



T.C.

SAKARYA ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

**HEPATİT B AŞISINA CEVAPTA BAĞIRSAK
MİKROBİYOTASININ ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI**

DR.ELİF ÖZÖZEN ŞAHİN

UZMANLIK TEZİ

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Prof. Dr. MEHMET KÖROĞLU

2022-SAKARYA

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

**HEPATİT B AŞISINA CEVAPTA BAĞIRSAK
MİKROBİYOTASININ ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI**

DR.ELİF ÖZÖZEN ŞAHİN

UZMANLIK TEZİ

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. MEHMET KÖROĞLU

2022-SAKARYA

ONAY

Kurum : Sakarya Üniversitesi/Tıp Fakültesi

Program türü : Uzmanlık Tezi

ANAbilim Dalı : Tıbbi Mikrobiyoloji

Tez Sahibi : Elif Özözen Şahin

Sınav Tarihi : **Saat:**

Tez Başlığı : Hepatit B aşısına cevapta bağırsak mikrobiyotasının rolünün araştırılması

Bu çalışma, içerik ve kalite bakımından Uzmanlık Tezi olarak Oybirliği / Oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

	Ünvan, Adı-Soyadı (Kurum adı)	İmza	Kabul/Red*
Danışman (Üye)			
Üye			
Üye			

* Red kararının gerekçesi onay dayfasının arkasında belirtilmelidir.

ONAY

“Bu tez .././202.. tarihinde yukarıdaki jüri tarafından Oybirliği / Oyçokluğu ile kabul edilmiştir.”

.././202..

Tıp Fakültesi Dekanı

BEYAN

Bu tezin kendi çalışmam olduğunu, planlanmasından yazımına kadar hiçbir aşamasında etik dışı davranışımın olmadığını, tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları kaynaklar listesine aldığımı, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

*Bu çalışma T.C. Sakarya Üniversitesi İlaç Dışı Grişimsel Araştırmalar Etik Kurulu'ndan 29/05/2020 tarihinde onay alınarak hazırlanmıştır.

*Bu çalışma, Sakarya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Komisyonu Başkanlığı tarafından 2020-7-25-35 numaralı proje ile desteklenmiştir.

Tarih:

.../.../...

.....

Adı-Soyadı

İmza

TEŞEKKÜR

Öncelikle bölüm tercihimde ve bugünkü mutluluğumda büyük payı olan eşim **Fatih Şahin**'e ve uzmanlık eğitiminin 3 yılında bana eşlik eden gözümün nuru kızım **İpek Ece Şahin**'e hayatım boyunca her zaman beni destekleyen **annem, babam ve kardeşime**, Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilimdalı'ndaki uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan anabilim dalı başkanımız **Prof. Dr. Mustafa ALTINDIŞ**'e, bilgi ve tecrübesini cömertce paylaşmasının yanı sıra her durumda yanımda olan, fikir veren, destekleyen **Doç.Dr. Özlem AYDEMİR**'e, ve **Dr. Öğretim Üyesi Tayfur DEMİRAY**'a, laboratuvar çalışmalarımızda yardımlarıyla bana destek olan uzman hekimlerimiz **Hüseyin Agah TERZİ, Engin KARAKÇE** ve **Hasan ZEYBEK**'e, uzmanlık eğitimim sürecince bilimsel ve sosyal her durumda yanına koştuğum, kendisiyle çalışmanın her zaman şans olduğuna inandığım canım ablam **Uzm.Dr.Hande TOPTAN**'a, asistan arkadaşlarım **Tuğba AYHANCI, Gökçen ORMANOĞLU, Halise YENER**'e ve laboratuvara adımlımı attığım ilk günden bugüne kadar hepsiyle uyum içinde çalıştığım tüm laboratuvar teknisyenlerimize teşekkürlerimi sunarım. Bu teşekkürlerimin yanı sıra hayat boyu emeklerini üzerimde taşıyacağım saygımın, sevgimin, vefamın ve minnetimin asla bitmeyeceği, haklarını ödeyemeceğim iki kişiye daha teşekkürüm var.

İlki bana okuma yazma öğretene ışığıyla yolumu aydınlatan çok kıymetli biricik ilkokul öğretmenim **Selma Sarı'ya**, ikincisi ise asistanı olmaktan her zaman gurur duyduğum ve kendisine layık olmak için her gün daha çok çalıştığım, bildiği herşeyi cömertçe benimle paylaşan, hiçbir yerde yazmayan, paylaşılmayan bilgilerini bana aktarıp üzerine koymam için teşvik eden, araştırma ve üretme konusunda ufku her zaman açan, sadece bilim değil insanlık ve hayat anlamında da çok şey öğrendiğim ve örnek aldığım, mesleğimi öğrenmemde en büyük emek sahibi çok kıymetli saygıdeğer danışman hocam **Prof.Dr. Mehmet KÖROĞLU**'na

Teşekkürlerimi sunarım.

Saygılarımla.

Dr. Elif ÖZÖZEN ŞAHİN

İÇİNDEKİLER

BEYAN.....	i
TEŞEKKÜR.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
KISALTMA VE SİMGELER LİSTESİ.....	v
ŞEKİL LİSTESİ.....	vii
TABLO LİSTESİ.....	viii
RESİM LİSTESİ.....	ix
ÖZET.....	x
ABSTRACT.....	xi
1. GİRİŞ ve AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	5
2.1. Mikrobiyota ve Mikrobiyom Tanımı.....	5
2.2. Mikrobiyotanın Tarihçesi.....	5
2.3. Mikrobiyota Analizi.....	6
2.4. Mikrobiyotanın Hastalıklarla İlişkisi.....	10
2.5. Mikrobiyota ve İmmün Sistem.....	13
2.5.1. Bağışıklık sisteminin gelişiminde mikrobiyotanın rolü.....	13
2.5.2. Homeostazda Mikrobiyota ve Bağışıklık Sistemi Arasındaki Etkileşim.....	15
2.6. Hepatit B Virüsü.....	20
2.6.1. Hepatit B virüsü ve özellikleri.....	20
2.6.2. HBV'nin yapısı ve proteinleri.....	20
2.6. 3. Hepatit B virüsünün bulaşıcılık özellikleri.....	21
2.6.4. Tedavi ve korunma yolları.....	21
2.6.5. Hepatit B aşısı.....	24
3. GEREÇ ve YÖNTEM... ..	27

3.1. Etik Kurul Onayı.....	27
3.2. Çalışma Grubu.....	27
3.3. Fekal Örneklerin Toplanması.....	28
3.4. Fekal Örneklerin Bristol Skorlaması ve Ph Ölçümü.....	28
3.5. Nükleik Asit (Dna) İzolasyonu.....	29
3.6. 16S rRNA Sekans.....	29
3.7. Biyoinformatik ve İstatistiksel Analizler.....	33
4. BULGULAR.....	36
4.1. Gönüllülerin Yaş/Cinsiyet Dağılımı.....	36
4.2. Bristol Skorlaması Sonuçları.....	36
4.3. Gaita pH Sonuçları.....	37
4.4. Beslenme Şekilleri.....	37
4.5. Biyoinformatik Ve İstatistiksel Analizler.....	38
4.5.1. <i>Firmucites/Bacteroidetes</i> oranı ve göreceli bolluk verileri.....	38
4.5.2. Alfa çeşitlilik analiz sonuçları.....	40
4.4.3. Beta çeşitlilik analiz sonuçları.....	42
4.4.4. LDA ve Lefse analizleri.....	44
4.4.5. Klodogram analizleri.....	48
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	50
6.KAYNAKLAR.....	65
7.EKLER.....	76
EK-1: Etik kurul kararı.....	76
EK- 2: Asgari bilgilendirilmiş gönüllü onam formu.....	77
ÖZGEÇMİŞ.....	80

KISALTMALAR ve SİMGELER LİSTESİ

HBV	: Hepatit B virüs
KZYA	: Kısa zincirli yağ asitleri
GİS	: Gastrointestinal sistem
İMP	: İnsan mikrobiyom projesi
NIH	: Ulusal sağlık enstitüleri
GALT	: Bağırsakla ilişkili lenfoid doku
NK	: Doğal öldürücü hücre
AMP	: Antimikrobiyal peptit
Ig A	: İmmunglobulin A
Th	: Yardımcı T hücresi
Treg	: Düzenleyici T hücresi
YNS	: Yeni nesil sekans
rRNA	: Ribozomal RNA
QIIME	: Quantitative Insights Into Microbial Ecology
ITS	: Internal Transcribed Spacer
GF	: Mikropsuz fare
İEL	: İntraepitelyal lenfosit
TLR 5	: Toll benzeri reseptör 5
DC	: Dendritik hücre
İBS	: İnflamatuvar bağırsak hastalığı
SFB	: Segmentli filamentöz bakteri

HCC	: Hepatosellüler karsinom
HIV	: İmmun yetmezlik virüsü
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
VKİ	: Vücut kitle indeksi
Qpcr	: Kantitatif polimerize zincir reaksiyonu
DEHB	: Dikkat eksikliği ve hiperaktivite bozukluğu



ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.5.2.1. Homeostazda bağırsak mikrobiyota etkileşimi (Zheng ve ark., 2020'den değiştirilerek kullanılmıştır).

Şekil 2.5.2.2. Bağırsak mikrobiyotasının farelerde aşılama/enfeksiyona karşı antikor tepkilerini etkilediği gösterilen mekanizmalar (Lynn ve Pulendran, 2018'den değiştirilerek kullanılmıştır).

Şekil 3.4.1. Bristol dışkı skalası (Bengi ve ark. 2014'den kullanılmıştır).

Şekil 4.5.1.1. Filum düzeyinde elde edilen sekans analiz sonuçları (H: hasta grubu, K: kontrol grubu)

Şekil 4.5.1.2. Sınıf düzeyinde sekans analiz sonuçları(H: hasta grubu, K: kontrol grubu)

Şekil 4.5.1.3. Cins düzeyinde sekans analiz sonuçları (H: hasta grubu, K: kontrol grubu)

Şekil 4.5.1.4. Tür düzeyinde sekans analiz sonuçları (H: hasta grubu, K: kontrol grubu)

Şekil 4.5.2.1. Simpson indeksi analizine göre alfa çeşitlilik sonuçları (Hasta ve kontrol grubunda)

Şekil 4.5.2.2. Shannon indeksi analizine göre alfa çeşitlilik sonuçları (Hasta ve kontrol grubunda)

Şekil 4.5.2.3. Chao 1 indeksi analizine göre alfa çeşitlilik sonuçları (Hasta ve kontrol grubunda)

Şekil 4.5.2.4 Shannon indeksi analizine göre hasta ve kontrol grubunun alfa çeşitlilik sonuçları (A: rarefaction grafiği B: boxplots grafiği)

Şekil 4.4.3.1. Beta çeşitlilikte Bray curtis analizi

Şekil 4.4.3.2. Beta çeşitlilikte Jaccard analizi

Şekil 4.4.4.1. Filum düzeyinde LDA/Lefse analiz grafikleri (A:Kontrol grubu B: Hasta grubu)

Şekil 4.4.4.2. Cins düzeyinde LDA/Lefse analiz grafikleri (A:Kontrol grubu B: Hasta grubu)

Şekil 4.4.5.1. Filum düzeyinde Klodogram analizi

Şekil 4.4.5.1. Cins düzeyinde Klodogram analizi

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.4.1. İntestinal mikrobiyom kompozisyonundaki değişiklikler ve ilişkilendirildiği bazı hastalıklar

Tablo 4.1.1 Çalışmaya dahil edilen gönüllülerin yaş ve cinsiyet dağılımı

Tablo 4.2.1. Bristol skorlama sonuçları

Tablo 4.3.1. Gaita pH ortalamaları

Tablo 4.4.1. Çalışma kapsamındaki kişilerin beslenme şekilleri.



RESİM LİSTESİ

Resim 3.6.1. Qubit 3 (ThermoFisher, ABD)

Resim 3.6.2. Agaroz jelde yürütülen PCR ürünleri

Resim 3.6.3. Minion yeni nesil sekans cihazı (Oxford Nanopore Technologies, İngiltere)



ÖZET

GİRİŞ VE AMAÇ: Bu çalışmada Hepatit B aşısına cevap alınan ve alınmayan sağlıklı bireylerin bağırsak mikrobiyom analizleri yapılarak, Hepatit B aşısına cevapta bağırsak mikrobiyotasının rolünün araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM: Çalışmaya aşı takvimine uygun şekilde (0.,1., ve 6.) 3 doz Hepatit B aşısı ve 3 doz rapel yapıldığı halde Anti-HBs <10 IU/ml olan 20 hasta ile aşılamadan sonra antikor yanıtı oluşan (Anti-HBs >100 IU/ml) 20 sağlıklı gönüllü olmak üzere 18-65 yaş arası toplam 40 kişi (Mart 2020 – Şubat 2022) dahil edildi. Alınan gaita örnekleri en geç 2 saat içerisinde laboratuvara ulaştırıldıktan sonra pH ölçümü ve Bristol skorlama yapıldı. Mikrobiyom analizleri yapılana kadar taze dondurularak -80°C’de saklandı. Nükleik asit izolasyonu, 16S rRNA PCR, yeni nesil dizileme işlemi, biyoinformatik ve istatistiksel analizler yapıldı.

BULGULAR: Hasta grubunda gaita pH’sı yüksek iken, *Firmucites/Bacteroidetes* oranı (hasta grubunda 1.31, kontrol grubunda 3.28) daha düşük saptandı ($p<0.05$). Hasta grubunda filum düzeyinde; *Bacteroidetes* sınıf düzeyinde; *Gammaproteobacteria*, *Bacteroidia*, *Negativicutes* takım düzeyinde; *Selenomonadales*, *Veillonellales*, *Bacteroidales* aile düzeyine; *Selenomonadaceae*, *Rikenellaceae*, *Veillonellaceae* cins düzeyinde; *Massiliprevotella*, *Alistipes* daha yüksek oranda bulunmuştur. Kontrol grubunda ise; filum düzeyinde; *Firmucutes* sınıf düzeyinde; *Clostridia* takım düzeyinde; *Clostridiales* aile düzeyinde; *Lachnospiraceae*, *Peptostreptococcaceae*, *Hungateiclostridiaceae* daha yüksek oranda bulunmuştur

SONUÇ: Hasta grubunun gaita pH değerleri düşük, *Firmucites/Bacteroidetes* oranı ise yüksek bulundu. Hasta grubunda filum düzeyinde; *Bacteroidetes* sınıf düzeyinde; *Gammaproteobacteria*, *Negativicutes* takım düzeyinde; *Selenomonadales*, *Veillonellales*, aile düzeyinde; *Selenomonadaceae*, *Rikenellaceae*, *Veillonellaceae* cins düzeyinde; *Massiliprevotella*, *Alistipes* daha yüksek oranda bulunmuştur. Kontrol grubunda ise; filum düzeyinde; *Firmucutes* sınıf düzeyinde; *Clostridia* takım düzeyinde; *Clostridiales* aile düzeyinde; *Lachnospiraceae*, *Peptostreptococcaceae*, *Hungateiclostridiaceae* daha yüksek oranda bulunmuştur. Bu veriler Hepatit B aşısına cevap alınamayan grupta bağırsak disbiyozisi varlığını göstermektedir. Ancak bağırsak mikrobiyom analizi sonuçlarının coğrafi bölge, iklim koşulları, diyet ve genetik farklılıkları ile değişkenlik gösterebileceği göz ardı edilmemelidir. Bu konuda daha kapsamlı araştırmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: Mikrobiyota, Hepatit B, mikrobiyom ve aşı, bağışıklık sistemi, bağırsak mikrobiyomu.

ABSTRACT

Investigation of the Role of the Gut Microbiota in the Response to Hepatitis B Vaccine

INTRODUCTION AND AIM: In this study, it is aimed to investigate the role of gut microbiota in the response to hepatitis B vaccine by performing intestinal microbiome analyzes of healthy individuals who respond and do not respond to hepatitis B vaccine.

MATERIALS AND METHODS: A total of 40 people (March 2020 – February 2022) between the ages of 18-65 comprising of 20 healthy volunteers (Anti-HBs >100 IU/ml) who had an antibody response after vaccination and other 20 patients with (Anti-HBs <10 IU/ml) even though they are administered 3 doses of Hepatitis B vaccine and 3 doses of booster in accordance with the vaccination schedule (0., 1st, and 6th) are included. After the stool samples are delivered to the laboratory within 2 hours at the latest, pH measurement and Bristol scoring are performed. They are freshly frozen and store at -80°C until microbiome analysis is performed. Nucleic acid isolation, 16S rRNA PCR, next generation sequencing, bioinformatics and statistical analyzes are executed.

RESULTS: While stool pH is high in the patient group, the *Firmucites/Bacteroidetes* ratio (1.31 in the patient group, 3.28 in the control group) is found to be lower ($p<0.05$). At the phylum level in the patient group; *Bacteroidetes* at grade level; *Gammaproteobacteria*, *Bacteroidia*, *Negativicutes* at the order level; *Selenomonadales*, *Veilloonellales*, *Bacteroidales* to family level; At the genus level of *Selenomonadaceae*, *Rikenellaceae*, *Veillonellaceae*; *Massiliprevotella* and *Alistipes* are monitored at a higher rate. In the control group; at the phylum level; *Firmucutes* at grade level; *Clostridia* at team level; *Clostridiales* family level; *Lachnospiraceae*, *Peptostreptococcaceae*, *Hungateiclostridiaceae* are found to be higher levels.

CONCLUSION: The stool pH values of the patient group are found to be low, and the *Firmucites/Bacteroidetes* ratio is high. At the phylum level in the patient group; *Bacteroidetes* at grade level; *Gammaproteobacteria*, *Negativicutes* at the order level; *Selenomonadales*, *Veilloonellales*, at family level; At the genus level of *Selenomonadaceae*, *Rikenellaceae*, *Veillonellaceae*; *Massiliprevotella* and *Alistipes* are found at a higher rate. In the control group; at the phylum level; *Firmucutes* at grade level; *Clostridia* at team level; *Clostridiales* family level; *Lachnospiraceae*, *Peptostreptococcaceae*, *Hungateiclostridiaceae* are found to be higher. These data show the presence of intestinal dysbiosis in the group that did not respond to the hepatitis B vaccine. However, it should not be ignored that the results of gut microbiome analysis may vary with geographical region, climatic conditions, diet and genetic differences. More extensive research is needed on this subject.

Key words: Hepatitis B, microbiota, microbiome and vaccine, immune system, gut microbiome

1. GİRİŞ VE AMAÇ

İnsan vücudunda bazı bölgelerinde (ürogenital-solunum-gastrointestinal sistem, burun, ağız boşluğu, cilt, boğaz gibi) herhangi bir hastalığa sebep olmadan yaşayan mikroorganizmalar bulunmaktadır. Önceleri normal flora olarak isimlendirilen bu durum 2000'li yılların başından itibaren mikrobiyota ya da mikrobiyom olarak isimlendirilmeye başlanmıştır. Mikrobiyom terimi ise ekolojik nişte yaşayan mikorganizmaların genomlarının toplamını ifade eder (Köroğlu, 2017). Mikrobiyotanın insan sağlığı ve hastalıklarıyla olan ilişkisinin aydınlatılması üzerine çalışmalar yoğunlaştırılmıştır. 2007 yılında insan sağlığı ve hastalıklarıyla ilgili mikrobiyotanın anlaşılmasını sağlamak için İnsan Mikrobiyom Projesi (HMP) başlatılmıştır (Turnbaugh ve ark., 2007).

İnsan mikrobiyotası, insan vücudu ile birlikte yaşayan tüm mikroorganizmaların toplamıdır. Bu topluluklar; ökaryotları (mantar ve parazitler), arkeaları, bakterileri ve virüsleri içerir. Bir insan vücudunun; ortalama bakteri miktarı, insan hücrelerinden 10 kat fazla, insan genomunda mevcut olan gen sayısından ise yaklaşık 1000 kat fazladır. Bununla birlikte, küçük boyutları nedeniyle, mikroorganizmalar vücut kütleminin yalnızca %1-3'ünü oluşturur. Bu da ~100 kg olan bir yetişkin bünyesinin 1-3 kilogramının bakterilerden oluştuğu anlamına gelir (Sekirov ve ark., 2010; Ding ve Schloss, 2014). Mikrobiyota içeriğinde bulunan mikroorganizmalar genellikle bizim için zararlı değildir. Hatta yıllar içinde yapılan çalışmalar göstermiş ki sağlığımızı korumak için gereklidirler. Mikrobiyota, patojen kolonizasyonuna ve etkilerine karşı konağın savunması ve bağışıklık sistemi ile birlikte çalışarak vücudun korunmasına katkıda bulunur. Ayrıca bazı metabolik işlevleri de vardır. Örneğin; bağırsak mikrobiyotasında bakteriler bulunan temel besin ve vitamin kaynağı oluşturmak için gıdalardan kısa zincirli yağ asitleri (KZYA) ve amino asitler gibi enerji ve besinlerin çıkarılmasına yardımcı olarak temel bir metabolik işlevi yerine getirir (Tilg ve ark., 2015).

İnsan vücudunda burun, ağız boşluğu, cilt, boğaz, ürogenital-solunum ve gastrointestinal sistem gibi birçok bölgede mikrobiyota bulunmaktadır. Bilimsel

alışmalar büyük oranda bağırsak mikrobiyotası üzerine odaklanmıştır (Thomas ve ark., 2015). Bağırsak mikrobiyotası konak ile etkileşimin en yoğun olduğu bölgelerden biridir. Bağırsak mikrobiyotası, konağın bir dizi hayati fonksiyonlarında önemli bir işlev görmekte ve sağlığa katkıda bulunmaktadır. Bağırsak mikrobiyotası, vücudumuzun sahip olmadığı genlere sahip olup bazı vitaminleri bizim için sağırlarlar. İhtiyaç duyduğumuz hayati önemi olan besinleri açığa çıkarmak için besinlerimizi parçalarlar, bağışıklık sistemimize patojenleri nasıl tanıyacağını ve hatta enfeksiyona yol açan mikroorganizmalarla mücadele eden yararlı anti-inflamatuar bileşikleri nasıl üreteceğini öğretirler.

İnsan vücudu, ayrılmaz bir parçası olan mikrobiyota ile denge halinde varlığını sürdürmektedir. Bu dengenin bozulması durumunda mikrobiyotanın sağladığı bir takım yararlı etkiler ortadan kalkabilmekte ve çeşitli hastalıklara zemin hazırlamaktadır. Disbiyozis, bağırsak mikrobiyota içeriğinde denge halinde bulunan mikroorganizmaların bu dengesinde meydana gelen bozulmalara verilen isimdir. Disbiyoz durumunda bağırsak mikrobiyotasının normal işleyişinin bozulması, belirli mikrobiyota üyelerinin sayısında ve çeşitliliğinde bazı değişiklikler meydana gelir. Giderek artan sayıda çalışma, bağırsak mikrobiyom bileşimindeki değişikliklerin çok sayıda hastalık (yaklaşık 40 farklı hastalık) durumuyla ilişkili olduğunu ve bu toplulukların manipülasyonunun terapötik alternatif bir seçenek olabileceğini göstermiştir (Sekirov ve ark., 2010). Örneğin; inflamatuvar bağırsak hastalığı, obezite, insülin direnci, metabolik sendrom, ülseratif kolit, multiple skleroz, romatoid artrit, hepatosteatoz ve diyabetes mellitus olmak üzere birçok hastalık disbiyozis ile ilişkili bulunan başlıca hastalıklardır (Clemente ve ark., 2012).

İntestinal mikrobiyota bileşenleri vcdn immünolojik işlevlerine de katkı sağlamaktadır. Peyer plakları, izole edilmiş lenfoid foliküller ve mezenterik lenf düğümleri dahil olmak üzere bağırsakla ilişkili lenfoid dokuların (GALT) gelişimini ve işlevselliğini kontrol ederek immun sistemim üzerinde önemli bir etki sahibidir (Brown ve ark., 2013; Dermott ve Huffnagle, 2014). Mikroorganizmalar ve ürünleri, bağışıklık sisteminin erken döneminde doğuştan gelen hematolenfoid hücrelerin (ILC1, 2 ve 3), yardımcı lenfoid hücrelerin, NK hücrelerin ve sitotoksik/sitotoksik olmayanların aktivasyonu ve gelişiminde, vücudun kendi hücrelerini kendi olmayanlardan (istilacılar) ayırt etmesi için gereklidir (Brown ve ark., 2013). NK

hücreleri, ILC1 ve IFN- γ üçü birlikte antimikrobiyal peptitler (AMP'ler), granülizin, defensinler, lizozim ve Reg III γ üretmektedirler (Ostaff ve ark., 2013). Bu maddelerin mikrobiyal ekoloji ve immün sürveyansın düzenlenmesinde kritik işlevleri vardır. Örneğin, mikrobiyal topluluklar tarafından üretilen polisakkarit A, α -galaktosilseramid ve triptofan metabolitleri, bağışıklık hücrelerini interlökin-22, Reg3 γ , IgA ve interlökin-17 üretmesi için uyarır. Immunglobulin A (Ig A), mikroorganizmaların dolaşıma girmesini önlemek için doğal immunitenin önemli bir bileşenidir. T yardımcı (Th) 17 hücreleri ve düzenleyici T hücreleri (Treg), dönüştürücü büyüme faktörü- β ve retinoik aside yanıt veren ve immün toleransı kontrol eden antijene özgü popülasyonlardır (Hooper ve ark., 2012). Bağırsak bakterileri tarafından tüm vücut bağışıklık sistemine katkısı hassas bir dengede gibi görünmektedir. Çünkü belirli bir türün kaybı, doğuştan gelen bağışıklık tepkisinin aşırı reaksiyona girmesine veya baskılanmasına yol açabilir (Round ve Mazmanian, 2009). Bu açıklamalardan da anlaşılacağı üzere henüz tam olarak aydınlatılmasa bile mikrobiyotanın ile immün sistem arasında çok güçlü bir etkileşim söz konusudur.

Dünya genelinde 2 milyar kadar birey Hepatit B virüsü (HBV) ile karşılaşmıştır ve 240 milyon kronik enfekte olgu bulunmaktadır. Her yıl dünyada 800.000 HBV ile ilişkili ölüm bildirilmektedir (Dooling ve ark., 2018). Hepatit B ile kronik enfeksiyonda tedaviye rağmen kalıcı virolojik yanıt düşüktür. HBV enfeksiyonu kontrolünde aşı ile korunma en önemli unsurdur. Hepatit B aşısı 3 doz olarak (0,1 ve 6, aylarda) yapılır ve anti-HBs>10 mL değeri koruyucu olarak kabul edilir. Aşılama, hastalık sıklığını azaltır, toplum korunmasını sağlar ve kronik enfeksiyonu önler (siroz ve hepatoselüler kansere progresyonu engeller). Ancak aşı sonrası tüm bireylerde serokonversiyon oluşmamaktadır. Aşı sonrası serokonversiyon oranı sağlıklı erişkinlerde %95'tir. Bu oran artan yaş ilerledikçe azalır. Ayrıca obezlerde, sigara içenlerde, ileri yaşta, organ transplant hastalarında, çölyak hastalarında ve immunsuprese hastalarda (kronik karaciğer, HIV, kronik renal yetmezlik, diyabet) aşırı olumlu yanıt oranları azalmakta ve hemodiyaliz hastalarında aşırı antikor cevabı %50-60'lara kadar düşmektedir (Marin ve ark., 2018).

Hepatit B aşısına yanıt olumsuz etkileyen bu faktörlerin hiçbirinin bulunmadığı bazı bireylerde hepatit B aşısına olumlu yanıt alınamamakta olup, bunun mekanizması

tam olarak bilinmemektedir. Henüz açıklanamayan bu mekanizmalardan bir tanesi de insan bağırsak mikrobiyomundaki değişiklikler olabilir.

Mikrobiyotanın insanlarda uygulanan aşılarla karşı alınan immün yanıtı nasıl etkilediğine dair literatürde sadece birkaç çalışma vardır. Bu çalışmaların 3'ü infantlara uygulanan oral aşılar, biri infantlara uygulanan intramüsküler aşılarla bir tanesi de yetişkinlere uygulanan oral aşılarla ilgilidir. Mevcut çalışmalara bakıldığında erişkinlerde intramüsküler uygulanan aşılar ve mikrobiyom ilişkisinin araştırıldığı hiçbir çalışma olmadığı görülmüştür. Bu tez çalışmasında Hepatit B aşısına cevap alınan ve alınmayan sağlıklı bireylerin bağırsak mikrobiyom analizleri yapılarak, Hepatit B aşısına cevapta bağırsak mikrobiyotasının rolünün araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Mikrobiyota ve Mikrobiyom Tanımı

İnsan vücudunun çeşitli bölgelerinde bulunan kommensal, simbiyotik ve patojenik mikroorganizmaların oluşturduğu ekolojik komüniteler, daha önceleri normal vücut florası olarak anılırken günümüzde mikrobiyota olarak adlandırılmaktadır. Mikrobiyom terimi ise ekolojik nişte yaşayan mikroorganizmaların genomlarının toplamını ifade eder (Köroğlu, 2017).

Vücudumuzun çeşitli bölgelerinde var olan bu mikroorganizmaların insan sağlığını faydalı ve zararlı etkileme potansiyelleri vardır. Örnek verilecek olursa; metabolik işlevlere katkıda bulunurlar, patojenlere karşı korurlar, bağışıklık sistemini eğitirler ve bu temel işlevler aracılığıyla fizyolojik işlevlerin çoğunu doğrudan veya dolaylı olarak etkilerler.

2.2. Mikrobiyotanın Tarihçesi

İnsan vücudunda bulunan ve hastalık oluşturmeyen mikroorganizmaların varlığı 100 yılı aşkın bir süredir bilinmektedir (Linares ve ark., 2016). Ancak bunların insan vücudu ile olan etkileşimleri (yararlı/zararlı etkileri) hakkında sınırlı bilgiler bulunmakta idi. Yeni nesil sekans teknolojisinin (YNS) kullanıma girmesi bu alanda çığır açmıştır. Bu teknolojinin kullanıma girmesi ile konvansiyonel mikrobiyolojik yöntemlerle vücuttaki mevcut mikroorganizmaların yaklaşık %3-5 'inin kültüre edilebildiği ortaya konulmuştur (Tedjo ve ark., 2015).

