

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ÇÖLYAK TANISI KONMUŞ GLUTENSİZ DİYET
UYGULAYAN HASTALARDA DUODENAL
MİKROBİYOTANIN YENİ NESİL DİZİLEME YÖNTEMİ
İLE ARAŞTIRILMASI

Toygar PEKCAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

2022-ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ÇÖLYAK TANISI KONMUŞ GLUTENSİZ DİYET
UYGULAYAN HASTALARDA DUODENAL
MİKROBİYOTANIN YENİ NESİL DİZİLEME YÖNTEMİ
İLE ARAŞTIRILMASI

Toygar PEKCAN

YÜKSEK LİSANS

DANIŞMAN
Prof. Dr. Dilek ÇOLAK

“Kaynakça gösterilerek tezimden yararlanılabilir”

2022-ANTALYA

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;

Bu çalışma jürimiz tarafından Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Tıbbi Mikrobiyoloji Programında yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir. .../...../.....

İmza

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Dilek ÇOLAK

Akdeniz Üniversitesi

Üye:

(Ünvanı, Adı Soyadı)

(Üniversite)

Üye:

(Ünvanı, Adı Soyadı)

(Üniversite)

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun/...../..... tarih ve/..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Enstitü

Müdürü

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı beyan ederim.

Öğrenci
Toygar PEKCAN
İmza

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Dilek ÇOLAK
İmza

TEŞEKKÜR

Aylar süren bir çabanın ardından bu kısmı yazmaya geçtiğime göre her şey yolunda gitmiş diyebiliriz sanırım. Bu kısım, Akdeniz Üniversitesindeki yüksek lisans maceramın sonu anlamına geldiği için bu macerada desteği dokunan herkese teşekkürlerimi sunmak isterim.

Öncelikle, ne zaman arasam beni cevapsız bırakmayan, mikrobiyotaya dair sonsuz bilgisiyle beni hep şaşırtıp konuya olan ilgimi aşılayan, stresli zamanlarımda her şeye rağmen pozitifliğiyle, tecrübesiyle devam etmemde yardımcı olan çok değerli danışmanım Prof. Dr. Dilek ÇOLAK'a şükranlarımı sunarım. Deneylerin ve tezin her aşamasında çokça kapısını çalıp yardımını istediğim, nerede olursa olsun tüm saçma sorularımı dahi sabırla cevaplayan Dr.Öğr. Üyesi Özlem KOYUNCU ÖZYURT'a; farklı bir konuyla yola çıkıp tezin oluşmasında ve hastalara ulaşabilmemde çok emeği dokunan Prof. Dr. Ayhan Hilmi ÇEKİN'e; kendi deneyimleriyle beni besleyip güler yüzüyle hep yardımcı olan Arş. Gör. Dr. Ceren HANGÜL'e; örnekleri toplarken ellerinden geldiğince bana yardımcı olmak için çabalayan Antalya Eğitim ve Araştırma Hastanesi Gastroenteroloji Bölümüne; bu maceranın sona ulaşmasında emeği geçen tüm Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'ndaki kıymetli hocalarıma çok teşekkür ederim.

Tez boyunca yorulup belki şikayetlerimle ve stresimle kafasını şişirdiğim, beni dinleyip anlamadıkları konular hakkında bile ilgili davranan, enteresan teklifleri ve fikirleriyle tezim dışında bir şeyler düşünüp bu süreci tamamlamamda emeği geçen çok sevgili dostlarım Furkan, Cem, Ortim, Fako, Kupra ve Eliş'e teşekkürü borç bilirim.

Son olarak, daima arkamda olduklarını bildiğim canım aileme teşekkür ederim. Yaptığı harika yemeklerle bu tezin oluşumunda çokça glikozu bünyeme sokup kafamı çalıştıran babam Turgay Pekcan'a, sık sık tezimi sorup unutmama hiç izin vermeyen ve beni çok küçük yaşta endoskopi ile tanıştırap arkadaşlarım arasında havalı olmamı sağlayan canım annem İlknur Pekcan'a ve gün içinde gelen "Tezine baktın mı?" mesajları ile odaklanamayan Toygar'ı iyi bilip tüm bu süreçte her türlü nazımı çeken muhterem sevgilim İlayda Karadeniz'e sonsuz teşekkür ederim.

ÖZET

Amaç: Çölyak hastalığı (ÇH) diyetle alınan glutene kalıcı bir intolerans ile karakterize ince bağırsağın kronik iltihaplı bir hastalığıdır. ÇH'nin bilinen tek tedavi şekli glutensiz diyetdir. Günümüzde beslenme ile diyet bileşenlerinin bağırsak mikrobiyotasını etkilediği literatürde gösterilmiştir. Bu çalışmada, glutensiz diyet uygulayan semptomsuz çölyak hastalarındaki yenilenmiş duodenal mikrobiyotanın spesifik bileşiminin yeni nesil dizileme yöntemi ile tanımlanması ve literatür temelli karşılaştırma ile verilerin irdelenmesi amaçlanmıştır.

Yöntem: Glütensiz diyet uygulayan 10 çölyak hastasından duodenum biyopsisi için endoskopi yapıp uygun biyopsi örnekleri alınmıştır. Toplanan biyopsiler DNA ekstraksiyonu yapıldıktan sonra sekanslama yapılana kadar -20°C'de saklanmıştır. Dizileme işlemi Illumina NextSeq 550 yeni nesil dizileme platformunda yapıp duodenal mikrobiyota bileşimi analiz edilmiştir.

Bulgular: Çalışmaya 5 erkek 5 kadın dahil edilip yaş ortalamaları 38.1'dir. Örneklerde toplam 36 farklı bakteriyel filum tespit edilmiştir. En sık görülen filumlar %31.46 Firmicutes, %21.47 Proteobacteria, %10.6 Bacteroidetes ve %6.1 Actinobacteria olarak bulunmuştur. Örneklerin aile olarak analizine bakıldığında, Bacillaceae 1 (%3.35) ve Streptococcaceae (%2.94) gruplarının en yüksek bolluğa sahip iki aile olduğu görülmektedir. Cins düzeyinde Streptococcus (%1.44) ve Geobacillus (%1.31) türleri örnekler arası en yüksek yüzdeye sahip cinslerdir. Örneklerin tür sayısı ortalaması 232.2 olarak hesaplanmıştır. Shannon endeksine göre, temel bileşen analizinde farklı gruplanan üç örnekte çeşitlilik, diğer örneklerle göre düşük bulunmuştur.

Sonuç: Bu çalışmaya katılan glutensiz diyet uygulayan çölyak hastalarında Firmicutes en sık görülen filum olmuştur. Örneklerin 7 sinde baskın filum Firmicutes iken 3 ünde Proteobacteria baskın izlenmiştir. Temel bileşen analizinde ve hiyerarşik kümelenme ağacında 7 hasta birbirine yakın profil sergilerken 3 hasta onlardan farklı bir duodenal floraya sahiptir.

Anahtar Kelimeler: çölyak hastalığı, duodenal mikrobiyota, yeni nesil dizileme, 16s rRNA

ABSTRACT

Objective: Celiac disease (CD) is a chronic inflammatory disease of the small intestine characterized by a persistent intolerance to dietary gluten. The only known treatment for celiac disease is gluten-free diet therapy. Today, it has been shown in the literature that dietary components affect the gut microbiota. In this study, it was aimed to identify the specific composition of the regenerated duodenal microbiota in asymptomatic celiac patients following a gluten-free diet after active disease state by next-generation sequencing method and to analyze the data by literature-based comparison.

Method: Endoscopy was performed for duodenum biopsy and biopsy samples were taken from 10 celiac patients who were on a gluten-free diet. Collected biopsies were stored at -20°C until sequencing after DNA extraction. Sequencing was performed on the Illumina NextSeq 550 next generation sequencing platform and duodenal microbiota composition was analyzed.

Results: Five men and five women were included in the study and their average age was 38.1. A total of 36 different bacterial phyla were detected in the samples. The most common phyla were 31.46% Firmicutes, 21.47% Proteobacteria, 10.6% Bacteroidetes and 6.1% Actinobacteria. When analyzing the samples as families, it is seen that Bacillaceae 1 (3.35%) and Streptococcaceae (2.94%) groups are the two families with the highest abundance. At the genus level, Streptococcus (1.44%) and Geobacillus (1.31%) species have the highest percentage among samples. The average number of species of the samples was calculated as 232.2. According to Shannon index, diversity was found lower in the three samples that were grouped differently in PCoA compared to the other samples.

Conclusion: In this study, Firmicutes was the most common phylum in celiac patients on a gluten-free diet. Firmicutes was the dominant phylum in 7 of the samples, while Proteobacteria was dominant in 3 of the samples. In PCoA and Hierarchical cluster tree, 7 patients showed similar profiles, while 3 patients had a different duodenal flora.

Keywords: celiac disease, duodenal microbiota, next-generation sequencing, 16s rRNA

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
TABLolar DİZİNİ	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
SİMGELER ve KISALTMALAR	vii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Mikrobiyota ve Konak İlişkisi	3
2.1.1. Mikrobiyota	3
2.1.1.1. Mikrobiyota nedir?	3
2.1.1.2. Mikrobiyotanın Gelişimi	4
2.1.1.3. GİS Fizyolojisi	6
2.1.1.4. Mikrobiyota-Organ Aksları	9
2.1.1.5. Mikrobiyota ve Bağışıklık Sistemi	11
2.1.1.6. Mikrobiyota ve Hastalık İlişkileri	13
2.1.2. Mikrobiyotaya Etki Eden Faktörler	17
2.1.2.1. GİS Yapısına Bağlı Faktörler	17
2.1.2.2. Genetik	18
2.1.2.3. Diyet	19
2.1.2.4. Antibiyotikler	20
2.1.3. Mikrobiyotanın Konak Üzerinde Etkisi	21
2.1.3.1. Fiziksel Bariyer Oluşumunda Mikrobiyota	23
2.1.3.1. İmmünolojik Bariyer Olarak Mikrobiyota	24
2.2. Çölyak Hastalığı ve Mikrobiyota	25
2.2.1. Çölyak Hastalığı	25
2.2.1.1. Çölyak Tanımı	25
2.2.1.2. Çölyak Prevalansı	26
2.2.1.3. Klinik Özellikleri ve Semptomlar	27
2.2.1.4. Çölyak Patogenezi	28

2.2.1.5. Çölyak Hastalığı Tanısı	30
2.2.1.6. Çölyak Hastalığı Tedavisi ve Glütensiz Diyet	31
2.2.2. Duodenal Mikrobiyota	32
2.3. Mikrobiyotanın Çölyak Hastalığının'da Potansiyel Rolü	34
2.4. Mikrobiyota Analizinde Yeni Nesil Dizileme Yöntemi	36
3. GEREÇ ve YÖNTEM	39
3.1. Etik Kurul Onayı	39
3.2. Örneklerin Toplanması	40
3.3. DNA İzolasyonu	41
3.4. Yeni Nesil Dizileme	42
3.4.1. Kütüphane Hazırlama	43
3.4.2. Dizileme	44
3.4.3. Biyoinformatik Analiz	45
4. BULGULAR	46
5. TARTIŞMA	54
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	59
KAYNAKLAR	60
ÖZGEÇMİŞ	83

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 2.1.	Bağırsak mikrobiyotasında potansiyel biyobelirteç olarak kullanılan bazı bakteri türleri ve ilişkili hastalıkları	14
Tablo 2.2.	Gastrointestinal sistem boyunca mikrobiyota karakteri ve konak ortamının özelliği.	17
Tablo 4.1.	Filum analizinde cinsiyet ve yaş dağılımı	46
Tablo 4.2.	Mikrobiyota analizinde metagenomik verilerin incelenmesinde çeşitlilik İndeksleri. (Shannon, Simpson, Inverse Simpson ve Tür Sayısı)	53

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Gastrointestinal sistemin şematik gösterimi	8
Şekil 2.2. Disbiyozisde bağışıklık sistemi ve mikrobiyotanın rolü. 1) Mikrobiyal disbiyoz, mukozal bariyer fonksiyonu ve inflamasyon arasındaki ilişki, 2) Mikrobiyota homeostazından sorumlu T hücreleri	16
Şekil 2.3. Kısa zincirli yağ asitlerinin metabolizması	22
Şekil 2.4. Çölyak hastalığının ortaya çıkmasında rol oynayan faktörler	26
Şekil 2.5. Çölyak hastalığının klinik semptomları	27
Şekil 3.1. Glütensiz diyetle uyuma testi	40
Şekil 3.2. Yeni Nesil Dizileme Yöntemi Çalışma Akışı	43
Şekil 4.1. Hastalardan en bol bulunan 20 bakteri filumu	47
Şekil 4.2. Saptanan Bakteri Filumlarının Duodenal Örneklerdeki Yoğunluğu	48
Şekil 4.3. Duodenal Örneklerde Saptanan Bakteri Aileleri	49
Şekil 4.4. Saptanan Bakteri Cinslerinin Duodenal Örneklerdeki Yoğunluğu	50
Şekil 4.5. Duodenal Mikrobiyotalarda Hiyerarşik Kümelenme Ağacı	51
Şekil 4.6. Duodenal Mikrobiyotalarda Temel Bileşen Analizi (Principal coordinates analysis)	52

SİMGELER ve KISALTMALAR

BDNF	: Beyin kaynaklı Nörotrofik Faktör (Brain-derived Neurotrophic Factor)
BEH	: Bağırsak Epitel Hücresi
ÇH	: Çölyak Hastalığı
DH	: Dentritik Hücre
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
EEH	: Enteroendokrin Hücreler
ESS	: Enterik Sinir Sistemi
EMA	: Endomisiyal Antikor
ESS	: Enterik Sinir Sistemi
GALT	: Bağırsakla ilişkili lenfoid doku (Gut – associated lymphoid tissue)
GD	:Glütensiz diyet
GI	: Gastrointestinal
GİS	: Gastrointestinal Sistem
HLA	: İnsan lökosit antijeni (Human Leucocyte Antigen)
IgA	: İmmünoglobulin A
KZYA	: Kısa Zincirli Yağ Asidi
LP	: Lamina Propria
LPS	: Lipopolisakkarit
MHC	: Majör doku uygunluk kompleksi (Major Histocompatibility Complex)

MS	: Multipl Skleroz
MSS	: Merkezi Sinir Sistemi
NOD2	: Nucleotide- binding oligomerization domain containing protein 2
OTU	: Operasyonel Taksonomik Birim (Operational Taxonomic Unit)
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PZR-DGGE	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu – denature gradient jel elektroforezi
PSA	: Polisakkarit A
rRNA	: Ribozomal Ribonükleik Asit
SNP	: Tek Nükleotid Polimorfizmi (Single Nucleotide Polymorphism)
TJ	: Sıkı bağlantı (Tight Junction)
TLR	: Toll-like receptor
tTG	: Doku Transglutaminazı (Tissue Transglutaminase)

1. GİRİŞ

Çölyak hastalığı (ÇH) genetik olarak yatkın (HLA-DQ2 / DQ8 pozitif) bireylerde, diyetle alınan glutene kalıcı intolerans ile karakterize en yaygın immün aracılı enteropati ve ince bağırsağın kronik iltihaplı bir hastalığıdır (Cheng ve ark., 2013). Çölyak hastalığının sonuç veren ve bilinen tek tedavi şekli glutensiz diyetdir (Wacklin ve ark., 2013). Avrupa kökenli popülasyonun %1 - %2'sini etkilediği bilinmektedir (Lohi ve ark., 2007). Ülkemizde Çölyak hastalığı görülme sıklığı % 0.3-1 arasındadır. Hastalığın genetik kökeninde yatan HLA antijenlerinin ırklara göre rastlanma sıklığı da farklılık gösterir. Çölyak hastalığına olan duyarlılık MHC sınıf II molekülleri HLA-DQ2 ve HLA-DQ8 ile güçlü bir şekilde ilişkili olsa da yüksek riskli HLA alelleri ve sıklıkla glutene maruz kalan çoğu insanda ÇH gelişmez (Torres ve ark., 2014). Bu nedenle hastalığın ortaya çıkışında ya da patogenezinde başka çevresel faktörlerin de varlığı rol oynayabilir. ÇH geleneksel olarak çocuklukta gelişen bir hastalık olarak kabul edilse de, birkaç tarama çalışması yetişkinlerde benzer prevalans oranları bulmuştur (Vivas ve ark., 2008). Gerek ırksal farklılıklardan kaynaklı HLA çeşitliliğine ve gerekse beslenme alışkanlıklarına bağlı olarak duodenal mikrobiyota diğer ülkelerde gözlenenden farklı olabilir. Bu sebeple ülkemizdeki HLA tiplerinin farklı oluşundan kaynaklı hastalarda da bilinenden farklı bir duodenal mikrobiyotanın görülmesi oldukça olasıdır (Torres ve ark., 2014).

Klinik ve deneysel çalışmalar, bağırsak mikrobiyotasının obezite, diyabet, atopik hastalıklar gibi çeşitli bozuklukların patogenezinde de önemli bir rol oynadığını ve ayrıca ÇH gelişimine katkıda bulunduğunu doğrulamıştır (Rajpal DK ve Brown JR, 2013). ÇH genellikle erken çocukluk döneminde, başlıca çevresel tetikleyicisi olan glutene ilk maruziyetten sonra ortaya çıkar. Bununla birlikte, erken ve geç yetişkinlikte ÇH başlangıcı yaşayan hastaların sayısı giderek artmaktadır (Catassi ve ark., 2010), bu da ÇH gelişiminde ek çevresel faktörlerin rol oynaması gerektiğini düşündürmektedir. Aslında, doğum şekli ve beslenme tipi, bağırsak enfeksiyonları ve antibiyotik alımı gibi erken dönemde bağırsak mikrobiyota kompozisyonunu etkileyen diğer çevresel faktörler de ÇH geliştirme riski ile ilişkilendirilmiştir (Sanz ve ark., 2011). Bu nedenle, birçok epidemiyolojik çalışma, ÇH riskinin oluşumunda birkaç perinatal faktörün birlikte rol

oynadığını göstermektedir. Ayrıca, birçok kompleks immün aracılı hastalık gibi çölyak da bağırsak mikrobiyotasının ve genomunun (mikrobiyom) bileşimindeki değişikliklerle bağlantılıdır. Son zamanlarda, spesifik klinik belirtilere göre sınıflandırılan çölyak hastalarının farklı alt grupları arasında mikrobiyotanın farklılık gösterdiği de gözlemlenmiştir. Ek olarak, ÇH tanısı konan hastaların büyük çoğunluğu glutensiz diyetle yanıt verse de, glutensiz diyetle rağmen klinik iyileşme göstermeyen bir çölyak hastalığı alt grubu da vardır (Wacklin ve ark., 2013). Tüm bu kanıtlar birlikte ele alındığında, mikrobiyotanın hastalık belirtileri, patogenezi ve riskinde bir rolü olduğunu göstermektedir. Bu da belirli hasta alt gruplarının semptomlarını hafifletmek veya bağırsak mikrobiyotasını modüle ederek hastalık riskini azaltmak için yeni stratejiler bulma şansının önünü açar.

16S rRNA gen klon kütüphanesi kullanılarak (Nistal ve ark., 2012), diyetle glutenin kesilmesi ile tedavi edilen ve edilmeyen çölyaklı yetişkinler arasında duodenal mikrobiyota çeşitliliğinin önemli ölçüde farklı olduğu görülmüş; bununla birlikte, ÇH olmayan kontrol gruplarının bakteri toplulukları oldukça değişken bulunmuştur. İnce bağırsaktaki mikrobiyotanın bileşimi, sağlıklı bireylerde veya çölyaklı hastalarda yüksek verimli 16S rRNA geni veya metagenomik sıralama yöntemleri kullanılarak nadiren analiz edilmiştir (van den Bogert ve ark., 2011; Cheng ve ark., 2013).

Bu yüksek lisans tez çalışmasında, aktif hastalık sonrası glutensiz diyet uygulayan semptomsuz çölyak hastalarındaki yenilenmiş duodenal mikrobiyotanın spesifik bileşiminin yeni nesil dizileme yöntemi ile tanımlanması ve literatür temelli karşılaştırma ile verilerin irdelenmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Mikrobiyota Ve Konak İlişkisi

2.1.1. Mikrobiyota

2.1.1.1. Mikrobiyota Nedir?

İnsan vücudu çok sayıda mikroorganizmaya ev sahipliği yapmaktadır. Bakteriler, arkeler, mantarlar, bazı ökaryotik bakteriler ve virüsler şimdiye kadar tespit edebildiğimiz mikroorganizmaları oluşturmaktadırlar. Vücudumuzda bulunan bütün bu mikroorganizmalar mikrobiyota olarak adlandırılırken onların genlerinin toplamı ve konaktaki çevresinden bahsediliyorsa "mikrobiyom" terimi kullanılmaktadır (Turnbaugh ve ark., 2013). Yıllardır sıkça duyduğumuz vücudumuzda insan hücrelerinden 10 kat daha fazla sayıda bakteri hücresi var söylemi kısa bir süre önce yapılan çalışmalarda, erkeklerde yaklaşık 1.3/1, kadınlarda yaklaşık 2.2/1 olarak mikroorganizmaların sayıca biraz daha fazla olduğu bir şekilde revize edilmiştir (Sender ve ark., 2016).

İnsan gastrointestinal sistemi ağız, mide, ince bağırsak [duodenum, ileum, jejunum], kalın bağırsak ve rektumdan oluşmaktadır. Her bir bölge mikrobiyal açıdan birbirinden farklılık göstermektedir. Çoğu sağlıklı insanın bağırsak mikrobiyotasında hücresel olarak görece bakterilerin bolluğu söz konusudur ve özellikle Bacteroidetes ve Firmicutes filumlarının üyeleri tarafından domine edilmiş durumdadır. Sadece ufak bir kısım bakteriyel olmayan mikroorganizmalardan (fungi, arke gibi) oluşur. Bu iki bakteriyel filumun oranı kişiden kişiye %10 ila %90 gibi geniş bir aralıkta değişse de bu iki filumun toplam yüzdesi yaklaşık olarak %95 gibi oranları bulmaktadır. Bununla birlikte, özellikle hastalık durumundaki bazı bireylerde Proteobacteria, Verrucomicrobia, Actinobacteria veya Fusobacteria gibi diğer bakteri filumları büyük yüzdelere sahip olabilir (Human Microbiome Project Consortium, 2012).

Bağırsaktaki mikrobiyotanın kolonizasyonu normal doğum sırasında doğum kanalından geçişle başlar ve genç erişkinliğe kadar kademeli bir şekilde bu mikrobiyota değişimi

devam eder. Mikrobiyotanın içeriği yoğunlukla genetik geçmişe, coğrafi faktörlere ve diyeteye bağlıdır ancak bu içeriğe etki eden farklı faktörler de bulunmaktadır (Bustos F. ve ark., 2014). Mikrobiyota, türler arasında devamlı bir değişimin olduğu kompleks ve dinamik bir ekosistemdir. Bu ekosistemdeki hastalık ve sağlık arası tür dinamiklerinin anlaşılması da mikrobiyotanın fonksiyonunu tahmin etmek ve anlamak açısından merkezi bir role sahiptir.

Memeli bağırsak mikrobiyotasının ana işlevi, konak tarafından verimli olarak parçalanamayan ve kullanılamayan lif ve selüloz gibi diyet bileşenlerini parçalayarak, gıda sindirimine ve enerji üretimine yardımcı olmaktır. Fakat bundan da fazlası, bağırsaktaki mikrobiyota kolonizasyonu, konağın bağışıklık sistemini eğitir ve bağırsak yolundaki anatomik yapıların doğru gelişimini şekillendirmeye yardımcı olur (Round ve Mazmanian, 2009).

Bağırsak mikrobiyomumuzun genomlarının, insan genomundan 500 kat daha fazla gen kodladığı tahmin edilmektedir (Li ve ark., 2014). Bu da demek ki bu mikrobiyal topluluk çok daha fazla biyokimyasal reaksiyon yapabilir ve konağından daha fazla tepki verir. Bağırsak mikroplarımız temelde küçük biyokimyasal fabrikalardır ve vücudumuzun metabolik kapasitelerini genişletmektedirler (Grice ve Segre, 2012). Hayvan modelleri, yapay ve her zaman insan fizyolojisi için kesin bir temsilci olmasa da, mikrobiyota araştırmalarına önemli katkı sağlamıştır. (Sonnenburg ve Bäckhed, 2016). Normal bir mikrobiyota ile kolonize edilen farelerin kanı, mikropsuz (germ-free) farelerin kanında bulunmayan düzinelerce metabolit içerir (Germ-free fare: sezaryen ile doğan ve steril izolatörlerde yetiştirilen). Bu da mikrobiyomun varlığının konağın biyokimyası üzerinde büyük bir etkiye sahip olabileceğini düşündürmektedir. (Wikoff ve ark., 2009).

2.1.1.2. Mikrobiyotanın Gelişimi

İnsan bağırsak mikrobiyotasının yapısı ve bileşimi, konak ve mikropları arasındaki birlikte evrimden kaynaklanır. Şimdiye kadar, sağlık ve hastalık durumlarında bağırsak mikrobiyotası üzerine yapılan çalışmaların çoğunluğu dışkı mikrobiyotasına

odaklanmıştır, çünkü dışkıya invaziv olmayan bir şekilde erişilebilir ve elde edilmesi kolaydır. Bu nedenle, bu literatür taraması çoğunlukla çalışma materyali olarak dışkı kullanan çalışmalara dayanmaktadır ve bu nedenle bağırsak mikrobiyotası, aksi belirtilmedikçe dışkı mikrobiyotasını ifade etmektedir (Cheng, 2016).

Bireyler arasında mikrobiyota taksonomik içeriğinde büyük farklılıklar gösterir ve aynı kişi bile zaman içinde önemli ölçüde farklılıklar gösterebilir. Fonksiyonel fazlalık, sağlıklı mikrobiyota karakterizasyonunu son derece karmaşık hale getirir, çünkü farklı taksonomik profiller, benzer davranışlara sahip ekosistemlere yol açabilir (Dominguez-Bello, M. G. ve ark., 2019). Bazı gözlemsel çalışmalar, mikrobiyota kompozisyonunun 2-3 yaşlarında tam olarak geliştiğini göstermektedir, ancak küçük çocuklarda mikrobiyal topluluk yapısı ve çeşitliliği hala yetişkinlerinkinden farklıdır (Bergström ve ark., 2014; Koenig ve ark., 2011; Yatsunenkov ve ark., 2012). Ek olarak, konak-mikrobiyota etkileşimlerinin belirlenmesinde çok önemli olduğu düşünülen mukoza ile ilişkili mikrobiyotanın gelişimi hala tam olarak anlaşılamamıştır.

Doğum, karmaşık bir mikrobiyotayla ilk büyük temastır ve memelilerde nesiller arası mikrobiyota transferi için en ilkel mekanizmalardandır. Korioamniyotik membranın yırtılması, bebeğin; annenin vajinal ve perineal dışkı mikroplarına maruz kalmasına izin verir (Bahn ve ark., 1998) Bebekler doğal normal doğumda, derileri ve ağızları annenin vajinal sekresyonu ile kaplı olarak doğarlar (Mueller ve ark., 2020). Mekonyumda hem DNA hem de canlı bakterilerin gözlemlenmesiyle bu sav desteklenmiştir (Nagpal ve ark., 2016). Mikrobiyotamız, annelerimiz, büyükannelerimiz ve daha ileri anaerik çizgide, mikrobiyal aktarım ile atalarımıza kadar uzanır. Bu ilk kolonize türün, sırayla gelişen bağışıklık sistemini eğiten ve sonraki mikroplar tarafından kolonizasyon için uygun koşullar sağlayan bir "öncü mikrobiyota" oluşturulmasında önemli olduğu gösterilmiştir (Dominguez-Bello ve ark., 2010). Aktarılan mikrobiyotanın, yeni doğanı besleyecek olan mikropların çoğunu içerip içermediğini ve hangi suşların anneden bebeğe geçip vücudunun hangi kısımlarını kolonize ettiği ve bunların işlevleri; ayrıca, bebeğin mikrobiyal çeşitliliğine babanın ve kardeşlerin katkısı ve son olarak modern tıbbi uygulamalardan hangilerinin kuşaklararası iletimi azalttığı henüz tam olarak anlaşılamamıştır (Song S.J. ve ark., 2013).

