

EKİN ECE GÜNER

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İSTANBUL-2021

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**ALLOJENİK KÖK HÜCRE NAKİLLERİNDE
MİKROBİYOTANIN ETKİSİ: ENGRAFMAN VE GVHD**

EKİN ECE GÜRER

**DANIŞMAN
PROF.DR.FATMA SAVRAN OĞUZ**

**TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
TIBBİ BİYOLOJİ PROGRAMI**

İSTANBUL-2021

İTHAF

Aileme ve ailemizin en minik üyesi Mario'ya ithaf ediyorum.



TEŞEKKÜR

Bana aile ortamı sunan, bilimsel anlamda ışık tutan, her daim desteğini esirgemeyen ve tüm bu imkanları sağlayan çok kıymetli hocam Prof. Dr. Fatma SAVRAN OĞUZ'a teşekkür ederim.

Tezimin her aşamasında bana yardımcı ve destek olan hocalarım Prof.Dr.Zerrin AKTAŞ ve Prof.Dr.Sevgi BEŞİŞİK KALAYOĞLU'na teşekkür ederim.

Değerli katkılarından dolayı hocam Prof.Dr.Osman Uğur SEZERMAN'a teşekkür ederim.

Tez çalışmamı yapabilmem için bana klinik olanaklarını sağlayan ve her zaman bilgilerini paylaşan değerli hocam Prof.Dr.Zafer GÜLBAŞ'a teşekkür ederim.

Tez çalışmam esnasında bana destek veren hocam Doç.Dr.Çiğdem KEKİK ÇINAR'a teşekkür ederim.

Her zaman güler yüzü ile yardımlarını hiçbir zaman eksik etmeyen Araştırma Görevlisi Demet KIVANÇ'a teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 35398

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	HATA! YER İŞARETİ TANIMLANMAMIŞ.
BEYAN.....	HATA! YER İŞARETİ TANIMLANMAMIŞ.
İTHAF.....	İİ
TEŞEKKÜR.....	İİİ
İÇİNDEKİLER	İV
TABLolar LİSTESİ.....	Vİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ	Vİİİ
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	X
ÖZET	Xİİ
ABSTRACT.....	Xİİİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Allojenik Hematopoetik Kök Hücre Nakli (HKHN)	4
2.2. Akut Graft Versus Host Hastalığı (GVHD).....	5
2.3. Mikrobiyota Kompozisyonu	8
2.4. Mikrobiyota Kolonizasyonu	9
2.5. Mikrobiyota Fizyolojisi	10
2.6. Major Histocompatibility Complex (MHC) (Büyük Doku uyum Kompleksi)	18
2.7. 16S rRNA.....	19
2.8. Mikrobiyota Analizinde Kullanılan Yöntemler	21
2.8.1. Parmak-İzi Analiz Yöntemleri (DGGE, TGGE, T-RFLP)	21
2.8.2. Floresan İn-Situ Hibridizasyon (FISH) Yöntemi.....	21
2.8.3. DNA Mikroarray Yöntemi.....	22
2.8.4. Yüksek Çözünürlükte Erime (HRM) Analizi	22
2.8.5. Yeni Nesil Dizileme (YND) Yöntemi	25
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	26
3.1. Hasta Grubu	26
3.2. Kontrol Grubu.....	26
3.3. Çalışmaya Dahil Edilme Kriterleri	26
3.4. Gereçler.....	27

3.4.1. Çalışmada Kullanılan Genel Cihazlar	27
3.4.2. Çalışmada Kullanılan Sarf ve Kimyasal Malzemeler	27
3.5. Kullanılan Kitler	28
3.5.1. Dışkıdan Nükleik Asit İzolasyon Kiti	28
3.5.2. Kullanılan Solüsyonlar	29
3.5.3. Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler	29
3.5.4. HRM ile Bakteriyal Metagenomik Analiz Kiti	30
3.5.4.1. Kullanılan Solüsyonlar	30
3.5.4.2. Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler	30
3.5.5. YND ile Bakteriyal Metagenomik Analiz İçin Kütüphane Hazırlama Kiti (16S rRNA V3-V4 460 bp amplicon kütüphaneleri)	30
3.5.6. Kullanılan Kitler	30
3.5.7. Kullanılan Cihazlar	30
3.6. Dışkıdan Nükleik Asit İzolasyonu	30
3.6.1. Uygulama Protokolü	32
3.7. HRM Analizi	33
3.7.1. Uygulama Protokolü	35
3.8. Yeni Nesil Dizileme Yöntemi	36
3.8.1. Uygulama Protokolü	38
3.9. Antibiyotik Direnç Testi	39
3.9.1. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanışları	39
3.9.1.1. Nükleik Asit Boyama Çözeltisi	39
3.9.1.2. %1'lik Agaroze Jel	39
3.9.1.3. X Taq PCR Master Mix	39
3.9.1.4. Primerler	39
3.10. DNA Amplifikasyonu	40
3.10.1. Elektroforez	41
3.10.2. Görüntüleme	41
3.11. İstatistiksel Analiz	41
4. BULGULAR	42
4.1. Mikrobiyota Analizi	45
4.2. Mikrobiyota ile allo-HKHN ilişkisi	46
4.3. Mikrobiyota ve Engrafman	51

4.4. Mikrobiyota ve aGVHD	58
4.5. Mikrobiyota ve Direnç Genleri	59
4.6. Direnç Geni Bulguları	60
4.7. Mikrobiyota ve HLA	61
5. TARTIŞMA	62
KAYNAKLAR	70
FORMLAR	HATA! YER İŞARETİ TANIMLANMAMIŞ.
6. GÖNÜLLÜ ONAY FORMU	HATA! YER İŞARETİ TANIMLANMAMIŞ.
HAM VERİLER	85
ETİK KURUL KARARI	HATA! YER İŞARETİ TANIMLANMAMIŞ.
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI	95
ÖZGEÇMİŞ	HATA! YER İŞARETİ TANIMLANMAMIŞ.

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2.1: Yüksek miktarda değişken bölgeler ve bu bölgelerin gendeki başlangıç ile bitiş pozisyonları.....	20
Tablo 3.1: Çalışmada kullanılan primerler	40
Tablo 4.1: Çalışma gruplarını demografik verileri	42
Tablo 4.2: Nakle ait komplikasyonlar.....	43
Tablo 4.3: aGVHD dereceleri ve hastalık çeşitleri	44
Tablo 4.4: Hastalarda ve kontrol grubunda en çok görülen HLA alelleri	45
Tablo 4.5: Vericilerin havuzları.....	47
Tablo 4.6: Alıcıların nakil öncesi NA havuzları.....	47
Tablo 4.7: Hastaların nakil sonrası NA havuzları.....	48
Tablo 4.8: GSBL pozitifliği	61
Tablo 4.9: HLA DRB1*03:01 ile GVHD/Relaps/Exitus ilişkisi.....	61

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1: Allo-HKHN ve GVHD.....	5
Şekil 2.2: Graft-versus host hastalığının başlaması	6
Şekil 2.3: Doğuştan gelen mikrobiyal kolonizasyon.....	9
Şekil 2.4: Bağırsak mikrobiyotası ve bağışıklık aktivasyonu.....	10
Şekil 2.5: KZYA'ların yapısı.....	12
Şekil 2.6: Çekirdek insan mikrobiyomu kavramı	15
Şekil 2.7: Bağırsak bağışıklık sistemi.....	16
Şekil 2.8: HLA genomik bölgesi gen haritası.....	18
Şekil 2.9: HRM yönteminde heterozigot ve homozigot denatürasyon eğrileri	23
Şekil 2.10: HRM analiz yönteminin reaksiyon mekanizması. (a) Sıcaklığa bağlı olarak çift iplikli DNA'nın denatürasyonu (b) HRM analizi sayesinde normalize eğrilerin oluşumu, (c) Amplikonların melting (erime) eğrisi ve erime sıcaklığına göre negatif türev eğrisi (dF/dT).....	24
Şekil 2.11: YND Temel Prensipleri	25
Şekil 3.1: Nükleik asit izolasyon kiti	28
Şekil 3.2: Kit solüsyonları	29
Şekil 3.3: DNA izolasyon aşamaları	31
Şekil 3.4: Spektrofotometre ölçümü	31
Şekil 3.5: Silika kolonlar	32
Şekil 3.6: Saf DNA	33
Şekil 3.7: Karışım hazırlama aşamaları	35
Şekil 3.8: qPCR Cihazı	36
Şekil 4.1: HRM analizi sonucu dendogram çizimleri.....	46
Şekil 4.2: Mikrobiyotadaki baskın filumlar.....	50
Şekil 4.3: Vericideki baskın filumlar.....	50
Şekil 4.4: Nakil öncesi ve sonrası için <i>Roseburia</i> cinsi seviyeleri	51
Şekil 4.5: Nakil öncesi ve sonrası için <i>Bifidobacterium</i> cinsi seviyeleri.....	52
Şekil 4.6: Nakil öncesi ve sonrası için <i>Faecalibacterium</i> cinsi seviyeleri	52
Şekil 4.7: Nakil öncesi ve sonrası için <i>Dorea</i> cinsi seviyeleri.....	53
Şekil 4.8: Nakil öncesi ve sonrası için <i>Blautia</i> cinsi seviyeleri.....	53
Şekil 4.9: Nakil öncesi ve sonrası için <i>Lactobacillus</i> cinsi seviyeleri	54

Şekil 4.10: Nakil öncesi ve sonrası için <i>Ruminococcus_1</i> cinsi seviyeleri	54
Şekil 4.11: Nakil öncesi ve sonrası için <i>Akkermansia</i> cinsi seviyeleri.....	55
Şekil 4.12: Nakil öncesi ve sonrası için <i>Barnesiella</i> cinsi seviyeleri	55
Şekil 4.13: Nakil öncesi ve sonrası için <i>Dialister</i> cinsi seviyeleri.....	56
Şekil 4.14: Nakil öncesi ve nakil sonrası <i>Prevotella_9</i> cinsi seviyeleri	56
Şekil 4.15: Nakil öncesi ve sonrası için <i>Lachnoclostridium</i> cinsi seviyeleri.....	57
Şekil 4.16: Nakil öncesi ve sonrası için <i>Bacteriodes</i> cinsi seviyeleri.....	57
Şekil 4.17: Nakil öncesi ve sonrası için <i>Bacteriodes</i> cinsi seviyeleri.....	58
Şekil 4.18: Nakil öncesi ve nakil sonrası <i>Enterococcus</i> cinsi seviyeleri	59
Şekil 4.19: Nakil öncesi ve nakil sonrası <i>Streptococcus</i> cinsi seviyeleri	59
Şekil 4.20: Nakil öncesi ve nakil sonrası <i>Klebsiella</i> cinsi seviyeleri.....	60

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

°C: Derece

aGVHD: Akut graft-versus host hastalığı

AHR: Aril hidrokarbon reseptörü

ASH: Antijen sunan hücreleri

BSI: Kan dolaşımı enfeksiyonu

CIBMTR: Uluslararası Kan ve İlik Nakli Araştırma Merkezi

DAMP: Hasarla ilişkili moleküler motifler

DGGE: Denaturing Gradient Gel Electrophoresis

dk: Dakika

EBMTR: Avrupa Kemik İliği Nakli Birliği

EFSA: Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi

FDA: Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç İdaresi

FISH: Floresan İn-Situ Hibridizasyon

FN: Ateşli nötropenin

GALT: Bağırsakla ilişkili lenfoid dokular=Gut Associated Lymphoid Tissue

GI GVHD: Gastrointestinal GVHD

GIS: Gastrointestinal sistemde

GRAS: İnsanlar tarafından tüketim için genel olarak güvenli

GVT: Graft-versus tümör

HKH: Hematopoetik kök hücreler

HKHN: Allo- hematopoetik kök hücre nakli

HLA: Human Leukocyte Antigen)

HMP: İnsan Mikrobiyom Projesi

HRM: Yüksek Çözünürlüklü Erime

KİT: Kemik iliği nakil

KZYA: Kısa zincirli yağ asitlerini

MALT: Mukoza ile ilişkili lenfoid doku=Mucosa Associated Lymphoid Tissue

MHC: Büyük Doku uyum Kompleksi= Major Histocompatibility Complex

MHCİb: MHC Sınıf Ib

mg: Miligram

ml: Mililitre

mM: Milimolar

NIH: Birleşik Devletler Ulusal Sağlık Enstitüleri

NKTC: Nature Killer T Cell

NLR: NOD benzeri reseptörler

OTU: Operasyonel taksonomik birimleri

PAMP: Patojenle ilişkili moleküler motifler

PAS: Periodic circadian protein-PER, AHR nuclear translocator-ARNT, single-minded protein –SIM

PCR: Polimeraz Zincir Reaksiyon

PEPT 1: Peptit Taşıyıcı Protein 1

Pmol: Pikomol

PSA: Polisakkarit A

QPS: Nitelikli güvenlik karinesi

RT-PZR=qPCR: Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Sn: Saniye

SPSS: Toplum Bilimleri İstatistik paketi= Statistical Package for Social Sciences

TGGE: Temperature Gradient Gel Electrophoresis

TLR: Toll benzeri reseptörler

TLR2: Toll-Like Receptor 2

Tm: Denatüre

T-RFLP: Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism

YND: Yeni Nesil Dizileme

V: Volt

µl: Mikrolitre

µM: Mikron

ÖZET

GÜRER, E.E. Allojenik Kök Hücre Nakillerinde Mikrobiyotanın Etkisi: Engrafman ve GVHD. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji AD, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul. 2021.

Allo- hematopoetik kök hücre nakli (HKHN) sonrası alloreaktif verici T hücreleri, deri, karaciğer, bağırsak, timus, merkezi sinir sistemi, yumurtalık veya testis dahil olmak üzere konağın hedef organlarına ve hematopoetik sisteme saldırabilir ve bu duruma akut graft-versus host hastalığı (aGVHD) adı verilir. İnsan vücudunda, genellikle “mikrobiyota” olarak adlandırılan çok sayıda mikroorganizma kolonize olmuştur. Allo-HKHN ile kullanılan ilaç tedavilerine bağlı olarak mikrobiyotanın değiştiği ve aGVHD gelişimi sırasında mikrobiyotanın hastalığın önemli bir düzenleyicisi olduğu bilinmektedir. Çalışmaya HKHN olmuş 25 hasta/verici dahil edilmiştir. Hastaların %16’sında nüks veya aGVHD geliştiği tespit edilmiştir. Alıcı ve vericilerde yüksek sıklıkta saptanan HLA (Human Leukocyte Antigen), alelleri; HLA-A*02:01, B*51:01, -C*06:02,-DRB1*15:01,-DQB1*03:01 ‘dir. Vericilerin bağırsak mikrobiyotasının %70’ini *Firmicutes* filumu oluştururken, %24’ünü *Bacteroidetes* filumu oluşturuyordu. Hastaların nakil öncesi bağırsak mikrobiyotasının %63’ünü *Firmicutes* filumu, nakil sonrası bağırsak mikrobiyotasının %54’ünü *Firmicutes* filumu olduğu saptanmıştır. Allo-HKHN öncesi alınan dışkı örneği ile engrafman sağlandıktan sonra alınan dışkı örneği karşılaştırıldığında, *Roseburia* (p=0,01), *Bifidobacterium* (p=0,05), *Faecalibacterium* (p=0,04) ve *Dorea* (p=0,05) cinslerinde istatistiksel olarak anlamlı azalma olduğu gözlemlenmiştir. Allo-HKHN’ni takiben aGVHD geliştiren hastalarda *Enterococcus* (p=0,3) cinsinde artış gözlenmiş, Geniş spektrumlu beta laktamaz (GBSL) pozitif olan hastalarda *Klebsiella* (p=0,4) cinsinin artmış olduğu gözlenmiştir fakat istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Bu tez çalışmasında alıcı/verici arasında mikrobiyota flora farklılıkları incelenmiştir. Ayrıca tam uyumlu HLA vericilerin de mikrobiyota ile ilişkisi ortaya konmuştur.

Anahtar Kelimeler: bağırsak mikrobiyotası, kan hastalıkları, hematopoetik kök hücre nakli, MHC

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 35398

ABSTRACT

GURER, E.E. The Effect of Microbiota in Allogeneic Stem Cell Transplants: Engraftment and GVHD. Istanbul University, Institution of Health Sciences, Department of Medical Biology, Master Thesis. 2021. Istanbul.

After allo-hematopoietic stem cell transplantation (HSCT), alloreactive donor T cells can attack target organs and hematopoietic system of the host, including skin, liver, intestine, thymus, central nervous system, ovary or testis, resulting in acute graft-versus host disease (aGVHD) is called. A large number of microorganisms, often called the "microbiota", have been colonized in the human body. It is known that the microbiota changes depending on the drug treatments used with Allo-HSCT and that the microbiota is an important regulator of the disease during the development of aGVHD. 25 patients/donors who had HSCT were included in the study. It was found that 16% of the patients developed relapse or aGVHD. HLA (Human Leukocyte Antigen), alleles detected with high frequency in recipients and donors; It is HLA-A*02:01, B*51:01, -C*06:02, -DRB1*15:01,-DQB1*03:01. *Firmicutes* phylum constituted 70% of the donors' gut microbiota, while Bacteroidetes phylum constituted 24%. It was determined that 63% of the pre-transplant intestinal microbiota of the patients was *Firmicutes* phylum, and 54% of the post-transplant intestinal microbiota was *Firmicutes* phylum. When the stool sample taken before Allo-HSCT was compared with the stool sample taken after engraftment, *Roseburia* (p=0,01), *Bifidobacterium* (p=0,05), *Faecalibacterium* (p=0,04) and *Dorea* (p=0,05) was observed to be a statistically significant decrease in breeds. An raise in *Enterococcus* (p=0,3) genus was observed in patients who developed aGVHD following Allo-HSCT, and an raise in *Klebsiella* (p=0,4) genus was observed in patients with broad-spectrum beta-lactamase (GBSL) positive, but no statistical significance was found. In this thesis study, the microbiota and flora differences between the donor/receiver were examined. In addition, the relationship of fully compatible HLA donors with the microbiota has been revealed.

Key Words: Intestinal microbiota, hematological malignancies, hematopoietic stem cell transplantation, MHC

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kök hücreler, özelleşmiş hücre soylarını oluşturmak için kendilerini yenileyen ve sınırsız bölünme özelliğine sahip farklılaşmamış hücrelerdir. Hematopoetik kök hücreler (HKH), embriyonal gelişim sırasında önce yolk kesesine sonra fetal karaciğere son olarak da dalak ve kemik iliğine göç ederler. Erişkinlerde, sayıca az kök hücre periferel kanda dolaşır ve büyüme faktörleriyle bu sayı artırılabilir (Bryder ve ark., 2006).

Kan hastalıklarını sınıflandırmanın ana prensibi; morfoloji, immünofenotip, genetik, moleküler ve klinik özelliklerine göre hastalıkların tanımlanmasına dayanır. Hücre soylarına ve ek olarak öncü veya olgun lenfoid hücrelerden türetilmelerine göre sınıflandırılmaya tabi tutulurlar (Harris ve ark., 1994).

Hematopoetik Kök Hücre Nakli (HKHN), malign hematolojik hastalıklar veya malign olarak bilinmeyen konjenital ve edinilmiş hastalıklar dahil olmak üzere birçok durum için en iyi bilinen tedavi yöntemidir (Gratwohl ve ark., 2013). HKH'ler, miyeloablasyon sağlanan hastalara kemoterapi ve/veya radyoterapi ile birlikte verildiğinde adezyon molekülleri gibi moleküller sayesinde kemik iliğine yerleşir ve yeni kan hücrelerini oluşturur, yani engrafman özelliği gösterirler (Trowbridge ve ark., 2006).

Otolog veya allojenik hematopoetik kök hücre naklinden sonra nüks, nakil başarısızlığının en sık nedeni haline gelmiştir (Horowitz ve ark., 2018).

HKHN sonrası gelişebilen akut graft-host hastalığı (aGVHD), konaktaki antijenleri yabancı olarak tanıyan T hücrelerinin alloaktivasyonu nedeniyle olur. Yapısal olarak aGVHD ve kronik GVHD olarak tanımlanır, ancak bu iki hastalık patolojisi bazı noktalarda örtüşebilir (Martin ve ark., 1990; Sullivan ve ark., 1991).

İnsanlarda, sindirim ve gıdaların emilmesi süreci gastrointestinal sistemde (GIS) gerçekleşir (Wang ve Kasper, 2014; Rea ve ark., 2016; Fleck ve ark., 2017).

İnsan vücudunda, genellikle “mikrobiyota” olarak adlandırılan çok sayıda mikroorganizma kolonize olmuştur. GIS, yaklaşık 100-150 farklı türde tahminen 100×10^9 bakteri içeriği ile en büyük mikrobiyal topluluğu oluşturur (Faith ve ark., 2013). Buna bağırsak mikrobiyotası adı da verilir. Liflerle beslenen bakteriler, asetat, propionat ve özellikle bütirat gibi kısa zincirli yağ asitlerini (KZYA) kalın bağırsakta üretir (Koh ve ark., 2016).

Tüm memelilerde, konağın işlevlerinin sürekliliği için gerekli olan mikroorganizma toplulukları bulunur. Bunlar; hücresel kompozisyon, genetik çeşitlilik ve metabolik kapasite açısından, konak ile dinamik ve simbiyotik dengede çalışan mikrobiyal hücrelerden oluşur. Vücutta bulunan çeşitli bakteri, arkea, mantar, protozoa, virüsler ve bunların kolektif genomuna ‘mikrobiyom’ adı verilir. Diğer bir yandan tüm bu topluluk, melez organizma olarak da kabul edilir (Shreiner ve ark., 2015; Turnbaugh ve ark., 2007).

Genel olarak, insan bağırsağı mikrobiyotası beslenme değişikliklerine hızla adapte olabilir. Bunun nedeni ise bağırsak mikrobiyotası çeşitliliğinin çok yüksek olmasıdır (Bäckhed ve ark., 2012; David ve ark., 2014).

Bağırsak mikrobiyotası, metabolizmayı ve mevcut enflamasyon düzeyini etkileyebilir. Gut disbiyozu endotoksemi, bağırsak/sistemik iltihaplanma ile ilişkili olabilir ve nöroenflamasyonu tetikleyebilirken sağlıklı bir bağırsak mikrobiyotası ise, enflamasyonu, anti-enflamatuar moleküllerinin üretimini indükleyerek enflamasyonu azaltabilir (Riccio ve ark., 2011; Riccio ve Rossano, 2013, 2015).

Allo-HKHN sonrası hastaların mortalitesi ve GVHD ile bağırsak mikrobiyotası ilişkisi (Murphy ve Nguyen, 2011; Zama ve ark., 2017), bağırsak mikrobiyotasının insan immün sistemini etkilediğine dair giderek artan kanıtlar ile son dönemlerde allo-HKHN sonrası mikrobiyotanın önemini arttırmıştır (Round ve Mazmanian, 2009; Postler ve Ghosh, 2017).

‘HLA (Human Leukocyte Antigen)’, insan kromozomun 6.bölgesinin kısa kolunda bulunan bir gen kompleksidir. Bu genler tüm insan genomunun %0,1’ini ve fonksiyonları bilinen genlerin de %0,6’sını oluştururlar (Trowsdale, 2011).

HLA genleri de dahil olmak üzere konağın immün sistemi ile ilgili genetik faktörleri, bağırsak mikrobiyal kompozisyonu üzerinde güçlü bir etkiye sahiptir (Eric ve ark., 2015).

Bu çalışmaya, HLA-A-B-C-DR-DQ tam uyumlu kardeş vericilerden allojenik hematopoetik kök hücre nakli olmuş 25 alıcı-25 verici dahil edilmiştir. Hastaların (nakil öncesi ve nakil sonrası) ve sağlıklı vericilerinin mikrobiyota profil analizi erime eğrisi polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi ve yeni nesil dizileme yöntemleriyle yapılmıştır. Bu analiz sonuçlarıyla nakil sonrası engrafman, GVHD gelişimi, HLA doku tipi-mikrobiyota ilişkisi incelenmiştir. Vericilerden dışkı örnekleri, hücre toplama işlemi için yapılan aşılama öncesi alınmıştır. Hasta örnekleri ise, nakil için gerekli olan tedavi

rejimi (kemoterapi, radyoterapi, immün s presifler, antibiyotikler vs.)  ncesi alınmıştır. Bu şekilde mikrobiyotanın herhangi bir dış etkene maruz kalma ihtimalinin en aza indirilmesi hedeflenmiştir. Hastalardan nakil öncesi ve nakil sonrası alınan örnekler arasında bakteri flora değişikliği saptanmıştır. Bu değişiklik nakil sonrasında değişen mikrobiyota ile hastalığın seyri, engrafman, GVHD gelişimi arasında ilişki olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca sağlıklı kontrol grubu sonuçları arasında da farklılıklar saptanmıştır. Doku tipi-mikrobiyota ilişkisi de kurulmuştur. Hastalığın tedavisi ve engellenmesi için fekal nakil, probiyotik desteği ve gut mikrobiyotanın regülasyonu ile terapötik tedavilere umut doğmuştur. Tüm bu çalışma ülkemizde lösemi ve lenfoma hasta grubunda, nakil öncesi ile nakil sonrası takipli ve karşılaştırmalı olacak şekilde yapılan ilk çalışmadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Allojenik Hematopoetik Kök Hücre Nakli (HKHN)

Kök hücreler, özelleşmiş hücre soylarını oluşturmak için kendilerini yenileyen ve sınırsız bölünme özelliğine sahip farklılaşma yaşamamış hücrelerdir. Hematopoetik kök hücreler (HKH), embriyonal gelişim sırasında önce yolk kesesine sonra fetal karaciğere son olarak da dalak ve kemik iliğine göç ederler. Erişkinlerde, sayıca az kök hücre periferik kanda dolaşır ve büyüme faktörleriyle bu sayı artırılabilir (Bryder ve ark., 2006).

HKH'ler, miyeloablasyon sağlanan hastalara kemoterapi ve/veya radyoterapi ile birlikte verildiğinde adezyon molekülleri gibi moleküller yoluyla kemik iliğine yerleşir böylece yeni kan hücrelerini oluşturur ve engraftman özelliği gösterirler (Trowbridge ve ark., 2006).

HKHN, seçilmiş malignitelerin (Örneğin; multipl miyelom, akut ve kronik lösemi, lenfoma) yanı sıra immün yetmezlik, kemik iliği yetmezliği ve amiloidoz gibi infiltratif bozuklukların tedavisinde de etkili olduğu gösterilmiş iyileştirici bir yöntemdir (Gratwohl ve ark., 2013).

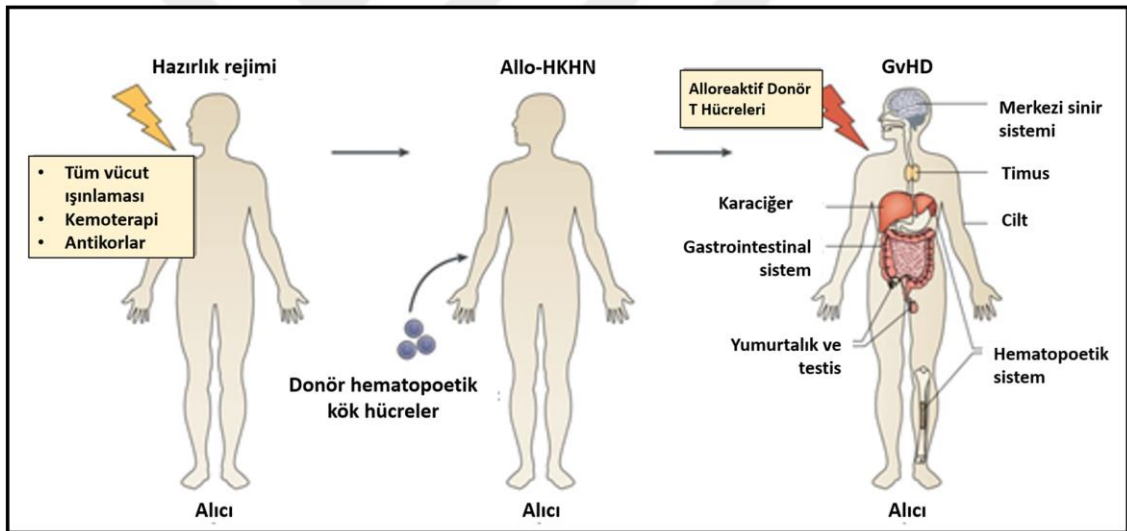
Klasik olarak, birincil hastalık kontrolü sağlandıktan sonra, HKHN'deki ilk adım, kalan malign hücreleri ortadan kaldırmak için yüksek doz kemoterapi ve/veya radyasyon tedavisini içerir. Kök hücre ürününün infüzyonu, hematopoetik ve immünolojik iyileşmeye yol açar. İmmünolojik iyileşme aylar veya yıllar gerektirebilir. Yoğunluğu azaltılmış rejimlerin geliştirilmesi, yaşlı hastaların ve miyeloablatif tedavi için uygun olmadığını düşünülen komorbiditeleri olan hastaların başarılı bir şekilde tedavisine olanak sağlamıştır. Şiddeti azaltılmış rejim, allojenik-HKHN'nin (allo-HKHN) toksisitesini azaltır ancak nüks riskini artırabilir. Allo-HKHN'den sonra hastalığın nüksetmesi ölümle sonuçlanabilir. Otolog veya allojenik hematopoetik kök hücre naklinden sonra nüks, tedavi başarısızlığının en sık nedeni haline gelmiştir (Horowitz ve ark., 2018).

