

T.C.
BOLU ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ ANA BİLİM DALI



KANDA BAKTERİYEL KALINTILARIN ARAŞTIRILMASI
VE ASTIMDAKİ ETKİLERİ

MİKROBİYOLOJİ YÜKSEK LİSANS TEZİ

HUSEYN BABAYEV

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Muhammet Güzel KURTOĞLU

İKİNCİ TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Cezmi Ali AKDİŞ

BOLU, ARALIK 2024

KABUL VE ONAY SAYFASI

Huseyn BABAYEV tarafından hazırlanan **KANDA BAKTERİYEL KALINTILARIN ARAŞTIRILMASI VE ASTIMDAKİ ETKİLERİ** adlı tez çalışması jürimiz tarafından Tıbbi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı Programında Yüksek Lisans Tezi olarak oy birliğiyle kabul edilmiştir. 3/01/2025

Jüri Üyeleri

İmza

Danışman
Prof. Dr. Muhammet Güzel KURTOĞLU
Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi

.....

Üye
Prof. Dr. Şükrü ÖKSÜZ
Düzce Üniversitesi

.....

Üye
Doç. Dr. Fatma AVCIOĞLU
Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi

.....

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Onayı

Prof. Dr. İbrahim KÜRTÜL
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Tez Yazım Kılavuzu ve Şablonuna uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
 - Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
 - Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
 - Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
 - Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu bildirir
- aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Teze ilişkin Turnitin adlı programında enstitü müdürlüğünce belirlenen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan benzerlik raporuna göre, tezin benzerlik oranı %30'u geçmemektedir.

Bu çalışma için daha önce Ankara Üniversitesi Etik Kurulundan 04-302-19 sayılı etik kurul izni alınmış olup, alınan kan örnekleri üzerinde geniş bir çalışma yapılmıştır. Bu koleksiyon materyallerinden yararlanılarak bu tez yapılmıştır. Bu nedenle ayrıca etik kurul alınmasına gerek kalmamıştır.

.....
HUSEYN BABAYEV

ÖNSÖZ

Bu tez çalışması, obezite ve astım gibi kronik hastalıkların patogeneğinde bakteriyel translokasyonun rolünü araştırmayı amaçlayan kapsamlı bir araştırmanın sonucudur. Modern yaşamın getirdiğı değişikliklerle birlikte artan bu hastalıkların altında yatan mekanizmaları anlamak, hem bilimsel açıdan hem de klinik uygulamalar açısından büyük önem taşımaktadır.

Araştırmamız, kan dolaşımındaki bakteriyel DNA varlığını ve bunun sistemik enflamasyonla ilişkisini inceleyen özgün bir yaklaşım sunmaktadır. Metagenomik analiz teknikleri kullanılarak elde ettiğimiz bulgular, obezite ve bağışıklık sistemi hastalıklarının patogeneğinde epitel bariyer disfonksiyonunun ve mikrobiyal translokasyonun önemli bir rol oynayabileceğini göstermektedir.

Huseyn BABAYEV

ÖZET

**KANDA BAKTERİYEL KALINTILARIN ARAŞTIRILMASI VE
ASTIMDAKİ ETKİLERİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ
HUSEYN BABAYEV
BOLU ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ ANA BİLİM DALI
MİKROBİYOLOJİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI
(TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. MUHAMMET GÜZEL KURTOĞLU)
(İKİNCİ DANIŞMAN: PROF. DR. CEZMİ ALİ AKDİŞ)
BOLU, OCAK - 2025
XV + 113 sayfa**

Bu çalışma, kan dolaşımındaki bakteriyel DNA'nın farklı kan bileşenleri arasındaki dağılımını ve astım ile ilişkisini araştırmayı amaçlamıştır. Öncelikle, bakteriyel DNA'nın kan kompartmanları arasındaki dağılımını belirlemek için plazma, buffy coat ve kırmızı kan hücrelerini içeren kan bileşenleri ayrıştırılmıştır. Çalışmaya toplam 131 katılımcı dahil edilmiş olup, bunlar normal kilolu kontrol (n=30), obez kontrol (n=30), normal kilolu astım (n=15) ve obez astım (n=44) gruplarına ayrılmıştır. Bakteriyel DNA seviyeleri kantitatif PCR kullanılarak ölçülmüş ve seçilen örneklerde 16S rRNA ve shotgun metagenomik sekanslama ile detaylı mikrobiyom profili analizleri gerçekleştirilmiştir. Kan bileşenlerinin analizinde, bakteriyel DNA'nın büyük çoğunluğunun (%89.77) buffy coat'ta lokalize olduğu ve bunun PMN'lerde (%70.64) PBMC'lere (%29.36) göre daha yüksek oranda bulunduğu tespit edilmiştir. Kırmızı kan hücreleri toplam bakteriyel DNA'nın %10.20'sini içerirken, plazmada sadece %0.03 oranında bakteriyel DNA saptanmıştır. Metagenomik analizler, obez bireylerin kan dolaşımında özellikle *Escherichia/Shigella* gibi bağırsak kaynaklı ve *Cutibacterium acnes* gibi deri kaynaklı bakterilerin normal kilolu bireylere göre daha yüksek oranda bulunduğunu göstermiştir. Bu bulgular, obezitede bağırsak ve deri bariyerlerinin bütünlüğünün bozulmasının bakteriyel translokasyona yol açabileceğini düşündürmektedir. Dolaşımdaki bakteriyel DNA seviyeleri ile enflamatuvar belirteçler arasında pozitif korelasyon saptanmıştır. Bu çalışma, kan dolaşımındaki bakteriyel DNA'nın sistemik enflamasyon ve epitelyal bariyer disfonksiyonunun potansiyel bir göstergesi olabileceğini ve bunun obezite ile ilişkili kronik enflamasyona katkıda bulunabileceğini ortaya koymaktadır. Bulgularımız, dolaşımdaki bakteriyel DNA'nın biyobelirteç olarak kullanılabileceğini ve epitelyal bariyer fonksiyonunu hedefleyen terapötik yaklaşımların geliştirilmesinin önemini vurgulamaktadır.

ANAHTAR KELİMELE: Dolaşımdaki bakteriyel DNA, obezite, astım, bağırsak-akciğer eksen, epitel bariyer disfonksiyonu, 16S rRNA dizileme, biyobelirteçler, bağışıklık düzensizliği

ABSTRACT

INVESTIGATION OF BACTERIAL REMNANTS IN BLOOD AND THEIR IMPLICATIONS IN ASTHMA

MSC THESIS

HUSEYN BABAYEV

BOLU ABANT IZZET BAYSAL UNIVERSITY

INSTITUTE OF GRADUATE STUDIES

DEPARTMENT OF MICROBIOLOGY

(SUPERVISOR: PROF. DR. MUHAMMET GÜZEL KURTOĞLU)

(CO-SUPERVISOR: PROF. DR. CEZMİ ALİ AKDİŞ)

BOLU, JANUARY 2025

XV + 113 pages

This study aimed to investigate the distribution of bacterial DNA among different blood components and its relationship with asthma. Blood components including plasma, buffy coat, and red blood cells were initially separated to determine the distribution of bacterial DNA between blood compartments. The study included 131 participants divided into normal-weight control (n=30), obese control (n=30), normal-weight asthma (n=15), and obese asthma (n=44) groups. Bacterial DNA levels were measured using quantitative PCR, and detailed microbiome profile analyses were performed on selected samples using 16S rRNA and shotgun metagenomic sequencing. Analysis of blood components revealed that the majority of bacterial DNA (89.77%) was localized in the buffy coat, with higher concentrations in PMNs (70.64%) compared to PBMCs (29.36%). Red blood cells contained 10.20% of total bacterial DNA, while only 0.03% was detected in plasma. Metagenomic analyses showed that obese individuals had higher proportions of gut-derived bacteria such as *Escherichia/Shigella* and skin-derived bacteria like *Cutibacterium acnes* in their bloodstream compared to normal-weight individuals. These findings suggest that compromised gut and skin barrier integrity in obesity may lead to bacterial translocation. Positive correlations were observed between circulating bacterial DNA levels and inflammatory markers. This study demonstrates that bacterial DNA in the bloodstream may serve as a potential indicator of systemic inflammation and epithelial barrier dysfunction, potentially contributing to obesity-associated chronic inflammation. Our findings highlight that circulating bacterial DNA could be used as a biomarker and emphasize the importance of developing therapeutic approaches targeting epithelial barrier function.

KEYWORDS: Circulating bacterial DNA, obesity, asthma, gut-lung axis, epithelial barrier dysfunction, 16S rRNA sequencing, biomarkers, immune dysregulation.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ŞEKİL LİSTESİ.....	x
TABLO LİSTESİ	xi
KISALTMA VE SEMBOLLER LİSTESİ	xii
TEŞEKKÜR	xiv
1. GİRİŞ.....	1
1.1 Astım	3
1.1.1.Astım Gelişiminde Epidemiyoloji ve Risk Faktörleri	3
1.1.2.Astımla İlişkili Genlerdeki Son Gelişmeler.....	4
1.1.3.Astım Gelişimindeki Moleküler Mekanizmalar	5
1.1.4.Yeni Moleküller ve Yolaklar	5
1.1.5.Obeziteye Bağlı Astımda Moleküler Mekanizmalar	6
1.1.6.Astım Teşhisi, Hassas Tıp ve Biyobelirteçler	6
1.1.7.Astım Endotipleri Tarafından Yönlendirilen Yeni Tedaviler.....	7
1.1.8.Astımda epitelyal bariyer.....	8
1.1.9.Hava Yolu Epitelinin Yapısı ve İşlevi	9
1.1.10. Epitelyal Bariyer Teorisi	9
1.1.11. Epitel Bariyer Hasarına Neden Olan Ajanlar	10
1.1.12. Epitel Bariyerlerinin Düzenlenmesi	11
1.1.13. Bağışıklık Yanıtlarında Epitel Hücrelerinin Rolü	11
1.1.14. Mikrobiyal Disbiyoz ve Translokasyon	12
1.1.15. Lokal Bariyer Defektleri ile Seyreden Kronik Hastalıklar.....	13
1.1.16. Bariyer Koruma ve Onarımı	15
1.1.17. Astımda Epitel Bariyer Disfonksiyonu	16
1.1.18. Bağırsak-Akciğer Ekseni ve Mikrobiyal Disbiyozis.....	17
1.1.19. Mikrobiyal Translokasyon Mekanizmaları	18
1.1.20. Beslenmenin Mikrobiyal Translokasyon Üzerindeki Etkisi.....	18
1.1.21. Antibiyotik Kullanımı ve Dysbiosis	19
1.1.22. Çevresel Faktörler ve Mikrobiyal Maruziyet	19
1.1.23. Genetik ve Epigenetik Faktörler.....	20
1.1.24. Astım Gelişimi için Çevresel Risk Faktörleri	21
1.1.25. Sitokinlerin ve İnflamatuar Mediyatörlerin Etkisi	24
1.1.26. Hava Yolunu Yeniden Şekillendirme ve Onarım Mekanizmaları	

1.2 Astımda metagenomik analiz teknikleri	25
1.2.1.Mikrobiyomların Dizileme Tabanlı Analizi	25
1.2.2.Metagenomların Analizi	27
1.2.3.Mikrobiyal Toplulukların Taksonomik Profili	27
1.2.4.Okuma Tabanlı Taksonomik Profillemeye	28
1.2.5.Montaj Tabanlı Genom Çözümlü Metagenomik	28
1.2.6.Suş Düzeyinde Taksonomik Profillemeye	29
1.2.7.Gen İçeriğinin Fonksiyonel Profili	30
1.2.8.Pangenom	30
1.2.9.Varsayılan Kodlama Genlerine İşlev Atama	31
1.2.10. Genlerin ve İşlevlerin Okuma Tabanlı Tanımlanması	31
1.2.11. Mobil Genetik Unsurların (MGE'ler) Tanımlanması	32
1.2.12. Mikrobiyomların RNA Tabanlı Analizi	32
1.2.13. Yeni Ortaya Çıkan Yaklaşımlar	33
1.2.14. Gelecek Perspektifleri	34
1.3 Amaç	36
2. MATERYAL ve YÖNTEM	38
2.1 Çalışma Tasarımı	38
2.1.1.Katılımcı Alımı ve Seçim Kriterleri	38
2.1.2.Etik Hususlar	38
2.2 Örnek Toplama	40
2.2.1.Serum Toplama Protokolü	40
2.2.2.Kan kompartmanlarının toplanması	40
2.3 Serumdan DNA Ekstraksiyonu	42
2.3.1.DNA Ekstraksiyon Protokolü	42
2.3.2.DNA Kalite Değerlendirmesi	42
2.3.3.qPCR Kullanarak İlk Miktar Tayini	43
2.4 Shotgun Metagenomik Sekanslama	44
2.4.1.Sekanslama için DNA Kütüphanesi Hazırlama	44
2.4.2.Sekanslama	45
2.5 16SrRNA Metagenomik Sekanslama	47
2.5.1.DNA Kütüphanesi Hazırlama	47
2.5.2.Kütüphane Kalite Kontrolü:	49
2.5.3.Kütüphanelerin Havuzlanması ve Hazırlanması:	50
2.5.4.Sekanslama	50
2.6 Biyoinformatik Analiz	51
2.6.1. Veri Ön İşleme	51
2.6.2.Taksonomik Profil Oluşturma	51
2.6.3.16S rRNA Analizi	52
2.6.4.Shotgun Metagenomik Analizi	56
2.7 Sınırlamalar ve Zorluklar	58
3. BULGULAR	59
3.1 Kan Bileşenlerinde Bakteriye DNA Dağılımı	59

3.1.1. Bakteriyel DNA'nın Kan Bileşenleri Arasındaki Dağılım Modeli.....	59
3.1.2. Kalite Kontrol ve Validasyon	60
3.2 Kohort Karakterizasyonu ve İlk Tarama	61
3.2.1. Çalışma Popülasyonu	61
3.2.2. Demografik Özellikler	61
3.2.3. Klinik Özellikler	62
3.3 İlk Biyomarker Analizi	66
3.3.1. Bakteriyel DNA Miktar Tayini.....	66
3.3.2. Zonulin Aile Peptidi (ZFP) Analizi	67
3.3.3. Biyobelirteçlerin Korelasyon Analizi	69
3.4 Seçilmiş Örneklerde Derin Mikrobiyom Analizi	72
3.4.1. Örnek Seçim Stratejisi	72
3.4.2. 16S rRNA Sekanslama Sonuçları.....	73
3.4.3. Gözlemlenen Cinsler	74
3.4.4. Shannon Çeşitlilik Endeksi.....	76
3.4.5. Simpson Çeşitlilik Endeksi.....	77
3.4.6. Beta Çeşitlilik Analizi	78
3.4.7. Diferansiyel Bolluk Analizi.....	78
3.4.8. Rastgele Orman Sınıflandırması.....	81
3.5 Normal Kilolu ve Obez Kontrol Gruplarında Serumdan Shotgun Metagenomik Analizi	82
3.5.1. Numune Dağıtımı ve Kalite Kontrol	82
3.5.2. Taksonomik Kompozisyon Analizi.....	82
3.5.3. Taksonomik Kompozisyon ve Filogenetik Analiz	82
3.5.4. Alfa Çeşitlilik Metrikleri	82
3.5.5. Beta Çeşitliliği ve Topluluk Yapısı	83
3.5.6. Diferansiyel Zenginleşme Analizi	83
3.5.7. Makine Öğrenimi Sınıflandırması	83
3.5.8. Korelasyon Ağı Analizi	84
3.5.9. Kanonik Korelasyon Analizi	84
4. TARTIŞMA	86
4.1 Obez Bireylerde Artan Bakteriyel DNA Seviyeleri ve Epitel Bariyer Bozukluğu	86
4.2 Mikrobiyom-Metabolom Etkileşimleri ve Kronik İnflamasyon	87
4.3 Mikrobiyom ve Bağışıklık Sistemi Etkileşimi	87
4.4 Obezite ve Astım Arasındaki İlişki: Mikrobiyomun Rolü	88
4.5 Mikrobiyom Temelli Terapötik Yaklaşımlar ve Gelecekteki Yönelimler	88
4.6 Kronik İnflamasyon ve Metabolik Bozukluklarda Mikrobiyomun Rolü ..	89
4.7 Mikrobiyom ve Otoimmün Hastalıklar	89
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	91
KAYNAKLAR	96

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 3.1. Bakteriyel DNA'nın kan bileşenleri arasında dağılımı.	59
Şekil 3.2. Bakteriyel DNA'nın buffy coat bileşenleri arasında dağılımı.	60
Şekil 3.3 Çalışma grupları arasında serum bakteriyel DNA seviyelerinin (pg/mL) dağılımı.	66
Şekil 3.4 Astım şiddetine göre serum bakteriyel DNA düzeyleri.....	67
Şekil 3.5 Hastalık başlangıç yaşına göre serum bakteriyel DNA düzeyleri	67
Şekil 3.6 Çalışma gruplarına göre serum zonulin düzeyleri	68
Şekil 3.7 Astım şiddetine göre serum zonulin düzeyleri	68
Şekil 3.8 Astım başlangıç yaşına göre serum bakteriyel DNA düzeyleri.....	69
Şekil 3.9 Tüm gruplara göre Bakteriyel DNA – Zonulin düzeylerinin serpm diagramı.....	70
Şekil 3.10 Çalışma Gruplarında Bakteriyel DNA ve Zonulin Düzeyleri Arasındaki Korelasyon Analizi.....	71
Şekil 3.11 Seçilmiş Gruplarda Alfa Çeşitlilik Metriklerinin Karşılaştırılması.	74
Şekil 3.12 Kontrol-Obez ve Kontrol-Yüksek Grupları Arasındaki Farklı Bolluğun Volkan Grafiği	81

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 3.1. Katılımcıların Demografik Özellikleri	61
Tablo 3.2. Katılımcıların Klinik Özellikleri	62
Tablo 3.3. Katılımcılar Arasında Astım Şiddeti	63
Tablo 3.4. Katılımcıların Astım Başlangıcına Göre Dağılımı	63
Tablo 3.5. Katılımcılar Arasında Komorbiditelerin Görülme Oranı	64
Tablo 3.6. Astmatik Katılımcılar Arasında Alerji Türleri	64
Tablo 3.7. Astmatik Katılımcılar Arasında Çocukluk Çağı Alerjik Öyküsü ...	65
Tablo 3.8. Çalışma Gruplarında Bakteriyel DNA ve Zonulin Düzeyleri Arasındaki Spearman Korelasyon Analizi	70
Tablo 3.9. Seçilen ve Seçilmeyen Örneklerin Karşılaştırılması	73
Tablo 3.10 Gruplara Göre Gözlemlenen Cinslerin Sayısı	74
Tablo 3.11 Gözlemlenen Cinsler için Kruskal-Wallis Testi	75
Tablo 3.12 Gözlemlenen Cinsler için İkili Karşılaştırmalar	75
Tablo 3.13 Gruba Göre Shannon Çeşitlilik Endeksi	76
Tablo 3.14 Shannon Çeşitlilik Endeksi için Kruskal-Wallis Testi	77
Tablo 3.15 Gruba Göre Simpson Çeşitlilik Endeksi	77
Tablo 3.16 Simpson Çeşitlilik Endeksi için Kruskal-Wallis Testi	78
Tablo 3.17 Bray-Curtis Farklılığı için PERMANOVA Sonuçları	78
Tablo 3.18 Önemli Farklılık Gösteren Türler (Obez-Yüksek ve Kontrol-Yüksek karşılaştırması)	79