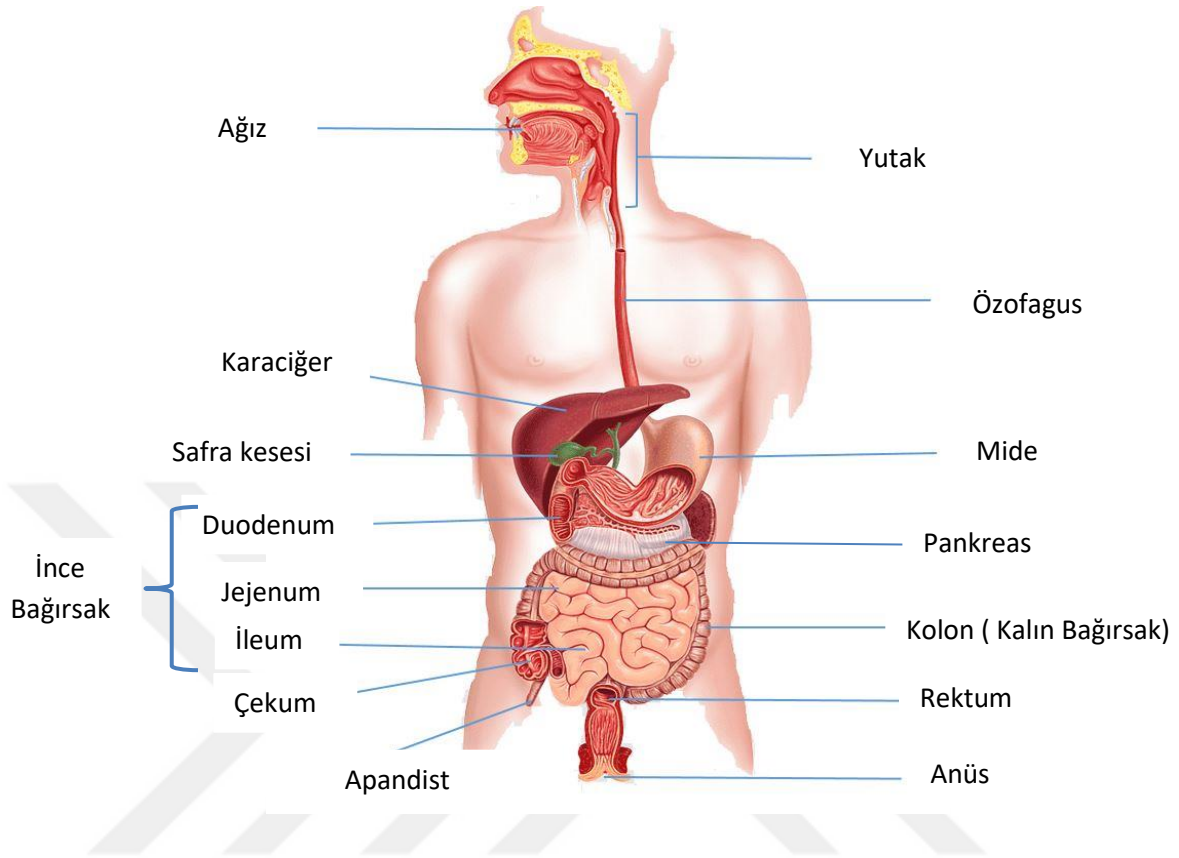
2.1.1.3. GIS Fizyolojisi

Gastrointestinal sistemin genel fonksiyonu, sindirim enzimleri ile kompleks makro besinlerin mikro besinlere yıkımı ve emilimi sonucu bu küçük besin moleküllerinin ince bağırsaktan kan ve lenf dolaşımına geçişi ile enerji elde edebilmektir. Gastrointestinal sistemin motilite, sekresyon, sindirim ve emilim olmak üzere dört adet temel fonksiyonu vardır. Motilite kas hareketleri sayesinde yiyeceklerin küçük parçalara ayrılıp karışması ve Gastrointestinal Sistem (GİS) boyunca iletiminden sorumludur. Sekresyon, sindirim sırasında ihtiyaç duyulan enzim, mukus ve sıvıların salgılanmasıdır. Sistem boyunca düz kasların peristaltizmi ile hareket eden besinler, mukozal yüzeyle gereken süre boyunca temas ederek yeterli emilim sağlanır. Bu mukozal yüzey konakla mikropların etkileşiminin gerçekleştiği ana konumdur. Bağırsaktan gün boyunca yaklaşık 9 litre sıvı geçer (sindirim enzimler, iyonlar, safra, mukus, su gibi) ve burada absorbe edilir. Bu sıvı hareketi hücreler arası ve transselüler olmak üzere ikiye ayrılır. Hücreler arası yol; tight junction denilen sıkı bağlantılarda ifadelerin değişikliği ile, besin emilime bağlı sıvı hareketini içerir. Transselüler yol ise epitel hücrelerin membranlarından pasif difüzyon yoluyla iyonların ve besinlerin, aquaporinler ile de sıvıların geçişini içermektedir. Bağırsakta yüksek miktarda emilim gerçekleştiği için GİS'in mukozal epitel bariyeri potansiyel antijenlere, toksinlere ve enfeksiyöz materyallere karşı kendini korumak üzere evrimleşmiştir (Camilleri ve ark., 2012).

İnsanda GİS birden fazla farklı organdan oluşur. Üst ve alt GİS olarak ayrılabilir. Üst GİS'i, ağız, yemek borusu, mide, duodenum, jejunum ve ileumu ifade eder. Kolon, rektum ve anüs ise alt GİS'i oluşturur. Bu sistemler şekil 2.1'de gösterilmiştir. Özofagus (yemek borusu), çok koordineli özofagus peristaltizmi (dalgası) yoluyla yutulan gıdaları farinksten mideye iter. Mideye girdikten sonra yiyecek karışımı, mide asidi ve sindirim enzimleri ile karıştırılır ve kimus adı verilen sindirilmiş materyal, pilorik sfinkterden duodenuma geçmek üzere parçalanır. İnce bağırsakta (duodenum, jejunum ve son olarak ileum) sindirim süreci, besin emilimine yardımcı olmak için proteinleri, yağları ve karbohidratları pankreas enzimleri ile daha küçük bileşenlere ayırır. Sindirim sürecine yardımcı olan aksesuar organlar arasında tükürük bezleri, pankreas, karaciğer ve safra kesesi bulunur. Lümen içeriği kalın bağırsağa ulaştığında, içerikler artık dışkı olarak

adlandırılır. Rektum ve anal kanal yoluyla atılmak üzere hazırlanır. Sindirim süreçlerini koordineli bir şekilde gerçekleştirmek için, gastrointestinal (GI) yol genel olarak, emilim ve salınım görevlerinin yapan epitel hücrelerin oluşturduğu iç mukozal tabakadan meydana gelir. Bu mukoza, bir dizi katmandan oluşan fonksiyonel bir anatomiye sahiptir. Bu katmanlar arasında sinirler, lenf dokuları ve bağ dokusundan oluşan submukozal katman; boyuna ve dairesel düz kaslardan oluşan kas tabakası ve en dış katman olan serozayı içerir (Greenwood-Van Meerveld, Johnson ve Grundy, 2017).

Bağırsak duvarı içinde, otonom sinir sisteminin bir alt bölümü olan ve otonom aktivite yapabilen Enterik Sinir Sistemi (ESS) bulunur. ESS, Merkezi Sinir Sistemi'nde bulunan birçok nörotransmitter ve nöromodülatörü içerir ve düz kas ve mukoza fonksiyonunu kontrol eden özel devreler halinde organize edilmiştir (Erdoğan, 2015). Yüz milyondan fazla nöron içeren bir sinir ağı vardır (Snell, 2011). ESS içindeki bu devreler, Merkezi Sinir Sistemi (MSS) katılımı olmadan rutin sindirim mekanizmalarının ilerlemesine izin verir. ESS, duyuşal nöronlar, motor nöronlar ve GI yoldan gelen bilgilerin dikkatlice entegre edilmesini sağlayan karmaşık sayıda internöron içerir. ESS'de bulunan içsel birincil duyuşal nöronlar, GI kas sistemini düzenleyen motor nöronların ve salgı hücrelerini sinir sistemine bağlayan sekretomotor nöronların aktivitesini kontrol eden internöronlara sinaptik olarak bağlıdır. Duyuşal nöronların bu sistemle iç içe olması sebebiyle bağırsaklarımız ikinci beyin olarak adlandırılmıştır.



Şekil 2.1. Gastrointestinal sistemin şematik gösterimi (Cheng ve ark., 2013)

GI mukozada yaygın olarak dağılmış özel enteroendokrin hücreler (EEH) vardır. Bu hücreler lümen içeriğini algılama, uzak hedeflerde klasik hormonlar için sinyal molekülleri salgılama veya farklı komşu hücreler üzerinde parakrin bir şekilde hareket etme yeteneğine sahiptir. Bu etkilere nöronsal yollar (enterik ve ekstrinsik nöronlar) dahildir. Her EEH tipinin GİS boyunca karakteristik bir dağılımı vardır. Salınan mediyatörler arasında kolesistokinin (CCK) ve glukagon benzeri peptid 1 (GLP-1) GI fonksiyonunun refleksi kontrolünde ve gıda alımının düzenlenmesinde önemli roller oynar. EEH'lerde, darboğaz şeklinde olan ve mikrovillilere bakan hücreler "açık tip" olarak adlandırılırken bazal membrana yakın bulunan, bağırsak lümenine ulaşmayan ve mikrovilli olmayanlara ise "kapalı tip" denir. Açık tip EEH'ler, lümeneye ulaşan mikrovilluslar aracılığıyla lümen içeriğini doğrudan tespit ederken, kapalı tiplerin lümen içeriği tarafından dolaylı olarak nöral veya hümorale yollar aracılığıyla aktive edildiği düşünülmektedir (Gribble ve Reimann, 2016; Latorre ve ark., 2016). Bu EEH-duyusal

nöron bağlantısı, EEH'ler ve onların ESS ve MSS ile iletişimdeki rolleri hakkında yeni bir perspektif açmıştır. Bu bilgilerden yola çıkarak EEH fonksiyonlarını değiştirmeye etki eden ilaçlar, GI bozukluklarda sıklıkla görülen depresyon ve anksiyete gibi rahatsızlıkların kontrolünde rol alabilir. EEH'ler üzerinden çalışan bileşiklerin terapötik potansiyeli yüksek bulunmuştur. Örneğin, diabetes mellitus tip 2'yi tedavi etmek için kullanılan, GLP-1R agonisti olan bir molekül, bu özelliğini pankreatik β -hücrelerinden insülin salgılanmasını uyarma kapasitesi sayesinde alır (van Raalte ve ark., 2016). Ayrıca, gastrik bypass olan hastalarda gıda alımının azaltılmasına bağlı olarak azalan GLP-1 ve bağırsak hormonu olan PYY(3-36), obeziteyi tedavi etmek için yeni bir terapötik potansiyele sahip olabilir (Svane ve ark., 2016).

2.1.1.4. Mikrobiyota-Organ Aksları

Bağırsak mikrobiyotası, karmaşık bir şekilde diğer organlarla ve genel sağlığımızla da bağlantılıdır. Bağırsak mikrobiyotası için tabir edilen 'organ' benzetmesi, diğer organ sistemlerini etkileyebilecek kadar büyük bir immünolojik etkiye ve metabolik kapasiteye sahip olmasından gelmektedir (Patterson ve ark., 2016). Bu sistem beyin, deri, karaciğer, kemikler, böbrek, akciğerler gibi birçok organla iletişim halindedir ve sağlıklılık açısından düzenleyici; hastalık durumunda ise hastalığa neden olabilecek düzeyde yakından ilişkilidir. Örneğin, bağırsak mikropları ve beynimiz arasında, bağırsak-beyin aksında, mikropların konağın beyin gelişimi ve davranışı üzerinde doğrudan mikrobiyal metabolitler yoluyla bir etkiye sahip olabileceği yönünde kanıtlar vardır. Kan dolaşımı veya dolaylı olarak, örneğin belirli genlerin ifadesini değiştirerek bu iletişimin sağlandığı düşünülmektedir (Dinan ve Cryan, 2017).

Mikroorganizmaların davranış ve bilişsel fonksiyonlar üzerindeki etkisi giderek daha fazla anlaşılmaktadır. Mikrobiyal sinyaller, sağlıklı insan vücudunun önemli işlevlerini düzenleyebilir ve çok sayıda çalışma, birçok hastalığın bağırsak mikrobiyotasının bozulmasından (disbiyozis) kaynaklandığını göstermiştir (Schroeder ve Backhed, 2016). Örneğin, Beyin Kaynaklı Nörotrofik Faktör (BDNF), hipokampal bölgede nöronal hayatta kalma ve büyümede rol oynayan merkezi bir nörotrofik proteindir. Gelişim ve

yetişkinlik döneminde nöronların hayatta kalması ve farklılaşması, fonksiyonel sinapsların oluşumu ve nöroplastisite gibi süreçlerde önemli rol oynar. BDNF miktarının bağırsak-beyin ekseninden etkilendiği gösterilmiştir. Bazı çalışmalarda, mikrobiyota profili enfeksiyon yoluyla değiştirildiğinde, artmış anksiyete benzeri davranışlarla ilişkili düşük hipokampal BDNF seviyeleri gözlenmiştir (Cryan and Dinan, 2012).

Bağırsak ve deri bir dizi önemli özelliği paylaşır. Her ikisi de yoğun şekilde damarlanmıştır ve sinir sistemine bağlıdır. Aynı zamanda farklı mikrobiyal topluluklarla büyük ölçüde kolonizedirler ve çevreyle iletişim kuran önemli temas organları olarak çalışırlar. Ayrıca, genel bağışıklık ve endokrin sistemleriyle iç içedirler ve nöroendokrin organlardır. Hem derinin hem de bağırsağın düzgün çalışması, tüm organizmanın homeostazı ve hayatta kalması için gereklidir. Hem diyet hem de tanımlanmış cilt hastalıkları, belirli GI ile güçlü bir ilişki göstermektedir. Örneğin, iltahaplı bağırsak hastalığı ve çölyakta dermatit ve sedef görülmesi bu sistemlerin ilişkisini kanıtlar niteliktedir (Kelsen ve Wu, 2012; Wu ve ark., 2013). Bu durum hem dahiliye hem de dermatoloji ders kitaplarında yıllardır bahsedilmektedir (Goldsmith ve ark., 2012).

Bağırsak mikrobiyotası ile bağırsak dışı organlar arasındaki en önemli bağlantılardan biri bağırsak-karaciğer aksıdır. Uzun yıllardan beri, karaciğerin sürekli olarak sadece sindirim ve emilim ürünlerine değil, aynı zamanda bakteri ve lipopolisakkarit (LPS) gibi bakteriyel bileşenler dahil olmak üzere bağırsak kaynaklı faktörlere maruz kaldığı iyi bilinmektedir. GİS ile karaciğer vena porta yolu ile yakın ilişkidir (O'Hara ve ark., 2007). Fizyolojik olarak, bu eksen, konağı bağırsaktan gelen potansiyel olarak zararlı ve toksik maddelere karşı koruyan ve böylece bağışıklık sisteminin homeostazını sağlayan önemli bir operasyonel birim gibi görünmektedir (Ponziani ve ark., 2019). Hayvanlarda ve insanlarda yapılan deneysel çalışmalar, siroz, alkole bağlı karaciğer hastalığı ve non-alkolik steatohepatit gibi birçok karaciğer hastalığının bağırsak disbiyozu ile bağlantılı olduğunu göstermiştir (Betrapally ve ark., 2017).

Akciğerlerde bağışıklığın olgunlaşması ve homeostazında akciğer mikrobiyotasının çok önemli rol oynadığı son birkaç yılda ortaya çıkmıştır (Dickson ve ark., 2018). Solunum yolunun mikrobiyal kolonizasyonu, o bölgedeki bağışıklık hücrelerinin olgunlaşması

için gerekli sinyalleri sağlar (Gollwitzer ve ark., 2014). Bölgeye özgü mikrobiyota tarafından yerel bağışıklık düzenlemesinin ötesinde, bağırsak mikrobiyotasının uzak bölgelerdeki bağışıklık etkisi, özellikle pulmoner bağışıklık sistemi üzerinde artık tanınmaktadır (Chiu ve ark., 2017). Mezenterik lenfatik sistem; akciğerler ve bağırsak arasında, bu bölgelerdeki bakterilerin, onların parçalarının veya metabolitlerinin (örn., KZYA'lar) bağırsak bariyerinden sistemik dolaşıma geçip akciğerlerde immün yanıtı modüle ettiği bilinmektedir (Trompette ve ark., 2014; Bingula ve ark., 2017; McAleer ve Kolls, 2018).

Bağırsak ve beyinle benzer şekilde, bağırsak ve böbrek arasında da iki yönlü bir sinerji ilişkisi vardır. Bir yanda, trimetilamin-N-oksit (TMAO), p kresil sülfat ve indoksil sülfat gibi üremik toksinler (Meijers ve Evenepoel, 2011) mikrobiyal metabolizmadan ortaya çıkarken, diğer yanda bu üremi bağırsak mikrobiyotasının içerik ve metabolizmasının bozulmasına neden olur (Jiang ve ark., 2015). Bu metabolitler, vasküler ve renal toksisite gösteren konak-mikrobiyota etkileşimleri nedeniyle ortaya çıkar.

Yukarıda da bahsedildiği gibi bağırsak mikrobiyotasının kendinden oldukça uzak bölge ve organlarda bile o bölgedeki bağışıklık tepkisini modüle edebilmekte ya da ortaya çıkardığı metabolitler aracılığıyla oldukça önemli düzenleyici ya da zarar verici etkilerde bulunabilmektedir. Bu veriler de bağırsağın diğer organlarla olan iletişimini ve etkileşimini bize göstermektedir.

2.1.1.5. Mikrobiyota ve Bağışıklık Sistemi

Mikrobiyota, bağışıklık sisteminin mimarisinin (Peyer plakları gibi), spesifik bağışıklık hücre popülasyonlarının (düzenleyici T hücreleri gibi) gelişiminde ve bağışıklık hücre tipleri arasındaki dengenin şekillenmesinde rol oynar. Mikrobiyotadan en çok etkilenen gastrointestinal bağışıklık mimarisinin iki bileşeni, mukus tabakası ve Peyer plaklarını içeren bağırsakla ilişkili lenfoid dokudur (GALT) (Rautava ve ark., 2012). Mukoza tabakası, bakteri yönünden zengin olan bağırsak lümeni ve bağırsak epitelisi arasındaki

ayırıcı tabakadır. Bu bakteri içermeyen bölge, bağışıklık elemanları ile bakterilerin temasını engeller, aksi takdirde sürekli bağışıklık uyarımı ve iltihaplanma meydana gelecektir. Bu fiziksel ayırım, tek bir hücre kalınlığında olan epitel tabakasının bariyer fonksiyonunu güçlendirmeye yardımcı olur (Deplancke ve Gaskins., 2001). Bağırsak mikropları, mukus tabakasının korunması için gereken uyarımları sağlar. Mikrobiyotası olmayan hayvan deneyleri göstermiştir ki bu germ-free canlılar, vahşi tipte olan hayvanlardan daha ince mukoza tabakasına sahiptir. Bunun sebebiyse mikrobiyotanın bazı üyeleri, *Akkermansia muciniphila* ve *Lactobacillus* türleri gibi, mukus üretimine katkıda bulunmalarıdır (Everard ve ark., 2013).

Doğuştan gelen bağışıklık sistemi, mukus tabakasının sterilliğini korur. Bağırsak epitel hücreleri bakteri-mukoza temasını salgılanan antibakteriyel proteinlerle sağlamaktadır. Spesifik olarak Gram-pozitif bakterileri hedef alan, doğrudan bakterisidal bir C-tipi lektin olan RegIII γ RegIII γ , enterositler ve Paneth hücreleri dahil olmak üzere epitel hücreleri tarafından üretildiği distal ince bağırsakta (ileum) en belirgin şekilde eksprese edilir. Bağırsak epitel hücreleri, MyD88'e bağlı bir şekilde antibakteriyel RegIII γ üretir. RegIII γ ekspresyonu, mikrobiyota ve konağın fiziksel ayırımı ile ilişkilidir. RegIII γ 'nin bağırsak epitel yüzeyinin bakteriyel kolonizasyonunu kısıtladığı ve mikrobiyota tarafından kazanılmış bağışıklık tepkilerinin aktivasyonunu sınırladığını gösterilmiştir. RegIII γ negatif fareler, artmış kazanılmış immün aktivasyon, artmış fekal immünoglobulin (Ig)A ve lamina propria artmış Th1 hücreleri sergilemiştir. Bu artışların bağırsak mikrobiyotasına bağlı olduğu düşünülmüştür. Mikrobiyotanın bağırsak epitelinden bu fiziksel ayırımı, doğuştan gelen bağışıklık sisteminin, adaptif bağışıklık sistemi ile teması sınırlayarak bağırsak mikrobiyotasının toleransını koruduğuna bir örnektir (Vaishnava ve ark., 2011).

Sağlıklı bir mikrobiyota, kolonizasyona karşı kendi korumasını oluşturarak konağı ayrıca korur. Buna kolonizasyon direnci denmektedir. Mikroorganizmalar, epiteli, mukus tabakasına antimikrobiyal peptidler salgılaması için uyarır ve patojenlere karşı bir bariyer sağlar (Gareau, Sherman ve Walker, 2010). *Bifidobacterium* gibi kommensal bakteriler, *Enterohemorajik E. coli O157:H7* gibi enfeksiyonları önlemek için maddeler üretebilir. (Fukuda ve ark., 2011).

Mikrobiyota, bağışıklık toleransını destekleyen fiziksel bariyer üzerindeki etkisine ek olarak, GALT oluşumunu da uyarır. Germ free hayvanlarda yapılan çalışmalarda, GALT'taki germinal merkezlerin ve sekretuar IgA'nın azaldığı gösterilmiştir (Ibnou-Zekri ve ark., 2003). GALT tarafından üretilen IgA, immünomodülatör bir şekilde etki eder. Kommensal bir bakteri olan *Bacteroides fragilis*'in bir bileşeni olan bakteriyel polisakkarit A (PSA) ile temasa geçtiklerinde, lokal olarak IgA salgılamak için kazanılmış immün yanıtı uyarırlar. Lokal olarak üretilen bu IgA daha sonra bakteriyel antijeni kaplar ve doğuştan gelen bağışıklık tepkisinin aktivasyonunun azalmasına neden olur (Peterson ve ark., 2007). Bu şekilde GALT, bakteriyel antijenleri tanıyan ve bağışıklık tepkisini uyaran bağımsız bir bağışıklık sistemi olarak işlev görür, ancak yanıt mukozal bölgede tutulur ve böylece sistemik iltihaplanmadan kaçınılır. İsveçli bebeklerde yapılan bir araştırma, *Bifidobacterium* türlerinin artan çeşitliliğinin, alerji ve otoimmüniteye karşı koruma ile bağlantılı olan artan IgA ile ilişkili olduğunu göstermiştir (Sjogren ve ark., 2009).

2.1.1.6. Mikrobiyota ve Hastalık İlişkileri

Son on yılda, koruyucu bağırsak bariyerinin ilgili bakteriler ve metabolitleri ile doğrudan temas yoluyla güçlendirilebileceği hipotezi kurulduğundan sağlık ve hastalık durumunda mikrobiyota konusu üzerine yoğun ilgi olmuştur ve güncel Pubmed verilerine göre (05/05/2022) mikrobiyom ve hastalık ilişkileri üzerine toplamda 50,274 adet yayın bulunmaktadır. (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=microbiome+and+disease>). Yapılan bu çalışmalarda, bağırsak mikrobiyotası, potansiyel olarak yeni müdahale olanakları sunan fonksiyonel ve tanısal biyobelirteçler sağlayabilir. Tablo 2.1'de bu biyobelirteçlere örnek verilmiştir.

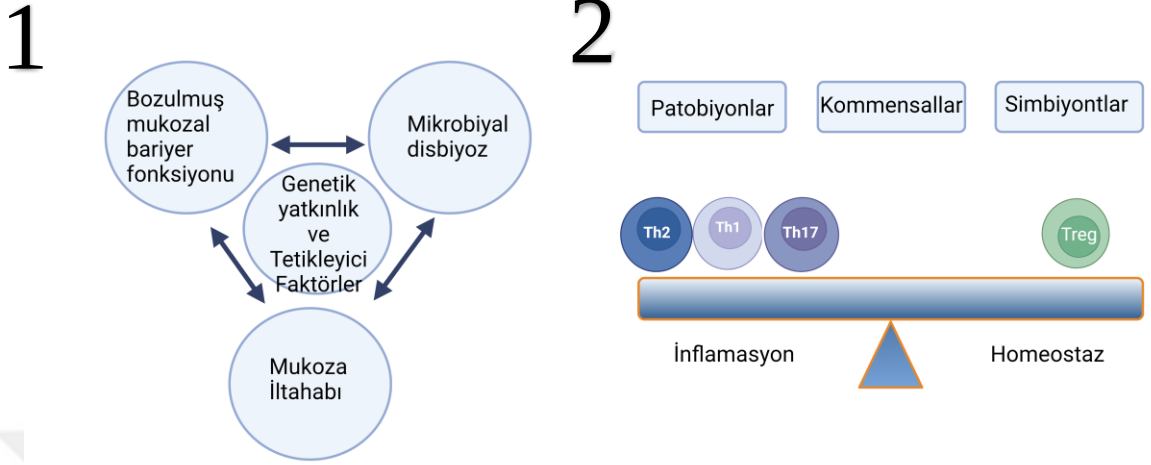
	Hastalıkla ilişkili Türler	Sağlıkla ilişkili Türler
Çölyak Hastalığı	<i>Ruminococcus torque</i> benzeri türler	<i>Bifidobacteria</i>
İnflamatuvar Bağırsak Hastalığı	<i>Ruminococcus gnavus</i> , <i>Ruminococcus torque</i>	<i>Faecelibacterium prausnitzii</i> <i>Akkermansia muciniphila</i>
Tip 1 Diyabet	-	<i>Bifidobacteria</i>
Multipl Skleroz * (MS)	<i>Methanobrevibacter*</i>	<i>Sutterella*</i>

Tablo 2.1. Bağırsak mikrobiyotasında potansiyel biyobelirteç olarak kullanılan bazı bakteri türleri ve ilişkili hastalıkları (Cheng ve ark., 2013). MS* (Schepici ve ark., 2019)

Sağlıklı mikrobiyota ve hastalık karşılaştırmalarında, genellikle mikrobiyal disbiyoz veya dengesizlik kavramı kullanılmaktadır (Cheng ve ark., 2013). Sorunlu mikrobiyota için kullanılan bu kavramlar, sağlıklı deneklerde gözlemlenen stabilitenin aksine, mikrobiyotada kalıcı rahatsızlıklara neden olan mikrobiyal ekosistemde esnekliğin olmaması ile ilgilidir (Zoetendal, Rajilic-Stojanovic ve de Vos 2008; Jalanka-Tuovinen ve ark., 2011). Bununla birlikte, mikrobiyal disbiyoz, sağlıklı kişilerde gözlenenin aksine mikrobiyota bileşiminde değişikliklerle ilişkilendirilmiştir. (Round ve Mazmanian, 2009). Otoimmün hastalıklarda inflamasyonu uyaranın, bağırsak mikrobiyotasındaki dengesizlik olduğu bulunmuştur. Mikrobiyal disbiyoz; simbiyont olarak da adlandırılan koruyucu bakterilerde bir azalma olarak kendini gösterir ve bu da mukozal bariyerin bozulmasına neden olur (Round ve Mazmanian, 2009). İnflamasyon patolojisinde mikrobiyal disbiyozun rolü biliniyor olsa da net olarak açıklanamamıştır. Artan proinflamatuvar bakteri veya patobiyont oranlarına sahip disbiyotik mikrobiyotanın, bağırsakta epitel sağlamlığını bozabileceği ve daha fazla inflamasyonu uyarabileceği öne sürülmüştür (Kirjavainen ve ark., 1999; Round ve Mazmanian, 2009; Pastorelli ve ark., 2013).