HKHN'de, tamamen veya kısmen miyeloablatif bir rejimi, otolog (alıcıdan türetilmiş) veya allojenik (vericiden türetilmiş) hematopoetik hücrelerin infüzyonu izler. Bu hazırlık rejimi, kötü huylu veya sayıca az olan hematopoetik hücrelerin yanı sıra sağlıklı hematopoetik hücreleri de tüketirken, otolog veya allojenik hücrelerin infüzyonu hastayı yeni bir sağlıklı hematopoetik sistemle yeniden oluşturur. Allo-

HKHN sonrası aGVHD gelişimi de kötü huylu hücreleri öldürerek malignitenin nüksetmesini önlemeye yardımcı olur. HKHN birçok hasta için hayatta kalma olasılığını artırmış olsa da, bu tedavi risksiz değildir (Jagasia ve ark., 2012).

2.2. Akut Graft Versus Host Hastalığı (GVHD)

Allo-HKHN sonrası allojenik verici T hücrelerin, rezidüel tümör hücrelerine saldırması graft-versus tümör (GVT) aktivitesi ile sonuçlanabilir. Bununla birlikte, bu alloreaktif verici T hücreleri, deri, karaciğer, bağırsak, timus, merkezi sinir sistemi, yumurtalık veya testis dahil olmak üzere konağın hedef organlarına ve hematopoetik sisteme saldırabilir ve bu duruma aGVHD adı verilir. aGVHD, allojenik hematopoetik kök hücre naklinden sonra ortaya çıkabilecek en önemli komplikasyonlardan biridir (Martin ve ark., 1990; Sullivan ve ark., 1991) (Şekil 2.1) (Shono ve ark., 2010).

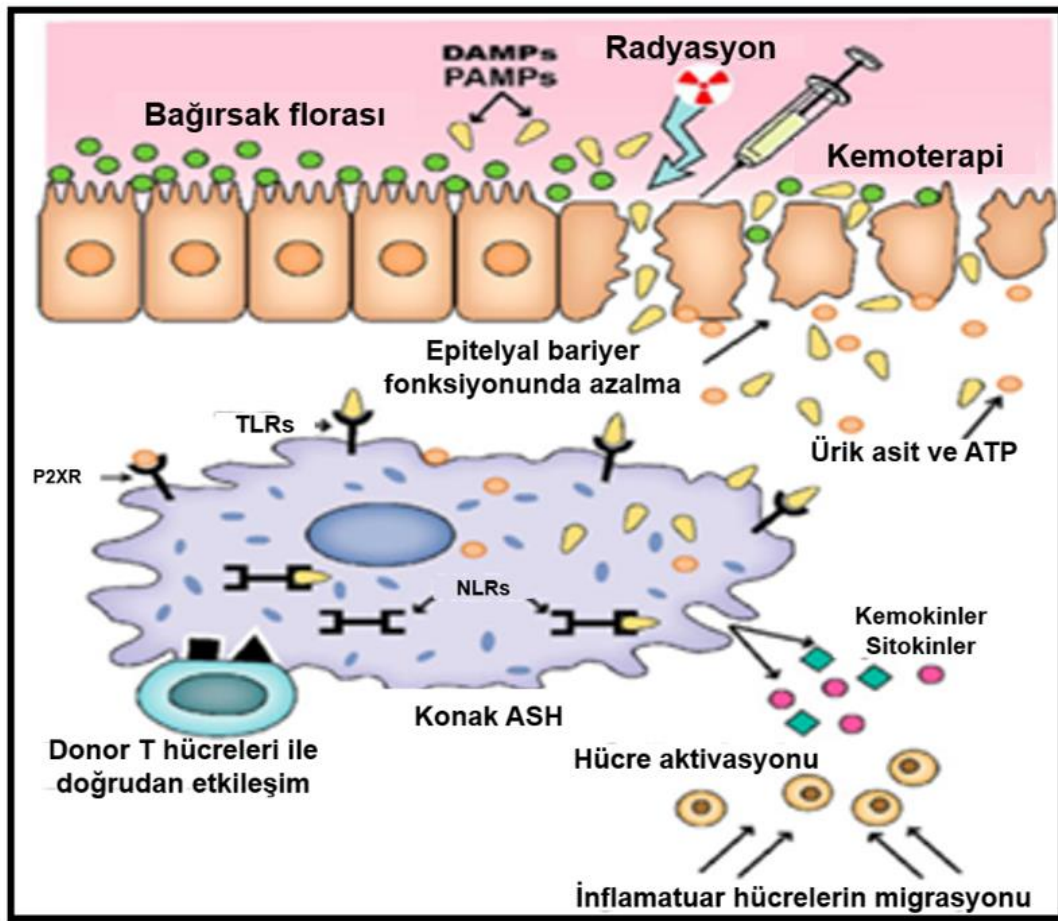


Şekil 2.1: Allo-HKHN ve GVHD

aGVHD için standart tedavi kortikosteroidlerden oluşur, ancak optimal doz ve program konusunda fikir birliği yoktur. Standart steroid tedaviye yanıt vermeyen aGVHD geliştiren hastaların tedavisi zordur (Zeiser ve ark., 2016; Martin ve ark., 2012; Westin ve ark., 2011). Kortikosteroidlere yanıt, hastaların yaklaşık %50'sinde görülür (Martin ve ark., 1990) ve başlangıç tedavisinde başarılı sonuç alamayanlarda %95'e varan ölüm oranları vardır (Arai ve ark., 2002). Yoğun transplant hazırlama rejimleri, immünsüpresif ajanlarla profilaktik tedaviye rağmen, alıcıların %20-%80'i aGVHD

geliştirir. aGVHD'nin görülme sıklığı ve şiddeti çeşitli risk faktörlerine bağlıdır (Flowers ve ark., 2011).

Kemoterapi tedavisi, epitel hücrelerinin ve bunların bütünlüğünün yok olmasına yol açar. Hasar görmüş epitel, ürik asit ve ATP salgılar ve bu da proinflamatuvar sitokinlerin üretimiyle sonuçlanır. ‘Toll benzeri reseptörler’ (TLR), ‘NOD benzeri reseptörler’ (NLR) ve P2XR’ler gibi patojen tanıma reseptörleri, ‘patojen ile ilişkili moleküler motifler’ (PAMP) ve ‘hasar ile ilişkili moleküler motifler’ (DAMP) tarafından etkinleştirilir. Bu sinyaller verici T hücresi aktivasyonuna yol açan antijen sunan hücreleri (ASH) aktive eder (Şekil 2.2) (Penack ve ark., 2010).



Şekil 2.2: Graft-versus host hastalığının başlaması

Avrupa Kemik İliği Nakli Birliği (EBMTR) derecelendirme sistemine göre, aGVHD derecelendirmesi şu şekilde yapılır;

- Derece A - Karaciğer veya gastrointestinal tutulum olmadan tek başına 1. Aşama cilt tutulumu (makülopapüler döküntü).
- Derece B - Evre 2 cilt tutulumu; Aşama 1 ile 2 bağırsak veya karaciğer tutulumu.
- Derece C - Herhangi bir organ sisteminin Aşama 3 tutulumu (genelleştirilmiş eritrodermi; bilirubin 6,1 ila 15,0 mg / dL; ishal 1500 ila 2000 mL / gün).
- Derece D - Herhangi bir organ sisteminin 4. Aşama tutulumu (büllöz oluşumlu genel eritrodermi; bilirubin > 15 mg / dL; ishal > 2000 mL / gün veya ağrı veya ileus) (EBMT, 2012).

Derece I (A) GVHD hafif hastalık, derece II (B) GVHD orta, derece III (C) şiddetli ve derece IV (D) yaşamı tehdit edici olarak karakterize edilir (Przepiorka ve ark., 1995; Cahn ve ark., 2005).

En şiddetli ve yaşamı tehdit eden vakalarda, cilt, bağırsak ve karaciğer tutulumu üçlüsüne gastrointestinal GVHD hakimdir. Deri tutulumlu aGvHH'de hem sistematik hem de topikal tedaviler etkili olduğundan genellikle yaşamı tehdit etmez (Leisenring ve ark., 2006). aGVHD, dermatit, enterit veya hepatik disfonksiyonu içerebilen ve genellikle HKHN'den 100 gün sonra gelişen enflamasyon ile karakterizedir. Tipik belirtiler arasında makülopapüler döküntü (deri); bulantı, kusma ve ishal (bağırsak); ve yükselen bilirubin (karaciğer) yer alır. Kronik GVHD, oral ve oküler sikka, geniş bir organ yelpazesini etkileyen fibrotik komplikasyonlar, gastrointestinal lezyonlar veya yükselen bilirubin ile karakterizedir, genellikle nakilden 1 ile 2 yıl sonra başlar (Glucksberg ve ark., 1974; Sullivan ve ark., 1991).

Alıcıdan köken alan miyeloid hücreler, gastrointestinal GVHD (GI GVHD) gelişimine katkı sağlar. Nötrofiller ve enflamatuvar monositler de dahil olmak üzere doğuştan gelen bağışıklık hücrelerinin, allo-HHKN'den kısa süre sonra bağırsağa hücum ederek buradaki doku hasarını arttırabilir (Schwab ve ark., 2014; Socié ve ark., 2004; Giroux ve ark., 2011; Klämbt ve ark., 2105).

Bağırsak tutulumlu GVHD'nin iki farklı fenotipi tanımlanabilir. Üst bağırsak ve orta-alt bağırsak; sunum, doğal seyir, tedaviye yanıt ve ölüm riski açısından farklılık gösterir. Üst bağırsak fenotipi genellikle orta-alt bağırsak fenotipine ilerlememektedir (Hockenbery ve ark., 2007; Baehr ve ark., 1995).

GVHD'de üst gastrointestinal tutulumunun sonucu olarak yiyecek intoleransı, bulantı, anoreksi, dispepsi ve kusma görülebilir. GVHD'nin orta-alt bağırsak fenotipi, bağırsak distansiyonundan kaynaklanan sekretuar, protein açısından zengin diyare, abdominal ağrı ve rektal hemoraji ile kendini gösterir (Schwartz ve ark., 2001; Ross ve Couriel, 2005).

Tüm bunların yanı sıra aGVHD gelişimi, HLA uyumlu kardeş vericilere kıyasla HLA özdeş olmayan veya akraba olmayan vericilerden yapılan HKHN'lerinde daha sık görülür ve daha şiddetlidir. aGVHD'nin şiddeti, Keystone Consensus 1994 kriterlerine (Przepiorka ve ark., 1995) veya Uluslararası Kan ve İlik Nakli Araştırma Merkezi (CIBMTR) kriterlerine (Rowlings ve ark., 1997) göre derecelendirilmelidir.

2.3. Mikrobiyota Kompozisyonu

İnsan vücudu, hayatta kalmamızın anahtarı olan binlerce farklı mikrobiyal tür tarafından kolonize edilmiştir (Marchesi ve ark., 2016).

İnsan mikrobiyotası, organizmaların yüzeylerinde ve belirli nişlerinde (bağırsak, deri, ağız vb.) yaşayan simbiyotik, komensal ve patojenik mikroorganizmaların (mikrobiyal taksonlar) ekolojik topluluğudur (Lederberg ve McCray, 2001).

Mikrobiyota bileşimi, GIS'in çeşitli bölümlerinde farklılık gösterir ve pH, konak salgısı, substrat varlığı gibi etkenlerden etkilenir, böylece aerobik kraniokaudal (ağızdan anüse) progresif bir azalma ve anaerobik bakteri türlerinde bir artış ile sonuçlanır (Flint ve ark., 2012).

İnsan bağırsaklarından alınan dışkı örneklerinde 1000'den fazla farklı bakteri türü tanımlanmıştır, ancak tür seviyesindeki bileşim bireyler arasında büyük ölçüde değişir. Mikrobiyota; dış etkenlerden (beslenme, yaşam tarzı, çevresel faktörler, ilaç kullanımı, stres) etkilenir (David ve ark., 2014; Obregon ve ark., 2015) ve bu sebeple bir bireyde bulunan türlerin sayısı 160'a kadar düşebilir (Qin ve ark., 2010).

Gastrointestinal sistem, besin proteinleri, bakteriler (Ley ve ark., 2008), virüsler (Duerkop ve Hooper, 2013) ve mantarlar gibi çevresel faktörlere sürekli maruz kalan en büyük mukozal yüzeyi sağlar (Underhill ve Iliev, 2014). Bakteriler, insan bağırsak mikrobiyotasının (Qin ve ark., 2010) büyük çoğunluğunu oluşturur. Kolon ve jejunum içinde 10^{11} - 10^{12} bakteri bulunur. İleumda ise bu sayı 10^5 - 10^9 arasında değişkenlik gösterir (Koren ve ark., 2012; Cox ve Blaser, 2015).

Bu organizmaların büyük çoğunluğunu çeşitli bakteriler oluşturmakla birlikte, floradaki virüsler ve mantarlarda da bu çeşitlilik mevcuttur (Qin ve ark., 2010; Ott ve ark., 2008; Reyes ve ark., 2010).

2.4. Mikrobiyota Kolonizasyonu

Bağırsak mikrobiyota kolonizasyonunun in-utero dönemde başladığı ve kompozisyonunun, hem çevresel hem de beslenme faktörlerine bağlı bir süreç olan, yaşamın ilk birkaç yılında sürekli değiştiği bilinmektedir (Koren ve ark., 2012; Cox ve Blaser, 2015). Üç yaş civarında mikrobiyal kompozisyon stabil hale gelir (Şekil 2.3) (Cox ve Blaser, 2015; Yatsunenکو ve ark., 2012; Harmsen ve ark., 2000; Sghir ve ark., 2000).



Şekil 2.3: Doğuştan gelen mikrobiyal kolonizasyon

Anormal ve sağlıklı bağırsak mikrobiyota popülasyonu çok geniştir ve bu çeşitliliğe genelde anaerobik bakteriler hakimdir (Eckburg ve ark., 2005; Human Microbiome Project Consortium, 2012).

Spesifik bakteri suşlarındaki büyük çeşitliliğe rağmen, metabolik yollarda yer alan mikrobiyal genlerin varlığı sağlıklı bireylerde nispeten aynıdır (Human Microbiome Project Consortium, 2012).

Sağlıklı insan bağırsağına birkaç filum hakimdir: *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Fusobacteria*, *Proteobacteria* ve *Verrucomicrobia*. İlk iki filum, bağırsak mikrobiyotasının yaklaşık %90'ını oluşturur. *Clostridium*, *Lactobacillus* ve *Enterococcus* en bol bulunan *Firmicutes* sınıfındayken, *Bacteroides* ve *Prevotella* en

bol bulunan *Bacteroidetes* sınıfında yer alır. *Bifidobacterium* ise en bol bulunan *Aktinobacteria* sınıfındadır (Arumugam ve ark., 2011). *Lactobacillus*, *Escherichia*, *Streptococcus* ve *Ruminococcus* diğer enterotiplerdendir (Conlon ve Bird, 2014).

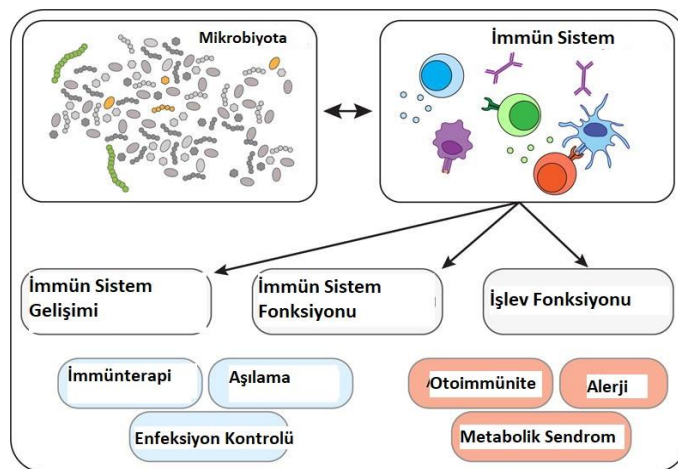
2.5. Mikrobiyota Fizyolojisi

Birçok fizyolojik etkisinden dolayı, bağırsak mikrobiyotası “unutulmuş organ” olarak tanımlanmaktadır. Son araştırmalar bağırsak mikrobiyotasının hematopoezi etkileyebileceğini göstermektedir (Balmer ve ark., 2014; Khosravi ve ark., 2014; Josefsdottir ve ark., 2017; Iwamura ve ark., 2017).

Bağırsak aynı zamanda vücutta en çok sinirlerle ilişkili ikinci organdır ve beyin ile iletişimi kolaylaştırır (Furness ve ark., 2014).

GIS’de ince bağırsak (ileum, duodenum ve jejunum) ve kalın bağırsak (kolon), yapı ve bileşimleri bakımından farklıdır. Örneğin; goblet hücreleri, proksimal kolon, Peyer plakları ise esas olarak ince bağırsakta bulunur (Nguyen ve ark., 2015; Atuma ve ark., 2001).

Buna ek olarak, kolonda mün katmanları daha incedir ve daha fazladır. Bu çeşitlilik, konak-mikrobiyota etkileşimlerinde önemli fonksiyonlarla ilişkilidir. Bağışıklık hücrelerinin yaklaşık %70’i bağırsakta bulunur; bu hücreler bağırsak mikrobiyotası ile beraber bağışıklık aktivasyonu ve tolerans dengesinde rol oynar (McDermott ve Huffnagle, 2014) (Şekil 2.4) (Balkaid ve Harrison, 2017).



Şekil 2.4: Bağırsak mikrobiyotası ve bağışıklık aktivasyonu

Bağırsak mikrobiyotası bazen bağırsak mikrobiyomu olarak da adlandırılır, buna bağırsak mikrobiyal kolonizasyon bölgesi denir, ancak bağırsak mikrobiyomu daha çok mikroorganizmaların kendisinden ziyade mikrobiyotanın toplam genetik yapısını ifade eder (Backhed ve ark., 2005).

Bağırsak mikrobiyomu insan fizyolojisiyle ilişkili rollere sahiptir: besin sindirimine katkıda bulunur, bağırsak mukozal bariyerinin yapısal bütünlüğünü korur, böylece patojenlerin kolonizasyonunu engeller, bağırsak-beyin eksenini iletişimine katılır ve bağışıklık sistemini hazırlar ve böylece sağlıklı durumun korunmasına yardımcı olur. Bunların yanı sıra, KZYA'lar sayesinde ATP üretimine katkıda bulunur, B ve K vitaminlerini (B5, B12) üretir, makrofaj gibi hücreleri regüle ederek patojenlerle savaşa katkı sağlar, tanıma ve modülasyonda görev alır (Kho ve Laf, 2018).

Her birey kendi bağırsak mikro floralarıyla simbiyotik birlikteliğe sahiptir. Bu simbiyotik yaşam, konağı patojenik bakterilerin kolonizasyonundan korur ve bağırsak bakterileri için konağın besinlerinden enerji sağlar. Ek olarak, ortaya çıkan araştırmalar bağırsak mikrobiyotasının aynı zamanda bağışıklık homeostazı, bağırsakla ilişkili lenfoid dokunun gelişimi, otoantijenlere tolerans gelişimi ve uyarlanabilir bağışıklık tepkilerini şekillendirme için de gerekli olduğunu göstermektedir (Hooper ve ark., 2012).

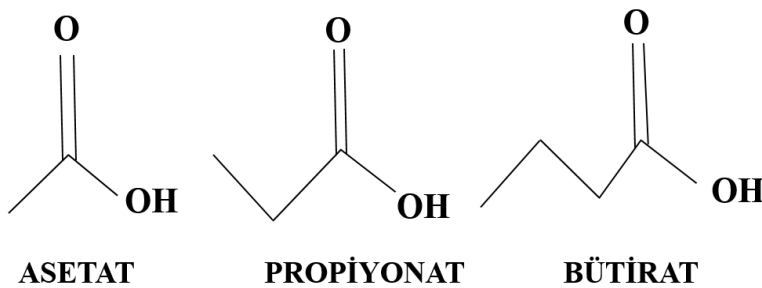
Aynı zamanda bağırsağın karmaşık vasküler yapısı, besinlerin ve suyun verimli bir şekilde emilmesini ve gastrointestinal sistem boyunca bir oksijenasyon gradyanını sağlar (Zheng ve ark., 2015).

Bağırsak, iç yüzeyinde yer alan ve lümene maruz kalan karmaşık bir mukozal bağışıklık sistemi ile vücuttaki en büyük bağışıklık organıdır. Lenfositler ve makrofajlar ve dendritik hücreler gibi doğuştan gelen bağışıklık hücreleri epitel tabakaları boyunca bulunur. Mukozal bağışıklık, kan ve bağırsak lenfleri arasında bir arayüz oluşturan, ayrı ayrı bölümlere ayrılmış bağırsakla ilişkili lenfoid dokular ('Gut Associated Lymphoid Tissue=GALT') ile karakterize edilir. Bu yapısal özellik, GALT'ın, mukozal bağışıklık tepkileri ve tolerans geliştirmek için bağırsak mikrobiyotası ile etkileşime girdiği bağırsak epiteline ve lamina propriaya sürekli olarak olgun bağışıklık hücreleri sağlamasına olanak tanır (McDermott ve Huffnagle, 2014). GALT, bir bileşeni olan mukoza ile ilişkili lenfoid doku ile beraber çalışır ('Mucosa Associated Lymphoid Tissue=MALT'). Fizyoloji ile uyumlu bu immünolojik yanıtlar, bağırsak ve sistemik

homeostazı sağlar. Bağırsak mikrobiyotası bu nedenle sadece yerel bağışıklıkta değil, aynı zamanda sistemik fizyolojinin sürdürülmesinde de kritik bir role sahiptir (Chow ve ark., 2010).

Hücreler; çevre, beslenme, mevcut komensal flora gibi faktörlerle ve konak metabolizması tarafından sağlanan mikro çevrelerindeki moleküllerle değişikliklere sürekli olarak adapte olur ve bunlara yanıt verir. Hücresel ortamdaki değişiklikleri tespit etmede birden fazla reseptör katılır. Bunlardan biri ligandla aktive edilen transkripsiyon faktörü aril hidrokarbon reseptörüdür (AHR). AHR ve oksijen seviyelerini, redoks potansiyelini ve sirkadiyen ritimdeki değişiklikleri algılamaya dahil olan PAS ('Periodic circadian protein-PER, AHR nuclear translocator-ARNT, single-minded protein –SIM') süper ailesinin diğer üyeleri, hücresel ortama adaptasyonu kontrol eder (McIntosh ve ark., 2010).

Bazı komensal bakterilerin ürettiği KZYA kolonda üretilen, ince bağırsakta sindirimi kolaylaştıran, besin lifi gibi emilmesi güç ve nişasta, insülin gibi sindirilemeyen karbonhidrat moleküllerinin parçalanmasına yardım eden organik yağ asitleridir. Günümüzde önemli bir KZYA olarak bilinen inülin, birçok tıbbi durumda umut verici bir nutrasötiktir. İnülin, bifidobakterilerin ve laktobasillerin büyümesini destekleyerek kalın bağırsakta sakarolize katılır (Wasim ve ark., 2019). İnce bağırsakta bulunan bakteriler, bakteri fermantasyonuna katılmak için kolona giderler. Oluşan KZYA'lar, kolondaki en baskın anyon olan asetat (iki karbon birimi) ve ardından propiyonat (üç karbon birimi) ve sonra bütirat (dört karbon birimi) olmak üzere bir ile yedi karbon birimi içerir (Şekil 2.5) (Darzi ve ark., 2011).



Şekil 2.5: KZYA'ların yapısı

Propiyonik asit üreten ince bağırsak bakterileri, kobalamin (B12) emilimini değiştirebilir ve yağ asidi aracılı enflamatuvar tepkileri etkileyebilir. Bu nedenle kobalamin, bağırsak mikrobiyomu, metilasyon kofaktörleri ve kısa zincirli (propiyonik asit) ve çoklu doymamış yağ asitleri (n-3 PUFAs) ile epigenetik bir şekilde benzersiz bir etkileşim gösterir (Joan, 2017). Örneğin *Clostridium* türü bakterilerden üretilen KZYA'lar ve bütiratlar, Foxp3 + T regülatör (Treg) hücrelerinin indüksiyonunu destekler (Furusawa ve ark., 2013).

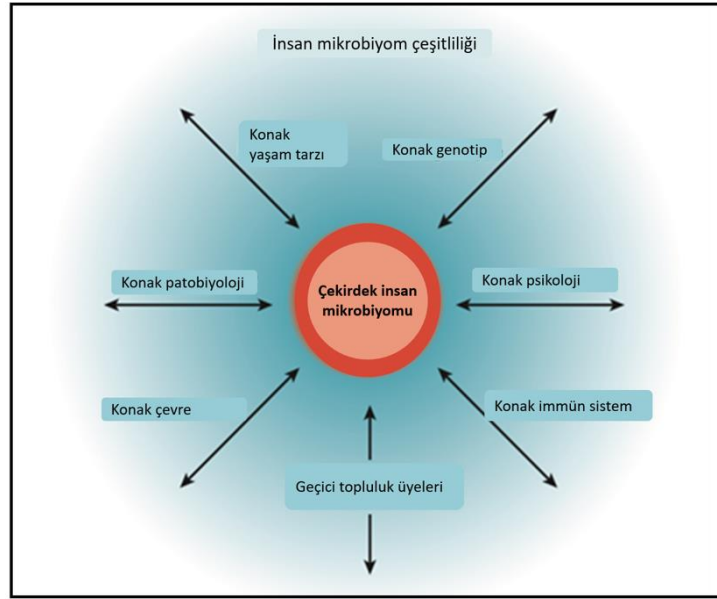
Bağırsakta üretildikten sonra, KZYA'lar sistemik dolaşıma superior mezenterik ven (SMV) veya inferior mezenterik ven (IMV) yoluyla ulaşabilir. Asetat, periferik dolaşımda bulunan başlıca KZYA'dır. İnsanda asetat konsantrasyonu kanda birkaç yüz mikrolitreye (μl) ulaşabilirken, propiyonat ve bütirat konsantrasyonu ihmal edilebilir düzeydedir (birkaç mikron) (Wolever ve ark., 1997). Ayrıca, serbest KZYA'lar kan-beyin bariyerini monokarboksilat taşıyıcılar aracılığıyla geçebilir (Vijay ve Morris 2014), bu da KZYA'ların bağırsaktaki mikrobiyota çeşitliliğinin beyne iletilmesi için sinyal molekülleri olarak işlev görebilmesini sağlar (Nagashima ve ark., 2010).

Ayrıca, bağırsak mikrobiyotasından türetilen bu metabolitler, yani kısa zincirli yağ asitleri, patojenik mikroorganizmaların büyüme inhibisyonu yoluyla çoklu ilaç direncine sebep olan *Enterobacteriaceae*'nin kolonizasyonunu engellemeye yardımcı olabilir (Sorbara ve ark., 2019).

İnsan genetik ve fizyolojik çeşitliliğinin kapsamını anlamak için mikroorganizmaların dağılımını ve evrimini etkileyen faktörler karakterize edilmelidir. Bu 'İnsan Mikrobiyom Projesi' kapsamında (HMP) ana hedeflerden biridir. HMP, İnsan Genom Projesinin mantıksal, kavramsal ve deneysel bir uzantısıdır. HMP tek bir proje değildir. Bu, Amerika Birleşik Devletleri (Ulusal Sağlık Enstitüleri Tıbbi Araştırma Yol Haritasının bir sonraki aşamasının bir parçası olarak), Asya ve Avrupa ülkelerinin de dahil olduğu global çapta eşzamanlı olarak başlatılan birden fazla projeden oluşan disiplinler arası bir çalışmadır. Yeni metagenomik alanı, bu topluluklardaki genomların ve bunlara karşılık gelen mRNA, protein ve metabolik ürünlerin karakterizasyonunu içerir (The Committee on Metagenomics, Washington DC, 2007). Devam eden projenin ilerleyen yıllarında Birleşik Devletler Ulusal Sağlık Enstitüleri (NIH), HMP ile, bazı klinik fenotipler ile ribozomal 16S rRNA dizilenmesi sayesinde mikrobiyota bileşimi arasındaki ilişkileri bildirmiştir (NIH HMPAT, 2019).

