



T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

İNFLAMATUVAR BAĞIRSAK HASTALIĞI VE MİKROBİYOTA İLİŞKİSİ

Dr. TUĞBA AVAN
TIPTA UZMANLIK TEZİ

SAMSUN, 2020



T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

İNFLAMATUVAR BAĞIRSAK HASTALIĞI VE MİKROBİYOTA İLİŞKİSİ

Dr. Tuğba AVAN
TIPTA UZMANLIK TEZİ

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Belma DURUPINAR

Bu tez, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Bilimsel Araştırma Yönetim Birimi tarafından PYO. TIP.1904.19.009 proje numarası ile desteklenmiştir.

Samsun, 2020

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca ve tezimi hazırlama sürecinde desteğini esirgemeyen, bilgi ve hoşgörüsü ile yanımda çalışmaktan mutluluk duyduğum değerli hocam ve tez danışmanım Prof. Dr. Belma DURUPINAR'a;

Asistanlık dönemim boyunca bilgilerinden ve tecrübelerinden faydalandığım Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı başkanımız Prof. Dr. Asuman BİRİNCİ ve öğretim üyeleri değerli hocalarım Doç. Dr. Yeliz TANRIVERDİ ÇAYCI, Dr. Öğr. Üyesi Kemal BİLGİN, Dr. Öğr. Üyesi Demet GÜR VURAL'a;

Asistanlık dönemimin ilk kısmını geçirdiğim, bilgilerinden ve tecrübelerinden faydalandığım Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyeleri değerli hocalarım Prof. Dr. Atifet Yasemin ÖZTOP, Prof. Dr. Mustafa Zahir BAKICI, Prof. Dr. Ömer POYRAZ, Prof. Dr. Zeynep SÜMER, Doç. Dr. Cem ÇELİK'e;

Tez çalışmamda desteklerinden dolayı Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Gastroenteroloji Bilim Dalı öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Beytullah YILDIRIM'a, Marmara Üniversitesi öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Nurver ÜLGER'e; İnönü Üniversitesi öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Barış OTLU'ya; Kocaeli Üniversitesi'nden Dr. Melike SAĞIR'a; Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Halk Sağlığı Anabilim Dalı'ndan Dr. Şeyma GENÇ ve Dr. Can Karabıçak'a;

Asistanlığım boyunca birlikte çalışmaktan ve tanışmaktan keyif aldığım asistan arkadaşlarım ve tüm mikrobiyoloji laboratuvarı çalışanlarına, desteklerinden dolayı değerli arkadaşlarım Dr. Hamza KADI, İlknur BIYIK ve Mecit MUTLU'ya;

Yaşamım boyunca hiçbir fedakârlıktan kaçmayarak beni destekleyen, her zaman yanımda olduklarını hissettiğim annem, babam, ablalarım ve şu an hayatta olmayan ancak varlığını tüm kalbimde bir an olsun bile eksik etmediğim rahmetli abim Ramazan AVAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Şubat 2020

Dr. Tuğba AVAN

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı	Tuğba AVAN	
Doğum Tarihi ve Yeri	01.01.1991 / Aksaray	
Öğrenim Durumu:		
Derece	Okul	Yıl
İlk/Orta	Cumhuriyet İlköğretim Okulu/Aksaray	1997-2004
Lise	Aksaray Anadolu Öğretmen Lisesi/Aksaray	2004-2008
Lisans/Yüksek lisans	İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi/İstanbul	2008-2014
Görevler:		
Görev Ünvanı	Görev Yeri	Yıl
Pratisyen Hekim	Sarıyahşi Devlet Hastanesi/Aksaray	2014-2015
Tıpta Uzmanlık Öğrencisi	Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı/Sivas	2016-2017
Tıpta Uzmanlık Öğrencisi	Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı/Samsun	2017- Halen
Bilimsel Kuruluşlara Üyelikler:		
1. Klinik Mikrobiyoloji Uzmanlık Derneği		
2. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti		
Yayınlar:		
1. Tanrıverdi, Y., Avan, T., Bilgin, K., & Birinci, A. Alt solunum yolu örneklerinden izole edilen Streptococcus Pneumoniae, Haemophilus İnfluenzae ve Moraxella Catarrhalis suşlarının antibiyotik duyarlılığının değerlendirilmesi. Turkish Journal of Clinics and Laboratory, 10(3), 277-282.		

BEYAN

“İnflamatuvar Bağırsak Hastalığı ve Mikrobiyota İlişkisi” adlı tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, başka bir çalışmadan kopya edilmediğini, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Tuğba AVAN

ÖZET

İnflamatuvar bağırsak hastalıkları Ülseratif kolit ve Crohn hastalığı olmak üzere iki ana gruba ayrılan, kronik seyirli, remisyon ve alevlenmelerle seyreden hastalık grubudur. Bu hastalığın patogenezinde, bireyin genetik yatkınlığı, çevresel faktörler, intestinal mikrobiyota ve immün yanıtların hepsi iç içe geçmiş durumdadır. Bu çalışmanın amacı, inflamatuvar bağırsak hastalığı olan bireylerde ve sağlıklı kontrollerde bağırsak mikrobiyotasının önemli bakteri türleri olan *Akkermansia mucinophilia*, *Bacteroides fragilis*, *Bifidobacterium spp*, *Escherichia coli*, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Fusobacterium nucleatum*, *Lactobacillus spp* ve *Prevotella intermedia* bakımından kantitatif karşılaştırmasını yapmak ve mikrobiyota değişiminin hastalık etiopatogenezi üzerine etkisini belirlemektir.

Çalışmaya, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Gastroenteroloji kliniğine başvuran 22 hasta ve 22 sağlıklı kontrol olmak üzere toplam 44 bireyden alınan gaita örneği dahil edilmiştir. Gaitadan DNA izolasyon işlemi için, özel gaitadan ekstraksiyon kiti (QIAmp DNA Stool Mini Kit, QIAGEN, Almanya) kullanıldı. Hedef bölge amplifikasyonu için çalışmada yer alan bakterilere spesifik primerler kullanıldı. Ekstraksiyon işlemi sonrası tüm bakterilerin gerçek zamanlı PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) yöntemi ile kantitasyon işlemi CFX96™ Real-Time PCR System cihazında (BIO-RAD, ABD) kullanılarak gerçekleştirildi.

Kantitasyon sonucunda hasta grubunda *Bifidobacterium spp* ($p=0,046$), *B. fragilis* ($p=0,033$), *A. Mucinophilia* ($p=0,009$) ve *F. prausnitzii* ($p<0,001$) bakterileri için istatistiksel olarak anlamlı düşüş gözlemlendi. *F. nucleatum* ($p=0,598$), *P. intermedia* ($p=0,551$), *E. coli* ($p=0,652$) ve *Lactobacillus spp* ($p=0,888$) bakterileri için istatistiksel olarak anlamlı fark görülmedi.

Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar, mikrobiyotanın inflamatuvar bağırsak hastalığı üzerindeki potansiyel rolünü destekler nitelikte olup, bir sonraki çalışmalar için kaynak niteliğindedir.

Anahtar Kelimeler: İnfamatuvar Bağırsak Hastalığı, Mikrobiyota, Gerçek Zamanlı PZR



ABSTRACT

Inflammatory bowel diseases which are divided in two main groups as Ulcerative colitis and Crohn's disease are in a group of diseases that continue with chronic progression, remission and exacerbations. In the pathogenesis of this disease, the genetic predisposition of the individual, environmental factors, intestinal microbiota and immune responses are all intertwined. The aim of this study is to make a quantitative comparison in terms of the important bacterial species of intestinal microbiota like *Akkermansia mucinophila*, *Bacteroides fragilis*, *Bifidobacterium spp*, *Escherichia coli*, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Fusobacterium nucleatum*, *Lactobacillus spp*. and *Prevotella intermedia* in individuals with inflammatory bowel disease and in healthy controls and to determine the effect on the disease etiopathogenesis of microbiota exchange.

Fecal specimens from 22 patients and 22 healthy controls totally 44 individuals applying to the Gastroenterology Department of Medicine Faculty in Ondokuz Mayıs University were included in the study. For the stool DNA isolation process, a special stool extraction kit (QIAmp DNA Stool Mini Kit, QIAGEN, Germany) was used. Bacteria-specific primers in the study were used for target site amplification. After extraction, quantitation process was implemented by real-time PCR (Polymerase Chain Reaction) method of all bacteria and using CFX96™ Real-Time PCR System device (BIO-RAD, USA).

Statistically significant decline was observed in the quantitation result of the patient group for the bacteria *Bifidobacterium spp*. ($p = 0.046$), *B. fragilis* ($p = 0.033$), *A. mucinophila* ($p = 0.009$) and *F. prausnitzii* ($p < 0.001$). There was no statistically significant difference between *F. nucleatum* ($p = 0.598$), *P. intermedia* ($p = 0.551$), *E. coli* ($p = 0.652$) and *Lactobacillus spp*. ($p = 0.888$).

The results obtained from this study support the potential role of microbiota on inflammatory bowel disease and serve as a source for further studies.

Keywords: Inflammatory Bowel Disease, Microbiota, Real-Time PCR



İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
ÖZGEÇMİŞ	ii
BEYAN	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR	x
TABLO LİSTESİ	xii
ŞEKİL LİSTESİ	xiii
1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1.İnflamatuvar Bağırsak Hastalığı	4
2.1.1. Tanımı	4
2.1.2. Epidemiyoloji	4
2.1.3. Etiyoloji ve patogenez	6
2.1.4. Ülseratif kolit.....	16
2.1.5. Crohn hastalığı.....	20
2.1.6. Tedavi	24
2.2. Mikrobiyota.....	26
2.2.1. Mikrobiyotanın gelişimi	27
2.2.2. Normal gastrointestinal mikrobiyota yapısı	31
2.2.3. Mikrobiyotayı etkileyen faktörler	35
2.2.4. Normal gastrointestinal mikrobiyotanın fonksiyonları	39
2.2.5. Mikrobiyota çalışma yöntemleri	45
2.2.6. Bağırsak mikrobiyotası ve inflamatuvar bağırsak hastalığı ilişkisi	67
2.2.7. Çalışmamızda kullanılan bakterilerin genel özellikleri	73

3. HASTALAR VE YÖNTEM	78
3.1. Etik Kurul Onayı	78
3.2. Hasta Seçimi.....	78
3.3. Örneklerin Toplanması ve Veriler.....	78
3.4. Mikrobiyolojik İnceleme	79
3.4.1. Gaita örneklerinin hazırlanması.....	80
3.4.2. Çalışmada kullanılacak bakterilerin hazırlanması	81
3.4.3. Gerçek zamanlı PZR işleminin yapılması.....	87
3.5. İstatiksel Analiz	88
4.BULGULAR	89
4.1. Demografik Bulgular ve Laboratuvar Verileri.....	89
4.2. Konvansiyonel PZR Sonuçları	90
4.3. <i>Faecalibacterium prausnitzii</i> ve <i>Akkermancia mucinophilia</i> Bakterilerine Ait Sekans Sonuçları.....	91
4.4. Gerçek Zamanlı PZR Sonuçları	92
4.4.1. <i>E. coli</i> 'ye ait gerçek zamanlı PZR sonuçları	95
4.4.2. <i>P. intermedia</i> 'ye ait gerçek zamanlı PZR sonuçları	95
4.4.3. <i>F. nucleatum</i> ait gerçek zamanlı PZR sonuçları.....	95
4.4.4. <i>Bifidobacterium spp.</i> 'ye ait gerçek zamanlı PZR sonuçları	99
4.4.5. <i>Lactobacillus spp.</i> 'ye ait gerçek zamanlı PZR sonuçları	99
4.4.6 <i>F. prausnitzii</i> 'ye ait gerçek zamanlı PZR sonuçları.....	99
4.4.7. <i>B. fragilis</i> 'ye ait gerçek zamanlı PZR sonuçları	103
4.4.8. <i>A. mucinophilia</i> 'ye ait gerçek zamanlı PZR sonuçları.....	103
5. TARTIŞMA	106
6.SONUÇ	123
7. KAYNAKLAR	125
8.EKLER	173

SİMGELER VE KISALTMALAR

°C	: Santigrat derece
µL	: Mikrolitre
AMP	: Antimikrobiyal peptid
bç	: Baz çifti
CH	: Crohn Hastalığı
DGGE	: Denaturing gradient gel electrophoresis
DH	: Dendritik hücreler
dH ₂ O	: Distile su
dk	: Dakika
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dNTP	: Deoksiribonükleik trifosfat
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
ESH	: Eritrosit sedimantasyon hızı
GALT	: Gut associated lymphoid tissue
GİS	: Gastrointestinal sistem
IBDMDB	: Inflammatory Bowel Disease Multi'omics Data Base
IFN-γ	: İnterferon gama
Ig	: İmmunglobulin
IL	: İnterlökin
İBH	: İnflamatuvar bağırsak hastalıkları
İEL	: İnterapitelyal lenfositler
log	: Logaritma
MAdCAM-1	: Mukozal adezyon-hücre adezyon molekül 1
MAMPs	: Microbe-associated molecular patterns
MgCl ₂	: Magnezyum kolrür
mL	: Mililitre
nm	: Nanometre
NOD	: Nucleotide-binding oligomerization domain molecules
NSAİİ	: Nonsteroidal antiinflamatuvar ilaç
OTU	: Operasyonel taksonomik üniteler
PPI	: Proton pompası inhibitörleri

PZR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
qPZR	: Kantitatif gerçek zamanlı PZR
QS	: Quorum sensing
RNA	: Ribonükleik asit
rpm (g)	: Devir/dakika
rRNA	: Ribozomal ribonükleik asit
SCFA	: Short chain fatty acid
slgA	: Salgısal IgA
sn	: Saniye
SSCP	: Single strand conformation polymorphism
T- RFLP	: Terminal restriction fragment length polymorphism
Taq	: Thermus aquaticus
TCR	: T-hücre reseptörü
TGGE	: Temperature gradient gel electrophoresis
Th	: Yardımcı T hücre
TLR	: Toll benzeri reseptörler
TNF-α	: Tümör nekroz faktörü-alfa
Treg	: Düzenleyici T hücre
UV	: Ultraviyole
ÜK	: Ülseratif Kolit
VCAM-1	: Vascular cell adhesion molecule -1

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. İnsan bağırsak mikrobiyotasının temel filum sınıfları ve temsil eden bakteri cinsi örnekleri

Tablo 2. İBH'de artan ve azalan bakteriler

Tablo 3. Çalışmamızda kullanılan bakterilerin sınıflandırılması

Tablo 4. Hasta ve sağlıklı kontrollerin çalışmaya dâhil edilme ve dışlanma kriterleri

Tablo 5. Çalışmada kullanılan bakterilere ait primer dizisi, hedef bölge büyüklüğü ve PZR bağlanma ısısı

Tablo 6. Kullanılan bakteri standartlarının kopya sayıları

Tablo 7. Konvansiyonel PZR reaksiyonu için hazırlanan karışım

Tablo 8. Gerçek Zamanlı PZR için amplifikasyon karışımı

Tablo 9. Hasta ve kontrollere ait demografik bilgiler

Tablo 10. Hastalara ait demografik ve laboratuvar bulguları

Tablo 11. Hasta ve kontrol gruplarına ait gerçek zamanlı PZR sonuçları

Tablo 12. Gerçek zamanlı PZR sonuçlarının ortalaması ve standart sapması

ŞEKİL LİSTESİ

- Şekil 1. Mikrobiyota gelişimini etkileyen faktörler
- Şekil 2. Mikrobiyotanın gelişimi
- Şekil 3. Normal gastrointestinal mikrobiyota yapısı
- Şekil 4. Sağlıklı mikrobiyotaya etki ederek disbiyozise neden olan etmenler
- Şekil 5. Mikrobiyota çalışma yöntemleri
- Şekil 6. 16S rRNA Gen Yapısı
- Şekil 7. Gerçek zamanlı PZR fazları
- Şekil 8. *Akkermancia mucinophilia* için jel elektroforez görüntüsü
- Şekil 9. *Faecalibacterium prausnitzii* için jel elektroforez görüntüsü
- Şekil 10. *Akkermancia mucinophilia* bakterisine ait sekans sonuçları
- Şekil 11. *Faecalibacterium prausnitzii* bakterisine ait sekans sonuçları
- Şekil 12: *E. Coli* için A. Standart eğri, B. Erime eğrisi, C. Amplifikasyon eğrisi
- Şekil 13. *P. intermedia* için A. Standart eğri, B. Erime eğrisi, C. Amplifikasyon eğrisi
- Şekil 14. *F. nucleatum* için A. Standart eğri, B. Erime eğrisi, C. Amplifikasyon eğrisi
- Şekil 15. *Bifidobacterium spp.* için A. Standart eğri, B. Erime eğrisi, C. Amplifikasyon eğrisi
- Şekil 16. *Lactobacillus spp.* için A. Standart eğri, B. Erime eğrisi, C. Amplifikasyon eğrisi
- Şekil 17. *F. prausnitzii* için A. Standart eğri, B. Erime eğrisi, C. Amplifikasyon eğrisi
- Şekil 18. *B. fragilis* için A. Standart eğri, B. Erime eğrisi, C. Amplifikasyon eğrisi
- Şekil 19: *A. mucinophilia* için A. Standart eğri, B. Erime eğrisi, C. Amplifikasyon eğrisi

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Tıbbın babası olarak bilinen Hipokrat, yıllar önce “Tüm hastalıklar bağırsakta başlar” sözü ile bağırsak mikrobiyotasının önemini vurgulamıştır. Son zamanlarda araştırmacıların çeşitli hastalıkların etiopatolojisinde bağırsak mikrobiyotasının rolüne dikkat çeken araştırmaları, Hipokrat'ın hipotezini doğrular niteliktedir. Mikrobiyotaya karşı bakış açısı mikrobiyom projesi ile değişerek önem kazanmış ve bağırsak mikrobiyotası hastalık ve sağlık ile ilgili bağımsız bir organ olarak düşünölmeye başlanmıştır (1). Mikrobiyota; insanlarla birlikte yaşayan özel türlerin hepsini, mikrobiyom ise bu mikroorganizmaların taşıdıkları genleri tanımlamak için kullanılır (2). İnsan mikrobiyotası; bakteriler, virusler, mantarlar ve birçok ökaryotik mikroorganizmalardan meydana gelmektedir (3). Gastrointestinal mikrobiyota ise, genellikle hem sistemik hem de bağırsak fizyolojisini etkileyebilen, bileşimi ve aktivitesi çok çeşitli bakterilerden oluşan, doğum sonrası kazanılmış bir organ olarak tarif edilmektedir (4). İnsanda mikrobiyota; hastalık ve sağlık durumlarında bağışıklık hücrelerinin olgunlaşmasını ve bağışıklık sistem fonksiyonlarının gelişmesini teşvik etmektedir (5). Bağırsak mikrobiyotası çeşitli türlerden oluşmaktadır ve bu türlerin %80'den fazlasını henüz költürü yapılamamış bakteriler oluşturur. Mikrobiyota çalışmalarının büyük çoğunluğunu metagenomik düzeyde yapılan çalışmalar oluşturmaktadır (6). Konak ile bağırsak bakterileri arasındaki mutualist ilişki simbiyoz olarak adlandırılırken; bağırsak mikrobiyotasındaki dengesizlik veya çeşitlilikteki azalma ise disbiyoz olarak adlandırılır. Kabızlık, obezite, inflamatuvar bağırsak hastalığı, depresyon, diyabet, kolon kanseri, koroner arter hastalıkları gibi çeşitli patolojilerle ilişkilendirilmektedir (7-13).

İnflamatuvar bağırsak hastalıkları (İBH), crohn hastalığı (CH) ve ülseratif kolit (ÜK) olarak ikiye bölünür ve son yıllarda önemli bir sorun haline geldikleri görölmektedir. Bu hastalıkların etiolojisi henüz bilinmemektedir. Ancak genetik yatkınlık, çevresel uyarılar ve bağışıklık yanıtları arasındaki karmaşık etkileşimlerin sonucu oluştuğları düşünölmektedir (14). Bu üç

bileşenin araştırıldığı çalışmalar, hastalığın patogenezi ile ilgili değerli bilgiler vermektedir. Patojenitede normal bağırsak mikrobiyotasına anormal bir immun yanıtın mı yoksa anormal bağırsak florasına özgül bir immun yanıtın mı rolünün olduğu uzun yıllardır incelenmektedir. Yapılan hayvan deneylerinde, her iki durumun da birlikte veya ayrı ayrı etkili olabilecekleri görülmektedir (15). İBH'nin en çok yüksek bakteri içeren bağırsak kısımlarında (kolon, terminal ileum) ortaya çıkmış olması; Chron hastalığının bakteri konsantrasyonunu azaltan diyetler, ileostomi, bağırsak lavajı ve geniş spektrumlu antibiyotikler ile tedavi edilebilmesi; temizlenmiş bir kolonun kommensal bakteriler ile yeniden muamele edilmesi sonucu inflamasyonun başlaması; florada bulunan kommensal bakterilerin hastalık gelişim sürecinde ne derece önemli olduğunu destekleyen kanıtlardır (16). İBH hastalığı olan olgularda mikrobiyal çeşitliliğin azalmasının yanı sıra çeşitli takson ve türlerin, hastalığın potansiyel belirleyicileri oldukları düşünülmektedir (2, 14). İBH'li hastalarda spesifik bir mikrobiyal işaret veya kalıcı bir değişiklik paterni tanımlanmamıştır. Çalışmalarda mukozadaki bakteri sayısında ve çeşitliliğinde değişiklik bildirilmişse de kesin bir ilişki gösterilememiştir. Ancak, sağlıklı kontrollere kıyasla, inflamasyon olmayan dokularda bile bağırsak epitelyum yüzeyine bağlı bakteri sayısında ve çeşitliliğinde değişiklik olduğu dikkat çekicidir (17, 18).

Bağırsak mikroflorasının, insan sağlığı ve çeşitli hastalıkların patogenezi üzerindeki etkisinin giderek önem kazandığı görülmektedir. İBH'de genetik ve çevresel etkenlerin yanı sıra mikrobiyota ve insan immün sisteminin de önemi bilinmektedir. Bu çalışma, İBH'nin etiyolojisinde diğer faktörler yanında mikrobiyotanın önemli bir faktör olabileceği ve bağırsak mikrobiyotasındaki spesifik bakteriler ve sayılarındaki değişikliklerin hastalığın etiyolojisinde önemli olabileceği varsayımından yola çıkılarak planlanmıştır. Çalışmada İBH'li olgularda bağırsak mikroflorasını oluşturan bakterilerin ve değişikliklerin saptanması amaçlanmıştır. Elde edeceğimiz bulgular, mikrobiyotadaki farklılıkların hastalığa duyarlılık veya direnç durumlarından sorumlu olup olmadıklarını; hastalığın şiddeti ile inflamasyon

ilişkinini de tartışma olanağı sunacaktır. Bulgularımız, bağırsak mikroflorasının birleşiminin, “tek bir patojen varlığı” dışında, İBH etioloji ve patogeneğinde ne derece etkili olabileceği hipotezimizi de destekleyecektir. İBH’li hastaların bağırsaklarından izole edilen mikroorganizmaların dağılım bilgisi, hastalığın tedavisinde sadece antibiyotik hedefini tanımlamak için değil, aynı zamanda bağırsak florasının prebiyotik ve probiyotik stratejileri ile tedavi edilmesine yönelik de katkılar sunacaktır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1.İnflamatuvar Bağırsak Hastalığı

2.1.1. Tanımı

İBH gastrointestinal kanalın nedeni tam olarak aydınlatılmamış kronik ve tekrarlayan immün aracılı inflamasyon ve genellikle çok sayıda organı etkileyen, ekstraintestinal bulgularla karakterize bir tablodur (19).

İBH, ÜK ve CH olmak üzere klinik ve prognostik olarak birbirinden farklı iki hastalığı içermektedir. ÜK hastalığı kolonu etkilerken, Chron hastalığı ağızdan perianal bölgeye kadar tüm gastrointestinal kanalı etkileyebilmektedir. Bu hastalıkların bazı farklı patolojik ve klinik karakterleri olmasına rağmen önemli benzerlikleri bulunmuş ve patogonezi tam olarak anlaşılamamıştır. ÜK ve CH'nin ayırıcı tanısı hastanın ve ailesinin öyküsü, endoskopik, histopatolojik incelemeler, laboratuvar testleri, radyolojik ve diğer gastrointestinal hastalıkların dışlanması ile yapılır (20).

2.1.2. Epidemiyoloji

Bir hastalığın sıklığını belirtmek için iki önemli terim kullanılır; prevalans ve insidans. Bir hastalığın prevalansı, belirli bir popülasyondaki veya belirli bir zaman periyodundaki bir hastalık veya sağlık durumunun mevcut vakalarının sayısıdır. İnsidans ise, belirli bir zaman diliminde belirli bir popülasyondaki yeni bir hastalık vakası sayısıdır. Dünyada İBH'nin prevalansı ve insidansı coğrafik dağılıma göre değişiklik göstermektedir. Soğuk iklim bölgelerinde ılıman iklim bölgelerine göre, kentsel alanlardan kırsal alanlara göre İBH görülme oranı artmaktadır. Gelişmiş ülkelerde ve sanayileşmenin arttığı ülkelerde İBH insidansı yükselmektedir. Son yıllarda dünya çapında prevalansı yükselmektedir. Dünyada beş milyon, Avrupa'da üç milyon, ABD'de ise bir milyon insan İBH'den muzdariptir (21). Dünya

genelinde veriler incelendiğinde CH insidans oranı 0,5-24,4/100.000, ÜK insidans oranı 0,1-16/100.000 olarak görülmektedir (22). İngiltere, Kuzey Avrupa gibi batılı ülkeler ve Amerika Birleşik Devletleri en yüksek prevalans ve insidansa sahip ülkelerdir. Faroe Adaları 81,5/100.000 oranıyla dünyadaki en yüksek insidans oranına sahip bölgedir (20). Hem ÜK'in hem de CH'nin yıllık en düşük insidansı Güney ve Doğu Avrupa, Asya ve Orta Doğu'da görülmektedir (1-8 / 100.000) (23). Prevalans ve insidans oranları Asya ve Orta Doğu'da düşük görünmesine rağmen Afrika, Asya ve Güney Amerika'nın sanayileşmiş bölgelerinde İBH insidansının arttığını gösteren çalışma da bulunmaktadır (24).

Türkiye'de yapılan çalışmalarda insidans oranı CH için 1,4/100.000, ÜK için 2,6/100.000; prevalans oranı CH için 7,7/100.000, ÜK için 25,2/100.000 olarak bildirilmiştir (25, 26). Kuzey ve Batı Avrupa ile Türkiye insidans verilerinin karşılaştırıldığı bir başka çalışmada ise Türkiye'de insidansın diğerlerine göre düşük olduğu görülmektedir (27).

CH'nin başlama yaşı, iki farklı yaş aralığında artış göstermektedir: ilki, daha çok görülen, 15-30 yaşları arasında gerçekleşir; ikincisi, daha az görülen, 50 ila 70 yaş arasındadır. Tanı çocuklarda ve ergenlerde % 25, 60 yaş üstü hastalarda % 10-15 oranında konmaktadır (21). ÜK'in ise herhangi bir yaşta ortaya çıkmasına rağmen daha çok 30-40 yaş arasında çıkmaktadır. Türkiye'deki yaş ortalaması her iki hastalık için de 20-29 ve 40-49 yaşları arasında iki farklı dağılım göstermektedir (26).

Kadın ve erkek arasında İBH insidansında küçük farklılıklar bildirilmiştir. Yetişkin dönem başlangıçlı CH'de belkide hormonal faktörlerin hastalık ekspresyonundaki etkisi nedeniyle hafif bir kadın baskınlığı görülmüştür (28, 29). Rochester Epidemiyoloji Projesi'nden elde edilen verileri kullanan bir çalışmada; erkek cinsiyeti, kadın cinsiyetine göre daha yüksek ÜK görülme oranı ile ilişkili bulunmuştur (28).

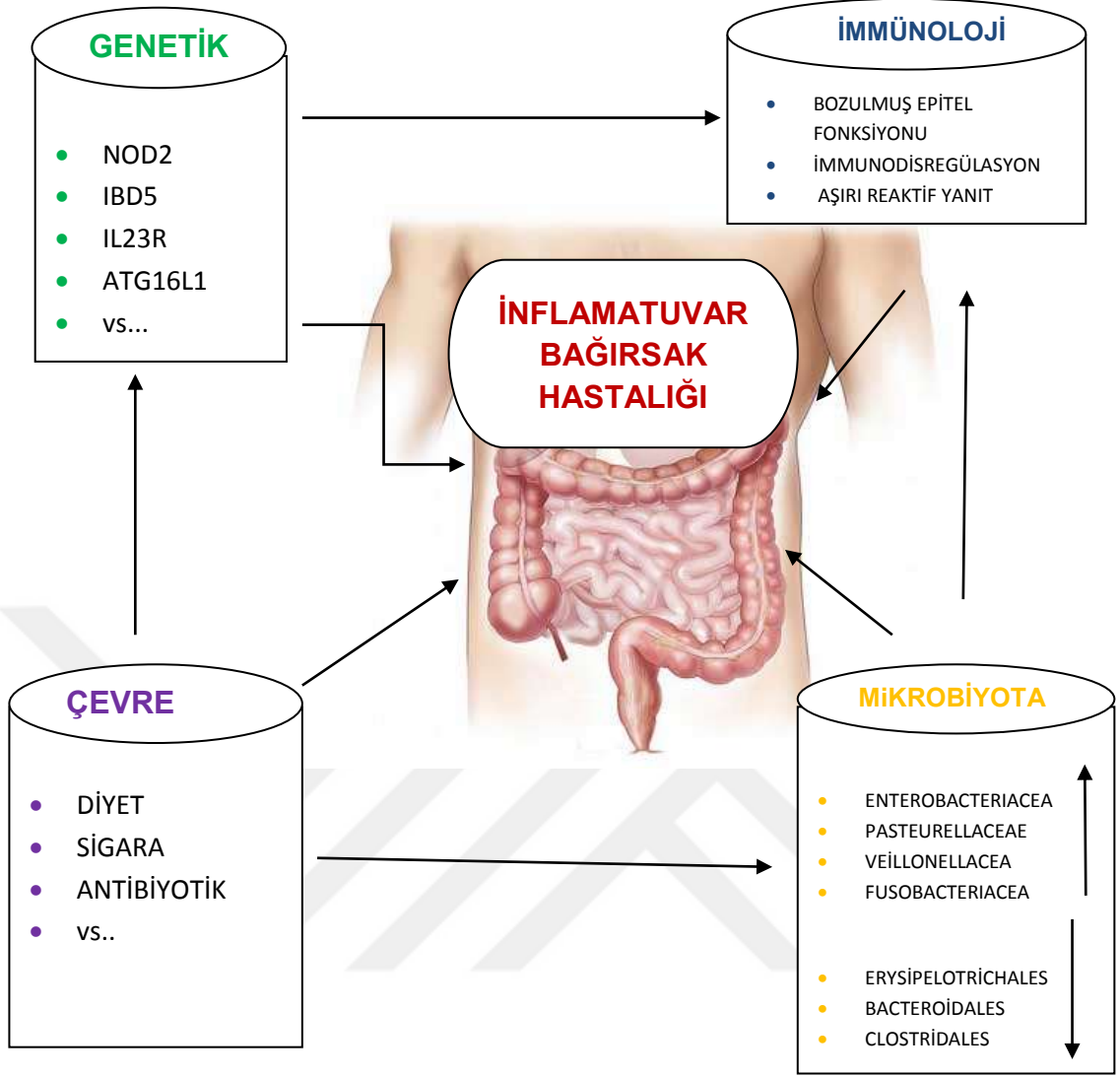
Hem ÜK hem de CH, Yahudi olmayan nüfuslara kıyasla Yahudi'lerde daha yaygındır (30). Siyah popülasyonlarda İBH insidansı beyazlara göre daha düşük bulunmuştur (31).

2.1.3. Etiyoloji ve patogenezi

Günümüzde halen İBH'nin kesin etiyojisi bilinmemektedir. Ancak genetik olarak yatkın bireylerde, bazı çevresel faktörlerin etkisi ile oluşan disbiyozise verilen düzensiz immün yanıt sonucu kronik intestinal inflamasyonun neden olduğu düşünülmektedir. Son çalışmalar gösteriyor ki, bireyin genetik yatkınlığı, çevresel faktörler, intestinal mikrobiyota ve immün yanıtların hepsi, İBH patogeneziine katkıda bulunmaktadır (Şekil 1).

2.1.3.1. Genetik faktörler

Hem hayvan hem de insan denemeleri, genetik faktörlerin İBH gelişimi üzerindeki etkilerini kanıtlamıştır (32). Ancak, CH'nin %85'inden fazlasının aile hikayesi yoktur (33). İBH'li birinci derece akrabaları olan hastalarda, hastalık riski normal kişilere göre 3 ila 20 kat daha yüksektir (34, 35). Her iki ebeveyninde İBH olan çocukların 28 yaşındayken İBH gelişim riskinin % 33 olduğu belirlenmiştir (32). CH'li bir kardeşe sahip olmak, normal insanlara kıyasla CH gelişim riskini 30 kat artırmaktadır (36). Yapılan ikiz kardeş çalışmalarının yaklaşık üçte ikisinde, bir kardeşte CH var ise diğer kardeşe de on yıl içinde tanı konulduğu gösterilmiştir (37).



Şekil 1. Mikrobiyota gelişimini etkileyen faktörler

Bir çalışmada, 554 CH hastasının %17'sinde aile öyküsü saptanmıştır. Hastaların %86'sında hastalık bölgesi yakınları ile uyumlu, %82'sinde ise hastalık klinik tipi yakınları ile uyumlu olduğu bulunmuştur (35). Başka bir çalışmada, etkilenen ailelerde hastalık yerleşimi ve türü ile olan uyumluluk sırasıyla %56 ve %49 olarak tespit edilmiştir (38). Bu nedenle, hastalığın klinik özellikleri ve yerinin kalıtsal olabileceği gösterilmiştir.

Çeşitli araştırmalar, hem CH hem de ÜK ile ilişkili 200'den fazla gen lokusu göstermiştir; bu genlerin %70'den fazlası immün aracılı hastalıklar ile de ilişkili bulunmuştur. Bu farklı genler tarafından sentezlenen proteinlerin

tespiti, bu hastalıkların patogenezi olan spesifik yolların tanımlanmasında yardımcı olmuştur (39, 40).

Hücre içi organellerin geri dönüşümüne izin veren ve hücre içi mikroorganizmaların uzaklaştırılmasına katkıda bulunan otofaji yolunu düzenleyen bazı genler (ATG16L1, NOD2, IRGM ve LRRK), CH ile ilişkilidir. CH'ye sahip bazı hastalarda bu yolların kusurlu olduğu düşünülmektedir (41-44).

Adaptif immünite ile ilişkili interlökin (IL)-17 ve IL-23 reseptör yolunu düzenleyen genler (örn; IL23R, IL12B, STAT3, JAK2, TNFSF15 ve TYK2), hem ÜK hem de CH'de riskin artması ile ilişkili bulunmuştur (45, 46).

Epitel fonksiyonunu düzenleyen birçok epitel bariyer geni (örneğin OCTN2, ECM1, CDH1, HNF4A, LAMB1 ve GNA12) İBH ile ilişkilidir. Daha yaygın olarak ÜK ile ilişkilidir (47, 48). Paneth hücre biyolojisini kontrol eden genler (örn, Xbp-1; NOD2, ATG16L1) CH'de de tanımlanmıştır (49, 50). Anormal Paneth hücrelerinin daha yüksek oranda olan CH hastalarında, cerrahi rezeksiyon sonrası diğer hastalarla karşılaştırıldığında daha erken hastalık nüksü izlenmiştir (50, 51).

2.1.3.2. İmmünolojik faktörler

Bağırsak mukozası, çok sayıda mikroorganizma içerdiğinden dolayı steril olmaması ile diğer mukozalardan farklılık gösterir. Burada bulunan kommensal mikroorganizmaların, patolojik mikroorganizmaların yayılımının önlenmesinde, yiyeceklerin sindiriminde ve temel besin sağlanmasında görevleri vardır (52). Bağırsak immün yanıtı bu kommensal mikroorganizmalara ve yiyecek antijenlerine karşı tepki göstermez iken patolojik mikroorganizmalara karşı cevap oluşturmaktadır. Bu nedenle bağırsak birçok lenfoid organ içermektedir ve bu da bağırsak ile ilişkili lenfoid doku (GALT- gut associated lymphoid tissue) olarak isimlendirilmiştir. GALT

lenfoid foliküllerden, Payer plaklarından ve lenf düğümlerinden oluşur. İBH hastalarında, GALT lokal bağışıklığı zayıflamıştır (53).

Fiziksel bariyer olarak rol alan silindirik bağırsak epitel hücreleri yüzey epiteline, villuslara, goblet hücrelerine, paneth hücrelerine ve nöroendokrin hücrelere farklılaşabilirler. Pro-inflamatuvar sitokinler ve serbest oksijen türlerinin üretimi ile bakteriyel ajanlara ve metabolitlere cevap veren epitel hücreleri, doğal ve edinsel bağışıklığa katkıda bulunmaktadır. Bağırsak epitel tabakasındaki hücreler, bağırsak patojenlerini subepitelyal lamina propriyadan ayırmayı sağlar (54). Aynı zamanda bağırsak epitel bariyerinin bütünlüğü, tight junction, desmosom ve adherans junction gibi bağlantılar ile korunur. Mukus tabakası mukozayı korumak için dış epitel yüzeyini kaplar ve mikroorganizmaların bağırsağa girme yeteneğini azaltır. Bu mukus tabakası genellikle goblet hücrelerinden salınan müsin, paneth hücrelerinden salınan defensinleri ve fosfatidilkolini (lesitin) içerir. Mukus tabakası, kommensal bakterilerle temas halinde bir dış tabakaya ve intestinal epitel ile temas halinde olan steril bir iç tabakaya sahiptir (55). Genetik duyarlılık veya çevresel stres ile ilişkili herhangi bir mekanizma nedeniyle mukus tabakasına zarar verilmesi, bağırsak mukozasının bağırsak patojenlerine daha fazla maruz kalmasına neden olur. Bu, hastalık patogenezinin önemli bir nedeni olan artan kronik bağırsak iltihabına neden olmaktadır (56). Bazı hayvan çalışmaları, anormal bağırsak epitelyal bariyer ve geçirgenliğin farelerde spontan kolit gelişiminin duyarlılığını arttırdığını göstermiştir. Diğer bir çalışmada, İBH gelişiminde intestinal geçirgenlik ve kusurlu epitelyal bariyerin etken olduğu gösterilmiştir. Bağırsak epitel hücrelerinde birçok mikroorganizmaya spesifik olmayan mukozal savunma sağlayan alfa-defensinler ve beta-defensinler gibi çeşitli antimikrobiyal peptidlerin üretimindeki bozulma da, CH hastalarında tespit edilmiştir (57).

Epitel hücreleri arasındaki boşluklarda çoğunlukla CD8+ T hücrelerinden oluşan ve $\gamma\delta$ TCR eksprese eden intraepitelyal lenfositler (İEL) bulunurlar. Bakteriyel antijene $\gamma\delta$ T hücresi doğal bağışıklığın bir parçası

olarak cevap vermektedir. Bu hücrelerin birçok görevi vardır. Patojen mikroorganizmaların bağırsak epiteline girmesini önlemek, immün korumayı desteklemek, hasarlı ve enfekte hücreleri uzaklaştırmak, epitel iyileşmeyi sağlamak gibi sitolitik ve düzenleyici görevler sayılabilir. İEL hücreleri T hücre markırları (örn CD45RO+), integrin- α E β 7, IL-2, interferon gama (IFN- γ) ve tümör nekroz faktörü-alfa (TNF- α) gibi sitokinleri de sentezleyebilmektedir (58, 59).

T ve B hücelere bağlı alanlar içeren Peyer plakları, bağırsak mukozasında lenfoid dokunun özelleşmiş olduğu bolca bulunan alanlardır. Lümenden antijenlerinin alımından ve antijene spesifik immunglobulin A (IgA) üretimi yapan B hücre oluşumundan sorumludur (60). Peyer plak yüzeylerinde aralarında M hücrelerini içeren epitel hücreleri bulunmaktadır. Mukozal bağışıklıkta önemli rol oynayan M hücreleri, lümenden bakterileri ve çözünebilen antijenleri içine alarak kontrollü bir şekilde Peyer plaklarının içine taşırlar. Peyer plaklarında bulunan T hücrelerinin çoğu CD4+ T hücreleridir ve T hücrelerinin 2/3'ü α T-hücre reseptörü (TCR) ekspres eder. B hücreleri ise çoğunlukla IgA üretimi yaparlar (61).

Bağırsak lamina propriasında bulunan IgA+ plazma hücreleri, T ve B lenfositler, nötrofiller, makrofajlar ve dendritik hücreler epiteli geçen antijenin işlenmesinde görev alırlar. Normalde immatür safhada bulunan dendritik hücreler, yüksek endositik aktivite ve düşük T hücre aktivasyonu özelliği ile de bağırsak boyunca immün cevabın düzenlenmesinde rol almaktadırlar. Etkenle maruziyet sonrası olgunluk kazanarak T hücreleri aktive etmek üzere ikincil lenfoid organlara giderler. CD4+ ve CD8+ T hücrelerine antijen sunmak, T hücrelerde apoptozisi uyarmak ve IL-10 üreterek immün toleransı uyarmak dendritik hücrelerin başlıca görevleridir. Ayrıca foliküler dendritik hücreler, B hücre fonksiyonunun sürdürülmesi ve immünolojik hafıza oluşturulmasını sağlamaktadır (62, 63). Plazma hücrelerinin ve B lenfositlerin %80'i IgA, %15'i IgM, %3'ü IgG, %2'si ise IgE salgılamaktadırlar. Sekretuar IgA, lümen antijenlerine bağlanarak bunların lümene bağlanmasını önleyip

mukus tabakası ile ortamdaki uzaklaşmasını sağlayarak antijene özgü anti-inflamatuvar etki göstermektedir. Bu edinsel immün savunma fonksiyonu sonucu bağırsak patojenlerine karşı koruyuculuk işlevini sağlamaktadır. İnsanda IgA üretimi hem T hücrelere bağlı, hem de T hücrelerden bağımsız olarak gerçekleşebilmektedir (64). B lenfositleri ayrıca mukozal adezyon-hücre adezyon molekül 1 (MAdCAM-1) ve vasküler hücre adezyon molekülü-1 (Vascular cell adhesion molecule/VCAM-1) aracılığı ile hücrelerin hedefe gidişinde rol alan $\alpha 4\beta 7$ integrin üretiminde rol alırlar. T lenfositleri ise IgA üretiminde sorumlu sitokinlerin (IL-2, IL-4 ve IL-5) salgılanmasını sağlarlar (59, 65). İBH'li hastalarda miyeloid hücrelerin ürettiği lamina propria'da yüksek sitokin seviyeleri tespit edilmiştir (66-68).

CD4+ T yardımcı (Th) hücreleri, fonksiyonel olarak çeşitli T hücre alt gruplarına ayrılır. Bu alt gruplar Th1 hücreleri, Th2 hücreleri, Th17 hücreleri ve düzenleyici T hücreleridir. Hücre içi mikroorganizmaları temizleyen Th1 hücreleri, ağırlıklı olarak IFN- γ , TNF- α ve IL-2 üretir (69). IL-4 tarafından indüklenen ve IL-12 tarafından inhibe edilen Th2 hücreleri genellikle IL-4, IL-5 ve IL-13'ü üretir, böylece B hücresi farklılaşması sağlar. Th2 hücreleri alerjik reaksiyonlarda rol oynar ve toksinlere karşı koruma sağlar (69, 70). Hücre dışı patojenleri, otoimmünitede merkezi bir rol oynayan yardımcı T hücrelerinden alan hücreleri temizleyen Th17, inflamatuvar süreci ve mukozal yüzeylerdeki tepkileri düzenlemede önemlidir (71). Th17 hücrelerinin alt grupları ayrıca IFN- γ , TNF- α veya IL-10 da üretebilir. Sitokinler, Th17 hücrelerinin mukozal yüzeyler üzerindeki davranışını belirler. IL-23 (p19 / p40 heterodimerinden oluşur) Th17 hücrelerinin stabilizasyonu için önemlidir (72). IL-23 reseptöründeki mutasyonlar İBH'ye yatkınlığı artırması ile ilişkilidir (45, 73, 74). Bu sitokinlerin önemi, hem p19 alt ünitesinin hem de p40 alt ünitesinin (hem IL-12 hem de IL-23'te ortak olarak bulunur) hedef alındığı tedavinin etkinliği gösterilerek kanıtlanmıştır (75). Çalışmalar, Th17 tarafından üretilen IL-21 ve IL-2'nin İBH hastalarının inflamatuvar mukozasında yüksek olduğunu göstermiştir (76, 77). Anormal T-hücre tepkisi ile sitokinlerin ve kemokinlerin aşırı üretimi, kronik bağırsak iltihabının nedeni

olabilir. İBH tedavisinde ilaçların temel amacı adaptif bağışıklıktır. Kortikosteroidlerin ana mekanizması, TNF- α ve IL-1 gibi pro-inflamatuvar sitokinlerin baskılanması, T hücre farklılaşmasının ve tip 1 interferon sekresyonunun düzenlenmesidir (78). Artmış mukozal IL-12 seviyeleri anormal Th1 immün tepkisine yol açabilir. Bu da CH'de bağırsak iltihabına neden olabilmektedir (79, 80).

Bağırsak lümenindeki mikroorganizmalara aşırı immün cevap, bağırsakta iltihaplanma ile sonuçlanabilir. Bu nedenle, bağışıklık sisteminin denge halinde olması gerekmektedir. Mukozal immün sistemin disfonksiyonu İBH'nin patogenezinde önemli bir rol oynamaktadır. İntestinal mukoza içinde çeşitli lenfositlerin antijenine spesifik aktivasyonu, İBH immünopatolojisinin önemli bir özelliğidir (81). Yapılan çalışmalar CH'de inflame bağırsak mukozasında Th-1 ile ilişkili sitokinler (TNF, IFN- γ , IL-12) ile Th-17 ilişkili sitokinlerin (IL-17A, IL-21, IL-23) belirgin bir şekilde arttığını ve bazı inhibitör sitokinlerin (TGF- β , IL-10, IL-25, IL-33 ve IL-37) önemli ölçüde azaldığını göstermiştir. Ancak ÜK hastalarının inflame bağırsak mukozasındaki sitokin profilleri daha farklıdır. ÜK'de Th-2 ye bağlı sitokinlerin (IL-4, IL-13) üretiminin arttığı görülmektedir (81, 82). Pro/anti-inflamatuvar sitokinlerin bu dengesizliği, bağırsak mukozal inflamasyonuna katkıda bulunur. İBH olan olgularda inflamasyon kaskadının regülasyonunda, özellikle baskılanmasında defekt olması nedeniyle inflamasyon artarak sürer ve hasar da devam eder (82).

2.1.3.3. Çevresel faktörler

Günümüzde İBH ile ilişkili çok sayıda çalışma yapılmış ve etiyopatogenez için çoğunlukla aşağıda belirtilen risk faktörleri ile ilişki bulunmuştur.

Sigara, CH için risk faktörüdür, ancak ÜK için değildir (83, 84). Bu ikiliğin temeli henüz çözülmemiş olsa da, nikotin ve / veya sigara yan ürünleri

doğrudan mukozal immün yanıtları, düz kas tonusunu, bağırsak geçirgenliğini ve mikro damarları etkileyebileceği düşünülmüştür (85). İki yüz binden fazla kadını içeren bir kohort çalışmasında, hem mevcut hem de eski sigara içenlerin hiç sigara içmeyenlere kıyasla CH geliştirme olasılığı daha yüksek bulunmuştur. Yine aynı çalışmada ülseratif kolit riski, sigara içmeyenlere göre mevcut sigara içenler için anlamlı derecede farklı bulunmamıştır (84). Sigara içmek aynı zamanda CH'den kaynaklı cerrahi gerektiren komplikasyonlarını da (örneğin darlıklar, fistül) arttırır (83, 85, 86). Mevcut veriler sigaranın ÜK için risk faktörü olmadığını ve ÜK gelişme riskini azaltabileceğini göstermektedir (83, 87). Sigarayı bırakma ile ilişkili riskteki artış, sigaranın koruyucu etkisinin kaybıyla açıklanabilir. Bu daha sonra ÜK semptomlarının başlamasına neden olan maskeleyici etki olarak yorumlanabilir. Sigara içmek aynı zamanda ÜK'nin seyrini de etkileyebilmektedir. ÜK hastalarda sigara bırakma, hastalık aktivitesindeki artış ve hastanede yatış riski ile ilişkilendirilmiştir (88).

Fiziksel aktivite, CH riskindeki bir azalmayla ilişkilendirilmiş, ancak ÜK ile ilişkisi saptanmamıştır (89, 90). Fiziksel aktivite hakkında veri sağlayan 194.711 kadını kapsayan iki büyük prospektif kohort çalışmasında, CH riski, fiziksel aktivite ile ters orantılı olarak bulunmuştur (89).

Diyet faktörleri, epidemiyolojik çalışmalardan elde edilen veriler ışığında İBH geliştirme riskinde rol oynayabileceğini göstermektedir. Özellikle meyve ve sebzelerden elde edilen yüksek oranda lif alımı, CH riskinde bir azalmayla ilişkilendirilmiş ancak ÜK ile bir bağlantı saptanamamıştır (91-93). Hayvansal yağ ve poliansatüre yağ asitlerinin diyetle alım artışı, ÜK ve CH riskinde bir artış ve ÜK hastalarında nüks artışı ile ilişkilendirilmiştir (92, 94-96). Yüksek omega-3 yağ asidi alımı ve daha düşük bir omega-6 yağ asidi alımı, daha düşük bir CH riski ile ilişkilendirilmiştir (97). Veriler, D vitamini alımının, CH riski ile ters ilişkili olduğunu ve D vitamini eksikliğinin İBH hastalarında yaygın olduğunu göstermektedir (98, 99). Gıda antijenlerinin, İBH gelişmesine neden olan immünolojik bir yanıtı tetiklediği

düşünülmektedir; Bununla birlikte, spesifik patojenik antijenler tanımlanmamıştır (100).

Uyku yoksunluğu, İBH hastalarında artmış ÜK ve hastalık alevlenmesi riski ile ilişkili bulunmuştur (101, 102). Prospektif bir kohort çalışması 151.871 kadında uyku süresini ve İBH insidansını değerlendirdi. Günde altı saatten az veya dokuz saatten fazla saat uyuma süresi bildirilen kadınlar, günde yedi ila sekiz saat uyuma süresi bildirilen kadınlara göre daha yüksek ülseratif kolit riskine sahipken, uyku süresi CH riskini değiştirmemiş olarak tespit edilmiştir (101).

Enfeksiyon hastalıkları, spesifik bir patojen yer almasa da, İBH gelişiminde bazı klinik çalışmaların hedefi olmuştur. Bazı gözlemsel çalışmalar, akut gastroenterit ile İBH gelişimi arasında bir ilişki olduğunu göstermiştir (103-106). Porter ve arkadaşlarının 3000 hasta ve 11000 kontrol ile yaptığı çalışmada, kontrollere kıyasla akut gastroenterit atağı geçiren hastalarda İBH riski daha yüksek bulunmuştur (103). Birkaç araştırma, birçok bulaşıcı ajanın (örn; mikobakteriler, virusler, mantarlar) İBH'nin patogenezendeki rolünü değerlendirmiştir; ancak nedensel bir faktör olarak spesifik bir patojen tanımlanmamıştır (103-110).

Antibiyotik kullanımı İBH ile ilişkilendirilmiş olmasına rağmen, bunun nedensel bir ilişki olup olmadığı açık değildir (111-113). İBH tanısı alan 7208 hastayı içeren 11 gözlem çalışmasının meta-analizinde antibiyotik maruziyeti, CH riskinin artmasıyla ilişkilirken ÜK ile ilişki gözlemlenmemiştir (112).

Nonsteroidal anti-inflamatuvar ilaçlar (NSAİİ) İBH gelişme riskini artırabilir. Yetmiş binden fazla kadını içeren bir kohort çalışmasında, ayda en az 15 gün boyunca NSAİİ kullanımı, ÜK ve CH riskinin ilaç kullanmayanlara göre arttırdığı görülmüştür. NSAİİ'lerin İBH ile ilişkisi birkaç mekanizmadan kaynaklanıyor olabilir. NSAİİ kullanımı ile ilişkili bağırsak epitel bariyerinin siklooksijenaz aracılı bozulması, bağırsak mikrobiyomu ve bağırsak

yüzeyindeki immün hücreler arasındaki etkileşimi etkileyebilir. Ek olarak, NSAİİ'ler, İBH patogenezinde kilit rol olan trombosit agregasyonunu, inflamatuvar mediatörlerin salınımını ve strese mikrovasküler yanıtı değiştirir (114-116).

