



***Helicobacter pylori* TEDAVİSİNİN MİKROBİYOTA ÜZERİNE ETKİSİ**

Serap SÜZÜK

**DOKTORA TEZİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

KASIM 2015

Serap SÜZÜK tarafından hazırlanan “*Helicobacter pylori* Tedavisinin Mikrobiyota Üzerine Etkisi” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ / OY ÇOKLUĞU ile Gazi Üniversitesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalında DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman (Başkan): Prof. Dr. Meltem YALINAY

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum

Üye : Prof. Dr. Tarkan KARAKAN

Gastroenteroloji Bilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum

Üye : Prof. Dr. Kayhan ÇAĞLAR

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum

Üye : Prof. Dr. Yakut AKYÖN YILMAZ

Tıbbi Mikrobiyoloji ABD, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum

Üye : Prof. Dr. Sibel ERGÜVEN

Tıbbi Mikrobiyoloji ABD, Hacettepe Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum

Tez Savunma Tarihi: 05/11/2015

Jüri tarafından kabul edilen bu tezin Doktora Tezi olması için gerekli şartları yerine getirdiğini onaylıyorum.

Doç. Dr. Ufuk KOCA ÇALIŞKAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

(İmza)

Serap Süzük

05/11/2015

Helicobacter pylori TEDAVİSİNİN MİKROBİYOTA ÜZERİNE ETKİSİ

(Doktora Tezi)

Serap SÜZÜK

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Kasım 2015

ÖZET

Bağırsak florasının, insan sağlığı ve çeşitli hastalıkların patogenezi üzerindeki önemi ve etkisi insan mikrobiyom projesinin de gündeme gelmesiyle daha da önem kazanmıştır. Bağırsak mikrobiyotası hem mikroorganizma sayısı hem de türleri bakımından bireysel farklılıklar gösteren dinamik bir sistemdir. Diyet alışkanlıkları, yaşam tarzı, yaş, konağın genetik yatkınlıkları ve antibiyotik kullanımı da barsak florasını etkilemektedir. Bu çalışmanın amacı *Helicobacter pylori* (HP)'si pozitif olan ve tetrasiklin ile metronidazol antibiyotik tedavisi alan hastalarda, antibiyotik kullanım öncesi ve sonrası bağırsak mikrobiyotasının önemli bakteri türleri olan *Bifidobacterium spp*, *Bacteroides fragilis*, *Lactobacillus spp*, *Akkermansia mucinophilia* ve *Fecalobacterium prausnitzii* bakımından kantitatif karşılaştırmasını yapmak ve antibiyotik kullanımının mikrobiyota değişimi üzerine etkisini belirlemektir. Çalışmaya Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Gastroenteroloji kliniğine başvuran ve HP pozitif tanısı alan 39 hasta dahil edildi. Hastaların 39'u antibiyotik öncesi gaita örneği vermesine rağmen ancak 18 hasta antibiyotik sonrası gaita örneği verdi. Çalışmada hastalardan alınan 200 mg gaita örneği değerlendirmeye alındı. Gaitada fazla miktarda DNA izolasyon inhibitörlerinin varlığından dolayı DNA izolasyon işlemi için, özel gaitadan ekstraksiyon kiti kullanıldı (QIAmp DNA Stool Mini Kit, QIAgen, Almanya). Hedef bölge amplifikasyonu için çalışmada yer alan bakterilerin 16S rRNA bölgesine spesifik primerler kullanıldı. Kantitasyon işleminin optimizasyonu ve primerlerin özgüllüğünün doğrulanması için ilgili bakterilerin ATCC suşları ile değerlendirme yapıldı. Ekstraksiyon örneklerinde bakterilerin hem HP pozitif hem de sağlıklı gönüllülerden alınan gaita örneklerinden yapılan ekstraksiyon işlemi sonrası tüm bakterilerin gerçek zamanlı PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) yöntemi ile kantitasyon işlemi Rotor-Gene® 6000 cihazında (Qiagen, Almanya) yapıldı. HP tedavisi alan hastalarda antibiyotik kullanım öncesi ve sonrası yapılan kantitasyon sonucunda *Bifidobacterium spp* (p=0,000), *Bacteroides fragilis* (p=0,000), *Lactobacillus spp* (p=0,000), *A. mucinophilia* (p=0,000) ve *F. prausnitzii* için istatistiksel olarak anlamlı düşüş gözlemlendi. Elde edilen veriler doğrultusunda HP tedavisinde kullanılan tetrasiklin ve metronidazolün mikrobiyotada disbiyozise neden olabilecek bir zemin oluşturabileceğini söylemek mümkündür.

Bilim Kodu : 1039.3

Anahtar Kelimeler :Bağırsak mikrobiyotası, Gerçek zamanlı PZR, *Helicobacter pylori*
Antibiyotik tedavisi

Sayfa Adedi 128

Danışman :Prof. Dr. Meltem Yalınay

THE EFFECTS OF *Helicobacter pylori* TREATMENT ON MICROBIOTA

(Ph. D. Thesis)

Serap SÜZÜK

GAZI UNIVERSITY

INSTITUTE OF HEALTH SCIENCES

November 2015

ABSTRACT

The importance and effect of the intestinal flora on human health and pathogenesis of various diseases have been gained even more importance with the human microbiome project coming into the agenda. The intestinal microbiota is a dynamic system showing individual differences in both the number and species of microorganisms. Dietary habits, lifestyle, age, genetic predisposition of the host and use of antibiotics also affect the intestinal flora. The aim of this study is to carry out a quantitative comparison as regards the *Bifidobacterium spp*, *Bacteriodes fragilis*, *Lactobacillus spp*, *Akkermansia mucinophilia* and *Fecalobacterium prausnitzii*, which are the important bacterial species of the intestinal microbiota before and after antibiotic therapy with tetracycline and metronidazole in patients who are positive for *Helicobacter pylori* (HP) and to determine the effects of antibiotic use on the microbiota. 39 patients who applied to the Gastroenterology Clinic of Gazi University Medical Faculty and were diagnosed as HP-positive were included in this study. While 39 of the patients did not give stool sample before antibiotic therapy, 18 patients gave stool sample after antibiotic therapy. The stool samples of 200 mg in weight were collected from the patients who were included in the evaluation. A special extraction kit (QIAmp DNA Stool Mini Kit, QIAgen, GERMANY) was used for DNA isolation procedure because of the presence of DNA isolation inhibitors in large amount in stool. Primers specific for the 16S rRNA region of the bacteria included in the study were used for the amplification of the target region. ATCC strains of the related bacteria were evaluated for optimization of the quantification procedure and verification of the specificity of primers. Following the extraction of bacteria on the stool samples collected from both HP-positive patients and healthy volunteers, all the bacteria were subjected to real-time quantification procedure with PCR (Polymerase Chain reaction) method on Rotor-Gene® 20 device (Qiagen, Germany). As a result of the quantification before and after antibiotic use in patients receiving HP treatment, statistically significant decreases were observed in *Bifidobacterium spp* (p=0,000), *Bacteriodes fragilis* (p=0,000), *Lactobacillus spp* (p=0,000), *A. mucinophilia* (p=0,000) and *F. prausnitzii*. Based on the data obtained, it can be said that tetracycline and metronidazole used to treat HP can prepare the ground that could result in dysbiosis in microbiota.

Science Code : 1039.3

Key Words : Gut microbiota, real time PCR, *Helicobacter pylori*,
treatment of antibiotic

Page Number : 128

Advisor : Prof. Dr. Meltem Yalınay

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim ve tez sürecinde bilgi, tecrübe ve emeğini esirgemeyip eğitimime sonsuz katkısı olan danışmanım sayın “Prof. Dr. Meltem YALINAY”a, doktora eğitimim sürecinde bilgilerini benimle paylaşan tüm Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerine, tez çalışmamdaki katkılarından dolayı “Prof. Dr. Tarkan KARAKAN”a, tez sürecinde kurumsal olarak destek sağlayan “Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanı “Doç Dr. Selçuk KILIÇ”a, tezimin örneklerinin toplanmasında katkı sağlayan “Uzm. Dr. Sıdika Zeynep GÖK SARGIN”a, tez aşamasında tecrübelerini benimle paylaşan “Prof. Dr. Barış OTLU” ve “Ceren ÖZKUL”a ve her zaman yanımda olan aileme sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	x
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiii
 1. GİRİŞ.....	 1
2. GENEL BİLGİLER.....	5
2.1. Mikrobiyota.....	6
2.1.1. Doğumla mikrobiyatanın oluşumu	6
2.2. Mikrobiyotaya etki eden faktörler.....	8
2.2.1. Konak genetiği.....	8
2.2.2. Coğrafik özellikler	8
2.2.3. Yaşlanma	8
2.2.4. Diyet.....	9
2.2.5. Antibiyotik kullanımı.....	9
2.2.6. Pre ve probiyotik kullanımı	10
2.3. Sağlıklı bireylerde mikrobiyotanın fonksiyonu.....	11
2.3.1. İmmünolojik fonksiyon.....	11
2.3.2. Koruma fonksiyonu	12
2.3.3. Gastrointestinal sistemin yapısı ve görevlerine etkisi.....	12
2.3.4. GİS dışındaki etkileri	13
2.3.5. Beslenme ve metabolizma	15
2.4. Mikrobiyotanın hastalıklarla olan ilişkisi.....	16
2.4.1. Gastrointestinal sistem hastalıkları ile mikrobiyota ilişkisi	16
2.5. <i>Helicobacter pylori</i> ve bağırsak mikrobiyotası	22
2.6. Antibiyotik kullanımının mikrobiyota üzerine etkisi	24

	Sayfa
2.7. Mikrobiyota bileşimi	27
2.7.1. Filum Firmicutes	29
2.7.2. Filum Bacteroidetes	34
2.7.3. Filum Actinobacteria	34
2.7.4. Filum Proteobacteria	35
2.7.5. Filum Verrumicrobia	35
2.7.6. Filum Fusobacteria	36
2.7.7. Filum Euryarchaeota	36
2.8. Mikrobiyota analiz yöntemleri	36
2.8.1. Mikroskobi	36
2.8.2. Kültür	37
2.8.3. Moleküler Yöntemler	37
2.9. Kantitatif gerçek zamanlı PZR (qPZR)	47
2.9.1. q PZR'nin aşamaları	47
2.9.2. qPZR'de eşik değerin hesaplanması ve standart eğrinin çizilmesi	48
2.9.3. qPZR'da kullanılan problemler	49
3. MATERYAL METOT	53
3.1. Etik kurul onayı	53
3.2. Hastaların seçimi	53
3.3. Örneklerin toplanması	54
3.4. Standart bakteri kültürleri	55
3.4.1. <i>Bifidobacterium breve</i> ATCC 15700	55
3.4.2. <i>Bacteroides fragilis</i> ATCC 252855	55
3.4.3. <i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356	55
3.4.4. <i>Akkermansia muciniphila</i> ATCC BAA-835	55
3.4.5. <i>Faecalibacterium prausnitzii</i> ATCC 27766	56
3.5. q PZR analizleri ve eksternal standartların hazırlanması	57
3.6. Gaita örneklerinden DNA ekstraksiyonu	59
3.7. qPZR metodu	60
3.8. Melting curve (erime eğrisi) analizi	61
3.9. İstatistiksel analiz	61
4. BULGULAR	63

	Sayfa
4.1. Çalışmaya katılanlara ait demografik bilgiler	63
4.2. Kantitasyon sonuçları	64
4.2.1. <i>Bifidobacterium spp</i> qPZR sonuçları	66
4.2.2. <i>B. fragilis</i> qPZR sonuçları	68
4.2.3. <i>Lactobacillus spp</i> qPZR sonuçları	69
4.2.4. <i>A. mucinophilia</i> qPZR sonuçları	70
4.2.5. <i>F. prausnitzii</i> qPZR sonuçları	72
4.3. Antibiyotiğin mikrobiyotaya etkisi	73
5. TARTIŞMA	77
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	87
KAYNAKLAR	91
EKLER	111
EK-1	113
ÖZGEÇMİŞ	117

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Bazı hastalıkların mikrobiyota türleri ile olan ilişkisi	21
Çizelge 2.2. Kültür bağımlı olmayan yöntemlerin avantaj ve dezavantajları	42
Çizelge 2.3. Sekans yöntemlerinin avantaj ve dezavantajları	45
Çizelge 3.1. Standart suşlara ait primerler, hedef bölge büyüklüğü ve PZR sıcaklığı ..	57
Çizelge 3.2. Kullanılan bakteri standartlarının kopya sayıları	58
Çizelge 3.3. Gerçek zamanlı PZR amplifikasyon koşulları	61
Çizelge 4.1. Gönüllülerin beden kitle indeksi sınıflamasına göre dağılımları	64
Çizelge 4.2. Antibiyotik kullanım öncesi ve sonrası pPZR sonuçları	65
Çizelge 4.3. Bakterilerin qPZR sonuçlarının ortalaması ve standart sapması	66

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Bağırsak mikrobiyotasının bölgesel dağılımı	5
Şekil 2.2. Bağırsak mikrobiyotasının değişimi	7
Şekil 2.3. Mikrobiyota içeriğinin yaşa göre değişimi	9
Şekil 2.4. Mikrobiyotaya etki eden iç ve dış faktörler	10
Şekil 2.5. Beyin-bağırsak-mikrobiyota aksisi	14
Şekil 2.6. Sindirilemeyen polisakkaritlerden oluşan son ürünler	15
Şekil 2.7. Mikrobiyotanın konak metabolizması üzerindeki etkisi	18
Şekil 2.8. Yüksek yağlı diyet ve <i>A. muciniphila</i> 'nın bağırsak ekosistemine etkisi	19
Şekil 2.9. <i>Helicobacter pylori</i> 'nin virülans faktörleri	23
Şekil 2.10. Antibiyotik kullanımının mikrobiyota üzerine etkisi	25
Şekil 2.11. Antibiyotik alımının mikrobiyota üzerine farklı etkileri	27
Şekil 2.12. Bağırsak mikrobiyotasının taksonomik sınıflandırması	29
Şekil 2.13. Filum Firmucutes'in taksonomik sınıflandırması	30
Şekil 2.14. Analiz yöntemlerinin bakteri tanımlama düzeylerinin karşılaştırması	45
Şekil 2.15. Mikrobiyota analizinde biyoinformatik analizler	46
Şekil 2.16. Gerçek zamanlı PZR fazları	48
Şekil 3.1. Hasta bilgi formu	54
Şekil 3.2. Erime eğrisi analizi programı	61
Şekil 4.1. Antibiyotik kullanım öncesi gaita örneklerinde bakteri dağılımı	66
Şekil 4.2. <i>B. breve</i> ATCC 15700 suşu ile hazırlanan standart eğri	67
Şekil 4.3. <i>Bifidobacterium spp</i> gerçek zamanlı PZR sonucu	67
Şekil 4.4. <i>Bifidobacterium spp</i> erime eğrisi analizi grafiği	68
Şekil 4.5. <i>B. fragilis</i> ATCC 252855 suşu ile hazırlanan standart eğri	69

Şekil	Sayfa
Şekil 4.6. <i>B. fragilis</i> grup erime eğrisi analizi grafiği	69
Şekil 4.7. <i>L. acidophilus</i> ATCC 4356 suşuna ait standart eğri	70
Şekil 4.8. <i>Lactobacillus spp</i> 'ye ait qPZR sonucu	70
Şekil 4.9. <i>A. muciniphila</i> ATCC BAA-835 suşuna ait standart eğri.....	71
Şekil 4.10. <i>A. mucinophila</i> 'ya ait qPZR sonuçları.....	72
Şekil 4.11. <i>A. mucinophila</i> 'ya ait erime eğrisi grafiği	72
Şekil 4.12. <i>F. praustnitzii</i> ATCC 27766 suşu ile hazırlanan standart eğri	73
Şekil 4.13. <i>F. praustnitzii</i> 'ye ait erime eğrisi grafiği	73
Şekil 4.14. <i>Bifidobacterium spp</i> 'nin antibiyotik kullanım öncesi ve sonrası dağılımı ...	74
Şekil 4.15. <i>B. fragilis</i> 'in antibiyotik kullanım öncesi ve sonrası dağılımı.....	74
Şekil 4.16. <i>Lactobacillus spp</i> 'nin antibiyotik kullanım öncesi ve sonrası dağılımı	75
Şekil 4.17. <i>A. mucinophila</i> 'nın antibiyotik kullanım öncesi ve sonrası dağılımı	75
Şekil 4.18. <i>F. praustnitzii</i> 'nin antibiyotik kullanım öncesi ve sonrası dağılımı	76

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler

Açıklamalar

°C	Santigrat derece
CO ₂	Karbon dioksit
ddH ₂ O	Çift distile su
ddNTP	Dideoksi nükleotid trifosfat
dL	Desilitre
g	Gram
H ₂ O	Su
L	Litre
mL	Mililitre
MnSO ₄ .H ₂ O	Manganaz sülfat monohidrat
pH	Hidrojen gücü
uU	İnternasyonal ünite
µL	Mikro litre

Kısaltmalar

Açıklamalar

ATCC	Amerikan tipi standart kültür koleksiyonu
ATP	Adenozin trifosfat
BHI	Brain Heart Infusion
BKİ	Beden kitle indeksi
CagA	Sitotoksin ile ilişkili gen A
Cp	Crossing point, Kesişme noktası
Ct	Treshold cycle, eşik döngü
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
Fiaf	Adipöz faktör
GLP	Glukagon benzeri peptid

Kısaltmalar**Açıklamalar****HOMO-IR**

İnsülin direnci

HP*Helicobacter pylori***Ig**

İmmünglobulin

IL

İnterlökin

KZYA

Kısa zincirli yağ asidi

LPL

Lipoprotein lipaz

MRS

Man Ragoza Sharpe

PBS

Potasyum fosfat tamponu

PPi

Polimeraz pirofosfat

PPI

Proton pompa inhibitörü

PZR

Polimeraz zincir reaksiyonu

qPZR

Gerçek zamanlı PZR

rDNA

Ribozomal DNA

RNA

Ribo Nükleik Asit

rRNA

Ribozomal RNA

TLR

Toll like reseptör

VacA

Vakuol yapıcı sitotoksi

1. GİRİŞ

İnsan mikrobiyom projesi ile bağırsak mikrobiyota çalışmalarından elde edilen veriler bağırsak mikrobiyotasının hem insan sağlığında hem de bir çok hastalığın gelişmesinde etkili bir organ olduğu ortaya konmuştur. Yapılan çalışmalar özellikle insan bağırsağında yaklaşık 10-100 trilyon mikroorganizmanın varlığını göstermektedir. Bu büyük mikroorganizma topluluğunda ise yaklaşık 500-1000 kadar farklı türün barındırıldığı bilinmektedir. Hem sayısal olarak hem de çeşitlilik olarak mikrobiyota, bireysel farklılıklar göstermekte olup kişinin diyet alışkanlıkları, yaşam tarzı, yaşı, genetik özellikleri ile antibiyotik, prebiyotik ve probiyotik kullanıp kulanması ile değişime uğrayabilen dinamik bir yapıdır. İşte bu değişim, mikrobiyotanın var olan iç dengesini bozarak birçok ciddi metabolik ve inflamatuvar patolojiyide içeren olumsuz süreçlerin temelini oluşturmaktadır.

Mikrobiyota ile insan yaşamı arasında ki ilişki hep merak edilmiş ve araştırılmıştır. Ancak konvansiyonel yöntemler ile bu ilişkinin ortaya konması, yöntemden kaynaklanan birçok sınırlılıklardan dolayı kısıtlıdır. Ancak yüksek sekans teknolojisinin ortaya konması ile mikrobiyotanın içeriği, fonksiyonu ve insan yaşamı üzerinde ki etkileri daha net anlaşılmaya başlanmıştır. Bu yüksek teknolojik yöntemin kullanıldığı “İnsan Mikrobiyom Projesi” ile mikrobiyotanın yapısı, fonksiyonları ve etkileri üzerine önemli bilgiler sağlanmıştır. Bu projeden yaklaşık 2,3 terabyte büyüklüğünde metagenomik bir veri bankası elde edilmiştir. Bu projeden elde edilen veriler ile mikrobiyotanın insan yaşamındaki en önemli organı olduğu gerçeği ortaya konmuştur. Bu projenin en önemli çıktılarından biri, konvansiyonel yöntemlerin mikrobiyotanın değerlendirilmesi için çok yetersiz kaldığıdır. Yeni teknolojilerin kullanılmasıyla elde edilen verilerde önemli artış olmuştur. Özellikle birçok hastalık ile mikrobiyota arasında ki ilişkinin varlığını gösteren çalışmalar yayınlanmaya başlanmıştır. Birçok hastalıklığın patogenezinde, mikrobiyotanın yapısında meydana gelen değişimlerin neden olduğu birçok fizyolojik ve immünolojik süreç yer almaktadır. Antibiyotik kullanımının da bağırsak mikrobiyotasında uzun süreli ve önemli değişikliklere neden olduğu bilinmektedir. Bu değişim, birçok hastalığın ortaya çıkmasına zemin oluşturabilecek bir değişimdir. Burada bahsedilen değişim, mikrobiyotada yer alan filumların arasında ki orantısal değişimdir.

Helicobacter pylori (HP), hem ülkemizde hem de dünyada oldukça yaygın görülen bir enfeksiyondur ve tüm yaş gruplarında etkilidir. Bu bakterinin tedavisi zor olup tedavilerde

üçlü dördlü antibiyotik kombinasyonları önerilmektedir. Ayrıca tedavi süreci de oldukça uzundur. Biz bu çalışmada hem çok çeşitli hem de uzun süreli antibiyotik tedavisi alan HP hastalarında antibiyotik kullanımının mikrobiyota üzerindeki etkilerini ortaya koymayı amaçladık. Bu amaçla, değişimin boyutlarını bakteri filumları düzeyinde ortaya koyarak filumlar arası orantısal değişimi de göstermeyi hedefledik.

Antibiyotik kullanımı, mikrobiyotada ciddi bir disbiyozise neden olabilecek bir faktördür. Bireylerde oluşan disbiyozis ise diğer kişisel faktörlerinde etkisi ile birçok kronik hastalık için zemin oluşturabilecektir. Bu nedenle oluşan/oluşabilecek etkinin gösterilmesi gerekmektedir. Bizim çalışmamızdan elde edilen veriler, bu hastaların tedavi süreçlerinde disbiyozisin ortaya çıktığını göstermektedir.

Çalışmaya dahil olan gönüllülerin tümünde antibiyotik kullanım sonrası mikrobiyotada antibiyotik kullanım öncesine göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalmanın olduğu, ancak bu azalmanın kişiler bazında farklılıklar gösterdiği ortaya konmuştur. Bu farklılık, gönüllülerin yeme alışkanlıklarından ve/veya genetik özelliklerinden kaynaklanıyor olabilir. Ayrıca, bu tedavi protokollerine probiyotiklerin eklenmesi bu disbiyozisin gelişimini engelleyebilir.

Çalışmaya dahil olan gönüllülerin tamamına, aynı doz ve süreleri içeren antibiyotik tedavisini önerilmiştir. Bilindiği üzere antibiyotik tedavisinde doz ve süre kullanımı önemli olup gönüllülerin tümünün bu hassasiyete uyduğu kabul edilmiştir. Ayrıca, gönüllülerin tedavi sürecinde yeme alışkanlıkları göz ardı edilmiştir. Çalışmanın bir diğer sınırlılığı antibiyotik kullanım öncesi gaita örneği veren gönüllülerin hepsinin antibiyotik kullanım sonrası gaita örneğini vermemesidir. Ancak, toplanan gaita örneği sayısının ve elde edilen verilerin istatistiksel değerlendirme yapılmasına olanak sağlaması bu sınırlılıkların tümünün göz ardı edilebileceğini ortaya koymuştur.

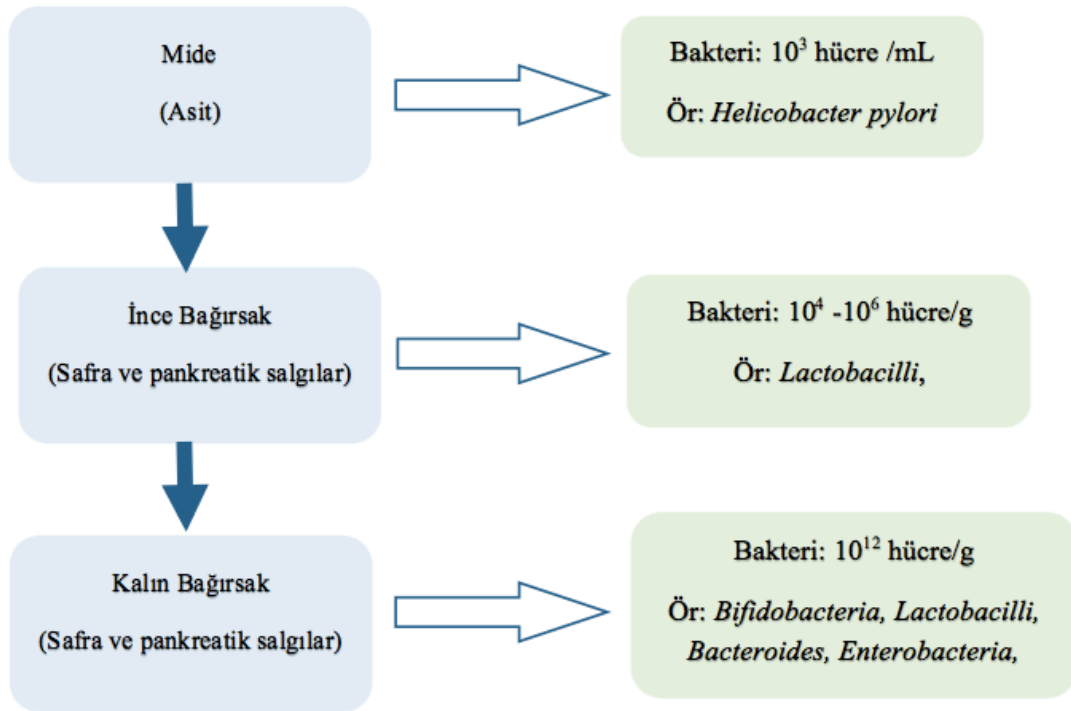
Tanımlar

Bu çalışmada mikrobiyota; insan bağırsağında yaşayan mikroorganizma topluluğunu, disbiyozis; bu mikrobiyotada meydana gelen denge bozukluklarını, antibiyotik; enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde kullanılan, mikroorganizmaların üremesini inhibe eden ya da onları tamamen öldüren ilaçları, probiyotik; sindirim sisteminde belirli sayıda bulunan ve tüketildiğinde bireyin bağırsaklarındaki bakterilerin sayıca dengesini sağlayarak sindirim sistemi ve bağırsak sağlığını koruyan canlı mikroorganizmalar ve/veya bileşenlerini

bulunduran ve raf ömrü sonuna kadar bu canlılığı muhafaza eden ürünleri, prebiyotikler; bağırsaklarda yaşayan yararlı bakterilerin hem sayısını hem aktivitesini hem de probiyotiklerin etkisini arttıran sindirilmeyen bileşenleri, gönüllü; bu çalışmaya kendi rızası ile katılmayı kabul eden kişiyi, gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu; klinik örnekte mevcut olan mikroorganizmanın nükleik asit amplifikasyonu ile eş zamanlı olarak artış gösteren floresan sinyalinin ölçülmesi ile kantitatif sonuç alınabilen polimeraz zincir reaksiyonunu tanımlar.

2. GENEL BİLGİLER

İnsan bağırsak mukozası, bünyesinde yaklaşık olarak 10^{14} kadar bakteri ile kolonize olmuş epitel, lamina propria ve muskularis mukoza tabasından oluşmaktadır. Bağırsaktaki bu bakteri sayısı, insan vücudundaki hücrelerin sayısından on kat daha fazladır [1]. Normal flora olarak adlandırdığımız bu bakteri topluluğu, “İnsan Mikrobiyom Projesi” ile birlikte mikrobiyota olarak tanımlanmıştır [2]. Doğumdan çok kısa bir süre içinde gelişmeye başlayan mikrobiyota yaklaşık olarak 1000 kadar türü bünyesinde barındırmaktadır ve kişinin yaşı, diyet alışkanlıkları, yaşam tarzı, genetik yatkınlıkları, antibiyotik kullanımı gibi faktörler ile değişikliklere uğrayabilmektedir [3]. Ancak gastrointestinal sistemi bölümlerinin farklı fizyolojik ve kimyasal özelliklere sahip olmasından dolayı farklı bölgeler farklı bakteri profillerine sahiptir [3] (Şekil 2.1.).



Şekil 2.1. Bağırsak mikrobiyotasının bölgesel dağılımı

Mikrobiyota ile konak arasında kommensal bir yaşam söz konusudur. Mikrobiyota, elzem besinleri sağlar, K vitamini sentezler, selülozun sindirimini sağlar, anjiyogenesiz ile bağırsak-sinir fonksiyonlarının düzenlenmesine yardımcı olur. Ayrıca bağırsakta metanogenesiz, asetogenesiz, nitrat redüksiyonu ve sülfat redüksiyonu gibi redüksiyon reaksiyonlarını düzenlerler [2]. Patogen mikroorganizmalara karşı bariyer oluşturmak ve antijenlerin tanınmasını sağlamak gibi konularda da immün sisteme yardım etmektedirler.

Mikrobiyotanın yapısının herhangi bir nedenle değişmesi veya bozulmasına disbiyozis denir. Disbiyozis oluşumu, kişide ciddi metabolik ve inflamatuvar patolojilere yol açarak birçok hastalığın oluşmasına zemin hazırlamaktadır [4].

Mikrobiyota üyesi bakterilerin spesifik besin ihtiyaçlarından ve metabolik özelliklerinden dolayı birçoğunun kültür gibi konvansiyonel yöntemler ile tanımlanması zordur. Ancak günümüzde metagenomik analizler ve 16S ribozomal RNA (rRNA) sekans analizleri ile mikrobiyotanın genel dağılımı ve baskın türleri hakkında veri elde edilebilmektedir [5].

2.1. Mikrobiyota

2.1.1. Doğumla mikrobiyotanın oluşumu

İnsan bağırsak mikrobiyotası, doğumda sterildir. Maternal kolonizasyon, hamilelik süresi, doğum şekli, ilk enteral beslenme içeriği ve doğumla birlikte antibiyotik kullanımı gibi birçok faktör, yeni doğanın mikrobiyota yapısına etki edebilmektedir [6]. Doğumda, annenin vajinal, bağırsak ve deri florasından etkilenen mikrobiyota yaklaşık birinci hafta sonunda, *Staphylococci* ve *Enterococci* gibi aerobik ve fakültatif anaerob bakterilerin hakimiyetindedir. Bakterilerin oksijen tüketimine bağlı olarak bağırsak redoks potansiyeli düşerek anaerob bir çevre oluşur. Bu anaerob ortamda ise *Bifidobacteria*, *Bacteroides* ve *Clostridia* grubu bakteriler hakim olmaya başlar [7]. *Bifidobacteria*'nın floraya hakimiyeti, sezaryen ile doğan bebeklerde, vajinal doğum ile doğan bebeklere göre yaklaşık on gün daha geç gerçekleşir [6]. Ayrıca, mama ile beslenen bebeklerde *Bifidobacteria* anne sütü ile beslenen bebeklere göre sayıca daha azdır. Hamilelik süresi kısa olan prematüre bebeklerde ise *Bifidobacteria* hem sayıca çok düşüktür hem de flora hakimiyeti çok geç gerçekleşmektedir [7].

Bu kişiye bağlı faktörler dışında sosyo-ekonomik koşullar, dini inançlar, bölgesel alışkanlıklar, coğrafi faktörlerde mikrobiyota değişimi üzerinde etkilidir [8].

Yeni doğan mikrobiyotasının, değişim süreci iki yaşına kadar devam etmekte ve iki yaşında, çeşitlilik ve sayı olarak bir yetişkin mikrobiyotasına benzer yapı kazanmaktadır. Oluşan mikrobiyota bireysel bir özellik gösterir ve parmak izi gibi bireysel farklılığını kişinin tüm yaşamı boyunca korur [9].

Bağırsak ekosistemi; bağırsağın anatomik yapısına bağlı olarak değişiklikler göstermektedir. İnce bağırsağın mideye yakın olmasından ve pH değişimlerinden daha fazla etkilenmesinden dolayı, kalın bağırsağa göre nispeten daha az tür ve sayıda bakteriye

2.2. Mikrobiyotaya etki eden faktörler

2.2.1. Konak genetiği

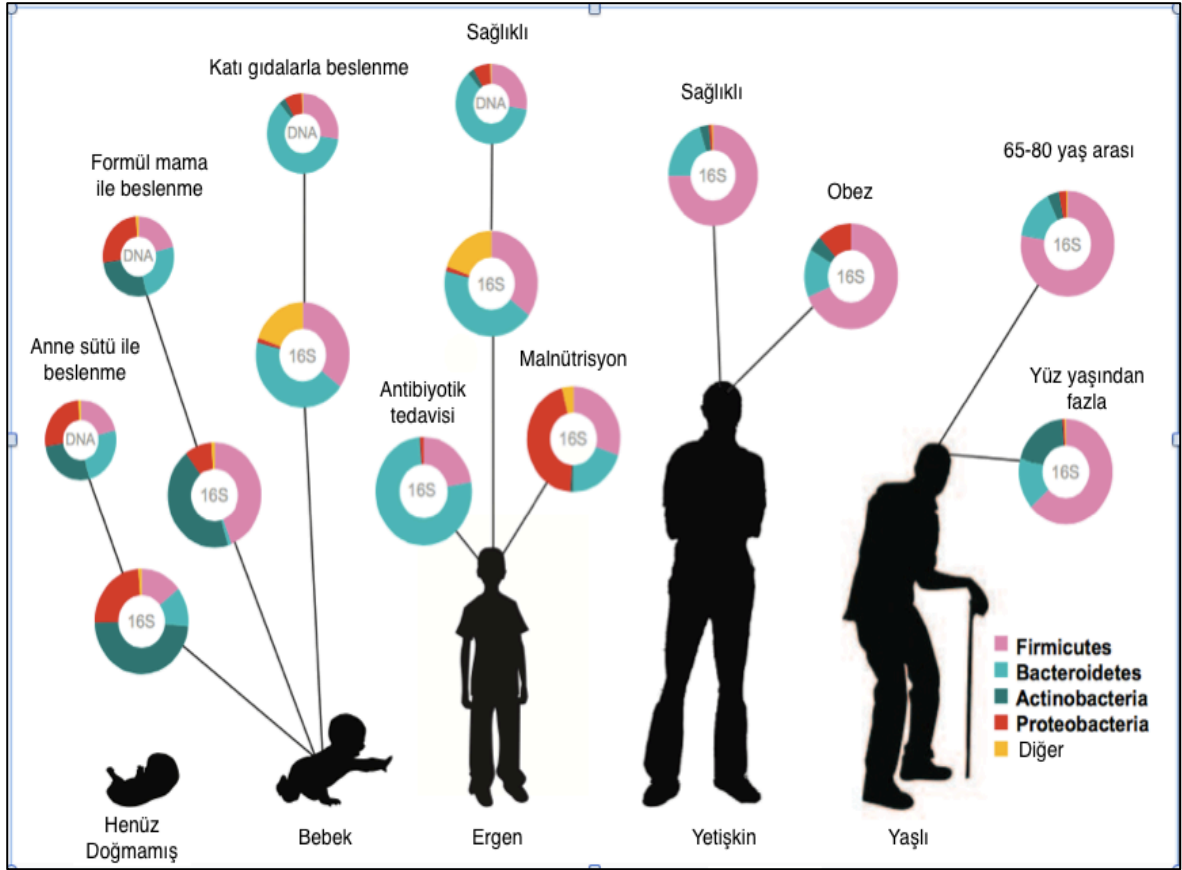
İkizler üzerinde yapılan çalışmalar, tek yumurta ikizlerinde çift yumurta ikizlerine göre mikrobiyotanın daha yüksek benzerliğe sahip oluğu gösterilmiştir [12]. Ayrıca üç kuşak fare deneylerinde de kuşaklar arası mikrobiyota benzerliğinin yüksek olduğunu ancak diğer fareler ile farklılıklar olabildiği ortaya konmuştur. Bu çalışmalardan elde edilen bilgiler, mikrobiyotanın genetik özellikler ile yakından ilişkili olduğunu gösteren önemli kanıtlardır [13].

2.2.2. Coğrafik özellikler

Farklı coğrafik bölgelerden yapılan çalışmalar aynı yaş gruplarında mikrobiyotanın yapısında farklılıklar olduğunu göstermiştir. Bu durumun nedeni olarak kişilerin yaşadığı bölgelerin iklim özellikleri, yeme alışkanlıkları, dini yaşam şekilleri, bölgesel özelliklerinden kaynaklanabileceği belirtilmektedir [14].

2.2.3. Yaşlanma

Yaşlanmayla bağırsak hareketlerinde azalma, gastrik asit salgısında azalma gibi fizyolojik olaylar ortaya çıkmaktadır. Bu değişiklikler bağırsak mikrobiyotasının gençlere göre yaşlılarda farklılık göstermesine neden olabilmektedir. Yaşlı insanlarda *Bifidobacteria* grubu bakterilerde hem sayıca hem de tür bakımından azalma görülürken aynı zamanda kısa zincirli yağ asitlerinin üretiminde de azalma görülür. Buna karşın, *Clostridia*, *Eubacteria* ve *Fusobacteria* gruplarında artış görülmektedir [15]. Şekil 2.3'de yaş ile mikrobiyota değişimi gösterilmiştir.



Şekil 2.3. Mikrobiyota içeriğinin yaşa göre değişimi [15]

2.2.4. Diyet

Mikrobiyota ile diyet arasındaki ilişkiyi göstermek için yapılan çalışmalar oldukça fazladır. Özellikle yaşamın ilk yıllarında ki yeme alışkanlıkları mikrobiyotanın şekillenmesine oldukça fazla katkı yapmaktadır. Anne sütü ile beslenme mikrobiyotada daha çok yararlı bakterilerin baskın hale gelmesini sağlamaktadır [16]. Diyet ince bağırsak florası üzerinde daha fazla etkiye sahiptir. Çünkü ince bağırsak kolona göre daha çeşitli substrat kaynağına sahiptir. Buna karşın diyetin aslında mikrobiyotanın tüm bağırsak bölümlerinde etkili olduğunu ortaya koyan çalışmalar bulunmaktadır. Örneğin bir yıl boyunca düşük kalorili diyetlerle beslenen obez kişilerin mikrobiyotasında diyet öncesine göre *Bacteroides* grubu bakterilerinde artış, *Firmicutes* grubu bakterilerde düşüş gözlenmektedir [16].

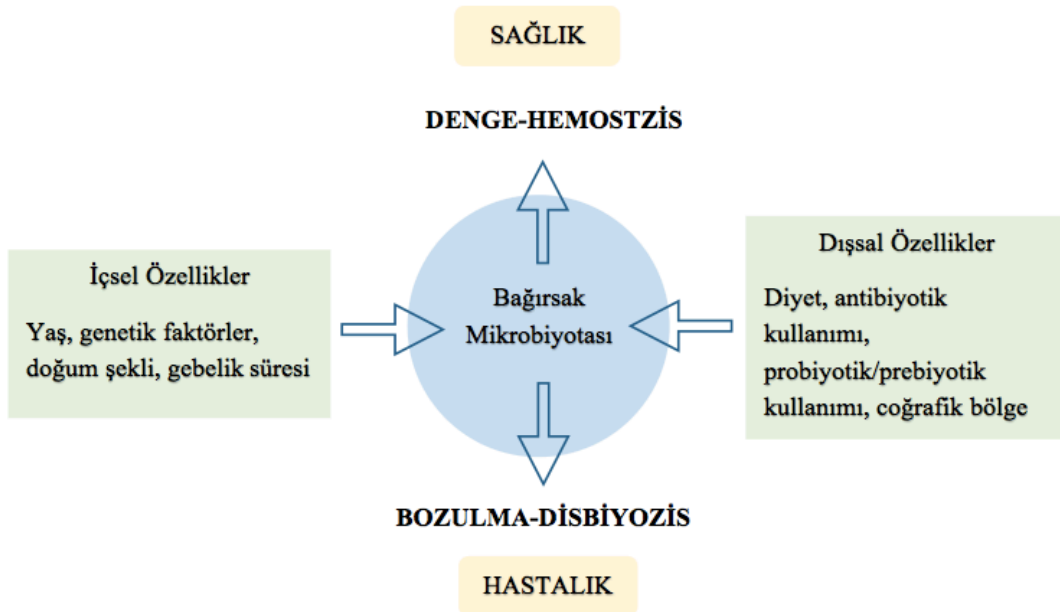
2.2.5. Antibiyotik kullanımı

Mikrobiyotayı etkileyen en güçlü faktörün antibiyotikler olduğu bilinmektedir. Yedi günlük klindamisin tedavisinden sonra *Bacterioides* türlerinin mikrobiyotada antibiyotik kullanımı öncesi dağılımı ve sayısına ulaşması için 2 yıllık bir sürenin geçmesi gerekmektedir [17].

2.2.6. Pre ve probiyotik kullanımı

Fermente yiyeceklerin insan sağlığı üzerine etkisi uzun zamandır bilinmektedir. Özellikle bu tip gıdalar florada *Bifidobacteria* ve *Lactobacillus* grubu bakterilerin hem sayıca artışına hem de çeşitliliğine neden olmaktadır. Probiyotikler insan sağlığı için yararlı canlı bakterilerlerdir [18]. *Bifidobacteria* ve özellikle *Lactobacillus* probiyotik ajanlarda sıklıkla tercih edilen bakterilerdir. Ayrıca mikrobiyotadaki mevcut yararlı bakterilerin metabolizmasını destekleyen ve bu yararlı bakterilerin çoğalmasını uyaran inülin ve fruktooligosakkarit gibi maddeleri içeren besinlere de prebiyotik denir [19]. Prebiyotik ve probiyotiklerin alınmasının; alerji, inflamatuvar bağırsak hastalığı, irritabl bağırsak sendromu ve enterit gibi bazı klinik durumlar için koruyucu özellik taşıdığı belirtilmektedir [11].

Mikrobiyota yapısında hemostasisin sağlanması kişinin sağlıklı olmasına etki ederken disbiyozisin oluşumu ise birçok hastalık için zemin oluşturmaktadır. Şekil 2.4’de mikrobiyotaya etki eden iç ve dış faktörler ile mikrobiyotanın gösterdiği tepki özetlenmiştir.