İnsanlarda hastalıkta ve sağlıkta vücudun mikrobiyal florasını araştırmak için 2007 yılında İnsan Mikrobiyom Projesi (İMP) başlatılmıştır. İlk aşamada (İMP1) insan mikrobiyal florasını tanımlamaya ve karakterize etmeye odaklanılmıştır. Bütünleştirici İnsan Mikrobiyom Projesi (İMP2) olarak bilinen ikinci aşama, mikrobiyomu karakterize etmek için kaynaklar oluşturmak ve mikropların sağlık ve hastalık durumlarındaki rollerini aydınlatmak amacıyla 2014 yılında başlatılmış ve biri diğerini tamamlayan bu iki program 2016 yılında sonuçlanmıştır.

İnsan Mikrobiyom Projesi 1'in ana bulgularından biri; tek başına mikrobiyomun taksonomik bileşimi genellikle konak fenotipi ile iyi bir korelasyon olmamasıdır.

Bunun nedeni; kişiye özgü mikrobiyom kompozisyonun fonksiyonları veya kişiselleştirilmiş türe özgü değişiklikler (beslenme, coğrafi farklılıklar, genetik vb.) ile ilgili olabileceği görüşü ortaya çıkmıştır. Bu bulgu, İMP'nin ikinci aşaması olan Bütünleştirici İMP'nin (İMP 2) geliştirilmesinin temelini oluşturmuştur. Bağışıklık, metabolizma ve dinamik moleküler aktivite dahil olmak üzere konakçı-mikrobiyom etkileşimini keşfetmek ve zamanla konak-mikrop etkileşimlerinin detaylı anlaşılması için planlanmıştır. Devam projesi olan bu program; mikrobiyom araştırma topluluğu için mevcut olan kaynak tabanını genişletmeyi, konak ve mikrobiyom arasındaki ilişkiyi mekanik olarak ele almayı ve İMP 1 tespit edilen sorulara cevap bulabilmeyi amaçlamıştır. Bu nedenle İMP 2 içindeki hastalık odaklı projeler, karşılıklı olarak insan ve mikrobiyal etkileşim mekanizmalarını değerlendirmek ve gelecekteki çalışmalar için protokoller, veriler ve biyolojik örnekler sağlamak adına konuya çok yönlü yaklaşımları kullanmaya yönelmişlerdir. İMP 2 deki bu projeler, insan sağlığı ve hastalık dinamiklerini izleyen üç çalışmayı içeriyordu. Bu üç çalışma; hamilelik ve erken doğum, inflamatuvar bağırsak hastalıkları ve prediyabetli bireyleri etkileyen stresörleri inceleyen araştırmalardır. Böylece önemli sağlık sorunlarını doğrudan ele alırken, aynı zamanda araştırma topluluğunun genel ilgi alanına giren mikrobiyom tipi ile ilişkili koşulların modellerini oluşturmaya da katkı sağlamıştır (Jonathan ve ark., 2019).

Artık tamamlanma aşamasına gelen bu çalışmalarla birlikte, yalnızca mikrobiyal dinamikler hakkında değil aynı zamanda mikrobiyomdaki değişiklikler, insan vücudunun buna tepkileri ve karşılıklı etkileşim mekanizmaları hakkında da zengin bir veri sağlanmıştır.

2.3. Mikrobiyota Analizi

İnsan vücudunun çeşitli bölgelerinde bulunan mikrobiyota kompozisyonunu belirlemek amacıyla kültüre dayalı konvansiyonel mikrobiyolojik yöntemler yetersiz kaldığından dolayı günümüzde mikrobiyom analizleri yaygın kullanılmaktadır (Claesson ve ark., 2017). Mikrobiyom analizi, belirli bir vücut bölgesinde bulunan mikroorganizma topluluğunun bileşimini ve işlevini belirlemeyi kapsar. İnsan vücudu üzerindeki farklı bölgelerde bulunan mikroorganizma topluluklarının henüz keşfedilmemiş ayrıntılarına ulaşmak için yapılan mikrobiyom analizleri; uygun örnek

toplanması, bu örneklerin işlenmesi, yeni nesil dizileme aşaması ve biyoinformatik süreçleri kapsayan karmaşık bir disiplindir. Kapsayıcı ve karmaşık bu analiz disiplini, belirlenen hedeflere veya hastalıklara yönelik analiz imkanı sağlamaktadır (Bharti ve Grimm, 2021).

Çalışma grubu ve hedef vücut bölgesi belirlendikten sonra, mikrobiyom analizlerinin ilk basamağı; hedef bölgeden uygun şekilde mikrobiyom çalışmaya uygun olan numunelerin toplanması, transferi, saklanması ve bunlar için gerekli altyapının oluşturulmasıdır. Ayrıca hedefe uygun sağlıklı/normal kontrol grubu seçilmeli ve aynı örnek alım protokolü bu gruba da uygulanmalıdır. Bu örnekler; ağız, burun, vajen gibi boşlukların mukoza örnekleri, deriden sürüntü örnekleri, steril vücut alanlarından alınan sıvı örnekleri, vajinal veya fekal örnekler olabilir (Thomas ve ark., 2015). Literatürde mevcut mikrobiyom çalışmalarının 2/3'ü bağırsak mikrobiyomu üzerine yoğunlaşmıştır (Jason ve ark., 2016).

Mikrobiyom çalışmaları planlanırken fekal örneklerin toplanmasından önce çalışma grupları oluşturulurken kronik hastalık, diyet, antibiyotik, mide koruyucu ilaç, probiyotik tüketimi ile beden ağırlığı ve benzeri birçok faktör dikkate alınmalıdır. Çünkü, adı geçen unsurlar bağırsak içeriğini etkileyebileceğinden mikrobiyom çalışmalarının sonuçlarını da etkilemektedir (Kumar ve ark., 2018; Köroğlu 2020).

Fekal örnek toplamak kolay gibi görünse de örneğin alımı, transferi ve saklama koşulları sonucu direk etkileyen unsurlardır. Bu nedenle fekal örnek toplama sürecinde kurallara titizlikle uyulması gerekmektedir. Dışkı numuneleri diğer numunelere kıyasla genellikle planlanan zamanda alınamamaktadır. Buna ilaveten örneğin hastanede verilmesi ya da örnek alındıktan sonra hastaneye transportu uygun koşullarda gerçekleştirilmelidir. Fekal örnek sızdırmaz vida kapaklı bir kap veya özel mikrobiyota stabilizasyon tamponu içeren transfer tüpleri içerisine konulmalıdır. Eğer örnek transportu sırasında 30 dakikadan uzun süre oda ısısı şartlarında bekler ise denge bozulur. Aerop bakteriler ortamda üstünlük sağlar ve yanılığlara sebep olabilir. Fekal mikrobiyom analizleri için uygun şekilde alınmış örnekler 30 dakika içinde taze olarak dondurulup -80 °C'de saklanabilir. Yaygın olan yöntem de bu şekildedir. Fekal örneklerin mikrobiyota stabilizasyon tamponu içerisine alınması tercih sebebidir. Çünkü bu özel tamponlar içerisine alınan fekal örnekler birkaç gün

oda ısısında bekleyebilmektedir ve böylece transfer sürecinde zaman kazanılmış olmaktadır (Thomas ve ark., 2015). Ayrıca alınan fekal örnekler, -20°C birkaç gün veya -80 °C’de uzun yıllar boyunca saklanabilir (Köroğlu, 2020).

Örneklerin toplanmasını takiben ilk olarak, numunelerden bakteriyel DNA izolasyonu yapılır. Bu izolasyon sürecinde otomatize sistemler ve ticari izolasyon kitlerinden faydalanılabilir. İzolasyondan sonra gerekli uygunluktaki primerlerin kullanılmasıyla PZR yapılır ve 16S rRNA bölgesinin çoğaltılması sağlanır (Thomas ve ark., 2015).

Bağırsak mikrobiyom kompozisyonunun çoğu üyesi anaerobik ve kültür ile konvansiyonel koşullarda üretilmesi oldukça güç mikroorganizmalardır. Bu üretim zorluğuna moleküler yöntemler geliştirilerek çözüm aranmıştır. Bakterileri analiz edebilmek adına öncelikle moleküler yöntemlerde öncelikle 16S rRNA genleri üzerine odaklanılmıştır. (Clarridge, 2004). 16S rRNA’nın hedef olarak seçilme sebebi ise; bütün bakterilerde bulunması, korunmuş ve fonksiyonel olması ayrıca çok değişken bir veri tabanına yeterli şekilde sahip olmasıdır. (DeLong ve Pace, 2001). Ancak; genellikle 16s rRNA’nın tamamının dizi analizi yapılamamaktadır. Onun yerine 16s rRNA bölgesinde bulunan V3-V4, V1-V5 gibi en değişken bölgelerin dizilemesi yapılmaktadır. Yine de 16s rRNA’nın tamamının dizilenmesi tercih sebebidir.

Günümüzde mikrobiyom verileri büyük oranda yeni nesil DNA dizileme teknolojileri kullanılarak elde edilmektedir. Her ne kadar düşük çıktılı konvansiyonel teknolojiler (örneğin gerçek zamanlı polimerize zincir reaksiyonu, Western Blot analizleri, Sanger dizileme vb.) belli bir hedefe yönelik analiz imkanı sağlayıp; mikrobiyota çalışmalarında kısıtlı bir kullanım alanı bulsa da omik teknolojilerin yaygınlaşması ile metagenom yaklaşımları bu alanın en yaygın teknolojisi haline gelmiştir. Bu doğrultuda mikrobiyom çalışmaları yoğunlukla iki temel DNA dizileme tekniği üzerinde şekillenmiştir. Bunlar; 16S/18S RNA genleri ve Internal Transcribed Spacer (ITS) Bölgesi gibi belirli bölgelerin dizilendiği ampikon dizileme veya bir örnekteki tüm DNA materyalinin dizilendiği metagenom dizilemedir (Shotgun dizileme). 16S ribozomal alt ünite geni bakteriler için kullanılırken 18S ribozomal ITS bölgeleri ise maya/mantar türlerinde benzer özellikler taşıdığından fungal mikrobiyotayı keşfetmeyi hedefleyen çalışmalarda tercih edilmektedir (Hoffmann ve ark., 2013).

Amplikon dizileme; düşük maliyetlidir ve biyoinformatik analizlerin yapılması daha kolaydır. Kendisini daha cazip kılan bu sebepler ile kullanımı daha yaygındır. Amplikon dizilemenin amacı mikrobiyal türlerde evrensel olarak bulunan filogenetik sinyaller taşıyan DNA parçalarının hedefli olarak dizilenmesidir. Bu sayede bir mikrobiyom içerisindeki tüm mikrobiyal taksonlar duyarlılığı yüksek bir şekilde genetik olarak örneklenmekte, dahası dizilenen amplikonların taşıdığı filogenetik sinyallerden faydalanılarak örnekteki türlerin varlığı ve örneğin biyoçeşitliliğinin ortaya çıkarılması mümkün olmaktadır. Amplikon dizileme ile taksonomik çeşitlilik, yani bir örnekteki hangi türlerden hangi miktarlarda olduğu ortaya çıkarılabilmektedir. Öte yandan hedeflenen marker genler tüm türlerde ve suşlarda farklı kopya sayıları ile bulunmaktadır. Buna bağlı olarak, biyoinformatik analiz sonucunda elde edilen relatif bolluk oranları, gerçekte mikrobiyotanın içerisinde hangi taksonomik grubun hangi oranda bulunduğu bilgisi ile doğrudan örtüşmeyebilir. Bu durum amplikon dizilemenin bir dezavantajıdır. Ancak tüm genom dizilemenin zorlukları ve maliyeti düşünüldüğünde daha pratik bir yöntem de yoktur.

Shotgun metagenom dizileme, genellikle çevresel örnek analizlerinde kullanılır. Metagenom dizilemede elde edilen 16S ribozomal kısa alt ünite geni, bakterilerde korunmuş olarak bulunan ve prokaryot sistematiğinde altın standart olarak kullanılan marker dizi olduğundan bakteri çeşitliliğinin amaçlandığı mikrobiyota çalışmalarında kullanılmaktadır (Sharpton, 2014).

Amplikon dizileme shotgun dizileme ile karşılaştırıldığında daha hızlı ve maliyeti düşük olmasının yanı sıra tek bir genomik bölgeden sekans yapma üstünlüğüne sahiptir. Dünya genelinde yaygın kullanılan farklı marka ve modellerde yeni nesil dizileme cihazları mevcuttur. Yeni nesil sekans sistemlerinin alışılmış yöntemlerden farklı olarak bazı avantajlı yönleri vardır. Bu üsyün yönleri, konakçıya gen bölgesi yerleştirmek gerekmeden geleneksel yöntemlere göre çok daha hızlı şekilde klonal olarak sınıflandırma yapılabilmesidir. (Sanschagrin ve Yergeau, 2014).

Yeni nesil dizileme sistemlerinin ham verileri, mevcut teknolojiler sebebiyle genomların tamamını değil, DNA fragmanlarını içermektedir. Bu fragmanlar, DNA sentezinin optik (Illumina temelli teknolojiler) veya elektronik (ION Torrent temelli teknolojiler) tespitine dayalıdır. İkinci nesil dizileme teknolojilerinde tipik olarak

birkaç yüz baz çiftine kadar dizileme yapılabilmektedir. Üçüncü nesil dizileme sistemlerinde (Oxford Nanopore ve Pasific Biosciences) ise; birkaç bin baz çiftine kadar dizileme imkanı vardır (Bharti ve Grimm, 2021).

Hedef bölgenin amplifikasyon ve sekansı yapıldıktan sonra biyoinformatik işlem basamağı gerçekleştirilmektedir. Biyoinformatik analizler mikrobiyom çalışmalarının en önemli basamaklarından birini oluşturmaktadır. Biyoinformatik analizler, orijini bilinmeyen milyonlarca DNA parçasının değerlendirilmesini içermektedir. Analizin kalitesi açısından belli başlı ön işlemlerin yürütülmesi tipik biyoinformatik iş akışlarının ilk aşaması olarak ortaya çıkmaktadır (Callahan ve ark., 2016).

Sekans sonuçları ile mikrobiyomun data analizleri yapılır. Quantitative Insights Into Microbial Ecology (QIIME) sık tercih edilen bir mikrobiyom analiz paketidir. Biyoinformatik veri analizleri ve ilişkili istatistiksel analizler neticesinde elde edilen sonuçların değerlendirilebilir parametrelere dönüştürülmesi ve klinik yorumların yapılabilmesine imkan sağlanmış olur (Kumar ve ark., 2014).

2.4. Mikrobiyotanın Hastalıklarla İlişkisi

Bağırsak mikrobiyotası disbiyozisinin birçok patolojik durumun etyolojisinde yer aldığına yönündeki çalışmalar her geçen gün artmaktadır. Bu patolojik durumlar intestinal sistem ile ilgili olabildiği gibi intesitinal sistem dışı da olabilmektedir. Mikrobiyom, vücuttaki homeostaz, metabolizma, mineral ve vitaminlerin üretimi, endokrin bazı uyarıların oluşması, patojen bazı mikroorganizmaların kolonize olmasının önüne geçilmesi, immünolojik yanıtların düzenlenmesi ve ksenobiyotik bileşiklerin metabolize edilmesini de kapsayan yaşamın devamında oldukça önemli olan süreçlere katılır (Barko ve ark., 2018; Nicholson ve ark., 2012). Henüz etkileşimleri tam olarak aydınlatılamamış çok sayıda gastrointestinal, sistemik ve otoimmün hastalık, normal dışı bağırsak mikrobiyota kompozisyon toplulukları ile ilişkili görülmektedir. Patogenezi açıklanması henüz tam olarak olmasa da bu etkileşim mikrobiyom ile konakçının metabolizması ve bağışıklık sistemi arasındaki karmaşık ilişkiler yoluyla birbirini etkilediğini düşündürmektedir (Wang ve ark., 2017).

Mukozal immünolojik dengenin milyarlarca zararsız mikroorganizma ve nadir olarak patojen istilacı mikroorganizmalar arasında doğru ayrımı yapmak gibi çok önemli bir görevi vardır. Hem doğal hem de kazanılmış bağışıklık sistemi, yabancı mikroorganizmalara ve yabancı diyet antijenlerine sürekli maruz kalmaktadır. Bağışıklık sistemi, patojen kolonizasyonunu, direkt olarak bölgesel ve genel olarak sistemik inflamatuvar yanıtlar ile önlemeye çalışmaktadır (Barko ve ark., 2018).

Sağlıklı bireylerde gastrointestinal sistem mikrobiyotasının etkisiyle salgılanan proinflamatuvar ve antiinflamatuvar sitokinlerin etkisiyle, normal flora elemanları olan mikroorganizmalar tanınmakta, tolere edilmekte ve bir denge halinde bulunmaktadır. Yine bu sitokinlerin etkisi ile patojen bazı mikroorganizmaların mukus tabakasına ve altında bulunan epitel içerisine girmesi engellenir. Kısa zincirli yağ asitleri (KZYA) epitel ile sıkı bağlantılar oluşturur ve mukus oluşumunu indükler. Bağırsağımızda bizimle yaşayan bazı mikroorganizmalar, naif T-lenfositlerinin immun sistemi yöneten sitokinler salgılayan ve inflamasyonu önleyici rolleri olan Treg hücrelerine dönüşerek olgunlaşmasını teşvik eden epitelde bulunan M hücreleri ve dendritik h zrelerce tanınırlar. Bağışıklık sistemimizin önemli hücrelerinden olan lenfositler, epitel hücrelerini uyararak anitmikrobiyal etkiye sahip defensin benzeri maddeler salgılanmasını sağlarlar (Belkaid ve Naik, 2013).

Disbiyozis gelişen bireylerde ise; öncelikle disbiyozis mikrobiyotadaki çeşitliliğin azalması ya da bağırsak içeriğindeki mikrobiyal kompozisyon dengesinin bozulması ile karakterize olur. Disbiyozis durumunda değişen bağırsak kompozisyonu ile oluşan yeni antijenik ortamın dendritik hücreler ve M hücreleri tarafından tanınması, naif T hücrelerinin her ikisinin de pro-inflamatuvar sitokinleri salgılayan Th1 ve Th17 hücrelerine olgunlaşmasıyla sonuçlanır. Mikrobiyota kompozisyonunun, dolayısıyla da mikrobiyom metabolizmasının ( rneğin kısa zincirli yağ asidi üreminin azalması gibi) değişmesi ile mukus tabakasının yapısı bozulmaktadır. Böylece mukus tabakasının bağırsaktaki mikrobiyal kompozisyonu stabil şekilde kalmasını sağlamak ve patojen mikroorganizmaların kolonizasyonunu engellemek gibi konak için oldukça yararlı işlevlerinde bozulmalar olacaktır (Haller, 2018).

Bağırsağın mikrobiyal kompozisyonu, sindirim sisteminin peristaltizmi ve bağırsak epitelinin fonksiyonu üzerinde oldukça etkili role sahiptir. Ayrıca bağırsak

mikrobiyomu, hormonal sistem, immun sistem, beslenme ve sindirim sistemi aracılığıyla oluşturduğu etkiler neticesinde birçok hastalıkta oluşumunda rol oynamaktadır. (Björkstén ve ark., 2001; Vrieze ve ark., 2010).

Gastrointestinal sistemin mikrobiyota kompozisyonunda oluşan birtakım değişiklikler ile ilişkili olduğu hastalıkların en çok rastlananları Tablo 2.4.1.'de özetlenmiştir.

Tablo 2.4.1. İntestinal mikrobiyom kompozisyonundaki değişiklikler ve ilişkilendirildiği bazı hastalıklar (Yılmaz ve Altındış 2017'den kullanılmıştır).

Hastalık	Mikrobiyomdaki Değişiklik	Etki
Allerji	<i>Lactobacillus spp.</i> azalma <i>Bifidobacterium adolescentis</i> azalma <i>Clostridium difficile</i> azalma <i>Helicobacter pylori</i> azalma	Erken kolonizasyon, virüsün mediyatörlerin oluşumunda/azalması önemlidir.
Çölyak	<i>Bacteroides vulgatus</i> artış <i>Escherichia coli</i> azalma <i>Clostridium coccoides</i> azalma	Erken yaşta kolonizasyon oranları, virüsün oral toleransa sebep olabilmektedir.
Otizm	<i>Bacteroidetes</i> artış <i>Proteobacteria</i> artış <i>Actinobacteria</i> azalma <i>Firmicutes</i> azalma	Kontrol grubuyla karşılaştırma sonucu azalmış bakteriyel çeşitlilik mevcuttur.
Obezite	<i>Bacteroidetes</i> azalma <i>Lactobacillus</i> artış <i>Firmicutes/Bacteroidetes</i> oranı azalma <i>Methanobrevibacter smithii</i> azalma	Bağırsakta artan Gram negatif bakteri oranı, dolaşımda lipopolisakkarit artışına sebep olur. Bu da kronik endotoksemi ve insülin direncini doğurur.
Tip 2 Diyabet	<i>Firmicutes</i> azalma <i>Clostridium</i> azalma <i>Bacteroides-Prevotella</i> artış <i>Clostridia coccoides-Eubacterium rectale</i> azalma <i>Betaproteobacteria</i> artış <i>Bacteroidetes/Firmicutes</i> oranı artış	Bağırsakta artan Gram negatif bakteri oranı, dolaşımda lipopolisakkarit artışına sebep olur. Bu da kronik endotoksemi ve insülin direncini doğurur.
Romatoid Artrit	<i>Bifidobacteria</i> azalma <i>Bacteroidetes</i> azalma	Bağışıklık sistemi üzerine etkilidir. Bazı bakteriyel metabolitler, pro-inflamatuvar moleküllerin üretilmesini tetikleyebilir.
Tip 1 Diyabet	<i>Bacteriodes</i> artış <i>Firmicutes</i> azalma <i>Akkermansia</i> azalma	Azalmış intestinal permeabilite ve inflamasyon sonrası, pankreas beta hücre hasarı oluşur.
Hipertansiyon	<i>Veillonellaceae</i> azalma	Artmış plazma asetat ve heptanoat seviyeleri ile mikrobiyota kompozisyonu, kan basıncı artışı ile ilişkilidir.

2.5. Mikrobiyota ve İmmün Sistem

Bağırsak, deri ve diğer mukozal ortamlar dahil olmak üzere insan vücudu, topluca mikrobiyota olarak adlandırılan çok sayıda mikroorganizma tarafından kolonize edilmektedir (Sender ve ark., 2016). Mantarlar, virüsler, parazitler de dahil olmak üzere bu ekosistemdeki bakteri ve diğer mikroorganizmaların toplu genomları, son yirmi yılda, kültürden bağımsız genomik tekniklerin hızlı bir şekilde gelişmesiyle birlikte giderek daha fazla araştırılmıştır. Mikrobiyom araştırmalarındaki son gelişmeler, bağırsak mikrobiyotasının yalnızca pasif bir seyirci olmadığını, aynı zamanda sirkadyen ritm, beslenme, metabolizma ve bağışıklık sistemi dahil olmak üzere birçok konak fonksiyonunu aktif olarak etkilediğini ortaya koymuştur (Lynch ve Hsiao, 2019).

Bağırsak mikrobiyotası ile bağışıklık sistemi gelişimi ve işlevi arasındaki çift yönlü ilişki, homeostaz ve hastalık durumundaki çok yönlü etkileşimleri içerir. Mikrobiyom, konağın doğuştan gelen ve edinilmiş bağışıklık sisteminin ana bileşenlerinin geliştirilmesinde kritik rol oynar. Aynı zamanda bağışıklık sistemi, konak ile simbiyotik mikroorganizmaların ilişkilerinin temel özelliklerinin korunmasını da düzenler. Genetik olarak duyarlı bir konakta, mikrobiyota-bağışıklık etkileşimlerindeki dengesizliklerin, çok sayıda immünolojik hastalığın patogenezeine katkıda bulunduğu düşünülmektedir (Shi ve ark., 2017).

2.5.1. Bağışıklık sisteminin gelişiminde mikrobiyotanın rolü:

Yaşamın ilk dönemlerinde insan vücudunun mukozal yüzeylerinin mikroorganizmalar ile kolonizasyonu, konağın bağışıklık sisteminin olgunlaşmasında çok önemli bir rol oynar (Gensollon ve ark., 2016). Mikrobiyota bileşimi daha kararlı yetişkin benzeri konfigürasyona yaklaşık 3 yaşında ulaşmaktadır. İnsanda bağışıklık sisteminin gelişimindeki en kritik etkileşimlerin, birey içi ve bireyler arası değişkenliğin en yüksek olduğu yaşamın ilk yıllarında gerçekleştiği bilinmektedir (Backhed, 2015). Bu dönem immün sistemin gelişmesinde bir fırsat olarak değerlendirilebilir. Ancak bu “fırsat penceresi” dönemi bebekleri mikrobiyotaya yönelik çevresel saldırılara karşı daha duyarlı hale getirebilir ve bağışıklık üzerinde potansiyel olarak uzun süreli zararlı etkiler de yaratabilir (Russell, 2012). Yenidoğanlarda ve bebeklerde bağışıklık sisteminin henüz olgunlaşmamış olmasından dolayı çeşitli patojenlere karşı daha duyarlıdırlar. Bu da bulaşıcı

hastalıkları çocuklarda ölümlerin önde gelen nedenlerinden biri haline getirir (Bhutta ve Black, 2013). Öte yandan, nekrotizan enterokolitte olduğu gibi, prematüre doğan bebeklerde aşırı inflamasyona karşı artan eğilim ile de sıklıkla karşılaşılır (Neu ve Walker, 2011). Bugüne kadar yapılan çalışmaların çoğunda intrauterin dönemde mikrobiyal bir kolonizasyon saptanmamış olup, genellikle mikrobiyom kompozisyonu oluşmasında en büyük payının doğumdan sonra meydana geldiğine ve esas olarak annenin mikrobiyotasından kaynaklandığına inanılmaktadır (Gomez, 2016; Wang, 2018). Çok sayıda faktör, vücudun birçok bölgesinde ilk mikrobiyotanın bileşimini ve dağılımını bu ilk kolonizasyon etkiler (Bhutta ve Black, 2013). Bu açıdan bakıldığında, doğum şeklinin mikrobiyota içeriğini doğrudan etkilediği ve normal doğumun sağlıklı mikrobiyotanın oluşumunda daha avantajlı olduğu düşünülmektedir (Ivanov, 2018).

Mikrobiyota ve konak bağışıklığı arasındaki nedensel ilişkilerin incelenmesi, mikropsuz (Germ Free: GF) hayvan modellerinin kullanımıyla öğrenilmeye çalışılmıştır. GF hayvanlar üzerinde erken dönemde yapılan çalışmalar, kommensal mikroorganizmaların yokluğunun, lenfoid dokunun gelişimi ve bağışıklık fonksiyonlarının ciddi bağırsak kusurları ile ilişkili olduğunu göstermiştir (Bauer, 1963). İntra epitelyal lenfostiller (İEL), geleneksel kolonize hayvanlara kıyasla GF farelerde önemli ölçüde azalmıştır ve de novo kolonizasyon ile güçlü şekilde indüklenebilir (Umesaki ve ark., 1993). Ig A antikorları, koruyucu mukozal immunitede önemli rol oynar. Yenidoğanlarda ve GF hayvanlarda düşük düzeyde olan Ig A antikorları, mikrobiyal kolonizasyonla hızla artış gösterir (Hapfelmeier ve ark., 2010).

İnce bağırsağın lamina propriası, güçlü immünomodülatör efektör hücrelerden olan çok sayıda CD4⁺ T (Th17) hücresi içerir (Ivanov, 2008; Umesaki, 1993;). Hayvan deneylerinde bağırsakta en yoğun bulunan bakterilerden olan *Bacteroides fragilis* tarafından üretilen bir bakteriyel polisakkaritin sistemik T hücre eksikliklerinin ve lenfoid dokulardaki Th1/Th2 dengesizliklerinin düzeltilmesi de dahil olmak üzere farelerde gelişen bağışıklık sisteminin olgunlaşmasına önemli katkı sağladığı saptanmıştır (Mazmanian ve ark., 2005).

Bağırsakta bulunan immünoglobulinleri etkileyen kommensal mikroorganizmlardan gelen hücre dışı sinyallerle bağırsak mukozasında bulunan öncül B lenfosit dizilerinin olgunlaşması düzenlenir (Wesemann ve ark., 2013). Yaşamın erken dönemlerindeki bağırsak mikrobiyal çeşitliliği, alerji reaksiyonlar ile bağlantı olan mukozal IgE'nin indüklenmesini baskılayarak önemli bir immün modülatör rolü üstlenmiş olur (Cahenzli ve ark., 2003). Doğuştan gelen bir bağışıklık reseptörü olan Toll benzeri reseptör 5 (TLR5), bakteriyel flagellinler için bir reseptör görevi görür. Farelerde, TLR5 aracılığıyla gerçekleşen kolonize kamçıli bakterilerin seçilimi yenidoğan dönemiyle sınırlı olsa da, bu kritik süreç bağırsak mikrobiyota bileşimini şekillendirir ve böylece yetişkin yaşamında bağışıklık sistemindeki dengeyi ve sağlığı etkiler (Fulde ve ark., 2018).

Özetlemek gerekirse, konağın bağışıklık sistemi ile mikrobiyota etkileşimlerinin, yaşamın erken dönemlerinde oldukça kritik olduğu bir görülmektedir. Bu dönemdeki etkileşimin yaşamın sonraki dönemlerinde bağışıklık sistemi dengesi ve inflamatuvar hastalıklara karşı duyarlılığa katkıda bulunan immünolojik mekanizmalar üzerinde uzun süreli etkileri olabileceği görüşü her geçen gün daha fazla kabul edilmektedir. Bununla birlikte, bu etkileşimlerin mekanizmaları hala net olarak ortaya konulamamıştır. Yenidoğan dönemindeki disbiyozis daha belirsiz bir durumdur ve saptanması zordur. Yenidoğan dönemindeki disbiyozisin erişkin dönemdeki immunité ve immünolojik hastalık riski üzerindeki uzun vadeli etkileri konusunda daha çok çalışma yapılmasına ihtiyaç vardır. Bu tür modülatör etkilere ilişkin daha ayrıntılı bilgiler, bağışıklıkla ilgili bozuklukların anlaşılması, önlenmesi ve tedavisi üzerinde etkili olabilir (Fulde ve ark., 2018).