Oral kontraseptifler ve hormon replasman tedavisinin, İBH gelişme riskini az da olsa artırabileceği gösterilmiştir (117-119). 75.815 premenopozal kadını içeren 14 çalışmanın meta-analizinde, oral kontraseptif kullananlarda, kullanmayanlara göre ÜK ve CH görülme riski yüksek bulunmuştur (117). Başka bir çalışmada ise, 108.844 postmenopozal kadının, hormon replasman tedavisi ÜK riskinde artış ile ilişkiliyken, CH ile risk saptanmamıştır. ÜK riski hem mevcut hem de geçmiş kullanıcılar arasında, menopoz sonrası hormon tedavisini hiç kullanmayan kadınlara kıyasla artmıştır (118). Oral kontraseptiflerin veya hormon replasman tedavisinin İBH riskini arttırdığı mekanizma belirsizdir, ancak mikro damar sistemi üzerindeki trombotik etkileri veya östrojenin inflamatuvar cevabın artırılmasındaki etkileri neden olarak düşünülebilir (120).

Akne vulgaris tedavisinde kullanılan izotretinoin ile İBH arasında bir ilişki olduğu bildirilmiştir (121, 122). İzotretinoin kullanımı ile İBH gelişimi arasındaki potansiyel ilişki düşüncesini rahatsız edici kılan, izotretinoin ile tedavi edilen akne hastalarının çoğunun, bazı verilerin İBH gelişimi ile ilişkili olabileceğini öne süren oral tetrasiklin sınıfı antibiyotiklerle de tedavi edildiği gerçeğidir (113, 123).

Apendektomi ile İBH arasındaki ilişki, tanının CH mı yoksa ÜK mi olduğuna bağlıdır. CH'de bazı çalışmalar, appendektomiden sonra CH riskinin arttığını göstermiştir (124). Aynı zamanda, başka bir meta-analizde ortaya çıkan artmış riskin, yeni başlayan CH olan hastalarda yanlış bir tanıdan kaynaklanabileceğini öne sürdü (125). ÜK de ise veriler, apandektominin, ÜK gelişme riskini azaltabileceğini ve koruyucu etki mekanizmasının bilinmediğini göstermektedir (106, 126-128).

Psikolojik faktörler ile İBH gelişme riski arasındaki ilişkiyi inceleyen çalışmalar tutarsız sonuçlar vermiştir (129, 130). Stresin İBH hastalarında semptomların alevlenmesindeki etkisi, muhtemelen enterik sinir sisteminin aktivasyonu ve pro-inflamatuvar sitokinlerin üretiminden kaynaklı olabilir (131, 132).

Obezitenin İBH gelişimi için artmış risk teşkil edip etmeyeceği belli değildir (133, 134). Karın içi yağ birikimi mukozal iltihaplanmalara katkıda bulunabilir ve böylece İBH hastalarında klinik seyri etkiler (135). CH olan bir çalışmada, obez hastalarda obez olmayan hastalara kıyasla anoperineal komplikasyonlar daha erken meydana gelmiştir. Obez hastalarda aktif hastalık geliştirmesi ve hastaneye yatışın gerekliliği daha olası olarak bulunmuştur (136).

2.1.3.4. Mikrobiyota

İBH ve mikrobiyota ilişkisi bir sonraki başlıkta detaylı olarak incelenecektir.

2.1.4. Ülseratif kolit

ÜK, kolonun mukozal tabakası ile sınırlı tekrarlayan inflamasyon atakları ile karakterizedir. Genellikle rektumu içerir ve kolonun diğer kısımlarını içerecek şekilde proksimal ve sürekli bir şekilde uzanabilir.

Klinik bulgular

ÜK'li hastalarda genellikle kanlı diyare ile birlikte kolit görülmektedir. Bağırsak hareketleri rektal inflamasyonun bir sonucu olarak sık ve azdır. İlişkili semptomlar arasında kolik karın ağrısı, tenesmus ve idrar kaçırma vardır. Esas olarak distal tutulumu olan hastalarda, kan ve mukusun sık akması ile birlikte kabızlık da olabilmektedir (137).

Semptomların başlangıcı genellikle kademelidir ve birkaç hafta içinde ilerler. Semptomlar, kendiliğinden sınırlı rektal kanama atakları ile devam edebilir. Semptomların şiddeti, kanlı veya kansız günde dört veya daha az dışkı bulunan hafif hastalıktan şiddetli kramplar ve sürekli kanama ile günde 10'dan fazla dışkı ile seyreden ağır hastalığa kadar değişkenlik gösterebilir (137).

Hastalarda ateş, halsizlik ve kilo kaybı gibi sistemik semptomlar olabilir. Ayrıca kan kaybı, kronik hastalık anemisi veya otoimmün hemolitik anemiden kaynaklanan demir eksikliğine bağlı anemi nedeniyle dispne ve çarpıntı olabilir. Sistemik semptomların varlığı ve ciddiyeti, bağırsak hastalığının klinik ciddiyetine bağlıdır.

Fizik muayene

Özellikle hafif hastalığı olan hastalarda genellikle normaldir. Orta ila şiddetli ÜK'si olan hastalarda ateş, hipotansiyon, taşikardi ve solukluk görülebilir. Rektal muayenede kanamaya bağlı kanıtlar bulunabilir. Uzun süreli diyare semptomları olan hastalarda kas kaybı, deri altı yağ kaybı, kilo kaybı ve yetersiz beslenmeden kaynaklanan periferik ödem belirtileri olabilir (137).

Hastalık aktivitesinin şiddeti, hastalık aktivite endeksi kullanılarak objektif olarak ölçülebilir. Montreal ÜK şiddeti sınıflandırılması ishali sıklığına, şiddetine ve sistemik semptomlar ile birlikte laboratuvar anormalliklerinin varlığına bağlı olarak hafif, orta ve ağır olarak sınıflandıran bir endekstir (138). ÜK şiddeti sınıflandırılması;

- Hafif: Bu hastalarda günde dört veya daha az kanlı veya kansız dışkı vardır, sistemik toksisite belirtileri yoktur ve normal bir eritrosit sedimentasyon hızı (ESH) vardır. Hafif kramplı ağrı, tenesmus ve kabızlık dönemleri de

yaygındır; ancak şiddetli karın ağrısı, bol kanama, ateş ve kilo kaybı hafif hastalık spektrumunun bir parçası değildir.

●Orta: Bu hastalarda sık sık gevşek, kanlı dışkı (günde dörtten fazla), eritrosit transplantasyonu gerektirmeyen hafif anemi ve şiddetli olmayan karın ağrısı vardır. Hastalar, düşük dereceli ateş de dâhil olmak üzere minimal sistemik toksisite belirtilerine sahiptir. Yeterli beslenme genellikle korunur ve klinik hastalık ile ilişkili olmayan kilo kaybı vardır.

●Ağır: Şiddetli bir klinik tabloya sahip hastalarda, tipik olarak şiddetli kramplarla beraber sık kanlı dışkılama (günde altı veya daha fazla) ile beraber ateş (sıcaklık ≥ 37.5 ° C), taşikardi (≥ 90 atım/dk), anemi (hemoglobün $< 10,5$ g / dL) ve yüksek ESR (≥ 30 mm / saat) gibi sistemik toksisite bulguları vardır. Hastalarda hızlı kilo kaybı olabilmektedir.

ÜK'li hastaların çoğu, hafif şiddette bir atak sırasında tanı almaktadır. İlk tanıda hastaların yaklaşık yüzde 27'sinde orta derecede hastalık varken yüzde 1'inde ciddi hastalık tablosu görülmektedir (139, 140).

Mayo skorlama sisteminde ise, hastalığın ciddiyetini değerlendirmek ve tedavi sırasında hastaları izlemek için kullanılmaktadır (141). Skorlar 0 ile 12 arasında değişmekte olup, ilerleyen skorlar daha ağır olduğunu göstermektedir.

Ekstraintestinal bulgular

ÜK öncelikle bağırsakla ilgili olsa da, diğer organ sistemleri de etkilemektedir. İBH olan hastaların yüzde 10'undan azında ilk başvuruda ekstraintestinal bir bulgu görülürken, hastaların yaşamları boyunca ekstraintestinal bulgu verme olasılığı yüzde 25 olarak görülmüştür. Primer sklerozan kolanjit ve ankilozan spondilit hariç, ekstraintestinal bulgular kolitin klinik seyrini takip etmede kullanılabilir (142). Artrit, İBH'nin en sık

görülen bağırsak dışı bulgusudur. İBH'nin en sık görülen oküler belirtileri arasında üveit ve episklerit bulunur. Sklerit, iritis ve konjonktivit de İBH ile ilişkilendirilmiştir. İBH ile ilişkili en sık görülen cilt lezyonları eritema nodozum ve pyoderma gangrenozumdur. Primer sklerozan kolanjit, yağlı karaciğer ve otoimmün karaciğer hastalığı, İBH ile ilişkilendirilmiştir. İBH'li hastalar hem venöz hem de arteriyel tromboembolizm açısından yüksek risk altındadır. Otoimmün hemolitik anemi, İBH ile ilişkilendirilmiştir. Anemili hastalar asemptomatik olabilir veya dispne, yorgunluk ve çarpıntı gibi spesifik olmayan semptomlara sahip olabilir. İBH'nin pulmoner komplikasyonları, nadir olmasına rağmen, solunum yolu inflamasyonu, parankimal akciğer hastalığı, serozit, tromboembolik hastalık ve ilaca bağlı akciğer toksisitesini içerir. Semptomlar, difüzyon kapasitesindeki asemptomatik düşüşlerden öksürük ve mukopürüent balgam üretimi ile bronşektaziye etkisiz hale getirmeye kadar değişir (143-150).

Laboratuvar bulguları

Şiddetli ÜK hastalarda anemi, yüksek eritrosit sedimentasyon hızı (≥ 30 mm / saat), düşük albümin, ishal ve dehidrasyon nedeniyle elektrolit anormallikleri olabilir (151, 152). ÜK ile birlikte primer sklerozan kolanjiti olan hastalarda serum alkalın fosfataz konsantrasyonu da yükselebilir. Bağırsak iltihabı nedeniyle fekal kalprotektin veya laktoferrin yükselebilir (153).

Görüntüleme

ÜK tanısı için abdominal görüntüleme gerekli değildir, ancak kolit semptomları olan hastalarda uygulanabilir. Abdominal radyografi genellikle hafif-orta şiddette hastalığı olan hastalarda normaldir, ancak ciddi veya fulminan ÜK'li hastalarda tanımlayıcı olabilmektedir. Çift kontrastlı baryum lavmanı, bilgisayarlı tomografi, manyetik rezonans görüntüleme ve doppler ile yapılan ultrason görüntülemeye kullanılabilir.

ÜK'li hastalarda endoskopik bulgular spesifik değildir. Endoskopide elde edilen kolon biyopsileri, iltihaplanmanın kronikliğini belirlemek ve diğer kolit nedenlerini dışlamak için gereklidir. Bir ileokolonoskopi, CH'ye işaret eden iltihaplanma için terminal ileumun değerlendirilmesine ve kolonik hastalığın endoskopik genişliğini ve ciddiyetini belirlemeye izin verir. Bununla birlikte, ağır kolitli hastalarda toksik megakolonun perforasyon potansiyeli nedeniyle kolonoskopiden kaçınılmalıdır. Bu gibi hastalarda fleksibl sigmoidoskopi yapılmalı ve değerlendirme rektum ve distal sigmoid kolonla sınırlı olmalıdır (154, 155).

ÜK hastalarda endoskopik bulgular, eritematöz görünümde mukozanın büyümesine bağlı olarak vasküler belirti kaybını içerir. Ayrıca, mukozda peteşiler, eksüdalara, ödem, erozyonlar, dokunma gevrekliği ve spontan kanama mevcut olabilir. ÜK'yi düşündürülen biyopsi özellikleri, kript apselerini, kript dallanmasını, kısalmasını ve kargaşasını ve kript atrofisini içerir. Müsin tükenmesi ve Paneth hücre metaplazisi dahil olmak üzere epitel hücre anormallikleri görülebilir. Bu özelliklerin hiçbiri ÜK'ye özgü olmamakla birlikte, iki veya daha fazla histolojik özelliğin varlığı ÜK için oldukça spesifiktir (156, 157).

ÜK tanısı, dört haftadan uzun süredir kronik ishalin varlığına, endoskopide aktif iltihaplanma kanıtlarına ve biyopside kronik değişikliklere dayanmaktadır. Bu özellikler ÜK için spesifik olmadığından, tanı koymak aynı zamanda diğer kolit nedenlerinin ekarte edilmesine, laboratuvar çalışmalarına ve endoskopide elde edilen kolonun biyopsilerine bağlıdır (158).

2.1.5. Crohn hastalığı

Bir diğer İBH olan CH, transmural inflamasyonla karakterizedir ve ağız boşluğundan perianal bölgeye kadar lüminal gastrointestinal sistemin herhangi bir bölümünü içerebilir. Hastalık dağılımı şu şekildedir: Hastaların

yaklaşık %80'inde, genellikle distal ileumda ince bağırsak tutulumu vardır ve hastaların üçte birinde sadece ileitis vardır. Hastaların yaklaşık %50'sinde ileokolit vardır ve bu da ileum ve kolonun tutulumunu ifade eder. Hastaların yaklaşık %20'si ise kolonla sınırlı hastalığa sahiptir. ÜK'li hastalardaki rektal tutulumun aksine, kolitli CH hastalarının yarısında rektum korunmaktadır. Hastaların yaklaşık üçte birinde perianal hastalık vardır. Yaklaşık %5 ila 15 oranında ağız veya gastroduodenal alan tutulumu bulunurken, daha az sayıda hasta yemek borusu ve proksimal ince bağırsakta tutulum vardır.

CH başlangıç yaşı, hastalık yeri ve hastalık davranışına göre sınıflandırılabilir. Montreal sınıflandırması epidemiyolojik ve popülasyon temelli çalışmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır (137).

Klinik özellikler

CH'li hastalarda tanı konmadan yıllar önce semptom olabilir veya akut olarak ortaya çıkabilir (138). Kardinal semptomlar arasında karın ağrısı, ishal (belirgin kanaması olan veya olmayan), yorgunluk ve kilo kaybı vardır (140). Karın kramp ağrıları, hastalık CH'nin yaygın bir belirtisidir. Distal ileum ile sınırlı hastalığı olan bir hasta sıklıkla sağ alt kadranda ağrısı ile kendini gösterir. İnflamatuvar sürecin transmural yapısı fibrotik darlıklara neden olur. Bu striktürler sıklıkla tekrarlayan karın ağrısı ve ince bağırsak tıkanıklığı veya daha az yaygın olarak kolonik tıkanıklığa neden olur. İshal, sık rastlanan bir durumdur. Yorgunluk ve kilo kaybı da diğer klinik bulgulardır (141).

CH'nin transmural bağırsak inflamasyonu, fistüllere ve abse oluşumuna yol açabilecek sinüs yolları ile ilişkilidir: Fistüller, transmural inflamasyonun serosaya nüfuz edebilen ve fistüllere yol açabilen sinüs traktları ile ilişkilidir. Fistüller, iki epitel döşeli organı birbirine bağlayan yollardır. Örneğin, bağırsağı mesaneye (enterovezikal), cilde (enterokutan), bağırsaklara (enteroenterik) veya vajinaya (enterovajinal) bağlayabilir (24).

CH'deki diğer gastrointestinal tutulum bölgelerinin klinik bulguları değişkindir ve ileokolonik tutulumdan daha az sıklıkta ortaya çıkar. Ağız tutulumunda aftöz ülser veya ağızda ve diş etlerinde ağrı olabilir. Özofagus tutulumu, odinofaji veya disfaji ile ortaya çıkabilir. Gastroduodenal tutulum hastaların yüzde 15'inde görülür ve üst karın ağrısı, bulantı ve/veya postprandiyal kusma ile ortaya çıkabilir (159).

Malabsorpsiyon, ince bağırsak tutulumu olan CH'de ve safra tuzu emilim bozukluğu olan hastalarda protein kalorisi yetersiz beslenmesine, hipokalsemiye, vitamin eksikliğine (örn. Vitamin B12) ve metabolik kemik hastalığına yol açabilecek sulu ishal ve steatore ile birlikte olabilir (159).

Ekstraintestinal belirtiler

CH'nin ekstraintestinal belirtileri genellikle inflamatuvar hastalık aktivitesiyle ilişkilidir. Artrit veya artropati, üveit, iritis ve episklerit gibi göz tutulumu, eritema nodozum ve pyoderma gangrenozum gibi deri bulguları, primer sklerozan kolanjit, piyojenik karaciğer absesi, ikincil amiloidoz, kalsiyum oksalat ve ürik asit gibi renal taşları ve pulmoner tutulum örnek olarak verilebilir (160).

Fizik muayene

Fiziksel muayene normal olabilir veya CH'yi düşündüren spesifik olmayan belirtiler (örn; kilo kaybı) gösterebilir. Daha spesifik bulgular arasında perianal cilt bulguları, sinüs izleri ve karın hassasiyeti veya elle hissedilir karın kitlesi (tipik olarak sağ alt kadranda) bulunur (146).

Laboratuvar Bulguları

Rutin laboratuvar testleri normal olabilir veya anemi, yüksek lökosit sayımı, yüksek C-reaktif protein, elektrolit anormallikleri, demir eksikliği, B12

vitamini eksikliği ve D vitamini eksikliğini ortaya çıkarabilir. Dışkı inflamatuvar belirteçleri (fokal kalprotektin veya laktoferrin), bağırsak iltihabı nedeniyle yükselebilir (146).

Görüntüleme

Endoskopik özellikler arasında, normal görünen mukozanın alanlarına bitişik fokal ülserler ve kaldırım taşı görünümü ile sonuçlanan nodüler mukozal değişiklikler yer alır. Atlamalı tutulum bölgeleri ve geniş hastalık alanları tarafından kesilen normal bağırsak segmentleri ile tipiktir. Psödopolipler de mevcut olabilir. Normal görünen rektal mukoza CH'de sık görülür. Kolonoskopi sırasında, histolojik inflamasyon kanıtlarını değerlendirmek için görünüşte endoskopik olarak normal olsa bile sağ kolon, sol kolon ve rektumdan biyopsiler alınır. Histolojik bulgular fokal ülserasyonları, akut ve kronik inflamasyonu içerir. Bu bulgular genellikle tanıdan ziyade doğrulayıcıdır. Granülomlar, CH'li hastaların yüzde 30'unda görülür ve bu histolojik bulgu destekleyicidir ancak tanı koymak için gerekli değildir. Video kapsül endoskopisi veya kablosuz video endoskopi, ince bağırsak mukozasını radyasyona maruz kalmaksızın değerlendirme imkanı sağlar. Diğer ince bağırsak çalışmalarında görülmeyen lezyonları (örn; ince bağırsak ülserleri) tespit edebilir. Görüntüleme yöntemlerinden manyetik rezonans, bilgisayarlı tomografi, baryumlu görüntülemeler tanıda alternatif olarak kullanılabilir (140).

Prognoz

CH'li birçok hasta için semptomlar kronik ve aralıktır, ancak hastalık seyri değişebilir. Bazı hastalarda sürekli ve progresif bir aktif hastalık seyri olabilirken, hastaların yaklaşık %20'si ilk tanıdan sonra uzun süreli remisyona girebilir (161). Kronik bağırsak iltihabı, striktür, fistül veya apse gibi komplikasyonlara neden olabilir. Popülasyona dayalı bir kohort çalışması, CH'li hastalarda intestinal komplikasyon gelişme riskinin tanıdan 20 yıl sonra

%50 olduğunu ve ileal tutulumun komplikasyonların başlaması için daha kısa bir zaman aralığı ile ilişkili olduğunu göstermiştir (162).

2.1.6. Tedavi

İBH tedavisindeki hedef; akut hastalığa bağlı semptomları azaltmak, mukozal inflamasyonu azaltmak, hastanın iyilik halini düzenlemek, hastaneye yatışı engellemek, komplikasyonları ve cerrahiyi azaltmaktır. İnflamasyonun bölgesi, tutulumun derecesi, semptomların şiddeti, ekstraintestinal komplikasyonlar ve tedaviye cevap tedavi stratejisini belirlemektedir.

2.1.6.1. Medikal tedavi

Aminosalisilatlar (5-ASA), immunmodilatörler (azatiyoprin, 6-merkaptopurin, metotreksat), kortikosteroidler, antibiyotikler (metronidazol, siprofloksasin) ve biyolojik ajanlar (infliksimab, adalimumab, vedolizumumab ve ustekinumab) medikal tedavinin altı önemli bileşenleridir.

Akut alevlenmelerde ve başlangıç tedavisinde aminosalisilatlar ve kortikosteroidler kullanılmaktadır. Aminosalisilatlar, remisyonun sağlanması için verilir ve kolonik hastalıkta daha etkilidirler. Bu nedenle ÜK'de CH'ye göre daha fazla tercih sebebidir. Hem rektal hem de oral kullanım şekilleri bulunmaktadır ve kombine tedavileri tek başına tedaviye göre daha hızlı remisyonu sağlamaktadır. İkinci grup ilaç olan kortikosteroidler, aminosalisilat tedavisi ile yeterli yanıtı ulaşılmayan ya da kullanamayan hastalarda düşünülmektedir. Kortikosteroidler, inflamasyonu baskılayarak semptomlarda hızlı bir iyileşme sağlar. Orta-şiddetli aktif İBH'de tercih edilirken uzun dönem tedavide efektif olmadığı için tercih edilmemelidir. Steroidlerin 12 haftadan daha uzun bir kullanımları sonucunda ise katarakt, osteoporoz ve miyopati gibi yan etkileri görülebilir (163) .

İBH tedavisindeki önemli olan diğer nokta korumadır. Bunun için immünomodülatörler, biyolojik ajanlar ve antibiyotikler kullanılmaktadır. İmmünomodülatörler, uzun dönem inflamasyonu kontrol etmek ve hastayı remisyonda tutmak için kullanılır. Steroid tedavisi verilemeyen hastalarda ilk tedavi seçeneği olarak düşünülür. Bu ilaçların etkisi ortalama 2-3 haftada ortaya çıkmaktadır. Oral 6-merkatopurin ve azatiyoprin gibi tiyopurinler; haftalık uygulanan metoreksat bu grupta örnek verilebilir. Siklosporin ve takrolimus gibi kalsinörin inhibitörleri şiddetli hastalıkta ve steroide yanıtız vakalarda kullanılır. Anti tümör nekroz faktör ilaçları olan infliksimab ve adalimumab İBH tedavisinde kullanılır. CH'de yaygın ince bağırsak tutulumu olanlarda, ÜK'li hastalarda ise şiddetli kolit hastalarında tercih edilir. Antibiyotikler, CH'de komplikasyonların tedavisinde kullanılmaktadır. ÜK'de ise poş enfeksiyonu gelişmiş ise tercih edilir (163).

2.1.6.2. Cerrahi tedavi

Striktür, perforasyon, obstrüksiyon, refrakter kanama, apse varlığı ve medikal tedaviye cevap vermeyen vakalarda cerrahi tedavi tercih edilir. ÜK'li hastalarda kolektomi ile kür sağlanırken; CH'de kür sağlanmamaktadır (164).

2.1.6.3. Diğer tedaviler

Antidiyareik ilaçlar, probiyotikler, prebiyotikler ve fekal mikrobiyota transplantasyonu diğer tedavi seçenekleridir. Antidiyaretik ilaçlar, darlık gibi komplikasyonları olan, tedaviye yanıt vermeyen CH'de semptomatik tedavide yararlı bulunmuştur (165). Fizyolojik ve terapötik aktiviteleri olan probiyotiklerin, CH olan hastalarda indüksiyon veya remisyonun sürdürülmesinde yararlı olduğu görülmüştür. Ancak fayda sağlayıp sağlayamayacağı henüz kesin olarak belirlenmemiştir. Fekal mikrobiyota transplantasyonu ile yapılan çalışmalar ÜK remisyon indüksiyonunu sağladığını göstermiştir (166).

2.2. Mikrobiyota

İnsan; memeli hücreleri ve prokaryotik hücrelerin toplamından oluşan karmaşık bir yapıya sahiptir. “Mikrobiyota” terimi, insan vücudunda bulunan simbiyotik, kommensal ve patojenik mikroorganizmaları temsil eden mikrobiyal florayı tanımlar. Mikrobiyom ise, bu mikroorganizmaların genomlarını ifade eder (167). Her insan, 10 ile 100 trilyon arası mikrobiyal hücre içermektedir ve 70 kg’lık bir insanın yaklaşık 1-2 kg’ı bakterilerden oluşmaktadır. Bu bakterilerin yaklaşık %90’ı bağırsaklarda yerleşmiş durumdadır. Genom sayısı bakımından da bakterilerin genomu insan genom sayısından kat kat fazladır. Bağırsak mikrobiyomunun insan genomundan 150 kat daha fazla gen içerdiği tahmin edilmektedir. Yüzey alanı olarak bakteriler iki tenis kortu büyüklüğündedir. Tüm bu rakamlar göz önüne alındığında, aslında mikrobiyota sanal bir organ olup, işlevleri, genetik yapısı, metabolizması birçok organdan daha büyüktür (168). ‘İnsan Mikrobiyom Projesi’ kültürden bağımsız olan ve metagenomik yöntemlerin gelişiminden sonraki en büyük projedir. Projenin tamamlanmasıyla birlikte, hem mikrobiyotanın içeriği ve çeşitliliği, hem de fonksiyonel özellikleri ile ilgili birçok yeni bilgiler edinilmiştir. Bu proje ile 300 sağlıklı insanın 15 farklı vücut bölgesinden alınan örnekler değerlendirilmiş ve 35 trilyon okumadan oluşan 2,3 terabyte büyüklüğünde bir metagenomik veri bankası elde edilmiştir (169). Kişi üzerindeki mikrobiyomlar, zaman içinde çevresel faktörler, diyet, probiyotikler, prebiyotikler, virusler ve özellikle antibiyotikler ve ilaçların etkisi ile değişim gösterebilir (170). Yeni geliştirilen DNA sekanslama teknikleri ile insan mikrobiyomunun çeşitliliği büyük ölçüde ortaya konulmuş ve standart kültür tekniklerinin aksine mikroorganizmaların en az %80’i tespit edilebilmiştir (6). Ribozomal RNA’nın alt birimi olan 16S rRNA gen ölçümleriyle mikroorganizmalar özgün bir şekilde saptanabilmektedir. 16S rRNA alt birimi, çoğu bakteri için ortak olan yüksek oranda korunan bölgelere ve her bakteri türüne özgü değişken bölgelere sahiptir. Bu özgünlük bakterileri taksonomik olarak sınıflandırmayı sağlar (171). Mantarlarda ise, 18S rRNA veya 26S rRNA gen bölgeleri ölçülerek sınıflandırma

yapılmaktadır (172). Bu gelişmelerle, son on yılda, bağırsak mikrobiyotası birçok gastrointestinal ve ekstra-gastrointestinal hastalığın araştırılmasında anahtar bir konu haline gelmiştir.

2.2.1. Mikrobiyotanın gelişimi

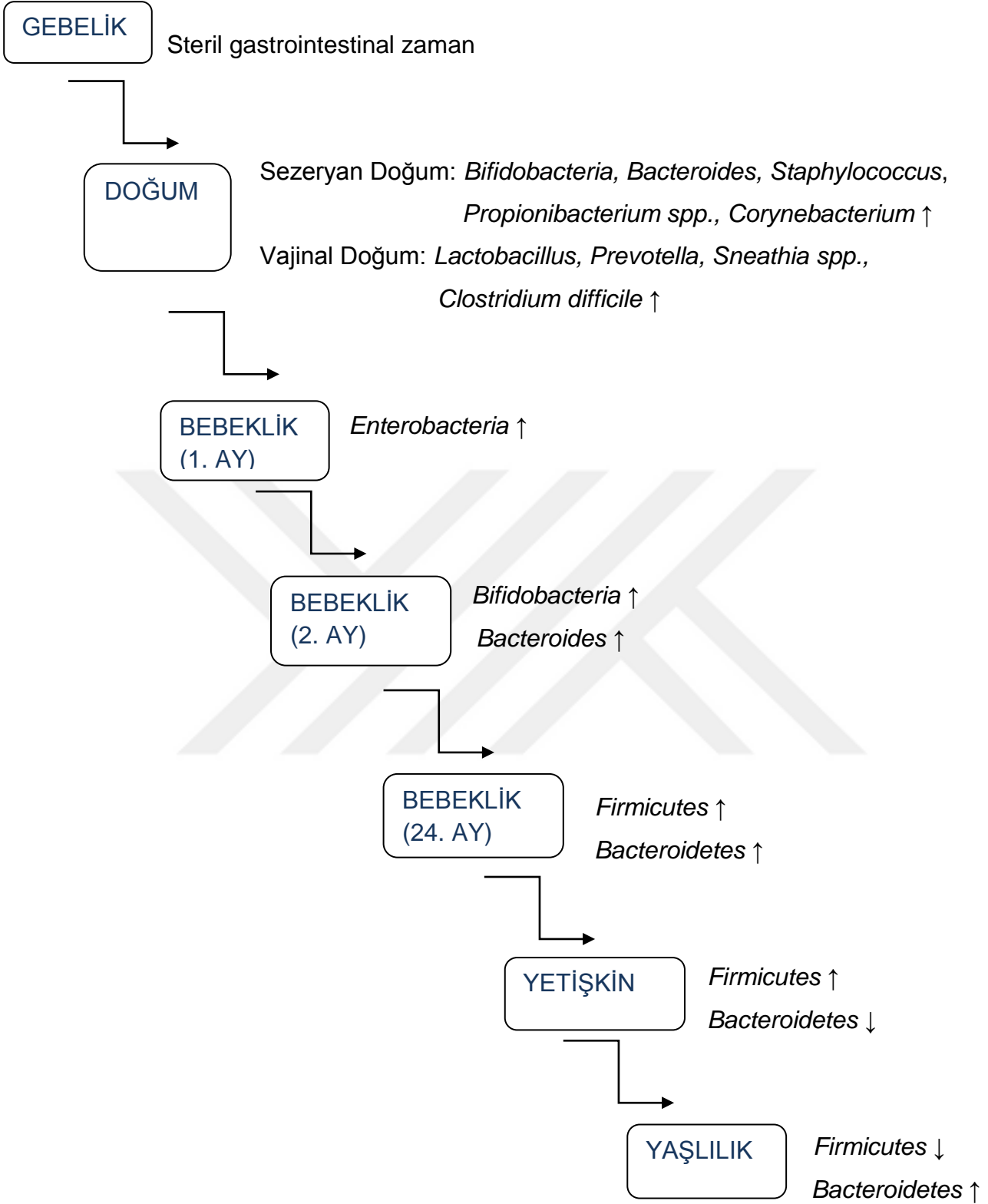
Gebeliğin ilk gününden bebeğin ilk iki yaş dönemine kadar olan dönem ilk 1000 gün olarak tanımlanmaktadır. Bu dönem bebeklikten erişkinliğe kadar birçok sistemi etkilemektedir. Tüm yaşamı etkileyen bu ilk 1000 günlük sürecin büyük çoğunluğunun anne ile ilgili olduğu gösterilmiştir. Mikrobiyota üzerindeki geçici ve kalıcı etkiler annenin gebelik süreci, doğum şekli, emzirmesi ve beslenmesi ile ilişkilendirilmiştir (173). Mikrobiyota gelişim sürecindeki değişimler Şekil 2'de özetlenmiştir.

Doğum şeklinin mikrobiyota üzerindeki etkisini gösteren ilk çalışma, Dominguez Bello ve ark.'nın 2010 yılında Venezuela'da 9 gebe kadın ile yaptıkları çalışmadır. Bu çalışmada 4 gebe normal vajinal doğum yaparken, 5 gebe sezaryen doğum yapmıştır. Çalışmada ilk doğumun şekline bağlı olarak mikrobiyota profilinin farklı olduğu gösterilmiştir. Ancak çalışmaya katılan gebe sayısının kısıtlı olması çalışmanın dezavantajı olarak yorumlanmıştır. Normal vajinal yöntemle doğan bebeklerin çoğunun anatomik noktalarında; annenin vajinal florasında bulunan *Laktobacillus*, *Atopobium*, *Sneathia* ve *Prevotella* bakterilerinin baskın olduğu görülmüştür. Sezaryen yöntemle doğan bebeklerde ise, *Laktobacillus*'un yoğun olmadığı, *Staphylococcus* türlerinin baskın olarak bulunduğu bildirilmiştir (174). Kanada'da yapılan bir başka çalışmada sezaryen ve normal doğum karşılaştırılarak aradaki fark ortaya konmuştur. Yine aynı çalışmada doğum sonrası anne sütü kullanımının da mikrobiyotayı etkilediği ortaya konmuştur (175). Martin ve ark.'nın yaptığı bir başka çalışmada, spontan vajinal yol ile doğan ve anne sütü ile beslenen bebeklerde intestinal mikrobiyotadaki *Bifidobacteria* içeriğinin, ilk 20 gün içerisinde baskın hale geldiği, sezaryen ile doğan bebeklerde ise bu sürecin 6. aya kadar uzadığı tespit edilmiştir (176). Hill ve

ark.'nın 2017 yılında yaptıkları çalışmada doğum şeklinin bebeğin intestinal mikrobiyotası üzerindeki etkilerinin yanı sıra gestasyonel yaşın da mikrobiyota üzerine etkili olduğu, term ve preterm bebekler arasında farklılıklar olduğu görülmüştür. Sezaryen ile doğan bebeklerde, ilk 6 ay yalnızca anne sütü ile beslenmenin mikrobiyota üzerine olumlu etkilerinin olduğu belirtilmiştir (177). Chu ve ark.'nın 2017 yılında yaptıkları çalışmada, tüm bu çalışmaların aksine spontan vajinal yol ile sezaryen arasında mikrobiyota çeşitliliği açısından fark olmadığı belirtilmiştir (178). Ancak bu araştırma, normal doğum ile sezaryen arasındaki mikrobiyota farkının değişmediğini ifade eden bu döneme kadarki tek çalışmadır ve yeni çalışmalar ile desteklenmesi gereklidir. Gebelik döneminde annenin mikrobiyotasını etkileyen faktörlerden olan “annenin gebelik sırasındaki beslenmesi, gebe kalmadan önceki vücut kitle indeksi ve annenin gebelikteki stres durumunun” bebeğin mikrobiyotası üzerinde de etkili olduğu gösterilmiştir (176, 179, 180).

Bir diğer önemli etken olan anne sütü ile beslenme, erken dönemde mikrobiyota üzerinde etkilidir (179). Dünya Sağlık Örgütü yaşamın ilk 6 ayında tek başına, 2 yaşına kadar ise diğer besinler ile birlikte anne sütü verilmesini önermektedir (181). Anne sütünün mikrobiyotası ile ilgili yapılan çalışmalarda, anne sütünün kendisine ait bir mikrobiyota içeriği olduğu ve bu içeriğin de doğum şekli ve gestasyon haftasına göre farklılıklar gösterdiği görülmüştür (182). Anne sütünün mikrobiyota içeriğinin ve dolayısı ile bebeğin mikrobiyotasının önemli diğer özelliği de, anne sütünün prebiyotik içeriğidir (183). Anne sütü ile beslenen bebeklerin intestinal mikrobiyota içeriğine kısa süre içerisinde *Bifidobacterium spp.* hakim olmakta, formül mama ile beslenen bebeklerde ise, mikrobiyota içeriği farklılık göstermektedir. Yaşamın ilk 6 ayında yalnız anne sütü alan bebeklerde, erişkinlerden çok farklı olarak bebeğin ihtiyaçlarına yönelik olduğu ve *Bifidobacterium*'un egemen olduğu (%75) gösterilmiştir (176, 179, 184).

Çocukluk döneminde yapılan ilk kültür temelli araştırmalarda, gastrointestinal (GİS) mikrobiyomunun, 1-4 yaş arasında olgunlaşarak kolonizasyon durumuna ulaştığı düşünölmekteydi (185). Ancak yakın zamanlarda yapılan moleköler çalışmalar, çocukların ve yetişkinlerin GİS mikrobiyomunda önemli farklılıkları ortaya çıkarmıştır. ABD'de yapılan bir araştırma, yetişkin GİS mikrobiyomuna kıyasla, çocuklarda *Firmicutes*, *Proteobacteria* ve *Actinobacteria*'da genel bir artma, *Bacteroidetes*'te bir azalma olduğunu ortaya koymuştur. Ayrıca, *Ruminococcus spp.*, *Roseburia spp.*, *Alistipes spp.*, *Faecalibacterium spp.*, *Bacteroides xylanisolvens* ve *Bacteroides vulgatus* bakterilerinin erişkinlere kıyasla, çocuklarda artmış olarak görölmüştür (186). Erken çocukluk döneminde intestinal mikrobiyotanın içeriğini etkileyen bir diğer önemli faktör, antibiyotik kullanımıdır (179). Antibiyotiklerin her yaş döneminde kullanılmasının değişik ölçülerde mikrobiyota kompozisyonu üzerine olumsuz etkileri bulunmaktadır (187). Özellikle yaşamın ilk 5 yılında, antibiyotik kullanımının ergenlik ve erişkin dönemde obezite ve inflamatuvar bağırsak hastalıkları ile ilişkili olabileceğine yönelik çalışmalar bulunmaktadır (188, 189). Erken dönemde mikrobiyota üzerinde etkili olan olumsuz diğer faktörlerin, endüstriyel gıdaların yoğun tüketimi, sigara kullanımı, şehir yaşamı, aşırı hijyenik yaklaşımlardır. Son yıllarda ayağı toprağa basan, yeşil alanlarda zaman geçiren ve evde evcil hayvan besleyen çocuklarda enfeksiyonların ve allerjik hastalıkların sıklığının azalması ile ilgili olumlu sonuçlar bildirilmektedir (190-194). GİS mikrobiyomu ile ilgili ergenlik döneminde yapılmış çok fazla bir çalışma bulunmamaktadır. Ancak hormonal değişikliklerden dolayı önemli bir geçiş dönemi olarak düşünölmektedir (195).



Şekil 2. Mikrobiyotanın gelişimi

Kaynak: Kumar ve ark. (2016) (196).

Yaşlılık dönemi mikrobiyotası üzerine yapılan çalışmalarda, GİS mikrobiyomunun yetişkinlerden farklı olduğunu gösterilmiştir. GİS mikrobiyomunun kompozisyonundaki değişikliklerin sağlıktaki düşüşlerle ilişkili olduğu düşünülmektedir (197). Genel olarak, yaşlılarda *Firmicutes/Bacteroides* oranının azaldığı görülmüştür. *Bacteroides spp.*, *Prevotella spp.*, *Faecalibacterium prausnitzii* ve *Enterobacteriaceae*'da bir artış saptanmış ve bu yaşlılıkta yaşam kalitesinin genel olarak düşmesiyle ilişkilendirilmiştir. Yaşlılıkta gözlenen bu değişiklikler ilaç kullanımının artması, diyet eksikliği ve ayrıca hormonal seviyelerin değişmesi ile ilişkilendirilmiştir (186, 196).

2.2.2. Normal gastrointestinal mikrobiyota yapısı

Yapılan çalışmalar mikrobiyotanın parmak izi gibi kişiye özel olduğunu göstermektedir. Coğrafya, diyet, yaşam tarzı gibi farklılıklarla birlikte sağlıklı bireylerin hem taksonomik hem de fonksiyonel mikrobiyotası çeşitlilik göstermektedir. Bağırsak mikrobiyotasının 500-1000 mikrop türünden oluştuğu düşünülmekteydi. Ancak son zamanlarda yapılan geniş çaplı çalışmalarda, bu düşüncenin aksine insan bağırsak mikroflorasının 35000'in üzerinde bakteri türünden oluştuğu tahmin edilmektedir (198). İnsan Mikrobiyom Projesi (HMP) ve İnsan Bağırsak Sisteminin Metagenomu (MetaHIT) çalışmaları sonucunda insan mikrobiyomunda 10 milyondan fazla gen olabileceği düşünülmektedir. Vücudumuzdaki hücre sayısının bakteri sayısına oranının 1/10 olduğu bilinmekteyken, son zamanlarda yapılan çalışmalarda bu oranın 1/1 olduğu ortaya konmuştur (199). Gastrointestinal sistemde özefagustan rektuma kadar mikroorganizmaların hem çeşitliliği hem de sayısı artmaktadır. Özefagus ve midede bakteri yoğunluğu 10^1 - 10^3 iken kolonda yaklaşık 10^{12} olduğu tahmin edilmektedir (196).

MetaHIT ve HMP verilerince toplam 12 filuma ait 2172 bakteri türü tanımlanmış ve bu bakterilerin %93,5'i *Bacteroides*, *Firmicutes*, *Actinobacteria* ve *Proteobacteria* filumuna ait olarak bulunmuştur (200).

Bacteriodes ve *Firmicutes* ailelerinin bağırsak mikrobiyomunun büyük bir çoğunluğunu oluşturduğu bilinmektedir. *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Fusobacteria* ve *Verromicrobia* bağırsak mikrobiyotasını oluşturan temel 6 bakteriyel filum elemanlarıdır (Tablo 1) (6). Bu genel profil sabit kalsa da, bağırsak mikrobiyota dağılımı hem zamansal hem de mekansal farklılıklar göstermektedir. Örneğin özefagusta bulunan bakteri sayısı ve çeşitliliği rektumda değişmektedir (201). Lümenden mukoza derinliğine gittikçe de bakteri çeşitliliği değişmektedir. Gaitadan da ölçülebilen *Streptococcus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Enterobacteriaceae*, *Clostridium*, *Bacteroides*, *Ruminococcus* ve *Lactobacillus* gibi bakteriler luminal yüzeyde baskın iken *Lactobacillus*, *Clostridium*, *Akkermansia* ve *Enterococcus* gibi bakteriler daha çok mukoza ve mukus ile ilişkilidir (202).

Tablo 1. İnsan bağırsak mikrobiyotasının temel filum sınıfları ve temsil eden bakteri cinsi örnekleri

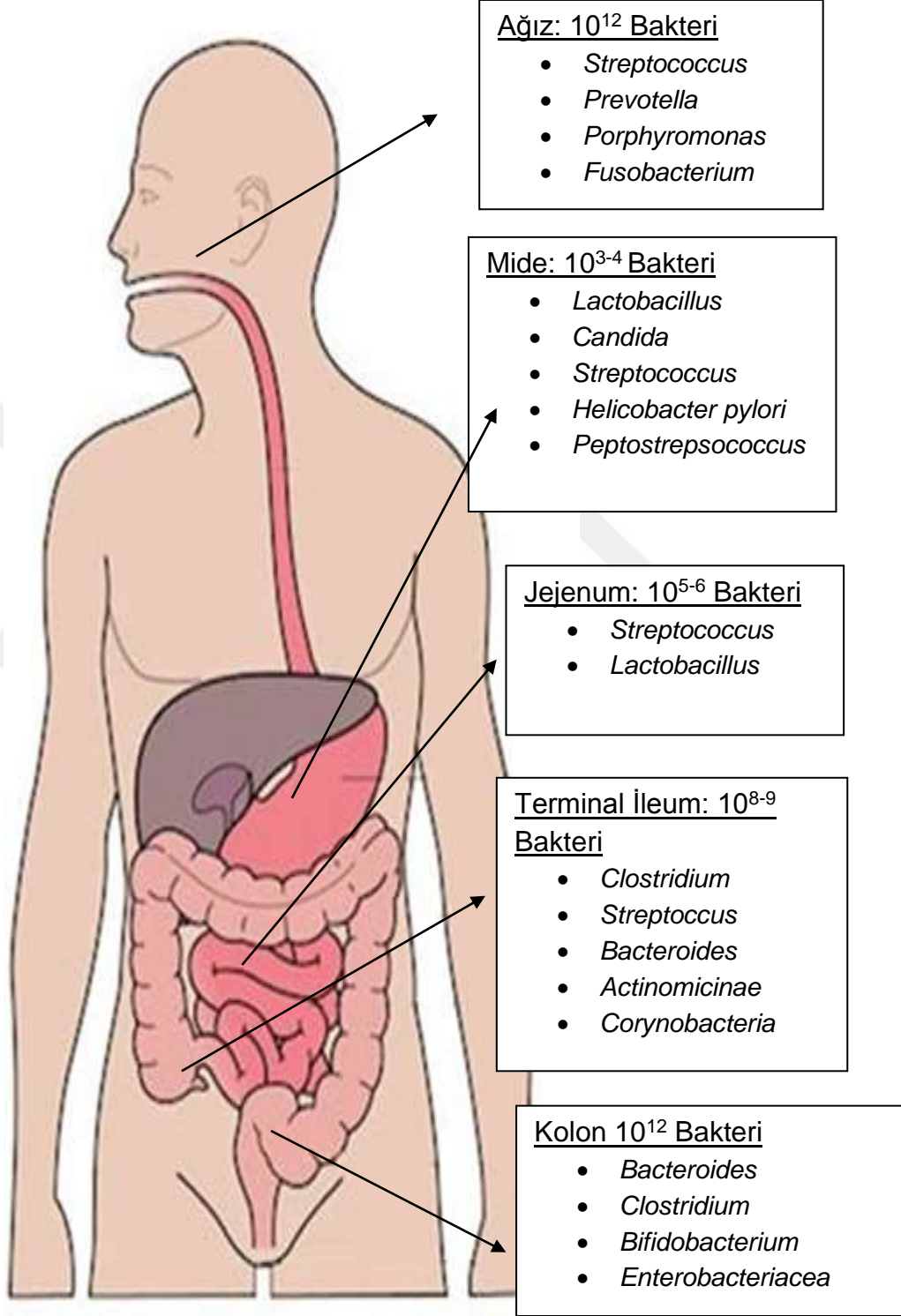
Filum	Cins
Firmicutes	<i>Faecalibacterium</i>
	<i>Lactobacillus</i>
	<i>Clostridium</i>
	<i>Enterococcus</i>
	<i>Ruminococcus</i>
	<i>Veillonella</i>
Bacteroidetes	<i>Bacteroides</i>
	<i>Prevotella</i>
Actinobacteria	<i>Bifidobacterium</i>
Proteobacteria	<i>Escherischia</i>
Fusobacteria	<i>Fusobacterium</i>
Verromicrobia	<i>Akkermansia</i>

Ağız boşluğunda; *Streptococcus*, *Prevotella*, *Porphyromonas* ve *Fusobacterium* suşları yoğun olarak bulunmaktadır. Midede; *Helicobacter*, *Streptococcus*, *Prevotella*, *Veillonella*, *Rothia*, *Lactobacillus*, *Staphylococcus* ve *Peptostreptococcus* yoğun bulunur. *Helicobacter*, midede bulunan baskın

bir cinstir ve mide florasının tüm mikrobiyal düzenini belirler. *Streptococcus*, distal özofagus, duodenum ve jejunumda baskın bir cins olarak görünmektedir. Kalın bağırsak, vücutta bulunan tüm mikropların %70' inden fazlasını içerir. Kalın bağırsakta yaşayan baskın filum *Firmicutes* ve *Bacteroidetes*'dir (203). Son zamanda yapılan çalışmalar, bu oranın sağlıklı kişilerde değişebildiğini göstermiş ve konunun tartışılmasına neden olmuştur. Kolon, *Firmicutes* ve *Bacteroidetes* filumlarının yanı sıra, çok az miktarda da olsa *Vibrio cholera*, *Campylobacter jejuni*, *Salmonella enterica*, *Bacteroides fragilis* ve *Escherichia coli* gibi birincil patojenleri (%0,1) de içermektedir (204). Şekil 3'de normal gastrointestinal mikrobiyada yapısında bulunan bakteri sayıları ve örnekleri görülmektedir.

MetaHIT çalışmaları, bağırsak florasının sınıflandırılmasında başka bir yolu önermiştir. Bu sınıflandırma, ilaçlar ve diyetle farklı cevaplar veren, coğrafya ve cinsiyete göre istikrarlı, iyi dengelenmiş konakçı-mikrobiyal simbiyotik durumuna göre yapılmıştır. Bu kümeler enterotip adı verilmiştir. Genel olarak üç enterotip vardır: Yüksek miktarda *Bacteroides* olan Enterotip 1; *Prevotella* bolluğu olan Enterotip 2; ve bol miktarda *Ruminococcus* bulunan Enterotip 3. Enterotip 1'e ait bakteriler; proteazlar, heksoaminidazlar ve galaktosidazlar gibi geniş bir sakkarolitik potansiyele sahiptir. Bu enzimatik potansiyel kümesi göz önüne alındığında, bu organizmaların diyet karbonhidratlarından ve proteinlerinden enerji elde ettiği anlaşılır. Enterotip 2'e ait bakteriler; ağırlıklı olarak, bağırsak mukozal katmanını örten müsin glikoproteinlerinin bir indirgeyicisi olarak davranır. Enterotip 3'e ait bakteriler; şekerlerin hücre zarından taşınmasına ek olarak müsin yıkımı ile de ilişkilendirilmiştir. Enterotipler, ayrıca diğer spesifik metabolik fonksiyonlara da sahiptirler. Örneğin, biotin, riboflavin, pantotenik asit ve askorbat sentezi enterotip 1'de daha fazla görülürken, tiamin ve folat sentezi enterotip 2'de daha baskındır. Enterotip kavramı, farklı bireylerdeki farklı organizma sınıflarının dağılımını açıklamamaktadır. *Bacteroides* ve *Prevotella*'nın bağırsakta eşit oranda bulunmaması nedeniyle, bireyler arası dağılımı, bu iki

organizmanın ikisinin de baskınlığına dayanan enterogradient kavramı daha iyi açıklamaktadır (205).



Şekil 3. Normal gastrointestinal mikrobiyota yapısı

2.2.3. Mikrobiyotayı etkileyen faktörler

Mikrobiyota, dinamik ve bireye özgü bir yapıya sahiptir. Çeşitli faktörler mikrobiyotayı geçici veya kalıcı olarak değiştirebilmektedir. Mikrobiyom ve çevresel faktörler arasındaki dinamik etkileşim, mukozal ve sistemik bağışıklığı şekillendirir. Bu değişikliği sağlayan, kişiye bağlı intrinsik faktörler ve çevresel değişkenlere bağlı ekstrinsik faktörlerdir. İntrinsik faktörler; genetik, gastrik asit, motilite, mukus, GİS sekresyonları, immunité gibi kişinin yapısına bağlıdır. Çevresel faktörleri içeren ekstrinsik faktörler; bağırsak mikrobiyomunda çok önemli bir rol oynarlar. Aynı tesiste ayrı kafeslerde bulunan, aynı genotipli fareler bile farklı mikrobiyota kompozisyonları göstermektedirler (206). Normal sağlıklı bir mikrobiyota, çeşitli nedenlerin etkisi ile bozularak disbiyozise neden olmaktadır (Şekil 4).

Mikrobiyota ve genetik ilişkisi çeşitli çalışmalar ile gösterilmiştir. Üç kuşak boyunca fareler incelenmiş, kuşaklar arası mikrobiyota benzerliğinin yüksek olduğu ancak diğer fareler ile farklılıklar gösterdiği bildirilmiştir. Bir diğer çalışmada ikizler incelenmiş, tek yumurta ikizlerinde çift yumurta ikizlerine göre mikrobiyota benzerliğinin daha yüksek olduğu gösterilmiştir (207, 208).

İntestinal pH değişimi ile bakteri topluluklarında belirgin bir değişiklik görülmektedir. Yapılan invitro çalışmalarda asidik ortamda, bütirat üreten bakterilerden *Roseburia spp.*'de artma, aside duyarlı *Bacteroides*'lerin üremesinde azalma, *Firmicutes* ve *Actinomicetes*'lerin ise daha dirençli oldukları görülmüştür (209, 210).