Mikrobiyotanın hastalıkla ilişkisi ile ilgili çalışmalarda, nedensellik mi korelasyon mu sorusu ele alınmıştır. Örneğin, bir cilt hastalığı olan sedef hastalarında sağlıklı kontrollerden farklı bir cilt mikrobiyotası gözlenmiştir (Alekseyenko ve ark., 2013),

ancak bu değişen mikrobiyotanın hastalığın nedeni mi yoksa değişen cilt dokusunun bir sonucu mu sorusuna cevap vermek yıllardır bilim insanlarını zorlamıştır. Son keşifler, değişen bir cilt mikrobiyotasının atopik dermatite (Kobayashi ve ark., 2015) neden olabileceğini belirtirken, sedef hastalarında değişen mikrobiyotanın, cildin fizyolojik değişikliklerinin bir yan etkisi veya bir etkisi gibi görüldüğünü ileri sürmüştür (Niehues ve ark., 2017). Mikrobiyota, doğrudan bir hastalığa sebep olmasa bile, mikrobiyal toplulukta sonradan meydana gelen değişimler diğer hastalıkların riskini artırabilir. Ek olarak, mikrobiyota, teşhis edilmesi zor hastalıklarda, özellikle Crohn hastalığı gibi, belirli hastalıkları veya alt tipleri test etmek için hala faydalı bir belirteç olarak kabul edilebilir (Knight ve ark., 2017). Bu alandaki kanıtların artması, bağırsak mikrobiyotasının bileşimi ve işlevindeki değişikliklerin, obezite (Maruvada ve ark., 2017), diyabet (Knip ve Honkanen, 2017), inflamatuvar bağırsak hastalığı (Ni ve ark., 2017) ve kanser (Kareva, 2019) de dahil olmak üzere bir takım kronik inflamatuvar hastalık ile ilişkili olduğu hipotezini desteklemektedir. Mikrobiyota ve hastalık ilişkilerine immünolojik perspektiften bakıldığında, çeşitli bakteri türlerinin Th1, Th2, Th17 ve Treg gibi pro- veya anti-inflamatuvar özelliklerle ilişkili olan farklı T hücre popülasyonlarının farklılaşmasını uyarabildiği görülmüştür. Th1/Th2 hücre popülasyonlarının oranı, otoimmün hastalıkların (Th1-polarizasyon) ve alerjilerin (Th2-polarizasyon) patogeneğinde önemlidir (Campbell, 2014). Bu nedenle, mikrobiyal disbiyozun kendisi birtakım farklı anomalilere de sebep olabilir; örneğin, bozulmuş epitel bariyer fonksiyonu, bağışıklık sisteminde düzensizlikler ve ardından mukozal inflamasyonun ortaya çıkışı gibi. (Cheng ve ark., 2013; Ohland ve Jobin, 2015; Round ve Mazmanian, 2009). Tetikleyici faktörlerden bağımsız olarak, bağırsak iltihabı, bağırsak homeostazında ilerleyici bir bozulma ile bir kısır döngü ortaya çıkarabilir (Cheng ve ark., 2013; Kirjavainen ve ark., 1999; Ohland ve Jobin, 2015). Bu da hastalığa sebep olan esas faktörün hangisi olduğunun bilinemediği bir duruma dönüşmektedir. Bu sorunu aşmak için, uzun dönemli çalışmalara, yani aynı bireylerde sağlıklı bir durumdan hastalık teşhisine kadar hastalık ilerlemesinin izlenmesinden elde edilen verilere ihtiyaç vardır (Cheng, 2016).



Şekil 2.2. Disbiyozisde bağışıklık sistemi ve mikrobiyotanın rolü. 1) Mikrobiyal disbiyoz, mukozal bariyer fonksiyonu ve inflamasyon arasındaki ilişki (Cheng ve ark. 2013'den modifiye edilmiştir). 2) Mikrobiyota homeostazından sorumlu T hücreleri (Round ve Mazmanian, 2009'dan modifiye edilmiştir).

ÇH'de duodenal ve/veya jejunal mikrobiyotaya odaklanan çalışmalar, literatürde oldukça sınırlıdır ve sıklıkla birbiriyle çelişen sonuçlar vardır. Ek olarak, mukozal mikrobiyota bileşimindeki farklılıklar, ÇH oluşma patogenezinde bozulmuş mikrobiyotanın bir etkisini değil de, iltihaplı bir ÇH mukozasının sonucu olarak bozulmuş bir mikrobiyotayı da temsil edebilir. Bu nedenle, ideal bir çalışmada aynı denekte, karşılaştırılabilir metodlarla yapılmış mukozal biyopsi ve dışkı mikrobiyota analizleri, bu verilerin yorumlanmasında dikkate alınması gereken olası farklılıklara ışık tutabilir (Valitutti ve ark., 2019).

2.1.2. Mikrobiyotaya Etki Eden Faktörler

2.1.2.1. GİS yapısına bağlı faktörler

Konağın mikrobiyota üzerinde etkisini gösterme yolları oldukça kompleks ve katmanlıdır. GİS'in farklı bölümlerindeki pH, oksijen seviyesi ve mukus içeriğindeki farklılıklar, bakteri yoğunluğunu, çeşitliliğini ve kompozisyonunu etkileyen ana unsurlardır. Mikrobiyota yoğunluğu, bağırsak içeriğinin gramı başına düşen bakteri hücresi sayısı olarak tanımlanır. Tablo 2.2'de Gastrointestinal sistem boyunca konak ortamı ve mikrobiyotanın bazı özellikleri verilmiştir. Tablodaki bakteri taksonları hem lümenal hem de mukozal taksonları içermektedir.

		Mikrobiyotanın özellikleri			Konak Çevresi	
		Çeşitlilik	Yoğunluk (cfu/g)	Ana Taksonlar	pH	Oksijen
Mide		Düşük	10^1 - 10^3	<i>Prevotella</i> <i>Streptococcus</i>	<3	Yüksek
İnce Bağırsak	Duodenum		< 10^4	<i>Prevotella</i> <i>Streptococcus</i> <i>Veillonella</i>	6.4	
	Jejunum		10^4 - 10^5	<i>Streptococcus</i> <i>Veillonella</i> <i>y-Proteobacteria</i>	6.6	
	İleum		10^7 - 10^8	<i>Streptococcus</i> <i>Bacteroidetes</i> <i>Clostridium cluster IV</i> <i>Clostridium cluster XIVa</i>	7.3	
Kolon		Yüksek	10^{10} - 10^{12}	<i>Actinobacteria</i> <i>Bacteroidetes</i> <i>Clostridium</i>	5.7-6.6	Düşük

Tablo 2.2. Gastrointestinal sistem boyunca mikrobiyota özellikleri ve konak ortamının özelliği. (Cheng, 2016; McGuckin ve ark., 2011; Lozupone ve ark. 2012; Ohland ve Jobin 2015; Zoetendal ve ark. 2012; Bik ve ark. 2006; Islam ve ark., 2011; Wacklin ve ark., 2013; Fallingborg ve diğerleri 1989; Leser ve Mølbak, 2009)

Çocukluktan yaşlılığa kadar tüm vücut fizyolojisindeki uzun vadeli değişiklikler, sağlıklı çocuklar, yetişkinler ve yaşlı kişiler arasındaki bağırsak mikrobiyota yapısına etki etmektedir (Sommer ve Bäckhed, 2013; Odamaki ve ark., 2016). Bununla beraber, kişiler arası genotip farklılıkları, çevre (diyet dahil) ve normal gastrointestinal sistem koşullarının tümü, mikrobiyal topluluğun bileşimini etkileyebilir.

2.1.2.2. Genetik

Bağırsak mikrobiyotasının genetik, diyet ve çevresel faktörler tarafından şekillendiği iyi bilinmektedir. Genetik etmenlerin de mikrobiyota üzerindeki etkisini gözlemleyen pek çok çalışma vardır. Bu tarz çalışmalar da dizayn edilirken en değerli kaynaklardan biri olan ikiz deneyleri; genetik ve epigenetik faktörleri aydınlatma konusunda oldukça kıymetlidir. Örneğin, mikrobiyota bileşimi, ikizler arasında, akraba olmayan iki kişiden daha benzer bulunmuştur (Tims ve ark., 2013; Turnbaugh ve ark., 2009). Yine de bu çalışmaları ele alarak benzer bağırsak mikrobiyotasını oluşturan nedenin, çevresel etkileri hesaba katmadan sadece genotip özellikleri olduğu sonucuna varılmamalıdır.

Genotipin mikrobiyotadaki elemanlara etkisi dolaylı ya da direkt olabilir. Dolaylı yolda, spesifik bazı bakteri tanıma reseptörlerinin, bakteriyel taksonları nasıl etkilediğinden bahsedilebilir. Örneğin, Nükleotid bağlayıcı oligomerizasyon alanı içeren protein 2 (NOD2), doğal bağışıklık hücrelerinin sitoplazmasında bulunan bir bağışıklık elemanı reseptörüdür. Bu reseptör, bağırsaktaki antiinflamatuvar yolakta önemlidir. Fareler üzerinde yapılan çalışmalar, NOD2 reseptörü knock-out edildiğinde farelerde *bifidobakteri* türleri bulunmadığından ve şiddetli ileitis (kronik ileum iltahaplanması) görüldüğünden bahsederek, NOD2'nin spesifik mikrobiyota taksonları üzerinde bir etkisi olduğunu ortaya koymuştur (Heimesaat ve ark., 2014). Diğer bir çalışmada, ÇH için risk aleli olan İnsan Lökosit Antijeni (HLA)-DQ2'nin erken yaş bağırsak mikrobiyota kompozisyonunu belirlediği görülmüştür; bu aleli taşıyan bebeklerin mikrobiyotasının, onları taşıyıcı olmayanlardan ayırdığı rapor edilmiştir. Ayrıca, azalan *Bifidobacterium* türleri ile artan çeşitli *Proteobacteria* türlerinin negatif korelasyonunun ÇH gibi bazı hastalıklar için genetik zemin hazırladığı görülmüştür. Bu kompozisyonun oluşumu, HLA-DQ2/8 alelleri olmayan deneklere kıyasla HLA-DQ2 yüksek genetik risk alel taşıyıcıları ile ilişkili bulunmuştur (Olivares ve ark., 2014). Bu tarz çalışmalara ek

olarak, metabolik sendromun risk aleli olan apolipoprotein A-V geninde görülen bir tek nükleotid polimorfizmi (SNP); yaş, cinsiyet ve metabolik sendromdan bağımsız olarak *Bifidobacterium* türlerinin bolluğunda önemli ölçüde azalış ile ilişkili bulunmuştur (Lim ve ark., 2016).

2.1.2.3. Diyet

Diyet, bağırsak mikrobiyotasının bileşimini ve fonksiyonunu modüle eden en önemli çevresel etmenlerden biri olarak kabul edilir. Tüm ana diyet bileşenleri; karbohidratlar, proteinler ve yağlar, bağırsak mikrobiyota bileşimi üzerinde cins düzeyinde dahi olabilen derin etkiler gösterir (Salonen ve de Vos, 2014). Genel olarak, konak tarafından sindirilebilir polisakkaritler, ince bağırsakta monosakkarit ve disakkaritlere parçalanır. Bu basit karbohidratların emilmeyen bir kısmı kolondaki yerleşik Proteobakterilerin ve *Lactobacillus* türlerini barındıran Firmicuteslerin büyümesini destekler (Koropatkin, Cameron ve Martens 2012). Bu noktada kısa zincirli yağ asitlerinin fonksiyonu ile benzer işlevdedirler. Bununla birlikte, mikrobiyota çapraz besleme ağlarına sahiptir, yani bakteriler enerji kaynağı olarak diğer bakterilerin metabolitlerini de kullanabilir. Diyet lifi veya müsinler gibi karmaşık substratların belirli bakteriler tarafından parçalanması diğer bakterileri besleyebilir. Bu tür çapraz beslenme ve mevcut besinlerin verimli kullanımı, mikrobiyal ekosistemi diyet değişikliklerine karşı daha dirençli hale getirmektedir. Bu nedenle mikrobiyotada günden güne değişiklik görülmeyebilir (Korpela ve ark., 2014; O'Keefe ve ark., 2015).

Uzun süreli veya alışılmış bir diyetin mikrobiyota yapısı üzerinde daha tutarlı ve derin bir etkiyle sonuçlandığı bulunmuştur (Salonen ve de Vos, 2014). Çeşitli çalışmalarda gösterildiği gibi, farklı etnik kökenlerin kafa karıştırıcı etkisi göz önünde bulundurulsa bile, batı toplumlarının mikrobiyotası, batılı olmayan popülasyonlarındakinden hala önemli ölçüde farklıdır (Schnorr ve ark., 2014; Ou ve ark., 2013). Genel olarak, avcı-toplayıcı tarzı kabileler (Schnorr ve ark., 2014) ve yerli Afrikalılar gibi doğayla yakın temas halinde yaşayan, lif temelli bir diyetle sahip insanlarda batılı popülasyonlara kıyasla daha yüksek mikrobiyal çeşitlilik ve düşük *Bacteroides/Prevotella* oranı gözlenir (Ou ve ark.,

2013). Bu gözlemler, mikrobiyota yapısının şekillenmesinde genel yapılan diyet veya bir tür belirgin beslenme değişiklikleri gibi çevresel faktörlerin, mikrobiyota üzerinde genotipten daha büyük bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Bu etki hem insan hem de hayvan deneylerinde, diyetle müdahale edilen çalışmalarda tespit edilmiştir (O'Keefe ve ark., 2015; Carmody ve ark., 2015). Afrika'nın kırsal kesimlerindeki beslenme tarzı genel olarak yüksek lifli ve düşük yağlıdır. Bu diyetten yüksek yağlı ve düşük lifli beslenmeye geçtiklerinde, potansiyel bütirat üreticilerinin ve kompleks karbohidratları kullanan bakteri taksonlarının varlıklarında azalmaya yol açmaktadır (O'Keefe ve ark., 2015). Diyetin mikrobiyota üzerindeki etkisi ayrıca anne sütüyle beraber ilk besini almamızdan itibaren kendini göstermektedir. Örneğin, anne sütü bebeklerin bağırsağındaki *Bifidobacterium* türlerinin kolonize olmasını teşvik etmektedir (Akobeng ve ark., 2006). Bu bakteri türleri bebek sağlığı ve anne sütü bağlantısında oldukça sık bahsedilmektedir. Hatta sadece anne sütünün diyetle dahil olması değil süresinin de mikrobiyota üzerindeki etkisi incelenmiştir. (Akobeng ve ark., 2006) yaptığı retrospektif çalışmalarda; daha uzun süreli emzirilmenin ve özellikle glutenli besinlere başlandığında anne sütüne devam edilmesinin çölyak hastalığı riskini azalttığı veya başlangıcını geciktirdiğini göstermiştir. Bu çalışmaya ek olarak başka çalışmalar da yapılmış ve anlamlı bir fark bulamamışlardır. O nedenle henüz anne sütünün çölyaka karşı koruyuculuğunu veya hastalığa etkisi konusunda ileriye dönük çalışmalar yoktur.

2.1.2.4. Antibiyotikler

Antibiyotikler ve yaygın olarak kullanılan diğer ilaçlar, mikrobiyotanın bileşimini önemli ölçüde değiştiren; buna bağlı olarak hastalık ve sağlık durumlarındaki mikrobiyotanın potansiyel fonksiyonunu gözlemleyebileceğimiz kadar net etkileyen çevresel faktörlerdir (Zeissig ve Blumberg, 2014).

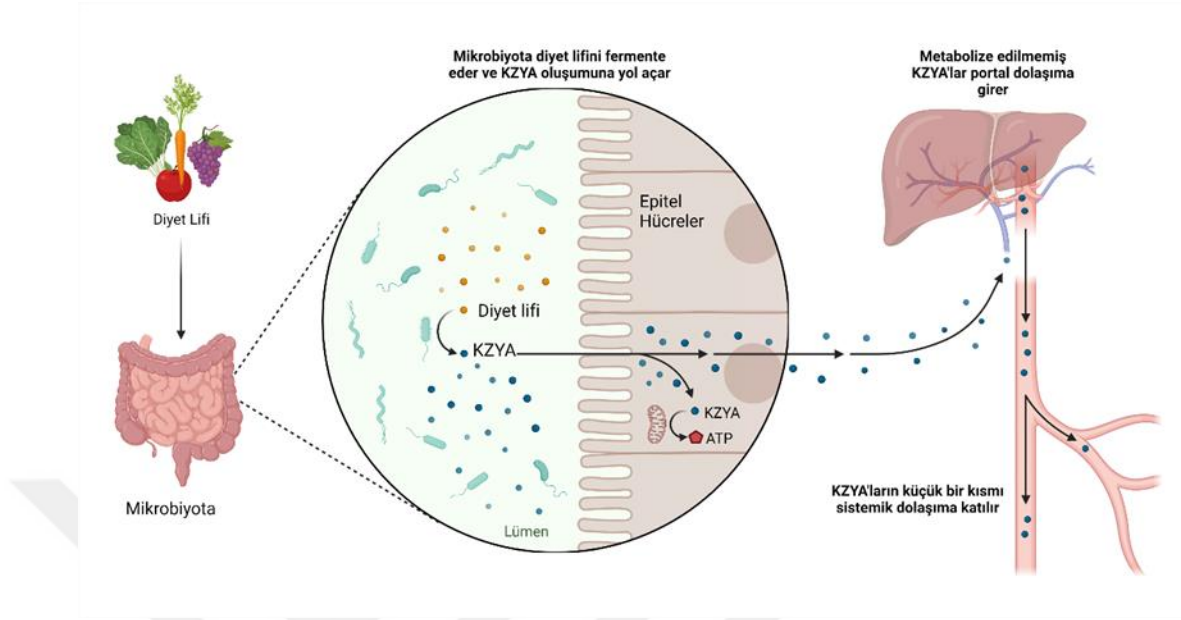
Antibiyotik özelinde tedavinin doğası sebebiyle bakterinin kendisine ek olarak vücudun diğer bölgelerinde de hedef bakteriye benzer türlerde azalışa sebep olacağı bilinmektedir. Bu bakterilerin büyük çoğunluğunun bağırsaklarımızda bulunduğunu göz önüne alınca bağırsak mikrobiyotasında ne kadar büyük değişikliğe yol açacağını tahmin etmek mümkündür. Antibiyotik tedavisinin süresi ve antibiyotik tipi de mikrobiyota üzerindeki değişimin kalıcı ya da geçici olmasını belirlemektedir. Buna örnek olarak;

makrolid sınıfı antibiyotik tedavisinin hem genel mikrobiyal zenginlik hem de spesifik mikrobiyota bolluğu üzerinde penisiline göre çok daha güçlü bir etki gösterdiğini bildirilmiştir (Korpela ve ark., 2016). Hatta bu fark o kadar fazladır ki makrolid tedavisinden 2 sene sonra dahi mikrobiyal zenginlik tedavi öncesindeki kontrol seviyesine gelememiştir. Penisilin tedavisinde 6 ay sonra mikrobiyal zenginlik yönünden anlamlı düşüş yaşanmadan devam etmektedir (Korpela ve ark., 2016). Siprofloksasin ve vankomisin tedavilerinden sonra da makrolid grubuna benzer sonuçlar görülmüş ve mikrobiyotadaki çeşitlilik ve bolluk tedavi öncesi seviyelerine gelememiştir. Bu tedaviler hatta hastalık ile ilişkili olan *Proteobacteria* türlerinin sayısında artışa sebep olmuştur (Vrieze ve ark., 2014, Dethlefsen ve Relman, 2011).

Yakın zamanda, antibiyotik kullanımı ile diğer inflamatuvar bağırsak hastalıklarda olduğu gibi, çölyak hastalığının ortaya çıkışı arasında da bağlantı bildirilmiştir. Bu bağlantı antibiyotiğe bağlı mikrobiyota bozulmasının ÇH başlangıcı ve patogenezindeki rolünü düşündürmekte ve gelecek araştırmalar için önemli bir yer tutmaktadır.

2.1.3. MİKROBİYOTANIN KONAK ÜZERİNDE ETKİSİ

Bağırsak mikrobiyotası, beraber yaşadığı konağın büyümesini desteklemek için besinlerden gelen enerjinin verimini arttırmak da dahil olmak üzere çeşitli sindirim süreçlerine katılır. Günlük kalori ihtiyacının yaklaşık %5'inin, diyet lifi olarak da adlandırılan sindirilemeyen besin artıklarının fermentasyonu ile sağlandığı tahmin edilmektedir (Frayn, 2010). Diyetimizde yer alan lifin fermentasyonu konak için çok önemli metabolik yollardan biridir. Asetat, propiyonat ve bütirat ve daha fazlası da olmak üzere kısa zincirli yağ asitleri (KZYA) gibi metabolitler bu yolla üretilir (Frayn, 2010). Kısa zincirli yağ asitleri sindirilemeyen karbohidratların, diyet lifi de diyebiliriz, bağırsaktaki fermentasyonu sonucu ortaya çıkan ilk fermentasyon ürünleridir. Bu sayede ve sindirilemeyen karbohidratlar, bağırsak mikrobiyotamız ve onun barındığı bağırsak çevresi tarafından kullanılabilir hale gelir; ufak bir kısmı da dolaşıma katılıp vücudun diğer yerlerindeki fonksiyonlarını yerine getirirler (Şekil 2.3.).



Şekil 2.3. Kısa zincirli yağ asitlerinin metabolizması.(BioRender ile oluşturulmuştur).

IBH gibi hastalıklarda mikrobiyotadaki değişiklik, azalan bakteriyel çeşitlilik ve *F.prausnitzii* gibi bütirat üreten bakterilerin sayısındaki azalma ile ilişkilendirilmiştir. Hatta benzer çeşitlilik kaybı, sedef romatizması yaşayan hastalarda da görülmüş ve mikrobiyota ve onun metabolitlerinin immün düzenleyici rolü üzerindeki bağlantılarını güçlendiren sonuçlar elde edilmiştir (Scher ve ark., 2015). Bunlar gibi çok sayıda çalışma, farklı kısa zincirli yağ asitlerinin azalışı veya mikrobiyotadaki bozulmaya bağlı KZYA miktarındaki düşüş ile ortaya çıkan farklı problemlerden bahsedilmiştir (Morrison ve Preston, 2016). Ayrıca mikrobiyota, B ve K vitaminleri, folik asit ve biyotin gibi vitaminlerin sentezlenmesine katılır ve konağın demir emilimini çok yakından etkiler (Floch, 2005; Deschemin ve ark, 2016). Ayrıca mikrobiyota ve ürünleri, konağı endojen veya eksojen tehditlere karşı koruyan hem fiziksel hem de immünolojik bariyerlerle çift yönlü bir ilişki içerisinde (Bischoff ve ark, 2014).

2.1.3.1. Fiziksel Bariyer Oluşumunda Mikrobiyota

İnce bağırsağımız boyunca fiziksel bariyer olarak görev yapan yapıları; mikrobiyota, mide özsuyu, pankreatik enzimler, mukus ve epitel monolayer oluşturur (Viggiano ve ark., 2015). Epitel monolayer, farklı tipte bağırsak epitel hücrelerinden (BEH) ve sıkı bağlantılar (TJ) gibi hücreler arası bağlantılardan oluşur. Kriptlerde bulunan kök hücrelerden meydana gelen BEH'ler dört ana hücre tipini meydana getirirler; bunlar enterositler, goblet hücreleri, enteroendokrin hücreler (EEH) ve Paneth hücreleridir. (Turner, 2009; Umar, 2010). Enterositler, tüm ince bağırsak epitel hücrelerinin 'inden fazlasını oluşturan, yukarıdakilerden en baskın olan hücre tipidir (Umar, 2010). Goblet hücreleri, mukus yenilenmesi ve epitel hücrelerin büyümesi ve onarımı için ihtiyaç duyulan çeşitli müsinleri ve trefoil peptidleri üretir (Umar, 2010). Enteroendokrin hücrelerin çok önemli görevleri vardır. Bunlar gıda alımını, bağırsak geçişini, sindirim enzimlerinin salınımını, bağırsak fiziksel bariyer fonksiyonunu ve bağışıklık tepkilerini düzenleyen hormonları salgılamaktır; hatta hormon salgısına ek olarak birçok hormonun da prekürsörünü eksprese etmektedirler (Furness ve ark., 2013).

Paneth hücreleri, villöz kriptte üretilen rejenere edici adacık türevi protein 3 (RegIII) ve antimikrobiyal peptidleri (AMP'ler) yenileyen defensinleri salgılar (Bischoff ve ark., 2014). Tüm bu antimikrobiyal ürünler ve salgılayıcı IgA (sIgA), normal bağırsak epiteli homeostazını sürdürmek için ve kriptlerdeki bakteri kolonizasyonunu sınırlamada önemlidir (Bischoff ve ark., 2014). Sıkı bağlantılar (Tight junctions), bağırsak geçirgenliğini ve enterosit polaritesini kontrol etmek için gerekli bir yapı olarak kabul edilir (Turner, 2009; Bischoff ve ark., 2014). Zonulin ve F-aktin gibi proteinlerle beraber sıkı bağlantılar sağlam, bağırsak geçirgenliğini düzenleyen, sızdırmaz bir yapı oluştururlar. Bu bariyerin yıkılması bağırsak boşluğundaki antijenlerin, mikrobiyotanın ve toksik ürünlerinin lenf ve kan dolaşımına sızmasına yol açar (Turner, 2009). Bağırsak mikrobiyotasının kendisi ekolojik nişler ve besinler için patojenlerle rekabet ederek doğal bir savunma bariyeri oluşturur (O'Hara ve Shanahan, 2006). Ayrıca mukozanın en uygun şekilde çalışması için gerekli molekülleri işler ve bağırsak bariyer fonksiyonunu güçlendirir. Mesela KZYA'lar, özellikle kolondaki bütrik asit, enterositler için önemli bir enerji kaynağı sağlar ve sağlıklı veya kolon kanseri hücre fenotiplerinde BEH'lerin

farklılaşmasını ve çoğalmasını kontrol eder (Comalada ve ark., 2006; Ulluwishewa ve ark., 2011; Leonel ve Alvarez-Leite, 2012). Ayrıca, KZYA müsin üretimini destekler ve sıkı bağlantı proteinlerinin ekspresyonunu arttırmak gibi önemli görevleri vardır (Peng ve ark., 2009; Plöger ve ark., 2012).

2.1.3.2. İmmünolojik Bariyer Olarak Mikrobiyota

Bağırsak epitelini fiziksel bir bariyer gibi değil de dinamik yaşayan bir sistem gibi düşünmek gereklidir. Burada salgılanan moleküller de özel koruyucu immünolojik bir bariyer oluşturur. Ayrıca, Lamina Propria (LP) içinde bulunan bağışıklık hücreleri istilacı mikroplarla onları ortadan kaldırmak için savaşır (Peterson ve Artis, 2014). Bağırsak mikrobiyotası, özellikle kommensal bakteriler hem doğuştan gelen hem de adaptif immünolojik aktiviteler dahil olmak üzere, bağışıklık sistemini eğitmek ve bağırsakta bağırsak homeostazını sürdürmekte yer alırlar. Örneğin, mikropsuz (germ-free) hayvanlar normal bağışıklık sistemi geliştiremezler (Round ve ark., 2009).

Lamina propriada bulunan Peyer plakları (PP), bağırsak lümeninden antijen numunesinin alınıp bağışıklık tepkilerinin başlangıcının ve düzenlenmesinin gerçekleştiği bağırsakla ilişkili bir lenfoid dokudur (GALT). İnce bağırsakta, lümen antijenlerinden örnek alınması M (mikrofold) hücreleri veya dendritik hücre (DH) gibi özel hücreler tarafından başlatılır ve bu hücreler bağırsak lümen içeriğini örneklemek için epitelden geçebilirler. M hücreleri tarafından sunulan bir antijen ayrıca makrofajlar, B hücreleri ve DH'ler dahil profesyonel antijen sunan hücrelere aktarılabilir (Furness ve ark., 2013). Bu da bağırsak mikrobiyotasının immünolojik bariyer oluşturma konusunda nasıl kritik bir rol oynadığını bize göstermektedir.

Kommensal bakteriler, savunma veya toleransa yönelik T hücre popülasyonlarından olan naive-CD4⁺ T hücre farklılaşmasının uyarılmasında çok önemlidir (Campbell, 2014). T helper 1 (Th1), Th2 ve Th17, hücre aracılı bağışıklığı, humoral bağışıklığı ve fagositik granülositlerin alımını destekleyen savunmaya yönelik T hücre tipleridir. Düzenleyici T hücreleri (Treg) ise bu üç bağışıklık tepkisi arasındaki dengeyi sağlar ve immün baskılayıcı özelliklere sahiptir (Campbell, 2014; Ohland ve Jobin, 2015).

Farklılaşmış T hücre popülasyonları, salgıladıkları sitokinler ile birlikte, pro-inflamatuvar veya anti-inflamatuvar bağışıklık profillerinin baskınlığını belirleyebilir. Buradaki sitokin oranlarındaki dengenin bağırsak immün homeostazını korumanın bir yolu olarak erken yaşta normal bağırsak mikrobiyotasına karşı toleransı başlattığına inanılmaktadır. (Di Mauro ve ark., 2013).