KISALTMA VE SEMBOLLER LİSTESİ

AIDS	: Acquired Immune Deficiency Syndrome (Edinilmiş Bağışıklık Yetersizliği Sendromu)
BAİBÜ	: Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi
BMI	: Body Mass Index (Vücut Kitle İndeksi)
CCA	: Canonical Correlation Analysis (Kanonik Korelasyon Analizi)
CD	: Cluster of Differentiation (Küme Farklılaşması)
COPD	: Chronic Obstructive Pulmonary Disease (Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı)
CRP	: C-Reactive Protein (C-Reaktif Protein)
DEP	: Diesel Exhaust Particles (Dizel Egzoz Partikülleri)
DNA	: Deoxyribonucleic Acid (Deoksiribonükleik Asit)
EMT	: Epithelial-Mesenchymal Transition (Epitelyal-Mezenkimal Geçiş)
FEV₁	: Forced Expiratory Volume in 1 second (1. Saniyedeki Zorlu Ekspiratuar Hacim)
FMT	: Fecal Microbiota Transplantation (Fekal Mikrobiyota Transplantasyonu)
FVC	: Forced Vital Capacity (Zorlu Vital Kapasite)
GÖRH	: Gastroözofageal Reflü Hastalığı
HDM	: House Dust Mite (Ev Tozu Akarı)
IBD	: Inflammatory Bowel Disease (İnflamatuvar Bağırsak Hastalığı)
IgE	: Immunoglobulin E (İmmünoglobülin E)
IL	: Interleukin (İnterlökin)
ILC2	: Type 2 Innate Lymphoid Cells (Tip 2 Doğal Lenfoid Hücreler)
LPS	: Lipopolysaccharide (Lipopolisakkarit)
MAG	: Metagenome-Assembled Genome (Metagenom Birleştirilmiş Genom)
MGE	: Mobile Genetic Elements (Mobil Genetik Elementler)
MMF	: Maximal Mid-expiratory Flow (Maksimal Orta Ekspiratuar Akım)
NMDS	: Non-metric Multidimensional Scaling (Metrik Olmayan Çok Boyutlu Ölçekleme)
NSAİİ	: Nonsteroidal Anti-İnflamatuvar İlaç
OKS	: Oral Kortikosteroid
OTU	: Operational Taxonomic Unit (Operasyonel Taksonomik Birim)
PAMP	: Pathogen-Associated Molecular Patterns (Patojen İlişkili Moleküler Paternler)
PBMC	: Peripheral Blood Mononuclear Cells (Periferik Kan Mononükleer Hücreleri)

PcoA	: Principal Coordinates Analysis (Temel Koordinatlar Analizi)
PCR	: Polymerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
PM	: Particulate Matter (Partikül Madde)
PMN	: Polymorphonuclear Leukocytes (Polimorfonükleer Lökositler)
PRR	: Pattern Recognition Receptors (Patern Tanıma Reseptörleri)
qPCR	: Quantitative PCR (Kantitatif PCR)
RBC	: Red Blood Cells (Kırmızı Kan Hücreleri)
RNA	: Ribonucleic Acid (Ribonükleik Asit)
rRNA	: Ribosomal RNA (Ribozomal RNA)
SAD	: Small Airway Dysfunction (Küçük Hava Yolu Disfonksiyonu)
SCFA	: Short-Chain Fatty Acids (Kısa Zincirli Yağ Asitleri)
SIAF	: Swiss Institute of Allergy and Asthma Research (İsviçre Alerji ve Astım Araştırma Enstitüsü)
SLE	: Systemic Lupus Erythematosus (Sistemik Lupus Eritematozus)
SNP	: Single Nucleotide Polymorphism (Tek Nükleotid Polimorfizmi)
SPRI	: Solid Phase Reversible Immobilization (Katı Faz Geri Dönüşümlü İmmobilizasyon)
TGF-β	: Transforming Growth Factor Beta (Dönüştürücü Büyüme Faktörü Beta)
Th2	: T Helper 2 Cells (T Yardımcı 2 Hücreleri)
TJ	: Tight Junction (Sıkı Bağlantı)
TLR	: Toll-like Receptor (Toll Benzeri Reseptör)
TMAO	: Trimethylamine N-oxide (Trimetilamin N-oksit)
TSLP	: Thymic Stromal Lymphopoietin (Timik Stromal Lenfopoietin)
VKİ	: Vücut Kitle İndeksi
ZFP	: Zonulin Family Peptide (Zonulin Ailesi Peptidi)
ZO-1	: Zonula Occludens-1

TEŞEKKÜR

Bu zorlu ve uzun akademik yolculukta bana rehberlik eden, bilgi ve deneyimleriyle araştırmamın her aşamasında destek olan değerli danışmanım Prof. Dr. Muhammet Güzel KURTOĞLU'na en derin şükranlarımı sunarım. Kendisinin titiz akademik yaklaşımı ve yapıcı eleştirileri, bu tezin şekillenmesinde ve olgunlaşmasında çok değerli katkılar sağlamıştır.

İkinci tez danışmanım Prof. Dr. Cezmi Ali AKDİŞ'e, özellikle immünoloji ve bağışıklık sistemi hastalıkları konusundaki derin bilgi birikimiyle araştırmamıza yön verdiği ve değerli katkılar sunduğu için içtenlikle teşekkür ederim. Bu çalışmanın tüm deneysel aşamaları İsviçre'nin Davos kentinde bulunan, direktörü olduğu Swiss Institute of Allergy and Asthma Research (SIAF) laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir. Araştırmamızın finansal desteğini sağlayan SIAF enstitüsüne ve çalışanlarına teşekkürlerimi sunarım.

Geniş vizyonu, köklü akademik birikimi ile araştırmamıza sağladığı bilimsel katkılar ve yol gösterici yönlendirmeleri için Prof. Dr. Mübeccel AKDİŞ'e içtenlikle teşekkür ederim.

Bu araştırmayı yapmamıza olanak tanıyan kıymetli kohort örneklerini paylaşarak çalışmamızın gerçekleşmesinde büyük rol oynayan Prof. Dr. Vesile Dilşad MUNGAN ve Doç. Dr. Zeynep ÇELEBİ SÖZENER'e teşekkürlerimi sunarım.

Doç. Dr. Fatma AVCIOĞLU'na ve Doç. Dr. Mustafa BEHÇET'e, yüksek lisans programındaki eğitimim boyunca sağladıkları rehberlik, bilgi ve tecrübeleriyle bu çalışmaya sundukları katkılar için en içten teşekkürlerimi sunarım.

Araştırmamın her aşamasında bilimsel katkılarını ve desteğini esirgemeyen, laboratuvar çalışmalarında ve verilerin değerlendirilmesinde bana yol gösteren değerli hocam Doç. Dr. İsmail ÖĞÜLÜR'e ve zorlu akademik yolculuğumun başından sonuna kadar her zaman yanımda olan, değerli bilgi ve tecrübelerini paylaşan, manevi desteğini hiç esirgemeyen Doç. Dr. Sena ARDIÇLI'ya içtenlikle teşekkür ederim. Kendilerinin deneyimleri, yönlendirmeleri ve katkıları, hem çalışmamın bilimsel kalitesinin artmasında hem de bu sürecin başarıyla tamamlanmasında çok önemli rol oynadı.

Bu zorlu süreçte her zaman yanımda olan, sonsuz sabrı ve anlayışıyla bana destek veren, motivasyonumu hiç kaybetmememi sağlayan sevgili eşim Fatıma Hacer KURTOĞLU BABAYEV'e en içten teşekkürlerimi sunarım. Onun desteği, anlayışı ve cesaretlendirmesi olmasaydı bu tezi tamamlamam çok daha zor olurdu.

Son olarak, bu uzun ve yorucu süreçte her zaman yanımda olan, maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen sevgili aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Onların anlayışı ve cesaretlendirmesi, bu tezi tamamlamamda en büyük motivasyon kaynağım olmuştur.

Huseyn BABAYEV

Bolu, 2024



1. GİRİŞ

Modern tıbbın karşı karşıya kaldığı en dikkat çekici epidemiyolojik dönüşümlerden biri, immünolojik rahatsızlıkların küresel ölçekte gösterdiği dramatik yükseliştir. Günümüzde bir milyarı aşkın insanın yaşam kalitesini etkileyen bu fenomen, özellikle endüstrileşmiş toplumlarda belirgin bir görünüm sergilemekte ve gelişmekte olan ülkelerde de modernleşme sürecine paralel olarak ivme kazanmaktadır (Akdis, 2021).

İnsan vücudunun doğal savunma mekanizmalarında kilit bir role sahip olan epitelyal bariyerler, deri ve mukozal dokularda adeta bir kalkan görevi görerek çevresel tehditler karşısında organizmanın homeostazını korumaktadır. Bu hassas dengenin bozulması, modern çağın yaygın rahatsızlıkları olan astımdan atopik dermatite, alerjik rinitten enflamatuvar bağırsak hastalıklarına uzanan geniş bir yelpazedeki immünolojik bozuklukların tetikleyicisi olabilmektedir (Akdis, 2021).

Tarihsel perspektiften bakıldığında, alerjik rahatsızlıkların 19. yüzyıl öncesindeki görece nadir varlığı dikkat çekicidir. İlk sistematik saman nezlesi vakalarının tıbbi literatüre girişi, 1800'lerin başlarına tekabül etmektedir (Blackley, 1873; Bostock, 1819). Müteakip dönemde, özellikle tarımsal modernizasyon ve artan polen maruziyetiyle eşzamanlı olarak alerjik rinit vakalarında kayda değer bir artış gözlemlenmiştir (Platts-Mills, 2015). 1960'lar sonrasında astım ve atopik dermatit vakalarındaki epidemik artış, bu eğilimin dramatik bir tezahürü olmuştur (Eder vd., 2006). Yeni milenyumla birlikte, gıda alerjileri, eozinofilik özofajit ve ilaç kaynaklı anafilaksi vakalarında gözlemlenen belirgin yükseliş, bu kompleks tabloyu daha da çarpıcı hale getirmektedir (Willits vd., 2018).

Astım, günümüz tıbbının karşı karşıya kaldığı en karmaşık solunum sistemi rahatsızlıklarından biridir. Bu kronik hastalık, hava yollarında meydana gelen enflamasyon, aşırı duyarlılık reaksiyonları ve yapısal değişiklikler ile kendini göstermekte olup, global ölçekte milyonlarca insanın yaşam kalitesini etkilemektedir. Modern tıp biliminin kaydettiği önemli ilerlemelere ve yoğun araştırma çabalarına rağmen, astımın kökeninde yatan nedensel mekanizmalar ve hastalığın gelişim süreci halen tam anlamıyla aydınlatılamamıştır. Bu durum, hastalığın etkin kontrolünü zorlaştıran başlıca faktörlerden biri olmaya devam etmektedir.

Bilimsel literatürde astım üzerine yapılan konvansiyonel araştırmalar, uzun süre boyunca genetik predispozisyon, çevresel tetikleyiciler ve immün sistem disfonksiyonları üzerinde yoğunlaşmıştır. Ancak son dönemde ortaya çıkan bilimsel veriler, insan mikrobiyomunun — vücudumuzda yaşayan mikroorganizmaların genetik materyallerinin toplamının — astımın patogeneğinde ve progresyonunda beklenenden çok daha kritik bir role sahip olduğunu işaret etmektedir. Mikrobiyom, immünolojik modülasyondan metabolik fonksiyonlara uzanan geniş bir yelpazede fizyolojik süreçleri etkileyerek, hastalığın seyrinde belirleyici bir faktör olarak öne çıkmaktadır.

Metagenomik alanındaki teknolojik yenilikler, mikrobiyoloji araştırmalarında çığır açıcı bir dönüşümü beraberinde getirmiştir. Geleneksel kültürleme yöntemlerinin sınırlamalarını aşan bu yeni yaklaşımlar, mikrobiyal toplulukların derinlemesine ve bütüncül analizine imkan tanımaktadır. Astım araştırmalarında mikrobiyom çalışmaları başlangıçta bağırsak ve solunum yolu florasına odaklanmış olsa da, bilimsel ilgi giderek serum mikrobiyomunun keşfine yönelmektedir.

Dolaşım sisteminde tespit edilen mikrobiyal DNA fragmanları ve hücre dışı veziküller, organizmanın genel sağlık durumu ve hastalık süreçlerinde mikroorganizmaların sistemik etkilerini yansıtan değerli biyolojik göstergeler olarak değerlendirilmektedir. Bu bağlamda serum metagenomiği, minimal invaziv karakteri ile astım patogeneğinde sistemik mikrobiyomun rolünü aydınlatmada yenilikçi bir araştırma platformu sunmaktadır. Astım tanısı almış bireylerin serum mikrobiyom profillerinin sağlıklı kontrol gruplarıyla karşılaştırmalı analizi, hastalığa özgü mikrobiyal imzaların tanımlanmasına olanak sağlamaktadır.

Bu sistematik karşılaştırmalı yaklaşım, mikrobiyal kompozisyon ve fonksiyonel potansiyeldeki farklılıkları ortaya çıkararak, astımın patofizyolojisine dair yeni içgörüler sunma potansiyeli taşımaktadır. Bu bilimsel keşifler, yalnızca hastalığın moleküler mekanizmalarını aydınlatmakla kalmayıp, aynı zamanda yeni tanısal biyobelirteçlerin ve terapötik hedeflerin belirlenmesine de zemin hazırlamaktadır. Çalışmamız, gelişmiş shotgun metagenomik sekanslama teknolojilerini kullanarak serum mikrobiyomunun kapsamlı karakterizasyonunu hedeflemektedir.

1.1 Astım

Astım patogeneğinde enflamasyon ve hava yolu hiperreaktivitesi santral rol oynar. Klinik manifestasyonları arasında bronkokonstriksiyona bağlı öksürük, wheezing, dispne ve göğüste ağrı bulunur. Bu heterojen solunum yolu patolojisi, çeşitli immünolojik ve enflamatuvar mekanizmaların etkileşimi sonucu ortaya çıkar.

Son üç dekatın araştırmaları, astımın fenotipik ve endotipik varyasyonlarını aydınlatmıştır. Bu moleküler ve klinik sınıflandırmalar, hassas kişiselleştirilmiş tıbbi yaklaşımıyla tedavi edici stratejilerin optimizasyonuna olarak sağlamıştır(Agache & Akdiş, 2019). Hastalığın etiyolojisinde çevresel maruziyetler, genetik polimorfizmler ve epigenetik modifikasyonlar gibi multifaktöriyel determinantlar rol oynar. Bu faktörlerin kompleks etkileşimi, astımın klinik çeşitliliğini ve terapötik yanıt değişkenliğini açıklar (Olafsdottir vd., 2020).

Global epidemiyolojik veriler, astım prevalans ve insidansında progresif artış göstermektedir. Bu trend, patofizyolojik mekanizmalar, predispozan faktörler ve inovatif terapötik modaliteler üzerine araştırmaların intensifikasyonunu gerekli kılmaktadır (E. A. Mitchell, 1985).

1.1.1. Astım Gelişiminde Epidemiyoloji ve Risk Faktörleri

Epidemiyolojik araştırmalar astımın küresel prevalansındaki yükselişi bilimsel verilerle doğrulamaktadır. İsveç'te yürütülen longitudinal bir çalışmada, Borna ve ekibi 2008-2016 periyodunda özellikle 16-25 yaş kohortunda astım insidansında belirgin bir artış saptamıştır (Borna vd., 2019). Solunum semptomlarındaki paralel yükseliş, hastalığın suboptimal tanı oranlarına işaret etmektedir.

Pediyatrik popülasyonda astım prevalansı yaş segmentasyonuna göre varyasyon göstermektedir. Branco ve arkadaşlarının çalışması, prevalansın okul öncesi dönemde %4.4, ilkokul döneminde %6.4 olduğunu ortaya koymuştur (Branco vd., 2020). Kentsel-kırsal lokalizasyon farkı gözlenmezken, ebeveyn astım öyküsü ve bebeklik döneminde antibiyotik maruziyeti risk faktörleri olarak tanımlanmıştır.

Liu ve ekibinin Danimarka'da gerçekleştirdiği popülasyon bazlı kohort çalışması, maternal hipotiroidizm ile pediatrik astım arasında anlamlı korelasyon tespit etmişlerdir (Liu vd., 2017). Gebelik döneminde tiroid hormon replasmanı almayan annelerin çocuklarında bu risk daha belirgindir.

Cinsiyet dimorfizmi astım epidemiyolojisinde önemli bir parametredir. Ödling ve arkadaşlarının çalışmasında İsviçre adolesan kohortunda, astım prevalansı ve kontrolsüz hastalık oranı kadınlarda baskın olduğu gösterilmiştir (Ödling vd., 2018). Puberte öncesi erkeklerde predominanstan puberte sonrası feminen predominansa geçiş, özellikle rinokonjonktivit komorbiditesinde belirgindir.

Komorbiditeler astımın klinik seyrini modifiye eder. ACOS prevalansı erişkin başlangıçlı astımda %6.6'dır (W. Wang vd., 2018). Alerjik rinit birlikteliğinin olması bütünleşik havayolu konseptini destekler.

Obezite-astım ilişkisinde Sharma ve ekibi (2019) adipokinler, sitokinler ve yağ asitlerinin makrofaj polarizasyonu üzerinden patogenezdaki rolünü tanımlamıştır (Sharma & Tripathi, 2019). Ek olarak psikiyatrik Hastalığın bulunması hastalık şiddetiyle pozitif korelasyon gösterir. Finlandiya kohort verilerine göre KOAH, respiratuvar neoplaziler ve kardiyovasküler hastalıklar mortaliteyi artırırken, alerjik rinit mortalitede azalma fakat morbiditede artışla ilişkilidir.

1.1.2. Astımla İlişkili Genlerdeki Son Gelişmeler

Astımın moleküler patogenezinde genetik determinantlar primer rol oynar. 17q21 lokusundaki polimorfik varyantlar pediatrik astım fenotipiyle güçlü korelasyon gösterir. Farzan ve ekibinin araştırması, inhale kortikosteroid tedavisine rağmen alevlenme riskini artıran spesifik 17q21 polimorfizmlerini identifiye etmiştir (Farzan vd., 2018). rs7216389 SNP'sinin etnik gruplar arasında heterojen dağılım gösterdiği, Doğu Asya, Afrika-Amerikan ve Hispanik popülasyonlarda daha yüksek frekans sergilediği saptanmıştır.

17q21 lokalizasyonundaki ORMDL3 geni astım patogenezinde kritik fonksiyon gösterir. Astımlı bireylerde ORMDL3 ekspresyonu ve rs8076131 gibi SNP'lerin frekansı kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede yüksektir. Gorlanova ve arkadaşlarının çalışması, 17q21 risk alelleri taşıyan infantlarda laktasyonun

respiratuvar semptomlara karşı koruyucu etki gösterdiğini ortaya koyarak genç çevre etkileşimlerinin önemini vurgulamıştır (Gorlanova vd., 2018). İnterlökin-1 reseptör-benzeri 1 (ST2) genindeki polimorfizmler, pediatrik ve adolesan popülasyonda ICS etkinliğini module eder. Genom-wide association çalışmaları astımla ilişkili yeni risk varyantları ve lokuslarını saptayarak hastalığın kompleks genetik temellerini aydınlatmıştır.