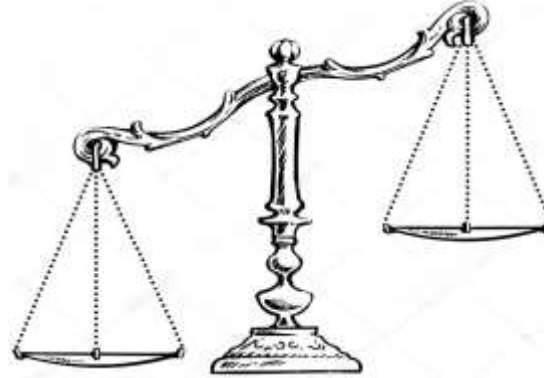
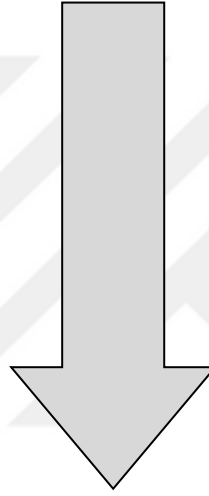
SAĞLIKLI MİKROBİYOTA

Intrinsik Faktörler

- Genetik
- Gastrik asit
- Motilite
- Mukus
- GİS sekresyonları
- İmmunite
-

Ekstrinsik Faktörler

- Diyet
- Yaşanılan coğrafya
- Antibiyotik kullanımı
- Pre/Probiyotik kullanımı
-



DİSBIYOSIS

Şekil 4. Sağlıklı mikrobiyotaya etki ederek disbiyozise neden olan etmenler

Diyet, bağırsak mikrobiyotasını en çok etkileyen ve bağırsak mikrobiyomunu düzenleyici olan faktörlerin başında gelir. Wu ve ark., diyet değişikliğinin mikrobiyotayı hızlı bir şekilde değiştirdiğini ancak bu değişikliklerin enterotipler arasında değişiklik yapacak kadar büyük olmadığını göstermiştir. Hayvansal yağ içeren ve karbonhidrat ağırlıklı besinler tüketenlerde bile, farklı enterotipler görülmüştür. Farelerde yüksek yağlı ve yüksek şekerli diyetle beslenme, bağırsak mikrobiyomunun kompozisyonunu ve çeşitliliğini değiştirmiş ve kısa zincirli yağ asidi üretiminin değişmesine neden olmuştur (211). De Filippo ve ark., Burkino Faso'da yaşayan çocukların diyetlerinin çiftçilerin tarım ve beslenme tarzını yansıttığını göstermişlerdir. Çalışmalarında, bu çocukların mikrobiyotasında *Bacteroides*, *Xylanibacter* ve *Prevotella* bakterilerinin arttığını; *Firmicutes* bakterilerinin azaldığını; bu durumun İtalyan çocuklardan farklı olduğunu gözlemişlerdir. Bu bakteriler kısa zincirli yağ asitlerini sentezlemektedirler. Çalışmalarında bu mikrobiyota profilinin, bitkisel polisakkaridleri metabolize edecek şekilde değişim geçirdiği ve bunun inflamasyona veya non-enfeksiyöz hastalıklara karşı koruyucu olduğu sonucuna ulaşmışlardır (212). Obez kişilerin bir yıl boyunca düşük kalorili diyetlerle beslenmeleri durumunda, diyet öncesine göre mikrobiyotalarında *Bacteroides* grubu bakterilerin arttığı, *Firmicutes* grubu bakterilerin ise azaldığı gözlenmiştir (213).

Antibiyotikler, bağırsak mikrobiyotasını etkileyen bir diğer önemli faktördür. Antibiyotiklerin bağırsak mikrobiyotasına kısa dönemli ve uzun dönemli etkileri bulunmaktadır. Ancak uzun dönem etkileri ile ilgili yapılmış çalışma sayısı yetersizdir. Antibiyotiklerin etkisi, antibiyotiğin türü, kullanım süresi ve dozu, farmakokinetiğine göre değişmektedir. Farmakodinamik durumu da değiştirmeleri nedeniyle farklı antibiyotikler mikrobiyotada farklı etki oluşturabilmektedirler. Örneğin klindamisin, geniş spektrumludur ve safra yoluyla atıldığı için dışkıda yüksek konsantrasyonda bulunmaktadır. Bu nedenle mikrobiyotanın düzelmesi uzun süre alır. Makrolidler, uzun dönemde, *Actinobacter* (özellikle *Bifidobacter*) ve *Firmicutes* (özellikle *Lactobaciller*) türlerinde azalma yaparken, *Bacteroidetes* ve *Proteobacteria*

türlerinde artışa neden olmaktadır. Siprofloksasinin, uzun dönemde gram pozitif aerobları ve bakteriyel çeşitliliği azalttığı gözlenmiştir. Ancak antibiyotiklerin sürekli olarak disbiyozise yol açtığını söylemek yanlış olacaktır. Bazı durumlarda da farklı antibiyotiklerin bağırsak florasını pozitif yönde etkileyerek öbiyotik etki gösterdikleri gözlenmektedir. Örneğin nitrofurantoin ile yapılan bir çalışmada komplike olmayan idrar yolu enfeksiyonlarında kullanıldığında, *Actinobacteria*'lar da (özellikle *Bifidobacteria*) artışa, başka bir çalışmada *Faecalibacterium* ailesinde artışa neden olduğu gözlemlenmiştir (214).

Proton pompası inhibitörleri (PPI), NSAİİ'ler, prokinetik ilaçlar mikrobiyotayı etkileyen diğer ekstrinsik faktörler arasında gösterilmektedir. Kullanımı her geçen gün artan PPI ile ilgili yapılan bir çalışmada, 16S metagenomik fekal mikrobiyota incelemesi sonucu, PPI kullanımının özellikle *Streptococcus* artışı ve *Faecalibacterium* azalması yaptığı görülmüştür. Başka bir çalışmada, PPI kullanan hastalarda *Bacteroides* türlerinde azalma, *Firmicutes* türlerinde de artma saptanmıştır (215).

Prebiyotikler ve probiyotikler de mikrobiyotayı etkilemektedirler. Prebiyotikler, mikrobiyotadaki mevcut yararlı bakterilerin metabolizmasını destekleyen ve bu yararlı bakterilerin çoğalmasını uyaran inülin ve fruktooligosakkarit gibi maddelerdir. Probiyotikler ise, insan sağlığı için yararlı *Bifidobacteria* ve *Lactobacillus* gibi canlı bakterilerlerdir. Bunlar, florada bakterilerin hem sayıca artışına hem de çeşitliliğine neden olmaktadır. Prebiyotik ve probiyotiklerin; alerji, inflamatuvar bağırsak hastalığı, irritabl bağırsak sendromu ve enterit gibi bazı klinik hastalıklar için koruyucu özellikte oldukları bilinmektedir (216).

2.2.4. Normal gastrointestinal mikrobiyotanın fonksiyonları

Konak bağırsağı, mikroorganizmalar için uygun bir yaşam ortamı sağlar. Mikroorganizmalar ise, konak için önemli olan çok sayıda metabolik, immünolojik ve koruyucu olan fonksiyonlara sahiptirler.

2.2.4.1. Metabolik fonksiyonları

Bağırsak mikrobiyotasındaki mikroorganizmaların en önemli besin kaynağı, diyetdeki karbonhidratlardır. Karbonhidratların kolonik organizmalar tarafından fermantasyonu, konakçı için zengin enerji kaynakları olan bütirat, propiyonat ve asetat gibi kısa zincirli yağ asitlerinin (Short chain fatty acid/SCFA) sentezlenmesiyle sonuçlanır. Yanı sıra bütirat, D-laktat gibi toksik metabolik yan ürünlerin de birikmesi önlenir (217). Karbonhidrat metabolizmasına katılan baskın organizmalar *Bacteroides* cinsinin üyeleridir. Glikozil transferazlar, glikozit hidrolazlar ve polisakarit liyazlar gibi enzimleri eksprese ederek görevlerini gerçekleştirirler. Bu organizmalar arasında en iyi örnek, 260'ın üzerinde hidrolaz enzimini kodlayan bir genom ile donatılmış olan *Bacteroides thetaiotaomicron*'dur (218). Ek olarak bağırsak mikrobiyotasının, adipositlerde lipoprotein lipaz aktivitesinin inhibisyonunu baskılayarak, lipid metabolizması üzerinde olumlu bir etki sağladığı gösterilmiştir. *Bacteroides thetaiotaomicron*'un, ayrıca lipid sindirimi için pankreas lipazının gerektirdiği bir kolipazın ekspresyonunu düzenleyerek lipid hidrolizinin etkinliğini arttırdığı gösterilmiştir (219).

Bağırsak mikrobiyotası, mikrobiyal proteinazlar ile protein metabolize edici özelliğe de sahiptir. Bakteri hücre duvarında bulunan amino asit taşıyıcılarından bazıları, bağırsak lümeninden bakterilere amino asit girişini kolaylaştırırlar. Bu şekilde amino asitler küçük sinyal moleküllerine ve antimikrobiyal peptitlere (bakteriyosinler) dönüştürülmüş olur. L-histidinin, bakteriyel hdcA genleri tarafından kodlanan bakteriyel enzim olan histamin dekarboksilaz tarafından histamine dönüştürülmesi bunun bir örneğidir (220).

K vitamini ve çeşitli B vitamini bileşenlerinin sentezlenmesi, bağırsak mikrobiyotasının önemli olan diğer metabolik fonksiyonlarından. *Bacteroides* cinsinin üyelerinin, antidiyabetik, antiaterojenik, hipolipidemik ve immünomodülatör özelliklere sahip olduğu bilinen konjuge linoleik asitleri sentezlediği gösterilmiştir. Ayrıca, normal bağırsak mikrobiyotasının yüksek enerji metabolizmasının göstergesi olan pirüvik asit, sitrik asit, fumarik asit ve malik asitin serum konsantrasyonlarını artırarak sağlıklı bir metabolizma sağladığı da gösterilmiştir (205).

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda, insan bağırsak mikrobiyotasının, diyetle tüketilen çeşitli polifenollerin (fenolik bileşikler) parçalanmasında da rol oynadıkları gösterilmiştir. Diyetle genellikle inaktif olan polifenoller, diğer faktörlerin yanı sıra, GİS mikrobiyotası tarafından şeker kısmının çıkarılması ile aktif bileşiklere dönüştürülürler. Polifenolün yapısal özgülüğünü ve mikrobiyotanın bireysel zenginliğini, bağırsakta meydana gelen biyotransformasyon seviyesi belirler. Nihai aktif ürünler, portal ven tarafından emilirler ve diğer doku ve organlara hareket ederek antimikrobiyal ve diğer metabolik etkilerini sağlarlar (221).

Son yıllarda bağırsak mikrobiyomunun ksenobiyotik ve ilaçları metabolize etme yetenekleri fark edilmiştir. Bu nedenle, gelecekte hastalıkların tedavisinde rol alabilecekleri düşünülmektedir. Clayton ve ark., bağırsak mikrobiyal metabolit ürünü olan p-kresolün, karaciğerin hepatik sülfotransferazlarını inhibe etmesi nedeni ile asetaminofen metabolize etme kapasitesini azaltabileceğini göstermişlerdir (222).

2.2.4.2. İmmün fonksiyonlar

Bağırsak mikrobiyotası, hem doğal hem de adaptif bağışıklık sistemleri ile paralel olarak bağırsak immünomodülasyonuna katkıda bulunur. Bu durum hem bağırsağın mukozal immünitesinde hem de sistemik immünitede geçerlidir. Bağışıklık sistemini immün sistem organları, hücreleri, sitokinleri ve

hücre reseptörleri oluşturmaktadır. Bağırsakta bulunan mukozal immün sistem peyer plakları, lamina propriya ve epitel hücreleri olmak üzere üç farklı mukozal lenfoid yapıdan oluşmaktadır (223). Epitel hücrelerinin yüzeyindeki mukus tabakası, organizmanın ilk savunma hattını oluşturan fizyolojik bariyerdir. İnce bağırsak epitelinde kriptaların tabanında yer alan Paneth hücreleri, bağırsak lümenindeki bakteri veya patojenlere yanıt olarak antimikrobiyal peptidleri (AMP) salgılayarak bağırsakta doğuştan gelen konakçı savunmasına katkıda bulunur (224). Mukus tabakası ve AMP'ler, simbiyotik bakteri istilasını engelleyen mukozal bariyeri oluştururlar. Öncü çalışmalar, konakçı mukozal savunmasında AMP'lerin bağırsak lümenindeki mikrobiyotayı doğrudan etkilediklerini göstermiştir (206). Epitel hücreleri, bağırsak mukozal bağışıklık sisteminin ikinci fiziksel bariyeridir ve doğrudan bağırsakların immün sürveyansına katılırlar. Epitel hücreleri sadece mikroorganizmaların doğrudan savunmasında rol oynamazlar; ayrıca sitokinler ve kemokinler üreterek mukozal immün sisteme sinyaller gönderirler (225). Uyarılara cevap olarak, epitel hücrelerinde bulunan lenfoid hücreler, inflamasyonda savunucu veya patojenik bir rol oynayan sitokinleri üretmek üzere aktive edilirler; bu cevap, memelilerde bağırsak homeostazının kontrolü ile yakından ilgilidir. IL-22, lenfoid hücreler tarafından üretilir ve bağırsakta enfeksiyon sırasında homeostazı ve iyileşmeyi destekler (206). İEL, iltihaplanma sırasında savunma ve patogeneizde önemli bir rol oynarlar. İEL'ler aktive edildiklerinde, epitel hücrelerini yaralanmaya karşı korumak üzere IFN- γ ve keratinosit büyüme faktörü gibi sitokinleri eksprese ederler (206). Dendritik hücreler (DH), bağışıklık sisteminin eksojen patojenleri etkili bir şekilde tanıma ve yok etmesinden sorumludurlar. DH'ler antijenleri bariyerden mukoza ilişkili lenfoid dokuya sürekli geçirme veya lenf nodlarını boşaltma yeteneğine sahiptirler (226). Sabit durumda, DH'ler, CD4+ T hücrelerinin düzenleyici T hücrelerine (Treg) doğru farklılaşmasını teşvik ederek bağırsak immün toleransını düzenlerler (227). Pro-inflamatuvar Th hücreleri, konakçı savunma reaksiyonu sırasında, patojenleri elimine ederek ve ardından doku tahribatına yol açan doku iltihabını indükleyerek, otoimmünitede önemli bir rol oynarlar (206).

B ve T hücrelerinden oluşan lamina propria, bağırsak epitel hücrelerinin alt tabakasında bulunur. T hücreleri lümen ortamındaki sinyale hızlı bir şekilde yanıt vererek inflamatuvar veya anti-inflamatuvar yanıtları başlatırlar (228). Lamina propria, CD4+ T hücreleri, intestinal inflamasyonu düzenlemede rol oynayan IL-17 ve IL-22'yi salgılar. Bağırsak epitel hücreleri, CXCR ve CC kemokinler gibi kemokinlerin ekspresyonunu indükleyebilen IL-17'yi üretir. IgA üreten B hücrelerinin olgunlaşma yeri olan Peyyer plakları, B hücrelerinin ve plazma hücrelerinin oluşmasına katkıda bulunurlar. Peyyer'in yamalarındaki aktive edilmiş B hücreleri, bağırsakta sürekli olarak T hücrelerine bağımlı ve T hücrelerinden bağımsız tepkiler için, IgA üreten plazma hücrelerini üretirler. IgA'nın salgılanması bağırsak bariyerinin korunmasında büyük katkı sağlamaktadır. (206). Aktivasyondan sonra, T hücreleri ve B hücreleri, spesifik immün yanıtın bir parçası olarak işlev gören lamina propria'ya geri döner (225).

Bağırsak mukozası, bağışıklık sisteminin en büyük bileşenini oluşturur ve bağırsak mikrobiyomu ile yakından ilişkilidir. Bağırsak mukozası bağışıklık sisteminin dengesi, konak homeostazı ve savunmasında kritik bir rol oynar. Germfree (GF, patojensiz) fareler ile yapılan çalışmalar, bağırsak mikrobiyomunun, mukozal bağışıklığın oluşmasında hayati bir rol oynadığını göstermiştir. Spesifik GF hayvanlarla karşılaştırıldığında, GF hayvanların daha az İEL ürettiği ve lamina propriada IgA salgılayan plazma hücrelerinin sayısının önemli ölçüde düşük olduğu görülür. Anjiyojenin-4, Paneth hücrelerinde bulunan bir mikrobisidal protein sınıfıdır ve mikroplara karşı bağırsak lümeninden salgılanabilir. Gerçek zamanlı kantitatif PZR ile Anjiyojenin-4'ün mRNA ekspresyon seviyesinin, geleneksel farelere kıyasla GF farelerde belirgin şekilde azaldığı gösterilmiştir. Bu sonuç, mukozal bağışıklık için bağırsak mikrobiyotasının gerekli olduğunu göstermektedir. GF farelerdeki Peyyer plakları, geleneksel farelere göre daha küçük bir germinal merkez içerir. Bu hayvanlara tedavi amaçlı *Bacteroides fragilis* verilmesi sonucu, CD4+ T hücrelerinin proliferasyonu sağlanmış ve olumsuz tablo düzelmiştir (229).

Son zamanlarda yapılan bir çalışmada, prebiyotiklerle tedaviden sonra dışkıdaki IgA'nın önemli ölçüde arttığı, mezenterik lenf nodlarındaki ve Peyer plaklarındaki pro-inflamatuvar faktör ekspresyonunun önemli ölçüde azaldığı gösterilmiştir. Bir tür simbiyotik bakteri türü olan *Bacteroides fragilis*, IL-17 üretimini inhibe ederek ve bağırsak Treg'lerinin aktivitesini artırarak, anti-inflamatuvar etki yapan polisakkarit A'yı üretir. Kalın bağırsakta *Clostridium* kolonizasyonu TGF- β seviyesini artırır ve IL-10 ekspresyonunu teşvik eder. Ancak, *Clostridium* kolonizasyonu İBH'de düşmüştür. Bu sonuçlar bağırsak mikrobiyomunun bağırsak mukozal immün dengesini etkilediğini göstermektedir (206).

Bağırsak mukozası, mikrobiyom konakçı etkileşimleri için ana bölgedir. Bağırsakta mikropların tanınması, Toll-like receptors (TLRs) ve nucleotide-binding oligomerization domain molecules (NODs) olmak üzere iki önemli reseptör aracılığı ile gerçekleşmektedir (230). Bu reseptörler geniş ölçüde bağırsak epitel hücrelerinde, makrofajlarda ve dendritik hücrelerde bulunmaktadır. Bu reseptörler, patojen ve kommensal bakteriler üzerinde bulunan 'microbe-associated molecular patterns (MAMPs)' olarak adlandırılan moleküler kalıpları tanır. Bir mikroorganizma tanınıp özüksendikten veya epitel tabakasını istila ettikten sonra uygun bir immünolojik tepki başlatılır. Reseptör ve MAMPs aşamasından sonra duruma göre hem patolojik hem de koruyucu etkiler görülebilir. Koruyucu etkiler; pro-inflamatuvar sitokinlerin (IL - 8, IL - 12, IL - 23) down regülasyonu ve Treg hücreleri tarafından üretilen IL-10 gibi anti-inflamatuvar sitokinlerin up regülasyonu ile oluşur (231). Kommensal bakteriler, dendritik hücreler tarafından Treg hücrelerine dönüşecek olan naif T hücrelerine sunulur. Treg'ler de anti-inflamatuvar sitokinleri salgılayarak sistemik ve lokal tolerans durumunun ortaya çıkmasını sağlar. Kommensal mikroorganizmalar aynı zamanda B ve T hücrelerinin aktivasyonunu için gerekli olan antijenlerin lenfoid dokuya taşınmasında görevli fagosit hücrelerinin migrasyonunu baskılamaktadır (232). Bunun yanı sıra bu bakteriler goblet hücrelerinin farklılaşmasını ve mukus üretimini de artırır. Patojenik bakteriler ise,

dendritik hücrelerin, naif T hücrelerinin Th1 ve Th17 hücrelerine farklılaşmasını sağlayacak pro-inflamatuvar sitokinlerin salınmasına neden olur. Ek olarak, epitel hücrelerinin bazolateral tarafında normal olarak bulunan TLR-4 ve -5, pro-inflamatuvar süreci desteklemek üzere eksprese edilir. Farklı gram negatif bakteriler farklı lipopolisakkarit modifikasyonuna sahip olduğu için TLR'yi uyarma potansiyelleri de farklıdır. Böylece farklı bakterilere farklı immünolojik yanıt verilir (231).

Mikrobiyal metabolitler, metabolik etkilerinin yanı sıra immün cevabı da etkilemektedirler. Nişasta, inülin gibi kompleks karbonhidratların fermantasyonu sonucu oluşan metabolizma ürünleri asetat, propiyonat ve bütiratı da içine alan SCFA'lardır. SCFA'lar kolonositler için vazgeçilmez bir enerji kaynağıdır. Aynı zamanda sıkı bağlantıları güçlendirerek epitel bariyerini korur, bağırsak hareketliliğini düzenlemeye yardımcı olur ve anti-inflamatuvar bileşiklerin üretimini uyarır. SCFA, nötrofilde bulunan bir G reseptörüne bağlanarak nötrofil migrasyonunu azaltır. Böylece inflamasyonu baskılamaktadır. Yapılan hayvan deneylerinde de koliti baskıladığı görülmüştür (233). Azalmış SCFA üretimi, toksik mikrobiyal metabolitlerin çoğalması, mukozal bariyer fonksiyonunda bozukluk ve mikrop kaynaklı konakçı immün düzensizliği, uzun süreli kalıcı bir pro-inflamatuvar sürecin yerleşmesine neden olur. Yapılan bir çalışmada akut diyareye sahip köpeklerde fekal *Faecalibacterium* miktarındaki azalmayla birlikte fekal propiyonattaki azalmalar da tanımlanmıştır. Safra asitleri gibi diğer metabolitlerin de immünomodülatör etkileri vardır. Primer safra asitleri, bağırsak mikropları tarafından metabolize edilerek sekonder safra asitlerine dönüşür. Sekonder safra asitleri, konakçının primer safra asitlerinden daha fazla ölçüde çeşitli konakçı reseptörlerini bağlar ve aktive eder (231).

Bağırsak mikrobiyotasının geliştirdiği bir diğer mekanizma, lokal immüno globulinleri indükleyerek patojenik suşların aşırı büyümesini kontrol etmektir. *Bacteroides* gibi Gram negatif organizmalar başta olmak üzere bağırsak mikrobiyotası, intestinal dendritik hücreleri aktive ederek, yine

intestinal mukozada bulunan plazma hücrelerinden salgısal IgA (slgA) üretimini uyarır. SlgA, bağırsak mikrobiyotasını kaplar. Mikrobiyotayı kaplayan slgA, ağırlıklı olarak bakteriyel proteazların parçalanma etkisine daha dirençli olan slgA2 alt sınıfındandır. Bağırsak epitel hücreleri, slgA1 fenotipinden slgA2'ye geçişi indükleyen proliferasyon indükleyici bir ligand (APRIL) üretebilir. Böylece, mikrobiyotanın bağırsak lümeninden dolaşıma translokasyonu kısıtlanır ve sistemik bir bağışıklık tepkisi önlenmiş olur (205).

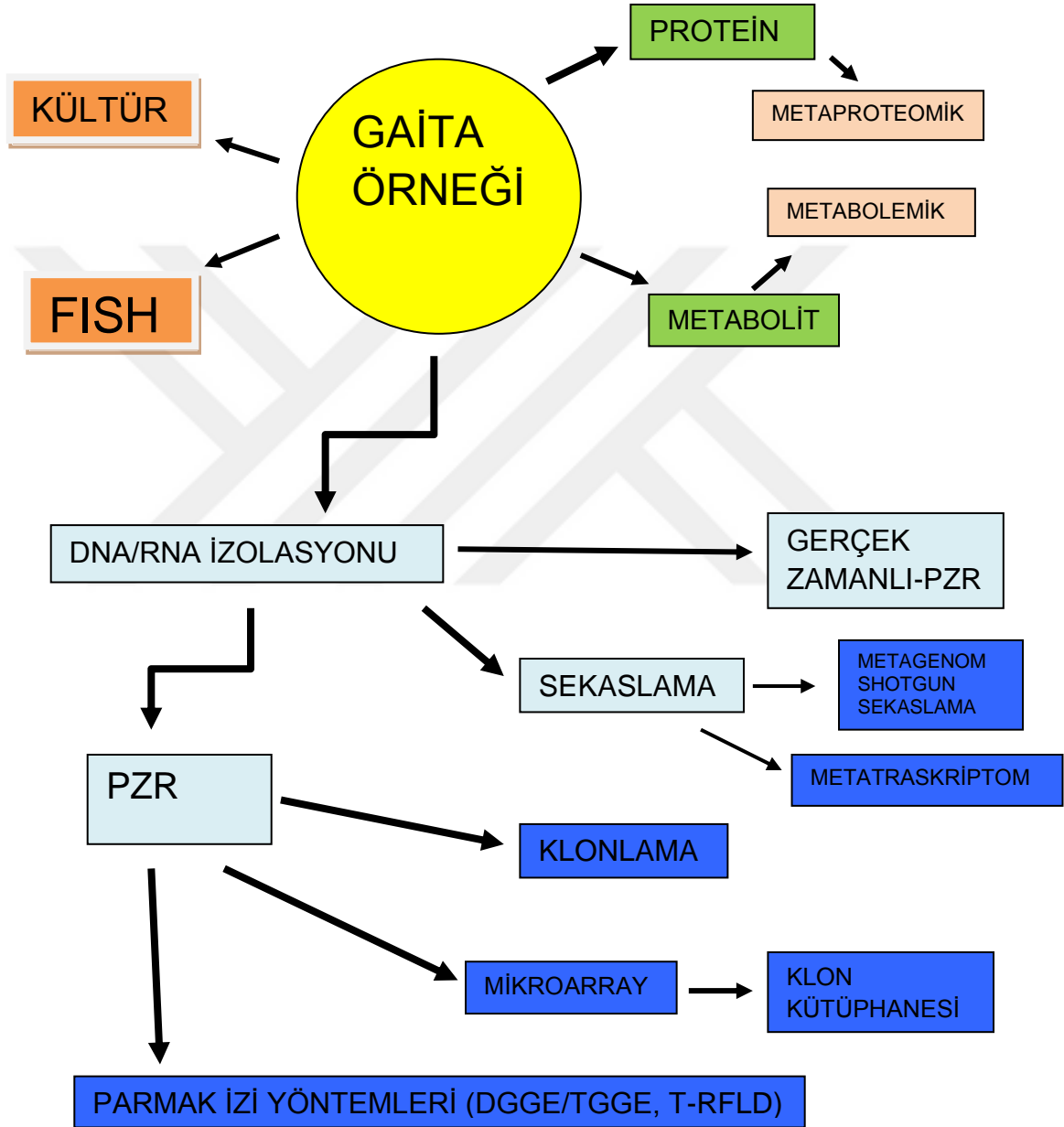
2.2.4.3. Koruyucu fonksiyonu

Sağlıklı bir bağırsak için, bağırsakta mukozal immün sistemin patolojik mikroorganizmalar için yanıt geliştirirken, kommensal bakterilere karşı da tolerans geliştirmesi gerekmektedir. Mikrobiyotanın fiziksel varlığı patojenik mikroorganizmaların yerleşmesine engel olmaktadır. Mikrobiyotada bulunan bakterilerin salgıladığı bir takım antimikrobiyal maddeler de bu sürece katkıda bulunmaktadır. Örneklendirmeyi, Lactobasillus bakterilerinin ürettikleri laktik asitin, bakterilerin hücre duvarına zarar vermek amacı ile konak ürünü olan lizozim ile birlikte çalışması ile yapabiliriz (234).

2.2.5. Mikrobiyota çalışma yöntemleri

Bağırsak mikrobiyotası son derece karmaşıktır. Moleküler yöntemlerin geliştirilerek kullanılmaya başlanması, bağırsak bakterilerinin konakçı sağlığı ve refahı üzerindeki etkisinin anlaşılmasında devrim yaratmıştır. Bağırsak bakterilerini tanımlamak amacıyla, geçmişten günümüze her birinin güçlü ve zayıf yanları olan çeşitli yöntemlerin kullanıldığı görülmektedir. Mikrobiyota ile ilgili yapılan araştırmalara bakıldığında kültür temelli, moleküler temelli ve metabolitlerin ölçülmesine dayanan yöntemlerin kullanıldığı görülmektedir. Moleküler temelli yöntemler, sekans temelli olmayan yöntemler (floresan in-situ hibridizasyon akım sitometrisi, pulsed field jel elektroforezi, denatüre edici gradiyent jel elektroforezi, sıcaklık gradiyent jel elektroforezi, tek zincir konfarmasyon polimorfizmi yöntemi) ve sekans temelli yöntemler

(metagenomik, metatranskriptom) olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Şekil 5’de bu yöntemler özetlenmiştir (235).



Şekil 5. Mikrobiyota çalışma yöntemleri

2.2.5.1. Mikrobiyota alışmaları için örneklerin toplanması ve saklanması

Bağırsak mikrobiyota analizlerinin doğruluğu, numunelerin uygun seçimine, toplanmasına ve n işlenmesine bağlıdır. Bağırsak mikrobiyotası çalışmalarında araştırmacının hangi tip rneklemeye yapacağı, seçtiği yöntemin çalışmasına olan etkisi nedeni ile de önemlidir. İnsan bağırsağı mikrobiyotasının analizi için kullanılan örnekler dışkı, bağırsak doku biyopsisi ve bağırsak mukozal lavaj materyalidir. Bu numunelerin her birinin belirli avantajları ve dezavantajları vardır. Bağırsaktaki belli bir bölümün mikrobiyotası için yapılacak çalışmalarda biyopsi tercih edilebilir. Ancak biyopsi öncesi mikrobiyotayı değiştiren özel bir hazırlığa (rneğin kolonik biyopsiler için lavaj) ihtiyaç duyabilir. En yaygın olarak kullanılan örnek, invaziv olmaması, hızlı ve kolay erişilebilir olması nedeni ile gaitadır. Dışkı rnekleri, gastrointestinal sistemin uzunluğu boyunca birkaç segmentten örnekleri içermesine rağmen esasen distal bağırsakta bulunmaktadır. Bu nedenle gaita, gastrointestinal sistemde bakterilerin en yoğun bulunduğu bölge olan kolon bölgesindeki bakterileri daha iyi temsil etmesi nedeniyle iyi bir seçim olacaktır (236).

En yaygın kullanılan depolama stratejisi, numuneleri -20° C'de veya daha düşük derecelerde dondurmaktır. Numuneler toplandıktan sonra kısa süre içinde dondurulması gerekmektedir. Numunelerin düşük sıcaklıkta depolanmasının nedeni, DNA'nın dondurulduktan sonra nispeten daha kararlı olması nedeniyledir. Bununla birlikte, DNA'nın uzun süre depolandıktan sonra donmuş numunelerde bozulduğu da bilinmektedir; bu nedenle, numuneleri mümkün olan en kısa sürede işleme koymak akıllıcadır. Özellikle, numunelerin tekrar tekrar dondurulmasından kaçınılmalıdır. İdeal olarak, bir çalışmanın tüm örnekleri aynı anda ve aynı laboratuvarında herhangi bir parti etkisini en aza indirmek için aynı personel tarafından işlenmelidir (237).

2.2.5.2. Kùltür temelli yöntemler

Yirminci yüzyılın başlarına kadar bağırsak mikrobiyotası kùltür temelli yöntemler kullanılarak, ardından morfolojik ve biyokimyasal yöntemler ile fenotiplendirme yapılarak tanımlanmıştır. Ancak bağırsak mikrobiyotasının büyük kısmını oluşturan anaeroplara bu tanımlama işlemleri süresince hayatta kalamamakta ve tanımlanamamaktadır (235). 1970'lerde anaerobik kùltüre dayalı teknikleri kullanarak yapılan çalışmalar insan bağırsağında 400 ila 500 farklı bakteri türü tanımlamıştır (238). Her ne kadar kùltür ile bakteri teşhisi oldukça ucuz olsa da, yoğun emek gerektirir ve kùltür tek başına bağırsak mikrobiyotasının çeşitliliği hakkında sınırlı bir görüş sunar. Bu güne kadar bağırsak mikrobiyota üyelerinin %30'undan azı kùltürle tanımlanabilmiştir (239). Ayrıca bağırsakta bulunan mikroorganizmaların kùltürde üreme eğilimleri farklılık göstermektedir. Bu nedenle kùltür temelli yöntemler ile alınan sonuçlarda anaerobik bakteriler kaçırıldığı için aerobik bakterilerin yoğunluğu göreceli olarak fazla bulunmaktadır. Bu teknikle bağırsak lümeni içindeki bakterilerin çeşitliliği belirgin olarak az görülmektedir ve bu tarz çalışmalarda faydaları kısıtlıdır. Bu nedenle bağırsak mikrobiyota araştırılması çalışmalarında yeterli ilgiyi görmemiş; sadece sınırlı klinik durumlarda belirli grup bakterilerin araştırılmasında kullanılması ile sınırlı kalmıştır. Kùltür çalışmalarındaki bu sınırlılıkların yanı sıra mikrobiyota çalışmaları için 20. yüzyılın sonlarından itibaren farklı bakteri türlerinin tanımlandığı moleküler yöntemler kullanılmaya başlanmıştır (235).

2.2.5.3. Moleküler yöntemler

DNA ekstraksiyonu

Mikrobiyal DNA'nın feçes ve diğer örneklerden izole edilmesinde bilinmesi gereken birçok önemli husus vardır. İlk olarak, örneklerdeki mikrobiyal yükler aşırı değişken olabilir. Örneğin dışkı örnekleri, 10^{10} hücre/gr veya toplam dışkı kütlelerinin %50'sine kadar mikrobiyal yük içerebilmektedir;

bununla birlikte, mikrobiyal hücre, proksimal bağırsaktan elde edilen numunelerde daha az sayıda bulunmuştur (240). İkinci bir husus, bağırsak mikroorganizma çeşitliliğinin yüksek olmasıdır. Gram-negatif bakteriler, siyanobakteriler, archaea, mantarlar ve protozoalar ve çok sayıda Gram-pozitif diğer mikroorganizmaları içerir. Bu mikroorganizmaların hücre zarf yapısı oldukça değişkendir ve bu da DNA ekstraksiyonunun etkinliğini değiştirmektedir. Örneğin, Gram pozitif bakterilerin hücre duvarları Gram-negatif bakteriler ile karşılaştırıldığında daha kalın olduğu için lizis edilmesi daha zordur. Üçüncü husus, bağırsak lümeninden ve dışkıdan elde edilen örneğin, sindirilmemiş malzeme içeriği yüksek olabilir ve bu yüzeylerde mikrobiyal biyofilmler oluşabilir. Bu maddelerin DNA ekstraksiyonundan önce çıkarılmaması (örn; santrifüjleme) yanılmaya neden olabilir. Son bir husus olarak, dışkı, polimeraz zincir reaksiyonunu (PZR) inhibe eden çok çeşitli nükleazlar ve bileşikler içerir. Olası PZR inhibitörleri arasında bilirubinler, safra tuzları ve kompleks karbonhidratlar ile polifenolik bileşikler ve kan bulunur (237, 241-243).

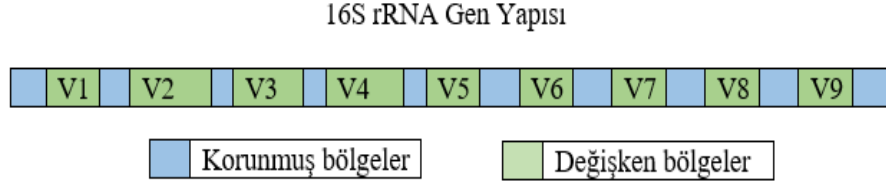
DNA'nın dışkıdan ekstraksiyonu için çok çeşitli yöntemler tarif edilmiştir, ancak yöntemin uygunluğu amaçlanan uygulamaya bağlıdır. Örneğin, belirli mikroorganizmalar için tasarlanan ekstraksiyon yöntemleri, DNA topluluğunu etkili bir şekilde çıkartamayabilir. Tüm ekstraksiyon yöntemleri dört adımdan oluşur: (i) daha büyük partiküllerin yıkanmasını, homojenleştirilmesini ve uzaklaştırılmasını içeren numunenin hazırlanması; (ii) tipik olarak çeşitli deterjanlar, katotropik maddeler ve/veya çözücüler ilavesiyle nükleazların etkisizleştirilmesiyle eşzamanlı olarak gerçekleştirilen hücrelerin parçalanması; (iii) kirlenici genomik olmayan materyallerin ve PZR inhibitörlerinin uzaklaştırılması ve (iv) DNA'nın geri kazanımı. Sonuç olarak; analizin kalitesi, numune kaynaklı sorunları en aza indirmeye yönelik olarak, numune içindeki tüm mikroorganizmaların verimli bir şekilde parçalanmasının sağlanması ile ilişkilidir. Henüz her bir örnek tipine özel olarak geliştirilmiş ve en uygun olan prosedür bildirilmemiştir. Mekanik bozulma yöntemlerinin (örn; boncuk çırpma yöntemlerinin kullanılması ve / veya donmuş numunelerin

öğütülmesi gibi) bazı çalışmalarda etkili olduğu kanıtlanmıştır. Ancak, mekanik bozulma yöntemleri ısı birikmesine ve DNA kaymasına neden olabilmektedir (237). Günümüzde çeşitli DNA ekstraksiyon kitleri piyasada bulunmaktadır; bunlardan bazılarında, PZR inhibitörleri yok edilerek DNA' nin kalitesi ve verimi artırılmıştır (örn; Qiagen QIAamp DNA Stool Mini Kit®). Li ve ark., Qiagen kitinin boncuk ile parçalama kadar etkili olduğunu bulmuştur (244). Diğer çalışmalarda da, ticari bozulmalarla birlikte mekanik bozulma kullanımının, elde edilen DNA miktarını arttırdığını göstermiştir (245). Fiziksel ekstraksiyon aşamasındaki donma-çözülme işlemleri de, numunelerdeki bakteri filotiplerinin çeşitliliğini artırabilir (246). DNA ekstraksiyonundan önce liyofilizasyonun spesifik mikroorganizmaların miktarını arttırdığı gösterilmiştir (247). Ticari bir DNA ekstraksiyon kiti (yani PZR inhibitörünün çıkarılması özelliğine sahip) ile bozulma tekniğinin birlikte kullanılması ile en iyi sonuçların elde edilmesini sağlayacaktır. Araştırmacıların, kendi koşullarına göre en iyi yöntemi belirlemeleri için, pilot çalışmalarda (örn; DNA verimi, tür çeşitliliği ve zenginlikleri gibi) yöntemleri değerlendirmeleri gerekmektedir.

Hedef gen bölgeleri (16S rRNA)

16S rRNA, prokaryotik ribozomların küçük alt birimi olan 30S' lik bölümünde yer alan, translasyonunda görev aldığı için mikroorganizmalar arasında son derece korunmuş olan ve yaklaşık 1500 baz çifti olan kısa bölgedir. Bu RNA parçası, türler için korunmuş bölgelere ek olarak, 9 adet yüksek değişkenlik gösteren V1'den V9'a kadar isimlendirilmiş bölgeleri içerir. Biyolojik çeşitlilik açısından bu değişken bölgeler oldukça önem arz etmektedir (Şekil 6) (248). Bu değişken bölgelerdeki nükleotit sekanslarındaki farklılıklar, bakterilerin evrimsel farklılığını yansıtır ve bu nedenle bu sekanslar bakteri türlerinin tanımlanması ve filogenetik sınıflandırılması için güvenilir bir yöntem sağlar (235). 16S rRNA'nın fonksiyonlarından biri, protein sentezinin başlatılması ve uzatılmasıdır. 16s RNA geninin mikrobiyota çalışmalarında tercih edilme nedeni, değişken bölgeler ile beraber korunmuş

bölgeleri içermesi ve bu bölgelere bağlantı kuran üniversal primerlerin yazılmasına olanak sağlaması olarak gösterilmiştir (248).



Şekil 6. 16S rRNA Gen Yapısı

İlk başlarda geliştirilen moleküler teknikler, çeşitli bakteriler arasındaki bu çok değişken bölgelerin sadece uzunluk farkından ve nükleotid sekanslarındaki majör varyasyonlardan faydalanıyordu. Ancak son 15 yılda, nükleik asit dizileme teknolojisinde hızlı gelişmeler olmuş, yüksek verimli multi-paralel sekanslama yaygın bir şekilde makul fiyatlarla kullanılabilir olmuştur. Böylelikle mikrobiyota çalışmaları için altın standart haline gelmiştir (235).

Bakteriyel toplulukların bileşiminin tanımlanmasında, 16S rRNA genlerinin kullanılmasıyla ilgili problemler bulunmaktadır. Örneğin, farklı değişken bölgeler farklı bakterileri tanımladığı için, 16S rRNA geninin neredeyse tamamının sekanslanması gerekebilir. 16S rRNA genini kullanmanın diğer bir dezavantajı ise, bakteri genleri ile gen kopyalarının birlikte bulunması ve bu kopya sayısının taksonlar arasında eşit olmamasıdır. Bu durum, bir topluluk içindeki belirli bakteri türlerinin göreceli yoğunluğunu tahmin etmede hataya yol açabilmektedir. Yukarıda belirtilen sınırlamalar, cpn60 ve rpoB genleri gibi 16S rRNA genine alternatif hedeflerin geliştirilmesine yol açmıştır. Bu alternatif gen hedeflerinin analiz için kullanılmasındaki ana sınırlama, şu anda tür veri tabanlarının kapsamlarının nispeten sınırlı olmasıdır (237).

16S rRNA ve cpn60 genlerinin korunmuş bölgelerini içeren çok sayıda primer düzenlenmiştir ve bu primerlere genel olarak 'evrensel primer' denilmektedir. Türlerle bağlı olarak değişmekle birlikte yaklaşık 1500 bp uzunluğunda tüm 16S rRNA genini veya V2-V3 bölgesi, V4-V5 bölgesi, V6-V8 bölgesi gibi gen içindeki spesifik değişken bölgeleri hedefleyen bir dizi primer seti geliştirilmiştir.

2.2.5.3.1. Sekans temelli olmayan moleküler yöntemler

Bu başlık altındaki tekniklerde öncelikle bakteri nükleik asidi numuneden ekstrakte edilir. Daha sonra 16S rRNA geninin tümü veya bu genin bir veya daha fazla seçilmiş hiper değişken bölge içeren segmentinin amplifikasyonu yapılır. Tüm 16S rRNA genini veya seçilen hiper değişken bölgeleri çevreleyen bakteriyel genomdaki korunmuş bölgelere karşılık gelen evrensel primerlerle PZR uygulanır. Ardından bu karışım, parça uzunluğuna dayanan elektroforez esaslı ayırma (örn; denatüre edici gradyan jel elektroforezi veya sıcaklık gradyanlı jel elektroforezi) veya spesifik nükleotit sekansların varlığına dayanan (örn; in-situ Hibridizasyon akım sitometrisi veya bakteriyel DNA mikrodizileri) tetkik yöntemleri ile ölçülür (235).

Bu yöntemlerin temel dezavantajı, birbiri ile yakın ilişkide olan bakteri gruplarındaki 16S rRNA genindeki farkın küçük olmasından dolayı bakteri gruplarının ayırımındaki sınırlılıktır. Aynı zamanda miktar olarak az bulunan bakteri gruplarını da kaçırmaktadır. Bu nedenle, bu yöntemlerin yerini zaman içinde yeni nesil sekanslama teknikleri almıştır (235).

Floresan in-situ hibridizasyon akım sitometrisi

Akım sitometrisi, süspansiyon hücrelerin akış kanalı boyunca geçerken tek tek ayrışması ve tespit edilmesi üzerine geliştirilmiş bir cihazdır. Mikrobiyolojide akım sitometrisi, mikroorganizmaların canlılığını, sayısını, tanımlanmasını, patogenezini, antibiyotiklerin duyarlılıklarını saptama

amacıyla kullanılmaktadır. Araştırmacıların mikroorganizmaların bir populasyon içindeki dağılım özelliklerini ölçebilmesini sağlamak için, her mikroorganizma için veri toplaması en önemli özelliğidir. Akım sitometrisi içindeki bakteri oranı düşük olsa bile örnekteki canlı ve cansız bakterileri ayırarak, üremesi zor ve zaman alıcı bakteriler dahil olmak üzere kantitatif olarak daha doğru ve hızlı sonuç verir. Bu yöntem ile mikrobiyota bileşeni niceliksel olarak tanımlanabilmektedir (249). İn situ hibridizasyon yöntemiyle ise, RNA veya DNA dizilerinin saptanmasında klonlanmış genomik problr veya oligonükleotid problr kullanılmaktadır. Hedef 16S rRNA dizisine karşıt floresan ile işaretlenmiş oligonükleotid probların kullanıldığı yöntem direkt olarak klinik örneğe muamele edildiğinde düşük çıktılı iken bu yöntemi akım sitometrisi gibi sistemler ile birlikte kullanıldığında yüksek çıktılı bir tanı metodu olarak kullanılmaktadır (250). Bu yöntem hızlı ve yarı kantitatifdir. Bu yöntemin en büyük dezavantajı, spesifik bölge hedef alınarak dizayn edilmiş problr kullanıldığı için hiç bilinmeyen türlerin tanımlanmasındaki zorluktur (251).

Pulsed field jel elektroforezi

Jel elektroforezi, 100-200 baz çifti (bç) ile 50 kilobaz çifti (kbç) arasındaki DNA fragmentlerinin ayrılmasına, boyutlarının bilinmesinde ve görüntülenmesinde en sık kullanılan bir tekniktir. 50 kbç'nin üzerindeki moleküller, büyüklükleri nedeniyle jel üzerinde ayrışamazlar. Pulsed field jel elektroforezi, iki değişken alternatif elektrik alanının 110° ila 180° arasındaki bir açıyla uygulanması ile moleküllerin ayrıştığı bir sistemdir. Bu sistem ile parazit ve mantar gibi büyük kromozoma sahip canlılar dahil olmak üzere birçok türün kromozomal DNA'sının ayrıştırması yapılabilmektedir (252). Düşük erime ısıları agaroz jel içinde bulunan, yapısal bütünlüğü değişmemiş olan genomik DNA'nın, uygun restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesilmesi ile oluşan profillerin tespiti ve yorumlanmasını esas alan bir yöntemdir. Büyük moleküllerin yönünü değiştirmek için küçük olanlardan daha fazla zaman gereklidir (253).

PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

PZR, ortaya çıktığı 1980'li yıllardan günümüze amplifikasyona dayanan DNA bazlı analizlerin mikrobiyolojik etkenlerin tanımlanmasında kullanıldığı önemli bir yöntem haline gelmiştir. Bu yöntemle in vivo DNA replikasyonunun adımları taklit edilerek, istenen bir DNA bölgesinin seçici in vitro amplifikasyonu sağlanır. Böylece bir saatten daha kısa bir sürede tek bir hedef nükleik asit bölgesinden milyonlarca kopya elde edilebilmektedir (254). PZR yönteminde, tanımlanmış bir hedef DNA bölgesine spesifik amplifikasyon, üç aşamalı ardışık döngülerle elde edilir: i) Tek iplikli hedefler elde etmek için DNA'nın denatürasyonu, ii) kısa ve spesifik primerlerin hedef DNA'ya bağlanması ve iii) primerlerden başlayarak bir termostabil DNA polimeraz kullanılarak DNA'nın polimerizasyonu. Her döngüde ampikon sayısı iki katına çıkar ve şablon olarak orijinal hedef DNA ile üretilen parçalar dışında, ardışık tüm ürünler, iki primer arasındaki mesafeye karşılık gelen sabit bir boyuta sahip olur. Pozitif reaksiyonun tespiti agaroz jel elektroforezi ile doğru DNA fragmanının gösterilmesi ile sağlanır (255). PZR ile ilgili temel sorunlar; mikrobiyota gibi saf olmayan örneklerden mikrobiyal tanımlama yapılacaksa amplifikasyon aşamasında, numunenin içerebileceği PZR inhibitörlerinin varlığı; RNA ile çalışılacaksa numunedeki RNAaz varlığı, PZR artefakt ve spesifik olmayan PZR ürünlerinin oluşması, seçilecek primerin etkinlik ve özgüllüğü gibi bir dizi sınırlamalardır (256).

Mikrobiyota araştırılmasında kullanılan popüler yöntemlerden bir diğeri de bir numunedeki DNA parçalarının karşılaştırılmasını sağlayan moleküler parmak izi yöntemleridir. Bunlar arasında Denatüre edici gradiyent jel elektroforezi (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis/DGGE), Sıcaklık gradiyent jel elektroforezi (Temperature Gradient Gel Electrophoresis/TGGE) ve Terminal Restriksiyon parçacık uzunluk Polimorfizmi (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism/T-RFLP) gibi yöntemler bulunmaktadır.

Denatüre edici gradiyent jel elektroforezi (DGGE) ve Sıcaklık gradiyent jel elektroforezi (TGGE)

DGGE ve TGGE, bir akrilamid jel boyunca hareket eden numuneleri ayırmak için kimyasal bir gradyan veya sıcaklık gradyanı kullanan, jel elektroforez formlarıdır. DGGE, 1993 yılında Muyzer ve ark. tarafından mikrobiyal ekolojiyi tanımlamada ilk kez kullanılmıştır. Daha sonra kısa bir süre içinde karmaşık mikrobiyal çeşitliliğin bulunduğu örneklerde kullanılmaya devam edilmiştir. Her iki elektroforez türünde de (DGGE ve TGGE), aynı uzunlukta ancak farklı dizilere sahip DNA parçalarının ayrılması mümkündür. DNA parçalarının ayırımı kısmen eritilmiş çift zincirli bir DNA molekülünün poliakrilamid jel içindeki düşük elektroforetik hareketliliğine dayanılarak yapılır. DGGE, doğrusal bir DNA denatüre edici gradyan (formamid ve üre karışımı); TGGE, doğrusal sıcaklık gradyanı içeren poliakrilamid jel de yapılır. Erime bölgeleri (aynı erime sıcaklıklarına (T_m) sahip baz çiftlerinin uzantıları), farklı alanlardaki DNA fragmanlarının erimesine yol açar. En düşük T_m ' ye sahip bir alan, denatüre veya sıcaklık gradyan jelinde belirli bir pozisyonda T_m ' sine ulaştığında ve çift sarmal DNA tek sarmal haline geldiğinde, DNA molekülünün göçü neredeyse durma noktasına gelir. Bu erime bölgeleri içindeki dizilerdeki varyasyonlar, erime sıcaklıklarının değişmesine neden olur. Farklı sekanslara sahip moleküllerin göçü, denatüre veya sıcaklık gradyan jelinde farklı pozisyonlarda durdurulur ve böylece ayrılma başlar. DGGE ve TGGE'de, DNA bantları etidyum bromür, SYBR Green I veya gümüş boyası kullanılarak görsel hale getirilebilir. Görüntülenen bantlardan daha sonra sekans veya prob hibridizasyonu yapılabilir. Her bandın, farklı bir mikrobiyal ürünü temsil ettiği düşünülerek, oluşan DNA paternlerinin, topluluğun çeşitliliğini yansıttığı kabul edilir. Bu tekniklerin sınırlılıkları; PZR temelli sorunlar ile filogenetik bir tanımlama için dizileme veya prob analizi gerektirmesinden kaynaklanır (255, 257).

Terminal restriksiyon parçacık uzunluk polimorfizmi (T-RFLP)

Restriksiyon endonükleaz enzimiyle kesilen 16S rRNA gen amplikonlarının oluşturduğu parçacıkların analizi bu yöntemin prensibidir. Her bakteri taksonu için belli bir moleküler ağırlığa sahip bir terminal restriksiyon fragmanı oluşur ve boyutu farklı olan bir dizi DNA fragmanı PZR sırasında floresan ile işaretlenmesiyle analiz edilir. T-RFLP, temel olarak mikrobiyal topluluk çeşitliliğini değerlendirmek, karşılaştırmak ve ayrıca bağırsak mikrobiyotasındaki değişkenliği değerlendirmek için kullanılır. Bu teknik yarı nicel, hızlı ve ucuzdur. T-RFLP'nin kullanım sınırlılığı, filogenetik tanımlamaya izin vermemesidir. Bu sorun, 16S rRNA klon kütüphanesi analizi ile T-RFLP birleştirilerek çözümlenebilmektedir (239).

Tek zincir konformasyon polimorfizmi yöntemi (Single Strand Conformation Polymorphism/SSCP)

Mikrobiyal çeşitliliği incelemek için kullanılan ve elektroforetik ayırmaya dayanan diğer bir parmak izi analitik tekniğidir. Çok sayıda örnekte ve çok çeşitli organizmalarda, farklı genomik değişkenlerin tanımlanmasına izin veren, yaygın olarak kullanılan bir tarama yöntemidir. Mutasyon tespiti ve genotipleme için basit ve hassas bir tekniktir. SSCP analiz prensibi, tek zincirli DNA'nın tanımlanmış bir uygunluğa sahip olduğu gerçeğine dayanmaktadır. Sekanstaki tek bir baz değişikliği ile ilişkili olan değiştirilmiş konformasyon, tek iplikli DNA'nın denatüre edici olmayan elektroforez koşulları altında farklı şekilde göç etmesine neden olabilir. Daha önce bahsedilmiş olan DGGE'de, boyut farkı olmayan fakat değişken G + C içeriğine sahip DNA PZR ürünlerinin ayrılmasında kullanılır ve bu nedenle test DNA örneğinin çift sarmallı konformasyonuna (dsDNA) dayanır. SSCP'de ise, tek sarmallı DNA (ssDNA) ürünlerinde çalışır. Bu teknik daha önceleri, insan genlerindeki genomik polimorfizmleri saptamak için kullanılmıştır. Ancak, günümüzde çevresel DNA örneklerinde bulunan mikrobiyal toplulukları incelemek ve karakterize etmek için de birçok kişi tarafından kullanılmaktadır.