2.5.2. Homeostazda mikrobiyota ve bağışıklık sistemi arasındaki etkileşim:

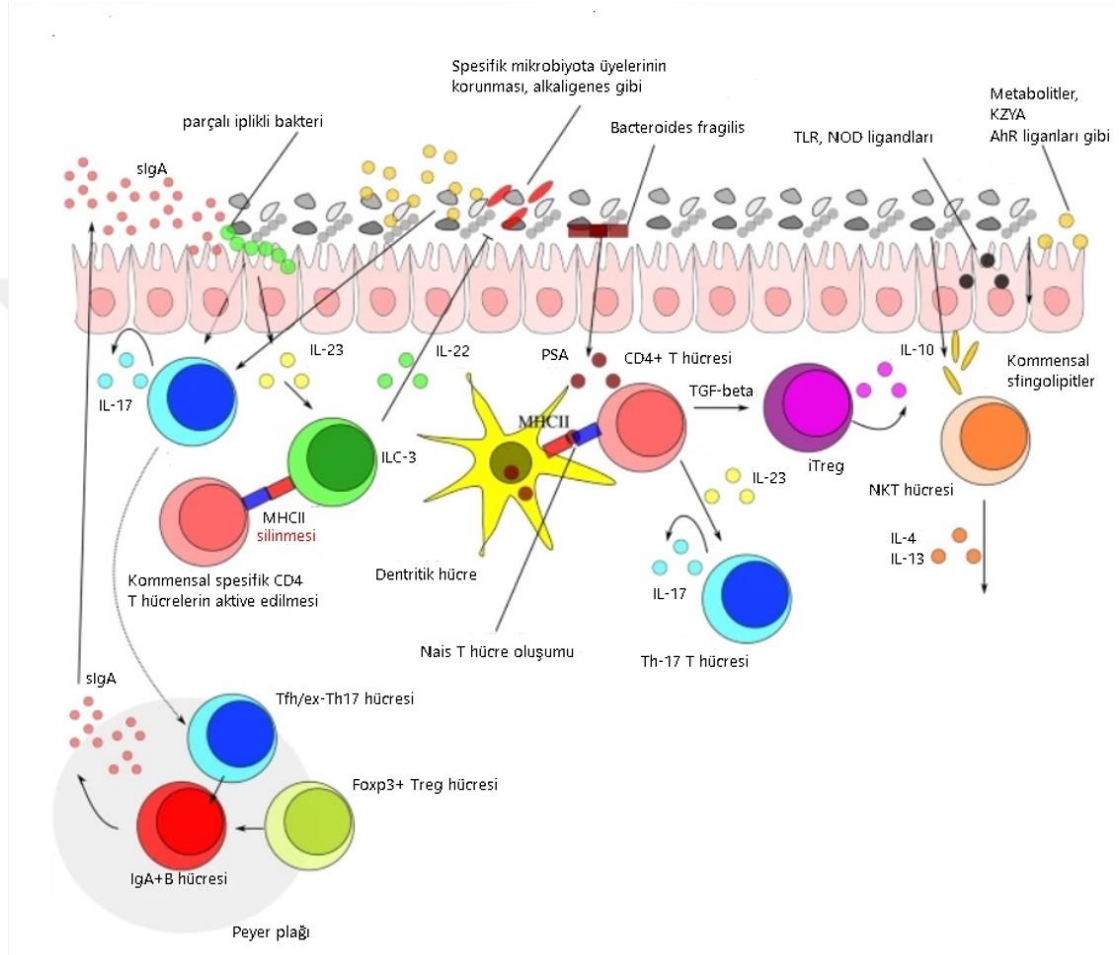
İnsan vücudunun mikrobiyota ile etkileşimleri için en çok çalışma yapılan ve en iyi açıklanan vücut bölgesi bağırsak mukozasıdır (Thomas, 2016). Bağırsak bağışıklık sisteminin en önemli özelliği; patojenik bakterilerin yol açtığı enfeksiyonlar ve kommensal mikroorganizmaların steril vücut ortamına izinsiz girişine karşı korur iken bir yandan da bağırsaktaki muazzam ve sürekli değişen zararsız mikroorganizma zenginliğine karşı immün tolerans oluşturma yeteneğine sahip olmasıdır (Mowat, 2018). Sağlıklı bir bireyde, bağırsak mikrobiyotasının ilk

bağışıklık tepkisi, kesinlikle mukozal yüzeyden gerçekleşir (Konrad ev ark., 2006). Bir epitel tabakası bağırsak lümenini alttaki dokulardan ayırır. Yoğun bir mukus tabakası da bağırsak epiteli ile yerleşik mikroorganizmaları birbirinden ayırır. Mukus bariyeri, hiperglikosillenmiş müsin MUC2 içeriğine sahiptir (Belkaid ve Naik, 2013). Bununla birlikte, MUC2 yalnızca statik koruma sağlamakla kalmaz, aynı zamanda enterik dendritik hücreleri (DC'ler) bir anti-inflamatuar duruma yönlendirerek bağırsak antijenlerinin immünojenisitesini de sınırlandırır (Shan, 2013). Bağırsak epitel yapısı sıkı bir yapı olup transepitelyal geçirgenliği kısıtlamada kritik bir role sahiptir. Bazı mikrobiyal sinyaller ve metabolitler bu epitelyal sıklık durumu üzerine etkilidir. Örneğin; bakteriyel bir metabolit olan indolün üretimi yoluyla, sıkı bağlantıların ve ilişkili hücre iskeleti proteinlerinin yukarı regülasyonu ile epitelyal bariyerin güçlendirilmesini destekler (Bansal ve ark., 2010). Ek olarak, salgısal IgA antikorları ve antimikrobiyal peptitler (AMP'ler) de mukozal bariyer fonksiyonunu korumaktadır (Peterson ve ark., 2007).

Mikrobiyota ve bağırsak mukozası arasındaki etkileşimler, konak bağışıklık sisteminin olgunlaşmasında kritik bir rol oynar. Örneğin, belirli bakteriler ve ürünleri, tolerojenik anti inflammatuar T düzenleyici hücrelerin gelişiminde rol oynarken diğerleri, daha proinflammatuar Th17 hücrelerinin gelişmesine ve mukozal yüzeylerden salgılanan IgA'yı üretmek için B lenfositlerinin programlanmasına katkı sağlar. Konak mikrobiyal çeşitliliğinden en çok etkilenen bağırsak epiteli, bakteriyel metabolizmayı desteklemek için mukus formundaki besinlerin ve bağırsak mikrobiyotasının yapısını şekillendirmeye de yardımcı olan antimikrobiyal peptitlerin üretimi yoluyla bağırsak mikrobiyotası ile etkileşime girer (Khor ve ark., 2011).

İnflamatuar Bağırsak Hastalığı (İBS) gelişimi ile ilişkili genetik lokuslar, bu süreçlerin her birini etkileyen yolları içerir. Astım, İBS, tip 1 diyabet ve diğerleri gibi kompleks immünolojik aracılı hastalıkların gelişiminde konak genetiği ve çevresel faktörler arasındaki etkileşim mikrobiyal ortamdaki değişikliklerle oldukça ilişkili bulunmuştur (Shreiner ve ark., 2015). Bu mikrobiyal ortamdaki değişikliğin bahsi geçen hastalıkların son 20 yılda hızla artan insidansına neden olduğu fikrine yol açmıştır. Gerçekten de, çevremizdeki birçok etken, bu hastalık süreçlerinin artan insidansı ile eşzamanlı olarak son birkaç on yılda çarpıcı biçimde değişmiştir.

Bağırsak mikrobiyotasındaki değişikliklerle sonuçlandığı varsayılan çevresel değişimler; modern yaşam tarzı unsurları arasında iyileştirilmiş sanitasyon, aşılar, artan antibiyotik kullanımı, parazit enfeksiyonlarında azalma, sezaryen, daha küçük aile büyüklüğü, soğutma, daha az kalabalık yaşam koşulları, yerleşik yaşam tarzları, gıda işleme ve diyet değişiklikleri yer almaktadır (Cani, 2018).



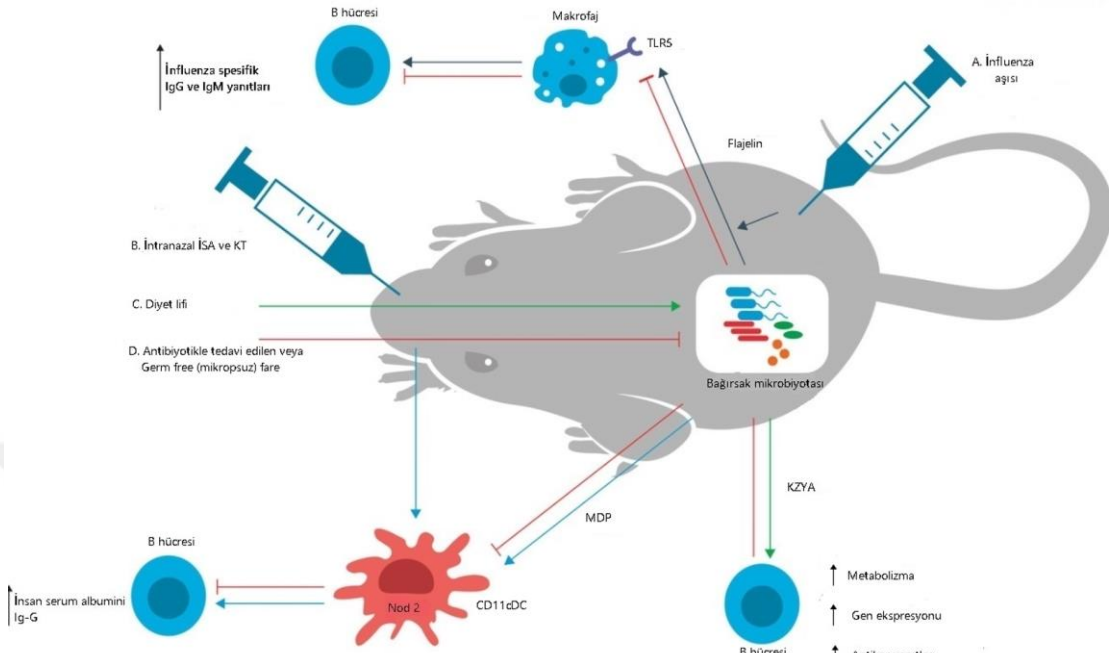
Şekil 2.5.2.1. Homeostazda bağırsak mikrobiyota etkileşimi (Zheng ve ark., 2020'den değiştirilerek kullanılmıştır).

Mikrobiyotamızı tanıyan TLR ve NOD ligandları ve bakteriyel metabolitler (örneğin, SCFA, AhR ligandları) doğrudan enterositler ve bağırsak bağışıklık hücreleri üzerinde etki eder ve bağışıklığı modüle etmek için sistemik dolaşım yoluyla uzak dokulara da ulaşabilir. Peyer plaklarında lokalize olan Foxp3⁺ Treg hücreleri ve Tfh/ex-Th17 hücreleri, B hücrelerinin farklılaşmasını ve salgısal IgA üretimini teşvik eder. Tüm bunlar, homeostatik mikrobiyota oluşumunu ve bileşiminin düzenlenmesi sağlar. Segmentli filamentöz bakteriler (SFB) ve diğer birçok kommensal bakteri

tarafından oluşturulan bağırsak kolonizasyonu, $CD4^+$ Th17 hücrelerinin farklılaşmasını destekler. Ayrıca, SFB kolonizasyonu, ROR γ t tarafından IL-17A üretimini indüklemek için ILC3/IL-22/SAA1/2 eksenini aracılığıyla sinyalleşmeye neden olur. ILC3'ten üretilen IL-22, Th17 hücreleri tarafından IL-17A üretimini teşvik ederek spesifik mikrobiyota üyelerinin muhafazasına katkıda bulunur. Ayrıca, ILC3 ile eksprese edilen MHCII'nin silinmesi, zararsız kolonize edicilere karşı bir bağışıklık tepkisini önlemek için kommensal spesifik $CD4^+$ T hücrelerini aktive eder. Erken yaşam mikrobiyal kolonizasyonu, bağırsak lamina propria ve akciğerlerde potansiyel hastalık teşvik edici aktiviteyi önlemek için kısmen sfingolipid üretimi yoluyla iNKT hücrelerinin genişlemesini sınırlar. Memeli bağırsak mikrobiyotasının önde gelen bir üyesi olan *Bacteroides fragilis* ile kolonizasyon, $CD4^+$ T hücresi farklılaşması ve Th1 ve Th2 popülasyonlarını dengelemek için, PSA'ya dayanan bir etki. PSA, TLR2'ye bağımlı bir mekanizma yoluyla lamina propria Dendritik hücreler (DC) tarafından alınır ve saf $CD4^+$ T hücrelerine sunulur. Aktive edilmiş TGF- β 'nın eşzamanlı varlığında, bu hücreler düzenleyici T hücrelerine (iTreg) farklılaşabilir. Bu hücreler tarafından üretilen IL-10, bağışıklık homeostazını destekler. Aksine, aynı kaskad yoluyla lisanslanan IL-23, proinflatuar Th17 hücrelerinin genişlemesini destekler (Zheng ve ark., 2020).

Yukarıda detaylı bir şekilde açıklandığı üzere bağırsak mikrobiyotası ile immün sistem arasında çok yoğun ve karmaşık bir etkileşim bulunmaktadır. Bu etkileşim denge halinde olup, bu denge bozulduğu takdirde çeşitli 18irüsün18jik sorunlar ile sonuçlanacağını tahmin etmek zor değildir. Bu etkileşimde kısa zincirli yağ asitlerinde azalma olursa TLR ve NOD ligandları üzerindeki uyarılarda azalma olacağı için bağışıklık sisteminin modülasyonundaki bazı basamaklarda aksaklıklar oluşabilir ve T reg hücrelerin üretiminde azalma olur (Lynn ve Pulendran, 2018). Peyer plaklarında lokalize olan T reg hücrelerindeki baskılanmalar B hücrelerinde farklılaşma olmasını ve salgısal IgA üretilmesini baskılayabilir. Yaşamın erken dönemindeki mikrobiyal kolonizasyondaki çeşitliliğinin az olması bağırsak lamina propriasında sfingolipid üretimini baskılar ve bu durum NK (doğal öldürücü) hücrelerindeki sınırlamayı ortadan kaldırır ve genişlemesindeki kontrol edici etkileri ortadan kaldırır (Zheng ve ark., 2020). Bağırsak mikrobiyotasının önemli

üyelerinden olan *Bacteroides fragilis* ile kolonizasyonuna az olması $CD4^+$ T hücresi farklılaşması ve Th1 ve Th2 popülasyonlarını etkiler.



Şekil 2.5.2.2. Bağırsak mikrobiyotasının farelerde aşılama/enfeksiyona karşı antikor tepkilerini etkilediği gösterilen mekanizmalar (Lynn ve Pulendran, 2018’den değiştirilerek kullanılmıştır).

A. Bağırsak mikrobiyotasından flajellinin TLR 5 aracılı algılanması, farelerde mevsimsel grip aşısına karşı optimal antikor tepkileri için gereklidir.

B. CD^{11c+} DH (Dendritik Hücre)’ler tarafından bağırsak mikrobiyotasından muramil dipeptidin (MDP) Nod2 aracılı tanınması, farelerin İnsan Serum Albumini ve Kolera toksini ile intranasal immünizasyonunda optimal antikor tepkileri için gereklidir.

C. Diyet lifi, B hücre metabolizmasını ve gen ekspresyonunu artırarak farelerde *Citrobacter* enfeksiyonuna karşı optimal antikor yanıtılarını destekleyen kısa incirli yağ asitlerinin (KZYA) bağırsak mikrobiyotası tarafından üretimini destekler.

D. Mikrobiyotanın aşı tepkileri üzerindeki bu olumlu etkileri, antibiyotikle tedavi edilen veya mikropsuz (Germ free) farelerde etkili değildir.

2.6. Hepatit B Virüsü

2.6.1. Hepatit B virüsü ve özellikleri

Hepatit B virüsü (HBV), RNA ile replikasyonunu gerçekleştirebilen ve konak genomuna entegrasyon sağlayabilen, Hepadnaviridae ailesinden bir DNA virüsüdür. Beklenmedik bir biçimde retrovirüslere benzeyen özelliklere sahiptir. HBV

replikasyonunun alışlagelmişin dışında benzersiz ve kendine has olma özelliği, virüsün enfekte olmuş hücrelerde kalıcılığıdır (Liang, 2009). Genotiplendirme yapılırken genetik olarak %8'den fazla fark olması özelliği ile genotiplerin sayısı genotip A-J olarak 10'a kadar tanımlanmıştır. Tüm genomda genetik benzerlik ve farklılık yüzdelere göre değerlendirilerek genotipler tekrar subgruplara indirgenmiştir. (Zhang ve Cao, 2011). HBV genotip ve subgenotipleri HbeAg serokonversiyonu, HBV enfeksiyonunun ilerleyişi, klinik olarak oluşan cevap, prognozu ve antiviral yanıt açısından farklılıklar göstermektedir (Zhang ve Cao, 2011; Bharti ve Grimm, 2021). Ülkemizde en sık görülen genotip D'dır (Sunbul ve Leblebicioglu, 2005).

2.6.2. HBV'nin yapısı ve proteinleri

Hepatit B virüsü'nün elektron mikroskobu ile incelenmesinde Dane partikülü (42nm), küresel (20nm) ve tübüler-filamentöz (22nm) 3 farklı virüs yapısı gözlenmiştir (Liang, 2009). Dane partikülü, virüsün DNA genomu ve viral polimerazını ayrıca nükleokapsid yapısı ile bu kapsidi çevreleyen HbcAg ile kompleks oluşturan ve HBsAg içeren lipit zarfla kaplanmış çift katlı 42nm çapında küresel yapı olarak tanımlanabilir (Liang, 2009). Kolesterolde zengin lipid içeriğine sahip zarf yapısı virüsün enfektivitesi için gereklidir (Baumert ve ark., 2004). Büyük zarflı virüslerin aksi yönünde, nükleokapsid, endoplazmik retikulumdan zarfını tomurcuklanarak oluştururken; zarf zarfı üstünde L (büyük), M (orta) ve S (küçük) olmak üzere 3 farklı yüzey glikoproteinlerinin belirli bir düzen içinde yoğun olarak dizilmelerini uyarır (Baumert ve ark., 2004; Block ve ark., 2007). HBsAg'nin dolaşımında 6 aydan daha uzun süre kalması genellikle kronik enfeksiyon olarak kabul edilir ve virüsün zarf proteinlerini saptamak için en çok kullanılan bu proteindir (Block ve ark., 2007.)

2.6.3. Hepatit B virüsünün bulaşıcılık özellikleri

Hepatit B enfeksiyonu, kontrol edilmemiş kan ürünlerinin kullanımı, sterilize edilmemiş araçla yapılan tıbbi ya da diş müdahaleleri, kullanılmış enjektör paylaşımı, tıraş bıçağı, diş fırçası gibi eşyaların paylaşımı ile bulaşabilir. Hemodiyaliz, dövme, piercing yaptırma ve enfekte kişilerin vücut sıvıları ile

mukozal ya da kütanöz temas Hepatit B enfeksiyon bulaşı için risk oluşturan durumlardandır.

2.6.4. Tedavi ve Korunma Yolları

Karaciğer yetmezliği, siroz ve hepatosellüler karsinom (HCC) gibi yaşam için ciddi tehditler oluşturan komplikasyonlara sebep olan HBV'nin, günümüzde uyguladığımız antiviral tedavi modaliteleri ile tümüyle eradike edilmesinin uygulanabilir olmayışı, enfeksiyon ile enfekte olmamanın yani korunmanın önemini daha da göz önüne getirmektedir. (Zoulim ve Perrillo, 2008). HBV enfeksiyonundan korunmada uygulanabileceklerin başında enfeksiyonun bulaşından korunmak için yapılabilecek davranışsal değişiklikler gelmektedir. Güvenli cinsel yaşam konusunda bilgilendirilme, damar içi bağımlılık yapıcı madde kullananların eğitilmesi ve rehabilitasyon süreçlerine önem verilmesi, traş bıçağı ve tırnak makası gibi kişisel eşyaların ortak kullanılmaması, mesleksi olarak HBV ile karşılaşılmasının engellenmesine yönelik önlemler gibi davranışsal korunma yöntemleri enfeksiyonun erişkin yaş grubunda edinildiği gelişmiş ülkelerde daha fazla önemli olmaktadır (Köroğlu ve ark., 2018). Kan ve kan ürünlerinin kullanılmadan önce HBsAg açısından taranması, sterilizasyon ve dezenfeksiyon esaslarının uygulanması diğer önemli korunma seçenekleridir. Aktif ve pasif bağışıklama ile korunma, yeniden ve erken çocukluk yaş gruplarında daha çok enfeksiyonun edinildiği orta ve yüksek endemikite gösteren bölgelerde daha etkili olmaktadır (Hou ve ark., 2005; Özaçar, 2008).

Akut HBV enfeksiyonu belirtisiz şekilde geçirilebilir ya da semptomlar verebilir. Akut dönemde birçok olguda klinik bir belirti ve semptom olmadığı için çoğu olguyu akut dönemde saptamak zordur. Klinik belirti veren birçok olgu ise hastane yatışı gerektirmeden ayaktan tedavi ile tedavi ve takip edilebilir (WHO Guidelines, 2015). Akut HBV enfeksiyonunda tedavi modalitemiz destek tedavisidir. Özgün bir tedavi biçimi söz konusu değildir. Hastalara dinlenme önerilir. Diyetlerinde sınırlama yapmaları konusunda bir gereklilik yoktur. Laboratuvar değerleri ve semptomlar olarak düzelme hali oluşana kadar alkol tüketiminin yanısıra birçok ilacın kullanımı da sedatif, analjezik ve anksiyolitik gibi özellikle de hepatotoksik ilaç kullanımından kaçınılmalıdır (EASL, 2015). Ciddi kusması olan olgulara metoklopramid ve sıvı-

elektrolit desteği yapılmalıdır. İmmun yetersizliği olmayan, akut hepatit B enfeksiyonlu hastalarda nükleozid analogları kullanılmamalıdır. Aşırı derecede emezis ve kusması olan, bilinç değişikliği ve hepatik ensefalopati kliniği olan olgular; bilirubin düzeyi 15-20 mg/dL'nin, protrombin zamanı 17 sn'nin üzerinde olanlar, protrombin zamanı ve bilirubin değerleri birkaç hafta süresince sabit olarak takip edilirken transaminazlarda aniden hızlı düşüş gösteren olgular hastanede yatış yapılarak tedavi edilmelidir (Kawai ve Feinstone, 2010).

Hepatit B enfeksiyonundan korunmak için yapılması gerekenlerin başında tüm yenidoğanları HBV'ye karşı aşılama vardır böylece uzun vadede tüm toplumun enfeksiyona karşı bağışıklık sağlamış olması hedeflenmiş olur (Beutels, 2002). Genç Erişin yaş grubundaki bireylere HBV açısından tarama ve aşılama uygulanmalıdır. HBV taşıyıcıları ile temas riski olanlar aşılanmalıdır (Mahoney, 1999). HBV enfekte bireyle temas sonrasında en kısa zamanda aşı ve gerekirse (temas eden hiç aşılanmamışsa) Hepatit B Immunglobulin (HBIG) uygulanmalıdır (Mast, 2006). HBV enfeksiyonunun neden önemli olduğu nasıl bulaşabileceği ve nasıl korunmak gerektiği hususlarında topluma bilgilendirme yapılmalıdır (Mast, 2006). HBsAg pozitif kişiler, Hepatit A'ya duyarlı bireylere aşı ile bağışıklama sağlanmaya çalışılmalıdır. Gebe bireylerde rutin olarak HBV enfeksiyonu yönünden tarama yapılmalıdır (Mast, 2006).

Hepatit B virüsü ile enfekte anneden doğan bebeklerde korunma için izlenmesi gereken yol ise şöyle olmalıdır; HBsAg pozitif bütün kişiler enfeksiyöz olmakla beraber, HbeAg pozitif olan bireylerdeki viral yük daha fazla olduğu için bu kişilerin enfeksiyonu bulaştırma olasılığı HbeAg negatif olanlara göre daha fazladır. Teması takiben bağışıklık için koruma uygulanmadığında, HbeAg pozitif hamile bir anneden dünyaya gelen bebeklerde, ilk 6 ayda %70-90 kronik Hepatit B enfeksiyonu gelişme olasılığı yüksek iken; bu oran HbeAg negatif bir gebeden dünyaya gelen doğan bebeklerde %10'dan azdır (CDC, 2015). HbeAg pozitif anneden doğan bebeklere, doğumu takip eden ilk 24 saatte hem HBİG hem de hepatit B aşısının uygulanması ve standart üç doz aşı protokolünün tamamlanmasıyla, HBV bulaşının %85-95 oranında önüne geçilmektedir (Tang ve ark., 2018).

Dünya üzerinde yaşayan 2 milyar birey Hepatit B virüsü ile enfektidir ve 257 milyon kişide kronik Hepatit B enfeksiyonu bulunmaktadır. Her yıl Hepatit B enfeksiyonu ve buna bağlı oluşan komplikasyonlar sebebiyle yaklaşık 700.000 kişi yaşamının sonuna gelmektedir (WHO, 2021). Hepatit B enfeksiyonunun oluşturduğu sosyoekonomik yük de düşünüldüğünde Hepatit B enfeksiyonundan korunmada aşının önemi daha da önemli bir yer tutmaktadır.

Ülkemizde ulusal HBV aşılama, ilk kez 1998 yılında yenidoğan bebeklere ve risk grubundaki kişilere uygulanmasıyla başlamıştır. Yenidoğan dönemine aşılanmanın uygulanmasının ardından 2005 yılından itibaren ilköğretim okullarında HBV aşısı uygulanması başlatılmıştır. Son olarak 2020 yılında yürürlüğe giren ve 2008, 2009 yıllarında güncellenen Güncellenmiş Bağışıklama Programı genelgesinde bebeklere HBV aşısının doğumda ilk doz, bebek bir aylık olduğunda ikinci doz, ikinci dozdan dört ay sonra da üçüncü doz şeklinde yapılması gerekliliği bildirilmiştir. Aynı zamanda bu genelge sayesinde ilköğretim okullarında eğitim gören tüm öğrencilerin eksik aşılarının tamamlanması ayrıca aşısız çocuk kalmaması da amaçlanmıştır (Kandemir, 2020).

2.6.5. Hepatit B aşısı

Hepatit B aşısı HBsAg antijeni içermektedir. Dünya üzerinde FDA tarafınca onaydan geçen ilk Hepatit B virüs aşısı 1981'de üretimi yapılan plazmadan köken alan aşıdır. Ancak bu aşının elde edilişinin maliyeti yüksek, üretim sürecinin güç olması ve sonraki yıllarda keşfedilen immun yetmezlik virüsü (HIV) nedeniyle oluşan güvensizlikler sebebiyle 1986 yılında rekombinant aşılar kullanıma girmiştir (Van Buren ve ark., 1991). Günümüzde aktif olarak sıkça kullanımı sağlanan rekombinant Hepatit B aşılarının uygulanması ile % 90 oranından da yüksek Hepatit B'e karşı bağışıklık yanıtı sağlanmış olmaktadır (Yang ve ark., 2016). Bugün kullanımı uygun bulunup onaylanmış üç aşı (Hepatit B) bulunmaktadır. İkinci nesil aşılarından olan ve sırasıyla 10 µg- 20 µg HBsAg içeren (RecombivaxR- EngerixBR) mayadan elde edilmiştir ve üç doz uygulanır. Bu ikinci nesil Hepatit B aşılarının immun yanıt cevaplarının yüksek ve oluşabilecek beklenmeyen etki olasılıklarının düşük olması sebepleri onları sık tercih edilme nedenlerinden olmaktadır (Yang ve ark., 2016). Hepatit B aşılarından adjuvan içeren ve memeli hücresi aracılığıyla

üretileen bir diğeer aşı (HepsilavR) 20 µg HBsAg barındırmaktadır. Bu adjuvanlı aşı güvenilir şekilde kullanılabilecek standartlarda olduğunu ve oldukça etkin olduğunu yüksek antikor yanıtları oluşturarak kanıtlamıştır (Hyer ve ark., 2018). Türkiye’de şu an adjuvan içeren Hepatit B aşısı henüz kullanılmamakta olup Hepatit B aşılarının 2. nesil olanları tercih edilmektedir. Özellikle bağışıklığı baskınlanmış HIV/AIDS gibi hastalarda, immunsupresiflerde ve biyoyolojik ajan kullananlarda, 2. nesil Hepatit B aşılarının antikor yanıtı konusunda ortak bir görüş bulunmamaktadır. Günümüzde bağışıklama amacıyla kullanılan aşılar, Hepatit B virüsünün majöt yüzey antijenini içerir. Bu antijen rekombinant DNA teknolojisi ile üretilmiştir. Rekombinant aşılardan aktif içeriğı HBsAg, plazmid aracılığıyla HBsAg geninin memeli ya da maya hücresi içine eklenmesiyle üretilir. Rekombinant teknolojisiyle üretilen aşılar hiçbir enfeksiyöz parçacık içermemeleri sebebiyle plazma aşıları ile kıyasladığımızda çok daha avantajlı ve güvenilirdir (Goldstein ve ark., 2005; Hyams, 1995).

Hepatit B aşısı uygulaması şu şekilde uygulanmaktadır; aşı standart uygulama aşı takvimine göre 0, 1 ve 6. aylarda veya 0, 1, 2 ve 12. aylarda yetişkin bireylerde deltoid kas içersine, yenidoğan ve süt çocuklarında ise üst bacak kası içersine enjekte edilme suretiyle olmaktadır (Gülcü ve Arslan, 2018). Herhangi bir aşı ile başlanan aşı programına diğeer bir aşı ile devam edilebilir. HBV için bulaş riski olanlarda uygun aşılamaya ile etkin antikor düzeyi oluşup, oluşmadığı kontrol edilmelidir. Aşı sonrası koruyucu antikor düzeyi saptananlarda (>10 IU/ml) ilave hatırlatma dozlarına gerek yoktur (Rubin ve ark., 2014).

Hepatit B enfeksiyonuna karşı bağışıklama sağlamak amacıyla kullandığımız aşı tek başına ve diğeer aşılarda birlikte kombinasyon biçiminde de kullanılmaktadır. Kombinasyon aşılarda immun yanıt ve güvenlik, aşılardan ayrı ayrı verilmesiyle gözlenenle aynıdır doğumda Hepatit B aşısı uygulanmak istendiğinde seçim monovalan formdan yana olmalıdır (Kandemir, 2020).