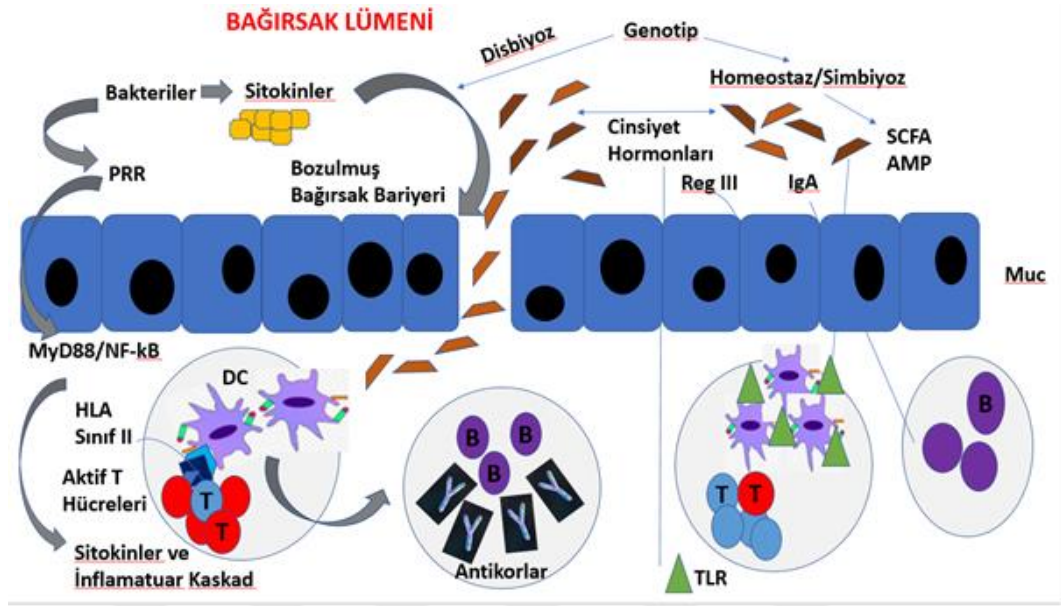
İnsan mikrobiyotası, insan sağlığının birçok yönüne önemli bir katkıda bulunur ve büyük ölçüde beslenmeden etkilenir. Bağırsak disbiyozunun (bağırsakta mikrobiyal dengesizlik) enflamasyonlu ve bağışıklık aracılı hastalıklarla (örneğin iltihaplı bağırsak hastalığı) ilişkili olduğu düşünülmektedir. Düzenli fermente gıdaların tüketimi (örneğin kefir vb.), bağırsak disbiyozunun proinflatuar etkilerine karşı koymak için potansiyel bir koruyuculuk oluşturabilir (Leah ve ark., 2020). *Bifidobacterium* ve *Lactobacillus* gibi yararlı mikroorganizma gruplarında azalma ve *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Fusobacterium nukleatum* ve *Clostridium spp* gibi fırsatçı patojenlerin artışı ile birlikte disbiyoz arasında ilişki bulunmaktadır (Garrett-Bakelman ve ark., 2019).

Flora, tüm vücuttan bağırsak veya bağırsak içindeki bir bölge gibi belirli bir yüzey alanına kadar çeşitli ölçeklerde tanımlanabilir. Çekirdek insan mikrobiyomu, insanların tamamında veya büyük çoğunluğunda belirli bir florada bulunan genler kümesidir. Değişken insan mikrobiyomu, daha küçük bir insan alt kümesinde belirli bir florada bulunan genler kümesidir. Bu varyasyon, konak genotipi, konağın fizyolojik durumu (doğuştan gelen ve uyarlanabilir bağışıklık sistemlerinin özellikleri dahil), konak patobiyojisi (hastalık durumu), konağın yaşam tarzı (beslenme dahil), konak ortamı (evde ve / veya çalışma) ve bir habitatı kalıcı olarak kolonileştiremeyen geçici mikroorganizma popülasyonlarının varlığı ile ilişkilidir. Çekirdeğin rengindeki derecelendirme, insan mikro evrimi sırasında yeni genlerin çekirdek mikrobiyoma dahil edilebileceği, diğer genlerin ise dışlanabileceği olasılığını gösterir (Şekil 2.6) (Lowe ve ark., 2012).



Şekil 2.6: Çekirdek insan mikrobiyomu kavramı

Bağırsak bağışıklık sistemi ise, tabakalandırma ve bölümlendirme yoluyla konağın patojenik bakterilere maruz kalmasını engeller. Beslenme ve enfeksiyonlar gibi çevresel faktörler mikrobiyal ekosistemdeki belirli taksonların bulunma sıklığını değiştirir. PEPT 1 (Peptit Taşıyıcı Protein 1)'in ifadesi, östrojen tarafından modifiye edilir (Der-Boghossian ve ark., 2010), böylece cinsiyete özgü etkiler sağlar. Genetik olarak yatkın bir konakta, bir enfeksiyon veya bir olay, patojenik mikroorganizmaların artmasına veya yararlı komensallerin yok olmasına yol açarak bağırsakta disbiyoz ve pro-enflamatuar koşullara yol açabilir. Bağırsaktaki enflamasyon, sıkı bağlantı proteinlerinin ekspresyonunun azalmasına, bağırsak geçirgenliğinin artmasına ve ardından bağırsak bütünlüğünün bozulmasına neden olabilir. Bu sebeple artan geçirgenlik sonucunda, komensallerin ve mikrobiyal ürünlerin, ASH'lar tarafından sunulmaları ve pro-enflamatuar yanıtı arttırmaları ile sonuçlanabilir. Sağlıklı ve dengeli bir mikrobiyota, dengeli bir mukozal bağışıklık tepkisinin oluşmasına yol açarken, disbiyoz, T hücrelerinin aktivasyonuna ve bağırsak lümeninde bulunan mikrobiyal ürünler için spesifik antikorların üretimine neden olur. Bağırsakta, adaptif immün yanıtın aktive edilmiş hücreleri, enflamatuar kaskadı daha da aktive edebilen pro-enflamatuar sitokinler üretecektir. Bağırsak adaptif bağışıklık sisteminin hücreleri bağırsak dışında patolojiye neden olabilir (Şekil 2.7) (Eric ve ark., 2015).



Şekil 2.7: Bağırsak bağışıklık sistemi

Bazı durumlarda, mikroorganizmaların yapısal molekülleri, immünomodülatör etkilere sorumludur. *Bacteroides fragilis*'ten türetilen polisakkarit A (PSA) ve glikosfingolipidler böyle bir örnektir (Surana ve ark., 2014). *B. fragilis*'ten türetilen glikosfingolipidler, lamina propria'da bağırsak doğal öldürücü T hücrelerinin (Nature Killer T Cell=NKTC) proliferasyonunu inhibe ederek hayvan modellerinde kolitin şiddetini azaltmıştır (An ve ark., 2014). Mekanik olarak PSA, dendritik hücreler üzerinde TLR2 (Toll-Like Receptor 2)'yi devreye sokmak için dış zar vezikülleriyle birleşir ve bu da CD4 + CD25 + Treg hücrelerinde IL-10 ekspresyonunu indükler (Mazmanian ve ark., 2008; Shen ve ark., 2012; Dasgupta ve ark., 2014). Bunun yanı sıra IL-1 ve IL-6 gibi sitokinler ise sadece bağırsak mikrobiyotası kompozisyonunu doğrudan değiştirmekle kalmaz, aynı zamanda önemli MHC (Major Histocompatibility Complex) immün kostimülatör moleküllerin artışı ile GVHD'nin gelişimi için en uygun koşulları yaratır. Doku hasarının neden olduğu artan bağırsak geçirgenliği, endotoksinlerin bağırsak mukozası boyunca translokasyonuna izin vererek, konağın doğal bağışıklık sisteminin aktivasyonunu ve sitokin salınımını daha da güçlendirir (Teshima ve ark., 2002). Mikrobiyota tarafından DAMP'lardan ve PAMP'lardan

salınan bir dizi molekül, bu aktivasyon kaskadı için alternatif yollar sağlar (Ramadan ve Paczesny, 2015).

Son yıllarda, bağırsak mikrobiyotasının bağışıklık sistemi üzerindeki etkisi, Treg ve Th17 hücrelerinin mukozal hücre yanıtlarının düzenlenmesindeki rolünün anlaşılmasıyla önemini arttırmıştır (Xu ve ark., 2019). Örneğin, komensal *Bacteroides fragilis*'in kolon içinde indüklenebilir Treg hücreleri teşvik ettiği gösterilmiştir (Round ve Mazmanian, 2010)

Son on yılda, gıdalar (probiyotikler ve prebiyotikler dahil), mikroorganizmalar ve bunların metabolitleri ile mukozal ve sistemik bağışıklık sistemleri arasındaki etkileşimi insan veya hayvan modelleri kullanarak değerlendiren çalışmalarda önemli artışlar olmuştur (Han ve Xiao, 2020).

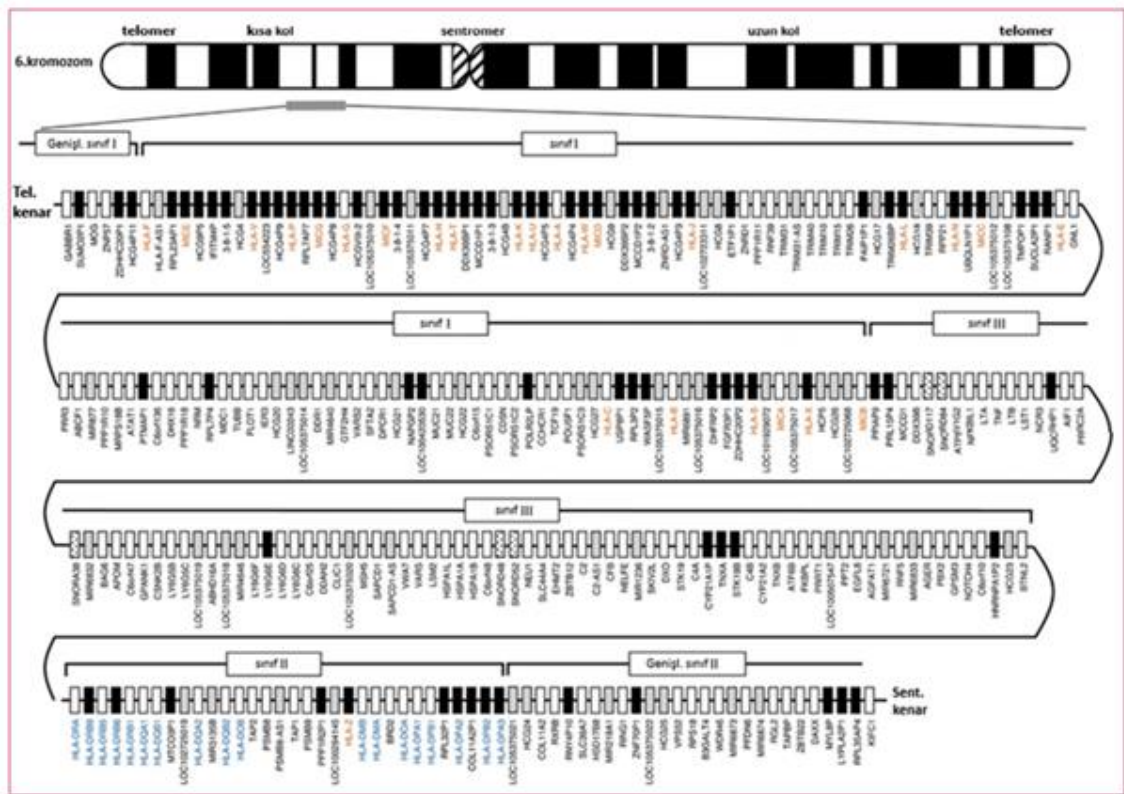
Anatomik olarak bağırsağa bağlı organlar, özellikle pankreas ve karaciğer, mikrobiyotaya bağlı otoimmüniteden etkilenebilir ve çeşitli bağırsak dışı organlarda sistemik otoimmün hastalık için amplifikatör görevi görebilir (Fine ve ark, 2020).

Konak-mikrobiyota etkileşimleri, bağışıklık sisteminin gelişimi için esastır. Son zamanlarda yaşam tarzlarında meydana gelen keskin değişiklikler, evrimsel süreçte bir dengesizliğe yol açmıştır ve otoimmün, alerjik ve kronik inflamatuvar bozukluklar gibi immün aracılı hastalıklarda ani bir artışa sebep olmuştur. Hücresel mekanizmalar (otoantijenlerle çapraz reaktivite ve bunların modifikasyonu gibi) sonucunda simbiyotik ilişki içerisindeki bakteriler pathobiontlara dönüşebilir. Bununla birlikte, konak genetiği ve epigenetik faktörler, immün aracılı hastalıklarda hangi komensallerin patolojenlere dönüşeceğini belirler. Bu, neden bazı bakterilerin bir hastalıkta yararlı, diğerinde patojenik olabileceğini açıklamaya yardımcı olur (William ve ark., 2020).

Bifidobacterium ve *Lactobacillus* türleri, GIS dengesini geri kazanmak için en çok çalışılan türlerdir. *Bifidobacterium* türleri *B. longum*, *B. B. animalis*, *B. bifidum* ve *B. breve* ile *Lactobacillus* türleri *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *L. fermentum*, *L. reuteri*, *L. bulgaricus*, *L. lactis*, *L. casei*, *L. paracasei*, *L. curvatus* ve *L. sakei*, insanlar tarafından tüketim için genellikle güvenli (GRAS) kabul edilmektedir. Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) ve Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA)'nın tanıdığı nitelikli güvenlik karinesi (QPS) statüsüne sahiptir (FDA, 2020).

2.6. Major Histocompatibility Complex (MHC) (Büyük Doku uyum Kompleksi)

'MHC' insanda 6. kromozomun kısa kolunda konumlanan ve yaklaşık 4000 kilobazlık büyük bir gen kompleksidir. MHC genleri, insandaki tüm genomunun %0,1'ini ve fonksiyonları bilinen genlerin %0,6'sını kapsar. Gen açısından oldukça zengin olan bu bölgede toplam yaklaşık 283 lokus tanımlanmıştır (Şekil 2.8) (Trowsdale, 2011) (Genome Reference Consortium Human Build).



Şekil 2.8: HLA genomik bölgesi gen haritası

HLA üç ana lokusu içerir. Bu lokuslar, sentromerden telomere doğru HLA Sınıf II, HLA Sınıf III ve HLA Sınıf I'dir. TAP moleküllerini kodlayan genler, HLA Sınıf II'de HLA DP, DM, DQ, DR ve TAP moleküllerini kodlayan genler vardır. Antijen sunumundan sorumlu molekülleri HLA DP, DQ ve DR kodlar (Shiina ve ark., 2017).

İnsanlar; nakil, kan transfüzyonu veya hamilelik sırasında allojenik HLA molekülleri ile karşılaşır. Oluşan anti-HLA antikorları, çok az sayıda başka HLA aleli ürünü tarafından paylaşılan "özel" epitoplarla veya birçok HLA aleli tarafından kodlanan "genel" epitoplarla reaksiyona girebilir (Van Rood ve Van Leeuwen, 1963).

HLA Sınıf I molekülleri, antijen sunumu sırasında T hücre koreseptörü olan CD8 – ile etkileşim oluşturur ve CD8 - sitotoksik T hücre yanıtı gelişir. Benzer olarak, CD4 + koreseptörü ile HLA Sınıf II molekülleri bağlanır. Sonuç olarak CD4 + yardımcı T hücre cevabı meydana gelir (Rudolph ve ark., 2006).

Yabancı antijenler olarak immün sistem tarafından allojenik HLA moleküllerinin fark edilmesiyle alloreaktif T hücreleri harekete geçer. Bu olay, doğrudan ya da direkt gerçekleşir. Vericiye ait ASH'ların yüzeyindeki HLA molekülleri kendi MHC moleküllerine yapısı bakımından benzer ise direkt olarak alloreaktif T hücreleriyle etkileşim oluşturabilir ve sonucunda birden fazla T hücresi aktif hale gelir. Diğer alternatif yol ise, ASH'lar tarafından allojenik HLA molekülleri yakalanarak işlenir ve T hücrelerine sunulur. Doğrudan gerçekleşen bu sunumda ise özgün T hücre cevabı oluşur (Nagy, 2012).

Konağın bağışıklık sistemi bir ekosistem yöneticisi olarak çalışır ve mikrobiyal bileşimi ve çeşitliliği kontrol etmede kritik bir rol oynar. HLA genleri de dahil olmak üzere konağın immün sistemi ile ilgili genetik faktörleri, bağırsak mikrobiyal kompozisyonu üzerinde güçlü bir etkiye sahiptir. Pek çok durumda, HLA alelleri, genom ilişkili çalışmalarda belirlenen diğer genetik faktörlerden daha fazla hastalıklara yatkınlık sağlar. Bazı HLA alellerinin, otoimmün hastalıklara yatkınlık ile ilişkili olduğu da bilinmektedir. Buna DQ*2/8 ilişkili Çölyak Hastalığı (Sanz ve ark., 2011; Sellitto ve ark., 2012) veya HLA-DRB1*04:01/04:02 ilişkili Romatoid Artrit (Eric ve ark., 2015) gibi hastalıklar örnektir (Gough ve Simmonds, 2007).

2.7. 16S rRNA

Prokaryotik canlıların ribozomlarında 30S ve 50S'lik alt birimlere sahiptir ve 30S'lik ribozom alt biriminde 16S rRNA geni yer alır (Fukuda ve ark., 2016). Bu genler organizmalarda çok iyi korunmuştur ve mRNA'dan protein translasyonunda rol oynarlar. rRNA dizilerinin ilk kullanımında filogenetik analizler yapılırken canlılar Eubacteria, Archaeobacteria, Eukaryotes şeklinde üç gruba ayrılmıştır (Woese ve ark., 1990). Özel rRNA primerleri ile ribozomun küçük alt birimlerinin hepsi ya da bir kısmı kullanılarak rRNA dizileri oluşturulmuş ve türler arası yakınlık ilişkileri matriks metodu ile incelenmiştir. İlk filogenetik ağaçlarda *Escherichia coli* (eubacterium), *Halobacterium volcanii* (archeobacterium), *Mus mus* (eukaryote), *Dictyostelium discoideum* (eukaryote), *Zea mays* (eukaryote), *Saccharomyces cerevisiae* (eukaryote),

Xenopus laevis (eukaryote) türlerinde yakınlık ilişkileri anlaşılma çalışılmıştır (Lane ve ark., 1985).

16S rRNA geni, 9 tane yüksek miktarda değişken (V1-V9) ve kısa nükleotidlerden oluşan bölgeler içerir (Chakravorty ve ark., 2007). Bizim çalışmamızda V3 ve V4 bölgeleri kullanılmıştır. Diğer bölgeler ise fazla dizi korunumuna sahip olduğu için çok tercih edilmezler. Jeodezik uzaklığa göre farklı bölgelerdeki yakınlık ilişkileri incelendiğinde, bakteri filogenetik analizinde V4-V6 bölgeleri bütün 16S rRNA gen dizisini en iyi temsil ettiği için en güvenilir bölgeler olmuştur. Bunun yanı sıra V2 ve V8 bölgeleri ise en az güvenilir bölgeler olarak bildirilmiştir (Yang ve ark., 2016). 16S rRNA genlerinin korunmuş bölgelere sahip olması, bu genleri mikrobiyota çalışmalarında dünya çapında yaygın olarak çalışır hale getirmiştir. Bu sebeple, veri havuzlarında kayıtlı 16S rRNA gen dizileri hızla artmaktadır. Bakteri analizinde ve sınıflandırılmasında gen dizilerine erişimi artırmaktadır (Tablo 2.1).

Tablo 2.1: Yüksek miktarda değişken bölgeler ve bu bölgelerin gendeki başlangıç ile bitiş pozisyonları

Değişken bölge numarası	Başlangıç ve bitiş numaraları
V1 bölgesi	66-99
V2 bölgesi	137-142
V3 bölgesi	433-497
V4 bölgesi	576-872
V5 bölgesi	822-879
V6 bölgesi	986-1043
V7 bölgesi	1117-1173
V8 bölgesi	1243-1294
V9 bölgesi	1435-1465

2.8. Mikrobiyota Analizinde Kullanılan Yöntemler

Son yıllarda mikrobiyotaya artan ilgi ile beraber analiz yöntemleri de gelişim göstermiştir. Tüm bu yöntemlerin avantajları olduğu gibi dezavantajları da bulunmaktadır. DNA dizileme gibi moleküler yöntemler en güvenilir yöntemler olarak kabul edilmektedir. Bu çalışmada 16S rRNA bölgesi çoğaltılarak Yüksek Çözünürlüklü Erime (HRM) yöntemi ve Yeni Nesil Dizileme (YND) yöntemi analiz edilerek mikrobiyota tayini yapılmıştır.

2.8.1. Parmak-İzi Analiz Yöntemleri (DGGE, TGGE, T-RFLP)

Mikroorganizma topluluklarının araştırılmasında ‘Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism’ (T-RFLP), ‘Temperature Gradient Gel Electrophoresis’ (TGGE) ve ‘Denaturing Gradient Gel Electrophoresis’ (DGGE) gibi moleküler parmak izi yöntemleri sıkça kullanılmaktadır. Bu yöntemlerin temelinde DNA fragmentlerinin karşılaştırılması yer alır ve bu yöntemlerin hepsinde Polimeraz Zincir Reaksiyon (PCR) ürünleri, kapiller veya jel üzerinde farklı hareket ederek birbirinden ayrılmaktadır (Gilbride ve ark., 2006).

Mikrobiyota çalışmalarında en çok kullanılan 16S rRNA gen ampliconları, elektroforetik bir akım ile formamid denatüre edici bir ajanla poliakrilamid bir jelde yürütülür. DNA parçacıkları moleküler ağırlıklarına göre hareket etmeye başlar ve denatüre ajan sayesinde DNA denatürasyonu başlar. Nihayetinde DNA’nın tamamı denatüre olunca jelde olan hareketi durur. Nükleik asit dizilimine bağlı olarak erime sıcaklıkları oluşur ve denatüre eden ajanın farklı bölgelerinde hareketi durur. Farklı dizilerdeki DNA kısımları birbirlerinden ayrılır ve böylece bant oluşumu gözlenir. Türden türe DNA’nın dizilimi farklılık gösterdiği için, bu şekilde tür tayini yapılabilir. Bu analiz yöntemi ile çeşitli örneklerin olduğu havuzdan bile çok fazla sayıda 16S tür tayini yapılabilir (Fraher ve ark., 2012).

2.8.2. Floresan İn-Situ Hibridizasyon (FISH) Yöntemi

‘Floresan İn-Situ Hibridizasyon’ (FISH) yöntemi, kullanılan ilk metagenomik analizlerden biridir. FISH yönteminde DNA izolasyonu yapılmaz, mikroorganizma kolonizasyonundaki genler özel oligonükleotid problarla hedeflenerek işaretlenir (Amann ve ark., 1995). Bu yöntem ilk defa Giovannoni ve arkadaşları (Giovannoni ve ark., 1998) tarafından bulunmuştur. Bakteriyoloji alanında, bakterilerin mikroskop altında tespiti için rRNA komplementer radyoaktif işaretli oligonükleotid prob ile

muamale edilmiştir. Neredeyse son 15 yılda mikrobiyoloji alanındaki çalışmalar için daha sonraları geliştirilen floresan boyaların kullanımı etkili bir moleküler yöntem haline gelmiştir. FISH yönteminde RNA veya DNA baz çiftlerinin tespitinde kopyalanmış oligonükleotid probalar veya genomik probalar ile çalışılmaktadır. Buradaki amaç, oligonükleotid probalar kullanılarak 16S rRNA dizisini komplementer floresan ile işaretlemektir. Flow sitometri yöntemiyle beraber kullanıldığında detaylı sonuç alınabilen bir yöntem olmaktadır (Amann ve ark., 1990).

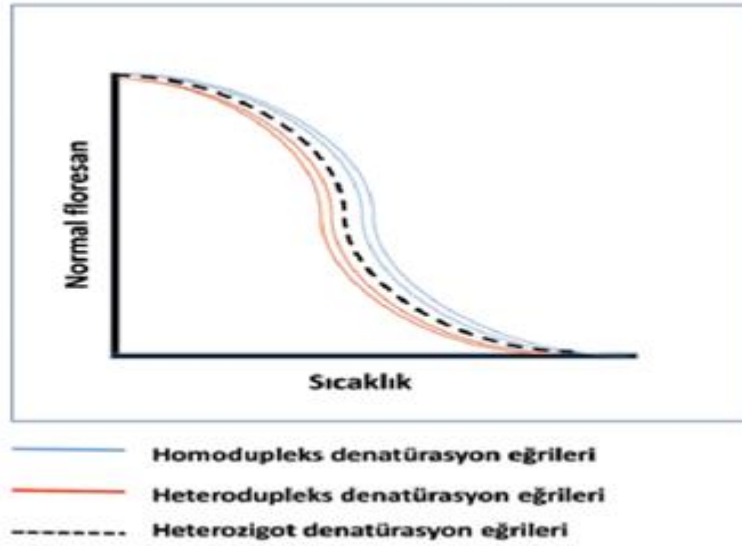
2.8.3. DNA Mikroarray Yöntemi

Mikrobiyal topluluklarının çeşitlilik analizlerinde DNA çip ve filogenetik mikrodizi olarak bilinen hassas array teknolojileri geliştirilmiştir. Bu çipler kolonizasyondaki 16S rRNA genlerine komplementer ve örneklerin karşılaştırılabilmesine olanak sağlayan oligonükleotid problemleri içermektedir. ‘Microbiota Array’, ‘PhyloChip’ ve ‘HITChip’ gibi bazı arrayler, bir örnekteki çeşitliliği bir seferde tayin edebilmektedir (Paliy ve Agans, 2012). Bu genom arraylerinin suşlardan izolasyonları saf kültürlerden tercih edilmektedir. İzole edilen bütün genomik DNA’lar kullanılarak oluşturulmaktadır ve zor veya basit karışımli suşların bile tek başına türlerinin tayinini yapabilecek şekilde tasarlanmaktadır. (Wu ve ark., 2004).

2.8.4. Yüksek Çözünürlükte Erime (HRM) Analizi

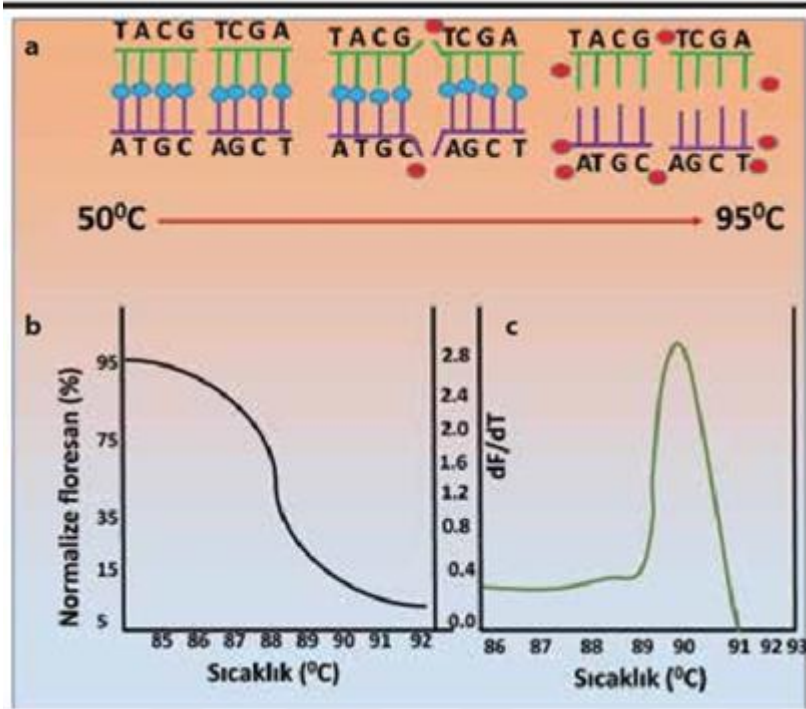
‘Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonunun’ (RT-PZR), 1997’de yaygın kullanıma başlanmasıyla ‘Yüksek Çözünürlükte Erime yöntemi’ geliştirilmiştir. HRM analizinde DNA’daki moleküllerin erime kinetiğine bağlı olarak çalışan bir yöntemdir. Bu yöntem, tamamiyle kapalı tüp devresiyle gerçekleşir ve bu süreçte yalnızca DNA’nın interkalasyon problemleri kullanılmaktadır. Kapalı tüp devresi sayesinde ‘HRM’ yönteminde bulaşıcı riski azalır ve bu da avantaj sağlamaktadır. Ortamdaki sıcaklık artışına takiben DNA metaryeli ayrışır, boya salınır ve floresan düşer. Floresandaki bu düşüş DNA’nın denatürasyonu (T_m) doğru orantılıdır. Floresan ölçüm, ‘denatürasyon eğrisi’ veya ‘erime eğrisi’ isimleriyle işlenir. Bu eğriler bu yöntemin ham verileridir. Bu ham veriler, diğer bir deyişle, belirli bir zaman aralığında, sıcaklık değişimine bağlı olarak floresan ışımaya miktarındaki değişim olarak da bilinmektedir. Bu erime eğrileri, 0.5°C’lik yükselmelerle 65°C’den 95°C’ye kadar olan aralığı kapsamaktadır. Her örneğin HRM analizi, eğrilerin pozisyonu ve şekli izlenerek

çıkarılır. Tüm örnekler kendi içinde tek bir bazlık değişim var ise bile hızlıca saptanır ve işlenir (Ririe ve ark., 1997) (Şekil 2.9) (Dirican ve ark., 2017).