Şekil 2.4. Mikrobiyotaya etki eden iç ve dış faktörler

2.3. Sağlıklı bireylerde mikrobiyotanın fonksiyonu

2.3.1. İmmünolojik fonksiyon

Bağırsak mikrobiyotasının hem bağırsağın mukozal immünitesinde hem de sistemik immünitede önemli olduğu, bağırsak florasından yoksun steril hayvan deneylerinde gösterilmiştir. Bu hayvanlar, anormal sayıda ve çeşitte immün sistem hücrelerine sahiptirler. Ayrıca hem lokal hem de sistemik lenfoid doku yapılarında da anormallikler mevcut olup Peyer plakları hipoplastik iken olgun lenfoid folikül sayıları da düşüktür. Tüm bu olaylara bağlı olarak immünglobulin (Ig)A üreten plazma hücrelerinin de hem sayısı azdır hem de immünglobulin (hem IgA hem de IgG) salgıları düşüktür. Bu hayvanlarda, sitokin seviyesi ve sitokin profili de düzensizlikler gösterir [11]. Bu hayvanlarda beklenildiği gibi CD4+ T hücre yoksunluğu da gözlenmektedir. Tedavi amaçlı bu hayvanlara *Bacteroides fragilis* verilmesi ise tüm bu olumsuz tablonun tamamen yok olmasını sağlar [20]. Oral yolla verilen tedavi sonrası, CD4+ T hücrelerinin proliferasyonu sağlanmakta ve lenfosit içeren dalağın beyaz pulpası gelişmektedir. Bağırsak mikrobiyotası hem lokal hem de sistemik olarak konak immün sisteminin olgunlaşmasında; moleküler, hücresel ve organ seviyesinde katkı sağlamaktadır [11].

Bağırsak anatomik yapısı gereği oldukça geniş bir yüzeye sahip olup dış ortam ile daha geniş bir alanda temas halindedir. Mikrobiyota üyeleri bağırsak epitel hücrelerinin Toll-Like reseptör (TLR) ve NOD Like reseptör (NLR) gibi patern tanıma reseptörlerini (pattern recognition receptors, PRP) uyarırken aynı zamanda immün hücrelerine antijen sunumu yapmaktadırlar [21]. Ayrıca mikrobiyotada bulunan Gram negatif bakterilerin peptidoglikan tabakası NLR aracılığıyla lenf foliküllerinin olgunlaşmasını sağlar. Olgunlaşan lenf folikülleri ise TLR aracılığıyla mikrobiyotayı tanımakta ve B hücre kümelenmesini sağlamaktadır [22].

Mikrobiyotada yer alan Gram negatif bakterilerin sahip oldukları lipopolisakkarit (LPS), IgA ile birlikte intestinal alkalen fosfataz üretimini arttırarak immün sistem gelişimine katkıda bulunurlar [23]. Bununla beraber *Bacterioides thetaiotaomicron* proinflamatuvar transkripsiyon etkinliği bulunan Nükleer Faktör Kapa B (NF κ B) inaktivasyonu ile hücresel immünite üzerinde etkilidirler [24].

İmmünglobulin A'nın maksimum seviyede indüklenmesinde bağırsak Dendritik hücreleri (DH)'nin aktivasyonu için ön koşul mikrobiyotanın varlığıdır [25]. Gram negatif bakterilerin Gram pozitiflere göre salgısal IgA üretiminde daha etkili olmalarına rağmen,

bağırsakta IgA yokluğu Gram pozitif bakterilerin aşırı üretimi ile ilişkilendirilmektedir. Aslında tüm bu süreçler, mikrobiyota elemanlarının da kendi aralarında bir rekabet halinde olduğunun göstergesidir [26].

2.3.2. Koruma fonksiyonu

Bağırsakta mikrobiyotanın fiziksel olarak bulunması, patojen bakterilerin kolonizasyonuna engel olur. Gram pozitif anaerop bakteriler, Gram negatif anaerop bakterilere göre patojen bakterilerin kolonizasyonunun engellenmesinde daha etkilidirler. Ayrıca mikrobiyota üyeleri antimikrobiyal madde sentezleyerek de patojen bakterilerin bağırsakta inhibisyonuna aracılık ederler. Özellikle *Lactobasillus* cinsi bakterilerin ürettikleri laktik asit konak tarafından salgılanan lizozimin etkisini arttırarak birlikte bakterilerin hücre duvarına zarar verirler [27].

Konak tarafından salgılanan antimikrobiyal peptidler mikrobiyotanın dengede kalmasını sağlarken, mikrobiyota elemanları da inaktif formda salgılanan antimikrobiyal peptidlerin aktivasyonunu sağlar. Ayrıca mikrobiyotanın metabolik ürünlerinden olan kısa zincirli yağ asitleri (KZYA) ve litokolik asit antimikrobiyal peptidlerin sentezini arttırırlar [28].

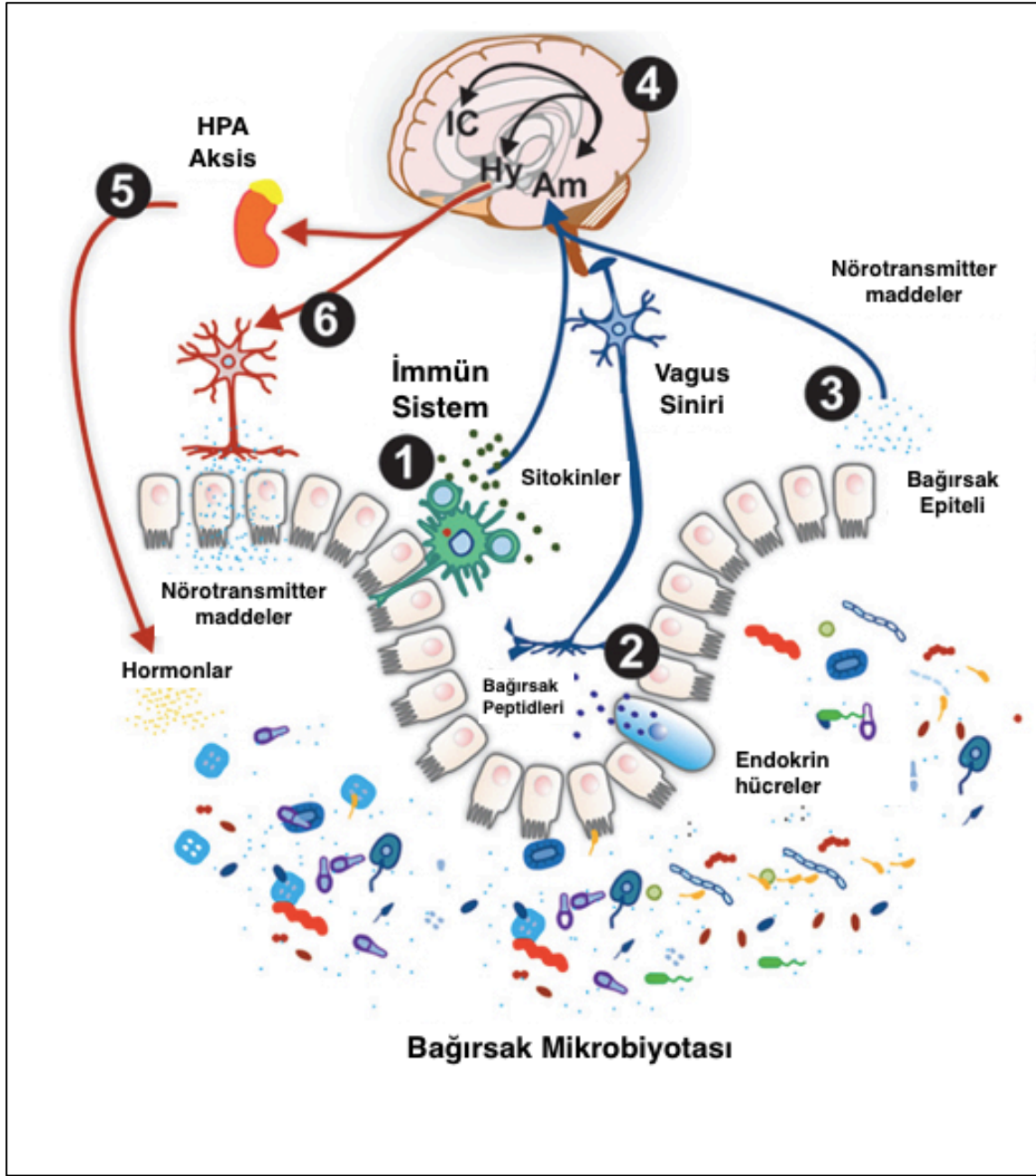
2.3.3. Gastrointestinal sistemin yapısı ve görevlerine etkisi

Doğumda henüz immatür olan gastrointestinal sistem (GİS), olgunlaşma için GİS'in yeterli peristaltik hareketleri sağlaması, yeterli yüzey alanına sahip olması ve beslenme için kan desteğinin sağlanması ve floranın yerleşmesi gerekmektedir [11]. Birçok mikrobiyota üyesi bakteriler, anjiyogenik aktiviteye sahip anjiyogenin 3 sentezini aktive ederek dokunun damarlanmasını sağlar [29]. Ayrıca doğumdan itibaren *B. thetaiotaomicron* kolonizasyonu ile enterik sinir sisteminin peristaltik hareketleri sağlamasına yardımcı olurlar. Mikrobiyotanın GİS boyunca kolonizasyonu, mukozal glikolizasyon için önemli bir faktördür ve bu durum epitel hücreleri için önemli bir besin kaynağıdır. Mikrobiyota epitel hücrelerine glukoz girişini destekleyerek intestinal epitelin beslenmesinde de rol alırlar [30].

Bağırsak mikrobiyotası aynı zamanda bağırsak içi homeostasisi sağlamaktadır. Hücre-hücre bağlantılarının devamlılığını sağlayarak ve epitelyal yaralanmaların tamirinde görev alarak epitel bütünlüğünün sağlanmasından sorumludurlar [11].

2.3.4. GİS dışındaki etkileri

Bağırsak mikrobiyotası sadece bağırsağın yapısı ve fonksiyonunda yer almayıp vücudun bir çok doku, organ, sistem ve ekstraintestinal işlevlerde etkinlikleri bildirilmektedir. Bağırsak mikrobiyotasından yoksun olan hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalardan elde edilen verilere göre; bu hayvanlarda kardiyovasküler sistem bozuklukları ve mezenterin damarlanmasında yetersizlik söz konusudur [11]. Ancak mikrobiyotanın en şaşırtıcı işlevi, endokrin sistem üzerindeki etkilerine bağlı olarak kişinin davranışları üzerine olan etkisidir. Stres sırasında hipotalamo-pitüiter aksdan salınan kortikotropin salıcı hormon ve adrenokortikotropik hormon yanıtını düzenleyerek vücudu stresin etkilerinden korur [11]. Son yıllarda yapılan çalışmalarda özellikle bağırsak mikrobiyotasının santral ve periferel sinir sisteminde ki işlevleri ortaya konmakta ve “beyin-bağırsak-mikrobiyota aksis”i terminolojisi kullanılmaktadır [31]. Bu yapı özellikle irritabl bağırsak hastalığı gibi GİS’in fonksiyonel hastalıklarının mekanizmasının açıklanmasında yardımcı olabilir ve bu mekanizma şematik olarak Şekil 2.5’de gösterilmiştir [31]. Davranışsal etki bakımından bir diğer önemli konu ise iştah kontrolüdür. Deney hayvanları ile yapılan çalışmalarda iştahı regüle eden hormona karşı vücut bir otoantikor sentezlemekte olup bu antikorun epitoplari ile mikrobiyota bakterileri arasında yüksek düzeyde homoloji varlığı mevcuttur. Bu durum, bağırsak mikrobiyotasının yeme bozuklukları ile ilişkisini de ortaya koymaktadır [32].



Şekil 2.5. Beyin-bağırsak-mikrobiyota aksisi. Afferent kol (mavi ok): (1) lenfositler bağırsak lümeninde yer almaktadır ve başlangıçta endokrin veya parakrin etkiye sahip sitokinler salınır, (2) Enteroendokrin hücrelerden salınan bağırsak peptidleri sinirleri aktive eder, (3) Mikrobiyota tarafından üretilen nörotransmitter veya onun öncüsü maddeler endokrin veya parakrin etkiye sahip bağırsak epiteline ulaşabilirler, (4) visseral entegratörlerin ana girişi olarak Amygdala (Am) ve Insular korteks (IC) içeren yeni bir nöral ağ. Hipotalamik (Hy) aktivasyonun sürekliliği efferent kolu başlatır (kırmızı ok): (5) Hipotalamik- pituitary-adrenal (HPA) aksisin aktivasyonu ile salınan kortikosteroidler bağırsak mikrobiyotasının içeriğini kontrol eder, (6) Nöronal efferent aktivasyonu anti inflamatuvar kolinerjik refleks ve/veya sempatik aktivasyon ile doğrudan bağırsak mikrobiyotası içeriğine etki edebilir [31]

2.3.5. Beslenme ve metabolizma

İnsan sindirim sistemi, bazı besinlerin sindirimi konusunda yetersiz kalabilmektedir. Mikrobiyotanın en önemli işlevlerinden biri de alınan gıdalardan enerji üretiminin sağlanmasıdır. Alınan ve insan sindirim sistemi tarafından sindirilemeyen polisakkaritler fermentasyon yolu ile mikrobiyota tarafından sindirilmekte ve son ürün olarak KZYA meydana getirilmektedir. Bu ürünler arasında sıklıkla, asetat, propiyonat, bütirat ve laktat bulunur [33]. Bu maddeleri üreten bakteri grupları Şekil 2.6'da yer almaktadır. Kısa zincirli yağ asitleri, sadece konak için enerji kaynağı olarak iş görmeyip aynı zamanda potansiyel toksik maddelerin birikimini de önlemektedirler [34].

Sindirilemeyen Polisakkaritler			
ASETAT	LAKTAT	BUTİRAT	PROPIYONAT
Bacteriodes	Bifidobacteria	Clostridia	Bacteriodes
Bifidobacteria	Bacteriodes	Eubacteria	Propionobacter
Eubacteria	Peptostreptococci	Fusobacteria	Veillonella
Lactobacilli	Lactobacilli	Peptostreptococci	
Clostridia	Eubacteria	Buytrivibrio	
Ruminicocci	Ruminicocci		
Peptostreptococci	Actinomyces		
Veillonella	Fusobacteria		
Fusbacter	Enterococci		
Buytrivibrio	Clostridia		

Şekil 2.6. Sindirilemeyen polisakkaritlerden oluşan son ürünler

Sindirilemeyen polisakkaritleri, bağırsak epiteli tarafından absorbe olabilecek monosakkaritlere parçalamasına neden olan bağırsak mikrobiyotası, aynı zamanda günlük diyetdeki lipidin alınması ve biriktirilmesine de aracılık eder. Mikrobiyota lipoprotein lipaz (LPL) inhibisyonunu baskılayarak adipoz dokuda LPL aktivitesini artırır. Bu özelliklerinden dolayı mikrobiyota konak enerji dengesinin sağlanmasında da önemli bir role sahiptir. Esansiyel aminoasitler ve vitaminlerin (K, B2, B1, folik asit, biotin ve pantothenik asit) sentezinden de sorumludurlar [35]. Bağırsak mikrobiyotasının bir diğer önemli işlevi, ksenobiyotik metazbolizması üzerinedir. Örneğin *Oxalobacter formigenes* türü diyetle alınan oksalatı parçalayıp üriner oksalat atılımının azalmasına katkıda bulunur [36].

2.4. Mikrobiyotanın hastalıklarla olan ilişkisi

Mikrobiyota vücutta, inflamasyon, immün sistem, beslenme, endokrin sistem, epitel matürasyonu ve bağırsak epitelizasyonunda ki işlevleri düşünüldüğünde birçok hastalığında ana kaynağı olması kaçınılmazdır. Mikrobiyotanın hastalıklarının patogenezinde rol almasının temelinde inflamasyon ile enfeksiyonların ve enfeksiyon sonrası olayların etkileri yatmaktadır [11]. Mikrobiyotanın çeşitli faktörler ile iç dengesi bozulabilir ve bu durumda mikrobiyota hem içerik hem de sayısal olarak bir değişime uğrar. Bu durum disbiyozis olarak adlandırılır. Günümüzde mikrobiyotadan kaynaklanan hastalıkların temelinde disbiyozisin var olduğu kabul edilmektedir.

2.4.1. Gastrointestinal sistem hastalıkları ile mikrobiyota ilişkisi

Inflamatuvar Bağırsak Hastalığı

Genetik yatkınlığın ve immün sistem sorunlarının neden olduğu düşünülen bu hastalıkta son yıllarda sağlıklı bireylere göre mikrobiyotanın yapısı, dağılımı ve sayısı oldukça farklı olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur. Mukozal biyopsi değerlendirmelerinde, özellikle bu kişilerde *Firmicutes* ve *Bacteroidetes* grubu bakteriler önemli ölçüde azalırken *Proteobacteria* ve *Actinobacteria* grubu bakteriler artmaktadır [37]. Ancak bu bakteri oranlarındaki değişimler ile hastalığın mekanizmasını açıklayabilmek yetersiz kalmaktadır. Bununla birlikte yapılan başka bir çalışmada *Firmicutes* grubu bakteriler ile birlikte bu grup hastalarda *Clostridium IX* ve *VI* gruplarında da azalma olduğu gösterilmiştir. Bu bakteriler bilindiği üzere özellikle kolonda KZYA üretimi, karbonhidrat fermentasyonunda ve bütirat üretiminde iş görürler. Özellikle bütirat miktarında azalma, epitel hücre olgunlaşmasını inhibe eder. Ayrıca bütirat azalmasıyla proinflamatuvar sitokinlerin salınımı artar. Tüm bunların dışında bütirat bağırsak mukozasında müsin sekresyon artışını ve antimikrobiyal peptid üretimini indüklemektedir. Bütirat miktarında azalma bağırsak mukozasında hasarlanmaya ve kronik inflamasyona neden olur ki bu durum hastalığın patogenezinin de ortaya koymaktadır [38].

Inflamatuvar bağırsak hastalığının patogenezinde rol alan başka bir genus ise *Desulfovibrinoales* ve *Desulfobacterales* gibi sülfatı indirgeyen bakterilerin sayıca artmasıdır. Bu bakteriler sülfatı indirgeyerek bağırsak lümenindeki epitel hücreleri için toksik olan hidrojen sülfid oluşumuna neden olurlar. Bu epitel hasarı da inflamasyona neden olur [39].

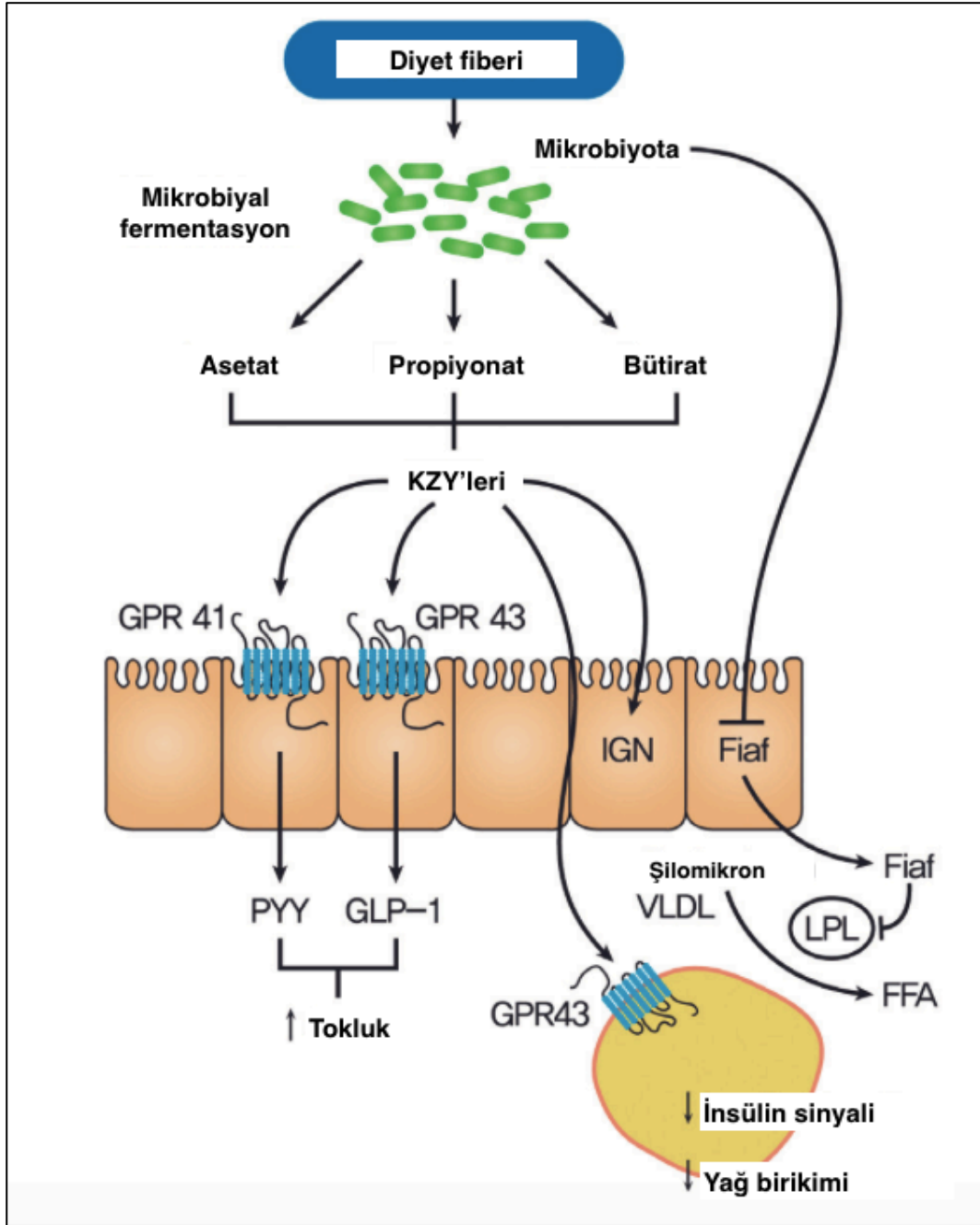
İrritabl bağırsak sendromu

İrritabl bağırsak sendromu, çok yaygın görülmekle birlikte hastalığın etiyopatogenez özellikleri tam olarak açıklanamamıştır. Yapılan çalışmalar hastalığın etiolojisinde; inflamasyon, kişinin psikososyal özellikleri, genetik özellikleri ve diyet alışkanlıklarının patogeneizde rol oynadığını göstermektedir. Mikrobiyota ile bu hastalığın arasındaki ilişkiyi göstermek için birçok çalışma yapılmasına rağmen çalışmalar net bir ilişkiyi gösterir nitelikte değildir. Sıklıkla hastalarda mikrobiyotada laktobasil ve bifidobakteri gruplarının azaldığı ve daha sıklıkla anaerobik gram negatif bakterilerin artış gösterdiği bildirilmektedir [40].

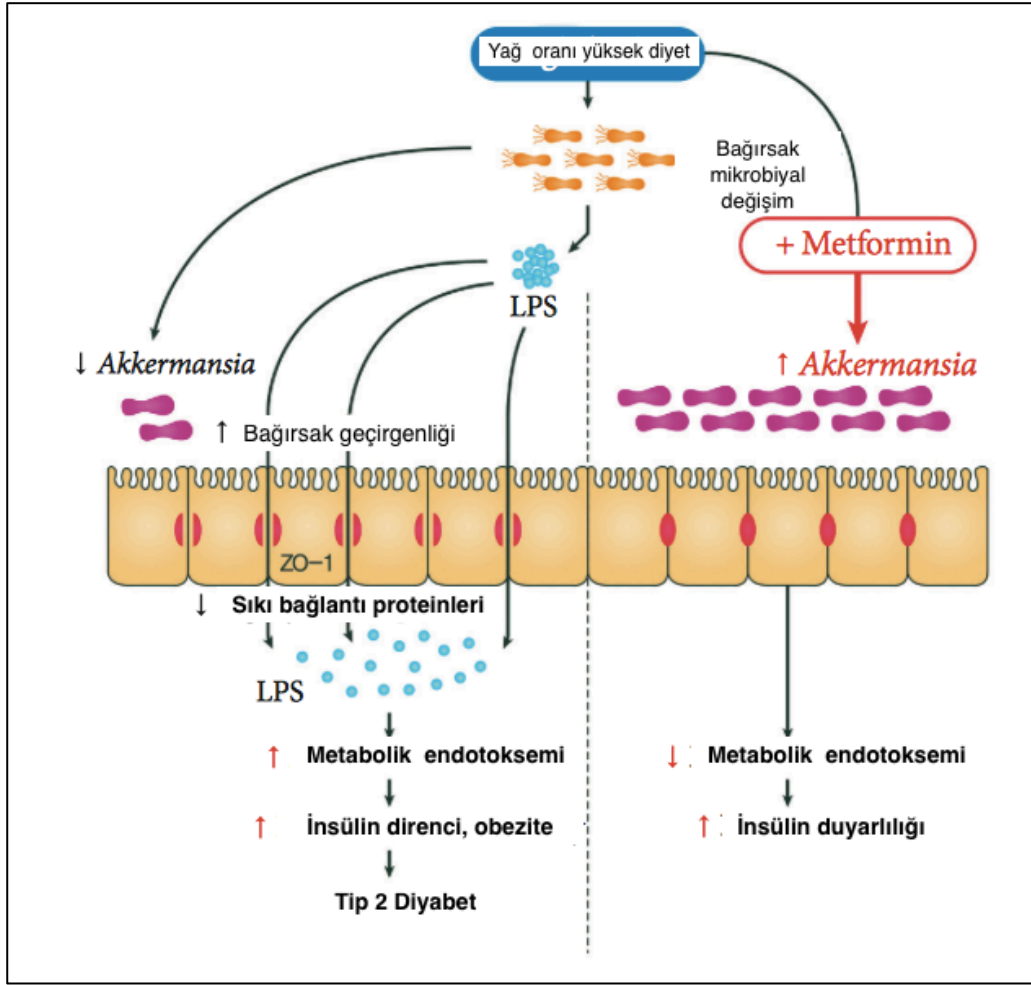
Obezite, Tip 2 Diyabet ve Metabolik Sendrom

Obez ve/veya tip 2 diyabeti olan hastaların mikrobiyotasında *Firmicutes* ve *Bifidobacterium* cinsi bakterilerde azalma görülürken *Bacteroidetes* ve *Prevotella* grubu bakterilerde artış görülmektedir. Bu bakterilerde ki artış, plazma glukoz düzeylerinde artışa neden olmaktadır. Bunun nedeni, sindirilemeyen fiberlerden bakterilerin ürettikleri KZYA'den kaynaklanmaktadır. Kısa zincirli yağ asitleri, GPR-41 ve GPR-43 gibi G protein aracılı reseptör'(GPR)lerin ligantıdır. Ligant-reseptör bağlanması ile enteroendokrin hücreler uyarılır ve peptid YY gibi peptid hormonların sekresyonu ve glukagon benzeri peptid (GLP) artar. Peptid YY, bağırsak hareketini azaltır, bağırsak geçiş hızını arttırır ve diyetlerden enerji üretimini azaltırken GLP-1 insülin duyarlılığını arttırır. Bağırsak mikrobiyotası beyaz yağ dokusunda yağ birikimi ve lipoprotein lipazı (LPL) inhibe ederek açlıkla indüklenen adipöz faktörü (Fiaf) etkili bir şekilde baskılar. Ayrıca, GPR-43'ün KZYA ile aktivasyonu yağ dokusunda insülin salınımını baskılar ve ardışık olarak yağ depolanmasını önler. Kısa zincirli yağ asitleri aynı zamanda intestinal glukoneogenezisi de aktive ederek gıda alımını azaltır. (Şekil 2.7) [41].

Yüksek yağ içeriği olan diyetler mikrobiyota değişimine neden olarak bağırsak geçirgenliğinde artışa ve bağırsak epitel hücreleri arasındaki sıkı bağlantı proteinlerinin sentezinde azalmaya neden olur. Epitel hücreleri arasında bağın zayıflaması lipopolisakkaritlerin portal kan dolaşımına geçişine neden olur. Bağırsağın bariyer fonksiyonunun bozulması ve mikrobiyotadan kaynaklanan endotoksemi obezite, insülin direnci ve tip 2 diyabetin patogenezini oluşturur. Mikrobiyotada *Akkermansia muciniphila* artışı hem metabolik endotoksemiye azaltmakta hem de insülin direncini düşürmektedir. Bu amaçla obezite ve tip 2 diyabet tedavisi için bu bakteri umut vericidir (Şekil 2.8) [41].



Şekil 2.7. Mikrobiyotanın konak metabolizaması üzerindeki etkisi [41]



Şekil 2.8. Yüksek yağlı diyet ve *A. muciniphila*'nın bağırsak ekosistemine etkisi [41]

Alkolik olmayan yağlı karaciğer hastalığı

Alkolik olmayan karaciğer yağlanması hastalığının patogenezinde insülin direnci ve oksidatif stres varlığının rol oynadığı bildirilmektedir. Ancak son yıllarda yapılan çalışmalar, bu hastalığın patogenezinin mikrobiyotaya ile yakından ilişkili olduğunu göstermektedir [42]. Alkolik olmayan karaciğer hastalığı olan kişilerde yapılan çalışmalarda özellikle *Bacteroidetes* ve *Bifidobacterium* türlerinin azalmasına karşılık *Actinobacteria* genusunda artış olduğu bildirilmektedir. *Actinobacteria* monosakkaritlerin fermentasyonuna neden olarak endojen etanol üretimine neden olmaktadır. Etanol, bağırsak epiteli üzerinde toksik etki göstererek inflamatuvar sitokinlerin üretimine neden olur. İnflamasyon ise insülin direncinin oluşmasına ve artmasına yol açar. Gram negatif bakterilerin yapısındaki lipopolisakkaritler epitel hücresinin yüzeyindeki TLR4'ler aracılığı ile sistemik inflamasyona neden olurlar, bu nedenle mikrobiyotaya yapısında artış olması inflamasyon artışına neden olur. İnflamasyon sonucu açığa çıkan hidrojen peroksit

(H₂O₂) ve benzeri serbest oksijen radikalleri oksidatif strese neden olur. Bu oksidatif stresin ilerlemesi ile sirozun patogeneziindeki ana faktör olan fibrozis ortaya çıkar [43].

Kronik kalp hastalıkları

Kardiyovasküler hastalık riski ile mikrobiyota arasında doğrudan bir ilişki vardır. Çünkü bu bakteriler diyetdeki kolinden daha sonra karaciğerde trimetilamin N-oksidi dönüşen trimetilamin üretirler. Trimetil amin pro-aterojenik bir bileşiktir. Ayrıca, kronik kalp hastalığı olan hastaların bağırsak florasında adherent yapma özelliği bulunan bakteriler sayıca fazla miktarda bulunur. Ayrıca yüksek geçirgenliğe sahip bağırsak duvarı bakteri ve/veya endotoksinlerin geçişine izin verebilirler ve bu geçiş, kronik kalp hastalıklarında aktive olan inflammatör sitokinler için önemli uyaranlardır. Bilindiği üzere, hiperkolesterolemi koroner arter hastalıklarının gelişiminden ve ilerlemesinden sorumludur. Özellikle *Lactobacillus plantarum*'un bazı suşları safra tuzu hidrolazlarının üretimini tetiklerler ve ayrıca besinlerden kolesterolün daha fazla emilimine neden olurlar [2].

Otizm

Otizm, özellikle 1980'lerden itibaren hızla artış gösteren bir hastalık grubudur. Genetik ve çevresel faktörlerin etkisinde olan bu hastalık bağırsak fonksiyonlarından da etkilenebilmektedir. Hasta kişilerde *Clostridia* aşırı miktarda mikrobiyotada yer alırken *Bifidobacteria* grubu bakterilerin miktarı önemli ölçüde azalmıştır. *Clostridia* grubu bakterilerin oluşturduğu ekzotoksinler ve propionat hastalığın daha da kötüleşmesine neden olmaktadır. Ayrıca bu hastalığın patogeneziinde özellikle bağırsak-mikrobiyota-beyin aksının önemli olduğu düşünülmektedir [44].

Kanser

Disbiyozis gelişimi özellikle gastrointestinal ve prostat kanserlerinin gelişimi için bir zemin oluşturmaktadır. Bakteriler, kromozom kırma faktörü olan klastojenleri üreten makrofajları tetikleyebilirler. Bu etki ile komşu hücre kromozomları da etkilenmekte ve kanser oluşumu için zemin oluşmaktadır. Ayrıca, bakterilerin yarattığı peroksidatif stres özellikle ileum ve kolonda kanser patolojisi ile ilişkilidir [45]. Mikrobiyota elemanları anti kanserojen olarak da kullanılmaktadırlar. Özellikle patojenik Th17 klonunun üretimini ve immün yanıt oluşumunu uyarırlar [46].

Diğer hastalıklar

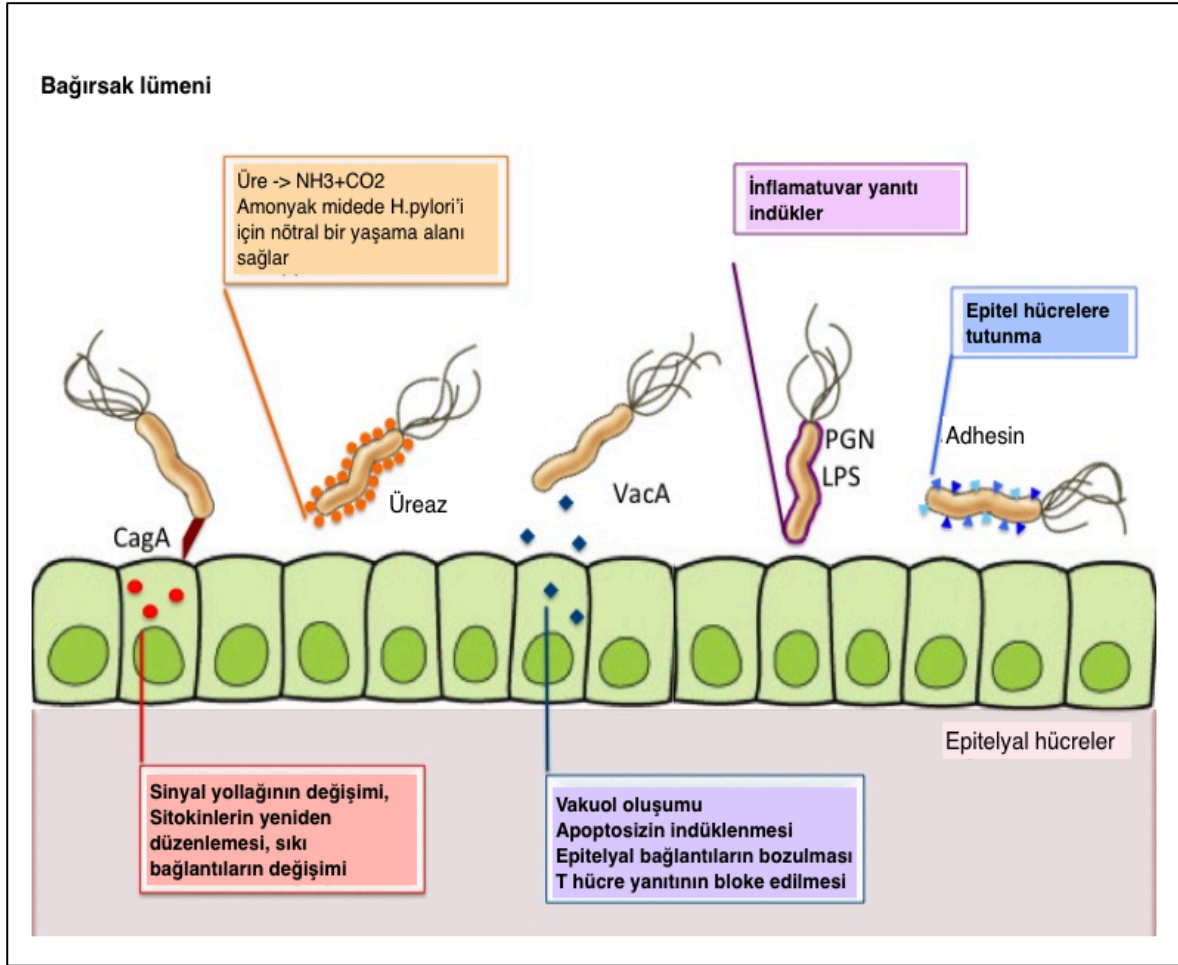
Romatoid artrit, kronik böbrek hastalığı, ailevi akdeniz ateşi hastalığı ve malaise ile ilişkili olduğunu gösteren çalışmalar vardır. Ayrıca HIV enfeksiyonunun kronikleşmesinde de etkilidirler [2]. Çizelge 2.1’de çeşitli hastalıkların mikrobiyota profilleri özetlenmiştir [2].

Çizelge 2.1. Bazı hastalıkların mikrobiyota türleri ile olan ilişkisi

Hastalık	Kaynak/Örnek	Disbiyozis
Ülseratif Kolit	İnsan / Gaita	↓ <i>Roseburia hominis</i> ↓ <i>Faecalibacterium prausnitzii</i>
Chron Hastalığı	İnsan / Gaita	↓ <i>Bacteroides</i> ↓ <i>Bifidobacteria</i>
Tip 1 Diyabet	İnsan (Çocuk) / Gaita	↓ <i>Lactobacillus</i> ↓ <i>Bifidobacterium</i> ↓ <i>Blautia coccoides</i> ↓ <i>Eubacterium rectal</i> ↓ <i>Prevotella</i> ↑ <i>Clostridium</i> ↑ <i>Bacteroides</i> ↑ <i>Veillonella</i>
Tip 2 Diyabet	İnsan / Gaita	↓ <i>Clostridia</i> ↓ <i>Firmicutes</i> ↑ <i>Betaproteobacteria</i>
Kolorektal Kanser	İnsan / Gaita	↓ <i>Prevotella</i> ↓ <i>Ruminococcus spp.</i> ↓ <i>Pseudobutyrvibrio ruminis</i> ↑ <i>Acidaminobacter</i> , ↑ <i>Phascolarctobacterium</i> , ↑ <i>Citrobacter farmer</i> ↑ <i>Akkermansia muciniphila</i>
Otizm	İnsan (Çocuk) /Gaita	↓ <i>Firmicutes</i> ↓ <i>Actinobacteria</i> ↑ <i>Bacteroides vulgates</i> ↑ <i>Desulfovibrio</i>
Romatoid artrit	İnsan / Gaita	↓ <i>Bifidobacteria</i> ↓ <i>Bacteroides fragilis</i>
HIV	İnsan / Gaita	↓ <i>Lactobacilli</i> ↓ <i>Bifidobacteria</i> ↑ <i>Candida albicans</i> ↑ <i>Pseudomonas aeruginosa</i>

2.5. *Helicobacter pylori* ve bağırsak mikrobiyotası

Helicobacter pylori (HP), dünya üzerindeki popülasyonun çok büyük bir kısmını kronik olarak enfekte etmiş ve basit bir enfeksiyondan mide kanserine kadar giden geniş bir yelpazede hastalık yapabilen Gram negatif bir bakteridir. Özellikle gelişmekte olan ülkelerde 0-8 yaş grubu çocuklarda HP enfeksiyonu hızla kazanılmakta ve adölesan çağa gelmeden toplumun büyük bir kısmını enfekte etmektedir. Hastalık yapma şekli ve düzeyi sadece bakterinin mide mukozasına yerleşmesi ile değil bir çok kişisel ve çevresel faktörün etkisindedir. Enfeksiyon ile sosyoekonomik gelişmişlik düzeyi arasında sıkı ilişki vardır [47]. Doku kesitlerinde; mide mukus tabakasının altında, epitel yüzeyinde ve lümende görülmektedir. Gram negatif boyanma özelliği gösteren HP, dokuda spiral kültürde basil ve kıvrık kokoidal şekildedir. Hücrenin bir ucunda bulunan 4-6 adet flagellasıyla bulunduğu ortamda hızlı hareket eder. Mikroaerofil bir bakteri olup %5-10 O₂ içeren CO₂'li ortamlarda ürer. Oksidaz, katalaz ve üreaz gibi biyokimyasal testleri pozitif olup üreaz pozitifliği en önemli virülans özellikleri arasında yer almaktadır. Günümüzde HP'nin en önemli virülans faktörü, sitotoksin ile ilişkili gen A (CagA)'dır. CagA geni, yaklaşık 30 genden oluşan CagA patojenisite adası (cag-PAI)'nın içinde bulunmaktadır. Bir diğer virülans özelliği epitel hücrelerinde vakuol oluşumuna neden olan vakuol yapıcı sitotoksin (VacA)'dır [48]. *Helicobacter pylori*'nin virülans faktörleri Şekil 2.9'da özetlenmiştir.



Şekil 2.9. *Helicobacter pylori*'nin virülans faktörleri [48].

Bakteri kamçıları sayesinde mide mukozasına tutunur mukus içindeki nötrale yakın pH aralığında yaşamını sürdürür. Mukozada değişiklik yaparak aktif akut, kronik gastrit ile peptik ülser neden olur. Bakteri immün sistemin hücrelerinden katalaz enzimi ile kaçır ancak fagosit edilese bile nötrofillerin içinde yaşamını sürdürebilir. Üreaz enzimi sayesinde HP mide sıvısındaki düşük pH'dan kendini korur. Üreaz enziminin etkisi ile açığa çıkan NH₄ epitel hücreleri için toksik olup epitel hücreleri arasında bağlantıları zayıflamasına ve kopmasına neden olarak salgıladığı sitotoksik maddelerin etkinliğini artırır. Salgıladığı bu toksik maddeler mukusunda bütünlüğünü bozarak mide pH'nın asidik etkisi ile epitel hücrelerindeki hasar kronikleşir [49].