Sağlıklı, herhangi bir komorbiditesi ve immünsüpresif durumu olmayan hastalar için Hepatit B aşı dozları standart hale gelmiştir. Hemodiyaliz hastaları gibi özel hasta

gruplarında yüksek doz Hepatit B aşısı standartize edilmişken, HIV/AIDS, immünsüpresif durum veya immünsüpresif ilaç kullanımı durumlarında aşı dozları konusunda rehberler arasında henüz bir görüş birliği sağlanamamıştır. Avrupa HIV/AIDS Derneği standart doz Hepatit B aşılması, aşı başarısızlığında yüksek doz aşılamaya önermektedir (Ryom ve ark., 2019). CDC ise HIV/AIDS gibi immünsüpresif koşullarda yüksek doz Hepatit B aşılması önermektedir. Amerikan Enfeksiyon Hastalıkları Derneği'nin rehberi de HIV/AIDS tanılı hastalarda çift doz Hepatit B aşısı önermektedir (Rubin ve ark., 2014).

Aşıya oluşan antikor yanıtı açısından yapılan aşının türü ve yaş faktörünün yanı sıra en önemli parametre hastanın immün durumudur. İmmün sistemi etkileyen ilaçlar ve mevcut komorbiditeler aşıya cevaben oluşan antikor yanıtını da etkilemektedir. Örneğin hemodiyaliz hastalarında standart doz Hepatit B aşısına karşı oluşan yanıt normal sağlıklı popülasyona göre oldukça düşüktür (www.kidney.org.uk Erişim tarihi: 1.01.2022). Bu nedenle hemodiyaliz hastalarında yüksek doz hepatit B aşısı uzun yıllardır standart prosedür haline gelmiştir (Banatvala ve Van Damme,2003).

Aşı sonrası antikor titresi <10 IU/ml olan aşıya antikor yanıtının yetersiz olduğu olgularda tekrar dozlar veya tetanoz aşısı ile birlikte uygulamalar yapılmıştır. Ancak bu konuda yeterli bilimsel veri bulunmamaktadır. Hemodiyaliz hastaları dışında aşı cevabının kimlerde neden oluşmadığı ile ilgili yeterli araştırma yoktur. Hepatit B aşısına cevap alınamayan hastalarda etyolojik faktörlerden birinin immün sistem ile yakından ilişkili olan bağırsak mikrobiyota kompozisyonu olabileceği düşünülerek bu çalışma planlanmıştır.

3.GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Etik Kurul Onayı

Çalışmamızın etik kurul onayı (SAÜTF-KAEK No: 2020/02/11); Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi İlaç Dışı Girişimsel Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan, 28.02.2020 tarihli imza ile alınmıştır (**Ek 1**).

3.2. Çalışma Grubu

Bu araştırma, Sağlık Bakanlığı Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi (SAÜTF) Klinik Araştırmalar Etik Kurulu (KAEK) tarafından etik kurul onayı verilmesini ardından, Mart 2020 – Şubat 2022 tarihleri arasında Sakarya Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda yapılmıştır. Çalışmaya standart olarak yapılan 3 doz Hepatit B aşılmasına rağmen aşı yanıtı alınamamış ve tekrar 3 doz rapel uygulandığı halde Anti-HBs <10 IU/ml olan 20 hasta ile aşılama ile antikor yanıtı oluşmuş ve Anti-HBs >100 IU/ml olan 20 sağlıklı gönüllü kontrol grubu olarak dahil edilmiştir. Çalışmaya dahil edilen tüm gönüllerin (hasta ve kontrol grubu) hiçbir kronik/sistemik hastalığı bulunmamakta olup herhangi bir ilaç/gıda takviyesi kullanımı da yoktur. Hasta ve kontrol grubu oluşturulurken yapılacak olan araştırma konusunda bilgi aktarılmış, bilgilendirilmiş gönüllü olur formu (**Ek 2**) okutulmuş, çalışmaya katılmak isteyenlerin onam ve imzaları alınarak çalışmaya dahil edilmiştir. Gönüllü olarak çalışmaya katılan tüm hasta ve kontrol grubundaki bireylere dahil edilme ve dışlama kriterlerine uygunluğu değerlendirebilmek amacıyla amacıyla; ilaç kullanımı (antibiyotik, proton pompası inhibitörü kullanımı), kronik hastalık durumu ve beslenme alışkanlıkları sorularını kapsayan mini bir anket uygulanmıştır. Çalışma gruplarına dahil edilme ve çalışma dışı bırakılma ölçütleri aşağıda sıralanmaktadır.

Hasta grubuna dahil edilme kriterleri:

- Tekrarlanan rapele (0. 1. Ve 6. Aylarda olmak üzere 2 kez) rağmen Anti-HBs titresinin <10 IU/ml olması
- 18-65 yaş aralığında olması
- Hastanın okur-yazar olması

- Bilgilendirilmiş gönüllü olur formunu imzalayarak yazılı onam vermiş olması
- En az 6 haftadır herhangi bir antibiyotik, proton pompa inhibitörü, vitamin takviyesi, probiyotik ürün kullanmıyor olması
- Bilinen sistemik, dermatolojik ve psikiyatrik tanısının bulunmaması

Kontrol grubuna dahil edilme kriterleri:

- Rutin olarak uygulanan (0., 1. ve 6. Ay) Hepatit B aşısına yanıt alınması ve Anti-HBs titresinin $>100\text{uI/ml}$ olması
- 18-65 yaş aralığında olması
- Hasta grubuyla yaş ve cinsiyet uyumu sergiliyor olması
- Gönüllünün okur-yazar olması
- Bilgilendirilmiş gönüllü olur formunu imzalayarak yazılı onam vermiş olması
- En az 6 haftadır herhangi bir antibiyotik, proton pompa inhibitörü, vitamin takviyesi, probiyotik ürün kullanmıyor olması
- Bilinen sistemik, dermatolojik ve psikiyatrik tanısının bulunmaması

Çalışmadan dışlama kriterleri :

- Çalışmaya katılmayı kabul etmemesi
- 18-65 yaş aralığında olmamak
- 6 hafta ve daha kısa süre önce antibiyotik, proton pompası inhibitörü ve/veya probiyotik, prebiyotik kullanmış olması

3.3. Fekal Örneklerin Toplanması

Hasta ve kontrol grubundan alınan gaita örnekleri en geç 2 saat içerisinde laboratuvara ulaştırılmıştır. Laboratuvarımıza ulaştırılan gaita örneklerinden öncelikle pH ölçümü yapılmış sonrasında

2 eş parçaya bölünerek (parçalar en az 1 gr olacak şekilde) taze olarak dondurulup -80°C’de saklamaya alınmıştır.

3.4. Fekal Örneklerin Bristol Skorlaması ve pH Ölçümü

Çalışmamızda Bristol dışkı skalası kullanılarak hasta örneklerinin skorlaması yapılmıştır (**Şekil 3.4.1.**).

Toplanan gaita örneklerinden pH metre cihazı ile pH ölçümleri yapılmıştır.

	Tip 1: Keçi pisliği tarzında, topak topak ve parça parça sert dışkı
	Tip 2: Daha büyük ve birleşik topaklanma
	Tip 3: Daha az kalın, daha yumuşak kıvamlı, yüzeyinde derin olmayan çatlakların olduğu dışkı
	Tip 4: Yılan veya sosis gibi pürüzsüz, kaygan yüzeyli ve yumuşak kıvamlı dışkı
	Tip 5: Kenar verecek kıvamda parça parça dışkı
	Tip 6: Yumuşak kıvamlı, su içeriği daha fazla, parça parça dışkı
	Tip 7: Sert ya da yumuşak, katı dışkı içeriği hiç olmayan sulu dışkı

Şekil 3.4.1. Bristol dışkı skalası (Bengi ve ark. 2014'den kullanılmıştır).

3.5. Nükleik Asit (Dna) İzolasyonu

Genomik DNA, üretici firmanın önerileri doğrultusunda uygulamalar ile Qiaamp® Fast DNA Stool Mini kit (QIAGEN, Germany) kullanılarak gaita örneklerinden izole edilmiştir.

3.6. 16S rRNA Sekans

Dizi analizi amacıyla yapılacak olan kütüphane hazırlık aşamasından önce PCR Proof Reading DNA Polymerase 2x Reaction Mix ve her bir primerden 200 nm kullanılarak uygulanmıştır. PCR cihazında şu ısı döngü programı izlenmiştir: 95°C'de 3 dakika; 25 döngü 95°C'de 30 saniye, 55°C'de 30 saniye ve 72°C'de 90 saniye; 72°C'de 5 dakika. Amplifikasyon ürünüde bulunan total nükleik asit miktarı florometrik yöntem (Qubit 3, ThermoFisher, ABD) ile ölçülmüştür (Resim 3.6.1). Amplifikasyon ürünleri ölçüm sonrasında agaroz jelde yürütülerek boyutu (~1450 bp) doğrulanmış ve PCR Product Purification Kit kullanılarak saflaştırılmıştır (Resim 3.6.2.).

Deneyisel kontrol sağlamak adına araştırmamızda kullanılan dışkı örnekleri ile birlikte teorik kompozisyonu bilinen Mikrobiyal Topluluk DNA Standardı da kullanılmıştır.

16S rRNA hedefli metagenomik analiz için daha önce tanımlanmış iş akışları kullanılmıştır (Cusco vd. 2018). Amplikon kütüphanelerinin oluşturulması için kullanılacak primer çifti 16S rRNA geninin kapsayan yaklaşık 1400 bp'lik bir bölgeyi hedeflemektedir (Zeng vd., 2013; Klindworth vd., 2013). Hedef spesifik

primer çiftlerinin 5' ucuna, oluşturulan kütüphanenin Oxford Nanopore Technologies Nanopore barkod DNA dizileri eklenmiştir. 16S rRNA'ya özgü hedef spesifik primer-konnektör sekansları ileri primer için TTTCTGTTGGTGCTGATATTGC - AGRGTTTGATYHTGGCTCAG -3' ve geri primer için 5'- ACTTGCTGTCGCTCTATCTTC - TACCTTGTTAYGACTT -3' şeklindedir.

Amplikon kütüphanesi hazırlanması için ligasyon dizileme kiti 1D (SQK-LSK108; Oxford Nanopore Technologies) kullanılmış ve ve amplikon kütüphanesi MinION cihazına (Oxford Nanopore Technologies, İngiltere) yüklenmiştir (Resim 3.6.3.). Cihaza 1–1.5 µg DNA içeriğine sahip 45 µl barkodlanmış DNA karışımı ve pozitif kontrol olarak 5 µl lambda faj DNA'sı yüklenmiştir. DNA uç tamiri ve dA eklenmesi için NEBNext End Repair/dA-tailing Module (New England Biolabs) kiti kullanılmıştır. Saflaştırma için Agencourt AMPure XP beads (Beckman Coulter) kiti kullanılmıştır.

Adaptör ligasyonu aşaması için toplam 0.2 pmol uçları hazırlanmış DNA 50 µl Blunt/TA ligase master mix (New England Biolabs) karışımının içerisine eklenmiş ve 20 µl adaptör karışımı eklenerek oda sıcaklığında 10 dakika inkübasyona bırakılmıştır. DNA kütüphanesinin elde edilmesi için son saflaştırma işlemi Adapter Bead Binding buffer (provided in the SQK-LSK108 kit) ve 0.5X Agencourt AMPure XP beads (Beckman Coulter) kitleri kullanılarak tamamlanmıştır.

Dizileme karışımı (14 µl DNA kütüphanesi), Loading beads (25.5 µl) ve Running Buffer karışımı (35.5 µl) ile karıştırılır. Kullanılacak R9.4 akış hücresi priming yapılarak yüklemeye hazır hale getirilmiş ve hazırlanan dizileme karışımı akış hücresinin örnek yükleme kısmına aktarılmıştır.

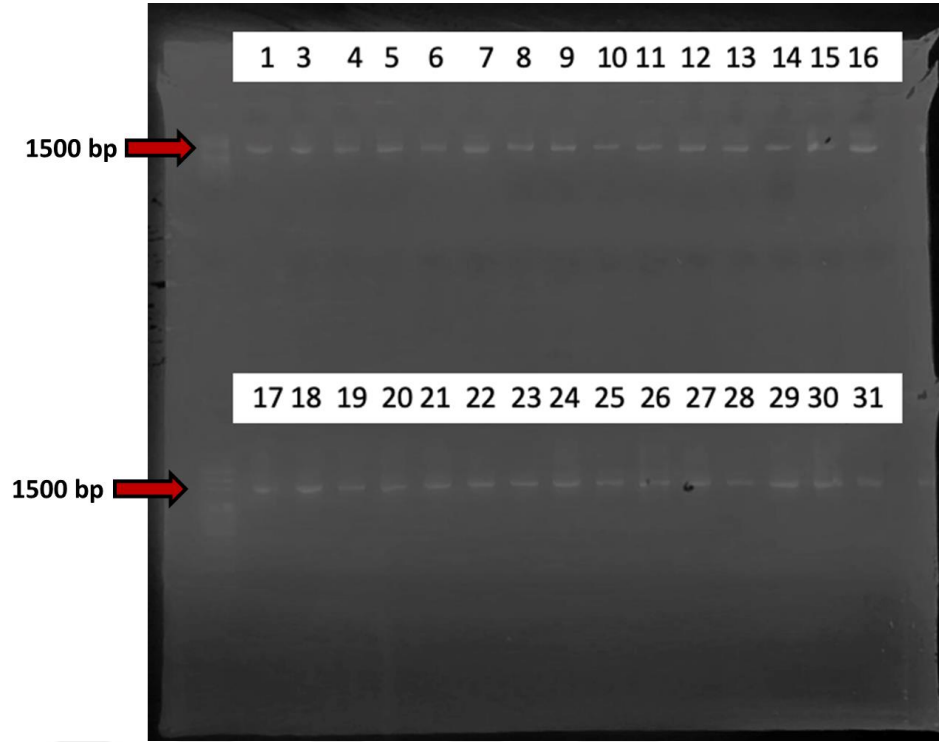
MinION™ kontrol yazılımı, MinKNOW™ versiyon 0.46.1.9 (R9.4) kullanılarak 48 saatlik (R9.4) bir dizileme protokolü gerçekleştirilmiştir. Okuma verileri, 1.2.2 rev 1.5 iş akışı ve Metrichor™ agent (versiyon 0.16.37960) yazılımı tarafından baz alınarak elde edilmiştir.

Dizileme bittikten sonra, fast5 formatında elde edilen sonuçlar guppy v3.1.5 yazılımı kullanılarak fastq formatına çevrilmiştir (base-calling ve de-multiplexing). Barkod ve adaptör sekansları Porechop v0.2.3 yazılımı kullanılarak temizlenmiş, ayrıca

dizilerin her iki ucundan 45 baz silinerek evrensel primer ve etiketler de silinmiştir. Dizilerin temizlenmesinin ardından 1350-1550 bp uzunluğunda ki okumalar filtrelenmiş ve geriye kalan okumalar analizden çıkarılmıştır.



Resim 3.6.1. Qubit 3 (ThermoFisher, ABD)



Resim 3.6.2. Agaroj jelde yürütülen PCR rnleri



Resim 3.6.3. Minion yeni nesil sekans cihazı (Oxford Nanopore Technologies, İngiltere)

3.7. Biyoinformatik ve İstatistiksel Analizler

16S dizilimi, Oxford Nanopore Teknolojisi kullanılarak MinION™ (Oxford Nanopore Technologies, Cat. # MIN-101B) cihazında yapıldı.

İlk olarak kütüphane hazırlığı yapılmıştır. Dizileme için adaptörlerin bağlı olduğu bir DNA parçaları havuzu hazırlanmalıdır. 16S Barkodlama Kiti 1-24 (SQK-16S024) sayesinde, cins analizi için multipleks numuneler incelenebilir. LongAmp Hot Start Taq 2X Master Mix (NEB, M0533S) kullanıldı, ardından numune içeren tüplere 16S spesifik barkod primerleri eklendi. Daha sonra, her numuneyi çoğaltmak için PCR yapıldı. İlk denatürasyon için tüp bir döngü için 95 °C'de 1 dakika tutuldu. Daha sonra 95 °C'de 20 saniye 25 döngü denatürasyon ve 55°C'de 30 saniye 25 döngü bağlanma yapıldı. Uzatma işlemi, 65 °C'de 2 dakika 25 döngü ve 65°C'de 5 dakika süreyle bir son uzatma döngüsü olarak yapılmıştır.

PCR adımlarından sonra sırasıyla saflaştırma için Agencourt AMPure XP boncukları ve Rapid Adapter (RAP) kullanıldı. Ardından, tüm barkodlu kütüphaneler uygun konsantrasyonlarda bir araya getirildi. Hazırlanan kütüphane, MinION akış hücresine yükleme için kullanıldı. Kütüphane, yüklenmeye hazır olana kadar buz üzerinde saklandı.

Örnekleri hazırlamak için Flow Cell Hazırlama Kiti (EXP-FLP002) kullanıldı. 11 µl DNA numunesi 25.5 µl Loading Beads (LB) ve 34 µl Sekanslama Tamponu (SQB) ile karıştırıldı. Kullanılacak R9.4 akış hücresi hazırlandı ve örnek yüklemeye hazır hale getirildi. Hazırlanan dizileme karışımı, akış hücresinin numune yükleme kısmına aktarıldı.

48 saatlik sekanslama protokolü (R9.4), MinION™ kontrol yazılımı, MinKNOW™ sürüm 21.11.8 kullanılarak yapıldı.

Dizileme bittikten sonra, fast5 formatında elde edilen sonuçlar guppy v6.0.1 yazılımı kullanılarak fastq formatına çevrilmiştir (base-calling, de-multiplexing, barkod, primer ve adaptör sekansları temizlenmesi). Dizilerin temizlenmesinin ardından uzunluğu 1000-2000 bp dışında kalan okumalar ve kalitesi düşük okumalar filtrelenmiş ve analizden çıkarılmıştır (Wick ve ark.,2019).

Temizlenmiş okumalar Python programlama dili kullanılarak özelleştirilmiş iş akışı ile analize tabi tutulmuştur.

Sekanslar analize hazır hale getirilecek kalite adımlarını geçirdikten sonra 16s rRNA için özelleştirilmiş NCBI veritabanı üzerinde lokal dizileme analizi ile taksonomik sınıflandırma yapılır ve yüksek olasılıklı organizmalar ile eşleştirmeler yapılır (Sayers ve ark.,2022). Bu eşleştirmelerin kalite kontrolleri eşleşen bölgenin uzunluğu ve benzerlik oranını girdi olarak alan istatistiksel bir test ile yapılır ve anlamlı benzerliğe sahip atamalar takson bilgisi olarak kaydedilir.

Takson atamalarından sonra uygulanan istatistiksel kontrollerin sonuçlarından sonra geriye kalan veriden rapor da sunulan post analiz sonuçları için relative abundance ları hesaplanır. Relative abundance ve organizmaların genomları ile BIOM ve Qiime dosya formatları yardımı ile filogenetik analizler, alpha & beta çeşitlilik analizleri, lineer discriminant analysis effect size(Lefse), Krona, benzerlik matris ısı haritaları (heatmap) ve bunlar için istatistik test sonuçları(p-value) analizleri üretilip raporda sunulur (Daniel ve ark., 2012; Bolyen ve ark., 2019; segata ve ark., 2011; Ondov ve ark., 2011).

Sekans analiz sonuçlarına göre alfa, beta çeşitlilik, Lefse, LDA, klodogram analizleri yapılmıştır.

Alfa çeşitlilik analizi, ekosistemdeki her bir örneğin kendi içerisindeki türlerin bulunma durumunu gösteren analizlere verilen genel addır. Alfa çeşitlilik analizinde örneklerin kendi içerisinde bulunan organizmalara göre mikrobiyom dağılımını gösteren Shannon, Simpson, Chao1 gibi analiz yöntemleri bulunmaktadır. Bu dağılım gösterilirken örneklerin o gruplara ait özellikleri ile beraber bolluk oranları yani abundance ları da gösterilmektedir.

Beta çeşitlilik analizindeki temel amaç ise örneklerin birbirleri içinde ve bulundukları gruplara göre diğer gruplar ile karşılaştırılarak gruplar veya örnekler arası yapısal durumu gözlemlenmektedir. Bunun için genel olarak örneklerin ait oldukları organizmalar ile de karşılaştırılması amaçlanıp PCoA analizleri yani temel koordinat analizi yapılmıştır. PCoA analizleri PCA analizlerinden farklı olarak örneklere ait olan organizmalarının birbiri arasındaki uzaklıklar hesaba katılmaktadır.

Bunun yanında örneklerin ait oldukları gruplarda bu analizin bir başka ayağını oluşturmaktadır. Çalışmamızda PCoA analizleri Weighted-unifrac ve Bray-curtis analizleri ile yapılmıştır. Bray-Curtis PCoA analizi örneklerdeki organizmaların oranları dikkate alarak ortak paylaşılan organizmaların bulunma hesabına dayalı bir istatistik kullanılarak oluşturulmaktadır. Diğer yanda Weighted-unifrac ise örneklerin içerisindeki organizmalara ait genomların sekansları ile bir filogenetik ağaç oluşturmaya yönelik uzaklık hesabını ve organizmaların bulunma oranları birlikte analiz edilir.



4. BULGULAR

4.1. Gönüllülerin Yaş/Cinsiyet Dağılımı

Çalışmaya dahil edilen sağlıklı gönüllülerin ve hasta grubunun cinsiyet dağılımı 8 (%40) kadın, 12 (%60) erkek olmak üzere benzer idi. Hepatit B aşısına antikor yanıtı oluşturmamayan grubun yaş ortalaması $48,05 \pm 13,25$, antikor yanıtı oluşturan kontrol grubunun yaş ortalaması ise $38,35 \pm 5.94$ idi.

Tablo 4.1.1 Çalışmaya dahil edilen gönüllülerin yaş ve cinsiyet dağılımı

	Hasta Grubu	Kontrol Grubu
Yaş	$48,05 \pm 13,25$	$38,35 \pm 5.94$
Cinsiyet		
Erkek	12	12
Kadın	8	8
Toplam Sayı	20	20

4.2. Bristol Skorlama Sonuçları

Hepatit B aşısına antikor yanıtı oluşturmamayan hasta grubunun gaita örnekleri daha çok Tip 2-3 ve 4 arasında, sağlıklı gönüllülerin gaita örneklerinin ise daha çok Tip 3-4-5 arasında olduğu saptandı. Tüm örneklerin Bristol dışkı skorları Tablo 4.2.1.'de verilmiştir.

Tablo 4.2.1. Bristol skorlama sonuçları

Bristol Skoru	Hasta Grubu (n=20)	Kontrol Grubu (n=20)
Tip1	-	-
Tip2	4	2
Tip3	4	4
Tip4	7	7
Tip5	3	5
Tip6	1	1
Tip7	1	1

4.3. Gaita pH Sonuçları

Hepatit B aşısına antikor yanıtı oluşturmamayan hasta grubu ile antikor oluşturan kontrol grubunun gaita pH ları karşılaştırıldığında; hasta grubunun grubun gaita pH

ortalamlarının kontrol grubun ortalamasına göre daha yüksek olduğu görüldü. İki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı idi ($p < 0.05$).

Her iki grubun da gaita pH ortalamaları Tablo 4.3.1’de verilmiştir.

Tablo 4.3.1. Gaita pH ortalamaları

pH	Hasta Grubu (n=20)	Kontrol Grubu (n=20)	p
	6.2	5.94	0.001*

*: $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı. Mann-Whitney U test.

4.4. Beslenme Şekilleri

Çalışmaya katılan tüm gönüllülere beslenme alışkanlıkları sorulmuştur. Hepatit B aşısına antikor yanıtı oluşturmeyan hasta grubundaki hastaların %40’ı (8/20) daha çok sebze ağırlıklı, %10’u (2/20) hayvansal protein ağırlıklı, %10’u (2/20) karbonhidrat ağırlıklı, %40’ı (8/20) ise karışık beslenme alışkanlığına sahiptir. Sağlıklı gönüllülerin ise %30’u (6/20) sebze ağırlıklı, %25’i (5/20) hayvansal protein ağırlıklı, %25’i (5/20) karbonhidrat ağırlıklı, %20’sinin (4/20) ise karışık beslenme alışkanlığı ile beslendiği tespit edilmiştir. Sonuçlar tablo 4.4.1.’de verilmiştir.

Tablo 4.4.1. Çalışma kapsamındaki kişilerin beslenme şekilleri

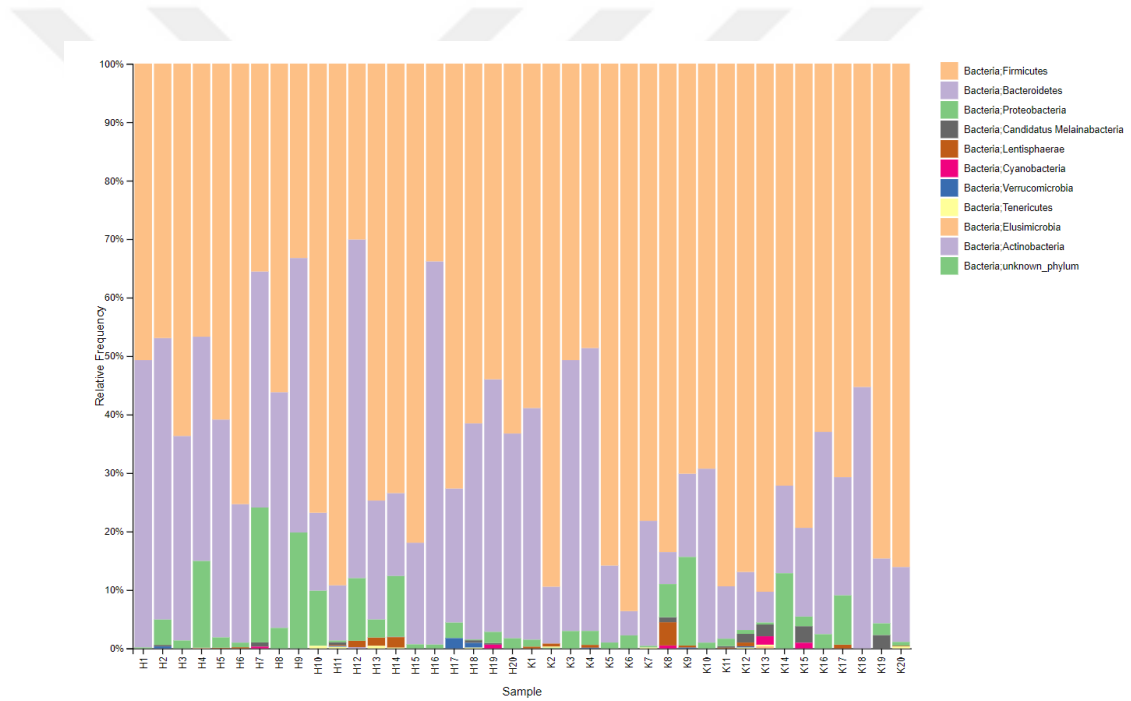
Beslenme Şekli	Hasta Grubu (n=20)		Kontrol Grubu(n=20)	
	N	%	N	%
Karbonhidrat ağırlıklı	2	10	5	25
Protein ağırlıklı	2	10	5	25
Sebze ağırlıklı	8	40	8	40
Karışık beslenme	8	40	4	20

4.5. Biyoinformatik Ve İstatistiksel Analizler

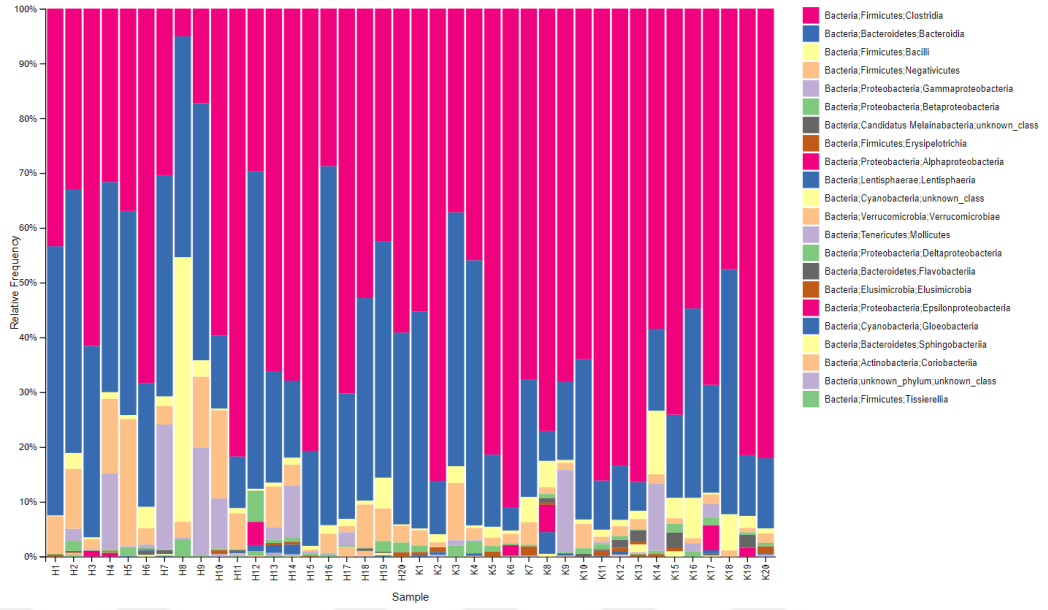
4.5.1. *Firmucites/Bacteroidetes* oranı ve göreceli bolluk verileri

Firmucites/Bacteroidetes oranının sağlıklı kontrol grubuna göre hasta grubunda daha düşük olduğu saptandı (Hepatit B aşısına antikor oluşturmayan hasta grubunda 1.31, kontrol grubunda 3.28).