Şekil 2.9: HRM yönteminde heterozigot ve homozigot denatürasyon eğrileri

HRM analizinde boyalar (EvaGreen, SYBR Green gibi) kullanılarak floresan ışımlar oluşturulur. Bu yöntemde birden fazla boya ve gerçek zamanlı PCR (qPCR) cihazı kullanılır. Bu sebeple cihazın kendi kitine özel olan ve toksik etkisi düşük boyalar kullanılmaktadır. Bu boyalar; LCGreens (Idaho Technology Inc, Salt Lake City, Utah), LightCyclers ResoLight Dye (Roche, Indianapolis, IN), Syto9s (Invitrogen; Carlsbad, CA, United States), SYBR Green BioRad iQ™5 USA, Eva Greens (Biotum) (Inc. Corporate Place, Hayward, CA) (Eischeid AC. SYTO, 2011)'dir. Tüm bu boyaların kullanılması ile DNA metaryelinin denatürasyonu gözlenerek kayıt altına alınmaktadır (Şekil 2.10) (Dirican ve ark., 2017). Boyaların konsantrasyonundaki yüksekliklerin bazı istenmeyen durumları tetikleyebildiği kabul edilmektedir (Monis ve ark., 2005).

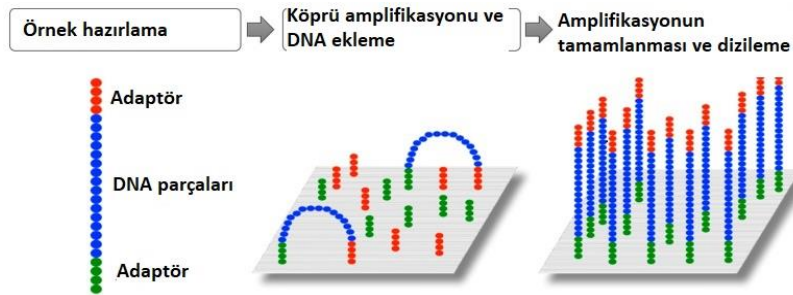


Şekil 2.10: HRM analiz yönteminin reaksiyon mekanizması. (a) Sıcaklığa bağlı olarak çift iplikli DNA'nın denatürasyonu (b) HRM analizi sayesinde normalize eğrilerin oluşumu, (c) Amplikonların melting (erime) eğrisi ve erime sıcaklığına göre negatif türev eğrisi (dF/dT)

'HRM analizi' ile DNA fragmanlarının dizilerine özgü erime profilleri elde edilmekte, bu eğriler normalize edilip fark profilleri oluşturulduğunda ise diziler arasındaki tek nükleotid farklar ortaya konabilmektedir (Wittwer ve ark., 2001). Böylelikle DNA dizi analizine gerek kalmadan DNA'lar dizilerine göre gruplandırılabilir. Bu yaklaşım metagenomik çalışmalarda da kullanılmakta, bir karışım halinde bulunan 16S rRNA amplikonlarının dizi varyasyonları, bu amplikonların HRM profiline de yansımaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalar, bakteriyel komünite profil parmak izi oluşturmada sıkça kullanılan 'denatüran gradyan jel elektorforez (DGGE) yöntemi' yerine HRM analizinin kullanılabileceğini göstermiştir (Hjelmsø vd. 2014; Kim ve Lee 2013). Bu durum, yüksek maliyet ve iş gücü gerektiren çok örnekli çalışmalarda, yüzlerce örneğin mikrobiyal komünite profillerinin bir günde ortaya konmasını sağlayarak bir devrim yaratma potansiyeline sahiptir.

2.8.5. Yeni Nesil Dizileme (YND) Yöntemi

YND, Sanger DNA dizileme yönteminin ilk olarak 1977'de ortaya çıkmasından (Sanger ve ark., 1977; Mardis, 2008) birkaç on yıl sonra ona paralel geliştirilmiş detaylı, yüksek verimli bir DNA dizileme teknolojisidir. YND yönteminin temelinde, DNA metaryelinin enzimatik reaksiyonlara girerek kesilmesi, DNA parçalarının çoğaltılması ve birden fazla DNA bölümü ile havuz oluşturulması yatar. Milyonlarca kısa DNA parçasını aynı anda dizilememek mümkündür, böylece genomdaki tüm bazların bir kaç defa okunması sağlanır ve olası varyasyonlar tespit edilerek daha güvenli sonuçlar verilebilir. YND özetle, çalışma yapılacak metaryelin genomik DNA'sının çıkarılması ve ondan amaçlanan bölgelerin seçilmesi, enzimatik yollarla DNA'nın kesilerek havuz yapılması, havuzu kapsayan DNA'ların çoğaltılarak dizilenmesi ve sonucun ham veri olarak işlenmesi, kaynak dizi yardımıyla rita çıkarılması, değişim var ise yorumlanıp tanımlanması, YND ya da Sanger sekanslama yardımıyla doğrulama ve ayrışım (segregasyon) analizinin yapılması, olası patojenik değişimlerin saptanması ve alınan tüm verilerin raporlanması işlemlerinden oluşan bir süreçtir (Buermans ve den Dunnen, 2014) (Şekil 2.11) (Garrido-Cardenas ve ark., 2017).



Şekil 2.11: YND Temel Prensibi

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Hasta Grubu

Araştırmaya Anadolu Sağlık Merkezi, Onkolojik Hematoloji Polikliniği'nde nakil hazırlık takibinde olan 25 hasta dahil edildi. Hastalardan nakil öncesi hazırlık rejimleri başlamadan önce ve nakli takiben 3. haftada olmak üzere toplam 2 kere dışkı örneği alındı. Hastaların dışkı örnekleri kemik iliği vaka sorumlusu ve kemik iliği nakil (KİT) servis hemşireleri tarafından steril swap kabına alındı. Kaplardaki örnekler çalışılmaya başlanana kadar uygun şartlarda (-80 °C) saklandı. Mikroorganizma DNA izolasyon işlemi 10'lu gruplar halinde Spin Column Nükleik Asit İzolasyon Kiti (Bioeksen, Türkiye) kullanılarak yapıldı. İzole edilen DNA'lar daha sonra HRM ve YND işlemine konulmak için uygun şartlarda (-20 °C) saklandı.

3.2. Kontrol Grubu

Çalışmaya kontrol grubu olarak, hastaların vericileri olan 25 sağlıklı birey dahil edildi. Dışkı örnekleri nakil öncesi aşılama rejimi öncesi alındı. Örnekler yine kemik iliği vaka sorumlusu ve KİT servis hemşireleri tarafından steril swap kabına alındı. Örnekler çalışma başlanana kadar uygun şartlarda (-80°C) muhafaza edildi. Daha sonra mikroorganizma DNA izolasyonu yapıldı. Sağlıklı kontrol gruplarına da hasta grubu ile aynı şekilde ve aynı zamanda HRM ve YND testleri yapıldı. Hastaların ve kontrol gruplarının dışkı örneklerinden nükleik asit izolasyon işlemleri İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarı ve 16S rRNA çoğaltılması, HRM ve YND analizleri Bioeksen Ar-Ge Teknolojileri LTD.ŞTİ Laboratuvarı'nda yapıldı.

Etik kurul onayı sonrasında çalışmaya dahil edilen gönüllülere (hasta ve sağlıklı bireylere) bilgilendirme yapıldı ve onam formu imzalatıldı.

3.3. Çalışmaya Dahil Edilme Kriterleri

Bu çalışmada aşağıda belirtildiği gibi mikrobiyotayı etkileyen faktörlere sahip olmayan kişiler seçilmiştir.

- Hamile olmak
- Kemoterapi ve radyoterapi almıyor ya da yakın zamanda almış olması
- Gıda alerjisi olması
- Malabsorpsiyon olması

- İnvazivenfeksiyona sahip olması
- 3 ay öncesine kadar antibiyotik kullanmış olması
- 4 hafta öncesine kadar kortikosteroid kullanmış olması
- İmmünsüpresif ilaç kullanmış olması
- Sülfosalazin, meselazin kullanıyor ise 4 hafta öncesine kadar bırakmamış olması
- Son 6 ay içerisinde prebiyotik/probiyotik tedavisi almış olması
- Çalışmadan üç ay öncesine kadar kolon temizliği yapılmış olması

3.4. Gereçler

3.4.1. Çalışmada Kullanılan Genel Cihazlar

- Derin dondurucu (-20 °C) (Siemens A++)
- Derin dondurucu (-20 °C) (Bosch)
- Derin dondurucu (-80 °C) (Sanyo)
- Santrifüj (Mikro) (Heraeus, Biofugo Pico)
- Cubee GeneReach Spin Down Centrifuge
- Multi Spin (Biosan MSC-600)
- Vorteks (IKA, MS2)
- Isıtmalı Çalkalayıcı (Gerhardt)
- Isıtıcı Blok (Wealtec, HB-1)
- Spektrofotometre (Thermo Scientific, Nanodrop 2000)
- Roche Lightcycler 96 qPCR Cihazı
- Lenovo Bilgisayar
- UV Transillüminatör
- Elektroforez Jel Tankı
- Su Banyosu
- Mikrodalga
- Illumina MiSeq YND Cihazı
- Çeker ocak

3.4.2. Çalışmada Kullanılan Sarf ve Kimyasal Malzemeler

- Otomatik Pipet (10 µl'lik) (Axypet)
- Otomatik Pipet (100 µl'lik) (Axypet)

- Otomatik Pipet (20-200 µl'lik) (Genex Beta)
- Otomatik Pipet (1000 µl'lik) (Hamilton, Axypet)
- Otomatik Pipet Ucu (10, 100 ve 1000 µl'lik) (BioPointe Scientific)
- 1,5 ml'lik ve 2 ml'lik mini santrifüj tüpü
- 0,5 ml'lik qPCR cihazı tüpleri

3.5. Kullanılan Kitler

3.5.1. Dışkıdan Nükleik Asit İzolasyon Kiti

- qPCR HRM Mix Kiti (Bio-Speedy)
- Biospeedy® Proof Reading DNA Polymerase 2x Reaction Mix
- Biospeedy® PCR Product Purification Kit
- YND ile Bakteriyal Metagenomik Analiz İçin Kütüphane Hazırlama Kiti (16S rRNA V3-V4 460 bp ampikon kütüphaneleri)
- PBS
- TBE
- Etidyüm Bromür
- Agaroz
- RedSafe™ Nükleik Asit Boyama Çözeltilisi



Şekil 3.1: Nükleik asit izolasyon kiti



Şekil 3.2: Kit solüsyonları

3.5.2. Kullanılan Solüsyonlar

- STL-P1 Liziz Tamponu
- Pr-K Proteinaz K
- GIT2 Kaotropik tuz
- IP Bağlama tamponu
- WB1 Yıkama tamponu
- WB2 Yıkama tamponu
- EB Elüsyon tamponu

3.5.3. Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler

- Otomatik Pipet (20-200 µl'lik) (Genex Beta)
- Otomatik Pipet (1000 µl'lik) (Hamilton)
- Otomatik Pipet Ucu (10, 100 ve 1000 µl'lik) (BioPointe Scientific)
- 1,5 ml'lik ve 2 ml'lik mini santrifüj tüpü
- Kolon
- Toplama Tüpü
- İnhibitüp
- Derin dondurucu (-20 °C) (Siemens A++)
- Derin dondurucu (-80 °C) (Sanyo)
- Santrifüj (Mikro) (Heraeus, Biofugo Pico)
- Vorteks (IKA, MS2)
- Isıtmalı Çalkalayıcı (Gerhardt)
- Isıtıcı (Wealtec, HB-1)

- Spektrofotometre (Thermo Scientific, Nanodrop 2000)

3.5.4. HRM ile Bakteriyal Metagenomik Analiz Kiti

3.5.4.1. Kullanılan Solüsyonlar

- dH₂O
- Master Mix
- Eva Green 50x
- Primer F
- Primer R

3.5.4.2. Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler

- Otomatik Pipet (10, 100 ve 1000 µl'lik) (Axypet)
- Otomatik Pipet Ucu (10, 100 ve 1000 µl'lik) (BioPointe Scientific)
- 1,5 ml'lik ve 2 ml'lik mini santrifüj tüpü
- Kolon
- Derin dondurucu (-20°C) (Bosch)
- 0.5 ml'lik qPCR cihazı tüpleri
- Roche Lightcycler 96 qPCR cihazı
- Lenovo Bilgisayar
- Cubee GeneReach Spin Down Centrifuge
- Biosan MSC-600 Multi Spin
- Çeker ocak

3.5.5. YND ile Bakteriyal Metagenomik Analiz İçin Kütüphane Hazırlama Kiti (16S rRNA V3-V4 460 bp ampikon kütüphaneleri)

3.5.6. Kullanılan Kitler

- Nextera XT Index Kit
- Biospeedy PCR Product Purification Kit
- Biospeedy Proof Reading DNA Polymerase 2x Reaction Mix

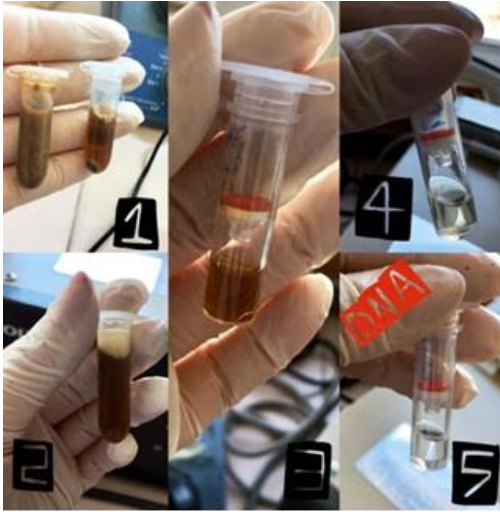
3.5.7. Kullanılan Cihazlar

- Illumina Miseq

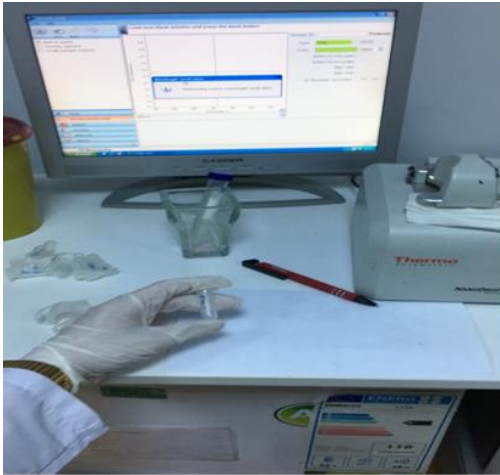
3.6. Dışkıdan Nükleik Asit İzolasyonu

İlk aşamada numunelerden nükleik asit izolasyonu, dışkıdan nükleik asit izolasyon kiti (Bioeksen, Türkiye) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. DNA izolasyonu için daha önce tanımlanmış fiziksel (boncukla parçalama veya sonikasyon), kimyasal (SDS veya CTAB) ve biyokimyasal

(proteinazK, lizozim) parçalama yöntemleri farklı kombinasyonlarda uygulanmış ve en etkin yöntem belirlenmiştir. Parçalanmış hücrelerdeki DNA ve Protein moleküllerini ayırmak için silika kolonlar kullanılmış, RNA kontaminasyonu RNAaz uygulamasıyla giderilmiştir (Şekil 3.3). İzolasyonun son aşamasında, silika kolonlarda tutunan DNA'lar, DNase/Pyrogen bulundurmayan su içinde çözöldü ve spektrofotometre yardımıyla çıkarılan nükleik asit oranı ile özönlüğü saptanmıştır. 'OD260/OD280' oranı '1.8-2.0', 'OD260/OD230' oranı '2.0-2.2' olacak şekilde ve en az 10 ng/ul (tercihen 50-300 ng/μL) konsantrasyon aralığında DNA'lar seçilmiştir (Şekil 3.4).



Şekil 3.3: DNA izolasyon aşamaları



Şekil 3.4: Spektrofotometre ölçümü

Dışkıdan Nükleik Asit İzolasyonu Kitine ait gerekli özellikler;

Parçalama için, CTAB, proteinaz K, Guanidium Tyosiyonat içermelidir.

Kit ile swab, sıvı ve katı besi yerinden alınan örnekler ile çalışılabilir.

Silika membran teknolojisine sahip olmalı, kit yeterli miktarda kolon ve yakalama tüplerini içermelidir.

PCR inhibitor eleme solüsyonu içermelidir.

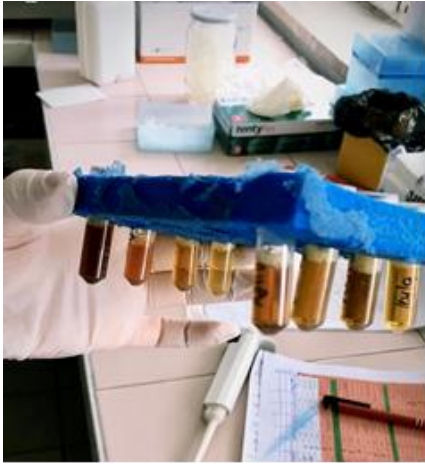
DNA ekstraksiyon verimi en az 30 ng/mg numune olmalıdır.

Elde edilen DNA'nın A260/280 indeksi 1.8-2.0 arası olmalıdır

İzolasyon işlemi 30 dakikadan kısa bir sürede tamamlanabilir.

3.6.1. Uygulama Protokolü

200 mg örnek içerisinde 300 µL tampon (200 mM Tris-HCl, pH 8.0; 20 mM EDTA; %10 Triton X-100) bulunduran tüplere alınmıştır ve 6000 rpm'de 1 dakika (dk) homojenizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Örneğin üzerine, 10 µl Lizozim eklenmiştir. 15 dakikada 37 °C'de inkübasyonu sağlanmıştır. Daha sonra numuneye 250 µl parçalama tamponu (0,5 µg/µl Proteinaz K, %5 Tween® 20, 3M Guanidinium thiocyanate, 20 mM Tris-HCl, pH 8.0) ilave edilerek 15 dk 37°C'de 5 dk 95 °C'de inkübatörde bekletilmiştir. Bu işlemlere takiben 250 µl izopropanol katılarak santrifüj edilmiştir ve aşamada silika kolonlar kullanılmıştır (Şekil 3.5). Silika kolona bağlı kalan DNA'lar yıkama işlemlerine 2 kez tabi tutulur (20 mM NaCl, 2 mM Tris-HCl pH 7,5, %80 Etanol). DNA elüsyonu 50 µL 100 mM Tris-HCl, pH 8,0 kullanılarak gerçekleştirilmiştir. DNA'lar bir sonraki işleme kadar -20 °C de saklanmıştır (Şekil 3.6).



Şekil 3.5: Silika kolonlar



Şekil 3.6: Saf DNA

3.7. HRM Analizi

HRM öncesi 16S rDNA bölgelerinin çoğaltımı PCR ile gerçekleşmiştir. Yapılan tüm HRM analizlerine dizisi bilinen bir standart DNA, referans HRM profilini elde etmek için dahil edilmiştir. Elde edilen sıcaklık-floresan şiddeti ham verileri, Reja ve arkadaşları tarafından tanımlanan istatistiksel yaklaşımı temel alan Biospeedy® HRM Analiz Yazılımı (Bioeksen Ar Ge Teknolojileri Ltd. Şti., Türkiye) kullanılarak ile analiz edilmiştir (Reja ve ark., 2010). HRM yazılımı sıcaklık-floresan şiddeti ham verilerini sıcaklık - % floresan değişimi olacak şekilde normalize edilmiştir. Elde edilen normalize erime eğrisi profillerinin, referans DNA'dan elde edilen erime eğrisi profilinden farkları alınarak farklılık profilleri elde edilmiştir. Elde edilen farklılık profilleri proje kapsamında oluşturulacak bir veri bankasında saklanmaktadır. HRM yazılımı, analiz edilen yeni numunelerden elde edilen farklılık profillerini, veri bankasında mevcut farklılık profilleriyle karşılaştırarak, analiz edilen numunenin HRM profilinin veri bankasında olup olmadığı konusunda bilgi vermiştir. HRM analizi sonucu orta çıkan profiller, Minitab 17 yazılım programıyla (Minitab, İngiltere) yapılarak kendi içinde karşılaştırılarak dendrogramlar oluşturulmuştur. PCA ordinasyonlarının hesaplanması ve korelasyon analizleri Minitab 17 yazılım programı kullanılarak yapılmıştır.

HRM analizleri sonucunda belirlenen gruplar, her grubun DNA'ları kendi içerisinde birleştirilerek analiz edilmiştir. 16S rRNA geninin V3-V4 bölgelerini içeren

ortalama 460 bp'lik bir hedeflemiştir. Amplikon havuzlarının yapılması için kullanılacak primer çifti 16S rRNA geninin V3-V4 bölgesini kapsayan yaklaşık 460 bp'lik bir alan hedeflemiştir (Klindworth ve ark., 2013). Amaçlanan spesifik primer ikililerinin 5' ucuna, oluşturulacak havuzun Illumina indeks ile dizileme adaptörleri uyumluluğunun sağlanması için konnektör DNA dizileri eklenmiştir. 16S rRNA'ya özel ve bu bölgeyi amaçlayan primer-konnektör dizileri ileri primer için 5'TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG-CCTACGGGNGGCWGCAG-3' ve geri primer için 5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3' olarak belirlenmiştir.

HRM ile Bakteriyal Metagenomik Analiz Kiti içerisinde kullanılacak DNA polimeraz enzimine ait gerekli özellikler:

Sıcak başlangıç özelliği olmalıdır.

Proof reading özelliği olmalıdır.

Yüksek aktiviteli füzyon protein içermelidir.

Primer dimer oluşturmamalıdır.

HRM ile Bakteriyal Metagenomik Analiz Kiti içerisinde kullanılacak olan floresan boya interkalasyon özellikli olmalıdır.

Kit içerisindeki tampon çözeltide reaksiyonun çalışması için gerekli iyonların yanı sıra inhibisyon engelleyici Bovin serum albümin (1,6 mg/ml) ve DMSO (%2) maddeleri bulunmalıdır.

Kit içerisinde gönderilen primerler 100pmol/μL konsantrasyonunda olmalı ve primerlerin çalışma sıcaklığı ile hedef bölgeye ait bilgiler kullanım klavuzunda belirtilmelidir.

HRM ile Bakteriyal Metagenomik Analiz Kitinin tüm çalışma prensibini, çalışma koşullarını ve Real-Time PCR cihazı programını içeren bilgiler kit ile tedarik edilmedi.

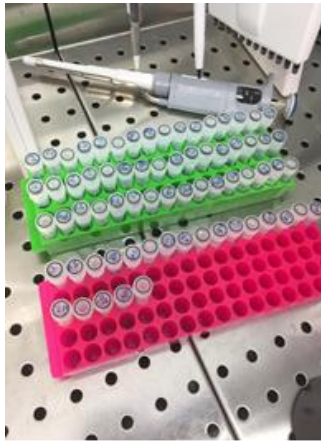
Kit yalnızca bakteriyal organizmalara spesifik olup ökaryotik organizmaları çoğaltmamalıdır.

Kit, bakteriyal 16 rRNA geninde en büyük varyasyon oranına sahip olan V3-V4 bölgelerini çoğaltmalıdır.

Elde edilen sonuçlar istenildiği takdirde, kit sağlayıcısı tarafından HRM analiz yazılımı ile değerlendirilmelidir. Bu nedenle, kit sağlayıcısı bünyesinde bir HRM analiz yazılımı bulundurmalıdır.

3.7.1. Uygulama Protokolü

1.Sırasıyla her bir örnek için 5µL Master Mix 2x, 0,0025µL Primer F, 0,0025µL Primer R, 2,75µL H₂O ve 0,20µL Eva green 50x prob hazırlandı. 2.Primer F ve Primer R 1/60 oranında sulandırılarak kullanıldı. 3.Her bir kuyucuğa 8µL karışım ve 2µL DNA eklendi 4. Toplamda kişi başı için 2µL örnek ve 8µL diğer malzemeler olmak üzere 10µL karışım hazırlandı (Şekil 3.7). 5.Kuyular 8’li stripler halinde üzerleri kapatılarak qPCR cihazına kondu. 6.Bact342f (5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3') ve Bact534r (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3') primer çifti ile hedeflenmiştir. PCR 1 döngü 3 dakika 95°C; 40 döngü 20 saniye 95°C, 20 saniye 53°C ve 30 saniye 72°C koşullarında gerçekleştirilmiştir. 7.PCR sonrasında yapılmış olan standart HRM analizinde sıcaklık 65°C’den 95°C’ye 0.05°C/sn hızla çıkartılmış, bu sırada aralıksız floresan okunmuştur (Şekil 3.8).



Şekil 3.7: Karışım hazırlama aşamaları



Şekil 3.8: qPCR Cihazı

3.8. Yeni Nesil Dizileme Yöntemi

Çalışmada kullanılan her iki yöntem de nükleik asitlerin mikrobiyal bir örnekten ekstraksiyonu ile başlar. Daha sonra, 16S rRNA geni PCR amplifikasyonuna tabi tutulur ya da küçük DNA fragmanları (shotgun metagenomikleri) halinde kesilir. Ortaya çıkan 16S rRNA gen ampliconları veya kesilmiş DNA fragmanları, YND teknikleri kullanılarak dizilenir. Son olarak, tüm dizi verileri, araştırmacının test edilen örneğin taksonomik bileşimini ve/veya fonksiyonel kapasitesini keşfetmesine olanak tanıyan kapsamlı bir biyoinformatik algoritmalar dizisi kullanılarak işlenir. Operasyonel taksonomik birimleri (OTU) çok benzer dizilerden oluşan bir gruptur (Stefan ve ark., 2019).

YND, patojenik mikroorganizmaların tespiti, tanımlanması ve karakterizasyonu, bulaşıcı hastalıklar için uygun (antimikrobiyal) tedavinin oluşturulmasında önemli bir yöntemdir (Lagier ve ark., 2015).

"YND" terimi tek bir tekniği göstermez; son on yılda geliştirilen Sanger sonrası dizileme teknolojilerinin topluluğunu ifade eder. Bu yenilikler arasında sentez yoluyla sıralama (Ronaghi ve ark., 1998), ligasyon yoluyla sıralama (Shendure ve ark., 2005), iyon yarı iletken dizileme (Rothberg ve ark., 2011) ve diğerleri bulunur. YND teknolojileri, çok sayıda numuneden daha az maliyetle son derece yüksek verim sağlaması bakımından Sanger yönteminden farklıdır (Mardis, 2011). Milyarlarca DNA

nükleotidi dizilenebilir bu da önemli ölçüde daha fazla sonuç verir ve Sanger dizileme ile kullanılan parça klonlama yöntemlerine olan ihtiyacı en aza indirir (Metzker, 2010). İkinci nesil sekanslama yöntemleri, amplifiye edilmiş DNA klonlarının sekanslanmasından ziyade amplifiye edilmiş sekanslama kütüphaneleri hazırlama ihtiyacıyla karakterize edilirken, üçüncü jenerasyon tek moleküler sekanslama, zaman alıcı ve maliyetli amplifikasyon kütüphanelerinin yaratılmasına gerek kalmadan yapılabilir. (Thompson ve Milos, 2011).

YND ile Bakteriyal Metagenomik Analiz Kiti içerisinde kullanılacak DNA polimeraz enzimine ait gerekli özellikler:

- a. Sıcak başlangıç özelliği olmalıdır.
- b. Proof reading özelliği olmalıdır.
- c. Yüksek aktiviteli füzyon protein içermelidir.
- d. Primer dimer oluşturmamalıdır.
- e. YND ile Bakteriyal Metagenomik Analiz Kiti içerisinde kullanılacak olan floresan boya interkalasyon özellikli olmalıdır.

Kit içerisindeki tampon çözeltide reaksiyonun çalışması için gerekli iyonların yanı sıra inhibisyon engelleyici Bovin serum albümin (1,6 mg/ml) ve DMSO (%2) maddeleri bulunmalıdır.

Kit içerisinde gönderilen primerler 100pmol/ul konsantrasyonunda olmalı ve amaçlanan bölgeye özel primer ikililerinin 5' ucuna, hazırlanan havuzun Illumina indeks ve dizileme adaptörleri uyumluluğunun sağlanması için konnektör DNA dizileri eklenmelidir.

Kit içerisinde PCR'dan elde edilen amplikonların saflaştırılması için gerekli komponentler bulunmalıdır.

Kit içerisinde, Saflaştırılan amplikonlara adaptör ekleme amaçlı ikincil PCR için gerekli reaktantlar ve illumina sekanslama adaptörleri bulunmalıdır.

Kit içerisinde, Illumina platformuna uygun kütüphane havuzu oluşturmak ve havuzlanan kütüphanelerin sekans öncesi seyreltme ve denaturasyon işlemleri için gerekli sarflar bulunmalıdır.

YND ile Bakteriyal Metagenomik Analiz Kitinin tüm çalışma prensibini ve çalışma koşullarını içeren bilgiler kit ile tedarik edilmedi.

Kit yalnızca bakteriyal organizmalara spesifik olup ökaryotik organizmaları çoğaltmamalıdır.

Kit, bakteriyal 16 rRNA geninde en büyük varyasyon oranına sahip olan V3-V4 bölgelerini çoğaltmalıdır.

Elde edilen sonuçlar istenildiği takdirde, kit sağlayıcısı tarafından YND analiz yazılımı ile değerlendirilmelidir. Bu nedenle, kit sağlayıcısı bünyesinde bir HRM analiz yazılımı bulundurmamalıdır.