1.1.3. Astım Gelişimindeki Moleküler Mekanizmalar

İmmünolojik perspektiften astımın patofizyolojisi kompleks mediyatör sistemlerini kapsar. Tip 2 astımda, Th2 lenfositleri ve ILC2'ler enflamatuvar kaskadın koordinasyonunda santral rol oynar ve IL-5, IL-9, IL-13 gibi proinflamatuvar sitokinlerin sekresyonunu regüle eder. Braga ve arkadaşlarının tek hücre analiz metodolojisiyle gerçekleştirdiği araştırma, bronşiyal epitelyumda Th2 hücrelerinin yapısal ve enflamatuvar hücrelerle interaksiyonlarını detaylı şekilde karakterize etmiştir (Braga vd., 2019).

Protein S'nin antiinflamatuvar özellikleri alerjik astım modellerinde gösterilmiş olup, Th2 sitokin ekspresyonunu ve bronşiyal hiperreaktivitesini baskıladığı gösterilmiştir. Sisteamin ise Th2/Th17 hücre popülasyonlarını aşağı-regüle ederek bronşiyal hiperreaktiviteyi inhibe eder.

Tip 2 olmayan astım fenotipinde nötrofilik enflamasyon ve Th17 yanıtları predominanttır. Ro ve ekibinin araştırması, lökotrien B4 reseptörleri BLT1 ve BLT2'nin nötrofil-aracılı pulmoner enflamasyondaki rolünü ortaya koymuş ve IL-17'nin BLT1/2 sinyal yolağı üzerinden sentezinin kritik önemini vurgulamıştır (M. J. Ro vd., 2019).

1.1.4. Yeni Moleküller ve Yolaklar

IL-4 ve IL-13'ün kritik sitokinleri, IL-4R α reseptör subunitini paylaşarak tip 2 astım patogenezi indükler. IL-4R α blokajı, alerjene duyarlı murin modellerinde bronşiyal hiperreaktivite, eozinofili ve goblet hücre metaplazisini efektif şekilde inhibe eder.

IL-33, mastosit aktivasyonu ve astım alevlenmelerinde anahtar rol oynar. Ro ve ekibinin çalışmaları, "MyD88-5-LO-BLT2-NF- κ B" sinyal kaskadının IL-33

aracılı IL-13 sentezinde mastositlerde kritik fonksiyon gösterdiğini ortaya koymuştur(M. Ro vd., 2017).

IL-37 ve Chit1 (chitotriosidase) molekülleri alerjik enflamasyon ve Treg hücre regülasyonunda fonksiyoneldir. M-MDSC'lerin (monositik miyeloid-derive supresör hücreler) T hücre yanıtlarını module etme kapasitesi, astım patogeneğinde yeni mekanistik perspektifler sunmaktadır.

DP2 (prostaglandin D2 reseptör 2) ve CSF1R (koloni stimulan faktör 1 reseptörü) gibi reseptörler astım patogeneğinde rol oynayarak potansiyel terapötik hedefler olarak öne çıkar. Seramid/sphingosine-1-fosfat rasyosu, eozinofilik ve nötrofilik enflamasyon paternlerini yansıtarak astım endotiplerinin diskriminasyonunda biomarker olarak değerlendirilebilir.

1.1.5. Obeziteye Bağlı Astımda Moleküler Mekanizmalar

Adipozite ile ilişkili astım patogenezi özgün mekanistik yollarla karakterizedir. Obez astım hastalarında, artmış arginaz ekspresyonu ve aktivitesi dökümanite edilmiştir. Bu bulgu, arginaz inhibitörlerinin potansiyel terapötik etkinliğini işaret eder.

Choi ve ekibinin araştırmaları, seramid düzeylerindeki artışın obez murin modellerinde bronşiyal hiperreaktivite ve enflamasyonu potansiyelize ettiğini göstermiştir (Choi vd., 2020). Bu çalışma, seramid sentaz 6'yı yeni terapötik hedef olarak saptamıştır.

1.1.6. Astım Teşhisi, Hassas Tıp ve Biyobelirteçler

Astımın optimal klinik yönetimi, akuratif diagnostik ve monitorizasyon stratejilerine dayanır. Branco ve ekibinin pediatrik popülasyonda %1.3 oranında teşhis edilememiş astım tespit etmesi, hastalığın suboptimal tanı oranlarını vurgulamaktadır (Branco vd., 2020).

Kişiselleştirilmiş tıp yaklaşımında fenotip ve endotiplerin karakterizasyonu esastır. Postma ve arkadaşları (2019) küçük hava yolları disfonksiyonunu (SAD) değerlendiren klinik skor sistemini geliştirmiş ve SAD'nin tüm astım spektrumunda, özellikle ağır astımda baskın olduğunu ortaya koymuşlardır (Postma vd., 2019).

Biomarkerler astım yönetiminde kritik önem taşırlar. Eozinofil düzeyleri tip 2 astımın hassas indikatörüdür; periferik kan ve balgam eozinofil miktarı, IL-5 veya IL-4/IL-13 antagonistlerinin tedavi etkinliğini tahmin etmeyi sağlar. FeNO yüksekliği tip 2 enflamasyon ve alevlenme riskini yansıtır.

Omik teknolojileri moleküler fenotipleme kapasitesini genişletir. Ivanova ve ekibinin genomik, transkriptomik ve proteomik analizleri, astımın bireylerarası çeşitlilik ve farklılığını ortaya koymuştur (Ivanova vd., 2019).

eNose teknolojisiyle verilen nefesin analizi, astım kontrolünün non-invaziv bir yöntemle izlenmesine imkan tanımıştır (Abdel-Aziz vd., 2020). Araştırmalar, eNose teknolojisinin, kontrolsüz astımın tanınması ve tedavi çeşitliliğine katkı sağladığını ortaya koymuştur.

1.1.7. Astım Endotipleri Tarafından Yönlendirilen Yeni Tedaviler

Hedefli terapötik yaklaşımlar, ağır astımın klinik yönetiminde önemli bir paradigma değişikliği yaratmıştır. Bu bağlamda, IgE antagonisti omalizumab, IL-5 inhibitörleri (mepolizumab ve reslizumab), IL-5R α blokeri benralizumab ve IL-4R α antagonisti dupilumab gibi biyolojik tedaviler, astımın kontrolü ve alevlenmesini baskılamada etkinlik göstermiştir (Agache vd., 2020; Humbert vd., 2019). Omalizumab, özellikle alerjik astımda, yüksek IgE seviyeleri olan hastalarda etkili bir tedavi seçeneği olarak öne çıkmaktadır (Braunstahl vd., 2013; Canonica vd., 2018). Klinik çalışmalar, bu biyolojik tedavilerin, astım semptomlarını kontrol etme ve hastalık progresyonunu yavaşlatma konusundaki potansiyelini ortaya koymuştur (Bälgrädean vd., 2021).

Biyomarker-bazlı hasta seleksiyonu, optimum terapötik yanıt için kritik bir öneme sahiptir. Örneğin, benralizumab, yüksek periferik eozinofili ve nazal polipozisli hastalarda üstün etkinlik göstermektedir (Humbert vd., 2019; Tepetam vd., 2023). Ayrıca, omalizumabın etkinliği, belirli biyomarkerler (örneğin, kan eozinofil sayısı, kan IgE seviyeleri) ile ilişkilendirilmiştir, bu da kişiselleştirilmiş tedavi stratejilerinin geliştirilmesine olanak tanımıştır (J. Li vd., 2020). Bu tür bir yanıt belirleme, sağlık hizmetleri maliyetlerinin optimizasyonuna da katkıda bulunmaktadır (Agache vd., 2020).

Alerjen-spesifik immünoterapinin (AIT) alerjik astımda tek nedensel tedavi yöntemi olarak önemi devam etmektedir. AIT yönteminin, özellikle pediatri

popülasyonda semptom kontrolünü ve hastalık ilerlemesinin, değişim potansiyeli, yapılan klinik çalışmalarla ortaya konulmuştur (Božek vd., 2023; Filippo vd., 2022). Yeni aşı formülasyonları ve optimize edilmiş uygulama protokolleri, bu alandaki araştırmaların odak noktası haline gelmiştir (Božek et al., 2023). AIT'nin biyolojik tedavilerle kombinasyonu, tedavi potansiyelinin artmasına olanak tanımıştır (Božek vd., 2023; Filippo vd., 2022).

Non-farmakolojik müdahaleler, eğitim ve öz yönetim programları, astım tedavi algoritmasının önemli bileşenleridir. Sistematik incelemeler, bu yaklaşımların metodolojik standardizasyonunun önemini vurgulamaktadır (Bailey vd., 2010; Zairina vd., 2014). Eğitim programları, hastaların kendi durumlarını yönetmelerine yardımcı olma amacı taşırken, bu tür müdahalelerin etkinliği, sağlık sonuçlarını iyileştirmede de önemli bir rol oynamıştır (Bailey vd., 2010).

Sonuç olarak, astım araştırmaları, epidemiyoloji, genetik, çevresel risk faktörleri, moleküler mekanizmalar ve terapötik stratejiler konularında sürekli bir bilgi akışı sağlamaktadır. Fenotip-endotip karakterizasyonu, kişiselleştirilmiş tıbbi yaklaşımlarını optimize ederek klinik sonuçlarda iyileşme sağlamaktadır (Agache vd., 2020; Humbert vd., 2019). Hedefli biyolojik tedavilerin ve yeni biyomarkerların geliştirilmesi, hastalık kontrolü ve sağlık hizmetleri üzerindeki yükün azaltılması açısından umut verici perspektifler sunmaktadır (Tajiri vd., 2023). Astımın karmaşık patofizyolojisi ve mikrobiom-viral enfeksiyonlar gibi faktörlerle etkileşimlerinin anlaşılması, gelecekteki terapötik yöntemlerin optimizasyonu için kritik öneme sahiptir (Humbert vd., 2019; Trischler vd., 2021).

1.1.8. Astımda epitelyal bariyer

Solunum sistemi epitelyal bariyeri, organizmanın patojenler, alerjenler ve çevresel kirleticilere karşı primer defans mekanizması olarak işlev göstermektedir. Astım patogenezinde, epitelyal bariyer bütünlüğünün ve fonksiyonlarında gözlenen dejenerasyon, permeabilitede belirgin bir artışa yol açmakta; bu durum alerjen ve mikroorganizmaların bronşiyal submukozal dokulara penetrasyonunu kolaylaştırmaktadır. Söz konusu epitelyal disfonksiyon, çevresel ajanların doku penetrasyonunu artırarak immünolojik yanıtların artmasına ve enflamatuvar kaskadın aktivasyonuna sebebiyet vermekte, böylece hastalığın progresyonuna

önemli ölçüde katkıda bulunmaktadır. Bu bağlamda, epitelyal bariyer fonksiyonunun restorasyonu ve güçlendirilmesi, astım tedavisinde potansiyel bir tedavi seçeneği olarak değerlendirilmektedir.

1.1.9. Hava Yolu Epitelinin Yapısı ve İşlevi

Bronşiyal epitelyum; siliyer, goblet, bazal ve clara hücrelerini içeren heterojenik hücre popülasyonlarından oluşan psödostratifye, siliyer ve mukosiliyer karakterde bir dokusal organizasyona sahiptir. Bu sofistike hücresel mimari, mukosiliyer klirens mekanizması, muköz sekresyon ve zonula okludens, zonula adherens, macula adherens ve gap junction komplekslerini kapsayan bariyer fonksiyonları aracılığıyla havayolu homeostazının idamesinde kritik rol oynamaktadır (A. M. Davies vd., 2014). Fiziksel bariyer fonksiyonu, ekzojen sağlığa zararlı ajanların transmukozal transportunu inhibe eden adezyon komplekslerine dayanmaktadır. Klaudin, okludin ve zonula okludens-1 (ZO-1) proteinlerinden müteşekkil tight junction kompleksleri, epitelyal hücreler arasındaki paraselüler aralığın oklüzyonunu sağlamaktadır (Xiao, 2013). E-kaderin ve kateninleri ihtiva eden adherens junction yapıları ise ilave mekanik stabilizasyon ve sinyal transdüksiyon fonksiyonları temin etmektedir (Yuksel et al., 2015). Bu junction kompleksleri kolektif olarak epitelyal bütünlüğü muhafaza etmekte ve permeabiliteyi regüle etmektedir.

1.1.10. Epitelyal Bariyer Teorisi

"Epitelyal bariyer hipotezi", endüstrileşmenin ve çağdaş yaşam modellerinin beraberinde getirdiği çevresel değişikliklerin, epitelyal bariyerlere zararlı etki gösteren ajanlara yoğun bir şekilde maruziyet olduğu ve bunun sonucunda kronik enflamatuvar hastalıkların insidansında gözlenen artışa katkı sağladığı kabul edilmiştir (Akdis, 2021). Bu hipotez, mikrobiyal maruziyetin ve mikrobiyotal kompozisyonun immünolojik regülasyon ve hastalık patogenezindeki rolünü vurgulayan hijyen hipotezi, "eski dostlar" hipotezi ve biyodiversite hipotezi gibi önceden var olan teorilerin kapsamını genişletmektedir (Haahtela vd., 2013; Rook vd., 2004).

Burada, çevresel faktörlerin epitelyal bariyer disfonksiyonuna katkısının mekanistik bazını, bu tür disfonksiyonların immünolojik devamlılığı ve bariyer bozulması ile muhtelif kronik hastalıkların patogenezi arasındaki korelasyonu

irdelemektedir. Buna ilaveten, epitelyal bariyer fonksiyonunun restorasyonunu ve hastalık başlamasının önlenmesini hedefleyen potansiyel terapötik yöntemler ele alınmaktadır.

Diabetes mellitus, obezite, romatoid artrit, multipl skleroz ve çölyak hastalığı gibi otoimmün ve metabolik hastalıkların prevalansında 1960'lardan bu yana anlamlı bir artış gözlenmektedir(Bach, 2002). Bu epidemiyolojik eğilimler, endüstrileşme ve modernizasyon ile ilişkili faktörlerin söz konusu hastalıkların insidansındaki artışa katkıda bulunduğuna işaret etmektedir.

Epitelyal bariyer hipotezi, endüstrileşme ve kentleşmeye sekonder gelişen çevresel değişimlerin indüklediği epitelyal bariyerlere hasar verici etki gösteren ajanlara artmış ekspozisyonun, alerjik, otoimmün ve diğer kronik kondisyonlardaki artışın etyopatogenezinde rol oynadığını öne sürmektedir (Akdis, 2021). Hipotez, epitelyal bariyer disfonksiyonunun mikrobiyal disbiyozis ve bakteriyel translokasyona yol açarak immünolojik yanıtları ve kronik enflamasyonu tetiklediğini iddia etmektedir.

Bu teorik yaklaşım, tip 2 enflamatuvar hastalıkların patogenezinde epitelyal bariyer disfonksiyonunun rolüne odaklanan önceden var olan bariyer hipotezinin kapsamını genişletmektedir (Pothoven & Schleimer, 2017). Genişletilmiş hipotez, yalnızca alerjik hastalıkları değil, aynı zamanda otoimmün ve metabolik durumların yanı sıra epitelyal bariyer bozulması ve mikrobiyal disbiyozis ile potansiyel birliktelik gösteren nöropsikiyatrik bozuklukları da kapsamaktadır.

1.1.11. Epitel Bariyer Hasarına Neden Olan Ajanlar

Endüstriyalizasyon ve modern yaşam tarzlarının bir sonucu olarak ortaya çıkan multipl çevresel ajanların epitelyal bariyerlere zararlı etkileri dokümanite edilmiştir. Öncelikli olarak, evde kullanıma yönelik deterjanlar ve sürfaktanlar önemli bir risk faktörü teşkil etmektedir. Çamaşır deterjanları, bulaşık yıkama solüsyonları ve ev temizlik ürünlerinde yaygın olarak kullanılan sodyum dodesil sülfat ve sodyum dodesilbenzensülfonat gibi sürfaktanların, epitelyal hücrelerdeki tight junction komplekslerinin düzensizliğine sebebiyet verdiği gösterilmiştir (M. Wang vd., 2019). Söz konusu ajanların dilüe formlarının dahi kutanöz ve respiratuvar epitelyal bariyerlerde kırılmalara yol açtığı ortaya konulmuştur (Xian vd., 2016).

Hazır gıda ürünlerinde yaygın olarak kullanılan karboksimetilselüloz ve polisorbitat-80 gibi emülsifiyan ajanlar, intestinal permeabiliteyi potansiyelize ederek bakteriyel translokasyonu kolaylaştırır (Roberts vd., 2013). Bu kimyasal ajanlar, deterjanlarla benzer mekanizmalar üzerinden intestinal bariyer bütünlüğünü bozmaktadır.

Atmosferik kontaminantlar da epitelyal bariyerler üzerinde önemli deleteriyöz etkiler göstermektedir. Partiküler matter, dizel egzoz partikülleri, ozon, nanopartiküller ve mikroplastiklerin respiratuvar epitelyal bariyerlerde indüklediği hasar net bir şekilde ortaya konmuştur (Caraballo vd., 2011; Jin vd., 2019). Bu polütanlara maruziyet, astım ve kronik obstrüktif pulmoner hastalık (COPD) gibi respiratuvar patolojilerin insidansındaki artışla korelasyon göstermektedir.

Alerjenler ve patojenler de epitelyal bariyer disfonksiyonunda rol oynamaktadır. Ev tozu akarları ve polenlerden derive olan spesifik alerjenlerin, epitelyal bariyerleri dezorganize eden intrinsik proteolitik aktiviteye sahip oldukları tespit edilmiştir (Leino vd., 2013). *Staphylococcus aureus* gibi patojenik mikroorganizmalar, epitelyal hücrelerde hasara ve enflamatuvar yanıtların amplifikasyonuna yol açan toksinler ve enzimatik faktörler üretmektedir (Bachert vd., 2001).

Modern yaşam tarzı faktörleri de epitelyal bariyer fonksiyonlarının değişiminde önem arz etmektedir. Tütün kullanımının respiratuvar epitelyumdaki tight junction komplekslerini bozduğu ettiği gösterilmiştir (Aghapour vd., 2018). Buna ilaveten, yüksek lipid içerikli diyet paternleri ve antibiyotik kullanımı intestinal mikrobiyotayı değişime uğratarak intestinal bariyer fonksiyonlarını baskılamaktadır (Raybould, 2012).

1.1.12. Epitel Bariyerlerinin Düzenlenmesi

Epitel bariyerler, fiziksel, kimyasal ve immünolojik bileşenlerden oluşan karmaşık yapılardır. Epitel hücreler arasındaki sıkı bağlantılar (TJ'ler) ve adherens bağlantıları paraselüler geçirgenliği düzenlerken, mukus tabakaları ve antimikrobiyal peptitler patojenlere karşı ek koruma sağlar (Akdis, 2021).

1.1.13. Bağışıklık Yanıtlarında Epitel Hücrelerinin Rolü

Epitelyal hücreler, sitokinler, kemokinler ve antimikrobiyal peptidlerin sekresyonu yoluyla immünolojik yanıtlara aktif katılım göstermektedir. Bu

hücreler, patojen-asosiy moleküler paternlerin (PAMP'lar) pattern recognition reseptörleri (PRR'ler) aracılığıyla tanımayı sağlayarak doğal immün yanıtın aktivasyonunu indükleyebilmektedir (Peterson & Artis, 2014).