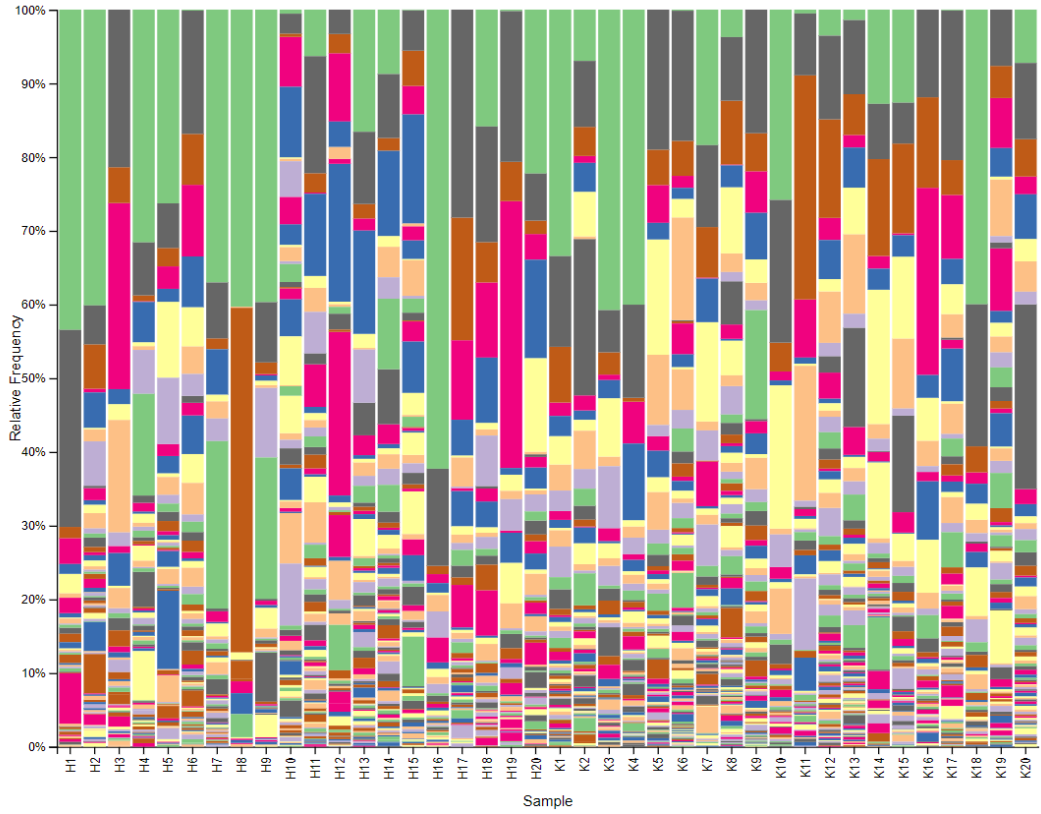
Hasta ve kontrol grubunun gaita numunelerinden saflaştırılan DNA örnekleri, konsensüs primerler ile 16s rDNA PCR ve sonrasında sekans analizi işlemlerine tabi tutulmuştur. Dizileme sonuçlarının biyoinformatik analizleri neticesinde filum, sınıf, cins ve tür bazında elde edilen sonuçlar sırasıyla Şekil 4.5.1.1.- 4.5.1.2.- 4.5.1.3.- 4.5.1.4’de verilmiştir. Kontrol grubu sağlıklı gönüllüler (K) ve hasta grubu ise (H) x ekseninde etiketlenmiş ve her grup için y ekseninde göreceli operasyonel taksonomik birim (OTU) bolluğu olarak ifade edilmiştir.



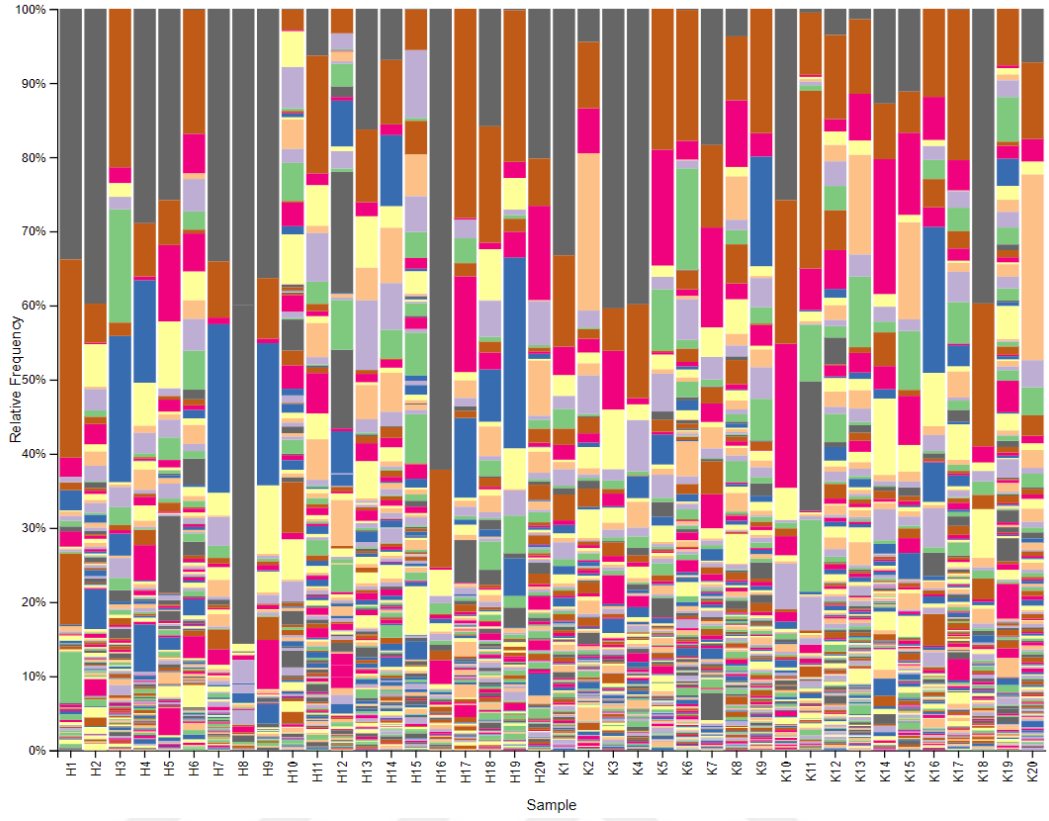
Şekil 4.5.1.1. Filum düzeyinde elde edilen sekans analiz sonuçları (H: hasta grubu, K: kontrol grubu)



Şekil 4.5.1.2. Sınıf düzeyinde sekans analiz sonuçları(H: hasta grubu, K: kontrol grubu)



Şekil 4.5.1.3. Cins düzeyinde sekans analiz sonuçları (H: hasta grubu, K: kontrol grubu)

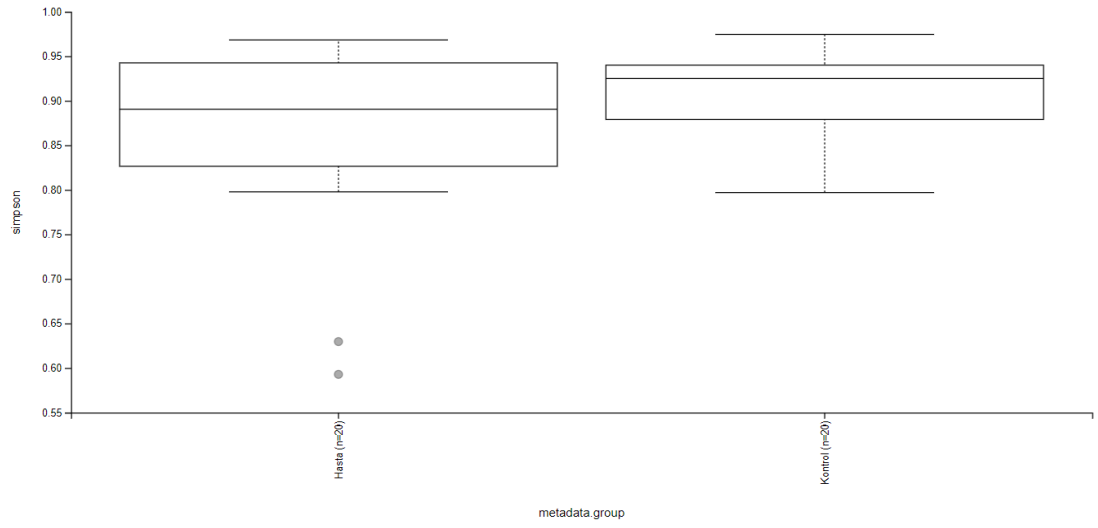


Şekil 4.5.1.4. Tür düzeyinde sekans analiz sonuçları (H: hasta grubu, K: kontrol grubu)

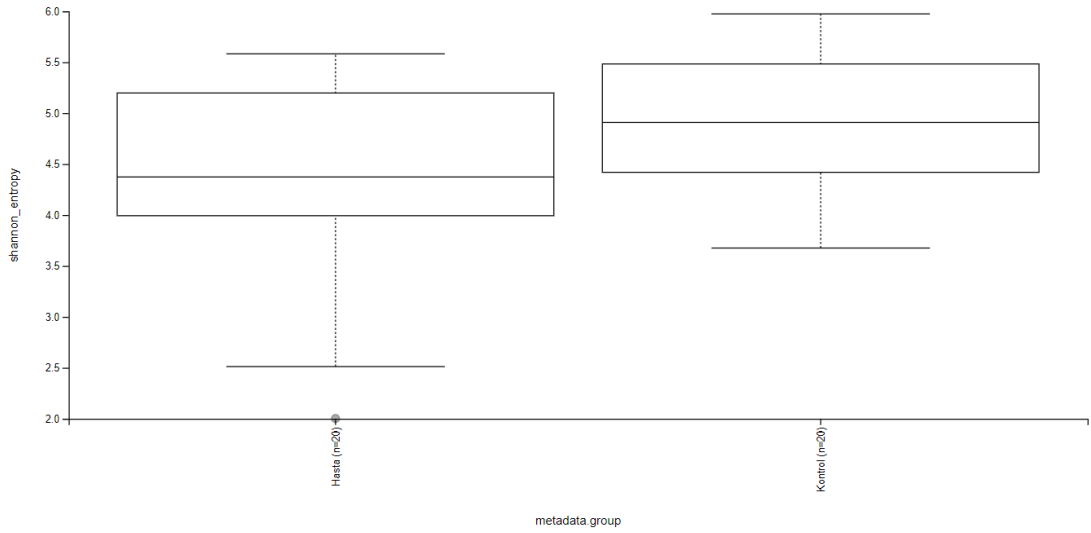
4.5.2 Alfa çeşitlilik analiz sonuçları

Shannon ve Simpson analizlerinde alfa çeşitlilik açısından hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı bir fark bulunmadı (sırasıyla $p=0.223$, $p=0.417$). Ancak Shannon analizi sonucunda kontrol grubunda filogenetik çeşitliliğin (mikrobiyal bolluğun) hasta grubuna göre daha fazla olduğu gözlemlendi (Şekil 4.5.2.1- 4.5.2.2.).

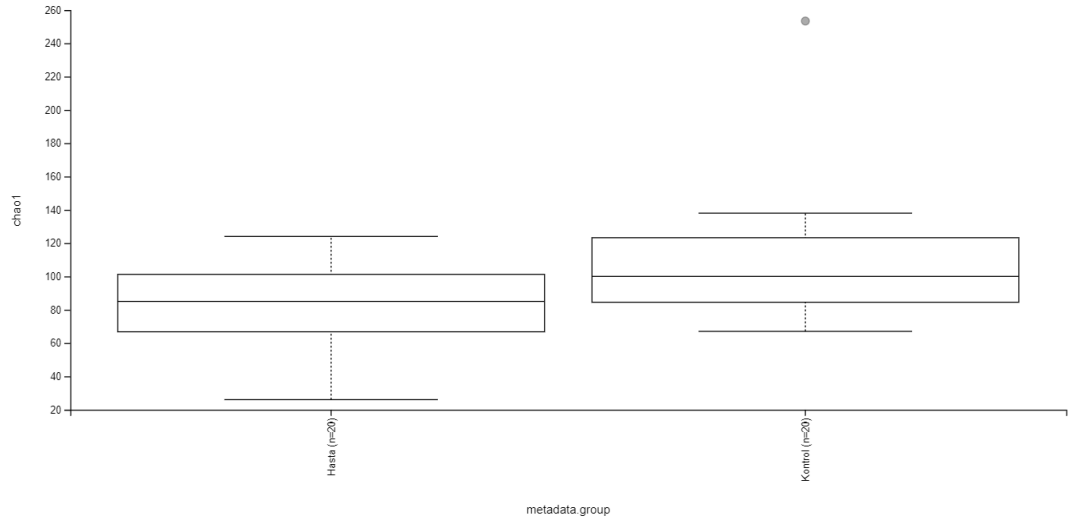
Chao 1 analizinde ise hasta ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu saptanmıştır ($p=0.0359$). Chao 1 analizine göre kontrol grubunda anlamlı oranda alfa çeşitlilik düzeyi daha yüksek bulundu (Şekil 4.5.2.3.).



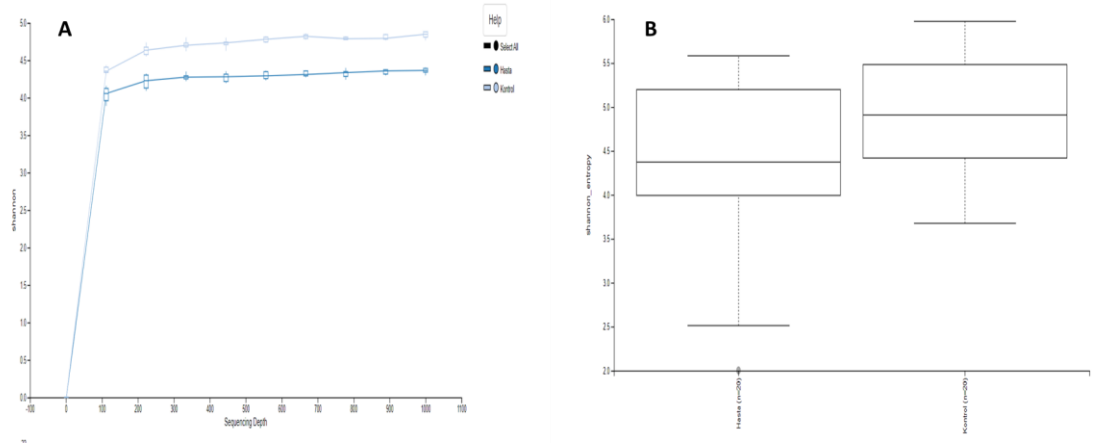
Şekil 4.5.2.1. Simpson indeksi analizine göre alfa çeşitlilik sonuçları (Hasta ve kontrol grubunda)



Şekil 4.5.2.2. Shannon indeksi analizine göre alfa çeşitlilik sonuçları (Hasta ve kontrol grubunda)



Şekil 4.5.2.3. Chao 1 indeksi analizine göre alfa çeşitlilik sonuçları (Hasta ve kontrol grubunda)

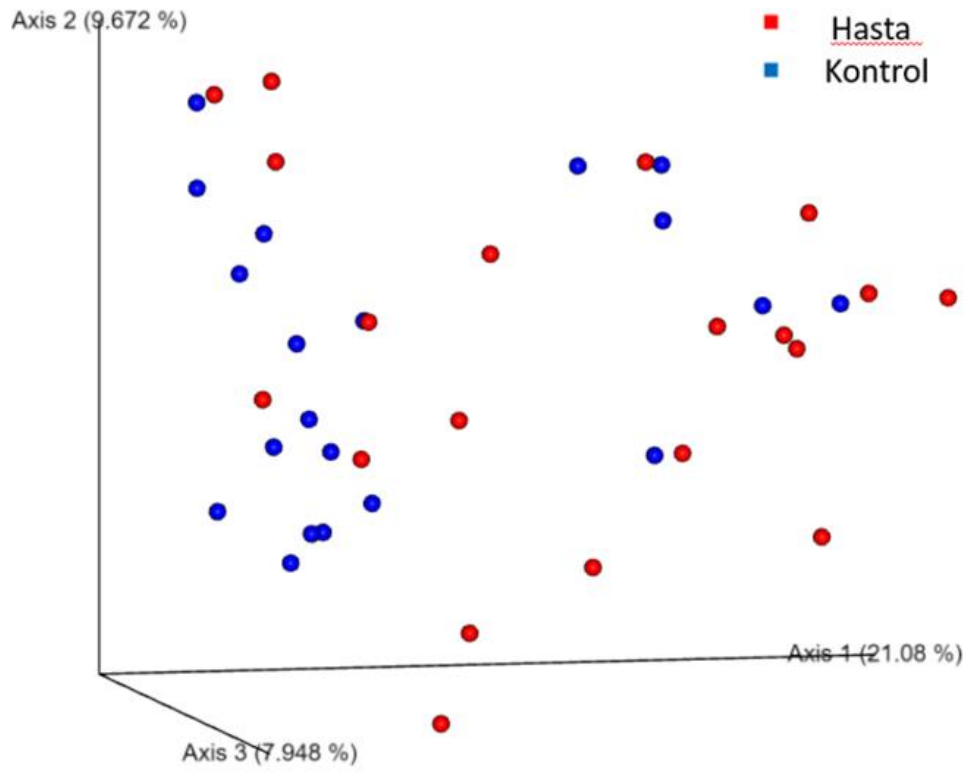


Şekil 4.5.2.4 Shannon indeksi analizine göre hasta ve kontrol grubunun alfa çeşitlilik sonuçları (A: rarefaction grafiği B: boxplots grafiği)

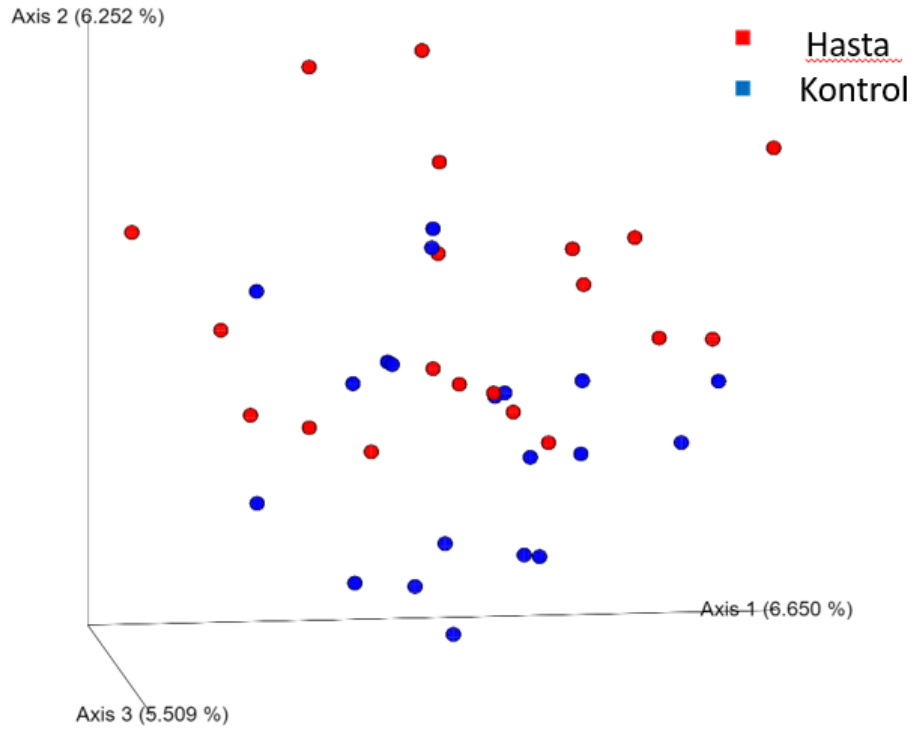
4.4.3 Beta çeşitlilik analiz sonuçları

Bray-Curtis beta çeşitlilik analizinde iki grup arasında anlamlı farklılık saptanmıştır. PC 1 (Axis 1) maksimum varyasyon oranı: %21.08, PC 2 (Axis 2) varyasyon oranı 9.67 olarak saptanmıştır (Şekil 4.4.3.1.).

Jaccard beta çeşitlilik analizinde iki grup arasında anlamlı farklılık saptanmıştır. PC 1 (Axis 1) maksimum varyasyon oranı: %6.65, PC 2 (Axis 2) varyasyon oranı 6.25 olarak saptanmıştır (Şekil 4.4.3.2.).



Şekil 4.4.3.1. Beta çeşitlilikte Bray curtis analizi



Şekil 4.4.3.2. Beta çeşitlilikte Jaccard analizi

4.4.4 LDA ve Lefse analizleri

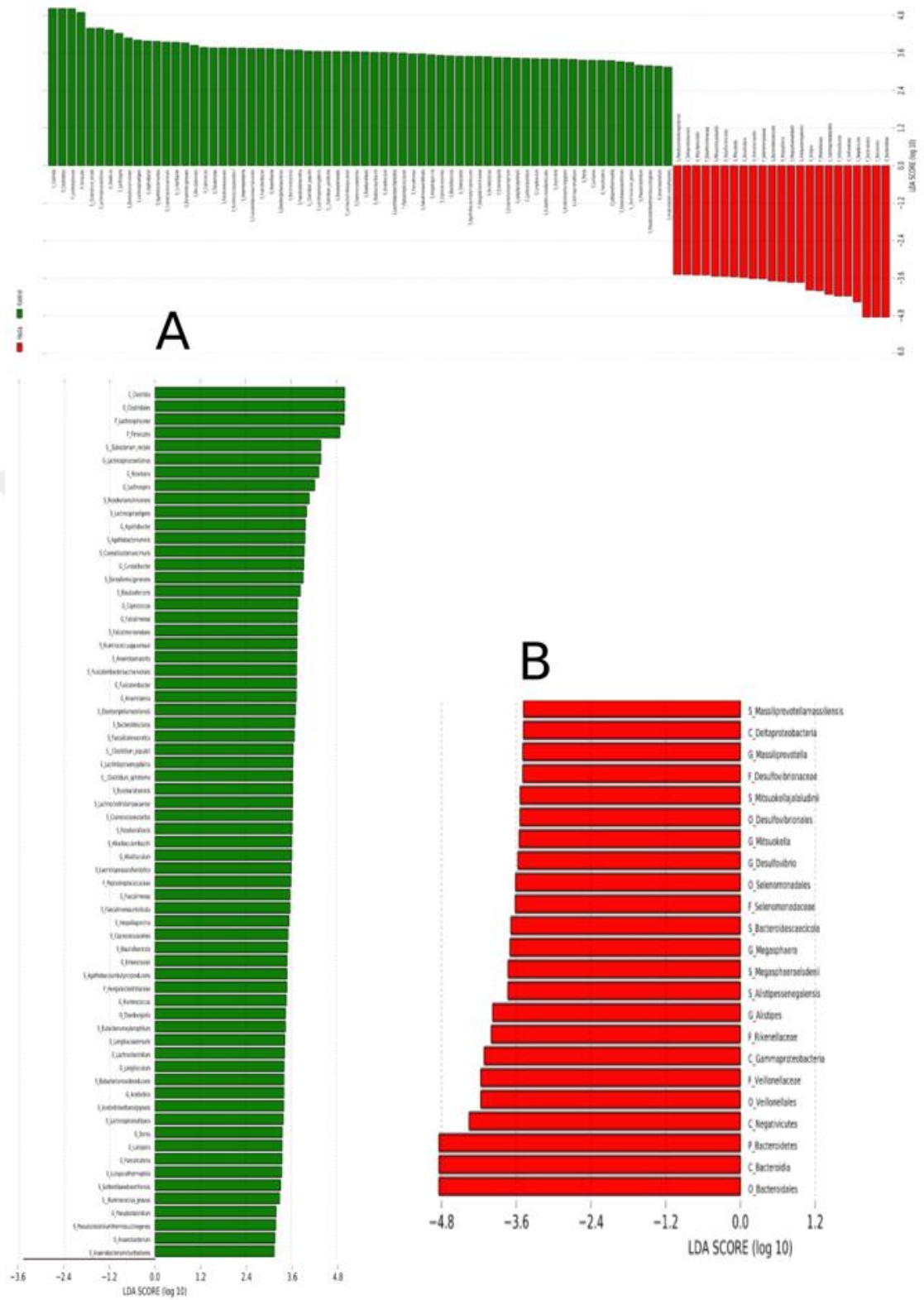
LDA/Lefse analizleri sonucunda hasta grubunda filum düzeyinde; *Bacteroidetes* sınıf düzeyinde; *Deltaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Bacteroidia*, *Negativicutes* takım düzeyinde; *Desulfovibrionales*, *Selenomonadales*, *Veillonellales*, *Bacteroidales* aile düzeyine; *Desulfovibrionaceae*, *Selenomonadaceae*, *Rikenellaceae*, *Veillonellaceae* cins düzeyinde; *Massiliprevotella*, *Mitsuokella*, *Desulfovibrio*, *Megasphaera*, *Alistipes* tür düzeyinde; *Massiliprevotella massiliensis*, *Mitsuokella ajalaludinii*, *Bacteroides caecicola*, *Megasphaera elsdenii*, *Alistipes senegalensis* daha yüksek oranda bulunmuştur ($p < 0.05$ ve LDA skoru > 2).

Kontrol grubunda ise filum düzeyinde; *Firmicutes* sınıf düzeyinde; *Clostridia* takım düzeyinde; *Clostridiales* aile düzeyinde; *Lachnospiraceae*, *Peptostreptococcaceae*, *Hungatei clostridiaceae* cins düzeyinde; *Lachnospiraceae*, *Roseburia*, *Lachnospira*, *Agathobacter*, *Coprococcus*, *Falcatimonas*, *Fusicatenibacter*, *Anaerotaenia*,

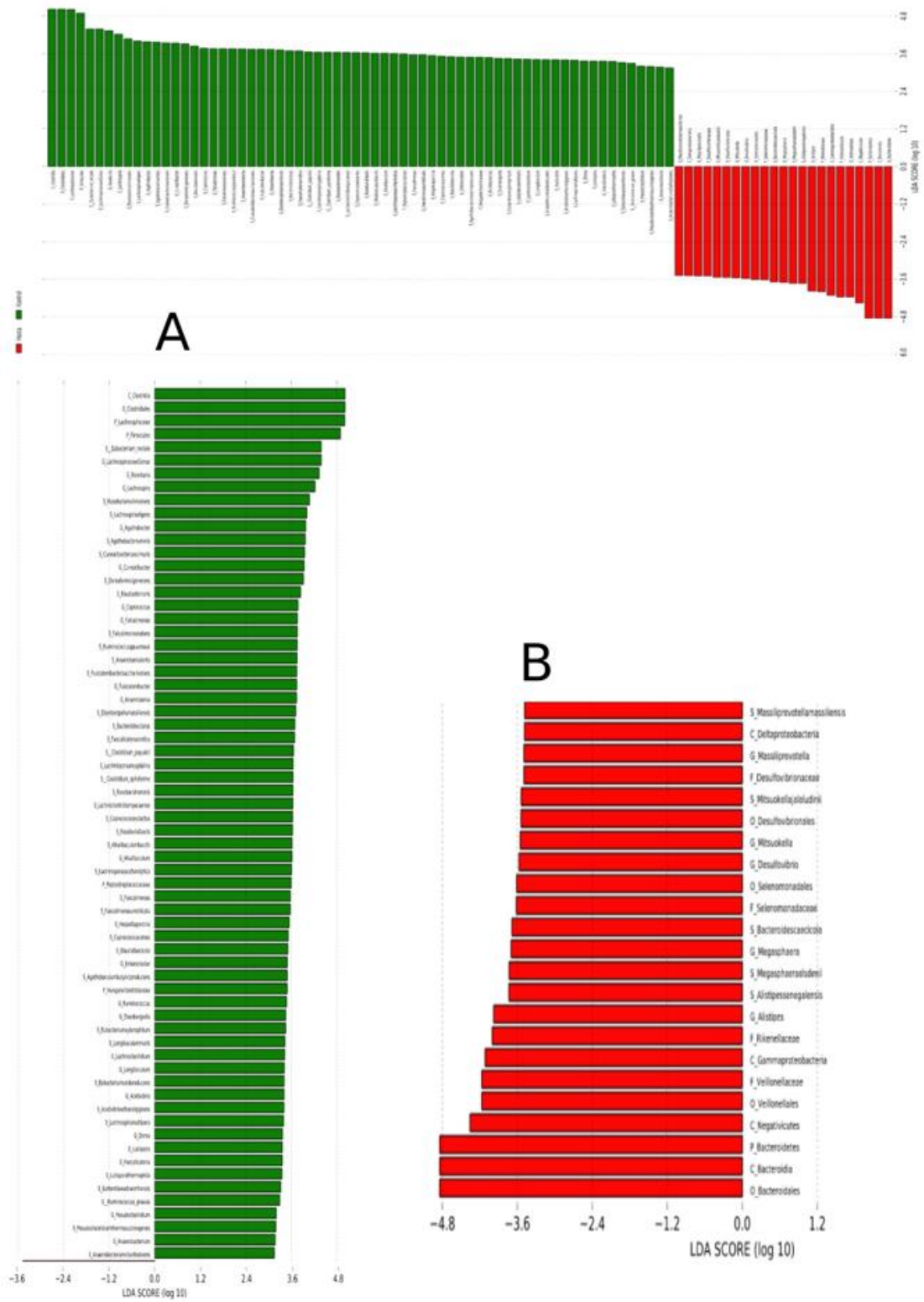
Alkalibaculum, *Faecalimonas*, *Enterocloster*, *Ruminococcus*, *Lachnoclostridium*, *Longibaculum*, *Acetivibrio*, *Dorea*, *Lutispora*, *Faecalicatena*, *Pseudoclostridium*, *Anabacterium* tür düzeyinde; *Eubacterium rectale*, *Roseburia inulinivorans*, *Lachnospira eligens*, *Agathobacter ruminis*, *Cuneatibacter caecimuris*, *Dorea formicigenerans*, *Blautiaster coris*, *Falcatimonas natans*, *Ruminococcus gauvreauii*, *Anaerotaenia torta*, *Fusicatenibacter saccharivorans*, *Eisenbergiella massiliensis*, *Bacteroides clarus*, *Faecalica tenaorotica*, *Clostridium populeti*, *Lacrimispora amygdalina*, *Clostridium spiroforme*, *Roseburia hominis*, *Lachnoclostridium pacaense*, *Coprococcus eutactus*, *Roseburia faecis*, *Alkalibaculum bacchi*, *Lacrimispora saccharolytica*, *Faecalimonasum bilicata*, *Hespellia porcina*, *Coprococcus comes*, *Blautia faecicola*, *Agathobaculum butyriciproducens*, *Eubacterium xylanophilum*, *Longibaculum muris*, *Eubacterium oxidoreducens*, *Acetivibrio ethanoligignens*, *Lachnospira multipara*, *Luthispora thermophila*, *Sutterella wadsworthensis*, *Ruminococcus gnavus*, *Pseudoclostridium thermosuccinogenes*, *Anabacterium chartisolvans* daha yüksek oranda görülmüştür ($p<0.05$ ve LDA skoru >2).