Yeni nesil dizileme kiti sentez ile dizileme yöntemi temelli olmalıdır

Kit ile bir işletimde en az 8 Gb data elde edilmelidir.

Elde edilen datanın en az %75 'inin QC 30 ve üzerinde olması gerekmektedir.

Kit eşleştirilmiş uç dizilemesi için kullanılabilenlidir.

3.8.1. Uygulama Protokolü

Bu çalışmada, HRM analizleri sonucunda belirlenen gruplar, her grubun DNA'ları kendi içerisinde birleştirilerek analiz edilmiştir. İlk yapılan PCR işleminde "Biospeedy® Proof Reading DNA Polymerase 2x Reaction Mix" kullanılmıştır ve tüm primerlerden 200 nm uygulanmıştır. Biorad CFX Connect Cihazında şu ısıl döngü programı izlenmiştir: 95°C'de 3 dakika; 25 döngü 95°C'de 30 saniye, 55°C'de 30 saniye ve 72°C'de 30 saniye; 72°C'de 5 dakika. PCR ürünü agaroz jelde yürütülerek boyutu (~550 bp) doğrulanmış, "Biospeedy® PCR Product Purification Kit" yardımıyla saflaştırılmıştır.

Saflaştırma işlemi gerçekleşmiş PCR numunesinin ikinci PCR basamağı ve Illumina'nın dizileme adaptörleri Nextera XT Index Kiti (Illumina, ABD) kullanılmıştır. PCR işlemi döngü sıralaması, 3 dk 95°C; 8 döngü 30 sn 95°C'de, 30 sn 55°C'de, 30 sn 72°C son olarak da 5 dk 72°C olarak planlanmıştır. 'PCR' ürünü, "Biospeedy® PCR Product Purification Kit" (Bioeksen, Türkiye) yardımıyla saflaştırılmıştır. Kütüphane hazır hale 'Bioanalyzer DNA 1000 çipi' ile boyut (~630 bp) kontrolü yapılarak getirilmiştir. Kütüphanenin son hali 10 mM Tris pH 8.5'un 4 nM'e seyreltilerek getirilmiştir. 5 µl'lik parçalar şeklinde havuzu oluşturmak için bir araya getirilmiştir.

Kümeleme ve dizilme öncesi hazırlık, havuz oluşturulan kütüphanelerin NaOH kullanılarak denatürasyonunun sağlanması, hibridizasyon tamponu yardımıyla seyreltilerek gerçekleştirilmiştir. Sıcaklık ile denatürasyon sağlandıktan sonra MiSeq dizileme yapılmıştır. Bu işlemde ‘Illumina MiSeq v3 reaksiyon kitleri’ kullanılmıştır. Bütün reaksiyonlara kontrol amaçlı %5 PhiX dahil edilmiştir.

3.9. Antibiyotik Direnç Testi

3.9.1. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanışları

3.9.1.1. Nükleik Asit Boyama Çözeltisi

“RedSafe™ nükleik asit boyama çözeltisi (20.000x)” kullanıma hazır ve kanserojen olmayan bir boya olduğundan çalışmamızda tercih edilmiştir. Kullanıcı talimatına göre 100 ml %1’lik agaroz jel için 5 µl RedSafe™ Nucleic Acid Staining Solution kullanılmıştır.

3.9.1.2. %1’lik Agaroz Jel

100 ml 0,5X TBE’ye ve 1 gr agaroz katarak mikrodalga fırında içinde partikül kalmayana kadar eritilmiştir. Hazırlanan jel, su banyosunda 55 °C’de, 10-15 dakika bekletildikten sonra 5 µl etidyum bromür ile muamele edilmiştir. Jel, kasete dökülmüş ve kuyucukların oluşması için tarak yerleştirilmiştir. Oda sıcaklığında donması için bekletilmiştir.

3.9.1.3. X Taq PCR Master Mix

Ticari şekilde mevcut bulunan bu çözelti içerisinde primerler ve DNA hariç PCR için gereken tüm malzemeler bulunmaktadır. Çözelti direkt 2X olarak sulandırılmadan kullanılmıştır.

3.9.1.4. Primerler

Çalışmamızda kullanılan primerler Tablo 3.1’de yer almaktadır. Bu primerler *Klebsiella pneumoniae* için daha önce de kullanılmış olan ve spesifik karbapenem direncini göstren gen bölgelerini içeren bölgelerdir.

Tablo 3.1: Çalışmada kullanılan primerler

Primer Adı	Primer Dizisi	Primer Büyüklüğü
blaCTXM-1	F: 5'-CGCTTTGCGATGTGCAG-3'	550 bp
	R: 5'-ACCGCGATATCGTTGGT-3'	
blaNDM	F: 5'-TCTCGACATGCCGGGTTTCGG-3'	475 bp
	R: 5'-ACCGAGATTGCCGAGCGACTT-3'	
OXA-48	F: 5-TTGGTGGCATCGATTATCGG-3	743 bp
	R: 5-GAGCACTTCTTTTGTGATGGC-3	
KPC	F: 5'-TGTCAGTGTATCGCGGTC-3'	900 bp
	R: 5'-CTCAGTGCTCTACAGAAAAAC-3'	

Liyofilize haldeki primerlerine sırasıyla primer sentez raporuna göre RNAz, DNAz içermeyen su ilave edilerek 100 mikron (μ M) karışımlar hazırlanmıştır. Bu karışımlar 10 pmol'e çevirilerek çalışmamızda kullanılmıştır.

3.10. DNA Amplifikasyonu

Tümü 25 μ l olan PCR karışımında, zaten izole edilmiş olan 1 μ l DNA kullanılmıştır. Bir örnek için 12,5 μ l 2X Taq PCR Master Mix, 0,5 μ l (10pmol) F ve R primerleri kullanılarak hazırlanmıştır. Pozitif kontrol olarak laboratuvar arşivinde bulunan kontrol suşları kullanılmıştır.

PCR reaksiyonları gerekli optimizasyonlar sonucunda;

OXA48: 94°C'de 5 dk, 35 döngü 94°C'de 60 s, 56°C'de 45 s, 72°C'de 60 s ve bitiş reaksiyonu için 72°C'de 7 dk şeklinde gerçekleştirilmiştir.

NDM: 94°C'de 5 dk, 35 döngü 94°C'de 45 s, 60°C'de 45 s, 72°C'de 60 s ve bitiş reaksiyonu için 72°C'de 2 dk şeklinde gerçekleştirilmiştir.

KPC: 94°C'de 5 dk, 35 döngü 94°C'de 45 s, 55°C'de 45 s, 72°C'de 60 s ve bitiş reaksiyonu için 72°C'de 2 dk şeklinde gerçekleştirilmiştir.

CTXM-1: 95°C'de 2 dk, 30 döngü 95°C'de 60 s, 62°C'de 45 s, 72°C'de 45s ve bitiş reaksiyonu için 72°C'de 5 dk olarak belirlenmiştir ve gerçekleştirilmiştir.

3.10.1. Elektroforez

10 µl amplifikasyon ürünü (yükleme tamponlu mix) 0,5X TBE çözeltisi içerisindeki “RedSafe™ Nükleik asit boyama çözeltisi ile boyanmış ve %1’lik agaroz jel kullanılarak 100 volt (V)’da 45 dakika ilerlemesi sağlanmıştır.

3.10.2. Görüntüleme

Elektroforezden hemen sonra, jel translüminatöre konarak UV varlığında görüntülenme işlemi yapılmıştır.

3.11. İstatistiksel Analiz

Bu tez çalışmasının istatistiksel analizi ‘Toplum Bilimleri İstatistik paketi (Statistical Package for Social Sciences, SPSS) 22.0 paket programı’, Graphpad programı ve R programlama dili ile yapıldı. Verilerde medyan, frekans, oran ve ortalama ve standart sapma hesaplamaları yapılmıştır. Bağımlı nicel veriler analiz edilirken Wilcoxon, nitel bağımsız veriler analiz edilirken de Ki-kare testi seçildi. Spearman Korelasyonu ise korelasyon analizi için kullanıldı. İstatistiksel olarak anlam $p < 0,05$ değeri alındı.

Mikrobiyota analizinde indeks ve primer sekansları kırılacak ve sonrasında özgün sekanslar tanımlanmıştır. Kırılan özgün sekanslar SILVA rRNA veri tabanı algoritması kullanılarak hizalanmıştır. Bu adımdan önce SILVA veritabanı (Pruesse ve ark., 2007) dizileri kesilerek sadece V3-V4 bölgesinin olması sağlanmıştır. Dizilerin iki ucunda bulunan uygun olmayan diziler filtreleme yöntemi kullanılarak uzaklaştırılmıştır böylece hata kontrolü sağlanmıştır. Ön kümeleme yapılarak kirlilik engellenmiştir. UCHIME (Edgar ve ark., 2011) kodu kullanılarak kimera elemesi yapılmıştır. Sınıflandırma, diziler üzerinde Mothur-Bayesian ile yapılmıştır. Gerekli bilgiler (taksonomi dosyaları ve referans), SILVA veri tabanından (Pruesse ve ark., 2007) elde edilmiştir. OTU seçildikten ve SILVA rDNA veri tabanına göre taksonomik tayini yapıldıktan sonra OTU’lar filotiplerine göre gruplandırılmıştır. Taksonomik sınıflandırma için Bacteria Silva veri bankası ve analiz için QIIME 2 programları kullanılmıştır.

4. BULGULAR

Çalışmaya kan hastalığı olan ve hematopoetik kök hücre nakli olmuş 25 hasta ve birinci derece akrabalık ilişkisi bulunan 25 hasta yakını (vericileri, kontrol grubu) dahil edildi. Hastalar ile kontrol grubunun cinsiyet ve yaş dağılımı Tablo 4.1’de özetlenmiştir.

Tablo 4.1: Çalışma gruplarını demografik verileri

	Alıcı (Ort.±s.s.)	Verici (Ort.±s.s.)
Yaş Dağılımı	46,24±14,86 yıl	43,40±13,20 yıl
Cinsiyet Dağılımı (Erkek, Kadın)	15, 10	17, 8

Çalışmada yer alan 25 hastanın HKHN sonrası ilk 100 günlük sağ kalım oranı %80 olarak bulundu. Hastaların %16’sında hastalık tekrarı ve aGVHD geliştiği gözlemlendi. Engrafman olan hastaların %20’si full kimerikti. HLA uyumu hastalar ve vericiler arasında 10/10 ve vericilerin 1 tanesi (erkek kuzen) hariç hepsi hastaların kardeşi (16 erkek kardeş, 8 kız kardeş) idi. Kök hücre kaynağının %92’si çevre kanı olurken, %8’i kemik iliği idi. Hem hasta hem vericiler de 0 RH+ en sık rastlanan kan grubu olmuştur. Hastalara nakil öncesi ve sonrası kemoterapi, antibiyotik, immünsupresif ve antiviral ilaçlar kullanılmıştır. Hastaların nakle ait komplikasyonları Tablo 4.2’de belirtilmiştir.

Tablo 4.2: Nakle ait komplikasyonlar

Komplikasyonlar	n (%)
İlk 100 Günlük Sağ Kalım	80
Hastalık Tekrarı	16
aGVHD Gelişimi	16
İlk 3 Haftada Full Kimerik	20
Graft Rejeksiyonu	0
HLA Uyumu	
HLA Tam Uyumlu	100
HLA Kısmi Uyumlu	0
Akraba Dışı	0
Kök Hücre Kaynağı	
Çevre Kanı	92
Kemik İliği	8
aGVHD Profilaksisi	Endoxan (Siklofosfamid), Sandimum (Siklosporin), Prograf (Takrolimus), Cellcept (Mikofenolat mofetil)
Kondisyon Rejimleri Miyeloablatif (MA) Rejim Non-Miyeloablatif (NMA) Rejim	Busulfex (Busulfan), Endoxan (Siklofosfamid), Fludara (Fludarabin), Alkeran (Melfalan), ATG (Anti-insan-t-lenfosit-immunoglobulini), TBI (Tüm beden ışınlanması), Trecondi (Treosulfan)
Antibiyotikler	Bactrim (Sülfametoksazol, Trimetoprim), Tazocin (Piperasilin sodyum, Tazobaktam sodyum), Amikozit (Amikasin sülfat), Targocid (Teikoplanin), Meronem (Meropenem trihidrat), Colimycin (Kolistimetat sodyum), Fosit (Fosfomisin sodyum), Cipro (Siprofloksasin hidroklorür monohidrat), Zinnat (Sefuroksim), Triflucan (Flukonazol), Vfend (Vorikonazol), Zyvoxid (Linezolid)

Çalışmaya dahil olan 25 hastada toplam 11 adet farklı hematolojik malignite vardı. Bu gruptaki çeşitler arasında akut miyeloid lösemi (AML), myelodiplastik sendrom (MDS), multiple myeloma (MM), non-hodgkin lenfoma (NHL), hodgkin lenfoma (HL), akut lenfoblastik lösemide (ALL), kronik miyeloid lösemi (KML), kronik myelomonositik lösemi (KMML), idiyopatik aplastik anemi (IAA), primer myelofibroz (PMF), kronik miyeloproliferatif hastalıklar (KMPH) bulunuyordu. 25 hastadan 4 kişi aGVHD geliştirdi (Tablo 4.3).

Tablo 4.3: aGVHD dereceleri ve hastalık çeşitleri

Tanı	N=25
AML	6
MDS	4
MM	2
NHL	3
HL	1
ALL	2
KML	2
KMML	1
IAA	1
PMF	1
KMPH	2
aGVHD Gelişimi	N=4
Derece I	3
Derece II	0
Derece III	0
Derece IV	1

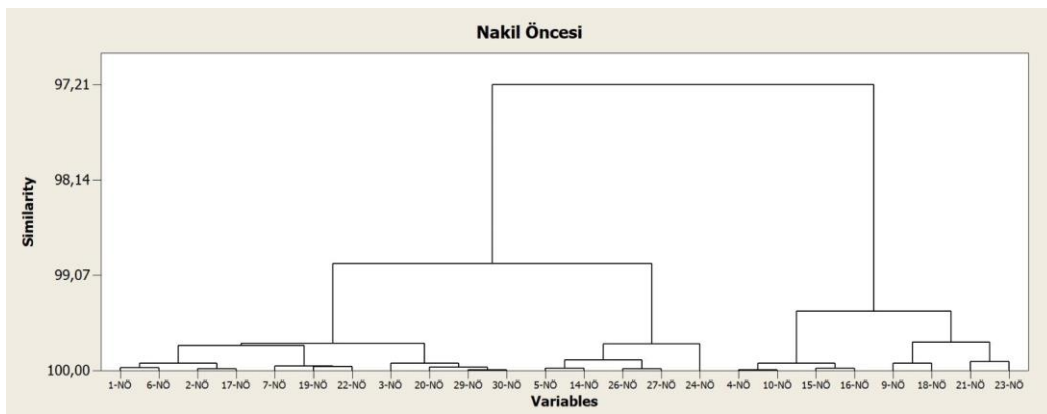
Çalışmada alıcı ve vericileri arasında tam HLA doku uyumu bulunuyordu. Alıcı ve vericilerde en yüksek frekansa sahip aleller; HLA-A*02:01, HLA-B*51:01, HLA-C*06:02, HLA-DR*15:01, HLA-DQ*03:01 olmuştur (Tablo 4.4).

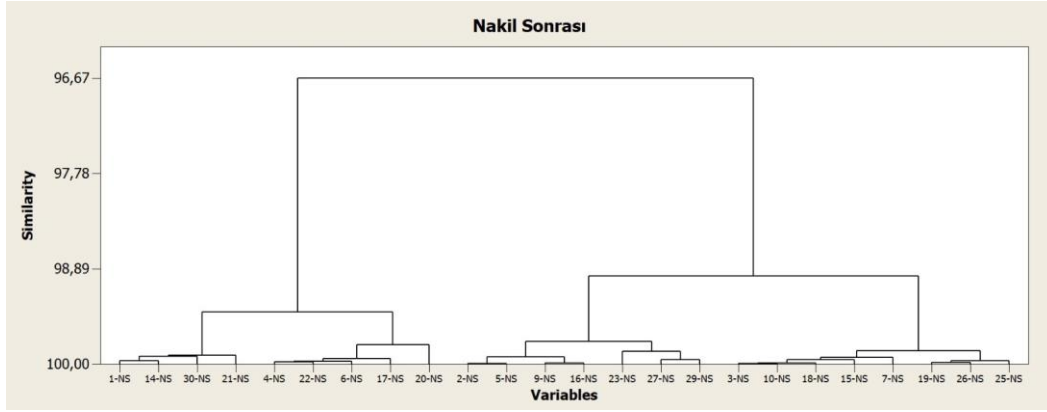
Tablo 4.4: Hastalarda ve kontrol grubunda en çok görülen HLA alelleri

Alıcı-Verici HLA Antijeni	f
HLA-A*02:01	25
HLA-B*51:01	14
HLA-C*06:02	18
HLA-DR*15:01	14
HLA-DQ*03:01	34

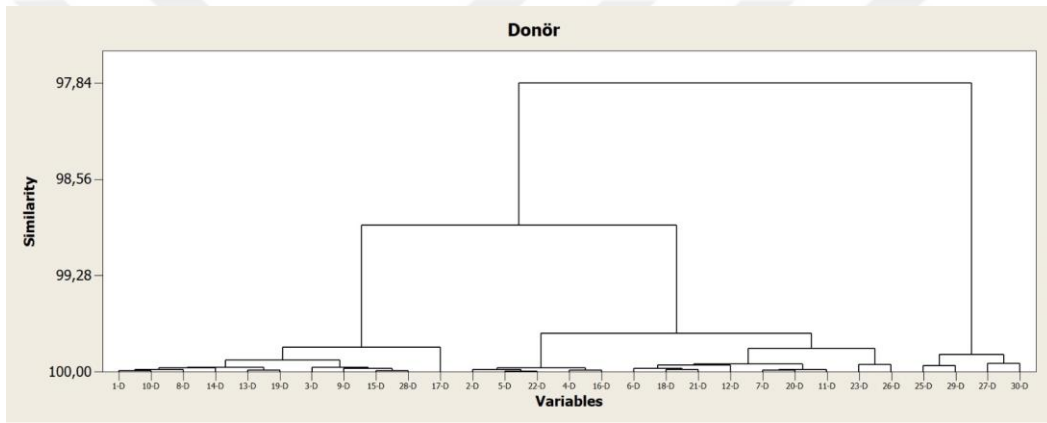
4.1. Mikrobiyota Analizi

Tüm hastalardan nakil öncesi ve engrafman sonrası olmak üzere iki kere dışkı örneği alındı. Her iki örneğe mikrobiyota analizi yapıldı. Allo-HKHN ve aldığı tedaviler sonucunda örnekler arasında, öncesi-sonrası şeklinde karşılaştırma yapıldı. Her bir örneğe ilk olarak HRM analizi yapıldı ve bunun sonucunda dendogramlar çıkarıldı (Şekil 4.1: A, B, C).

**A: Nakil öncesi**



B: Nakil sonrası



C: Vericiler

Şekil 4.1: HRM analizi sonucu dendogram çizimleri

4.2. Mikrobiyota ile allo-HKHN ilişkisi

Dendrogram sonuçlarına göre en yakın çıkan kollar beraber gruplanarak havuzlar oluşturuldu. Toplamda; vericiler için 4 (Tablo 4.5), nakil öncesi için 6 (Tablo 4.6) ve nakil sonrası için 6 (Tablo 4.7) havuz olmak üzere 3 grup, 16 nükleik asit (NA) havuzu oluşturuldu. Hastaların nakil öncesi, nakil sonrası örnekleri ile vericilerin örnekleri YND yöntemiyle detaylı analiz edildi.

Tablo 4.5: Vericilerin havuzları

V-Havuz 1	V-Havuz 2	V-Havuz 3	V-Havuz 4
Firmicutes	Firmicutes	Firmicutes	Firmicutes
Bacteroidetes	Bacteroidetes	Bacteroidetes	Bacteroidetes
Proteobacteria	Actinobacteria	Proteobacteria	Proteobacteria
Actinobacteria	Proteobacteria	Actinobacteria	Actinobacteria
Tenericutes	Verrucomicrobia	Verrucomicrobia	Tenericutes
Cyanobacteria	Tenericutes	Tenericutes	Verrucomicrobia
Verrucomicrobia	Cyanobacteria	Elusimicrobia	Kiritimatiellaeota
	Kiritimatiellaeota	Cyanobacteria	Synergistetes

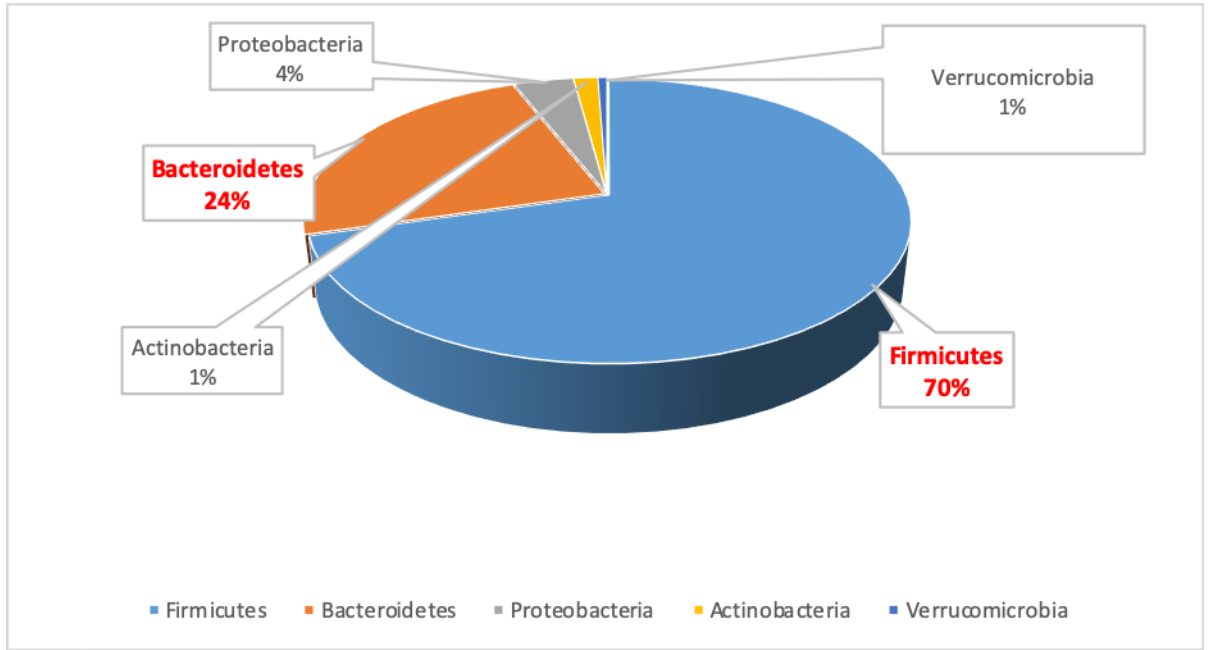
Tablo 4.6: Alıcıların nakil öncesi NA havuzları

NÖ-Havuz 1	NÖ-Havuz 2	NÖ-Havuz 3	NÖ-Havuz 4	NÖ-Havuz 5	NÖ-Havuz 6
Firmicutes	Firmicutes	Firmicutes	Firmicutes	Firmicutes	Firmicutes
Bacteroidetes	Bacteroidetes	Bacteroidetes	Bacteroidetes	Proteobacteria	Proteobacteria
Proteobacteria	Proteobacteria	Verrucomicrobia	Proteobacteria	Bacteroidetes	Bacteroidetes
Verrucomicrobia	Verrucomicrobia	Proteobacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinobacteria
Actinobacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Tenericutes	Epsilonbacteraeota	
Tenericutes	Patescibacteria	Cyanobacteria			
Patescibacteria		Synergistetes			
Epsilonbacteraeota		Patescibacteria			
		Fusobacteria			

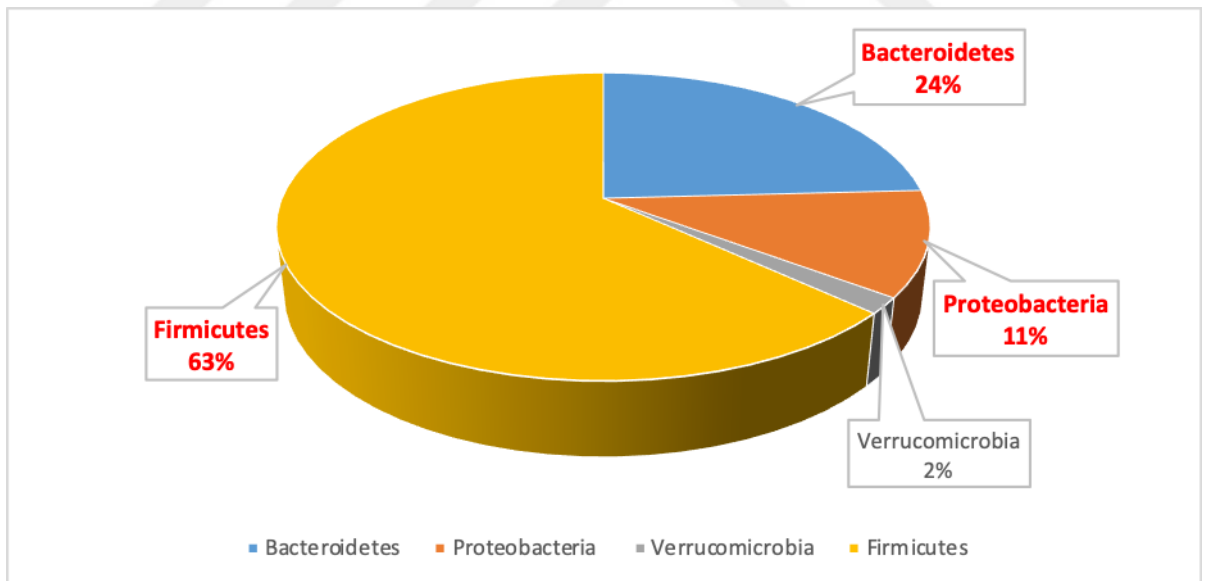
Tablo 4.7: Hastaların nakil sonrası NA havuzları

NS-HAVUZ 1	NS-HAVUZ 2	NS-HAVUZ 3	NS-HAVUZ 4	NS-HAVUZ 5	NS-HAVUZ 6
Proteobacteria	Firmicutes	Bacteroidetes	Firmicutes	Firmicutes	Firmicutes
Bacteroidetes	Proteobacteria	Firmicutes	Bacteroidetes	Proteobacteria	Bacteroidetes
Firmicutes	Bacteroidetes	Proteobacteria	Synergistetes	Actinobacteria	Proteobacteria
Actinobacteria	Actinobacteria	Verrucomicrobia	Proteobacteria	Bacteroidetes	Actinobacteria
	Epsilonbacteraeota	Actinobacteria	Actinobacteria		Verrucomicrobia
			Fusobacteria		

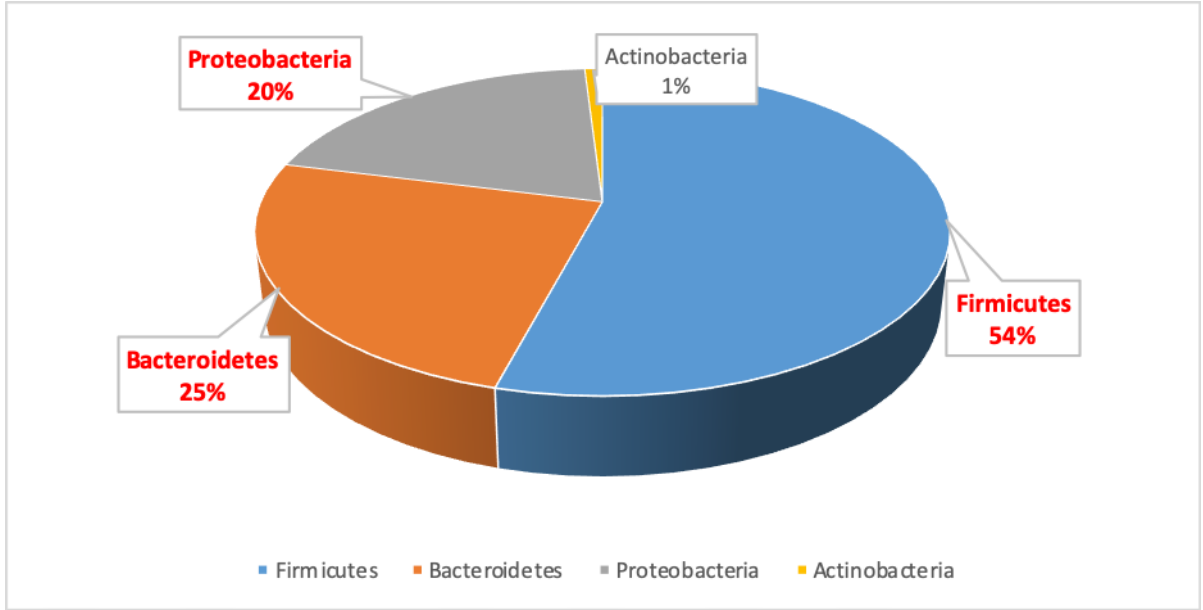
Hastaların nakil öncesi ve nakil sonrası (engrafman) örneklerinde belirgin bir farklılık vardı. Vericilerinin mikrobiyotası hastaların nakil öncesi mikrobiyota florasına yakın bulundu. Hastalarda nakil öncesi ve nakil sonrası istatistiksel olarak anlamlı çeşitlilik kaybı olduğu saptandı ($p=0,02$). Vericilerin bağırsak mikrobiyotasının %70'ini *Firmicutes* filumu oluştururken, %24'ünü *Bacteroidetes* filumu oluşturuyordu. Hastaların nakil öncesi bağırsak mikrobiyotasının %63'ünü *Firmicutes* filumu, %24'ünü *Bacteroidetes* filumu ve %11'ini *Proteobacteria* filumu oluşturuyordu. Hastaların nakil sonrası bağırsak mikrobiyotasının %54'ünü *Firmicutes* filumu, %25'ini *Bacteroidetes* filumu ve %20'sini *Proteobacteria* filumu oluşturuyordu (Şekil 4.2: D, E, F).