Mide, GIS'in bölümleri içinde en az mikrobiyota yoğunluğuna sahip organdır. Çünkü mide, hızlı peristaltik hareketlere, düşük pH'ya ve yüksek safra konsantrasyonuna sahiptir. Midenin en önemli mikrobiyota üyesi HP'dir. Bağırsak mikrobiyotası gibi HP'nin de beyin-bağırsak-mikrobiyota aksı arasında çift yönlü etkileşim varlığını gösteren durumlar

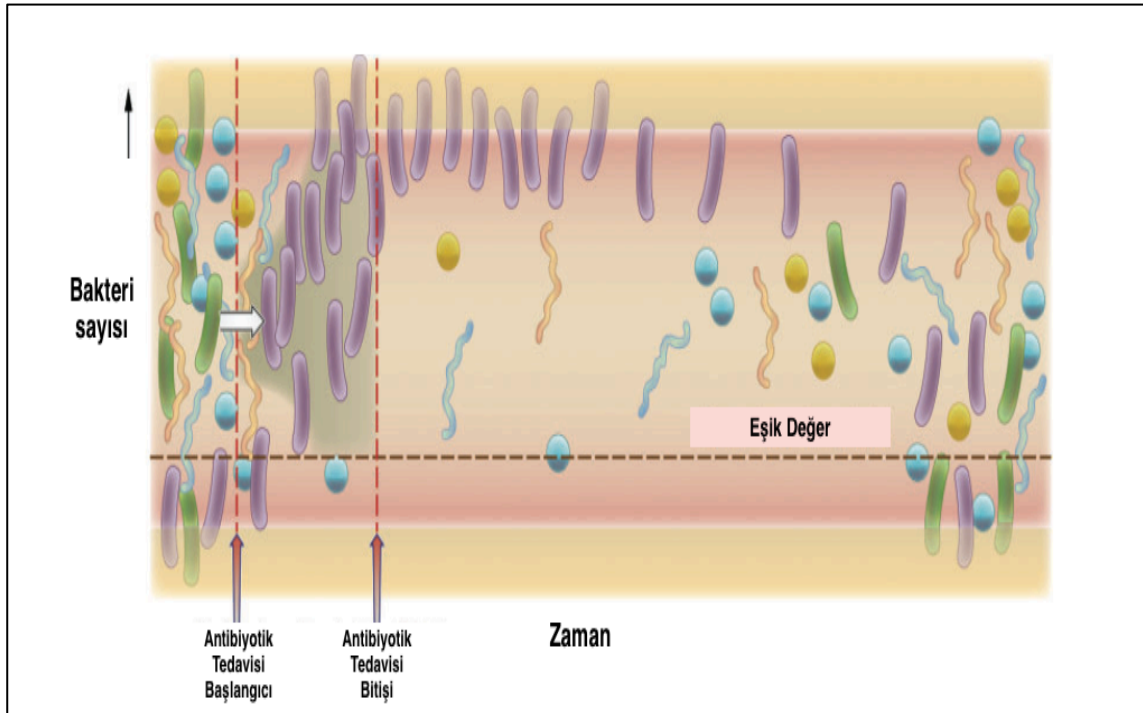
vardır: (1) HP enfeksiyonunda inflamatuvar bağırsak sendromuna benzer belirtiler olması, (2) ateroskleroz ve kardiyak aritmi gibi sindirim sistemi dışındaki hastalıklarla HP enfeksiyonu birlikteliği, (3) HP enfeksiyonunun tedavisinden sonra sindirim sistemindeki belirtilerin hafiflemesine paralel olarak kişinin yaşam kalitesinin artması, (4) HP enfeksiyonu ile aksonal tipte Guillain-Barré nöropatisi, multiple sklerozis ve epilepsi gelişmesi arasında öngörülen birliktelik olması, (5) HP enfeksiyonuyla otonom sinir sisteminin dengesinin modülasyonu gibi durumlardır. HP, özefagusun hareketlerini, gastrik asit sekresyonunu, mukozal kan akışını, endokrin ve immün sistem fonksiyonlarına doğrudan etki ederken asetil kolin, dopamin, leptin, ghrelin, kalsitonin, somatostatin gibi nörotransmitter maddeler ile de dolaylı olarak bağırsak mikrobiyotasına etki etmektedir. Bununla birlikte, TLR regülasyonu ve sitokinlerin salınımı ile de ilişkilidir. Akut *H. pylori* enfeksiyonu, sitotoksin maddelerin salınımına (VacA), inflamatuvar etkili sitokinlerin salınımına (IL-1, IL-6, TNF α), B 12 vitamini eksikliğine ve bağırsak disbiyozisine neden olmaktadır [50]. Ayrıca deneysel hayvan çalışmalarında HP ile enfekte olmayan farelerin mikrobiyotasında *Lactobacilli* cinsi bakterilerin, enfekte olan farelere göre oldukça fazla miktarda olduğu gösterilmiştir [51]. Normal mikrobiyotaya sahip ve mikrobiyotası olmayan farelerin *H. pylori* ile kolonize edildiği ve edilmediği hayvanların değerlendirildiği çalışmada; *H. pylori* ile kolonize olan hayvanlarda beden kitle indeksinin azaldığı gösterilmiştir [52]. Ghrelin ve leptin hormon seviyelerinin düzenlenmesinde etkili olan *H. pylori* varlığı ile obezite arasında ters korelasyon mevcuttur [53]. Ayrıca *H. pylori* inflamasyonun erken göstergelerinden bir olan eotaksin-1 adı verilen kemokin maddenin salınımına neden olarak kronik inflamasyonu şiddetlendirir [54].

Kronik *H. pylori* enfeksiyonu, kalın bağırsak mikrobiyotasında belirgin değişikliklere neden olmaktadır. Hayvan deneyleri, *H. pylori*'nin irritabl bağırsak sendromuna neden olan mikrobiyota elemanları üzerinde etkisi olabileceğini göstermektedir [55]. Irritabl bağırsak sendromu gibi kronik inflamasyon durumlarına karşı oluşan immün yanıtın *H. pylori* enfeksiyonu tarafından regüle edildiği bir başka hayvan kolit modelinde gösterilmiştir [56]. Bazı sitokin seviyelerinde artış, dendritik hücre ve T hücre aktivasyonu, Th1/Th17 yolağının regülasyonu, *H. pylori* karşı antikorların üretimi gibi mekanizmaların irritabl bağırsak sendromunun inhibisyonunda etkili olduğu düşünülmektedir [57].

2.6. Antibiyotik kullanımının mikrobiyota üzerine etkisi

Antibiyotik kullanım amacı patojen etkene karşı kişiyi korumak ve sağaltım sağlamaktır. Ancak antibiyotiklerin hedef mikroorganizmalar dışında konaktaki kommensal

mikroorganizmalar üzerinde istenmeyen etkilere yol açabilirler. Buna en iyi örnek, antibiyotik kullanımına bağlı olarak mikrobiyota dengesinde bozulma sonucu açığa çıkan antibiyotik bağımlı diyaredir. Bir diğer önemli sorun antibiyotik kullanımına bağlı olarak antibiyotik direncinde artış olmasıdır. Direnç gelişiminin iki etkisi mevcuttur; hedef patojen mikroorganizmada direnç gelişimine neden olabilir ve/veya mikrobiyota elemanlarında direnç oluşumuna neden olabilir. Bu ikinci durumda mikrobiyota diğer mikroorganizmalar için direnç mekanizmaları bakımından rezarvuvar görevi üstlenmektedirler. Bu durum Şekil 2.10'da özetlenmiştir [17, 58].



Şekil 2.10. Antibiyotik kullanımının mikrobiyota üzerine etkisi. Antibiyotik kullanımı ile dirençli olan bakteriler (mor basiller) zaman içinde duyarlı olan bakterilere (yeşil basiller) direnç genlerini aktarabilirler ve duyarlı bakteriler dirençli hale döner (beyaz ok). Bazı bakteriler musin tabakası (sarı bölüm) içinde kalarak antibiyotiğin etkilerinden korunabilirler. Şekilde aynı zamanda antibiyotik kullanımı bittikten sonra bile etkilerinin devam ettiği görülmektedir [17].

Antibiyotik kullanımına bağlı gelişen kısa süreli etkide; mikrobiyotanın sayısı ve içeriği değişerek disbiyozis oluşumuna neden olarak birçok hastalık için zemin oluşturmaktadır. Uzun süreli etkisinde ise direnç gelişimi ile beraber mikrobiyotanın yapısal değişikliklerine bağlı gelişen fonksiyonel değişiklikleridir. Bu etki özellikle antibiyotiklerin, mikrobiyotanın büyük bir kısmını oluşturan anaerob bakteriler üzerindeki etkilerinden kaynaklanır. Mikrobiyota ayrıca patojenlere karşı bariyer görevi görmektedir, ancak antibiyotik kullanımı ile sayıca azalan mikrobiyota patojen mikroorganizmaların bağırsak

epiteli yüzeyine tutunmasına da olanak sağlayacaktır. *Clostridium difficile* mikrobiyota yapısında bulunmasına rağmen sayıca diğer bakterilere göre daha az oranda bulunur. Ancak geniş spektrumlu antibiyotik kullanım sonrası *C. difficile*, floraya hakim hale gelir ve pseudomembranöz kolite neden olur [59].

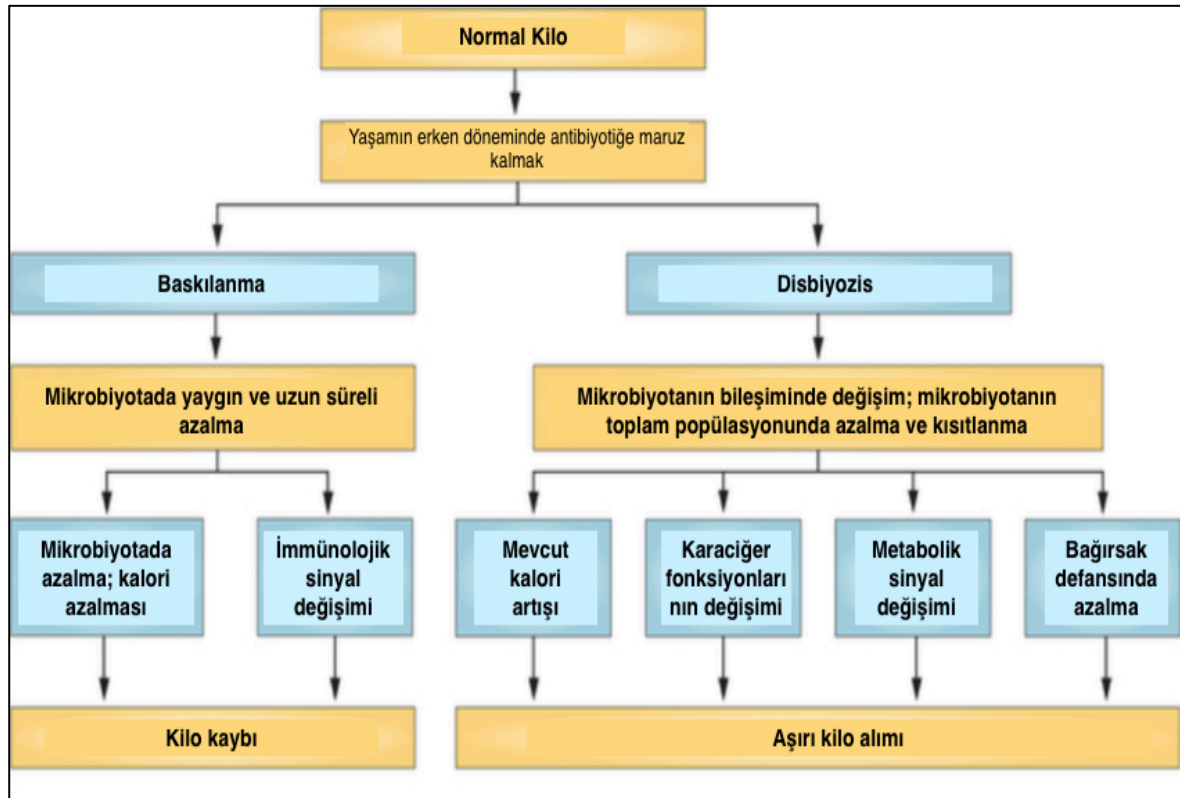
Antibiyotik kullanımı ile mikrobiyotada meydana gelen değişiklikleri gösterebilmek için genellikle kültüre dayalı olmayan moleküler yöntemlerin kullanımı önerilmektedir. Ancak bazı durumlarda seçilen yöntemle göre farklı sonuçlar da alınabilmektedir. Örneğin klindamisin kullanımı sonrası, 16s rRNA gen primerleri ile yapılan çalışmada *Bacteroidetes* grubu bakteriler antibiyotik kullanımından sonraki 3. aydan itibaren florada tekrar gözlemlenirken, *Bacteroidetes* grup spesifik primerlerin kullanıldığı deneylerde antibiyotik kullanımından sonraki ikinci yılda ancak bakterilerin antibiyotik kullanım öncesi seviyelerine ulaştıkları görülmüştür [60].

Bağırsak mikrobiyotasını ciddi şekilde etkileyen tedavi yöntemlerinden biri de HP tedavisidir. Klaritromisin, metronidazol ve omeprazol tedavisi alan hastaların gaita örnekleri incelendiğinde bağırsak mikrobiyotasının çok büyük bir kısmının etkilendiği görülmüştür ve yaklaşık antibiyotik kullanımından sonraki 4. yılda mikrobiyota tedavi öncesi konumuna ulaşmaktadır [61]. Ayrıca, antibiyotik tedavisi, bağırsak mikrobiyotasını boğaz mikrobiyotasına göre daha fazla etkilemektedir. Boğaz mikrobiyotası bağırsak mikrobiyotasına göre daha esnek bir yapıya sahiptir [61].

Mikrobiyotanın oluşumu doğumla başlayan bir süreçtir ve annenin mikrobiyotasından etkilenmektedir. Annenin ise mikrobiyotası birinci trimester ile üçüncü trimester arasında dahi farklılıklar göstermektedir. Hatta gebelikte antibiyotik kullanımı bebeğin mikrobiyotası üzerinde de dolaylı bir etkiye sahiptir [62]. Ayrıca gebeliği sürecinde antibiyotik kullanan annelerin bebeklerinde astım gelişme riski %30 kadardır. Antibiyotiğe maruz kalan annelerin bebekleri doğumda düşük doğum ağırlığına sahiptirler ve bu çocuklarda ileri yaşamlarında obezite gelişme riski vardır. Amerika Birleşik Devletleri'nde bir çocuk iki yaşına kadar ortalama üç kez antibiyotik tedavisi almaktadır [63]. Reçetelenen antibiyotik dışında gıda, tarım ve hayvancılık sektörlerinin kullandığı antibiyotiklerden de kişisel olarak etkilenmekteyiz. Ancak bu tip antibiyotik alımının daha çok direnç gelişimi ile ilişkili olduğu düşünülmektedir [64]. Yaşamın ilk 6 ayında en az bir kez antibiyotik alımı ise 10. aydan itibaren beden kitle indeksinde artışa neden olmaktadır.

Ayrıca bu bebeklerin antibiyotik kullanımı ile beraber anneleri de kilolu ise normal kiloya sahip annelerin bebeklerine göre vücut kitle indeksleri daha yüksektir [65].

Antibiyotik alımı sonrası mikrobiyotada sürekli ve kalıcı azalma olması ise kilo kaybı ile sonuçlanırken antibiyotik mikrobiyotanın içeriğine etki ederek yapısını değiştirmesi ile oluşan disbiyozis kilo alımına neden olmaktadır [63]. Bu durum Şekil 2.11’da özetlenmiştir.



Şekil 2.11. Antibiyotik alımının mikrobiyota üzerine farklı etkileri

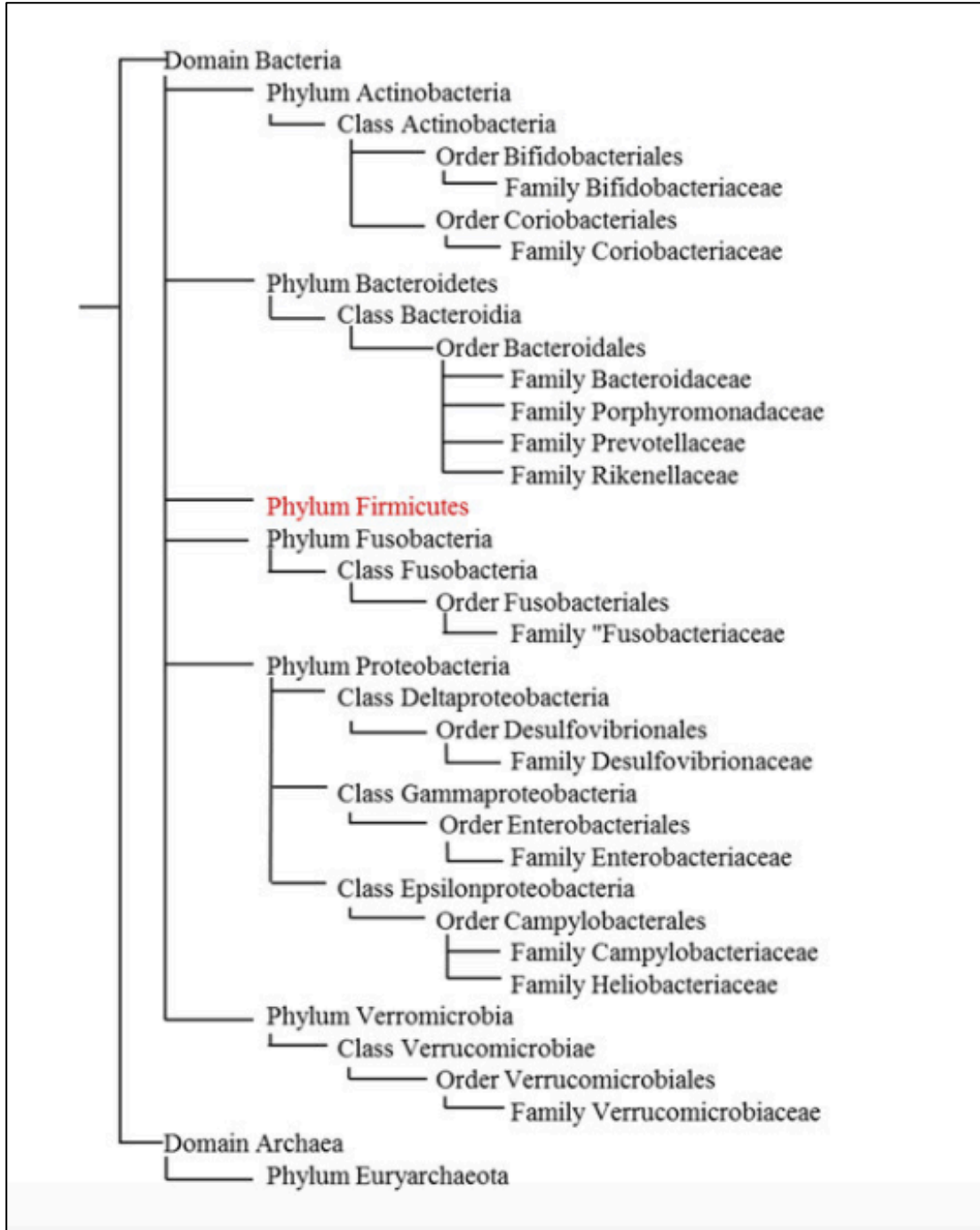
2.7. Mikrobiyota bileşimi

Yapılan geniş çaplı çalışmalar ile insan mikrobiyotasındaki tür sayısının yaklaşık 35,000 kadar olduğunu göstermektedir. Aslında tür sayısı bu tür çalışmalar için yetersiz kalmaktadır. Bakteri türleri ile beraber; İnsan Mikrobiyom Projesi ve İnsan Gastrointestinal Sistem Metagenom Projesi ile insan mikrobiyotasında yaklaşık 10 milyonun üzerinde genom yer aldığı bilinmektedir [66]. Yüksek gen sayısı ve düşük gen sayısı, mikrobiyota ve mikrobiyota fonksiyonları ile yakından ilişkilidir. Yüksek gen sayısına sahip mikrobiyotada *Anaerotruncus colihominis*, *Butyrivibrio crossotus*, *Akkermansia spp* ve *Fecalibacterium spp* yer almaktadır. Sağlıklı bir sindirim için yüksek gen sayılı mikrobiyota belirleyici bir özelliğe sahiptir. Bu mikrobiyota bakterileri, bütirat

üreten, hidrojen üretimine meyilli, hidrojen sülfür üretimini azaltan ve metanogenik/asetogenik ekosistemin sağlanmasından sorumludurlar. Yüksek gen sayısına sahip bireyler hem sağlam bir mikrobiyotaya sahiptirler hem de bu bireylerin metabolik hastalık ve obezite gelişme riski düşük gen sayılı mikrobiyotaya sahip bireylere göre daha düşüktür [67]. Düşük gen sayılı mikrobiyotaya sahip kişilerde inflamatuvar bağırsak hastalığı ile ilişkili olduğu düşünülen *Bacteroides spp* ve *Ruminococcus gnavus* türleri daha fazla bulunur. Düşük gen sayılı mikrobiyotada yer alan diğer bakteriler; *Parabacteroides*, *Campylobacter*, *Dialister*, *Porphyromonas*, *Staphylococcus* ve *Anaerostipes*'tir [68].

Dengedeki bir mikrobiyotada *Firmicutes* ve *Bacteroidetes* filumları baskın olarak bulunurken bunları *Actinobacteria* ve *Verrucomicrobia* filumları izler. *Firmicutes* ve *Bacteroidetes* bakterileri sıklıkla kalın bağırsağa yerleşme eğilimindedir [66].

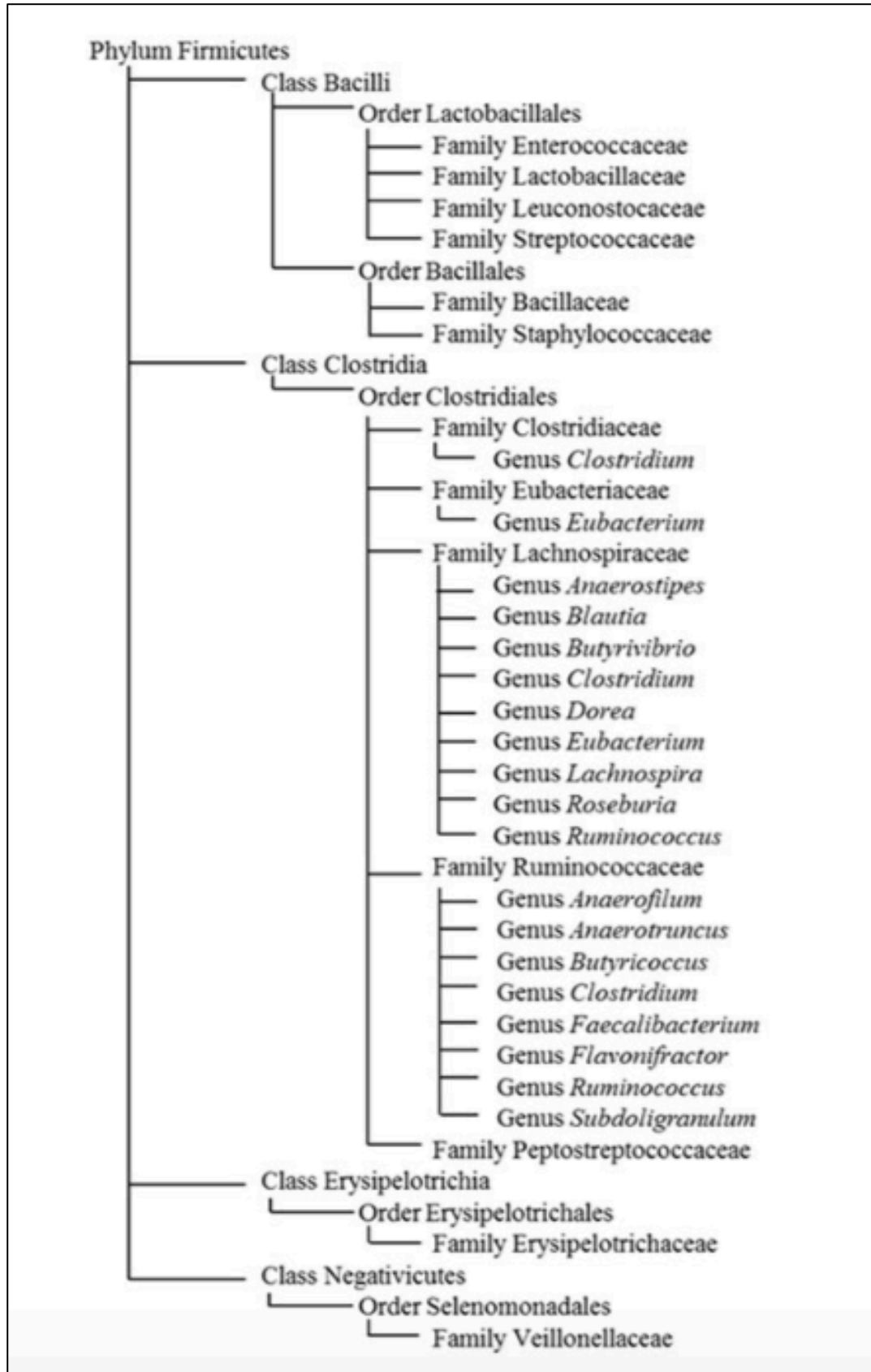
Bağırsak mikrobiyotasında yaygın olarak bulunan türler taksonomik sınıflandırmaya göre yedi filum (*Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Fusobacteria*, *Verromicrobia*, ve *Cyanobacteria*-benzeri) Bacteria Domain'de yer alırken bir filum (*Euryarchaeota*) Archaea Domain'de yer alır. Bağırsak florasında yer alan bakterilerin taksonomik sınıflandırması Şekil 2.12'de yer almaktadır [69].



Şekil 2.12. Bağırsak mikrobiyotasının taksonomik sınıflandırması[69]

2.7.1. Filum Firmicutes

Filum Firmicutes genellikle Gram pozitif bakterilerden oluşmakla birlikte lipopolisakkarit içeren az sayıda Gram negatif bakterileri de içermektedir. Mikrobiyotanın en büyük filumunun taksonomik sınıflandırması Şekil 2.13’de gösterilmiştir [69].



Şekil 2.13. Filum Firmicutes'in taksonomik sınıflandırması [69]

Family Clostridiaceae (Clostridial Cluster I)

Clostridial Cluster I gerçek Clostridia türleri olarak bilinirler ve bu grup içerisinde; spor oluşturan ve herkes tarafından iyi bilinen *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, ve *Clostridium tetani* türleri yer almaktadır. *Clostridia* genusu dışında; *Eubacterium* ve *Sarcina* genusları da Cluster I içinde yer alır. Deoksiribonükleik asit (DNA) G+C içeriği %22-53 arasındadır. Bu grupta yer alan bakterilerin hiçbirisi ATP üretimi için elektron alıcısı olarak O₂'yi kullanmazlar. Bu türlerin, oksijen varlığında üremeleri inhibe olurken anaerobik koşullarda yeniden üremeye başlayabilirler. Bu bakteriler kemolitotrofik ve organoheterotrofikler. Bunlar içinde; sakkorilitik türler, proteolitik ve peptidolitik türler, lipolitik türler ve organik tuzları parçalayan türler vardır. Bu bakterilerin tipik özelliği, substrat maddelerden çeşitli konsantrasyonlarda asetik asit, laktik asit ve / veya etanol, propanol ve butanol ile butirik asit oluştururlar. Üretilen bütirat miktarı kullandıkları substrat ile yakından ilişkilidir [70].

Family Lachnospiraceae (Clostridial Cluster XIV; *Eubacterium rectale* – *Blautia coccoides* grup)

Clostridial XIV grubunu oluşturan bu familyada *Anaerostipes*, *Blautia*, *Butyrivibrio*, *Catonella*, *Clostridium*, *Coprococcus*, *Dorea*, *Eubacterium*, *Lachnospira*, *Johnsonella*, *Roseburia*, *Ruminococcus*, ve *Shuttleworthia* cinslerine ait türler yer almaktadır. Bu bakterilerin tümü zorunlu anaeropturlar ve polisakkarilitik olup bütirat üretilir. Ayrıca DNA G+C içeriği %29-51 arasındadır [71].

Anaerostipes spp., glukoz metabolizmasının ana ürünleri olarak bütirat, asetat ve laktat üretirler ve asetatı parçalayabilirler. *Blautia* türleri ise glukoz metabolizmasından asetat, etanol, hidrojen, laktat ve süksinat üretirler. *Butyrivibrio* türleri ise şekerlerin çok büyük bir kısmını sindirirler ayrıca, hem hücresel hem de ekstrasellüler esteraz aktivitesine sahiptirler. Pektinolitik ve amilolitik olan türler yanında ksanolitik türlerde mevcuttur. Bazı türlerin ise heterosiklik biflavonoid tip kompleks bileşikleri de parçaladıkları bilinmektedir. Lachnospiraceae familyasına ait *Clostridium* cinsine ait türler (*C. bolteae*, *C. clostridioforme*, *C. hathewayi*, *C. indolis*, *C. jejuense*, *C. nexile*, *C. saccharolyticum*, *C. scindens*, *C. sphenoides*, *C. symbiosum* ve *C. xylanolyticum*) farklı tipteki karbohidratları parçalayarak asetat, laktat, propionat, süksinat, bütirat, etanol, CO₂ ve H₂ oluştururlar. *Dorea spp.* glukoz metabolizmasından etanol, format, asetat, CO₂ ve H₂ oluşturabilirler ancak bütirat oluşturamazlar. *Eubacterium* cinsinde yer alan bakteriler (*E. cellulosolvens*, *E. eligens*, *E. hallii*, *E. ramulus*, *E. rectale* ve *E. ventriosum*) glukoz metabolizmasının ana

ürünü olarak laktat üretirler. *E. ramulus*, flavon halkasını parçalayarak hidroksi fenilasetik asit ve hidroksifenil probiyonik asit oluştururlar. *Lachnospira* türleri ise öncelikle pektini fermente ederler. *Roseburia* türleri ise karbonhidrat ve kısa zincirli yağ asitlerinden butirat üreten bakterilerdir. *Ruminococcus* cinsine ait türler (*R. gnavus*, *R. lactaris*, *R. obeum*, *R. torques*) ise laktik asit ve asetik asit üretirler [69].

Family Ruminococcaceae (Clostridial clusters III and IV)

Clostridial cluster III, *Acetivibrio* ve bazı *Clostridium* türlerini (*C. aldrichii*, *C. cellobioparum*, *C. cellulolyticum*, *C. hungatei*, *C. josui*, *C. stercorarium*, ve *C. thermocellum*) içerir, ancak bu grup bakteriler insan bağırsak mikrobiyotasında yaygın olarak bulunmazlar [72].

Clostridial cluster IV (*Clostridium leptum* grup), *Anaerofilum*, *Anaerotruncus*, *Butyricoccus*, *Clostridium*, *Faecalibacterium*, *Flavonifractor*, *Pseudoflavonifractor*, *Ruminococcus*, ve *Subdoligranulum* genusuna ait türleri içerir. Polisakkarolitik olan bu bakteriler yaygın olarak bütirat üretirler Zorunlu anaeropturlar ve DNA G+C içerikleri %27-60'dır [69].

Anaerofilum cinsi bakteriler glokoz ve ksiloz gibi monosakkaritleri parçalarlar ve fermentasyon ürünü olarak laktat, asetat, etanol ve CO₂ meydana getirirler [73]. *Anaerotruncus spp* glukoz metabolizmasından asetik asit ile bütirik asit üretirler [74]. *Clostridium* cinsine ait türler (*C. leptum*, *C. methylpentosum*, *C. sporosphaeroides* ve *C. viride*) ise farklı karbonhidratlar üzerinde etkileri vardır ve son ürün olarak asetat, propionat, bütirat, propanol, CO₂ ve H₂ oluşturabilirler [75]. *Eubacterium* cinsine ait türler ise *E. desmolans* ve *E. siraeum* olup laktat, bütirat, etanol ve/veya H₂ açığa çıkarırlar. *Faecalibacterium spp* bütirat, D-laktat ve format oluşturabilirler ve asetatı parçalayabilirler. *Ruminococcus* cinsine ait türler (*R. albus*, *R. bromii*, *R. cellulosi*, *R. callidus* ve *R. flavefaciens*) glukoz metabolizması son ürünü olarak asetat, format, süksinat, etanol, CO₂ ve/veya H₂ üretirler [69].

Family Veillonellaceae

Bu familyanın üyeleri Gram negatiftir. Bağırsak mikrobiyotasında yaygın olarak *Anaeroglobus*, *Dialister*, *Megasphaera*, *Mitsuokella*, *Selenomonas*, ve *Veillonella* cinsi bakteriler vardır. Bu bakteriler, sadece galaktoz ve mannozu fermente edebilirler ve son ürün olarak asetat, propionat, izobutirat, bütirat ve izovalerat üretirler [76].

Family Peptostreptococcaceae (Clostridial cluster XI, *Clostridium lituseburense* grup)

Bu grup içinde *Clostridium*, *Eubacterium*, *Filifactor*, ve *Peptostreptococcus* cinsi bakteriler yer almaktadır. En önemli cinsi *Clostridium* olup *C. bartlettii*, *C. bifermentans*, *C. difficile*, *C. irregulare*, *C. lituseburense*, ve *C. sordellii* türlerini kapsar. Bu grup bakteriler sakkarolitikler ve asetat, butirat, valerat, izovalerat glukoz metabolizmasının majör ürünleridir. Bunun yanında, daha az oranda propionat, etanol, propanol, isobutanol ve H₂ üretirler [69].

Family Eubacterium (Clostridial cluster XV, *Eubacterium limosum* grup)

Bu grupta *Acetobacterium*, *Alkalibacter*, *Anaerofustis*, *Eubacterium* ve *Pseudoramibacter* cinsleri yer alır. Grubun temsilcisi olan *Eubacterium* cinsine ait türler ise; *E. aggregans*, *E. barkeri*, *E. callenderi*, ve *E. coprostanoligenes*. Glukoz metabolizmasından bütirat, format, laktat ve/veya hidrojen üretirler [69].

Family Erysipelotrichaceae (Clostridial cluster XVI, Clostridial cluster XVIII *Clostridium ramosum* grup)

Bu grup içinde *Clostridium*, *Erysipelothrix*, *Eubacterium*, ve *Holdemania* cinsleri yer alır. Karbonhidrat fermentasyonu yaparlar ve bütirat, laktat, asetat, CO₂ ve H₂ oluşturabilirler. Clostridial cluster XVIII ise *Clostridium cocleatum*, *Clostridium ramosum*, *Clostridium saccharogumia*, ve *Clostridium spiroforme* türlerini içerir ve bu bakteriler asetat, format, laktat ve süksinat oluştururlar [69].

Class Basilli

Bu sınıfın en önemli takımı Lactobacillales'tir. Bu takımın içinde Laktik asit bakterileri (LAB) olarak tanımlanan Enterococcaceae, Lactobacillaceae, Leuconostocaceae, ve Streptococcaceae familyalar yer alır. Bunlar Gram pozitif, spor oluşturmeyen fakültatif anaerobic bakterilerdir, DNA G+C %50'den daha azdır ve fermentasyon ile laktik asit üretirler. Bu grup bakteriler genellikle yiyecek ve içeceklerde de bulunurlar. *Enterococcus spp* glukoz fermentasyonu sonrasında baskın ürün L(+)-laktik asittir. Bu grup ayrıca özellikle antibiyotik direnç geni içeren ve virülans faktörlerini taşıyan plazmidlere sahiptirler. Özellikle direnç genleri mikrobiyota bakterileri için rezervuar görevi görür ve diğer bakterilerin de bu direnç genlerini kazanmalarına neden olurlar. Bu grup bakteriler sıklıkla sağlık hizmetleri ile ilişkili enfeksiyonlarda da karşımıza çıkmaktadır. Grubun bir diğer önemli takımı *Lactobacillus* ve *Pediococcus* türlerini içeren Lactobacillaceae'dir. *Lactobacillus* türleri zorunlu sakkarolitiklerdir. Glukoz fermentasyonu ile laktik asit

oluştururlar, anaerobik ortamlarda sıklıkla son ürün asetik asittir. *Pediococcus spp* ise çok farklı substratları kullanabilir ve son ürün genellikle laktik asittir. Leuconostocaceae ise *Leuconostoc spp* ve *Weissella spp* içerir. Bu grubun son temsilcisi olan Streptococcaceae *Lactococcus spp* ve *Streptococcus spp* içerir [77].

Bacillales takımı, aynı zamanda Bacillaceae ve Staphylococcaceae familyalarını da içerir. *Bacillus spp*'nin çok az bir kısmı zorunlu anaerobik olmasına rağmen büyük bir çoğunluğu aerobik veya fakültatif anaerobik solunum yaparlar . Sporlu bakterilerdir ve nitratı nitrite indirgerler. Patojenik türlerinde ekzotoksin üretimi gözlenir. Staphylococcus spp ise fakültatif anaerob bakterilerdir. Son ürün olarak laktik asit oluşturmalarına karşın aerobik koşullarda asetik asit ve CO₂ üretirler [78].

2.7.2. Filum Bacteroidetes

Gram negatif, DNA G+C içeriği %28-61 olup en önemli genusu *Bacteroides*'tir [69].

Family Bacteroidaceae

Bacteroides spp sakkarilitik olup polisakkaritleri parçalayan enzimlere sahiptirler ve bu enzimleri ile polisakkaritleri basit ve kompleks şekerleri konağın kullanabileceği alt ürünlere parçalarlar. Metabolik son ürünleri ise asetat ve süksinattır. Bu türler safranin enterohepatik sirkülasyonunda rol alırlar [79].

Family Prevotellaceae, Porphyromonadaceae ve Rikenellaceae

Prevotellaceae ve Porphyromonadaceae'da yer alan türler daha çok oral mikrobiyotada yer alırlar. Bu grupta gastrointestinal yolda daha çok Rikenellaceae familyasına ait *Alistipes spp* ve *Rikenella spp* yer alır. *Alistipes spp* sakkarilitik olup ana son ürün süksinik asittir. *Rikenella spp* ise daha zayıf sakkarilitik bakterilerdir ve son ürün olarak asetat oluştururlar [69].

2.7.3. Filum Actinobacteria

Üyelerin büyük bir çoğunluğu Gram pozitif olup yüksek DNA G+C (%60-64) oranına sahiptirler [69].

Family Bifidobacteriaceae

İnsan bağırsak mikrobiyotasının en önemli türü *Bifidobacterium spp*'dir. Yaygın olarak bulunan türler; *B. adolescentis*, *B. angulatum*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. catenulatum*, *B. longum* ve *B. pseudocatenulatum*. Bu bakteriler substrat olarak birçok polisakkariti

kullanabilirler ve son ürün olarak asetat ve laktat oluştururlar. Bağırsak mikrobiyotası yanında ağız mikrobiyotasında da yaygın olarak bulunurlar [80].

Family Coriobacteriaceae

Coriobacteriaceae familyası *Eubacterium* cinsinin bazı türlerinin yeniden sınıflandırılması ile oluşmuştur. Bu grubun gastrointestinal yolda yer alan türleri *Collinsella*, *Coriobacterium* ve *Eggerthella* türleridir. Glukoz metabolizmasının son ürünü olarak genellikle asetat, laktat ve H₂ oluştururlar [81].

2.7.4. Filum Proteobacteria

Class Delta Proteobacteria

İnsan bağırsak mikrobiyotasının gastrointestinal yolda H₂S üreten Desulfovibrionaceae familyasına ait *Desulfovibrio spp* (*D. desulfuricans* subsp. *desulfuricans*, *D. fairfieldensis*, *D. piger*, ve *D. vulgaris*) ile *Bilophila spp* türlerini içerir. Sülfat indirgeyen bu bakteriler, zorunlu anaerop bakterilerdir. Sülfat indirgenme reaksiyonları için çok farklı substratları kullanabilirler. Bu bakteriler daha çok yiyecek ve içeceklerde koruyucu olarak bulunan SO₄²⁻ and SO₃²⁻ gibi sülfür bileşiklerinin oksidasyonunda iş görürler. *Bilophila spp* non-sakkorilitik bakterilerdir ve asetat ana son ürünleridir [82].

Class Gamma Proteobacteria

Bu grup içinde Enterobacteriaceae familyasında yer alan *Cronobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Shigella*, ve *Yersinia* cinsine ait türler bulunur. Bu grup sıklıkla fakültatif anaerop bakterilerdir ve genellikle patojen olarak yer alırlar [69].

Class Epsilon Proteobacteria

Bu grup içinde de *Campylobacter spp* ve *Helicobacter spp* türleri yer alırlar [69].

2.7.5. Filum Verrumicrobia

Aslında bu filumda yer alan bakteriler genellikle deniz bakterileridir. Ancak son yıllarda mikrobiyota üzerine yapılan çalışmalarda *Akkermansia muciniphila* türünün insan bağırsak florasında yer alan önemli bir bakteri olduğunu ortaya koymaktadır. Kemoorganotrofik bir bakteri olup karbon, enerji ve nitrojen kaynağı olarak musini kullanabilir. Ayrıca musin fermentasyonundan sülfat oluşturur [83].

2.7.6. Filum Fusobacteria

Bu filum içindeki önemli aileler Fusobacteriaceae'dir. Pepton ve glukozu enerji kaynağı olarak kullanır ve son ürün olarak bütirik asit oluşturur. Bu grupta yer alan *Fusobacterium nucleatum* ve *Fusobacterium necrophorum* endotoksin oluşumundan da sorumludurlar [84].

2.7.7. Filum Euryarchaeota

Archaea domaininde yer alan bu grup bakteriler, zorunlu anaerop olup çeşitli bileşiklerden metan oluşumundan sorumludurlar. Bu grup bakteriler, insan gastrointestinal yolunda alkol, KZYA, CO₂ ve H₂ gibi major fermentasyon ürünlerini metabolize ederler. Bu tip bakteriler mikrobiyotada oldukça az miktarda bulunurlar [85].

2.8. Mikrobiyota analiz yöntemleri

Bağırsak mikrobiyotası üzerinde çalışmak için kişilerin gaita örnekleri toplanmalı ve gaita örneklerinden DNA izole edilmelidir. Konvansiyonel kültür yöntemleri ile bu kadar çok elemandan oluşan bağırsak mikrobiyotasını izole etmek ve tanımlamak mümkün değildir. Mikrobiyota ile ilgili ilk yapılan çalışmalar kültüre dayalı olup mikrobiyotanın ancak %10-25 kadarını belirleyebilmiştir. Çünkü bağırsak mikrobiyotasının büyük bir kısmını anaerop bakteriler oluşturmaktadır ve mikrobiyota içindeki bakteri sayısı ve türü oldukça fazladır. Anaerop kültür yöntemlerindeki gelişmeler, mikrobiyotanın dominant bakteri cinslerinin *Bacteroides*, *Clostridium* ve *Bifidobacterium* olduğunu ortaya koymuştur [86].

2.8.1. Mikroskopi

Mikrobiyoloji laboratuvarının en basit ancak en önemli teknikleri arasında yer alan mikroskobik çalışmalar mikrobiyota analizlerinde de yerini almaktadır. En basitinden bir ışık mikroskobu mikrobiyota elemanlarının gram boyanması ve spor oluşturup oluşturmamalarının belirlenmesinde kullanılır. Ancak, ışık mikroskobunun ötesinde iki boyutlu epifloresan mikroskoplar, üç boyutlu konfokal taramalı lazer mikroskoplar mikrobiyota analiz yöntemleri için tercih edilmektedir. Özellikle konfokal taramalı lazer mikroskobu mikrobiyal örneklerle zarar vermeden özellikle hücrelerin yerleşimi açısından önemli bilgiler veren hızlı bir mikroskobik yöntemdir. Ayrıca bu mikroskobik çalışmalar canlı ve ölü hücre arasındaki yapısal farklılıklar hakkında bilgi edinmek mümkündür. Bunların dışında çözünürlük gücü daha fazla olan taramalı elektron mikroskop ve geçirimsiz elektron mikroskopta kullanılmaktadır. Scanning elektron mikroskop özellikle bakterilerin

morfolojik yapıları hakkında bilgi verirken geçirimli elektron mikroskop bakteri fizyolojisinin anlaşılması yönünde bakterinin iç yapısı hakkında bilgi verir [69].