Epitelyal bariyer disfonksiyonu, subepitelyal kompartmanda lokalize olan immün hücrelerin çevresel antijenlere ve mikrobiyal ajanlara maruziyetine sebebiyet vererek anormal immün aktivasyonunu tetiklemektedir. Bu patolojik süreç, kronik enflamasyon ve doku bozulması ile sonuçlanabilmektedir. Bu bağlamda, intestinal bariyer permeabilitesindeki artış, lipopolisakkarit (LPS) gibi mikrobiyal ürünlerin translokasyonunu kolaylaştırarak sistemik enflamasyonun artmasına ve insülin rezistansının gelişimine katkıda bulunmaktadır (Cani vd., 2007).

1.1.14. Mikrobiyal Disbiyoz ve Translokasyon

Epitelyal bariyerlerin bozulması, mikrobiyal disbiyozise, diğer bir deyişle mikrobiyotal kompozisyonda homeostazın bozulmasına sebebiyet verebilmektedir. Bu disbiyotik durum, fırsatçı patojenlerin proliferasyonunu ve bakteriyel organizmaların ve metabolitlerinin subepitelyal kompartmanlara translokasyonunu kolaylaştırabilmektedir (Akdis, 2021). Bakteriyel translokasyon fenomeni, immünolojik yanıtları stimüle ederek enflamatuvar kaskadın aktivasyonuna ve hastalık gelişimine katkıda bulunmaktadır.

Mikrobiyal disbiyozis, multipl kronik patolojilerle birlikteliği göstermektedir. İnflamatuvar bağırsak hastalığında (İBH), intestinal mikrobiyotadaki disbiyotik değişiklikler, mikrobiyal çeşitlilikte azalma ve değişime uğramış mikrobiyal kompozisyon ile karakterize bir patern sergilemektedir (Xavier & Podolsky, 2007). Obesite ve metabolik sendrom patogeneğinde, intestinal mikrobiyotal kompozisyondaki modifikasyonların insülin rezistansı ile korelasyon gösterdiği ortaya konulmuştur (Cani vd., 2007). Bu disbiyotik süreç, intestinal permeabilite artışını ve sistemik enflamasyonu potansiyelize etmektedir.

Otoimmün durumlar açısından değerlendirildiğinde, disbiyozis ve bariyer disfonksiyonunun, romatoid artrit ve multipl skleroz gibi otoimmün patolojilerin patogeneğinde rol oynadığı kabul edilmektedir (Scher & Abramson, 2011).

İmmünolojik yanıtlar da epitelyal bariyer fonksiyonlarının ortama uyum sağlamasında kritik rol oynamaktadır. Özellikle interlökin-4, interlökin-5 ve

interlökin-13 sitokinlerinin baskın olduğu Tip 2 immün yanıtlar bu bağlamda önem arz etmektedir. Söz konusu sitokinler, tight junction protein ifadesinin modülasyonu ve müköz sekresyonunun stimülasyonu yoluyla epitelyal bariyer fonksiyonlarını baskılayabilmektedir (Akdis, 2021).

Tip 2 immün yanıtlar, helmintik enfestasyonlara ve toksik ajanlara karşı savunma mekanizmalarında esansiyel rol oynamakla birlikte, düzensizliği durumunda patolojik süreçlere katkıda bulunmaktadır. Alerjik kondisyonlarda, persistan tip 2 enflamasyon, bariyer onarım mekanizmalarını inhibe ederek irreversible bariyer disfonksiyonuna ve kronik enflamasyona sebebiyet vermektedir (Wawrzyniak vd., 2017).

Epitelyal bariyer disfonksiyonu, *Staphylococcus aureus* gibi fırsatçı patojenlerin kolonizasyonunu kolaylaştırmaktadır. İmmün sistem bu duruma hem doğal hem de kazanılmış mekanizmalarla yanıt vermektedir; ancak bu immünolojik yanıt patojenin eradikasyonunda yetersiz kalabilmekte ve kronik enflamatuvar sürecin devamlılığına yol açabilmektedir. *S. aureus* kolonizasyonu, atopik dermatit ve kronik rinosinüzit gibi patolojilerde baskın bir rol almaktadır. Bu mikroorganizma, T lenfositlerini aktive eden ve enflamatuvar yanıtları çoğaltan süperantijenlerin üretimini gerçekleştirmektedir (Bachert vd., 2001). *S. aureus*'a spesifik IgE antikorlarının titreleri hastalık şiddeti ile pozitif korelasyon göstermektedir.

Epitelyal bariyer disfonksiyonu, çeşitli kronik hastalık patogenezinde önemli rol oynamaktadır. Alerjik ve inflamatuvar bağırsak hastalığı gibi durumlarda, lokal bariyer defektleri etkilenen dokularda direkt patolojik değişikliklere sebebiyet vermektedir. Tip 1 diabetes mellitus, romatoid artrit ve multipl skleroz gibi sistemik patolojilerde ise bariyer disfonksiyonu hastalık patogenezinin anlamlı katkıda bulunmaktadır. Buna ilaveten, Alzheimer hastalığı ve otizm spektrum bozuklukları gibi nörolojik ve psikiyatrik durumlarda, bariyer disfonksiyonu ve mikrobiyal disbiyozisin hastalık patogenezinde potansiyel rol oynadığı öne sürülmektedir.

1.1.15. Lokal Bariyer Defektleri ile Seyreden Kronik Hastalıklar

Alerjik durumlarda, kutanöz ve mukozal dokulardaki epitelyal bariyer disfonksiyonu, lokal enflamatuvar yanıtların indüksiyonuna ve hastalık manifestasyonlarının ortaya çıkmasına sebebiyet vermektedir. Atopik dermatit

patogenezinde, filaggrin gibi bariyer protein ekspresyonundan sorumlu genlerdeki mutasyonlar, kutanöz bariyer fonksiyonlarının bozulmasına yol açmaktadır (Irvine vd., 2011). Deterjanlara maruziyet gibi çevresel faktörler, önceden var olan bariyer disfonksiyonunu arttırarak alerjen duyarlılığını potansiyelize edebilmektedir.

Respiratuvar sistemde gözlenen epitelyal bariyer disfonksiyonu, astım ve alerjik rinit patogenezinde kritik rol oynamaktadır. Çevresel polütanlar ve alerjenler, epitelyal bariyer bütünlüğünü bozarak alerjen ortaya çıkışını arttırıp immün aktivasyona yol açabilmektedir (Georas & Rezaee, 2014). İnflamatuvar bağırsak hastalığında ise, intestinal bariyer disfonksiyonu, luminal antijenlerin ve bakteriyel organizmaların translokasyonunu kolaylaştırarak immünolojik yanıtları ve kronik enflamasyonu tetiklemektedir (Xavier & Podolsky, 2007).

Epitelyal bariyer disfonksiyonu, immün aktivasyon ve enflamasyonun stimülasyonu yoluyla sistemik otoimmün ve metabolik patolojilerin patogenezinde de rol oynamaktadır. Tip 1 diabetes mellitus vakalarında, hastalık başlangıcından önce intestinal permeabilitede artış gözlenmiş olup, bu fenomenin hastalık patogenezinde kritik rol oynadığı tahmin edilmektedir (Bosi vd., 2006). Bariyer disfonksiyonu, pankreatik beta hücrelerine karşı otoimmün yanıtları indükleyebilecek mikrobiyal antijenlerin translokasyonunu kolaylaştırmaktadır.

Romatoid artrit, intestinal bariyer disfonksiyonu ve mikrobiyal disbiyozis önemli patogenetik faktörler olarak öne çıkmaktadır. Bakteriyel translokasyon, intestinal immün hücrelerin aktivasyonuna ve bu hücrelerin artiküler dokulara migrasyonuna sebebiyet vererek enflamatuvar yanıtları arttırabilmektedir (Tajik vd., 2020). Multipl sklerozda ise, atmosferik polütanlara ekspozisyon respiratuvar bariyerleri bozarak, santral sinir sistemine migrasyon gösteren immün hücrelerin aktivasyonunu indükleyebilmektedir (Odoardi vd., 2012). İntestinal bariyer disfonksiyonu ve disbiyozis de hastalık patogenezinde rol oynamaktadır (Camara-Lemarroy vd., 2020).

Obesite ve metabolik sendromda, bariyer disfonksiyonu ve mikrobiyal disbiyozis, sistemik enflamasyon ve insülin rezistansının patogenezinde katkıda bulunmaktadır (Cani vd., 2007). İntestinal permeabilitedeki artış, mikrobiyal ürünlerin translokasyonunu kolaylaştırarak ederek kronik enflamatuvar yanıtları potansiyelize etmektedir.

Alzheimer hastalığında, intestinal bariyer disfonksiyonu ve mikrobiyal disbiyozis nöroenflamasyona katkıda bulunmaktadır. Preklinik çalışmalar, serebral

patoloji belirtilerinden önce intestinal bariyer bozulması ve mikrobiyal translokasyon varlığını göstermiştir (Honarpisheh vd., 2020). Otizm spektrum bozukluklarında ise, pediatrik popülasyonda intestinal permeabilitede artış ve tight junction protein ekspresyonunda değişimler tespit edilmiştir (Fiorentino vd., 2016). Mikrobiyal disbiyozis ve sistemik enflamasyon nörolojik gelişim süreçlerini değişime uğratabilmektedir.

1.1.16. Bariyer Koruma ve Onarımı

Epitelyal bariyerlerin korunmasına ve restorasyonuna yönelik terapötik modaliteler multipl stratejileri kapsamaktadır. Atopik dermatit tedavisinde, kutanöz bariyer fonksiyonlarının restorasyonu amacıyla topikal emolyent uygulamaları önem arz etmektedir (Simpson vd., 2014). Bütirat ve histon deasetilaz inhibitörleri gibi tight junction komplekslerinin stabilizasyonunu ve bariyer reparasyonunu potansiyelize eden ajanlar da terapötik yaklaşımlar arasında yer almaktadır (Wawrzyniak vd., 2017).

Epitelyal bariyerlere bozucu etki gösteren deterjanlar, emülsifiye edici ajanlar ve çevresel polütanlara maruziyetini minimize etmek de koruyucu stratejiler arasında önemli bir yer tutmaktadır. Buna ilaveten, probiyotik ve prebiyotik ajanların verilmesi yoluyla faydalı mikroorganizmaların proliferasyonunun ve kolonizasyonunun arttırılması hedeflenmektedir. Diyet modifikasyonları perspektifinden değerlendirildiğinde, fiber içeriği yüksek ve prosese gıdalardan fakir beslenme paternleri, sağlıklı bir mikrobiyal ekosistemin idamesinde ciddi anlamda rol oynamaktadır.

Biyolojik ajanlar kategorisinde, astım ve atopik dermatit tedavisinde kullanılan anti-IL-4 ve anti-IL-13 monoklonal antikorları gibi bariyer disfonksiyonu ve enflamasyonda rol oynayan sitokinleri hedefleyen terapötik modaliteler yer almaktadır (Simpson vd., 2016).

Epitelyal bariyer hipotezi, endüstrileşme ve modern yaşam tarzlarının indüklediği çevresel değişiklikler bağlamında alerjik, otoimmün ve diğer kronik kondisyonlardaki insidans artışının anlaşılmasına yönelik birleşik bir hipotez öne sürülmektedir (Akdis, 2021). Bu hipotez, epitelyal bariyer bütünlüğünün kritik rolüne odaklanarak, bariyerlere olumsuz etki gösteren çevresel ajanların etkisini vurgularken, daha önce öne sürülen teorilerin entegrasyonunu sağlamaktadır.

Epitelyal bariyerlerin bozulması, mikrobiyal disbiyozis, immün aktivasyon ve kronik enflamasyona sebebiyet vererek multipl patolojilerin patogeneze katkıda bulunmaktadır. Bariyer fonksiyonlarının restorasyonunu, immünolojik yanıtların modülasyonunu ve olumsuz etki gösteren ajanlara maruziyetin azaltılmasını hedefleyen terapötik stratejiler, hastalıkların önlenmesi ve yönetimi açısından gelecek dönemlerin yaklaşımları olarak değerlendirilmektedir.

Gelecek dönem bilimsel araştırmalar, bariyer disfonksiyonunun moleküler mekanizmalarının açıklanması, bariyer bütünlüğünün değişimine yönelik güvenilir biyomarkerların geliştirilmesine ve epitelyal bariyerleri güçlendiren terapötik modalitelerin keşfine odaklanmalıdır. Halk sağlığı açısından, multipl kronik hastalıkların ana sebeplerini ortaya koyan düzenlemelerin hedefinde bariyerlere zarar veren çevresel ajanlara maruziyeti azaltmak yer almaktadır.

1.1.17. Astımda Epitel Bariyer Disfonksiyonu

Astmatik hastalarda bronşiyal epitelyumun, yapısal ve fonksiyonel anomaliler yer almaktadır. Epitelyal bariyer bütünlüğü, junction komplekslerinin yapısal bütünlüğünün bozulması, tight junction proteinlerinin tükenmesi ve adezyon moleküllerinin ekspresyon paternlerindeki değişimler nedeniyle baskılanmaktadır. Bu disfonksiyon, çevresel alerjenlerin, patojenik mikroorganizmaların ve atmosferik polütanların subepitelyal kompartmanlara penetrasyonunu kolaylaştırarak permeabilitede artışa sebebiyet vermekte, bu durum da enflamatuvar kaskat devreye girerek süreklilik sağlamaktadır (Georas & Rezaee, 2014; Holgate vd., 2004).

Astım patogenezinde rol oynayan alerjenlerin, klaudin, okludin ve ZO-1 gibi tight junction proteinlerinin ekspresyonunu baskılayarak tight junction komplekslerinin bütünlüğünün bozulmasına sebebiyet verdiği gösterilmiştir (Xiao vd., 2011). Benzer şekilde, adherens junction komplekslerinin esansiyel komponentleri olan E-kaderin ve β -katenin ekspresyon seviyeleri, astmatik epitelyumda sağlıklı kontrollere kıyasla anlamlı bir derecede azaldığı gözlenmiştir (Yuksel vd., 2021). Bu azalma, epitelyal bariyerin zararlı ajanlara karşı bariyer fonksiyonu görme özelliğini baskılamaktadır.

Konneksin proteinlerinden oluşmuş gap junction kompleksleri, interselüler iletişimi kolaylaştırmaktadır. Alerjik modellerde, konneksin 37'nin mRNA ve

protein ekspresyon seviyelerinde gözlenen azalma, epitelyal homeostazı ve onarıcı mekanizmaları modüle edebilmektedir (Xiao vd., 2011).

İntestinal kompartmandan sistemik sirkülasyona mikrobiyal translokasyon fenomeninin araştırılması, astım patogenezi üzerindeki potansiyel etkilerinin ortaya çıkarılması açısından kritik önem arz etmektedir. Mikrobiyal translokasyon, mikroorganizmaların veya metabolitlerinin intestinal lümeninden epitelyal bariyeri geçmesi ve sistemik sirkülasyona geçiş sürecini tanımlamaktadır. Bu fenomen, sistemik immünolojik yanıtların ve enflamatuvar kaskadın aktivasyonunu indükleyerek astım patogenezinin potansiyel katkıda bulunabilmektedir.

1.1.18. Bağırsak-Akciğer Ekseni ve Mikrobiyal Disbiyozis

İntestinal-pulmoner aksis, gastrointestinal sistem ve respiratuvar sistem arasındaki mikrobiyal metabolitler, immün hücre trafiği ve enflamatuvar mediyatörler aracılığıyla gerçekleşen iki yönlü iletişimi tanımlamaktadır (Song vd., 2024). İntestinal veya pulmoner kompartmanlardaki mikrobiyal ekosistemin homeostazının bozulması olarak tanımlanan disbiyozis, bu aksiyel iletişimi bozarak astımın klinik seyrini değiştirebilir.

1.1.18.1 Bağırsak Mikrobiyotası ve Bağışıklık Modülasyonu

İntestinal mikrobiyota, immün sistemin matürasyonunda ve regülasyonunda kritik bir rol oynamaktadır. Mikrobiyota, hem doğal hem de adaptif immün yanıtların gelişimsel süreçlerini modüle ederek, respiratuvar homeostazın sağlanmasında önemli bir etkiye sahiptir. Özellikle, bağırsak mikrobiyotasının metabolitleri, immün sistemin çeşitli hücre türleri üzerinde etkili olarak, bağışıklık yanıtlarını düzenlemekte ve bu süreçte hematopoezi desteklemektedir (Dang & Marsland, 2019; L. Wang vd., 2019). Bu bağlamda, kommensal mikroorganizmaların patojenik kaynaklı olmayan antijenlere karşı hipersensitivite reaksiyonlarını baskılayan eden tolerojenik bir immün sistemin kurulmasında elzem olduğu vurgulanmaktadır (Dang & Marsland, 2019; Goretzki vd., 2021).

Astmatik bireylerde, *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* gibi yararlı bakteriyel popülasyonların azalması ve *Candida* türleri gibi patojenik mikroorganizmaların proliferasyonu ile karakterize olan disbiyoz, alerjik astım ile ilişkili Th2-predominant immünolojik yanıtları potansiyalize edebilir. Bu durum,

immün disregülasyona yol açarak astım semptomlarını kötüleştirebilir (Qin, 2023; Ünüvar vd., 2019). Ayrıca, astım patolojisinde Th2 hücrelerinin rolü, IgE üretimi ve eozinofil akımı ile ilişkilidir; bu da alerjik inflamasyonun temel mekanizmalarından biridir (Kuruvilla vd., 2018). Disbiyozun, alerjik astımda görülen bu Th2 yanıtlarını nasıl etkilediği üzerine yapılan çalışmalar, bağırsak mikrobiyotasının immün yanıtları nasıl şekillendirdiğine dair önemli bilgiler sunmaktadır (Tsang vd., 2018).

1.1.19. Mikrobiyal Translokasyon Mekanizmaları

Mikrobiyal translokasyon fenomeni, intestinal bariyer bütünlüğünün baskılanmış olduğu durumlarda ortaya çıktığı, mikroorganizmaların veya lipopolisakkarit (LPS) gibi komponentlerinin sistemik sirkülasyona penetrasyonunu kolaylaştırmaktadır. İntestinal permeabilitenin artışına katkıda bulunan faktörler arasında psikososyal stres, antimikrobiyal ajan kullanımı, diyet modifikasyonları ve enfeksiyöz prosesler yer almaktadır (Das vd., 2024). Transloke olan mikrobiyal ürünler, immün hücrelerle etkileşime girerek sistemik enflamatuvar yanıtları indükleyebilmekte ve respiratuvar homeostazı modifiye edebilmektedir.

Asetat, propiyonat ve bütirat gibi kısa zincirli yağ asitleri (SCFA'lar), intestinal mikroorganizmalar tarafından diyet fiberlerinin fermentasyonu sonucu üretilen metabolitlerdir. SCFA'ların immünolojik yanıtların modülasyonunda ve intestinal bariyer bütünlüğünün korunmasında rol oynadığı ortaya konulmuştur (Cait vd., 2018).