Hasta grubunda sınıf düzeyinde; *Deltaproteobacteria*, takım düzeyinde; *Selenomonadales* cins düzeyinde; *Megasphaera*, tür düzeylerinde ise *Massilliprevototella massiliensis*, *Mitsuokella ajalaludinii* ve *Alistipes senegalensis* bakterileri yüksek oranda bulunmuştur ($p<0.05$ ve LDA skoru >2). Ancak bu bakteriler kontrol grubunda sadece 1 hastada bulundukları için bu bakteriler yorumlama yapılırken değerlendirme dışı bırakılmıştır.

Hasta ve sağlıklı grupta yüksek oranda bulunan taksonlarla ilgili örnek analiz sonuçları Şekil 4.4.4.1. ve 4.4.4.2.'de sunulmuştur.



Şekil 4.4.4.1. Filum düzeyinde LDA/Lefse analiz grafikleri (A: kontrol grubu B: hasta grubu)

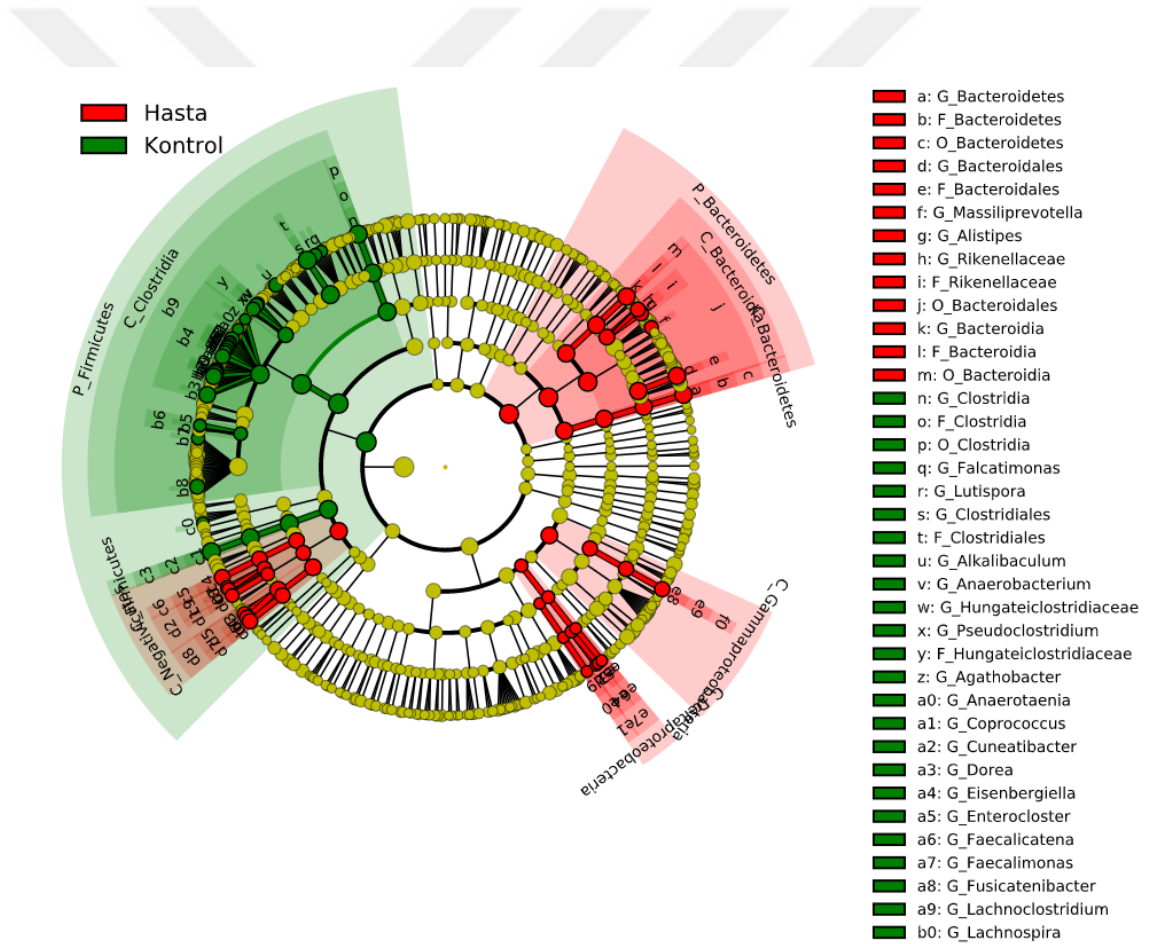


Şekil 4.4.4.2. Cins düzeyinde LDA/Lefse analiz grafikleri (A: kontrol grubu B: hasta grubu)

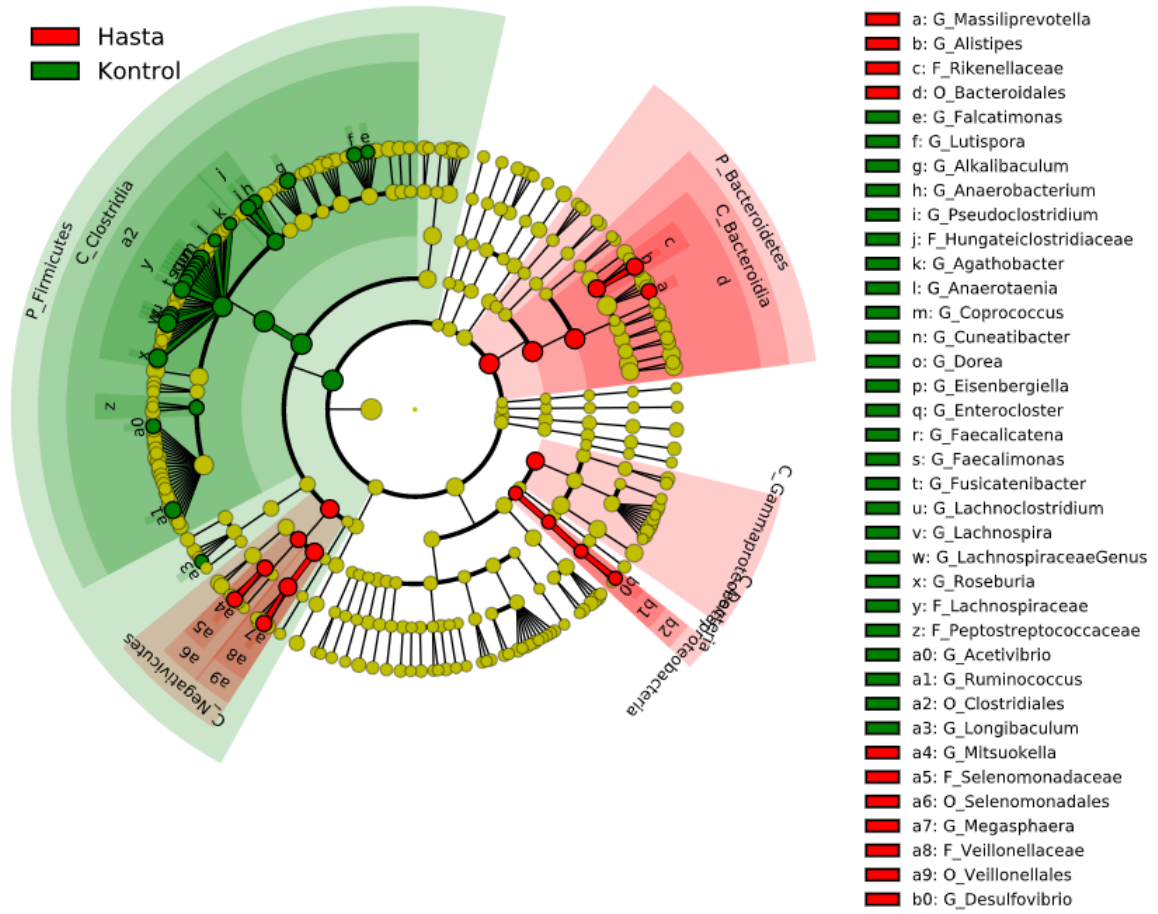
4.4.5. Klodogram analizleri

Hasta grubunda filum düzeyinde; *Bacteroidetes* sınıf düzeyinde; *Gammaproteobacteria*, *Bacteroidia*, *Negativicutes* takım düzeyinde; *Selenomonadales*, *Veillonellales*, *Bacteroidales* aile düzeyine; *Selenomonadaceae*, *Rikenellaceae*, *Veillonellaceae* cins düzeyinde; *Massiliprevotella*, *Alistipes* daha yüksek oranda bulunmaktır.

Kontrol grubunda ise; filum düzeyinde; *Firmucutes* sınıf düzeyinde; *Clostridia* takım düzeyinde; *Clostridiales* aile düzeyinde; *Lachnospiraceae*, *Peptostreptococcaceae*, *Hungateiclostridiaceae* daha yüksek oranda bulunmuştur.



Şekil 4.4.5.1. Filum düzeyinde Klodogram analizi



Şekil 4.4.5.2. Cins düzeyinde Klodogram analizi

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Yeni nesil sekans sistemlerinin gelişmesi ile birlikte insan mikrobiyotasına yönelik araştırmalar artmış ve mikrobiyotanın fonksiyonları hakkında daha detaylı bilgi sahibi olunmuştur. Son 15 yılda yapılan çalışmalarla çok sayıda hastalığın ve sağlık durumunun mikrobiyota bileşiminden önemli oranda etkilendiği ortaya konulmuştur. Bağırsak, içeriğinde bulunan bakteriler ve konak etkileşiminin en yoğun olduğu vücut bölgelerinden biridir. Bu nedenle çok sayıda sistemik, otoimmün, nörolojik ve metabolik hastalığın bağırsak mikrobiyotası kompozisyonu ile ilişkili olduğu çok sayıda çalışmada rapor edilmiştir (Icaza-Chávez, 2013). Bağırsak mikrobiyomu, bağışıklık sisteminin gelişiminde ve düzenlenmesinde de çok önemli bir rol oynar. Ancak, mikrobiyota immün sistem ilişkisini inceleyen yayın sayısı oldukça azdır. Mikrobiyotanın insanlarda uygulanan aşılar karşı alınan immün yanıtı nasıl etkilediğine dair literatürde sadece birkaç (08.02.2022 tarihi itibarıyla 5 çalışmaya ulaşılabilmektedir) çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmaların 3'ü infantlara uygulanan oral aşılarda, biri infantlara uygulanan intramusküler aşılarla birisi de yetişkinlere uygulanan oral aşılarla ilgilidir. Mevcut çalışmalara bakıldığında erişkinlerde intramusküler uygulanan aşılar ve mikrobiyom ilişkisinin araştırıldığı hiçbir çalışma olmadığı görülmüştür. Bu tez çalışmasında Hepatit B uygulanmasına rağmen anti-HBs yanıtı oluşmayan hastalar ile sağlıklı gönüllülerden oluşan kontrol grubunun bağırsak mikrobiyom analizleri yapılarak aşı cevabında bağırsak mikrobiyotasının rolünün ortaya konulması amaçlanmıştır.

Aşılar karşı bağışıklık tepkisinde bireyler arasında önemli farklılıklar vardır. Örneğin, Hepatit B aşısına verilen serolojik yanıt bebek yedi aylık olana dek 100 kattan fazla değişir ve bazı bebeklerde ölçülebilir seviyede antikor bulunmaz. Benzer şekilde, altı aylıkken pnömokok ve Hib aşısına verilen yanıt 40 kata kadar değişmektedir. Bu değişikliğin hem koruyucu etkinlik hem de koruma süresi üzerinde etkileri vardır. İnsan bağışıklık sisteminin olgunlaşması ve uyaranlara (doğal ya da edinilmiş aşı ile olduğu gibi) yanıt verebilmesi bir süreç gerektirir ve bu

süreci etkileyen çok sayıda faktör vardır. Yaş, cinsiyet, genetik, coğrafi konum, aşının uygulama şekli (oral, parenteral), aşı tipi, uygulanan günün saati ve birlikte uygulanan aşılar, çinko eksikliği ve avitaminozlar (A vitamini, D vitamini) gibi yetersiz beslenme, bağırsaklardaki gelişen bazı enfeksiyonlar, bebeğin immunitésinin etkin düzeyde olgunlaşmamış olması (özellikle prematür doğumlarda), metabolik hastalıklar, annede mikroplara özgü antikorlar (plasenta veya anne sütü yoluyla bulaşan), belirli patojenlere önceden maruz kalmanın neden olduğu bağırsak Ig A ve konakçıya özgü genetik faktörler gibi bir insanının bağışıklık sistemi ile bağırsak mikrobiyomu arasındaki etkileşimi etkileyen birçok faktör vardır (Desselberger, 2018). Bağırsak mikrobiyomu, doğal enfeksiyon veya aşılamaaya karşı bağışıklık tepkisini etkilediği kabul edilen karmaşık bir faktör grubunun yalnızca bir bileşenidir. Ancak, henüz yeterli veri olmasa da mevcut birkaç çalışma ve mikrobiyota ile immünolojik sistem ilişkisi düşünüldüğünde; bağırsak mikrobiyota kompozisyonunun aşı yanıtlarını tahmin edilenden daha fazla etkilediği muhtemeldir. (Desselberger, 2017; Parker ve ark., 2018).

Literatürde yer alan mikrobiyom ve aşı cevabının ilişkisinin incelendiği çalışmalarda genellikle Bristol dışkı skorlaması yapılmamıştır. Bizim çalışmamızda hasta ve kontrol grubunun Bristol dışkı skorlaması yönünden benzer olduğu saptanmıştır (Tablo 4.2.1.). Bristol dışkı skorlaması bağırsak pasaj geçiş süresini doğrudan yansıttığından mikrobiyom çalışmalarında muhakkak değerlendirilmesi gereken bir parametredir olup, mikrobiyom araştırmalarında yapılmaması önemli bir eksiklikdir.

Gaita pH değerleri de bağırsak içeriği hakkında önemli ipuçları vermektedir. Literatürde yer alan az sayıdaki mikrobiyom ve aşı cevabının ilişkisinin incelendiği çalışmalarda gaita pH'sının ölçümünün yapılmadığı görülmüştür. Bu çalışmada hasta ve kontrol grubunun gaita pH değerleri arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı idi (p değeri:0.001 ve Tablo 4.3.1.).

Mikrobiyom ve aşı cevabı ilişkisinin incelendiği çalışmalarda genellikle beslenme şekli alışkanlıkları değerlendirmeye alınmamıştır. Bu çalışmada hasta ve kontrol grubu beslenme alışkanlıkları yönünden değerlendirilmiş ve benzer bulunmuştur (Tablo 4.4.1.).

Literatürdeki birçok çalışmadan bildiğimiz üzere, artan vücut kitle indeksi (VKI) ile *Firmicutes* içeriği kademeli olarak artarken *Bacteroidetes* içeriği azalmaktadır. F/B oranındaki artış BMI yüksekliği ile doğru orantılıdır. Ayrıca kilo kaybı ile F/B oranı azalmaktadır (Koliada ve ark., 2017; Mathur ve Barlow, 2015; Sweeney ve Morton, 2013). F/B oranı ve CRP düzeyleri arasında da doğrusal bir ilişki olduğuna dair çalışmalar mevcuttur. Obezite ile artan yağ dokusu ve yağ dokusunda artan IL-6 ekspresyonu ve bunun periferik dolaşıma salınması ile CRP düzeyi F/B oranı arasındaki ilişki açıklanmaya çalışılmıştır. Kantitatif PCR (qPCR) ile yapılan yaş ile değişen F/B oranının araştırıldığı başka bir çalışmada, F/B oranının doğumdan yetişkinliğe kadar bir artış gösterdiği ve ileri yaşla birlikte daha da değiştiği yönündedir. Yetişkin dönem ile bebeklik dönemi F/B oranları arasında yetişkinlik dönemi lehine anlamlı bir farklılık vardır. Yaşlılık döneminde ise yaşamın erken dönemlerine benzer şekilde F/B oranı düşüktür (Mariat ve ark., 2009).

Sağlıklı kadınların (n=53) dışkı örneğinden yapılan 16 rDNA aracılı mikrobiyom çeşitliliği incelenmesinde dışkının kıvamını değerlendirmede kullanılan Bristol dışkı skalası ile F/B oranı arasında doğrusal bir ilişki olduğu bildirilmiştir. Gözlenen mikrobiyal çeşitlilik dışkı sertliği ile yani Bristol dışkı skorlamasının azalması ile önemli ölçüde azalır (Vandeputte, 2016).

Bu tez çalışmasında *Firmicutes/Bacteroidetes* oranının sağlıklı kontrol grubuna göre hasta grubunda daha düşük olduğu saptandı (hasta grubunda 1.31, kontrol grubunda 3.28). Aşı cevabı ile mikrobiyota arasındaki ilişkinin araştırıldığı mevcut az sayıda çalışmada F/B oranı ile ilgili veri bulunamamıştır. Ancak bu konudaki birkaç çalışmadan biri olan Ghana'da yapılan ve bebeklerde oral rotavirüs aşısına cevapta bağırsak mikroyotasının etkisini değerlendiren araştırmada *Bacteroidetes* filumu oranının düşük olduğu bireylerde Rotavirus aşısına karşı daha yüksek antikor cevabı olduğu bildirmiştir (Harris ve ark., 2017). Bu bulgu ile çalışmamızda elde edilen hasta grubundaki düşük F/B oranı uyumludur. Diğer bir ifade ile kontrol grubunda *Bacteroidetes* filumu oranı daha düşüktür.

Literatürde bulunan bu konudaki az sayıda çalışmadan biri olan Ghana'daki bebeklerin oral Rotavirus aşına bağışıklık cevabı ile bağırsak mikrobiyotasının ilişkisini araştıran araştırmada yapılan Shannon indeksine (alfa çeşitlilik analizi) göre oral Rotavirus aşısına cevap veren ve vermeyen grup arasında anlamlı bir fark

bulunmadığı bildirilmiştir (Harris ve ark., 2017). Ancak bu çalışmanın infantlar (6 haftalık) üzerinde yapıldığı göz ardı edilmemelidir. Bundan dolayı elde edilen bulguların genele yansıtılamayacağı aşıkardır. Nikaragua’da 5 yaşından küçük çocuklar üzerinde yapılan yine oral Rotavirus aşısına cevapta bağırsak mikrobiyomunun etkisinin incelendiği araştırmada aşıya yanıt veren ve vermeyen gruplar arasında Shannon indeksine (alfa çeşitlilik analizi) göre oral Rotavirus aşısına cevap veren ve vermeyen grup arasında anlamlı bir fark bulunmadığı bildirilmiştir (Fix ve ark., 2020). İnfluenza A aşısına yanıtta bağırsak mikrobiyotasının etkisinin araştırıldığı domuzlarda yapılan bir çalışmada İnfluenzaya özgü Ig G düzeyi ile bağırsak mikrobiyotası ilişkisi incelenmiştir. Aşılanmış (n=89) ve aşılanmamış (n=29) hayvanların dışkı mikrobiyotasının çeşitliliği farklı zaman aralıklarında alfa ve beta çeşitlilik analizleri ile değerlendirilmiş ve (alfa çeşitliliği: tümü nominal p) alfa çeşitlilik ve beta çeşitlilik açısından gruplar arasında anlamlı bir fark olmadığını sonucuna varılmıştır.

Steroid tedavisi görmemiş otoimmün hepatitli hastalar ile sağlıklı kontrollerin bağırsak mikrobiyota içeriklerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada, otoimmün hepatitli hastaların daha düşük alfa çeşitliliğe (Shannon indeksi $p<0.01$) sahip olduğu belirtilmiştir. (Wei ve ark., 2020).

Çalışmamızda iki farklı istatistiksel analiz yönteminde (Shannon ve Simpson) hasta ve kontrol grubu arasında alfa çeşitlilik açısından anlamlı bir fark saptanmadı (Şekil 5.5.2.1.- 5.5.2.2.). Ancak, diğer bir istatistiksel method olan Chao 1 analizinde, kontrol grubunda anlamlı oranda alfa çeşitlilik düzeyi daha yüksek bulunmuştur (Şekil 5.5.2.3.). Ayrıca Shannon analizi sonucunda iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmasa da; kontrol grubunda filogenetik çeşitliliğin (mikrobiyal bolluğun) hasta grubuna göre daha fazla olduğu tespit edilmiştir (Şekil 5.5.2.4.). Bu tez çalışmasında filogenetik çeşitliliğin kontrol grubunda daha fazla olmasının aşı cevabında etkili olabileceği çıkarımı yapılabilir.

Bu çalışmadaki Bray-Curtis ve Jaccard beta çeşitlilik analizleri sonucunda hasta grubu ile kontrol grubu arasında anlamlı fark olduğu saptanmıştır (Bray-Curtis PC1: %21.08, Jaccard PC1 :%6.65). Literatürde bulunan çalışmalarda beta çeşitlilik verileri sunulmamıştır. Bu çalışmada alfa çeşitlilik verilerinin de bir yansıması olarak kontrol grubunda bulunup hasta grubunda bulunmayan mikroorganizma çeşitliliğinin

anlamli oranda daha fazla olduğu saptanmıştır. Aşıya alınan yanıtta kontrol grubunda bulunup hasta grubunda bulunmayan mikroorganizma çeşitliliğinin rolü olabileceği söylenebilir.

Bağırsak mikrobiyotası ve bağışıklık tepkisinin gelişimi, yapılmış birçok çalışmada ortaya konulmuş ve birbirine bağımlı olarak kabul edilmiştir (Huang ve ark., 2018; Kandasamy ve ark., 2014; Planya ve ark., Twitchell ve ark., 2016; Vlasova ve ark., 2013; Zhang ve ark., 2008; Zhang ve ark., 2014). Ayrıca bağırsak mikrobiyotası ile insanlardaki immünolojik mekanizmalar arasındaki ilişkiyi inceleyen bir derleme yazısında; düşük gelirli ölkelerdeki çocuklarda oral aşı yanıtları, muhtemelen bağırsak disbiyozunun bir sonucu olarak düşük olduğu görüşü önce sürölmüştür (Desselberger,2017; Parker, 2018). Bağırsak mikrobiyom kompozisyonu aşı etkinliğini artırıcı ya da azaltıcı etkilere neden olabilecek bazı potansiyel mekanizmalara sahiptir. Bu potansiyel mekanizmaların anlaşılmasına ihtiyaç vardır (Van de Guchte ve ark., 2018). Elimizde henüz bu konuda yeterli veri bulunmadığı için kesin çıkarımlar yapılamaz.

Literatürde konuya yönelik birkaç çalışmadan birinde; Bangladeşte 48 infant üzerinde oral Poliovirus, intradermal BCG, intramusköler tetanoz ve Hepatit B aşıları uygulanıp aşı cevabı ve bağırsak mikrobiyom ierđi arasındaki ilişki araştırılmıştır. Araştırmada bebeklerden 6, 11 ve 15. haftalarda toplanan fekal örnekler ile yapılan bağırsak mikrobiyom analizlerinde cins düzeyinde *Bifidobacterium*, filum düzeyinde *Actinobacteria*'nın yüksek oranda olması aşılara (BCG, tetanoz toksoidi, oral çocuk felci aşısı, Hepatit B aşısı) olumlu bağışıklık tepkileri ile ilişkilendirilmiştir. Bunun aksine takım düzeyinde Clostridiales, Enterobacteriales ve Pseudomonadales'in yüksek bolluğu ise daha düşük aşı tepkileri ile ilişkilendirilmiştir (Hüda ve ark., 2014).

Fransa'da 2004 yılında 20 bebeğe uygulanan beşli aşı (Difteri-Tetanoz-aselöler Boğmaca-inaktive edilmiş Polio- *Haemophilus influenzae* tip b) öncesinde ve sonrasında 4, 8,12 ve 16. haftalarda fekal örnekler alınmıştır. Fekal örneklerden multipleks PCR ile *Bifidobacterium longum subspecies Bifidobacterium infantis* alışılmış ve fekal Polio spesifik Ig A düzeyleri ile arasındaki ilişki incelenmiştir. Daha yüksek Polio spesifik Ig A düzeylerine sahip bebeklerin aynı zamanda bağırsak

mikrobiyotasında daha yüksek *Bifidobacterium longum subspecies Bifidobacterium infantis* olan bebekler olduğu bildirilmiştir.

Ghana'da 2017 yılında 78 infantta yapılan oral rotavirüs aşısına (RVV, Rotarix) yanıt verenler ve yanıt vermeyenler, yaşları uyumlu sağlıklı kontrol grubu olarak Hollandalı infantlarla karşılaştırılmıştır. Bebek bağırsak mikrobiyomunun bileşimi ile Gana'daki çocuklarda RV aşısına verilen yanıt arasında anlamlı bir ilişki bulunmuştur. RVV'ye yanıtın yüksek olması, *Streptococcus bovis* oranının yüksek *Bacteroidetes* oranın düşük olması ile ilişkili bulunmuştur. Aşıya yüksek yanıt verenlerde *Streptococcus gallolyticus*, *Streptococcus bovis*, *Clostridium XI* ve *Proteobacteria (Serratia , E. coli)*'nın daha yüksek oranda olduğu gözlemlenmiştir (Harris ve ark., 2018). Bağırsak mikrobiyom kompozisyonları incelendiğinde Rotavirüs aşısına yanıt vermeyenlerde yüksek konsantrasyonlarda *Bacteroidetes spp.*, yanıt verenlerde daha yüksek konsantrasyonlarda *Fusobacterium spp.* saptanmıştır. Ayrıca Ghana'lı aşıya iyi yanıt verenlerin mikrobiyom bileşimi, aşıya iyi yanıt veremeyen Ghana'lı bebeklerden daha fazla oranda Hollandalı bebeklerinkine benzer olarak bulunmuştur (Harris ve ark., 2017). Ancak bu çalışmanın 6 haftalık infantlar üzerinde yapıldığı ve mikrobiyom analizlerinde yaygın kullanılmayan bir yöntem olan mikroçip hibridizasyon tekniği ile yapıldığı dikkate alınmalıdır. Bu tez çalışmasında yetişkin yaş grubu incelenmiş olmasına rağmen hasta grubunda *Bacteroidetes* filumu anlamlı oranda daha yüksek bulunmuştur. Bu bulgu Harris ve arkadaşlarının çalışması ile uyumluluk göstermektedir.

Nikaragua'da yapılan bir çalışmada 5 yaşından küçük 50 çocuğun bağırsak mikrobiyota bileşimi ile rotavirüs aşısına cevabın ilişkisi incelenmiştir. Çocuklar Rotavirus aşısını takiben Ig A düzeyleri açısından değerlendirilmiş ve antikor yanıtı verip vermemesine göre iki gruba ayrılarak bağırsak mikrobiyota analizleri yapılmıştır. İki grup arasında alfa ve beta çeşitlilik açısından anlamlı bir fark bulunmadığını rapor etmişlerdir. Bunun yanında aşıya yanıt verenlerde *Fusobacteria* ve *Eggerthella* oranının daha yüksek, yanıt vermeyenlerde ise *Proteobacteria* ve *Enterobacteriaceae* oranının daha yüksek olarak bulunduğunu bildirmişlerdir. Bu makalede ayrıca yüksek gelirli ülkelerde mevcut oral Rotavirus aşılarının oldukça etkili olmasının aksine aynı aşılarda düşük ve orta gelirli ülkelere düşük etkinlikte

olması konusuna dikkat çekilmiştir. Bu durumun bir sebebi olarak bağırsak mikrobiyotasının enterik bağışıklık sistemine etkisi ile aşılama verilen yanıtın değişebileceği düşünülmüştür. Yazarlar sonuç olarak bağırsak mikrobiyom içeriğinin bebeklerde oral Rotavirus aşısına cevapta sınırlı bir etkisi olduğunu bildirmişlerdir. Söz konusu çalışmada oral Rotavirus aşısına cevabın bağırsak mikrobiyomu ile ilişkisinin 5 yaşından küçük çocuklar üzerinde araştırıldığı unutulmamalıdır. Ayrıca bir kısım bakteri taksonlarının analizinde de aile düzeyinin altına inilemediği görülmüştür. Bu çalışmadan elde edilen veriler erişkin yaş grubuna uyarlanmamalıdır.

Yukarıda sıralanan aşı etkinliği ve bağırsak mikrobiyom ilişkisini inceleyen çalışmalar infantlar ve 5 yaşından küçük çocuklar üzerinde yapılmıştır. Bilindiği üzere 3 yaşına kadar olan yaşamın ilk yıllarında insan bağırsak mikrobiyota kompozisyonu stabil değildir (Ficara ve ark., 2020). Kaldı ki çalışmalar biri hariç yenidoğan ve infantlarda yapılmıştır. Yenidoğan ve infantlarda bağırsak mikrobiyota kompozisyonu çok daha değişkendir. Ancak bağırsak mikrobiyotasının temelleri infant dönemde atıldığından kalıcı bağırsak mikrobiyotası bağışıklık sistemi ilişkisi açısından yaşamın ilk dönemleri çok önemlidir (Lynn ve Pulendran, 2018). Dolayısıyla mikrobiyota kompozisyonu açısından henüz gelişim sürecini tamamlamamış infantlar üzerinde yapılan çalışmalarda elde edilen verilerin genellenemeyeceği söylenebilir.

Amerika Birleşik Devletleri'nde 2013 yılında 17 yetişkinde yapılan araştırmada oral *Salmonella Typhi* aşısı ile bağışıklık tepkisi üzerinde bağırsak mikrobiyomunun etkisi araştırılmıştır. Araştırmada aşı uygulanmadan bir hafta önce ve aşı uygulandıktan iki ay sonrasında alınan örnekler ile bağırsak mikrobiyom analizleri yapılmıştır. Çalışmada, *Clostridiales* takımından ağırlıklı olarak *Lachnospiraceae* ve *Ruminococcaceae* familyalarından oluşan bağırsak mikrobiyota kompozisyonuna sahip bireylerin oral *Salmonella* aşısına daha iyi bir antikor yanıtı verdiğini tespit edilmiştir (Eloe-Fadrosh ve ark., 2013).

Literatürde hayvan deneylerinde bağırsak mikrobiyotası ve aşı cevabını inceleyen yayınlar mevcuttur. Domuzlar üzerinde 2021 yılı ortalarında yapılan bir çalışmada İnfluenza A aşısına yanıtta bağırsak mikrobiyotasının etkinliğinin değerlendirilmiştir.