2.8.2. Kültür

Kültür mikroorganizmaların tanımlanmasında kullanılan vazgeçilmez bir yöntemdir. Mikrobiyota analizlerinde kültür yönteminin uygulanmasının bazı avantajları vardır. Bunlar arasında yöntemin maliyet etkin olması, yarı kantitatif sonuç vermesi, yaygın olarak kullanılması, biyokimyasal testlerin yapılmasına imkan tanınması ve diğer teknikler için öncü olması sayılabilir. Ancak mikrobiyotanın hem sayı hem tür çeşitliliğinin fazla olması, üyelerin birçoğunun anaerop bakteri olmasından dolayı da kültür yönteminin bazı dezavantajları vardır. Bu dezavantajları da şu şekilde özetleyebiliriz: Öncelikle anaerop bakterilerin kültür yöntemleri oldukça zahmetlidir, kültür yöntemi ile mikrobiyotanın ancak %30 kadarının kültürü yapılabilmektedir, örneklerin vakit geçirmeden işleme alınması gerekmektedir, sadece kültürü yapılabilen mikroorganizmalar için uygun bir yöntemdir, seçilen besiyerlerinin özelliğine göre sonuçlar değişim gösterebilir, birçok bakteri tekrar pasajlarda üretilmeyecektir. İdentifikasyon işlemi için birçok izolasyon yöntemine daha ihtiyaç duyulmaktadır, kültür sonuçlarını yorumlamak için iyi bir deneyim ve iyi bir laboratuvar alt yapısına ihtiyaç duyulmaktadır [87].

2.8.3. Moleküler yöntemler

Mikrobiyotanın bu kadar karmaşık bir yapıya sahip olması ve kültür yöntemlerini tanımlama için yetersiz kalması ile moleküler yöntemler devreye girmiştir. Çünkü mikrobiyotanın fizyolojisini anlamak için hem mikrobiyotanın çeşitliliğinin ortaya konması hem de sayıca bu bakterilerin belirlenmesi ihtiyacını doğurmuştur. Bu nedenle araştırmacılar, hücre, DNA, RNA, proteinler, metabolitler, biyobelirleyicilerin çalışıldığı genoma dayalı olan moleküler yöntemleri kullanmaya başlamışlardır. Bu başlıkta yer alan yöntemleri kültüre dayalı ve kültüre dayalı olmayan moleküler yöntemler olmak üzere iki grupta incelemek mümkündür [87].

Kültüre dayalı moleküler yöntemler

Kültüre dayalı moleküler yöntemler: Fenotipik Parmak İzi Analizi ve Genotipik Parmak İzi analizi olmak üzere iki başlıkta toplanabilirler.

Fenotipik parmak izi analiz yöntemleri

Bu yöntemler, daha az duyarlıdır ve parmak izindeki değişiklikler her zaman farklı bir bakteriyi işaret etmeyebilir. Fenotipik parmak izi yöntemleri; çözünebilir proteinlerin poliakrilamid jel elektroforezi, yağ asidi analizleri, bakteriyofaj tiplendirme ve serotiplendirmedir. Bunlar içinde en etkili yöntem serotiplendirmedir. Çünkü serotiplendirmede alt kültürler olmaksızın koloniler, türe veya cinse özgü monoklonal antikorun hibridizasyonu ile doğrudan tanımlanabilir [88].

Genotipik parmak izi analiz yöntemleri

Kompleks yapıdaki insan mikrobiyotasının deşifre edilmesi için genotipik parmak izi analiz yöntemleri majör bir avantajdır. Bu yöntemler arasında; nükleik asit problemleri ile koloni hibridizasyonu, pulsed field jel elektroforezi ve ribotiplendirmedir [89].

Kültüre bağımlı olmayan moleküler yöntemler

Kültür bağımlı olmayan yöntemler, filogenetik sınıflandırma araçları olarak bilinirler. Kültüre göre daha hızlı ve güvenilir sonuçlar verirler, çünkü bu yöntemlerle yapılan tanımlama, nükleik asitlere dayalı yapılmaktadır. Moleküler yöntemler tek bir türün tanımlanmasından daha karmaşık yapıdaki makro bir yapının tanımlanmasına kadar geniş bir alana hizmet ederler, ayrıca moleküler yöntemler bakteri türlerinin evrimsel bağlantısının ortaya konmasına da olanak sağlamaktadır. Moleküler yöntemler: Floresans in-situ Hibridizasyon (FISH), akım sitometrisi, Kantitatif Dot-Blot hibridizasyon ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) dayalı tekniklerdir (Checkerboard hibridizasyon, Microarray, 16S rRNA, recA gen, multiplex-PZR, AP-PZR, TAP-PCR, DGGE/TGGE, gen klonlama ve dizileme, T-RFLP, RAPD, Gerçek zamanlı PZR) [90].

Floresan in-situ hibridizasyon (FISH)

FISH, floresan madde ile işaretlenmiş oligonükleotid problemleri 16S rRNA hedef komplementeri ile hibridizasyon yapması temeline dayanır. Oldukça yüksek sensitiviteye sahip olan bu yöntemde filogenetik tanımlama yapmak mümkündür ancak bilinmeyen türlerin tanımlanması mümkün değildir [87].

Akım sitometri (FS)

Yöntemin temeli, bir kapillerin içinden akan hücrelerin özelliklerinin lazer ışını ile aydınlatılan bir bölgeden geçerken belirlenmesi esasına dayanır. Bu yöntem, mikrobiyotanın hem niteliksel hem de niceliksel tanımlanmasına imkan tanır. Hücrelerin,

boyut, moleküler durumu ve yoğunluğu hakkında bilgi verir. Zaman yönünden oldukça avantajlı bir yöntemdir. Ayrıca DNA ekstraksiyonuna ve amplifikasyona ihtiyaç duymayan bir yöntemdir. Ancak bu yöntem sıvı örneklerle çalışılabilmekte ve sonuçların yorumlanması için oldukça komplike bir veri analizine ihtiyaç duymaktadır [91].

Kantitatif dot-blot

Bir örnekte bulunan tüm mikrobiyota 16S rRNA toplam sayısı ile ilgili olarak, hedef mikroorganizmanın 16S rRNA sayısının belirlenmesine dayalı bir yöntemdir. Yöntem, hücrelerin metabolik aktivitesi hakkında bilgi vermesine karşın, uygulaması ve sonuçların yorumlanması karmaşıktır [92].

Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA (Random Amplified Polymorphic RAPD)

Bu teknik, DNA belirleyicileri geliştirmek için kullanılan modifiye bir PZR tekniğidir. Tek, kısa ve rasgele bir oligonükleotid primeri kullanarak bilinmeyen DNA dizilerinin çoğaltılması esasına dayanır. Bu nedenle araştırılan örneğin baz dizisinin bilinmesine ihtiyaç yoktur. Kalıp DNA'nın özelliklerini taşıyan bir amplifikasyon bandına sahiptir. Kısa bir süre içinde çok sayıda marker elde edilebilir. Bu PZR amplifikasyon ürünleri (3.0 kb'a kadar) agaoroz jelde (%1,5-2) ayrılabilir ve etidyum bromid ile ürünler görünür hale getirilebilir. Bu tekniğin en önemli avantajları; ucuz ve hızlı olması ve çok gelişmiş aletlere ihtiyaç duymamasıdır [93].

PZR-denatüre gradiyen jel elektroforezi (Denaturing gradient gel electrophoresis, PZR-DGGE) ve PZR-sıcaklık gradiyent elektroforezi (Temperature gradient gel electrophoresis, PZR-TGGE)

PZR-DGGE, mikrobiyota içeriğinde meydana gelen değişimleri göstermek için kullanılan bir yöntemdir. PZR ile amplifiye edilmiş olan 16S rDNA fragmentleri poliakrilamid jel ile ayrılmaktadır. Jel, üre veya formamid gibi denatüre edici bir ajanın gradiyentini içerir. Bu işlem ampikonların ayrılmasına yardımcı olur. Heterodupleks ve farklı guanin ve sitozin içeriğine sahip farklı ampikonlar, farklı noktalarda birbirlerinden ayrılırlar. Gen sekansı, farklı bir denatürasyon noktasında erimeye başlar [87].

PZR-TGGE, PZR-DGGE yöntemine benzerdir, ancak bu yöntem denatüre edici gradiyent jel kullanılmaksızın yapıldığından daha basit ve hızlıdır. Ayrıca bu özellikler PZR-TGGE yönteminin tekrarlanabilir olmasına imkan sağlamaktadır. PZR-TGGE, elektroforez işleminde sıcaklık düzenli bir aralıkta yavaş yavaş artırılarak elektroforez sonunda linear bir sıcaklık gradiyentinin sağlanmasına olanak tanır. Bu yöntemler bakterilerin

yoğunluğunun çalışılmasına olanak sağlamasından dolayı analiz için semikantitasyon veri sağlar [94].

Terminal restriksiyon parçacık uzunluk polimorfizmi (Terminal-restriction fragment, T-RFLP)

Bu yöntem, 16S rRNA genindeki polimorfizmin, analizine göre mikrobiyal yoğunluğun değerlendirilmesinde kullanılan bir yöntemdir. Testin temeli, floresan ile etiketli 16S rRNA geni son PZR ürününün restriksiyon endonükleazı ile saflaştırılmasına dayanmaktadır [95].

Arbitrarily primed (AP) PZR

Bu teknikte, keyfi olarak seçilmiş olan 10-12 bazlık kısa tek bir primer kullanılır. Reaksiyonun uzunluğu, primerin bağlandığı bölgenin yakın homoloji gösteren bölgelere bağlanmasına izin vermek için indirgenir. Ancak test sonunda, çok fazla ürünün amplifiye olması bu testin kısıtlılığını artırır [89].

Mikroçip

Bu metod, çıktıları açısından oldukça güçlü bir yöntemdir. Çünkü bir test içinde binlerce genin analizine olanak tanımaktadır. Bütün genom gen ekspresyonunu izlemek için geliştirilmiş bir yöntemdir. Bu nedenle mikrobiyotaya çalışmalarına sistematik ve kantitatif analiz imkanı tanımaktadır. Floresan ile işaretlenmiş primerlerin mikroarray katı yüzeyde *in situ* olarak genomik DNA veya 16S rRNA sentezlenmesi temeline dayanır. Hedef bakterinin varlığı, floresan maddenin yoğunluğuna göre kantitatif sonuç vermektedir. İnsan mikrobiyotasının evrimi yönünde yapılan çalışmalarda daha 16S rRNA ve küçük alt ünit (small subunit, SSU) rRNA genlerinin baz alındığı filogenetik mikroarrayler kullanılmaktadır [96].

16S rRNA gen sekansı

16S rRNA geni, bütün bakterilerde bulunan ve fonksiyonel olarak korunmuş olan gen dizileridir ve cins ya da tür düzeyinde tanımlama sağlamaktadır. Bilinmeyen bakterilerin tanımlanmasına olanak sağlarken aynı zamanda kantitatif sonuç verebilmesi yöntemin önemli avantajlarından biridir [97].

recA gen dizi analizi

recA geni, genler arası filogenetik ilişkinin belirlenmesinde oldukça duyarlı bir moleküldür. Gen ürünü olan RecA proteini rekombinasyonda ve DNA tamirinde kritik rol almaktadır [98].

Gerçek zamanlı PZR veya kantitatif gerçek zamanlı PZR (Real Time RT-PZR veya Quantitative PZR, qPZR)

Bakteri topluluğunda bakterilerin tanımlanmasına ve kantitasyonuna imkan sağlayan bir yöntemdir. Yöntem oldukça hızlı olup duyarlılığı da yüksektir. Bu özelliklerinden dolayı da oldukça maliyet etkin bir yöntemdir. Ancak yöntem, mikrobiyotada oluşan değişikliklerin izlenmesi için uygun bir yöntem değildir. Ayrıca, bilinen türlere göre primer hazırlandığından bilinmeyen türlerin tanımlanmasında kullanılamaz [99]. Tezde, gerçek zamanlı PZR yöntemi kullanılacağından yöntem 2.9’da daha geniş ve detaylı olarak sunulmuştur.

Kültür bağımlı olmayan yöntemlerin avantaj ve dezavantajları Çizelge 2.2’de yer almaktadır.

Çizelge 2.2. Kültür bağımlı olmayan yöntemlerin avantaj ve dezavantajları

Yöntem	Avantaj	Dezavantaj
qPCR	- Filogenetik tanımlama - Kantitasyon - Hızlı - Yüksek duyarlılık	- PZR bias - Bilinmeyen türlere uygulanamaz - Tek hedef
DGGE/TGGE	- Hızlı - Yarı kantitatif - Örneklerin ileri testler için kullanımına olanak sağlar	- Filogenetik tanımlama yapamaz - PZR bias
T-RFLP	- Hızlı - Yarı kantitatif - Maliyet etkin	- Filogenetik tanımlama yapamaz - PZR bias
FISH	- Filogenetik tanımlama yapabilir - Yarı kantitatif - PZR biası yoktur - Yüksek duyarlılık - In situ tanımlama	- Prob bağımlı dizi - Bilinmeyen türlere uygulanamaz
Mikroarray	- Filogenetik tanımlama yapabilir - Yarı kantitatif - Hızlı	- Çapraz hibridizasyon - PZR bias - Düşük düzeydeki bakterileri için düşük duyarlılık
16S rRNA	- Filogenetik tanımlama - Kantitatif	- PZR bias - Zahmetli - Pahalı - Klonlama bias
Flow Sitometri	- Kantitatif ve kalitatif - Metabolik analiz - Zaman etkin - DNA ekstraksiyonu ve amplifikasyonuna ihtiyaç duymaz - Yüksek doğruluk	- Kompleks analize ihtiyaç duyar - Hücre boyutu bias

Sekans analizi

Bakterinin tür düzeyinde tanımlanması için 16S rRNA analizi altın standart kabul edilmesine rağmen, 1500 veya daha fazla baz çiftinden oluşan 16S rRNA tüm genom bilgisinin tek bir kütüphaneden sekanslanmaya ihtiyacı vardır. Elde edilen bu sekans sonucu da mikroorganizmanın tanımlanması için veritabanı ile karşılaştırılmalıdır. İşlem için doğrudan 16S rRNA ampikonu kullanılabileceği gibi jelden bantların alındığı PZR ile tekrar amplifiye edilmesiyle de kullanılabilir. Sanger dizi analiz yöntemi, yeni nesil sekanslama teknolojilerinde yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Yeni nesil sekanslama teknolojileri hem daha maliyet etkindir hem de zaman kazandırıcıdır [87].

Sanger sekanslama

Son 30 yıldır, saçma tekniği ile Sanger sekanslama yöntemi DNA sekanslama teknikleri arasında altın standart olarak iş görür. İşlem, DNA'nın saflaştırılması, boya ile işaretli dideoksinükleotid trifosfat (ddNTP) ile terminal ucun işaretlenmesi, kapiller elektroforez ve floresan akışı ile floresan maddenin tespiti basamaklarında gerçekleşir. Dideoksinükleotid trifosfat 3' OH ucu içermez ve zincirin uzamasını engeller. Bu yöntem yaklaşık 800 baz ve daha uzun baz dizilerinin okunmasına imkan tanır, Genellikle 700 baz veya daha düşük baz dizilerinin okunmasında hatalar verebilmektedir. Bağırsak mikrobiyotası dahil birçok çalışma alanında Sanger sekanslama yöntemi bilime katkı sunmuştur. Ancak Sangerin uzun baz dizilerinde okuma yapması, test maliyetinin yüksek olması yöntemin dezavantajları arasında yer almaktadır [87].

Shutgon yöntemi uzun DNA parçalarının sekanslanmasında kullanılır. Sanger yöntemi ile tek seferde analizi mümkün olmayan uzun DNA parçaları daha küçük parçalara bölünür. Parçaların her biri plazmide klonlanır ve bu hali ile plazmidler dizilenir ve biyoinformatik analizler parçaları bir araya getirilerek büyük bir DNA molkelünün sekanslanması sağlanır [100].

Yeni Nesil Sekanslama

Pirodizileme

Pirodizileme, DNA polimeraz aktivitesinin kemilüminesans bir enzim aracılığı ile tespitine dayanan bir yöntemdir. Bu yöntemde dizileme reaksiyonu, DNA'nın tek sarmalı üzerinde tamamlayıcı sarmalın sentezlenmesi ile gerçekleşir. Öncelikle çift iplikli DNA küçük parçalara ayrılır. Bu küçük parçalara, sekanslama primerlerini taşıyan adaptörler eklenir. Mikroreaktörler içerisinde DNA parçalarının emülsiyon bazlı klonal amplifikasyonu sağlanır. Sekanslama primerleri ile sabitlenmiş olan tek sarmallı kalıp DNA, ardışık olarak akan A, G, S ve T nükleotidleri kalıp DNA dizisindeki tamamlayıcısı ile karşılaştığında bir ışık oluşur. Hangi nükleotidin bağlanması sırasında kemilüminisans sinyalin oluştuğu tespit edilir. Ayrıca nükleotid akışı sırasında tamamlayıcı nükleotidin tutunması sırasında DNA polimeraz pirofosfat (PPi) açığa çıkmasını sağlar. PPi, ATP sülfirilaz enzimi yarımı ile ATP'ye dönüştürülür ve oluşan ATP, lüsiferaz enzimi ile lüsiferini oksilüsiferine dönüştürür. Işığın şiddeti oluşan ATP miktarı ile doğru orantılıdır ve ışık CCD kamera yardımı ile kaydedilir. Elde edilen veriler bilgisayar programı yardımı ile sekanslamayı ortaya koyar [101].

Geri dönüşümlü terminatör dizileme

DNA molekülleri öncelikle slide üzerindeki primerlere bağlanıp amplifiye edilir. Pirodizilemeden farklı olarak DNA, her yıkamadan sonra, bir nükleotid uzar. Floresan işaretli nükleotidler kamera aracılığı ile tespit edildikten sonra, 3' ucundaki sonlandırıcı kimyasal olarak çıkartılır ve sonraki sıklusa geçilir [102].

Ligasyon yoluyla dizileme

Bu yöntemde, pirodizilemede olduğu gibi emülsiyon PZR ile yapılır. Farklı olarak DNA polimeraz yerine DNA ligaz enzimi kullanılır [103].

Ion Torrent Dizileme

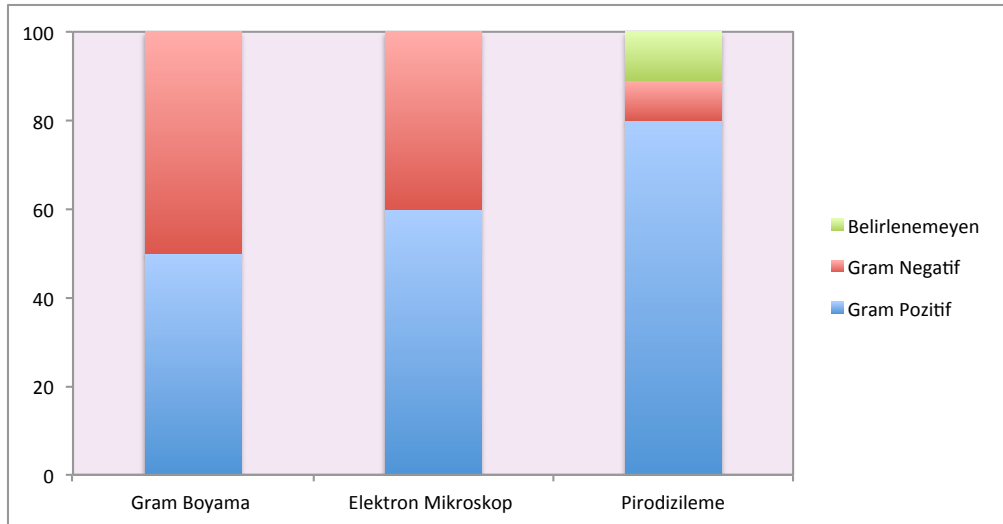
DNA polimerizasyonu sırasında açığa çıkan hidrojen iyonlarının hipersensitif iyon sensörleri tarafından algılanmasına dayanan bir yöntemdir [104].

Gerçek zamanlı dizileme

Bu yöntemde, DNA polimerizasyonu gerçek zamanlı olarak gözlenir ve sentez yoluyla dizileme temeline dayanır. Molekülün kendisi sensör olarak kullanılır [105]. Şekil 2. 14'de mikrobiyota analiz yöntemlerinin bakteri tanımlamasında ki doğruluk oranları ile Çizelge 2.3'de sekanslama yöntemlerinin birbirine göre avantaj ve dezavantajları yer almaktadır.

Çizelge 2.3. Sekans yöntemlerinin avantaj ve dezavantajları

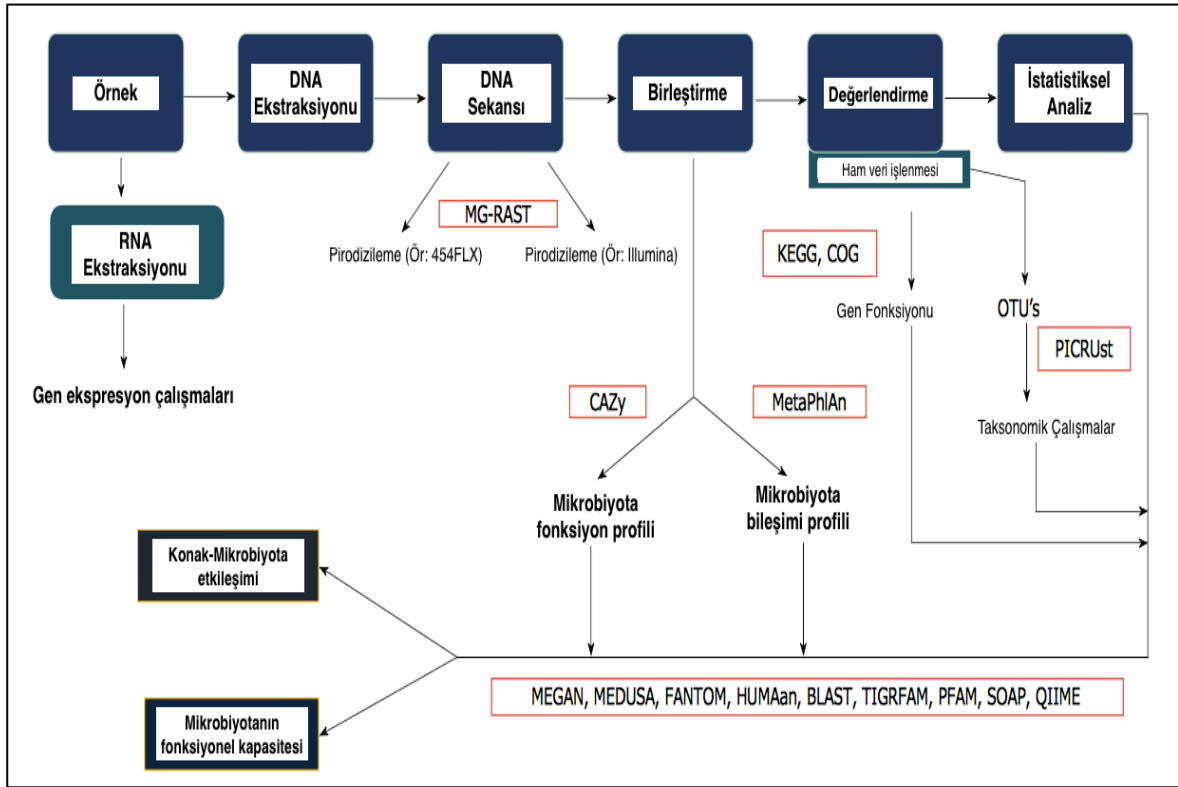
Yöntem (Üretici firma)	Avantaj	Dezavantaj
Pirodizileme (454 GS FLX+, Roche)	- Okuma süresi uzundur - Yüksek verimlilik - Duyarlı - Aynı zamanda birden fazla örneği analit etme imkanı - Koloni biası yoktur	- Yüksek maliyet - Homopolimerlerde yüksek hata oranı - Kısa sekans okuma - Kapsamlı biyoinformatik analize ihtiyaç duyar
Geri dönüşümlü terminatör dizileme (HiSeq2000/2500, Illumina)	- Etkili - Okuma sürelerini iyileştiren süreklilik - Yüksek verimlilik - Manuel iş azlığı	- Uzun çalışma süresi - Kısa okuma uzunlukları - Yükseltme geliştirilme aşamasındadır
Ligasyon (5500xl SOLiD, Life Technologies)	- Düşük hata oranı - Yüksek verimlilik	- Çok kısa uzunluklar - Uzun çalışma süresi
Gerçek zamanlı sekans (PacBio RS, Pacific Bioscience)	- Örnek hazırlaması kolay - Reaktif maliyeti düşük - Çok uzun okuma uzunluğu	- Hata oranı yüksek - Sistem maliyeti yüksek - Sistem kurulumu zordur
Ion Torrent Dizileme (Ion torrent, Life Technologies)	- Kısa okuma süresi - Esnek çip reaktifler	Enstrüman geliştirilme aşamasında



Şekil 2.14. Analiz yöntemlerinin bakteri tanımlama düzeylerinin karşılaştırması [90]

Biyoinformatik analiz

Sekans sonrası elde edilen ürün, genellikle çok büyük hacimli, gürültülü, kontamine haldedir. Biyoinformatik analizler, bakteriyel tanımlama için verinin temizlenmesini ve hazır hale getirilmesini sağlar. Ayrıca biyoinformatik analizlerden sadece tanımlama değil, metabolik fonksiyonlar hakkında da bilgi sağlamak mümkündür. Sekans verilerinin istatistik analizi, aynı bireydeki türlerin farklılığını tanımlayan alfa farklılık ve bireyler arası tür farklılıklarını ortaya koyan beta farklılıkları da açığa çıkarır [66]. Şekil 2.15’de mikrobiyota analizinde biyoinformatik iş akışı özetlenmiştir.



Şekil 2.15. Mikrobiyota analizinde biyoinformatik analizler (MG-RAST: Metagenomics rapid annotation using subsystem technology; CAZy: Carbohydrate active-enzymes; MetaPhlAn: Metagenomic phylogenetic analysis; KEGG: Kyoto encyclopaedia for genes and genomics; COG: Clusters of orthologous group; PICRUSt: Phylogenetic investigation of communities by reconstruction of unobserved states; MEGAN: Meta genome analyzer; MEDUSA: Metagenomic data utilization and analysis; FANTOM: Functional annotation and taxonomic analysis of metagenomes; HUMAan: Human microbiome project unified metabolic analysis network; BLAST: Basic local alignment search tool; TIGRFAM: Protein sequence classification; PFAM: Protein families; SOAP: Short oligonucleotide analysis package; QIIME: Quantitative insights into microbial ecology.)

2.9. Kantitatif gerçek zamanlı PZR (qPZR)

Polimeraz zincir reaksiyonlarının başarısı kalıp DNA konsantrasyonu ile doğrudan ilişkilidir. Bu nedenle, ürün miktarının bilinmesi önemlidir. Konvansiyonel PZR’da amplifikasyon ürünün ölçülmesi, “son nokta, end point” yöntemi ile reaksiyon bittikten sonra plato fazında elde edilen ürüne göre gerçekleşmektedir. Ancak PZR reaksiyonunda, düşük ilk kopya miktarı içeren örnek ile yüksek ilk kopya miktarı içeren örnek aynı plato seviyesine ulaşabilmektedir. Bu durumda, başlangıç kopya miktarına göre amplifikasyon etkinliğini ifade etmek yanlışlıklara neden olabilecektir. [106]. Sağlıklı bir kantitasyon yapmak, kontaminasyonu en aza indirmek, test süresini kısaltmak ve testin özgüllüğünü arttırmak için gerçek zamanlı PZR formatı geliştirilmiştir [107].

Gerçek zamanlı PZR, kantitatif gerçek zamanlı PZR (Quantification Real Time, qPZR) olarak da tanımlanabilmektedir. Amplifikasyon ürününün her amplifikasyon sonunda ölçülmesinden dolayı yöntem “gerçek zamanlı (real time)” yaklaşımı kazanmaktadır. Yöntemde, çift sarmallı DNA’ya yapışan floresan boyalar veya DNA ile birleştiğinde floresan veren oligonükleotidler kullanılmaktadır. Amplikon miktarı, reaksiyon sonunda oluşan floresan sinyal ile ölçülmektedir. Sıcaklık döngüleri ve floresan okuması aynı cihaz içinde ve aynı tüp içinde gerçekleştiğinden hem testin süresi kısaltmakta hem de kontaminasyon riski en aza indirilmektedir. Amplifikasyonun ilk 30 siklusunun 30 dakika içinde gerçekleşmesi sağlanarak da yöntemin duyarlılığı arttırılmıştır. Ayrıca kapiller tüplerin kullanılmasıyla siklus süresi bir dakikadan daha kısa süreye düşürülmüştür [108].

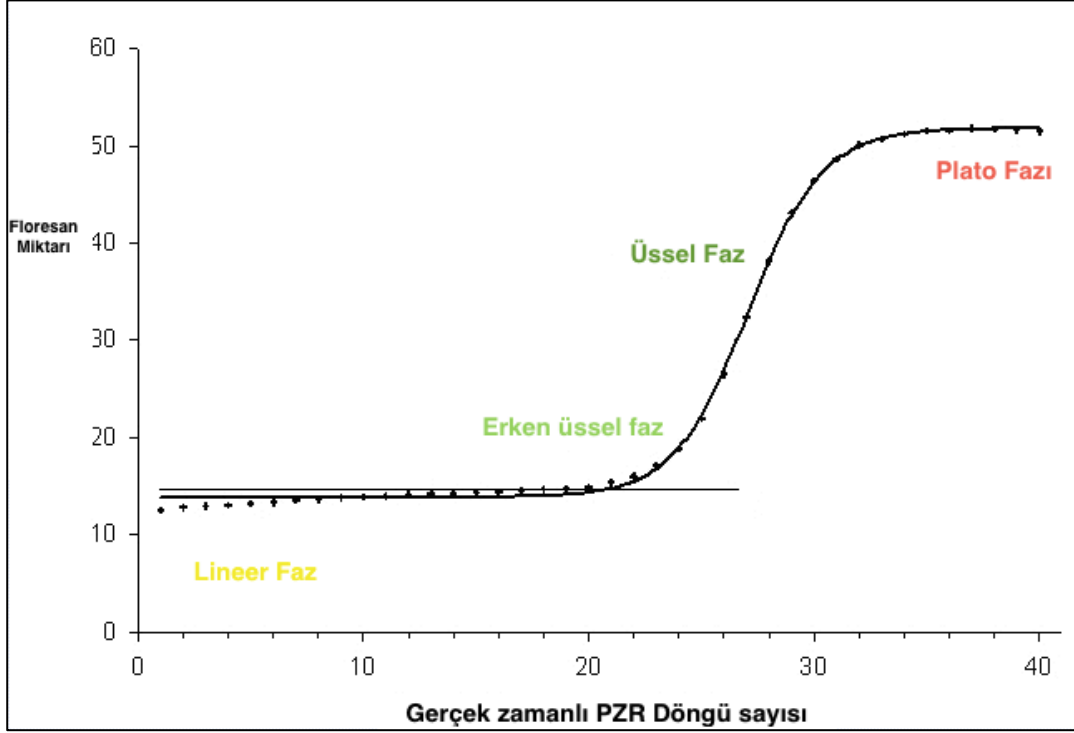
2.9.1. qPZR’nin aşamaları

Gerçek zamanlı PZR’da 4 ana faz bulunmaktadır:

- Lineer Faz: Başlangıç aşamasıdır ve yaklaşık 10-15 döngü sürer ve bu fazda reaksiyon çok hızlı ilerlese de, çoğalma miktarı tespit sınırlarının altında olup hesaplama yapılamaz
- Erken Üssel Faz: Bu faz, artış miktarının tespit edildiği sınırdır. Artış miktarı belirli bir eşik seviyeye ulaşır. Bu seviyeye Ct (Treshold Cycle, Eşik döngü) ya da CP (Crossing Point, Kesişme noktası) adı verilmektedir. Bu değer reaksiyona eklenen kalıp kopya sayısının hesaplanmasında kullanıldığı için önemlidir.
- Üssel Faz: Bu fazda DNA miktarı hızla artar.

- Plato Fazı: Bu fazda artış miktarı, reaktiflerin azalması, ürün miktarının artması ve primer-kalıp yerine kalıp-kalıp bağlanmalarının başlamasından dolayı, azalır [109, 110].

Şekil 2.16’da konvansiyonel PZR ile gerçek zamanlı PZR fazları gösterilmektedir.



Şekil 2.16. Gerçek zamanlı PZR fazları

2.9.2. qPZR’de eşik değerin hesaplanması ve standart eğrinin çizilmesi

Gerçek zamanlı PZR’de son ürün $N_n = N_0 \times 2^n$ formülüne göre hesaplanmaktadır. Bu formül aslında şartlar optimal ve sabit kabul edildiğinde doğrudur ve bu formüle göre her siklusta ürün replike olmaktadır. Test tüpünde ise sürecin her aşamasında bu mükemmellik sağlanmamaktadır. Reaksiyon sırasında birçok faktörün etkisi ile optimal durumdan uzaklaşılır. Bu durumda, yani lag fazından sonra ürün miktarının hesaplanmasında $N_n = N_0 \times (E_{\text{sabit}})^n$ formülü kullanılır. Reaksiyonun en mükemmel olduğu varsayılan üssel fazda uygulanır. Plato fazına gelindiğinde ise doğru ölçümler yapabilmek imkansız hale gelir ve $N_n = N_0 \times (E_{\text{değişken}})^n$ formülüne göre hesaplama yapılır [111-113].

N_n : n döngüsündeki PZR ürün miktarı

N_0 : başlangıçtaki molekül sayısı

E: amplifikasyon etkinliği

ⁿ: döngü sayısı

PZR ürününün görünür hale gelebilmesi için 10^{11} - 10^{12} kadar ürünün oluşması gerekmektedir. İlk ürün miktarına bağlı olarak ürünün saptanma miktarına ulaşması farklı sayıda döngülerde gerçekleşeceğinden her örneğin Ct veya CP değeri farklılık göstermektedir. Eşik değeri; amplifikasyonda ölçülebilen en düşük floresan değeridir yani, amplifikasyon eğrisinin doğrusal artış fazına geçtiği en alt sınırdır. Başlangıçtaki hedef sayısı bilenen standartlar çalışılarak bu doğrusal ilişkiye göre “standart eğri” çizilir. Standartlarla çizilen bu eğri üzerindeki pozisyonuna göre bilinmeyen örnekte başlangıçta bulunan hedef miktarı saptanabilir. [111].

2.9.3. qPZR’da kullanılan problar

Gerçek zamanlı PZR tekniğinde PZR ürünü floresan boyalar kullanılarak ölçülmektedir. Doğrudan çift zincirli DNA’ya bağlanan boyalar sıklıkla kullanılmıştır. Reaksiyon sürecinde boya artefaktları, testte yalancı okumalara neden olabilmektedir. Ancak çok güçlü sinyal vermelerinden dolayı arkaplan gürültüsünden daha kolay arınırlar. Bu nedenle, problemlerin yüksek sinyal üretecek şekilde tasarlanması önemlidir. Çift sarmal DNA boyalarının dezavantajlarını önlemek için işarteli problemler kullanıma girmiştir [114-116].

Gerçek zamanlı PZR’nin ana amacı kantitasyon yapmak olduğundan dolayı, prob hazırlanmasında bazı durumların göz önünde bulundurulması gerekir:

- Problemler, primerlerin bağlanacağı bölgeden daha uzak bir bölgeye bağlanması tercih edilmelidir. Aksi halde amplifikasyonun başlaması ile hedef bölge kapanabilir.
- Problemlerin Tm değerleri, primerlerin Tm değerlerine göre 5-10 °C daha yüksek olmalıdır. Çünkü primerlerin problemlere göre bağlanma yeteneği daha fazladır ve problemlerin bağlanması engellenebilir.
- Floresan sinyal, PZR’ın annealing aşamasında gerçekleştiğinden bu aşamadan daha önce prob bağlanmalıdır. Bu nedenle prob Tm değeri, reaksiyonun bağlanma aşamasında ki Tm değerinden daha yüksek olmalıdır.
- Yine problemlerin Tm değerleri amplifikasyon sıcaklığını aşmamalıdır. Aksi halde zincirden ayrılmayan problemler sentezi engelleyebilirler [115].

DNA’ya özgül olmadan bağlanan boyalarla saptama

Bu tip problemler, çift zincirli DNA'ya özgül olmadan bağlanırlar. Bu boyalar içinde en sık kullanılanı “SYBER Green I” ve “SYBER Gold”dur. Bu boyalar çift zincirli DNA'nın arasına doğrudan girerek 20-100 katlık floresan ısınma artışı olur ve oluşan bu artış cihaz tarafından algılanır. SYBER Green I sadece çift zincirli DNA'ya bağlandığında floresan verir. Bu test için bir dezavantajdır. Çünkü, hedef DNA bulunmadığı durumlarda da primerlerin kendi aralarında ki nonspesifik primer dimerler arasına da girebilirler ve amplifikasyon olmamasına rağmen floresan artışı izlenebilir. Floresan artışının ürün kaynaklı olup olmadığını anlamak için “erime eğrisi, (melting curve)” analizi yapılarak bu sorun çözülebilir. Erime eğrisi analizi, “erime sıcaklığı, (melting temperature), T_m”ye göre yapılır. Erime sıcaklığı; çift sarmal DNA'nın %50'sinin tek sarmal hale geçmesi için gereken sıcaklık olup her çift sarmal kendine özgü T_m değerine sahiptir. Amplifikasyon işlemi tamamlandıktan sonra, sıcaklık yavaş yavaş yükseltilerek SYBER Green I boyasının çift sarmal DNA'dan ayrılması sağlanır. Bu şekilde reaksiyonun floresan miktarı azalır. Bu şekilde hazırlanan erime eğrisinden T_m değeri hesaplanır. Reaksiyonda kullanılan pozitif kontrolün T_m değeri ile karşılaştırılarak hedef bölgenin amplifikasyonunun gerçekleşip gerçekleşmediği tespit edilebilir [115, 117].

DNA'ya özgül olarak bağlanan boylarla saptama

Bu tip boyanmada çoğaltılmış ürünün tamamı değil, ürün içinde ki özgül bir bölgeye bağlanır. Bu yöntem aslında hedef bölgenin dolaylı bir gösterim yöntemidir.

Floresan Resonans Enerji Transferi (FRET)

Özgül problemlerden biri, 3' ucundan verici boya ile diğeri ise 5' ucunda alıcı boya ile işaretlidir. Uzunlukları yaklaşık 30 nükleotid kadardır. Bağlanma sonrasında, ikinci probun 5' ucundan sentez olmaması için fosfat bağlanmıştır. Bu tip problemler hedef bölge üzerinde birbirine 1-5 nükleotidlik uzaklıkta bağlanır ve işaretli uçlar birbirine çok yakın mesafede yer alır. İki boyanın yan yana gelmesi ile açığa çıkan enerji ikinci prob üzerinde ki boyayı aktif hale getirir. Bu aktifleşme ile floresan yayılır ve oluşan floresan miktarı amplifikasyon ürünü ile doğru orantılıdır. PZR döngüsünde bu problemler hedefe düşük sıcaklıkta bağlanır, yüksek sıcaklıkta probdan ayrılır. Böylelikle her döngüde DNA miktarı artacağından ışıma miktarı da artar [115, 116].

TaqMan Probları

Probların 5' ve 3' uçları florokrom maddelerle işaretlidir. 5' ucunda ilerleyici, 3' ucunda baskılayıcı florokrom bulunur. Prob, tek zincirli DNA üzerinde ki hedef bölge üzerinde primerlerin bağlanma bölgesinin arasında kalan yerlere bağlanır. Hibridizasyon süresince 5'ucundaki florokrom boyanın ışıması 3' florokrom ile baskılanır. Uzama, probun bağlanma noktasına kadar devam eder ve sentezin devamı için TaqDNA Polimeraz 5'-3' ekzonükleaz aktivitesini kullanarak probu 5' ucundan itibaren yıkmaya başlar. Böylece ilerleyici florokrom serbest hale gelir ve floresan ışıma verir. Her bir PZR siklusunda ürün arttıkça flöresan miktarı da artar [115].

Moleküler beacon

Bu problar da TaqMan problemleri gibi 5' ucunda ilerleyici, 3' ucunda baskılayıcı florokroma sahiptir. Ancak TaqMan problemlerinden ayrı olarak moleküler beaconlarda 5' ve 3' uçları bir saç tokasının iki ucunu oluşturacak şekilde bükülmüş bir yapıya sahiptir. Problemlerin hedef DNA'ya bağlanabilmesi için bu yapının tamamen açılması ve doğrusal bir yapı kazanması gerekmektedir. Bu açılmada ilerleyici ve baskılayıcı florokromlar birbirlerinden tamamen ayrılırlar ve bu ayrılma ile bir ışıma meydana gelir [115, 117].

3. MATERİYAL METOT

3.1. Etik kurul onayı

Çalışmaya ait etik kurul onayı Sağlık Bakanlığı Zekai Tahir Burak Kadın Sağlığı Eğitim ve Araştırma Hastanesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından alınmıştır. Çalışmaya dahil edilen kişiler gönüllü olarak çalışmaya katılmayı kabul etmişlerdir. Tüm gönüllüler 18 yaş üzerinde olup gönüllülere Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Gastroenteroloji Kliniği'nde ilgili hekim tarafından çalışma hakkında bilgi verilmiş ve kendi imzaları ile onamları alınmıştır. Etik Kurul onayı EK-1'de sunulmuştur.

3.2. Hastaların seçimi

Çalışmaya Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Gastroenteroloji Bilim Dalı'na başvurmuş, *Helicobacter pylori* ile enfekte olduğu doğrulanmış 39 gönüllü çalışmaya dahil edildi. Gönüllülerden tümünden antibiyotik kullanım öncesi gaita örneği alındı. Antibiyotik kullanımından 6 hafta sonra 18 gönüllü gaita örneği verdi. Toplam 57 gaita örneği çalışıldı.