SSCP analizi aşağıdaki dört adımı içerir: 1) ilgilenilen DNA dizisinin PZR ile amplifikasyonu; 2) ift sarmallı PZR rnlerinin denatürasyonu; 3) denatüre DNA (tek iplikli)'nin soğutulması; (4) tek iplikli DNA'ların denatüre edici olmayan koşullar altında elektroforez ile hareketlilik farkının saptanması. SSCP'deki hareketlilik kaymalarını görselleştirmek için çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Bunlar; radyoizotop etiketleme, gümüş boyama, fluoresan boya ile isaretli PZR primerleri ve daha yakın zamanlarda da kapiler bazlı elektroforez yöntemlerini içermektedir. Gümüş boyama, basit, hızlı ve uygun maliyetlidir ve klinik laboratuvarlarda rutin olarak yapılabilir. Denatrasyondan sonra, tek iplikli DNA, katlanarak üç boyutlu ve sekansa bağlı benzersiz bir konformasyonel durum alır. Farklı dizilere sahip, tek sarmallı iki DNA zinciri arasındaki Şekil farkı, nükleotitlerin sayısının aynı olmasına ve bir SSCP uygulaması yapılmış olmasına karşın, elektroforez jeli üzerinde farklı Şekilde g etmelerine neden olabilir. Bu nedenle, bu yöntem mikrobiyal bir topluluktaki genetik çeşitliliği tahmin etmek için iyi bir seçimdir. Yöntemin sınırlılıkları, SSCP ve DGGE'de, olduğu gibi aynı DNA dizisinin jel üzerinde çoklu bantlar üretebilme olasılığıdır. Bununla birlikte, gradyan jel gerektirmemektedir ve çeşitlilik çalışmaları için kullanılmaktadır (258, 259).

DNA mikroarray

Bu teknoloji, Southern blotting gibi konvansiyonel DNA-DNA veya DNA-RNA hibridizasyon teknikleri ile geliştirilmiştir. Mikroarray, prob olarak adlandırılan ve cam, silikon, cipler ve mikroskobik boncuklar gibi katı bir destek yüzeyine kovalent olarak bağlanmış, bir dizi tanımlanmış oligonkleotitlerden oluşur. Bu bilinen prob koleksiyonları, genellikle floresansla saptanan prob-hedef hibridizasyonunun yakalanması ile otomatik olarak skorlanabilir. Hedef genellikle bakteriyel kromozom veya plazmidin spesifik bir gen bölgesidir. Bu hibridizasyonlar, prob-hedef bağlı moleküllerin sayısı tarafından üretilen floresans miktarına bağlı olarak izlenebilir ve ölçülebilir. Mikroarray teknolojisi ile bir kerede bir prob ile çalışan geleneksel DNA hibridizasyonundan farklı olarak, aynı prob içerisine binlerce prob

yerleştirilebilir (255). Bu nedenle mikrobiyal toplulukların profillerinin çıkarılması ile ilgili çalışmalarda dizileme yöntemlerine alternatif olarak kullanılmaya başlanmıştır. Bağırsak mikrobiyotasını hedef alan mikroarray çipleri geliştirilmiştir ve bazıları ticarileştirilmiştir. Hızlı ve yarı kantitatif olduklarından, DNA mikroarrayleri temel olarak, farklı popülasyonlar arasındaki mikrobiyota ve insandaki bağırsak mikrobiyomundaki değişimleri belirli hastalıklarla karşılaştırmak için çalışmalarda kullanılır. Ancak, çapraz hibridizasyon olasılığı ve bir referans dizisi mevcut olsa bile bağırsak mikrobiyotasında düşük seviyede bulunan türlerin tespitindeki zorluklar nedeni ile bağırsak mikrobiyota analizlerinde tercih edilmemektedir (260).

2.2.5.3.2. Sekans temelli moleküler yöntemler

Sekanslama temelli moleküler yöntemlerdeki gelişmeler, maliyet etkin ve ulaşılabilir olmaları mikrobiyota çalışmalarında kültür temelli yöntemlerin yerine tercih edilmelerini olmuştur. Sekans temelli olmayan yöntemler, mikrobiyota topluluk yapısını ortaya koymakta sınırlı kalmakta iken, sekans temelli yöntemler topluluk yapısı ile birlikte filogenetik analiz imkanı sunmaktadır. Bakteriyel türlerin tanımlanmaları hem fenotipik hem de moleküler özelliklere göre yapılmaktadır. Ancak türlerin moleküler verilere dayanılarak tanımlanmalarında sorunlar yaşanmaktadır. Bu nedenle, moleküler özelliklerin tanımlandığı çalışmalarda, taksonomik birimler, türlerden ziyade, “filotipler” veya “operasyonel taksonomik üniteler (OTU)” olarak adlandırılmaktadır. Bazı araştırmacılar filotipleri tanımlarken %97 oranındaki benzerliği temel alırken; bazıları %98 veya %99 oranındaki benzerliğin temel alınmasını savunmaktadırlar. “Tür zenginliği”, bir topluluktaki türlerin sayısını ifade eden göreceli bir terimdir; oysa “tür çeşitliliği”, hem tür zenginliğini hem de göreceli bolluklarını veya eşitliklerini içeren bir terimdir. Ekolojik bir topluluk içindeki çeşitliliğin bir ölçüsüdür. “Topluluk bileşimi”, tür zenginliğini ve çeşitliliğini toplu olarak ifade eder. “Topluluk yapısı”, belirli bir ortamdaki bileşenlerin birbirleriyle veya kümelenmeleriyle nasıl ilişkili olduklarını gösterir. Filogenetik yapı, 16S rDNA

dizileri ile bu diziler arasındaki evrimsel ilişkileri tahmini olarak yansıtmaktadır. 16S rDNA dizileme yöntemi ile filogenetik yapının belirlenmesi ile diziler arasındaki evrimsel ilişkilerin yansıtılabilir. Filogenetik, çeşitli organizma grupları arasındaki evrimsel ilişkilerin incelenmesidir. Evrensel genlerin korunmuş ve değişken bölgelere sahip olmaları, araştırmacıların hem filogenetik hem de topluluk yapısı analizlerini aynı anda yapmalarına neden olmaktadır (237).

Klonlama

Sekansa dayalı yöntemlerin ilk olarak kullanıldıkları dönemlerde, bakteriyel bir topluluktan izole edilen DNA fragmanları, klonlama vektörlerine (örneğin, genetik olarak işlenmiş plazmid); bu vektörler de hızla büyüyen bakterilere (genellikle E. coli) transformasyon yoluyla aktarılmıştır. Bu bakterilerin çoğalması ile "klonlanmış" DNA fragmanları da çoğaltılmış olmaktadır. Daha sonra, "Klonlanmış" DNA fragmanlarının, Sanger sekans yöntemi (dideoksinükleotid ile zincir sonlandırma metodu) kullanılarak dizilemeleri yapılmıştır.

Klonlama yöntemi ile karışık bir örnekteki bakterilerin, tek tek dizi analizlerinin gerçekleştirilmesi mümkün hale gelmektedir. Bu yöntem yüksek maliyet ve emek gerektirdiğinden kullanımı sınırlıdır. Son zamanlarda DNA dizileme zamanını ve maliyetini azaltan yeni nesil dizileme metodu geliştirilmiştir. Geliştirilen bu yöntemle bakteri içine klonlama ve sonrasında bu bakterileri sıralama gereksinimi ortadan kalkmış ve daha düşük bir maliyet ve emekle sekanslama işleminin yapılabilmesi mümkün olmuştur. Yeni nesil dizileme, tüm genom, metagenom ve amplikon dizilimi için kullanılabilir (261).

Yeni nesil sekanslama

Bu yöntemle hızlı bir şekilde, çok fazla maliyet gerektirmeden dizileme yapılabilmektedir. Klonlanmış amplikonlar yerine, direkt olarak DNA

amplikonu veya topluluk DNA'sı kullanılmaktadır. Dizi analizleri daha önce uzun genomların dizilenmesi için fragmentlere ayrılan kısa DNA dizilerinin bir genom kütüphanesi oluşturmak amacıyla bir vektöre klonlanmasını gerektirmekte idi. Ancak yeni nesil cihazlarda bu gereklilik ortadan kalkmıştır. Ticari olarak geliştirilmiş çeşitleri vardır. Yeni nesil dizileme cihazlarından en yaygın olanları, "Pyrosequencing 454" ve "Illumina" cihazlarıdır. Pirosekanslamada üzerinde oligonükleotid diziler bulunan boncuklar bulunmaktadır. Önceden fragmanlara ayrılmış ve amplifikasyonları yapılmış (DNA kütüphanesi oluşturulması) örnekler bu boncukların üzerindeki kendilerine özgül oligonükleotid dizilerine bağlanmaktadır. Kütüphanedeki her bir DNA fragmanı boncukların üzerinde kendine özgül adaptöre bağlanır. Emülsiyon PZR ile boncukların üzerinde bulunan özgül diziler amplifikasyona tabi tutulur. Eklenen bazlar verdikleri ışımaya göre saptanır. Illumina teknolojisi benzer şekilde dizileme yapar. Farklı olarak, adaptör oligonükleotid diziler boncuklara değil bir slayt üzerine (flow cell) bağlıdır. Bu teknik emülsiyon PZR yerine "köprü amplifikasyonuna" dayanır. Dizileme, önceki yöntemdeki gibi eklenen bazların farklı renklerde verdikleri ışımalara dayanılarak yapılmaktadır (239).

Metagenomik sekanslama

"Shotgun sekanslama" olarak da adlandırılan metagenomik analiz, bir ortamda (örn; dışkılar) bulunan DNA parçalarını rastgele dizmek için kullanılır. Bu yaklaşımlarda, bir PZR amplifikasyon aşaması atlanarak DNA doğrudan bir numunedan dizilenir. Bu, PZR yanlılığının potansiyel etkilerini azaltır, ancak pahalı ve daha fazla biyoinformatik zorlukları içerir. Bu veriler, genlerin metabolik tanımlarına göre (örn; hücre duvarı yapımı, antibiyotik direnci, karbonhidrat metabolizması) geniş gruplara ayrıldığı fonksiyonel analizler için kullanılabilir. Bu metabolik profil daha sonra iki veya daha fazla topluluk arasında karşılaştırılabilir. Metagenomik çalışmalar, bazı taksonomik bilgileri sağlamak için belirli genlerin (örn; 16S rRNA geni, cpm60 geni, vb.) sıralanması ile oluşur (262).

Metatranskriptomik

Bir ortamda tüm mikropların RNA'sının incelenmesidir. Genellikle cDNA mikrodizileri, gen ekspresyonu çalışmalarında kullanılmıştır. Yeni nesil sekanslamanın ortaya çıkışı, RNA-seq'in eklenmesi ile transkriptomik alanında devrim yaratmıştır (263). Tüm genomu kapsamının yanı sıra, yeni transkriptleri tanımlama ve hem konakçı hem de mikrobiyal sakinlerinin transkriptomlarını analiz etme potansiyeline sahip olması nedeniyle, daha yüksek bir dinamiğe sahiptir (264). RNA sekansındaki teknolojik gelişmeler, transkripsiyonel olarak aktif olan popülasyonlar hakkındaki detayları ortaya çıkarmayı mümkün kılmıştır ve metagenomiklerde gösterildiği gibi sadece bakteriyel popülasyonların genetik içeriğini tanımlamamaktadır (265, 266). Yöntem, bağırsak mikroplarının, prokaryotik fizyoloji ve patojenitede karbonhidrat metabolizmasını, enerji üretimini ve hücrel bileşenlerin sentezini nasıl düzenlediklerini ortaya koymak için kullanılmıştır (267). Bu yöntemde bazı sınırlılıkları vardır. Prokaryotik mRNA, toplam RNA türlerinin sadece %1-5'ini oluşturur, çoğunluğu rRNA ve tRNA'dır; bu, transkriptominin ana konusu olan mRNA'nın kapsamını önemli ölçüde azaltabilir. Ayrıca, mRNA'nın toplanmasında ve mikrobiyal RNA'yı konakçıya ait RNA karışımından ayırmadaki teknik zorluklar yaşanabilmektedir (268, 269).

2.2.5.4. Metabolitlerin saptanmasına dayalı yöntemler

2.2.5.4.1. Metaproteomik

Metaproteomik çalışmalarda amaç, tüm gen translasyon ürün gruplarını tanımlamak, post-transisyonel modifikasyon ürünleri hakkında ek bilgi sağlamak ve transkriptom ölçümleri ile ilgi yer bilgileri sağlamaktır. Shotgun metaproteomiği, kütle spektrometrisi ile birleştirilmiş yüksek performanslı bir sıvı kromatografisi kombinasyonu ile kompleks karışımlarda proteinlerin tanımlanmasında proteomik tekniklerinin kullanılması anlamına gelir. Shotgun metaproteomiklerinin en yaygın yöntemi, karışımdaki proteinlerin

çıkarılması ve sindirilmesi ile başlar, daha sonra elde edilen peptitler, sıvı kromatografi veya poliakrilamid jel elektroforezi ile ayrılır, son olarak, peptit kütleleri ve spektrumları ölçülür ve referans protein veri tabanlarından genomik sekans bilgisi tahmin edilenler ile karşılaştırılır. Bu yöntemle yapılmış çalışma sayısı çok azdır. Bunun nedeni bakteriyel türlerin kompozisyonunun farklı bireyler arasında heterojenlik göstermesidir. Proteinlerin, yakından ilişkili türlerden farklılaştırılması, nicelleştirilmesi ve çeşitli transkripsiyon sonrası post modifikasyon olaylarının karakterizasyonu gibi bilişimsel engeller metaproteomik için hala büyük zorluklardır (270).

2.2.5.4.2. Metabolomik

Metabolomik, bir biyolojik hücre, doku, organ veya organizma içindeki tüm metabolitlerin toplanmasını temsil eden metabolom çalışmasıdır (271). Kütle spektrometresi (MS) ve nükleer manyetik rezonans (NMR) gibi tespit yöntemlerinin bir kombinasyonu kullanılarak metabolitlerin tanımlanması ve nicelendirilmesi gerçekleştirilir (272). Bağırsak mikrobiyotası çalışmalarında metabolitlerin kullanıldığı metabolomik yöntemler daha sık kullanılmaya başlanmıştır. Bu da kişiye özel tedavi ve beslenme şeklinin geliştirilmesi gibi çalışmalarda yeni biyobelirteçlerin üretilmesinin gerekliliğini doğurmaktadır. (273). Metabolik profilleme, hücrenin fizyolojisinin anlık bir görüntüsünü verebilir ve metabolitleri hücresel süreçlerle ilişkilendirmek için güçlü bir yol sunar (274). Metabolik çalışmadaki zorluk, bir metabolitin konakçı tarafından mı, yoksa mikrobiyom tarafından mı üretildiğini belirlemedeki güçlülüdür. Hücresel biyolojinin daha iyi anlaşılmasını sağlamak için metaproteomik, metatranskriptomik ve metabolomik bilgilerin entegre edilmesi gereklidir.

2.2.5.5. Kantitatif gerçek zamanlı PZR (qPZR)

Gerçek zamanlı PZR, araştırmacıların hedef DNA veya RNA'yı tespit etmelerine ek olarak, aynı zamanda hedef miktarlarını belirler ve kantitatif sonuç verir. Standart klasik PZR yöntemine teknik olarak benzemekle

beraber farklı olarak; qPZR yönteminde karışıma çift zincirli DNA'ya (yeni oluşan ürünlere) bağlanan floresan boya veya floresan boya işaretli proplar eklenmektedir. Bu süreç gerçek zamanlı olarak bilgisayar ortamında izlenebilmektedir. Floresan okuma ve sıcaklık döngüleri aynı tüp ve cihaz içinde gerçekleştiğinden hem testin süresi kısalmakta hem de kontaminasyon riski en aza indirilmektedir. Floresan oluşumu mevcut DNA miktarı ile doğru orantılı olarak artmaktadır. Mikrobiyota çalışmalarında çok sayıda bağırsak numunesinde bir hedefi hızlıca ölçebilmeyi sağlayan, yüksek verimli bir yöntem olarak tercih edilebilmektedir. Hedef takson veya gruba özgü kantitatif primerlerin geliştirilmesi ve kullanılması açısından FISH ile benzerlik gösterir. Gerçek zamanlı PZR isimlendirilmesi dışında, kantitatif real time PZR, kinetik PZR, homojen PZR gibi isimler de kullanılmaktadır (275).

Patojen belirlenmesi, tek nokta mutasyonlarının belirlenmesi, metilasyon tespiti, DNA hasarının belirlenmesi, kromozom bozukluklarının tespiti gibi çalışmalarda kullanımı olsa da, DNA'nın kopya sayısını sayısal değerlere dönüştürme en çok kullanıldığı alanlardır (276).

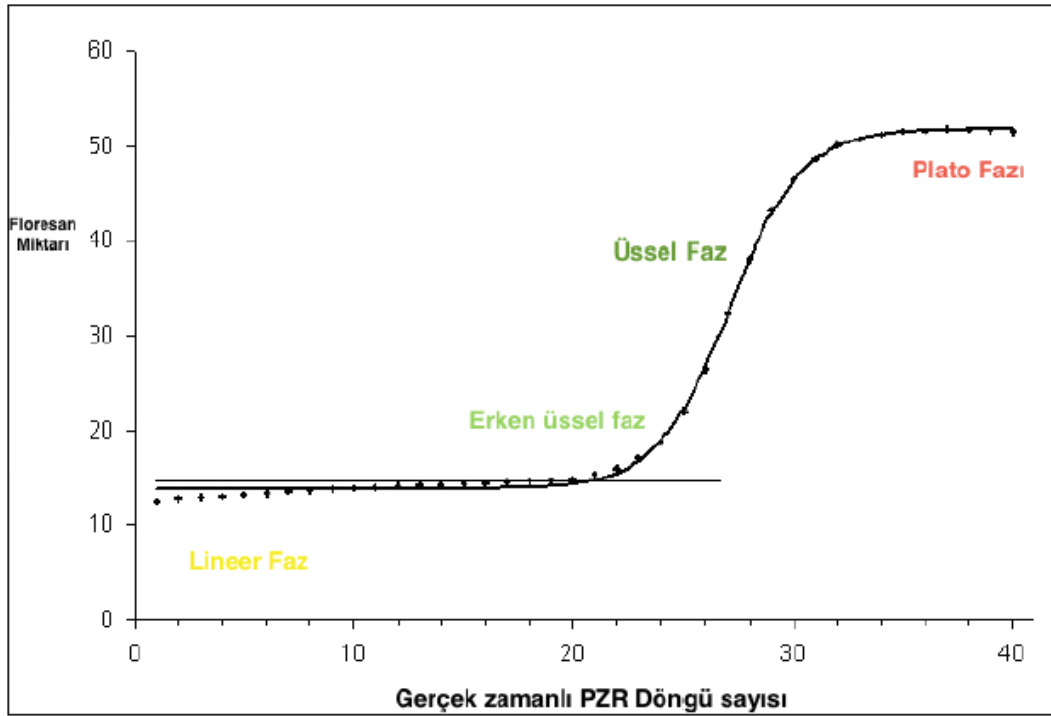
Yöntemin çalışma prensibinde öncelikle miktarı bilinen hedefe sahip örneğin belli bir eşik değerinde floresan verdiği PZR siklusu tespit edilir. CT (cycle threshold, eşik döngü) referans değeri belirlenir. Buna uygun standart eğri oluşturulur. CT, üründeki ilk anlamlı artış olduğu noktayı göstermektedir. CT, ürün çoğaltımının doğruluğunu görmede önemli olduğu için qPZR'ın ana prensibidir. Örneğin nükleik asit miktarı, standart eğri ile klinik örneğin CT değeri karşılaştırılarak hesaplanmaktadır. PZR siklus sayısı ile floresan miktarı logaritmik olarak hesaplanır (277). Gerçek zamanlı PZR'da 4 ana faz bulunmaktadır (Şekil 7):

1) Lineer faz: Yaklaşık 10-15 döngüden oluşan başlangıç aşamasıdır. Bu fazda reaksiyon çok hızlı ilerler ve çoğalma miktarı tespit sınırlarının altında olup hesaplama yapılamaz.

2) Erken üssel faz: Artış miktarı belirli bir eşik seviyeye ulaşır ve tespit edilir. Bu seviyeye CT ya da CP (Crossing Point, Kesişme noktası) adı verilmektedir. Bu değer kalıp kopya sayısının hesaplanmasında kullanılmaktadır.

3) Üssel Faz: DNA miktarının hızla arttığı dönemdir.

4) Plato Fazı: Artış miktarı, reaktiflerin azalması, ürün miktarının artması ve primer-kalıp yerine kalıp-kalıp bağlanmalarının başlamasından dolayı, azalır (278).



Şekil 7. Gerçek zamanlı PZR fazları

SYBR Green boyaları ve TaqMan problemleri en çok kullanılan kimyasallardır. SYBR Green I, spesifik olmadan herhangi bir çift sarmallı nükleik aside bağlanan ve en fazla kullanılan birleştirici boyadır. Çoğalan DNA miktarındaki artışla birlikte qPCR cihazında okunan floresanın miktarı da eş zamanlı olarak artmaktadır. SYBR Green I, 497 nm dalga boyunda

yükseltgenir ve 520 nm dalga boyunda indirgenir. Boya 30 amplifikasyon döngüsü sonrası yalnızca aktivitesinin %6'sını kaybeder ve çift sarmallı DNA'nın küçük oluşuna bağlanır. İşlem öncesi reaksiyon karışımında çift zincirli DNA molekülü, primerler ve "SYBR Green I" boyası bulunmakta ve bağlı olmayan serbest DNA molekülü çok az bir floresan ışıma yapabilmektedir. İlk döngülerde sinyal zayıftır ancak ürün miktarı arttıkça floresan miktarı hızla artar. Bu artış qPZR cihazının monitöründen izlenebilir (276).

Yöntemin kolay ve ucuz olması yanı sıra bir takım sorunları da bulunmaktadır. İstenmeyen PZR ürünlerin çoğalması ile yine floresan açığa çıkacağı için her zaman istediğimiz DNA'nın çoğaldığını işaret etmez yanlış pozitiflikler mümkündür. Ortamda hedef DNA dizisi olmadığında, primerlerin birbiri ile bağlanmaları sonucunda "primer dimer"leri olarak adlandırılan ve çift zincirli DNA bölgelerinin oluşumu ile karakterize floresan ışımaya gözlenebilir (279).

Çoğaltılan DNA'nın istenilen hedef bölge olup olmadığını anlayabilmek için DNA'ların erime eğrisi analizlerinin ("melting curve", "dissociation") yapılması gerekmektedir. Erime eğrisi analizi yapılmak istendiğinde cihaz PZR tüplerini yavaşça ısıtmaya başlar. Çift sarmal DNA'nın %50'sinin tek sarmal hale geçmesi için gereken sıcaklık erime sıcaklığı (melting temperature= T_m) olarak adlandırılır. Çift zincirli DNA birbirinden ayrılmaya başladığında floresan boya serbest kalır ve okunan floresan miktarı da düşer. Her bir DNA'nın belirli bir T_m derecesi vardır. Bu erime sıcaklığı çoğalan DNA parçalarının uzunluğuna ve içerdiği GC/AT oranına bağlıdır. T_m derecesinin farklı olması her ürünün kendine özgü uzunluğu ve gen dizisi içermesindedir. Bu yüzden T_m sıcaklığı her ürün için özeldir. Çoğunlukla bu yöntemle bilinmeyen iki DNA dizisi karşılaştırılmak istendiğinde yöntem güvenilir bir şekilde kullanılabilir. Erime eğrisinden yararlanılarak aplikonun T_m değeri saptanabilmektedir. Örneklerin miktar tayinini yapabilmek için bir standart eğrinin çizilmesi gerekmektedir. Konsantrasyonu bilinen

standartların başlangıçtaki kopya sayılarının logaritmasına karşı Ct değerlerinin çizilmesiyle standart eğriler oluşur. Gerçek zamanlı PZR işleminin verimliliği, standart eğri ile hesaplanmaktadır. (280).

DNA parçasının çoğaltılmak istenilen bölgesi özel bir bölge ise, bu bölgenin saptanmasında floresan bir boya ile işaretli problar kullanılır. Bu teknikler "TaqMan" prob, "Molecular beacon", "Light-up" prob, hibridizasyon prob ve "Scorpion" primer gibi floresan işaretli problar kullanılarak yapılan yöntemlerdir. TagMan probe yöntemi çoğaltılmak istenilen DNA'ya komplementer olan ve floresan bir boya ile işaretlenmiş tek zincirli bir prob içerir. 3' uçtaki baskılayıcı boya (TAMRA) 5' uçtaki reporter (FAM) boyasının sinyal oluşturmasını engellemektedir. Çoğaltılma sırasında hedef nükleik asit dizisi üzerindeki primerlerin bağlanma bölgeleri arasına "Taq Man" problar bağlanırlar. Primerlerin bağlanmasının ardından yeni zincirler oluşmaya başlar. Probun bağlı olduğu bölgeye gelindiğinde Taq DNA polimeraz enzimi 5'→3 ekzonükleaz aktivitesi ile FAM'ı probdan ayırır. Serbest hale geçen FAM, sinyal oluşturur ve DNA zincir sentezi uzamaya devam eder. Her bir döngüde ürün çoğalımı arttıkça floresan da ona bağlı olarak artmaya devam eder (279). İdeal olarak, ampikonun boyutu, optimum PZR verimi için 50 ila 150 baz olmalı, primer erime sıcaklığı (Tm) 58-60° C arasında olmalı ve TaqMan probu Tm, primer Tm'den yaklaşık 10° C daha yüksek olmalıdır (237).

Moleküler Boncuk yöntemi, bir diğer qPZR çeşididir. Prensibi diğer iki yöntemden farklıdır. Saç tokası şeklindeki yapısının yuvarlak uç kısmı, çoğaltılacak DNA ile komplementer tek zincirli DNA dizisini içerir. Bu yapının düz olan uç kısımları 2 adet florokrom boya içermektedir. Bunlardan baskılayıcı florofor, diğer boyanın floresansını engeller. Çoğaltılmak istenilen DNA bölgesi PZR ile çoğalmaya başladığında prob hedef DNA dizisine göre dizayn edildiğinden birbirleri ile karşılaştıklarında konformasyonu değişir ve düz, çift zincirli hale geçer. Moleküler boncuk hedef nükleik asit dizisi ile hibridize olur olmaz boncuk molekülünün yapısı değişir. Boyalar da

birbirlerinden uzaklaştığından floresan miktarı artar. Tetkik, floresan ölçümü ile sonuçlanır (281).

Hibridizasyon Prob yöntemi, iki farklı prob dizayn edilerek oluşturulmuş bir diğer qPZR yöntemidir. 3' ucunda floresans isaretli boya (donor), 5' ucunda alıcı boya (acceptor) bulunmaktadır. PZR reaksiyonu sırasında bu iki prob hedef nükleik asit dizisine bağlanıp birbirine yaklaştığında bir enerji yayılımı olur. Enerji "donor" boyadan "acceptor" boyaya transfer olur. Bu enerji transferi sonucunda oluşan floresans miktarı PZR süresince oluşan ürün miktarı ile doğru olarak artar (282).

Kantitatif PZR, bağırsaktaki bakterileri ölçmek için son derece güçlü ve kullanışlı, yüksek verimli bir yöntem olduğunu kanıtlamıştır.

2.2.6. Bağırsak mikrobiyotası ve inflamatuvar bağırsak hastalığı ilişkisi

Distal ileum ve kolon yüksek konsantrasyonda mikroorganizma içeren bölgelerdir. Bu mikroorganizmaların daha önce de bahsedildiği gibi birçok önemli fonksiyonu vardır. Ancak genetik olarak yatkın kişilerde bazı mikroorganizmalar ve ürünleri İBH'ye neden olabilmektedir. Mikrobiyotadaki bu değişiklikler, çocuklarda hastalık tanısının ilk olarak konulduğu zamanlarda da saptanmıştır. Bu bulgu disbiyozun; klinik hastalıktan önce gelebileceğini, uzun süredir devam eden inflamasyon ve tıbbi tedaviden bağımsız olarak gelişebileceğini düşündürmektedir (283). Bu mikrobiyal değişikliklerin İBH'nin sebebi mi, yoksa İBH sonucu oluşmuş olan değişikliklerin bir sonucu mu olup olmadığı henüz açık değildir. İlginç olarak, ÜK hastalarından alınan mikrobiyota örnekleri farelere transfer edildiğinde, Th17 tepkilerinin indüklendiği görülmüştür. Bu durum, bu bakterilerin hastalarda gözlenen düzensiz T hücre tepkilerine katkıda bulunabileceğini göstermektedir. Bu güne kadar hiçbir tek ajanın İBH ile tutarlı bir ilişkisi tespit edilememiştir. Halen geçerli olan hipotez; bağırsak bakteri topluluklarındaki değişikliklerin İBH ile ilişkili iltihapların başlatılmasına ve/veya sürdürülmesine

katkıda bulunabileceğidir (284). Fekal mikrobiyota, uzun zamandır potansiyel bir risk faktörü, tedavi yanıtındaki heterojenliğin bir açıklaması veya terapötik müdahalenin yeni bir noktası (örneğin fekal transplantasyon) olarak İBH'de yer almaktadır. Yapılan çalışmalarda İBH, bağırsak mikrobiyotası ile ilişkilendirilmiştir. Birçok çalışmada İBH ile genel olarak bozulmuş bir bağırsak ekolojisi ve çeşitliliğinin azalması arasında bir ilişki bulunmuştur. Ancak, bağırsak bileşimlerindeki muazzam karmaşıklık ve bireyler arası yüksek değişkenlikler nedeniyle bu durumu açıklamak zor olmaktadır.

Tablo 2. İBH'de artan ve azalan bakteriler

	İBH'de Artan	İBH'de Azalan
Mikrobiyal Kompozisyon	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Proteobacteria</i> • <i>Escherichia coli</i> • <i>Fusobacterium spp.</i> • <i>Ruminococcus gnavusa</i> • <i>Pasteurellaceae</i> • <i>Veillonellaceae</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Bifidobacterium spp.</i> • <i>Groups IV and XIVA Clostridium</i> • <i>Faecalibacterium prausnitzii</i> • <i>Roseburia spp.</i> • <i>Suterella spp.</i> • <i>Bacteroides</i>
Mikrobiyal Fonksiyon	<ul style="list-style-type: none"> • Amino asit transportu • Sülfat transportu • Oksidatif stres • Tip 2 sekresyon sistemi 	<ul style="list-style-type: none"> • SCFAs • Bütirat • Amino asit biyosentezi

İnflamatuvar Bağırsak Hastalığı, Inflammatory Bowel Disease Multi'omics Data Base (IBDMDB) projesi, her biri insan mikrobiyom projesinin bir parçası olan beş klinik merkezden 132 kişiyi, bir yıl süre ile takip ederek oluşturulmuştur. Bu proje kapsamında, 1.785 dışkı örneği (her iki haftada bir), 651 bağırsak biyopsi örneği ve 529 kan örneği analiz edilmiştir. IBDMDB ile, mikrobiyomdaki çeşitli farklılıklar tanımlanmış ve hastalık sürecindeki immün tepkiler anlaşılmasına çalışmasıdır. Bu çalışmada, İBH hastalarında, hem aktif hem de remisyon dönemlerindeki mikrobiyal bileşimleri de tanımlanılmaya

çalışılmıştır. Hastalığın remisyon zamanlarında, kontrol grupların benzer ve 'baseline' olarak tanımlanan düzeyde olduğu gösterilmiştir. Çalışmada, spesifik hastalık durumuna bakılmaksızın, genel bir inflamatuvar yanıt için, ortak birçok özelliği paylaşan, yüksek oranda farklı mikrobiyal kompozisyonları olan disbiyoz skoru tanımlanmıştır. Disbiyoz, iltihaplanmayla birlikte, açilkarnitin havuzları ve safra asitlerinde büyük değişimler ve artan serum antikor seviyeleri gibi, sistemik düzensizliğe neden olan diğer konakçı ve biyokimyasal değişiklikler ile de ilişkilendirilmiştir. Çalışma ile konakçı-mikrobiyom etkileşimlerinin stabilitesi ve dinamikleri karakterize edilmiştir. Mikrobiyota ve bağışıklık tepkilerinin özellikle kontrol grubundaki sağlıklı bireyler ile kıyaslandığında İBH katılımcılarında belirgin olarak daha az kararlı olduğu vurgulanmıştır (285).

İBH'li olgularda sağlıklı bireylerle karşılaştırıldıklarında anti-inflamatuvar kapasiteye sahip bakterilerin sayılarında azalma, inflamatuvar kapasiteye sahip bakterilerin sayısında ise artış gözlenmektedir. Dikkati çeken en önemli değişiklikler; bağırsak mikrobiyotasındaki çeşitliliğin azalması yanı sıra, *Bacteroidetes* (*Alistipes*, *Barnesiella* vs.) ve *Firmicutes* (*Faecalibacterium*, *Oscillibacter*, *Agathobacter*, *Ruminococcus*, vs) türü bakterilerin yoğunluklarındaki düşüklüktür. *Bifidobacterium adolescentis* ve *Faecalibacterium prausnitzii* gibi anti-inflamatuvar kapasiteye sahip bakterilerin yoğunlukları azalmıştır. *F. prausnitzii*'nin anti-inflamatuvar etkisinin bütirat üretmesinden kaynaklandığı bilinmektedir. Sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında CH olan kişilerde, *F. prausnitzii*, *Blautia faecis*, *Roseburia inulinivorans*, *Ruminococcus torques* ve *Clostridium lavalense* bakterilerinin miktarlarının azaldığı gözlenmiştir. *F. prausnitzii* sayısındaki azalma, cerrahi sonrası ileal relapslar ile ilişkilendirilmiştir (286, 287). ÜK hastalarında ise, relaps sonrası *F. prausnitzii* popülasyonundaki düzelmeyi, klinik olarak remisyonun sürdürülmesi ile ilişkili olduğu sonucuna varılmıştır. Sokol ve ark., *F. prausnitzii* ile uyarılmış insan periferik kan mononükleer hücrelerinin IL-10 üretimini indüklediğini; IL-12 ve IFN-gama gibi inflamatuvar sitokinlerin üretimini inhibe ettiğini göstermişlerdir. Ayrıca, genetik olarak İBH riski

taşıyan sağlıklı bireylerin bağırsak mikrobiyotasında *Roseburia spp.* cinsinde önemli bir azalma olduğunu da göstermişlerdir (Tablo 2) (288, 289).

İBH hastalarında *Proteobacteria* grubunda ve çoğunlukla da *E. coli*' de göreceli bir artış söz konusudur. Özellikle yetişkin CH'de izole edilen *E.coli* grubu, proinflamatuvar özelliğe de sahip olan, entero invaziv *E. Coli* (EİEC) 'dir. Sağlıklı bireylerde EİEC kolonizasyonunun oranı %6 bulunurken, CH olan bireylerde bu oran %38 olarak bulunmuştur (289). Moustafa ve ark, sağlıklı kontrollere kıyasla, İBH hastalarında hem *E. coli* hem de *Clostridium perfringens*'in enterotoksin, hemoglobin proteaz, hemolizin A, hemolizin B, hemolizin C, hemolizin D, sitotoksik nekrotizan faktör 1 gibi virülans faktörlerinin prevalansının arttığını gözlemişlerdir. CH'de bu prevalansın ÜK hastalarına göre daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir (290). Bağırsak epiteline yapışma kabiliyetine sahip olan patojenik bakterilerin artışı, bağırsak geçirgenliğini etkiler, bağırsak mikrobiyotasının çeşitliliğini ve bileşimini değiştirir. Sonuç olarak bağırsak iltihabının indüklenmesine neden olan tepkiler ortaya çıkar. İBH hastalarında *Ruminococcus gnavas* ve *Ruminococcus torques* gibi mukolitik bakterilerin artması ile ilişkili olarak mukoza ile ilişkili bakterilerde artış bildirilmiştir (288).

Mycobacterium avium subsp para-tuberculosis (MAP), İBH etyopatogenezinde rol oynayan tetikleyici faktör olarak tartışılan aerobik patojenik bakteridir. MAP, insan dışında primatlar ve köpekler dahil olmak üzere, sığırlarda ve diğer türlerde kronik koliti uyarmaktadır. Sığırlarda MAP kaynaklı bağırsak iltihaplanması John hastalığı olarak adlandırılır ve insan CH ile klinik ve histolojik özellikleri aynıdır. MAP'ın bağırsak inflamasyonuna olan katkısı ile ilgili bilgiler, CH üzerine yapılmış birçok çalışmaya dayanmaktadır. NOD2 varyantına sahip olan CH hastalarında, MAP'ın hatalı olarak tanımlanması ve otofaji ile ilgili ATG16L1 geninde eksiklik olan farelerin makrofajlarında MAP kalıcılığının gösterilmesi, MAP'ın intestinal inflamasyondaki rolünün en önemli kanıtlarıdır. Tüm bunlar patojenik

bakterilerin, genetik açıdan duyarlı konakçılarda kronik bağırsak iltihabına neden olabileceğini göstermektedir (291).

İBH patogeneğinde bakterilerin yanı sıra, bu bakterilerin ürettiği metabolik ürünler de sorumlu tutulmaktadır. Örneğin, *Alistipes*, *F. prausnitzii* ve *Clostridium cluster IV*, *XIVa*, *XVIII* gibi bütirat üreten bakterilerin azalmasının bir sonucu olarak İBH hastalarında kısa zincirli yağ asitlerinin konsantrasyonunun azaldığı rapor edilmiştir (286, 287). Bu azalma, kısa zincirli yağ asitlerinin epitelyal hücre bütünlüğünün ve Treg hücrelerinin düzenlenmesi açısından gerekli olması nedeniyle önemlidir. Bağırsak epitel hücrelerine zarar veren ve mukozal iltihaplanmaya neden olan hidrojen sülfat, sülfatın indirgenmesi sonucu oluşmaktadır. Sülfatın indirgenmesine neden olan *Desulfovibrio* gibi bakterilerin, İBH hastalarında artmış olduğu bulunmuştur. Ayrıca bu hastalarda farklı bireylerde farklı taksonların etkilenmesiyle ortaya çıkan; oksidatif stres yollarında bir artış, karbonhidrat metabolizmasında ve amino asit biyosentezinde bir düşüş de rapor edilmiştir (Tablo 2) (292).

Bugüne kadar İBH etiolojisinde mantar, archaea ve virusleri içine alan diğer önemli mikroorganizmaların rolü geniş ölçüde göz ardı edilmiştir. Gelişen teknolojik yeni tanımlama yöntemleri ile daha az tanınan mikroorganizmalar da artık tanımlanmaya başlanmıştır. İBH'de bakteriyel mikrobiyota yanı sıra, fungal mikrobiyota değişiklikleri de rapor edilmiştir. *Saccharomyces cerevisiae*'nin mannana karşı oluşan antikorları CH ile ilişkilendirilmiş; Card9 gibi İBH ile ilişkili birkaç genin, mantarlara karşı immün tepkilerde rol oynadığı görülmüş; farelerde yapılan çalışmalarda da bağırsak iltihabının mantarların çoğalmasını tetiklediği tespit edilmiştir. Bu bulgular, fungal mikrobiyota ve İBH patogenezi arasında bağlantı olabileceğini düşündürmüştür. Bazı mantarların, iltihaplanma duyarlılığını negatif (*Candida albicans*) veya pozitif (*Saccharomyces boulardii*) şekilde düzenleyebileceği görülmüştür. Fare deneylerinde, mantarların algılanmasında majör olan Dectin-1 veya Card9 gibi genlere sahip olmayan farelerde artmış bir mantar

mikrobiyota yükü bulunmuş ve kolite daha yatkın oldukları tespit edilmiştir. Sokol ve ark.'nın yaptığı çalışmada, *Basidiomycota*'nın yoğunluğunun arttığı ve *Ascomycota* yoğunluğunun azaldığı tespit edilmiştir. *Basidiomycota/Ascomycota* yoğunluk oranı, alevlenme döneminde, remisyon dönemine göre ve hastalarda sağlıklı deneklere göre artmış olarak bulunmuştur. *Malassezia sympodialis* ve *Saccharomyces* (özellikle *S. cerevisiae*) türlerinde de azalma tespit edilmiştir. *C. albicans*, İBH'li hastalarda ve özellikle alevlenmede bol miktarda bulunmuştur (293).

Hem metod hem de analitik zorluklar nedeni ile bağırsak virom yapısını değerlendiren çalışmalar sınırlı sayıdadır. Bu çalışmalar da bağırsaktaki viral topluluğun çoğunluğunu oluşturan bakteriyofajlar üzerine yoğunlaşmıştır. Böyle bir çalışmada, İBH hastalarında *Caudovirales* bakteriyofajında belirgin bir genişleme gözlenmiştir. Başka bir çalışmada da, CH ve ÜK hastalarının kolonik mukozasında *Herpesviridae* transkripti bildirilmiştir (286). Ungaro ve ark.'nın yakın zamanda yaptıkları bir çalışmada, ÜK hastaları arasında *Hepadnaviridae* transkriptinin; CH hastaları arasında da *Hepeviridae* seviyelerinin yüksek olduğu gösterilmiştir. ÜK, düşük seviyelerde *Polidnaviridae* ve *Tymoviridae* viromu ile karakterize edilirken, CH, düşük seviyelerde *Virgaviridae* ile ilişkilendirilmiştir (294). Yapılan bu çalışmalarda yazarlar, ökaryotik viruslerin de bağırsak iltihabı ile ilişkili olduğunu ve İBH tedavisi için antivirallerin geliştirilmesi gerekliliğini vurgulamışlardır.

Yukardaki verilerden de anlaşılacağı üzere, bağırsak mikrobiyotası ve metabolik ürünlerinin, İBH patogenezinde önemli bir payının olduğu görülmektedir.

2.2.7. Çalışmamızda kullanılan bakterilerin genel özellikleri

Çalışmamızda sekiz adet bakteri kullanılmıştır. Bu bakterilerin genel özellikleri aşağıda özetlenmekte ve sınıflandırılması Tablo 3'de görülmektedir.

Tablo 3. Çalışmamızda kullanılan bakterilerin sınıflandırılması

Tür	Cins	Aile	Takım	Sınıf	Filum
<i>A. mucinophila</i>	<i>Akkermansia</i>	<i>Verrucomircobiaceae</i>	<i>Verrucomicrobiales</i>	<i>Verrucomicrobiae</i>	<i>Verrucomicrobia</i>
<i>B. fragilis</i>	<i>Bacteroides</i>	<i>Bacteroidaceae</i>	<i>Bacteroidales</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Bacteroidetes</i>
<i>Bifidobacterium</i> spp.	<i>Bifidobacterium</i>	<i>Bifidobacteriaceae</i>	<i>Bifidobacteriales</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>
<i>E. coli</i>	<i>Eschericha</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Enterobacteriales</i>	<i>Gamma proteobacteria</i>	<i>Proteobacteria</i>
<i>F. prausnitzii</i>	<i>Faecalibacterium</i>	<i>Ruminococcaceae</i>	<i>Clostridiales</i>	<i>Clostridia</i>	<i>Firmicutes</i>
<i>F. nucleatum</i>	<i>Fusobacterium</i>	<i>Fusobacteriaceae</i>	<i>Fusobacteriales</i>	<i>Fusobacteria</i>	<i>Fusobacteria</i>
<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactobacillaceae</i>	<i>Lactobacillales</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Firmicutes</i>
<i>P. intermedia</i>	<i>Prevotella</i>	<i>Prevotellaceae</i>	<i>Bacteroidales</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Bacteroidetes</i>

2.2.7.1. *Akkermansia mucinophila*

Akkermansia muciniphila, *Verrucomicrobia* filumunun bir bakterisidir. *A. muciniphila* varlığı sağlıklı bağırsak ile ilişkilidir ve bolluğu çeşitli hastalık durumlarıyla ters orantılıdır. *A. muciniphila*, kalın bağırsağın mukus tabakasında bulunur ve burada bağırsak bütünlüğünü korumaya dahil olur. Bağırsakta immün sistem regülasyonuna katılır ve bağırsak bariyer fonksiyonunu koruyucu role sahiptir. *Faecalibacterium prausnitzii* ile birlikte bağırsakta bütirat üretiminde rolü vardır (295).

2.2.7.2. *Bacteroides fragilis* grup

Bacteroidetes, memeli gastrointestinal kanalında sayıca çok bol miktarda bulunan zorunlu anaerobik, hareketsiz Gram negatif bakterilerden biridir. İnsanda genelde kommensal olarak kolonda normal flora üyesi olarak bulunur. *B. fragilis*, *Bacteroides* cinsi içinde en sık görülen tür olarak karşımıza çıkmaktadır. Yapılan çalışmalarda *Bacteroides*'in, bağırsak epitelinin glikosilasyonunu indükleyen, konakçı kullanımı için karbonhidratları sindiren, immün sistemi güçlendiren ve İBH hayvan modellerinde bağırsak inflamasyonundan koruyan bir bakteri cinsi olduğu gösterilmiştir (296).

2.2.7.3. *Bifidobacterium* spp

Bifidobacterium cinsinin üyeleri, Gram-pozitif, zorunlu anaerobik, hareketli olmayan, spor oluşturmeyen bakterilerdir. Nispeten uzun, ince, polimorfik yapıda basillerdir. Bazı türleri çatallanma ve dallanma gösteren yapılar oluşturabilir. Katı besi yerinde beyaz, parlak, kenarları düzensiz koloniler oluştururlar. İnsan ve hayvan bağırsak mikrobiyotasının en önemli bileşenleridir. Anne sütü ile beslenen çocukların gastrointestinal florasının büyük çoğunluğunu oluşturmaktadırlar. Yetişkin insanlarda ağız boşluğu, vajen ve bağırsak florasında tespit edilirler. *Bifidobacterium* türleri içerisinde *B. dentium*, tek patojen tür olarak söylenmektedir. Ancak *B. longum* ve *B. breve* ile oluşan infeksiyonlar da bildirilmiştir (297). *Bifidobacterium*'un patojenik potansiyeli belirsizliğini korumaktadır.

Bu cins 50'den fazla türden oluşur, insanlarda sadece 10 tür bulunur. Emzirilen bebeklerde *Bifidobacterium* bağırsak mikrobiyotasının %80'inden fazlasını oluştururken, yetişkinlerde dışkı florasının sadece %3-6'sını oluştururlar. Tür dağılımı bebeklerde ve yetişkinlerde farklıdır; *Bifidobacterium adolescentis* ve *Bifidobacterium longum subsp. longum* yetişkin bağırsak florasındaki ana bifidobakteriyel türlerdir ve *Bifidobacterium longum subsp. infantis* ve *Bifidobacterium breve*, insanda bebeklerin

bağırsak kanalındaki baskın türlerdir. *Bifidobacterium* cinsinin bazı seçilmiş üyeleri, patojenlerle rekabetçi olarak savaşır, bağışıklık sisteminin modülasyonunu yapar ve diyetten türetilmiş karbonhidratların parçalanmasını sağlayarak konakçıya avantaj sağlar. *Bifidobacterium* bu etkileri nedeniyle, hastalıkları önlemek veya tedavi etmek amacıyla, diğer laktik asit bakterileri ile kombinasyon halinde probiyotik ürünlere eklenirler (298).

2.2.7.4. *Faecalibacterium prausnitzii*

F. prausnitzii türleri, *Firmicutes* filum, *Clostridium* sınıfı, *Ruminococcaceae* familyasında bulunan sporsuz Gram pozitif anaerob bakteridir. Bağırsak fizyolojisi için önemli olan bütiratın üretimini sağlayan başlıca bakterilerden biridir. Bütirat, kolonositler için ana enerji kaynağı olup, kolorektal kanser ve İBH'ya karşı koruyucu özelliklere sahiptir. *F. prausnitzii* ayrıca, bağırsak bariyer fonksiyonunu arttıran ve paraselüler geçirgenliği etkileyen metabolitlerin salınması yoluyla da iltihabın şiddetini azaltmaktadır (299).

2.2.7.5. *Fusobacterium nucleatum*

Sporsuz, düz veya kıvrık, uzun, ince, zorunlu anaerob, gram negatif basillerdir. *F.nucleatum* zor üreyen bir bakteridir. Ağız boşluğu, gastrointestinal kanal ve genital bölgede komensal olarak bulunmaktadır. Ağız bakımı iyi olmayan kişilerin diş etlerinde bol miktarda bulunmuştur. Beyin, plevra, akciğer ve karaciğer apselerine neden olabilir (300). *F. nucleatum* varlığı ile insan kolorektal kanseri arasında bir ilişki, hem hasta popülasyonlarında hem de hastalık aşamalarında ortaya çıkmıştır. Araştırmacılar *F. nucleatum* türünü kolorektal kanserli hastalarda kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulmuşlardır. Epitel hücrelere E-cadherin bağlandığı zaman, türün virülans faktörü olan FadA uyarılmaktadır, nükleer faktör kappa B aktive olmaktadır. Böylece *F. nucleatum* türü ile sitokinlerden özellikle TNF- α ve IL-10 seviyeleri artmıştır. Uzun zamandır *F.*

nucleatum'un, farklı enfeksiyonlara sahip hastalardan, anaerobik numunelerde sıkça izole edildiği ve tanımlandığı ve fırsatçı bir patojen olarak kabul edildiği görülmektedir (301, 302).

2.2.7.6. *Escherichia coli*

Gezegende bulunan bütün memeli canlılar *E.coli* ile kolonize olmuş durumdadır. Bebeklerde ilk kolonize olan bakterilerden bir tanesidir ve bir yetişkin ömrü boyunca bu bakteri ile kolonize kalacaktır. *E. coli*'nin nasıl kolonize olduğu ve nasıl hastalığa neden olduğu hala tam olarak anlaşılmamıştır. Yapılan çalışmalar, *E. coli* suşlarının kalın bağırsağa ulaştığında, kolonileşmek için mukus tabakasına girdiğini ve farklı suşlarda farklılık göstermekle birlikte orada besinleri büyüme amacıyla kullandığını göstermektedir (303). *E.coli*, *Escherichia* ailesinde bulunan, insan için önemli bir fırsatçı patojen, kalın bağırsağın en yaygın fakültatif anaerop gram negatif bakterisidir. Yaklaşık 2-6 µm boyunda, 1-1,5 µm eninde, düz, uçları yuvarlak bir basildir (304).

E.coli'nin özellikle invaziv tipi CH'da yüksek miktarda tespit edilmiştir. Bu invaziv *E.coli*, epitel hücrelerini istila edebilir, makrofajlarda hayatta kalabilir ve biyofilmler oluşturabilir. Fizyolojik şartlarda, *E. coli*'nin hayatta kalması, reaktif oksijen türlerinin seviyelerindeki artışa ve konağın bağırsaklarında normal koşullarda koruyucu bir etki sağlayan kommensal bakteri popülasyonlarındaki düşüşe bağlıdır (303).

2.2.7.7. *Lactobacillus spp.*

Lactobacillus, doğa da yaygın olarak bulunmakta ve insan ağız boşluğu, gastrointestinal ve ürogenital sistem floralarında karşımıza çıkmaktadır. Yeni doğanda ve puperteden menopoza kadar olan dönemdeki erişkin kadın vajen florasında bulunmaktadır. Vajen florasında glukojenden laktik asit oluşturarak pH'yı düşürür ve patojen mikroorganizmalardan korur.

Bu bakterilerin yapısı ince, uzun ve silindir şeklinde olabilmekle beraber, tombul ve kısa da görülebilen gram pozitif basil şeklindedir. Üreyebilmek için mikroaerofilik veya aneorob ortama gereksinim duysalar da, aerobik özellik de kazanabilirler. Rogosa seçici besi yerinde kolaylıkla üremektedir (297).

İnsan ve hayvan bağırsak mikrobiyotasından çok sayıda *Lactobacillus* suşu izole edilmiştir. Bu bakteri grubu, gastrointestinal sistemin stabilitesini korumak, bağırsak enfeksiyonlarını önlemek ve genellikle bağırsak sağlığını desteklemek için önemlidir. *Lactobacillus*, hastalıklarla ilişkilendirilmemiş ve patojenik olmadığı kabul edilmiştir (305).