SCFA'lar, bronşiyal enflamasyonun baskılanması yoluyla astmatik semptomların iyileşmesine sebebiyet verebilmektedir. Dendritik hücrelerin ve T lenfositlerinin aktivitesini modüle ederek interlökin-4 (IL-4) gibi proenflamatuvar sitokinlerin üretiminde azalmaya ve IgE seviyelerinin düşmesine yol açmaktadır (Cait vd., 2018). Disbiyotik murin modellerde SCFA verilmesi, IL-4 üreten CD4+ T lenfosit popülasyonunda ve alerjik pulmoner enflamasyona duyarlılıkta azalma ile sonuçlanmıştır.

1.1.20. Beslenmenin Mikrobiyal Translokasyon Üzerindeki Etkisi

Diyet kompozisyonu, intestinal mikrobiyotanın kompozisyonel ve fonksiyonel karakteristiklerini anlamlı derecede değişime uğratmaktadır. Yüksek

fiber içeriğine sahip diyet paternleri, SCFA üretiminden sorumlu bakteriyel popülasyonların çoğalmasını stimüle ederek intestinal bariyer bütünlüğünün uygun hale getirmesi ve immünolojik yanıtların modülasyonuna katkıda bulunmaktadır (Lunjani vd., 2022).

Yüksek lipid ve redükte fiber içeriği ile karakterize batı tipi diyet kompozisyonları, mikrobiyal translokasyonu kolaylaştırarak disbiyozis ve intestinal permeabilitede artışa sebebiyet verebilmektedir (Lunjani vd., 2022). Buna mukabil, meyve, sebze ve tam tahıl ürünleri açısından zengin diyet kompozisyonları, sağlıklı bir mikrobiyal ekosistemin idamesini destekleyerek astım insidansında ve şiddetinde azalmaya yol açabilmektedir.

1.1.21. Antibiyotik Kullanımı ve Dysbiosis

Antibiyotikler bağırsak mikrobiyotasını bozarak disbiyoz ve astıma yatkınlığın artmasına neden olabilir (Perdijk vd., 2024). Erken yaşta antibiyotik maruziyeti, bağırsak mikrobiyal topluluklarındaki değişiklikler ve bağışıklık fonksiyon bozukluğu daha yüksek astım riski ile ilişkilendirilmiştir.

Antibiyotik kaynaklı disbiyoz bağışıklık sisteminin olgunlaşmasını bozarak Th2 bağışıklık yanıtının çarpık olmasına yol açabilir (Huffnagle, 2010). Bu dengesizlik aşırı duyarlılık reaksiyonlarını teşvik eder ve alerjenlere karşı toleransı azaltarak astım gelişimine katkıda bulunur.

1.1.22. Çevresel Faktörler ve Mikrobiyal Maruziyet

Kentleşme süreçleri ve gelişmiş hijyen uygulamalarının yaygınlaşması neticesinde çevresel mikroorganizmalara maruziyette gözlenen azalma, astım başta olmak üzere alerjik hastalıkların prevalansındaki artışta önemli bir etiyolojik faktör olarak değerlendirilmektedir (Lynch & Boushey, 2016).

Hijyen hipotezi, yaşamın erken dönemlerinde sınırlı mikrobiyal maruziyetin yetersiz immünolojik stimülasyona yol açarak immün sistem düzensizliğine ve artmış alerjik duyarlılığa neden olduğunu öne sürmektedir (Holt & Strickland, 2009). Bu bağlamda, erken dönem mikrobiyal kolonizasyon, immünolojik toleransın indüksiyonu ve hipersensitivitenin önlenmesinde kritik önem taşımaktadır.

Mikrobiyal translokasyon, sistemik enflamasyona katkıda bulunarak astım semptomlarının şiddetlenmesine neden olabilmektedir. Kan dolaşımında

lipopolisakkarit (LPS) gibi endotoksinlerin varlığı, enflamatuvar yanıtları tetikleyebilmektedir (Lad vd., 2021). Yüksek endotoksin düzeyleri, artmış astım şiddeti ve bronşiyal hiperreaktivite ile korelasyon göstermektedir.

Transloke olan mikrobiyal komponentler, immün hücreleri aktive ederek proenflamatuvar sitokinlerin sekresyonunu indüklemektedir (Ciprandi vd., 2024). Bu aktivasyon, hava yolu enflamasyonunu, mukus hipersekresyonunu ve astımın karakteristik özelliği olan bronşiyal obstrüksiyonu potansiyelize etmektedir.

Bağırsak ve akciğer mikrobiyotası arasındaki karşılıklı etkileşim, solunum yollarındaki immün yanıtları modüle etmektedir (Ver Heul vd., 2019). Astım hastalarında hem intestinal hem de pulmoner mikrobiyotada değişimler gözlenmektedir. Akciğerlerde Proteobacteria oranında artış ve Bacteroidetes miktarında da azalma saptanmaktadır (Sohn vd., 2020). Bu mikrobiyotal değişimler, lokal immün yanıtları ve hava yolu enflamasyonunu etkileyebilmektedir.

İntestinal ve pulmoner mikroorganizmalar, immün fonksiyonları modüle edebilen metabolitler üretmektedir. SCFA'lar pulmoner immüniteyi etkilerken, akciğerdeki mikrobiyal metabolitler de astımın progresyonunda rol oynayabilmektedir (Valverde-Molina & García-Marcos, 2023).

Mikrobiyal translokasyonun astım patogenezindeki rolünün aydınlatılması, yeni terapötik yaklaşımların geliştirilmesine olanak sağlamaktadır. *Lactobacillus* türleri gibi probiyotiklerin suplementasyonu, intestinal mikrobiyotanın modülasyonu ve astım riskinin azaltılması açısından umut vadeci sonuçlar göstermektedir (Cox vd., 2010). Risk grubundaki infantların *Lactobacillus casei* ile suplementasyonu, egzama insidansını azaltarak alerjik hastalıklar açısından potansiyel terapötik faydalar sunmaktadır.

Diyetin yüksek lifli besinlerle zenginleştirilmesi, yararlı mikroorganizmaların proliferasyonunu ve SCFA üretimini stimüle ederek intestinal bariyer bütünlüğünü artırabilmekte ve enflamasyonu baskılayabilmektedir (Lunjani vd., 2022).

1.1.23. Genetik ve Epigenetik Faktörler

Mikrobiyal translokasyon ve astıma karşı bireysel duyarlılık, genetik polimorfizmlerden önemli ölçüde etkilenmektedir. Toll benzeri reseptör 4 (TLR4) genindeki mutasyonlar, endotoksinlere karşı tepkide azalmaya yol açarak immün

aktivasyonunu modüle edebilmektedir (Crane, 2001). Bu genetik varyasyonlar, mikrobiyal translokasyonun astım patogenezindeki etkisini uyarlayabilmektedir.

CD14 genindeki polimorfizmler, çözünür CD14 düzeylerini ve serum IgE konsantrasyonlarını etkileyerek alerjik yanıtları ve astım riskini module etmektedir (Crane, 2001). Psikolojik stres faktörleri, intestinal permeabiliteyi ve mikrobiyota kompozisyonunu değiştirerek mikrobiyal translokasyonu artırabilmektedir (Das vd., 2024). Stres kaynaklı disbiyozis, enflamatuvar süreçleri potansiyelize ederek astım semptomlarının şiddetlenmesine neden olabilmektedir.

Beslenme alışkanlıkları, intestinal mikrobiyomun kompozisyonunu ve fonksiyonunu önemli ölçüde etkilemekte, bu durum serum mikrobiyomunun astım ile ilişkisini modüle edebilmektedir. Belirli diyet paternleri, epitelyal bariyeri destekleyen ve mikrobiyal translokasyonu minimize eden sağlıklı bir mikrobiyota profilini teşvik ederek astım semptomlarının hafiflemesine katkıda bulunabilmektedir.

Hava yolu epiteli sürekli olarak alerjenler, kirleticiler, tütün dumanı ve patojenler gibi çevresel faktörlere maruz kalmaktadır. Bu ajanlar epitelyal bariyere direkt hasar verebilmekte veya fonksiyonunu modifiye ederek astım patogenezine katkıda bulunabilmektedir (D. E. Davies, 2014).

Ev tozu akarları ve polen gibi alerjenlere maruziyet, epitelyal bağlantıları düzensizleştirerek permeabilitede artışa neden olabilmektedir (Bonser & Erle, 2017). Partikül madde ve sigara dumanı gibi kirleticiler, oksidatif stres ve enflamasyonu indükleyerek epitelyal bütünlüğü bozmaktadır (Raby vd., 2023). Hava kirleticilerinden titanyum dioksit partiküllerinin, claudin 7 gibi epitelyal bariyer proteinlerini modüle ederek astımda bariyer disfonksiyonunu şiddetlendirdiği gösterilmiştir (Y.-G. Lee vd., 2021).

1.1.24. Astım Gelişimi için Çevresel Risk Faktörleri

1.1.24.1 Atmosferik Kirleticilerin Etkileri

Hava kalitesinin astım semptomları ve alevlenmeleri üzerindeki etkisi kritik önem arz etmektedir. Kim ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği araştırmada, $\leq 10 \mu\text{m}$ çapındaki partikül maddeye (PM₁₀) artmış maruziyetin, yetersiz astım kontrolü ve

indüklenmiş balgamda yükselmiş tip 2 doğal lenfoid hücre (ILC2s) seviyeleri ile korelasyon gösterdiği ortaya konulmuştur (H. S. Kim vd., 2019).

PM10'a prenatal maruziyet, bronşiyal hiperreaktivite artışı ve erken okul çağı çocuklarında yeni astım tanısı riskinde elevasyonla ilişkilendirilmiştir. Dizel egzoz partikülleri (DEP), özellikle ev tozu akarı (HDM) gibi alerjenlerle kombine olduğunda, IL-33 sinyalizasyonunda artış ve steroid-refrakter astım alevlenmelerine yol açarak hava yollarında tip 2 immün yanıtı potansiyelize edebilmektedir (Brandt vd., 2020).

1.1.24.2 Alerjen Maruziyeti ve Meteorolojik Faktörler

Spesifik alerjenlerin astım patogeneziindeki rolü belirgindir. Gao ve arkadaşları (2019), birden fazla Artemisia polen alerjenlerine karşı gelişen duyarlılığın, kuzey Çin'de alerjik astım riskini anlamlı düzeyde artırdığını göstermiştir (Gao vd., 2018). Alternaria alternata sporlarına maruziyet, yatkın bireylerde astım alevlenmelerini arttırabilmektedir.

Fırtına astımı, polen granüllerinden alerjenik partiküllerin salınımına bağlı olarak astım ataklarında akut elevasyona neden olan bir fenomendir. D'Amato ve arkadaşları (2016), fırtınaların, astım öyküsü bulunmayan ancak alerjik riniti olan bireylerde dahi acil medikal müdahale gerektiren şiddetli astım ataklarını indükleyebildiğini belirtmişlerdir (D'Amato vd., 2019).

1.1.24.3 Tütün Ürünleri ve Elektronik Nikotin İletim Sistemleri

Konvansiyonel sigara kullanımı, astım gelişimi ve alevlenmeleri için kabul edilmiş bir risk faktörüdür. Elektronik sigaralar ve ısıtılmış tütün ürünlerinin etkileri ise daha az karakterizedir. Adolesan popülasyonda yapılan bir araştırmada, bu ürünlerin izole kullanımının anlamlı risk faktörü olmadığı, ancak konvansiyonel sigaralarla kombine kullanımlarının astım ve alerjik rinit semptomlarını şiddetlendirdiği gösterilmiştir.

1.1.24.4 Nutrisyonel Faktörler ve Farmakolojik Ajanlar

Diyet komponentleri astım riskini modifiye edebilmektedir. Venter ve arkadaşları, yağ asidi metabolizmasının astım patogeneziindeki rolünü vurgulayarak, profilaktik ve terapötik potansiyellerinin araştırılması için standardize dozlarla klinik çalışmaların gerekliliğini öne sürmüştür (Venter vd., 2019). Fast-food tüketimi, adolesan grupta artmış astım insidansı ile ilişkilendirilirken, erişkin popülasyonda bu korelasyon gösterilememiştir.

Gestasyonel D vitamini suplementasyonunun astım profilaksisindeki rolü araştırılmış, ancak güncel çalışmalar heterojen sonuçlar vermiştir. Feng ve arkadaşları, yüksek doz D vitamini suplementasyonunun okul öncesi hışıltı ataklarını azaltmasına rağmen, 6 yaşına kadar astım insidansını düşürmediğini göstermiştir (Feng vd., 2017).

Gebelikte histamin-2 reseptör antagonistleri ve proton pompası inhibitörleri gibi asit süpresif ajanların kullanımı, pediatrik astım riskinde artış ile ilişkilendirilmiştir.

1.1.24.5 Mikrobiyal Disbiyozis ve Astım

Nazal pasajlar, pulmoner sistem ve intestinal sistemdeki mikrobiyota, astımın patogenezi ve regülasyonunda önemli rol oynamaktadır. Erken dönem antibiyotik maruziyeti mikrobiyomu düzensiz hale getirerek astım riskini potansiyelize edebilmektedir. İmmatür mikrobiyom varlığı ve maternal astım öyküsü, infantlarda astım gelişimi açısından risk faktörü olarak değerlendirilmektedir.

Spesifik bakteriyel cinsler, özellikle *Escherichia* ve *Gemmiger*, okul öncesi dönemde astım gelişimi ile ilişkilendirilmiştir. Lee ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği çalışmada, genç erişkinler ve astımlı geriatrik popülasyon arasında üst solunum yolu mikrobiyomu ve metabolomunda yaşa bağlı varyasyonlar saptanmış, mikrobiyal kompozisyon ve fonksiyondaki değişimler astım patogeneziyi değiştirdiği öne sürülmüştür (J. J. Lee vd., 2018).

Probiyotik uygulamaları, deneysel hayvan modellerinde astım profilaksisi açısından suş-spesifik etkiler göstermiştir. Spacova ve arkadaşları, *Lactobacillus rhamnosus* GG suşunun intranazal uygulamasının, murin modellerde eozinofilik enflamasyonu ve bronşiyal hiperreaktiviteyi baskılandığını göstermişlerdir (Spacova vd., 2018) . Bununla birlikte, insan çalışmalarında probiyotiklerin astım insidansı üzerindeki etkileri açısından tutarlı sonuçlar elde edilememiştir.

1.1.25. Sitokinlerin ve İnflamatuvar Mediyatörlerin Etkisi

Astımlı hava yollarında disfonksiyonel epitel, enflamatuvar süreçleri ve doku yenilenmesini düzenleyen çeşitli sitokinlerin üretilmesi, büyüme faktörlerinin sekrete edilmesi ve bunlara yanıt oluşturmada rol alır.

Astmatik bronşiyal epitel hücreleri, Th2 tipi immün yanıtların oluşumu, eozinofilik enflamasyonu potansiyelize eden interlökin (IL)-25, IL-33 ve timik stromal lenfopoietin (TSLP) gibi sitokinleri salgılanmasını sağlarlar (Bartemes & Kita, 2018; P. D. Mitchell & O'Byrne, 2017). Bu sitokinler, immün hücre migrasyonunu ve aktivasyonunu artırarak enflamatuvar kaskadın devamlılığına katkıda bulunmaktadır.

Hasarlı veya rejenerasyon sürecindeki epitel hücrelerinden salınan transforme edici büyüme faktörü-beta (TGF- β), hava yolunun yeniden şekillenmesinde kritik bir mediyatör olarak rol oynamaktadır. TGF- β , epitel hücrelerinin mezenkimal fenotip kazandığı epitelyal-mezenkimal transisyonu (EMT) indükleyerek subepitelyal fibrozis ve bronşiyal duvar kalınlaşmasına yol açmaktadır (Hackett vd., 2009). EMT süreci, E-cadherin ve ZO-1 gibi epitelyal markerlerin azalması ve vimentin ve α -düz kas aktin gibi mezenkimal markerlerin artması ile karakterizedir (Hackett vd., 2009).

1.1.26. Hava Yolunu Yeniden Şekillendirme ve Onarım Mekanizmaları

Kronik epitelyal hasar ve düzensiz onarım yanıtları, astımda hava yolunun şekillenmesinde majör rol oynamaktadır. Kalıcı hasar ve düzensiz onarım süreçleri, goblet hücre hiperplazisi, subepitelyal fibrozis ve düz kas hipertrofisi gibi yapısal değişimlere neden olmaktadır(Raby vd., 2023).

Müköz sekrete eden goblet hücrelerinin hiperplazisi, aşırı mukus salgılanmasına yol açarak hava yolu obstrüksiyonu ve mukosiliyer klirenste bozulmaya neden olmaktadır(Raby vd., 2023). Müsin kompozisyonundaki

değişiklikler, özellikle MUC5AC/MUC5B oranındaki değişimler, mukus karakteristiklerini modifiye ederek hastalık şiddetini potansiyelize etmektedir(Bonser & Erle, 2017).

Siliyer hücrelerdeki hasar ve epitelyal hücre farklılaşmasındaki düzensizlikler, mukosiliyer fonksiyonu baskılayarak mukus ve patojenlerin hava yollarından atılımını azatılmaktadır (Raby vd., 2023). Bu disfonksiyon, enflamatuvar süreçleri ve bronşiyal hiperreaktiviteyi arttırabilmektedir.

1.2 Astımda metagenomik analiz teknikleri

Modern sekanslama teknolojileri ve analitik metodolojilerdeki ilerlemeler, serum örneklerindeki mikrobiyal çeşitliliğine ve fonksiyonel potansiyelin detaylı karakterizasyonuna olanak sağlamıştır. Versi ve arkadaşları, farklı astım şiddetlerinde filum, genus ve species düzeyindeki varyasyonları saptamak amacıyla balgam metagenomu üzerinde sekanslama analizi gerçekleştirmiştir. Araştırmacılar, şiddetli astımda nötrofilik enflamasyonla ilişkili bakteriyel çeşitlilikte azalma ve sigara kullanım durumuna bağlı tür hakimiyeti saptamışlardır (Versi vd., 2024).

Wilson ve arkadaşları, orta-şiddetli astımlı pediatrik ve erişkin popülasyonda intestinal metagenomun karakterizasyonu amacıyla fekal örneklerde tüm metagenom shotgun sekanslaması uygulamıştır . Elde edilen veriler, astmatik bireylerin intestinal mikrobiyotasında uzun zincirli yağ asidi biyosentetik genleri aracılığıyla fonksiyonel modifikasyonlar ve antimikrobiyal rezistans genlerinde upregülasyon demonstre etmiş olup, bu bulgular astım yönetimi ve tedavi edici yaklaşımlar açısından önemli çıkarımlar taşımaktadır (Wilson vd., 2023).

1.2.1. Mikrobiyomların Dizileme Tabanlı Analizi

Mikrobiyomlar, su ve karasal ekosistemlerden konakçı-spesifik nişlere kadar çeşitli habitatlarda bulunmakta olup, tarım, çevresel ve insan sağlığında kritik roller üstlenmektedir (Hartmann & Six, 2022; Hou vd., 2022). Konvansiyonel kültür-bazlı metodolojiler, mikrobiyal komüniteler hakkında temel bilgiler sağlamakla birlikte, düşük verim ve çoğu mikroorganizmanın kültüre edilememesi nedeniyle limitasyonlar içermektedir (Hitch vd., 2021). Sekanslama-bazlı yaklaşımların, özellikle metagenomik metodolojilerin ortaya çıkışı, kültüre

edilemeyen mikroorganizmaların analizine olanak sağlayarak mikrobiyom araştırmalarında model değişimine yol açmıştır.