Bütirat, propiyonat ve asetat gibi çokça bilinen kısa zincirli yağ asitleri, bağışıklık sistemi üzerinde kritik etkiler gösterir. Özellikle, bütirat gibi belirli KYZA'lar, sIgA üretimini uyarabilir (Kim ve ark., 2016), düzenleyici T hücrelerinin farklılaşmasını ve çoğalmasını teşvik edebilir (Smith ve ark., 2013), Nf-kB aktivasyonunu inhibe edebilir ve böylece anti-inflamatuvar ajanlar gibi davranırlar (Vinolo ve ark., 2011). Özetle, bağırsak mikrobiyotamız, bağırsak epitel hücreleri ve bağışıklık sistemi arasında karmaşık bir ilişki vardır. Bağırsak sağlığını korumak için kommensallere karşı abartılı reaksiyondan kaçınırken patojenlere karşı yeterli düzeyde savunma sağlamak içinse etkileşimlerinin dengelenmesi gerekir.

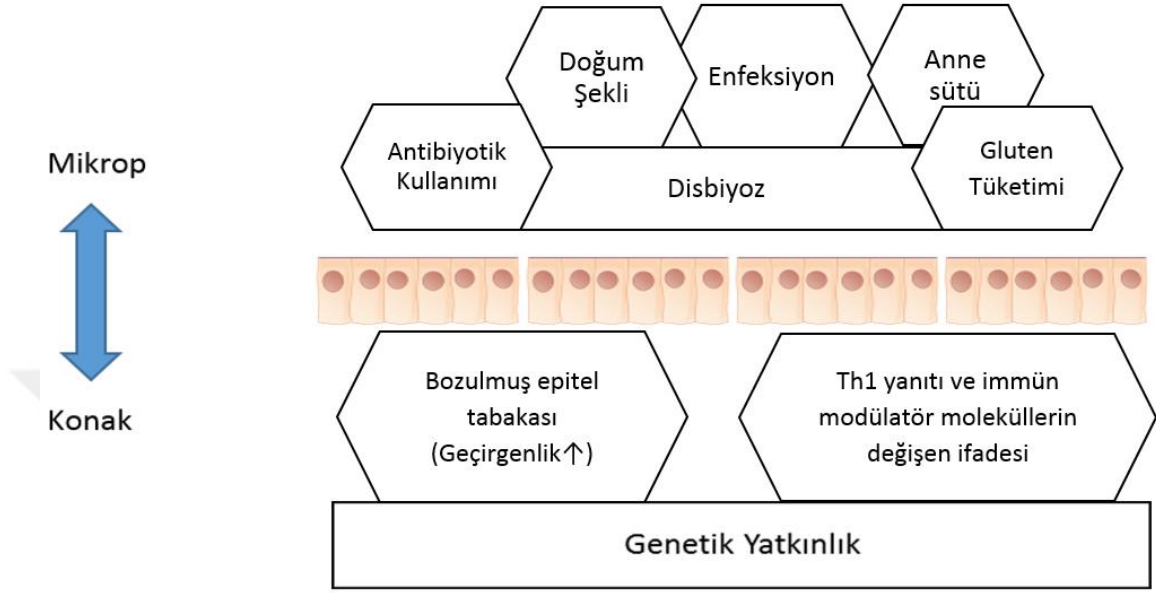
2.2. Çölyak Hastalığı Ve Mikrobiyota

2.2.1. Çölyak Hastalığı

2.2.1.1. Çölyak Tanımı

ÇH, hastalığa genetik yakınlık sebebiyle duyarlı kişilerde (HLA DQ2/8 pozitif) buğday, arpa, çavdar gibi diyetle alınan glutenin yol açtığı kronik, bağışıklık aracılı bir enteropatidir (Robert ME. ve Gibson J., 2014). Yüz seneden daha uzun bir süre önce tanımlanmış olmasına rağmen ancak 20. yüzyılın ortalarında gluteninin patogenezdaki rolü kabul edilmiştir (Dicke WK, 1950). Hastalığın patogenizinde çevresel faktörler, genetik ve bağışıklık tepkisi önemlidir.

Şekil 2.4'te hastalığın ortaya çıkmasında rol alan sık bilinen faktörler toplu bir şekilde gösterilmektedir.



Şekil 2.4. Çölyak hastalığının ortaya çıkmasında rol oynayan faktörler (Cheng, 2016).

2.2.1.2 Çölyak Prevelansı

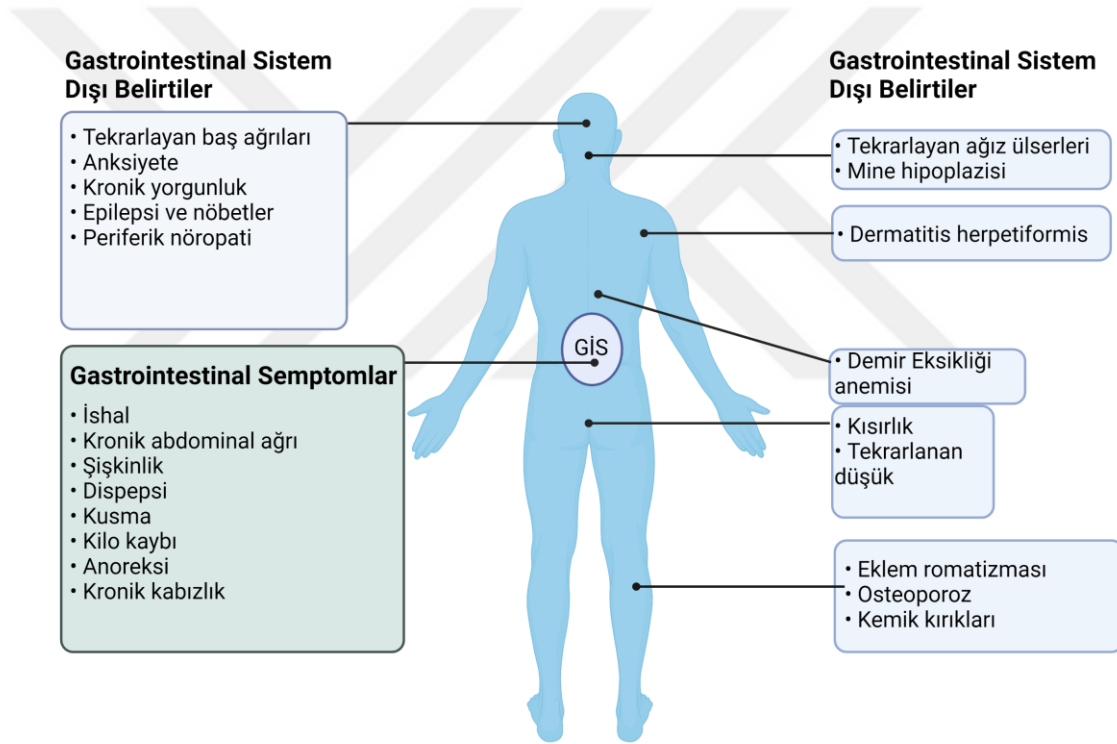
Çölyak hastalığı dünya çapında bir dağılıma sahiptir ve genel popülasyonun yaklaşık %1'inin çölyak olduğu kabul edilir ancak Avrupa kökenli popülasyonlara sahip ülkelerde, özellikle İsveç'te (Ludvigsson JF ve ark., 2013) ve Finlandiya'da (Maki M. ve ark., 2003) daha sık görülmektedir.

Sadece Avrupa'da değil, Asya'da da %1 civarında yaygınlık oranları gösterilmiştir (Singh P ve ark., 2016). Sahra altı Afrika'dan alınan veriler oldukça önemli bir farkla daha düşük seviyelerde ÇH prevalansını işaret etmektedir (Cataldo F. ve ark., 2002). Ayrıca, Afrikalı Amerikalılar arasında da ÇH nadir görülmektedir (Choung RS ve ark., 2017). ÇH kadınlarda erkeklerden daha sık görülür ve erken çocukluktan geç yetişkinliğe kadar ortaya çıkabilir. (Robert ME. ve Gibson J., 2014). Doktorların yeterli farkındalığının olmaması veya başvuru anında hem yaş hem de klinik semptomlardaki değişkenliğin çok fazla olması nedeniyle, semptomların başlangıcı ile tanı arasında

genellikle 10 yıllık bir gecikme vardır ve bu süre zarfında hastalar sıklıkla doktordan doktora yardım aramaya gittiklerini bildirmişlerdir.

2.2.1.3. Klinik Özellikleri ve Semptomlar

Klinikte en sık görülen semptomlar abdominal rahatsızlık, ishal ve karın ağrısıdır. Bununla birlikte, birçok hastada gastrointestinal belirtiler yoktur ve boy kısalığı, kısırlık, nörolojik bozukluklar veya dermatitis herpetiformis dahil olmak üzere başka belirti ve semptomlar sergiler (Patel ve Robert, 2022) (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Çölyak hastalığının klinik semptomları (Patel ve Robert, 2022; Caio ve ark., 2019).

Gizli çölyak hastalığı olan erişkinlerde, yorgunluk şikayetleri demir eksikliği anemisi veya osteoporoz varlığını ortaya çıkarabilir ve bu da sonuçta doğru tanıya yol açar. İlginç bir şekilde, bazı hastalar tamamen asemptomatiktir ve başlangıçta yalnızca biyopsi analizinde histolojik değişikliklerle tanı konur. Klinik sunum şeklini belirleyen faktörler tam olarak anlaşılmamıştır (Caio ve ark., 2019).

Çalışmalar, klinik semptomların belirleyicisi olarak, glutene duyarlı hale getirilmiş T lenfositlerin bir promotörü ve lokal sitokin üretiminin en önemli uyarılarından olan interlökin (IL)-15'e odaklanmıştır (Abadie V. ve Jabri B., 2014; Jabri B. ve Sollid LM, 2009)

2.2.1.4. Çölyak Patogenezi

ÇH, literatürde otoimmün özelliklere sahip T hücre aracılı inflamatuvar bir hastalık olarak adlandırılır. Gliadin ile indüklenen T hücresi yanıtı, spesifik ve doğuştan gelen (innate) bağışıklık bileşenlerini içerir. Bu tepkilerden ilki lamina propriadaki CD4+ T hücrelerin, ağırlıklı olarak antijen sunan hücrelerin (APC'ler) hücre yüzeyindeki HLA-DQ2 veya -DQ8 molekülleri tarafından sunulan deamide gluten peptidlerine karşıdır (Sollid LM, 2002).

Hastaların %95'i MHC II HLA –DQ2 (çoğunlukla) ve DQ8 genlerinden birini taşımaktadırlar ancak tabi ki bu genetik fenotipleri hastalığın patogenezi tam olarak yansıtmamaktadır çünkü sağlıklı popülasyonun %30'u DQ2 genini herhangi bir hastalık belirtisi göstermeden taşımaktadır (Sollid LM ve Thorsby, 1993). Gliadin peptidleri, epitel bariyerini geçerek lamina propriadaki T-lenfositleri aktive eder. Uyarılan CD4+ T-lenfositleri, yüksek seviyelerde proinflamatuvar sitokinler üretir, bu da IFN-gama'nın hakim olduğu bir Th1 modelini ve bir Th 2 modelini indükler, bu da plazmada farklılaşan B-lenfositlerin sayı artışı ile (klonal genişleme) sonuçlanır (anti-gliadin ve anti-doku-transglutaminaz antikorları salgılayan hücrelerin oluşması) (Björck S. ve ark., 2015).

Yetişkinlerde, CD4 +T hücre yanıtı esas olarak α -gliadin 33-mer amino asit peptidine yöneliktir. Gliadin, glutamin kalıntılarını deamidasyon yoluyla negatif yüklü glutamat kalıntılarına dönüştürebilen doku transglutaminaz enzimi için iyi bir substrattır (Dieterich W ve ark., 1997). Bu süreçte gliadin negatif yüklü hale gelir ve antijen sunan hücreler üzerindeki DQ2 ve DQ8 moleküllerinin yüzeyi reseptörlerine bağlanmayı kolaylaştırır. Bu deamidasyon, CD4 antigliadin T hücre tepkisini belirgin şekilde artırır (Molberg ve ark., 1998). Bağırsakta antigliadin bağışıklık yanıtı geliştikçe, antitransglutaminaz antikorları ortaya çıkar. Bu antikorların hastalığın patogeneziindeki

rolleri açık olmasa da serum IgA antikorları kript epitel hücre farklılaşmasını inhibe eder (Halttunen ve Maki, 1999) ve immün kompleksler kompleman sistemini ve Fc reseptörlerini aktive ederek inflamatuvar yanıtları tetikleyebilir.

T-lenfositler tarafından tanınmayan bazı gliadin peptidleri, hem antijen sunan hücreleri hem de bağırsak epitel hücrelerini aktive eder; özellikle, CD8+ T-lenfositler, interlökin (IL)-15 tarafından uyarılabilir. Bu da artmış CD8+ intraepitelyal hücre yoğunluğu ile ÇH'nin ayırt edici özelliği olarak kabul edilir (Troncone ve Jabri, 2011). Bu mekanizmada ilk olarak, doğal öldürücü (natural killer-NK) hücrelerin reseptörü NKG2D'yi eksprese eden intraepitelyal CD8+ T hücreleri, stres kaynaklı MIC (MHC class I chain) moleküllerini eksprese eden epitel hücrelerini öldürebilir. İkinci olarak, bazı bilimsel çalışmalar CD4+ T hücreleri tarafından tanınmayan peptidlerin epitel değişiklikleri önceden indükleyebileceğini ve stresli epitel hücrelerini öldürmek için sitolitik NKG2D yolağını harekete geçiren epitel hücreler üzerinde IL-15 ve MIC moleküllerini indükleyebileceğini düşünmektedir. Yine de henüz glutenin epitel hücrelerindeki stres moleküllerinin ve IL-15'in ekspresyonunu nasıl tetiklediği ve lamina propriadaki CD4+ T hücre yanıtı ile epiteldeki CD8+ T hücreleri arasındaki ilişki hala açık değildir (Hue S. ve ark., 2004).

Buğday, arpa, ve çavdarda gastrik, duodenal ve pankreatik enzimler sonucu parçalandıktan sonra ortaya çıkan ve T hücrelerini aktive edebilen yüzlerce immünojenik peptid tanımlanmıştır (Cebolla ve ark., 2018). Bununla birlikte, gluten peptidlerinin tümü çölyak hastalarına eşit derecede zararlı değildir, çünkü bu peptidlerde bulunan epitopların sayısı farklı tahıllar ve tahıl türleri arasında büyük farklılıklar gösterebilir (van Herpen ve ark., 2006).

Ciccocioppo ve arkadaşları, gluten peptidlerinin toksik ve immünojenik olmak üzere iki gruba ayrıldığını öne sürmüşlerdir. Her iki yol da, bağırsak hasarının kronik sürecini sürdürmek için etkileşime girer ve birbirini güçlendirir. Bazı peptidler, çölyak hastalarının ince bağırsağından alınan biyopsilere "ex vivo" uygulandıklarında T hücresi aracılı olmayan mukozal hasarı uyardıkları görülmüştür (Ciccocioppo ve ark., 2005). Gluten İmmünojenik Peptidler, çölyak hastalarının periferik kanından izole edilen T hücre dizilerini spesifik olarak uyaran diziler içerir. Bir peptid immünojenik olarak

tanımlandığında, toksik özelliklere sahip olup olmadığına bakılmaksızın çölyakla ilişkili ve tetikleyici olarak kabul edilir (Slot ve ark., 2016). Bu tür T hücresi olmayan aktif peptid (non-T cell active peptide) için toksisite mekanizması henüz net değildir ve peptidlerin bu sınıflandırması hakkında geniş bir fikir birliği yoktur. Birkaç çalışma, α -gliadinlerden türetilen peptidlerin, hastaların büyük çoğunluğunda güçlü yanıtlar indüklediğini, diğer peptidlere verilen yanıtların ise daha az olduğunu göstermiştir (Cebolla ve ark., 2018).

Adaptif bağışıklık tepkisini indüklemek için birkaç gliadin peptidi tarif edilmiştir, ancak bunların çoğu mide, pankreas ve bağırsak proteazları tarafından sindirilir. İyi bilinen iki ana peptid sindirilmeden kalır: 33-mer (p55-87) ve 25-mer (p31-55). Bu iki peptid, gluten alımından sonra çölyaklı hastaların bağırsağında in vivo olarak aktiftir (Nanayakkara ve ark., 2013).

Gliadin peptidlerinin mukozaya nasıl girdiği hala bilinmiyor olsa da gastrointestinal enfeksiyonların neden olduğu doku hasarı veya zonulin'in (tight junction parçalanmasını ve ardından bağırsak geçirgenliğinde bir artışa neden olan bir protein) artması ile ilgili olabilir (Fasano ve ark., 2000).

2.2.1.5. Çölyak Hastalığı Tanısı

ÇH tanısında kandan antikor tarama testleri kullanılmaktadır. Doku Transglutaminaz Antikorları (tTG-IgA) testi, gluten tüketen çölyak hastalarının yaklaşık %98'inde pozitifdir. Aynı test, ÇH olmayan sağlıklı kişilerin yaklaşık %95'inde negatif çıkacaktır. tTG testi ÇH için en duyarlı testtir ancak nadir de olsa da, negatif çıkabilir. ÇH tanısında kan testlerinin doğru olması için gluten içeren bir diyetle olmak önemlidir (Al-Toma ve ark., 2019).

Ayrıca, özellikle tip 1 diyabet, otoimmün karaciğer hastalığı, Hashimoto tiroiditi, psoriasis veya romatoid artrit gibi otoimmün bozukluklar, veya kalp yetmezliği olan ve ÇH olmayan kişilerde yanlış pozitif test sonucu riski de vardır.

ÇH'yi teşhis etmedeki altın standart ince bağırsak biyopsisidir (Caio ve ark., 2019). Glutensiz diyetle başlandıktan sonra klinik bulguların düzelmesi yaklaşık 1-2 hafta

içindedir. Mukozal histolojinin düzelmesi ise 6 ayı bulmaktadır. Tanı için özgün antikorlar da gluten kesildikten sonra 6 ay ila 1 sene arasında görünmez olmaktadır (Ventura ve ark., 1999).

2.2.1.6. Çölyak Hastalığı tedavisi ve Glutensiz Diyet

ÇH'nin bilinen tek tedavisi ömür boyu glutensiz bir diyetdir; ancak glutensiz diyetle rağmen semptomları hala devam eden hastaların sayısı da oldukça fazladır. Hastalara tüm glutenden (buğday, çavdar ve arpa) kaçınmaları tavsiye edilir, ancak bunun ne anlama geldiği konusunda fikir birliği yoktur ve glutensiz diyetle rağmen semptomların devam etmesinin ardındaki olası sebep de istemeden tüketilen gluten ya da kronik kabızlık gibi düşük lif tüketimine bağlı oluşan tanı konmamış gastrointestinal rahatsızlıklardır (Dewar ve ark., 2012; Paarlahti ve ark., 2013).

Buğday, dolayısıyla gluten batı diyetinde hemen hemen her yerde bulunur. "Glutensiz" ürünlerin eser miktarda gluten içerdiği Finlandiya'da çoğu hasta iyi durumdadır. Biyopsileri normalleşmiştir ve glutensiz bir diyet uygulayan genel hastalarda ölüm oranında artış olmamaktadır. Bununla birlikte, New York'ta, glutensiz bir diyetle rağmen duodenumdaki mukozal anormallikler devam edebilir, bu da Amerika Birleşik Devletleri'ndeki gibi büyük kentsel alanlarda glutensiz bir diyetin daha zor olabileceğini düşündürmektedir. (Collin P ve ark., 1994).

Hastalar, doğal olarak glutensiz olan unlar ve tahıllar hakkında bilgi sahibi olmalıdır. Bunlara pirinç ve mısırın yanı sıra patates ve kestane unu, teff, darı, kinoa, karabuğday ve amarant dahildir. Buğday, çavdar ve arpadan elde edilen un genellikle demir, tiamin, riboflavin ve niasin ile takviye edilir; bununla birlikte, glutensiz ürünler genelde pirinç bazlıdır ve bundan dolayı takviyeli ürünler değildir. Buna bağlı olarak glutensiz diyet, B vitaminleri ve demir açısından düşüktür. (Thompson T., 2000; Hallert C. ve ark., 2002). Yulaf tüketimi hastalar için bir ikilem olmaya devam etmektedir. Çok sayıda çalışma, çölyak hastalarının çoğunun yulafı tolere ettiğini göstermiştir (Peraaho M. ve ark., 2004; Storsrud S. ve ark., 2003). Bununla birlikte, bazı çölyak hastaları da yulafa

karşı bir bağışıklık tepkisi geliştirir ve lif artışına bağlı olarak gastrointestinal semptomlar yulaf tüketildiğinde daha sık görülür (Arentz-Hansen H. ve ark., 2004).

Gelişmekte olan ülkelerde çölyak hastalığı teşhisi konan kişiler, glutensiz bir diyeti sürdürmek için büyük zorluklar yaşamaktadır. Yüksek gıda fiyatları, yetersiz gıda etiketlenmesi, restoranlarda menüde bilgi eksikliği, ilaçlarda gluten içeren ürünlerin kullanımı gibi sebeplerden ötürü diyetlerine bağlı kalmakta zorluk yaşamaktadırlar. Glutensiz diyetle uyumda karşılaşılan kısıtlamalar nedeniyle yaşam kalitesi önemli bir konudur. Amerika Birleşik Devletleri'nde ankete katılan hastalar, çölyak hastalığı tanısı konulduktan ve glutensiz bir diyetle başladıktan sonra yaşam kalitesinde ve sağlıklarında iyileşme bildirmişlerdir (Green PHR ve ark., 2001). Bununla birlikte, yukarıdaki diyeti sürdürmekteki zorluklar sebebiyle yaşam kalitesi üzerinde olumsuz etki bildiren çalışmalar da vardır (Usai P ve ark., 2002).

2.2.2. Duodenal Mikrobiyota

GİS boyunca, farklı bölgelerde farklı mikrobiyal çeşitlilik görülmektedir. Mikrobiyota konsantrasyonu, midede en az sayıda, ancak kolonda çok yüksek konsantrasyonlarda olmak üzere, GİS boyunca istikrarlı bir şekilde artar. Mide gram içeriği başına sadece 10^1 bakteri barındırırken duodenum ($10^3/g$), jejunum ($10^4/g$), ileum ($10^7/g$) ve kolonda (10^{12} bakteri/gram) artan yoğunluklar ve bakteri çeşitliliği bulunur. (Sekiroy ve ark., 2010).

Stearns ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, ağız mikrobiyotası da hesaba katılmış ve ağızdaki filogenetik çeşitlilik, test edilen diğer konumların herhangi birine göre tüm örneklerde önemli ölçüde daha yüksek ve çok daha tutarlı bulunmuştur (Stearns ve ark., 2011).

Birçok çalışma GİS mikrobiyotasını incelerken örnek alma kolaylığı sebebiyle fekal mikrobiyota üzerine yoğunlaşmıştır bu nedenle duodenal mikrobiyota profili üzerine çok fazla çalışma yoktur. Duodenal biyopsi veya mukus örneklerinden çalışılan sekans çalışmalarında rektal biyopsi veya fekal örneklerle göre daha fazla sayıda operasyonel

taksonomik birim elde edilmiştir. Ayrıca duodenal biyopsi ve mukus örneklerinde rektal örneklerle göre α -çeşitlilik analizinde anlamlı şekilde daha fazla mikrobiyal çeşitlilik bulunmuştur (Li ve ark., 2015). Bu veriler ışığında duodenal örnekler ile çalışmak her ne kadar zor olsa da mikrobiyal çeşitliliğin daha fazla olması nedeniyle rektal biyopsi ve dışkı örneklerine göre çölyak hastalığında zarar gören duodenum bölgesinin mikrobiyomunu daha iyi yansıtabilmekte ve daha fazla bakteri türünü yakalayabilmemize olanak tanımaktadır.

Bakteriyel yoğunluk anlamında kolon en fazla sayıda bakteriyi barındırıyor olsa da en fazla çeşitlilik barındıran bölgenin orası olmadığı yukarıda bahsedilen çalışmalarda gösterilmiştir. Bunu destekleyen bir çalışmada duodenal örneklerde rektal örneklerle göre çeşitlilik daha fazla bulunmuştur (Li ve ark., 2015). Benzer bir çalışmada, duodenum ve dışkı örnekleri karşılaştırıldığında, dışkı örneklerinin bakteriyel olarak daha zengin olduğu bulunmuştur. Bunun nedeni olarak bahsi geçen çalışmada mikrobiyota analizi için kullanılan yöntemin PCR- DGGE olması düşünülmektedir. Bu metod, mikrobiyal topluluklarda dominant türleri rahatça yakalarken daha az sayıda bulunan birçok bakteri türünün kaçırılmasına neden olmaktadır (Di Cagno ve ark., 2011). Kolondaki bakteri çeşitliliği duodenuma göre daha düşük olsa da bakteri bolluğu çok daha fazladır. Ağız en fazla mikrobiyal çeşitliliği olan bölgedir ve burdan çok çeşitli şekilde başlayan mikrobiyota, GI kanal boyunca öncelikle mide asidinden ve konağın bağışıklık sisteminden, hatta safra kesesinden de geçip ilk istasyon olan on iki parmak bağırsağına ulaşır ve ardından bir yarışma başlar. Bağırsağın karmaşık, seçici ortamı ve çok uzun olması göz önüne alındığında, daha az bakteri çeşidi hayatta kalır ve kalın bağırsağa ulaşabilir. Ayrıca bu süreç boyunca bağırsak içinde geçen sürenin sindirim süreci boyunca en uzun zaman olması bakterilerin gelişimi için bir avantaj sağlar. Bu nedenle, kalın bağırsakta daha düşük bir çeşitlilik ancak daha fazla sayıda mikrobiyal topluluk olduğu söylenebilir. (Stearns ve ark., 2011)

2.3. Mikrobiyotanın Çölyak Hastalığında Potansiyel Rolü

Bağırsak mikrobiyotasının ÇH gelişimini veya başlangıcını nasıl etkilediğini açıklayan kesin mekanizmalar henüz bilinmemektedir. Olası mekanizmalar; bağırsak epitel bütünlüğünün ve doğuştan gelen bağışıklığın modülasyonunu, ayrıca gliadin kaynaklı bağışıklık tepkilerini şiddetlendirmesini içerir (Verdu, Galipeau ve Jabri, 2015). Gluten, önemli miktarda prolin ve glutamin amino asitleri içerir. Bu da ince bağırsakta enzimatik sindirimde direnç yol açar (Shan ve ark., 2002). Bu uzun gliadin peptidleri daha sonra, lamina propria'da doku transglutaminaz 2 (TG2) tarafından deaminasyona uğradıkları bağırsak mukozasından geçer, dendritik hücreler tarafından yakalanır ve daha sonra pro-inflamatuvar glutene özgü CD4+ T hücre yanıtlarını tetikler (Shan ve ark., 2002; Green ve Jabri, 2006). Bu glutene özgü bağışıklık tepkileri, duyarlı bireylerde IFN- γ , anti-doku TG (tTG) antikorları, anti-gliadin antikoru ve anti-endomisyal antikorların (EMA) üretimini içerir (Shan ve ark., 2002; Green ve Jabri, 2006). Zonulin'in artması sonrasında karşılaşılan artmış mukozal geçirgenlik veya bir gastrointestinal enfeksiyon sırasında tetiklenen diğer bazı mekanizmalar gibi doku hasarı, uzun gliadin peptidlerinin neden mukozadan lamina propria'ya geçebildiğini açıklayabilir (Fasano ve ark., 2000).