HP tanısı alan gönüllülerin tümüne 10 günlük proton pompa inhibitörü, tetrasiklin, metronidazol ve bizmut içeren dördü tedavî protokolü uygulandı. Çalışmaya dahil olmayı kabul eden gönüllülerden alınan bilgiler ile Şekil 3.1'de yer alan "Hasta Bilgi Formu" dolduruldu. Son iki hafta içerisinde herhangi bir enfeksiyon için antibiyotik tedavî alan, son 6 ay içerisinde kortikosteroid, prebiyotik ve / veya probiyotik tedavî alan, dışkı örneği veremeyen ya da vermek istemeyen gönüllüler çalışmaya dahil edilmedi. Gönüllülere ait beden kitle indeksi (BKİ), kilogram cinsinden vücut ağırlığının, metre cinsinden boy uzunluğunun karesine bölünmesiyle hesaplandı. Ayrıca gönüllülerin, açlık mg/dL cinsinden glikoz değerleri, uIU/mL açlık insülin değerleri ile çarpılıp çıkan sonucun 405'e bölünmesi ile mg/dL cinsinden HOMO-IR değeri hesaplandı. HOMO-IR skoru $\geq 2,5$ olan gönüllüler insülin direnci pozitif (HOMA-IR(+)) olarak değerlendirildi.

<i>Helicobacter pylori</i> Tedavisinin Mikrobiyota Üzerine Etkisi Çalışması			
Hasta Bilgi Formu			
Sıra No			
Tarih:	Telefon:		
Hastanın Cinsiyeti	☐	Kadın	☐
Hastanın Yaşı			
Sistemik hastalığı var mı?	☐	Yok	
	☐	Diabetes mellitus	
	☐	Astım	
	☐	Hipertansiyon	
	☐	Obezite	
	☐	Kollajen Doku Hastalığı	
	☐	Böbrek Hastalığı	
	☐	Diğer	
Sürekli ilaç kullanımı var mı?	☐	Evet	☐
Son 2 haftada antibiyotik kullanım öyküsü var mı?	☐	Evet	☐
Sigara kullanıyor mu?	☐	Evet	☐
Alkol kullanıyor mu?	☐	Evet	☐
Vücut kitle indeksi belirlenmesi	☐	Kilo	
	☐	Boy	
	☐	Vücut Kite İndeksi	
HOMO-IR değerinin belirlenmesi	☐	12 saat açlık glukoz değeri	
	☐	Açlık insülin değeri	
	☐	HOMO-IR değeri	
Daha önce <i>H.pylori</i> tedavisi için antibiyotik tedavisi aldı mı?	☐	Evet	☐
	☐	6 ay önce	
	☐	1 yıl önce	
	☐	2 yıl ve daha önce	

Şekil 3.1. Hasta bilgi formu

3.3. Örneklerin toplanması

Çalışmaya dahil olmayı kabul eden gönüllülerin gaita örnekleri, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Moleküler Mikrobiyoloji Laboratuvarında toplandı. Tüm gaita örneklerinden 200 mg tartılarak steril endorf tüplere alındı. Antibiyotik kullanımından önce alınan örnekler için “AO”, antibiyotik kullanımından sonra alınan örnekler için “AS” kodu kullanıldı. Alınan örnek sırasına göre 01’den başlamak üzere bir her bir gönüllüye bir numara verildi (AO-01, AO-02, AS-01, AS-02

gibi). Antibiyotik kullanımından önce ve antibiyotik kullanımından sonra alınan tüm gaita örnekleri çalışma gününe kadar -80°C’de saklandı.

3.4. Standart bakteri kültürleri

Bu çalışmada kullanılmış olan standart suşlar; *Akkermansia muciniphila* ATCC BAA-835, *Faecalibacterium prausnitzii* ATCC 27766, *Bifidobacterium breve* ATCC 15700, *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, *Bacteroides fragilis* ATCC 25285 Amerikan tipi standart kültür koleksiyonundan (ATCC) temin edildi. Standart suşların, üretici firma önerileri doğrultusunda kültürleri yapıldı.

3.4.1. *Bifidobacterium breve* ATCC 15700

Bifidobacterium breve ATCC 15700 MRS Agar hazırlanarak anaerobik ortamda 48 saat 37°C’de inkübe edildi. Gram boyama ile gram pozitif pleomorfik basiller gözlemlendi.

3.4.2. *Bacteroides fragilis* ATCC 25285

Bacteroides fragilis ATCC 25285 5 µg/mL hemin ve 0,1 µg/mL Vitamin K1 içeren modifiye kıymalı Brain Heart Infusion (BHI) agar’da besiyerinde anaerobik ortamda 37°C’de inkübe edildi. Üreyen kolonilerden Gram boyama yaparak gram pozitif basiller gözlemlendi.

3.4.3. *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356

Lactobacillus acidophilus ATCC 4356 suşu Man Rogosa Sharpe (MRS) agar’da, 37°C’de anaerobik ortamda bir gece inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda besiyerinde üreyen yuvarlak beyaz kolonilerden Gram boyama yapılarak gram pozitif basil formunda, çoğunlukla zincir yapmış bakteriler gözlemlendi.

MRS Agar hazırlanması; 1 L besiyeri için 10 gr pepton, 10 gr et ekstraktı, 10 gr maya ekstraktı, 20 gr dekstroz, 1 gr Sorbitan Monooleate (veya 1 mL Tween 80), 2 gr amonyum sitrat, 5 gr sodyum asetat, 0,05 gr manganaz sülfat monohidrat (MnSo₄.H₂O), 2 gr disodyum hidrojen fosfat, 15 gr agar (BactoAgar, Difco) eklenerek distile su ile 1 L’ye tamamlanıp 121°C’de otoklavlandı [118].

3.4.4. *Akkermansia muciniphila* ATCC BAA-835

Akkermansia muciniphila ATCC BAA-835 suşu 5 µg/mL hemin ve 0,1 µg/mL Vitamin K1 içeren Brain Heart Infusion (BHI) agar’da, 37°C’de anaerobik ortamda 4-7 gün süreyle

inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda besiyerinde grimsi, opak koloniler gözlemlendi. Gram boyama yapılarak gram negatif oval bakterilerin varlığı gözlemlendi.

3.4.5. *Faecalibacterium praustnitzii* ATCC 27766

Faecalibacterium praustnitzii ATCC 27766 kültürü için %30 rumen sıvısı içeren M2GSC besiyeri hazırlandı. Anaerobik koşullarda 37°C’de 2-3 gün inkübe edildi. İnkübasyon sonunda küçük, şeffaf, düzensiz, zayıf üremiş olan kolonilerden Gram boyama yapılarak gram negatif basillerin varlığı gözlemlendi

M2GSC Besiyerinin hazırlanması; Besiyerinin 1 L’si için 10 gr Tripton, 2,5 gr maya ekstraktı, 4 gr sodyum bikarbonat, 2 gr dekstrozu, 2 gr sellobiozu, 2 gr çözünür nişasta, 1 gr L-sistein, 0,45 gr dipotasyum fosfat, 0,45 gr potasyum hidrojen fosfat, 0,9 gr amonyum sülfat, 0,9 gr sodyum klorür, 0,09 gr MgSO₄.7H₂O, 0,09 gr kalsiyum klorür, 1 mg resazurin, 1 mg biotin karıştırılarak %30 süzülmüş rumen sıvısı eklendi ve 1 L’ye distile suya tamamlanıp 121°C’de otoklavlandı [119].

Her bir kültürlerden yapılan ekstraksiyonlardan PZR yapıp agaroz jelde görüntülendi. Her bir bakteri için spesifik bant varlığı gözlemlendi. Polimeraz zincir reaksiyonunda, kullanılan spesifik primerler kullanılarak çoğaltılan bölge büyüklüğü ile reaksiyonda kullanılan sıcaklıklar Çizelge 3.1’de yer almaktadır.

Çizelge 3.1. Standart suşlara ait primerler, hedef bölge büyüklüğü ve PZR sıcaklığı

Bakteri Adı	Primer Adı	Primer Dizisi (5'→3')	Hedef Bölge Büyüklüğü (bp)	Annealing Sıcaklığı (°C)	Referans
<i>Bifidobacterium spp.</i>	g-Bifid-F	CTCCTGGAAACGGGTGG	550	55	[120]
	g-Bifid-R	GGTGTCTCTCCGATATCTACA			
<i>Bacteroides fragilis grup</i>	g-Bfra-F	ATAGCCTTTCGAAAGRAAGAT	495	50	[120]
	g-Bfra-R	CCAGTATCAACTGCAATTTTA			
<i>Lactobacillus spp.</i>	Lact-F	AGCAGTAGGGAATCTTCCA	341	50	[121]
	Lact-R	CACCGCTACACATGGAG			
<i>Akkermancia mucinophilia</i>	AM-1	CAGCACGTGAAGGTGGGGAC	327	60	[122]
	AM-2	CCTTGCGGTTGGCTTCAGAT			
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	Fprau223F	GATGGCCTCGCGTCCGATTAG	199	58	[123]
	Fprau420R	CCGAAGACCTTCTTCCTCC			

3.5. q PZR analizleri ve eksternal standartların hazırlanması

Üreyen bakteri kolonilerinden 2-3 öze dolusu toplanarak potasyum fosfat tampon çözeltisi (PBS) içine alındı. PBS içindeki saf bakteri DNA'ları High-Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) kullanılarak izole edildi. DNA izolatları çalışma gününe kadar -20°C'de saklandı.

Ekstraksiyonu yapılan DNA'ların miktarı A_{260} 'daki absorbansı MaestroNano, (Maestrogen, İtalya) cihazında 3 ölçüm sonucu alınan ortalama ile belirlendi. DNA miktarları belirlenen örneklerin içerdiği DNA kopya sayısı aşağıdaki formüle göre belirlendi.

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

$$MA = baz\ çifti\ sayısı \times 660\ dalton/baz\ çifti$$

Yukarıdaki formüle göre her bakterinin DNA izolatu için ölçülen ng miktarı baz alınarak hesaplanan kopya sayıları Çizelge 3.2’de yer almaktadır. İlgili standart bakterilerin tüm genom baz çifti (bç) sayısı Pubmed Nükleotid Blast veritabanı kullanılarak belirlendi (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Çizelge 3.2. Kullanılan bakteri standartlarının kopya sayıları

Bakteri Adı	DNA miktarı (ng)	Baz çifti sayısı (bp)	DNA kopya sayısı/ μL
<i>B. breve</i>	117,2	2294458	$4,6 \times 10^7$
<i>B. fragilis</i>	167,3	5205140	3×10^5
<i>L. acidophilus</i>	138,8	2078001	7×10^6
<i>A. muciniphila</i>	40,6	2664102	$1,38 \times 10^7$
<i>F. praustnitzii</i>	47,3	3321367	$1,3 \times 10^7$

Her bakteri standardı için ilk standarttan nükleaz içermeyen su ile 1/10, 1/100, 1/1000, 1/10000, 1/100000 dilüsyonlar hazırlanarak Rotor Gene 3000 PZR cihazında (Qiagen, Almanya) her bakteriye özgül primer dizileri kullanılarak çalışıldı ve en az 3 standart kullanılarak standart eğriler oluşturuldu. İlgili bakterilerin 16S rRNA’ya spesifik primer dizileri literatür taraması yapılarak gen bankasında bulunan 16S rRNA DNA dizilerinden seçildi. Klinik örneklerdeki bakterilerin kopya sayısı oluşturulan standart eğriler kullanılarak belirlendi. Seçilen dizilerinin hedef bölgelerine uyumlu olup olmadığı Primer Blast veritabanı (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>) kullanılarak doğrulandı. Primer dizileri ve bağlanma sıcaklıkları Çizelge 3.1’de yer almaktadır.

3.6. Gaita örneklerinden DNA ekstraksiyonu

Gaitada fazla miktarda DNA izolasyon inhibitörlerinin varlığından dolayı gönüllülerden alınan antibiyotik kullanım öncesi ve antibiyotik kullanım sonrası gaita örneklerinden DNA izolasyon işlemi için, özel gaitadan ekstraksiyon kiti kullanıldı (QIAmp DNA Stool Mini Kit, QIAgen, Hilden Germany). Kitin, gaita tüp protokolüne (Protocol: Using Stool Tubes for Isolation of DNA from Stool for Human DNA Analysis) göre ekstraksiyon işlemi yapıldı. Protokole göre ekstraksiyon işlemi oda sıcaklığında (15-29°C) ve santrifüj süreçleri 20,000g (14,000 rpm)'de gerçekleştirildi. Test başlamadan önce üretici firma önerileri doğrultusuna göre Buffer AW1 ve AW2 hazırlandı. Buffer AW1 ve AW2 kullanım öncesi mutlaka homojenize etmek için karıştırıldı. Ekstraksiyon işlemi aşağıda belirtilen protokole göre gerçekleştirildi:

1. İçinde 200 mg gaita örneği bulunan tüplerin buz aküsü üzerine yerleştirildi.
2. Her bir tüpün üzerine 2.6 mL Buffer ASL eklendi. Tampon eklenirken tüpün kenarlarındaki örnekleri alabilmek için pipetleme yapılarak kapak kısmı yıkandı. Gaita örneği tampon içinde, homojenize bir karışım haline gelinceye kadar kuvvetli ve devamlı bir şekilde vortekslendi.
3. Örnek kodunun yazıldığı 2 mL'lik mikrosantrifüj tüplerinin içerisine gaita lizatının 2mL'si aktarıldı.
4. Dışkı partiküllerinin çökmesi için 1 dakika boyunca santrifüj edildi.
5. 1,4 mL süpernatant yeni bir 2mL'lik mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. Pellet atıldı.
6. Her bir tüp içine bir adet InhibitEX tableti eklendi ve tablet eriyinceye kadar hızla vortekslendi. Bu aşamada InhibitEX matriksinin tüm inhibitörleri adsorbe etmesi için 1 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
7. InhibitEx matriksine tutunmuş olan tüm inhibitörleri örnekten uzaklaştırmak için 3 dakika santrifüj işlemi yapıldı. Bu aşamadan sonra gözle değerlendirme yapıldı. Santrifüj süresi yetersiz olduğu düşünülen tüpler üretici firmanın önerileri doğrultusunda 3 dakika daha santrifüj işlemine tabi tutuldu.
8. Bu işlemten sonra hızla süpernatant toplanıp 1,5 mL'lik mikrosantrifüj tüplerine alındı. Pellet atıldı.
9. 25 µL proteinaz K 2 mL'lik yeni bir mikrosantrifüj tüpüne kondu.
10. Proteinaz K içeren tüp içerisine 7. basamakta elde edilen üründen 600 µL eklendi.
11. Üzerine 600 µL Buffer AL eklendi ve 15 saniye vortekslendi.
12. Bu tüp 70°C'de 10 dakika inkübe edildi.

13. Lisata 600 µL %96-100'lük etanol eklendi ve vortekslenerek karıştırıldı.
14. 2 mL'lik toplama tüpü içerisine yeni ve kapağına hasta kodu yazılmış olan QIAamp spin kolon kondu. 13. basamaktan elde edilen lizattan 600 µL QIAamp spin kolona eklendi. Kapak kapatılıp 1 dakika santrifüj edildi. QIAamp spin kolon yeni bir 2 mL'lik toplama tüpüne alındı. Bu aşamada spin kolon tam olarak boşalmamışsa santrifüj işlemine kolon tamamen boşalıncaya kadar devam edildi.
15. Spin kolonun ağzı dikkatlice açılarak üzerine alikotlanmış olan lizatın ikinci 600 µL'si eklendi ve 1 dakika santrifüj edildi. QIAamp spin kolon yeni bir 2 mL'lik toplama tüpüne alındı. Filtreyi içeren tüp atıldı.
16. Alikotlanmış lizatın üçüncü 600 µL'si için 15. basamak tekrarlandı.
17. Spin kolonun ağzı dikkatlice açılarak 500 µL Buffer AW1 eklendi. Kapak kapatılıp 1 dakika santrifüj edildi. QIAamp spin kolon yeni bir 2 mL'lik toplama tüpüne alındı ve filtrat içeren toplama tüpü atıldı.
18. Spin kolonun ağzı dikkatlice açıldı ve üzerine 500 µL Buffer AW2 eklendi. Kapak kapatılıp 3 dakika santrifüj edildi. Filtrat içeren toplama tüpü atıldı.
19. Spin kolon yeni bir 2 mL'lik toplama tüpüne alındı ve 1 dakika santrifüj edildi.
20. Spin kolon yeni ve örnek kodunun yazıldığı 1,5 mL'lik mikrosantrifüj tüpüne alındı. Spin kolonun kapağı dikkatlice açılarak içine 200 µL Buffer AE doğrudan QIAamp membranı üzerine eklendi. Kapağı kapatılıp 1 dakika oda ısısında inkübe edildi. Daha sonra DNA için 1 dakika santrifüj edildi.
21. Elde edilen örnekler gerçek zamanlı PZR testi çalışılınca kadar -20°C'de saklandı.

3.7. qPZR metodu

Kantitasyon için amplifikasyon reaksiyonu Rotor Gene 6000 cihazında (Qiagen, Almanya) Sybr Green (RT² SYBR Green qPCR, Qiagen, Almanya) kullanılarak gerçekleştirildi. Her bir örnek için toplam hacmi 25 µL olan amplifikasyon karışımı hazırlandı:

- 12,5 µL qPZR Mastermix
- 1,0 µL P1
- 1,0 µL P2
- 8,0 µL ddH₂O
- 2,5 µL örnek

Gerçek zamanlı PZR için belirlenen amplifikasyon koşulları Çizelge 3.3'de yer almaktadır.

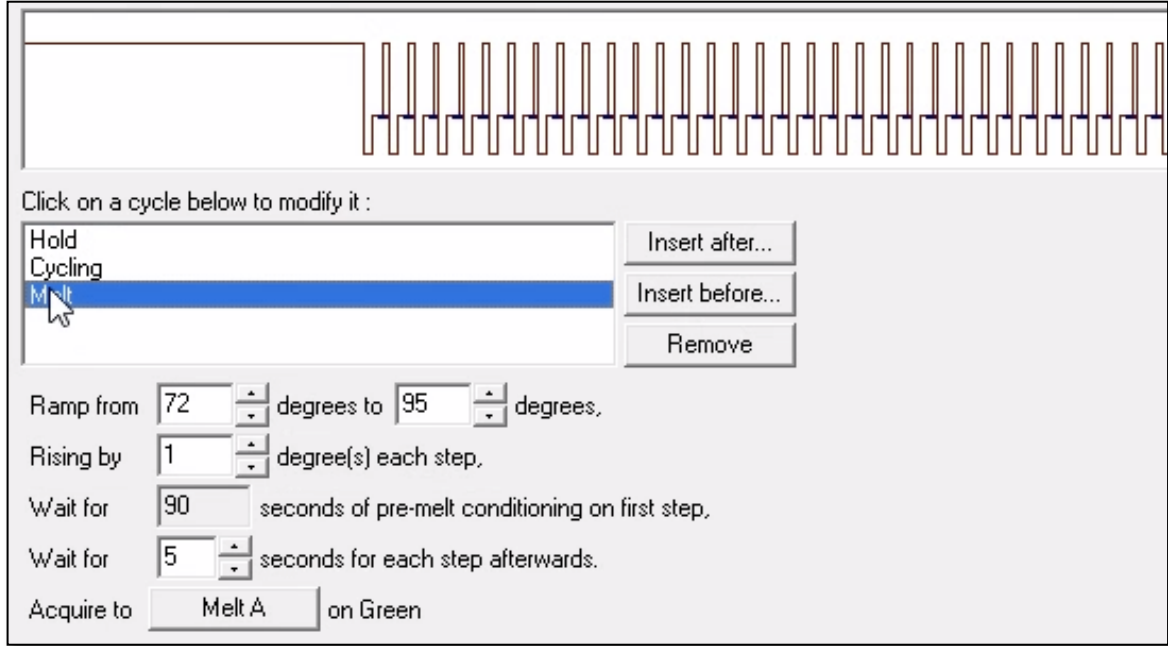
Çizelge 3.3. Gerçek zamanlı PZR amplifikasyon koşulları

Döngü sayısı	Süre	Isı
1	10 dakika	95°C
	10 saniye	95°C
55	1 dakika	55°C*

* Her bir etkene uygun bağlanma ısısı seçildi ve SYBR Green kanalında floresans okuma yapıldı. Her bir bakteri için uygun bağlanma ısısı Çizelge 3.1’te yer almaktadır.

3.8. Melting curve (erime eğrisi) analizi:

qPZR ile edilen floresan ışımların hedef bölgenin amplifikasyonu ile mi gerçekleştiği, yoksa özgül olmayan bir ürün mü olduğunu anlayabilmek için her örnek için “melting curve” (erime eğrisi) analizi yapıldı (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Erime eğrisi analizi programı

3.9. İstatistiksel analiz

Veriler Mikrosoft Excel’e girilerek log bakteriyel miktarı hesaplandı. Verilerin değerlendirilmesi SPSS 22.0 paket programı kullanılarak yapıldı. Ortalama ve yüzde değerler hesaplanarak gerekli kıyaslamalar yapıldı. Antibiyotik kullanım öncesi ve antibiyotik kullanım sonrası ile ilgili verilerin ortalamaları $p < 0,05$ anlamlı kabul edilerek Mann-Whitney U Testi ile değerlendirildi.

4. BULGULAR

4.1. Çalışmaya katılanlara ait demografik bilgiler

Çalışmaya katılmayı kabul eden ve HP tanısı konan 39 gönüllüye çalışma hakkında bilgi verildi ve çalışmaya kendi rızaları ile katıldıklarına dair onam formu alındı. Bu hastaların tümüne 10 günlük PPI+tetrasiklin+metronidazol+bizmut dördütlü tedavi protokolü uygulandı. Antibiyotik tedavisi sonrası 6. haftada yeni gaita örnekleri toplandı. Ancak gönüllülerin sadece 18 (%46,15)'i antibiyotik tedavi sonrası gaita örneği verdi.

Çalışmaya dahil olan gönüllülerin 13 (%33,33)'ü erkek ve 26 (%66,67)'sı kadın idi. Gönüllülerin yaş ortalaması $45 \pm 15,76$ olarak tespit edildi (erkek $52 \pm 15,89$, kadın $42 \pm 15,71$).

Gönüllülerin 22 (%56,41)'sinin herhangi bir sistemik hastalığı olmadığı belirlendi. Gönüllülerde en sık belirlenen sistemik hastalıklar sırasıyla; 11 (%28,20) yüksek tansiyon, 6 (%15,38) tip 2 diyabet ve 5 (%12,82) otoimmün hastalıktır. Çalışma grubunda 17 (%43,58) gönüllünün sürekli ilaç kullandığı belirlendi. Antibiyotik kullanmadan önce alınan gaita örneklerinden kantitasyon yapılan tüm bakteriler açısından sistemik bir hastalığı olanlar ile olmayanlar arasında (*Bifidobacterium spp* $p=0,899$, *B. fragilis* $p=0,789$, *Lactobacillus spp* $p=0,989$, *A. mucinophilia* $p=0,671$, *F. prausnitzii* $p=0,590$) ve sürekli ilaç kullananlar ile kullanmayanlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı (*Bifidobacterium spp* $p=0,365$, *B. fragilis* $p=0,570$, *Lactobacillus spp* $p=0,922$, *A. mucinophilia* $p=0,487$, *F. prausnitzii* $p=0,810$).

Çalışmaya dahil olan gönüllülerin BKİ'ne göre dağılımları Çizelge 4.1'de yer almaktadır. Antibiyotik kullanım öncesi alınan gaita örneklerinden kantitasyon yapılan bakteriler açısından BKİ göre zayıf ve şişman gönüllüler arasında anlamlı bir fark tespit edilmedi (*Bifidobacterium spp* ($p=0,508$), *B. fragilis* ($p=0,456$), *Lactobacillus spp* ($p=0,204$), *A. mucinophilia* ($p=0,714$), *F. prausnitzii* ($p=0,714$)).

Çizelge 4.1. Gönüllülerin beden kitle indeksi sınıflamsına göre dağılımları

Beden Kitle İndeksi Sınıflaması*	Sayı (%)
Zayıf (<18,50)	2 (%5,12)
Normal (18,50-24,99)	16 (%41,03)
Hafif Şişman/Fazla Kilolu (≥ 25)	12 (%30,77)
Obez (≥ 30)	9 (%23,08)

*BKİ Sınıflandırması Dünya Sağlık Örgütü'nün obezite sınıflandırması baz alınarak yapıldı [124]

Yapılan değerlendirmede çalışmaya dahil olan gönüllüler arasında 17 (%43,58)'sinin HOMO-IR değeri pozitif olarak saptandı. Yapılan istatistiksel değerlendirmede; HOMO-IR değeri pozitif olanlar ile olmayanlar arasında herhangi bir bakteri için anlamlı bir fark belirlenmedi (*Bifidobacterium spp* p=0,130, *B. fragilis* p=0,989, *Lactobacillus spp* p=0,133, *A. mucinophilia* p=0,887, *F. prausnitzii* p=0,821).

Çalışmaya dahil edilen gönüllülerin hiçbirisi çalışmaya dahil edildiği dönemden yaklaşık 6 hafta öncesine kadar antibiyotik ve/veya pre / probiyotik almadığını beyan etti. Ayrıca gönüllülerin sadece 2 (%5,12)'si sigara kullanırken hiçbirisi alkol kullanmadığını bildirdi.

Gönüllülerin 9 (%23,08)'u iki yıl ve daha öncesinde HP tedavisi aldığını, 2 (%5,12)'si bir yıl öncesinde HP tedavisi aldığını ve 28 (%71,80)'i ilk kez HP tanısı aldığını söyledi. Antibiyotik kullanım öncesi gaita örneklerinden kantitasyon yapılan bakterilerden hiçbirisinde daha önce HP tedavisi alanlar ile almayanlar arasında anlamlı bir fark gözlenmedi (*Bifidobacterium spp* p=0,925, *B. fragilis* p=0,814, *Lactobacillus spp* p=0,522, *A. mucinophilia* p=0,457, *F. prausnitzii* p=0,206)

4.2. Kantitasyon sonuçları

Gönüllülerden antibiyotik kullanmadan önce ve kullandıktan sonra alınan gaita örneklerinden ekstraksiyona giren ve amplifiye olan miktarlarına göre hesaplanan log₁₀/gr gaitadaki miktarları Çizelge 4.2'de verildi. Çizelge 4.3'de ise bakterilerin log₁₀/gr gaitadaki ortama değerleri standart sapması ile birlikte yer almaktadır.

Çizelge 4.2. Antibiyotik kullanım öncesi ve sonrası pPZR sonuçları

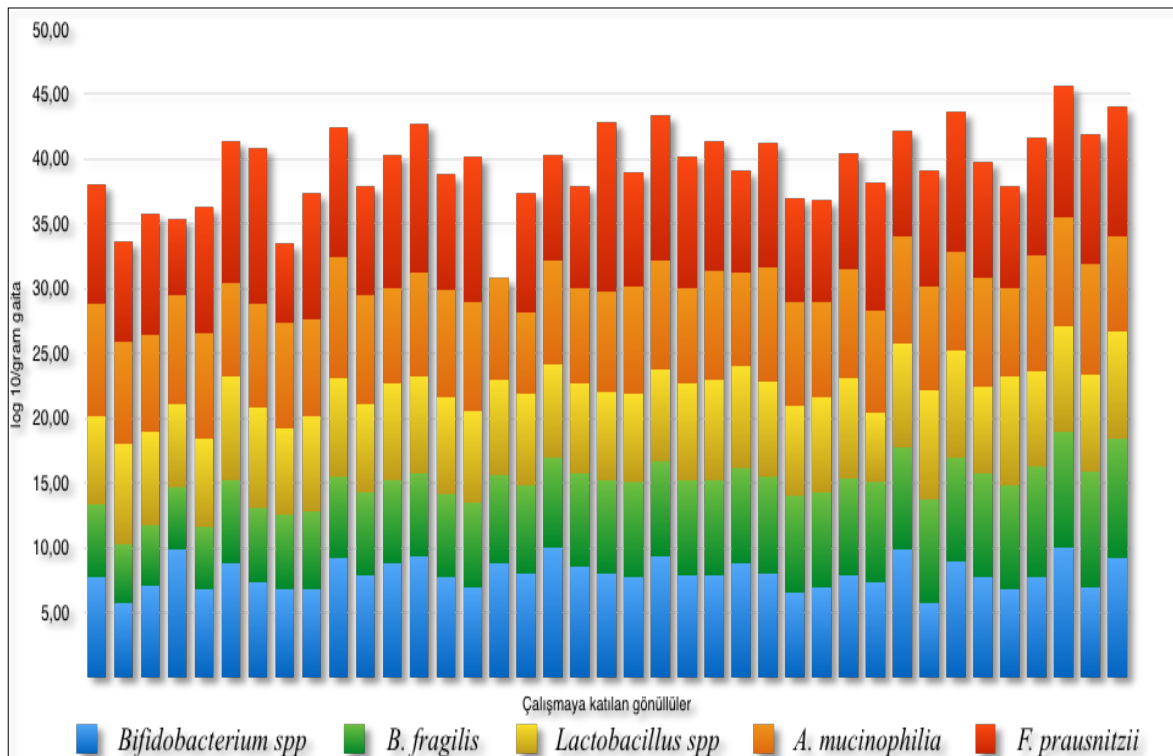
	Antibiyotik Kullanım Öncesi Alınan Örnekler (log ₁₀ /gr gaita)					Antibiyotik Kullanım Sonrası Alınan Örnekler (log ₁₀ /gram gaita)				
	<i>Bifidobacterium spp</i>	<i>B. fragilis</i>	<i>Lactobacillus spp</i>	<i>A. mucinophila</i>	<i>F. prausnitzii</i>	<i>Bifidobacterium spp</i>	<i>B. fragilis</i>	<i>Lactobacillus spp</i>	<i>A. mucinophila</i>	<i>F. prausnitzii</i>
1	7,73	5,56	6,80	8,75	9,15	6,29	5,06	6,53	5,41	6,80
2	5,77	4,48	7,80	7,80	7,77					
3	7,13	4,57	7,21	7,57	9,24					
4	9,81	4,81	6,48	8,34	5,92					
5	6,80	4,81	6,80	8,13	9,81	0,00	0,00	6,30	6,38	6,39
6	8,81	6,39	8,06	7,21	10,96					
7	7,29	5,80	7,77	7,95	11,97					
8	6,80	5,81	6,57	8,15	6,10					
9	6,81	5,96	7,35	7,48	9,81	5,57	4,55	6,39	6,14	6,20
10	9,17	6,29	7,68	9,34	9,95					
11	7,87	6,39	6,81	8,39	8,39	6,29	5,34	6,29	7,77	0,00
12	8,80	6,39	7,56	7,27	10,24	0,00	0,00	5,05	5,81	6,24
13	9,39	6,39	7,39	8,12	11,39	0,00	5,16	0,00	7,17	6,29
14	7,77	6,39	7,41	8,33	8,96					
15	6,96	6,49	7,15	8,34	11,24	4,95	0,00	5,56	4,80	5,39
16	8,77	6,81	7,38	7,80	0,00					
17	7,95	6,82	7,06	6,31	9,21	4,78	5,39	7,33	6,06	7,22
18	9,97	6,96	7,21	7,96	8,22					
19	8,59	7,15	6,94	7,33	7,90					
20	7,96	7,24	6,81	7,80	12,97					
21	7,80	7,33	6,80	8,27	8,83					
22	9,39	7,35	7,05	8,33	11,24					
23	7,82	7,39	7,41	7,39	10,22	7,39	6,24	8,17	8,17	6,34
24	7,81	7,39	7,81	8,34	9,96					
25	8,80	7,39	7,78	7,27	7,81	6,39	3,80	6,33	6,45	5,56
26	8,05	7,39	7,40	8,79	9,60	6,08	4,80	6,41	5,49	5,57
27	6,57	7,39	6,96	8,08	7,96					
28	6,90	7,39	7,39	7,33	7,80					
29	7,81	7,53	7,81	8,34	8,97					
30	7,29	7,73	5,44	7,81	9,96	6,14	4,02	4,54	7,15	5,05
31	9,83	7,89	8,06	8,20	8,16	7,17	5,77	6,49	6,49	7,17
32	5,80	7,97	8,33	8,03	8,99	5,96	5,57	5,80	5,80	6,35
33	8,96	7,97	8,35	7,54	10,80					
34	7,80	7,97	6,70	8,33	8,96	0,00	0,00	6,29	6,29	6,22
35	6,77	8,06	8,35	6,78	7,94	7,06	6,26	7,97	5,39	6,70
36	7,77	8,50	7,39	8,96	8,96	6,49	4,57	6,71	5,92	6,91
37	9,98	8,96	8,17	8,32	10,24					
38	6,97	8,97	7,39	8,54	9,97	6,49	0,00	5,96	5,77	6,39
39	9,17	9,22	8,29	7,39	9,97					

Çizelge 4.3. Bakterilerin qPZR sonuçlarının ortalaması ve standart sapması

Bakteriler	Antibiyotik Kullanım Öncesi Ortalama±SS* (log ₁₀ /g)	Antibiyotik Kullanım Sonrası Ortalama±SS (log ₁₀ /g)
<i>Bifidobacterium spp</i>	7,81±1,12	6,11±2,74
<i>B. fragilis</i>	8,24±1,19	5,69±2,89
<i>Lactobacillus spp</i>	7,39±0,61	6,32±1,74
<i>A. mucinophilia</i>	8,08±0,60	6,10±0,86
<i>F. prausnitzii</i>	9,21±2,09	6,32±1,59

*SS: Standart sapma

Gönüllülerden antibiyotik öncesi alınan gaita örneklerinde bakterilerinin her bir kişi bazında dağılımı Şekil 4.1’de verildi.

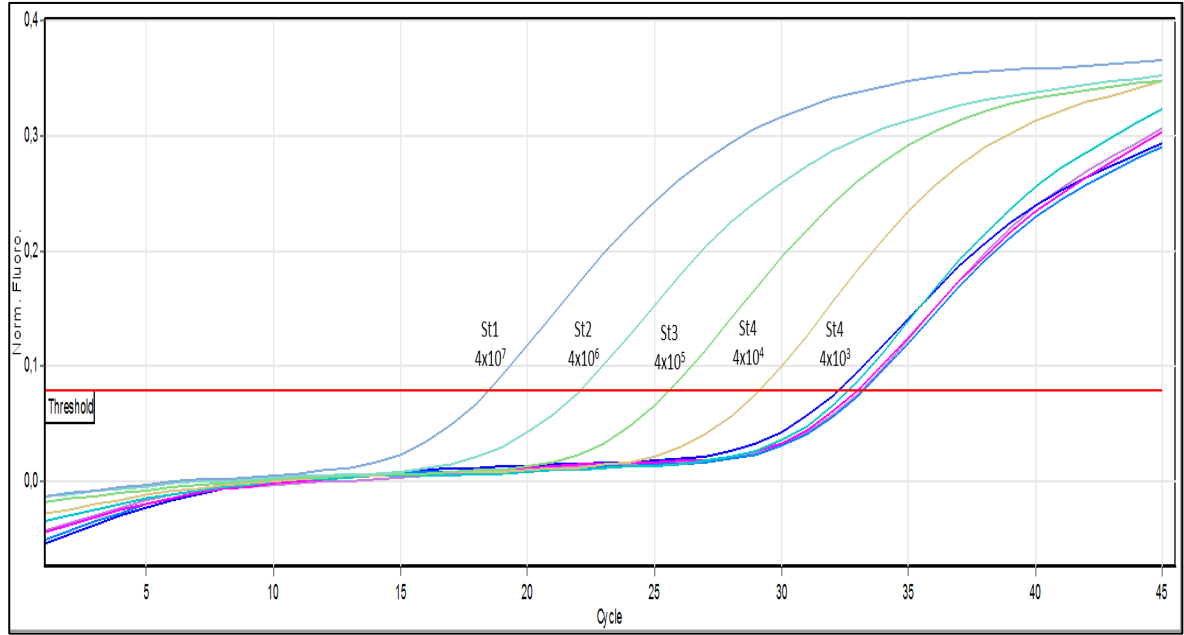


Şekil 4.1. Antibiyotik kullanım öncesi gaita örneklerinde bakteri dağılımı

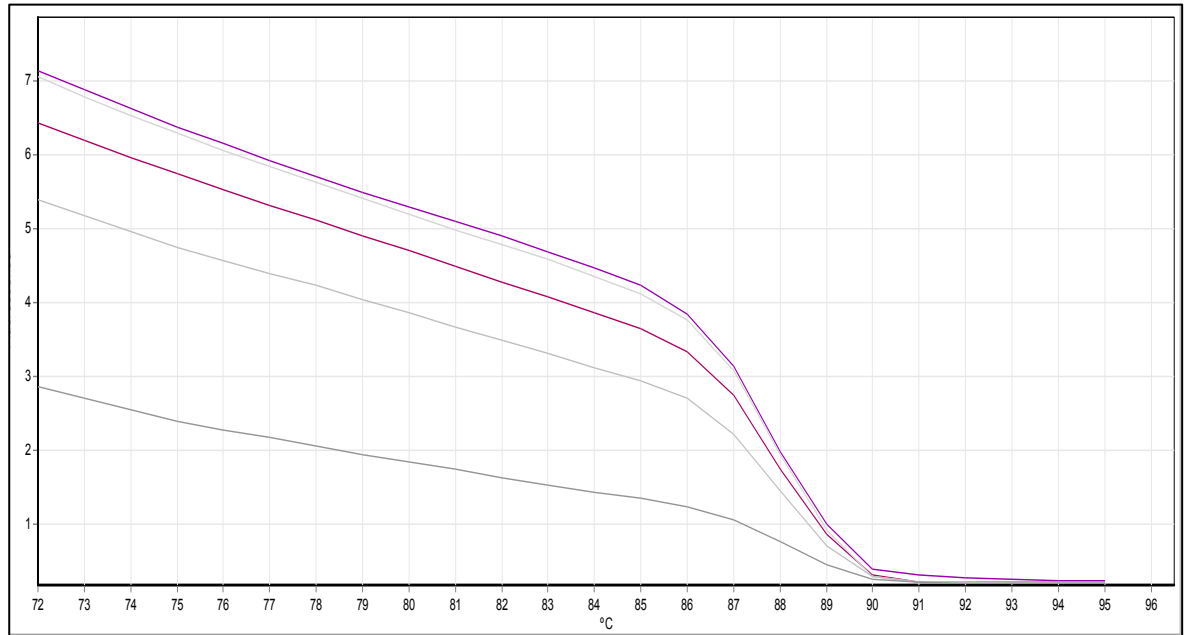
4.2.1. Bifidobacterium spp qPZR sonuçları

Bifidobacterium breve ATCC 15700 suşu ile hazırlanan standart eğriler (Şekil 4.2) ile hem antibiyotik kullanım öncesi hem de antibiyotik kullanım sonrası *Bifidobacterium spp* kopya sayısı belirlendi (Şekil 4.3). Bakteriye ait elde edilen verilerden yapılan erime eğrisi

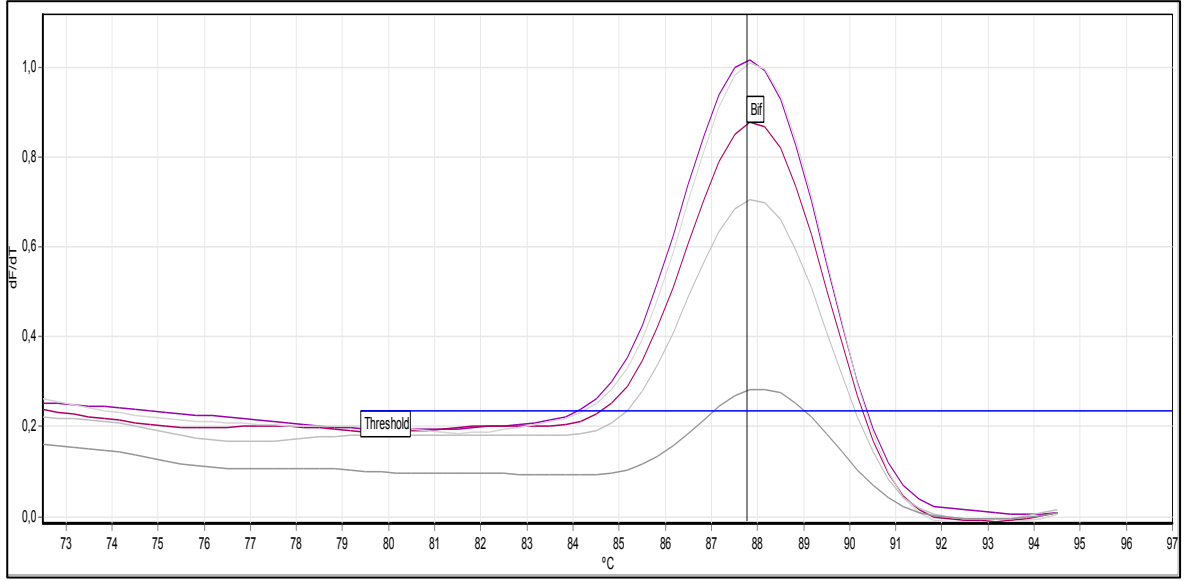
grafiği Şekil 4.4’de verildi. Antibiyotik kullanım öncesi ve antibiyotik kullanım sonrası alınan örneklerde *Bifidobacterium spp*’nin azaldığı ve bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi ($p=0,000$, $<0,005$). Bununla beraber 4 gönüllünün antibiyotik kullanım sonrası gaita örneklerinde *Bifidobacterium spp* saptanamadı. Bu hastaların demografik bilgileri arasında herhangi bir ilişki görülmedi.