1970'lerden 2000'lerin başına kadar, 16S ribozomal RNA (rRNA) gen sekanslaması metagenomik analizin köşe taşı olarak kabul edilmiştir (Lane vd., 1985; Woese & Fox, 1977). Bu metodoloji, spesifik türlerin saptanması için 16S rRNA geninin aşırı değişken bölgelerini genetik parmak izi olarak kullanmaktadır (Peer vd., 1996). Bu bölgelerin amplifikasyonu ve sekanslanması, mikrobiyal komünitelerin taksonomik çoğalmasına olanak sağlamaktadır.

Sanger sekanslama teknolojisini kullanan başlangıç çalışmaları, insan intestinal mikrobiyotasında bireyler arası anlamlı varyasyonlar ortaya koymuş ve öngörülenden daha yüksek bir çeşitliliğe işaret etmiştir (Eckburg vd., 2005). Yüksek-verimli sekanslama teknolojilerinin gelişimi, mikrobiyal çeşitlilik analiz kapasitesini genişleterek çeşitli toplulukların eş zamanlı incelenmesine ve milyonlarca amplikonun saptanmasına olanak sağlamıştır (Caporaso vd., 2012; Huber vd., 2007).

16S rRNA sekanslamasının sınırlaması da mevcuttur. Virüsler veya 16S rRNA geninden yoksun ökaryotik mikroorganizmaların saptanması mümkün değildir ve protein-kodlayan genler gibi genomik içerik hakkında sınırlı bilgi sağlamaktadır. Bu sınırlamalar, amplifikasyon-bazlı marker genler yerine total DNA sekanslamasına dayanan tüm-genome shotgun metagenomik yaklaşımların gelişimine yol açmıştır. Shotgun metagenomik, daha yüksek rezolüsyonlu tür düzeyinde yayılma ve gen içerik, fonksiyon ve genomik varyasyonların incelenmesine olanak sağlamaktadır.

DNA analizinin ötesinde, metatranskriptom olarak adlandırılan mikrobiyal toplulukların kolektif RNA transkriptlerinin incelenmesi için RNA sekanslama metodolojileri uygulanmıştır. Bu yaklaşımlar, araştırmacıların gen transkripsiyon paternleri ve çevresel değişikliklere yanıtlar gibi fonksiyonel aktiviteleri araştırma olanağı oluşturmuştur (Ojala vd., 2023).

Bu alan, mikrobiyomlardan türetilen DNA ve RNA sekanslama verilerinin analizindeki içerik ve görüşlerin anlaşılması için bir çerçeve sunmuştur. Metagenomların taksonomik ve gen içerik düzeylerinde analizi, transkriptomlar, küçük RNA'lar ve aktif olarak translate edilen RNA'lar üzerine yapılan araştırmalar mikrobiyal fonksiyonlar hakkındaki anlayışımızı geliştirmekte ve long-read

sekanslama ve tek hücre sekanslama gibi yeni metodolojiler mikrobiyal biyoloji hakkındaki bilgilerimizi ilerletmekmiştir.

1.2.2. Metagenomların Analizi

Metagenomik çalışmalar, ekosistemlerdeki gizemli çeşitlilik ve fonksiyonel potansiyelin ortaya çıkarılmasında kritik rol oynamıştır. Bu araştırmalar, prokaryotik filogenetik ağaca yüz binlerce yeni mikrobiyal genomun entegrasyonunu sağlamış (Parks vd., 2017; Pasolli vd., 2019), insan-ilişkili antik mikroorganizmaların genomik rekonstrüksiyonunu gerçekleştirmiş (Lugli vd., 2017; Wibowo vd., 2021), farklı ekolojik nişlerdeki mikroorganizma ve virüslerin kantifikasyonunu mümkün kılmış (Gregory vd., 2019; Liang & Bushman, 2021) ve yakın filogenetik ilişkili genomlar arasında dahi gen kompozisyonunda anlamlı varyasyonların varlığını ortaya koymuştur (Nakano vd., 2023).

1.2.3. Mikrobiyal Toplulukların Taksonomik Profili

Taksonomik profillemeye, marker genlerin amplikon sekanslaması veya shotgun metagenomik sekanslama metodolojileri ile gerçekleştirilebilmektedir. Shotgun yaklaşımları, total genomik sekanslamaya dayalı olması nedeniyle amplikon-bazlı verilerden daha kapsamlı bilgiler sağlamaktadır. Bu metodoloji, genomik varyantların ve suşların identifikasyonuna ve kültürasyon olmaksızın bir komünite içindeki spesifik organizmaların genomlarının toplanmasına olanak tanımaktadır.

Shotgun sekanslama metodolojisi daha yüksek maliyetli olmakla birlikte, araştırma hedeflerine bağlı olarak derinlik modifikasyonu mümkündür. Low-throughput sekanslama ile daha az okuma sayısı taksonomik profillemeye için yeterli olabilirken (Hillmann vd., 2018), aşırı derin sekanslama, değişik topluluklardan yüksek kaliteli genomların oluşturulması için temel oluşturmaktadır (Carter vd., 2023).

Shotgun metagenomik verilerinin taksonomik kompozisyonu tipik olarak okuma-bazlı veya topluluk-bazlı metodolojiler kullanılarak analiz edilmektedir (Blanco-Míguez vd., 2023). Okuma-bazlı yaklaşımlar, sekanslama okumalarının direkt olarak referans veritabanlarına haritalanmalarını içerirken, topluluk-bazlı yaklaşımlar okumaları denetleyici bir şekilde bir araya getirmekte ve daha sonraki örtüşenleri metagenom-assembled genom'lara (MAG'ler) ayırmaktadır.

1.2.4. Okuma Tabanlı Taksonomik Profilleme

Metagenomik sekans verilerinin taksonomik sınıflandırılmasında iki temel metodolojik yaklaşım bulunmaktadır: sekans dizilerinin klad-spesifik veya evrensel markör genlerle eşleştirilmesi ile tam genom dizileriyle hizalanması.

Klad-Spesifik Markör Gen Metodolojisi: MetaPhlAn gibi analitik araçlar, sekans verilerini spesifik mikrobiyal taksonlara özgü markör gen setleriyle eşleştirme prensibine dayanmaktadır (Truong vd., 2015; Blanco-Míguez vd., 2023). Bu yaklaşım, örnekteki mikroorganizmaların tespitinde etkili olmakla birlikte, genomik kompozisyon hakkında kapsamlı bilgi sunmakta sınırlı kalmaktadır.

Evrensel Markör Gen Metodolojisi: mOTUs benzeri analitik sistemler, mikroorganizmaların çoğunluğunda konserve edilmiş genleri hedefleyerek, henüz karakterize edilmemiş mikrobiyotaların referans-bağımsız profillemesini mümkün kılmaktadır (Ruscheweyh vd., 2021).

Tam Genom Haritalama Metodolojisi: Centrifuge gibi biyoinformatik araçlar, sekans verilerini referans organizmaların tam genom dizileriyle hizalayarak, gen repertuarı ve genetik varyasyonları kapsayan detaylı topluluk profilleri oluşturmaktadır (D. Kim vd., 2016). Ancak bu yaklaşım, yüksek hesaplama kapasitesi gerektirmektedir.

K-mer Temelli Sınıflandırma Sistemleri: Kraken (Wood vd., 2019; Wood & Salzberg, 2014), ganon (Piro vd., 2020) ve MetaCache (Müller vd., 2017) gibi araçlar, hızlı sınıflandırma amacıyla tam k-mer eşleştirme algoritmaları kullanmaktadır. Bu sistemler yüksek hassasiyet göstermekle birlikte, hatalı sekans eşleştirmeleri nedeniyle yanlış pozitif sonuçlar üretebilmektedir. KrakenUniq ise özgün k-mer kantifikasyonu yaklaşımıyla hassasiyeti optimize etmekte ve düşük biyokütle içeren, kontaminasyon riski yüksek örneklerin analizinde avantaj sağlamaktadır (Breitwieser vd., 2018; Danko vd., 2021).

1.2.5. Montaj Tabanlı Genom Çözümlü Metagenomik

Metagenomik verilerin analitik süreçlerinde, montaj-bazlı metodolojiler mikroorganizmaların bireysel genomlarının in silico rekonstrüksiyonunu hedeflemektedir. Sekans verileri, de Bruijn graf algoritmaları kullanan metaSPAdes (Nurk vd., 2017) ve MEGAHIT (D. Li vd., 2015) gibi biyoinformatik araçlar vasıtasıyla kontig formasyonlarına dönüştürülmektedir. Canu (Koren vd., 2017) ve metaFlye (Kolmogorov vd., 2020) gibi uzun-okuma montaj yazılımları, PacBio ve

Oxford Nanopore Technologies platformlarından elde edilen uzun sekans verilerinin işlenmesinde kullanılmaktadır.

Hibrit montaj stratejileri, rekonstrüksiyon kalitesini optimize etmek amacıyla kısa ve uzun sekans verilerinin entegrasyonunu sağlamaktadır (Antipov vd., 2015; Wick vd., 2017). Montaj-bazlı metodolojiler, yeni mikrobiyal taksonların keşfine imkan tanımış ve mikrobiyal filogenetik ağacın kapsamlı şekilde anlaşılmasına katkıda bulunmuştur (Brown vd., 2015; Spang vd., 2015).

Montaj prosedürünü takiben, kontigler MetaBAT2 (Kang vd., 2019), MaxBin (Wu vd., 2014) ve CONCOCT (Alneberg vd., 2014) gibi yazılımlar kullanılarak Metagenom-Assembled Genome (MAG) ünitelerine ayrılmaktadır. Bu MAG'ler, mikrobiyel komünitedeki münferit türlerin genomik kompozisyonlarını temsil etmektedir. CheckM gibi kalite kontrol araçlarıyla, genom rekonstrüksiyonunun bütünlüğü ve olası kontaminasyonlar değerlendirilmektedir (Parks vd., 2015).

Genom-rezolüsyonlu metagenomik yaklaşımlar, yeni mikrobiyal filumların karakterizasyonunda ve mikrobiyal evrimleşmenin aydınlatılmasında kritik rol oynamıştır. Bu metodoloji, akuatik sedimentler (Delmont vd., 2018), okyanus örnekleri (Nayfach vd., 2020) ve insan mikrobiyom örnekleri (Pasolli vd., 2019) gibi çeşitli ekolojik nişlerden genomik rekonstrüksiyonların elde edilmesini mümkün kılmıştır.

1.2.6. Suş Düzeyinde Taksonomik Profilleme

Mikrobiyal komünitelerin suş-rezolüsyonlu analizi, kritik önem taşımaktadır. Zira aynı tür içerisindeki farklı suşlar, virülans faktörleri ve antimikrobiyal direnç gibi fenotipik özellikler bakımından belirgin heterojenite gösterebilmektedir (Jain vd., 2018; Rossum vd., 2020). Suş-spesifik analizler, bireyler arası mikrobiyal transmisyonun takibini ve suş-spesifik sağlık/hastalık korelasyonlarının tanımlanmasını mümkün kılmaktadır (Madi vd., 2023; Zhu vd., 2015).

Suş-rezolüsyonlu profilleme metodolojileri, markör gen-bazlı yaklaşımlar ve genom-kapsayıcı stratejiler olmak üzere iki ana kategoriye ayrılmaktadır:

Markör Gen-Bazlı Metodoloji: StrainPhlAn gibi analitik araçlar, her bir örnekteki dominant suşların identifikasyonu için spesifik markör genleri kullanmaktadır (Truong vd., 2017).

Genom-Kapsayıcı Metodoloji: MIDAS (Nayfach vd., 2016; Zhao vd., 2023) ve inStrain (Olm vd., 2021) gibi biyoinformatik araçlar, suş identifikasyonu amacıyla tüm genom sekansı boyunca varyant analizi gerçekleştirmektedir.

Montaj-Bazlı Metodoloji: BHap gibi yazılımlar, tek nükleotid varyantlarını muhafaza ederek, hata düzeltme prosedürü uygulamaksızın sekans verilerini kontiglere birleştirmek suretiyle haplotip rekonstrüksiyonu gerçekleştirmektedir (X. Li vd., 2019).

Bu metodolojiler, suş çeşitliliği hakkında detaylı bilgi sağlamakta olup, maternal-infantil bakteriyel transmisyonun (Ferretti vd., 2018; Yassour vd., 2018) ve fekal mikrobiyota transplantasyonu sonrası mikrobiyal topluluk dinamiklerinin (Podlesny vd., 2022; Schmidt vd., 2022) araştırılmasında kullanılmaktadır.

1.2.7. Gen İçeriğinin Fonksiyonel Profili

Fonksiyonel profillemeye metodolojisi, mikrobiyomun moleküler ve metabolik karakterizasyonunu sağlayarak, spesifik genlerin ve metabolik yolların mevcudiyetini ortaya koymaktadır. Bu yaklaşım, mikroorganizmaların fonksiyonel repertuarı ve metabolik aktiviteleri hakkında kapsamlı bilgi sunmaktadır. Söz konusu metodoloji, potansiyel patojenler veya kommensal mikroorganizmaların identifikasyonunda ve bunların metabolik kapasitelerinin belirlenmesinde önemli rol oynamaktadır (Frolova vd., 2022; Nies vd., 2021).

1.2.8. Pangenom

Pangenom analiz metodolojisi, genomik elementleri üç temel kategoride sınıflandırmaktadır: çekirdek genom (core genome), aksesuar genom (accessory genome) ve klad-spesifik unique genler (Medini vd., 2005). Çekirdek genom, bir filogenetik klad içerisindeki tüm organizmalarda konserve edilmiş genleri kapsamakta iken, aksesuar genom belirli organizmalarda mevcut olan ancak evrensel olmayan genetik elementleri içermektedir. GET_HOMOLOGUES (Contreras-Moreira & Vinuesa, 2013), Roary (Page vd., 2015) ve anvi'o (Eren vd., 2015) gibi biyoinformatik araçlar, pangenom analizinin sistematik uygulanmasını mümkün kılmaktadır.

Pangenom analizi, genetik diversite ve evlasyon dinamiklerinin aydınlatılmasında kritik rol oynamaktadır. Bu metodolojinin uygulamalarına örnek

olarak, *Bradyrhizobium diazoefficiens*'in çevresel stres faktörlerine bağlı genom redüksiyonunun karakterizasyonu gösterilebilir (Simonsen, 2021).

1.2.9. Varsayılan Kodlama Genlerine İşlev Atama

Mikrobiyal genlerin fonksiyonel anotasyonu, tanımlanmamış genlerin yüksek prevalansı nedeniyle önemli zorluklar içermektedir. Hesaplamalı metodolojiler, aday genlerin BLAST (Camacho vd., 2009) veya DIAMOND (Buchfink vd., 2014) gibi alignment algoritmalarıyla UniRef (Süzek vd., 2007) benzeri veritabanlarına karşı analiz edildiği homoloji-bazlı yaklaşımları kapsamaktadır. Ayrıca Hidden Markov modelleri, fonksiyonel domainlerin identifikasyonunda kullanılmaktadır (Durbin vd., 1998; Pachter vd., 2002).

Genom kontekst-bazlı anotasyon stratejileri, genomik komşuluk ilişkilerini ve fonksiyonel açıdan ilişkili genlerin ko-lokalizasyon eğilimlerini temel alarak gen fonksiyonlarının karakterizasyonunu sağlamaktadır (Rodríguez del Río vd., 2023). Yapısal homoloji yaklaşımları ise, AlphaFold (Jumper vd., 2021) gibi protein yapısal tahmin etme araçlarını kullanarak, yapısal benzerlik temelinde fonksiyonel tahminler gerçekleştirmektedir (Berman, 2000; Kempen vd., 2023).

Bu sofistike metodolojilere rağmen, mikrobiyal genlerin önemli bir fraksiyonu halen fonksiyonel olarak karakterize edilememiş durumdadır ve bu durum mikrobiyal fonksiyonların kapsamlı anlaşılmasını kısıtlamaktadır (Almeida vd., 2019; Ghatak vd., 2019).

1.2.10. Genlerin ve İşlevlerin Okuma Tabanlı Tanımlanması

HUMAnN3 gibi biyoinformatik araçlar, montaj gerektirmeksizin fonksiyonel profillemeye gerçekleştirmekte ve bu amaçla sekans verilerini karakterize edilmiş gen ve metabolik yolak veritabanlarıyla hizalamaktadır (Beghini vd., 2021). HUMAnN3'ün analitik iş akışı üç temel aşamadan oluşmaktadır: Öncelikle örnekteki taksonların identifikasyonu gerçekleştirilmekte, ardından sekans verileri bu taksonların pangenomlarıyla hizalamakta ve son olarak eşleşmeyen sekanslar için non-redundant protein (yedeksiz protein) veritabanına karşı tecüme aramaları gerçekleştirilmektedir.

Gen profillemeye metodolojisi, mikrobiyal gen repertuarı ile immün kontrol noktası inhibisyonuna bağlı kolit gelişimi gibi konak fenotipleri arasındaki korelasyonların identifikasyonunda kullanılmaktadır (Dubin vd., 2016). Carnelian

gibi makine öğrenmesi yaklaşımları ise, sekans karakteristiklerine dayalı gen sınıflandırması yoluyla fonksiyonel tahmin gerçekleştirmektedir (Nazeen vd., 2020).

1.2.11. Mobil Genetik Unsurların (MGE'ler) Tanımlanması

Mobil genetik elementler (MGE'ler), genomlar içinde veya genomlar arasında translokasyon kapasitesine sahip DNA sekansları olup, mikrobiyal evölüsyon ve adaptasyonda kritik roller üstlenmektedir. MGE'ler; transpozonlar, plazmidler, integronlar ve bakteriyofajları kapsayan geniş bir element spektrumunu içermektedir (Frost vd., 2005). Bu elementler, horizontal gen transferi mekanizmaları aracılığıyla antimikrobiyal direnç gibi fenotipik özelliklerin yayılımını sağlamaktadır (Groussin vd., 2021; Khedkar vd., 2022).

Kromozomal entegre MGE'lerin identifikasyonuna yönelik biyoinformatik araçlar arasında, multiple genom hizalamasını gerçekleştiren Mauve (Darling vd., 2004) ve insersiyon sekansları ile transpozonların tespit edilmesini sağlayan ISEScan (Xie & Tang, 2017) bulunmaktadır. geNomad yazılımı ise, sekans motiflerini ve sinir ağları algoritmalarını kullanarak DNA sekanslarını kromozomal, plazmid veya viral kökenli olarak sınıflandırmaktadır (Camargo vd., 2023). Uzun-okuma sekanslama teknolojilerindeki gelişmeler, MGE'lerin ve bunların konak genomlarıyla olan ilişkilerinin karakterizasyonunda önemli avantajlar sağlamaktadır.

1.2.12. Mikrobiyomların RNA Tabanlı Analizi

Mikrobiyal komünitelerin RNA sekanslama analizleri, gen ekspresyon profillerinin, small RNA'ların ve transkripsiyonel regülasyonun karakterizasyonunu mümkün kılmaktadır. Metodolojik kompleksiteler nedeniyle DNA-bazlı yaklaşımlara kıyasla daha sınırlı uygulama alanı bulmasına rağmen, RNA-bazlı analitik stratejiler, genomik kompozisyonun ötesinde mikrobiyal fonksiyonların aydınlatılmasında önemli bilgiler sağlamaktadır.