D: Verici



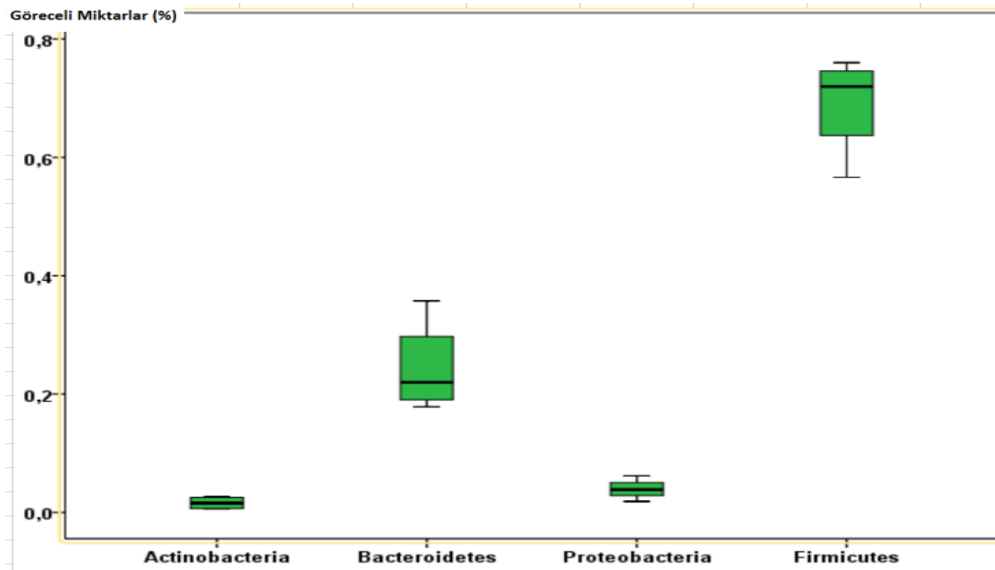
E: Nakil öncesi



F: Nakil sonrası

Şekil 4.2: Mikrobiyotadaki baskın filumlar

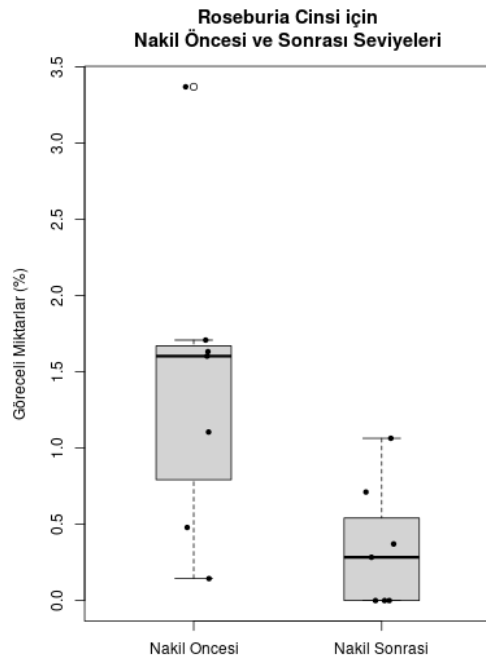
Vericilerde Firmicutes (%70), Bacteroidetes (%24), Proteobacteria (%4) ve Actinobacteria (%1) filumları bulunmuştur (Şekil 4.3).



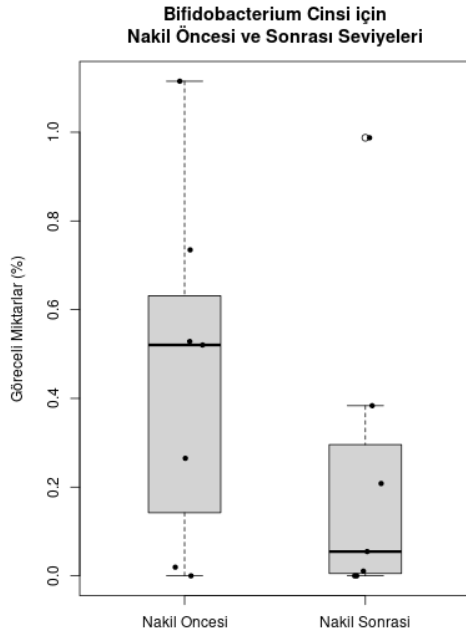
Şekil 4.3: Vericideki baskın filumlar

4.3. Mikrobiyota ve Engrafman

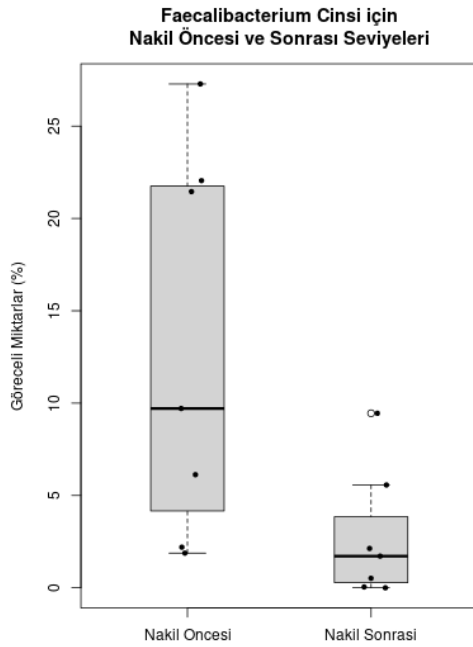
Allo-HKHN öncesi alınan dışkı örneği ile engrafman sağlandıktan sonra alınan dışkı örneği karşılaştırıldığında, *Roseburia* ($p=0,01$) (Şekil 4.4), *Bifidobacterium* ($p=0,05$) (Şekil 4.5), *Faecalibacterium* ($p=0,04$) (Şekil 4.6) ve *Dorea* ($p=0,05$) (Şekil 4.7) cinslerinde istatistiksel olarak anlamlı azalma olduğu gözlemlenmiştir. *Blautia* ($p=0,2$) (Şekil 4.8), *Lactobacillus* ($p=0,1$) (Şekil 4.9), *Ruminococcus* ($p=0,6$) (Şekil 4.10), *Akkermansia* ($p=0,1$) (Şekil 4.11), *Barnesiella* ($p=0,2$) (Şekil 4.12), *Dialister* ($p=0,3$) (Şekil 4.13) ve *Prevotella* ($p=0,3$) (Şekil 4.14) cinslerinde azalma gözlemlenmiştir fakat istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. *Lachnoclostridium* ($p=0,1$) (Şekil 4.15), *Bacteriodes* ($p=0,1$) (Şekil 4.16) ve *Veillonella* ($p=0,3$) (Şekil 4.17) cinslerinde artış olduğu gözlemlenmiştir fakat istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.



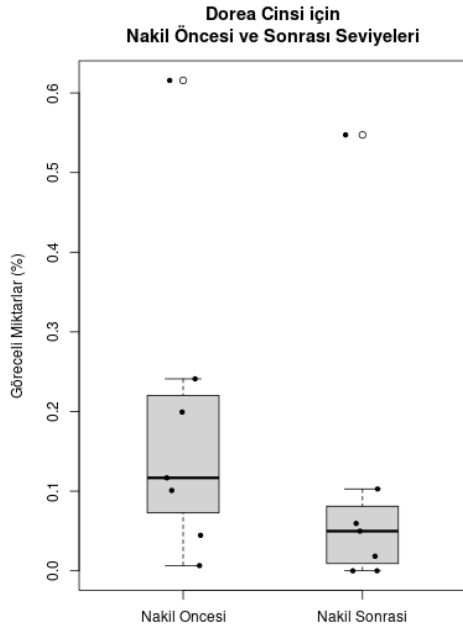
Şekil 4.4: Nakil öncesi ve sonrası için *Roseburia* cinsi seviyeleri



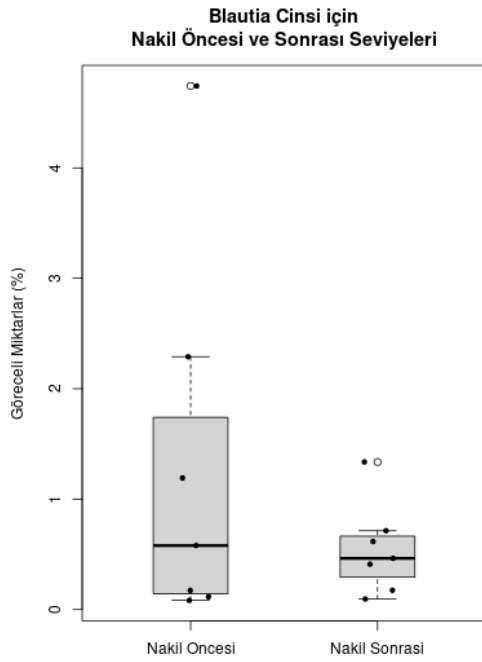
Şekil 4.5: Nakil öncesi ve sonrası için *Bifidobacterium* cinsi seviyeleri



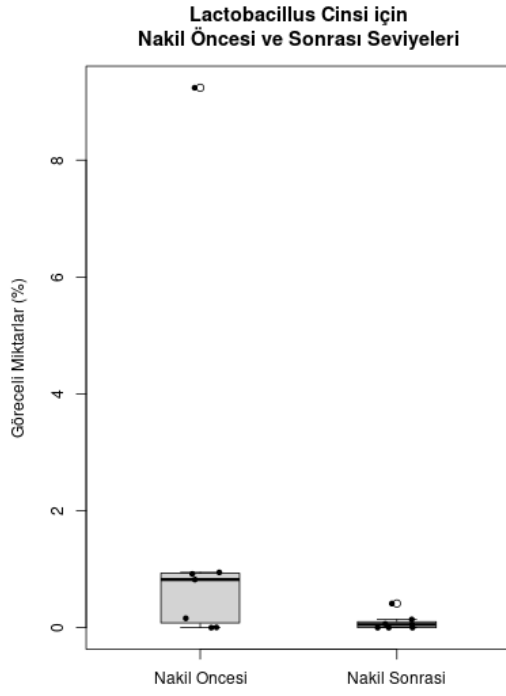
Şekil 4.6: Nakil öncesi ve sonrası için *Faecalibacterium* cinsi seviyeleri



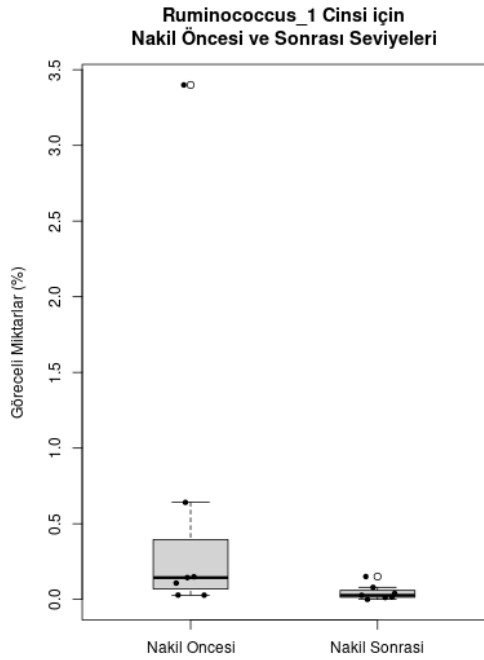
Şekil 4.7: Nakil öncesi ve sonrası için Dorea cinsi seviyeleri



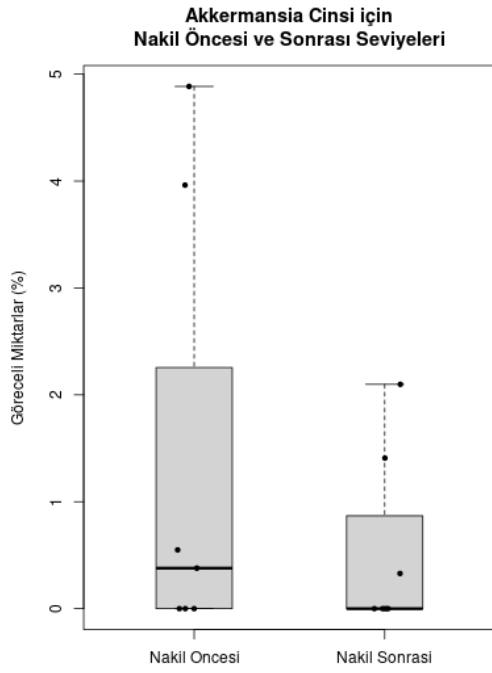
Şekil 4.8: Nakil öncesi ve sonrası için Blautia cinsi seviyeleri



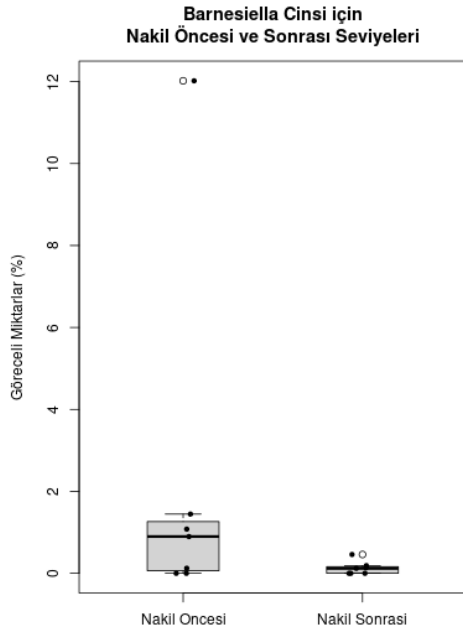
Şekil 4.9: Nakil öncesi ve sonrası için *Lactobacillus* cinsi seviyeleri



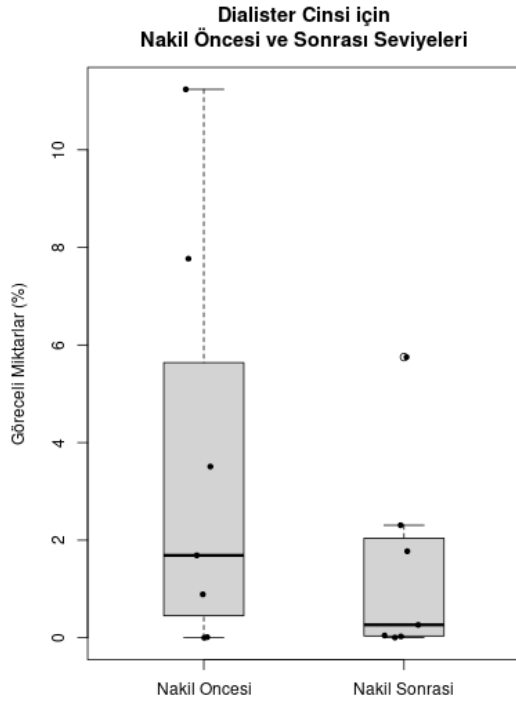
Şekil 4.10: Nakil öncesi ve sonrası için *Ruminococcus_1* cinsi seviyeleri



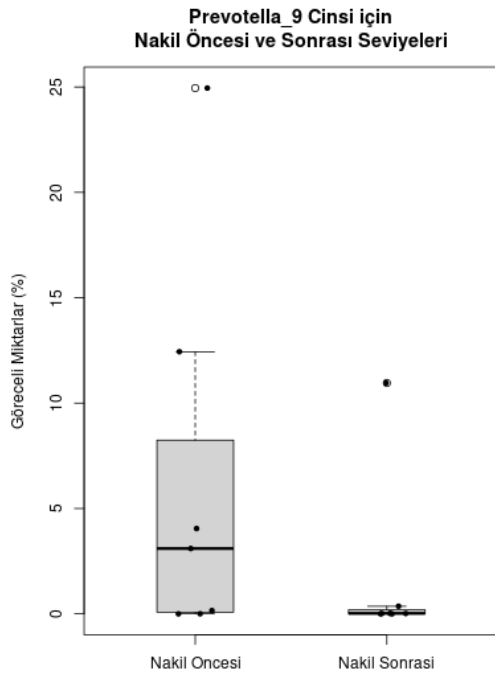
Şekil 4.11: Nakil öncesi ve sonrası için *Akkermansia* cinsi seviyeleri



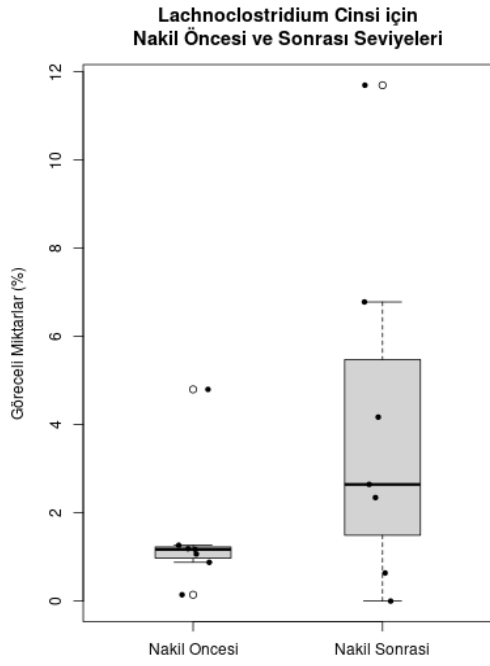
Şekil 4.12: Nakil öncesi ve sonrası için *Barnesiella* cinsi seviyeleri



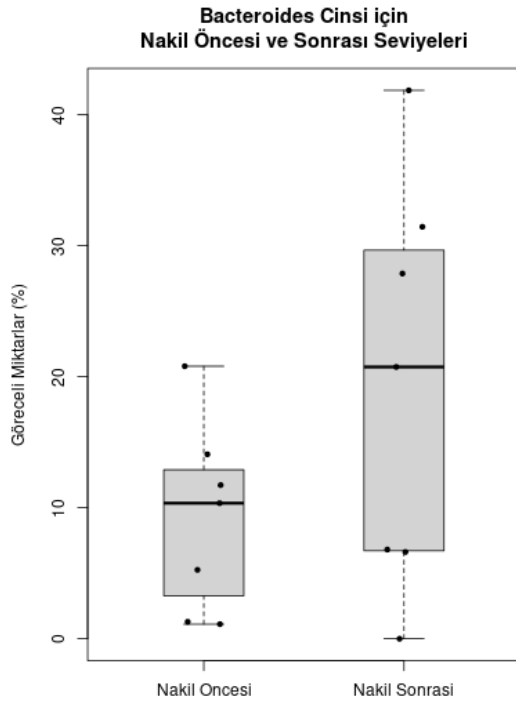
Şekil 4.13: Nakil öncesi ve sonrası için *Dialister* cinsi seviyeleri



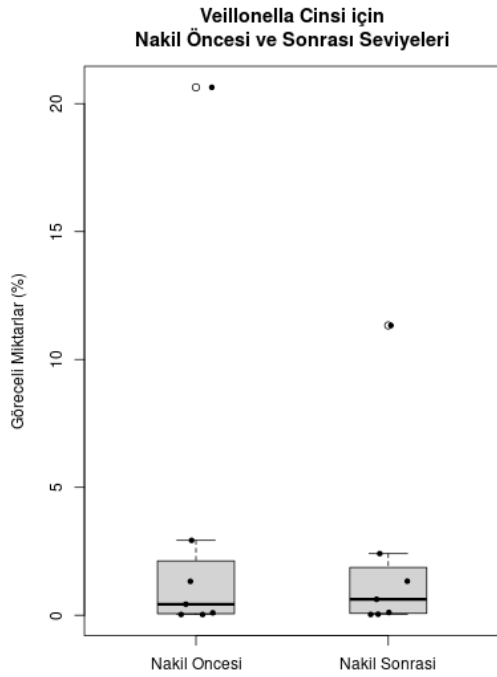
Şekil 4.14: Nakil öncesi ve nakil sonrası *Prevotella_9* cinsi seviyeleri



Şekil 4.15: Nakil öncesi ve sonrası için *Lachnospiridium* cinsi seviyeleri



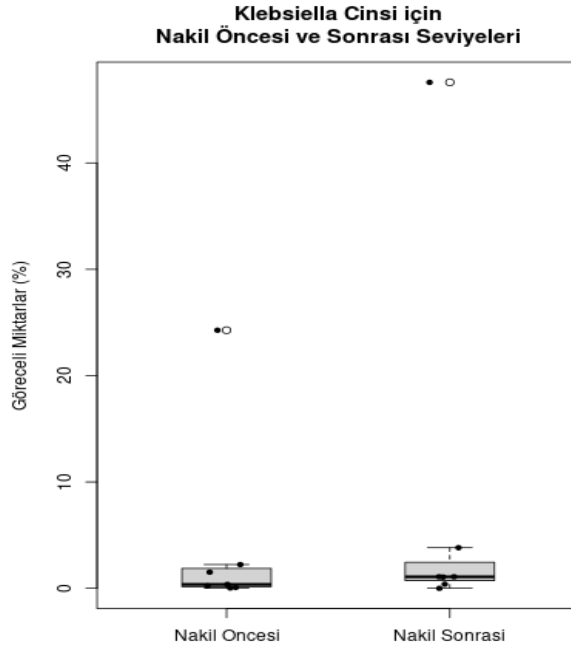
Şekil 4.16: Nakil öncesi ve sonrası için *Bacteroides* cinsi seviyeleri



Şekil 4.17: Nakil öncesi ve sonrası için *Bacteriodes* cinsi seviyeleri

4.4. Mikrobiyota ve aGVHD

Allo-HKHN'ni takiben aGVHD geliştiren hastalarda *Enterococcus* ($p=0,3$) (Şekil 4.18) cinsinde artış gözlenmiştir fakat istatistiksel olarak anlam bulunmamıştır *Streptococcus* ($p=0,3$) (Şekil 4.19) cinsinde belirgin bir farklılık görülmemiştir.



Şekil 4.20: Nakil öncesi ve nakil sonrası Klebsiella cinsi seviyeleri

4.6. Direnç Geni Bulguları

Hastaların nakil sonrası dışkı örneğinden yapılan testte, KPC ve NDM gen pozitifliği bulunmadı. %16 CTXM-1 geni, %16 CTXM-1/OXA-48 gen birlikteliği saptandı (Tablo 4.8).

Tablo 4.8: GSBL pozitifliği

	Hasta Grubu
	Alıcı (Nakil Sonrası) %
KPC Pozitifliği	0
NDM Pozitifliği	0
OXA-48 Pozitifliği	0
CTXM-1 Pozitifliği	16
OXA 48+CTXM-1 Pozitifliği	16

4.7. Mikrobiyota ve HLA

HLA alelleri arasında homozigotluk olan kişilerde mikrobiyota çeşitliliği heterozigot olanlara göre daha az olduğu saptanmıştır ve bu istatistiksel olarak anlamlı olarak bulunmuştur ($p=0,02$).

Çalışmamıza dahil olan alıcı ve vericiler de en fazla frekansa sahip HLA aleli HLA-DQB1*03:01 ($f=34$) olmuştur. Allo-HKHN sonrası toplamda 5 relaps geliştirmiş hastanın 4'ünde ($p=0,1$), 5 GVHD geliştiren hastanın 1'inde ($p=0,2$) ve 7 exitus olan hastanın 3'ünde ($p=0,5$) HLA-DQB1*03:01 aleli varlığı saptanmıştır fakat istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Bunun yanı sıra ex olan 1 hastanın ve GVHD geliştiren 1 hastanın DQB1 lokusunda 03:01 homozigotluğu taşıdığı saptanmıştır.

Tablo 4.9: HLA DRB1*03:01 ile GVHD/Relaps/Exitus İlişkisi

	GVHD (+)	GVHD (-)	Relaps (+)	Relaps (-)	Exitus (+)	Exitus (-)
HLA DQB1*03:01 (+)	1	12	4	9	3	10
HLA DQB1*03:01 (-)	2	9	1	11	4	8

HLA-DRB1*03:01 bulunan bireylerde *Ruminococcaceae* ailesi üyelerinin daha fazla olduğu görülmüştür fakat istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0,2$).

5. TARTIŞMA

Mikrobiyota, insan vücudunun en önemli metabolik düzenleticilerden birisi olduğu kabul edilmektedir. Mekanizması çözülmüş işlevlerinin yanı sıra henüz araştırma aşamasında olan mekanizmaların da vücutta kritik rolü olduğu düşünülmektedir. Mikrobiyota genlerle ve immün sistemle olan ilişkileri sonucunda birçok hastalıkla ilişkilendirilmiştir. ‘MHC’ genleri de bu ilişkili olduğu genlerden en önemlisidir. Bağırsak mikrobiyotasının hastalıklardaki rolü ile ilgili araştırmalar son yirmi yılda hızla artmıştır. Bağırsak mikrobiyotası ve etki mekanizmaları hakkında bilgi sağlamak, mikrobiyotanın bağırsağın ötesinde rolünün anlaşılmasını sağlamak, mikrobiyota dayalı terapötik tedavilerin geliştirilmesini ilerletmek ve bunların klinikte kullanılır hale gelmesi için çalışmalar devam etmektedir. Gelişen teknoloji ve artan çalışma sayısı ile mikrobiyotanın insan vücuduna olan etkileri ve hastalıklarla olan yakın ilişkisi gün geçtikçe daha iyi anlaşılmaktadır. Böylece mikrobiyotanın modülasyonu sayesinde henüz cevap bulamamış problemlerin soru işaretlerini de gidermesi beklenmektedir.

İlk kez Eiseman ve arkadaşları 1958 yılında bağırsak mikrobiyotasını tedavide kullanılmıştır (Seki ve Schnabl, 2012). Son 20 yılı aşkın süre içerisinde fonksiyonu büyük ölçüde açıklığa kavuşturulan bağırsak mikrobiyotası, önemi anlaşıldıkça birçok hastalığın takibinde ve kliniğinde önemli değişikliklere sebep olmuştur. Günümüzde sıkça rastlanan hematolojik malignitelerde de mikrobiyotanın rolü ortaya konmuştur. Allo-HKHN, lösemi ve lenfoma gibi hematolojik maligniteleri tedavi etmek ve aplastik anemi gibi disfonksiyonel hematopoez ile ilişkili durumları olan hastalarda kemik iliği fonksiyonunu eski haline getirmek için hayat kurtaran bir işlemdir (D'Souza ve ark., 2017). Allo-HKHN sırasında, tedavi rejimi, beslenme, enfeksiyonlar, antibiyotik kullanımı gibi faktörler, bağırsak florasının dengesini kaybetmesine neden olur (Taur ve ark., 2012; Taur ve ark., 2015). Allo-HKHN sırasında mikrobiyotadaki mikroorganizma çeşitliliği azalır ve bağırsağın mikrobiyal bileşiminde önemli değişiklikler gözlemlenir, bu da kemoterapi ve radyoterapiden oluşan hazırlık rejimlerinin veya naklin bağırsak disbiyozuna neden olduğunu gösterir (Holler ve ark., 2014; Taur ve ark., 2014; Chiusolo ve ark., 2015). Disbiyosiz gerçekleşen hastaların gastrointestinal sistemlerinde bir takım değişiklikler meydana gelir. Örneğin, patojen sayısındaki artış, ince bağırsakta antimikrobiyal peptit üreten Paneth hücrelerinin kaybından kaynaklanabilir (Eriguchi ve

ark., 2015, 2012; Hayase ve ark., 2017). Dahası, engrafman ile düşük bağırsak çeşitliliğinin ilişkili olduğu gösterilmiştir, bu da bağırsak mikrobiyotasının allo-KHN'de başarı veya başarısızlıkta önemli bir faktör olabileceğini düşündürmektedir (Taur ve ark., 2014). Seattle'dan yeni bir rapor, nötrofil engrafmanında bağırsak mikrobiyota etkisinin allo-HKHN'den sonra şiddetli aGVHD hakkında yol gösterici olabileceğini bildirmiştir (Golob ve ark., 2017). Çalışmamıza dahil edilen alıcı ve verici grupları arasında mikrobiyota analizleri sonucuna göre alıcıların nakil öncesi mikrobiyotaları ile nakil sonrası mikrobiyotaları arasında önemli bir değişim olduğu gözlemlenmiştir. Vericilerin mikrobiyota analizlerinin, alıcıların nakil öncesi mikrobiyota analizlerine benzer olduğu saptanmıştır. *Firmicutes* filumunun, tüm grupların bağırsak mikrobiyotasında en fazla saptanan filum olduğu gösterilmiştir. *Firmicutes* oranı vericilerde %70 iken alıcılarda nakil öncesi %63 ve nakil sonrası %54 olarak bulunmuştur.