ÇH'nin ilerlemesinde veya başlangıcında bağırsak mikrobiyotasının rolü pozitif veya negatif olabilir. *Clostridium* türleri, *Streptococcus* türleri ve koliform bakteriler ince bağırsakta baskın bakterilerdir ve diyet değişikliklerine hızlı tepki vermeye katkıda bulunabilir (Zoetendal ve ark., 2012). Ayrıca *Clostridium* türü bakteriler, özellikle *Clostridium* kümesi XIVa üyeleri, sindirilmemiş olisakkaritleri doğrudan bütirata direkt olarak dönüştürmekle kalmaz, aynı zamanda *Streptococcus* türü bakteriler tarafından üretilen laktatı, epitel bütünlüğünü destekleyen önemli bir metabolit olan bütirata dolaylı olarak da dönüştürebilir (Zoetendal ve ark., 2012). In vitro çalışmalarda, *Bifidobacterium lactis* ve *Bifidobacterium bifidum*'un epitel hücrelerinde gliadine bağlı epitel bariyer disfonksiyonuna karşı koruyucu olduğu gösterilmiştir (Cinova ve ark., 2011; Lindfors ve ark., 2008). Buna karşılık, *E. coli* ve *Shigella* türü bakterilerin gliadin peptidlerinin lamina propria'da translokasyonunu arttırdığı gösterilmiştir (Cinova ve ark., 2011). Ayrıca, *Bacteroides fragilis* ve *Akkermansia muciniphila*'nın epitel

bütünlüğünü iyileştirdiği bildirilmiştir. Ek olarak, bir bütün olarak kommensaller patojenlere karşı fiziksel bir bariyer olarak kabul edilirken belirli bakteriler tarafından üretilen bütirat gibi kısa zincirli yağ asitleri epitel bariyer fonksiyonunu güçlendirirler (Reunanen ve ark., 2015).

Mikrobiyotanın, hastalığın oluşumu üzerindeki dolaylı etkisi hem doğal hem de kazanılmış bağışıklık sisteminin modülasyonu ile olabilir (Green ve Jabri, 2006). Hem bakteriyel ligandlara karşı, hem de mikrobiyal disbiyozise bağlı gelişen bağışıklık yanıtı, proinflamatuvar sitokin ve kemokin artışına yol açabilmektedir (Zhernakova ve ark., 2010). Kalliomäki ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, çölyak hastalarından alınan duodenal biyopsilerin, duodenal toll like reseptör (TLR) ekspresyonunu ve bunların inhibitörlerini değiştirdiği bulunmuştur. Bu da ÇH patogeneğinde, doğal bağışıklığın ve bakteriyel ligand tanınmanın etkisi olduğunu göstermiştir (Kalliomäki ve ark., 2012). Ayrıca, ÇH için bir risk aleli olan SH2B3 geninin taşıyıcılarında, bakteriyel patojen tanıma önemli olan ve NF- κ B sinyal yolağının öncülerinden olan NOD2 tanıma yolunun aktivasyonu arttırmıştır (Zhernakova ve ark., 2010).

ÇH patogeneğinde mikrobiyotanın rolünü araştırmak için yapılan bir araştırmada, normal şartlar altında zarar vermeyen bir simbiyont olarak yaşayan potansiyel olarak hastalığa neden olan bir organizma olan patobiyont *E.coli* içeren ve içermeyen mikrobiyota, HLA-DQ8-genotipli steril mikrobiyotalı farelere aktarılmıştır. *E. coli*'nin varlığının gluten kaynaklı hastalık patolojisinin gelişimini şiddetlendirdiği ve hatta mikrobiyota vankomisin tedavisi ile harap olduysa bu patolojinin *E. coli*'nin varlığında daha da arttığı gözlemlenmiştir. *E.coli* içeren disbiyotik mikrobiyota, *E.coli* içermeyen mikrobiyotaya kıyasla hem pro-inflamatuvar gliadin-spesifik T hücre yanıtında artış, hem de IgA anti-gliadin antikor üretiminde artışa neden olmuştur (Galipeau ve ark., 2015).

Genellikle CD8⁺ T hücrelerini ve NK hücre aktivasyonunu, çoğalmasını ve sitolitik aktiviteyi uyaran bir sitokin olan IL-15'in artışı ÇH ile ilişkilidir (Abadie V. ve Jabri B., 2014). Gram-negatif bakterilerin hücre zarının dışında bulunan lipopolisakkarid (LPS),

TLR-4 aktivasyonu yoluyla IL-15 üretimini uyararak, immünolojik ortamı modüle etmede rol oynayabilir. Dolayısıyla, bağırsak mikrobiyotasının LPS taşıyan üyelerinin, özellikle *Proteobacteria*'nın, IL-15 artışında rol aldığı düşünülmektedir (Re ve ark., 2004). Ayrıca, TLR-2 aktivasyonunun, in vivo ve in vitro olarak Treg proliferasyonunu uyardığı gözlenmiştir. Hücre içinde de TLR-2, Treg'lerin işlevini kontrol eder ve Treg'ler aracılığıyla immünolojik düzenleyici etki gösterir (Sutmuller ve ark., 2006). İlginç bir şekilde, *B. fragilis*, TLR-2 sinyalini aktive eden polisakkarit A (PSA) üretir ve konağa bağışıklık düzenleyici etkiler sağlamak için PSA içeren dış zar veziküllerini serbest bıraktığı görülmüştür. Ayrıca, *B. fragilis*'in Treg hücre sayısını ve anti-inflamatuvar sitokin üretimini arttırması, ÇH'deki bağırsak iltihabını önleyebileceğini, hatta tersine dahi döndürebileceğini düşündürmektedir (Shen ve ark., 2012). Bu çalışmalar mikrobiyotanın ÇH üzerindeki potansiyel etkilerini gösterir niteliktedir. Eğer mikrobiyotayı oluşturan üyelerin tek tek veya beraber bağışıklık sistemimizi nasıl modüle ettiği anlaşılabilirse ÇH'nin ortaya çıkışı ve tedavisi üzerine bilinmeyenin keşfedilmesi oldukça olasıdır.

2.4. Mikrobiyota Analizinde Yeni Nesil Dizileme Yöntemi

Mikrobiyotanın ayrıntılı şekilde karakterize edilmesi, bu karmaşık ekosistemin ve dinamiklerinin sağlık ve hastalıktaki rolünün araştırılmasındaki ilk adımdır. Bugüne kadar bu konudaki yaklaşımlar tarih içerisinde kültür temelli yöntemlerle başladıysa da güncelde kültür-bağımsız (moleküler) teknikler uygulanmaktadır. Geleneksel kültür-temelli metodlar, laboratuvar ortamında yetiştirilebilen bakteri türlerini tespit edebilirler, ancak bu tür bakteriler mikrobiyotanın sadece %10 ila %50'sini oluşturmaktadır (Eckburg ve ark., 2005). Mikrobiyotayı daha geniş ve kültürden bağımsız olarak analiz eden kültür- bağımsız tekniklerin uygulanması yoluyla, büyük ilerlemeler kaydedilmiştir (Zoetendal ve ark., 2008).

Tarihsel olarak DNA dizilemenin ortaya çıkışında Sanger metodu 1975 yılında öncü olarak bizi DNA dizileme konseptiyle tanıştırmıştır (Sanger F., 1975). Bu dizileme konsepti, DNA polimeraz enzimatik senteziyle DNA'daki dizileri hızlıca belirleme yöntemi olarak keşfedilmiş daha sonra 1977 yılında, DNA dizilemesi konusunda iki çok

önemli daha makale yayınlanıp DNA dizilemesi alanında büyük sıçramalara vesile olmuşlardır. Bunlar, Frederick Sanger'in zincir sonlandırıcı dideoksinükleotid analoglarına dayanan enzimatik dideoksi DNA dizileme tekniği, yani Sanger dizileme metodu (Sanger ve ark., 1977) ve Allan Maxam ve Walter Gilbert'in kimyasal bozunma ile DNA dizileme yöntemi; terminal DNA parçalarının terminal olarak etiketlenmiş uçlarının kimyasal olarak belirli bazlara bölünerek sonra jel elektroforezi ile ayrıldığı dizileme tekniğidir (Pareek, Smoczynski ve Tretyn, 2011). Daha sonra bu tez çalışmasında da kullanılan yeni nesil dizileme yönteminin ortaya çıkışı, yukarıda bahsedilen Sanger metodunun standart yöntem olarak kullanımının maliyet yüksekliği ve yavaş olması nedeniyle paralel dizileme yapılarak ilk adımları atılmış ve 2000 yılında yeni nesil dizileme teknolojileri kullanılmaya başlanmıştır (Behjati ve Tarpey, 2013).

Yeni Nesil Dizileme (YND) yöntemi kullanarak yapılan dizileme, mikrobiyotayı nicel olarak karakterize etmek için güçlü bir yöntemdir. Mikrobiyal popülasyonlar hakkında bilgi sağlar ve kültürde üretilmeyen veya nispeten düşük miktarda olabilen ve geleneksel yöntemlerle saptanamayan mikroorganizmaların keşfedilmesine yardımcı olur (Poussin ve ark., 2018). YND, daha önce mümkün olmadığı düşünülen mikrobiyotanın kültürden bağımsız analizini mümkün kılmıştır (Helmink ve ark., 2019)

YND yöntemi, RNA/DNA analizinde yaygın olarak kullanılan yüksek verimli yöntemlerdendir (Kuczynski ve ark., 2011). YND teknikleri, karmaşık mikrobiyal ekosistemlerden çok sayıda (kısmi) 16S/18S rRNA geninin veya toplam topluluk DNA'sının paralel olarak aynı anda çoğaltılmasına izin vererek hızlı ve bütünsel karakterizasyonu kolaylaştırmak için geliştirilmiştir (Lepage ve ark., 2013). Tüm prokaryotik ribozomların 30S alt biriminin yapısal bir bileşeni olan 16S ribozomal RNA ve ribozomal RNA kodlanmasını sağlayan 1500 baz uzunluğundaki gen, tüm bakterilerde bulunmaktadır. Gen içerisinde son derece korunmuş bölgeler yer almakla beraber, aynı zamanda farklı bakteri türlerinin filogenetik olarak sınıflandırılmasına olanak verecek kadar değişken bölgeleri de içermektedir. Korunan bölgeler, geniş spektrumlu primerler tasarlamak için kullanılabilir ve değişken bölgeler, cins/aile düzeyinde sınıflandırma yapabilmek için değerlidir (Fox ve ark., 1980). Farklı türler arasındaki 16S rRNA bölgelerindeki dizi farklılıkları, evrimsel uzaklığa orantılı olarak

artmaktadır. Bu sebeple 16S rRNA dizisi, farklı bakteri türlerinin belirlenmesinde bir belirteç olarak kullanılmaktadır (Kuczynski ve ark., 2011). Saptanan 16S rRNA gen dizisinin kültürde üretilmiş bakterilerinkilerle veya önceden tanımlanmış dizilerle benzerliği, moleküler temelli yaklaşımlar ile mikrobiyom kompozisyonunu analiz etmenin temelini oluşturur (Clarridge JE, 2004).

16S rRNA gen dizisi analizi ile tespit edilen bakteri türlerini tanımlamak için Filotip veya OTU (operasyonel taksonomik birim) terimleri kullanılır, çünkü bakterilerin esas olarak tanımlanabilmesi için fenotipik karakterizasyon yapılması gerekmektedir. 16S rRNA gen dizileri, benzerliklerine göre kümelenebilir, bu da farklı karşılık gelen taksonomik birim (OTU) seviyeleri ile sonuçlanır. 16S rRNA dizileri arasındaki %90 - 99 benzerlik değerleri, genellikle filotip veya OTU ve cins düzeyinde sınıflandırma olarak adlandırılır (Rajilić-Stojanović ve ark., 2009). Şu ana kadar yapılmış çok sayıda çalışma ile kültür ve çevresel örneklerden elde edilmiş sayısız bakteriyel türün 16S rRNA dizileri çıkarılmıştır. Bu diziler, GreenGenes, Ribosomal Database Project ve SILVA da dahil olmak üzere çeşitli veri tabanlarında kayıt altına alınmıştır (Cox, Cookson ve Moffatt, 2013). Yeni nesil dizileme gibi yöntemlerle elde edilen yüksek hacimli dizi verileri, bu veritabanları ile kıyaslanarak tespit edilen DNA parçalarının hangi türe ait olduğu oransal olarak tanımlanabilmektedir (Fraher ve ark., 2012).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Etik Kurul Onayı

Bu çalışma, Antalya Eğitim ve Araştırma Hastanesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 26/11/2020 tarihinde, 18/1 karar numarası ile onaylanmıştır.

3.2. Örneklerin toplanması

Çalışma, Antalya Eğitim ve Araştırma Hastanesi Gastroenteroloji Kliniği'nde ve Akdeniz Üniversitesi Hastanesi Merkezi Laboratuvarı Mikrobiyoloji Bölümünde yapılmıştır.

Ocak - Haziran 2021 tarihleri arasında Antalya Eğitim ve Araştırma Hastanesi Gastroenteroloji Kliniği'nde daha önceden ÇH tanısı konulmuş 10 hasta çalışmaya alınmıştır. Rutin kontrolleri sebebiyle hastaneye müracaatlarında gastrointestinal endoskopi yapılan hastalardan çalışmaya uygun kriterleri olanlar çalışmaya dahil edilmiştir. Çalışma öncesi; hastalara araştırma anlatılmış ve onamları alınmıştır.

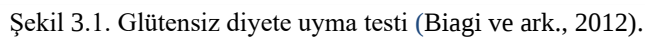
Çalışmaya dahil edilme kriterleri

- En az 1 yıldır glutensiz diyetini yapmış olmak,
- En az 3 aydır antibiyotik veya probiyotik tedavisi almamış olmak,
- EMA ve tTG IgG - IgA düzeylerinden diyetle uyup uymadığı serolojik olarak da test edilmiş olmak,
- 18-65 yaş arası olmak,
- Glutensiz diyetle uyuma testinde 3-4 skorunda olmak

Çalışmadan dışlanma kriterleri

- 18 yaşından küçük olan hastalar
- Diyet tedavisine uymayan hastalar

- Dahil edilme kriterleri şartlarını taşıyan, kontrole gelen vakaların dosyaları ve hastane bilgi yönetim sisteminden hikayeleri, yaş ve cinsiyet gibi demografik özellikleri ve yapılan laboratuvar tetkikleri incelenmiştir. Hasta takip formu adı altında tüm bu veriler kişisel formlar halinde toplanmıştır. Glutensiz diyetlerine uyup uymadıklarını kontrol etmek amacıyla ve hasta dahil etme kriteri olarak serolojik testlere ek olarak daha önceden Biagi ve arkadaşları tarafından uygulanıp onaylanmış olan, 5 skorluk bir test yapılmıştır. Bu testte skoru 3 veya 4 olan hastalar çalışmaya dahil edilmiştir.



ÇH tanısı daha önce endoskopik biyopsi sonucu konmuş, en az 1 senedir glutensiz diyetini uygulayan hastalara standart prosedür olarak duodenal villuslarındaki iyileşmeleri kontrol etmek amacıyla yapılan rutin endoskopi ve biyopsi alımı işlemleri sırasında her hastadan mikrobiyota analizi için de biyopsi örneği alınmıştır. Alınan duodenal biyopsi örnekleri, serum fizyolojik dolu steril tüp içerisine konulup, soğuk zincire uyularak Akdeniz Üniversitesi Hastanesi Merkezi Laboratuvarı Mikrobiyoloji Bölümüne getirilmiştir.

3.3. DNA İzolasyonu

Biyopsi alındıktan sonra soğuk zincirde 30 dakika içerisinde Akdeniz Üniversitesi Hastanesi Merkezi Laboratuvarı Mikrobiyoloji Bölümüne getirilen örnekler, bekletilmeden DNA izolasyonu için işleme alınmıştır. DNA izolasyonu için QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Almanya) kullanılmıştır. Kit prosedürüne uygun olarak DNA izolasyonları yapılmıştır.

Ekstraksiyon yöntemi:

1. Biyopsi örnekleri, öncelikle $\leq 25\text{mg}$ olacak şekilde tartılmıştır ve sonrasında steril petri kaplarında bisturi ile mekanik parçalanma yapılmıştır.
2. Sonrasında kimyasal parçalanma için, örnekler $180\ \mu\text{L}$ Buffer ATL ve $20\ \mu\text{L}$ Proteinaz K solüsyonu içerisinde, ısı bloğu (Biometra TB1 Thermoblock, Almanya) üzerinde 56°C sıcaklıkta bir gece inkübe edilmiştir.
3. Ertesi gün solüsyon içerisindeki biyopsi örnekleri çok kısa bir vorteks yapılarak homojen hale getirilmiş ve üzerine $200\ \mu\text{L}$ Buffer AL eklenmiştir.
4. 15 saniye vortekslenen örnekler, 10 dakika boyunca 70°C 'de ısı bloğu üzerinde inkübe edilmiştir.
5. Çok kısa santifüj (Eppendorf 5417C Centrifuge, ABD) yapılan örneklerin üzerine $200\ \mu\text{L}$ %96'lık etil alkol eklenip on beş sn daha vortekslenmiştir.
6. Spin kolona pipetle aktarılan örnekler $8000\ \text{rpm}$ 'de 1 dakika santrifüjlenmiştir.
7. Santrifüj sonrası alt kısımdaki toplama tüpü atılıp, üst kısımdaki filtreler yeni toplama tüplerine yerleştirilmiştir.

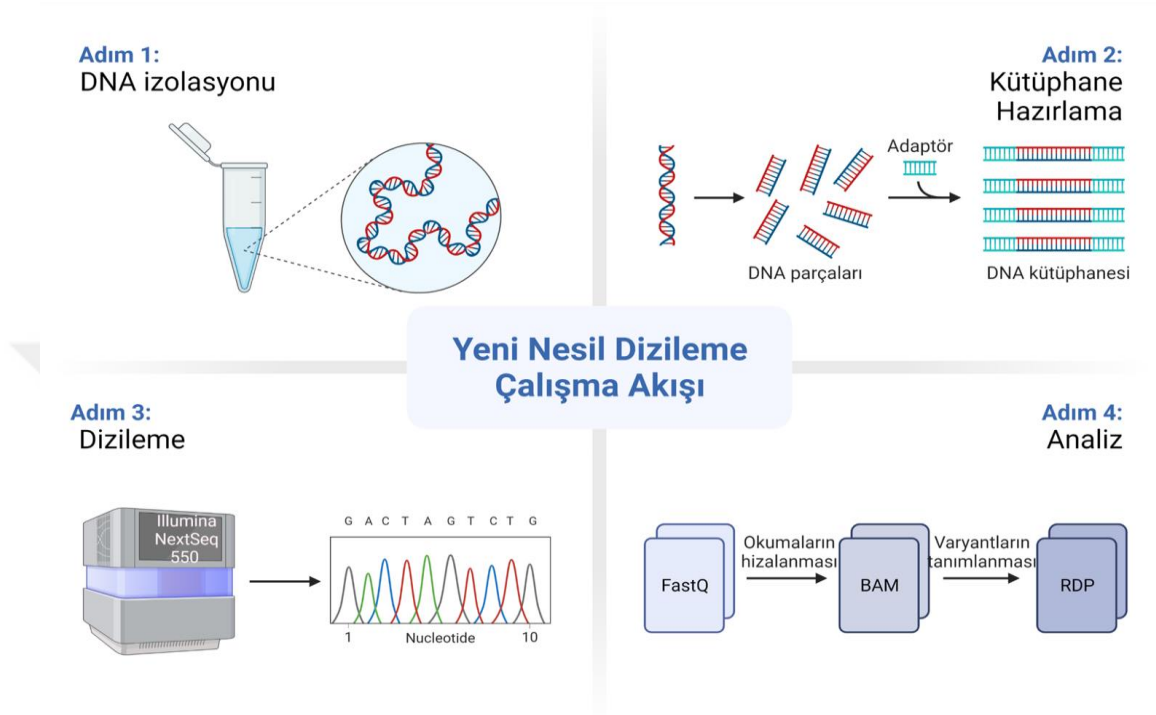
8. 500 µL Buffer AW1, spin kolonların filtre kısımlarına eklenerek 8000 rpm’de 1 dakika santrifüjlenmiştir.
9. Santrifüj sonrası alt kısımdaki toplama tüpleri atılıp, üst kısımdaki filtreler yeni bir toplama tüpüne yerleştirilmiştir.
10. 500 µL Buffer AW2 spin kolonların filtre kısımlarına eklenip maksimum hızda (14000 rpm) 3 dakika boyunca santrifüj yapılmıştır.
11. Santrifüj sonrası alt kısımdaki toplama tüpü atılıp, üst kısımdaki filtreler yeni toplama tüplerine alınmış ve 1 dakika boyunca maksimum hızda (14000 rpm) boş olarak santrifüj edilmiştir.
12. Santrifüj sonrası üst kısımdaki filtreler 1.5 ml’lik ependorflara yerleştirilmiştir.
13. Üzerine 200 µL Buffer AE eklenip oda ısısında 1 dakika inkübe edilmiştir.
14. İnkübasyon sonrası 8000 rpm’de 1 dakika santrifüjlenerek, üst kısımdaki filtreler atılmıştır.
15. Alt kısımdaki DNA ekstratını içeren ependorfların kapakları kapatılarak DNA konsantrasyon ve saflık tayini yapılmıştır

İzole DNA’lara, spektrofotometrik ve florometrik yöntemler kullanılarak, konsantrasyon ve saflık tayini yapılmıştır. Bu ölçümler için, NanoDrop 2000 (Thermo Fisher, ABD) ve Qubit (Thermo Fisher, ABD) cihazları kullanılmıştır. Bu ölçümlerde, konsantrasyon değeri >50 ng/µl (10 µl) olan örnekler ve saflık değeri ~1.8 (260/280) ve >1.8 (260/230) ölçülen örnekler uygun örnek olarak kabul edilmiş ve çalışmaya alınmıştır. Ölçümleri yapılarak uygun görülen örnekler, YND yöntemi yapılarına kadar -20°C’de muhafaza edilmiştir.

3.4. Yeni Nesil Dizileme

Tüm örneklerin DNA izolasyonu tamamlandıktan sonra, 16S rRNA dizilemesinin üç temel adımı olan kütüphane hazırlama, dizileme ve biyoinformatik analiz kısımlarına geçilmiştir. Yeni nesil dizileme işlemi Illumina NextSeq 550 yeni nesil dizileme platformunda (illumina, CA, USA) yapılmıştır. DNA izolasyonu da dahil olmak üzere

temelde dört adımda gerçekleştirilen yeni nesil dizileme metodu şekil 3.2.'de resmedilmiştir.



Şekil 3.2. Yeni Nesil Dizileme Yöntemi Çalışma Akışı.

3.4.1. Kütüphane Hazırlama

Her bir örnekteki 16S rDNA V3-V4 bölgelerinin zenginleştirilmesi için 16S Forward ve 16S Forward Reverse kodlu primerler kullanılmıştır.

- 16S Forward
(TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCW GCAG)
- 16S Reverse
(GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGT ATCTAATCC)

Projede, kütüphane hazırlığı sırasında, her bir örnek için ayrı ayrı 25 döngülü 2 basamaklı PZR işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu işlemlerde, KAPA HiFi HotStart ReadyMix (Roche) enzimi kullanılmıştır.

Birinci PZR aşamasında aşağıdaki sikluslar uygulanmıştır;

1. 95°C’de 3 dakika → 1 siklus
2. 95°C’de 30 saniye
3. 55°C’de 30 saniye 25 siklus
4. 72°C’de 30 saniye
5. 72°C’de 5 dakika → 1 siklus

İkinci PZR uygulamasında, Illumina index ve adaptör dizilerinin eklenmesi için Nextera XT Index Primer 1 ve Nextera XT Index Primer 2 setleri (illumina, CA, USA) kullanılmıştır.

İkinci PZR aşamasında, aşağıdaki sikluslar uygulanmıştır;

1. 95°C’de 3 dakika 1 siklus
2. 95°C-30 saniye
3. 55°C-30 saniye 8 siklus
4. 72°C-30 saniye
5. 72°C’de 5 dakika 1 siklus

Her iki PZR işlemi sonrasında Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter, USA) kiti ile saflaştırma ve pürifikasyon gerçekleştirilmiştir.

PZR sonrasında, tüm örnekler için PZR ürünlerinin, %2’lik agaroz jel üzerinde bant varlığı ve göreceli bant yoğunlukları kontrol edilmiştir. Hazırlanan kütüphanenin Qubit florometresi (Qubit4 Fluorometer, Thermo Fisher, USA) ile ölçümü yapılmış ve normalizasyon sonrası dizileme işlemine alınmıştır.

3.4.2. Dizileme

Dizileme uygulaması, Illumina NextSeq 550 yeni nesil dizileme platformunda (illumina, CA, USA), NextSeq 550 High Output Reagent kiti ile çift yönlü (2x150bp) okuma ile ve üretici firma yönergeleri takip edilerek gerçekleştirilmiştir.

3.4.3. Biyoinformatik Analiz

Dizileme işlemi sonrası kalite kontrol basamaklarında FastQC (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) programı kullanılmıştır. Kalite kontrol sonuçları baz alınarak her örneğin, veri miktarları, okuma kaliteleri, GC dağılımları, kimer dağılımları, olası adaptör kontaminasyonları incelenmiştir.

Kalite kontrol sonrasında, düşük okuma kalitesine (Phred Score < Q20, 30 bplik pencere aralığı) sahip okumalar, tüm veriden çıkarılmıştır. Ayrıca, okuma uçlarındaki düşük kaliteli nükleotid baz okumaları, olası adaptör kirletici ile kimerik diziler, Genomes OnLine Database (GOLD) temel alınarak Trimmomatic (<http://www.usadellab.org/cms/?page=trimmomatic>) aracı ile kırpma işlemi gerçekleştirilmiştir. Taksonomik olarak hedef organizmaların profillerini okuyup çıkarabilmek amacıyla (Wang Q ve ark., 2007) tarafından geliştirilmiş Ribosomal Database Project (RDP) Classifier kullanılarak Greengenes veritabanı temel alınarak taksonomik hizalama yapılmıştır. Hizalama sonrasında 10 örnekteki OTU grupları da belirlenmiştir. Elde edilen verilerin raporlanması, istatistik analizleri ve veri görselleştirme çalışmalarında R ve Excel kullanılmıştır.

4. BULGULAR

Ocak- Haziran 2021 tarihleri arasında, daha önceden ÇH tanısı konulmuş ve çalışmanın dahil edilme kriterlerine uyan 10 erişkin hasta çalışmaya alınmıştır. Bu hastalardan beşi erkek, beşi kadındır. Hastaların yaş ortalaması 38.1 olarak belirlenmiştir (Tablo 4.1.).

Örnek	Yaş	En Bol Filum	Firmicutes (%)	Bacteroidetes (%)	Proteobacteria (%)	Actinobacteria (%)
1	28	F	37.17	12.57	20.24	6.7
2	38	F	25.3	5.5	22.2	15.31
3	24	F	33.22	10.45	19.57	3.91
4	46	F	44.52	3.03	19.87	3.86
5	40	P	17.31	10.26	25.31	3.22
6	43	F	35.68	13.94	12	5.92
7	29	F	40.59	9.05	15.48	5.14
8	35	P	18	14.12	31.88	6.41
9	47	P	22.04	5.56	40.19	5.62
10	51	F	40.76	21.81	8.03	4.9

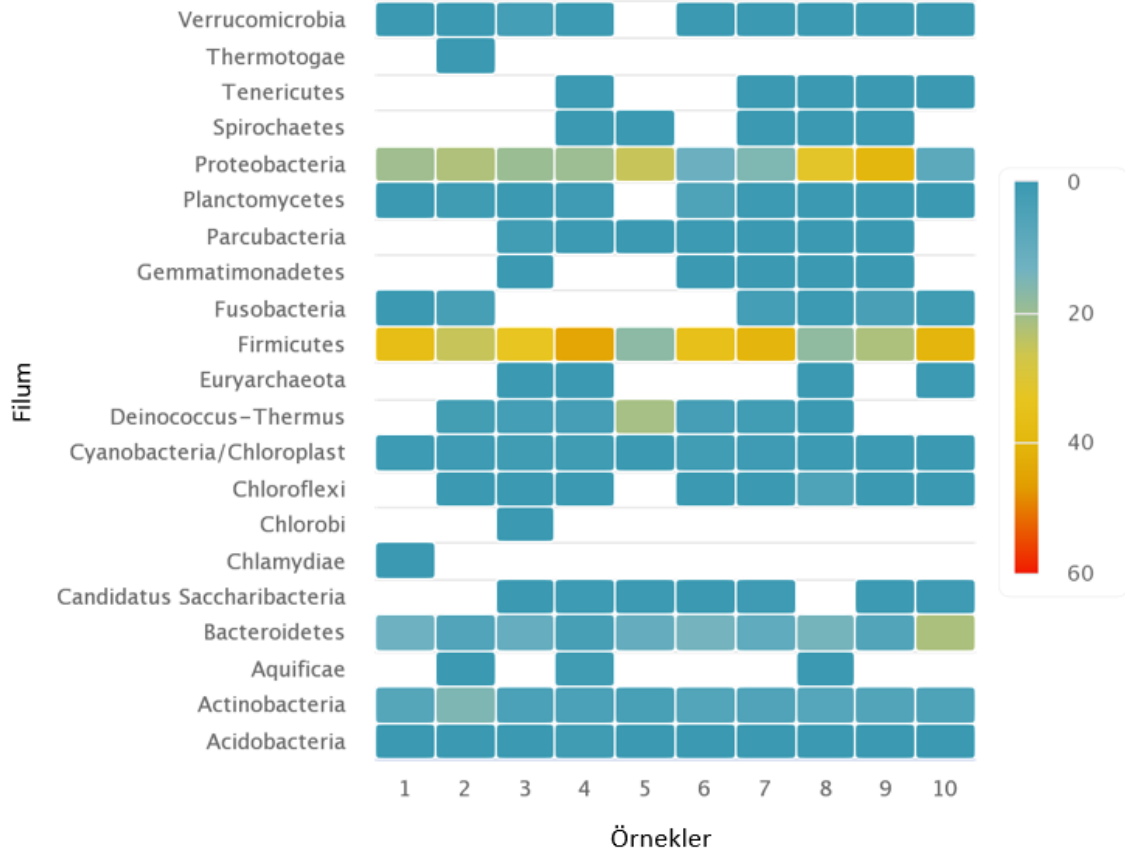
Tablo 4.1. Filum analizinde cinsiyet ve yaş dağılımı.