1.2.12.1 Metatranskriptomiks

Metatranskriptomik analiz metodolojisi, mikrobiyal popülasyondan izole edilen RNA'nın sekanslanması yoluyla gen ekspresyon paternlerinin karakterizasyonunu sağlamaktadır. Bu yaklaşımın temel metodolojik zorluklarından biri, rRNA ve tRNA moleküllerinin bol miktarlarda olup, rRNA

tüketme stratejilerinin uygulanmasını gerektirmektedir (Deng vd., 2022; Tan vd., 2023). Analitik iş akışları, read-bazlı ve montaj-bazlı yaklaşımların entegrasyonunu içermektedir(Shakya vd., 2019; Taj vd., 2023).

Diferansiyel gen ekspresyon analizleri, edgeR (Robinson vd., 2009) ve DESeq2 (Love vd., 2014) gibi biyoinformatik araçlar vasıtasıyla gerçekleştirilmektedir. Metatranskriptomik yaklaşımlar, rumen mikrobiyomunun metan prodüksiyonu dinamiklerinin ve mikrobiyal komünitelerin çevresel değişikliklere karşı adaptif yanıtlarının araştırılmasında kullanılmaktadır (Söllinger vd., 2018).

1.2.12.2 Küçük RNA'lar

Küçük RNA (sRNA) molekülleri, bakteriyel ve arkeyal organizmalarda post-transkripsiyonel gen regülasyonunda kritik roller üstlenmektedir(Bervoets & Charlier, 2019; Storz vd., 2011). sRNA moleküllerinin ve hedef sekanslarının in silico prediksyon ve karakterizasyonuna yönelik CopraRNA ve IntaRNA gibi hesaplamalı metodolojiler geliştirilmiş olup (Wright vd., 2014), SHAPE-seq gibi deneysel yaklaşımlar sRNA sekonder yapılarının determinasyonunda önemli bilgiler sağlamaktadır (Lucks vd., 2011).

1.2.12.3 MetaRibo-Seq Kullanarak Çeviri Ölçümü

MetaRibo-Seq metodolojisi, mikrobiyel komünitelerde aktif translasyon sürecindeki mRNA moleküllerinin kantifikasyonu amacıyla ribozom profillemeye tekniğinin adaptasyonunu içermektedir (Fremin vd., 2020). Bu yaklaşım, özellikle küçük molekül ağırlıklı proteinlerin ve peptidlerin translasyonel validasyonunda kullanılmaktadır (Sberro vd., 2019). Metodolojinin başlıca teknik limitasyonları arasında, yapısal RNA moleküllerinden kaynaklanan non-spesifik sinyaller ve yüksek kaliteli referans genom gereksinimi bulunmaktadır.

1.2.13. Yeni Ortaya Çıkan Yaklaşımlar

1.2.13.1 Uzun-Okuma Sekanslama Teknolojileri

PacBio ve Oxford Nanopore Technologies platformları, 10 kb'nin üzerinde sekans uzunluğu sağlayarak montaj kontiguity'sini ve yapısal varyantların deteksiyonunu optimize etmektedir (Chanin vd., 2023; Moss vd., 2020). Yüksek hata oranları ve maliyet faktörlerine rağmen, doğruluk ve maliyet etkinliğindeki

ilerlemeler, bu teknolojilerin mikrobiyom araştırmalarındaki kullanımını yaygınlaştırmaktadır.

1.2.13.2 DNA Metilasyon Analizi

DNA metilasyonu, prokaryotik gen regölasyonu ve defans mekanizmalarında esansiyel roller üstlenmektedir (Beaulaurier vd., 2018; Blow vd., 2016). Uzun-okuma sekanslama teknolojileri, metilasyon paternlerinin karakterizasyonu yoluyla epigenetik regölasyon mekanizmalarının aydınlatılmasına ve genom montaj kalitesinin mükemmelleşmesine katkıda bulunmaktadır(Tourancheau vd., 2021).

1.2.13.3 Hi-C ile Fiziksel İnteraksiyonların Karakterizasyonu

Hi-C metodolojisi, DNA bölgeleri arasındaki fiziksel interaksiyonların deteksiyonu vasıtasıyla MGE'lerin konak genomlarıyla eşleştirilmesini ve genom montaj kalitesinin iyileştirilmesini sağlamaktadır (Du & Sun, 2022; Uritskiy vd., 2021). Hi-C verileri, plazmid ve fajların bakteriyel konakçılarla ilişkilendirilmesinde ve kromozomal 3D organizasyonun karakterizasyonunda kritik rol oynamaktadır (Stalder vd., 2019).

1.2.13.4 Single-Cell Metodolojiler

Single-cell genomik ve transkriptomik yaklaşımlar, bireysel hücre analizleri yoluyla toplu sekanslama limitasyonlarının aşılmasını sağlamaktadır. Microbe-seq (Zheng vd., 2022) ve M3-seq (Ma vd., 2023) gibi tekniklerdeki gelişmeler, tür-spesifik analizlerin ve mikrobiyal heterojenitenin karakterizasyonunu mümkün kılmaktadır. Başlıca teknik zorluklar arasında bakteriyel hücre izolasyonu ve lizis prosedürlerindeki kompleksiteler ile yüksek maliyetler bulunmaktadır.

1.2.14. Gelecek Perspektifleri

Sekanslama-bazlı mikrobiyom araştırmaları, mikrobiyal komünitelerin anlaşılmasında metot değişikliğine yol açmıştır. Bu metodolojiler, yeni mikrobiyal filogenetik hatların keşfini, gen repertuarının fonksiyonel karakterizasyonunu ve mikrobiyal gelişim ile ekolojinin aydınlatılmasını sağlamıştır. Uzun-okuma sekanslama, Hi-C ve single-cell metodolojiler gibi yeni ortaya çıkan teknolojiler, mikrobiyom araştırmalarının kapsamını genişletme potansiyeli taşımaktadır.

Bununla birlikte, prokaryotik olmayan mikroorganizmaların saptanmasındaki sınırlamalar, referans veritabanlarındaki önyargılar ve yüksek orandaki tanımlanmamış genler gibi teknik zorluklar devam etmektedir. Bu zorlukların aşılması, daha kapsamlı veritabanlarının oluşturulmasını, gelişmiş hesaplamalı metodolojilerin ve yüksek verimli deneysel tekniklerin geliştirilmesini gerektirmektedir.



1.3 Amaç

Bu araştırmanın ana hedefi, shotgun metagenomik dizileme teknolojisini kullanarak astım hastalarının serum mikrobiyom profillerini sağlıklı kontrol gruplarıyla karşılaştırmalı olarak incelemektir. Mikrobiyal yapı, çeşitlilik ve işlevsel potansiyeldeki değişimleri tespit ederek, astımla bağlantılı özel mikrobiyal grupları ve genetik bileşenleri belirlemeyi hedefliyoruz. Bu detaylı analiz, astımın gelişiminde rol oynayabilecek sistemik mikrobiyal etkenler hakkındaki bilgimizi genişletecektir.

Yan hedefler arasında astımlı kişilerin serumunda farklı miktarlarda bulunan mikrobiyal grupların ve genlerin belirlenmesi bulunmaktadır. Hangi bakteri, virüs, mantar veya arkelerin astımlı hastalarda kontrol grubuna göre belirgin şekilde fazla veya az olduğunu saptamayı amaçlıyoruz. Temel bulgularımızı qPCR testleriyle doğrulayarak güvenilirlik sağlayacağız. Serum mikrobiyomunun işlevsel özelliklerinin belirlenmesi bir diğer önemli konudur. Genleri tanımlayarak ve metabolik yolları yapılandırarak, astımlı hastalarda artış gösteren bağışıklık düzenlemesi, metabolizma veya antibiyotik direnciyle ilgili işlevleri tanımlamayı hedefliyoruz.

Ayrıca serum mikrobiyal profilleriyle akciğer fonksiyon testleri, iltihap belirteçlerinin düzeyleri ve astım şiddeti gibi astımın klinik göstergeleri arasındaki ilişkiyi değerlendirmeyi planlıyoruz. Bu, belirli mikrobiyal işaretlerle hastalık belirtileri arasındaki bağlantının anlaşılmasına yardımcı olabilir. Serum mikrobiyomunun çeşitliliğinin değerlendirilmesi önemlidir; mikrobiyal çeşitlilikteki değişimlerin astımla ilişkisini belirlemek için astımlı ve kontrol grupları arasında alfa çeşitlilik (örnek içi çeşitlilik) ve beta çeşitlilik (örnekler arası çeşitlilik) ölçümlerini karşılaştıracacağız.

Diğer bir hedef de makine öğrenimi algoritmalarından yararlanarak tahmin modelleri geliştirmektir. Modelleri serum mikrobiyom verileriyle eğiterek, astım durumunu yüksek doğrulukla öngörebilen mikrobiyal belirteçleri tanımlamayı amaçlıyoruz. Bunun erken teşhis ve kişiye özel tedavi stratejileri açısından önemli etkileri olabilir. İki farklı DNA özütleme ve kütüphane hazırlama protokolünün uygulanması ve karşılaştırılması da önemli bir hedeftir. Bu protokollerin iyileştirilmesi, düşük biyokütle içeren serum örneklerinden mikrobiyal DNA elde edilmesini artıracaktır.

Farklı yöntemlerin metagenomik sonuçların duyarlılığı, özgüllüğü ve tekrarlanabilirliği üzerindeki etkisini değerlendirmeyi hedefliyoruz. Bu yöntemsel iyileştirme, serum mikrobiyom analizi için sağlam ve güvenilir teknikler oluşturmak için gereklidir. Ayrıca, yaş, cinsiyet, vücut kitle indeksi, ilaç kullanımı ve çevresel maruziyetler gibi karıştırıcı faktörleri düzenlemek için çok değişkenli istatistiksel analizler yapacağız. Bu, gözlemlediğimiz ilişkilerin gerçekten astımla bağlantılı olmasını ve diğer değişkenlerden etkilenmemesini sağlayacaktır.

Bu hedeflere ulaşılmasıyla, çalışma astımın karmaşık nedenlerinin anlaşılmasına önemli katkı sağlayacaktır. Astımla ilişkili özel mikrobiyal işaretlerin ve işlevsel yolların belirlenmesi, hastalığın teşhisi veya ilerlemesinin izlenmesi için yeni belirteçlerin keşfine yol açabilir. Bu çalışma ayrıca, astım belirtilerini hafifletmek veya hastalığın başlamasını önlemek için sistemik mikrobiyomu düzenleyen müdahalelerin geliştirilmesine olanak tanıyan yeni tedavi hedeflerine ışık tutacaktır. Sonuç olarak bu araştırma sonucunda, bireysel mikrobiyom profillerini göz önünde bulundurarak astım tedavisinde kişiye özel tıp yaklaşımlarını ilerletmesine katkı sağlayacaktır.

2. MATERYAL ve YÖNTEM

Bu çalışmanın amacı, metagenomik analiz kullanarak astımlı bireylerin serum mikrobiyomunu astımlı olmayan kontrollerle karşılaştırmalı olarak araştırmaktır. Serum metagenomiği, astımın patogeneze katkıda bulunabilecek kan dolaşımındaki mikrobiyal DNA'yı keşfetmek için invazif olmayan bir yaklaşım sağlar. Metodoloji, katılımcı alımından veri analizine kadar ayrıntılı adımları kapsamaktadır. Sonraki uygulamalar için yeterli girdiyi sağlamak amacıyla mikrobiyal DNA'nın ilk miktar tayini için kantitatif PCR (qPCR) kullanılmıştır.

2.1 Çalışma Tasarımı

İki grubu içeren kesitsel karşılaştırmalı bir çalışma yürütülmüştür: astım tanısı konmuş bireyler ve astımlı olmayan sağlıklı kontroller. Çalışma, spesifik mikrobiyal imzaların astımla ilişkili olduğu hipoteziyle, bu gruplar arasında serum mikrobiyomundaki farklılıkları değerlendirmek üzere tasarlanmıştır. İki farklı edilmesi, sonuçların çapraz doğrulamasına ve tespit hassasiyetini ve doğruluğunu artırmak için protokollerin optimizasyonuna olanak tanır.

2.1.1. Katılımcı Alımı ve Seçim Kriterleri

Katılımcılar polikliniklerden alınmıştır. Astımlı grup, alerji ve immünoloji hastalıkları uzmanı tarafından doğrulanmış klinik astım tanısı olan 18 ila 65 yaş arası bireyleri içermektedir. Astımlılar için dahil edilme kriterleri hırıltılı solunum, nefes darlığı, göğüste sıkışma hissi ve öksürük gibi değişken solunum semptomları öyküsü ve spirometri ile gösterilen belgelenmiş değişken hava akımı kısıtlamasıydı. Astımlı olmayan kontrol grubu, astım veya diğer kronik solunum yolu hastalıkları öyküsü olmayan aynı yaş aralığındaki sağlıklı bireylerden oluşmuştur.

Her iki grup için de dışlama kriterleri arasında son dört hafta içinde antibiyotik kullanımı, akut enfeksiyon varlığı, kronik enflamatuvar veya otoimmün hastalıklar, hamilelik, emzirme, son bir yıl içinde sigara içme ve bilgilendirilmiş onam verme isteksizliği yer almıştır. Katılımcılar, uygunluğu sağlamak için anketler ve tıbbi kayıtlar kullanılarak taranmıştır.

2.1.2. Etik Hususlar

Etik onay, katılımcı kurumun Kurumsal İnceleme Kurulu'ndan alınmıştır. Tüm katılımcılar, çalışmanın amacı, prosedürleri, potansiyel riskleri ve faydaları

hakkında ayrıntılı bilgi aldıktan sonra yazılı bilgilendirilmiş onam vermiştir. Her katılımcıya benzersiz kimlik kodları atanarak gizlilik sağlanmış ve kişisel bilgiler kısıtlı erişimle güvenli bir şekilde saklanmıştır. Örneklerin toplanması ve çalışılması sırasında, Helsinki Bildirgesi'ne ve insan denekleri içeren araştırmaları düzenleyen ilgili ulusal yönetmeliklere bağlı kalınmıştır. Bu çalışmada daha önceki araştırma sonrası saklanan koleksiyon materyalleri kullanılmıştır.



2.2 Örnek Toplama

2.2.1. Serum Toplama Protokolü

Değişkenliği en aza indirmek için katılımcılardan standartlaştırılmış prosedürler izlenerek kan örnekleri toplanmıştır. Katılımcılara serum mikrobiyomu üzerindeki metabolik etkileri azaltmak için gece boyunca aç kalmaları talimatı verilmiştir. Venöz kan (10 mL) steril teknikler kullanılarak antekübital venden alınmış ve serum ayırıcı tüplere toplanmıştır. Kan 30 dakika boyunca oda sıcaklığında pıhtılaşmaya bırakılmış ve ardından serumu ayırmak için 4°C'de 15 dakika boyunca $1.500 \times g$ 'de santrifüjlenmiştir.

Serum, tekrarlanan donma-çözülme döngülerinden kaçınmak için 500 µL'lik hacimlerde steril, DNA içermeyen mikrosantrifüj tüplerine dikkatlice dağıtılmıştır. Örnekler DNA ekstraksiyonuna kadar hemen -80°C'de saklanmıştır. Tüm numune işlemleri, kontaminasyonu önlemek için sınıf II biyogüvenlik kabininde aseptik koşullar altında gerçekleştirilmiştir. Eldivenler, laboratuvar önlükleri ve yüz maskeleri giyildi ve steril ekipmanlar kullanıldı.

2.2.2. Kan kompartmanlarının toplanması

Kan örnekleri alındıktan sonra, mümkün olan en kısa sürede laboratuvara taşınmış ve oda sıcaklığında işleme alınmıştır.

2.2.2.1 Buffy coat toplanması

İlk olarak, kan örnekleri 10 dakika boyunca $1.500 \times g$ 'de oda sıcaklığında santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında, üstte oluşan plazma fraksiyonu steril pipetler kullanılarak dikkatlice toplanmış ve ayrı steril tüplere aktarılmıştır. Plazma alındıktan sonra, eritrositlerin (RBC'ler) ve beyaz kan hücrelerinin (lökositler) yoğun olarak bulunduğu buffy coat tabakası görünür hale gelmiştir. İnce bir beyaz tabaka şeklinde plazma ve eritrositler arasında yer alan bu buffy coat tabakası, mononükleer hücreler ve polimorfonükleer hücreler açısından zengindir. Buffy coat, steril koşullarda toplanarak ayrı bir tüpe aktarılmıştır.

2.2.2.2 Eritrositlerin toplanması

Buffy coat ve plazma fraksiyonları alındıktan sonra, tüpün dibinde kalan eritrosit fraksiyonu elde edilmiştir. Eritrositler, kontaminasyona dikkat edilerek toplanmış ve ayrı bir steril tüpe aktarılmıştır.

2.2.2.3 PBMC hücrelerin toplanması

Kalan kan örneği, Ficoll-Paque yoğunluk gradient santrifüjü yöntemi kullanılarak periferik kan mononükleer hücreleri (PBMC'ler) ve polimorfonükleer lökositlere (PMN'ler) ayrılmıştır. Kan örneği, eşit hacimde fosfat tamponlu salin (PBS) ile seyreltilmiş ve dikkatlice Ficoll-Paque solüsyonunun üzerine katmanlandırılmıştır. Daha sonra, 20 dakika boyunca 2.000 x g'de oda sıcaklığında santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında, tüpte oluşan katmanlar arasında PBMC'lerin bulunduğu halka şeklinde bir tabaka gözlenmiştir. Bu PBMC tabakası steril pipetle toplanmış ve PBS ile yıkanarak hücre kalıntıları ve Ficoll'den arındırılmıştır. Yıkama işlemi, 1.500 x g'de 10 dakika santrifüj edilerek gerçekleştirilmiş ve süpernatant atılmıştır. Elde edilen hücre peleti, bakteriyel DNA izolasyonu için hazırlanmıştır.

2.2.2.4 PMN hücrelerin toplanması

Ficoll-Paque santrifüjü sonrasında PBMC'lerin altında kalan ve eritrositlerden oluşan katman, kalan PMN hücrelerini içermektedir. Eritrositlerin uzaklaştırılması için bu fraksiyon, lizin tamponu – %0,83 NH₄Cl çözeltisi ile muamele edilmiştir. Lizin buffer ile karıştırılan hücre süspansiyonu, 10 dakika süreyle oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Eritrosit lizisi sonrasında, karışım 1.500 x g'de 10 dakika santrifüj edilerek PMN'ler pelet halinde elde edilmiştir. Hücre peleti, PBS ile yıkanarak kalan lizis bufferı ve hücre kalıntıları uzaklaştırılmıştır. Elde edilen PMN'ler, bakteriyel DNA izolasyonu için kullanılmıştır.