Domuzlara 28 günlükken İnfuenza A aşısı uygulanmış ve sonrasında İnfuenza A virüsüne özgü Ig G seviyeleri ölçülerek bağırsak mikrobiyomu ile ilişkisine bakılmıştır. Fekal örneklerden yapılan 16S rRNA gen dizilimi ile karakterize edilen aşılama öncesi mikrobiyotanın analizi ile daha zengin bir mikrobiyotaya sahip domuz yavrularında daha yüksek bir aşı tepkisi ortaya çıktığını göstermiştir. Çalışmanın sonucunda daha gl bir bağırsaklık tepkisinin, *Ruminococcaceae* familyası, *Bacteroides* ve *Prevotella* cinsinin bolluğu ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. Mikrobiyota kompozisyonunda *Muribaculaceae* familyası, *Helicobacter* ve *Escherichia-Shigella* cinslerinin daha çok bulunmasının ise daha düşük aşı tepkisi ile bağılantılı olduğu görüşü ne srlmştr (Mateos-Hernández ve ark., 2021). Bu hayvan çalışmasında adı geçen bakterilerden *Escherichia-Shigella* cinslerinin daha fazla oranda bulunmasının düşük aşı yanıtı ile ilişkili olduğu vurgulanmıştır. Bunun aksine Harris ve arkadaşlarının çalışmasında infantların bağırsak içerisinde E.coli gibi Enterobacteriaceae ailesinden olan toksijenik bakterilerin fazlalığının olumlu aşı cevabına neden olabileceği görüşü ne srlmştr (Harris ve ark., 2017).

Bağırsak mikrobiyotasının TLR 5 aracılı İnfuenza aşısına antikor tepkisine etkisini araştıran fare deneyi çalışmasında germ free (mikropsuz) fareler ile spesifik patojen içermeyen fare gruplarının aşıya verdiği antikor cevabı karşılaştırılmıştır. Germ free farelere göre spesifik patojen içermeyen farelerin İnfuenza aşısına özgü Ig G konsantrasyonlarının daha yüksek olduğu bulunmuştur. Aşıya özgü antikor seviyelerindeki bu farklılığın TLR 5 ekspresyonu ile de tutarlılık gösterdiğini belirttikleri araştırma sonucunda mikrobiyotanın İnfuenza aşılmasının ardından antikor yanıtların indüklenmesinde önemli olabileceği görüşü bildirilmiştir (Oh ve ark., 2014). Ancak bu çalışmada topyekn bir bağırsak mikrobiyom analizi incelenmemiş olduğundan yapılan çıkarım sınırlıdır ve genele yansıtılamaz.

Hayvanlar üzerinde de deneysel olarak aşı etkinliği ve mikrobiyom ilişkisinin incelendiği çalışmaların sonuçlarına bakıldığında; bağırsak mikrobiyotasının insanlar gibi hayvanlarda da aşı cevabını etkileyebileceğini görüşü ağırlık kazanmaktadır (Valdez ve ark., 2014). Örneğin *Cynomolgus* makaklarının kullanıldığđı bir çalışmada, stabil ve daha çeşitli bir bağırsak mikrobiyotasının aşılamaya ve takiben oluşan bağırsaklığa daha iyi bir yanıt ile ilişkili olduğu fikri desteklenmektedir (Seekatz ve ark., 2013). Bu bulgu, Elloe-Faldrosh ve arkadaşlarının yapmış olduğu

aşılama yanıt veren bireylerin çoğunluğunun daha zengin ve daha çeşitli bağırsak mikrobiyota kompozisyonlarına sahip olduğu görüşünü savunan başka bir insan kohort çalışması ile de tutarlılık göstermektedir (Eloie-Fadros ve ark., 2013). Bu bulgularla çalışmamızda elde edilen veriler uyumluluk göstermektedir.

Bu tez çalışmasında hasta grubunda kontrol grubuna göre *Massiliprevotellla* cins düzeyinde anlamlı oranda daha yüksek bulunmuştur. Literatürde çalışmamıza benzer bir yayına rastlanmamıştır. Ancak, bir çalışmada bağırsak mikrobiyomunda bulunan *Massiliprevotellla* cinsinin bağırsak mikrobiyotasında azalmasının çocuklarda pankreas adacık otoimmunitesi ve Tip1 diyabete gidişte etkisi olabileceği bildirilmiştir (Harbison ve ark., 2009). Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlarda hasta grubunda *Massiliprevotellla* cinsinin daha yüksek oranda bulunmuş olmasının aşı cevabını olumsuz etkilediği görüşü öne sürülebilir.

Çalışmamızda hasta grubunda kontrol grubuna göre *Bacteroidetes* sınıf düzeyinde anlamlı oranda daha yüksek bulunmuştur. Literatürde bağırsak mikrobiyomunda bulunan *Bacteroidetes* sınıfının bolluğu ile çok sayıda hastalıkla (ülseratif kolit, Tip1 diyabet vb.) ilişkisi olduğu bildirilmiştir (Davis-Richardson ve ark., 2014; Mills ve ark., 2022). Ancak yukarıda da anlatıldığı üzere Harris ve arkadaşlarının 2017 yılında Ghana’lı ve Hollandalı infantlar üzerinde oral Rotavirüs aşısına cevapta bağırsak mikrobiyom kompozisyonlarını inceledikleri çalışmaları neticesinde, Rotavirüs aşısına yanıt vermeyenlerde daha yüksek oranlarda *Bacteroidetes spp* bulunduğu saptanmıştır (Harris ve ark., 2017). Bu çalışmadakine benzer şekilde çalışmamızda Hepatit B aşısı sonrasında antikor cevabı oluşmayan hasta grubunda *Bacteroidetes* sınıf düzeyinde daha yüksek oranda bulunmuştur. Bu konuda yeterli sayıda yayın olmasa da *Bacteroidetes* sınıfındaki bakterilerin bağırsak içeriğinde fazla oranda bulunmasının aşırıya cevabı olumsuz etkilediği söylenebilir. Ayrıca F/B oranı ile birlikte değerlendirildiğinde; hasta grubunda *Bacteroidetes* sınıfındaki bakterilerin daha fazla olması bu gruptaki kişilerin bağırsak disbiyozisini yansıtmaktadır. Daha ileri bir yorum yapılacak olursa henüz yeterli veri olmasa da bu bakterilerin sayısını azaltan ya da *Firmucutes* sınıfı bakterilerin sayısını artıran mikrobiyota restorasyonuna yönelik tedaviler (probiyotik, prebiyotik vb.) uygulanabilir.

Bacteroidetes filumu içerisinde yer alan *Alistipes* cinsi bakteriler, diğer cins üyelerine kıyasla düşük bir oranda olmasına rağmen, disbiyoz ve hastalıkla daha fazla ilişkisi olduğu belirtilen anaerobik bakteri cinsidir (Parker ve ark., 2020). Tipik olarak sağlıklı insan bağırsak mikrobiyomundan izole edilmesine rağmen, insan hastalıklarındaki potansiyel fırsatçı patojenik rollerini vurgulayan şekilde apendiküler, abdominal, perirektal apselerden de izole edilmiştir. Bağırsak disbiyozunda dışkı mikrobiyotasında *Alistipes*'in oranında artış olduğu tespit edilmiştir. *Alistipes*'in mikrobiyotadaki bolluğu karaciğer fibrozu (Rau ve ark., 2018), kolorektal kanser (Moschen ve ark., 2016), kardiyovasküler hastalık (Zuo ve ark., 2019) ve duyudurum bozuklukları ile de ilişkilendirilmiştir. *A. ihumii* anoreksiya nervozadan mustarip bir hastanın dışkılarından izole edilirken, *A. obesi* morbid obeziteden mustarip bir hastadan izole edilmiştir. Daha sonraki gözlemleri şu gerçeğe birleştirerek *Alistipes finegoldii* besi piliçlerinde (Torok ve ark., 2011) bir büyüme destekleyicisi olarak kabul edilmiştir ve *A. putredinis*'in insanlarda turpgiller sebze grubunun tüketimile arttığı gözlemlenmiştir (Li ve ark., 2009). *Alistipes* türlerinin beslenmede farklı rollere sahip olabileceğini varsaymak mantıklıdır. *Alistipes*'in sağlık ve hastalık durumlarında farklı etkileri olduğu düşünülmektedir (Parker ve ark., 2020). Bizim çalışmamızda *Alistipes*'in Hepatit B aşısına olumlu antikor yanıtı vermeyen hasta grubunda daha yüksek oranda bulunması etkilediği kardiyolojik, nörolojik, gastrointestinal ve psikolojik birçok sistemin yanında bağışıklık sistemini de etkileyebileceğini düşündürmektedir.

Çalışmamızda hasta grubunda kontrol grubuna göre *Gammaproteobacteria* sınıfı anlamlı oranda daha yüksek bulundu. Bu bakterilerin aşı cevabı üzerinde olumsuz etkileri olduğu söylenenebileceği düşünülse de bu konuda yeterli veri henüz bulunmamaktadır. Çünkü bağırsak mikrobiyom kompozisyonunda bulunan *Gammaproteobacteria* sınıfı ve hastalık ilişkisini konu edinen çalışma nadirdir. Ulaşılabilen bir çalışma da bu tez konusu ile ilgili olmayıp, erken doğmuş düşük doğum ağırlıklı bebeklerin bağırsak disbiyozuna gidişte vajinal doğum şekli ve antenatal steroid kullanımının bağırsak mikrobiyotasında daha yüksek *Gammaproteobacteria* oranı ile ilişkili olabileceği bulunmuştur. Sonuçta

Gammaproteobacteria oranının prematüre bebeklerde bağırsak mikrobiyomunun gelişimini anlamada önemlidir (Ho ve ark., 2018).

Bu tez çalışmasında *Negativicutes* takım düzeyinde hasta grubunda daha yüksek oranda bulunmuştur. Bu bakterilerin aşı cevabı üzerinde olumsuz etkileri olduğu söylenenebilir. Ancak bu konuda yeterli veri henüz bulunmamaktadır. Çünkü yapılan literatür taramalarında bağırsak mikrobiyom içeriğinde bulunan *Negativicutes* takımı ve hastalık ilişkisi hakkında sadece bir çalışma tespit edilmiştir. Bu da immün sistem ve mikrobiyom ilişkisini inceleyen bir çalışma değildir. Söz konusu çalışma Güney Kore’ de yapılan sağlıklı genç erkek askerlerin bağırsak mikrobiyomuna sigaranın etkisinin değerlendirildiği çalışmada sigara için grubun bağırsak mikrobiyotasında *Negativicutes* oranı daha yüksek bulunmuştur (Yoon ve ark., 2021).

Bu çalışmada hasta grubunda kontrol grubuna göre *Selenomonadaceae* cinsi daha yüksek oranda bulunmuştur. Bu bakterilerin aşı cevabı üzerinde olumsuz etkileri olabileceği düşünülse de bu konuda yeterli veri henüz bulunmamaktadır. Çünkü yapılan literatür taramalarında bağırsak mikrobiyom içeriğinde bulunan *Selenomonadaceae* cinsi ve hastalık ilişkisi hakkında sadece bir çalışma tespit edilmiştir. Dikkat eksikliği ve hiperaktivite bozukluğu (DEHB) ile bağırsak mikrobiyomu arasındaki ilişkiyi araştıran 2021 yılında yapılan çalışmada, DEHB’li erişkinlerde göreceli olarak daha yüksek *Selenomonadaceae* oranlarının olduğu bildirilmiştir (Richarte ve ark., 2021). Bu hastalığın da tez konusu ile yakın bir ilgisi bulunmamakta olduğundan herhangi bir çıkarım yapılamamıştır. Ancak bazı çalışmalarda bu bakterilerin kortizol düzeyi etkileyebileceği görüşü bildirilmiştir (Rehman ve ark., 2020). Kortizol düzeyini etkileyen bir bakterinin immün sistem üzerine de etkileri olabilir.

Otoimmün hepatitli hastalar (n=91) ile sağlıklı kontrollerin (n=98) bağırsak mikrobiyota kompozisyon içeriğinin karşılaştırıldığı 2020 sonlarında yapılan bir çalışmada *Veillonella* ailesindeki bolluğun artışı hastalık durumu ile ilişkilendirilmiştir. Özellikle *Veillonella dispar* türü hastalıkla ilişkili en güçlü takson olarak bildirilmiş ve aspartat aminotransferaz düzeyi ve karaciğer iltihabı ile pozitif korelasyon gösterdiği ifade edilmiştir (Wei ve ark., 2020). Bizim çalışmamızda aşırı antikor yanıtı oluşturmayan grupta *Veillonella dispar* daha yüksek oranda

bulunmuştur. Çalışmamızda elde edilen verilere bakıldığında hasta grubunda kontrol grubuna göre cinsi *Veillonella* cinsi daha yüksek oranda bulunmuştur. Aşı cevabı *Veillonella* ilişkisi hakkında literatürde veri bulunmamaktadır. Ancak Wei ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada otoimmün hepatit geçiren hastalarda *Veillonella* ailesinin daha yüksek bulunması, bu bakterilerin immun sistem üzerinde etkileri olabileceğini göstermektedir. Çalışmamızda bu bakterilerin hasta grubunda daha yüksek bulunmuş olması *Veillonella* cinsi bakterilerin immun sistem ile yakın etkileşim olduğunu düşündürmektedir.

Araştırmamızda Hepatit B aşısına antikor yanıtı oluşmayan hasta grubunda *Rikenellaceae* cinsi bakteriler, aşıya antikor yanıtı oluşan gruba göre daha yüksek oranda bulunmuştur. Literatürde bu bakterilerle ilgili sadece bir çalışma bulunabilmiş olup bu da konumuz ile ilgili değildir. Söz konusu çalışmada koroner kalp hastalığının patogenezi düzenlemede bağırsak mikrobiyotasının rolünü araştıran bir çalışmada kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, *Rikenellaceae* cinsi bakterilerinin indüklenen akut miyokard iskemisi hastalarının bağırsak mikrobiyomunda daha yüksek oranda bulunduğu bildirilmiştir (Sun ve ark., 2019). Bu bakterilerin aşı cevabı üzerinde olumsuz etkileri olduğu söylenenebilir. Ancak bu konuda yeterli veri henüz bulunmamaktadır

Bizim çalışmamızda kontrol grubunda hasta grubuna göre *Peptostreptococcaceae* ailesinin daha yüksek oranda bulunduğu tespit edilmiştir. Literatürde bu bakterilerle ilgili sadece birkaç çalışma bulunabilmiş olup bu da konumuz ile ilgili değildir. Bu çalışmalardan birinde, *Peptostreptococcaceae* ailesinin kolorektal kanser modeli oluşturulmuş deney farelerinden ve sağlıklı kontrol grubundan alınan dışkı numuneleri ile yapılan bağırsak mikrobiyom analizi sonuçları karşılaştırıldığında kolorektal kanserli farelerin bağırsak mikrobiyomunda daha yüksek oranda *Peptostreptococcaceae* ailesinin bulunduğu tespit edilmiştir. Aynı çalışmanın sonucunda özellikle *Peptostreptococcus anaerobius*'un farelerde kolon tümörü oluşumuna ve olası karsinogenez mekanizmalarına katkısı olabileceği bildirilmiştir (Tsoi ve ark., 2017). Bir diğer çalışmada ise obez ve Tip 2 Diyabetli kişilerde kilo verme sonrası bağırsak mikrobiyotasındaki değişimin incelenmiş ve kilo verdikten sonra bağırsak mikrobiyom içeriğinin *Faecalibacterium prausnitzii*, *Akkermansia muciniphila* ve *Peptostreptococcus anaerobius* yönünden zenginleştiği

bildirilmiştir. (Remely ve ark., 2016). Bu sonuçlara göre *Peptostreptococcus anaerobius* yararlı bir bakteri gibi görünmektedir. Bizim çalışmamızda da aşıya cevap oluşan grupta daha yüksek oranda bulunması bu bilgiyle uyumludur. Bu bakterilerin aşı cevabı üzerinde olumlu etkileri olduğu söylenenebilir. Ancak bu konuda yeterli veri henüz bulunmamaktadır.

Çalışmamızda sağlıklı kontrol grubunda yüksek oranda olduğunu tespit ettiğimiz *Lachnospiraceae* ailesi, bağırsak lümenini doğumdan itibaren kolonize eder ve yaşam boyunca bağırsak mikrobiyomunda bolluğu giderek artar. *Lachnospiraceae*, sağlık ve hastalıkta önemli bir rol oynar. *Lachnospiraceae* ailesi üyeleri kısa zincirli yağ asitlerinin ana üreticileri arasında yer alsa da, *Lachnospiraceae*'nin farklı taksonları da farklı bağırsak içi ve bağırsak dışı hastalıklarla ilişkilidir. Bağırsak mikrobiyomunda artan *Lachnospiraceae* oranı obezite ve Tip 2 diyabet ile ilişkili bulunmuştur. *Lachnospiraceae*, sindirilmemiş karbonhidratların metabolizmasında anahtar bir rol oynar. Bakterinin KZYA üretimi ile ilgili faydalı etkilere rağmen, gastrointestinal sistem mikrobiyotası tarafından bu sindirilmemiş karbonhidratların sindirimi, diyetten elde edilen enerjinin artmasına katkıda bulunur ve böylece açlık kan şekeri düzeylerini etkileyerek Tip 2 diyabet gelişimine neden olur. Ayrıca alkolsüz yağlı karaciğer hastalığı ve hafif böbrek fonksiyon kusurlarının da bağırsak mikrobiyomunda artan *Lachnospiraceae* ile ilişki olduğunu savunan çalışmalar mevcuttur (Barrios ve ark., 2015; Shen ve ark., 2017). *Lachnospiraceae*'nin sağlık durumu üzerindeki etkilerine bakacak olursak, bu etkilerinin büyük kısmını kolonda biriken ve sistemik olarak dolaşan küçük moleküllerin üretimi yoluyla yaptığını söyleyebiliriz (Biddle ve ark., 2013). *Lachnospiraceae* ailesi bağırsağımızdaki ana KZYA üreticilerinin başında yer almaktadır. *Lachnospiraceae* ailesi'nden özellikle *Blautia* ve *Roseburia* cinslerinin, bağırsak inflamatuvar süreçleri, ateroskleroz ve bağışıklık sisteminin olgunlaşmasının kontrolünde bakteriyel metabolizmalarının son ürünleri (bütirat) ile bu etkilere aracılık ettiği gösterilmiştir (Kasahara ve ark., 2018; Atarashi ve ark., 2011). Literatürde bu bakterilerle ilgili ulaşabildiğimiz çalışmalar *Lachnospiraceae* ailesinin sağlıkla ilişkisi üzerine olsa da bakterinin bağışıklık sistemi ile ilişkisi konusunda bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bizim araştırmamızda sağlıklı kontrol grubumuzda *Lachnospiraceae* ailesi hasta grubunu kıyasla daha

yüksek oranda bulunmuştur. Bulgularımızın literatürle uyumlu olduğu ve bu bakterilerin hasta grubunda daha az oranda olduğu saptanmıştır.

Kolorektal kanser gelişiminde bağırsak mikrobiyotasının etkisini araştıran bir çalışmada kolorektal kanser olan grup ile karşılaştırıldığında sağlıklı kontrol grunda *Clostridiales* ailesi'nin daha yüksek oranda bulunduğu bildirilmiştir. Bu etkinin *Clostridiales'in* diyet liflerini ve diğer kompleks karbonhidratları, kolonik inflamasyonu ve karsinogenezi engelleyebilen majör bir kolonik metabolit olan bütirata verimli bir şekilde fermente etmesi özelliği ile ilgili olduğu görüşünü destekleyen makaleler literatürde mevcuttur (Hamer ve ark., 2008; Koropatkin ve ark., 2012). Bu bakterilerin bütirat metabolizması üzerinde etkili olması immun mekanizmaları da etkilediğini düşündürmektedir. Ancak kesin bir çıkarım yapabilmek için yeterli veri bulunmamaktadır. Bizim çalışmamızda da Hepatit B aşısına antikor cevabı yüksek olan kontrol grubunda *Clostridiales* ailesi yüksek oranda bulunmuştur.

Bağırsak mikrobiyotası ile bağışıklık sistemi arasında karşılıklı bir etkileşim vardır. Düzenleyici T (Treg) hücreleri, bağışıklık tepkilerini kontrol etmek ve bağırsak homeostazını sürdürmek için önemlidir, ancak bağırsak mikrobiyotası üzerindeki kesin etkileri belirsizdir. Fare modelleri üzerinde Treg hücre tükenmesinin bağırsak mukozasının iltihaplanması ve bağırsak mikrobiyotası üzerindeki etkilerinin incelendiği bir çalışmada Treg hücre tükenmesine, *Firmicutes* filumunun nispi bolluğundaki bir artışın ve farelerde bağırsak iltihabı gelişiminin eşlik ettiği tespit edilmiştir (Kehrmann ve ark., 2020). Bağırsakta yüksek miktarda bulunan düzenleyici T (Treg) hücreleri doğal ve adaptif bağışıklık sisteminin bağışıklık tepkilerini kontrol ederek bağırsak homeostazını sürdürmek için oldukça önemlidir (Hadis ve ark., 2011). Treg hücrelerinin çoğu timustan üretilir, ancak kommensal bağırsak bakterilerinden antijenlerle temas yoluyla CD4⁺ T hücrelerinden de indüklenebilirler (Lathrop ve ark., 2011). Birkaç çalışma, depresyonu olan hastalara bağırsak mikrobiyomunda *Firmicutes'in* değişen oranlarını incelemiş ve bağırsak bariyerinin koruyucu işleviyle ilişkili olarak da depresyon durumunda bağırsak mikrobiyotasında *Firmicutes* oranının sağlıklı kontrollere göre azaldığını göstermiştir (Naseribafrouei ve ark., 2014). *Firmicutes'in* oranında azalma ile birlikte mikrobiyotada oluşan geçirgenlik artışı ve beraberinde

getirdiği bağırsak disbiyozunun depresyon patofizyolojisinde önemli olduğu düşünülmektedir (Huang ve ark., 2018). Genelleme yapılacak olursa *Firmucutes* ailesinin bakterilerinin fazlalığının sağlık üzerine olumlu etkileri olduğu söylenebilir. Araştırmamızda hasta grubu ile karşılaştırılığında sağlıklı kontrol grubunun bu bakterilerin daha fazla olması da bunu desteklemektedir. Ayrıca bu bakterilerin azlığı ya da fazlalığını F/B oranını da doğrudan etkilediği düşünüldüğünde bakterinin öneminin daha iyi anlaşılacağı açıktır.

Mikrobiyota çalışmalarının genelinde olduğu gibi çalışmamızda maliyet nedeniyle hasta ve kontrol grubu sayısının az olması, bazı fekal biyomarkerların bakılmamış olması, hasta ve kontrol grubu sayısının az olması gibi çalışmamızın kısıtlayıcı unsurları arasında sayılabilir.

Literatürde bağırsak mikrobiyota kompozisyonu ve immun sistem arasındaki ilişkiyi inceleyen çalışma sayısı sadece birkaç tanedir. Çalışmamızda hasta grubunun gaita pH ortalamalarının kontrol grubun ortalamasına göre anlamlı olarak daha yüksek olduğu görüldü. *Firmucites/Bacteroidetes* oranının sağlıklı kontrol grubuna göre hasta grubunda daha düşük olduğu saptandı. Hasta grubunda filum düzeyinde; *Bacteroidetes* sınıf düzeyinde; *Gammaproteobacteria*, *Bacteroidia*, *Negativicutes* takım düzeyinde; *Selenomonadales*, *Veilloonellales*, *Bacteroidales* aile düzeyine; *Selenomonadaceae*, *Rikenellaceae*, *Veillonellaceae* cins düzeyinde; *Massiliprevotella*, *Alistipes* daha yüksek oranda bulunmuştur. Kontrol grubunda ise; filum düzeyinde; *Firmucutes* sınıf düzeyinde; *Clostridia* takım düzeyinde; *Clostridiales* aile düzeyinde; *Lachnospiraceae*, *Peptostreptococcaceae*, *Hungateiclostridiaceae* daha yüksek oranda bulunmuştur. Elde edilen veriler Hepatit B aşısına cevap alınamayan grupta bağırsak disbiyozisi varlığını göstermektedir. Ancak bağırsak mikrobiyom analizi sonuçlarının coğrafi bölge, iklim koşulları, diyet ve genetik farklılıkları ile değişkenlik gösterebileceği göz ardı edilmemelidir. Bu konuda daha kapsamlı araştırmalara ihtiyaç vardır.

6. KAYNAKLAR

- Ardissone A. N, Dias R, Simell V, Leonard M. T, Kemppainen K. M. & Triplett E. W. *Bacteroides dorei* dominates gut microbiome prior to autoimmunity in Finnish children at high risk for type 1 diabetes. *Frontiers in microbiology*.2014;5, 678.
- Atarashi K, Tanoue T, Shima T, Imaoka A, Kuwahara T, Momose Y & Honda K. Induction of colonic regulatory T cells by indigenous *Clostridium* species. *Science*.2011;337-341.
- Bäckhed F, Fraser C. M, Ringel Y, Sanders M. E, Sartor R. B, Sherman P. M, & Finlay B. B. Defining a healthy human gut microbiome: current concepts, future directions, and clinical applications. *Cell host & microbe*.2012;12(5), 611-622.
- Backhed, F. et al. Yaşamın ilk yılında insan bağırsak mikrobiyomunun dinamikleri ve stabilizasyonu. *Cell Host Microbe*.2015;17,690–703.
- Banatvala J. E. & Van Damme P. Hepatitis B vaccine—do we need boosters?. *Journal of viral hepatitis*.2003;10(1), 1-6.
- Bansal T, Alaniz R. C, Wood T.K. & Jayaraman A. Bakteriyel sinyal indol, epitel hücre sıkı bağlantı direncini artırır ve inflamasyon göstergelerini azaltır. *Proc. Natl. Acad*.2010;10, 228–233.
- Barko P. C, McMichael M. A, Swanson K. S, & Williams D. A. The gastrointestinal microbiome: a review. *Journal of veterinary internal medicine*.2018;32(1), 9-25.
- Barrio C, Beaumont M, Pallister T, Villar J, Goodrich J. K, Clark A & Menni C. Gut-microbiota-metabolite axis in early renal function decline. *PloS one*.2015;10(8), e0134311.
- Bauer H, Horowitz R. E, Levenson S. M & Popper H. Lenfatik dokunun mikrobiyal flora tepkisi. Mikropsuz fareler üzerinde araştırmalar. *Ben. J. Pathol*.1963;42, 471-483.
- Baumert T. F, Meredith L, Ni Y, Felmlee D. J, McKeating J. A, & Urban, S. Entry of hepatitis B and C viruses—recent progress and future impact. *Current opinion in virology*.2014; 4, 58-65.
- Belkaid Y. & Naik S. Kommensaller tarafından doku bağışıklığının bölümlenmiş ve sistemik kontrolü. *Nat. immünol*.2013;14, 646-653.
- Beutels P, Edmunds WJ, Antonanzas F, et al. Economic evaluation of vaccination programmes: a consensus statement focusing on viral hepatitis. *Pharmacoeconomics* 2002; 20 (1): 1-7.
- Beutels P. Economic evaluations of hepatitis B immunization: a global review of recent studies (1994-2000). *Health Econ* 2001; 10 (8): 751-774. 66.

- Bharti R. & Grimm D. G. Current challenges and best-practice protocols for microbiome analysis. *Briefings in bioinformatics*.2021;22(1), 178-193.
- Bhutta Z. A. & Black R. E. Küresel anne, yenidoğan ve çocuk sağlığı - Çok yakın ve henüz çok uzak. *N. İngilizce J. Med.*2013;369, 2226–2235.
- Biddle A, Stewart L, Blanchard J. & Leschine S. Untangling the genetic basis of fibrolytic specialization by Lachnospiraceae and Ruminococcaceae in diverse gut communities. *Diversity*.2013;5(3), 627-640.
- Björkstén B, Sepp E, Julge K, Voor T, Mikelsaar M. Allergy development and the intestinal microflora during the first year of life. *J Allergy Clin Immunol*.2001;108: 516-520.
- Block T. M, Guo H. & Guo J. T. Molecular virology of hepatitis B virus for clinicians. *Clinics in liver disease*.2007;11(4), 685-706.
- Bolyen E, Rideout, J.R, Dillon M.R. et al. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nat Biotechnol*.2019;37, 852–857 <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0209-9>
- Brenchley J. M. & Douek D. C. Microbial translocation across the GI tract. *Annual review of immunology*.2012;30, 149-173.
- Brown E. M, Sadarangani M. And Finlay B. B, “The role of the immune system in governing host-microbe interactions in the intestine,” *Nature Immunology*.2013;vol. 14, no. 7, pp. 660–667.
- Cahenzli J, Koller Y, Wyss M, Geuking M.B. & McCoy K.D. Erken yaşam kolonizasyonu sırasındaki Bağırsak mikrobiyal çeşitliliği, uzun vadeli IgE seviyelerini şekillendirir. *Hücre Konak Mikrobu*.2013;14,559–570.
- Callahan B. J, McMurdie P. J, Rosen M. J, Han A. W, Johnson A. J. A, & Holmes S. P. DADA2: high-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature methods*.2016;13(7), 581-583.
- Cani P. D. Human gut microbiome: hopes, threats and promises. *Gut*.2018;67(9), 1716-1725.
- Centers for Disease Control and Prevention. A comprehensive immunization strategy to eliminate transmission of hepatitis B virus infection in the United States. Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP) Part I: Immunization of Infants, Children, and Adolescents. *MMWR*.2005;54(No.RR-16):1-23.
- Claesson M. J, Clooney A. G. & O'toole P. W. A clinician's guide to microbiome analysis. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*.2017;14(10),585-595.
- Collins, N., & Belkaid, Y. Do the microbiota influence vaccines and protective immunity to pathogens? Engaging our endogenous adjuvants. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*.2018;10(2), a028860.
- Daniel McDonald, Jose C. Clemente, Justin K, Rideout J, Stombaugh J, Wendel D, Wilke A, Huse S, Hufnagle J, Meyer F, Knight R, Caporaso G. The Biological

Observation Matrix (BIOM) format or: how I learned to stop worrying and love the ome-ome, GigaScience, 2012;2047–217X–1–7, <https://doi.org/10.1186/2047-217X-1-7>.

Ding T, Schloss P. D.Dynamics and associations of microbial community types across the human body. Nature.2014;509:357-60.

Donia M. S , Fischbach M. A .İnsan mikrobiyotasından küçük moleküller.Bilim.2015; 349:1254766 .

Dooling K. L, Guo A, Patel M, Lee G. M, Moore K, Belongia E. A. & Harpaz R.Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices for use of herpes zoster vaccines. Morbidity and Mortality Weekly Report.2018;67(3), 103.