Hastaların glutensiz diyetlerine uyumlarını görmek amacıyla, biyopsi alımıyla aynı tarihte serolojik olarak bakılmış olan EMA IgA-IgG ve tTG IgA-IgG testlerinin sonuçları kaydedilmiştir. Tüm hastalarda EMA-IgA ve IgG negatif bulunmuştur ancak tTG testinde IgG bir hastada pozitifdir.

EMA-IgA'nın ve tTG IgA'nın negatif olup tTG-IgG'nin pozitif görüldüğü bir hasta vardır. tTG IgA içinse iki hastada ara değer, iki hastada pozitif sonuç çıkmıştır. Ancak örnek alınan GD uygulayan çölyak hastalarının hiçbirisi devam eden klinik belirti tanımlamamışlardır.

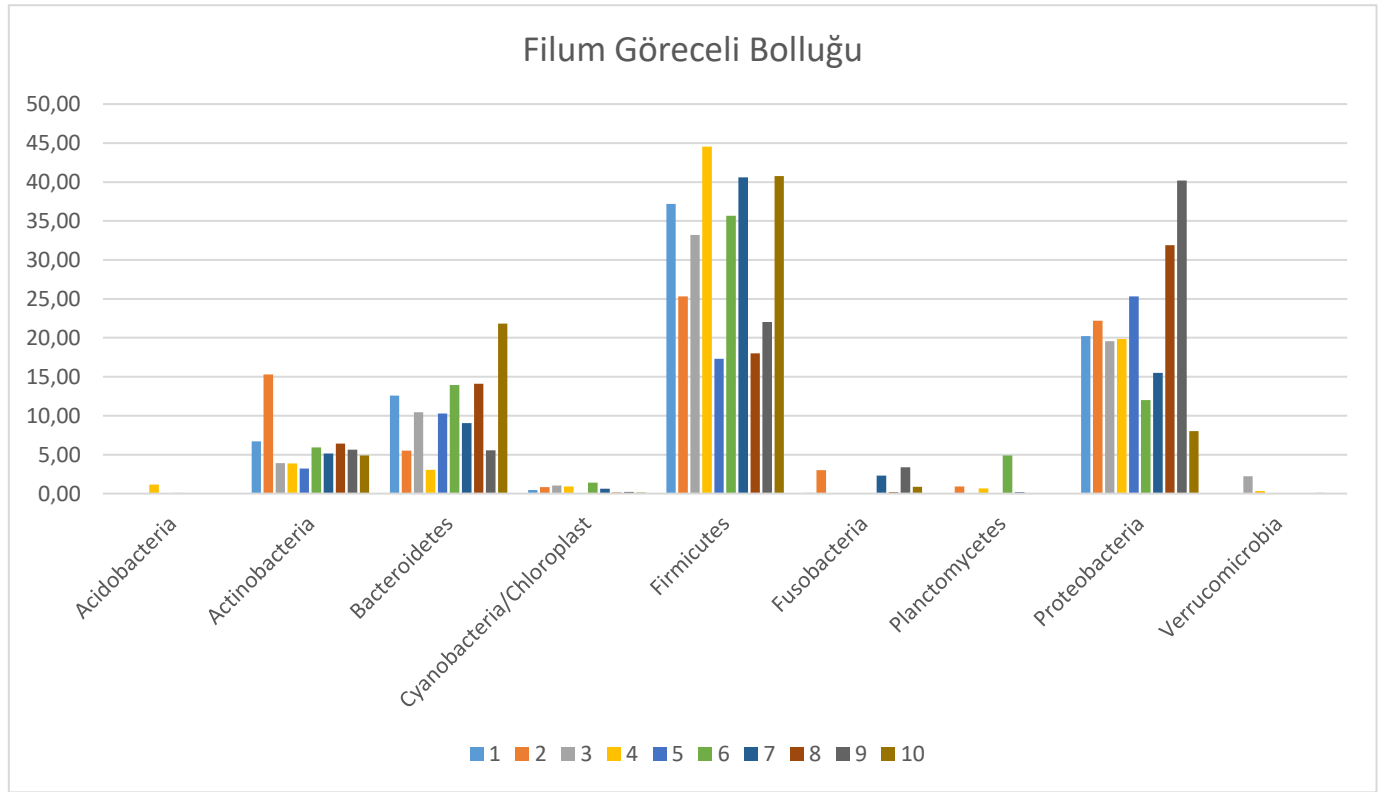
Hastaların duodenal biyopsi örneklerinin metagenomik analizi sonucunda, 10 hasta için toplam 36 farklı filum tespit edilmiştir. En yüksek oranda görülen 20 filum şekil 4.1'de grafikte gösterilmiştir.

Tüm hastalardaki En Bol 20 Filum



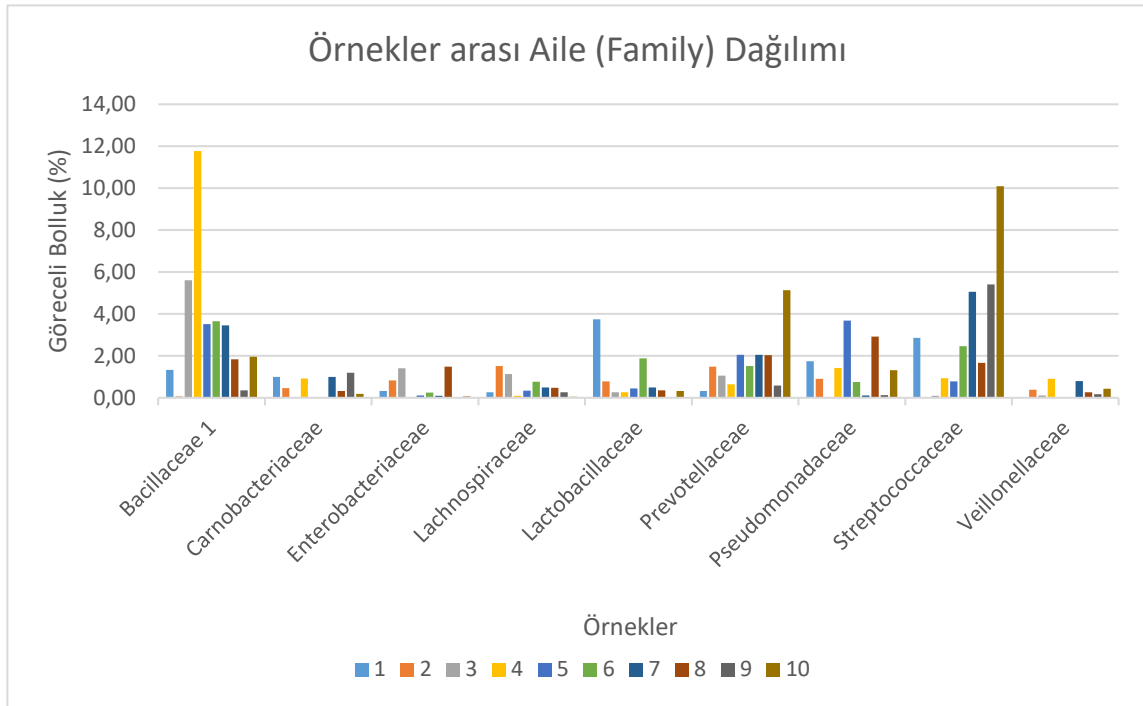
Şekil 4.1. Hastalarda en bol bulunan 20 Bakteri Filumu. Sağdaki renk belirteci göreceli bolluk miktarının yüzdesel olarak ifadesidir.

Örneklerde görülen filumların göreceli yoğunlukları Şekil 4.2. numaralı filum grafiğinde verilmiştir. En yüksek Firmicutes yüzdesi %44.52, en düşük yüzdesi ise %17.31 bulunmuş, ortalama olarak 10 örnekte %31.46 ile en bol bulunan filum olarak tespit edilmiştir. Proteobacteria filumu içinse en yüksek %40.19, en düşük %12 olarak hesaplanmış, ortalama olarak %21.47 ile en sık bulunan ikinci filum durumundadır.



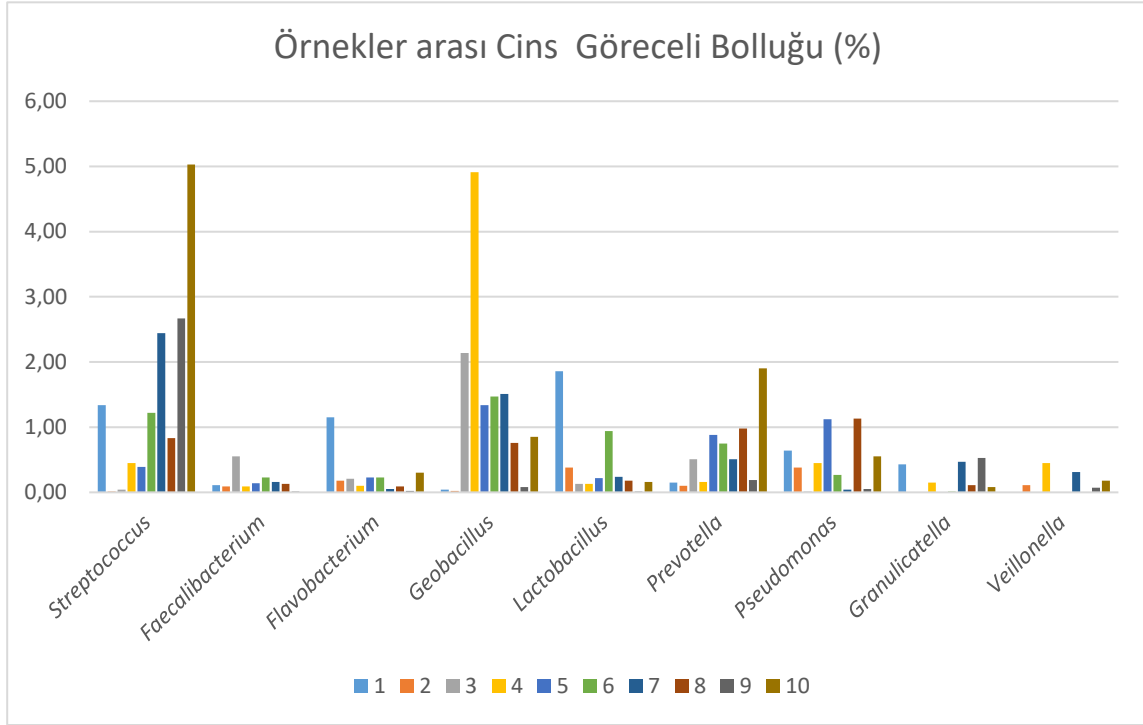
Şekil 4.2. Saptanan Bakteri Filumlarının Duodenal Örneklerdeki Yoğunluğu

Örneklerin aile olarak analizine bakıldığında, Bacillaceae 1 ve Streptococcaceae gruplarının en yüksek bolluğa sahip iki aile olduğu görülmektedir (Şekil 4.3). Bacillaceae 1 yüzdesi %11.77 ile en yüksek, en düşük yüzdesi ise %0.07 bulunmuş, ortalama olarak 10 örnekte %3.35 ile en bol bulunan aile olarak tespit edilmiştir. Streptococcaceae ailesi içinse en yüksek %10.10, en düşük %0.03 değeri bulunmuş, ortalama olarak % 2.94 ile en sık bulunan ikinci aile durumundadır.



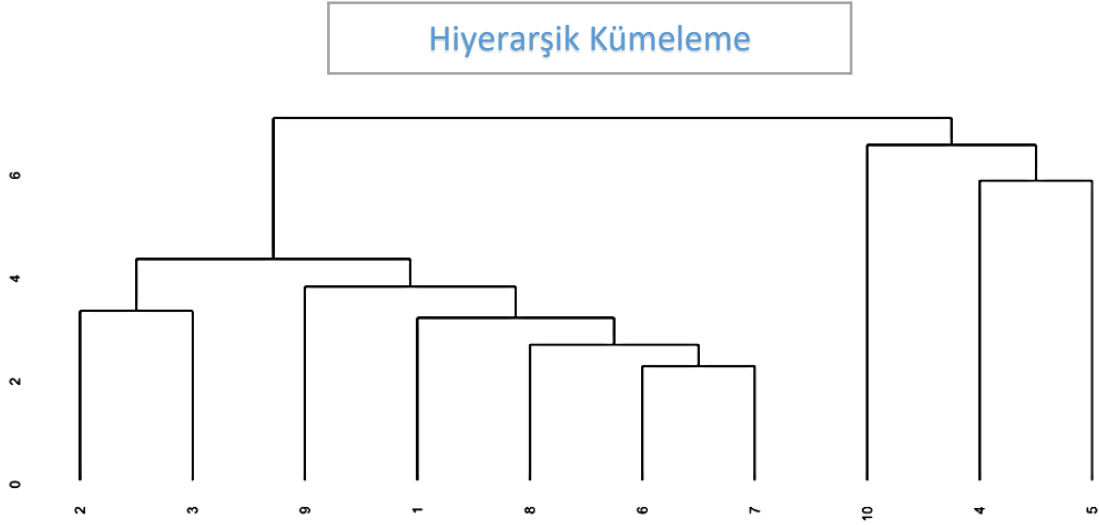
Şekil 4.3. Duodenal Örneklerde Saptanan Bakteri Aileleri

10 örnek arasında en sık görülen ve bolluğu en fazla olan 20 cins Şekil 4.4.'te gösterilmiştir. Cins düzeyinde örnekler arası benzerliklere baktığımızda *Streptococcus* ve *Geobacillus* örneklerin toplamında en yüksek bolluğa sahip iki cinstir. En yüksek *Streptococcus*'un yüzdesi %5.03, en düşük yüzdesi ise %0.01 bulunmuş, ortalama olarak 10 örnekte %1.44 ile en bol bulunan cins olarak tespit edilmiştir. *Geobacillus* cinsi içinse en yüksek %4.91, en düşük %0.02 değeri bulunmuş, ortalama olarak % 1.31 ile en sık bulunan ikinci cins durumundadır. Sadece bu iki cins %1'in üzerinde bulunmuştur.



Şekil 4.4. Saptanan Bakteri Cinslerinin Duodenal Örneklerdeki Yoğunluğu

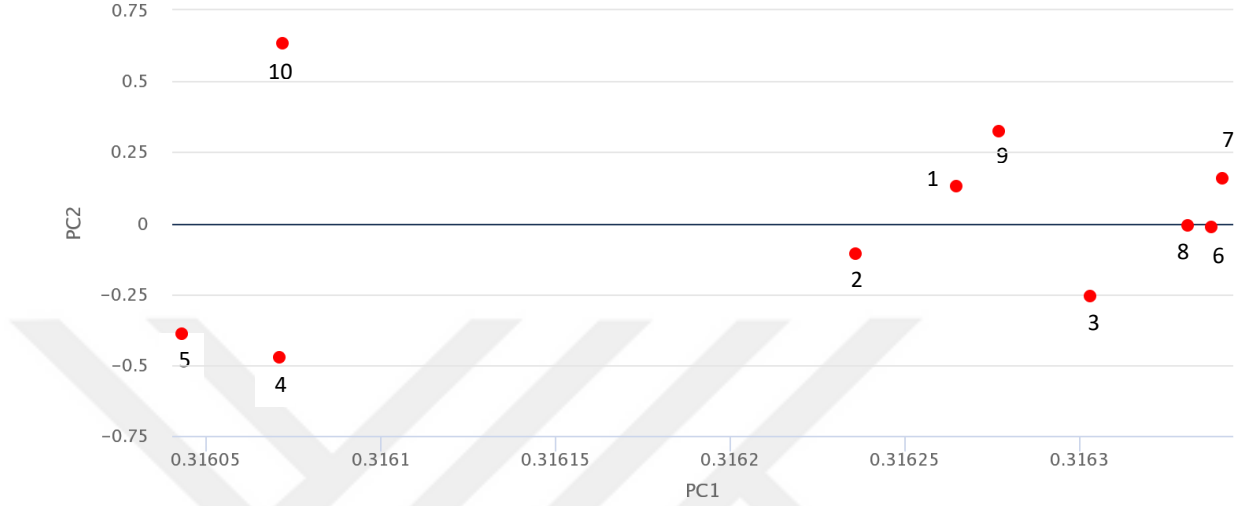
Benzer mikrobiyal profil dağılımı gösteren örnekler, grup içi çeşitlilik benzerliğini de görmek amacıyla hiyerarşik kümeleme yapılmıştır (Şekil 4.5). Kümelemede birbirine yakın mikrobiyal profil gösteren örnekler birbirine yakın dallarda gösterilmektedirler. Hiyerarşik kümeleme hesaplanmasında cins basamağındaki mikrobiyal profil esas alınmıştır. Bu analiz için R_hclust paketi kullanılmış ve grup ortalaması esas alınmıştır.



Şekil 4.5. Duodenal Mikrobiyotada Hiyerarşik Kümelenme Ağacı

Hiyerarşik kümelenme ağacına benzer bir yöntem olarak, temel bileşen analizi yapılmıştır. Bu dağılım grafiği, tüm örneklerin normalleştirilmiş göreceli mikrobiyal çeşitliliğini Temel Bileşen Analizi yaklaşımı ile gösterir. Temel Bileşen Analizi, numuneler arasında taksonomik sınıflandırmaların dağılımındaki sabit bir taksonomik seviyeye kadar olan farkları ölçer (Paradis ve ark., 2004). Dağılım içinde, küme oluşturan örnekler, benzer mikrobiyal dağılım göstermektedir. Temel Bileşen Analizi hesaplanmasında, cins basamağındaki mikrobiyal profil esas alınmıştır. Bu çalışmada grup içi cins düzeyindeki mikrobiyal profil benzerliklerini tanımlamak amacıyla kullanılmıştır. Bu grafiğe göre dördüncü, beşinci ve onuncu hastalar kendi aralarında benzer mikrobiyal profil gösterirken, diğer yedi örnek ise kendi aralarında benzer mikrobiyal profil bulunmuştur (Şekil 4.6).

Temel Bileşen Analizi



Şekil 4.6. Duodenal Mikrobiyotalarda Temel Bileşen Analizi (Principal Coordinate Analysis)

Metagenomik verilerin kendi arasındaki çeşitliliklerini elde etmek amacıyla belirli çeşitlilik endeksleri (filogenetik endeksler veya filogenetik metrikler olarak da adlandırılır) uygulanmıştır. Bu yöntemler, bir veri kümesinde (bir toplulukta) kaç farklı organizmanın bulunduğunu ve aynı zamanda dağıtılan bireyler arasındaki filogenetik ilişkileri (eş-dağılım, tür yakınlığı, tür zenginliğini) yansıtan nicel bir ölçüdür. Tablo 4.2.'de, her bir türün Shannon, Simpson ve Inverse Simpson endeksleri ve tespit edilen türlerin sayısı belirtilmiştir. Proje kapsamında, alfa-çeşitlilik, yani grup içi çeşitlilik hesaplamasında Shannon endeksi (Spellerberg ve ark., 2003) kullanılmıştır. Shannon endeksine göre, temel bileşen analizinde farklı olarak gruplanan dördüncü, beşinci ve onuncu örneklerde çeşitlilik, diğer örneklerle kıyasla daha düşük bulunmuştur. On örneğin tür sayısı ortalaması 232.2 olarak hesaplanmıştır. En düşük tür sayısı 141 iken en yüksek tür sayısı 399 bulunmuştur.

Örnek Adı	Shannon Endeksi	Simpson Endeksi	Inverse Simpson Endeksi	Tür Sayısı
1	3.06	0.91	11.52	203
2	3.19	0.9	10.39	178
3	3.2	0.89	9.4	215
4	2.66	0.79	4.84	302
5	2.37	0.81	5.3	141
6	3.12	0.93	13.39	178
7	3.09	0.89	9.11	263
8	3.44	0.94	15.64	399
9	2.79	0.85	6.56	282
10	2.27	0.76	4.11	161

Tablo 4.2. Mikrobiyota analizinde metagenomik verilerin incelenmesinde çeşitlilik indeksleri. (Shannon, Simpson, Inverse Simpson ve Tür Sayısı)

5. TARTIŞMA

İnsan gastrointestinal sistemi, yüksek sayıda mikroorganizma yoğunluğuna sahip bir bölgedir. Yapılan çalışmalar, kalın bağırsaktaki mikrobiyotayı analiz ederek bakterilerin konak sağlığı üzerinde bir etkisi olduğunu göstermiştir. Ancak, duodenum gibi üst bağırsak mikrobiyotasının karakterizasyonuna odaklanan daha az çalışma vardır. Çünkü uzun bir süre boyunca ince bağırsağın düşük bakteri yoğunluğuna sahip, yaşanması zor bir habitat olduğu varsayılırken, günümüzde çeşitli bakterilerin üst bağırsağı kolonize ettiği ve metabolik süreçte ve farklı hastalıkların tetiklenmesinde önemli rol oynayabileceği bilinmektedir (Caminero ve ark., 2016; Sanz ve ark., 2011).

Son yıllarda, ÇH'nin patogenezinde ve klinik belirtilerinde bağırsak mikrobiyota bileşimindeki değişikliklerin olası rolüne bir ilgi artışı söz konusudur (Caminero & Verdu, 2019). Fakat bu ilişkinin kurulması konusunda yeteri kadar veri henüz toplanamamıştır. Öncelikle bu konu ile yapılan çalışmaların büyük çoğunluğu örnek alma kolaylığı nedeniyle duodenal biyopsi yerine dışkıdan çalışılmıştır. İkinci olarak duodenal örnek almanın invaziv bir yöntem olması nedeniyle yapılan çalışmalarda da örnek sayısı azdır. Şimdiye kadar, yetişkin çölyak hastalarında bağırsak mikrobiyota kompozisyonunu biyopsiden araştıran sadece sekiz çalışma vardır (Schiepatti ve ark., 2021). Bu sekiz çalışmada GD uygulayan hastalardan, duodenal biyopsi yapılan hasta sayısı, maksimum 29, toplamda 61 hastadır (D'Argenio ve ark., 2016; Panelli ve ark., 2020; Wacklin ve ark., 2013, 2014). Bunlar arasında bir çalışmada duodenal mikrobiyota bileşimi ile CD'nin klinik belirtileri arasında bir ilişki olduğu bildirilmiştir.

Çalışmamıza katılan olgularda herhangi bir semptom bildirilmemiştir. Çalışmaya katılan hastalar arasındaki mikrobiyal benzerlikler ve farklılıklar, grup içi çeşitliliği görmek; filum, aile, cinsler ve türler arası farklara bakmak diğer çalışmalarla karşılaştırmak açısından önemlidir. Bu noktada hastalar arası en sık görülen filum ve aile bolluğu bir benzerlik yakalamak açısından anlamlıdır. Çalışmamızda filum olarak yedi örnekte Firmicutes bolluğu tespit edilirken, üç örnekte de Proteobacteria bolluğu gözlenmiştir. Filum farklılığı veya baskınlığı ile alakalı olgular arasında herhangi bir klinik semptom gözlenmemiştir. Çalışmamızda mikrobiyota çeşitliliği Shannon indeksi kullanılarak

ölçülmüştür. Bizim çalışmamızda tür sayısı 141 ile 399 arasında ve ortalama 232.2, Shannon indeksi ise ortalama 2.91 (2.27-3.44) olarak bulunmuştur. Bu çeşitlilik indeksi, bu bakterilerin tür dağılımındaki birbirlerine olan oranının da yakınlığını hesaba katarak, örnekte bulunan farklı bakteri sayısının nicel bir göstergesidir. Yani, tek veya sadece birkaç dominant türün olmadığını; türler arası dengeli bir dağılım olduğunu da göstermektedir. Bu nedenle Shannon çeşitlilik indeksi değeri hem tür sayısı arttığında hem de türler arası yüzdelerin birbirine benzerliği arttığında artar. Shannon indeksi, mikrobiyolojik çalışmalarda kullanılan iyi bilinen bir çeşitlilik indeksidir. Shannon indeksi değeri ne kadar yüksek olursa, topluluk çeşitliliği o kadar yüksek olur (Kim ve ark., 2017). Önceki çalışmalarda mikrobiyal çeşitlilik, diyet uygulamayan aktif çölyak hastalarında azalmış olarak bulunmuştur. Nistal ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada dokuz aktif dönemdeki çölyak hastasının tür sayısı ortalaması 202, Shannon indeksi ise ortalama 2.83 olarak bulunmuştur Dokuz kişilik sağlıklı kontrol grubunda ise Shannon indeksi 3.20'dir (Nistal ve ark., 2016). Ayrıca Nistal ve arkadaşlarının çalışmasında tür sayısı 180 ile 249 arasında değişmektedir. Aynı çalışmada, örneklerini sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırmış ve onlarda tür çeşitliliği ortalama 234 iken tür sayısı 213-277 arasında değişmektedir (Nistal ve ark., 2016). Başka bir çalışmada, sağlıklı dokuz gönüllüden elde edilen duodenal biyopsiden mikrobiyota analizinde Shannon indeksi ortalama 4.50 olarak hesaplanmıştır (Li ve ark., 2015). Aynı çalışmada, hem aktif çölyak hem de sağlıklı kontrol grubu için ana filumlar olarak Firmicutes ve Proteobacteria tespit edilmiştir. Nistal ve arkadaşlarının yaptığı bu çalışmada çölyak hastaları ve sağlıklı kişilerin duodenal mikrobiyotaları arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır. Buna ek olarak aynı çalışmada, tedavi edilmeyen ÇH ilişkili bakteri topluluklarının karakteristik bir kalıbı belirlenememiştir (Nistal ve ark., 2016). Bizim çalışmamızda, GD uygulayan ve diyetine uyduğu belirlenen hastalardan elde ettiğimiz verilerde, en sık görülen filumlar %31.46 ile Firmicutes, %21.47 Proteobacteria, %10.6 Bacteroidetes, %6.1 Actinobacteria olarak bulunmuştur.

D'Argenio ve arkadaşlarının çalışmasında, altı adet GD uygulayan çölyak hastası, 20 adet aktif çölyak hastası ve 15 adet de sağlıklı kontrol grubunda duodenal mikrobiyota incelenmiş; sonuç olarak üç grupta da en fazla görülen filum olarak Proteobacteria

bulunmuştur. Ayrıca, aktif çölyak hastalarında en az görülen filumlar Firmicutes ve Actinobacteria olarak tespit edilmiştir (D'Argenio ve ark., 2016). D'Argenio ve arkadaşlarının çalışmasındaki kadar Proteobacteria bolluğu (%39.3) olmasa da bizim çalışmamızda da en fazla bolluğu olan 2. Filum %21.47 ile Proteobacteria'dır. Bir diğer çalışmada yine GD uygulayan çölyak hastaları ile aktif, tedavi edilmeyen çölyak hastaları ve sağlıklı kontrol gruplarının duodenal mikrobiyotası incelenmiş ve üç grup için en sık görülen filumlar Firmicutes (%38), Proteobacteria (%29), Bacteroidetes (%17), Actinobacteria (%10), ve Fusobacteria (%4) olarak tespit edilmiştir (Nistal ve ark., 2012). Li ve arkadaşları tarafından sağlıklı gönüllülerden elde edilen duodenal mikrobiyota analizlerinde, duodenumda %70.3 oranında Firmicutes ve Proteobacteria filumlarının bulunduğu saptanmıştır (Li ve ark., 2015). Aynı çalışmada, sağlıklı kişilerin dışkı örneklerini ise %84.2 oranında Bacteroidetes ve Firmicutes filumlarının oluşturduğu bildirilmiştir (Li ve ark., 2015). Bizim çalışmamızda örneklerin hepsinden elde edilen verilere göre en sık görülen filumlar Firmicutes (%31.46) ve ardından Proteobacteria (%21.47) filumlarıdır. Bu veriler çölyak hastalarının glutensiz diyetle beraber, sağlıklı gönüllülerle filum düzeyinde benzer bir profil gösterdiğini düşündürmektedir. Çalışmaya katılan GD uygulayan hastalarda diyetle ilgili olarak semptomlarda da bir kayboluş söz konusudur. Bununla birlikte, bu konuda yapılmış çalışma sayısı çok azdır. Bu alanda daha kapsamlı ve daha çok sayıda çalışmaya ihtiyaç bulunmaktadır.