Şekil 4.2. *Bifidobacterium breve* ATCC 15700 suşu ile hazırlanan standart eğri



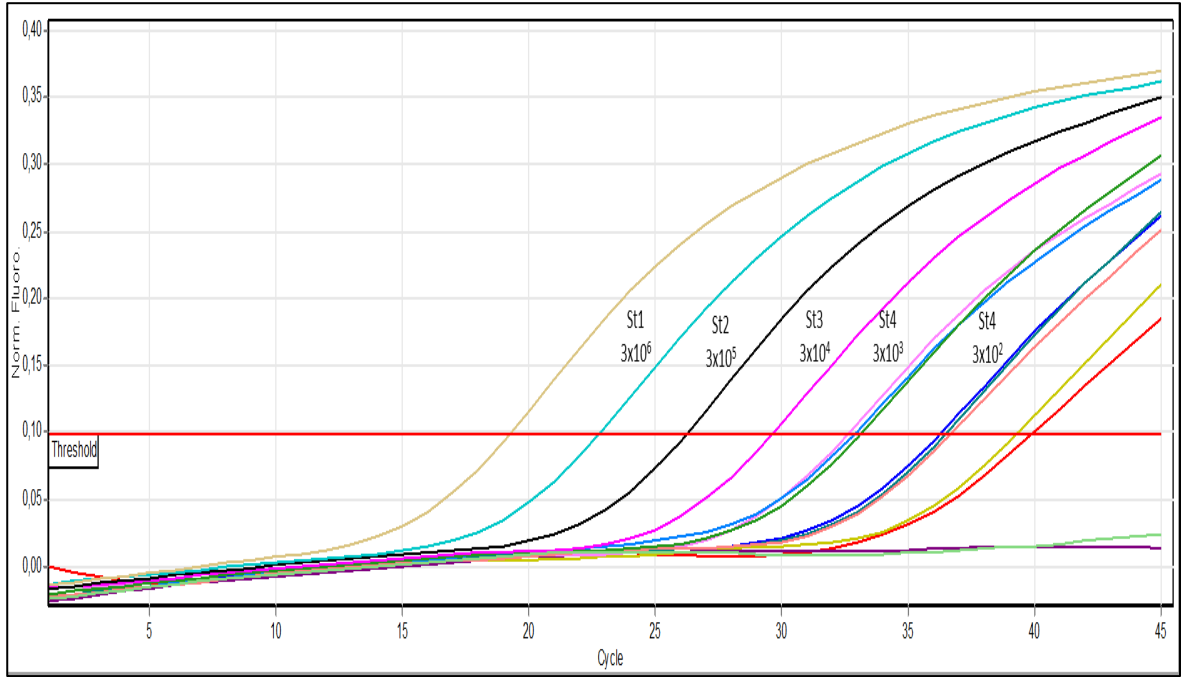
Şekil 4.3. *Bifidobacterium spp* gerçek zamanlı PZR sonucu



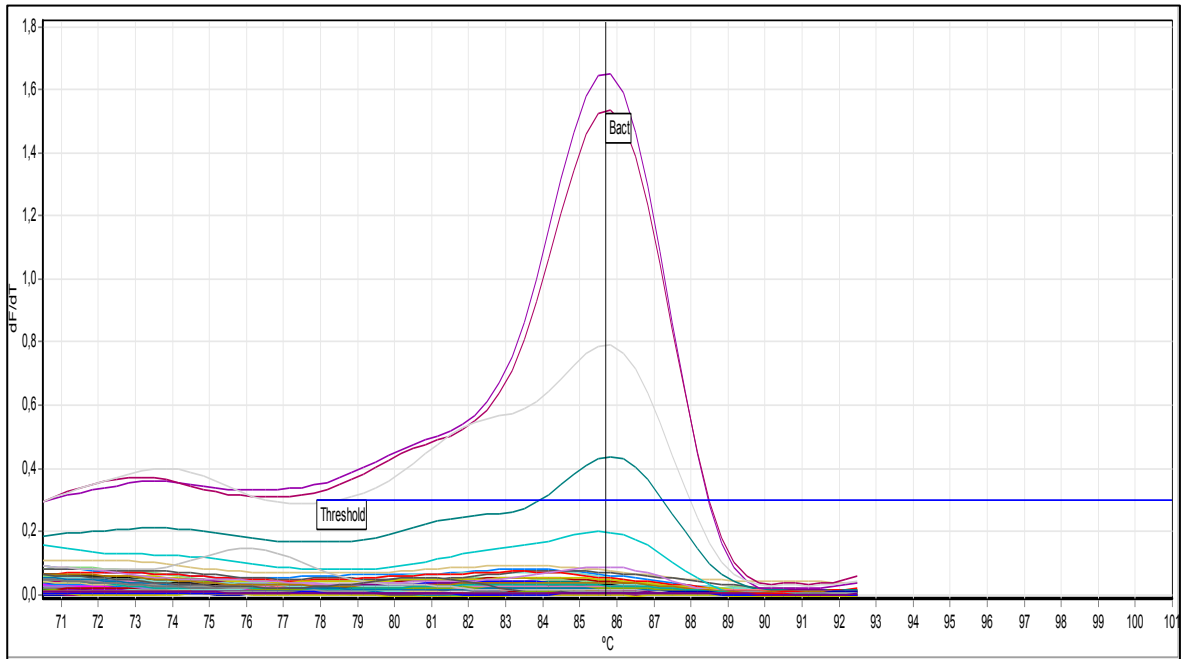
Şekil 4.4. *Bifidobacterium spp* erime eğrisi analizi grafiği

4.2.2. *B. fragilis* qPZR sonuçları

Bacteroides fragilis ATCC 252855 suşu ile hazırlanan standart eğriler (Şekil 4.5) ile hem antibiyotik kullanım öncesi hem de antibiyotik kullanım sonrası *B. fragilis* grup kopya sayısı belirlendi. Bakteriye ait elde edilen verilerden yapılan erime eğrisi grafiği Şekil 4.6'da verildi. Antibiyotik kullanım öncesi ve antibiyotik kullanım sonrası alınan örneklerde *B. fragilis*'in azaldığı ve bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi ($p=0,000$, $<0,005$). Bu bakteri 5 hastada antibiyotik kullanım sonrası hiç tespit edilemedi ve bu hastaların tümünün 60 yaş üstü olduğu belirlendi.



Şekil 4.5. *Bacteroides fragilis* ATCC 252855 suşu ile hazırlanan standart eğri

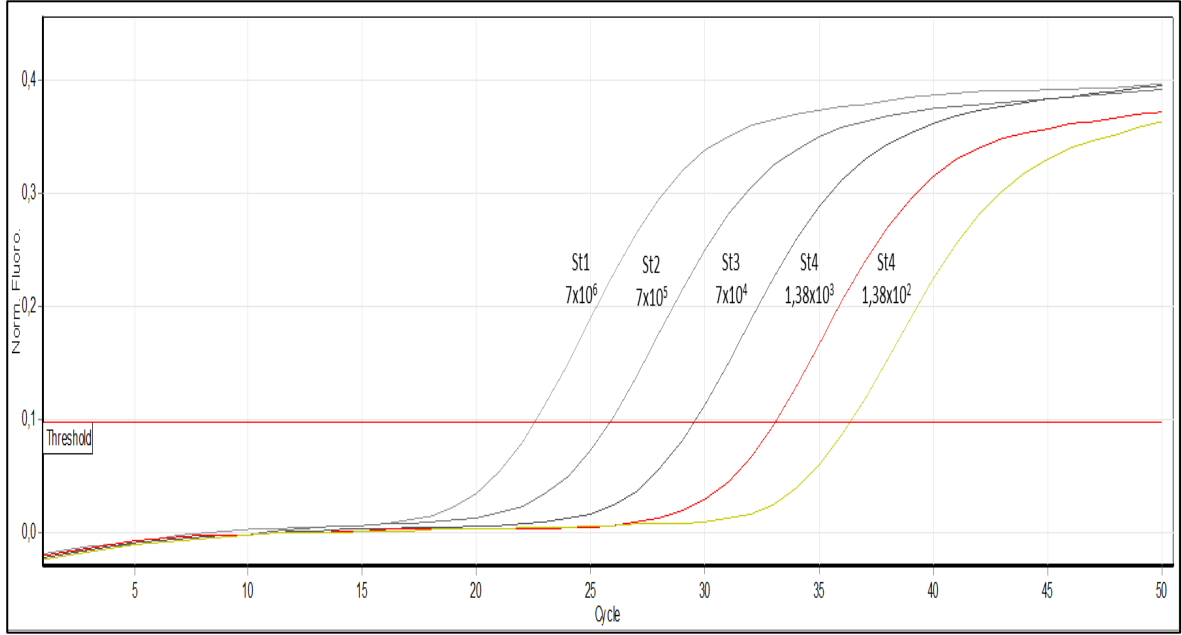


Şekil 4.6. *B. fragilis* grup erime eğrisi analizi grafiği

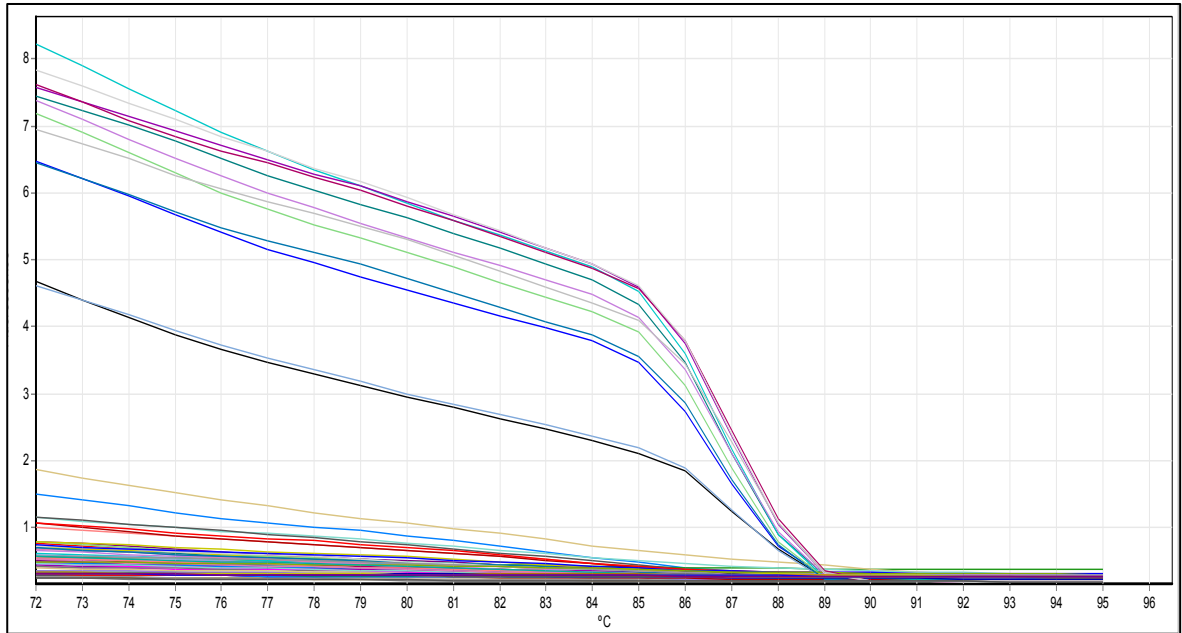
4.2.3. *Lactobacillus spp* qPZR sonuçları

Lactobacillus acidophilus ATCC 4356 suşu ile hazırlanan standart eğriler (Şekil 4.7) ile hem antibiyotik kullanım öncesi hem de antibiyotik kullanım sonrası *Lactobacillus spp* grup kopya sayısı belirlendi. Bakteriye ait elde edilen qPZR'ye ait sonuçlar Şekil 4.8'de verildi. Antibiyotik kullanım öncesi ve antibiyotik kullanım sonrası alınan örneklerde

Lactobacillus spp'nin azaldığı ve bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi ($p=0,000$, $<0,005$).



Şekil 4.7. *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 suşuna ait standart eğri

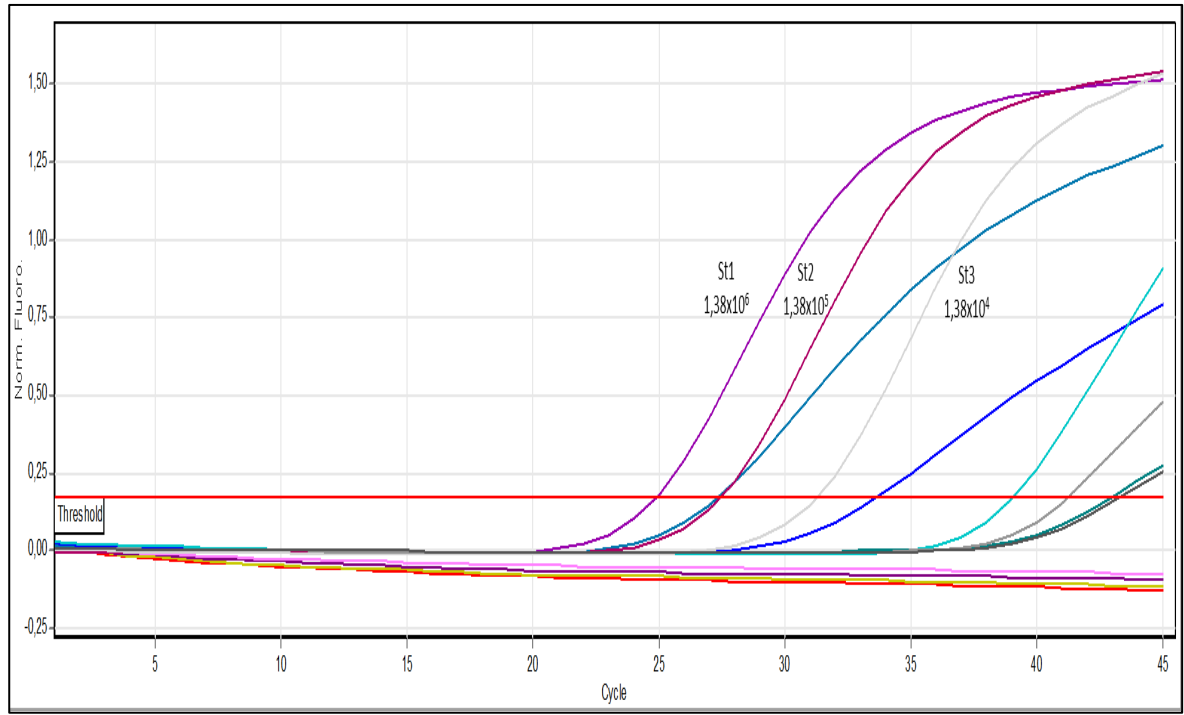


Şekil 4.8. *Lactobacillus spp*'ye ait qPZR sonucu

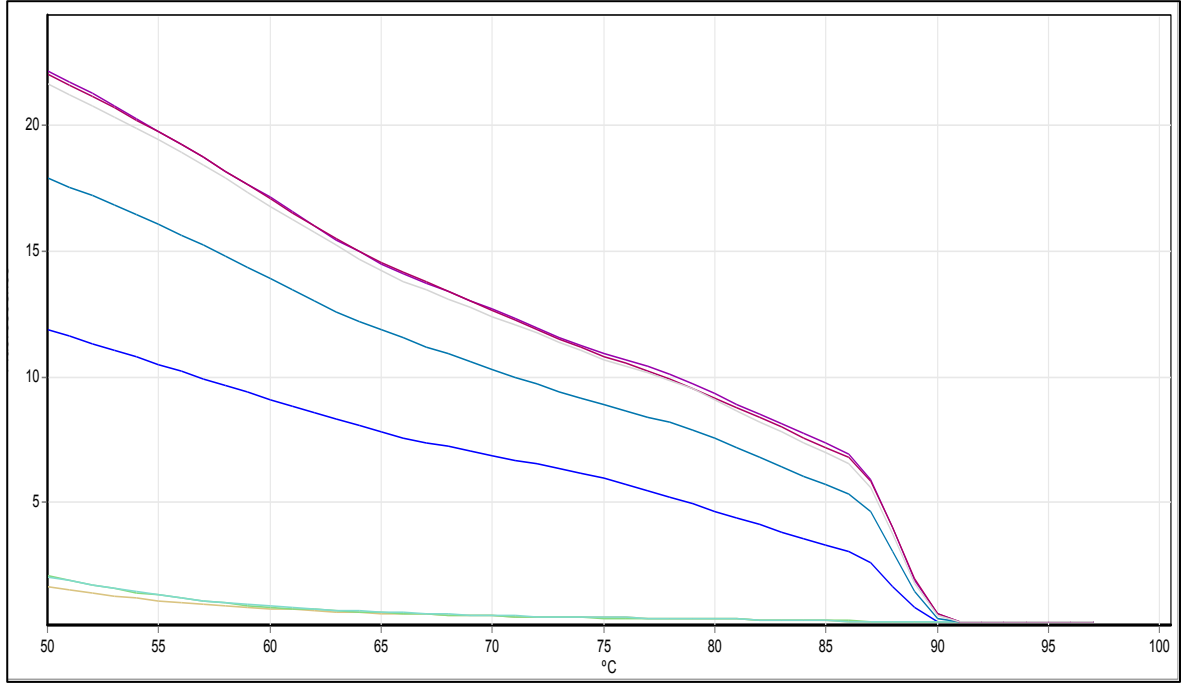
4.2.4. *A. mucinophila* qPZR sonuçları

Akkermansia muciniphila ATCC BAA-835 suşu ile hazırlanan standart eğriler (Şekil 4.9) ile hem antibiyotik kullanım öncesi hem de antibiyotik kullanım sonrası *A. mucinophila* kopya sayısı belirlendi. Bakteriye ait elde edilen qPZR'ye ait sonuçları ve erime eğrisi

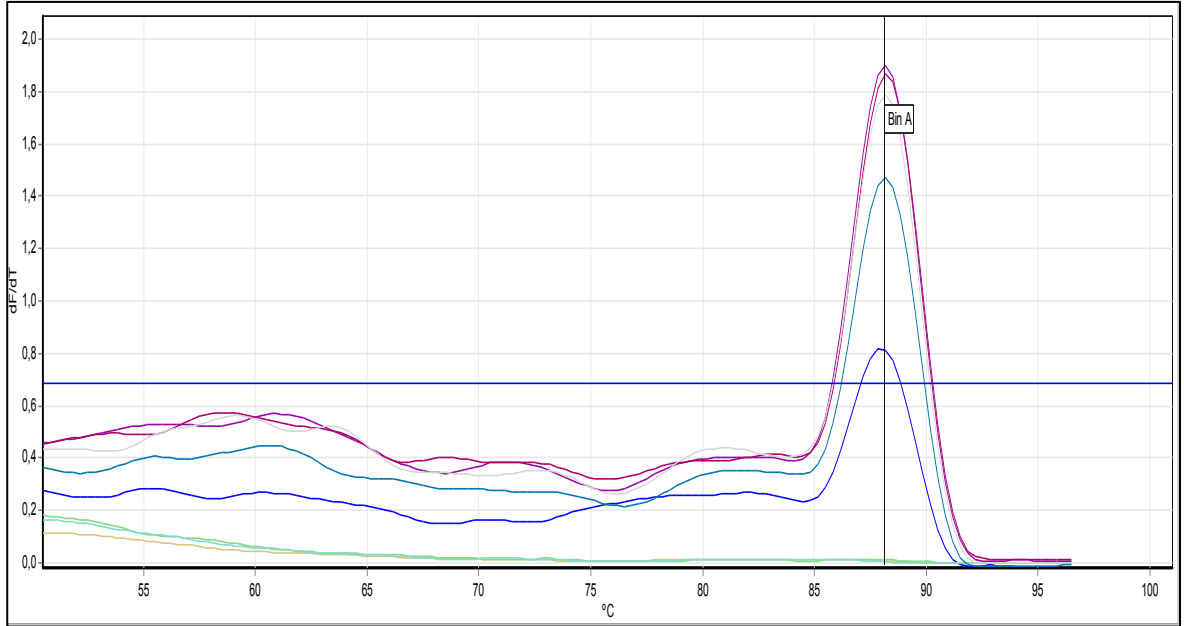
grafiği sırasıyla Şekil 4.10 ve Şekil 4.11’de verildi. Antibiyotik kullanım öncesi ve antibiyotik kullanım sonrası alınan örneklerde *A. mucinophilia*’nın azaldığı ve bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi ($p=0,000$, $<0,005$). Antibiyotik kullanım sonrası alınan örneklerde yapılan değerlendirmede *A. mucinophilia*’nın düşüş olmasına rağmen tüm hastalarda tespit edildiği görüldü.



Şekil 4.9. *A. muciniphila* ATCC BAA-835 suşuna ait standart eğri



Şekil 4.10. *A. mucinophilia*'ya ait qPZR sonuçları

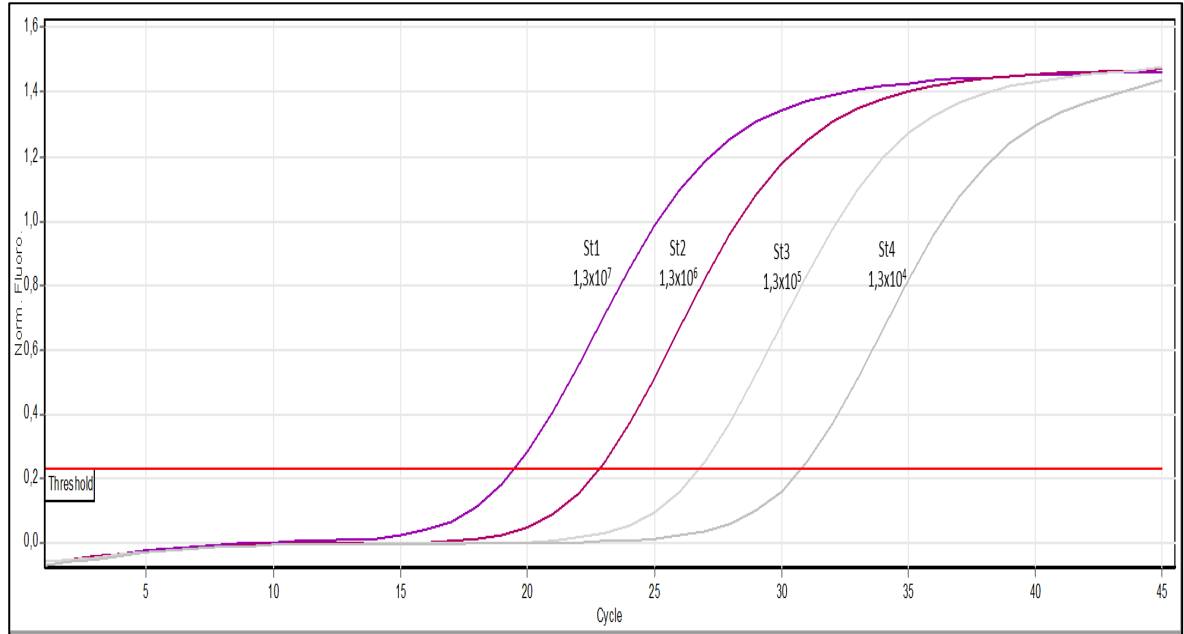


Şekil 4.11. *A. mucinophilia*'ya ait erime eğrisi grafiği

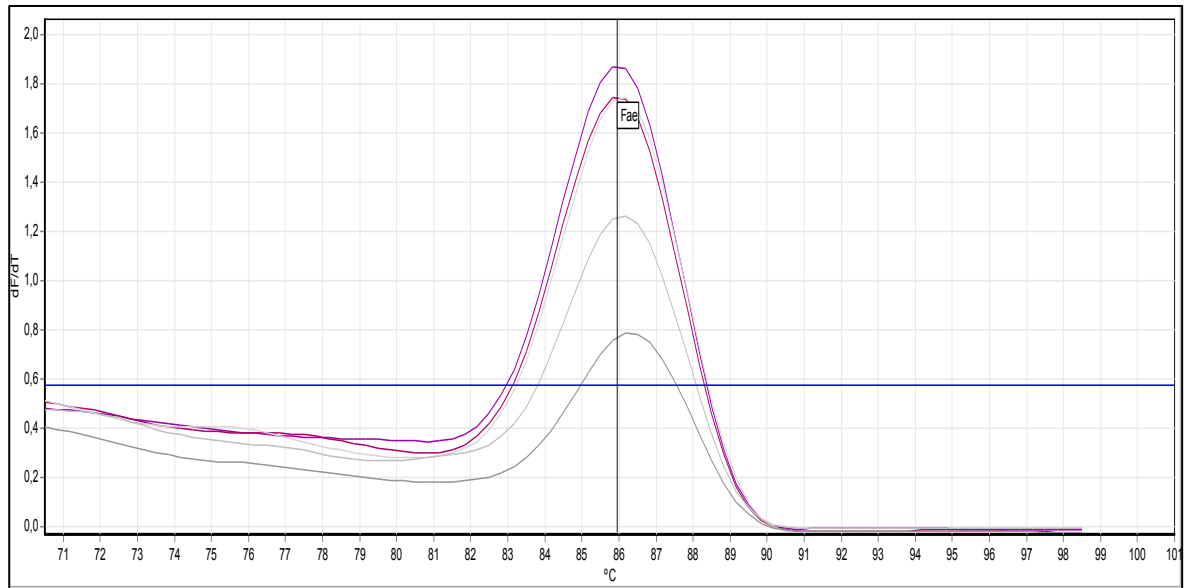
4.2.5. *F. prausnitzii* qPZR sonuçları

Faecalibacterium prausnitzii ATCC 27766 suşu ile hazırlanan standart eğriler (Şekil 4.12) ile hem antibiyotik kullanım öncesi hem de antibiyotik kullanım sonrası *F. prausnitzii* kopya sayısı belirlendi. Bakteriye ait elde edilen erime eğrisi grafiği Şekil 4.13'de verildi. Antibiyotik kullanım öncesi ve antibiyotik kullanım sonrası alınan

örneklerde *F. prausnitzii*'nin azaldığı ve bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi ($p=0,000$, $<0,005$).



Şekil 4.12. *F. prausnitzii* ATCC 27766 suşu ile hazırlanan standart eğri

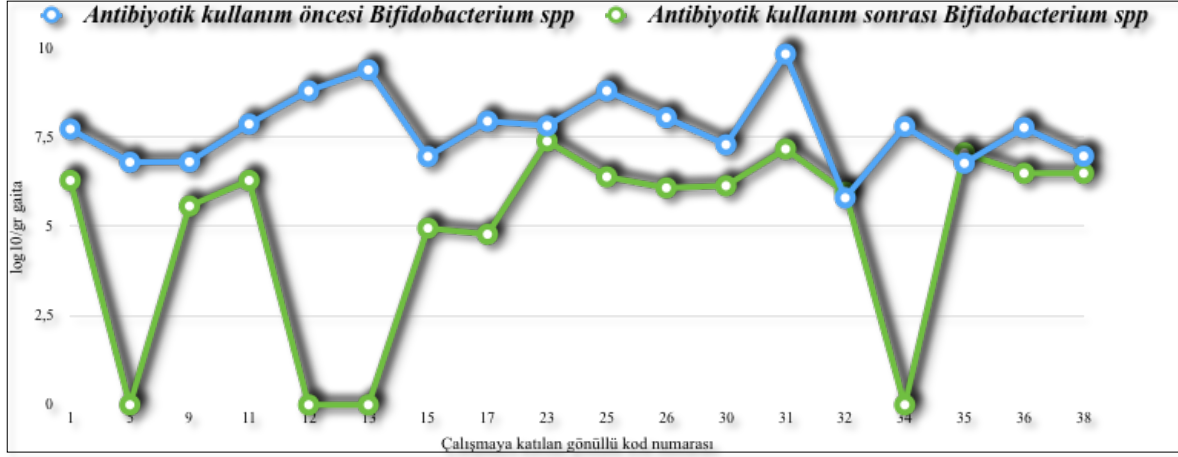


Şekil 4.13. *F. prausnitzii*'ye ait erime eğrisi grafiği

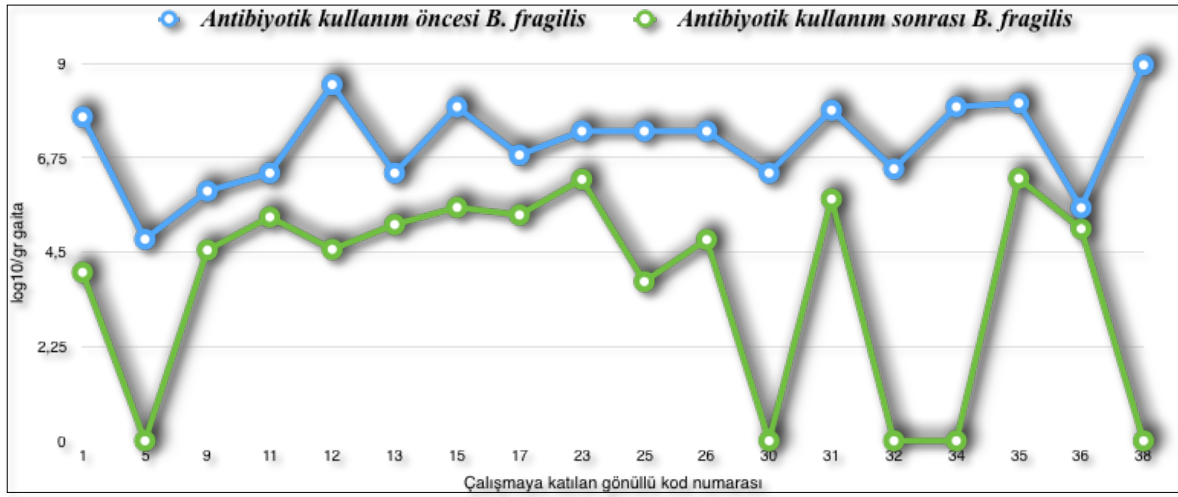
4.3. Antibiyotiğin mikrobiyotaya etkisi

Tetrasiklin ve metronidazol antibiyotiklerini içeren ve aynı tedavi protokolü uygulanan HP pozitif gönüllüler arasında 18 (%46,15)'i antibiyotik sonrası gaita örneğini verdi. Antibiyotik kullanım öncesi ile antibiyotik kullanım sonrası gaita örneklerinde yapılan kantitasyon çalışmasında çalışmaya dahil edilen tüm bakterilerin antibiyotik kullanım

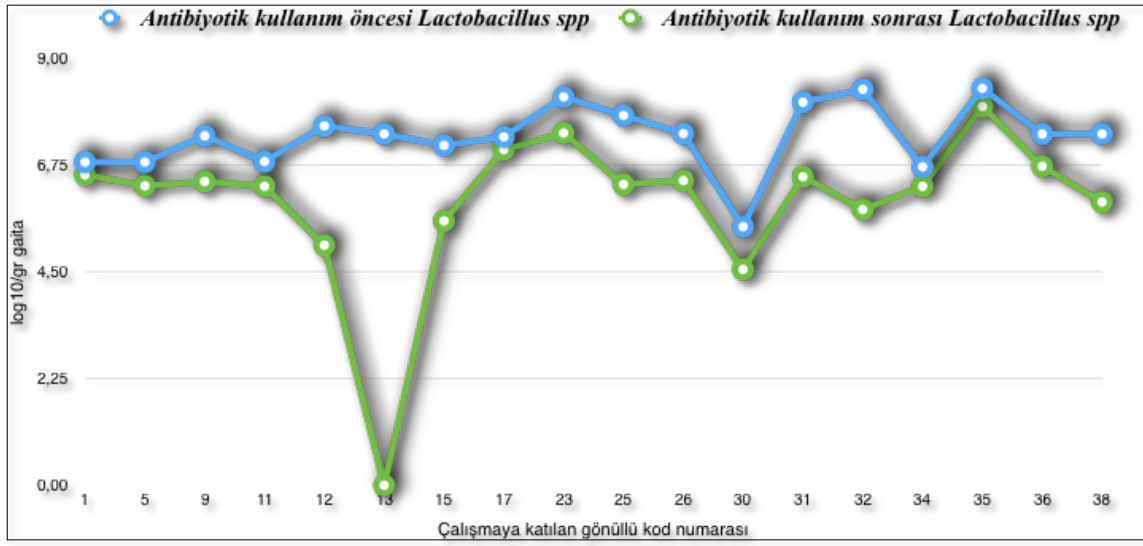
öncesine göre farklı oranlarda olsa bile düşüş gösterdiği belirlendi (Şekil 4.14-18). Ayrıca Mann Whitney U testi yapılan istatistiksel analizde tüm bakteri gruplarında bu düşüşün anlamlı olduğu saptandı (tüm bakterilerde $p=0,000$, $p<0,005$). Her bir bakteriye ait antibiyotik öncesi ve antibiyotik sonrası elde edilen miktarlarının değişimini gösteren grafikler sırasıyla *Bifidobacterium spp.* Şekil 4.14, *B. fragilis* Şekil 4.15, *Lactobacillus spp* Şekil 4.16, *A. mucinophilia* Şekil 4.17, *F. prausnitzii* Şekil 4.18’de verildi.



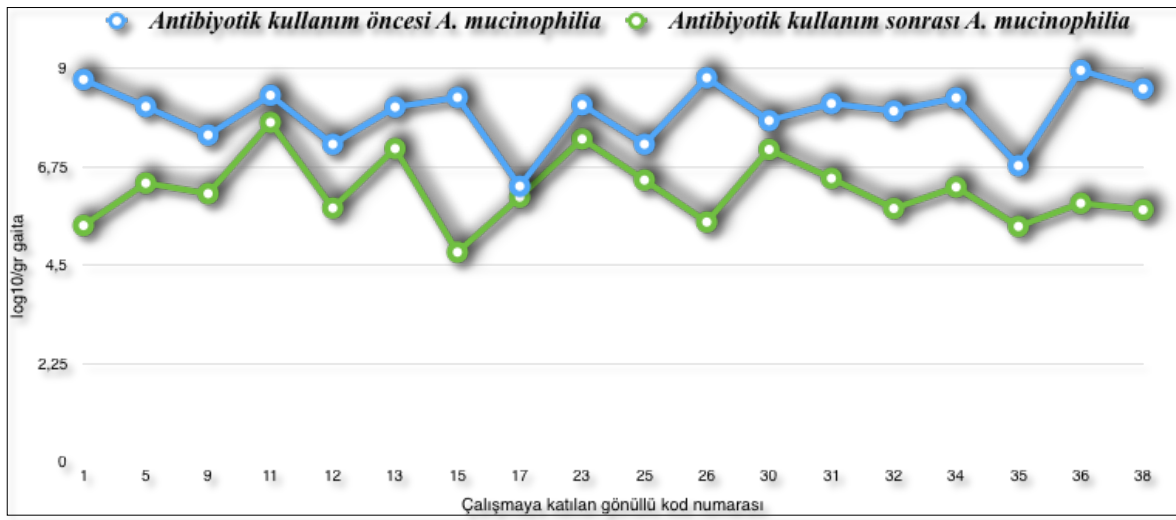
Şekil 4.14. *Bifidobacterium spp.*'nin antibiyotik kullanım öncesi ve sonrası dağılımı



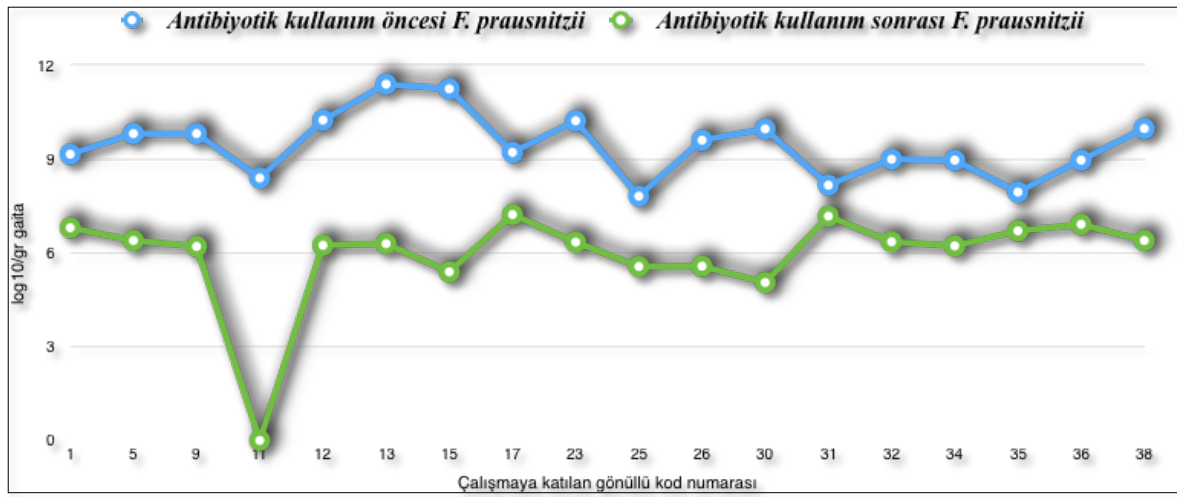
Şekil 4.15. *B. fragilis*'in antibiyotik kullanım öncesi ve sonrası dağılımı



Şekil 4.16. *Lactobacillus spp*'nin antibiyotik kullanım öncesi ve sonrası dağılımı



Şekil 4.17. *A. mucinophilia*'nin antibiyotik kullanım öncesi ve sonrası dağılımı



Şekil 4.18. *F. prausnitzii* 'nin antibiyotik kullanım öncesi ve sonrası dağılımı

5. TARTIŞMA

Mikrobiyota üzerine yapılan çalışmalar, Amerika Birleşik Devletleri Ulusal Sağlık Enstitüsü'nün önderliğinde "İnsan Mikrobiyom Projesi" ile başlatıldı [1]. Yaklaşık bir yıl sonra, Avrupa Birliği insan bağırsağının metagenomik yapısını incelemeye yönelik bir çalışmayı finanse etti. 2009 yılında ise, Uluslararası İnsan Mikrobiyom Konsorsiyum'u mikrobiyom ile insan sağlığı ve hastalıkları arasındaki ilişkiyi ortaya koymaya yönelik çalışmalar başlattı [125]. Son yıllarda hızla gelişen tekniklerin de etkisiyle insan bağırsak mikrobiyotasının yapısı ve fonksiyonları hakkında her geçen gün yeni bir bilgi literatüre eklenmektedir. Özellikle bağırsak mikrobiyotası konağın beslenme, metabolik, fizyolojik ve immünolojik bir çok sürecinde anahtar role sahip bir organ gibidir [126]. İnsan mikrobiyotası doğum süreci ile beraber oluşmaya başlayan dinamik bir ekosistemdir ve yaşamın ilk 2-3 yılında kadar özellikle *Bifidobacterium spp*'nin dominant olduğu bir yapıdadır [127]. Yaşam boyu bir çok faktörün etkisi ile farklılaşıp zenginleşir. Konak yetişkin bir birey olduğunda en kompleks ve tür bakımından en zengin yapısını kazanır. Bu dönemde özellikle *Bacteroidetes* ve *Firmicutes* filumuna ait bakteriler daha baskın hale gelir [128]. Her bir bireyin bireysel özelliklerine bağlı olmakla birlikte, sağlıklı bir bireyin yetişkin dönemindeki mikrobiyotası hemostatik denge açısından zirvededir. Aslında bu dengeli durum birey için bir öz oluşturmaktadır ve konak-mikrobiyota arasındaki dengeli simbiyotik yaşam devam ettiği sürece bu öz korunmaktadır [129]. Yaşamın ilerleyen dönemlerinde ise mikrobiyotada tür çeşitliliği azalır, *Bacteroides:Firmicutes* birlikteliğinde *Bacteroides* oranı artar. Ayrıca, *Proteobacteria* oranı artarken *Bifidobacterium* azalır [130].

Bilindiği üzere HP tüm dünyada geniş bir yayılım alanı bulmuş ve yaklaşık insanların %50'sini enfekte etmiş bir bakteridir. Hatta bu oran bazı bölgelerde %90'lara kadar ulaşabilmektedir. HP, mide mikroekosistemini değiştirerek mide mikrobiyotasının yapısına etki etmektedir. Aslında bu etki sadece mide ile sınırlı kalmayıp bağırsağın özellikle de kalın bağırsak mikrobiyotası üzerinde etkilidir. Ancak gastrointestinal sistemin fizyolojik bir denge halinde olduğu düşünülürse, HP'nin tüm bağırsak mikrobiyotası üzerinde etkili olduğu da söylenebilir [131]. Hayvan modelleri ile yapılan çalışmalarda, uzun süreli HP enfeksiyonunun mikrobiyota üzerinde değişikliklere neden olduğu belirtilmektedir [132]. HP pozitif hastalarda, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* ve *Firmicutes* grubu bakterilerin sayıca diğer bakterilere göre daha az sayıda bulunduğu bildirilmektedir [133]. HP ve bağırsak mikrobiyotası, arasında özellikle bağırsak inflamasyonuna eşlik eden bir işbirliği

bulunmaktadır. Ayrıca yapılan hayvan deneylerinden elde edilen bilgilere göre HP'nin bağırsak mikrobiyotası ile birlikte leptin ve ghelin gibi enerji üretimi ile ilgili hormonlar üzerinde de etkili olduğu söylenebilir [52].

HP ile bağırsak mikrobiyotası arasındaki ilişki sadece HP'nin mikrobiyota etkisi ile açıklanması durumunda eksik kalır, bu ilişki aslında çift yönlü bir etkileşime sahiptir. HP enfekte ettiği kişilerde gastrit, hazımsızlık, mukoza ile ilişkili lenfoid doku (MALT) lenfoma ve mide kanserine kadar değişen bir hastalık profiline sahiptir ve ayrıca stres altında gelişen peptik ülser içinde bir risk faktörüdür [134, 135]. HP'nin sorumlu olduğu bu hastalıklarının patogenezinde psikosomatik faktörlerin varlığı uzun zamandır bilinmektedir [136, 137]. HP'nin etken ve risk olduğu bu hastalıklarda HP doğrudan CagA, VacA gibi sitokinleri ve inflamasyon sürecini aktifleştirir ya da beyin-bağırsak-mikrobiyota aksı aracılığı ile dolaylı olarak GIS yolunda morfolojik ve patolojik değişikliklere neden olabilir [138]. Mikrobiyota içeriğinin ve fonksiyonunun, beyin-bağırsak-mikrobiyota aksında önemli ve kanıtlanmış bir rolü vardır. Mikrobiyota bu aksisde nörolojik, immünolojik ve endokrinolojik mesajların oluşturulmasında görev alır [139, 140]. Bu mekanizmanın işleyişini ve mikroorganizmalar ile olan etkileşimini anlamak için yapılacak daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır. Beyin-bağırsak-mikrobiyota aksının fonksiyonu ve işlevi ile ilgili yapılacak yeni çalışmalardan elde edilecek verilerin, HP tedavisinde mikrobiyotaya zarar vermeyen yeni yaklaşımları da ortaya koyabileceği düşünülmektedir.

Bu çalışmada, ülkemizde ve dünyada oldukça yaygın olarak görülen HP pozitif hastaların tedavisinde kullanılan antibiyotiklerin mikrobiyota üzerindeki etkisini belirlemeyi amaçladık. Bu amaçla Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Gastroenteroloji Kliniği'nde HP tanısı alan ve çalışmaya katılmayı kabul eden gönüllüler çalışmaya dahil edildi. Gönüllülere gastroenteroloji uzmanı tarafından standart bir tedavi protokolü uygulandı. Bu protokole göre gönüllülere PPI+terasiklin+metronidazol+bizmut içeren dörtlü tedavi protokolü 10 gün boyunca uygulandı. Gönüllülerden antibiyotik kullanmadan önce ve antibiyotik tedavi sonrası altıncı haftada olmak üzere iki gaita örneği alındı. Çalışmaya 39 gönüllü dahil edildi, ancak sadece 18 gönüllü tedavi sonrası gaita örneği verdi. Çalışmaya dahil edilen gönüllülerin demografik bilgileri de değerlendirildi.