2.2.7.8. *Prevotella intermedia*

Prevotella türleri ağız boşluğu, diş eti, vajen florası ve bağırsakta kommensal olarak bulunmaktadır. *P. intermedia*; gram negatif, küçük, basil veya kokobasil şeklinde olup pigmentli *Prevotella* türleri arasındadır. Kanlı besi yerinde 2-21 gün arasında pigment oluştururlar. Sakkorolitik oldukları için metabolik son ürünleri asetik ve süksinik asittir. *P. intermedia* 'nın baş boyun plevral enfeksiyonlara neden olabileceği bildirilmiştir (306).

Prevotella intermedia'nın uzun süredir periodontal hastalıklar, periapikal periodontit, akut gangrenöz hastalıklar ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Oral hastalıklara dahil olmasının yanı sıra, *Prevotella intermedia*'nın solunum yolunda kolonize olduğu ve kistik fibroz ve kronik bronşit ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (307); *P. intermedia* türünde, tripsin benzeri serin proteazlardan dipeptidil peptidaz IV ve sistein proteaz gibi birkaç proteaz tanımlanmıştır. Virulans faktörü olan bu proteazlar hücre yüzeyinden bakteriyal proteinlerin salınımına, immünglobulinlerin aktivasyonu ile adaptif immün sistem cevabının oluşumuna neden olmaktadır (308).

3. HASTALAR VE YÖNTEM

3.1. Etik Kurul Onayı

Tez çalışmasına dair etik kurul onayı, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından verilmiştir. Çalışma örnekleri Samsun Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Gastroenteroloji bilim dalına başvuran hastalardan seçilmiştir. Çalışmaya katılan hasta ve sağlıklı kişiler gönüllü olarak çalışmaya katılmış, çalışmaya dair bilgi verilmiş ve kendi rızaları ile onam formunu imzalamıştır. Etik kurul onayı EK-1'de verilmiştir.

3.2. Hasta Seçimi

Tek oran testi power analizi sonucuna göre çalışmaya 22 hasta ,22 sağlıklı olmak üzere toplam 44 gönüllü dahil edildi. Katılımcılardan sağlık bilgilerini toplamak amacı ile hastane nükleus verileri toplandı ve tüm konularda bilgilendirilmiş onam formu alındı. Çalışmaya katılan hastalar, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Gastroenteroloji bölümüne başvuran gönüllülerden seçildi. Gönüllü hasta ve sağlıklı kontrollerin çalışmaya dahil edilme ve dışlanma kriterleri Tablo 4'te listelenmiştir.

3.3. Örneklerin Toplanması ve Veriler

Gönüllülere, kendilerine verilen gaita toplama kabına ceviz büyüklüğünde (10-20 gr kadar) gaita örneğini özel bir kaşık yardımı ile steril plastik bir tüpe aktarmaları söylendi. Gaita örneklerinin 2 saat içinde laboratuvara ulaştırılması sağlandı. Örnekler 200 mg olacak şekilde tartılarak 2 mL'lik mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı ve çalışma gününe kadar -80°C de saklandı.

Tablo 4. Hasta ve sağlıklı kontrollerin çalışmaya dâhil edilme ve dışlanma kriterleri

Gönüllülerin Araştırmaya Dahil Edilme Kriterleri

- Çalışmaya dahil edildiği tarihte 18 ile 65 yaş arasında bulunuyor olması
- Gıda alerjisi olmaması
- Malabsorbsiyon olmaması
- İnvaziv enfeksiyona sahip olmaması
- 3 ay öncesine kadar antibiyotik kullanmamış olması
- 4 hafta öncesine kadar kortikosteroid kullanmamış olması
- Son 3 ay içerisinde prebiyotik/probiyotik tedavisi almamış olması
- Çalışmadan 3 ay öncesine kadar kolon temizliği yapılmamış olması

Gönüllülerin Dışlanma Kriterleri

- Çalışmaya dahil edildiği tarihte 18 yaşından küçük, 65 yaşından büyük olması
 - Gıda alerjisi olması
 - Malabsorbsiyon olması
 - İnvaziv enfeksiyona sahip olması
 - Son 3 ay içerisinde antibiyotik kullanmış olması
 - Son 4 hafta içerisinde kortikosteroid kullanmış olması
 - Son 6 ay içerisinde prebiyotik/probiyotik tedavisi almış olması
 - Çalışmadan 3 ay öncesine kadar kolon temizliği yapılmış olması
-

Hastaların kayıtları geriye dönük olarak hastane nükleus sistemi üzerinden tarandı. Hastaların klinik bulguları ile ilgili detaylı bilgi, hemoglobin, lökosit, trombosit, C-reaktif protein (CRP), eritrosit sedimentasyon hızı (ESH) seviyeleri kayıt edildi.

3.4. Mikrobiyolojik İnceleme

İnflamatuvar bağırsak hastalıklı kişiler ve sağlıklı kontrollerden alınan gaita örneklerinin moleküler mikrobiyolojik incelemesi aşağıdaki protokole uygun olarak gerçekleştirildi. Çalışma koşulları ve malzemelerin kullanılması sürecinde kontaminasyona karşı genel laboratuvar önlemleri alındı.

3.4.1. Gaita örneklerinin hazırlanması

Gaitada örneklerinde çok sayıda DNA izolasyon inhibitörleri bulunmakta ve bu nedenle DNA ekstraksiyon işleminde problemler yaşanmaktadır. Çalışmada bu sorunları en aza indirmek amacıyla gaita için özel ekstraksiyon kiti olan QIAamp® Fast DNA Stool Mini Kit (QIAGEN, Hilden Germany) kullanılmıştır ve üretici firma talimatları doğrultusunda DNA izole edilmiştir. DNA ekstraksiyonu aşağıda sırası ile belirtilen protokole göre gerçekleştirildi:

1. İçinde 200 mg gaita örneği bulunan 2mL tüplerin içine 1mL InhibitEX tamponu ilave edilerek homojenize etmek için 1 dakika vortex işlemi yapıldı.
2. Karışım homojenize olana kadar yaklaşık 1 dakika vorteks yapıldıktan sonra ısı bloğu üzerinde 95°C'de 10 dk boyunca inkübe edildi.
3. İnkübasyon sonunda dışkı partiküllerinin çökmesi için 1 dakika boyunca 14,000 rpm'de santrifüj edildi.
4. 200 µL süpernatant toplanıp içerisinde 15µL Proteinaz K bulunan 2 mL'lik mikrosantrifüj tüplerine alındı.
5. Üzerine 200 µL Buffer AL eklendi ve vortekslenerek 70°C'de 10 dakika boyunca inkübe edildi.
7. Üzerine 200 µL %96-100'lük etanol eklendi ve vortekslenerek karıştırılarak QIAamp spin kolona aktarıldı.
8. Kapak kapatılıp 1 dakika 14,000 rpm'de santrifüj edildi. QIAamp spin kolon yeni bir 2 mL'lik toplama tüpüne alındı.
9. Spin kolonun ağzı dikkatlice açılarak 500 µL Buffer AW1 eklendi. Kapak kapatılıp 1 dakika 14,000 rpm'de santrifüj edildi. QIAamp spin kolon yeni bir 2 mL'lik toplama tüpüne alındı ve filtrat içeren toplama tüpü atıldı.
10. Spin kolonun ağzı dikkatlice açıldı ve üzerine 500 µL Buffer AW2 eklendi. Kapak kapatılıp 14,000 rpm'de santrifüj edildi. Filtrat içeren toplama tüpü atıldı.
11. Spin kolon yeni bir 2 mL'lik toplama tüpüne alındı ve 3 dakika 14,000 rpm'de santrifüj edildi.

12. Spin kolon yeni ve örnek kodunun yazıldığı 1,5 mL'lik mikrosantrifüj tüpüne alındı. Spin kolonun kapağı dikkatlice açılarak içine 200 µL Buffer ATE doğrudan QIAamp membranı üzerine eklendi. Kapağı kapatılıp 1 dakika oda ısısında inkübe edildi. Daha sonra DNA için 1 dakika santrifüj edildi.

13. Elde edilen örnekler gerçek zamanlı PZR yapıma gününe kadar buzdolabının -20°C'lik bölümüne saklamaya kaldırıldı.

3.4.2. Çalışmada kullanılacak bakterilerin hazırlanması

Çalışmada toplamda sekiz adet bakterinin varlığı araştırıldı (Tablo 5). *Escherichia coli* ATCC 25922 suşu, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim dalı laboratuvarı kültür koleksiyonundan; *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586 suşu, Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi mikrobiyoloji Anabilim dalı laboratuvarı kültür koleksiyonundan; *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 ve *Bifidobacterium animalis ssp lactis* suşları, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Gıda Mühendisliği mikrobiyoloji laboratuvarı kültür koleksiyonundan; *Bacteroides fragilis* ve *Prevotella intermedia* suşları, Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim dalı laboratuvarı kültür koleksiyonundan temin edilmiştir. Çalışmada kullanılan bakterilere ait primer dizisi, hedef bölge büyüklüğü ve PZR bağlanma ısıları ile birlikte Tablo 5'te listelenmiştir.

Tablo 5. Çalışmada kullanılan bakterilere ait primer dizisi, hedef bölge büyüklüğü ve PZR bağlanma ısı

Bakteri Adı	Primer Adı	Primer Dizisi	Hedef Bölge Büyüklüğü (bp)	Annealing Sıcaklığı (°C)	Referans
<i>Bacteroides fragilis</i> grup	BAC-F	5' ATA GCC TTT CGA AAG RAA GAT 3'	495	50	(309)
	BAC-R	5' CCA GTA TCA ACT GCA ATT TTA 3'			
<i>Bifidobacterium</i> spp.	BIF-F	5' GGG TGG TAA TGC CGG ATG 3'	550	55	(309)
	BIF-R	5' TAA GCG ATG GAC TTT CAC ACC 3'			
<i>Escherichia coli</i>	ESC-F	5' GTT AAT ACC TTT GCT CAT TGA 3'	195	63	(310)
	ESC-R	5' ACC AGG GTA TCT AAT CCT GTT 3'			
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	FAE-F	5' GAT GGC CTC GCG TCC GAT TAG 3'	199	58	(310)
	FAE-R	5' CCG AAG ACC TTC TTC CTC C 3'			
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	FUS-F	5' CAC AAG CTG ACG CTC TAG A 3'	164	47	(311)
	FUS-R	5' TTA CCA GCT CTT AAA GCT TG 3'			
<i>Lactobacillus</i> spp.	LAC-F	5' AGC AGT AGG GAA TCT TCC A 3'	341	51	(312)
	LAC-R	5' CAC CGC TAC ACA TGG AG 3'			
<i>Prevotella intermedia</i>	PRE-F	5' AAT ACC CGA TGT TGT CCA CA 3'	339	51	(313)
	PRE-R	5' TTA GCC GGT CCT TAT TCG AA 3'			
<i>Akkermancia mucinophilia</i>	AKK-F	5' CAG CAC GTG AAG GTG GGG AC 3'	327	60	(314)
	AKK-R	5' CCT TGC GGT TGG CTT CAG AT 3'			

3.4.2.1. Bakterilerden DNA izolasyon işlemi

Çalışmada kullanılacak bakterilerin besi yerinde üreyen kolonilerinden bir öze dolusu alındı. İçerisinde 500 µl steril distile su bulunan mikrosantrifüj tüpüne aktararak vorteks işlemi uygulandı. Homojen hale gelen karışım, önceden 100°C'ye ayarlanmış kuru blokta 15 dakika inkübe edildi. İşlem sonunda mikrosantrifüj tüpleri santrifüj cihazında 15.000 rpm'de 4°C'de 20 dakika işleme tabi tutuldu. Daha sonra süpernatantlar temiz tüplere aktarıldı. DNA miktarının tayini ve izolasyonun kontrolü amacı ile örneklerin Nano drop

ND-1000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE) spektrofotometre cihazında ölçümleri yapıldı. Saflığı 260 nm ve 280 nm'de okunmuş değerler dikkate alınmış ve 1,8-2 değerleri saf DNA olarak kabul edilmiştir. Yeterli saflıkta tespit edilmeyen DNA örneklerinin bakterilerine tekrar ekstraksiyon işlemi yapıldı. Elde edilen DNA miktarı ng/µl olarak belirlenmiştir. DNA miktarları ölçülen bakterilerin kopya sayısı aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

$$\text{Kopya}/\mu\text{L}=6,022 \times 10^{23}(\text{kopya/mol}) \times \text{konsantrasyon (ng}/\mu\text{L})/(\text{baz çifti} \times 10^9 \times 660)$$

Formüle göre hesaplanan DNA izolatlarının kopya sayıları Tablo 6'da yer almaktadır. Yeterli saflıktaki DNA örnekleri, gerçek zamanlı PZR işlemine kadar -20°C'de saklamaya alındı.

Tablo 6. Kullanılan bakteri standartlarının kopya sayıları

Bakteriler	DNA (kopya sayısı/µL)
<i>Bacteroides fragilis grup</i>	5x10 ⁹
<i>Bifidobacterium spp</i>	43x10 ⁹
<i>Escherichia coli</i>	38,3x10 ⁹
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	88,6x10 ⁹
<i>Lactobacillus spp.</i>	10,9x10 ⁹
<i>Prevotella intermedia</i>	72x10 ⁹
<i>Akkermancia mucinophilia</i>	70,1x10 ⁹
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	99,4x10 ⁹

3.4.2.2. *Akkermancia mucinophilia* ve *Faecalibacterium prausnitzii* bakterilerinin hazırlanması

Faecalibacterium prausnitzii ve *Akkermancia mucinophilia* bakterileri için pozitif kontrol olarak kullanılacak izolatlar temin edilememiştir. Yapılan literatür çalışmalarından edinilen bilgiler doğrultusunda bu bakterilerin çoğu sağlıklı insan gaitasının normal florası elemanı olduğu bilinmektedir. Bu nedenle ilgili primerler kullanılarak DNA ekstraksiyonu yapılmış sağlıklı kontrollerin gaita örneklerinden, konvansiyonel PZR ve agaroz jel

elektroforez işlemi yapılarak pozitif gaita örnekleri tespit edildi. Her iki bakteri için spesifik bant aralığında kuvvetli pozitif tespit edilen bir örnek (8 numaralı örnek) seçildi. Bu örnek agaroz jelden UV ışığı altında kesilerek jel ekstraksiyon kiti (Thermo Gene Jet Purification Kit, Almanya) ile üretici firma talimatları doğrultusunda jelden DNA ekstraksiyonu yapıldı. Elde edilen DNA'ların bir kısmı sekanslama için ayrıldı. Sekanslama işlemi Sanger sekanslama metodu ile yapılmıştır (Sentebiolab, Ankara). Sekans sonucunun iki bakteriyi de doğrulaması üzerine bu iki örnek gerçek zamanlı PZR için standart olarak kullanıldı. DNA miktarının tayini ve izolasyonun kontrolü amacı ile diğer örneklerde olduğu gibi örneklerin Nano drop ND-1000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE) spektrofotometre cihazında ölçümleri yapıldı. Elde edilen DNA miktarı ng/µl olarak belirlendi. DNA miktarları ölçülen bakterilerin kopya sayısı yukarıda bahsedildiği gibi formül ile hesaplandı (Tablo 6). Kalan kısım çalışma gününe kadar -20°C'de saklandı.

3.4.2.2.1. Konvansiyonel PZR işleminin yapılması

Akkermancia mucinophilia ve *Faecalibacterium prausnitzii* bakterilerinin hasta ve sağlıklı kontrol numunelerinde varlığı konvansiyonel PZR yöntemi ile araştırıldı. Bakterilere ait hedef gen bölgesi büyüklüğü, gerekli primer çifti ve bağlanma ısısı Tablo 5'de gösterilmiştir. Hedef bölgelerinin çoğaltılması için gerekli reaksiyon karışımı (Thermo Taq DNA Polymerase) Tablo 7'da özetlenmiştir.

Tablo 7. Konvansiyonel PZR reaksiyonu için hazırlanan karışım

<i>Akkermancia mucinophilia</i>	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	Volüm
dH ₂ O	dH ₂ O	29,5 µL
10x PZR buffer	10x PZR buffer	5 µL
MgCL ₂	MgCL ₂	4 µL
dNTP	dNTP	1 µL
AKK-F Primer (10 pmol)	FAE-F Primer	2,5 µL
AKK-R Primer (10 pmol)	FAE-R Primer	2,5 µL
Taq polimerase	Taq polimerase	0,5 µL
Toplam	Toplam	45 µL

Master mixden 45 µL ve örneklerimizden 5 µL alınarak reaksiyon karışımı hazırlandı. Hazırlanan reaksiyon karışımı thermal cycler cihazına (SensoQuest Labcycler, Almanya) yüklendi.

Akkermancia mucinophilia gen bölgesi amplifikasyonu için aşağıdaki program ayarlandı.

- 95°C → 2 dk (ön denatürasyon) → 1 Döngü
 - 95°C → 30 sn (hedef DNA denatürasyonu)
 - 60°C → 30 sn (primer bağlanması)
 - 72°C → 1 dk (primer uzaması)
 - 72°C → 10 dk (son uzama) → 1 Döngü
- } 40 döngü

Faecalibacterium prausnitzii gen bölgesi amplifikasyonu için aşağıdaki program ayarlandı.

- 95°C → 2 dk (ön denatürasyon) → 1 Döngü
 - 95°C → 30 sn (hedef DNA denatürasyonu)
 - 58°C → 30 sn (primer bağlanması)
 - 72°C → 1 dk (primer uzaması)
 - 72°C → 10 dk (son uzama) → 1 Döngü
- } 40 döngü

Amplifiye edilmiş PZR ürünlerinin gözlenmesi amacıyla jel elektroforezi yapıldı. Bu uygulamalar aşağıdaki sıraya göre yapılmıştır:

- 1) 1,5 gr agaroz (Sigma, ABD) erlen kap içerisinde 150 ml 1X TBE tampon ile çözüldü. Mikrodalga fırında ısıtılarak agaroz tamamen eritildi. Jel ısı düşüncü katılaşımadan önce içerisine 10 µL etidyum bromid eklendi.
- 2) Uygun tarak takılmış jel kalıbına agaroz jel yavaşça döküldü ve oda ısısında katılaşmaya bırakıldı. Katılaşılan jel, elektroforez tankına aktarıldı ve tarak çıkarıldı.
- 3) Agaroz jel kuyucuklarına 10 µL yükleme boyası (6X Loading Dye, SNP) ile 50 µL PZR ürünü karıştırılarak jelde bulunan kuyulara dağıtıldı.
- 4) Jele yüklenen örneklerin başına 5 µL olacak şekilde merdiven (Thermo Scientific GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder) ve sonuna negatif kontrol yüklendi.
- 5) 120 V, 400 mA gücünde 30 dk süresince agaroz jelde yürütüldü.
- 6) Yürütme işlemi sonrasında değerlendirmek için UV cihazı (Bio-Rad, ABD) ile yapılarak görüntüler kaydedildi.

3.4.2.2.2. Agaroz jelden DNA izolasyonu

Agaroz jel elektroforezi sonucu 8 numaralı sağlıklı gönüllüye ait görüntüleme her iki bakteriye ait yüksek pozitiflik tespit edildi. Agaroz jel görüntüleme kabini içine konuldu ve UV ışık açıldı. Bistüri yardımı ile agaroz jelde 8 numaralı hastaya ait görüntülenen kısım kesilerek steril ependorf tüpe (1,5 mL) aktarıldı. Kesilen jel hassas terazi ile tartılarak ağırlığı belirlendi. Ekstraksiyon işlemi için özel kit (Thermo Gene Jet Purification Kit, Almanya) kullanıldı ve üretici firmanın talimatları doğrultusunda işlem yapıldı. Belirlenen ağırlığın üç katı kadar ependorf tüp içerisine Binding Buffer eklendi. Termal blokta 60°C'de 10 dk jelin erimesi için beklendi. Jel tamamen eridikten sonra jel ağırlığının üç katı kadar izopropil alkol eklendi. Pipetaj yapıldıktan sonra tüm karışım spin kolona aktarıldı. Spin kolonlar 14000 rpm'de 1 dk boyunca santrifüj edildi. Santrifüj sonrası spin kolon altı sıvı dökülerek tekrar

yerleştirildi. 500 µL Wash Buffer eklenerek tekrar aynı hızda santrifüj edildi. Santrifüj sonrası spin kolon toplama kabı atıldı ve spin kolon 1,5 mL'lik steril ependorf tüpe yerleştirildi. 50 µL Elution Buffer eklenerek aynı hızda santrifüj edildi. Santrifüj sonrası spin kolon atıldı. Ependorf tüp içinde bulunan DNA ekstraktı ikiye bölündü. Bir kısmı çalışma gününe kadar saklanmak üzere -20°C'ye kaldırıldı. Diğer bir kısım ise sekanslamaya gönderildi.

3.4.3. Gerçek zamanlı PZR işleminin yapılması

Kantitasyon için amplifikasyon reaksiyonu CFX96™ Real-Time System cihazında (BIO-RAD, ABD) SsoAdvanced Universal IT SYBR Green SMx (BIO-RAD, ABD) kullanılarak gerçekleştirildi. Her bir örnek için toplam hacmi 20 µL olan amplifikasyon karışımı hazırlandı:

Tablo 8. Gerçek zamanlı PZR için amplifikasyon karışımı

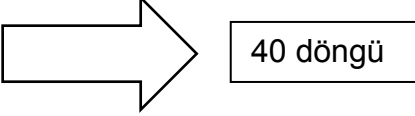
Reaksiyon İçeriği	Volüm
qPZR Mastermix	10 µL
Primer-F (10 pmol)	1,0 µL
Primer-R (10 pmol)	1,0 µL
ddH ₂ O	5,5 µL
Örnek	2,5 µL
Toplam	20 µL

Üretici firma talimatları doğrultusunda liyofilize halde bulunan primerlerin (Oligomer) sulandırma işlemi yapıldı. Bu stok primerden 10 µl alınarak 90 µl distile su ile toplam hacim 100 µl olacak biçimde tekrar sulandırılma yapıldı. Böylece çalışmamızda kullanılacak primerlerin konsantrasyonu 10 pmol/µl olarak belirlendi. Çalışma gününe kadar -20°C'de tutularak saklandı.

Her bakteri standardı için ilk standarttan steril su ile 1/10, 1/100, 1/1000, 1/10000, 1/100000 dilüsyonlar hazırlanarak CFX96™ Real-Time

PCR System cihazında (BIO-RAD, ABD) her bakteriye özgül primer dizileri kullanılarak çalışıldı. Her bakteri için en az 2 farklı standart kullanılarak standart eğriler oluşturuldu. Klinik örneklerdeki bakterilerin kopya sayısı oluşturulmuş olan bu standart eğriler kullanılarak belirlendi.

Gerçek zamanlı PZR işleminde uygulanan ısı döngüleri aşağıdaki gibi uygulandı:

- 98°C → 3 dk
 - 98°C → 15 sn
 - 60°C → 60 sn
- 

Her bir etken için SYBR Green kanalında floresans okuma yapıldı.

PZR işlemi sonrasında üretici firma talimatları doğrultusunda Melting Curve (Erime Eğrisi) analizi yapıldı ve yorumlandı. Böylece PZR ile edilen floresan ışımaların hedef bölgenin amplifikasyonu ile mi gerçekleştiği, yoksa özgül olmayan bir ürün mü olduğunun ayrımı yapıldı.

3.5. İstatiksel Analiz

Bakteriyel veriler Microsoft Excel'e girilerek log bakteriyel miktarı hesaplandı. Verilerin değerlendirilmesi SPSS 22.0 paket programı kullanılarak yapıldı. Ortalama ve yüzde değerler hesaplanarak gerekli kıyaslamalar yapıldı. Cinsiyet ve hastalık aktivitesine ait veriler için ki kare testi yapılmıştır. CH ve ÜK grupları için yaş, ESH, lökosit, hemoglobin ve trombosit ortalamalarının karşılaştırılmasında bağımsız gruplar t-testi kullanılmıştır. CRP değişkenine ait veriler normal dağılıma uymadığı için ortalamalarının karşılaştırılmasında Mann-Whitney U testi testi kullanılmıştır. *E. coli* bakterisine ait veriler gruplar arası ortalama karşılaştırma testi olarak bağımsız gruplar t testi kullanılmıştır. Diğer bakterilere ait veriler için anlamlılık testi olarak Mann-Whitney U testi yapılmıştır. Anlamlılık düzeyi $p < 0,05$ olarak alınmıştır.

4.BULGULAR

4.1. Demografik Bulgular ve Laboratuvar Verileri

Bu tez çalışmasına 10'u CH (%45,5) ve 12'si ÜK(%54,5) olmak üzere toplam 22 İBH'li hasta dahil edilmiştir. Bu 22 hastanın 13 (%59,1)'ü kadın 9 (%40,9)'u erkek hastadan oluşmaktadır. Çalışmaya katılan sağlıklı kontrol grubu, 10 (%45,5)'u erkek 12 (%54,5)'si kadın olmak üzere toplam 22 bireyden oluşmaktadır. Hasta ve kontrol grupları arasında cinsiyet açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p=0,761$). Çalışmaya katılan hastaların yaş ortalaması 34,04; sağlıklı kontrollerin yaş ortalaması 30,72 olarak hesaplanmıştır (Tablo 9). Hasta ve kontrol grubunda yaş ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur ($p=0,311$).

Tablo 9. Hasta ve kontrollere ait demografik bilgiler

Parametre	İBH hasta grubu	Sağlıklı kontrol grubu	p değeri
Cinsiyet			
Kadın n (%)	13 (59,1)	12 (54,5)	0,761
Erkek n (%)	9 (40,9)	10 (45,5)	0,761
Yaş (yıl)	34,04	30,72	0,311

Çalışmaya katılan ÜK ve CH ait demografik veriler, aktivite durumu ve laboratuvar bulguları Tablo 10'da verilmiştir. Kadın hastalardan 5 (%38,5)'i CH, 8 (%61,5)'i ÜK hastalığına sahipti. Erkek hastalardan 5 (%55,6)'i CH, 4 (%44,4)'ü ÜK hastalığına sahipti. Hasta grupları arasında cinsiyet açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık yoktur ($p=0,666$). CH hastalarının 7(%70)'si klinik olarak aktif durumda iken 3 (%30)'ü remisyon durumundaydı. ÜK hastalarının 7 (%58,3)'si klinik olarak aktif durumda iken 5 (%41,6)'i remisyon durumundaydı. CH ve ÜK hasta gruplarında aktivite açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık yoktur ($p=0,675$). CH hastalarının yaş

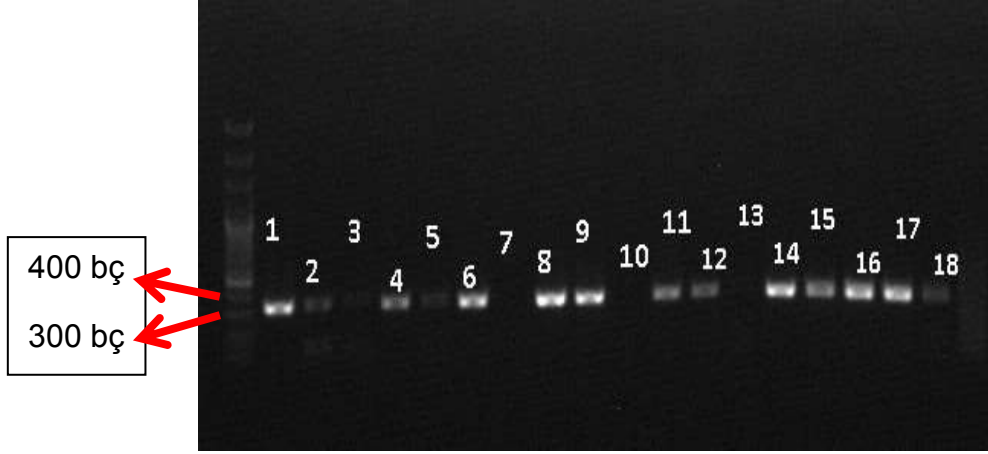
ortalaması 37,1 iken; ÜK hastalarının yaş ortalaması 31,5'dir. CH ve ÜK hasta gruplarında yaş ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir (p=0,34). CH hastalarının ESH ortalaması 41,3 iken; ÜK hastalarının 35,9 olarak hesaplanmıştır. CH ve ÜK hasta gruplarında sedim ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir (p=0,577). CH hastalarının CRP ortalaması 16 iken; ÜK hastalarının 7,75 olarak hesaplanmıştır. CH ve ÜK hasta gruplarında CRP'leri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır (p=0,003). CH ve ÜK hasta gruplarına kan sayımlarından tespit edilen hemoglobin, lökosit ve trombosit değer ortalamaları Tablo 10'da verilmiştir. CH ve ÜK hasta gruplarında hemoglobin ve lökosit ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değilken (p=0,443, p=0,36). Anlamlı (p=0,024) olarak bulunmuştur.

Tablo 10. Hasta grubunun demografik ve ortalama laboratuvar bulguları

Parametre	CH Hastaları	ÜK Hastaları	p değeri
Kadın (%)	38,5	61,5	0,666
Yaş (ortalama yıl)	37,1	31,5	0,340
Aktif Hastalık (%)	70	58,3	0,675
CRP (mg/L)	16	7,75	0,003
ESH (mm/saat)	41,3	35,9	0,577
Hemoglobin(g/dL)	12	12,8	0,443
Trombosit (bin/ μ L)	406,7	261,2	0,024
Lökosit (bin/ μ L)	9,1	7,9	0,360

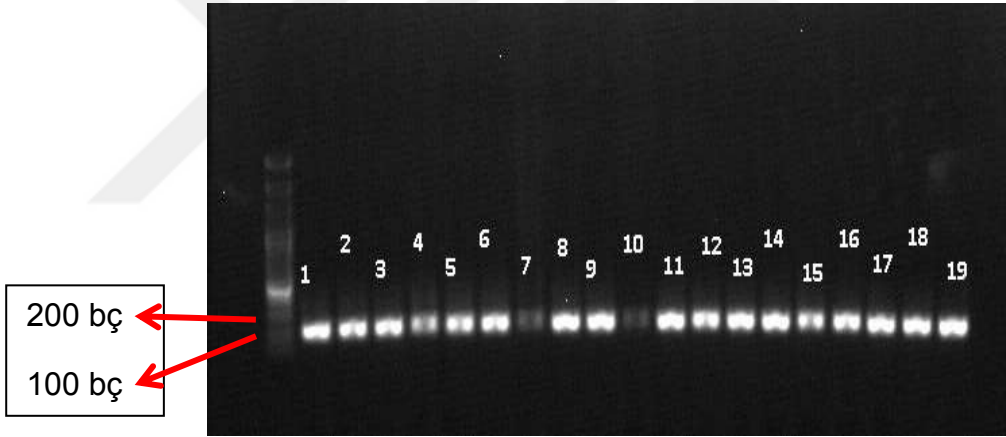
4.2. Konvansiyonel PZR sonuçları

Faecalibacterium prausnitzii ve *Akkermancia mucinophilia* bakterileri için konvansiyonel PZR işlemi yapıldı ve agaroz jel elektroforezi ile görüntüleme gerçekleştirildi. Jel elektroforez görüntülemesi sonucu her iki bakteride beklenen baz çifti aralığında pozitiflik gözlemlendi. *Akkermancia mucinophilia* için jel elektroforez görüntüleri Şekil 8'deki gibi tespit edildi.



Şekil 8. *Akkermancia mucinophilia* için jel elektroforez görüntüsü

Faecalibacterium prausnitzii için jel elektroforez görüntüleri Şekil 9'daki gibi tespit edildi.



Şekil 9. *Faecalibacterium prausnitzii* için jel elektroforez görüntüsü

4.3. *Faecalibacterium prausnitzii* ve *Akkermancia mucinophilia* Bakterilerine Ait Sekans Sonuçları

Sanger sekanslama işlemi uygulanan 8 numaralı pozitif örnek izolatinin dizisi değerlendirildiğinde her iki bakteri bölgesi için de uyumlu olduğu görülmüştür. Sekans sonuçlarının uyumluluğu Şekil 10 ve Şekil 11'de görülmektedir.

Download GenBank Graphics Sort by: E value

Akkermansia muciniphila JCM 30893 DNA, complete genome
Sequence ID: [AP021898.1](#) Length: 2845645 Number of Matches: 3

Range 1: 332316 to 332608 GenBank Graphics Next Match Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
523 bits(283)	1e-144	291/294(99%)	3/294(1%)	Plus/Minus
Query 7	CAGATC-AC TGGGAGG-AGGTGGGACGACGTCAGGTCAGTATGGCCCTTATGCCCAGGG	64		
Sbjct 332688	CAGATCAACTGGGAGGAAGGTGGGACGACGTCAGGTCAGTATGGCCCTTATGCCCAGGG	332549		
Query 65	CTGCACACGTA CTACAATGCC CAGTACAGAGGGGGCCGAAGCCCGAGGCCGAGSAAATC	124		
Sbjct 332548	CTGCACACGTA CTACAATGCC CAGTACAGAGGGGGCCGAAGCCCGAGGCCGAGSAAATC	332489		
Query 125	CTAAAAAC TGGGCC CAGTTCGGAC TGTAGGCTGCAACCCGCC TACACGAAGCCGGAATCG	184		
Sbjct 332488	CTAAAAAC TGGGCC CAGTTCGGAC TGTAGGCTGCAACCCGCC TACACGAAGCCGGAATCG	332429		
Query 185	CTAGTAATGGG C GATCAGC TACGGCGCCGTGAATACGTTCCCGGGTCTTG TACACACCGC	244		
Sbjct 332428	CTAGTAATGGG C GATCAGC TACGGCGCCGTGAATACGTTCCCGGGTCTTG TACACACCGC	332369		
Query 245	CCGTACATCATGGAAGCCGGTCCGACCCGAAGTATCTGAAAGCCAAACCCGAAG	298		
Sbjct 332368	CCGTACATCATGGAAGCCGGTCCGACCCGAAGTATCTGAAAGCCAA-CCGCAAG	332316		

Şekil 10. *Akkermansia muciniphila* bakterisine ait sekans sonuçları

Download GenBank Graphics Sort by: E value

Faecalibacterium prausnitzii isolate MGYG-HGUT-02545 genome assembly, chromosome: 1
Sequence ID: [LR699017.1](#) Length: 2833887 Number of Matches: 6
See 1 more title(s)

Range 1: 580281 to 580434 GenBank Graphics Next Match Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
272 bits(147)	3e-69	152/154(99%)	2/154(1%)	Plus/Minus
Query 16	CAA-GCGA-GATCGGTAGCCGGACTGAGAGGTTGAACGGCCACATTGGGACTGAGACACG	73		
Sbjct 588434	CAAGGCAGC GATCGGTAGCCGGACTGAGAGGTTGAACGGCCACATTGGGACTGAGACACG	588375		
Query 74	GCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGGAAACCCGATG	133		
Sbjct 588374	GCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGGAAACCCGATG	588315		
Query 134	CAGCGACGCCGCGTGGAGGAAGAAGGTC TTCGGA	167		
Sbjct 588314	CAGCGACGCCGCGTGGAGGAAGAAGGTC TTCGGA	580281		

Şekil 11. *Faecalibacterium prausnitzii* bakterisine ait sekans sonuçları

4.4. Gerçek Zamanlı PZR Sonuçları

Hasta ve kontrol gruplarından alınan gaita örneklerinden ekstrakte edilen DNA miktarları hesaplandı. Bir gram gaitadaki bakteri sayıları (1kopya/ μ L DNA=1 bakteri) cihazda ilgili standartlar kullanılarak oluşturulan standart eğrilere göre belirlendi ve log hesaplaması yapıldı (Tablo 11). Bakterilerin ortalama değerleri ve standart sapmaları ise Tablo 12’de verildi. İBH hastalık tiplerine ve aktivite durumuna göre bakteri sayılarının ortalaması ve standart sapmaları Tablo 13’de verildi.

Tablo 11. Hasta ve kontrol gruplarına ait gerçek zamanlı PZR sonuçları (log₁₀/gr)

Örnek Numarası	KONTROL GRUBU								Örnek Numarası	HASTA GRUBU							
	<i>E.coli</i>	<i>P.intermedia</i>	<i>F.nucleatum</i>	<i>Bifidobacterium spp.</i>	<i>Lactobacillus spp.</i>	<i>F.prausnitzii</i>	<i>B.fragilis</i>	<i>A.mucinophila</i>		<i>E.coli</i>	<i>P.intermedia</i>	<i>F.nucleatum</i>	<i>Bifidobacterium spp.</i>	<i>Lactobacillus spp.</i>	<i>F.prausnitzii</i>	<i>B.fragilis</i>	<i>A.mucinophila</i>
1k	6,46	0	0	7,05	6,04	5,04	10,12	2,64	23h	9,78	0	0	4,86	8,19	0,77	0	0,1
2k	5,61	0	0	5,79	6,19	4,23	6,62	0,5	24h	7,85	0	0	4,02	4,69	0,65	5,13	0
3k	6,46	1,77	5,17	6,9	6,98	4,51	8,33	0	25h	4,14	1,53	0	4,84	4,82	0,02	3,59	0,21
4k	8,49	0	4,48	7,93	7,91	4,51	8,2	2,9	26h	7,96	0	0	4,79	6,18	3,87	7,61	0
5k	8,34	0	4,47	6,52	6,97	4,4	9,28	0	27h	5,85	0	0	0	0	0	0	0
6k	7,78	0	0	6,24	7,01	4,18	9,52	2,17	28h	5,36	0	0	7,38	5,52	4,18	8,55	0,62
7k	9,36	0	0	8,41	6,4	5,01	7,76	0,03	29h	7,91	0	0	6,27	8,8	3,97	8,62	0
8k	7,32	0	0	6,48	5,78	5	8,24	4,37	30h	10,36	0	4,87	5,33	8,4	2,25	4,01	0
9k	7,11	0	5,02	5,84	7,13	4,27	9,18	2,5	31h	7,7	0	0	5,22	5,38	0	0	3,07
10k	7,96	0	0	7,18	6,84	4,54	6,57	0	32h	8,85	0	0	7,36	8,84	4,23	9,55	0
11k	8,23	0	0	7,33	6,91	4,04	7,79	1,58	33h	4,39	0	0	7,89	8,15	4,26	8,36	0
12k	7,54	0	0	6,63	8,29	4,06	7,57	1,39	34h	6,46	0	0	6,89	9,18	3,89	8,94	0
13k	9,23	0	0	7,73	8,3	4,66	8,05	0	35h	6,96	0	0	6,67	6,98	5,54	6,22	4,13
14k	7,23	2,14	0	6,62	6,55	4,97	10,04	2,63	36h	9,78	0	0	6,8	9,05	0,86	3,77	0,38
15k	8,23	0	0	7,25	8,31	4,86	8,24	4,67	37h	8,7	0	5,1	5,91	6,84	2,65	9,82	0,13
16k	7,5	0	0	6,84	6,71	5,47	8,68	4,44	38h	8,61	0	4,81	7,24	6,57	4,84	8,85	1,61
17k	8,7	0	4,77	8,16	7,8	5,14	7,44	2,45	39h	8,07	0	7,01	6,45	7,27	4,21	7,84	0
18k	6,14	0	0	6,95	8,09	4,53	8,89	0	40h	5,2	0	0	4,53	8,75	0,91	4,54	0
19k	6,27	0	0	5,87	8,11	4,01	7,39	0,61	41h	5,7	1,39	0	6,89	7,78	3,04	5,54	0,51
20k	7,2	2,41	5,38	6,11	5,14	4,41	9,51	4,22	42h	7,39	0	0	4,4	6,28	0,81	4,45	0
21k	7,85	0	0	6,76	7,3	3,89	8,51	2,87	43h	8	0	0	7,63	7,76	5,53	8,9	2,9
22k	6,96	0	0	6,61	7,57	3,97	8,82	1,4	44h	6,7	0	0	6,65	5,89	4,26	8,78	0

(k: kontrol, h:hasta)

Tablo 12. Gerçek zamanlı PZR ile elde edilen bakteri sayılarının ortalaması ve standart sapması (log₁₀/gr)

Bakteriler	Kontrol (Ortalama± SS)	Hasta (Ortalama± SS)	p değeri
<i>E.coli</i>	7,54±0,99	7,35±1,52	0,652
<i>P.intermedia</i>	0,28±0,74	0,13±0,43	0,551
<i>F.nucleatum</i>	1,30±2,19	0,99±2,18	0,598
<i>Bifidobacterium spp.</i>	6,87±0,72	5,8±1,74	0,046
<i>Lactobacillus spp.</i>	7,1±0,88	6,87±2,07	0,888
<i>F.prausnitzii</i>	4,53±0,43	2,76±1,91	<0,001
<i>B.fragilis</i>	8,39±0,98	6,04±3,18	0,033
<i>A.mucinophila</i>	1,88±1,62	0,62±1,19	0,009

SS: Standart sapma

Tablo 13: İBH hastalık özelliklerine göre bakteri ortalaması ve standart sapması (log₁₀/gr)

	<i>E.coli</i>	<i>P.intermedia</i>	<i>F.nucleatum</i>	<i>Bifidobacterium spp.</i>	<i>Lactobacillus spp.</i>	<i>F.prausnitzii</i>	<i>B.fragilis</i>	<i>A.mucinophila</i>
ÜK	8,18±1,54	0	0,99±2,10	5,35±0,99	7,41±1,44	2,22±1,73	5,41±2,80	0,47±1,29
CH	6,65±1,60	0,24±0,56	0,98±2,34	6,20±2,15	6,43±2,46	3,20±2,01	6,57±3,50	0,74±1,14
AKTİF	7,35±2,01	0,20±0,58	0,34±1,30	5,43±2,02	6,92±2,51	1,95±1,89	4,74±2,27	0,51±1,06
REMİSYON	7,35±1,17	0	2,11±2,98	6,49±0,82	6,8±1,12	4,18±0,82	8,32±1,09	0,81±1,45

(SS: Standart sapma)

4.4.1. *E. coli*'ye ait gerçek zamanlı PZR sonuçları

Escherichia coli ATCC 25922 suşu ile hazırlanan standart eğriler ile hasta ve kontrollere ait *E. coli* kopya sayısı belirlendi. Bakteriye ait elde edilen verilerden yapılan standart eğri (standard curve), erime eğrisi (melt peak) ve amplifikasyon eğrisi (amplification) Şekil 12'de gösterilmiştir. Kontrol ve hasta grubundaki *E. coli* ortalama ve standart sapmaları Tablo 12'de verilmiştir. Yapılan teste göre; kontrol ve hasta gruplarında *E. coli* ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur ($p:0,652$).

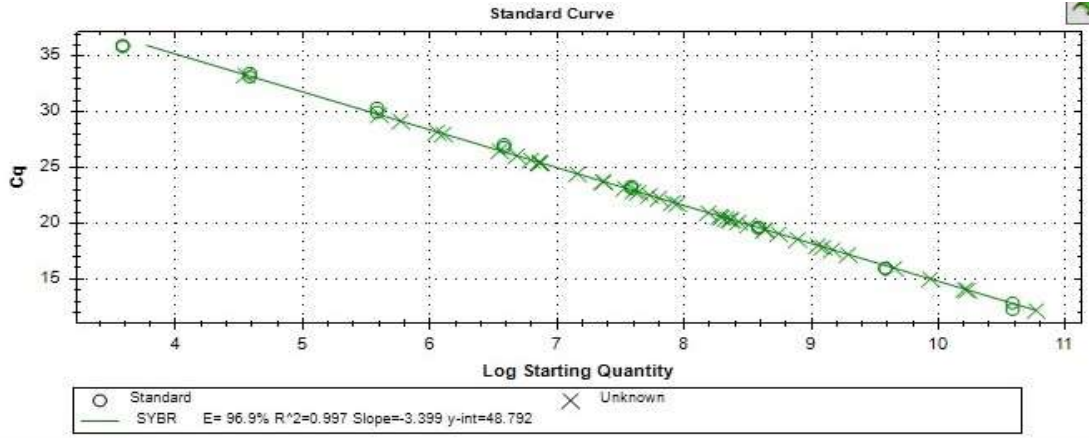
4.4.2. *P. intermedia*'ye ait gerçek zamanlı PZR sonuçları

P. intermedia suşu ile hazırlanan standart eğriler ile hasta ve kontrollere ait *P. intermedia* kopya sayısı belirlendi. Bakteriye ait elde edilen verilerden yapılan standart eğri (standard curve), erime eğrisi (melt peak) ve amplifikasyon eğrisi (amplification) Şekil 13'de gösterilmiştir. Kontrol ve hasta grubundaki *P. intermedia* ortalama ve standart sapmaları Tablo 12'de verilmiştir. Yapılan teste göre; kontrol ve hasta gruplarında *P. intermedia* ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur ($p:0,551$).

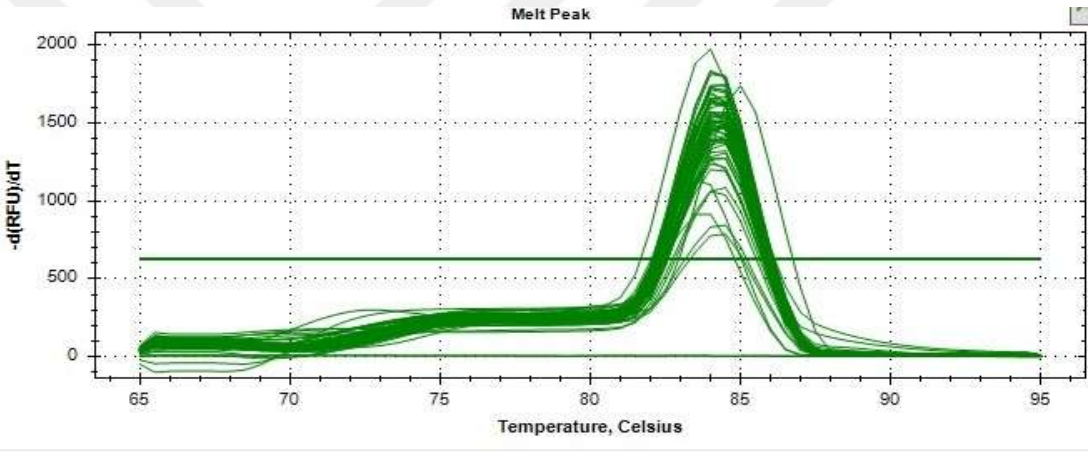
4.4.3. *F. nucleatum* ait gerçek zamanlı PZR sonuçları

F. nucleatum suşu ile hazırlanan standart eğriler ile hasta ve kontrollere ait *F. nucleatum* kopya sayısı belirlendi. Bakteriye ait elde edilen verilerden yapılan standart eğri (standard curve), erime eğrisi (melt peak) ve amplifikasyon eğrisi (amplification) Şekil 14'de gösterilmiştir. Kontrol ve hasta grubundaki *F. nucleatum* ortalama ve standart sapmaları Tablo 12'de verilmiştir. Yapılan teste göre; kontrol ve hasta gruplarında *F. nucleatum* ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur ($p:0,598$).

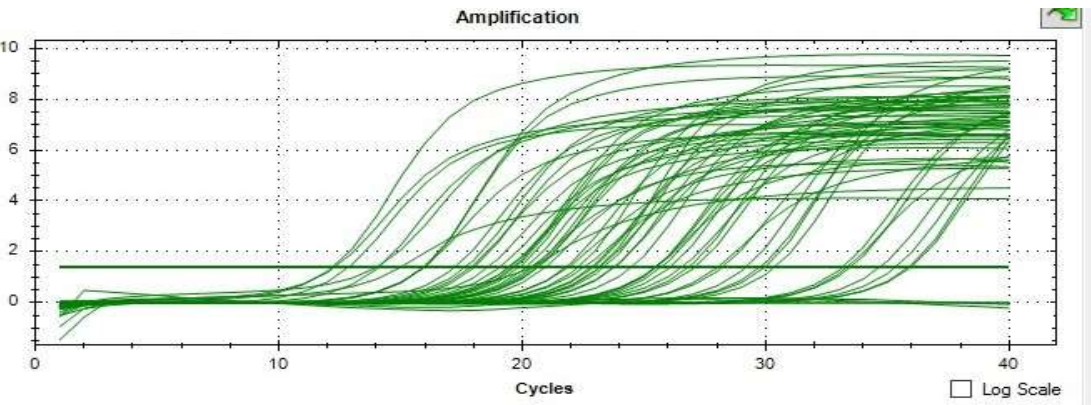
A.



B.

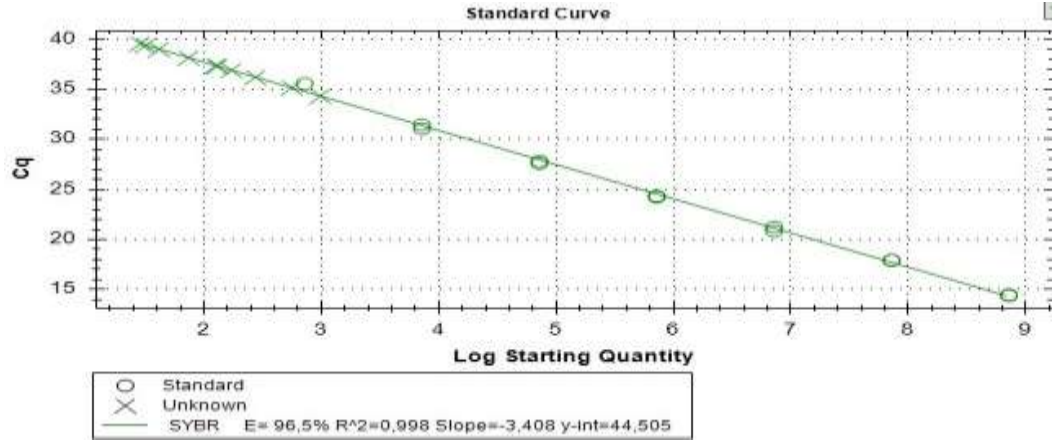


C.

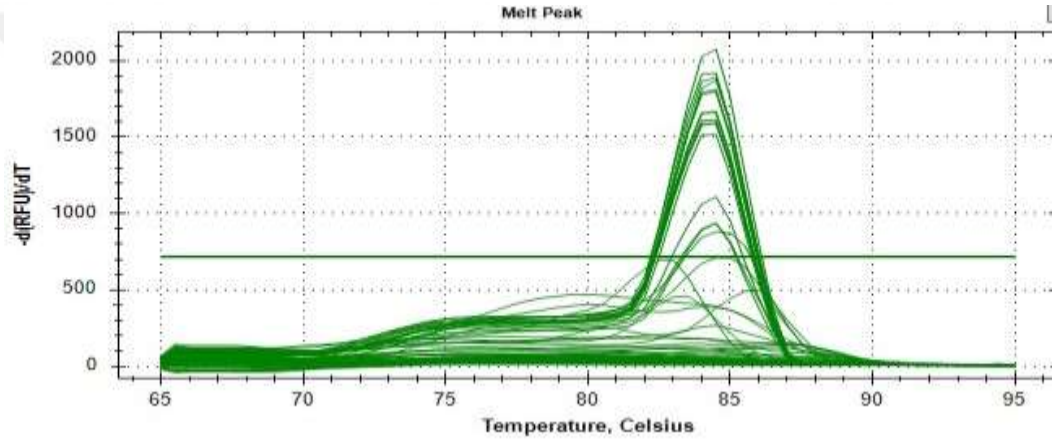


Şekil 12: *E. Coli* için A. Standart eğri, B. Erime eğrisi, C. Amplifikasyon eğrisi

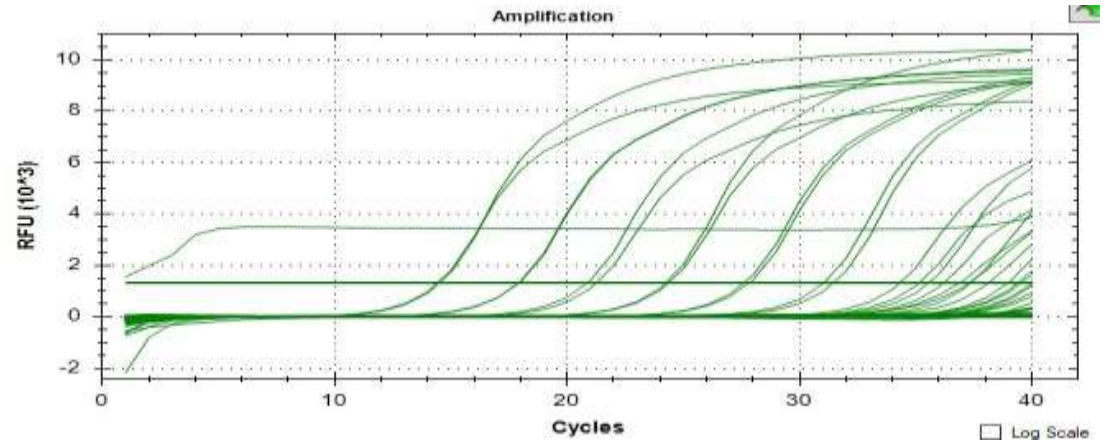
A.