Bağırsak mikrobiyotasının GVHD'yi etkilediğine dair ilk ipucu 1970'lerin başlarına dayanmaktadır (Jones ve ark., 1971; van Bekkum ve ark., 1974). Allojenik HKHN'yi takiben mikrobiyotanın rolüne ilişkin ilk araştırmalar, nakil sonrası enfeksiyon gelişmeyen farelerde rde ve akut GVHD'de önemli bir düşüş olduğunu göstermiştir (Jones ve ark., 1971; van Bekkum ve ark., 1974). Pek çok çalışmada, bağırsak mikrobiyomunun aGVHD'nin gelişiminde önemli bir rol oynadığını ve mikrobiyota çeşitlilik kaybının aGVHD ile ilişkili olduğu saptanmıştır (Whangbo ve ark., 2017; Jenq ve ark., 2018; Taur ve ark., 2014). GVHD geliştiren hastalarda mikrobiyota çeşitliliğinin daha az olmasından dolayı hastalık semptomları daha belirgin hale gelmiştir ve mikrobiyota profilinin allo-HKHN'den sonra artan mortalite için risk faktörü olabileceği düşünülmüştür (Jenq ve ark., 2012; Holler ve ark., 2014; Taur ve ark., 2014). Bu çalışmaya dahil olan hasların nakil öncesi ve nakil sonrası alınan örneklerin mikrobiyota analizinde önemli ölçüde çeşitlilik kaybı olduğu saptanmıştır. Nakil öncesi ve nakil sonrası okuma değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş izlenmiştir. GI yoldaki sistemik enflamasyon; GVHD'nin başlaması ve şiddetlenmesinde önemli bir rol oynar bu sebeple özellikle GI tutulumlu GVHD, GVHD'nin diğer organ tutulumlu türlerine göre daha tehlikeli ilerlemektedir (Ferrara ve ark., 2009). Bizim çalışmamızda hastalarda allo-HKHN sonrası 2 cilt GVHD, 1 cilt+karaciğer GVHD ve 1 GIS GVHD gelişimi gözlemlenmiştir. GIS GVHD gelişen hastada exitus bildirilmiştir. Bu hastada *Enterococcus* ve *Clostridium* cinslerinde artış

tespit edilmiştir fakat istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Ayrıca, mikrobiyotadaki kalitatif değişiklikler, özellikle kısa zincirli yağ asidi üreten anaerobların tükenmesiyle karakterize edilen mikrobiyota çeşitliliğinin kaybı allo-HKHN'nin bir sonucu olarak bilinmektedir (Andermann ve ark., 2018; Mathewson et al., 2016). Bu nedenle, mikrobiyotanın farklı koruyucu ve patojenik bileşenleri GVHD'yi ve HKHN'ni takiben hayatta kalmayı etkiler. Yapılan çalışmalarda, hastaneden taburcu olana kadar, birçok HKHN olmuş hastanın mikrobiyota çeşitliliğini yitirdiğini ve bu meydana gelen değişikliklerin hem tedavilerden hem de GVHD'nin gelişmesinden etkilendiğini göstermişlerdir (Jenq ve ark., 2012; Holler ve ark., 2014 ; Ubeda ve ark., 2010). Ek olarak, HKHN hastalarında anaerobik bakterileri hedef alan geniş bir prospektif çalışma, GVHD hasarında gerileme göstererek mikrobiyotadaki bazı spesifik türlerin yararlı etkileri olabileceğini göstermiştir (Beelen ve ark., 1999). Bu veriler göz önünde bulundurulduğunda mikrobiyota ve kök hücre nakli/GVHD gelişimi ilişkisinin takibi için riskli grupların belirlenmesi gerekmekte, yeni takip ve tedavi algoritmalarının geliştirilmesi graft sağkalımı yönünden önem arz etmektedir. Tam HLA doku uyumlu allo-HKHN olan hastaların bile yaklaşık %50'sinde akut ve/veya kronik GVHD ortaya çıkar. GVHD düşük şiddette (grade I-II) gelişir ise, hastalığın tekrarlama ihtimali daha az olur ve bu da yaşam süresini uzatır (Akpek, 2006). Bizim çalışmamızda aGVHD görülme sıklığı %16 (Dört vaka) olarak bulunmuştur. Bu vakalardan üç tanesi grade I iken bir tanesi grade IV olarak saptanmıştır.

HKHN olmuş hastalarda görülen bağırsak çeşitliliğinin kaybı, genellikle besinlerden alınan liflerden yararlanarak KZYA ürettiği bilinen *Clostridia* türlerinin kaybı ile ilişkilidir (Ganapathy ve ark., 2013). En iyi bilinen KZYA'lardan olan bütirat, bağırsak epitel hücrelerinin enerji kaynağı olarak bilinir. Fare modelinde yapılan deneysel bir çalışmada, HKHN'den önce farelerin florasında bolca bulunan *Lactobacillus* türleri nakil sonrası azalmış ve bu durum GVHD ile ilişkilendirilmiştir. *Lactobacillus* türlerinin aracılık ettiği GVHD hasarına karşı koruma ile mikrobiyotanın bağırsak iltihabının şiddetini kontrol edebileceği düşünülmüştür (Jenq ve ark., 2012). Yakın tarihli bir makale, farelerde allo-HKHN'den sonra bağırsak epitel hücrelerinde azalmış miktarlarda bütirat bulunduğunu ve bu durumun GVHD gelişimine bağlı olarak bağırsak hasarını arttırabileceğini öne sürmektedir (Mathewson ark., 2016). Bu tez çalışmasında allo-HKHN sonrası *Lactobacillus* türlerinde azalma tespit edilmiştir.

GVHD ile ilişkili spesifik disbiyoz, mikrobiyotadaki genel çeşitliliğin kaybıyla karakterizedir (Eriguchi ve ark., 2012). Fare modellerinde, hem yetişkinlerde hem de çocuklarda yapılan çalışma sonuçlarına göre, özellikle GVHD başlangıcı bildirilen farelerde bu durum, *Clostridiales* takımından sağlığı geliştirici *Faecalibacterium* bolluğundaki bir düşüş ve yüksek oranda *Enterokok* ile ilişkilendirilmiştir (Biagi ve ark., 2014). Bizim çalışmamızda da hastaların nakil öncesi ve nakil sonrası alınan dışkı örneklerinde nakil sonrası *Clostridia* türlerinde azalma görülmüştür fakat istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Çalışmamıza dahil olan hastalar arasında nakil sonrası GVHD geliştiren hastalarda artmış *Enterococcus* varlığı tespit edilmiştir fakat istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Mikrobiyotadaki baskın *Enterococcus* popülasyonun, ciddi aGVHD ile önemli ölçüde ilişkili olduğu çalışmamızda gösterilmiştir. Bu da GVHD patogeneğinde *Enterococcus* adına nedensel bir role işaret etmektedir (Stein-Thoeringer ve ark., 2018). Daha büyük bir yetişkin kohortu üzerinde yapılan bir çalışmada, *Lachnospiraceae* cinsinin nispi bolluğu ve *Blautia* cinsindeki azalış, GVHD'den ölüm oranlarının azalmasıyla ilişkilendirilmiştir (Jenq ve ark., 2015). Bizim çalışmamızda alıcıların nakil sonrası örneklerinde *Lachnospiraceae* ve *Blautia* cinsinlerinde azalış saptanmıştır fakat GVHD ve mortalite ile ilişkisi saptanmamıştır.

Taur ve arkadaşları (Taur ve ark., 2014), düşük bağırsak mikrobiyota çeşitliliğinin aGVHD ve daha kötü mortalite ile pozitif korelasyon gösterdiğini bildirmiştir. Nakil sonrası vakaların tamamına yakın kısmında düşük bağırsak çeşitliliği görülmüştür. aGVHD geliştiren ve mortalite ile pozitif korelasyonu olan alıcılarda da düşük bağırsak çeşitliliği saptanmıştır. Golob ve arkadaşları (Golob ve ark., 2017), *Actinobacteria* ve *Firmicutes*'in aGVHD ile pozitif korelasyon gösterdiğini, *Lachnospiraceae*'nin ise engrafman ile negatif korelasyon gösterdiğini bildirmiştir. Bu tez çalışmasında *Actinobacteria* ve *Firmicutes*, aGVHD ile pozitif korelasyon göstermiş fakat istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. aGVHD ile *Lachnospiraceae* cinsi arasında korelasyon gösterilememiş istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. GVHD'li hastaların disbiyoz semptomları, benzer inflamatuvar bağırsak hastalıkları bulunan hastaların semptomlarıyla benzerdir. Azalmış mikrobiyal zenginlik ve Gram pozitif bakterilerinin nispi bolluğu (özellikle *Clostridium* kümeleri) her iki durumda da bağırsak iltihabının yoğunluğu ile ilişkilidir (Kolho ve ark., 2015). Bağırdak mikrobiyotası ve HKHN dinamiklerini karakterize eden çalışmaların bazıları, belirli bir bağırsak mikrobiyal popülasyonunun (*Clostridiaceae*, *Lachnospiraceae* familyalarının

üyeleri, *Ruminococcaceae* ve *Eubacteriaceae*), aGVHD başlangıcı ve ilerlemesi üzerinde bir etki mekanizmasına sahip olduğunu düşündürmektedir (Simms-Waldrup ve ark., 2013). Bunun yanı sıra hem *Citrobacter* hem de *Enterobacteriaceae* ailesinin üyeleri, insanda yaygın olarak bulunan bir mikrobiyota bileşeni olarak bilinmemektedir (Naum ve ark., 2008).

Hastane patojenleri olarak bilinen *Citrobacter murlinae*, *Klebsiella pneumoniae* ve *Enterobacter cloacae* hematopoetik kök hücre nakillerinde enfeksiyon riski için oldukça önemlidir. *Enterococcus*, *Citrobacter* ve *Enterobacteriaceae*'nin diğer üyeleri örneğin *Enterobacter* ve *Klebsiella*), insan bağırsak mikrobiyotasının en fırsatçı üyeleridir. Nozokomiyal enfeksiyonlarında, *Citrobacter*, *Enterococcus*, *Klebsiella* ve *Enterobacter* iyi bilinen olası kaynaklardır ve morbidite ile mortalite nedeni olarak bildirilmiştir (Evans, 2010). Bu çalışmada vakalarda nozokomiyal enfeksiyonu görülmemiştir.

HKHN gerçekleşmeden önce ortamda bulunan mikrobiyota topluluğunun çeşitliliği, *Blautia* gibi sakkarolitik kommensallerin veya *Fusobacterium nucleatum*'un nispi artışı lokalize mukozal hasar için risk faktörlerini içerir. Bu tür mikroorganizmaların HKHN öncesi hastaneye yatış ve HKHN prosedürü sırasında, hastalarda immünolojik iyileşmeyi destekleyemeyen bir "patobiyom", yani 'sağlıklı hale adapte olmuş patojenik topluluk' haline gelme şansı daha fazla olabilir (Alverdy ve Krezalek, 2017).

Akut GVHD gelişimi, HLA uyumlu kardeş vericilere kıyasla HLA özdeş olmayan veya akraba olmayan vericilerden yapılan HKHN'lerinde daha sık görülür ve daha şiddetlidir (Przepiorka ve ark., 1995). Bizim çalışmamızda allo-HKHN'nin, tedavilerin ve GVHD gelişiminin mikrobiyotaya doğrudan etkisini göstermek için GVHD gelişmesinde önemli bir faktör olan uyumsuz 'HLA' nakil faktörü ortadan kaldırılmıştır. Tüm vericiler ile alıcılar arasında HLA uyumu, tam uyumlu olarak seçilmiştir. MHC'lerde heterozigot avantajı, MHC heterozigotlarının MHC homozigotlarından daha etkili bir bağışıklık tepkisine sahip olduğu ve sonuç olarak enfeksiyona karşı direncin arttığı argümanına dayanan patojen merkezli bir MHC evrim modelidir (Rodriguez-Concepcion ve Boronat, 2002). MHC polimorfizmini incelemek için 16S rRNA gen dizilimi kullanan bir çalışma, MHC alelleri ile bağırsaktaki mikrobiyal kompozisyon arasındaki ilişkileri göstermiştir (Bolnick ve ark., 2014). HLA moleküllerinin mikrobiyomun bileşimini bağışıklık aracılı eliminasyonla mı, yoksa

bakteriyel kolonizasyonu doğrudan etkileyerek mi kontrol ettiği henüz bilinmemektedir. Pek çok durumda, HLA alelleri, genom ilişkili çalışmalarda belirlenen diğer genetik faktörlerden daha fazla hastalık riski (Çölyak, Behçet, Üveit gibi) taşır (Gough ve Simmonds, 2007). Ayrıca, hayvan modellerinde yapılan önceki deneysel çalışmalar, MHC polimorfizmi ve mikrobiyota bileşimi arasında bir ilişki olduğunu göstermiştir. İlk çalışmalarda, kısa zincirli yağ asidi profillerini karşılaştırmak için sıvı gaz kromatografi kullanılmıştır (KZYA'lar yalnızca bağırsaktaki bakteriyel simbiyotlar tarafından üretilir) ve MHC konjenik fare suşları arasında bakteri florasının bileşimindeki farklılıklar gösterilmiştir (Toivanen ve ark., 2001). Bazı çalışmalardan elde edilen veriler, klasik olmayan MHC Sınıf Ib (MHCIb) moleküllerinin, T hücrelerine antijenleri sundukları için konak-mikrobiyota arasındaki etkileşimde doğrudan etkileri olduklarına dair kanıt sağlar (Linehan ve ark. 2017). Biriken kanıtlar konak-mikrobiyota etkileşimlerinde, klasik ve klasik olmayan MHC genlerinin, mikrobiyotanın bağışıklık sistemi ile moleküler çapraz etkileşimini kolaylaştıran yeni mekanizmaları temsil ettiğini göstermektedir. Araştırmalardan elde edilen sonuçlar, MHC heterozigotluğunun mikrobiyom işlevselliğini olumlu yönde etkilediği için tercih edildiği hipotezini desteklemektedir (Wadud ve ark., 2019). Çalışmamızda yer alan gruplarda, HLA alelleri arasında homozigotluk olan kişilerde mikrobiyota çeşitliliği heterozigot olanlara göre daha az bulunmuştur. Çalışmamıza dahil olan alıcı ve vericiler de en fazla frekansa sahip HLA aleli HLA-DQB1*03:01 olmuştur. Allo-HKHN sonrası toplamda 5 relaps geliştirmiş hastanın 4'ünde, 5 GVHD geliştiren hastanın 1'inde ve 7 exitus olan hastanın 3'ünde HLA-DQB1*03:01 aleli taşıdığı saptanmıştır fakat istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Bunun yanı sıra ex olan 1 hastanın ve GVHD geliştiren 1 hastanın DQB1 lokusunda 03:01 homozigotluğu taşıdığı saptanmıştır. Bunların yanı sıra HLA-DQB1*03:01 bulunan bireylerde *Ruminococcaceae* ailesi üyelerinin daha fazla olduğu görülmüştür fakat istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Profilaktik antibiyotiklerin eşzamanlı kullanımı ve ateşli nötropeninin (FN) antibiyotik tedavisi, mikrobiyal çeşitliliği etkiler ve bu da enfeksiyonlara duyarlılığı artırır (Qin ve ark., 2010; Human Microbiome Project Consortium, 2012). Hastaların HKHN'ye hazırlanırken aldıkları hazırlık kemoterapisi, uzamış nötropeni ve mukozal yüzeylerde hasarla sonuçlanarak, mikroorganizmaların bu bariyerlerden geçişini kolaylaştırmaktadır ve kan dolaşımı enfeksiyonuna (BSI) yatkınlık yaratmaktadır.

HKHN alıcılarında en sık görülen BSI nedenleri enterokoklar ve viridans grubu streptokoklardır (Castagnola ve ark., 2008; Almyroudis ve ark., 2005). Yapılan bir çalışmadan bildirilen sonuca göre, Türkiye'deki sekiz hastanenin yoğun bakım ünitelerinden alınan hasta örneklerinde, *Klebsiella* türleriyle beraber GSBL genlerinin pozitif korelasyon gösterdiği bulunmuştur (David ve Robert, 2005). Çalışma grubumuzda yapılan direnç geni bulguları sonucu pozitif olan hastalarda *Klebsiella* türlerinin sayıca fazla olduğu tespit edilmiştir. Septisemiden ölen bir hastada *Enterokok* ve *Klebsiella* türlerinde artış olduğu görülmüştür fakat istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Gelecekte, komensal florayı genişletmeye veya GI metabolomu kontrol etmeye yarayan hassas probiyotikler geliştirilebilir. Böylece bakteriyemi şüpheli hastalarda bu hassas probiyotikler biyolojik bir kapama anahtarı olarak kullanılabilir. Patojenik olmayan mikroorganizmalarla düzenlenen mikrobiyota, HKHN uygulanan ve bağışıklığı baskılanmış hastalarda bile kullanılabilir. Allo-HKHN sonrası disbiyoz, bakteriyemi ve sepsisin önlenmesi için gerekli olan organizmaların zenginleştirilmesi ile tedavi edilebilir. Ek olarak, insan ekosisteminin daha iyi anlaşılması, hastaların mikrobiyota kompozisyonunun bir hastalık biyobelirteci olarak kullanılmasına izin verebilir. Örneğin, bir hastanın mikrobiyal imzası, ikincil tedavilere daha erken başlamasına izin vererek, steroide dirençli GVHD için bir risk tahmincisi olarak hizmet edebilir. Genel olarak, mikrobiyota bazlı terapötikler, HKHN hastalarında GVHD'nin ve enfeksiyonların önlenmesi ve tedavisi için büyük umut vaat etmektedir. HKHN hastalarına uygulanabilir hedefli ve bireyselleştirilmiş disbiyoz önleme ve tedavi rejimlerinin geliştirilmesine yönelik daha fazla araştırmanın yapılması önem taşımaktadır.

Çalışmamız temelde, allo-HKHN olan kan hastalığına sahip hastalarda nakil, tedavi ve GVHD gelişimine bağlı olarak bağırsak mikrobiyotası değişimini ortaya koymayı hedeflemiştir. Değişen bakteri florasına karşılık hastanın kliniği takip edilmiştir. Hastanın vericisi ile benzer mikrobiyota profillerinin olup olmadığı incelenmiştir. Engrafman ve değişen mikrobiyota arasında bağlantı kurulmuştur. Hastalara ve vericilere doku uyumu tespiti için HLA doku tiplleme testi yapılmıştır. Tüm bunlara ek olarak hastaların nakil sonrası dışkı örneklerinde antibiyotik direnç geni pozitifliği değerlendirilmiştir.

Araştırmaya dahil edilen kişi sayısı arttırılarak her bir kişi için izolasyon sonrası YND ile mikrobiyota analizinin yapılması literatüre katkı sağlayacaktır. Türkiye için elde ettiğimiz çalışma sonuçları benzer çalışmaları yapan Avrupa ülkeleri ve Amerika çalışmalarının sonuçları ile koreledir. Hastalığın tedavisi ve prognozu için fekal nakil, pre-probiyotik desteği ve gut mikrobiyotanın regülasyonu ile terapötik tedavilere umut doğmuştur. Tüm bu çalışma, lösemi ve lenfoma hasta grubunda, nakil öncesi ile nakil sonrası takipli ve karşılaştırmalı olacak şekilde ilk defa yapılmıştır. İntestinal flora izlemi GVHD koruma ve/veya tedavisinde yönlendirici veri sağlayabilir. Bu tez çalışmasında allo-HKHN olgularında mikrobiyota değişimini olduğu görülmüştür.

HLA polimorfizmi ile mikrobiyota arasında ilişki olabileceğini düşündürmektedir.

KAYNAKLAR

- Almyroudis N, Fuller A, Jakubowski A, et al. Pre_and post_engraftment bloodstream infection rates and associated mortality in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. *Transpl Infect Dis.* 2005; **7**:11–17.
- Alverdy JC, Krezalek MA. *Collapse of the microbiome, emergence of the pathobiome, and the immunopathology of sepsis.* *Crit Care Med.* 2017; **45**:337–47.
- 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.* *Applied and Environmental Microbiology.* 1990; **56**(6): 1919–25.
- Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH. *Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation.* *Microbiological Reviews.* 1995; **59**(1):143-169.
- An, D. Sungwhan FO, Olszak T, Neves JF, Avci FY, Hasdemir DE ve ark. *Sphingolipids from a symbiotic microbe regulate homeostasis of host intestinal natural killer T cells.* *Cell.* 2014; **156**:123–133.
- Apperley, J., Carreras, E., Gluckman, E., & Masszi, T. (2012). *The EBMT handbook. hematopoietic stem cell transplantation*, 2012.
- Arai S, Margolis J, Zahurak M, Anders V, Vogelsang GB. “*Poor outcome in steroid-refractory graft-versus host disease with antithymocyte globulin treatment,*” *Biology of Blood and Marrow Transplantation.* 2002; **8**:155-160.
- Arumugam M, Raes J, Pelletier E, Le Paslier D, Yamada T, Mende DR ve ark. *Enterotypes of the human gut microbiome.* *Nature.* 2011; **473**:174–80
- Atuma C, Strugala V, Allen A, Holm L. *The adherent gastrointestinal mucus gel layer: thickness and physical state in vivo.* *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2001; **280**:922–929.
- Bäckhed F, Fraser CM, Ringel Y, Sanders ME, Sartor RB, Sherman PM ve ark. *Defining a healthy human gut microbiome: current concepts, future directions, and clinical applications.* *Cell Host Microbe* 2012; **12**:611-622.

- Backhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, Peterson DA, Gordon JI. *Hostbacterial mutualism in the human intestine. Science*. 2005; **307**:1915–20.
- Baehr PH, Levine DS, Bouvier ME, Hockenbery DM, Gooley TA, Stern JG ve ark. *Oral beclomethasone dipropionate for treatment of human intestinal graft-versus-host disease. Transplantation*. 1995; **60**:1231–1238.
- Balmer ML, Schurch CM, Saito Y, Geuking MB, Li H, Cuenca M ve ark. *Microbiota-derived compounds drive steady-state granulopoiesis via MyD88/TICAM signaling. J Immunol*. 2014; **193**:5273–83.
- Belkaid Y, Harrison OJ. *Homeostatic immunity and the microbiota, Immunity*. 2017; **46**(4): 562–576.
- Bolnick DI, Snowberg LK, Gregory Caporaso J, Lauber C, Knight R, Stutz WE. *Major Histocompatibility Complex class II polymorphism influences gut microbiota composition and diversity. Molecular ecology*. 2014; **23**(19):4831-45.
- Bryder D, Rossi DJ, Weissman IL. *Hematopoietic stem cells: The paradigmatic tissue-specific stem cell. Am J Pathol*. 2006;**169**: 338-346.
- Buermans HPJ, den Dunnen JT. *Next generation sequencing technology: Advances and applications. Biochimica et Biophysica Acta*. 2014; **1842**(10):1932-41.
- Cahn JY, Klein JP, Lee SJ, Milpied N, Blaise B, Antin JH ve ark. *Prospective evaluation of 2 acute graft-versus-host (GVHD) grading systems: a joint Société Française de Greffe de Moëlle et Thérapie Cellulaire (SFGM-TC), Dana Farber Cancer Institute (DFCI), and International Bone Marrow Transplant Registry (IBMTR) prospective study. Blood*. 2005; **106**:1495.
- Castagnola E, Bagnasco F, Faraci M, et al. *Incidence of bacteremias and invasive mycoses in children undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a single-center experience. Bone Marrow Transplant*. 2008; **41**:339–347
- Chakravorty S, Helb D, Burday M, Connell N, Alland D. *A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. J Microbiol Methods*. 2007; **69**(2):330-9.
- Chiusolo P, Metafuni E, Paroni Sterbini F, Giammarco S, Masucci L, Leone G ve ark. *Gut microbiome changes after stem cell transplantation. Blood*. 2015; **126**:1953.
- Chow J, Lee SM, Shen Y, Khosravi A, Mazmanian SK. *Host-bacterial symbiosis in health and disease. Adv. Immunol*. 2010; **107**:243–274.

- Conlon AM, Anthony BR. *The impact of diet and lifestyle on gut microbiota and human health. Nutrients.* 2014; **7**(1):17–44.
- Cox LM, Blaser MJ. *Antibiotics in early life and obesity. Nat Rev Endocrinol.* 2015; **11**:182–90.
- D’Souze, A., & Fretham, C. (2017). Current uses and outcomes of hematopoietic cell transplantation (HCT): CIBMTR summary slides.
- Darzi J, Gary S, Robertsen DM. *SCFA have a role in appetite regulation? Article in Proceedings of The Nutrition Society.* 2011; **70**(1):119-28
- Dasgupta S, Hasdemir ED, Ochoa-Reparaz J, Reinecker HC, Kasper D.L. *Plasmacytoid dendritic cells mediate anti- inflammatory responses to a gut commensal molecule via both innate and adaptive mechanisms. Cell Host Microbe.* 2014; **15**:413–423.
- David L.P and Robert A.B. *Extended-Spectrum β -Lactamases: a Clinical Update. Clin Microbiol Rev.* 2005; **18**(4): 657–686.
- David LA, Maurice CF, Carmody RN, Gootenberg DB, Button JE, Wolfe BE ve ark. *Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. Nature.* 2014; **505**:559-563.
- Der-Boghossian AH, Saad SR, Perreault C, Provost C, Jacques D, Kadi LN ve ark. *Role of insulin on jejunal PepT1 expression and function regulation in diabetic male and female rats. Can J Physiol Pharmacol.* 2010; **88**:753–9.
- Dirican E, Akkiprik M. *Moleküler Tanıda Yüksek Çözünürlüklü Erime Yöntemi ve Klinik Önemi, Clin Exp Health Sci.* 2017; **7**(1): 20-6
- Duerkop BA, Hooper LV. *Resident viruses and their interactions with the immune system. Nat Immunol.* 2013; **14**:654–9.
- Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M ve ark. *Diversity of the human intestinal microbial flora. Science.* 2005; **308**:1635–8.
- Eric M, Rishi A, Taneja V. *Immunogenetic control of the intestinal microbiota. Immunology.* 2015; **145**(3):313-322.
- Eisheid AC. *SYTO dyes and EvaGreen outperform SYBR Green in real-time PCR. BMC Res Notes.* 2011; **28**(4):263.

- Eriguchi Y, Nakamura K, Hashimoto D, Shimoda S, Shiono N, Akashi K ve ark. *Graft-versus-host disease disrupts intestinal microbial ecology by inhibiting Paneth cell production of α -defensins*. *Blood*. 2012; **120**(1):223–231.
- Eriguchi Y, Takashima S, Oka H, Shimoji S, Nakamura K, Uryu H ve ark. *Decreased secretion of Paneth cell α -defensins in graft-versus-host disease*. *Transpl Infect Dis*. 2015; **17**(5):702–706.
- Evans ES. *Coping with Candida infection*. *Proc Am Thorac Soc*. 2010; **7**(3):197-203.
- Faith JJ, Guruge JL, Charbonneau M, Subramanian S, Seedorf H, Goodman AL ve ark. *The long-term stability of the human gut microbiota*. *Science*. 2013; **341**(6141):1237439.
- FDA-GRAS notice. Accessed January 30, 2020. Available from: <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/fdcc/?set=GRASNotices>.
- Fine RL, Vieira MS, Gilmore MS, Kriegel MA. *Mechanisms and consequences of gut commensal translocation in chronic diseases*. *Gut Microbes*. 2020; **11**:217–230.
- Fleck AK, Schuppan D, Wiendl H, Klotz L. *Gut-CNS-axis as possibility to modulate inflammatory disease activity- implications for multiple sclerosis*. *Int J Mol Sci*. 2017; **14**:18(7):1526.
- Flint HJ, Scott KP, Louis P, Duncan SH. *The role of the gut microbiota in nutrition and health*. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2012; **9**:577–89.
- Flowers ME, Inamoto Y, Carpenter PA, Lee SJ, Kiem HP, Petersdorf EW ve ark. *Comparative analysis of risk factors for acute graft-versus-host disease and for chronic graft-versus-host disease according to National Institutes of Health consensus criteria*. *Blood*. 2011; **117**:3214-3219.
- Fraher MH, O'Toole PW, Quigley EM. *Techniques used to characterize the gut microbiota: a guide for the clinician*. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2012; **9**: 312–22.
- Fukuda K, Ogawa M, Taniguchi H, Saito M. *Molecular Approaches to Studying Microbial Communities: Targeting the 16S Ribosomal RNA Gene*. *J UOEH*. 2016; **38**(3):223-32.
- Furness JB, Callaghan BP, Rivera LR, Cho HJ. *The enteric nervous system and gastrointestinal innervation: integrated local and central control*. *Adv. Exp. Med. Biol*. 2014; **817**, 39–71.
- Furusawa Y, Obata Y, Fukuda S, Endo TA, Nakato G, Takahashi D ve ark. *Commensal*

microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. Nature. 2013; **504**:446–450.