EASL International Consensus Conference on Hepatitis B.Geneva. J Hepatol 2003;38:533- 540.

Eloe-Fadrosh E. A, McArthur M. A, Seekatz A. M, Drabek E. F, Rasko D. A, Sztein M. B. & Fraser C. M.Impact of oral typhoid vaccination on the human gut microbiota and correlations with S. Typhi-specific immunological responses. PloS one.2013;8(4), e62026.

Ficara, M, Pietrella E, Spada C, Della Casa Muttini E, Lucaccioni L, Iughetti L. & Berardi A. Changes of intestinal microbiota in early life. The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine.2020;33(6), 1036-1043.

Fix J, Chandrashekhar K, Perez J, Bucardo F, Hudgens M. G, Yuan L. & Becker-Dreps S.Association between gut microbiome composition and rotavirus vaccine response among Nicaraguan infants. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.2020;102(1), 213.

Fonseca D, Hand T, Han S. J, Gerner M, Zaretsky A, Byrd A. & Belkaid Y.Microbiota-dependent sequelae of acute infection compromise tissue-specific immunity. Cell.2015;163(2), 354-366.

Fuchs A. and Colonna M. Natural killer (NK) and NK-like cells at mucosal epithelia: mediators of anti-microbial defense and maintenance of tissue integrity. European Journal of Microbiology and Immunology. vol. 1, no. 4, pp. 2011;257–266.

Fulde M. ve ark. Toll benzeri reseptör 5 tarafından yenidoğan seçimi, uzun vadeli bağırsak mikrobiyota kompozisyonunu etkiler.Doğa.2018; 489-493.

Galli G, Hancock K, Hoschler K, DeVos J, Praus M, Bardelli M. & Stephenson I.Fast rise of broadly cross-reactive antibodies after boosting long-lived human memory B cells primed by an MF59 adjuvanted prepandemic vaccine. Proceedings of the National Academy of Sciences.2009;106(19), 7962-7967.

Gensollen T, Iyer S. S, Kasper D. L. & Blumberg R. S. Erken yaşamda mikrobiyota kolonizasyonunun bağışıklık sistemini nasıl şekillendirdiği. Bilim.2016; 352, 539-544.

Goldstein S. T, Zhou F, Hadler S. C, Bell B. P, Mast E. E. & Margolis H. S. A mathematical model to estimate global hepatitis B disease burden and vaccination impact. International journal of epidemiology.2005; 34(6), 1329-1339.

Gomez de Agüero M. et al. Maternal mikrobiyota, erken doğum sonrası doğuştan gelen bağışıklık gelişimini yönlendirir. Bilim.2016;351, 1296-1302.

Grassly N. C, Jafari H, Bahl S, Durrani S, Wenger J, Sutter R. W. & Aylward R. B. Mucosal immunity after vaccination with monovalent and trivalent oral poliovirus vaccine in India. The Journal of infectious diseases.2009; 200(5), 794-801.

Grimm D, Thimme R. & Blum, H. E. HBV life cycle and novel drug targets. Hepatology international.2011; 5(2), 644

Guidelines for vaccination in patients with chronic kidney disease. Indian J Nephrol. 2016;26(Suppl 1):S15–8.

GÜLCÜ S., & ARSLAN S. Çocuklarda aşı uygulamaları: Güncel bir gözden geçirme. Düzce Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi,2018; 8(1), 34-43.

Hadis U, Wahl B, Schulz O, Hardtke-Wolenski M, Schippers A, Wagner N. & Pabst, O. Intestinal tolerance requires gut homing and expansion of FoxP3⁺ regulatory T cells in the lamina propria. Immunity.2011;34(2), 237-246.

Hall J. A, Bouladoux N, Sun C. M, Wohlfert E. A, Blank R. B, Zhu Q. & Belkaid, Y. Commensal DNA limits regulatory T cell conversion and is a natural adjuvant of intestinal immune responses. Immunity.2008; 29(4), 637-649.

Hallander H. O, Paniagua M, Espinoza F, Askelöf P, Corrales E, Ringman M. & Storsaeter J. Calibrated serological techniques demonstrate significant different serum response rates to an oral killed cholera vaccine between Swedish and Nicaraguan children. Vaccine.2002; 21(1-2), 138-145.

Haller D. The gut microbiome in health and disease. Springer.2018.

Hamer H. M, Jonkers D. M. A. E, Venema K, Vanhoutvin S. A. L. W, Troost F. J. & Brummer R. J. The role of butyrate on colonic function. Alimentary pharmacology & therapeutics.2008; 27(2), 104-119.

Hapfelmeier S. ve ark. Mikropsuz farelerin geri dönüşümlü mikrobiyal kolonizasyonu, IgA bağışıklık tepkilerinin dinamiklerini ortaya çıkarır. Bilim.2010;328, 1705-1709.

Harbison J. E, Roth-Schulze A. J, Giles L. C, Tran C. D, Ngui K. M, Penno M. A. & Couper J. J. Gut microbiome dysbiosis and increased intestinal permeability in children with islet autoimmunity and type 1 diabetes: A prospective cohort study. Pediatric diabetes.2019;20(5), 574-583.

Harris V, Ali A, Fuentes S, Korpela K, Kazi M, Tate J. & de Vos W. M. Rotavirus vaccine response correlates with the infant gut microbiota composition in Pakistan. Gut Microbes.2018;9(2), 93-101.

Harris V. C, Armah G, Fuentes S, Korpela K. E, Parashar U, Victor J. C. & de Vos W. M. Significant correlation between the infant gut microbiome and rotavirus vaccine response in rural Ghana. The Journal of infectious diseases.2017;215(1), 34-41.

- Ho T. T, Groer M. W, Kane B, Yee A. L, Torres B. A, Gilbert J. A. & Maheshwari A..Dichotomous development of the gut microbiome in preterm infants. *Microbiome*.2018; 6(1), 1-13.
- Hoffmann C, Dollive S, Grunberg S, Chen J, Li H, Wu G. D. & Bushman F. D.Archaea and fungi of the human gut microbiome: correlations with diet and bacterial residents. *PloS one*.2013; 8(6), e66019.
- Holmgren J. & Czerkinsky C.Mucosal immunity and vaccines. *Nature medicine*.2005;11(4), S45-S53.
- Hooper L. V, Littman L. V. and A. J. Macpherson. Interactions between the microbiota and the immune system. *Science*.2012; vol. 336, no. 6086, pp. 1268–1273.
- Hou J, Liu Z, Gu F. Epidemiology and Prevention of Hepatitis B Virus Infection. *International Journal of Medical Sciences*. 2005;2(1):50-7
- Huang H. C, Vlasova A. N, Kumar A, Kandasamy S, Fischer D. D, Deblais L. & Rajashekara G.Effect of antibiotic, probiotic, and human rotavirus infection on colonisation dynamics of defined commensal microbiota in a gnotobiotic pig model. *Beneficial microbes*.2018; 9(1), 71-86.
- Huang Y, Shi X, Li Z, Shen Y, Shi X, Wang L. & Liang Y.Possible association of Firmicutes in the gut microbiota of patients with major depressive disorder. *Neuropsychiatric disease and treatment*.2018;14, 3329.
- Huda M. N, Lewis Z, Kalanetra K. M, Rashid M, Ahmad S. M, Raqib R, Stephensen C. B.Stool microbiota and vaccine responses of infants. *Pediatrics*.2014; 134(2), e362-e372.
- Hyams K. C.Risks of chronicity following acute hepatitis B virus infection: a review. *Clinical Infectious Diseases*.1995;20(4), 992-1000.
- Hyer R, McGuire DK, Xing B, Jackson S, Janssen R. Safety of a two-dose investigational hepatitis B vaccine, HBsAg1018, using a toll-like receptor 9 agonist adjuvant in adults. *Vaccine*. 2018;36(19):2604-2611.
- Icaza-Chávez M. E.Gut microbiota in health and disease. *Revista de Gastroenterología de México (English Edition)*.2013; 78(4), 240-248.
- Ivanov, II ve ark. Spesifik mikrobiyota, ince bağırsağın mukozasında IL-17 üreten T-yardımcı hücrelerin farklılaşmasını yönlendirir. *Cell Host Microbe* 2018; 337–349.
- J. C. Clemente, L. K. Ursell, L. W. Parfrey, and R. Knight.The impact of the gut microbiota on human health: an integrative view.*Cell*.2010;vol. 148, no. 6, pp. 1258–1270.
- J. L. Round and S. K. Mazmanian.The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nature Reviews Immunology*.2009;vol. 9, no. 5, pp. 313–323.
- Jason L. P, Abu-Ali G. & Huttenhower C.The healthy human microbiome. *Genome medicine*.2019;8, 51.

- Jiang, V, Jiang B, Tate J, Parashar U. D. & Patel M. M. Performance of rotavirus vaccines in developed and developing countries. *Human vaccines*.2010; 6(7), 532-542.
- Kamada N, Chen G. Y, Inohara N. & Núñez G. Control of pathogens and pathobionts by the gut microbiota. *Nature immunology*.2013; 14(7), 685-690.
- Kandasamy S, Chattha K. S, Vlasova A. N, Rajashekara G. & Saif L. J. Lactobacilli and Bifidobacteria enhance mucosal B cell responses and differentially modulate systemic antibody responses to an oral human rotavirus vaccine in a neonatal gnotobiotic pig disease model. *Gut microbes*.2014; 5(5), 639-651.
- Kandemir Ö. Hepatit B'den D'ye Hep güncel. In: Danalıoğlu A, Kandemir Ö. *Kronik Hepatit B.1.basım Content Ed Net yayınevi* 2020;110-114.
- Kasahara K, Krautkramer K. A, Org E, Romano K. A, Kerby R. L, Vivas E. I. & Rey F. E. Interactions between *Roseburia intestinalis* and diet modulate atherogenesis in a murine model. *Nature microbiology*.2018;3(12), 1461-1471.
- Kawai H, Feinstone SM: *Acute Viral Hepatitis. Principles and Practice of Infectious Diseases*, 5 th Ed (Eds: Mandell GL, Bennet JE, Dolin R), USA, Churchill-Livingstone;2000;1279-1297.
- Kehrmann J, Effenberg L, Wilk C, Schoemer D, Ngo Thi Phuong N, Adamczyk A. & Buer J. Depletion of Foxp3⁺ regulatory T cells is accompanied by an increase in the relative abundance of Firmicutes in the murine gut microbiome. *Immunology*.2020;159(3), 344-353.
- Khor B, Garder A. & Xavier R. J. Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature*.2011; 474(7351), 307-317.
- Koliada A, Syzenko G, Moseiko V, Budovska L, Puchkov K, Perederiy V. & Vaiserman A. Association between body mass index and Firmicutes/Bacteroidetes ratio in an adult Ukrainian population. *BMC microbiology*.2011; 17(1), 1-6.
- Konrad A, Cong Y, Duck W, Borlaza R. & Elson C.O. Enterik mikrobiyotanın antijenlerine murin bağışıklık tepkisinin sıkı mukozal bölümlenmesi. *Gastroenteroloji*.2006; 130, 2050–2059.
- Koroglu M, Demiray T, Ozbek A, Guclu E, Karabay O, Altindis M. & Durmaz, R. Nail scissors and fingernails as reservoirs of hepatitis B virus DNA: Role of nail scissors in household transmission of hepatitis B virus. *American journal of infection control*,.2018; 46(7), 793-797.
- Koropatkin N. M, Cameron E. A. & Martens E. C. How glycan metabolism shapes the human gut microbiota. *Nature Reviews Microbiology*.2012;10(5), 323-335.
- Korpe P. S. & Petri Jr, W. A. Environmental enteropathy: critical implications of a poorly understood condition. *Trends in molecular medicine*.2012; 18(6), 328-336.
- Köroğlu, M. Mikrobiyota Çalışmalarında Örnek Alımı ve DNA İzolasyonu. *Journal of Biotechnology and Strategic Health Research*.2017; 1, 50-55.

Lathrop S. K, Bloom S. M, Rao S. M, Nutsch K, Lio C, Santacruz N. & Hsieh C. S. Peripheral education of the immune system by colonic commensal microbiota. *Nature*.2011;22;478(7368), 250-254.

Levine M. M. Immunogenicity and efficacy of oral vaccines in developing countries: lessons from a live cholera vaccine. *BMC biology*.2010; 8(1), 1-10.

Li F, Hullar M. A, Schwarz Y. & Lampe J. W. Human gut bacterial communities are altered by addition of cruciferous vegetables to a controlled fruit-and vegetable-free diet. *The Journal of nutrition*.2009; 139(9), 1685-1691.

Liang T. J. Hepatitis B: the virus and disease. *Hepatology*.2009; 49(S5), S13-S21.

Linares D. M, Ross P. & Stanton C. Beneficial microbes: the pharmacy in the gut.2016; *Bioengineered* 7: 11–20.

Littman D. R. Do the microbiota influence vaccines and protective immunity to pathogens? If so, is there potential for efficacious microbiota-based vaccines?. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*.2018; 10(2), a029355.

Lynch JB & Hsiao E.Y. Mikrobiyomları, ortaya çıkan konak fenotiplerinin kaynakları olarak. *Bilim*.2019;365,1405–1409.

Lynn D. J. & Pulendran B. The potential of the microbiota to influence vaccine responses. *Journal of leukocyte biology*.2018;103(2), 225-231.

Mahoney F.J. Update on diagnosis, management, and prevention of hepatitis B virus infection. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12 (2): 351-366.

Mariat D, Firmesse O, Levenez F, Guimarães V. D, Sokol H, Doré J. & Furet J. The Firmicutes/Bacteroidetes ratio of the human microbiota changes with age. *BMC microbiology*.2009; 9(1), 1-6.

Marin M, Marlow M, Moore K. L. & Patel M. Recommendation of the Advisory Committee on Immunization Practices for use of a third dose of mumps virus-containing vaccine in persons at increased risk for mumps during an outbreak. *Morbidity and Mortality Weekly Report*.2018;67(1), 33.

Mast E. E, Weinbaum C. M, Fiore A. E, et al. A comprehensive immunization strategy to eliminate transmission of hepatitis B virus infection in the United States: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP) Part II: immunization of adults. *MMWR Recomm Rep*. 2006; 55 (RR-16): 1-33.

Mateos-Hernández L, Obregón D, Maye J, Borneres J, Versille N, de la Fuente J. & Cabezas-Cruz A. Anti-tick microbiota vaccine impacts *Ixodes ricinus* performance during feeding. *Vaccines*.2020; 8(4), 702.

Mathur, R. & Barlow G. M. Obesity and the microbiome. *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology*.2015;9(8), 1087-1099.

Mazmanian S. K, Liu C. H, Tzianabos A. O. & Kasper D.L. Simbiyotik bakterilerin immünomodülatör bir molekülü, konakçı bağışıklık sisteminin olgunlaşmasını yönlendirir. *Hücre*122.2005; 107-118 .

- McDermott A. J. and Huffnagle G. B. The microbiome and regulation of mucosal immunity. *Immunology*, vol. 142, no. 1, pp.2014;24–31.
- Medema M. H. & Fischbach M. A. Computational approaches to natural product discovery. *Nature chemical biology*.2015;11(9), 639-648.
- Mills R. H, Dulai P. S, Vázquez-Baeza Y, Saucedo C, Daniel N, Gerner R. R. & Gonzalez D. J. Multi-omics analyses of the ulcerative colitis gut microbiome link *Bacteroides vulgatus* proteases with disease severity. *Nature Microbiology*.2020; 1-15.
- Moschen A. R, Gerner R. R, Wang J, Klepsch V, Adolph T. E, Reider S. J. & Tilg H. Lipocalin 2 protects from inflammation and tumorigenesis associated with gut microbiota alterations. *Cell host & microbe*.2016; 19(4), 455-469.
- Mowat A.M. Cevap vermek ya da vermemek - bağırsak toleransına kişisel bir bakış açısı. *Nat. Rev. İmmünol*.2018;18, 405–415.
- Mutsch M, Zhou W, Rhodes P, Bopp M, Chen R. T, Linder T, Steffen R. Use of the inactivated intranasal influenza vaccine and the risk of Bell's palsy in Switzerland. *New England journal of medicine*.2004; 350(9), 896-903.
- Naseribafrouei A, Hestad K, Avershina E, Sekelja M, Linløkken A, Wilson R. & Rudi K. Correlation between the human fecal microbiota and depression. *Neurogastroenterology & Motility*.2014;26(8), 1155-1162.
- Neu J. & Walker W.A. Nekrotizan enterokolit. N. İngilizce J. Med.2011;364, 255–264.
- NIH Human Microbiome Portfolio Analysis. A review of 10 years of human microbiome research activities at the US National Institutes of Health, Fiscal Years 2007-2016. *Microbiome*.2019; 7, 1-19.
- Norton E. B, Lawson L. B, Freytag L. C. & Clements, J. D. Characterization of a mutant *Escherichia coli* heat-labile toxin, LT (R192G/L211A), as a safe and effective oral adjuvant. *Clinical and Vaccine Immunology*.2011;18(4), 546-551.
- Oh J. Z, Ravindran R, Chassaing B, Carvalho F. A, Maddur M. S, Bower M. & Pulendran B. TLR5-mediated sensing of gut microbiota is necessary for antibody responses to seasonal influenza vaccination. *Immunity*.2014; 41(3), 478-492.
- Oh J. Z, Ravindran R, Chassaing B, Carvalho F. A, Maddur M. S, Bower M. & Pulendran B. TLR5-mediated sensing of gut microbiota is necessary for antibody responses to seasonal influenza vaccination. *Immunity*.2014; 41(3), 478-492.
- Olsen I. & Yamazaki K. Can oral bacteria affect the microbiome of the gut?. *Journal of oral microbiology*.2019; 11(1), 1586422.
- Ondov B. D, Bergman N.H, Phillippy A. M. Interactive metagenomic visualization in a Web browser. *BMC Bioinformatics*. 2011;9.30;12:385. doi: 10.1186/1471-2105-12-385.

Ostaff M. J, Stange E. F, Wehkamp and J. Antimicrobial peptides and gut microbiota in homeostasis and pathology. *EMBO Molecular Medicine*.2013;vol. 5, no. 10, pp. 1465–1483.

Özaçar T. Hepatit B virüsü. In: Willke Topçu A, Söyletir G, Doğanay M, editors. *İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2008: 1882-904

Parker B. J, Wearsch P. A, Veloo A. & Rodriguez-Palacios A. The genus *Alistipes*: gut bacteria with emerging implications to inflammation, cancer, and mental health. *Frontiers in immunology*.2020; 11, 906.

Parker E. P, Ramani S, Lopman B. A, Church J. A, Iturriza-Gomara M, Prendergast A. J. & Grassly N. Causes of impaired oral vaccine efficacy in developing countries. *Future microbiology*.2018;13(1), 97-118.

Planer J. D, Peng Y, Kau A. L, Blanton L. V, Ndao I. M, Tarr P. I. & Gordon J. I. Development of the gut microbiota and mucosal IgA responses in twins and gnotobiotic mice. *Nature*.2016; 534(7606), 263-266.

Rau M, Rehman A, Dittrich M, Groen A. K, Hermanns H. M, Seyfried F. & Geier A. Fecal SCFAs and SCFA-producing bacteria in gut microbiome of human NAFLD as a putative link to systemic T-cell activation and advanced disease. *United European gastroenterology journal*.2018; 6(10), 1496-1507.

Rehman S. F, Bowerman K. L, Lachner N, Budden K. F, Kim R, Wood D. L. & Hansbro P. M. Changes in the Gut Microbiome in Chronic Obstructive Pulmonary Disease.2020;In C13.

Reid G, Younes J. A, Van der Mei H. C, Gloor G. B, Knight R. & Busscher H. J. Microbiota restoration: natural and supplemented recovery of human microbial communities. *Nature Reviews Microbiology*.2011;9(1), 27-38.

Remely M, Hippe B, Zanner J, Aumueller E, Brath H. & Haslberger A. Gut microbiota of obese, type 2 diabetic individuals is enriched in *Faecalibacterium prausnitzii*, *Akkermansia muciniphila* and *Peptostreptococcus anaerobius* after weight loss. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Immune, Endocrine & Metabolic Disorders)*.2016;16(2), 99-106.

Reyes A, Haynes M, Hanson N, Angly F. E, Heath A. C, Rohwer F et al. Viruses in the faecal microbiota of monozygotic twins and their mothers. *Nature* 2010; 466: 334–8.

Rubin L. G, Levin M. J, Ljungman P, Davies E. G, Avery R, Tomblyn M et al. Infectious Diseases Society of America. 2013 IDSA clinical practice guideline for vaccination of the immunocompromised host. *Clin Infect Dis*. 2014;58(3):e44-100.

Russell S.L. ve ark. Mikrobiyotadaki erken yaşam antibiyotik kaynaklı değişiklikler, alerjik astıma duyarlılığı artırır. *EMBO*.2012;7,13 , 440–447.

Ryom L, Cotter A, De Miguel R, Béguélin C, Podlekareva D, Arribas JR et al. EACS Governing Board. 2019 update of the European AIDS Clinical Society Guidelines

for treatment of people living with HIV version 10.0. HIV Med. 2020;21(10):617-24.

Sayers E.W, Bolton E.E, Brister J.R, Canese K, Chan J, Comeau D.C, Connor R, Funk K, Kelly C, Kim S, Madej T, Marchler-Bauer A, Lanczycki C, Lathrop S, Lu Z, Thibaud-Nissen F, Murphy T, Phan L, Skripchenko Y, Tse T, Wang J, Williams R, Trawick BW, Pruitt KD, Sherry ST. Database resources of the national center for biotechnology information. Nucleic Acids Res.2022;7,7;50(D1):D20-D26.doi: 10.1093/nar/gkab1112.

Seekatz A. M, Panda A, Rasko D. A, Toapanta F. R, Eloë-Fadrosch E. A, Khan A. Q. & Fraser C. M. Differential response of the cynomolgus macaque gut microbiota to Shigella infection. PloS one.2013; 8(6), e64212.

Segata N, Izard J, Waldron L, Gevers D, Miropolsky L, Garrett W.S, Huttenhower C. Metagenomic biomarker discovery and explanation.Genome Biol.2011;6, 24;12(6):R60. doi: 10.1186/gb-2011-12-6-r60.

Sekirov I, Russell S.L, Antunes LCM, Finlay B.B. Gut mibrobiota in health and disease. Physiol Rev.2010;90:859-904.

Sekirov, I, Russell S. L, Antunes L. C. M. & Finlay B. B. Gut microbiota in health and disease. Physiological reviews.2010.

Sender R, Fuchs S. & Milo R. Are we really vastly outnumbered? Revisiting the ratio of bacterial to host cells in humans. Cell.2006;164(3), 337-340.

Sender R, Fuchs S. & Milo R. Revised estimates for the number of human and bacteria cells in the body. PLoS biology,.2016;14(8), e1002533.

Shan M. Mukus, bağışıklık düzenleyici sinyaller ileterek bağırsak homeostazını ve oral toleransı artırır. Bilim.2013;342, 447–453.

Sharpton,T. J. An introduction to the analysis of shotgun metagenomic data. Frontiers in plant science.2014;5, 209.

Shen F, Zheng R. D, Sun X. Q, Ding W. J, Wang X. Y. & Fan J. G. Gut microbiota dysbiosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International.2017;16(4), 375-381.

Shi N, Li N, Duan X. & Niu H. Interaction between the gut microbiome and mucosal immune system. Military Medical Research.2017; 4(1), 1-7.

Shreiner A. B, Kao J. Y. & Young V. B. The gut microbiome in health and in disease. Current opinion in gastroenterology.2015;31(1), 69.

Sun L, Jia H, Li J, Yu M, Yang Y, Tian D. & Zou Z. Cecal gut microbiota and metabolites might contribute to the severity of acute myocardial ischemia by impacting the intestinal permeability, oxidative stress, and energy metabolism. Frontiers in microbiology.2019;1745.

Sunbul M. & Leblebicioglu H. Distribution of hepatitis B virus genotypes in patients with chronic hepatitis B in Turkey. World Journal of Gastroenterology: WJG.2005;11(13), 1976.

- Sweeney T. E. & Morton, J. M. The human gut microbiome: a review of the effect of obesity and surgically induced weight loss. *JAMA surgery*.2013;148(6), 563-569.
- Swidsinski A, Loening-Baucke V, Lochs H, and Hale L.P. Spatial organization of bacterial flora in normal and inflamed intestine: a fluorescence in situ hybridization study in mice. *World Journal of Gastroenterology*.vol. 11, no. 8, pp.2005;1131–1140.
- Tang L. S, Covert E, Wilson E. & Kottlil S.Chronic hepatitis B infection: a review. *Jama*.2018;319(17), 1802-1813.
- Tedjo D. I, Jonkers D. M, Savelkoul P. H, Masclee A. A, van Best N, Pierik M. J. & Penders J. The effect of sampling and storage on the fecal microbiota composition in healthy and diseased subjects. *PloS one*.2015;10(5), e0126685.
- Thomas V, Clark J. & Doré J. Fecal microbiota analysis: an overview of sample collection methods and sequencing strategies. *Future microbiology*.2015;10(9), 1485-1504.
- Tilg H. & Moschen A. R. Food, immunity, and the microbiome. *Gastroenterology*.2015; 148(6), 1107-1119.
- Torok V. A, Hughes R. J, Mikkelsen, L. L., Perez-Maldonado, R., Balding, K., MacAlpine R. & Ophel-Keller K. Identification and characterization of potential performance-related gut microbiotas in broiler chickens across various feeding trials. *Applied and environmental microbiology*.2011;77(17), 5868-5878.
- Tsoi H, Chu E. S, Zhang X, Sheng J, Nakatsu G, Ng S. C. & Yu J. *Peptostreptococcus anaerobius* induces intracellular cholesterol biosynthesis in colon cells to induce proliferation and causes dysplasia in mice. *Gastroenterology*.2017;152(6), 1419-1433.
- Turnbaugh P. J, Ley R. E, Hamady M, Fraser-Liggett C. M, Knight R. & Gordon J. I. The human microbiome project. *Nature*.2007;449(7164), 804-810.
- Umesaki Y, Setoyama H, Matsumoto S. & Okada Y. Mikropsuz farelerde mikrobiyal kolonizasyondan sonra alfa beta T-hücresi reseptörü taşıyan intestinal intraepitelyal lenfositlerin genişlemesi ve timustan bağımsızlığı. *İmmünoloji*.1993;79, 32-37.
- Valdez Y, Brown E. M. & Finlay B. B. Influence of the microbiota on vaccine effectiveness. *Trends in immunology*.2014;35(11), 526-537.
- Van Buren R. C. & Schaffner W. Hepatitis B virus: a comprehensive strategy for eliminating transmission in the United States through universal childhood vaccination. Recommendations of the Immunization Practices Advisory Committee (ACIP). *MMWR Recomm. Rep*.1991;40, 1-19.
- Van de Guchte, Blottière H. M. & Doré J. Humans as holobionts: implications for prevention and therapy. *Microbiome*.2018; 6(1), 1-6.
- Vlasova A. N, Chattha K. S, Kandasamy S, Liu Z, Esseili M, Shao L. & Saif L. J. Lactobacilli and bifidobacteria promote immune homeostasis by modulating innate immune responses to human rotavirus in neonatal gnotobiotic pigs. *PloS one*.2013;8(10), e76962.

Vrieze A, Holleman F, Zoetendal E.G, de Vos W.M, Hoekstra J.B, Nieuwdorp M. The environment within: how gut microbiota may influence metabolism and body composition. *Diabetologia*.2010;53: 606-613.

Wang, J. ve ark. Gestasyonel diyabetes mellitus ile ilişkili maternal ve neonatal mikrobiyota disbiyozu. *Gut*.2018;614-1625.

Wei Y, Li Y, Yan L. I, Sun C, Miao Q, Wang Q. & Ma X. Alterations of gut microbiome in autoimmune hepatitis. *Gut*.2020;69(3), 569-577.

Wesemann D.R. ve ark. Mikrobiyal kolonizasyon, bağırsak lamina propriasında erken B-soy gelişimini etkiler. *Doğa*.2018;501, 112–115.

Wick R.R, Judd L.M. & Holt K.E. Performance of neural network basecalling tools for Oxford Nanopore sequencing. *Genome Biol*.2019;20,129.
<https://doi.org/10.1186/s13059-019-1727>.

World Health Organization.Guidelines for the prevention care and treatment of persons with chronic hepatitis B infection: Mar-15. World Health Organization.

www.kidney.org.uk Erişim tarihi: 1.01.2022

Yang S, Tian G, Cui Y, Ding C, Deng M, Yu C et al. Factors influencing immunologic response to hepatitis B vaccine in adults. *SciRep*. 2016;6:27251.

Yatsunenکو T, Rey F. E, Manary M. J, Trehan I, Dominguez-Bello, M. G, Contreras, M. & Gordon J. I. Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature*.2012; 486(7402), 222-227.

Yoon H, Lee D. H, Lee J. H, Kwon J. E, Shin C. M, Yang S. J. & Kim B. Y. Characteristics of the Gut Microbiome of Healthy Young Male Soldiers in South Korea: The Effects of Smoking. *Gut and Liver*.2021;15(2), 243.

Zhang H, Wang H, Shepherd M, Wen K, Li G, Yang X. & Yuan L. Probiotics and virulent human rotavirus modulate the transplanted human gut microbiota in gnotobiotic pigs. *Gut pathogens*.2014;6(1), 1-7.

Zhang Q. & Cao G. Genotypes, mutations, and viral load of hepatitis B virus and the risk of hepatocellular carcinoma: HBV properties and hepatocarcinogenesis. *Hepatitis monthly*.2011;11(2), 86.

Zhang W, Azevedo M. S, Wen K, Gonzalez A, Saif L. J, Li G. & Yuan L. Probiotic *Lactobacillus acidophilus* enhances the immunogenicity of an oral rotavirus vaccine in gnotobiotic pigs. *Vaccine*.2008;26(29-30), 3655-3661.

Zheng D, Liwinski T. & Elinav E. Interaction between microbiota and immunity in health and disease. *Cell research*.2020;30(6), 492-506.

Zoulim F, Perrillo R. Hepatitis B: reflections on the current approach to antiviral therapy. *J Hepatol*. 2008;48(1):2-19

Zuo K, Li J, Li K, Hu C, Gao Y, Chen M. & Yang X. Disordered gut microbiota and alterations in metabolic patterns are associated with atrial fibrillation.*Gigascience*. 2019;8(6), giz058.