Son zamanlarda yapılan çalışmalar insülin direnci ve obezite üzerinde mikrobiyotanın rolü olduğunu göstermektedirler. Mikrobiyota ile obezite arasındaki ilişkinin temelinde; asetat,

propiyonat gibi mikrobiyal ürünler iş görür. Bu ürünler, bağırsak epitel hücrelerini uyarak yüksek seviyede metabolik inflamasyona neden olabilecek bakteriyel ürünler olup bağırsak geçirgenliğini artırır ve ayrıca fazladan kalori üreterek aşırı kalori oluşumu ile insülin direncinde artışa neden olabilirler [141]. İnsülin direnci, metabolik hastalık ve alkolik olmayan karaciğer hastalığının ortak özelliğidir [142]. Alkolik olmayan karaciğer yağlanması olan kişilerde kontrol grubuna göre *Faecalibacterium* türleri azalmaktadır [143]. Buna karşın bu hasta grubunda *Lactobacillus* türlerinde ve diğer Firmicutes türlerinde ise artış gözlenmektedir [144]. Bu çalışmada gönüllülerin, 17 (%43,58)'sinin HOMO-IR değeri pozitif olarak belirlendi. HOMO-IR değeri pozitif olan ve olmayan gönüllülerden antibiyotik kullanım öncesi alınan gaita örneklerinde saptanan bakteri miktarları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmedi (*Bifidobacterium spp* (p=0,130), *Bacteroides fragilis* (p=0,989), *Lactobacillus spp* (p=0,133), *A. mucinophilia* (p=0,887), ve *F. prausnitzii* (p=0,821)).

Mikrobiyota ile ilişkisi araştırılan bir diğer konu BKİ'dir. Obez çocuklarda, yetişkinlerde ve deney hayvanlarında gram pozitif Firmicutes grubu bakteriler gram negatif Bacteroidetes grubu bakterilere göre daha yüksek oranda bulunmaktadır [145, 146, 147]. Bu çalışmada BKİ'ne göre zayıf ve şişman olarak belirlenen gönüllülerin antibiyotik kullanım öncesi alınan gaita örneklerinde saptanan bakteri miktarları arasında istatistiksel olarak da anlamlı fark sadece *B. fragilis*'de (p=0,004) tespit edildi [*Bifidobacterium spp* (p=0,508), *Lactobacillus spp* (p=0,204), *A. mucinophilia* (p=0,714), ve *F. prausnitzii* (p=0,714)].

HP enfeksiyonlarının otaya konmasından bu yana HP tedavisi için ideal bir ilaç hatta tedavi protokolü belirlenememiştir. HP eradikasyonunda amaç, tedavide yaklaşık %85'in üstünde başarı sağlamaktır. Hastalığın tespit edildiği ilk yıllarda, yaklaşık 30-40 yıl öncesinde, tek antibiyotik kullanımı yaygın olup tedavi başarısızlıkları çok yüksek olarak belirlenmiştir [148]. Bu nedenle PPI ile amoksisilin veya klaritromisin ikili tedavi protokolü yaygın olarak kullanılmıştır [149, 150]. Ancak eradikasyon oranlarının oldukça düşük olmasından dolayı üçlü tedavi protokolleri ortaya konmuştur. Üçlü tedavi protokolleri genellikle PPI, klaritromisin, amoksisilin (veya metronidazol) şeklinde 7-10 veya 14 günlük olarak belirlenmiştir [149, 151]. Ancak ülkelerde direnç oranlarındaki farklılıklar, protokollerin tam uygulanmaması gibi nedenlerden dolayı tedavi protokollerindeki başarı oranları arasında dünya genelinde farklılıklara neden olmuştur. Günümüzde, bizmut temini mümkün olan ülkelerde, ülkenin direnç oranları da göz önünde

alınarak bizmut+PPI+iki antibiyotik, olmayan ülkelerde PPI+üç antibiyotik olmak üzere dördütlü tedavi protokolleri önerilmektedir [151]. Çalışmamıza dahil olan gönüllülerin tümüne bizmut+PPI+tetrasiklin+metronidazol kombinasyonundan oluşan 10 günlük dördütlü tedavi protokolü uygulanmıştır.

Mikrobiyotanın yapısı ve fonksiyonları birçok iç ve dış faktörlerden etkilenebilmektedir. Antibiyotik dış faktörler arasındaki en önemlileri arasında yer almaktadır. Antibiyotikler, yarım yüzyıldan beridir hem insan hem de hayvanların bakteriyel enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılan oldukça etkili ilaçlardır [152]. Antibiyotikler, patojen bakterilere karşı kullanılırken beraberinde istenmeyen yan etkiler ile karşımıza çıkmaktadır. Bu yan etkilerden biri önemli bir halk sağlığı problemi de olan antibiyotik direncidir. Patojen bakterilerde direnç gelişimi, tedavi başarısızlıklarına neden olur [153]. Antibiyotik kullanımının istenmeyen etkilerinden bir diğeri de mikrobiyota üzerine olan olumsuz etkileridir. Antibiyotikler mikrobiyota üzerinde de iki türlü istenmeyen etkiye neden olurlar. Mikrobiyotada yer alan bakteriler antibiyotik kullanımına bağlı olarak direnç gelişiminde rol alabilirler ya da mikrobiyotanın yapısını bozarak disbiyozise neden olabilirler [154].

Antibiyotikler, uzun yıllar son derece güvenli ilaçlar olarak kabul edilmesine rağmen son yıllarda, konak ve mikrobiyota üzerine etkileri araştırma konularının başında gelmektedir. Antibiyotikler, belli bir düzen içinde devam eden mikrobiyotanın dengesini bozabilirler [155]. Özellikle mikrobiyota gelişiminin kritik dönemlerinde bu etki kendisini daha fazla gösterir. Bu etki kullanılan antibiyotiğin etki mekanizması ve spektrumuyla da ilişkilidir [156]. Örneğin Gram pozitif etkinliği olan vankomisin çekumdaki *Bacteroides* filumundaki bakterileri önemli ölçüde etkilemektedir. Ancak aynı antibiyotik mikrobiyotadaki mevcut dirençli bir izolatın örneğin vankomisin dirençli *Enterococcus* türünün bağırsakta hakim olmasına da neden olabilmektedir [157]. Gram pozitif etkinliği olan vankomisin tedavisi, *Bacteroides* grubu bakterileri azalırken *Enterobacteriaceae* familyasının içinde yer aldığı *Proteobacteria* filumu bakterilerinde sayıca artışa neden olmaktadır [157, 158]. Bu kadar keskin sonuçları söylemek hayvan deneyleri için daha mümkündür. Çünkü hayvan modellerinde mikrobiyotanın oluşumu modele göre dizayn edilmektedir. Oysa insan üzerinde yapılan çalışmalar, daha kompleks bir bağırsak ekosistemi içinde gerçekleşmekte ve bu kompleks yapıdan farklı sonuçların alınmasına neden olabilir.

Çalışmamızda, tedavi protokolü kapsamında tetrasiklin ve metronidazol antibiyotikleri gönüllülere verildi. Bilindiği üzere tetrasiklin geniş spektrumlu bir antibiyotik olup bakteriyostatik etkilidir. Ancak yüksek dozlarda bakteriyosidal etkinlik göstermektedir. Metronidazol ise bakterisidal etkili bir antibiyotik olup hedefi anaerob mikroorganizmalardır [159]. Hem tetrasiklin hem de metronidazolün eş zamanlı kullanımından dolayı çalışmamızda değerlendirmeye alınan *Bifidobacterium spp*, *B. fragilis*, *Lactobacillus spp*, *A. mucinophilia* ve *F. prausnitzii* bakterilerinin tümünde antibiyotik kullanım sonrasında, antibiyotik kullanım öncesi duruma göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma tespit edildi [*Bifidobacterium spp* ($p=0,000$), *Bacteroides fragilis* ($p=0,000$), *Lactobacillus spp* ($p=0,000$), *A. mucinophilia* ($p=0,000$), ve *F. prausnitzii* ($p=0,000$)].

Antibiyotiklerin mikrobiyota üzerinde ki etkileri 1940'lı yıllardan itibaren çalışılmış bir konudur. Ancak o dönemde kültüre dayalı teknikler ile değişimlerin kısa dönem etkileri incelenebilmiştir [160]. Ayrıca bu yöntemlerle elde edilen veriler antibiyotiklerin etkilerini tam olarak anlayabilmek için yetersizdir. Bugün için ise antibiyotiklerin sadece kısa dönem etkilerini değil farklı moleküler teknikler ile uzun süreli etkilerini de ortaya koymak mümkün hale gelmiştir [58, 161]. Çalışmalar, tedavilerin mikrobiyotanın yaklaşık dörtte bir ile üçte bir oranında sayısal bir azalmaya ve ayrıca bileşiminde de ciddi değişikliklere neden olduğunu ortaya koymaktadır [162]. Tedaviden sonraki birkaç hafta sonra tedaviden önceki durumuna dönmeye başladığı bildirilmiş olmasına rağmen, son zamanlarda yapılan antibiyotik alımının uzun süreli etkilerinin değerlendirildiği çalışmalarda tedavi kesildikten 3 ay sonra dahi mikrobiyotanın tam olarak tedavi öncesi durumuna dönemediğini göstermektedir [133, 163, 164].

Deneyssel bir hayvan modelinde, 10 gün boyunca hayvanlara ampisilin, gentamisin, metronidazol, neomisin ve vankomisin den oluşan bir antibiyotik kokteyli 10 gün boyunca verilmiş ve bu hayvanlarda bakteri yükü ile birlikte anatomik, histolojik ve immünolojik olarak meydana gelen değişimler değerlendirilmiştir. 16S rDNA ile qPZR ile yapılan değerlendirmede bakteri sayısında kontrol grubuna göre 10 kat azalma olduğu ve bu azalmanın özellikle Firmicutes türlerinde gözlemlendiği bildirilmiştir. Buna karşın özellikle Bacteroidetes türlerinde ve Akkermansia türlerinde artış gözlemlenmiştir. Yapılan değerlendirmelerde antibiyotik kullanan hayvanların bağırsağında lamina propria tabakasında ve enterositlerde hiperplazi tespit edilmiştir. Çalışmanın çarpıcı bir diğer sonucu ise ince bağırsakta IL-17A sentezinde dikkat çekici bir düşüş görülmüş olmasıdır

[165]. Bizim çalışmamızda da benzer şekilde Firmicutes grubu bakterilerde en az 10 kat kadar azalma görülmüştür. Ancak bizim çalışmamızda Bacteroidetes ve Akkermansia grubu bakterilerde de yaklaşık 10 kat düşüş tespit edilmiştir. Hatta beş hastada Bacteroidetes hiç tespit edilmemiştir. Hayvan deneyleri ile insan deneyleri arasında farklılıkların görülmesi beklenen bir durumdur. İnsan bağırsağında daha kompleks bir ekosistemde gelişen olaylar söz konusudur. Ayrıca tedavi protokolünde yer alan bizmutun antibakteriyel etkinliği de bilinmektedir [166]. Bizmutun kullanımı da bakteri sayılarındaki düşüşe katkıda bulunmuş olabilir.

Yedi günlük florokinolon veya β -laktam antibiyotik tedavisi uygulanan hastalarda 16S rRNA ile qPZR ve pirosekans yöntemleri ile mikrobiyotanın değerlendirildiği bir başka çalışmada genel olarak bağırsak mikrobiyotasının yapısında ve tür çeşitliliğinde azalma olduğu bildirilmiştir. Bacteroidetes/Firmicutes oranında bir artış olduğu bildirilmiş olmasına rağmen genel olarak Bacteroidetes grubunda bizim çalışmamızın sonuçları ile paralel şekilde mikrobiyota genelinde azaldığı tespit edilmiştir [167].

Klaritromisin ve metronidazol tedavi protokolü uygulanan HP hastalarında kültür bazlı yapılan çalışmalarda antibiyotiklerin kısa süreli etkilerinde mikrobiyotada mutlak bir değişikliğin olduğu gösterilmiştir [168, 169, 170]. Kültürü yapılabilen *Bifidobacterium*, *Clostridium* ve *Bacteroides spp* bakterilerinde hemen tedavi sonrasında dikkat çekici düşüşlerin olduğu ve tedaviden dört hafta kadar sonra da *Bifidobacterium spp* ve *Bacteroides spp* türlerinde düşüklüğün devam ettiği bildirilmiştir [168]. Antibiyotiklerin etkilerinin bireysel değerlendirilmesi gerektiğini düşünen bir grup bilim adamı klaritromisin ve metronidazol tedavisi alan 3 HP hastasında, antibiyotiklerin bağırsak mikrobiyotası üzerinde kısa ve uzun süreli etkilerini incelemiştir. Gaita örnekleri antibiyotik tedavisini izleyen 0. gün, 8-13 gün, 1. yıl ve 4. yılda değerlendirilmiştir. Özellikle Bacteroidetes grubunda bireyler arasında farklılıklar olduğu saptanmıştır. Ancak hastaların tümünde Bacteroidetes grubunda azalma olduğu da görülmüştür. Tüm hastaların bakteri türleri arasında farklılıklar izlenmiştir. Çalışmanın çarpıcı özelliklerinden biri de hastalardan birinde Firmicutes grubu bakterilerin 0. günde artış göstermesidir. Ayrıca çalışmada oral antibiyotik alımının hem boğaz hem de bağırsak mikrobiyotasını ne kadar etkilediği de değerlendirilmiştir. Sonuç olarak antibiyotik tedavisinin, bağırsak mikrobiyotasını boğaz mikrobiyotasına göre daha dramatik bir şekilde değiştirdiği saptanmıştır [61]. Benzer olarak bizim çalışmamızda da genel olarak tüm bakteri

gruplarında düşüş gözlenmiş olmasına rağmen düşüş oranlarında bireyler arasında her bir bakteri grubunda farklılıklar tespit edilmiştir.

Klindamisin tedavisinden sonra kültür bazlı yöntemler ile mikrobiyotanın antibiyotik kullanımından önceki durumuna geri dönmesi tedaviden sonraki birkaç hafta içinde gerçekleştiği bildirilmiştir [171]. Aynı antibiyotiğin değerlendirildiği ve bakteri 16S rRNA gen primerlerinin kullanılarak moleküler çalışmaların kullanıldığı başka bir çalışmada floranın yaklaşık antibiyotik tedavisinden üç ay sonra antibiyotik öncesi yapısına döndüğü saptanmıştır. Bacteroides grup spesifik primerlerinin kullanılması durumunda ise antibiyotik tedavisinden 18 ay sonra bakterilerin antibiyotik kullanım öncesi konuma ulaştığı gösterilmiştir [60]. Pirosekans yönteminin kullanıldığı başka bir çalışmada ise mikrobiyotanın antibiyotik tedavisinden dört yıl sonra dahi değişiminin devam ettiği bildirilmiştir [61]. Çalışmada mikrobiyotanın saptanmasında duyarlılığı arttırmak amacıyla filumları temsil etmesi planlanan *Bifidobacterium spp*, *B. fragilis*, *Lactobacillus spp*, *A. mucinophilia* ve *F. prausnitzii* bakterilerine ait spesifik primerler kullanılmıştır.

Antibiyotiklerin mikrobiyota üzerinde farklı etkilere neden olması; antibiyotiğin spektrumu, etki mekanizması, uygulanma dozu, veriliş şekli, tedavi süresi ile farmokokinetik ve farmokodinamik özellikleri ile ilişkilidir. Bunun dışında konağın bazı özellikleri de bu etkinin ortaya çıkmasında önemlidir. Örneğin konağın mikrobiyota yapısı veya mikrobiyota elemanlarının antibiyotiklere dirençli olması mikrobiyotanın antibiyotiklerden etkilenme düzeyleri üzerinde kritik role sahip olabilir [17, 172]. Çalışmamızda antibiyotik sonrası yapılan değerlendirmede tüm bakterilerin istatistiksel olarak azalması daha çok anaerob bakteriler üzerinde etkili olan metronidazole duyarlılığın yüksek olmasından da kaynaklanıyor olabilir. Çünkü ülkemizde *B. fragilis*'de metronidazole direnç oranı %1'in altındadır [173].

Bakteri popülasyonlarının, antibiyotiğe maruz kaldıkça direnç geliştirebildiği ya da bu direnç genlerini horizontal olarak transfer edebildikleri bildirilmiştir [174]. İnsan bağırsak mikrobiyotası sahip oldukları direnç genlerini diğer flora elemanlarına ya da bağırsakta konaklamayan ancak lümeninden geçen kalıcı olmayan bakterilere de aktarabilirler [175]. Son yıllarda yapılan çalışmaların birçoğunda bu hipotezi destekleyen sonuçlar elde edilmiştir [176, 177, 178].

Sürekli ve uzun süreli antibiyotik kullanımı ile bağırsakta oluşan disbiyozis aslında bir çok hastalık içinde tetikleyici bir faktördür. Yedi yüz on sekiz kişinin dört yıl boyunca

değerlendirildiği bir çalışmada kişilerin antibiyotik kullanımları ile bağırsak inflamatuvar hastalık gelişimi arasında ki ilişkinin araştırıldığı çalışmada, antibiyotik kullanımı ile inflamatuvar bağırsak hastalığının gelişimi arasında pozitif bir ilişki bulunmuş, hatta antibiyotik kullanım oranının artmasına bağlı olarak hastalığın şiddetinin arttığı ifade edilmiştir [179]. HP enfeksiyonunun, inflamatuvar bağırsak hastalığı gelişimindeki rölatif risk 0,64 olup HP'nin inflamatuvar bağırsak hastalığı açısından koruyucu bir etkisi olduğu istatistiksel modeller üzerinden söylenebilir. Ancak bunun tersi olarak HP tedavisinden sonra kişilerde inflamatuvar bağırsak hastalığı gelişip gelişmediğinin araştırılmasına ihtiyaç vardır [180, 181].

Bakteriyel disbiyozis ile malignansi gelişmesi arasındaki ilişkiyi değerlendiren bir çalışmada, antibiyotik kullanımı ile kanser gelişimi arasında tahmini göreceli riskin %95 olduğu belirtilmiştir [182]. Antibiyotik kullanan 4029 kişide kolon kanseri gelişme riskinin değerlendirildiği benzer bir çalışmada kolon kanseri gelişimi için antibiyotik kullanımının bir risk faktörü olduğu belirlenmiştir. Hatta kanser gelişiminden önceki bir yıl içerisinde beş veya daha fazla antibiyotik reçetelenen kişilerde, riskin daha da yükseldiği bildirilmiştir [183]. Ayrıca uzun süre antibiyotik kullanımının meydana getirdiği mikrobiyota değişimi, diyabet gelişimi içinde bir risk faktörü olarak karşımıza çıkmaktadır [184].

Antibiyotiğe bağlı gelişen diyare tedavisinde kullanılan klindamisine eş zamanlı olarak tedaviye probiyotik eklenmesi, hem toksik metabolitlerin azaltılması ve hem de bakteri türlerinin korunması yoluyla bağırsak dengesinin korunmasını sağlar [185]. Bir grup araştırmacı HP tedavisinde kullanılan farklı probiyotiklerin etkinliğini araştırmışlardır. Farklı probiyotiklerin anti-HP ilaçlarının yan etkilerini azaltmakta etkili olduklarını bir probiyotiğin diğerine üstünlüğü bulunmadığını söylemişlerdir [186]. Tedavisi uzun süren HP hastalarında probiyotiklerin kullanımı yaygın olarak düşünülmektedir. Bu amaçla bir gruba sadece anti-HP tedavisi, diğer gruba anti-HP tedavisi ile birlikte probiyotik verilen çalışmada Firmicutes filumunun istatistiksel olarak iki grupta da düştüğü ancak değişimin probiyotik kullanan grupta çok daha düşük olduğu belirlenmiştir. Araştırmacılar, probiyotiklerin antibiyotik kullanımına bağlı olarak mikrobiyota dengesinin korunmasında ayrıca antibiyotiklerin neden olduğu değişimlerin en az düzeyde tutmasında etkili olduğunu belirtmişlerdir [187]. Üçlü tedavi protokolüne eş zamanlı olarak 10-14 günlük probiyotik eklenmiş olan tedavi protokollerinin başarısının oldukça yüksek olduğu, hastaların ishal benzeri şikayetlerinin probiyotik uygulanmayan hastalara göre daha az

oranda görüldüğü ve tedavi protokolüne daha fazla uyum gösterdikleri bildirilmektedir [188, 189].

Çalışmamızdan elde ettiğimiz tüm veriler doğrultusunda, antibiyotik kullanımının disbiyozise neden olabileceği belirlenmiştir. Ancak bu değişimlerin bireyler arasında farklılıklar gösterdiği de saptanmıştır. Antibiyotik kullanımı ile oluşan disbiyozis, başta inflamatuvar bağırsak hastalıkları olmak üzere birçok hastalığın gelişimine neden olabilecektir. Tüm bu nedenlerden dolayı antibiyotik tedavilerinde probiyotiklerin eklenmesi önerilebilir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Helicobacter pylori, tüm dünyada yaygın olan bir enfeksiyondur ve etken antibiyotik tedavisine genellikle dirençlidir. Bu amaçla, tüm dünyada bakterinin eradikasyonunun sağlanmasına yönelik standart tedavi protokolleri oluşturulmaktadır. Bakterinin bir çok antibiyotiğe dirençli olmasından dolayı tedavi protokollerinde birden fazla antibiyotik kullanımı söz konusudur. HP tedavisi alan hastalarda patojen etkenin eradikasyonu işlemi sürecinde mikrobiyotada etkilenmekte ve disbiyosis gelişebilmektedir. Bu amaçla çalışmada içerisinde PPI+metronidazol+tetrasiklin+bizmut içeren 10 günlük dördü HP tedavisi alan hastalarda antibiyotik kullanım öncesi ve antibiyotik tedavisi başladıktan altı hafta sonra alınan gaita örnekleri değerlendirme alınmıştır. İncelemeye alınan örneklerde mikrobiyotada yer alan filumları temsil eden bakterilerin gerçek zamanlı PZR yöntemi ile kantitasyonu yapılmıştır. Kantitasyon sonuçları istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Yapılan değerlendirmede;

- Antibiyotik kullanmadan önce ve antibiyotik kullanımından sonra değerlendirilen gaita örneklerinde değerlendirmeye alınan *Bifidobacterium spp*, *Bacteroides fragilis*, *Lactobacillus spp*, *A. mucinophilia*, ve *F. prausnitzii* bakterileri qPZR yöntemi ile çalışılarak gram başına düşen bakteri miktarı hesaplanmıştır ve düşüşün her bir bakteri için antibiyotik kullanım öncesine göre en az 10 katı kadar düştüğü saptanmıştır.
- Antibiyotik kullanmadan önce ve sonra değerlendirilen gaita örneklerinde Firmucutes filumuna ait bakterilerde düşüş saptanmış ve bu düşüşün istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir (*Bifidobacterium spp* (p=0,000), *F. prausnitzii* (p=0,000)).
- Antibiyotik kullanmadan önce ve sonra değerlendirilen gaita örneklerinde Firmicutes filumuna ait bakterilerde düşüş saptanmış ve bu düşüşün istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir (*Lactobacillus spp* (p=0,000)).
- Antibiyotik kullanmadan önce ve sonra değerlendirilen gaita örneklerinde Bacteroidetes filumuna ait bakterilerde düşüş saptanmış ve bu düşüşün istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir (*Bacteroides fragilis* (p=0,000)).
- Antibiyotik kullanmadan önce ve sonra değerlendirilen gaita örneklerinde Verrucomicrobia filumuna ait bakterilerde düşüş saptanmış ve bu düşüşün istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir (*A. mucinophilia* (p=0,000)).

- HP tedavisi alan tüm hastaların mikrobiyotasında bakteri oranlarında düşüş olması antibiyotiklerin bağırsak mikrobiyotasında disbiyosis gelişimi için bir risk faktörü olabileceği saptanmıştır.
- Antibiyotiklerin kişi bazında birbirinden farklı şekilde etkilere neden olabileceği saptanmıştır.

Bu çalışmanın en büyük kısıtlılığı antibiyotik kullanım sonrası tüm gönüllülerin gaita örneği vermemesidir. Ancak gönüllülerin en az yarısının antibiyotik kullanım sonrası örnekleri incelenebilmiştir. Elde edilen veriler istatistiksel değerlendirme yapılmasına olanak sağlamıştır. Bir diğer kısıtlılık, hastaların tümünün tedavi protokolüne uygun bir şekilde ilaç alıp almadığı kontrol edilemediği için tüm gönüllülerin tedavi protokolüne uydukları kabul edilmiştir. Ancak, tüm hastalarda bakterilerin antibiyotik öncesine göre düşüş göstermesi, hastaların tedavi protokolüne uygun ilaç aldıklarının göstergesi olabilir.

Elde edilen tüm sonuçlar, literatür taraması ile elde edilen sonuçlar ile uyumlu olup antibiyotik kullanımının çalışmaya dahil olan gönüllülerin mikrobiyotasında disbiyozise neden olabilecek önemli bir faktör olduğu belirlenmiştir. Disbiyosisin önlenmesi amacıyla HP tedavisi alan hastaların tedavi protokolüne probiyotik eklenmesinin uygun olacağı fikrindeyiz. Ayrıca, bağırsak mikrobiyotasında genel olarak tüm hastalarda düşüş belirlenmiş olsa da bu düşüşlerin hem hasta hem de bakteri bazında farklılıklar gösterebileceği belirlenmiştir. Bağırsak mikrobiyotası bireysel özellikler taşımakta olup analizlerin değerlendirilmesinde kişisel özellikler göz önünde tutulmalıdır.

Elde edilen tüm sonuçlar temel alınarak yeni çalışmalar tasarlanabilir;

- Farklı antibiyotiklerin veya farklı HP tedavi protokollerinin mikrobiyota üzerindeki etkileri incelenebilir
- Antibiyotik kullanımına bağlı inflamatuvar bağırsak hastalığı gelişimini irdelemek için, antibiyotik kullanım sonrası hastaların şikayetleri değerlendirilebilir
- Mikrobiyota farklı moleküler yöntemler değerlendirilerek yöntemler arası karşılaştırma yapılabilir
- Bireysel bazda mikrobiyota analizleri ve antibiyotiğin etkileri çalışılabilir
- Antibiyotik kullanımının uzun süreli etkilerine bakılarak ortaya çıkan değişimler değerlendirilebilir
- Mikrobiyotanın korunması amacıyla probiyotik/plasebo çalışmaları yapılabilir

- Ülkemizde çok yaygın olarak antibiyotik kullanımı söz konusu olduğundan ülkemize ait bir mikrobiyota veri tabanı oluşturulabilir.

Bu çalışmada antibiyotik kullanımının, mikrobiyotada disbiyozis gelişimi için zemin hazırlayan bir faktör olduğu gösterilmiştir. Bu sonuca göre, tedavi protokolüyle eş zamanlı olarak probiyotik kullanımı önerilmektedir.

KAYNAKLAR

1. Turnbaugh, P. J., Ley, R. E., Hamady, M., Fraser-Liggett, C. M., Knight, R., and Gordon, J. I. (2007). The human microbiome project. *Nature*, 449(7164), 804-810.
2. Zhang, Y. J., Li, S., Gan, R., Y., Zhou, T., Xu, D. P., and Li, H. B. (2015). Impacts of gut bacteria on human health and diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(4), 7493-7519.
3. Gerritsen, J., Smidt, H., Rijkers, G.T., and de Vos, W. M. (2011). Intestinal microbiota in human health and disease: The impact of probiotics. *Genes & Nutrition*, 6, 209–240.
4. Guarner, F., and Malagelada, J.R. (2003). Gut flora in health and disease, *Lancet*, 361(9356), 512-519.
5. Diamant, M., Blaak, E.E., de Vos, and W.M. (2011) Do nutrient gut-microbiota interactions play a role in human obesity, insulin resistance and type 2 diabetes? *Obesity Reviews*, 12, 272-281.
6. Gritz, E. C., and Bhandari V. (2015). The human neonatal gut microbiome: a brief review. *Frontiers in Pediatrics*, 3 (17), 1-12.
7. Gomez-Llorente, C., Plaza-Diaz, J., Aguilera, M., Munoz-Quezada, S., Bermudez-Brito, M., Peso-Echarri, P., Martinez-Silla, R., Vasallo-Morillas, M. I., Campaña-Martin, L., Vives-Piñera, I., Ballesta-Martinez, M. J., and Gil, A. (2013). Three main factors define changes in fecal micro- biota associated with feeding modality in infants. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 57, 461–466.
8. Eckburg, P. B., Bik, E. M., Bernstein, C. N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., Gill, S. R., Nelson, K. E., and Relman, D. A. (2005). Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*, 308, 1635-1638.
9. Bengmark, S. (1998) Ecological control of the gastrointestinal tract. The role of probiotic flora. *Gut*, 42(1), 2-7.
10. Swidsinski, A., Loening-Baucke, V., Lochs, H., and Hale, L. P. (2005). Spatial organization of bacterial flora in normal and inflamed intestine: a fluorescence in situ hybridization study in mice. *World Journal of Gastroenterology*, 11, 1131–1140.

11. Sekirov, I., Russell, S. L., Antunes, L. C., and Finlay, B. B. (2010). Gut microbiota in health and disease. *Physiological Reviews*, 90(3), 859-904.
12. Van de Merwe, J. P., Stegeman, J. H. and Hazenberg, M. P. (1983). The resident faecal flora is determined by genetic characteristics of the host. Implications for crohn's disease? *Antonie Van Leeuwenhoek*, 49, 119-124.
13. Ley, R. E., Bäckhed, F., Turnbaugh, P., Lozupone, C. A., Knight, R. D. and Gordon, J. I. (2005). Obesity alters gut microbial ecology. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 102(31), 11070-11075.
14. Björkstén, B., Naaber, P., Sepp, E. and Mikelsaar, M. (1999). The intestinal microflora in allergic Estonian and Swedish 2-year-old children. *Clinical and Experimental Allergy*, 29(3), 342-346.
15. Ottman, N., Smidt, H., de Vos W. M., and Belzer, C. (2012). The function of our microbiota: who is out there and what do they do? *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2, 104-115.
16. Booiijink, C. C., Zoetendal, E. G., Kleerebezem, M. and de Vos, W.M. (2007). Microbial communities in the human small intestine: coupling diversity to metagenomics. *Future Microbiology*, 2, 285-295.
17. Jernberg, C., Löfmark, S., Edlund, C., and Jansson, J. K. (2010). Long-term impacts of antibiotic exposure on the human intestinal microbiota. *Microbiology*, 156(11), 3216-3223.
18. Fuller, R. (1986 1-7 September). *Probiotics*. Paper presented at the Society for Applied Bacteriology Symposium Series, USA
19. Van Loo, J.A. (2004). Prebiotics promote good health: the basis, the potential, and the emerging evidence. *Journal of Clinical Gastroenterology* 38(6), 70-75.
20. Mazmanian, S. K., Liu, C. H., Tzianabos, A. O., and Kasper, D. L. (2005). An immunomodulatory molecule of symbiotic bacteria directs maturation of the host immune system. *Cell*, 122, 107–118.
21. Rakoff-Nahoum, S., and Medzhitov, R. (2008). Innate immune recognition of the indigenous microbial flora. *Mucosal Immunology*, 1(1), 10-14.
22. Bouskra, D., Brezillon, C., Berard, M., Werts, C., Varona, R., Boneca, I. G., and Eberl, G. (2008). Lymphoid tissue genesis induced by commensals through NOD1 regulates intestinal homeostasis. *Nature*, 456, 507– 510.
23. Bates, J. M., Akerlund, J., Mittge, E., and Guillemin, K. (2007). Intestinal alkaline phosphatase detoxifies lipopolysaccharide and prevents inflammation in

- zebrafish in response to the gut microbiota. *Cell Host & Microbe*, 2, 371–382.
24. Kelly, D., Campbell, J. I., King T. P., Grant, G., Jansson, E. A., Coutts, A. G., Pettersson, S., and Conway, S. (2004). Commensal anaerobic gut bacteria attenuate inflammation by regulating nuclear-cytoplasmic shuttling of PPAR-gamma and RelA. *Nature Immunology*, 5, 104–112.
 25. Macpherson, A. J., and Uhr, T. (2004). Induction of protective IgA by intestinal dendritic cells carrying commensal bacteria. *Science*, 303, 1662–1665.
 26. Yanagibashi, T., Hosono, A., Oyama, A., Tsuda, M., Hachimura, S., Takahashi, Y., Itoh, K., Hirayama, K., Takahashi, K., and Kaminogawa, S. (2009). Bacteroides induce higher IgA production than lactobacillus by increasing activation-induced cytidine deaminase expression in B cells in murine Peyer's patches. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 73, 372–377.
 27. Sanz, Y., Nadal, I., and Sanchez, E. (2007). Probiotics as drugs against human gastrointestinal infections. *Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery*, 2, 148–156.
 28. Termen, S., Tollin, M., Rodriguez, E., Sveinsdottir, S. H., Johannesson, B., Cederlund, A., Sjovall, J., Agerberth, B., and Gudmundsson, G. H. (2008). PU1 and bacterial metabolites regulate the human gene CAMP encoding antimicrobial peptide LL-37 in colon epithelial cells. *Molecular Immunology*, 45, 3947–3955.
 29. Stappenbeck, T. S., Hooper, L. V., and Gordon, J. I. (2002). Developmental regulation of intestinal angiogenesis by indigenous microbes via Paneth cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 15451–15455.
 30. Patsos, G., and Corfield, A. (2009). Management of the human mucosal defensive barrier: evidence for glycan legislation. *The Journal of Biological Chemistry*, 390, 581–590.
 31. Montiel-Castro, A. J., González-Cervantes, R. M., Bravo-Ruiseco, G., and Pacheco-López, G. (2013). The microbiota-gut-brain axis: neurobehavioral correlates, health and sociality. *Frontiers in Integrative Neuroscience*, 7(7), 70–86.
 32. Fetissov, S. O., Hamze Sinno, M., Coeffier, M., BoleFeysot, C., Ducrotte, P., Hokfelt, T., and Dechelotte, P. (2008). Autoantibodies against appetite-regulating peptide hormones and neuropeptides: putative modulation by gut microflora. *Nutrition*, 24, 348–359.

33. Macfarlane, S., and Macfarlane, G. T. (2003). Regulation of short-chain fatty acid production. *Proceedings Of The Nutrition Society*, 62, 67–72.
34. Vella, A., and Farrugia, G. (1998). D-Lactic acidosis: pathologic consequence of saprophytism. *Mayo Clinic Proceedings*, 73, 451–456.
35. Giorgetti, G., Brandimarte, G., Fabiocchi, F., Ricci, S., Flamini, P., Sandri, G., Trotta, M. C., Elisei, W., Penna, A., Giuseppina Lecca, P., Picchio, M., and Tursi A. (2015). Interactions between innate immunity, microbiota, and probiotics. *Journal of Immunology Research*, 2015, 501361-501368.
36. Sidhu, H., Allison, M. J., Chow, J. M., Clark, A., and Peck, A. B. (2001). Rapid reversal of hyperoxaluria in a rat model after probiotic administration of *Oxalobacter formigenes*. *The Journal of Urology*, 166, 1487–1491.
37. Nagalingam, N. A., and Lynch, S. V. (2012). Role of the microbiota in inflammatory bowel diseases. *Inflammatory Bowel Diseases*, 18, 968–984.
38. Kolho, K. L., Korpela, K., Jaakkola, T., Pichai, M. V., Zoetendal, E. G., Salonen, A., and de Vos, W. M. (2015). Fecal microbiota in pediatric inflammatory bowel disease and its relation to inflammation. *The American Journal of Gastroenterology*, 110(6), 921-930.
39. Sawin, E. A., De Wolfe, T. J., Aktas, B., Stroup, B. M., Murali, S. G., Steele, J. L., and Ney, D. M. (2015). Glycomacropeptide is a prebiotic that reduces *Desulfovibrio* bacteria, increases cecal short chain fatty acids and is anti-inflammatory in mice. *Gastrointestinal and Liver Physiology*, (In press)
40. El-Salhy, M. (2015). Recent developments in the pathophysiology of irritable bowel syndrome. *World Journal of Gastroenterology*, 21(25), 7621-7636.
41. Hur, K. Y., and Lee, M. S. (2015). Gut Microbiota and Metabolic Disorders. *Diabetes & Metabolism - Journal*, 39(3), 198-203.
42. Abdul-Hai, A., Abdallah, A., and Malnick, S. D. (2015). Influence of gut bacteria on development and progression of non-alcoholic fatty liver disease. *World Journal of Hepatology*, 7(12), 1679-1684.
43. Seki, E. and Schanbl, B. (2012). Role of innate immunity and the microbiota in liver fibrosis: crosstalk between the liver and gut. *The Journal of Physiology*, 590, 447-458.
44. Heberling, C. A., Dhurjati, P. S. and Sasser, M. (2013). Hypothesis for a systems connectivity model of autism spectrum disorder pathogenesis: Links to gut bacteria, oxidative stress, and intestinal permeability. *Medical Hypotheses*, 80,

264–270.