B.

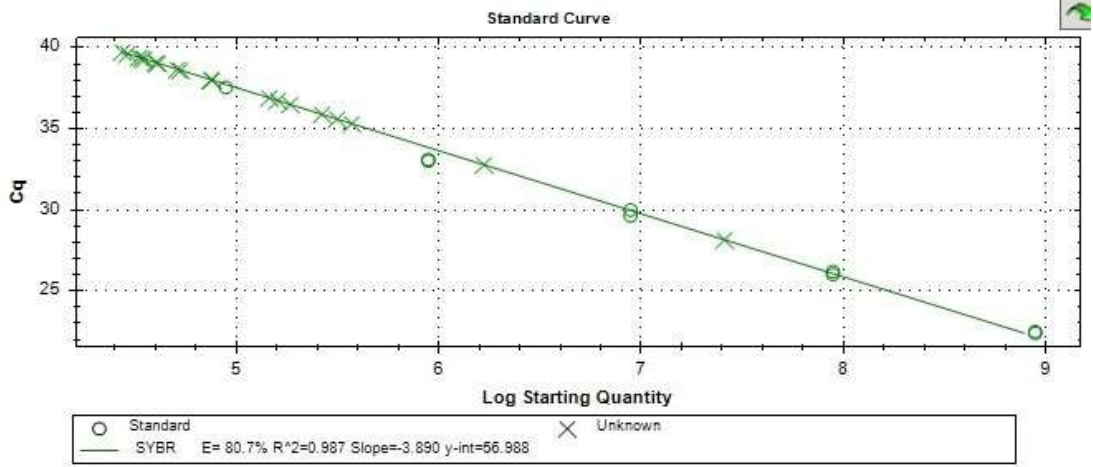


C.

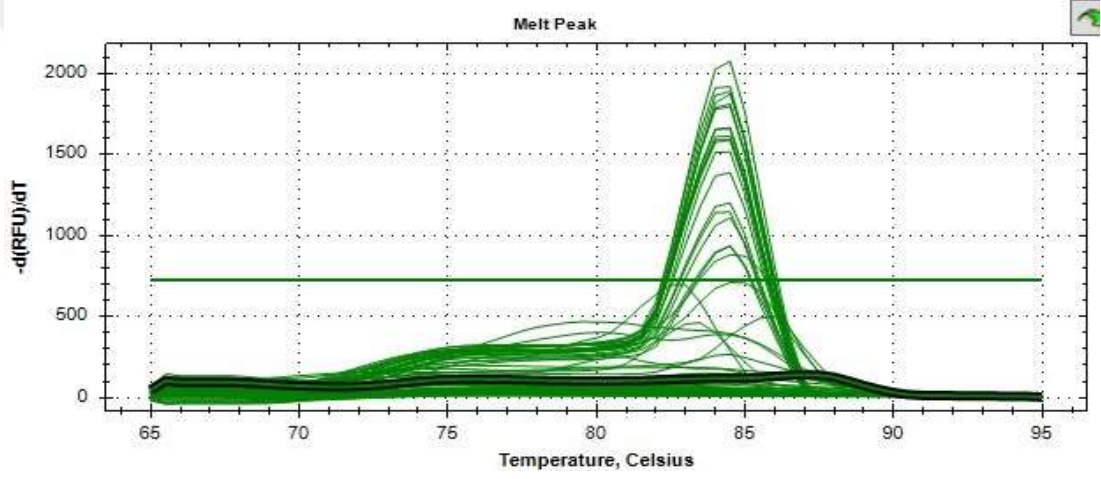


Şekil 13. *P. intermedia* için A. Standart eğri, B. Erime eğrisi, C. Amplifikasyon eğrisi

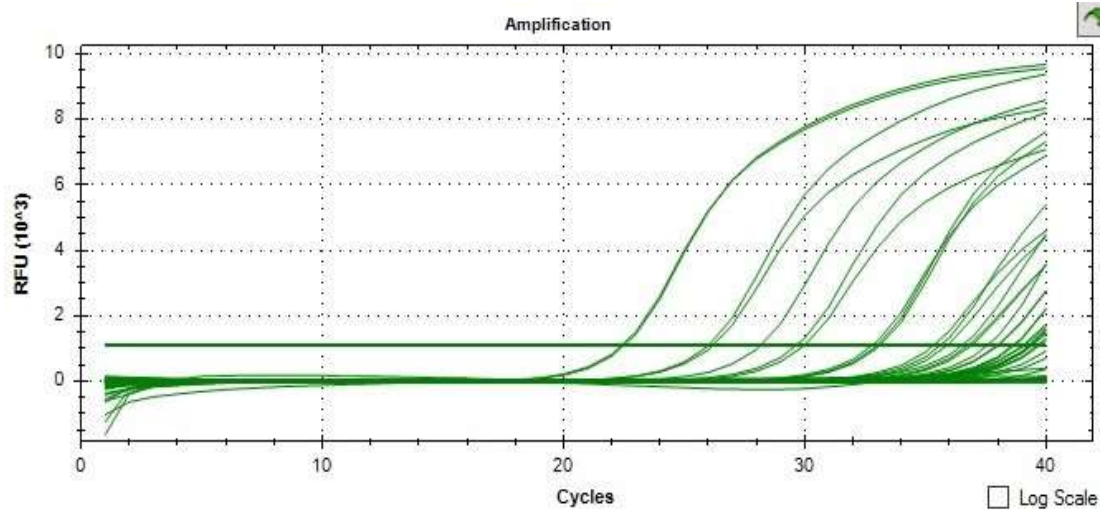
A.



B.



C.



Şekil 14. *F. nucleatum* için A. Standart eğri, B. Erime eğrisi, C. Amplifikasyon eğrisi

4.4.4. *Bifidobacterium spp.*'ye ait gerçek zamanlı PZR sonuçları

Bifidobacterium spp. suşu ile hazırlanan standart eğriler ile hasta ve kontrollere ait *Bifidobacterium spp.* kopya sayısı belirlendi. Bakteriye ait elde edilen verilerden yapılan standart eğri (standard curve), erime eğrisi (melt peak) ve amplifikasyon eğrisi (amplification) Şekil 15'de gösterilmiştir. Kontrol ve hasta grubundaki *Bifidobacterium spp.* ortalama ve standart sapmaları Tablo 12'de verilmiştir. Yapılan teste göre; kontrol ve hasta gruplarında *Bifidobacterium spp.* ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır (p:0,046).

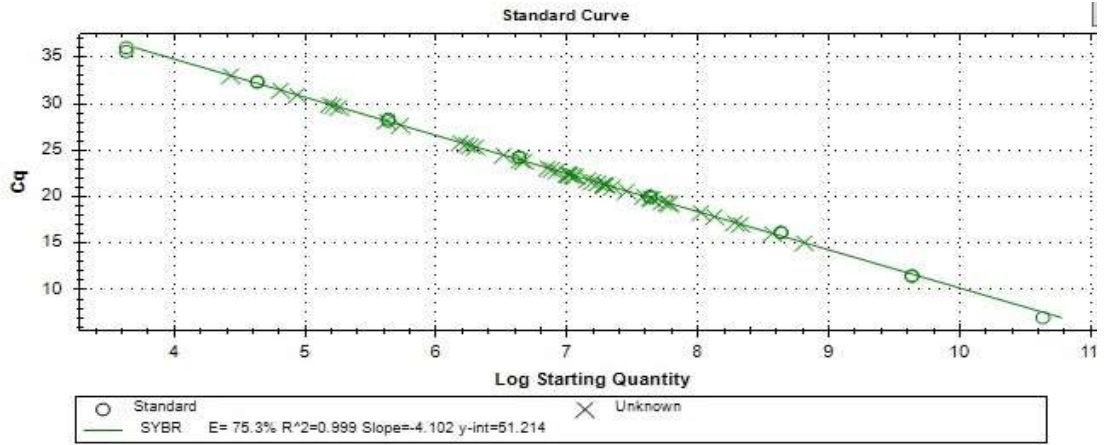
4.4.5. *Lactobacillus spp.*'ye ait gerçek zamanlı PZR sonuçları

Lactobacillus spp. suşu ile hazırlanan standart eğriler ile hasta ve kontrollere ait *Lactobacillus spp.* kopya sayısı belirlendi. Bakteriye ait elde edilen verilerden yapılan standart eğri (standard curve), erime eğrisi (melt peak) ve amplifikasyon eğrisi (amplification) Şekil 16'da gösterilmiştir. Kontrol ve hasta grubundaki *Lactobacillus spp.* ortalama ve standart sapmaları Tablo 12'de verilmiştir. Yapılan teste göre; kontrol ve hasta gruplarında *Lactobacillus spp.* ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur (p:0,888).

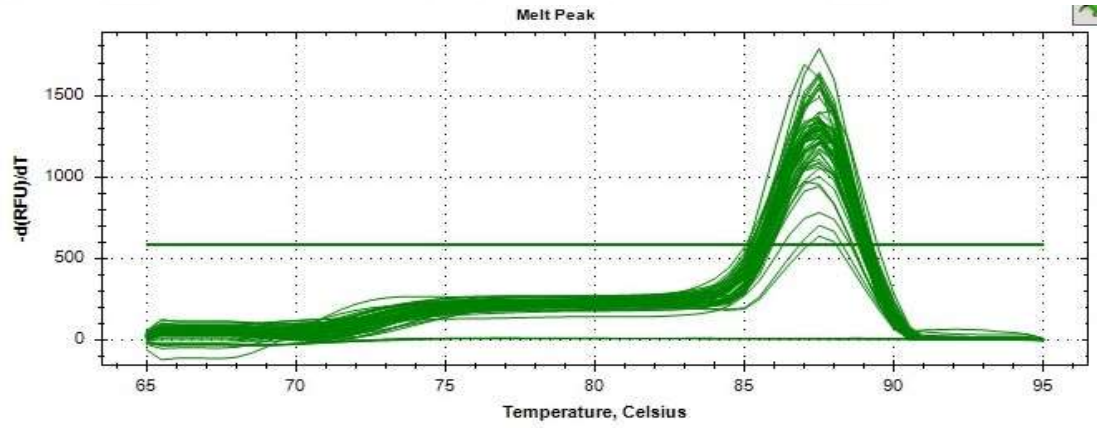
4.4.6 *F. prausnitzii*'ye ait gerçek zamanlı PZR sonuçları

F. prausnitzii suşu ile hazırlanan standart eğriler ile hasta ve kontrollere ait *F. prausnitzii* kopya sayısı belirlendi. Bakteriye ait elde edilen verilerden yapılan standart eğri (standard curve), erime eğrisi (melt peak) ve amplifikasyon eğrisi (amplification) Şekil 17'de gösterilmiştir. Kontrol ve hasta grubundaki *F. prausnitzii* ortalama ve standart sapmaları Tablo 12'de verilmiştir. Yapılan teste göre; kontrol ve hasta gruplarında *F. prausnitzii* ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0,001$).

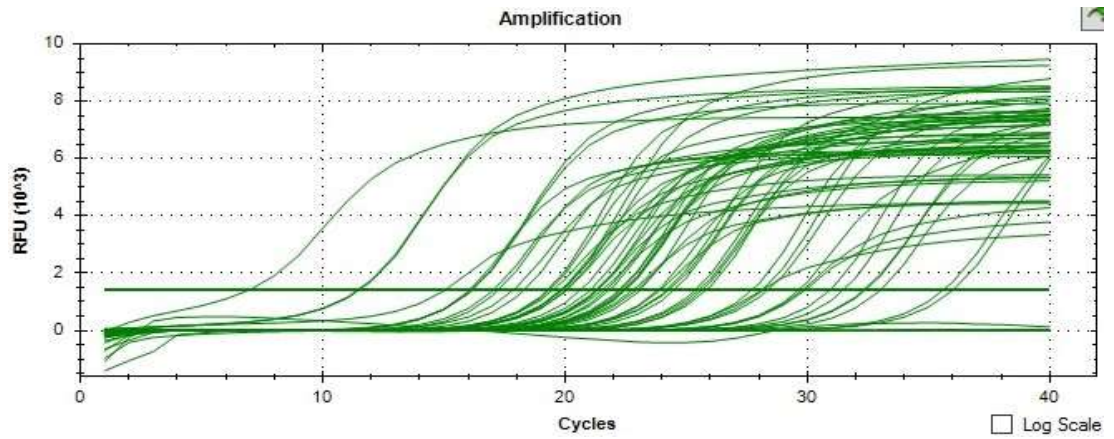
A.



B.

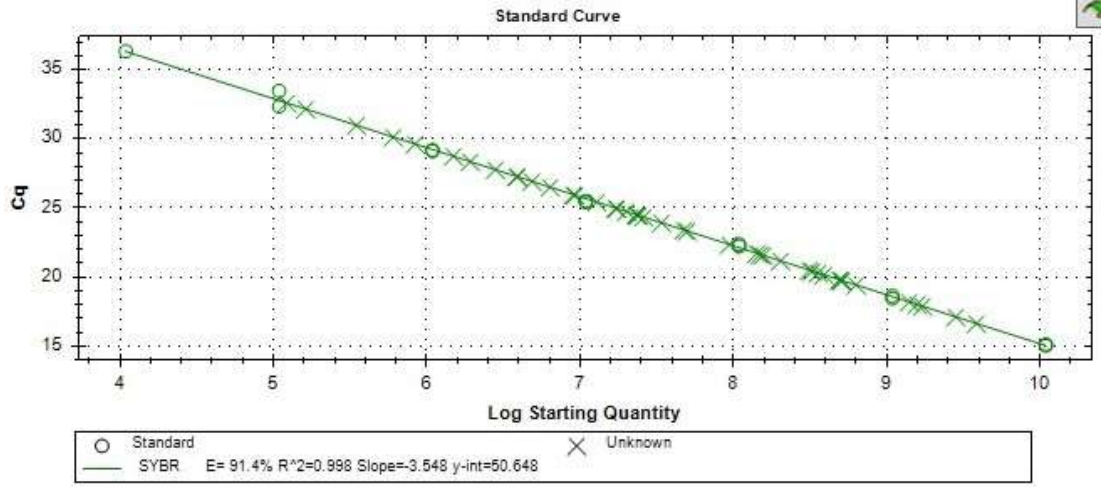


C.

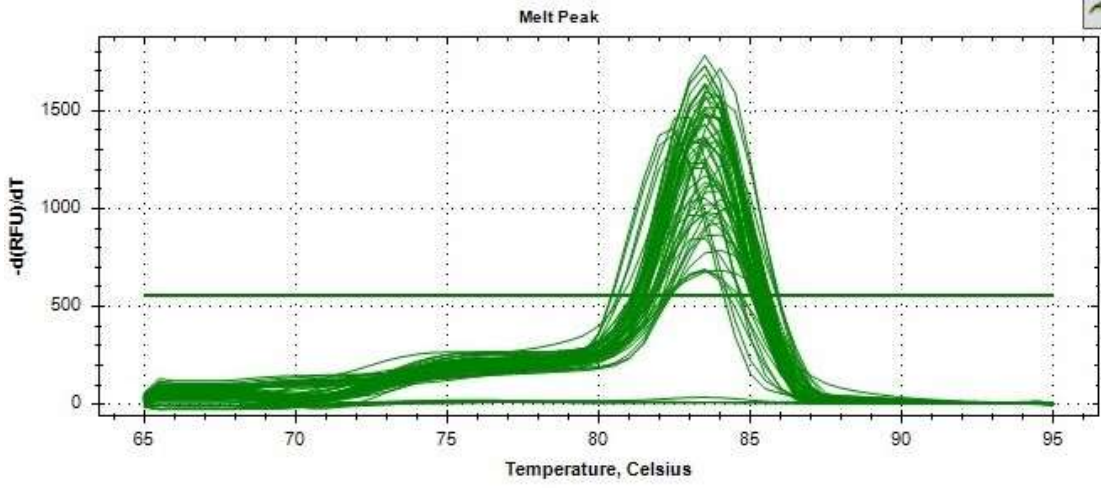


Şekil 15. *Bifidobacterium spp.* için A. Standart eğri, B. Erime eğrisi, C. Amplifikasyon eğrisi

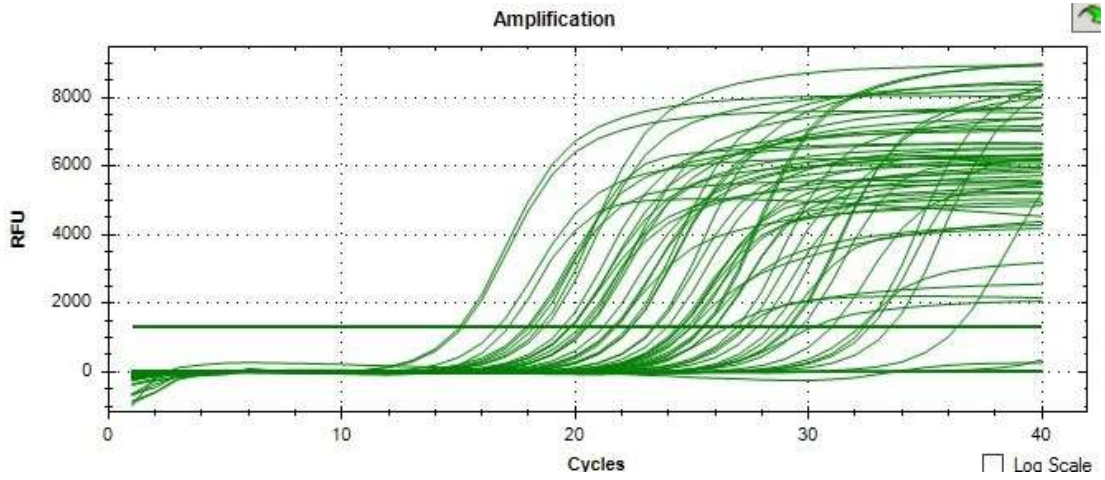
A.



B.

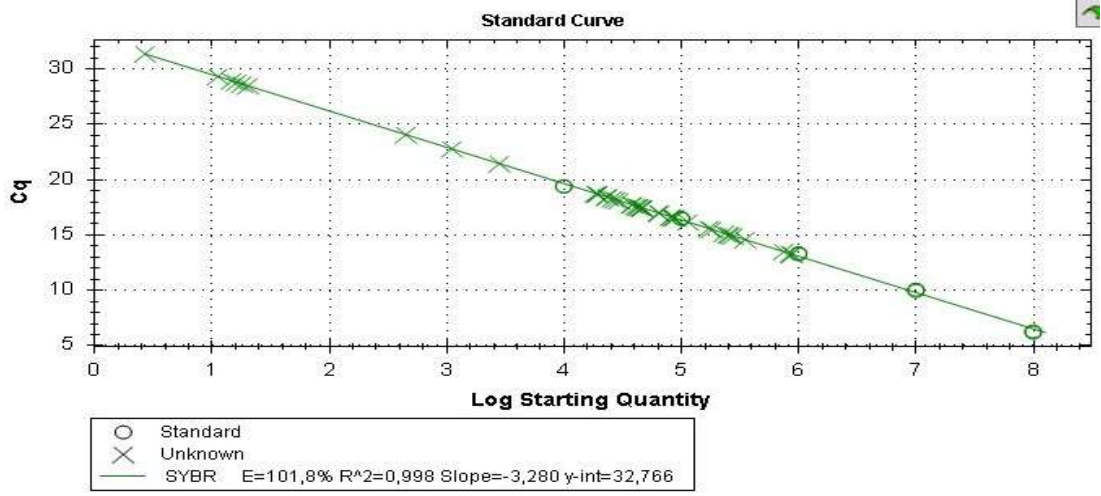


C.

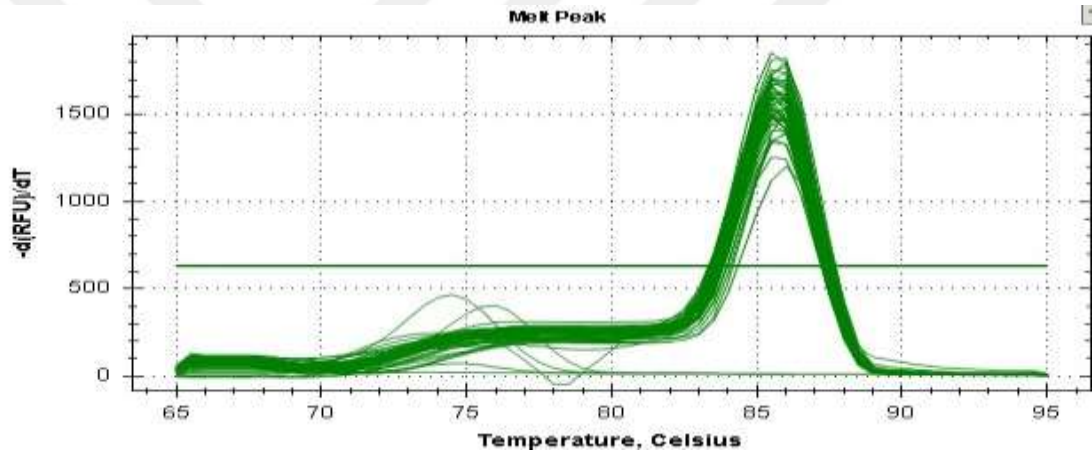


Şekil 16. *Lactobacillus spp.* için A. Standart eğri, B. Erime eğrisi, C. Amplifikasyon eğrisi

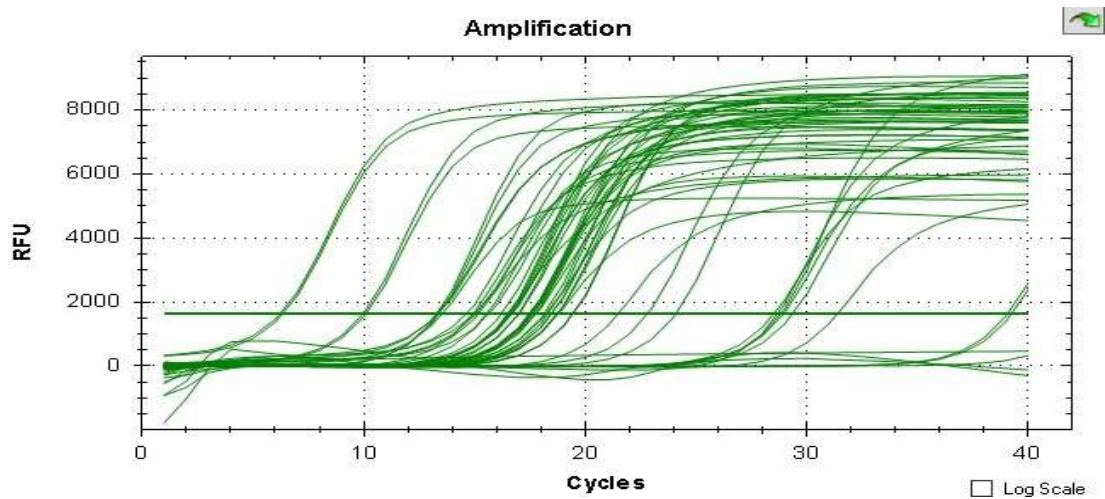
A.



B.



C.



Şekil 17. *F. prausnitzii* için A. Standart eğri, B. Erime eğrisi, C. Amplifikasyon eğrisi

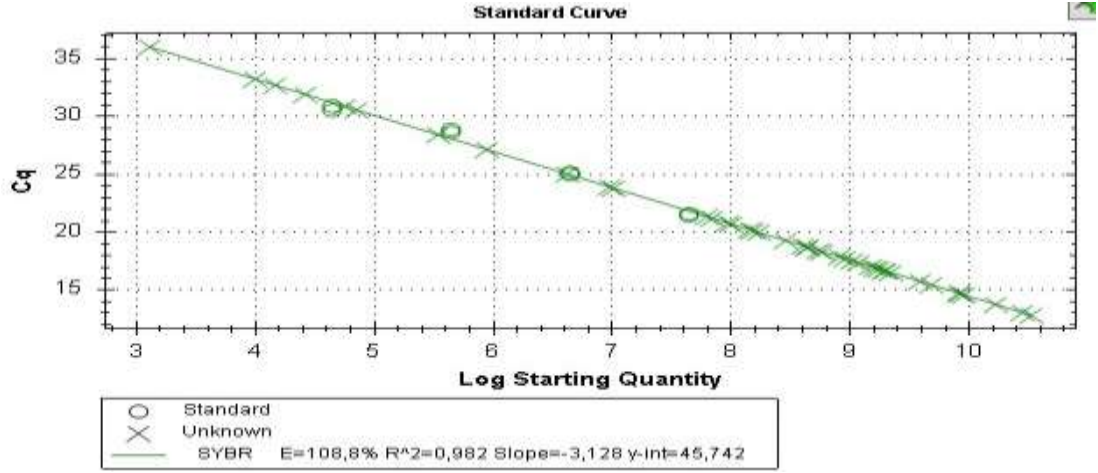
4.4.7. *B. fragilis*'ye ait gerçek zamanlı PZR sonuçları

B. fragilis suşu ile hazırlanan standart eğriler ile hasta ve kontrollere ait *B. fragilis* kopya sayısı belirlendi. Bakteriye ait elde edilen verilerden yapılan standart eğri (standard curve), erime eğrisi (melt peak) ve amplifikasyon eğrisi (amplification) Şekil 18'de gösterilmiştir. Kontrol ve hasta grubundaki *B. fragilis* ortalama ve standart sapmaları Tablo 12'de verilmiştir. Yapılan teste göre; kontrol ve hasta gruplarında *B. fragilis* ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p:0,033$).

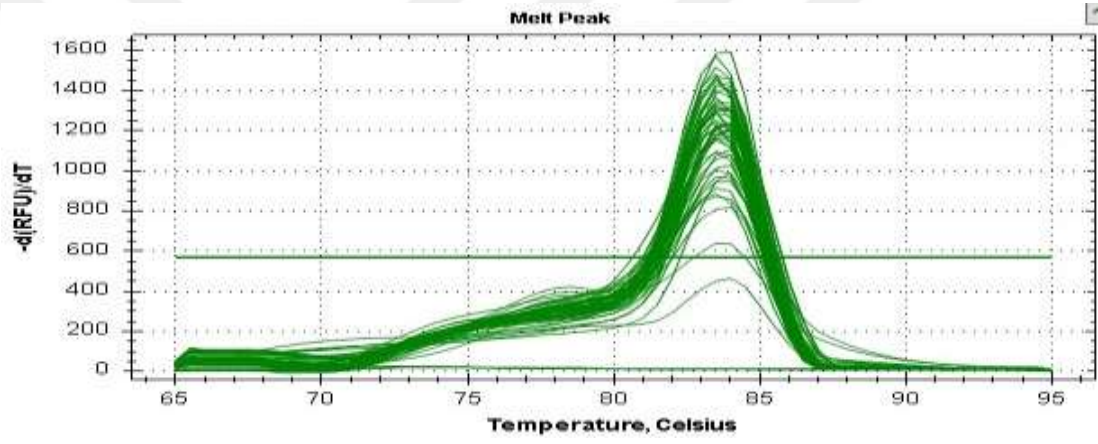
4.4.8. *A. mucinophilia*'ye ait gerçek zamanlı PZR sonuçları

A. mucinophilia suşu ile hazırlanan standart eğriler ile hasta ve kontrollere ait *A. mucinophilia* kopya sayısı belirlendi. Bakteriye ait elde edilen verilerden yapılan standart eğri (standard curve), erime eğrisi (melt peak) ve amplifikasyon eğrisi (amplification) Şekil 19'da gösterilmiştir. Kontrol ve hasta grubundaki *A. mucinophilia* ortalama ve standart sapmaları Tablo 12'de verilmiştir. Yapılan teste göre; kontrol ve hasta gruplarında *A. mucinophilia* ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p:0,009$).

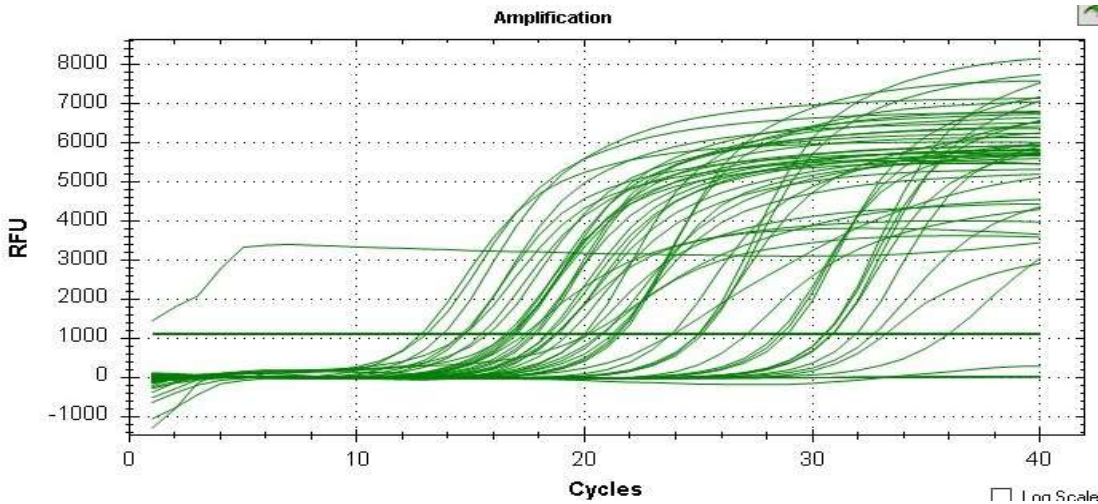
A.



B.

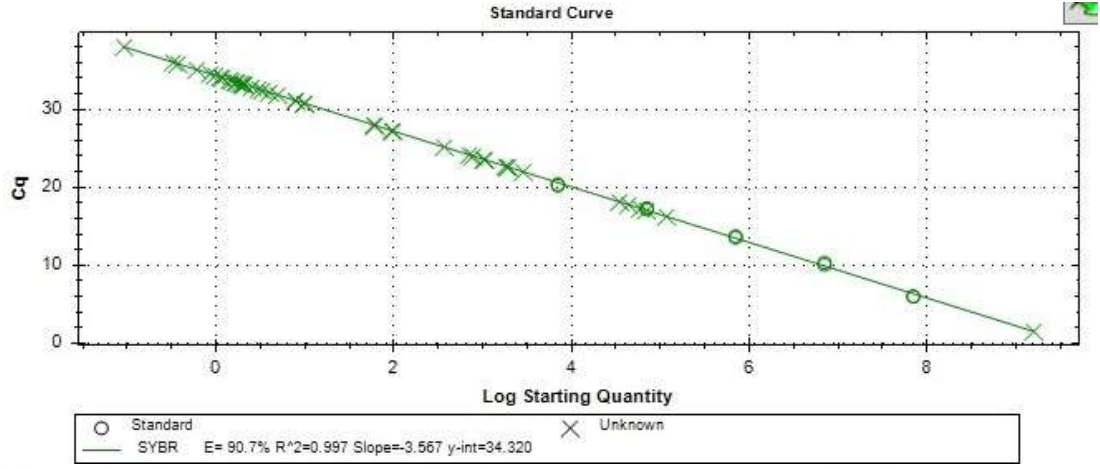


C.

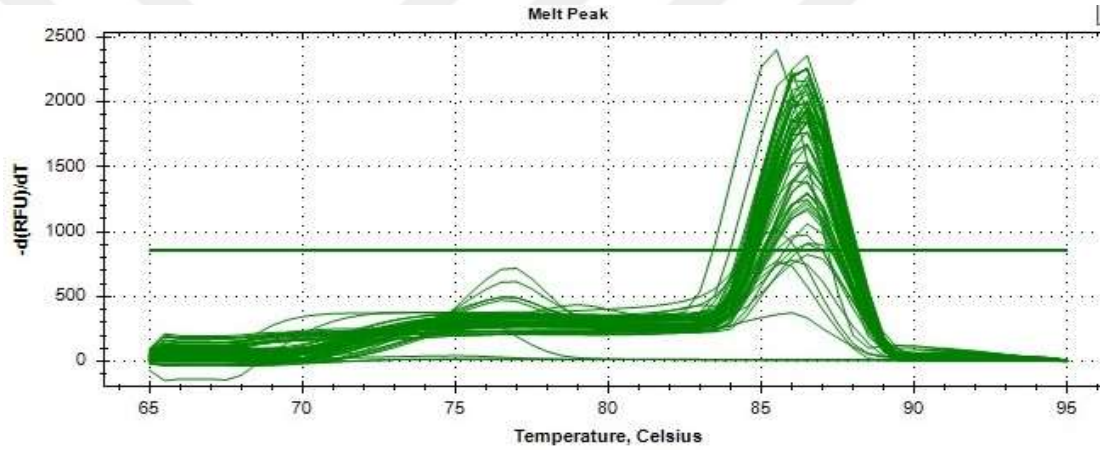


Şekil 18. *B. fragilis* için A. Standart eğri, B. Erime eğrisi, C. Amplifikasyon eğrisi

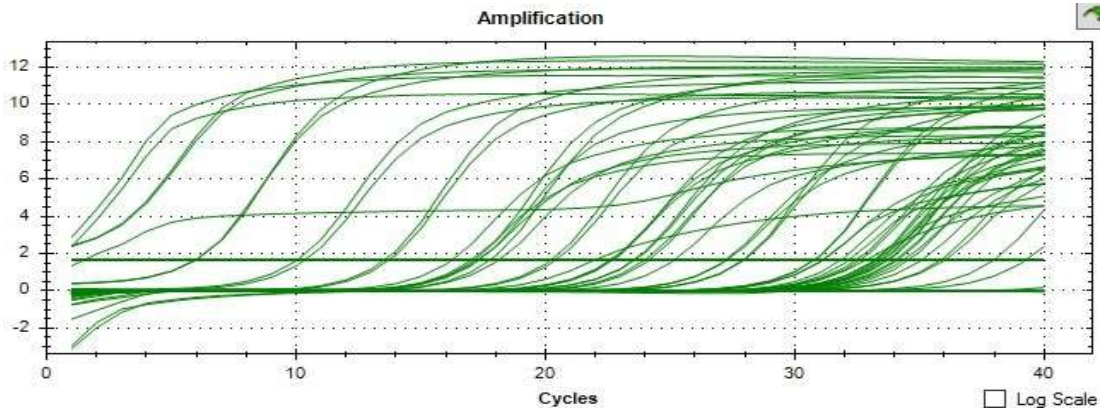
A.



B.



C.



Şekil 19: A. *mucinophila* için A. Standart eğri, B. Erime eğrisi, C. Amplifikasyon eğrisi

5. TARTIŞMA

İBH, küresel bir halk sağlığı sorunu oluşturan kronik inflamatuvar hastalık grubudur. Batı ülkelerinde prevalansı ve özellikle de sanayileşmiş ülkelerde insidansı hızla artmaktadır. Etiyoloji ve patogenezi tam olarak bilinmemekle birlikte genetik ve bağırsak mikrobiyotası gibi çevresel faktörler suçlanmaktadır. İnflamasyonla ilişkili olan bağışıklık sistemi ve lümen içindeki mikroorganizmalar ince bir epitel tabakası ile birbirinden ayrılmıştır. Bu durum göz önüne alındığında, İBH etiopatogenezi mikrobiyotayı düşünmemek imkansızdır. Ancak yine de, bu disbiyozisin inflamasyonun bir sebebi mi, yoksa bir sonucu mu olduğu açık değildir. Gastrointestinal sistemde bulunan mikroorganizmalar hem sağlık hem de hastalık durumunda birbirleri ve konak ile etkileşim halinde bulunmaktadır. Mikroorganizmaların hayatta kalması, gelişmesi ve ölümü; diyet, antibiyotik kullanımı ve bağırsak iltihabı gibi çevresel durumlardan etkilenmektedir. Bu nedenle, bazı mikroorganizmaların varlığı veya yokluğu, varsa yoğunluk miktarı hastalık gibi bazı durumların biyobelirteçi olabilmektedir. Mikroorganizmalar birçok işleve sahiptir. Biyoaktif moleküler salgılar, ekzojen veya endojen molekülleri dönüştürürler ve çeşitli reseptörler ile hücre reseptörleri tarafından algılanırlar. Yani İBH patogenezi bakteriler kadar metabolitleri de rol oynamaktadır.

Yapılan çalışmalar, aktif hastalığı olan İBH hastalarında sağlıklı kontroller ile karşılaştırıldığında *Faecalibacterium prausnitzii* gibi aerobik ve anaerobik kommensal bakterilerin azaldığını; *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Proteus* ve mantarlar gibi potansiyel olarak patojenik mikroorganizmalarda bir artış olduğunu göstermektedir. Çalışmalar ayrıca *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* cinslerinde önemli bir azalmanın yanı sıra, İBH hastalarının bağırsaklarında *Bacteroides*'te bir artış olduğunu göstermektedir. *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* prevalansının azalması, İBH'nin etiyojisinde önemli bir rol oynayabilir. Çünkü bu bakterilerin immünoregülatör etkileri vardır ve bu nedenle bağışıklık sistemi ile etkileşimde bulunarak bağırsak konakçı savunmalarına katkıda bulunurlar

(315). Aktif hastalığı olan İBH hastalarının bağırsaklarında bütirat üreten bakterilerin prevalansının azalması, bütirat seviyelerinin azalmasına yol açar. Bütirat, epitelyal bariyer bütünlüğünün bir güçlendiricisi, bağırsak mukozasında proinflamatuvar sitokin ekspresyonunun bir inhibitörü ve ayrıca müsin ile antimikrobiyal peptit üretiminin bir uyarıcısı olarak işlev görür. Bu nedenle bütiratın azalması İBH'yi kötüleştiren bir durumdur (315). Wills ve ark., ÜK hastalarına kıyasla CH hastalarında remisyon ve alevlenme arasındaki bakteriyel topluluk kompozisyonunda daha büyük değişiklikler olduğunu bildirmişlerdir (316). Hansen ve ark., yeni tanı konulan pediyatrik CH hastalarında *Faecalibacterium prausnitzii*'de bir artış ve bakteri çeşitliliğinde bir azalma olduğunu göstermişler ancak, bu değişiklik ÜK hastalarında gözlemlenmemiştir (317). Fyderek ve ark., CH'li hastaların iltihaplı mukozasında *Streptococcus spp.* türlerini, ÜK hastalarında ise *Lactobacillus spp.* türlerini baskın olarak bulmuşlardır. Her iki hastalık grubunda da *Bifidobacterium spp.* türlerini az sayıda gözlemlemişlerdir (318). Forbes JD ve ark., iltihaplı ÜK mukozasında *Proteobacteria* ve *Firmicutes* grubu bakterilerin daha sık olduğunu bulmuşlardır. İltihaplı CH mukozasında *Bacteroidetes* ve *Fusobacteria* grubu bakterilerin seviyelerinde bir artış gözlemlemişlerdir (319). Hintli popülasyon üzerinde yapılan bir çalışmada Kabeerdoss ve ark., CH'li hastalara kıyasla ÜK hastalarında *Bacteroides* ve *Lactobacillus* konsantrasyonu daha yoğun olarak bulmuşlardır (320). Vrakas ve ark., yaptıkları çalışmada *E. coli* oranlarının aktif CH ve ÜK'de sayısal olarak daha yüksek olduğu, ancak sağlıklı kontrollere kıyasla anlamlı bir fark olmadığını bulmuşlardır. *Lactobacillus spp.* ve *Bifidobacterium spp.* CH ve ÜK hastalarında oranları düşük oranda olup sağlıklı kontrollerle karşılaştırılabilir düzeydeydi. Buna karşılık, *Bacteroides spp.* oranları aktif CH'de, inaktif CH, inaktif ÜK ve kontrollere göre daha yüksekti. Aktif ve inaktif İBH hastalarında *F. prausnitzii* oranları kontrol grubuna göre daha düşüktü (321).

Bu çalışmada, İBH immünoptogenezinde rolü olabilecek sekiz bakterinin varlığı ile birlikte yoğunluğunu, hasta ve sağlıklı kontrolleri

kıyaslayarak tespit etmeyi amaçladık. Bu amaçla Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Gastroenteroloji bölümüne başvuran ve çalışmaya katılmayı kabul eden 22 hasta ve 22 sağlıklı kontrollerden gaita örnekleri alındı. Çalışmaya dahil olan hastaların demografik bilgileri de değerlendirmeye alındı.

İnflamatuvar bağırsak hastalığı olanların tanısı ve takibinde birçok laboratuvar belirteçleri kullanılmaktadır. Bunlardan en sık kullanılanları lökosit sayısı, CRP ve ESH gibi belirteçlerdir. Ancak İBH'de bunların duyarlılık ve özgüllükleri düşüktür (322). Örneğin CRP, sağlıklı bireylerde oldukça düşük düzeylerde bulunur (<1 mg/L). Serum düzeyleri inflamasyonun başlamasından 6-8 saat sonra yükselmeye başlar (323). Çalışmada, Tablo 10'da da görüldüğü gibi, hem ÜK hem de CH hastalarında CRP ortalamaları yüksek olarak bulunmuştur. ESH, yaşla birlikte farklılık göstermekle birlikte, sağlıklı erişkinlerde normal değerleri <20mm/saat olarak ölçülmektedir (324). Hastalarımıza ait ESH değerlerinin ortalaması; ÜK için 35,9; CH için ise de 41,3 olarak ölçülmüştür.

İBH'de inflamasyonun başlamasında bağırsak bakterileri rol oynamaktadır. Normal florada bulunan patojen olmayan bağırsak bakterilerinin muhtemelen inflamasyondan sorumlu olmadıkları düşünülmektedir. Ancak, özellikle *E.coli* gibi kommensal bakterilerin virulansının artması ile patojenik immün tepkiler uyarılabilmektedir. Patojenitenin artması ile bağırsak permeabilitesi artmakta, mikrobiyota içeriği değişmekte ve pro-inflamatuvar etkiden sorumlu gen ekspresyonu düzenlemektedir. Bu durumda inflamatuvar süreç başlamakta ve kolit meydana gelmektedir. Bu bulgular İBH'li hastalarda oluşan kolitin nedeninin bağırsak bakterileri ile birlikte bireyin genetik yatkınlığında önemli olduğunu düşündürmektedir (325). NOD2/CARD15 geni, defensin üretimi gibi doğal bağışıklık sistemi ile ilgilidir. Bu gendeki kusurlar konağın mikroorganizmalara karşı daha duyarlı olduğunu göstermektedir. Yapılan çalışmalar NOD2/CARD15 geninde mutasyon tespit edilen CH hastalarının invaziv

bakterilere karşı doğal bağışıklık tepkisini saptamıştır. NOD2 gen ifadesi, invaziv *E.coli* gibi virülan bakterilerin temizlenmesinde rol oynar. CH'de, *E.coli*'nin gastrointestinal sistemi, konakçı bağırsak epitel hücrelerini ve makrofajlarını anormal olarak kolonize etmesi; NOD2 ve doğuştan gelen bağışıklık sürveyans mekanizmasında bir disfonksiyonu sonucu kaynaklanmış olabilir (326).

E. coli'nin İBH hastalığının başlamasının olası bir nedeni olabileceği 1970'li yıllardan bu yana düşünülmektedir. Özellikle hastalığın nöksleri sırasında izole edilen *E. coli* suşlarının sayısı ve virülanslarının sağlıklı kontrollere göre arttığı bulunmuştur (315). 1978'de Keighley ve ark., CH hastalarında bağırsak bakteri konsantrasyonlarında özellikle *E. coli* suşlarında dramatik bir artış olduğuna dair gözlemlerini bildirmişlerdir (327). Darfeuille-Michaud ve ark., CH hastalarının ileal biyopsi örneklerinden izole edilen *E. coli* prevalansının arttığını göstermişlerdir (289). Bu bulgular, *E. coli*'nin CH'deki inflamatuvar süreçlerin başlamasına katılabileceğini düşündürmektedir. Martin ve ark., CH'si olan hastalardan elde edilen kolonik biyopsi örneklerinde mukoza ile ilişkili Gram negatif bakterilerin arttığını göstermişlerdir. Bu bakterilerden de %73'ü *E. coli* olarak tanımlanmıştır (328).

CH'nin histolojik özelliklerinden biri, bağırsağın epiteloid granülomatöz inflamasyonunun varlığıdır. İnvaziv *E. coli*, lenfositlerin toplanmasıyla birlikte çok çekirdekli dev hücreler oluşturarak aynı histolojik özelliğe sahip inflamasyona neden olur. CH hasta biyopsisi veya rezeksiyon örneklerinin %57'sinde *E. coli* antijenleri tespit edilirken; ülserlerin altında ve granülomlarda bulunan lamina propria içindeki makrofajlarda, mezenterik lenf düğümlerinin germinal merkezlerinde ve dev hücrelerde *E. coli*'ye karşı poliklonal antikolar tespit edilmiştir (329, 330). Schussler ve ark. 1976'da, CH hastalarında *E. coli*'nin lipit A ve O antijenlerine karşı antikor titrelerinin, sağlıklı kontroller ve ÜK gruplarındakilerle kıyaslandığında anlamlı bir yükselme gösterdiğini ve bu nedenle, CH ve ÜK'yi ayırmada biyobelirteç

olarak kullanılabileceğini söylenmişlerdir (331). Bizim çalışmamızda da Schussler ve ark.'nın bulgularının aksine, *E.coli* miktarı CH hastalarında ÜK hastalarından daha yüksek olarak tespit edildi.

Burke ve Axon, ÜK hastalarının dışkısından izole edilmiş *E. coli* suşlarının, hem enterotoksijenik hem de enteropatojenik özelliklere sahip olduğunu göstermişlerdir (332). Yapılan başka bir çalışmada ise, aktif ÜK hastalarından alınan rektal biyopsi veya fekal örneklerin bakteriyolojik analizinde *E. coli* suşlarının sayısının arttığı gösterilmiştir (333). ÜK ile ilişkili *E. coli* suşunun, dendritik hücrelerde hücre ölümünü indüklediği, TNF- α , IL-6 ve IL-23 sitokinlerinin salınımını uyardığı bildirilmiştir (328). Darfeuille-Michaud ve ark.'nın yapmış olduğu çalışmada belirtildiği gibi *E.coli* grubunda pro-inflamatuvar özelliğe de sahip olan, entero invaziv *E. coli* (EİEC) 'dir. Sağlıklı bireylerde EİEC kolonizasyonunun oranı %6 bulunurken, CH olan bireylerde bu oran %38 olarak bulunmuştur (289).

Bizim çalışmamızda ise, hasta ve kontrol gruplarının karşılaştırılmasında *E. coli* bakteri yoğunluğu mevcut literatür bulguları aksine istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0,652$). Bu bulgu, *E. Coli*'nin İBH patogenezindeki rolünü sorgulamamıza neden olmuştur. Çalışmamızda *E. coli* bakterisinin EİEC özelliğine bakılmamıştır. Bu durum *E. coli* ile ilgili bulgularımızın mevcut literatür bulguları ile farklılığını açıklamaktadır. Bu nedenle *E. coli*'nin İBH'de inflamasyona olan katkısını anlamak için, EİEC subtiplerinin de saptanmasının gerekli olduğu düşünülmüştür.

Bacteroides, kolonda en bol bulunan mikroorganizma gruplarından biridir. 16SrRNA sekanslaması kullanılarak yapılan son taksonomik çalışmalar, *Bacteroides* filumunu yeniden tanımlamıştır. *Bacteroides*'ler 12 türden oluşur, ancak bu türlerin bazılarının taksonomik pozisyonu hala değişmektedir. *Bacteroides fragilis*, tüm *Bacteroides* türlerinin yaklaşık %0,3'ünü içermesine rağmen, diğer *Bacteroides* türlerine göre hastalığa neden olma olasılığı daha yüksektir. *B. fragilis*, alt gastrointestinal sistemin,

bazı anaerobik bakterilerden daha aerotoleran olan kommensal anaerobik bakterisidir. Bu hareketsiz Gram negatif çomaklar, anaerobik şartlarda 48 saatlik inkübasyondan sonra yaklaşık 1 ila 3 µm çapında düz gri kolonileri oluştururlar. En önemli bir virülans faktörü, antifagositik özelliğe sahip abse oluşumuna neden olabilen polisakkarit kapsülleridir. Lipopolisakkaritleri, zayıf endotoksin aktivitesine sahiptir. *B. fragilis*, glikoz, laktoz, sükroz, maltoz ve ksilozu fermente eder. Aynı zamanda eskulin'i de hidrolize eder. *B. fragilis*, kolajenaz, hiyalüronidaz, DNA'az, heparinazı ve nöraminidaz gibi bir dizi hücre dışı enzimleri de üretmektedir (334).

B. fragilis, enterotoksijenik olmayan *B. fragilis* (NTBF) ve enterotoksijenik olan *B. fragilis* (ETBF) olarak adlandırılan iki farklı alt tipe ayrılmıştır. Yapılan son çalışmalarda, ETBF, hayvanlarda, çocuklarda ve erişkinlerde diyare hastalığına neden olması nedeniyle patojen olarak tanımlanmıştır. Diğer taraftan NTBF suşları, kolonik iltihaplanmayı bastırma potansiyelleri nedeniyle probiyotik olarak da önerilmektedirler (335). *B. fragilis* tarafından üretilen ve immünomodülatör etkili bir molekül olan polisakarit A, bağırsak dokusunda TLR-2 aracılığı ile anti-inflamatuvar immün tepkiye neden olur. *B. fragilis*'in, anti-inflamatuvar bir sitokin olan IL-10 üretimini indükleyerek Treg hücrelerini indüklediği ve kolit gelişimine karşı koruyucu rol oynadığı gösterilmiştir. Bu çalışmaların sonuçları *B. fragilis*'in anti-inflamatuvar etkisinin, kolitten korunmada önemli olduğunu göstermektedir (336). İBH'nin aktif hastalık veya nükslerle birlikte olduğu durumda ETBF varlığının artmış olduğu görülmektedir. ETBF kolonizasyonunun, epitel bariyer fonksiyonu bozulmuş bazı İBH hastalarında bu fonksiyonu daha da bozarak hastalığın nüksüne sebep olduğu görülmüştür (334). Prindiville ve ark., İBH hastalarının mikrobiyota profillerini kontrol grubu ile karşılaştırmış ve ETBF'nin, İBH'li hastalarda anlamlı olarak daha sık olduğunu bildirmişlerdir (337). Deng ve ark., *B. fragilis*'in immün dengenin sağlanmasında, mental hastalıklarda ve inflamatuvar hastalıklarda tedavi edici etkisini bildirmişlerdir (338).

Çalışmamızda, *B. fragilis*'in hasta ve sağlıklı kontrollere ait gaita örneklerindeki yoğunluğuna bakıldığında, kontrol grubunda hasta grubuna göre daha yüksek ve istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (0,033). Çalışmamızda ETBF ve NTBF ayırımı yapılmamıştır. Hasta grubunda *B. fragilis* yoğunluğunun kontrollere göre düşük bulunmasını nedeni olarak izole edilen türlerin NTBF olabileceği düşünülmüştür. Çalışmamızda *B. fragilis* yoğunluğu, ilginç olarak aktif döneminde bulunan hastalara kıyasla remisyon döneminde bulunan hastalarda daha yüksek bulunmuştur. Bu bulgu hastalardaki inflamasyonun artmasının *B. fragilis* yoğunluğunun azalması ile ilgili olabileceğini düşündürmüştür.