ÇH'de GD başlangıcı ile beraber genellikle klinik semptomlarda hızlı (1 hafta), ince bağırsak mukozasında ise daha yavaş (6 ay – 1 sene) bir iyileşme olur. Bununla birlikte, uzun süreli GD tedavisine rağmen birçok hastanın devam eden semptomlardan muzdarip olduğuna dair kanıtlar vardır. Bu tür devam eden semptomların en yaygın nedeni, bilerek veya bilmeden gluten alımıdır. Ayrıca tanısı konmamış başka bir gastrointestinal hastalığın varlığı veya glutensiz ürünlerdeki düşük lif içeriğine bağlı kabızlık veya refrakter ÇH de olabilir. (Dewar ve ark., 2012; Paarlahti ve ark., 2013). Bununla birlikte, birçok vakada sıkı GD'ye ve iyileşmiş bağırsak mukozasına rağmen kalıcı semptomların nedeni bilinmemektedir (Wacklin ve ark., 2014). Wacklin ve arkadaşları; GD uygulayan ancak semptomları olan 18 çölyak hastası ile GD uygulayan semptomsuz 18 çölyak

hastasında 16S rRNA gen dizilemesi ile duodenal mikrobiyotayı incelemişlerdir. Bizim çalışmamızdaki hastalarla benzer şekilde, bu hastalar da birkaç yıldır (≥ 3) katı bir GD uygulayan ve ince bağırsak mukozası biyopsileri normal olan çölyak otoantikörlerini normale döndürmüş hastalardır. Wacklin ve arkadaşlarının çalışmasında kalıcı semptomları olan hastaların, semptomları olmayan hastalara kıyasla farklı bir duodenal mikrobiyota tarafından kolonize edildiği gösterilmiştir. Semptomları olan hastalarda göreceli olarak daha yüksek Proteobacteria bolluğu ($p = 0.04$) ve daha düşük Bacteroidetes ($p = 0.01$) ve Firmicutes ($p = 0.05$) bolluğu bulunmuştur. Mikrobiyal zenginlikleri ve tür çeşitliliği de istatistiki olarak anlamlı şekilde ($p = 0.05$) daha düşüktür. Semptom göstermeyen hastalarda Firmicutes %46 ve Bacteroidetes %25; semptomlu hastalarda ise Firmicutes %33 ve Bacteroidetes %15 düzeylerindedir. Proteobacteria semptomlu hastalarda %40; semptomsuz hastalarda %21 oranlarındadır (Wacklin ve ark., 2014). Çalışmamıza katılan hastalar da uzun süredir devam ettikleri diyetle beraber herhangi bir belirti göstermemektedirler ve Firmicutes filumu, Wacklin ve arkadaşlarının semptomsuz hastalardaki bulgusu ile benzer olarak en yüksek oranda saptanmıştır.

Cins düzeyinde değerlendirmelere bakılacak olursa, *Streptococcus* (%1.44) ve *Geobacillus* (%1.31) türleri en yüksek yüzdeye sahip cinslerdir. *Prevotella* cinsi, çalışmamızda da en sık görülen üçüncü cins (%0.61) olarak bulunmuştur. Ayrıca *Lactobacillus* (%0.43) ve *Faecalibacterium* (%0.15) gibi bağırsak sağlığı ile ilişkili (Laval ve ark., 2015) cinsler de örneklerin duodenumlarında en bol bulunan 10 cins arasında bulunmaktadır. Nistal ve ark, GD uygulayan hastalarla, aktif çölyak hastalarını karşılaştırdığında, istatistiki olarak en anlamlı fark ($p < 0.05$) *Streptococcus* ve *Prevotella* türlerinde bulunmuştur ancak GD'ye devam eden grupta kontrol grubu ile aynı oranda *Prevotella* cinsi; daha yüksek miktarda *Streptococcus* cinsi bakteri bulunmuştur (Nistal ve ark., 2012). Bizim çalışmamızda da *Prevotella* cinsi, semptomsuz GD uygulayan çölyak hastalarında daha boldur. Bu sonuç, Wacklin ve arkadaşlarının GD uygulayan semptomsuz çölyak hastalarında daha fazla *Prevotella* bolluğu bildiren makalesi ile ve Nistal ve arkadaşlarının yukarıda belirtilen çalışması ile benzer sonuçlara sahiptir (Wacklin et al., 2014; Nistal ve ark., 2012). Nistal ve arkadaşları tarafından, GD

uygulayan grup, aktif çölyak hastalarına göre bakteriyel çeşitlilik açısından daha zengin bulunmuştur (Nistal ve ark., 2012). Bu değişikliklerin en azından bir kısmı, GD'nin doğrudan bir sonucu olabilir, çünkü diyet, bağırsakta niş belirleyici faktörlerin en önemli potansiyel kaynaklarından biridir (Dethlefsen ve ark, 2006). Bakteri topluluğundaki çeşitliliğin artması, kaybedilen duodenal homeostazın restorasyonu veya bağırsak iyileşmesi gibi mikro çevredeki değişikliklere bağlı olabilir. Belki de iyileşme, mukusun bileşimini etkilemekte ve böylece ona bağlı olan bakterileri değiştirmektedir (Johansson ve ark., 2011). Benzer bir şekilde başka bir çalışma da GD uygulayan çölyak hastalarının mikrobiyal profillerinin aktif çölyak ile sağlıklı kontroller arasında bir yerde olduğunu saptamıştır (Panelli ve ark., 2020).

Bu çalışma Türkiye'de çölyak hastalarında yeni nesil dizileme yöntemi ile duodenal biyopsi örnekleri incelenerek mikrobiyota analizinin yapıldığı ilk çalışmadır. Ekonomik sebeplerden dolayı örneklem küçük tutulmuş ve çalışmaya kontrol grubu dahil edilememiştir, bunlar çalışmamızın kısıtlayıcı yönleridir. Başka bir sınırlama, küçük alt birim ribozomal RNA'yı (16S rRNA) kodlayan yüksek oranda korunmuş genin bir veya daha fazla değişken bölgesinin dizilenmesine dayanan yeni nesil dizileme metodunun kendisiyle bağlantılıdır. Bakteriyel mikrobiyotanın profilini çıkarmak için yaygın olarak kullanılan bir yaklaşım olsa da, kısa dizilerde yer alan sınırlı taksonomik ve fonksiyonel bilgileri içermektedir. Bakteri topluluğunun hemen hemen her üyesinden gelen tüm genomların küçük parçalara ayrılıp sonra birleştirilerek ilgili veri tabanlarından hedef organizmaların istenen genlere göre dizildiği daha pahalı metagenomik dizileme yöntemleri ile daha ayrıntılı sonuçlar elde edilebilir (Jovel ve ark., 2016). Sekanslama cihazları, uygulama farklılıkları, örnek farklılıkları gibi nedenlerden dolayı mikrobiyota bileşimini değerlendirmede laboratuvarlar arası sonuçları karşılaştırmak zorlaşmaktadır. Mikrobiyota analizinde henüz bir standardizasyon sağlanamamış olması da sonuçların karşılaştırılmasını zorlaştırmaktadır. Ayrıca bağırsak mukozasına tutunmuş halde bulunan bakteriler ile bağırsak lümeninde bulunan bakteriler farklı olabilmektedirler (Li ve ark., 2015). Buna bağlı olarak biyopsi materyallerinden belirlenen mikrobiyota ile dışkı ya da lümen içeriği örneklerinden belirlenen mikrobiyota sonuçları farklı olabilir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmada ÇH tanısı almış ve GD ile beslenen hastalarda duodenal biyopsi örneklerinde yeni nesil dizileme yöntemi ile yapılan mikrobiyota analizinde Firmicutes %31.46 ve Proteobacteria %21.47 filumları en sık olarak saptanmıştır. Genetik ve coğrafi farklılıkların bağırsak mikrobiyotasını etkilediği bilinmektedir (Lax ve ark., 2014). Çeşitli hasta gruplarında mikrobiyota profillerinin araştırılması; mikrobiyotayı etkileyen faktörler ile hastalıkta ve sağlıkta etkili olan mikrobiyota profillerinin belirlenmesini sağlayarak, hastalığa ve kişiye özel tedavilerin geliştirilmesi için yol gösterici olacaktır.

KAYNAKLAR

Abadie, V., & Jabri, B. (2014). IL-15: a central regulator of celiac disease immunopathology. *Immunological reviews*, 260(1), 221–234.

Akobeng, A. K., Ramanan, A. V., Buchan, I., & Heller, R. F. (2006). Effect of breast feeding on risk of coeliac disease: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *Archives of disease in childhood*, 91(1), 39–43.

Alekseyenko, A.V., Perez-Perez, G.I., De Souza, A. et al. Community differentiation of the cutaneous microbiota in psoriasis. *Microbiome* 1, 31 (2013). <https://doi.org/10.1186/2049-2618-1-31>

Al-Toma, A., Volta, U., Auricchio, R., Castillejo, G., Sanders, D. S., Cellier, C., Mulder, C. J., & Lundin, K. E. A. (2019). European Society for the Study of Coeliac Disease (ESsCD) guideline for coeliac disease and other gluten-related disorders. *United European Gastroenterology Journal*, 7(5), 583–613.

Arentz-Hansen H, Fleckenstein B, Mol-berg O, et al. (2004). The molecular basis for oat intolerance in patients with celiac disease.

Bahn, S. A., Jacobson, J., & Petersen, F. (1998). Maternal and neonatal outcome following prolonged labor induction. *Obstetrics & Gynecology*, 92(3), 403-407.

Behjati, S., & Tarpey, P. S. (2013). What is next generation sequencing?. *Archives of disease in childhood. Education and practice edition*, 98(6), 236–238.

Bergström, A., Skov, T.H., Bahl, M.I. et al. (2014). Establishment of intestinal microbiota during early life: a longitudinal, explorative study of a large cohort of Danish infants. *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 2889–2900.

Betrapally, N. S., Gillevet, P. M., & Bajaj, J. S. (2017). Gut microbiome and liver disease. *Translational research: the journal of laboratory and clinical medicine*, 179, 49–59.

Biagi, F., Bianchi, P. I., Marchese, A., Trotta, L., Vattiato, C., Balduzzi, D., Brusco, G., Andrealli, A., Cisarò, F., Astegiano, M., Pellegrino, S., Magazzù, G., Klersy, C., & Corazza, G. R. (2012). A score that verifies adherence to a gluten-free diet: a cross-sectional, multicentre validation in real clinical life. *The British journal of nutrition*, 108(10), 1884–1888.

Bingula, R., Filaire, M., Radosevic-Robin, N., Bey, M., Berthon, J. Y., Bernalier-Donadille, A., Vasson, M. P., & Filaire, E. (2017). Desired Turbulence? Gut-Lung Axis, Immunity, and Lung Cancer. *Journal of oncology*, 2017, 5035371.

Bischoff, S. C., Barbara, G., Buurman, W., Ockhuizen, T., Schulzke, J. D., Serino, M., Tilg, H., Watson, A., & Wells, J. M. (2014). Intestinal permeability--a new target for disease prevention and therapy. *BMC gastroenterology*, 14, 189.

Björck, S., Lindehammer, S. R., Fex, M., & Agardh, D. (2015). Serum cytokine pattern in young children with screening detected coeliac disease. *Clinical and experimental immunology*, 179(2), 230–235.

Slot, I. D., van der Fels-Klerx, H. J., Bremer, M. G., & Hamer, R. J. (2016). Immunochemical Detection Methods for Gluten in Food Products: Where Do We Go from Here?. *Critical reviews in food science and nutrition*, 56(15), 2455–2466.

Bustos Fernandez LM, Lasa JS, Man F. (2014). Intestinal Microbiota: Its Role in Digestive Diseases. *Journal of clinical gastroenterology*, 48: 657-666.

Caio, G., Volta, U., Sapone, A., Leffler, D. A., De Giorgio, R., Catassi, C., & Fasano, A. (2019). Celiac disease: A comprehensive current review. In *BMC Medicine* (Vol. 17, Issue 1).

Camilleri M., Lasch K., Zhou W. (2012). Irritable bowel syndrome: methods, mechanisms, and pathophysiology. The confluence of increased permeability, inflammation, and pain in irritable bowel syndrome. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 303, G775–G785.

Caminero, A., & Verdu, E. F. (2019). Celiac disease: Should we care about microbes? *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 317(2), G161–G170.

Caminero, A., Galipeau, H. J., McCarville, J. L., Johnston, C. W., Bernier, S. P., Russell, A. K., Jury, J., Herran, A. R., Casqueiro, J., Tye-Din, J. A., Surette, M. G., Magarvey, N. A., Schuppan, D., & Verdu, E. F. (2016). Duodenal Bacteria from Patients with Celiac Disease and Healthy Subjects Distinctly Affect Gluten Breakdown and Immunogenicity. *Gastroenterology*, 151(4), 670–683.

Campbell, A.W., 2014. Autoimmunity and the Gut. *Autoimmune Diseases*, 2014.

Carmody, R.N., Gerber, G.K., Luevano, J.M., et al. 2015. Diet Dominates Host Genotype in Shaping the Murine Gut Microbiota. *Cell Host Microbe* 17, 72–84.

Cataldo F, Lio D, Simpore J, et al. Consumption of wheat foodstuffs not a risk for celiac disease occurrence in Burkina Faso. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2002; 35(2):233–4.

Catassi, C., Kryszak, D., Bhatti, B., Sturgeon, C., Helzlsouer, K., Clipp, S. L., Gelfond, D., Puppa, E., Sferruzza, A., & Fasano, A. (2010). Natural history of celiac disease autoimmunity in a USA cohort followed since 1974. *Annals of medicine*, 42(7), 530–538.

Cebolla, Á., Moreno, M. de L., Coto, L., & Sousa, C. (2018). Gluten immunogenic peptides as standard for the evaluation of potential harmful prolamins content in food and human specimen. *Nutrients*, 10(12), 1–16.

Cheng, J. (2016). The development of intestinal microbiota in childhood and host-microbe interactions in pediatric celiac disease.

Cheng, J., Kalliomäki, M., Heilig, H. G. H. J., Palva, A., Lähteenoja, H., de Vos, W. M., Salojärvi, J., & Satokari, R. (2013). Duodenal microbiota composition and mucosal homeostasis in pediatric celiac disease. *BMC Gastroenterology*, 13(1).

Chiu, L., Bazin, T., Truchetet, M. E., Schaefferbeke, T., Delhaes, L., & Pradeu, T. (2017). Protective Microbiota: From Localized to Long-Reaching Co-Immunity. *Frontiers in immunology*, 8, 1678.

Choung RS, Larson SA, Khaleghi S, et al. Prevalence and morbidity of undiagnosed celiac disease from a community-based study. *Gastroenterology* 2017; 152(4):830–839.

Ciccocioppo R, Di Sabatino A, Corazza GR: The immune recognition of gluten in coeliac disease. *Clin Exp Immunol* 2005, 140:408-416.

Cinova J., De Palma G., Stepankova R., et al. 2011. Role of intestinal bacteria in gliadin induced changes in intestinal mucosa: study in germ-free rats.

Clarridge J. E., 2004. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clinical microbiology reviews*, 17(4), 840–862.

Collin P, Reunala T, Pukkala E, et al. 1994. Coeliac disease associated disorders and survival. *Gut* 35:1215–18

Comalada M., Bailón E., de Haro O., et al. 2006. The effects of short-chain fatty acids on colon epithelial proliferation and survival depend on the cellular phenotype. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 132 (8): 487- 497.

Cox, M. J., Cookson, W. O., & Moffatt, M. F. (2013). Sequencing the human microbiome in health and disease. *Human molecular genetics*, 22(R1), R88–R94.

Cryan, J. F., & Dinan, T. G. (2012). Mind-altering microorganisms: the impact of the gut microbiota on brain and behaviour. *Nature reviews. Neuroscience*, 13(10), 701–712.

D’Argenio, V., Casaburi, G., Precone, V., Pagliuca, C., Colicchio, R., Sarnataro, D., Discepolo, V., Kim, S. M., Russo, I., Del Vecchio Blanco, G., Horner, D. S., Chiara, M., Pesole, G., Salvatore, P., Monteleone, G., Ciacchi, C., Caporaso, G. J., Jabri, B., Salvatore, F., & Sacchetti, L. (2016). Metagenomics reveals dysbiosis and a potentially pathogenic *N. flavescens* strain in duodenum of adult celiac patients. *American Journal of Gastroenterology*, 111(6), 879–890.

Demet ERDOĞAN. (2015). Enterik Sinir Sistemi (Ess) Ve İnsan Sağlığındaki Rolü (Vol. 9, pp. 9–16). Vol. 9, pp. 9–16. Bilimsel Tamamlayıcı Tıp Regülasyon ve Nöral Terapi Dergisi.

Deplancke B, Gaskins HR. Microbial modulation of innate defense: goblet cells and the intestinal mucus layer. *Am J Clin Nutr* 2001;73(6):1131S–41S.

Deschemin, J.-C., Noordine, M.-L., Remot, A., et al. 2016. The microbiota shifts the iron sensing of intestinal cells. *FASEB J.* 30, 252– 261.

Dethlefsen L, Eckburg P, Bik E, et al. Assembly of the human intestinal microbiota. *Trends Ecol Evol.* 2006;21:517–523.

Dethlefsen, L., Relman, D.A., 2011. Incomplete recovery and individualized responses of the human distal gut microbiota to repeated antibiotic perturbation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108 Suppl 1, 4554–4561.

Dewar, D. H., Donnelly, S. C., McLaughlin, S. D., Johnson, M. W., Ellis, H. J., & Ciclitira, P. J. (2012). Celiac disease: Management of persistent symptoms in patients on a gluten-free diet. *World Journal of Gastroenterology*, 18(12), 1348–1356.

Di Cagno, R., De Angelis, M., De Pasquale, I., Ndagijimana, M., Vernocchi, P., Ricciuti, P., Gagliardi, F., Laghi, L., Crecchio, C., Guerzoni, M., Gobbetti, M., & Francavilla, R. (2011). Duodenal and faecal microbiota of celiac children: Molecular, phenotype and metabolome characterization. *BMC Microbiology*, 11(1), 219.

Di Mauro, A., Neu, J., Riezzo, G., et al. 2013. Gastrointestinal function development and microbiota. *Ital. J. Pediatr.* 39, 15.

Dicke WK. Coeliac Disease Investigation on the Harmful Effect of Certain Types of Cereal on Patients With Coeliac Disease. Utrecht, The Netherlands: University of Utrecht; 1950.

Dickson, R. P., Erb-Downward, J. R., Falkowski, N. R., Hunter, E. M., Ashley, S. L., & Huffnagle, G. B. (2018). The Lung Microbiota of Healthy Mice Are Highly Variable,

Cluster by Environment, and Reflect Variation in Baseline Lung Innate Immunity. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 198(4), 497–508.

Dieterich W, Ehnis T, Bauer M, et al. Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease. *Nat Med* 1997; 3:797–801.

Dinan, T. G., & Cryan, J. F. (2017). The Microbiome-Gut-Brain Axis in Health and Disease. *Gastroenterology clinics of North America*, 46(1), 77–89.

Dominguez-Bello, M. G., Costello, E. K., Contreras, M., Magris, M., Hidalgo, G., Fierer, N., & Knight, R. (2010). Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(26), 11971–11975.

Dominguez-Bello, M. G., Godoy-Vitorino, F., Knight, R., & Blaser, M. J. (2019). Role of the microbiome in human development. *Gut*, 68(6), 1108–1114.

Eckburg, P. B., Bik, E. M., Bernstein, C. N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., Gill, S. R., Nelson, K. E., & Relman, D. A. (2005). Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science (New York, N.Y.)*, 308(5728), 1635–1638.

Everard A, Belzer C, Geurts L, et al. Cross-talk between *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;110(22):9066–71.

Fallingborg, J., Christensen, L. A., Ingeman-Nielsen, M., Jacobsen, B. A., Abildgaard, K., & Rasmussen, H. H. (1989). pH-profile and regional transit times of the normal gut measured by a radiotelemetry device. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 3(6), 605–613.

Fasano A, Not T, Wang W, et al. 2000. Zonulin, a newly discovered modulator of intestinal permeability, and its expression in coeliac disease. *Lancet* 355:1518–19.

Floch, M., 2005. *Netter's Gastroenterology*. Saunders, Elsevier, USA.

Fox, G. E., Stackebrandt, E., Hespell, R. B., Gibson, J., Maniloff, J., Dyer, T. A., Wolfe, R. S., Balch, W. E., Tanner, R. S., Magrum, L. J., Zablen, L. B., Blakemore, R., Gupta, R., Bonen, L., Lewis, B. J., Stahl, D. A., Luehrsen, K. R., Chen, K. N., & Woese, C. R., 1980. The phylogeny of prokaryotes. *Science* (New York, N.Y.), 209(4455), 457–463.

Fraher, M. H., O'Toole, P. W., & Quigley, E. M. (2012). Techniques used to characterize the gut microbiota: a guide for the clinician. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*, 9(6), 312–322.

Frayn, N. K.. 2010. *Metabolic regulation: a human perspective*. United Kingdom: A John Wiley & Sons, Ltd.Forsberg, Göte, Olle Hernell.

Fukuda S, Toh H, Hase K, et al. Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. *Nature* 2011;469(7331):543–7.

Furness, J.B., Rivera, L.R., Cho, H.-J., et al. 2013. The gut as a sensory organ. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 10, 729–740.

Galipeau, H.J., McCarville, J.L., Huebener, S., et al. (2015). Intestinal microbiota modulates gluten-induced immunopathology in humanized mice. *Am. J. Pathol.* 185, 2969– 2982.

Gareau MG, Sherman PM, Walker WA. Probiotics and the gut microbiota in intestinal health and disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2010;7(9):503–14.

Goldsmith, L. (2012). *Fitzpatrick's dermatology in general medicine* (8th ed., Vol. 2). McGraw-Hill medical.

Gollwitzer, E. S., Saglani, S., Trompette, A., Yadava, K., Sherburn, R., McCoy, K. D., Nicod, L. P., Lloyd, C. M., & Marsland, B. J. (2014). Lung microbiota promotes tolerance to allergens in neonates via PD-L1. *Nature medicine*, 20(6), 642–647.

Grice, E. A., & Segre, J. A. (2012). The human microbiome: our second genome. *Annual review of genomics and human genetics*, 13, 151–170. <https://doi.org/10.1146/annurev-genom-090711-163814>

Green PHR, Stavropoulos SN, Panagi SG, et al. 2001. Characteristics of adult celiac disease in the USA: results of a national survey. *Am. J. Gastroenterol.* 96:126–31

Green, P. H., & Jabri, B. (2006). Celiac disease. *Annual review of medicine*, 57, 207–221.

Greenwood-Van Meerveld, B., Johnson, A. C., & Grundy, D. (2017). Gastrointestinal Physiology and Function. *Handbook of experimental pharmacology*, 239, 1–16.

Gribble, F. M., & Reimann, F. (2016). Enteroendocrine Cells: Chemosensors in the Intestinal Epithelium. *Annual review of physiology*, 78, 277–299.

Hallert C, Grant C, Grehn S, et al. 2002. Evidence of poor vitamin status in coeliac patients on a gluten-free diet for 10 years. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 16:1333–39

Halttunen T, Maki M. 1999. Serum immunoglobulin A from patients with celiac disease inhibits human T84 intestinal crypt epithelial cell differentiation. *Gastroenterology* 116:566–72

Heimesaat, M.M., Dunay, I.R., Alutis, M., et al. 2014. Nucleotide-Oligomerization-Domain-2 Affects Commensal Gut Microbiota Composition and Intracerebral Immunopathology in Acute *Toxoplasma gondii* Induced Murine Ileitis. *PLOS ONE* 9, e105120.

Helmink BA, Khan MAW, Hermann A, Gopalakrishnan V, Wargo JA: The microbiome, cancer, and cancer therapy. *Nature medicine* 2019, 25(3):377-388.

<http://www.usadellab.org/cms/?page=trimmomatic>

<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>

Hue S, Mention JJ, Monteiro RC, et al. 2004. A direct role for NKG2D/MICA interaction in villous atrophy during celiac disease. *Immunity* 21:367–77

Human Microbiome Project Consortium (2012). Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*, 486(7402), 207–214.

Ibnou-Zekri, N., Blum, S., Schiffrin, E. J., & von der Weid, T. (2003). Divergent patterns of colonization and immune response elicited from two intestinal *Lactobacillus* strains that display similar properties in vitro. *Infection and immunity*, 71(1), 428–436. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.1.428-436.2003>

Islam, K. B., Fukiya, S., Hagio, M., Fujii, N., Ishizuka, S., Ooka, T., Ogura, Y., Hayashi, T., & Yokota, A. (2011). Bile acid is a host factor that regulates the composition of the cecal microbiota in rats. *Gastroenterology*, 141(5), 1773–1781.

Jabri B, Sollid LM. (2009). Tissue-mediated control of immunopathology in coeliac disease. *Nat Rev Immunol.* ; 9:858–870.

Jalanka-Tuovinen, J., Salonen, A., Nikkilä, J., et al. 2011. Intestinal microbiota in healthy adults: temporal analysis reveals individual and common core and relation to intestinal symptoms. *PloS One* 6, e23035.

Jiang, W., Wu, N., Wang, X., Chi, Y., Zhang, Y., Qiu, X., Hu, Y., Li, J. et al. (2015) Dysbiosis gut microbiota associated with inflammation and impaired mucosal immune function in intestine of humans with non-alcoholic fatty liver disease. *Sci Rep* 5, 8096.

Johansson M, Holme'n Larsson J, Hansson G. Microbes and Health Sackler Colloquium. The two mucus layers of colon are organized by the MUC2 mucin, whereas the outer layer is a legislator of host-microbial interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(suppl 1)4659–4665.

Jovel, J., Patterson, J., Wang, W., Hotte, N., O'Keefe, S., Mitchel, T., Perry, T., Kao, D., Mason, A. L., Madsen, K. L., & Wong, G. K. S. (2016). Characterization of the gut microbiome using 16S or shotgun metagenomics. *Frontiers in Microbiology*, 7(APR), 1–17.

Kalliomäki, M., Satokari, R., Lähteenoja, H., et al. 2012. Expression of Microbiota, Toll-like Receptors, and Their Regulators in the Small Intestinal Mucosa in Celiac Disease: *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 54, 727–732.

Kareva, I. Concise Review: Metabolism and Gut Microbiota in Cancer Immunoediting, CD8/Treg Ratios, Immune Cell Homeostasis, and Cancer (Immuno)Therapy. *Stem Cells* 2019.

Kelsen, J. R., & Wu, G. D. (2012). The gut microbiota, environment and diseases of modern society. *Gut microbes*, 3(4), 374–382.

Kim, B. R., Shin, J., Guevarra, R., Lee, J. H., Kim, D. W., Seol, K. H., Lee, J. H., Kim, H. B., & Isaacson, R. (2017). Deciphering Diversity Indices for a Better Understanding of Microbial Communities. *Journal of microbiology and biotechnology*, 27(12), 2089–2093.

Kim M.H., Qie Y.Q., Park J.H. et al. 2016. Gut Microbial Metabolites Fuel Host Antibody Responses. *Cell Host and Microbe* 20 (2): 202- 214.

Kirjavainen V. P., Gibson G.R. (1999). Healthy gut microflora and allergy: factors influencing development of the microbiota. *Annals of Medicine* 31 (4): 288-292.

Knight, R., Callewaert, C., Marotz, C., Hyde, E. R., Debelius, J. W., McDonald, D., & Sogin, M. L. (2017). The Microbiome and Human Biology. *Annual review of genomics and human genetics*, 18, 65–86.