45. Chu, F. F., Esworthy, S., Chu, P. G., Huycke, M., and Doroshov, J. (2003). Bacteria-induced intestinal cancer in mice with disrupted Gpx1 and Gpx2 genes. *Free Radical Biology and Medicine*, 351, 165–166.
46. Viaud, S., Saccheri, F., Mignot, G., Yamazaki, T., Daillère, R., Hannani, D., Enot, D. P., Pfirschke, C., Engblom, C., Pittet, M. J., Schlitzer, A., Ginhoux, F., Apetoh, L., Chachaty, E., Woerther, P. L., Eberl, G., Bérard, M., Ecobichon, C., Clermont, D., Bizet, C., Gaboriau-Routhiau, V., Cerf-Bensussan, N., Opolon, P., Yessaad, N., Vivier, E., Ryffel, B., Elson, C. O., Doré, J., Kroemer, G., Lepage, P., Boneca, I. G., Ghiringhelli, F., and Zitvogel, L. (2013). The intestinal microbiota modulates the anticancer immune effects of cyclophosphamide. *Science*, 342, 971–976.
47. Bujanover, Y., Reif, S., and Yaav, J. (1996). *Helicobacter pylori* and peptic disease in the pediatric patient. *Pediatric Clinics of North America*, 43, 213–229.
48. Morales-Guerrero, S. E., Mucito-Varela E., Aguilar-Gutiérrez G. R., Lopez-Vidal, Y. and Castillo-Rojas, G. (2013). The role of CagA protein signaling in gastric carcinogenesis - CagA signaling in gastric carcinogenesis. In Mozsik G. (Ed.), *Current Topics in Gastritis - 2012*, In Tech, Open Access, ISBN: 978-953-51-0907-5, DOI: 10.5772/46056
49. Kusters, J. G., van Vliet, A. H., and Kuipers, E. J. (2006). Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Clinical Microbiology Reviews*, 19(3), 449–490.
50. Budzyński, J., and Kłopotcka, M. (2014). Brain-gut axis in the pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *World Journal of Gastroenterology*, 20(18), 5212–5225.
51. Aebischer, T., Fischer, A., Walduck, A., Schlötelburg, C., Lindig, M., Schreiber, S., Meyer, T. F., Bereswill, S., and Göbel, U. B. (2006). Vaccination prevents *Helicobacter pylori*-induced alterations of the gastric flora in mice. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 46(2), 221–229.
52. Khosravi, Y., Seow, S. W., Amoyo, A. A., Chiow, K. H., Tan, T. L., Wong, W. Y., Poh, Q. H., Sentosa, I. M., Bunte, R. M., Pettersson, S., Loke, M. F., and Vadivelu, J. (2015). *Helicobacter pylori* infection can affect energy modulating hormones and body weight in germ free mice. *Scientific Reports*, 5, 8731–8738.
53. Lender, N., Talley, N. J., Enck, P., Haag, S., Zipfel, S., Morrison, M., and Holtmann, G. J. (2014). Review article: associations between *Helicobacter pylori*

- and obesity an ecological study. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. 40, 24–31.
54. Nagy, T. A., Allen, S. S., Wroblewski, L. E., Flaherty, D. K., Slaughter, J. C., Perez-Perez, G., Israel, D. A., and Peek, R. M. J. (2011). *Helicobacter pylori* induction of eosinophil migration is mediated by the cag pathogenicity island via microbial-epithelial interactions. *The American Journal of Pathology*. 178, 1448–1452.
 55. Heimesaat, M. M., Fischer, A., Plickert, R., Wiedemann, T., Loddenkemper, C., Göbel, U. B., Bereswill, S., and Rieder, G. (2014). *Helicobacter pylori* induced gastric immunopathology is associated with distinct microbiota changes in the large intestines of long-term infected Mongolian gerbils. *PLoS ONE*, 9(6): 100362-100373.
 56. Luther, J., Owyang, S. Y., Takeuchi, T., Cole, T. S., Zhang, M., Liu, M., Erb-Downward, J., Rubenstein, J. H., Chen, C. C., Pierzchala, A. V., Paul, J. A., and Kao, J. Y. (2011). *Helicobacter pylori* DNA decreases pro-inflammatory cytokine production by dendritic cells and attenuates dextran sodium sulphate-induced colitis. *Gut*, 60, 1479-1486.
 57. Papamichael, K., Konstantopoulos, P., and Mantzaris, G. J. (2014). *Helicobacter pylori* infection and inflammatory bowel disease: is there a link? *World Journal of Gastroenterology*, 20: 6374-6385.
 58. Perez-Cobas, A. E., Gosalbes, M. J., Friedrichs, A., Knecht, H., Artacho, A., Eismann, K., Otto, W., Rojo, D., Bargiela, R., von Bergen, M., Neulinger, S. C., Däumer, C., Heinsen, F. A., Latorre, A., Barbas, C., Seifert, J., dos Santos, V. M., Ott, S. J., Ferrer, M., and Moya, A. (2013) Gut microbiota disturbance during antibiotic therapy: a multi-omic approach. *Gut*, 62(11), 1591-1601.
 59. Bartlett, G. (2002). Clinical practice. Antibiotic-associated diarrhea. *The New England Journal of Medicine*. 346, 334-339.
 60. Löfmark, S., Jernberg, C., Billstrom, H., Andersson, D. I. and Edlund, C. (2006). Clindamycin-induced enrichment and long-term persistence of resistant *Bacteroides* spp and resistance genes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 58, 1160-1167.
 61. Jakobsson, H. E., Jernberg, C., Andersson, A. F., Sjölund-Karlsson, M., Jansson, J. K. and Engstrand, L. (2010). Short-term antibiotic treatment has differing long-term impacts on the human throat and gut microbiome. *PloS ONE*, 5, e9836

62. Koren, O., Goodrich, J. K., Cullender, T. C., Spor, A., Laitinen, K., Bäckhed, H. K., Gonzalez, A., Werner, J. J., Angenent, L. T., Knight, R., Bäckhed, F., Isolauri, E., Salminen, S., and Ley, R. E. (2012). Host remodeling of the gut microbiome and metabolic changes during pregnancy. *Cell*, 150(3), 470-480.
63. Cox, L. M. and Blaser, M. J. (2015). Antibiotics in early life and obesity. *Nature Reviews Endocrinology*, 11(3), 182–190.
64. Marshall, B. M., and Levy, S. B. (2011). Food animals and antimicrobials: impacts on human health. *Clinical Microbiology Reviews*, 24, 718–733.
65. Trasande, L., Blustein, J., Liu, M., Corwin, E., Cox, L. M., and Blaser, M. J. (2013). Infant antibiotic exposures and early-life body mass. *International Journal of Obesity*, 37, 16–23.
66. Jandhyala, S. M., Talukdar, R., Subramanyam, C., Vuyyuru, H., Sasikala, M., and Reddy, D. N. (2015) Role of the normal gut microbiota. *World Journal of Gastroenterology*, 21(29), 8787-8803.
67. Le Chatelier, E., Nielsen, T., Qin, J., Prifti, E., Hildebrand, F., Falony, G., Almeida, M., Arumugam, M., Batto, J. M., Kennedy, S., Leonard, P., Li, J., Burgdorf, K., Grarup, N., Jørgensen, T., Brandslund, I., Nielsen, H. B., Juncker, A. S., Bertalan, M., Levenez, F., Pons, N., Rasmussen, S., Sunagawa, S., Tap, J., Tims, S., Zoetendal, E. G., Brunak, S., Clément, K., Doré, J., Kleerebezem, M., Kristiansen, K., Renault, P., Sicheritz- Ponten, T., de Vos, W. M., Zucker, J. D., Raes, J., Hansen, T., Bork, P., Wang, J., Ehrlich, S. D., and Pedersen, O. (2013) Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature*, 500, 541-546.
68. Joossens, M., Huys, G., Cnockaert, M., De Preter, V., Verbeke, K., Rutgeerts, P., Vandamme, P., and Vermeire, S. (2011) Dysbiosis of the faecal microbiota in patients with Crohn's disease and their unaffected relatives. *Gut*, 60, 631-637.
69. Maukonen, J. (2012). *Characterization of the human predominant fecal microbiota, With special focus on the Clostridial clusters IV and XIVa*. PhD Thesis, VTT Technical Research Centre of Finland, Finland, p 25-34.
70. Wiegell, J., Tanner, R., Rainey, F. A. An introduction to the family Clostridiaceae. (2006). In Stackebrandt, E., Jones, D., Holzappel, W., Reboli, A. (Eds). *Prokaryotes*. New York, NY: Springer; pp. 654–678.
71. . Yarza, P., Ludwig, W., Euzéby, J., Amann, R., Schleifer, K. H., Glöckner, F. O., Rosselló-Móra, R. (2010). Update of the all-species living tree project based on

- 16S and 23S rRNA sequence analyses. *Systematic and Applied Microbiology*, 33(6), 291–299.
72. Hippe, H., Andreesen, J. R., and Gottschalk, G. (1992). The Genus *Clostridium* – Nonmedical. In: Balows, A., Trüper, H. G., Dworkin, M., Harder, W., Schleifer, K. (Eds.), *The Prokaryotes*. 2nd edition. New York, NY, Springer-Verlag, pp. 1800–1866.
 73. Zellner, G., Stackebrandt, E., Nagel, D., Messner, P., Weiss, N., and Winter, J. (1996). *Anaerofilum pentosovorans* gen. nov.sp.nov., and *Anaerofilum agile* sp.nov., two new, strictly anaerobic, mesophilic, acidogenic bacteria from anaerobic bioreactors. *International Journal Of Systematic Bacteriology*, 46(4), 871–875.
 74. Lawson, P. A., Song, Y., Liu, C., Molitoris, D. R., Vaisanen, M. L., Collins, M. D., Finegold, S. M. (2004). *Anaerotruncus colihominis* gen. nov., sp. nov., from human faeces. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(2), 413–417.
 75. He, Y. L., Ding, Y. F., Long, Y. Q. (1991). Two cellulolytic *Clostridium* species: *Clostridium cellulosi* sp. nov. and *Clostridium cellulofermentans* sp. nov. *International Journal Of Systematic Bacteriology*, 41(2), 306–30
 76. Rainey, F. A. (2009). Family X. Veillonellaceae. In de Vos, P., Garrity, G.M., Jones, D., Krieg, N. R., Ludwig, W., Rainey, F. A., (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2nd edition. Dordrecht, Germany, Springer. pp. 1059–1129.
 77. Wood, B. J. B., Holzapfel, W. H. (1995). *The genera of lactic acid bacteria*. 1st edition. Suffolk, Great Britain: Blackie Academic & Professional, pp23-34.
 78. Popoff, M. R., and Poulain, B. (2010). Bacterial toxins and the nervous system: neurotoxins and multipotential toxins interacting with neuronal cells. *Toxins (Basel)*, 2(4), 683–737.
 79. Wexler, H. M. *Bacteroides*: (2007). The good, the bad, and the nitty-gritty. *Clinical Microbiology Reviews*, 20(4), 593–621.
 80. Mättö, J., Malinen, E., Suihko, M. L., Alander, M., Palva, A., and Saarela, M. (2004). Genetic heterogeneity and functional properties of intestinal bifidobacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 97(3), 459–470.
 81. Wade, W. G., Downes, J., Dymock, D., Hiom, S. J., Weightman, A. J., Deuhirst, F. E., Paster, B. J., Tzellas, N. and Coleman, B. (1999). The family

- Coriobacteriaceae: reclassification of *Eubacterium exiguum* (Poco et.al 1996) and *Peptosterptococcus heliotrinireducens* (Lanigon 1976) as *Slackia heliotrinireducens* genov., and *Eubacterium lentum* (Prevot 1938) as *Eggerthella lenta*.gen.nov.jomb.nov. ***International Journal Of Systematic Bacteriology***, 49, 595-600.
82. Tsai, H. H., Sunderland, D., Gibson, G. R., Hart, C. A., and Rhodes, J. M. (1992). A novel mucin sulphatase from human faeces: its identification, purification and characterization. ***Clinical Science (Lond)***, 82(4), 447–454.
 83. Derrien, M., Vaughan, E. E., Plugge, C. M., and de Vos, W. M. (2004). *Akkermansia muciniphila* gen. nov., sp. nov., a human intestinal mucin-degrading bacterium. ***International Journal Of Systematic Bacteriology***, 54(5), 1469–1476.
 84. Hofstad, T. (2006). The Genus *Fusobacterium*. In Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K. H., Stackebrandt, E. (Eds.), *The Prokaryotes* New York, NY: Springer-Verlag; pp. 1016–1027.
 85. Thauer, R. K., Kaster, A., Seedorf, H., Buckel, W., and Hedderich, R. (2008). Methanogenic archaea: Ecologically relevant differences in energy conservation. ***Nature Reviews Microbiology***, 6(8), 579–591.
 86. Lagier, J. C., Hugon, P., Khelaifia, S., Fournier, P. E., La Scola, B., and Raoult, D. (2015). The rebirth of culture in microbiology through the example of culturomics to study human gut microbiota. ***Clinical Microbiology Reviews***, 28, 237-264.
 87. Fraher, M. H., O'toole, P. W. and Quigley, E. M. (2012). Techniques used to characterize the gut microbiota: a guide for the clinician. ***Nature reviews gastroenterology and hepatology***, 9, 312-322.
 88. Corthier, G., Muller, M. C., and L'Haridon, R. (1996). Selective enumeration of *Bacteroides vulgatus* and *B. distasonis* organisms in the predominant human fecal flora by using monoclonal antibodies. ***Applied and environmental microbiology***, 62(2), 735-738.
 89. O'Sullivan, D. J. (2000). Methods for analysis of the intestinal microflora. ***Current issues in intestinal microbiology***, 1(2), 39-50.
 90. Lagier, J. C., Million, M., Hugon, P., Armougom, F., and Raoult, D. (2012). Human gut microbiota: repertoire and variations. ***Frontiers in Cellular and Infection Microbiology***, 2, 136-155.
 91. Wang, Z., Gerstein, M., and Snyder, M. (2009). RNA-Seq: a revolutionary tool

- for transcriptomics. *Nature Reviews Genetics*, 10(1), 57-63.
92. Namsolleck, P., Thiel, R., Lawson, P., Holmstrøm, K., Rajilic, M., Vaughan, E. E., Rigottier-Gois L, Collins MD, de Vos WM, and Blaut, M. (2004). Molecular methods for the analysis of gut microbiota. *Microbial ecology in health and disease*, 16(2-3), 71-85.
 93. Kumar, N. S., and Gurusubramanian, G. (2011). Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers and its applications. *Science vision*, 11(3), 116-124.
 94. Zoetendal, E. G., Akkermans, A. D. L., and de Vos, W. M. (1998). Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host- specific communities of active bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 3854-3859.
 95. Matsumoto, M., Sakamoto, M., Hayashi, H., and Benno, Y. (2005). Novel phylogenetic assignment database for terminal-restriction fragment length polymorphism analysis of human colonic microbiota. *Journal of microbiological methods*, 61(3), 305-319.
 96. Paliy, O., and Agans, R. (2012). Application of phylogenetic microarrays to interrogation of human microbiota. *FEMS microbiology ecology*, 79(1), 2-11.
 97. Baker, G. C., Smith, J. J., and Cowan, D. A. (2003). Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *Journal of Microbiological Methods*, 55(3), 541-555.
 98. Roca A., and Cox M. M. 1997. RecA protein: structure, function, and role in recombinational DNA repair. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, 56:129-223.
 99. Miller, D. M., Dudley, E. G., and Roberts, R. F. (2012). Technical note: development of a quantitative PCR method for monitoring strain dynamics during yogurt manufacture. *Journal of Dairy Science*, 95(9), 4868- 4872.
 100. Brown, T. A. (2006). *Genomes*. Wiley-Liss, Oxford. Pp.100-134.
 101. Mardis, E. R. (2008). Next-generation DNA sequencing methods. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 9, 387–402.
 102. Shendure J., and Ji, H. (2008). Next-generation DNA sequencing. *Nature Biotechnology*, 26, 1135–1145.
 103. Mardis, E. R. (2008). The impact of next-generation sequencing technology on genetics. *Trends in Genetics*, 24, 133–141.
 104. Rothberg, J. M., Hinz, W., Rearick, T. M., Schultz, J., Mileski, W., Davey, M.,

- Leamon, J. H., Johnson, K., Milgrew, M. J., Edwards, M., Hoon, J., Simons, J. F., Marran, D., Myers, J. W., Davidson, J. F., Branting, A., Nobile, J. R., Puc, B. P., Light, D., Clark, T. A., Huber, M., Branciforte, J. T., Stoner, I. B., Cawley, S. E., Lyons, M., Fu, Y., Homer, N., Sedova, M., Miao, X., Reed, B., Sabina, J., Feierstein, E., Schorn, M., Alanjary, M., Dimalanta, E., Dressman, D., Kasinskas, R., Sokolsky, T., Fidanza, J. A., Namsaraev, E., McKernan, K. J., Williams, A., Roth, G. T., and Bustillo, J. (2011). An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. *Nature*, 475, 348–352.
105. Korch, J., Bjornson, K. P., Chaudhuri, B. P., Cicero, R. L., Flusberg, B. A., Gray, J. J., Holden, D., Saxena, R., Wegener, J., and Turner, S. W. (2010). Real-time DNA sequencing from single polymerase molecules. *Methods in Enzymology*, 472, 431–455.
106. Mulis, K. B. (1990). Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction. *Annales De Biologie Clinique*, 48, 579-582.
107. Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., and Watson, R. (1993). Kinetic PCR analysis: real time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology*, 11, 1026-1030.
108. Wittwer, C. T., Herrmann, M. G., Gundry, C. N., and Elenitoba-Johnson, K. S. (2001). Real Time multiplex PCR assays. *Methods*. 25, 430–442.
109. 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., and Smith, T. F. (2006). Real Time PCR in Clinical Microbiology: *Applications for Routine Laboratory Testing. Clinical Microbiology*, 19, 165–256.
110. Wong, M. L. and Medrano, J. F. (2005). Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques*, 39(1), 75-85.
111. Peirson, S. N., Butler, J. N., and Foster, R. G. (2003). Experimental validation of novel and conventional approaches to quantitative Real Time PCR data analysis. *Nucleic Acids Research*, 31 (14), 73-80.
112. Mackay, I. M. (2004). Real Time PCR in the microbiology laboratory. *Clinical Microbiology and Infection*. 10, 190–212.
113. Kubista, M., Andrade, J. M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonák, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjöback, R., Sjögreen, B., Strömbom, L., Ståhlberg, A., and Zoric, N. (2006). The Real Time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine*, 27, 95–125.

114. Navarro, E., Serrano-Heras, G., Castaño, M. J., and Solera, J. (2015). Real-time PCR detection chemistry. *Clinica Chimica Acta*, 439, 231-250.
115. Bao, G., Santangelo, P., Nitin, N., and Rhee, W. J. (2010). Nanostructured probes for in vivo gene detection. *Nanomedicine (Chichester)*, 54, 143-165.
116. Lyon, E., and Wittwer, C. T. (2009). LightCycler technology in molecular diagnostics. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 11(2), 93-101.
117. Smith, C. J., and Osborn, A. M. (2009). Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology*, 67(1), 6-20.
118. Ingham, S. C. (1999). Use of modified *Lactobacillus* selective medium and *Bifidobacterium iodoacetate* medium for differential enumeration of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium spp.* in powdered nutritional products. *Journal of Food Protection*, 62(1), 77-80.
119. Miyazaki, K., Martin, J. C., Marinsek-Logar, R., and Flint, H. J. (1997). Degradation and utilization of xylans by the rumen anaerobe *Prevotella bryantii* (formerly *P. ruminicola* subsp. *brevis*) B14. *Anaerobe*, 3, 373-381.
120. Matsuki, T., Watanabe, K., Fujimoto, J., Miyamoto, Y., Takada, T., Matsumoto, K., Oyaizu, H., and Tanaka, R. (2002). Development of 16S rRNA-gene-targeted group-specific primers for the detection and identification of predominant bacteria in human feces. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(11), 5445-5451.
121. Maeda, H., Fujimoto, C., Haruki, Y., Maeda, T., Kokeguchi, S., Petelin, M., Arai, H., Tanimoto, I., Nishimura, F., and Takashiba, S. (2003). Quantitative real-time PCR using TaqMan and SYBR Green for *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, tetQ gene and total bacteria. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 39(1), 81-86.
122. Everard, A., Belzer, C., Geurts, L., Ouwerkerk, J. P., Druart, C., Bindels, L. B., Guiot, Y., Derrien, M., Muccioli, G. G., Delzenne, N. M., de Vos, W. M., and Cani, P. D. (2013). Cross-talk between *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(22), 9066-9071.
123. Bartosch, S., Fite, A., Macfarlane, G. T. and McMurdo, M. E. (2004). Characterization of bacterial communities in feces from healthy elderly volunteers

- and hospitalized elderly patients by using real-time PCR and effects of antibiotic treatment on the fecal microbiota. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 3575–3581.
124. WHO Expert Consultation. (2004). Appropriate body-mass index for Asian populations and its implications for policy and intervention strategies. *Lancet*, 363(9403), 157-163.
 125. Peterson, J., Garges, S., Giovanni, M., McInnes, P., Wang, L., Schloss, J. A., Bonazzi, V., McEwen, J. E., Wetterstrand, K. A., Deal, C., Baker, C. C., Di Francesco, V., Howcroft, T. K., Karp, R. W., Lunsford, R. D., Wellington, C. R., Belachew, T., Wright, M., Giblin, C., David, H., Mills, M., Salomon, R., Mullins, C., Akolkar, B., Begg, L., Davis, C., Grandison, L., Humble, M., Khalsa, J., Little, A. R., Peavy, H., Pontzer, C., Portnoy, M., Sayre, M. H., Starke-Reed, P., Zakhari, S., Read, J., Watson, B., and Guyer, M. (2009). The NIH Human Microbiome Project. *Genome Research*, 19(12), 2317-2323.
 126. O'Hara, A. M., and Shanahan, F. (2006). The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Reports*, 7, 688–693.
 127. Koenig, J. E., Spor, A., Scalfone, N., Fricker, A. D., Stombaugh, J., Knight, R., Angenent, L. T., and Ley, R. E. (2011). Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(1), 4578–4585.
 128. Rajilic-Stojanovic, M., Heilig, H. G., Molenaar, D., Kajander, K., Surakka, A., Smidt, H., and De Vos, W. M. (2009). Development and application of the human intestinal tract chip, a phylogenetic microarray: analysis of universally conserved phylotypes in the abundant microbiota of young and elderly adults. *Environmental Microbiology*, 11, 1736–1751.
 129. Zoetendal, E. G., Rajilic-Stojanovic, M., and De Vos, W. M. (2008). High-throughput diversity and functionality analysis of the gastrointestinal tract microbiota. *Gut*, 57, 1605–1615.
 130. Biagi, E., Nylund, L., Candela, M., Ostan, R., Bucci, L., Pini, E., Nikkila, J., Monti, D., Satokari, R., Franceschi, C., Brigidi, P., and De Vos, W. (2010). Through ageing, and beyond: gut microbiota and inflammatory status in seniors and centenarians. *PLoS ONE*, 5, 10667-10681.
 131. Lopetuso, L. R., Scaldaferri, F., Franceschi, F., and Gasbarrini, A. (2014). The gastrointestinal microbiome - functional interference between stomach and

- intestine. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 28(6), 995-1002.
132. Osaki, T., Matsuki, T., Asahara, T., Zaman, C., Hanawa, T., Yonezawa, H., Kurata, S., Woo, T. D., Nomoto, K., and Kamiya, S.(2012). Comparative analysis of gastric bacterial microbiota in Mongolian gerbils after long-term infection with *Helicobacter pylori*. *Microbial Pathogenesis*, 53, 12–18.
 133. Maldonado-Contreras, A., Goldfarb, K. C., Godoy-Vitorino, F., Karaoz, U., Contreras, M., Blaser, M. J., Brodie, E. L., and Dominguez-Bello, M. G. (2011). Structure of the human gastric bacterial community in relation to *Helicobacter pylori* status. *The ISME Journal*, 5, 574–579.
 134. Malfertheiner, P., Megraud, F., O’Morain, C. A., Atherton, J., Axon, A. T., Bazzoli, F., Gensini, G. F., Gisbert, J. P., Graham, D. Y., Rokkas, T., El-Omar, E. M., and Kuipers, E. J. (2012) Management of *Helicobacter pylori* infection-the Maastricht IV/ Florence Consensus Report. *Gut*, 61, 646-664.
 135. Moriya, M., Uehara, A., Okumura, T., Miyamoto, M., and Kohgo, Y. (2011). Stress-induced hemorrhagic gastric ulcer after successful *Helicobacter pylori* eradication: two case reports. *Journal of Medical Case Reports*, 5, 252-255.
 136. Melmed, R. N., and Gelpin, Y. (1996). Duodenal ulcer: the helicobactrization of a psychosomatic disease? *The Israel Medical Association Journal*, 32, 211-216.
 137. Keohane, J., and Quigley, E. M. (2006). Functional dyspepsia: the role of visceral hypersensitivity in its pathogenesis. *World Journal Gastroenterol*, 12, 2672-2676.
 138. Robinson K. (2015). *Helicobacter pylori*-Mediated Protection against Extra-Gastric Immune and Inflammatory Disorders: *The Evidence and Controversies. Diseases*, 3(2), 34-55.
 139. Rhee, S. H., Pothoulakis, C., and Mayer, E. A. (2009). Principles and clinical implications of the brain-gut-enteric microbiota axis. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 6, 306-314.
 140. Konturek, P. C., Brzozowski, T., and Konturek, S. J. (2011). Stress and the gut: pathophysiology, clinical consequences, diagnostic approach and treatment options. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 62, 591-599.
 141. Mehal, W. Z., (2013). The Gordian Knot of dysbiosis, obesity and NAFLD,” *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 10 (11), 637–644.
 142. Paschos, P. and Paletas, K. (2009). Non alcoholic fatty liver disease and metabolic syndrome. *Hippokratia*, 3 (1), 9–19.

143. Wong, V. W., Tse, C. H., Lam, T. T., Wong, G. L., Chim, A. M., Chu, W., C., Yeung, D. K., Law, P. T., Kwan, H. S., Yu, J., Sung, J. J. and Chan, H. L. (2013). Molecular characterization of the fecal microbiota in patients with nonalcoholic steatohepatitis--a longitudinal study. *PLoS ONE*, 8(4), 62885-62896.
144. Raman, M., Ahmed, I., Gillevet, P. M., Probert, C. S., Ratcliffe, N. M., Smith, S., Greenwood, R., Sikaroodi, M., Lam, V., Crotty, P., Bailey, J., Myers, R. P., Rioux, K. P. (2013). Fecal microbiome and volatile organic compound metabolome in obese humans with nonalcoholic fatty liver disease. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 11(7), 868-875.
145. Ley, R. E., Baćkhed, F., Turnbaugh, P., Lozupone, C. A., Knight, R. D., and Gordon, J. I. (2005). Obesity alters gut microbial ecology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 11070-11075.
146. Ley, R. E. , Turnbaugh, P. J., Klein, S., and Gordon, J. I. (2006). Human gut microbes associated with obesity. *Nature*, 444, 1022-1023.
147. Xu, P., Li, M., Zhang, J. and Zhang, T. (2012). Correlation of intestinal microbiota with overweight and obesity in Kazakh school children. *BMC Microbiology*, 12, 283-289.
148. Li, B. Z., Threapleton, D. E., Wang, J. Y., Xu, J. M., Yuan, J. Q., Zhang, C., Li, P., Ye, Q. L., Guo, B., Mao, C., and Ye, D. Q. (2015). Comparative effectiveness and tolerance of treatments for *Helicobacter pylori*: systematic review and network meta-analysis. *British Medical Journal*, 351, 4052-4063.
149. Malfertheiner, P., Megraud, F., O'Morain, C., Bazzoli, F., El-Omar, E., Graham, D., Hunt, R., Rokkas, T., Vakil, N., and Kuipers E. J. (2007). Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection: the Maastricht III Consensus Report. *Gut*, 56(6), 772-781.
150. Valooran, G. J., Kate, V., Jagdish, S., and Basu, D. (2011). Sequential therapy versus standard triple drug therapy for eradication of *Helicobacter pylori* in patients with perforated duodenal ulcer following simple closure. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 46, 1045-1050.
151. Kadayifci, A., Uygun, A., Polat, Z., Kantarcioğlu, M., Kılıçlar, G., Başer, O., Özcan, A., and Emer, O. (2012). Comparison of bismuth-containing quadruple and concomitant therapies as a first-line treatment option for *Helicobacter pylori*. *The Turkish Journal of Gastroenterology*, 23(1), 8-13.

152. Andersson, D. I., and Hughes, D. (2011). Persistence of antibiotic resistance in bacterial populations. *FEMS Microbiology Reviews*, 35, 901–911.
153. Spellberg, B., Guidos, R., Gilbert, D., Bradley, J., Boucher, H. W., Scheld, M. W., Bartlett, J. G., Edwards Jr, J., and the Infectious Diseases Society of America. (2008). The Epidemic of Antibiotic-Resistant Infections: A Call to Action for the Medical Community from the Infectious Diseases Society of America. *The Epidemic of Antibiotic-Resistant Infections*, 46, 155-164.
154. Willing, B. P., Russell, S. L., and Finlay, B. B. (2011). Shifting the balance: antibiotic effects on host-microbiota mutualism. *Nature Reviews Microbiology*, 9(4), 233-243.
155. Rautava, S., Luoto, R., Salminen, S. and Isolauri, E. (2012). Microbial contact during pregnancy, intestinal colonization and human disease. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*. 9, 565–576.
156. Vrieze, A., Out, C., Fuentes, S., Jonker, L., Reuling, I., Kootte, R. S., van Nood, E., Holleman, F., Knaapen, M., Romijn, J. A., Soeters, M. R., Blaak, E. E., Dallinga-Thie, G. M., Reijnders, D., Ackermans, M. T., Serlie, M. J., Knop, F. K., Holst, J. J., van der Ley, C., Kema, I. P., Zoetendal, E. G., de Vos, W. M., Hoekstra, J. B., Strees, E. S., Groen, A. K, and Nieuwdorp, M. (2014). Impact of oral vancomycin on gut microbiota, bile acid metabolism, and insulin sensitivity. *Journal of Hepatology*. 60, 1–8.
157. Ubeda, C., Taur, Y., Jenq, R. R., Equinda, M. J., Son, T., Samstein, M., Viale, A., Socci, N. D., van den Brink, M. R., Kamboj, M., and Pamer, E. G. (2010). Vancomycin resistant *Enterococcus* domination of intestinal microbiota is enabled by antibiotic treatment in mice and precedes bloodstream invasion in humans. *Journal of Clinical Investigation*, (12), 4332-4341.
158. Sekirov, I., Tam, N. M., Jogova, M., Robertson, M. L., Li, Y., Lupp, C., and Finlay, B. B. (2008). Antibiotic induced perturbations of the intestinal microbiota alter host susceptibility to enteric infection. *Infection and Immunity*, 76(10), 4726-4736.
159. Kangaba, A. A., Saglam, F. Y., Tokman, H. B., Torun, M. and Torun, M. M. (2015). The prevalence of enterotoxin and antibiotic resistance genes in clinical and intestinal *Bacteroides fragilis* group isolates in Turkey. *Anaerobe*, 35, 72-76.
160. Goodman, A. L., Kallstrom, G., Faith, J. J., Reyes, A., Moore, A., Dantas, G. and Gordon, J. I. (2011) Extensive personal human gut microbiota culture

- collections characterized and manipulated in gnotobiotic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108, 6252–6257.
161. Fouhy, F., Guinane, C. M., Hussey, S., Wall, R., Ryan, C. A., Dempsey, E. M., Murphy, B., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., Stanton, C., and Cotter, P. D. (2012). High-throughput sequencing reveals the incomplete, short-term recovery of infant gut microbiota following parenteral antibiotic treatment with ampicillin and gentamicin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(11), 5811–5820.
 162. Dethlefsen, L., Huse, S., Sogin, M. L. and Relman, D. A. (2008). The pervasive effects of an antibiotic on the human gut microbiota, as revealed by deep 16S rRNA sequencing. *PLoS Biology*, 6(11), 2383-2400.
 163. De La Cochetière, M. F., Durand, T., Lepage, P., Bourreille, A., Galmiche, J. P., and Doré, J. (2005) Resilience of the dominant human fecal microbiota upon short-course antibiotic challenge. *Journal of Clinical Microbiology*, 43, 5588–5592.
 164. Manichanh, C., Reeder, J., Gibert, P., Varela, E., Llopis, M., Antolin, M., Guigo, R., Knight, R., and Guarner, F. (2010) Reshaping the gut microbiome with bacterial transplantation and antibiotic intake. *Genome Research*, 20(10), 1411-1419.
 165. Hill, D. A., Hoffmann, C., Abt, M. C., Du, Y., Kobuley, D., Kirn, T. J., Bushman, F. D., and Artis, D. (2010) Metagenomic analyses reveal antibiotic-induced temporal and spatial changes in intestinal microbiota with associated alterations in immune cell homeostasis. *Mucosal Immunology*, 3, 148–158.
 166. Ermis, F., Senocak, Tasci, E. (2015). Current *Helicobacter pylori* treatment in 2014. *World Journal of Methodology*, 5(2), 101-107.
 167. Panda, S., El khader, I., Casellas, F., López, Vivancos, J., García, Cors, M., Santiago, A., Cuenca, S., Guarner, F., and Manichanh, C. (2014). Short-term effect of antibiotics on human gut microbiota. *PLoS ONE*, 9(4), 95476-95489.
 168. Adamsson, I., Nord, C. E., Lundquist, P., Sjostedt, S., and Edlund, C. (1999) Comparative effects of omeprazole, amoxycillin plus metronidazole versus omeprazole, clarithromycin plus metronidazole on the oral, gastric and intestinal microflora in *Helicobacter pylori*-infected patients. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 44: 629–640.
 169. Buhling, A., Radun, D., Muller, W. A., and Malfertheiner, P. (2001) Influence of anti-*Helicobacter* triple-therapy with metronidazole, omeprazole and

- clarithromycin on intestinal microflora. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 15, 1445–1452.
170. Tanaka, J., Fukuda, Y., Shintani, S., Hori, K., Tomita, T., Ohkusa, T., Matsumoto, T., and Miwa, H. (2005) Influence of antimicrobial treatment for *Helicobacter pylori* infection on the intestinal microflora in Japanese macaques. *Journal of Medical Microbiology*, 54, 309–314.
 171. Sullivan, A., Edlund, C., and Nord, C. E. (2001). Effect of antimicrobial agents on the ecological balance of human microflora. *The Lancet Infectious Diseases*, 1(2), 101-114.
 172. Jernberg, C., Löfmark, S., Edlund, C. and Jansson, J.K. (2007). Long-term ecological impacts of antibiotic administration on the human intestinal microbiota. *The ISME Journal*, 1(1), 56-66.
 173. Nagy, E., Urbán, E., Nord, C. E., and ESCMID Study Group on Antimicrobial Resistance in Anaerobic Bacteria. (2011). Antimicrobial susceptibility of *Bacteroides fragilis* group isolates in Europe: 20 years of experience. *Clinical Microbiology and Infection*, 17(3), 371-379.
 174. Huddleston, J. R. (2014). Horizontal gene transfer in the human gastrointestinal tract: potential spread of antibiotic resistance genes. *Journal of Infection and Drug Resistance*, 7, 167-176.
 175. Salyers, A. A., Gupta, A., and Wang, Y. (2004). Human intestinal bacteria as reservoirs for antibiotic resistance genes. *Trends in Microbiology Cell*, 12(9), 412–416.
 176. Ghosh, T. S., Gupta, S. S., Nair, G. B., and Mande, S. S. (2013). *In silico* analysis of antibiotic resistance genes in the gut microflora of individuals from diverse geographies and age-groups. *PLoS ONE*, 8(12), 83823-83838.
 177. Sommer, M. O. A., Dantas, G., and Church, G. M. (2009). Functional characterization of the antibiotic resistance reservoir in the human microflora. *Science*, 325(5944), 1128–1131.
 178. Hu, Y., Yang, X., Qin, J., Lu, N., Cheng, G., Wu, N., Pan, Y., Li, J., Zhu, L., Wang, X., Meng, Z., Zhao, F., Liu, D., Ma, J., Qin, N., Xiang, C., Xiao, Y., Li, L., Yang, H., Wang, J., Yang, R., Gao, G. F., Wang, J., and Zhu, B. (2013). Metagenome-wide analysis of antibiotic resistance genes in a large cohort of human gut microbiota. *Nature Communications*, 4, 2151-2160.
 179. Hashash, J. G., Chintamaneni, P., Ramos, Rivers, C. M., Koutroubakis, I. E.,

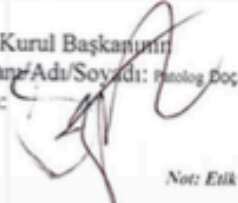
- Regueiro, M. D., Baidoo, L., Swoger, J. M., Barrie, A., Schwartz, M., Dunn, M. A., and Binion, D. G. (2015). Patterns of antibiotic exposure and clinical disease activity in inflammatory bowel disease: A 4-year prospective study. *Inflammatory Bowel Diseases*. (In press)
180. Luther, J., Dave, M., Higgins, P. D., and Kao, J. Y. (2010). Association between *Helicobacter pylori* infection and inflammatory bowel disease: a meta-analysis and systematic review of the literature. *Inflammatory Bowel Diseases*, 16(6), 1077-10784.
 181. Xiang, Z., Chen, Y. P., Ye, Y. F., Ma, K. F., Chen, S. H., Zheng, L., Yang, Y. D., and Jin, X. (2013). *Helicobacter pylori* and Crohn's disease: a retrospective single-center study from China. *World Journal Gastroenterol*, 19, 4576-4581.
 182. Boursi, B., Mamtani, R., Haynes, K., and Yang, Y. X. (2015). Recurrent antibiotic exposure may promote cancer formation-Another step in understanding the role of the human microbiota? *European Journal of Cancer*. (In press)
 183. Dik, V. K., van Oijen, M. G., Smeets, H. M., and Siersema, P. D. (2015). Frequent Use of Antibiotics Is Associated with Colorectal Cancer Risk: Results of a Nested Case-Control Study. *Digestive Diseases and Sciences*. (In press)
 184. Brown, K., Godovannyi, A., Ma, C., Zhang, Y., Ahmadi-Vand, Z., Dai, C., Gorzelak, M. A., Chan, Y., Chan, J. M., Lochner, A., Dutz, J. P., Vallance, B. A., and Gibson, D. L. (2015). Prolonged antibiotic treatment induces a diabetogenic intestinal microbiome that accelerates diabetes in NOD mice. *The ISME Journal*. (In press).
 185. Rehman, A., Heinsen, F. A., Koenen, M. E., Venema, K., Knecht, H., Hellmig, S., Schreiber, S., and Ott, S. J. (2012). Effects of probiotics and antibiotics on the intestinal homeostasis in a computer controlled model of the large intestine. *British Medical Journal Microbiololgy*, 12, 47-57.
 186. Cremonini, F., Di Caro, S., Covino, M., Armuzzi, A., Gabrielli, M., Santarelli, L., Nista, E. C., Cammarota, G., Gasbarrini, G., and Gasbarrini, A. (2002). Effect of different probiotic preparations on anti-helicobacter pylori therapy-related side effects: a parallel group, triple blind, placebo-controlled study. *The American Journal of Gastroenterology*, 97(11), 2744-2749.
 187. Oh, B., Kim, B. S., Kim, J. W., Kim, J. S., Koh, S. J., Kim, B. G., Lee, K. L., and Chun, J. (2015). The effect of probiotics on gut microbiota during the *Helicobacter pylori* eradication: Randomized controlled trial. *Helicobacter*. (In

press).

188. Du, Y. Q., Su, T., Fan, J. G., Lu, Y. X., Zheng, P., Li, X. H., Guo, C. Y., Xu, P., Gong, Y. F., and Li, Z. S. (2012). Adjuvant probiotics improve the eradication effect of triple therapy for *Helicobacter pylori* infection. ***World Journal Gastroenterol***, 18, 6302-6307.
189. Song, M. J., Park, D. I., Park, J. H., Kim, H. J., Cho, Y. K., Sohn, C. I., Jeon, W. K., and Kim, B. I. (2010). The effect of probiotics and mucoprotective agents on PPI-based triple therapy for eradication of *Helicobacter pylori*. ***Helicobacter***, 15, 206-213.

EKLER

EK-1. Etik kurul onayı

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU				
ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI		HELICOBACTER PYLORI TEDAVİSİNİN MIKROBİYOTA VE ANTİBİYOTİK DİRENÇ GENLERİ ÜZERİNE ETKİSİ		
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU				
ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	T.C SAĞLIK BAKANLIĞI ZEKAI TAHİR BURAK KADIN SAĞLIĞI EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU		
	AÇIK ADRESİ:	T.C. Sağlık Bakanlığı Zekai Tahir Burak Kadın Sağlığı Eğitim ve Araştırma Hastanesi Talatpasa Bulvarı Samanpazarı/ANKARA		
	TELEFON	0 312 306 56 85		
	FAKS	0 312 312 50 69		
	E-POSTA	etik_kurul@yahoo.com.tr		
BAŞVURU BİLGİLERİ	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof. Dr. Meltem Yalınay Çırak		
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Tıbbi Mikrobiyoloji ABD		
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi		
	VARSA İDARİ SORUMLU UNVANI/ADI/SOYADI			
	DESTEKLEYİCİ			
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ	Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi		
	ARAŞTIRMANIN FAZİ VE TÜRÜ	FAZ 1	☐	
		FAZ 2	☐	
		FAZ 3	☐	
		FAZ 4	☐	
Gözlemsel ilaç çalışması		☐		
Tıbbi cihaz klinik araştırması		☐		
In vitro tıbbi tanı cihazları ile yapılan performans değerlendirme çalışmaları		☐		
İlaç dışı klinik araştırma		☐		
Diğer ise belirtiniz: Analitik Çalışma				
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒	ÇOK MERKEZLİ ☐	ULUSAL ☐	ULUSLAR ARASI ☐
DEĞERLENDİRİLEN BELGİLER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
Etik Kurul Başkanı Unvanı/Adı/Soyadı: Patolog Doç. Dr. Sema ZERGEROĞLU İmza: 				
Not: Etik kurul başkanı, imzasının yer almadığı her sayfaya imza atmalıdır.				

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	HELICOBACTER PYLORI TEDAVİSİNİN MİKROBİYOTA VE ANTİBİYOTİK DİRENÇ GENLERİ ÜZERİNE ETKİSİ
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı		Açıklama
	SGORTA	☐	
KARAR BELGELERİ	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☒	
	BIYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	☐	
	ILAN	☐	
	YILLIK BİLDİRİM	☐	
	SONUÇ RAPORU	☐	
	GUVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	☐	
	DİĞER:	☐	
	Karar No: 48/2014	Tarihi: 23.12.2014	
	Yukarıda bilgileri verilen başvuruya ilişkin ilgili belgeler araştırmanın/çalışmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup araştırmanın/çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir. İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik kapsamında yer alan araştırmalar/çalışmalar için Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu'ndan izin alınması gerekmektedir.		

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU	
ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI	İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	Paulog Doç. Dr. Sema ZERGEROĞLU

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	Araştırma ile İlgili		Katılım		İmza
Av. Murat CANGÜL	Hukuk	Serbest Avukat	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐			
Doç. Dr. Eyüp HORASANLI	Anesteziyoloji	Keçiören EAH	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐			
Doç. Dr. Firat HARDALAC	Biomedikal	Gazi Üniv. Müh. Fak. Elek. Elektronik	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐			
Yük. Müh. Fatih DULKAN	Metalleri Müh.	Sanayi Bakanlığı	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐			
Prof. Dr. M. Ali BUMİN	Halk Sağlığı	Gazi Üni. Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐			
Uzm. Dr. Ece GÜL İBRİŞİM	Biyo kimya	Zekai Tahir Burak EAH	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐			
Doç. Dr. Ömer ERDEVE	Neonatalogi	Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐			
Prof. Dr. Uğur DİLMEN	Çocuk Hast. (Neonatalogi)	Zekai Tahir Burak EAH	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐			
Prof. Dr. H. Zafer GÜNEY	Farmakoloji	Gazi Üni. Tıp Fak.	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐			
Prof. Dr. Tarkan KARAKAN	Gastroenteroloji	Gazi Üni. Tıp Fak.	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐			
Doç. Dr. Elif Gül YAPAR EYİ	Kadın Doğum Hast.	Zekai Tahir Burak EAH	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐			
Doç. Dr. Sema ZERGEROĞLU	Patoloji	Zekai Tahir Burak EAH	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐			

*:Toplantıda Bulunma

Etik Kurul Başkanı'nın
Unvanı/Adı/Soyadı: Patolog Doç. Dr. Sema ZERGEROĞLU
İmza:

Not: Etik kurul başkanı, imzasının yer almadığı her sayfaya imza atmalıdır.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : Süzük, Serap
 Uyruğu : TC
 Doğum tarihi ve yeri : 23.09.1974
 Medeni hali : Bekar
 Telefon : 0 312 565 62 71
 Faks : 0 312 565 54 55
 e-mail : serap.suzuk1@saglik.gov.tr

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet
Doktora	Gazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Ens	Devam ediyor
Yüksek Lisans	Gazi Üniversitesi, Sağlık Bilimler Ens.	25.02.2000
Lisans	Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi	05.07.1995

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2014-Halen	Ankara, THSK	Mikrobiyoloji Uzmanı
2009-2014	Kırıkkale, YİH Hastanesi	Mikrobiyoloji Uzmanı
2006-2009	Bolu, Devlet Hastanesi	Mikrobiyoloji Uzmanı
2005-2006	Ankara, Düzen Lab.	Mikrobiyoloji Uzmanı
2002-2005	Ankara, SB Numune EAH	Mikrobiyoloji Asistan

Yabancı Dil

İngilizce

Yayınlar

1. Süzük S, Yetener V, Ergüngör V, Balaban N. Cerebellar abscess caused by Shewanella putrefaciens. Scandinavian Journal of Infectious Diseases, 2004; 36 (8): 621-622.

2. Süzük S, Ürünal B, Balaban N, Yetener V. Yoğun bakım ünitelerindeki hastalardan izole edilen mikroorganizmalar ve ilk beş sırada yer alanların antimikrobiyal maddelere duyarlılıkları, Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi, 2004; 34 (4): 238-243
3. Süzük S, Erdoğan D, Kaplanoğlu Take G, Ilgaz C, Değim ZG. Kitosan ve Taurin-Kitosan Uygulamasında Yara İyileşmesinde EGF Reseptör ve Fibronektin'in İmmünohistokimyasal Olarak Gösterilmesi, Gazi Medical Journal, 2011; 22 (1): 6-13.
4. Süzük S, Öztaş D, Avcıküçük H, Çalık A. Hemodiyaliz Ünitesi Çalışanlarının ve Hemodiyaliz Hastalarının HBsAg, Anti HBs ve Anti HCV Serolojik Göstergeleri ile Çalışanların El Hijyeni Uyum Oranları, Viral Hepatit Dergisi, 2013; 19(3):136-139.
5. Süzük S. Keneler ile Birlikte Yaşamak. MTA Doğal Kaynaklar ve Ekonomi Bülteni, 2013; 15: 63-67.
6. Avcıküçük H, Süzük S, Gençay C, Mıkçı H. Sigmoid Kolon Kanseri Bir Hastada Tespit Edilen Leuconostoc spp Bakteriyemisi. Journal of Clinical and Analytical Medicine, DOI: 10.4328/JCAM.2546
7. Süzük S, Avcıküçük H, Kaşkatepe B. Üriner sistem enfeksiyonlarından izole edilen Escherichia coli izolatlarına fosfomisin in-vitro etkinliği. FLORA 2014;19(1):13-17.
8. Süzük S, Avcıküçük H, Öztaş D, Kavak M, Çalık A. Acute Viral Hepatitis A (HAV) Frequency in Kırıkkale province between 2006 and 2013 in the 0-18 age group. Viral Hepatitis Journal 2014;20(3):106-109.
9. Avcıküçük H, Süzük S, Kavak M. HBsAg, Anti Hepatitis C Virus and Anti-HIV Seroprevalence Among Patients Admitted to Our Hospital between 2005 and 2013. Viral Hepatitis Journal 2014;20(3):125-130.
10. Süzük S, Aksaray S, Gülel O, Toyran A, Güvener E. Koroner Ateroskleroz ile Chlamydia pneumoniae ve Sitomegalovirüs Enfeksiyonu İlişkisi. Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıp Dergisi, 2015; 55(2): 155-159.

Hobiler

Fotoğraf çekmek, seslendirme yapmak