Bacteroides cinsi içinde sınıflandırılan *Prevotella*, zorunlu anaerobik gram negatif çubuk şeklinde bir bakteridir. Kan agarda gri, açık kahverengi veya siyah renkte parlak ve pürüzsüz koloniler oluşturduklarından “siyah pigmentli bakteri” olarak isimlendirilmektedirler. Gelişmesi için hemin ve menadione ihtiyaç duyarlar. Amino asiti fermante etme yetenekleri sınırlıdır. *Prevotella*, ağız boşluğu, üst solunum yolu, ürogenital sistem, gastrointestinal sistem ve insan dışkısı gibi çeşitli bölgelerde gözlenen çok yönlü bir bakteridir. Ağız boşluğundan izole edilen birçok *Prevotella* taksonu potansiyel fırsatçı patojenlerdir. *Prevotella* suşları, sağlıklı insan florasında yaygın olarak bulunur ve bazı suşlarının fırsatçı endojen enfeksiyonlara yol açtığı bildirilmiştir. *Prevotella intermedia*, *Prevotella dentalis*, *Prevotella denticola* ve *Prevotella melaninogenica*'nın çok çeşitli durumlarda patojenik olduğu ve konakçı dokulara saldırdığı bilinmektedir. *Prevotella intermedia*'nın uzun süredir periodontal hastalıklar, periapikal periodontitis ve akut gangrenöz hastalık ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Oral hastalıklara ek olarak, *Prevotella intermedia*'nın solunum yolunda kistik fibroz ve kronik bronşit ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (307). Son yapılan çalışmalar *Prevotella* yoğunluğu ve spesifik suşlarının Th17 immün yanıt ile ilişkili inflamatuvar hastalıklarla ilişkili olabileceğini göstermiştir (339). Proteaz veya peptidaz, *Prevotella intermedia*'nin başlıca virülans faktörlerinden biridir. Bu faktörlerin konak dokusunun bozulmasındaki rollerinin yanı sıra inflamatuvar hastalıklar da

dahil olmak üzere çeşitli patolojilerde yer alan sinyal yolunun da önemli bir parçasıdır (307). Bir araştırmada, Nucleotide-binding and oligomerization domain-Like Receptor P6 (NLRP6) iltihabının bağırsak homeostazında ve farelerde deneysel koliti tetikleyen *Prevotella* açısından zengin disbiyozdan korunmasında rol oynadığı gösterilmiştir. NLRP6 eksikliğinin bağırsak yüzeyinde goblet hücresi işlev bozukluğuna ve azalmış mukus sekresyonuna neden olduğu bulunmuştur (340). NLRP6 defekti bulunan farelere *Prevotella* açısından zengin disbiyozisli gaita verildiğinde kolitin tetiklendiği görülmüştür. İBH'de *Prevotella*'nın rolü, farelerde deneysel kolit varlığı ile gösterilse de, insanlarda şu anda *Prevotella* yoğunluk artışı ile hastalık arasındaki ilişki kesin olarak gösterilmemiştir. Aksine Lewis ve ark.'nın yaptığı bir çalışma, pediatrik CH hastalarında *Prevotella*'nın azaldığını göstermiştir (341). Ayrıca, Gevers ve ark.'nın yapmış olduğu kapsamlı bir çalışma da, *Prevotella* ile tedaviye henüz başlanılmamış olan yeni tanılı CH hastaları arasında bir ilişki bulunamamıştır (342).

Çalışmamızda hasta ve kontrol grubu arasında *P. intermedia* açısından anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p=0,551$). Ayrıca çalışmamızda üç kontrol ve iki hasta olmak üzere toplamda beş hastada *P. intermedia* pozitif bulunmuştur (Tablo 11). Bu durumda, bu bakterinin hastalık ile ilişkisi vardır veya yoktur demek mümkün değildir. Ancak pozitif bulunan iki hastanın hastalığının aktif döneminde olması dikkat çekicidir. Her ne kadar *P. intermedia* pozitif hasta sayısının az olması, yorum yapmamızı kısıtlayan faktör olsa da sadece aktif hastalarda görülmüş olması *P. intermedia*'nın hastalık patogenezinde rol oynayabileceği konusunda ipucu vermektedir.

İBH'ye karşı koruyucu rol oynayabilecek spesifik bağırsak bakteri grupları da vardır. *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* ve *Faecalibacterium* cinslerinin de içinde bulunduğu bu bakterilerin, anti-inflamatuvar sitokin uyarılması ve inflamatuvar sitokinlerin baskılanması gibi çeşitli mekanizmalar yoluyla konağı mukozal inflamasyondan koruduğu gösterilmiştir.

Fecalibacterium prausnitzii'nin anti-inflamatuvar özelliklere sahip olduğu gösterilmiştir. Ancak, İBH'de yeterince bulunmadığı görülmüştür (343).

F. prausnitzii, *Firmicutes* filumuna aittir ve *Clostridium leptum* grubunun ana bakterisidir. Son çalışmalar *F. prausnitzii*'nin insan bağırsak mikrobiyotasındaki en bol anaerobik bakteriden biri olduğunu ve dışkıdaki toplam bakterilerin yaklaşık %5'ini oluşturduğunu göstermiştir. *F. prausnitzii*, kolonositlere enerji sağlanmasında ve bağırsak sağlığının korunmasında önemli bir rol oynamaktadır. İn-vitro ve in-vivo çalışmalar *F. prausnitzii*'nin güçlü bir anti-inflamatuvar etkisinin olduğunu ve eksikliğin inflamasyonu tetikleyebildiğini göstermiştir. Özellikle, ÜK hastalarında hastalık aktivitesi ile *F. prausnitzii* sayısı arasında anlamlı bir ters korelasyonun olduğu gösterilmiştir. İBH hastalarının dışkı örneklerinde *F. prausnitzii* seviyesi düşük bulunmuş özellikle hastalığın aktivite olduğu dönemde bu düzeyin çok daha düşük olduğu görülmüştür (344). Willing ve ark., CH'li hasta örneklerinin ileal biyopsilerinde *E. coli*'nin sayıca arttığını, *F. prausnitzii*'nin ise önemli ölçüde azaldığını bildirmiştir (345). Sokol ve ark., ise mukozasında düşük miktarda *F. prausnitzii* olan CH hastalarının ameliyat sonrası nüksetme olasılığının daha yüksek olduğunu göstermiştir (346). Wang ve ark., aktif CH hastalarından aldığı biyopsi ve gaita örneklerini karşılaştırmışlar ve dışkı örneklerine göre biyopsi örneklerinde *F. Prausnitzii*'yi daha az sayıda bulmuşlardır (347). *F. prausnitzii*'nin İBH'ye karşı koruyucu etkisinin etiopatogenezi ile ilgili teoriler öne sürülmüştür. Duncan ve ark. *F. prausnitzii* suşlarının glikoz fermantasyonu sonucu nihai ürünlerinin önemli miktarlarının bütirat olduğunu göstermiştir (348). Bütirat, bağırsak fizyolojisinde, patojen istilasına karşı korunmada ve bağışıklık sisteminin modülasyonunda önemli bir rol oynar. Ayrıca bütirat, bağırsak epitel bütünlüğünün korunması için birincil enerji kaynağıdır. Bu nedenle, bütirat, anti-inflamatuvar etkiye katkıda bulunmaktadır. Ek olarak bütirat, histon deasetilaz aktivitesinin inhibisyonu yoluyla inflamatuvar yanıtı inhibe ederek NF-κB aktivitesinin baskılanmasına ve histonların hiperasetilasyonuna neden olabilir (344). Himmel ve ark., *F. prausnitzii*'nin inflamasyonun ilerlemesini kısıtlamak için düşük miktarlarda IL-

12 ve büyük miktarlarda IL-10 üretimini sağladığı için Treg hücrelerini indükleyebildiğini bulmuşlardır (349). Sokol ve ark. ise, *F. prausnitzii*'nin, IL-12 ve IFN- γ üretimini artırdığını bulmuşlardır (350). Lopez ve ark.'nın yaptığı çalışmada *E. coli* sayısında bir azalma olmadan *F. prausnitzii* sayısındaki artmanın uzun bir remisyon süresi ile ilişkili olduğunu gözlemlemiştir. Ayrıca bu çalışmada *E. coli*/*F. prausnitzii* oranının prognostik değer olarak gösterilebileceği ileri sürülmüştür (351).

Çalışmamızda, hasta ve kontrol grupları karşılaştırıldığında *F. prausnitzii* ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0,001$). Kontrol grubunda *F. prausnitzii* sayısı hastalara göre yüksek bulunmuştur. Sonuçlarımız literatürdeki diğer çalışmalar ile uyumludur. Aktif hastalarla remisyon dönemindeki hastalar kıyaslandığında *F. prausnitzii*'nin sayısının remisyon döneminde olanlarda yüksek saptanmıştır. Bu bulgu *F. prausnitzii*'nin remisyondaki hastalarda inflamasyonu engelleyebildiği şeklinde yorumlanmıştır.

Gastrointestinal sistemde *Firmicutes* filumunda bulunan hakim türler *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Veillonella*, *Staphylococcus* ve *Bacillus*'tur (352). *Lactobacillus*, gastrointestinal sistem bakterilerinin %1'inden daha azını oluşturan, Gram-pozitif, katalaz-negatif, sporsuz, 25'ten fazla tür içeren basillerdir. Bu bakteriler insanların %70'inden fazlasında bağırsak florasında ve özellikle batı tarzda diyetle beslenen insanlarda tespit edilmiştir. Yenidoğan gaitasında *Lactobacillus* miktarının dışkı gramında 10^5 cfu/g olduğu görülürken, 1 aylık ve daha büyük bebeklerde sayım dışkı gramında 10^6 - 10^8 cfu/g arasında değişmiştir (353). Beslenmenin başlaması ile bebeğin bağırsak florası değişmektedir. Anne sütü de bağırsak florasını değiştiren önemli faktörlerden biridir. Anne sütü, prebiyotik etkisi ile *Bifidobacterium spp.* ve *Lactobacillus spp.* bakterilerinin büyümesini uyarır ve bağırsağın mikrobiyal kompozisyonunun seçici olarak değiştirilmesinde rol alır (354). Sağlıklı bir insanda *Lactobacillus spp.*'nin bağırsak mikrobiyotasında dışkı gramında yaklaşık 10^6 - 10^7 cfu/g bulunduğu gösterilmiştir. *L. reuteri*, *L.*

johnsonii, *L. acidophilus*, *L. delbrueckii*, *L. casei*, *L. Rhamnosus*, *L. gasseri*, *L. paracasei*, *L. plantarum*, *L. brevis* ve *L. fermentum* türleri mikrobiyotada bulunan önemli türler olarak bildirilmiştir (355). İnsan bağırsak mikrobiyotası, *Lactobacillus* probiyotik suşlarının sıklıkla izole edildiği bir kaynaktır. İnsan bağırsak mikrobiyotasından izole edilen altı probiyotik *Lactobacillus* suşu (*L. rhamnosus*, *L. casei*, *L. casei*, *L. johnsonii*, *L. acidophilus* ve *L. reuteri*), başlıca gastrik ve enterik patojenlere karşı potansiyel antimikrobiyal etkileri bakımından kullanılmaktadır (356).

Bakterilerde, 'quorum sensing (QS)' olarak adlandırılan hücreler arası bir iletişim ağı bulunmaktadır. Patojen bakterilerde QS molekülleri, virülans faktörlerini kodlayan hedef genlerin ekspresyonunu doğrudan veya dolaylı olarak kontrol eden reseptörlere bağlanır. Bir QS mekanizması, laktik asit bakterileri tarafından bakteriyosinlerin üretimini de düzenler. İlginç bir şekilde, bakteriyosin üretimini kontrol eden *Lactobacillus*-QS moleküllerinin enfeksiyona tepki olarak aktive olduğu bulunmuştur. Ayrıca, bu bileşiklerin bakteriyel patojenlerin virülansının in vitro ve in vivo kontrolünde de rol aldığı bildirilmiştir. Bunun yanı sıra deneysel ve klinik veriler, *Lactobacillus* tarafından üretilen moleküllerin, gastrointestinal enfeksiyonları tedavi etmek için antibiyotiklere alternatif olarak anti-infeksiyöz molekül kaynağı olabileceğini göstermektedir (352). Önceki başka bir çalışmada, *Lactobacillus*'un laktocepin salgılayabildiğini ve pro-inflamatuvar kemokinleri seçici olarak bozarak anti-inflamatuvar etki oluşturabileceği gösterilmiştir (357). Mileti ve ark., *Lactobacillus paracasei*'nin kolit gelişiminde gecikme ve hastalığın şiddetinde azalma olduğunu, ancak *L. plantarum* ve *L. rhamnosus*'un kolit gelişimini şiddetlendirdiğini bulmuştur (358).

Crohn hastalığı olan hastaların bağırsaklarında *Lactobacillus spp.* ve *Bifidobacterium spp.* bakterilerinin azaldığı gözlenmiştir. *Lactobacillus* türlerinin probiyotik olarak kullanıldığı İBH'li hastalarda, bağırsak iltihabını iyileştirici etkileri olduğu görülmüştür. CH olan çocuklara *Lactobacillus rhamnosus* 4 hafta süreyle verilmiş ve tedaviye başlandıktan sonra hastalık

indeksinde önemli bir azalma ile sonuçlanmıştır. Dört *Lactobacillus* türünü içeren probiyotik formülasyonlar, İBH ile ilişkili proktitin önlenmesinde ve tedavi edilmesinde etkili bulunmuştur (359). *Lactobacillus casei*'nin, CH'de, pro-inflamatuvar mediatörleri azaltarak *E. coli* tarafından indüklenen pro-inflamatuvar etkileri antagonize ettiği gösterilmiştir. Probiyotik müdahalenin bağırsak iltihabı üzerindeki etkisi; kolonizasyon direncinin iyileştirilmesi, bariyer fonksiyonunun iyileştirilmesi, metabolik etkiler, sinyal iletiminin modülasyonu ve bağışıklık tepkileri dahil olmak üzere birçok farklı mekanizmanın sonucu olabileceği ileri sürülmüştür (360).

Çalışmamızda *Lactobacillus spp.* cins düzeyinde incelenmiş ve genel yoğunluğu değerlendirilmiştir. Hasta ve kontrol grupları karşılaştırıldığında kontrol grubunda hasta grubuna oranla daha yüksek bulunmasına rağmen, bu oran istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (0,888).

Wang ve ark.'nın yaptığı çalışmada ise, hem aktif CH hem de aktif ÜK hastalarında sağlıklı kontrollere göre *Bifidobacterium* ve *Lactobacillus* sayısında bir artış gözlemlenmiştir. *Bifidobacterium* oranı, aktif ÜK hastalarında aktif CH hastalarına göre daha yüksek bulunmuştur. Remisyondaki İBH hastalarında ise, *Bifidobacterium* ve *Lactobacillus* bakterileri, aktif İBH hastalarına göre azalmış olarak tespit edilmiştir. Ayrıca sağlıklı kontrollere kıyasla, aktif İBH hastalarında artmış *Bacteroides* eğilimi gözlemlenmiş, ancak anlamlı bir fark saptanmamıştır. Ayrıca, *Bacteroides* oranı, remisyondaki İBH hastalarında aktif İBH hastalarına göre daha düşük bulunmuştur. *Firmicutes* filum temsilci bakterilerinden biri olan *F. prausnitzii*, hem aktif ÜK hastalarında hem de aktif CH hastalarında azalmıştır. Remisyondaki İBH hastalarında *F. prausnitzii* artmış, ancak aktif İBH hastalarına kıyasla anlamlı bir fark gözlenmemiştir. *Gammaproteobacteria*'da en bol bulunan bakteri olan *E. coli*, hem CH hem de ÜK hastalarında artmıştır (361).

Bifidobacteria, *Actinobacteria* filumuna ait Gram-pozitif, anaerobik, sakkarolitik bakterilerdir; bunlar esas olarak memelilerin, kuşların ve böceklerin gastrointestinal sisteminde görülür, ayrıca anne sütü, fermente süt, peynir ve kefir gibi bazı gıdalarda da bulunmaktadır. *Bifidobacteria* genomu 2,0 ila 2,8 Mb arasında değişen ortalama bir boyuta sahiptir ve karbonhidrat sindirimi için gerekli olan genleri içermektedir. *Bifidobacterium*, gastrointestinal sistemi kolonize eden ve yaşamın ilk 12 ayında kolonda en yüksek oranlarına ulaşan (özellikle vajinal yolla doğan ve emzirilen bebeklerde toplam kolon mikrobiyotasının %90'ına kadar) ilk bakteriler arasındadır. Bu bolluk zaman içinde yetişkin bireylerde önemli ölçüde (<% 5) düşer ve yaşlılarda daha da azalır. Genel olarak, *B. bifidum* ve *B. longum* bebeklerde baskın türken, *B. adolescentis* ve *B. longum* yetişkin bağırsak mikrobiyotasına hakimdir. *Bifidobacterium*'ların temel görevlerine örnek olarak B vitaminleri, antioksidanlar, polifenoller ve konjuge linoleik asitlerin üretimi; bağışıklık sisteminin olgunlaşması ve bağışıklık homeostazının korunması; bağırsak bariyer fonksiyonlarının korunması; bakteriyosin üreterek, asit üretimi ile lüminal pH'ı azaltarak ve bağırsak mukozasına yapışmayı engelleyerek patojenlere karşı koruma sayılabilir. Bir başka önemli işlevi ise, karbonhidrat fermantasyonu ile diğer kolon bakterileri tarafından bütirat haline dönüştürülecek olan asetat ve laktat üretimidir (362, 363).

Bifidobacterium ve *Lactobacillus* (veya bu grupların en azından bazı üyeleri) bazı yazarlar tarafından İBH'ye karşı koruyucu olarak kabul edilmiştir. Seksik ve ark.'nin yaptığı çalışmada *Bifidobacterium* düzeyinin CH'de azaldığı ve bu azalmanın sadece inaktif hastalığı olan hastalarda anlamlı olduğu belirtilmiştir (364). *Bifidobacterium* türlerinin CH'ye karşı koruyucu rolü ile ilgili çalışmalar devam ederken, Campieri ve ark. da, dört *Bifidobacterium* suşunu içeren probiyotikler ile yaptıkları bir çalışmada, ameliyat sonrası CH nüks riskinin azaldığını bildirmiştir (365). Merwe ve ark., hastaların dışkılarında *Bifidobacterium*'u önemli ölçüde azalmış olarak bulmuştur. Benzer bir gözlem, Giaffer ve ark. tarafından da bildirilmiştir (366, 367). *Bifidobacterium*, bağırsak mikrobiyotası dengesini korumada önemli bir rol

oynadığı için konakçı için yararlıdır. Ayrıca *Bifidobacterium*, kronik inflamasyona neden olan patojenik bakterilerin büyümesini engeller. Son zamanlarda CH için alternatif tedavi seçeneğini olarak *Biifdobacterium* büyümesini teşvik eden fruktooligosakkaritler veya laktuloz gibi sindirilemeyen oligosakkaritlerin oral yoldan verilmesi önerilmektedir (368).

Çalışmamızda *Bifidobacterium spp.* cins düzeyinde incelenmiştir. Hasta ve kontrol grupları kıyaslandığında *Bifidobacterium spp.* hastalara oranla kontrol grubunda diğer literatür bulgularına benzer şekilde yüksek bulunmuştur ve bu verilerin ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır (0,046). Aynı zamanda hasta grubu içinde remisyon döneminde bulunan hastalarda, aktif dönemde olan hastalara kıyasla daha fazla *Bifidobacterium spp.* yoğunluğu bulunmaktadır. Bu da bize, *Bifidobacterium spp.* türü bakterilerin inflamasyondan koruyucu etkisini göstermektedir.

Fusobacterium nucleatum, oral kavitede bulunan anaerobik, komensal ve çok çeşitli insan hastalıkları ile ilişkili periodontal bir patojendir. Bu bakteri ağız florası dışında seyrek olarak görülmektedir. *F. nucleatum*, beş yaygın alt türü olan (*F. nucleatum animalis*, *F. nucleatum fusiforme*, *F. nucleatum nucleatum*, *F. nucleatum polymorphum* ve *F. nucleatum vincentii*), hastalıklarda prevalansı değişiklik gösteren heterojen bir türdür. Oral hastalıklar dışında kolorektal kanser, inflamatuvar bağırsak hastalığı ve apandisit gibi gastrointestinal hastalıklarla da ilişkisi düşünülmektedir (369). *F. nukleatum* ağız florasında oldukça yaygın bulunmasına rağmen, bağırsakta genellikle daha düşük seviyededir. Ancak İBH olanlarda miktarı artar ve diyet gibi faktörlerle modüle edilebilir. Diğer bağırsak bakterileri ve metabolitleri ile birlikte *F. nucleatum*, invaziv ve pro-inflamatuvar özellikleri nedeni ile İBH etiyojisine katkıda bulunabilir. Strauss ve ark.'nın yaptığı çalışmada İBH ve sağlıklı kontrollerden alınan biyopsi örnekleri karşılaştırılmıştır. Bu çalışma sonucunda kontrollere göre İBH hastalarında *Fusobacterium spp.* daha yoğun olarak bulunmuştur. Tür bazında ise en çok *F. nucleatum*'un görüldüğü bildirilmiştir. Ancak klinik olarak aktif hastalığı

bulunanlarda anlamlı bir fark görülmemiştir. Ayrıca bu çalışmada hastalardan izole edilen *F. nucleatum* suşlarının virulansının yüksek olduğu bildirilmiştir (370). Pascal ve ark.'nın CH üzerinde yaptığı çalışmada *Fusobacterium* ve *E.coli*'nin yoğunluğunu hastalarda artmış olarak bulmuşlardır (371).

Çalışmamızda, kontrol ve hasta gruplarında *F. nucleatum* ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur ($p=0,598$). Hastalarda belirgin bir artış saptanmamıştır. *F. nucleatum*'un pro-inflamtuvar etkisi nedeni ile İBH patogenezinde rol alabileceğini söyleyen çalışmaların aksine bizim çalışmamızda herhangi bir ilişki tespit edilememiştir.

Akkermansia muciniphila, *Verrucomicrobia* filumunda bulunan Gram negatif bir bakteridir. *A. muciniphila*, gastrointestinal sistemin mukus tabakasını kolonize eder ve fekal mikrobiyotanın %1-4'ünü oluşturur. Anaerobik bir bakteri olarak kabul edilir, ancak yeni çalışmalara göre, atmosferik oksijene maruz kaldığında da canlılığını yitirmediği gösterilmiştir. Böylece aerotoleran bir anaerobik bakteri olarak tanımlanmıştır. Müsin metabolizması ve mukus tabakasının kalınlığı üzerindeki etkisi nedeniyle, *A. muciniphila*'nın bağırsak bariyeri fonksiyonunda önemli bir rolü olduğu düşünülmektedir. İBH'de bariyer fonksiyonlarında bir azalma ile birlikte hem aktif hastalıkta hem de remisyon sırasında *A. muciniphila* miktarının azaldığı görülmüştür. Reunanen ve ark., *A. muciniphila*'nın in vitro olarak kolon hücrelerinde Caco2 ve HT-29 üzerindeki etkilerini incelemişler ve bu bakterilerin epitelyuma yapışma ve bağırsak bariyerini güçlendirme kapasitesini vurgulamışlardır. Aynı çalışmada, *A. muciniphila*'nın, IL-8 üretimini uyaran zayıf bir pro-inflamatuvar aktiviteye neden olabileceği gösterilmiştir. Bu nedenle, bu bakteri epitelde güçlü bir inflamatuvar kaskadı aktive etmediği, ancak mukozaya bağlı bağışıklık sistemini uygun bir seviyede uyardığı düşünülmektedir. Müsin ve bakteriler arasındaki ilişki mikrobiyotaya bağlı olarak değişmekte ve birçok çalışmada müsin bozucu bakterilerin bağırsak hastalıklarının patogenezinde potansiyel bir rol oynadıkları bildirilmektedir. *Akkermansia muciniphila* seviyelerinin, İBH,

obezite, diyabet ve apandisit gibi çeşitli bozukluklarla ters orantılı olduğu gösterilmiştir; ancak immünolojik etki mekanizmaları hakkında çok az bilgi bulunmaktadır (372). Presti ve ark. çalışmalarında İBH ve irritabl bağırsak sendromu olan hasta gruplarının kontrol grupları ile karşılaştırmışlardır. *A. muciniphila* yoğunluğunu İBH hastalarında diğer iki gruba göre daha az olarak tespit etmişlerdir (373). Kump ve ark., ÜK hastalarında fekal mikrobiyota transplantasyonu yapmışlar ve terapötik etkilerini araştırmışlardır. Özellikle *A. muciniphila* ve bazı *Ruminococcaceae* türlerinin etkisine bakmışlar ve çok önemli bir rol oynadıklarını görmüşlerdir. Bu nedenle, fekal transplantasyonda donörlerden spesifik seçimin gerekliliğini ve aynı zamanda alıcı mikrobiyotasında spesifik taksonların varlığı veya yokluğunun önemini vurgulamışlardır (374).

Çalışmamızda yapılan diğer çalışmalara benzer şekilde *A. muciniphilia* oranları hasta grubumuzda kontrollere oranla düşük bulunmuştur. Kontrol ve hasta gruplarında *A. mucinophilia* ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır (p:0,009).

Sonuç olarak çalışmamızda elde ettiğimiz bulgular, *Bifidobacterium spp.*, *A.mucinophilia*, *F.prausnitzii* bakterileri için İBH hastalarında mevcut literatür bulguları ile uyumludur. *Lactobacillus spp.*, *E.coli*, *P.intermedia* ve *F.nucleatum* bakterileri için ise bulgularımız literatürden farklı bulunmuştur. Çalışmamızın literatürde yer alan diğer çalışmalara göre bazı kısıtlılıkları da bulunmaktadır. Bunlardan birisi hasta sayısının yeterli düzeyde olmamasıdır. Her ne kadar power analizinde en az 10 hasta ve 10 kontrol çıkmış olsa da, mikrobiyota gibi kişiden kişiye ve diyetle değişkenlik gösteren bir yapının toplum geneline yansıtılması için daha fazla hasta ve kontrol grubuna yer verilmesi gerekmektedir. Çalışmamızdaki bir diğer kısıtlılık ise, mukoza ilişkili mikrobiyomdan ziyade fekal mikrobiyomun analiz edilmiş olmasıdır. Gevers ve ark., dışkı mikrobiyomunda disbiyozun ölçülmesinde gaitadan yapılan çalışmalarda duyarlılığın daha az olduğunu göstermişlerdir. (375). Bu nedenle gaita mikrobiyom ölçümü ile İBH

patofizyolojisinde kritik bir rol oynayabilecek mukoza ilişkili mikrobiyomdaki değişikliklerin kaçırılması olasıdır. Mikrobiyomdaki mukoza ile ilişkili değişiklikleri anlamak için, bağırsak biyopsileri ile birlikte gaita örneklerini de içeren ek çalışmalara ihtiyaç vardır. Çalışmamızda bir diğer kısıtlılık ise, çalışma metodumuz ile ilişkilidir. Günümüzde disbiyozisi tanımlamak için spesifik bakterilere odaklanmak yerine daha çok yeni nesil sekanslama gibi yöntemler tercih edilmektedir. Ancak maliyet olarak etkin olmamaları nedeniyle bu tür çalışmalar ülkemizde çok nadir olarak yapılabilmektedir.



6.SONUÇ

- Crohn hastalığı ve ülseratif kolit genetik olarak yatkınlığı olan kişilerde, enterik bakterilerdeki disbiyozis ile birlikte aşırı bağışıklık tepkilerinden kaynaklanmaktadır. Mevcut çalışmalar ve bizim çalışmamızda da görüldüğü gibi, agresif ve koruyucu bakteri türlerinin göreceli olarak dengesinin bozulduğu görülmektedir.
- Çalışmamızda İBH hastalarında sağlıklı kontrol grubuna göre, *Bifidobacterium spp.*, *A.mucinophila*, *F.prausnitzii* gibi literatürce anti-inflamatuvar etkinliği kanıtlanmış olan, mikrobiyota içinde yararlı olarak adlandırılan bakteriler azalmış olarak tespit edilmiştir. *Lactobacillus spp.*'de bu yararlı bakteriler grubunda tanımlanmaktadır. Ancak bizim çalışmamızda hasta ve kontrol grupları arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır.
- *E.coli*, *P.intermedia* ve *F.nucleatum* bakterileri ise, İBH hastalarında yapılan çalışmalarda artmış olarak bulunmuş ve hastalık ile ilişkilendirilmiştir. Bizim çalışmamızda bu bakterilerin yoğunluğunda hastalar ve sağlıklı kontroller arasında anlamlı bir fark gözlenmemiş ve ilişki kurulamamıştır.
- *B.fragilis* yoğunluğunun artması, yapılan çalışmaların bir kısmında İBH gelişimine neden olarak gösterilmişken, bazı çalışmalarda ise *B.fragilis*'in azalması hastalık nedeni olarak değerlendirilmiştir. Bizim çalışmamızda *B.fragilis* yoğunluğu sağlıklı kontrollere kıyasla hastalarda düşük olarak saptanmıştır. Literatürde İBH hastalarında *B.fragilis* ile ilgili elde edilen farklı bulgular, patolojik formu olan ETBF ile patojenik olmayan formu olan NTBF'nin yoğunluk farkı ile ilişkilendirilmektedir.

- İBH tedavisinde bağırsak bakterileri arasındaki disibiyozisi düzeltmek bir tedavi seçeneği olabilir. Bu amaçla antibiyotikler kullanılarak seçici olarak doku spektrumu azaltılabilir, agresif bakteri türleri ortadan kaldırılabilir veya lümen ve mukozal bakteri konsantrasyonları global olarak azaltılabilir. Alternatif olarak, probiyotikler, prebiyotiklerin veya kombine probiyotikler ve prebiyotikler (sinbiyotikler) tedaviye eklenebilir. Bu şekilde yararlı bakteriler olan *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* gibi türlerin baskınlığının artırılması sağlanabilir. Bir diğer yeni tedavi metodu ise fekal mikrobiyota transplantasyonudur.
- Çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçların bazı yeni çalışmaların planlanmasında temel oluşturacağını düşünmekteyiz. i) Antibiyotik kullanımının inflamatuvar bağırsak hastalığı gelişimine etkisinin incelemesi ve antibiyotik kullanımı sonrası hastaların şikayetleri ile birlikte mikrobiyotadaki değişikliklerin irdelenmesi; ii) mikrobiyotanın farklı moleküler yöntemler ile değerlendirilmesi ve yöntemlerin karşılaştırması; iii) bireysel alışkanlıkların ve diyetin mikrobiyotayı ne ölçüde değiştirdiği ve hastalığın gelişiminde, önlenmesinde, prognozunda ne gibi değişikliklere yol açabileceğine yönelik çalışmalar örnek verilebilir.

7. KAYNAKLAR

1. Dunne C. Adaptation of bacteria to the intestinal niche: probiotics and gut disorder. *Inflammatory bowel diseases* 2001; 7(2) :136-45.
2. Xu Z, Knight R. Dietary effects on human gut microbiome diversity. *British Journal of Nutrition* 2015; 113 (S1): S1-S5.
3. Tuğ A, Hancı İ, Balseven A. İnsan genom projesi: Umut mu, kabus mu. *Sürekli Tıp Eğitimi Dergisi* 2002; 11(2): 56-7.
4. Ley RE, Peterson DA, Gordon JI. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell* 2006;124(4):837-48.
5. Chow J, Lee SM, Shen Y, Khosravi A, Mazmanian SK. Host–bacterial symbiosis in health and disease. In: *Advances in immunology*. Ed. Fagarasan S, Cerutti A . Volüm 107. Elsevier,2010;243-74.
6. Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, et al. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* 2005; 308 (5728): 1635-8.
7. Zhu L, Liu W, Alkhouri R et al. Structural changes in the gut microbiome of constipated patients. *Physiological genomics* 2014; 46 (18): 679-86.
8. Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, Gordon JI. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* 2006; 444 (7122): 1027.
9. Larsen N, Vogensen FK, Van Den Berg FW et al. Gut microbiota in human adults with type 2 diabetes differs from non-diabetic adults. *PloS one* 2010; 5(2): e9085.

10. Sobhani I, Tap J, Roudot-Thoraval F et al. Microbial dysbiosis in colorectal cancer (CRC) patients. *PloS one* 2011; 6(1): e16393.
11. Emoto T, Yamashita T, Sasaki N et al. Analysis of gut microbiota in coronary artery disease patients: a possible link between gut microbiota and coronary artery disease. *Journal of atherosclerosis and thrombosis* 2016: 32672.
12. Tamboli C, Neut C, Desreumaux P, Colombel J. Dysbiosis as a prerequisite for IBD. *Gut* 2004; 53(7): 1057-.
13. Cenit MC, Sanz Y, Codoñer-Franch P. Influence of gut microbiota on neuropsychiatric disorders. *World journal of gastroenterology* 2017; 23(30): 5486.
14. Manichanh C, Borruel N, Casellas F, Guarner F. The gut microbiota in IBD. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology* 2012;9(10):599.
15. Buttó LF, Haller D. Dysbiosis in intestinal inflammation: cause or consequence. *International Journal of Medical Microbiology* 2016; 306(5): 302-9.
16. van der Waaij LA, Kroese FG, Visser A, Nelis GF, Westerveld BD, Jansen PL, et al. Immunoglobulin coating of faecal bacteria in inflammatory bowel disease. *European journal of gastroenterology & hepatology* 2004; 16(7): 669-74.
17. Sokol H, Seksik P, Rigottier-Gois L et al. Specificities of the fecal microbiota in inflammatory bowel disease. *Inflammatory bowel diseases* 2006; 12(2): 106-11.

18. Kleessen B, Kroesen A, Buhr H, Blaut M. Mucosal and invading bacteria in patients with inflammatory bowel disease compared with controls. *Scandinavian journal of gastroenterology* 2002; 37(9): 1034-41.
19. Navaneethan U, Shen B. Hepatopancreatobiliary manifestations and complications associated with inflammatory bowel disease. *Inflammatory bowel diseases* 2010; 16(9): 1598-619.
20. Kul S. İnflamatuvar bağırsak hastalıklarında ince bağırsakta aşırı bakteri çoğalmasının rolü. Başkent Üniversitesi, Ankara, 2018.
21. Meier J. Epidemiology. In: *Inflammatory Bowel Disease Nursing Manual*. Ed. Sturm A, White L. Volüm 1. Cham, Springer, 2019; 11-4.
22. Inflammatory Bowel Disease. <https://www.cdc.gov/ibd/#epidIBD>. 12/10/2019 tarihinde erişilmiştir.
23. Burisch J, Munkholm P. The epidemiology of inflammatory bowel disease. *Scandinavian journal of gastroenterology* 2015; 50 (8): 942-51.
24. Peppercorn MA. Clinical manifestations, diagnosis, and prognosis of Crohn's disease in adults. <https://www.uptodate.com/contents/clinical-manifestations-diagnosis-and-prognosis-of-crohns-disease-in-adults>. 10/11/2019 tarihinde erişilmiştir.
25. Buran T. İnflamatuvar Barsak Hastalığında Epidemiyoloji, Prevalans ve İnsidans. *Türkiye Klinikleri Gastroenterohepatology-Special Topics* 2017; 10 (1):1 5-7.
26. Dagli U, Epidemiology and genetics of inflammatory bowel disease in Turkey. Falk Symposium, İstanbul, 2008.

27. Tozun N, Atug O, Imeryuz N et al. Clinical characteristics of inflammatory bowel disease in Turkey: a multicenter epidemiologic survey. *Journal of clinical gastroenterology* 2009; 43 (1): 51-7.
28. Shivashankar R, Tremaine WJ, Harmsen WS, Loftus Jr EV. Incidence and prevalence of Crohn's disease and ulcerative colitis in Olmsted County, Minnesota from 1970 through 2010. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 2017; 15(6): 857-63.
29. Loftus E, Silverstein M, Sandborn W, Tremaine W, Harmsen W, Zinsmeister A. Ulcerative colitis in Olmsted County, Minnesota, 1940–1993: incidence, prevalence, and survival. *Gut* 2000; 46(3): 336-43.
30. Karlinger K, Györke T, Makö E, Mester Á, Tarján Z. The epidemiology and the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *European journal of radiology* 2000; 35 (3): 154-67.
31. Roth M-P, Petersen GM, McElree C, Feldman E, Rotter JI. Geographic origins of Jewish patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1989; 97 (4): 900-4.
32. Satsangi J, Jewell D, Rosenberg W, Bell J. Genetics of inflammatory bowel disease. *Gut* 1994; 35 (5): 696.
33. Orholm M, Munkholm P, Langholz E, Nielsen OH, Sørensen TI, Binder V. Familial occurrence of inflammatory bowel disease. *New England journal of medicine* 1991; 324 (2): 84-8.
34. Laharie D, Debeugny S, Peeters M et al. Inflammatory bowel disease in spouses and their offspring. *Gastroenterology* 2001; 120 (4): 816-9.

35. Satsangi J, Grootcholten C, Holt H, Jewell D. Clinical patterns of familial inflammatory bowel disease. *Gut* 1996; 38 (5): 738-41.
36. Fielding JF. The relative risk of inflammatory bowel disease among parents and siblings of Crohn's disease patients. *Journal of clinical gastroenterology* 1986; 8 (6): 655-7.
37. Yang H, McElree C, Roth M, Shanahan F, Targan S, Rotter J. Familial empirical risks for inflammatory bowel disease: differences between Jews and non-Jews. *Gut* 1993; 34 (4): 517-24.
38. Bayless TM, Tokayer AZ, Polito Jn, Quaskey SA, Mellits ED, Harris ML. Crohn's disease: concordance for site and clinical type in affected family members--potential hereditary influences. *Gastroenterology* 1996; 111 (3): 573-9.
39. Jostins L, Ripke S, Weersma RK et al. Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. *Nature* 2012; 491 (7422): 119.
40. Liu JZ, Van Sommeren S, Huang H et al. Association analyses identify 38 susceptibility loci for inflammatory bowel disease and highlight shared genetic risk across populations. *Nature genetics* 2015; 47(9): 979.
41. Rioux JD, Xavier RJ, Taylor KD et al. Genome-wide association study identifies new susceptibility loci for Crohn disease and implicates autophagy in disease pathogenesis. *Nature genetics*. 2007; 39(5): 596.
42. Hampe J, Franke A, Rosenstiel P et al. A genome-wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in ATG16L1. *Nature genetics* 2007; 39(2): 207.

43. Parkes M, Barrett JC, Prescott NJ et al. Sequence variants in the autophagy gene IRGM and multiple other replicating loci contribute to Crohn's disease susceptibility. *Nature genetics* 2007; 39(7): 830.
44. McCarroll SA, Huett A, Kuballa P et al. Deletion polymorphism upstream of IRGM associated with altered IRGM expression and Crohn's disease. *Nature genetics* 2008; 40(9): 1107.
45. Duerr RH, Taylor KD, Brant SR et al. A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. *Science* 2006; 314 (5804): 1461-3.
46. Franke A, Balschun T, Sina C et al. Genome-wide association study for ulcerative colitis identifies risk loci at 7q22 and 22q13 (IL17REL). *Nature genetics* 2010; 42(4): 292.
47. Anderson CA, Boucher G, Lees CW et al. Meta-analysis identifies 29 additional ulcerative colitis risk loci, increasing the number of confirmed associations to 47. *Nature genetics* 2011;43(3):246.
48. Barrett JC, Lee JC, Lees CW et al. Genome-wide association study of ulcerative colitis identifies three new susceptibility loci, including the HNF4A region. *Nature genetics* 2009;41(12):1330.
49. Kaser A, Lee A-H, Franke A et al. XBP1 links ER stress to intestinal inflammation and confers genetic risk for human inflammatory bowel disease. *Cell* 2008; 134 (5): 743-56.
50. VanDussen KL, Liu T-C, Li D et al. Genetic variants synthesize to produce paneth cell phenotypes that define subtypes of Crohn's disease. *Gastroenterology* 2014; 146(1): 200-9.

51. Liu T-C, Naito T, Liu Z et al. LRRK2 but not ATG16L1 is associated with Paneth cell defect in Japanese Crohn's disease patients. *JCI insight* 2017; 2 (6).
52. Bäckhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, Peterson DA, Gordon JI. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science* 2005; 307 (5717): 1915-20.
53. Faria AMC, Mucida D, McCafferty D-M, Tsuji NM, Verhasselt V. Tolerance and inflammation at the gut mucosa. *Clinical and Developmental Immunology* 2012.
54. Yu LC-H, Wang J-T, Wei S-C, Ni Y-H. Host-microbial interactions and regulation of intestinal epithelial barrier function: From physiology to pathology. *World journal of gastrointestinal pathophysiology* 2012; 3 (1): 27.
55. Geremia A, Biancheri P, Allan P, Corazza GR, Di Sabatino A. Innate and adaptive immunity in inflammatory bowel disease. *Autoimmunity reviews* 2014; 13(1): 3-10.
56. Kaser A, Blumberg R. Endoplasmic reticulum stress and intestinal inflammation. *Mucosal immunology* 2010; 3(1): 11.
57. Wehkamp J, Harder J, Weichenthal M et al. Inducible and constitutive β -defensins are differentially expressed in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Inflammatory bowel diseases* 2003; 9(4): 215-23.
58. Hayday A, Theodoridis E, Ramsburg E, Shires J. Intraepithelial lymphocytes: exploring the Third Way in immunology. *Nature immunology* 2001;2 (11): 997.

59. Abadie V, Discepolo V, Jabri B. Intraepithelial lymphocytes in celiac disease immunopathology. *Seminars in immunopathology*; 2012; 34: 551–566.
60. Feldman M, Friedman L, Brandt L. Sleisenger and Fordtran's gastrointestinal and liver disease. Pathophysiology Diagnosis & Management. Volüm 9. Philadelphia, Elsevier, 2010; 1227-357.
61. Corr SC, Gahan CC, Hill C. M-cells: origin, morphology and role in mucosal immunity and microbial pathogenesis. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 2008; 52 (1): 2-12.
62. Niess JH, Reinecker HC. Dendritic cells in the recognition of intestinal microbiota. *Cellular microbiology* 2006; 8(4): 558-64.
63. Lipscomb MF, Masten BJ. Dendritic cells: immune regulators in health and disease. *Physiological reviews* 2002; 82(1): 97-130.
64. Bland DA, Barrera CA, Reyes VE. Gastrointestinal mucosal immunology. In: Mucosal immunology and virology. Ed. Tying SK. London, Springer, 2006; 23-54.
65. Danese S, Semeraro S, Marini M et al. Adhesion molecules in inflammatory bowel disease: therapeutic implications for gut inflammation. *Digestive and liver disease* 2005; 37(11): 811-8.
66. Reinecker HC, Steffen M, Witthoef T et al. Enhand secretion of tumour necrosis factor-alpha, IL-6, and IL-1 β by isolated lamina propria mononuclear cells from patients with ulcerative colitis and Crohn's disease. *Clinical & Experimental Immunology* 1993; 94(1): 174-81.

67. Reimund J, Wittersheim C, Dumont S et al. Increased production of tumour necrosis factor-alpha interleukin-1 beta, and interleukin-6 by morphologically normal intestinal biopsies from patients with Crohn's disease. *Gut* 1996; 39 (5): 684-9.
68. Kamada N, Hisamatsu T, Okamoto S, Chinen H, Kobayashi T, Sato T, et al. Unique CD14+ intestinal macrophages contribute to the pathogenesis of Crohn disease via IL-23/IFN- γ axis. *The Journal of clinical investigation* 2008; 118(6): 2269-80.
69. Romagnani S. Lymphokine production by human T cells in disease states. *Annual review of immunology* 1994; 12(1): 227-57.
70. Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 Cells. *Annual review of immunology* 2009; 27: 485-517.
71. Weaver CT, Hatton RD, Mangan PR, Harrington LE. IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. *Annu Rev Immunol* 2007; 25: 821-52.
72. Diveu C, McGeachy MJ, Cua DJ. Cytokines that regulate autoimmunity. *Current opinion in immunology* 2008; 20(6): 663-8.
73. Tremelling M, Cummings F, Fisher SA et al. IL23R variation determines susceptibility but not disease phenotype in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2007;132 (5): 1657-64.
74. Baldassano RN, Bradfield JP, Monos DS et al. Association of variants of the interleukin-23 receptor gene with susceptibility to pediatric Crohn's disease. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 2007;5(8):972-6.

75. Sandborn WJ, Gasink C, Gao L-L et al. Ustekinumab induction and maintenance therapy in refractory Crohn's disease. *New England Journal of Medicine* 2012; 367 (16): 1519-28.
76. Monteleone G, Monteleone I, Fina D et al. Interleukin-21 enhances T-helper cell type I signaling and interferon- γ production in Crohn's disease. *Gastroenterology* 2005;128(3):687-94.
77. Sarra M, Monteleone I, Stolfi C, Fantini MC, Sileri P, Sica G, et al. Interferon-gamma-expressing cells are a major source of interleukin-21 in inflammatory bowel diseases. *Inflammatory bowel diseases* 2010; 16 (8): 1332-9.
78. Flammer JR, Rogatsky I. Minireview: Glucocorticoids in autoimmunity: unexpected targets and mechanisms. *Molecular endocrinology* 2011; 25 (7): 1075-86.
79. Podolsky DK. The current future understanding of inflammatory bowel disease. *Best practice & research Clinical gastroenterology* 2002; 16 (6): 933-43.
80. Monteleone G, Trapasso F, Parrello T, Biancone L, Stella A, Iuliano R, et al. Bioactive IL-18 expression is up-regulated in Crohn's disease. *The Journal of Immunology* 1999; 163 (1): 143-7.
81. Porcelli P, Zaka S, Centonze S, Sisto G. Psychological distress and levels of disease activity in inflammatory bowel disease. *The Italian journal of gastroenterology* 1994; 26(3): 111-5.
82. Porcell P, Leoci C, Guerra V. A prospective study of the relationship between disease activity and psychologic distress in patients with

inflammatory bowel disease. *Scandinavian journal of gastroenterology* 1996; 31 (8): 792-6.

83. Mahid SS, Minor KS, Soto RE, Hornung CA, Galandiuk S, editors. Smoking and inflammatory bowel disease: a meta-analysis. *Mayo Clinic Proceedings* 2006; 11:1462-1471.

84. Higuchi LM, Khalili H, Chan AT, Richter JM, Bousvaros A, Fuchs CS. A prospective study of cigarette smoking and the risk of inflammatory bowel disease in women. *The American journal of gastroenterology* 2012; 107(9): 1399.

85. Johnson G, Cosnes J, Mansfield J. Smoking cessation as primary therapy to modify the course of Crohn's disease. *Alimentary pharmacology & therapeutics* 2005; 21(8): 921-31.

86. Louis E, Michel V, Hugot J et al. Early development of stricturing or penetrating pattern in Crohn's disease is influenced by disease location, number of flares, and smoking but not by NOD2/CARD15 genotype. *Gut* 2003; 52(4): 552-7.

87. Boyko E, Perera D, Koepsell T, Keane E, Inui T. Effects of cigarette smoking on the clinical course of ulcerative colitis. *Scandinavian journal of gastroenterology* 1988; 23(9): 1147-52.

88. Beaugerie L, Massot N, Carbonnel F, Cattan S, Gendre J-P, Cosnes J. Impact of cessation of smoking on the course of ulcerative colitis. *The American journal of gastroenterology* 2001; 96(7): 2113-6.

89. Khalili H, Ananthakrishnan AN, Konijeti GG et al. Physical activity and risk of inflammatory bowel disease: prospective study from the Nurses' Health Study cohorts. *Bmj* 2013; 347: f6633.

90. Wanner M, Martin BW, Autenrieth CS et al. Associations between domains of physical activity, sitting time, and different measures of overweight and obesity. *Preventive medicine reports* 2016; 3: 177-84.
91. Ananthakrishnan AN, Khalili H, Konijeti GG et al. A prospective study of long-term intake of dietary fiber and risk of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Gastroenterology* 2013; 145 (5): 970-7.
92. Hou JK, Abraham B, El-Serag H. Dietary intake and risk of developing inflammatory bowel disease: a systematic review of the literature. *The American journal of gastroenterology* 2011; 106 (4): 563.
93. Abegunde AT, Muhammad BH, Bhatti O, Ali T. Environmental risk factors for inflammatory bowel diseases: Evidence based literature review. *World journal of gastroenterology* 2016; 22(27): 6296.
94. Sakamoto N, Kono S, Wakai K et al. Dietary risk factors for inflammatory bowel disease A Multicenter Case-Control Study in Japan. *Inflammatory bowel diseases* 2005;11(2):154-63.
95. Geerling B, Dagnelie P, Badart-Smook A, Russel M, Stockbrügger R, Brummer R-J. Diet as a risk factor for the development of ulcerative colitis. *The American journal of gastroenterology* 2000; 95(4): 1008-13.
96. Jowett S, Seal C, Pearce M et al. Influence of dietary factors on the clinical course of ulcerative colitis: a prospective cohort study. *Gut* 2004; 53(10): 1479-84.
97. Amre DK, D'souza S, Morgan K et al. Imbalances in dietary consumption of fatty acids, vegetables, and fruits are associated with risk for Crohn's

disease in children. *The American journal of gastroenterology* 2007; 102 (9): 2016.

98. Del Pinto R, Pietropaoli D, Chandar AK, Ferri C, Cominelli F. Association between inflammatory bowel disease and vitamin D deficiency: a systematic review and meta-analysis. *Inflammatory bowel diseases* 2015; 21(11): 2708-17.

99. Ananthakrishnan AN, Khalili H, Higuchi LM et al. Higher predicted vitamin D status is associated with reduced risk of Crohn's disease. *Gastroenterology* 2012; 142 (3): 482-9.

100. Chapman-Kiddell CA, Davies PS, Gillen L, Radford-Smith GL. Role of diet in the development of inflammatory bowel disease. *Inflammatory bowel diseases* 2009; 16(1): 137-51.

101. Ananthakrishnan AN, Khalili H, Konijeti GG et al. Sleep duration affects risk for ulcerative colitis: a prospective cohort study. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 2014;12 (11): 1879-86.

102. Ali T, Madhoun MF, Orr WC, Rubin DT. Assessment of the relationship between quality of sleep and disease activity in inflammatory bowel disease patients. *Inflammatory bowel diseases* 2013; 19(11): 2440-3.

103. Porter CK, Tribble DR, Aliaga PA, Halvorson HA, Riddle MS. Infectious gastroenteritis and risk of developing inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2008; 135(3): 781-6.

104. Gradel KO, Nielsen HL, Schønheyder HC, Ejlersen T, Kristensen B, Nielsen H. Increased short-and long-term risk of inflammatory bowel disease after salmonella or campylobacter gastroenteritis. *Gastroenterology* 2009; 137(2): 495-501.

105. Rodríguez LAG, Ruigómez A, Panés J. Acute gastroenteritis is followed by an increased risk of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2006; 130(6): 1588-94.
106. López-Serrano P, Pérez-Calle JL, Pérez-Fernández MT, Fernández-Font JM, Boixeda de Miguel D, Fernández-Rodríguez CM. Environmental risk factors in inflammatory bowel diseases. Investigating the hygiene hypothesis: a Spanish case-control study. *Scandinavian journal of gastroenterology* 2010; 45 : 1464-71.
107. Wakefield AJ, Ekbom A, Dhillon AP, Pittilo RM, Pounder RE. Crohn's disease: pathogenesis and persistent measles virus infection. *Gastroenterology* 1995; 108 (3): 911-6.
108. Feller M, Huwiler K, Stephan R et al. Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis and Crohn's disease: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet infectious diseases* 2007;7(9):607-13.
109. Iizuka M, Chiba M, Yukawa M et al. Immunohistochemical analysis of the distribution of measles related antigen in the intestinal mucosa in inflammatory bowel disease. *Gut* 2000; 46(2): 163-9.
110. Chassaing B, Darfeuille-Michaud A. The commensal microbiota and enteropathogens in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*. 2011; 140(6): 1720-8. e3.
111. Shaw SY, Blanchard JF, Bernstein CN. Association between the use of antibiotics and new diagnoses of Crohn's disease and ulcerative colitis. *The American journal of gastroenterology*. 2011; 106(12):2133.

112. Ungaro R, Bernstein CN, Geary R et al. Antibiotics associated with increased risk of new-onset Crohn's disease but not ulcerative colitis: a meta-analysis. *The American journal of gastroenterology* 2014; 109(11): 1728.
113. Margolis DJ, Fanelli M, Hoffstad O, Lewis JD. Potential association between the oral tetracycline class of antimicrobials used to treat acne and inflammatory bowel disease. *The American journal of gastroenterology* 2010; 105(12): 2610.
114. Ananthakrishnan AN, Higuchi LM, Huang ES et al. Aspirin, nonsteroidal anti-inflammatory drug use, and risk for Crohn disease and ulcerative colitis: a cohort study. *Annals of internal medicine* 2012; 156(5): 350-9.
115. Felder JB, Korelitz BI, Rajapakse R, Schwarz S, Horatagis AP, Gleim G. Effects of nonsteroidal antiinflammatory drugs on inflammatory bowel disease: a case-control study. *The American journal of gastroenterology* 2000; 95(8): 1949.
116. Takeuchi K, Smale S, Premchand P et al. Prevalence and mechanism of nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced clinical relapse in patients with inflammatory bowel disease. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 2006; 4(2): 196-202.
117. Cornish JA, Tan E, Simillis C, Clark SK, Teare J, Tekkis PP. The risk of oral contraceptives in the etiology of inflammatory bowel disease: a meta-analysis. *The American journal of gastroenterology* 2008; 103(9): 2394.
118. Khalili H, Higuchi LM, Ananthakrishnan AN et al. Hormone therapy increases risk of ulcerative colitis but not Crohn's disease. *Gastroenterology* 2012; 143(5): 1199-206.