Knip, M.; Honkanen, J. Modulation of Type 1 Diabetes Risk by the Intestinal Microbiome. *Curr. Diab. Rep.* 2017, 17, 105.

Kobayashi, T., Glatz, M., Horiuchi, K., Kawasaki, H., Akiyama, H., Kaplan, D. H., Kong, H. H., Amagai, M., & Nagao, K. (2015). Dysbiosis and *Staphylococcus aureus* Colonization Drives Inflammation in Atopic Dermatitis. *Immunity*, 42(4), 756–766.

Koenig, J.E., Spor, A., Scalfone, N., et al. 2011. Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108 Suppl 1, 4578–4585.

Koropatkin, N.M., Cameron, E.A., Martens, E.C., (2012). How glycan metabolism shapes the human gut microbiota. *Nat. Rev. Microbiol.* 10, 323–335.

Korpela, K., Flint, H.J., Johnstone, A.M., et al. (2014). Gut microbiota signatures predict host and microbiota responses to dietary interventions in obese individuals. *PloS One* 9, e90702.

Korpela, K., Salonen, A., Virta, L. J., Kekkonen, R. A., Forslund, K., Bork, P., & de Vos, W. M. (2016). Intestinal microbiome is related to lifetime antibiotic use in Finnish pre-school children. *Nature communications*, 7, 10410.

Kuczynski, J., Lauber, C. L., Walters, W. A., Parfrey, L. W., Clemente, J. C., Gevers, D., & Knight, R., 2011. Experimental and analytical tools for studying the human microbiome. *Nature reviews. Genetics*, 13(1), 47–58.

Latorre, R., Sternini, C., De Giorgio, R., & Greenwood-Van Meerveld, B. (2016). Enteroendocrine cells: a review of their role in brain-gut communication. *Neurogastroenterology and motility: the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society*, 28(5), 620–630.

Laval, L., Martin, R., Natividad, J. N., Chain, F., Miquel, S., Desclée de Maredsous, C., Capronnier, S., Sokol, H., Verdu, E. F., van Hylckama Vlieg, J. E., Bermúdez-Humarán, L. G., Smokvina, T., & Langella, P. (2015). *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-3690 and the commensal bacterium *Faecalibacterium prausnitzii* A2-165 exhibit similar protective effects to induced barrier hyper-permeability in mice. *Gut microbes*, 6(1), 1–9.

Lax, S., Smith, D. P., Hampton-Marcell, J., Owens, S. M., Handley, K. M., Scott, N. M., Gibbons, S. M., Larsen, P., Shogan, B. D., Weiss, S., Metcalf, J. L., Ursell, L. K., Vázquez-Baeza, Y., Van Treuren, W., Hasan, N. A., Gibson, M. K., Colwell, R., Dantas, G., Knight, R., & Gilbert, J. A. (2014). Longitudinal analysis of microbial interaction between humans and the indoor environment. *Science (New York, N.Y.)*, 345(6200), 1048–1052. <https://doi.org/10.1126/science.1254529>

Leonel, A.J., Alvarez-Leite, J.I., 2012. Butyrate: implications for intestinal function. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 15, 474– 479.

Lepage, P., Leclerc, M.C., Joossens, M., et al. 2013. A metagenomic insight into our gut's microbiome *Gut* 62, 146–158.

Leser, T.D. and Mølbaek, L. (2009), Better living through microbial action: the benefits of the mammalian gastrointestinal microbiota on the host. *Environmental Microbiology*, 11: 2194-2206.

Scher JU, Ubeda C, Artacho A, Attur M, Isaac S, Reddy SM, Marmon S, Neimann A, Brusca S, Patel T, et al. Decreased bacterial diversity characterizes the altered gut microbiota in patients with psoriatic arthritis, resembling dysbiosis in inflammatory bowel disease. *Arthritis Rheumatol* (2015); 67:128-39.

Li, G., Yang, M., Zhou, K., Zhang, L., Tian, L., Lv, S., ... Hou, X. (2015). Diversity of duodenal and rectal microbiota in biopsy tissues and luminal contents in healthy volunteers. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(7), 1136–1145.

Li, J., Jia, H., Cai, X. et al. An integrated catalog of reference genes in the human gut microbiome. *Nat Biotechnol* 32, 834–841 (2014).

Lim, M. Y., You, H. J., Yoon, H. S., Kwon, B., Lee, J. Y., Lee, S., Song, Y. M., Lee, K., Sung, J., & Ko, G. (2017). The effect of heritability and host genetics on the gut microbiota and metabolic syndrome. *Gut*, 66(6), 1031–1038.

Lindfors, K., Blomqvist, T., Juuti-Uusitalo, K., et al. 2008. Live probiotic *Bifidobacterium lactis* bacteria inhibit the toxic effects induced by wheat gliadin in epithelial cell culture. *Clin. Exp. Immunol.* 152, 552–558.

Lohi, S., Mustalahti, K., Kaukinen, K., Laurila, K., Collin, P., Rissanen, H., Lohi, O., Bravi, E., Gasparin, M., Reunanen, A., & Mäki, M. (2007). Increasing prevalence of coeliac disease over time. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 26(9), 1217–1225.

Lozupone, C.A., Stombaugh, J.I., Gordon, J.I., et al. 2012. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature* 489, 220–230.

Ludvigsson JF, Leffler DA, Bai JC, et al. The Oslo definitions for coeliac disease and related terms. *Gut* 2013;62(1):43–52.

Maki M, Mustalahti K, Kokkonen J, et al. Prevalence of celiac disease among children in Finland. *N Engl J Med* 2003;348(25):2517–24.

Maruvada, P.; Leone, V.; Kaplan, L.M.; Chang, E.B. The Human Microbiome and Obesity: Moving beyond Associations. *Cell Host Microbe* 2017, 22, 589–599.

McAleer, J. P., & Kolls, J. K. (2018). Contributions of the intestinal microbiome in lung immunity. *European journal of immunology*, 48(1), 39–49.

McGuckin, M.A., Lindén, S.K., Sutton, P., Florin, T.H., 2011. Mucin dynamics and enteric pathogens. *Nat. Rev. Microbiol.* 9, 265–278.

Meijers, B. K., & Evenepoel, P. (2011). The gut-kidney axis: indoxyl sulfate, p-cresyl sulfate and CKD progression. *Nephrology, dialysis, transplantation: official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, 26(3), 759–761.

Molberg O, McAdam SN, Korner R, et al. 1998. Tissue transglutaminase selectively modifies gliadin peptides that are recognized by gut-derived T cells in celiac disease. *Nat. Med.* 4:713–17

Morrison, D. J., and Preston, T. (2016). Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism. *Gut Microbes* 7, 189–200.

Mueller, N. T., Dominguez-Bello, M. G., Appel, L. J., & Hourigan, S. K. (2020). 'Vaginal seeding' after a caesarean section provides benefits to newborn children: FOR: Does exposing caesarean-delivered newborns to the vaginal microbiome affect their chronic disease risk? The critical need for trials of 'vaginal seeding' during caesarean section. *BJOG : an international journal of obstetrics and gynaecology*, 127(2), 301. <https://doi.org/10.1111/1471-0528.15979>

Nagpal, R., Kumar, M., Yadav, A. K., Hemalatha, R., Yadav, H., Marotta, F., & Yamashiro, Y. (2016). Gut microbiota in health and disease: an overview focused on metabolic inflammation. *Beneficial microbes*, 7(2), 181–194.

Nanayakkara, M.; Lania, G.; Maglio, M.; Discepolo, V.; Sarno, M.; Gaito, A.; Troncone, R.; Auricchio, S.; Auricchio, R.; Barone, M.V. An undigested gliadin peptide activates innate immunity and proliferative signaling in enterocytes: The role in celiac disease. *Am. J. Clin. Nutr.* 2013, 98, 1123–1135.

Niehues, H., Tsoi, L. C., van der Krieken, D. A., Jansen, P., Oortveld, M., Rodijk-Olthuis, D., van Vlijmen, I., Hendriks, W., Helder, R. W., Bouwstra, J. A., van den Bogaard, E. H., Stuart, P. E., Nair, R. P., Elder, J. T., Zeeuwen, P., & Schalkwijk, J. (2017). Psoriasis-Associated Late Cornified Envelope (LCE) Proteins Have Antibacterial Activity. *The Journal of investigative dermatology*, 137(11), 2380–2388.

Nistal, E., Caminero, A., Herrán, A. R., Arias, L., Vivas, S., Ruiz De Morales, J. M., Calleja, S., Sáenz De Miera, L. E., Arroyo, P., & Casqueiro, J. (2012). Differences of small intestinal bacteria populations in adults and children with/without celiac disease: Effect of age, gluten diet, and disease. *Inflammatory Bowel Diseases*, 18(4), 649–656.

O’Keefe, S.J.D., Li, J.V., Lahti, L., et al. 2015. Fat, fibre and cancer risk in African Americans and rural Africans. *Nat. Commun.* 6, 6342.

Odamaki, T., Kato, K., Sugahara, H., et al. 2016. Age-related changes in gut microbiota composition from newborn to centenarian: a cross-sectional study. *BMC Microbiol.* 16, 90.

O’Hara, A. M., & Shanahan, F. (2006). The gut flora as a forgotten organ. *EMBO reports*, 7(7), 688–693.

O’Hara, A. M., & Shanahan, F. (2007). Gut microbiota: mining for therapeutic potential. *Clinical gastroenterology and hepatology: the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*, 5(3), 274–284.

Ohland, C.L., Jobin, C., 2015. Microbial activities and intestinal homeostasis: A delicate balance between health and disease. *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.* 1, 28–40.

Olivares M, Neef A, Castillejo G, Palma GD, Varea V, Capilla A, Palau F, Nova E, Marcos A, Polanco I, Ribes-Koninckx C, Ortigosa L, Izquierdo L, Sanz Y (2014). The

HLA-DQ2 genotype selects for early intestinal microbiota composition in infants at high risk of developing coeliac disease. *Gut*. 2014 Mar;64(3) 406-417.

Ou, J.H., Carbonero, F., Zoetendal, E.G. et al. 2013. Diet, microbiota, and microbial metabolites in colon cancer risk in rural Africans and African Americans. *Am. J. Clin. Nutr.* 98(1): 111-120.

Paarlahti, P., Kurppa, K., Ukkola, A., Collin, P., Huhtala, H., Mäki, M., & Kaukinen, K. (2013). Predictors of persistent symptoms and reduced quality of life in treated coeliac disease patients: A large cross-sectional study. *BMC Gastroenterology*, 13(1).

Panelli, S., Capelli, E., Lupo, G. F. D., Schieppatti, A., Betti, E., Sauta, E., Marini, S., Bellazzi, R., Vanoli, A., Pasi, A., Cacciatore, R., Bacchi, S., Balestra, B., Pastoris, O., Frulloni, L., Corazza, G. R., Biagi, F., & Ciccocioppo, R. (2020). Comparative study of salivary, duodenal, and fecal microbiota composition across adult celiac disease. *Journal of Clinical Medicine*, 9(4).

Paradis, E., Claude, J., & Strimmer, K. (2004). APE: Analyses of Phylogenetics and Evolution in R language. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 20(2), 289–290.

Pareek, C. S., Smoczynski, R., & Tretyn, A. (2011). Sequencing technologies and genome sequencing. *Journal of applied genetics*, 52(4), 413–435.

Pastorelli, L., De Salvo, C., Mercado, J.R., et al. 2013. Central role of the gut epithelial barrier in the pathogenesis of chronic intestinal inflammation: lessons learned from animal models and human genetics. *Front. Immunol.* 4, 280.

Patel, N., & Robert, M. E. (2022). Frontiers in Celiac Disease: Where Autoimmunity and Environment Meet. *The American journal of surgical pathology*, 46(1), e43–e54. <https://doi.org/10.1097/PAS.0000000000001639>

Patterson, E., Ryan, P. M., Cryan, J. F., Dinan, T. G., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., & Stanton, C. (2016). Gut microbiota, obesity and diabetes. *Postgraduate medical journal*, 92(1087), 286–300.

Peng, L.Y., Li, Z.Y., Green, R.S., et al. 2009. Butyrate Enhances the Intestinal Barrier by Facilitating Tight Junction Assembly via Activation of AMP-Activated Protein Kinase in Caco-2 Cell Monolayers. *The American Institute of Nutrition* 139 (9): 1619-1625.

Peraaho M, Collin P, Kaukinen K, et al. 2004. Oats can diversify a gluten-free diet in celiac disease and dermatitis herpetiformis. *J. Am. Diet. Assoc.* 104:1148– 50

Peterson, D.A.; McNulty, N.P.; Guruge, J.L.; Gordon, J.I. IgA response to symbiotic bacteria as a mediator of gut homeostasis. *Cell Host Microbe* 2007, 2, 328–339.

Peterson, L. W., & Artis, D. (2014). Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nature reviews. Immunology*, 14(3), 141–153. <https://doi.org/10.1038/nri3608>

Plöger, S., Stumpff, F., Penner, G.B., et al. 2012. Microbial butyrate and its role for barrier function in the gastrointestinal tract. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1258, 52–59.

Ponziani, F. R., Bhoori, S., Castelli, C., Putignani, L., Rivoltini, L., Del Chierico, F., Sanguinetti, M., Morelli, D., Paroni Sterbini, F., Petito, V., Reddel, S., Calvani, R., Camisaschi, C., Picca, A., Tuccitto, A., Gasbarrini, A., Pompili, M., & Mazzaferro, V. (2019). Hepatocellular Carcinoma Is Associated With Gut Microbiota Profile and Inflammation in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 69(1), 107–120.

Poussin, C., Sierro, N., Boué, S., Battey, J., Scotti, E., Belcastro, V., Peitsch, M. C., Ivanov, N. V., & Hoeng, J. (2018). Interrogating the microbiome: experimental and computational considerations in support of study reproducibility. *Drug discovery today*, 23(9), 1644–1657.

Rajilić-Stojanović, M., Heilig, H.G.H.J., Molenaar, D., Kajander, K., Surakka, A., Smidt, H. and De Vos, W.M. (2009), Development and application of the human intestinal tract chip, a phylogenetic microarray: analysis of universally conserved phylotypes in the abundant microbiota of young and elderly adults. *Environmental Microbiology*, 11: 1736-1751.

Rajpal DK, Brown JR. (2013). Modulating the human gut microbiome as an emerging therapeutic paradigm. *Science progress*; 96: 224-236.

Rautava, S., Luoto, R., Salminen, S., et al. (2012). Microbial contact during pregnancy, intestinal colonization and human disease. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 9, 565–576.

Re, F., Strominger J.K., (2004). Heterogeneity of TLR-induced responses in dendritic cells: from innate to adaptive immunity. *Immunobiology* 209: 191-198.

Reunanen, J., Kainulainen, V., Huuskonen, L., et al. (2015). *Akkermansia muciniphila* Adheres to Enterocytes and Strengthens the Integrity of the Epithelial Cell Layer. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 3655–3662.

Robert ME, Gibson J. Inflammatory diseases of the small intestine. In: Odze RDGJ, Crawford JM, eds. *Surgical Pathology of the Gastrointestinal Tract, Liver, Biliary Tract and Pancreas*, 3rd Edition. Philadelphia, PA: WB Saunders; 2014;5:402–435.

Round, J.L., Mazmanian, S.K., 2009. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 313–323.

Salonen, A., de Vos, W.M., 2014. Impact of diet on human intestinal microbiota and health. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 5, 239–262.

Sanger F. (1975). The Croonian Lecture, 1975. Nucleotide sequences in DNA. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 191(1104), 317–333.

Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(12), 5463–5467.

Sanz, Y., Pama, G. De, & Laparra, M. (2011). Unraveling the ties between celiac disease and intestinal microbiota. *International Reviews of Immunology*, 30(4), 207–218.

- Schepici, G., Silvestro, S., Bramanti, P., & Mazzon, E. (2019). The Gut Microbiota in Multiple Sclerosis: An Overview of Clinical Trials. *Cell transplantation*, 28(12), 1507–1527. <https://doi.org/10.1177/0963689719873890>
- Schiepatti, A., Bacchi, S., Biagi, F., Panelli, S., Betti, E., Corazza, G. R., Capelli, E., & Ciccocioppo, R. (2021). Relationship between duodenal microbiota composition, clinical features at diagnosis, and persistent symptoms in adult Coeliac disease. *Digestive and Liver Disease*, 53(8), 972–979.
- Schnorr, S.L., Candela, M., Rampelli, S., et al. 2014. Gut microbiome of the Hadza hunter-gatherers. *Nat. Commun.* 5, 3654.
- Schroeder, B., Bäckhed, F. (2016). Signals from the gut microbiota to distant organs in physiology and disease. *Nat Med* 22, 1079–1089.
- Sekirov, I., Russell, S. L., Antunes, L. C., & Finlay, B. B. (2010). Gut microbiota in health and disease. *Physiological reviews*, 90(3), 859-904.
- Sender, R., Fuchs, S., & Milo, R. (2016). Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLoS Biology*, 14(8), 1–14.
- Shan, L., Molberg, Ø., Parrot, I., Hausch, F., Filiz, F., Gray, G. M., Sollid, L. M., & Khosla, C. (2002). Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue. *Science (New York, N.Y.)*, 297(5590), 2275–2279. <https://doi.org/10.1126/science.1074129>
- Shen, Y., Torchia, M.L.G., Lawson, G.W., et al. 2012. Outer Membrane Vesicles of a Human Commensal Mediate Immune Regulation and Disease Protection. *Cell Host & Microbe* 12 (4): 509-520.
- Singh P, Arora S, Singh A, et al. Prevalence of celiac disease in Asia: a systematic review and meta-analysis. *J Gastroenterol Hepatol* 2016;31(6):1095–101.
- Sjogren YM, Tomicic S, Lundberg A, et al. Influence of early gut microbiota on the maturation of childhood mucosal and systemic immune responses. *Clin Exp Allergy* 2009;39(12):1842–51.

Smith, M.P., Howitt, M.R., Panikov, N., et al. 2013. The Microbial Metabolites, Short-chain fatty acids, Regulate Colonic Treg Cell Homeostasis. *Science* 341 (6145): 569-573.

Snell, S.R; Klinik Nöroanatomy, Nobel Tıp Kitabevi, 2011.

Sollid LM, Thorsby E. HLA susceptibility genes in coeliac disease: genetic mapping and role in pathogenesis. *Gastroenterology* 105: 910 – 22. 1993.

Sollid LM. 2002. Coeliac disease: dissecting a complex inflammatory disorder. *Nat. Rev. Immunol.* 2:647–55.

Sommer, F., Bäckhed, F., 2013. The gut microbiota — masters of host development and physiology. *Nat. Rev. Microbiol.* 11, 227–238.

Song, S. J., Lauber, C., Costello, E. K., Lozupone, C. A., Humphrey, G., Berg-Lyons, D., Caporaso, J. G., Knights, D., Clemente, J. C., Nakielny, S., Gordon, J. I., Fierer, N., & Knight, R. (2013). Cohabiting family members share microbiota with one another and with their dogs. *eLife*, 2, e00458.

Sonnenburg, E.D., Smits, S.A., Tikhonov, M., et al. 2016. Diet-induced extinctions in the gut microbiota compound over generations. *Nature* 529, 212–215.

Spellerberg, Ian F., and Peter J. Fedor. (2003) A tribute to Claude Shannon (1916–2001) and a plea for more rigorous use of species richness, species diversity and the 'Shannon–Wiener' Index. *Global ecology and biogeography* 12.3, 177-179.

Stearns, J. C., Lynch, M. D., Senadheera, D. B., Tenenbaum, H. C., Goldberg, M. B., Cvitkovitch, D. G., Croitoru, K., Moreno-Hagelsieb, G., & Neufeld, J. D. (2011). Bacterial biogeography of the human digestive tract. *Scientific reports*, 1, 170.

Storsrud S, Hulthen LR, Lenner RA. 2003. Beneficial effects of oats in the gluten-free diet of adults with special reference to nutrient status, symptoms and subjective experiences. *Br. J. Nutr.* 90: 101–7

Sutmoller, R. P., den Brok, M. H., Kramer, M., Bennink, E. J., Toonen, L. W., Kullberg, B. J., Joosten, L. A., Akira, S., Netea, M. G., & Adema, G. J. (2006). Toll-like receptor 2 controls expansion and function of regulatory T cells. *The Journal of clinical investigation*, 116(2), 485–494.

Svane, M. S., Bojsen-Møller, K. N., Nielsen, S., Jørgensen, N. B., Dirksen, C., Bendtsen, F., Kristiansen, V. B., Hartmann, B., Holst, J. J., & Madsbad, S. (2016). Effects of endogenous GLP-1 and GIP on glucose tolerance after Roux-en-Y gastric bypass surgery. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 310(7), E505–E514.

Thompson T. 2000. Folate, iron, and dietary fiber contents of the gluten-free diet. *J. Am. Diet. Assoc.* 100:1389–96

Tims, S., Derom, C., Jonkers, D. M., Vlietinck, R., Saris, W. H., Kleerebezem, M., de Vos, W. M., & Zoetendal, E. G. (2013). Microbiota conservation and BMI signatures in adult monozygotic twins. *The ISME journal*, 7(4), 707–717.

Torres, M. I., Palomeque, T., & Lorite, P. (2014). HLA in Gastrointestinal Inflammatory Disorders. *HLA and Associated Important Diseases*, March.

Trompette, A., Gollwitzer, E. S., Yadava, K., Sichelstiel, A. K., Sprenger, N., Ngombu, C., et al. (2014). Gut microbiota metabolism of dietary fiber influences allergic airway disease and hematopoiesis. *Nat. Med.* 20, 159–166.

Troncone, R., & Jabri, B. (2011). Coeliac disease and gluten sensitivity. *Journal of Internal Medicine*, 269(6), 582–590.

Turnbaugh, P. J., Ley, R. E., Hamady, M., Fraser-liggett, C., Knight, R., & Gordon, J. I. (2013). ourselves in a changing world. 449(7164), 804–810.

Turner J. R. (2009). Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nature reviews. Immunology*, 9(11), 799–809.

Ulluwishewa, D., Anderson, R.C., McNabb, W.C., et al. 2011. Regulation of Tight Junction Permeability by Intestinal Bacteria and Dietary Components. *J. Nutr.* 141, 769–776.

Umar S. (2010). Intestinal stem cells. *Current gastroenterology reports*, 12(5), 340–348.

Usai P, Minerba L, Marini B, et al. 2002. Case control study on health-related quality of life in adult coeliac disease. *Dig. Liver Dis.* 34:547–52

Vaishnava, S. et al. The antibacterial lectin RegIII γ promotes the spatial segregation of microbiota and host in the intestine. *Science* 334, 255–258 (2011).

Valitutti, F., Cucchiara, S., & Fasano, A. (2019). Celiac disease and the microbiome. In *Nutrients* (Vol. 11, Issue 10). MDPI AG.

van den Bogert, B., de Vos, W. M., Zoetendal, E. G., & Kleerebezem, M. (2011). Microarray analysis and barcoded pyrosequencing provide consistent microbial profiles depending on the source of human intestinal samples. *Applied and environmental microbiology*, 77(6), 2071–2080.

van Herpen, T. W. J. M., Goryunova, S. V., van der Schoot, J., Mitreva, M., Salentijn, E., Vorst, O., Schenk, M. F., van Veelen, P. A., Koning, F., van Soest, L. J. M., Vosman, B., Bosch, D., Hamer, R. J., Gilissen, L. J. W. J., & Smulders, M. J. M. (2006). Alpha-gliadin genes from the A, B, and D genomes of wheat contain different sets of celiac disease epitopes. *BMC Genomics*, 7, 1–13.

Ventura A, Magazzu G, Greco L. (1999). Duration of exposure to gluten and risk for autoimmune disorders in patients with celiac disease. SIGEP Study Group for Autoimmune Disorders in Celiac Disease. *Gastroenterology* 117:297–303.

Verdu EF, Galipeau HJ, Jabri B. (2015). ; Novel players in coeliac disease pathogenesis: role of the gut microbiota. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 12:497–506.

Viggiano, D., Ianiro, G., Vanella, G., Bibbò, S., Bruno, G., Simeone, G., Mele, G., 2015. Gut barrier in health and disease: focus on childhood. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 19, 1077–1085.

Vinolo, M. A., Rodrigues, H. G., Hatanaka, E., Sato, F. T., Sampaio, S. C., & Curi, R. (2011). Suppressive effect of short-chain fatty acids on production of proinflammatory mediators by neutrophils. *The Journal of nutritional biochemistry*, 22(9), 849–855.

Vivas, S., Ruiz De Morales, J. M., Fernandez, M., Hernando, M., Herrero, B., Casqueiro, J., & Gutierrez, S. (2008). Age-related clinical, serological, and histopathological features of celiac disease. *American Journal of Gastroenterology*, 103(9), 2360–2365.

Vrieze, A., Out, C., Fuentes, S., Jonker, L., Reuling, I., Kootte, R. S., van Nood, E., Holleman, F., Knaapen, M., Romijn, J. A., Soeters, M. R., Blaak, E. E., Dallinga-Thie, G. M., Reijnders, D., Ackermans, M. T., Serlie, M. J., Knop, F. K., Holst, J. J., van der Ley, C., Kema, I. P., ... Nieuwdorp, M. (2014). Impact of oral vancomycin on gut microbiota, bile acid metabolism, and insulin sensitivity. *Journal of hepatology*, 60(4), 824–831.

Wacklin, P., Kaukinen, K., Tuovinen, E., Collin, P., Lindfors, K., Partanen, J., Mäki, M., & Mättö, J. (2013). The duodenal microbiota composition of adult celiac disease patients is associated with the clinical manifestation of the disease. *Inflammatory Bowel Diseases*.

Wacklin, P., Laurikka, P., Lindfors, K., Collin, P., Salmi, T., Lähdeaho, M. L., Saavalainen, P., Mäki, M., Mättö, J., Kurppa, K., & Kaukinen, K. (2014). Altered Duodenal microbiota composition in celiac disease patients suffering from persistent symptoms on a long-term gluten-free diet. *American Journal of Gastroenterology*, 109(12), 1933–1941.

Wang, Q, G. M. Garrity, J. M. Tiedje, and J. R. Cole., 2007. Naïve Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy. *Appl Environ Microbiol.* 73(16):5261-7.

Wikoff, W. R., Anfora, A. T., Liu, J., Schultz, P. G., Lesley, S. A., Peters, E. C., & Siuzdak, G. (2009). Metabolomics analysis reveals large effects of gut microflora on

mammalian blood metabolites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(10), 3698–3703.

Wu, G. D., & Lewis, J. D. (2013). Analysis of the human gut microbiome and association with disease. *Clinical gastroenterology and hepatology: the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*, 11(7), 774–777.

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

Zeissig, S., & Blumberg, R. S. (2014). Life at the beginning: perturbation of the microbiota by antibiotics in early life and its role in health and disease. *Nature immunology*, 15(4), 307–310.

Zhernakova, A., Elbers, C. C., Ferwerda, B., Romanos, J., Trynka, G., Dubois, P. C., de Kovel, C. G., Franke, L., Oosting, M., Barisani, D., Bardella, M. T., Finnish Celiac Disease Study Group, Joosten, L. A., Saavalainen, P., van Heel, D. A., Catassi, C., Netea, M. G., & Wijmenga, C. (2010). Evolutionary and functional analysis of celiac risk loci reveals SH2B3 as a protective factor against bacterial infection. *American journal of human genetics*, 86(6), 970–977.

Zoetendal EG, Raes J, van de Bogert B, Arumugam M, Booijink CC, Troost FJ, Bork P, Wels M, de Vos WM, Kleerebezem M: The human small intestinal microbiota is driven by rapid uptake and conversion of simple carbohydrates. *ISME J*, 2012, 6:1415–1426.

Zoetendal, E.G., Rajilic-Stojanovic, M. and de Vos, W.M. (2008) High-throughput diversity and functionality analysis of the gastrointestinal tract microbiota. *Gut* 57, 1605–1615.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Toygar	Uyruğu	T.C.
Soyadı	PEKCAN	Tel no	
Doğum tarihi		e-posta	

Eğitim Bilgileri

Mezun olduğu kurum		Mezuniyet yılı
Lise		
Lisans		
Yüksek Lisans	-	-
Doktora	-	-

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (yıl-yıl)

Yabancı Dilleri	Sınav türü	Puanı
İngilizce		

Proje Deneyimi

Proje Adı	Destekleyen kurum	Süre (Yıl-Yıl)