Garrett-Bakelman FE, Darshi M, Green S J, Gur RC, Lin L, Macias BR ve ark. *The NASA Twins Study: a multidimensional analysis of a year-long human spaceflight. Science.* 2019; **364**(6436):eaau8650.

Garrido-Cardenas JA, Garcia-Maroto F, Alvarez-Bermejo JA, Manzano-Agugliaro F. *DNA Sequencing Sensors: An Overview, Sensors (Basel).* 2017; **17**(3):588.

Genome Reference Consortium Human Build 38 patch release 2(GRCh38.p2). https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF_000001405.28/

Gilbride KA, Lee DY, Beaudette LA. *Molecular techniques in wastewater: Understanding microbial communities, detecting pathogens, and real-time process control. J Microbiol Meth.* 2006; **66**:1–20.

Giovannoni SJ, DeLong EF, Olsen GJ, Pace NR. *Phylogenetic group-specific oligodeoxynucleotide probes for identification of single microbial cells. Journal of Bacteriology.* 1988; **170**(2):720-726.

Giroux M, Delisle JS, Gauthier SD, Heinonen KM, Hinsinger J, Houde B ve ark. *SMAD3 prevents graft-versus-host disease by restraining Th1 differentiation and granulocyte-mediated tissue damage. Blood.* 2011; **117**:1734–44.

Glucksberg H, Storb R, Fefer A, Buckner CD, Neiman PE, Clift RA ve ark. *Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HL-A-matched sibling donors. Transplantation.* 1974; **18**(4):295–304.

Golob JL, Pergam SA, Srinivasan S, Fiedler TL, Liu C, Garciaet K ve ark. *Stool microbiota at neutrophil recovery is predictive for severe acute graft vs host disease after hematopoietic cell transplantation. Clin Infect Dis.* 2017; **65**:1984–1991.

Gough SC, Simmonds. *The HLA Region and Autoimmune Disease: Associations and Mechanisms of Action. Curr Genomics.* 2007; **8**:453–465.

Gratwohl A, Pasquini MC, Aljurf MD, Confer DL, Baldomero H, Bouzas LF ve ark. *Global Hematopoietic Stem Cell Transplantation (HSCT) At One Million: An Achievement Of Pioneers and Foreseeable Challenges For The Next Decade. A Report From The Worldwide Network For Blood and Marrow Transplantation (WBMT) Blood.* 2013; **122**(21):2133.

- Han Y, Xiao H. Whole food-based approaches to modulating gut microbiota and associated diseases. *Annual Review of Food Science and Technology*. 2020; **11**(1):14.1–.25.
- Harmsen HJ, Wildeboer-Veloo AC, Raangs GC, Wagendorp AA, Klijn N, Bindels JG. Analysis of intestinal flora development in breast-fed and formula-fed infants by using molecular identification and detection methods. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2000; **30**:61–7.
- Harris NL, Jaffe ES, Stein H, Banks PM, Chan JKC, Cleary ML ve ark. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood*. 1994;**84**(5):1361- 1392.
- Hayase E, Hashimoto D, Nakamura K, Noizat C, Ogasawara R, Takahashi S ve ark. R-Spondin1 expands Paneth cells and prevents dysbiosis induced by graft-versus-host disease. *J Exp Med*. 2017; **214**(12):3507–3518.
- Hjelmsø MH, Hansen LH, Bælum J, Feld L, Holben WE, Jacobsen CS. High-resolution melt analysis for rapid comparison of bacterial community compositions. *Applied and environmental microbiology*. 2014; **80**(12):3568-3575.
- Hockenbery DM, Cruickshank S, Rodell TC, Gooley T, Schuening F, Rowley S ve ark. A randomized, placebo-controlled trial of oral beclomethasone dipropionate as a prednisone-sparing therapy for gastrointestinal graft-versus-host disease. *Blood*. 2007; **109**:4557–4563.
- Holler E, Butzhammer P, Schmid K, Hundsruker C, Koestler J, Peter K ve ark. Metagenomic analysis of the stool microbiome in patients receiving allogeneic stem cell transplantation: loss of diversity is associated with use of systemic antibiotics and more pronounced in gastrointestinal graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2014; **20**(5):640-645.
- Hooper LV, Littman DR, Macpherson AJ. Interactions between the microbiota and the immune system. *Science*. 2012; **336**:1268–73.
- Horowitz M, Schreiber H, Elder A, Heidenreich O, Vormoor J, Toffalori C ve ark. Epidemiology and biology of relapse after stem cell transplantation, Bone Marrow Transplant. 2018; **53**(11):1379-1389.
- Human Microbiome Project Consortium. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*. 2012; **486**(7402): 207-214.

- Iwamura C, Bouladoux N, Belkaid Y, Sher A, Jankovic D. *Sensing of the microbiota by NOD1 in mesenchymal stromal cells regulates murine hematopoiesis. Blood.* 2017; **129**:171–6.
- Jagasia M, Arora M, Flowers ME, Chao NJ, McCarthy PL, Cutler CS ve ark. *Risk factors for acute GVHD and survival after hematopoietic cell transplantation. Blood.* 2012; **119**(1):296-307.
- Josefsdottir KS, Baldridge MT, Kadmon CS, King KY. *Antibiotics impair murine hematopoiesis by depleting the intestinal microbiota. Blood.* 2017; **129**:729–39.
- Kho ZY, Laf SK. *The human gut microbiome a potential controller of wellness and disease. Front Microbiol.* 2018; **9**:1835.
- Khosravi A, Yanez A, Price JG, Chow A, Merad M, Goodridge HS ve ark. *Gut microbiota promote hematopoiesis to control bacterial infection. Cell Host Microbe.* 2014; **15**:374–81
- Kim J, Lim J, Lee C. *Quantitative real-time PCR approaches for microbial community studies in wastewater treatment systems: applications and considerations. Biotechnol. Adv.* 2013; **31**:1358–1373.
- Klämbt V, Wohlfeil SA, Schwab L, Hülsmöller J, Ayata K, Apostolova P ve ark. *A novel function for P2Y2 in myeloid recipient-derived cells during graft-versus-host disease. J Immunol.* 2015; **195**:5795–804.
- Klindworth A, Pruesse E, Schweer T, Peplles J, Quast C, Hornet M ve ark. *Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. Nucleic Acids Res.* 2013; **41**(1):e1.
- Koh A, De Vadder F, Kovatcheva-Datchary P, Bäckhed F. *From dietary fiber to host physiology: short-chain fatty acids as key bacterial metabolites. Cell.* 2016; **165**:1332-1345.
- Kolho KL, Korpela K, Jaakkola T, Pichai MVA, Zoetendal EG, Salonen A ve ark. *Fecal microbiota in pediatric inflammatory bowel disease and its relation to inflammation. Am J Gastroenterol.* 2015; **110**: 921–930.
- Koren O, Goodrich JK, Cullender TC, Spor A, Laitinen K, Bäckhed HK, ve ark. *Host remodeling of the gut microbiome and metabolic changes during pregnancy. Cell.* 2012; **150**:470–80.

- Koren O, Goodrich JK, Cullender TC, Spor A, Laitinen K, Bäckhed HK ve ark. *Host remodeling of the gut microbiome and metabolic changes during pregnancy. Cell.* 2012; **150**:470–80.
- Lagier JC, Hugon P, Khelaifia S, Fournies PE, La Scola B, Raoult D. *The rebirth of culture in microbiology through the example of culturomics to study human gut microbiota. Clin Microbiol Rev.* 2015; **28**:237–264
- Lane DJ, Pace B, Olsen GJ, Stahl DA, Sogin ML, Pace NR. *Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. Proc Natl Acad Sci U S.* 1985; **82**(20):6955-9.
- Leah TS, Reine EN, Jennifer GN, Karin BM. *Does Consumption of Fermented Foods Modify the Human Gut Microbiota? J Nutr.* 2020; **150**(7):1680-1692.
- Lederberg J, McCray AT. ‘Ome sweet ‘Omics – a genealogical treasury of words. *Scientist* 2001; **15**:8.
- Leisenring WM, Martin PJ, Petersdorf EW, Regan AE, Aboulhosn N, Stern JM ve ark. *An acute graft-versus-host disease activity index to predict survival after hematopoietic cell transplantation with myeloablative conditioning regimens. Blood.* 2006; **108**: 749–755.
- Ley RE, Lozupone CA, Hamady M, Knight R, Gordon JI. *Worlds within worlds: evolution of the vertebrate gut microbiota. Nat Rev Microbiol.* 2008; **6**:776–88.
- Linehan JL, Oliver JH, Seong-Ji H, Byrd AL, Vujkovic-Cvijin AVI, Villarino SK ve ark. *Non-classical immunity controls microbiota impact on skin immunity and tissue repair. Cell.* 2017; **172**(4):784-796.e18
- Lowe B, Marsh TL, Isaacs-Cosgrove N, Kirkwood RN, Kiupel M, Mulks MH. *Defining the “core microbiome” of the microbial communities in the tonsils of healthy pigs, BMC Microbiology.* 2012; **12**(1):20
- Marchesi JR, Adams DH, Fava F, Hermes GDA, Hirschfield GM, Hold G ve ark. *The gut microbiota and host health: a new clinical frontier. Gut.* 2016; **65**:330–339.
- Mardis ER. *A decade’s perspective on DNA sequencing technology. Nature.* 2011; **470**:198–203.
- Mardis ER. *Next-generation DNA sequencing methods. Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2008; **9**:387–402.
- Martin PJ, Rizzo JD, Wingard JR, Ballen K, Curtin PT, Cutler C ve ark. *First- and second-line systemic treatment of acute graft-versushost disease: recommendations*

- of the american society of blood and marrow transplantation. Biol blood marrow transplant.* 2012; **18**:1150–63.
- Martin PJ, Schoch G, Fisher L, Byers V, Anasetti C, Appelbaum FR ve ark. *A retrospective analysis of therapy for acute graft-versus-host disease: initial treatment. Blood.* (1990) **76**(8):1464–72.
- Mazmanian, SK, Round JL, Kasper DL. *A microbial symbiosis factor prevents intestinal inflammatory disease. Nature.* 2008; **453**:620–625.
- McDermott AJ, Huffnagle GB. *The microbiome and regulation of mucosal immunity. Immunology.* 2014; **142**:24–31.
- McIntosh, BE, Hogenesch, JB, Bradfield CA. *Mammalian Per-Arnt-Sim proteins in environmental adaptation. Annu. Rev. Physiol.* 2010; **72**:625–645.
- Metzker ML. *Sequencing technologies. The next generation. Nat Rev Genet.* 2010; **11**:31–46.
- Monis PT, Giglio S, Saint CP. *Comparison of SYTO9 and SYBR Green I for real-time polymerase chain reaction and investigation of the effect of dye concentration on amplification and DNA melting curve analysis. Anal Biochem.* 2005; **340**:24–34.
- Nagashima H, Morio Y, Meshitsuka S, Yamane K, Nanjo Y, Teshima R ve ark. *Alloreactivity: an old puzzle revisited. Scand J Immunol.* 2012; **75**:463–70
- Nagy ZA. *Alloreactivity: an old puzzle revisited. Scand J Immunol.* 2012; **75**:463–70.
- National Research Council. (2007). *The new science of metagenomics: revealing the secrets of our microbial planet.* National Academies Press.
- Naum M, Brown EW, Mason-Gamer RJ. *Is 16S rDNA a reliable phylogenetic marker to characterize relationships below the family level in the enterobacteriaceae? J Mol Evol.* 2008; **66**:630–42.
- Nguyen TL, Vieira-Silva S, Liston A, Raes J. *How informative is the mouse for human gut microbiota research? Dis. Model. Mech.* 2015; **8**:1–16.
- NIH HMPAT. *A review of 10 years of human microbiome research activities at the US National Institutes of Health, Fiscal Years 2007–2016. Microbiome.* 2019; **7**(1):31.
- Obregon-Tito AJ, Tito RY, Metcalf J, Sankaranarayanan K, Clemente JC, Ursell LK ve ark. *Subsistence strategies in traditional societies distinguish gut microbiomes. Nat Commun.* 2015; **6**:6505.

- Ott SJ, Kühbacher T, Musfeldt M, Rosenstiel P, Hellmig S, Rehmanet A ve ark. *Fungi and inflammatory bowel diseases: alterations of composition and diversity. Scand J Gastroenterol.* 2008; **43**(7):831-841.
- Paliy O, Agans R. *Application of phylogenetic microarrays to interrogation of human microbiota. FEMS Microbiol Ecol.* 2012; **79**(1): 2–11
- Penack O, Holler E, van den Brink MR. *Graft-versus-host disease: regulation by microbe-associated molecules and innate immune receptors. Blood.* 2010; **115**(10):1865–72.
- Postler TS, Ghosh S. *Understanding the holobiont: how microbial metabolites affect human health and shape the immune system. Cell Metab.* 2017; **26**:110–30.
- Przepiorka D, Weisdorf D, Martin P, Klingemann HG, Beatty P, Hows J. Thomas E.D. *Consensus Conference on Acute GVHD Grading. Bone Marrow Transplant.* 1995; **15**:825-8.
- Qin J, Li R, Arumugam RJM, Burgdorf KS, Manichanh C ve ark. *A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. Nature.* 2010; **464**(7285):59-65.
- Qin J, Li R, Raes J et al. MetaHIT Consortium. *A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. Nature.* 2010; **464**(7285):59-65.
- Ramadan A, Paczesny S. *Various forms of tissue damage and danger signals following hematopoietic stem-cell transplantation. Front Immunol.* 2015; **6**:14.
- Rea K, Dinan TG, Cryan JF. *The microbiome: a key regulator of stress and neuroinflammation. Neurobiol Stress.* 2016; **4**:23-33.
- Reja V, Kwok A, Stone G, Yang L, Missel A, Menzel C ve ark. *"ScreenClust: Advanced statistical software for supervised and unsupervised high resolution melting (HRM) analysis." Methods.* 2010; **50**(4):10-4.
- Reyes A, Haynes M, Hanson N, Angly FE, Heath AC, Rohwer F ve ark. *Viruses in the faecal microbiota of monozygotic twins and their mothers. Nature.* 2010; **466**(7304):334-338
- Riccio P, Rossano R. *Nutrition facts in multiple sclerosis. ASN Neuro.* 2015; **18**; **7**(1):1759091414568185.
- Riccio P, Rossano R. *The role of nutrition in multiple sclerosis: a story yet to be written. Rev Esp Esclerosis Multiple.* 2013; **5**:24-37.

- Riccio P. *The molecular basis of nutritional intervention in multiple sclerosis: a narrative review. Complement TherMed.* 2011; **19**:228-237.
- Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT. *Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. Anal Biochem* 1997; **245**:154-60.
- Rodriguez-Concepcion M, Boronat A. *Elucidation of the methylerythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria and plastids. A metabolic milestone achieved through genomics. Plant Physiol.* 2002; **130**(3):1079–89.
- Ronaghi M, Uhlen M, Nyren PA. *A sequencing method based on real-time pyrophosphate. Science.* 1998; **281**:363–5.
- Ross WA, Couriel D. *Colonic graft-versus-host disease. Curr Opin Gastroenterol.* 2005; **21**:64-69.
- Rothberg JM, Hinz W, Rearick TM, Schultz J, Mileski W, Davey M et al. *An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. Nature.* 2011; **475**:348–52.
- Round JL, Mazmanian SK. *Inducible Foxp3⁺ regulatory T-cell development by a commensal bacterium of the intestinal microbiota. Proc Natl Acad Sci USA.* 2010; **107**(27):12204–12209.
- Rowlings PA, Przepiorka D, Klein JP, Gale RP, Passweg JR, Henslee-Downey PJ et al. *IBMTR Severity Index for grading acute graft-versus-host disease: retrospective comparison with Glucksberg grade. Br J Haematol.* 1997; **97**:855. 855-864.
- Rudolph MG, Stanfield RL, Wilson IA. *How TCRs bind MHCs, peptides and coreceptors. Annu Rev Immunol.* 2006; **24**:419-66.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci USA.* 1977; **74**:5463–7.
- Schwab L, Goroncy L, Palaniyandi S, Gautam S, Triantafyllopoulou A, Mocsai A et al. *Neutrophil granulocytes recruited upon translocation of intestinal bacteria enhance graft-versus-host disease via tissue damage. Nat med.* 2014; **20**:648–54.
- Schwartz JM, Wolford JL, Thornquist MD, Hockenberg DM, Murakami CS, Drennan F et al. *Severe gastrointestinal bleeding after hematopoietic cell transplantation, 1987-1997: incidence, causes, and outcome. Am J Gastroenterol.* 2001; **96**:385 –393.
- Seki E, Schnabl B. *Role of innate immunity and the microbiota in liver fibrosis: crosstalk between the liver and gut. J Physiol.* 2012; **590**:447-58.

- Sghir A, Gramet G, Suau A, Rochet V, Pochart P, Dore J. *Quantification of bacterial groups within human fecal flora by oligonucleotide probe hybridization*. *Appl Environ Microbiol*. 2000; **66**:2263–6.
- Shen Y, Torchia MLG, Lawson GW, Karp CL, Ashwell JD, Mazmanian SK. *Outer membrane vesicles of a human commensal mediate immune regulation and disease protection*. *Cell Host Microbe*. 2012; **12**:509–520.
- Shendure J, Porreca GJ, Reppas NB, Lin X, McCutcheon JP, Rosenbaum AM ve ark. *Accurate multiplex polony sequencing of an evolved bacterial genome*. *Science*. 2005; **309**:1728–32.
- Shiina T, Blancher A, Inoko H, Kulski JK. *Comparative genomics of the human, macaque and mouse major histocompatibility complex*. *Immunology*. 2017; **150**:127–138.
- Shono Y, Ueha S, Wang Y, Abe J, Kurachi M, Matsuno Y ve ark. *Bone marrow graft-versus-host disease: early destruction of hematopoietic niche after MHC-mismatched hematopoietic stem cell transplantation*. *Blood*. 2010; **15**:5401–5411.
- Shreiner AB, Kao JY, Young VB. *The gut microbiome in health and in disease*. *Curr Opin Gastroenterol*. 2015; **31**:69–75.
- Simms-Waldrup TR, Sunkersett G, Coughlin LA, Savani MR, Arana C, Kim J ve ark. *Antibiotic-induced depletion of anti-inflammatory clostridia is associated with the development of graft-versus-host disease in pediatric stem cell transplantation patients*. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2017; **23**:820–9. 9.
- Socié G, Mary JY, Lemann M, Daneshpouy M, Guardiola P, Meignin V ve ark. *Prognostic value of apoptotic cells and infiltrating neutrophils in graft-versus-host disease of the gastrointestinal tract in humans: TNF and fas expression*. *Blood*. 2004; **103**:50–7.
- Sorbara MT, Dubin K, Littmann ER, Moody TU, Fontana E, Seok R ve ark. *Inhibiting antibiotic-resistant Enterobacteriaceae by microbiota-mediated intracellular acidification*. *J Exp Med*. 2019; **216**(1):84–98.
- Stefan AB, Jansen R, Hays JP. *Understanding and overcoming the pitfalls and biases of next-generation sequencing (NGS) methods for use in the routine clinical microbiological diagnostic laboratory*. *Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 2019; **38**:1059–1070.

- Sullivan KM, Agura E, Anasetti C, Appelbaum F, Badger C, Bearman S ve ark. *Chronic graft-versus-host disease and other late complications of bone marrow transplantation. Semin Hematol.* 1991; **28**(3):250-259.
- Sullivan KM, Agura E, Anasetti C, Badger C, Bearman S, Erickson K ve ark. *Chronic graft-versus-host disease and other late complications of bone marrow transplantation. Semin Hematol.* 1991;**28**(3):250-259.
- Surana NK, Kasper DL. *Deciphering the tete- a-tete between the microbiota and the immune system. J. Clin. Invest.* 2014; **124**: 4197–4203.
- Taur Y, Jenq RR, Perales MA, Littmann ER, Morjaria S, Ling L ve ark.. *The effects of intestinal tract bacterial diversity on mortality following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Blood.* 2014; **124**:1174–1182.
- Taur Y, Jenq RR, Ubeda C, van den Brink M, Pamer EG. *Role of intestinal microbiota in transplantation outcomes. Best Pract. Res. Clin. Haematol.* 2015; **28**:155–161.
- Taur Y, Xavier JB, Lipuma L, Ubeda C, Goldberg J, Gobourne A ve ark. *Intestinal domination and the risk of bacteremia in patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Clin Infect Dis.* 2012; **55**(7): 905-914.
- Teshima T, Ordemann R, Reddy P, Gagin S, Liu C, Cooke KR ve ark. *Acute graft-versus-host disease does not require alloantigen expression on host epithelium. Nat Med.* 2002; **8**:575–581.
- Thompson JF, Milos PM. *The properties and applications of single-molecule DNA sequencing. Genome Biol.* 2011; **12**:217.
- Toivanen, J, Vaahtovuori EE. *Influence of major histocompatibility complex on bacterial composition of fecal flora, Infect. Immun.* 2001; **69**(4):2372-2377.
- Trowbridge JJ, Moon RT, Bhatia M. *Hematopoietic stem cell biology: too much of a Wnt thing. Nat Immunol.* 2006; **7**(10):1021-3.
- Trowsdale J. *The MHC, disease and selection. Immunol Lett.* 2011; **137**:1-8.
- Turnbaugh PJ, Ley RE, Hamady M, Fraser-Liggett CM, Knight R, Gordon JI. *The human microbiome project. Nature.* 2007; **449**(7164):804-810.
- Underhill DM, Iliev ID. *The mycobiota: interactions between commensal fungi and the host immune system. Nat Rev Immunol.* 2014; **14**:405–16.
- Van Rood JJ, van Leeuwen A. *Leukocyte grouping. A method and its application. J Clin Invest.* 1963; **42**:1382–1390.

- Vijay N, Morris ME. *Role of monocarboxylate transporters in drug delivery to the transporters in drug delivery to the brain. Curr Pharm Des.* 2014; **20**(10):1487-1498.
- Wadud KMA, Stephens WZ, Mohammed AD, Round JL, Kubinak JL. *Does MHC heterozygosity influence microbiota form and function? Plos One.* 2019; **4**(5): e0215946.
- Wang Y, Kasper LH. *The role of microbiome in central nervous system disorders. Brain Behav Immun.* 2014; **38**:1-12.
- Wasim A, Navneet G, Ramakant J. *Role of inulin as prebiotics on inflammatory bowel disease. Drug Discoveries & Therapeutics.* 2019; **13**(1):1-8.
- Westin JR, Saliba RM, De Lima M, Alousi A, Hosing C, Qazilbash MH ve ark. *Steroid-refractory acute GVHD: predictors and outcomes. Adv hematol.* 2011; **2011**:601953.
- William ER, Teri MG, Martin AK. *Host-microbiota interactions in immune-mediated diseases, Nature Reviews Microbiology.* 2020; **21**:538.
- Wittwer CT, Herrmann MG, Gundry CN, Elenitoba-Johnson KS. *Real-time multiplex PCR assays. Methods.* 2001; **25**: 430-42.
- Woese CR, Kandler O, Wheelis ML. *Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990; **87**(12):4576-9.
- Wolever TM, Josse RG, Leiter LA, Chiasson JL. *Time of day and glucose tolerance status affect serum short-chain fatty acid concentrations in humans. Metabolism.* 1997; **46**(7):805-811.
- Wu L, Thompson DK, Liu X, Fields MW, Bagwell CE, Tiedje JM, Zhou J. *Development and evaluation of microarray-based whole-genome hybridization for detection of microorganisms within the context of environmental applications. Environ Sci Technol.* 2004; **38**(24): 6775-82.
- Xu H, Liu M, Cao J, Li X, Fan D, Xia Y ve ark. *The Dynamic Interplay between the Gut Microbiota and Autoimmune Diseases. J Immunol Res.* 2019:7546047.
- Yang B, Wang Y, Qian PY. *Sensitivity and correlation of hypervariable regions in 16S rRNA genes in phylogenetic analysis. BMC Bioinformatics.* 2016; **17**:125
- Yatsunenko T, Rey FE, Manary MJ et al. *Human gut microbiome viewed across age and geography. Nature* 2012; **486**:222–7.

- Zama D, Biagi E, Masetti R, Gasperini P, Prete A, Candela M ve ark. *Gut microbiota and hematopoietic stem cell transplantation: where do we stand? Bone Marrow Transplant.* 2017; **52**:7–14.
- Zeiser R, Socie G, Blazar BR. *Pathogenesis of acute graft-versushost disease: from intestinal microbiota alterations to donor T cell activation. Br j haematol.* 2016; **175**:191–207.
- Zheng L, Kelly CJ, Colgan SP. Physiologic hypoxia and oxygen homeostasis in the healthy intestine. A Review in the Theme: Cellular Responses to Hypoxia. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2015; 309:350–360.



HAM VERİLER

Taxa	EG-1	EG-2	EG-3	EG-4	EG-5	EG-6	EG-7	EG-8
D_0__Bacteria;D_1__Actinobacteria	0,02432823	0,02625041	0,00722892	0,00593668	0,00440739	0,00566936	0,00717695	0,00906469
D_0__Bacteria;D_1__Bacteroidetes	0,20251611	0,17848073	0,23706827	0,35757715	0,32831803	0,39915845	0,19538052	0,36856201
D_0__Bacteria;D_1__Cyanobacteria	0,00061369	0,00110412	8.03E-01	0	0	0	0,00091078	0
D_0__Bacteria;D_1__Elusimicrobia	0	0	0,00032129	0	0	0	0	0
D_0__Bacteria;D_1__Epsilonbacteraeota	0	0	0	0	6.51E-01	0	0	0
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes	0,73177574	0,76013029	0,70742972	0,56642193	0,52830066	0,50470601	0,71445226	0,5083093
D_0__Bacteria;D_1__Fusobacteria	0	0	0	0	0	0	7.29E-01	0
D_0__Bacteria;D_1__Kiritimatiellaeota	0	8.28E-01	0	0	0	0	0	0
D_0__Bacteria;D_1__Patescibacteria	0	0	0	0,0001434	8.68E-01	6.64E-01	0,00010929	0
D_0__Bacteria;D_1__Proteobacteria	0,0388375	0,01857679	0,03815261	0,06180452	0,13159209	0,05078064	0,0329338	0,11385799
D_0__Bacteria;D_1__Synergistetes	0	0	0	0,0001434	0	0	0,00010929	0
D_0__Bacteria;D_1__Tenericutes	0,00170955	0,0027603	0,00248996	0,00444534	0,0017369	0	0	0,00020602
D_0__Bacteria;D_1__Verrucomicrobia	0,00021917	0,01261455	0,00722892	0,00352759	0,00549295	0,03961909	0,04885424	0
Taxa	EG-9	EG-10	EG-11	EG-12	EG-13	EG-14	EG-15	EG-16
D_0__Bacteria;D_1__Actinobacteria	0,00382891	0,00100894	0,00118906	0,00084903	0,01100306	0,0010042	0,03988063	0,00423454
D_0__Bacteria;D_1__Bacteroidetes	0,01531564	0,04223119	0,25693619	0,08400106	0,48365833	0,40067555	0,00108519	0,24186718
D_0__Bacteria;D_1__Cyanobacteria	0	0	0	0	0	0	0	0

D_0__Bacteria;D_1__Elusimicrobia	0	0	0	0	0	0	0	0
D_0__Bacteria;D_1__Epsilonbacteraeota	0,00081814	0	0	0,00015919	0	0	0	0
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes	0,69394901	0,5781205	0,23781213	0,52894667	0,37490601	0,49342706	0,90952252	0,66019031
D_0__Bacteria;D_1__Fusobacteria	0	0	0	0	0	0,0010042	0	0
D_0__Bacteria;D_1__Kiritimatiellaeota	0	0	0	0	0	0	0	0
D_0__Bacteria;D_1__Patescibacteria	0	0	0	0	0	0	0	0
D_0__Bacteria;D_1__Proteobacteria	0,28608829	0,37863938	0,50406262	0,38604404	0,11634668	0,04181121	0,04951167	0,09041997
D_0__Bacteria;D_1__Synergistetes	0	0	0	0	0	0,06207778	0	0
D_0__Bacteria;D_1__Tenericutes	0	0	0	0	0	0	0	0
D_0__Bacteria;D_1__Verrucomicrobia	0	0	0	0	0,01408592	0	0	0,003288



İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

ALLOJENİK KÖK HÜCRE NAKİLLERİNDE MİKROBİYOTANIN ETKİSİ: ENGRAFMAN VE GVHD-2

ORJİNALLİK RAPORU

% 10	% 8	% 4	% 6
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	nek.istanbul.edu.tr:4444 İnternet Kaynağı	% 1
2	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	% 1
3	Submitted to Ardahan Üniversitesi Öğrenci Ödevi	% 1
4	dergipark.org.tr İnternet Kaynağı	% 1
5	genderi.org İnternet Kaynağı	<% 1
6	ÇİFCİ, İhsan Hakkı, KARAKEÇE, Engin, DEMİRAY, Tayfur, AŞIK, Gülşah and ER, Halil. "Karbapenem dirençli Klebsiella pneumoniae suşlarında OXA-48 ve KPC varlığının araştırılması", Antibiyotik ve Kemoterapi (ANKEM) Derneği, 2013. Yayın	<% 1
7	thd.org.tr İnternet Kaynağı	<% 1