119. Garcia Rodriguez L, González-Pérez A, Johansson S, Wallander MA. Risk factors for inflammatory bowel disease in the general population. *Alimentary pharmacology & therapeutics* 2005; 22(4): 309-15.
120. Cutolo M, Capellino S, Sulli A et al. Estrogens and autoimmune diseases. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2006; 1089 (1): 538-47.
121. Bankar R, Dafe C, Köhnke A, Babu P. Ulcerative colitis probably associated with isotretinoin. *Indian journal of gastroenterology: official journal of the Indian Society of Gastroenterology* 2006;25(3):171.
122. Reniers DE, Howard JM. Isotretinoin-induced inflammatory bowel disease in an adolescent. *Annals of Pharmacotherapy* 2001; 35(10): 1214-6.
123. Alhusayen RO, Juurlink DN, Mamdani MM et al. Isotretinoin use and the risk of inflammatory bowel disease: a population-based cohort study. *Journal of Investigative Dermatology* 2013; 133(4): 907-12.
124. Andersson RE, Olaison G, Tysk C, Ekbohm A. Appendectomy is followed by increased risk of Crohn's disease. *Gastroenterology* 2003; 124(1): 40-6.
125. Kaplan GG, Jackson T, Sands BE, Frisch M, Andersson RE, Korzenik J. The risk of developing Crohn's disease after an appendectomy: a meta-analysis. *The American journal of gastroenterology* 2008; 103 (11): 2925.
126. Rutgeerts P, D'Haens G, Hiele M, Geboes K, Vantrappen G. Appendectomy protects against ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1994; 106(5): 1251-3.

127. Andersson RE, Olaison G, Tysk C, Ekblom A. Appendectomy and protection against ulcerative colitis. *New England Journal of Medicine* 2001; 344(11): 808-14.
128. Okazaki K, Onodera H, Watanabe N et al. A patient with improvement of ulcerative colitis after appendectomy. *Gastroenterology* 2000; 119(2): 502-6.
129. Lerebours E, Gower-Rousseau C, Merle V et al. Stressful life events as a risk factor for inflammatory bowel disease onset: a population-based case-control study. *The American journal of gastroenterology* 2007; 102 (1): 122.
130. Li J, Nørgård B, Precht DH, Olsen J. Psychological stress and inflammatory bowel disease: a follow-up study in parents who lost a child in Denmark. *The American journal of gastroenterology* 2004; 99 (6): 1129.
131. Singh S, Graff LA, Bernstein CN. Do NSAIDs, antibiotics, infections, or stress trigger flares in IBD? *The American journal of gastroenterology* 2009; 104 (5): 1298.
132. Bitton A, Dobkin P, Edwardes M, Sewitch M, Meddings J, Cohen A, et al. Predicting relapse in Crohn's disease: a biopsychosocial model. *Gastroenterology* 2005; 128(4): A103-A.
133. Chan SS, Luben R, Olsen A et al. Body mass index and the risk for Crohn's disease and ulcerative colitis: data from a European Prospective Cohort Study (The IBD in EPIC Study). *The American journal of gastroenterology* 2013; 108(4): 575.
134. Mendall MA, Gunasekera AV, John BJ, Kumar D. Is obesity a risk factor for Crohn's disease? *Digestive diseases and sciences* 2011; 56 (3): 837-44.

135. Desreumaux P, Ernst O, Geboes K et al. Inflammatory alterations in mesenteric adipose tissue in Crohn's disease. *Gastroenterology* 1999; 117 (1): 73-81.
136. Blain A, Cattan S, Beaugerie L, Carbonnel F, Gendre J, Cosnes J. Crohn's disease clinical course and severity in obese patients. *Clinical nutrition* 2002; 21(1): 51-7.
137. Silverberg MS, Satsangi J, Ahmad T et al. Toward an integrated clinical, molecular and serological classification of inflammatory bowel disease: report of a Working Party of the 2005 Montreal World Congress of Gastroenterology. *Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology* 2005; 19 (Suppl A): 5A-36A.
138. Satsangi J, Silverberg M, Vermeire S, Colombel J. The Montreal classification of inflammatory bowel disease: controversies, consensus, and implications. *Gut* 2006; 55(6): 749-53.
139. Powel DW. Approach to the patient with diarrhea. In: Principles of clinical gastroenterology. Ed. Yamada T, Alpers DH, Kalloo AN, Kaplowitz N, Owyang C, Powell DW. Volüm 1. West Sussex, Wiley-Blackwell, 2008; 304-360.
140. Langholz E, Munkholm P, Nielsen OH, Kreiner S, Binder V. Incidence and prevalence of ulcerative colitis in Copenhagen county from 1962 to 1987. *Scandinavian journal of gastroenterology* 1991; 26(12): 1247-56.
141. Schroeder KW, Tremaine WJ, Ilstrup DM. Coated oral 5-aminosalicylic acid therapy for mildly to moderately active ulcerative colitis. *New England Journal of Medicine*. 1987; 317 (26): 1625-9.

142. Mosen U, Sorstad J, Hellers G, Johansson C. Extracolonic diagnoses in ulcerative colitis: an epidemiological study. *American Journal of Gastroenterology* 1990; 85(6).
143. Bernstein CN, Blanchard JF, Houston DS, Wajda A. The incidence of deep venous thrombosis and pulmonary embolism among patients with inflammatory bowel disease: a population-based cohort study. *Thrombosis and haemostasis* 2001; 85 (03): 430-4.
144. Solem CA, Loftus Jr EV, Tremaine WJ, Sandborn WJ. Venous thromboembolism in inflammatory bowel disease. *The American journal of gastroenterology* 2004; 99 (1): 97.
145. Irving PM, Pasi KJ, Rampton DS. Thrombosis and inflammatory bowel disease. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 2005; 3(7): 617-28.
146. Spina L, Saibeni S, Battaglioli T, Peyvandi F, De Franchis R, Vecchi M. Thrombosis in inflammatory bowel diseases: role of inherited thrombophilia. *The American journal of gastroenterology* 2005; 100 (9): 2036.
147. Bernstein CN, Wajda A, Blanchard JF. The incidence of arterial thromboembolic diseases in inflammatory bowel disease: a population-based study. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 2008; 6 (1): 41-5.
148. Novacek G, Weltermann A, Sobala A et al. Inflammatory bowel disease is a risk factor for recurrent venous thromboembolism. *Gastroenterology* 2010;139 (3): 779-87. e1.
149. Murthy SK, Nguyen GC. Venous thromboembolism in inflammatory bowel disease: an epidemiological review. *The American journal of gastroenterology* 2011; 106 (4): 713.

150. Vermeire S, Van Assche G, Rutgeerts P. C-reactive protein as a marker for inflammatory bowel disease. *Inflammatory bowel diseases* 2004; 10 (5): 661-5.
151. Rodgers AD, Cummins AG. CRP correlates with clinical score in ulcerative colitis but not in Crohn's disease. *Digestive diseases and sciences* 2007; 52 (9): 2063-8.
152. Prantera C, Davoli M, Lorenzetti R et al. Clinical and laboratory indicators of extent of ulcerative colitis. Serum C-reactive protein helps the most. *Journal of clinical gastroenterology* 1988; 10(1): 41-5.
153. Van Rheenen PF, Van de Vijver E, Fidler V. Faecal calprotectin for screening of patients with suspected inflammatory bowel disease: diagnostic meta-analysis. *Bmj* 2010; 341: c3369.
154. Travis SP, Schnell D, Krzeski P et al. Developing an instrument to assess the endoscopic severity of ulcerative colitis: the Ulcerative Colitis Endoscopic Index of Severity (UCEIS). *Gut* 2012; 61 (4): 535-42.
155. Samuel S, Bruining DH, Loftus Jr EV et al. Validation of the ulcerative colitis colonoscopic index of severity and its correlation with disease activity measures. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 2013; 11(1): 49-54. e1.
156. Nikolaus S, Schreiber S. Diagnostics of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2007; 133 (5): 1670-89.
157. Jenkins D, Balsitis M, Gallivan S, Dixon M, Gilmour H, Shepherd N, et al. Guidelines for the initial biopsy diagnosis of suspected chronic idiopathic inflammatory bowel disease. *The British Society of Gastroenterology Initiative. Journal of clinical pathology* 1997; 50 (2): 93.

158. Mowat C, Cole A, Windsor A et al. Guidelines for the management of inflammatory bowel disease in adults. *Gut* 2011; 60 (5): 571-607.
159. Greenstein A, Sachar D, Gibas A et al. Outcome of toxic dilatation in ulcerative and Crohn's colitis. *Journal of clinical gastroenterology* 1985; 7 (2): 137-43.
160. Jalan K, Sircus W, Card W, Falconer C, Bruce J, Crean G, et al. An experience of ulcerative colitis: I. Toxic dilation in 55 cases. *Gastroenterology* 1969; 57(1): 68-82.
161. Solberg IC, Vatn MH, Høie O et al. Clinical course in Crohn's disease: results of a Norwegian population-based ten-year follow-up study. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 2007; 5 (12): 1430-8.
162. Thia KT, Sandborn WJ, Harmsen WS, Zinsmeister AR, Loftus Jr EV. Risk factors associated with progression to intestinal complications of Crohn's disease in a population-based cohort. *Gastroenterology* 2010; 139(4): 1147-55.
163. Lamb CA, Kennedy NA, Raine T et al. British Society of Gastroenterology consensus guidelines on the management of inflammatory bowel disease in adults. *Gut* 2019; 68 (Suppl 3): s1-s106.
164. Gionchetti P, Dignass A, Danese S et al. 3rd European evidence-based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease 2016: part 2: surgical management and special situations. *Journal of Crohn's and Colitis* 2016; 11(2): 135-49.
165. Barrett KE, Dharmasathaphorn K. Pharmacological aspects of therapy in inflammatory bowel diseases: antidiarrheal agents. *Journal of clinical gastroenterology* 1988; 10(1): 57-63.

166. Costello S, Soo W, Bryant R, Jairath V, Hart A, Andrews J. Systematic review with meta-analysis: faecal microbiota transplantation for the induction of remission for active ulcerative colitis. *Alimentary pharmacology & therapeutics* 2017; 46 (3): 213-24.
167. Turnbaugh PJ, Ley RE, Hamady M, Fraser-Liggett CM, Knight R, Gordon JI. The human microbiome project. *Nature* 2007; 449 (7164): 804.
168. Fagoonee S, Pellicano R. Does the Microbiota Play a Pivotal Role in the Pathogenesis of Irritable Bowel Syndrome?. *J. Clin. Med* 2019, 8(11), 1808.
169. Peterson J, Garges S, Giovanni M et al. The NIH human microbiome project. *Genome research* 2009; 19 (12): 2317-23.
170. Tamburini S, Shen N, Wu HC, Clemente JC. The microbiome in early life: implications for health outcomes. *Nature medicine* 2016;22(7):713.
171. Huse SM, Dethlefsen L, Huber JA, Welch DM, Relman DA, Sogin ML. Exploring microbial diversity and taxonomy using SSU rRNA hypervariable tag sequencing. *PLoS genetics* 2008; 4 (11): e1000255.
172. De Filippis F, Laiola M, Blaiotta G, Ercolini D. Different amplicon targets for sequencing-based studies of fungal diversity. *Appl Environ Microbiol* 2017; 83 (17): e00905-17.
173. da Cunha AJLA, Leite ÁJM, de Almeida IS. The pediatrician's role in the first thousand days of the child: the pursuit of healthy nutrition and development. *Jornal de Pediatria (Versão em Português)* 2015; 91(6): S44-S51.

174. Dominguez-Bello MG, Costello EK, Contreras M et al. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2010;107(26):11971-5.
175. Azad MB, Konya T, Maughan H et al. Gut microbiota of healthy Canadian infants: profiles by mode of delivery and infant diet at 4 months. *Cmaj* 2013; 185 (5): 385-94.
176. Martin R, Makino H, Yavuz AC et al. Early-life events, including mode of delivery and type of feeding, siblings and gender, shape the developing gut microbiota. *PloS one* 2016;11(6):e0158498.
177. Hill CJ, Lynch DB, Murphy K et al. Evolution of gut microbiota composition from birth to 24 weeks in the infantmet cohort. *Microbiome* 2017; 5 (1): 4.
178. Chu DM, Ma J, Prince AL, Antony KM, Seferovic MD, Aagaard KM. Maturation of the infant microbiome community structure and function across multiple body sites and in relation to mode of delivery. *Nature medicine* 2017; 23 (3): 314.
179. Amenyogbe N, Kollmann TR, Ben-Othman R. Early-life host–microbiome interphase: the key frontier for immune development. *Frontiers in pediatrics* 2017; 5: 111.
180. Jašarević E, Howard CD, Misic AM, Beiting DP, Bale TL. Stress during pregnancy alters temporal and spatial dynamics of the maternal and offspring microbiome in a sex-specific manner. *Scientific reports* 2017; 7: 44182.

181. Breastfeeding. WHO.

https://www.who.int/nutrition/topics/exclusive_breastfeeding/en/. 11/10/2019

tarihinde erişilmiştir.

182. Urbaniak C, Angelini M, Gloor GB, Reid G. Human milk microbiota profiles in relation to birthing method, gestation and infant gender. *Microbiome* 2016; 4 (1): 1.

183. Gomez-Gallego C, Garcia-Mantrana I, Salminen S, Collado MC. The human milk microbiome and factors influencing its composition and activity. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine* 2016; 21: 400-405.

184. Underwood MA, German JB, Lebrilla CB, Mills DA. Bifidobacterium longum subspecies infantis: champion colonizer of the infant gut. *Pediatric research* 2015; 77 (1-2): 229-35.

185. Ellis-Pegler R, Crabtree C, Lambert H. The faecal flora of children in the United Kingdom. *Epidemiology & Infection* 1975; 75 (1): 135-42.

186. Greenhalgh K, Meyer KM, Aagaard KM, Wilmes P. The human gut microbiome in health: establishment and resilience of microbiota over a lifetime. *Environmental microbiology* 2016; 18 (7): 2103-16.

187. Becattini S, Taur Y, Pamer EG. Antibiotic-induced changes in the intestinal microbiota and disease. *Trends in molecular medicine* 2016; 22 (6): 458-78.

188. Trasande L, Blustein J, Liu M, Corwin E, Cox L, Blaser M. Infant antibiotic exposures and early-life body mass. *International journal of obesity* 2013; 37 (1): 16.

189. Kronman MP, Zaoutis TE, Haynes K, Feng R, Coffin SE. Antibiotic exposure and IBD development among children: a population-based cohort study. *Pediatrics* 2012; 130(4): e794-e803.
190. Ruokolainen L, Von Hertzen L, Fyhrquist N et al. Green areas around homes reduce atopic sensitization in children. *Allergy* 2015;70(2):195-202.
191. Gomez A, Petzelkova KJ, Burns MB et al. Gut microbiome of coexisting BaAka pygmies and Bantu reflects gradients of traditional subsistence patterns. *Cell reports* 2016; 14 (9): 2142-53.
192. Zeevi D, Korem T, Zmora N et al. Personalized Nutrition by Prediction of Glycemic Responses. *Cell* 2015; 163 (5): 1079-1094
193. Mason MR, Preshaw PM, Nagaraja HN, Dabdoub SM, Rahman A, Kumar PS. The subgingival microbiome of clinically healthy current and never smokers. *The ISME journal* 2015; 9 (1): 268.
194. Kettleson EM, Adhikari A, Vesper S, Coombs K, Indugula R, Reponen T. Key determinants of the fungal and bacterial microbiomes in homes. *Environmental research* 2015; 138: 130-5.
195. Koren O, Goodrich JK, Cullender TC et al. Host remodeling of the gut microbiome and metabolic changes during pregnancy. *Cell* 2012; 150 (3): 470-80.
196. Kumar M, Babaei P, Ji B, Nielsen J. Human gut microbiota and healthy aging: recent developments and future prospective. *Nutrition and Healthy aging* 2016; 4 (1): 3-16.
197. Claesson MJ, Jeffery IB, Conde S et al. Gut microbiota composition correlates with diet and health in the elderly. *Nature* 2012; 488 (7410): 178.

198. Frank DN, Amand ALS, Feldman RA, Boedeker EC, Harpaz N, Pace NR. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2007;104(34):13780-5.
199. Sender R, Fuchs S, Milo R. Revised estimates for the number of human and bacteria cells in the body. *PLoS biology* 2016; 14(8): e1002533.
200. Li J, Jia H, Cai X et al. An integrated catalog of reference genes in the human gut microbiome. *Nature biotechnology* 2014; 32 (8): 834.
201. O'Hara AM, Shanahan F. The gut flora as a forgotten organ. *EMBO reports* 2006;7(7):688-93.
202. Swidsinski A, Loening-Baucke V, Lochs H, Hale LP. Spatial organization of bacterial flora in normal and inflamed intestine: a fluorescence in situ hybridization study in mice. *World journal of gastroenterology: WJG* 2005; 11(8): 1131.
203. Corfield AP. The interaction of the gut microbiota with the mucus barrier in health and disease in human. *Microorganisms* 2018; 6 (3): 78.
204. Gillespie JJ, Wattam AR, Cammer SA et al. PATRIC: the comprehensive bacterial bioinformatics resource with a focus on human pathogenic species. *Infection and immunity* 2011; 79 (11): 4286-98.
205. Jandhyala SM, Talukdar R, Subramanyam C, Vuyyuru H, Sasikala M, Reddy DN. Role of the normal gut microbiota. *World journal of gastroenterology: WJG* 2015; 21 (29): 8787.

206. Shi N, Li N, Duan X, Niu H. Interaction between the gut microbiome and mucosal immune system. *Military Medical Research* 2017; 4(1): 14.
207. Sekirov I, Russell SL, Antunes LCM, Finlay BB. Gut microbiota in health and disease. *Physiological reviews* 2010; 90 (3): 859-904.
208. Van de Merwe J, Stegeman J, Hazenberg M. The resident faecal flora is determined by genetic characteristics of the host. Implications for Crohn's disease? *Antonie Van Leeuwenhoek* 1983; 49 (2): 119-24.
209. Walker AW, Duncan SH, Leitch ECM, Child MW, Flint HJ. pH and peptide supply can radically alter bacterial populations and short-chain fatty acid ratios within microbial communities from the human colon. *Appl Environ Microbiol* 2005; 71(7): 3692-700.
210. Duncan SH, Louis P, Thomson JM, Flint HJ. The role of pH in determining the species composition of the human colonic microbiota. *Environmental microbiology* 2009; 11 (8): 2112-22.
211. David LA, Maurice CF, Carmody RN et al. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature* 2014; 505 (7484): 559.
212. De Filippo C, Cavalieri D, Di Paola M et al. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2010; 107 (33): 14691-6.
213. Cani PD, Delzenne NM. Interplay between obesity and associated metabolic disorders: new insights into the gut microbiota. *Current opinion in pharmacology* 2009; 9(6): 737-43.

214. Karakan T. Mikrobiyotayı Değiştiren Faktörler. *Turkiye Klinikleri Gastroenterohepatology-Special Topics* 2018; 11 (3): 1-4.
215. Ponziani FR, Scaldaferri F, Petito V et al. The role of antibiotics in gut microbiota modulation: the eubiotic effects of rifaximin. *Digestive Diseases* 2016; 34 (3): 269-78.
216. Van Loo JA. Prebiotics promote good health: the basis, the potential, and the emerging evidence. *Journal of clinical gastroenterology* 2004; 38: S70-S5.
217. Macfarlane S, Macfarlane GT. Regulation of short-chain fatty acid production. *Proceedings of the Nutrition Society* 2003; 62(1): 67-72.
218. Cantarel BL, Lombard V, Henrissat B. Complex carbohydrate utilization by the healthy human microbiome. *PloS one* 2012; 7 (6): e28742.
219. Hooper LV, Wong MH, Thelin A, Hansson L, Falk PG, Gordon JI. Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine. *Science* 2001; 291 (5505): 881-4.
220. Thomas CM, Hong T, van Pijkeren JP et al. Histamine derived from probiotic *Lactobacillus reuteri* suppresses TNF via modulation of PKA and ERK signaling. *PloS one* 2012; 7 (2): e31951.
221. Marín L, Miguélez EM, Villar CJ, Lombó F. Bioavailability of dietary polyphenols and gut microbiota metabolism: antimicrobial properties. *BioMed research international* 2015.
222. Clayton TA, Baker D, Lindon JC, Everett JR, Nicholson JK. From the Cover: Pharmacometabonomic identification of a significant host-microbiome metabolic interaction affecting human drug metabolism. *Proceedings of the*

National Academy of Sciences of the United States of America 2009; 106 (34): 14728.

223. Richards JL, Yap YA, McLeod KH, Mackay CR, Mariño E. Dietary metabolites and the gut microbiota: an alternative approach to control inflammatory and autoimmune diseases. *Clinical & translational immunology* 2016; 5 (5): e82.

224. Ayabe T, Ashida T, Kohgo Y, Kono T. The role of Paneth cells and their antimicrobial peptides in innate host defense. *Trends in microbiology* 2004; 12(8): 394-8.

225. Kuhn KA, Pedraza I, Demoruelle MK. Mucosal immune responses to microbiota in the development of autoimmune disease. *Rheumatic Disease Clinics* 2014; 40 (4): 711-25.

226. Rescigno M, Urbano M, Valzasina B et al. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nature immunology* 2001; 2 (4): 361.

227. Colombo BM, Scalvenzi T, Benlamara S, Pollet N. Microbiota and mucosal immunity in amphibians. *Frontiers in immunology* 2015; 6: 111.

228. Lui JB, Devarajan P, Teplicki SA, Chen Z. Cross-differentiation from the CD8 lineage to CD4 T cells in the gut-associated microenvironment with a nonessential role of microbiota. *Cell reports* 2015; 10 (4): 574-85.

229. Mazmanian SK, Liu CH, Tzianabos AO, Kasper DL. An immunomodulatory molecule of symbiotic bacteria directs maturation of the host immune system. *Cell* 2005; 122(1): 107-18.

230. Moresco EMY, LaVine D, Beutler B. Toll-like receptors. *Current Biology* 2011; 21 (13): R488-R93.
231. Barko P, McMichael M, Swanson KS, Williams DA. The gastrointestinal microbiome: a review. *Journal of veterinary internal medicine*. 2018; 32 (1): 9-25.
232. Wrzosek L, Miquel S, Noordine M-L et al. Bacteroides thetaiotaomicron and Faecalibacterium prausnitzii influence the production of mucus glycans and the development of goblet cells in the colonic epithelium of a gnotobiotic model rodent. *BMC biology* 2013; 11 (1): 61.
233. Smith PM, Howitt MR, Panikov N et al. The microbial metabolites, short-chain fatty acids, regulate colonic Treg cell homeostasis. *Science* 2013; 341 (6145): 569-73.
234. Sanz Y, Nadal I, Sánchez E. Probiotics as drugs against human gastrointestinal infections. *Recent patents on anti-infective drug discovery* 2007; 2(2): 148-56.
235. Sarangi AN, Goel A, Aggarwal R. Methods for studying gut microbiota: A primer for physicians. *Journal of clinical and experimental hepatology* 2019; 9 (1): 62-73.
236. Tong M, Jacobs JP, McHardy IH, Braun J. Sampling of intestinal microbiota and targeted amplification of bacterial 16S rRNA genes for microbial ecologic analysis. *Current protocols in immunology* 2014; 107 (1): 7-41.
237. Thomas MC, Thomas DK, Kalmokoff ML, Brooks SP, Selinger LB. Molecular methods to measure intestinal bacteria: a review. *Journal of AOAC International* 2012; 95 (1): 5-23.

238. Dave M, Higgins PD, Middha S, Rioux KP. The human gut microbiome: current knowledge, challenges, and future directions. *Translational Research* 2012; 160 (4): 246-57.
239. Fraher MH, O'toole PW, Quigley EM. Techniques used to characterize the gut microbiota: a guide for the clinician. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology* 2012; 9 (6): 312.
240. Sullivan Å, Törnblom H, Lindberg G et al. The micro-flora of the small bowel in health and disease. *Anaerobe* 2003; 9 (1): 11-4.
241. Macfarlane S, McBain A, Macfarlane G. Consequences of biofilm and sessile growth in the large intestine. *Advances in Dental Research* 1997; 11 (1): 59-68.
242. Anderson KL, Lebepe-Mazur S. Comparison of rapid methods for the extraction of bacterial DNA from colonic and caecal lumen contents of the pig. *Journal of applied microbiology* 2003; 94 (6): 988-93.
243. Monteiro L, Bonnemaïson D, Vekris A et al. Complex polysaccharides as PCR inhibitors in feces: *Helicobacter pylori* model. *Journal of clinical microbiology* 1997; 35 (4): 995-8.
244. Li M, Gong J, Cottrill M, et al. Evaluation of QIAamp® DNA Stool Mini Kit for ecological studies of gut microbiota. *Journal of Microbiological Methods* 2003; 54 (1): 13-20.
245. Yu Z, Morrison M. Improved extraction of PCR-quality community DNA from digesta and fecal samples. *Biotechniques* 2004; 36 (5): 808-12.

246. Brooks SP, McAllister M, Sandoz M, Kalmokoff M. Culture-independent phylogenetic analysis of the faecal flora of the rat. *Canadian journal of microbiology* 2003;49(10):589-601.
247. Rapp D, Waller J, Brightwell G, Muirhead RW. Lyophilization prior to direct DNA extraction from bovine feces improves the quantification of *Escherichia coli* O157: H7 and *Campylobacter jejuni*. *Appl Environ Microbiol* 2010; 76 (5): 1686-8.
248. Turan MK, Günay ÖC, Kayış SA, Çörtük M. Mikrobiyotada 16S rRNA ve Basit Biyoinformatik Analizler. *Journal of Biotechnology And Strategic Health Research* 2018; 2 (1): 23-34.
249. Ay C, Cantürk Z. Flow sitometrinin mikrobiyoloji alanında kullanımı. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Fen Bilimleri Dergisi*. 31(3): 144-51.
250. Amann RI, Binder BJ, Olson RJ, Chisholm SW, Devereux R, Stahl DA. Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl Environ Microbiol* 1990; 56 (6): 1919-25.
251. Møter A, Göbel UB. Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. *Journal of Microbiological Methods* 2000; 41: 85–112.
252. Mustafa T, Altınok İ. Pulsed-Field Jel Elektroforez (PFGE) Metodu ve Akuatik Organizmalarda Kullanımı. *Süleyman Demirel Üniversitesi Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi Dergisi* 2013; 9 (1): 44-54.
253. Westermeier R. Electrophoresis in practice-A laboratory manual of proteome analysis. Volüm 4. Weinheim, Wiley-VCH, 2005; 24-34

254. Bartlett JM, Stirling D. A short history of the polymerase chain reaction. In: PCR protocols. Volüm 226. Springer, 2003; 3-6.
255. Naum M, Lampel K. DNA-based assays. Elsevier, 2016.
256. Gürsoy NC, Otlu B. Mikrobiyota Çalışmalarında Moleküler Tanı Yöntemleri. *Journal Of Biotechnology And Strategic Health Research* 2017; 1: 56-67.
257. Zhou X, Li Y. Atlas of Oral Microbiology: From Healthy Microflora to Disease. Academic Press, 2015;15-41.
258. Dong Y, Zhu H. Single-strand conformational polymorphism analysis. *Methods Mol Med* 2005; 108: 149-58.
259. Nema V. The Role and Future Possibilities of Next-Generation Sequencing in Studying Microbial Diversity. In: Microbial Diversity in the Genomic Era. Ed. Das S, Dash HR. Elsevier, 2019: 611-30.
260. Feng X-w, Ding W-p, Xiong L-y, Guo L, Sun J-m, Xiao P. Recent Advancements in Intestinal Microbiota Analyses: A Review for Non-Microbiologists. *Current medical science* 2018; 38 (6): 949-61.
261. Morozova O, Marra MA. Applications of next-generation sequencing technologies in functional genomics. *Genomics* 2008; 92 (5): 255-64.
262. Hill JE, Fernando WU, Zello GA, Tyler RT, Dahl WJ, Van Kessel AG. Improvement of the representation of bifidobacteria in fecal microbiota metagenomic libraries by application of the cpn60 universal primer cocktail. *Appl Environ Microbiol* 2010; 76 (13): 4550-2.

263. Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature reviews genetics* 2009; 10 (1): 57.
264. Westermann AJ, Gorski SA, Vogel J. Dual RNA-seq of pathogen and host. *Nature Reviews Microbiology* 2012; 10 (9): 618.
265. Bashiardes S, Zilberman-Schapira G, Elinav E. Use of metatranscriptomics in microbiome research. *Bioinformatics and biology insights* 2016; 10:BBI. S34610.
266. Franzosa EA, Morgan XC, Segata N et al. Relating the metatranscriptome and metagenome of the human gut. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2014; 111 (22): E2329-E38.
267. Gosalbes MJ, Durbán A, Pignatelli M et al. Metatranscriptomic approach to analyze the functional human gut microbiota. *PloS one* 2011; 6 (3): e17447.
268. Peano C, Pietrelli A, Consolandi C, Rossi E, Petiti L, Tagliabue L, et al. An efficient rRNA removal method for RNA sequencing in GC-rich bacteria. *Microbial informatics and experimentation*. 2013;3(1):1.
269. Simon C, Daniel R. Metagenomic analyses: past and future trends. *Appl Environ Microbiol* 2011; 77 (4): 1153-61.
270. Xiong W, Abraham PE, Li Z, Pan C, Hettich RL. Microbial metaproteomics for characterizing the range of metabolic functions and activities of human gut microbiota. *Proteomics* 2015; 15(20): 3424-38.
271. Jordan KW, Nordenstam J, Lauwers GY et al. Metabolomic characterization of human rectal adenocarcinoma with intact tissue magnetic resonance spectroscopy. *Diseases of the colon and rectum* 2009; 52(3): 520.

272. Aldridge BB, Rhee KY. Microbial metabolomics: innovation, application, insight. *Current opinion in microbiology* 2014; 19: 90-6.
273. Vernocchi P, Del Chierico F, Putignani L. Gut microbiota profiling: metabolomics based approach to unravel compounds affecting human health. *Frontiers in microbiology* 2016; 7: 1144.
274. Aguiar-Pulido V, Huang W, Suarez-Ulloa V, Cickovski T, Mathee K, Narasimhan G. Metagenomics, metatranscriptomics, and metabolomics approaches for microbiome analysis: supplementary issue: bioinformatics methods and applications for big metagenomics data. *Evolutionary Bioinformatics* 2016; 12: EBO. S36436.
275. Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of molecular endocrinology* 2000; 25 (2): 169-93.
276. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K, et al. The real-time polymerase chain reaction. *Molecular aspects of medicine* 2006; 27 (2-3): 95-125.
277. Mackay IM, Arden KE, Nitsche A. Real-time PCR in virology. *Nucleic acids research* 2002; 30(6): 1292-305.
278. Espy M, Uhl J, Sloan L, Buckwalter S, Jones M, Vetter E, et al. Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clinical microbiology reviews* 2006; 19 (1): 165-256.
279. Gut M, Leutenegger CM, Huder JB, Pedersen NC, Lutz H. One-tube fluorogenic reverse transcription-polymerase chain reaction for the

quantitation of feline coronaviruses. *Journal of virological methods*. 1999; 77 (1): 37-46.

280. Van der Velden V, Hochhaus A, Cazzaniga G, Szczepanski T, Gabert J, Van Dongen J. Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. *Leukemia* 2003; 17 (6): 1013.

281. Tyagi S, Kramer FR. Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. *Nature biotechnology* 1996; 14 (3):303.

282. Caplin B, Rasmussen R, Bernard P, Wittwer C. Lightcycler™ hybridization probes—the most direct way to monitor PCR amplification and mutation detection. *Biochemica* 1999; 1: 5-8.

283. Haberman Y, Tickle TL, Dexheimer PJ et al. Pediatric Crohn disease patients exhibit specific ileal transcriptome and microbiome signature. *The Journal of clinical investigation* 2014; 124 (8): 3617-33.

284. Atarashi K, Tanoue T, Ando M et al. Th17 cell induction by adhesion of microbes to intestinal epithelial cells. *Cell* 2015; 163 (2): 367-80.

285. Integrative H. The Integrative Human Microbiome Project: dynamic analysis of microbiome-host omics profiles during periods of human health and disease. *Cell host & microbe* 2014; 16 (3): 276.

286. Knox NC, Forbes JD, Van Domselaar G, Bernstein CN. The gut microbiome as a target for IBD treatment: are we there yet? *Current treatment options in gastroenterology* 2019; 17 (1): 115-26.

287. Takahashi K, Nishida A, Fujimoto T et al. Reduced abundance of butyrate-producing bacteria species in the fecal microbial community in Crohn's disease. *Digestion* 2016; 93 (1): 59-65.
288. Nishida A, Inoue R, Inatomi O, Bamba S, Naito Y, Andoh A. Gut microbiota in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Clinical journal of gastroenterology* 2018; 11 (1): 1-10.
289. Darfeuille-Michaud A, Boudeau J, Bulois P et al. High prevalence of adherent-invasive Escherichia coli associated with ileal mucosa in Crohn's disease. *Gastroenterology* 2004; 127 (2): 412-21.
290. Moustafa A, Li W, Anderson EL et al. Genetic risk, dysbiosis, and treatment stratification using host genome and gut microbiome in inflammatory bowel disease. *Clinical and translational gastroenterology* 2018; 9 (1): e132.
291. Khan I, Ullah N, Zha L et al. Alteration of Gut Microbiota in Inflammatory Bowel Disease (IBD): Cause or Consequence? IBD Treatment Targeting the Gut Microbiome. *Pathogens* 2019; 8(3): 126.
292. Schirmer M, Franzosa EA, Lloyd-Price J et al. Dynamics of metatranscription in the inflammatory bowel disease gut microbiome. *Nature microbiology* 2018; 3 (3) :337.
293. Sokol H, Leducq V, Aschard H et al. Fungal microbiota dysbiosis in IBD. *Gut* 2017; 66 (6): 1039-48.
294. Ungaro F, Massimino L, Furfaro F et al. Metagenomic analysis of intestinal mucosa revealed a specific eukaryotic gut virome signature in early-diagnosed inflammatory bowel disease. *Gut microbes* 2019; 10 (2): 149-58.

295. Geerlings SY, Kostopoulos I, De Vos WM, Belzer C. Akkermansia muciniphila in the human gastrointestinal tract: when, where, and how? *Microorganisms* 2018; 6 (3): 75.
296. Lee SM, Donaldson GP, Mikulski Z, Boyajian S, Ley K, Mazmanian SK. Bacterial colonization factors control specificity and stability of the gut microbiota. *Nature* 2013; 501 (7467): 426.
297. Kıyan M. Anaerop, Sporsuz, Gram Pozitif Basil ve Koklar. Ed. Ustaçelebi Ş. 1. Baskı. Ankara: Güneş Kitapevi, 1999; 649-58.
298. Esaiassen E, Hjerde E, Cavanagh JP, Simonsen GS, Klingenberg C. Bifidobacterium Bacteremia: Clinical Characteristics and a Genomic Approach To Assess Pathogenicity. *Journal of clinical microbiology*. 2017; 55 (7): 2234-48.
299. Lopez-Siles M, Duncan SH, Garcia-Gil LJ, Martinez-Medina M. Faecalibacterium prausnitzii: from microbiology to diagnostics and prognostics. *The ISME journal* 2017; 11 (4): 841.
300. Kıyan M. Anaerop Bakteriler. Ed. Ustaçelebi Ş. 1. Baskı. Ankara: Güneş Kitapevi; 1999; 611-22.
301. Brennan CA, Garrett WS. Fusobacterium nucleatum—symbiont, opportunist and oncobacterium. *Nature Reviews Microbiology* 2019; 17 (3): 156-66.
302. Castellarin M, Warren RL, Freeman JD et al. Fusobacterium nucleatum infection is prevalent in human colorectal carcinoma. *Genome research* 2012; 22 (2): 299-306.

303. Conway T, Cohen PS. Commensal and pathogenic *Escherichia coli* metabolism in the gut. *Microbiology spectrum* 2015; 3(3).
304. Erdem B. Enterobactericea. Ed. Ustaçelebi Ş. 1. Baskı. Ankara: Güneş Kitapevi; 1999; 471-517
305. Prabhurajeshwar C, Chandrakanth RK. Probiotic potential of Lactobacilli with antagonistic activity against pathogenic strains: An in vitro validation for the production of inhibitory substances. *Biomedical journal* 2017; 40 (5): 270-83.
306. Kıyan M. Anaerop, Gram Negatif Basil ve Koklar. Ed. Ustaçelebi Ş. 1. Baskı. Ankara: Güneş Kitapevi; 1999; 623-51.
307. Ruan Y, Shen L, Zou Y et al. Comparative genome analysis of *Prevotella intermedia* strain isolated from infected root canal reveals features related to pathogenicity and adaptation. *BMC genomics* 2015; 16(1): 122.
308. Byrne DP, Manandhar SP, Potempa J, Smalley JW. Breakdown of albumin and haemalbumin by the cysteine protease interpain A, an albuminase of *Prevotella intermedia*. *BMC microbiology* 2015; 15 (1): 185.
309. Matsuki T, Watanabe K, Fujimoto J et al. Development of 16S rRNA-gene-targeted group-specific primers for the detection and identification of predominant bacteria in human feces. *Appl Environ Microbiol.* 2002; 68 (11): 5445-51.
310. Bartosch S, Fite A, Macfarlane GT, McMurdo ME. 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. *Appl Environ Microbiol* 2004;70(6):3575-81.

311. Liu P, Liu Y, Wang J, Guo Y, Zhang Y, Xiao S. Detection of fusobacterium nucleatum and fadA adhesin gene in patients with orthodontic gingivitis and non-orthodontic periodontal inflammation. *PLoS One*. 2014; 9 (1): e85280.
312. Robertson SJ, Zhou JY, Geddes K et al. Nod1 and Nod2 signaling does not alter the composition of intestinal bacterial communities at homeostasis. *Gut microbes* 2013; 4 (3): 222-31.
313. Maeda H, Fujimoto C, Haruki Y et al. Quantitative real-time PCR using TaqMan and SYBR Green for Actinobacillus actinomycetemcomitans, Porphyromonas gingivalis, Prevotella intermedia, tetQ gene and total bacteria. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 2003; 39 (1): 81-6.
314. Everard A, Belzer C, Geurts L et al. Cross-talk between Akkermansia muciniphila and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2013; 110 (22): 9066-71.
315. Mirsepasi-Lauridsen HC, Vallance BA, Krogfelt KA, Petersen AM. Escherichia coli pathobionts associated with inflammatory bowel disease. *Clinical microbiology reviews* 2019; 32 (2): e00060-18.
316. Wills ES, Jonkers DM, Savelkoul PH, Masclee AA, Pierik MJ, Penders J. Fecal microbial composition of ulcerative colitis and Crohn's disease patients in remission and subsequent exacerbation. *PLoS One*. 2014; 9 (3): e90981.
317. Hansen R, Russell RK, Reiff C et al. Microbiota of de-novo pediatric IBD: increased Faecalibacterium prausnitzii and reduced bacterial diversity in Crohn's but not in ulcerative colitis. *The American journal of gastroenterology* 2012; 107 (12): 1913.

318. Fyderek K, Strus M, Kowalska-Duplaga K et al. Mucosal bacterial microflora and mucus layer thickness in adolescents with inflammatory bowel disease. *World journal of gastroenterology: WJG* 2009; 15 (42): 5287.
319. Forbes JD, Van Domselaar G, Bernstein CN. Microbiome survey of the inflamed and noninflamed gut at different compartments within the gastrointestinal tract of inflammatory bowel disease patients. *Inflammatory bowel diseases* 2016; 22 (4): 817-25.
320. Kabeerdoss J, Jayakanthan P, Pugazhendhi S, Ramakrishna BS. Alterations of mucosal microbiota in the colon of patients with inflammatory bowel disease revealed by real time polymerase chain reaction amplification of 16S ribosomal ribonucleic acid. *The Indian journal of medical research* 2015; 142 (1): 23.
321. Vrakas S, Mountzouris KC, Michalopoulos G et al. Intestinal bacteria composition and translocation of bacteria in inflammatory bowel disease. *PloS one* 2017; 12(1): e0170034.
322. Burri E, Beglinger C. Faecal calprotectin-a useful tool in the management of inflammatory bowel disease. *Swiss medical weekly* 2012; 142 (1314).
323. Clyne B, Olshaker JS. The C-reactive protein. *The Journal of emergency medicine* 1999; 17 (6): 1019-25.
324. Akpınar E, Saatçi E, Sandıkçı S, Aysalar U. Eritrosit Sedimantasyon Hızı ve C-Reaktif Protein: Hâlâ Değerli mi? *Türkiye Aile Hekimliği Dergisi*. 2008;11(4):154-62.

325. Granit D, Tınazlı M, Yılmaz N, Alagözlü H. İnflamatuar Bağırsak Hastalıkları ve Mikrobiyota. *Türkiye Klinikleri Gastroenterohepatology-Special Topics* 2018; 11(3): 24-32.
326. Barnich N, Darfeuille-Michaud A. Adherent-invasive Escherichia coli and Crohn's disease. *Current opinion in gastroenterology* 2007;23 (1):16-20.
327. Keighly M, Arabi Y, Dimock F, Burdon D, Allan R, Alexander-Williams J. Influence of inflammatory bowel disease on intestinal microflora *Gut* 1978; 19:1099-104.
328. Martin HM, Campbell BJ, Hart CA et al. Enhanced Escherichia coli adherence and invasion in Crohn's disease and colon cancer. *Gastroenterology* 2004;127(1):80-93.
329. Rinta-Kanto JM, Sun S, Sharma S, Kiene RP, Moran MA. Bacterial community transcription patterns during a marine phytoplankton bloom. *Environmental microbiology* 2012;14(1):228-39.
330. Meconi S, Vercellone A, Levillain F et al. Adherent-invasive Escherichia coli isolated from Crohn's disease patients induce granulomas in vitro. *Cellular microbiology* 2007; 9(5):1252-61.
331. Schüssler P, Kruis W, Marget W. Lipid A antibody titers and O antibody titers in Crohn's disease, ulcerative colitis and acute enteritis (author's transl). *Medizinische Klinik* 1976;71 (44): 1898-902.
332. Burke D, Axon A. Hydrophobic adhesin of E coli in ulcerative colitis. *Gut* 1988; 29 (1): 41-3.

333. Petersen AM, Nielsen EM, Litrup E, Brynskov J, Mirsepasi H, Krogfelt KA. A phylogenetic group of *Escherichia coli* associated with active left-sided inflammatory bowel disease. *BMC microbiology* 2009; 9 (1): 171.
334. Holton J. Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*. *Current infectious disease reports* 2008; 10 (2): 99-104.
335. Zhang W, Zhu B, Xu J et al. *Bacteroides fragilis* protects against antibiotic-associated diarrhea in rats by modulating intestinal defenses. *Frontiers in immunology* 2018; 9: 1040.
336. Lee YK, Mehrabian P, Boyajian S et al. The Protective Role of *Bacteroides fragilis* in a Murine Model of Colitis-Associated Colorectal Cancer. *mSphere* 2018; 3 (6): e00587-18.
337. Prindiville TP, Sheikh RA, Cohen SH, Tang YJ, Cantrell MC, Silva Jr J. *Bacteroides fragilis* enterotoxin gene sequences in patients with inflammatory bowel disease. *Emerging infectious diseases* 2000; 6(2):171.
338. Deng H, Li Z, Tan Y et al. A novel strain of *Bacteroides fragilis* enhances phagocytosis and polarises M1 macrophages. *Scientific reports* 2016; 6: 29401.
339. Larsen JM. The immune response to *Prevotella* bacteria in chronic inflammatory disease. *Immunology* 2017; 151 (4): 363-74.
340. Wlodarska M, Thaiss CA, Nowarski R et al. NLRP6 inflammasome orchestrates the colonic host-microbial interface by regulating goblet cell mucus secretion. *Cell* 2014; 156 (5): 1045-59.

341. Lewis JD, Chen EZ, Baldassano RN et al. Inflammation, antibiotics, and diet as environmental stressors of the gut microbiome in pediatric Crohn's disease. *Cell host & microbe* 2015;18(4):489-500.
342. Gevers D, Kugathasan S, Knights D, Kostic AD, Knight R, Xavier RJ. A microbiome foundation for the study of Crohn's disease. *Cell host & microbe* 2017; 21(3): 301-4.
343. Zuo T, Ng SC. The gut microbiota in the pathogenesis and therapeutics of inflammatory bowel disease. *Frontiers in microbiology* 2018;9.
344. Cao Y, Shen J, Ran ZH. Association between *Faecalibacterium prausnitzii* reduction and inflammatory bowel disease: a meta-analysis and systematic review of the literature. *Gastroenterology research and practice* 2014.
345. Willing B, Halfvarson J, Dicksved J, Rosenquist M, Jänerot G, Engstrand L, Tysk C, Jansson JK. Twin studies reveal specific imbalances in the mucosa-associated microbiota of patients with ileal Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2009;15:653-60.
346. Sokol H, Seksik P, Furet J et al. Low counts of *Faecalibacterium prausnitzii* in colitis microbiota. *Inflammatory bowel diseases* 2009; 15(8): 1183-9.
347. Wang M, Molin G, Ahrné S, Adawi D, Jeppsson B. High proportions of proinflammatory bacteria on the colonic mucosa in a young patient with ulcerative colitis as revealed by cloning and sequencing of 16S rRNA genes. *Digestive diseases and sciences* 2007;52(3):620-7.

348. Duncan SH, Louis P, Flint HJ. Lactate-utilizing bacteria, isolated from human feces, that produce butyrate as a major fermentation product. *Appl Environ Microbiol* 2004; 70 (10): 5810-7.
349. Himmel ME, Yao Y, Orban PC, Steiner TS, Levings MK. Regulatory T-cell therapy for inflammatory bowel disease: more questions than answers. *Immunology* 2012;136(2):115-22.
350. Sokol H, Pigneur B, Watterlot L et al. Faecalibacterium prausnitzii is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2008; 105 (43): 16731-6.
351. Lopez-Siles M, Martinez-Medina M, Busquets D et al. Mucosa-associated Faecalibacterium prausnitzii and Escherichia coli co-abundance can distinguish Irritable Bowel Syndrome and Inflammatory Bowel Disease phenotypes. *International journal of medical microbiology*. 2014;304(3-4):464-75.
352. Liévin-Le Moal, V., & Servin, A. L. (2014). Anti-infective activities of lactobacillus strains in the human intestinal microbiota: from probiotics to gastrointestinal anti-infectious biotherapeutic agents. *Clinical microbiology reviews* 2014; 27(2), 167-199.
353. Heilig HG, Zoetendal EG, Vaughan EE, Marteau P, Akkermans AD, de Vos WM. Molecular diversity of Lactobacillus spp. and other lactic acid bacteria in the human intestine as determined by specific amplification of 16S ribosomal DNA. *Appl Environ Microbiol* 2002; 68 (1): 114-23.
354. Goulet O. Potential role of the intestinal microbiota in programming health and disease. *Nutrition reviews* 2015;73:32-40.

355. Walter J. Ecological role of lactobacilli in the gastrointestinal tract: implications for fundamental and biomedical research. *Appl Environ Microbiol* 2008; 74 (16): 4985-96.
356. Wang R-F, Cao W-W, Cerniglia CE. PCR detection and quantitation of predominant anaerobic bacteria in human and animal fecal samples. *Appl Environ Microbiol* 1996;62(4):1242-7.
357. von Schillde M-A, Hörmannspenger G, Weiher M et al. Lactocepine secreted by *Lactobacillus* exerts anti-inflammatory effects by selectively degrading proinflammatory chemokines. *Cell host & microbe* 2012; 11(4): 387-96.
358. Mileti E, Matteoli G, Iliev ID, Rescigno M. Comparison of the immunomodulatory properties of three probiotic strains of *Lactobacilli* using complex culture systems: prediction for in vivo efficacy. *PloS one*. 2009;4(9): e7056.
359. Peña JA, Rogers AB, Ge Z et al. Probiotic *Lactobacillus* spp. diminish *Helicobacter hepaticus*-induced inflammatory bowel disease in interleukin-10-deficient mice. *Infection and immunity* 2005;73(2):912-20.
360. Nell S, Suerbaum S, Josenhans C. The impact of the microbiota on the pathogenesis of IBD: lessons from mouse infection models. *Nature Reviews Microbiology* 2010; 8(8):564.
361. Wang W, Chen L, Zhou R et al. Increased proportions of *Bifidobacterium* and the *Lactobacillus* group and loss of butyrate-producing bacteria in inflammatory bowel disease. *Journal of clinical microbiology* 2014;52(2):398-406.

362. Rivière A, Selak M, Lantin D, Leroy F, De Vuyst L. Bifidobacteria and butyrate-producing colon bacteria: importance and strategies for their stimulation in the human gut. *Frontiers in microbiology* 2016; 7: 979.
363. Grimm V, Westermann C, Riedel CU. Bifidobacteria-host interactions an update on colonisation factors. *BioMed research international* 2014.
364. Seksik P, Rigottier-Gois L, Gramet G et al. Alterations of the dominant faecal bacterial groups in patients with Crohn's disease of the colon. *Gut* 2003; 52 (2): 237-42.
365. Campieri M, Rizzello F, Venturi A, Poggioli G, Ugolini F. Combination of antibiotic and probiotic treatment is efficacious in prophylaxis of post-operative recurrence of Crohn's disease: a randomized controlled study vs mesalamine. *Gastroenterology* 2000; 118(4):A781.
366. Giaffer M, Holdsworth C, Duerden B. The assessment of faecal flora in patients with inflammatory bowel disease by a simplified bacteriological technique. *Journal of medical microbiology* 1991; 35 (4): 238-43.
367. Van de Merwe J, Schröder A, Wensinck F, Hazenberg M. The obligate anaerobic faecal flora of patients with Crohn's disease and their first-degree relatives. *Scandinavian journal of gastroenterology* 1988; 23 (9): 1125-31.
368. Favier C, Neut C, Mizon C, Cortot A, Colombel J, Mizon J. Fecal β -d-galactosidase production and bifidobacteria are decreased in Crohn's disease. *Digestive diseases and sciences* 1997; 42 (4): 817-22.
369. Han YW. *Fusobacterium nucleatum*: a commensal-turned pathogen. *Current opinion in microbiology* 2015; 23: 141-7.

370. Strauss J, Kaplan GG, Beck PL et al. Invasive potential of gut mucosa-derived *Fusobacterium nucleatum* positively correlates with IBD status of the host. *Inflammatory bowel diseases* 2011; 17 (9): 1971-8.
371. Pascal V, Pozuelo M, Borrueal N, Casellas F, Campos D, Santiago A, et al. A microbial signature for Crohn's disease. *Gut*. 2017;66(5):813-22.
372. Macchione I, Lopetuso L, Ianaro G et al. *Akkermansia muciniphila*: key player in metabolic and gastrointestinal disorders. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2019; 23 (18): 8075-83.
373. Presti AL, Chierico FD, Altomare A et al. Exploring the genetic diversity of the 16S rRNA gene of *Akkermansia muciniphila* in IBD and IBS. *Future Microbiology* 2019(00).
374. Kump P, Wurm P, Gröchenig H et al. The taxonomic composition of the donor intestinal microbiota is a major factor influencing the efficacy of faecal microbiota transplantation in therapy refractory ulcerative colitis. *Alimentary pharmacology & therapeutics* 2018; 47(1): 67-77.
375. Gevers D, Kugathasan S, Denson LA et al. The treatment-naive microbiome in new-onset Crohn's disease. *Cell host & microbe* 2014; 15(3): 382-92.

8.EKLER

EK 1. Etik kurul onay belgesi



T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

Sayı: B.30.2.ODM.0.20.08/17

18 .01.2019

Sayın Prof. Dr. Belma DURUPINAR

Etik Kurulumuza sunmuş olduğunuz **İnflamatuvar Bağırsak Hastalığı ve Mikrobiyota ilişkisi** başlıklı OMÜ KAİK 2019/17 Karar nolu Mikrobiyoloji çalışması nitelikli araştırma projeniz amaç, gerekçe, yaklaşım ve yöntemle ilgili açıklamaları, Klinik Araştırmalar Etik kurulu yönergesine göre 17.01.2019 tarihli Etik Kurulumuzda incelenmiş etik açıdan uygun bulunmuştur. Ancak araştırma bütçesinin maddi desteği henüz sağlanamadığından projeye bütçe desteği sağlanıp, tarafımıza bildirilmesinden sonra başlanmasına oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinize arz/rica ederim.

Prof.Dr. Emine ÇULAK
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Başkanı

EK 2. Turnitin orijinallik raporu

İnflamatuvar Bağırsak Hastalığı ve Mikrobiyota ilişkisi

ORIJINALLIK RAPORU

%9 BENZERLİK ENDEKSİ	%6 İNTERNET KAYNAKLARI	%2 YAYINLAR	%7 ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ
--------------------------------	-------------------------------------	-----------------------	-------------------------------

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	Submitted to Konya Necmettin Erbakan University Öğrenci Ödevi	%1
2	Submitted to Trakya University Öğrenci Ödevi	%1
3	Submitted to Ondokuz Mayıs Üniversitesi Öğrenci Ödevi	%1
4	klimud2015.org İnternet Kaynağı	%1
5	sistem.nevsehir.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1