2.3 Serumdan DNA Ekstraksiyonu

2.3.1. DNA Ekstraksiyon Protokolü

Düşük girdili numuneler için tasarlanmış ticari olarak temin edilebilen bir DNA ekstraksiyon kiti olan QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit'i kullanılmıştır:

- i. **Lizis:** Hücreleri ve hücre dışı vezikülleri parçalayarak nükleik asitleri serbest bırakmak için serum örneklerine kaotropik tuzlar ve proteinaz K içeren lizis tamponunun eklenmesi.
- ii. **Bağlanma:** Yüksek kaotropik tuz koşulları altında silika bazlı membranlara DNA bağlanması.
- iii. **Yıkama:** Kontaminantları ve inhibitörleri uzaklaştırmak için etanol içeren tamponlarla sıralı yıkamalar.
- iv. **Elüsyon:** DNA'nın küçük bir hacimde (30 µL) nükleaz içermeyen su içinde elüe edilmesi.
- v. DNaz kontaminasyonundan kaçınma: Sertifikalı DNaz içermeyen reaktifler ve sarf malzemeleri kullanılarak DNaz kontaminasyonunun önlenmesine özen gösterilmiştir.

2.3.2. DNA Kalite Değerlendirmesi

Çıkarılan DNA konsantrasyon ve saflık açısından değerlendirilmiştir:

- i. Kantifikasyon: DNA konsantrasyonu Qubit dsDNA Yüksek Hassasiyet Testi kullanılarak ölçülmüştür.
- ii. Saflık Değerlendirmesi: A260/A280 oranı, protein kontaminasyonunu değerlendirmek için bir NanoDrop spektrofotometre kullanılarak belirlenmiştir.
- iii. Bütünlük Kontrolü: Beklenen parçalanma nedeniyle, agaroz jel elektroforezi bilgilendirici değildi; bu nedenle, parça boyutu dağılımını değerlendirmek için Agilent TapeStation sistemi kullanıldı.

Negatif kontroller (serum içermeyen ekstraksiyon boşlukları) kontaminasyonu izlemek için numunelerle birlikte işlenmiştir.

2.3.3. qPCR Kullanarak İlk Miktar Tayini

DNA ekstraksiyonundan önce, evrensel bakteriyel 16S rRNA genlerini hedefleyen qPCR kullanılarak mikrobiyal DNA'nın ilk kantifikasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu adım, sonraki metagenomik analiz için serum örneklerinde yeterli mikrobiyal DNA'nın mevcut olmasını sağlamıştır. qPCR, bakteriyel 16S rRNA genleri için evrensel primerler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Her numunedeki mikrobiyal yükü ölçmek için bilinen bakteriyel DNA konsantrasyonları kullanılarak standart eğriler oluşturulmuştur. Düşük mikrobiyal DNA konsantrasyonlarına sahip numuneler not edilmiş ve ekstraksiyon protokolleri buna göre optimize edilmiştir.



2.4 Shotgun Metagenomik Sekanslama

2.4.1. Sekanslama için DNA Kütüphanesi Hazırlama

Metagenomik analiz için DNA kütüphanesi hazırlama süreci, örneklerin genetik çeşitliliğini doğru bir şekilde temsil etmek ve yüksek kaliteli sekans verileri elde etmek için kritik öneme sahiptir. DNA kütüphanesi hazırlama işlemi aşağıdaki adımları içermektedir:

2.4.1.1 Enzimatik Parçalama

Toplam genomik DNA, istenen insert boyutunu (~300 baz çifti) elde etmek amacıyla enzimatik olarak parçalanmıştır. Bu işlem için özel olarak tasarlanmış enzim karışımları kullanılmıştır. Parçalama reaksiyonu, 1 µg DNA, parçalama tamponu ve enzim karışımından oluşan bir reaksiyon karışımı hazırlanarak gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon karışımı, belirli bir sıcaklıkta (örneğin 37°C) ve belirli bir süre (örneğin 30 dakika) inkübe edilmiştir. Bu süre ve sıcaklık, hedeflenen fragment boyut dağılımını elde etmek için optimize edilmiştir.

2.4.1.2 Uç Onarımı ve A-Kuyruk Ekleme

Parçalanmış DNA, uç onarımı ve 3' uçlarına tek bir adenin nükleotidi ekleme işlemine tabi tutulmuştur. Uç onarımı, DNA fragmentlerinin uçlarında oluşabilecek tek sarmallı çıkıntıların doldurulması veya çıkarılmasıyla düzgün uçların elde edilmesini sağlar. Adenin ekleme işlemi ise, adaptörlerin DNA'ya etkili bir şekilde bağlanmasını kolaylaştırmak için gereklidir. Bu adımda, uygun enzimler ve tamponlar kullanılarak reaksiyon karışımı hazırlanmış ve belirli bir sıcaklıkta inkübe edilmiştir.

2.4.1.3 Adaptör Bağlama

Uç onarımı ve A-kuyruk ekleme işlemlerinin ardından, benzersiz ikili indekslere sahip özel adaptörler DNA fragmentlerine ligasyon yöntemiyle bağlanmıştır. Adaptörler, sekanslama platformunun (Illumina NovaSeq 6000) gerektirdiği dizilimleri ve indeks bölgelerini içerir. Ligasyon reaksiyonu, adaptörler, ligasyon tamponu ve T4 DNA ligaz enzimi eklenerek gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon karışımı, oda sıcaklığında veya üreticinin önerdiği koşullarda inkübe edilmiştir.

2.4.1.4 PCR Zenginleştirme

Adaptör bağlanmış DNA fragmentleri, kütüphanenin yeterli miktarda ve kalite kontrol edilebilir olması için PCR amplifikasyonuna tabi tutulmuştur. Bu işlemde, yüksek sadakatli bir DNA polimeraz kullanılmıştır. PCR reaksiyonu, adaptörlere bağlanan primerler, dNTP karışımı, yüksek sadakatli polimeraz tamponu ve enzimi içeren bir karışım hazırlanarak gerçekleştirilmiştir. Termal döngü protokolü, denatürasyon, bağlanma ve uzatma adımlarını içerecek şekilde optimize edilmiştir (örneğin, 95°C'de 30 saniye denatürasyon, 60°C'de 30 saniye bağlanma, 72°C'de 30 saniye uzatma, toplam 12-15 döngü).

2.4.1.5 Boyut Seçimi

PCR sonrası kütüphane, istenmeyen boyuttaki DNA fragmentlerini uzaklaştırmak ve istenen 300-400 baz çifti boyut aralığındaki fragmentleri zenginleştirmek için manyetik boncuklarla çift taraflı boyut seçimine tabi tutulmuştur. Bu işlemde, SPRI (Solid Phase Reversible Immobilization) teknolojisine dayalı manyetik boncuklar kullanılmıştır. İlk olarak, büyük boyutlu fragmentleri bağlamak için belirli bir hacimde boncuk eklenmiş ve süpernatant toplanmıştır. Daha sonra, küçük boyutlu fragmentleri uzaklaştırmak için ikinci bir boncuk eklemesi yapılmış ve hedef boyuttaki DNA boncuklara bağlanmıştır. Son olarak, DNA boncuklardan yıkayıp çıkararak saflaştırılmıştır.

2.4.1.6 Kalite Kontrol

Hazırlanan DNA kütüphanesinin kalitesi ve konsantrasyonu, Agilent 2100 Bioanalyzer veya eşdeğer bir cihaz kullanılarak değerlendirilmiştir. Bioanalyzer sonuçları, kütüphanenin boyut dağılımını ve fragmentlerin bütünlüğünü göstermiştir. Ayrıca, kütüphane konsantrasyonu Qubit fluorometre kullanılarak kuantifiye edilmiştir. Bu adımlar, sekanslama öncesi kütüphanenin uygunluğunu doğrulamak için önemlidir.

2.4.2. Sekanslama

DNA kütüphaneleri, yüksek verimli ve derinlemesine metagenomik analiz için Illumina NovaSeq 6000 platformunda sekanslanmıştır.

2.4.2.1 Okuma Uzunluğu

Sekanslama, eşleştirilmiş uçlu (paired-end) 150 baz çifti uzunluğunda okumalar üretecek şekilde yapılandırılmıştır. Bu yöntem, DNA fragmentlerinin her iki ucunun da okunmasını sağlar ve montaj işlemlerinde daha iyi hizalama ve daha uzun efektif okuma uzunluğu elde edilmesine yardımcı olur.

2.4.2.2 Akış Hücresi Yükleme

Kütüphaneler, konsantrasyonları normalize edilerek eşit molar oranlarda havuzlanmıştır. Normalize edilmiş kütüphane karışımı, sekanslama akış hücresine yüklenmeden önce denatüre edilmiş ve tek sarmallı DNA'ya dönüştürülmüştür. Akış hücresine yüklenen toplam DNA miktarı ve konsantrasyonu, platformun optimal verim ve kalite için önerilen değerlerine uygun olarak ayarlanmıştır.

2.4.2.3 Kalite Kontrol

Sekanslama işlemi sırasında kalite kontrol ve kalibrasyon amacıyla, kütüphane karışımına %1 oranında PhiX kontrol kütüphanesi eklenmiştir. PhiX, iyi karakterize edilmiş ve dengeli bir genom yapısına sahip olduğundan, baz çağırma hatalarını ve sekanslama sapmalarını tespit etmek için kullanılmıştır. Sekanslama sırasında gerçek zamanlı olarak kalite metrikleri (örneğin, Q30 skorları) izlenmiş ve gerektiğinde müdahaleler yapılmıştır.

2.5 16SrRNA Metagenomik Sekanslama

Bu çalışmada, mikrobiyal toplulukların kompozisyonunu ve çeşitliliğini belirlemek amacıyla 16S rRNA geninin V3-V4 bölgelerinin amplifikasyonu ve sekanslanması gerçekleştirilmiştir. Uygulanan protokol, Illumina NextSeq 2000 platformu kullanılarak yüksek verimli sekanslama ve downstream analizler için optimize edilmiştir.

2.5.1. DNA Kütüphanesi Hazırlama

2.5.1.1 Örnek Hazırlığı:

Örnekler, daha önceki çalışmalardan elde edilen ve jel ekstraksiyonu ile saflaştırılmış PCR ürünleridir. Bu PCR ürünleri, 16S rRNA geninin hedeflenen bölgelerini içermekte ve safsızlıklardan arındırılmış durumdadır. Jel ekstraksiyonu, agaroz jel elektroforezi sonrası istenen boyuttaki DNA bantlarının kesilerek DNA ekstraksiyon kitleri kullanılarak yapılmıştır.

2.5.1.2 Primer Tasarımı ve Overhang Adaptörlerin Eklenmesi:

16S rRNA geninin V3-V4 bölgelerini amplifiye etmek için kullanılan spesifik primerler aşağıdaki gibidir:

İleri Primer (343F): 5' TAC GGR AGG CAG CAG 3'

Ters Primer (784R): 5' TAC CAG GGT ATC TAA TCC T 3'

Bu primerlere, Illumina platformunda kütüphane hazırlanmasına uygun overhang adaptör dizileri eklenmiştir:

İleri Overhang Adaptörü:

5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG - [343F]-3'

Ters Overhang Adaptörü:

5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG - [784R]-3'

Overhang adaptörlerin eklenmesi, indeksleme ve sekanslama adaptörlerinin bağlanmasına olanak tanıyarak, son kütüphane hazırlama adımlarının verimliliğini artırır.

2.5.1.3 İlk PCR Amplifikasyonu:

İlk PCR reaksiyonu, hedeflenen 16S rRNA gen bölgesinin amplifikasyonunu sağlar. Reaksiyon karışımı ve termal döngü protokolü aşağıdaki gibidir:

Reaksiyon Karışımı (25 µL toplam hacim):

- 12.5 µL 2X yüksek sadakatli PCR master mix (örn. Phusion High-Fidelity PCR Master Mix)
- 2.5 µL ileri primer (10 µM)
- 2.5 µL ters primer (10 µM)
- 5 µL DNA şablonu (10 ng/µL)
- 2.5 µL nükleazsız su

Termal Döngü Protokolü:

- 95°C'de 3 dakika başlangıç denatürasyonu

25 döngü:

- 95°C'de 30 saniye denatürasyon
- 55°C'de 30 saniye primer bağlanması
- 72°C'de 30 saniye uzatma
- 72°C'de 5 dakika son uzatma

2.5.1.4 PCR Ürünlerinin Temizlenmesi:

Amplifikasyon sonrası PCR ürünleri, yan ürünleri ve primer dimerlerini uzaklaştırmak için manyetik boncuk bazlı temizleme kiti AMPure XP beads kullanılarak saflaştırılmıştır. Temizleme işlemi şu şekilde gerçekleştirilmiştir:

PCR ürünlerine 0.8 kat hacimde manyetik boncuk eklenmiştir. Karışım oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edilmiştir. Manyetik stand üzerinde boncuklar ayrılmış ve süpernatant atılmıştır. Boncuklar %70 etanol ile iki kez yıkanmıştır.

Boncuklar oda sıcaklığında kurutulmuş ve ardından nükleazsız su ile DNA elüe edilmiştir.

2.5.1.5 İndeksleme PCR'si ve Barkodlama:

Temizlenmiş PCR ürünlerine, Illumina'nın çift yönlü indeksleme sistemi kullanılarak indeksler ve P5/P7 adaptörleri eklenmiştir. Bu işlem, benzersiz indeks kombinasyonlarıyla farklı örneklerin karıştırılmadan sekanslanmasını sağlar.

Reaksiyon Karışımı (50 µL toplam hacim):

- 25 µL 2X HF PCR master mix
- 5 µL İleri İndeks Primeri (N7XX)
- 5 µL Ters İndeks Primeri (S5XX)
- 10 µL temizlenmiş PCR ürünü
- 5 µL nükleazsız su

Termal Döngü Protokolü:

- 95°C'de 3 dakika başlangıç denatürasyonu

8 döngü:

- 95°C'de 30 saniye denatürasyon
- 55°C'de 30 saniye primer bağlanması
- 72°C'de 30 saniye uzatma
- 72°C'de 5 dakika son uzatma

2.5.1.6 İndekslenmiş Kütüphanelerin Temizlenmesi:

İndeksleme PCR'si sonrası ürünler, aynı manyetik boncuk bazlı temizleme protokolü kullanılarak tekrar saflaştırılmıştır. Bu adım, fazla indeks primerlerini ve olası primer dimerlerini uzaklaştırmak için kritiktir.

2.5.2. Kütüphane Kalite Kontrolü:

Hazırlanan kütüphanelerin kalite ve miktarının değerlendirilmesi için aşağıdaki analizler yapılmıştır:

2.5.2.1 Boyut Dağılımı Analizi

Agilent 2100 Bioanalyzer veya eşdeğer bir cihaz kullanılarak kütüphanelerin boyut dağılımı belirlenmiştir. Hedeflenen boyut aralığı 200-600 baz çifti olup, bu aralık barcoding işlemi sonrası elde edilen kütüphanelerin uygunluğunu gösterir.

2.5.2.2 Konsantrasyon Ölçümü

Qubit fluorometre ile dsDNA HS (High Sensitivity) kiti kullanılarak kütüphane konsantrasyonu kuantifiye edilmiştir. Bu adım, kütüphanelerin doğru miktarda sekanslanmasını sağlamak için gereklidir.

2.5.3. Kütüphanelerin Havuzlanması ve Hazırlanması:

Bireysel kütüphaneler, konsantrasyonlarına göre normalize edilerek eşit molar oranlarda havuzlanmıştır. Havuzlanan kütüphaneler, sekanslama öncesi denatürasyon ve dilüsyon işlemlerine tabi tutulmuştur:

Havuzlanan kütüphane karışımı 0.2 N NaOH ile denatüre edilmiştir.

Denatüre edilmiş kütüphane, Illumina'nın önerdiği son konsantrasyona 1.8 pM'a seyreltilmiştir.

Düşük çeşitlilikli amplicon kütüphanelerinde sinyal yoğunluğunu artırmak ve baz çağırma doğruluğunu sağlamak için kütüphane karışımına %30 oranında PhiX kontrol kütüphanesi eklenmiştir.

2.5.4. Sekanslama

Sekanslama işlemi, Illumina NextSeq 2000 platformu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kullanılan sekanslama parametreleri aşağıdaki gibidir: okuma türü olarak eşleştirilmiş uçlu (Paired-End) sekanslama tercih edilmiş ve her bir uç için 300 baz çifti uzunluğunda okumalar (PE300bp) elde edilmiştir. Toplam okuma sayısı, hedeflenen derinliğe ve örnek sayısına göre ayarlanmıştır.

2.6 Biyoinformatik Analiz

2.6.1. Veri Ön İşleme

2.6.1.1 Kalite Filtreleme

Ham okuma verileri, kalite kontrolü için FastQC yazılımı kullanılarak değerlendirildi. Bu adımda, sekanslama verilerinin kalite metrikleri incelendi ve potansiyel sorunlar tespit edildi. Düşük kaliteli bazları ve adaptör kontaminasyonlarını gidermek için Trimmomatic yazılımı kullanıldı. Trimmomatic ile kaydırmalı pencere yöntemi uygulanarak, belirlenen kalite eşiğinin altındaki bazlar kırıldı ve adaptör sekansları temizlendi. Bu işlem, downstream analizler için yüksek kaliteli ve güvenilir veriler elde etmek amacıyla yapıldı.

2.6.1.2 Konak DNA Kaldırma

İnsan genomuna ait potansiyel kontaminasyonları ortadan kaldırmak için, temizlenmiş okuma verileri insan referans genomu (GRCh38) ile hizalandı. Bu işlem için Bowtie2 hizalama aracı kullanıldı. İnsan genomuna hizalanan okuma verileri analizden çıkarılarak, mikrobiyal DNA'ya odaklanıldı ve insan DNA'sının analiz sonuçlarına etkisi minimize edildi.

2.6.2. Taksonomik Profil Oluşturma

2.6.2.1 Kraken2 Sınıflandırması

Mikrobiyal kompozisyonun belirlenmesi için, kalite kontrolünden geçmiş ve konak DNA'sı temizlenmiş okuma verileri Kraken2 aracı ile analiz edildi. Kraken2, kapsamlı bir mikrobiyal referans veri tabanı kullanarak yüksek doğrulukta taksonomik sınıflandırma yapar. Her bir okuma, en yüksek benzerlik gösterdiği taksona atanarak, örneklerin mikrobiyal profili çıkarıldı.

2.6.2.2 Bracken Bolluk Tahmini

Kraken2'nin sınıflandırma sonuçlarına dayanarak, tür düzeyinde daha hassas bolluk tahminleri yapmak için Bracken aracı kullanıldı. Bracken, yanlış sınıflandırmaları düzelterek ve sınıflandırılmamış okumaları yeniden dağıtarak, her

bir türün gerçek bolluk oranlarını tahmin eder. Böylece, örneklerin tür düzeyindeki mikrobiyal kompozisyonu daha doğru bir şekilde belirlendi.

2.6.3. 16S rRNA Analizi

2.6.3.1 Verilerin Okunması ve Birleştirilmesi

Kraken2 algoritması ile her bir taksonomik birim için okumaların bulunduğu rapor dosyaları oluşturuldu. Her bir dosya, örnek kimliği çıkarılarak ve kolon isimleri standartlaştırılarak okundu. Okuma verileri, tüm örnekleri içerecek şekilde tek bir veri çerçevesinde birleştirildi. Bu sayede, analizlerde kullanılacak kapsamlı bir veri seti oluşturuldu.

2.6.3.2 Ökaryotik Okumaların Kaldırılması

Analizlerin bakteriyel odaklı olması nedeniyle, Eukaryota, Fungi, Archaea, Viridiplantae ve Metazoa gibi ökaryotik organizmalara ait okumalar veri setinden çıkarıldı. Bu işlem, taksonomik isimlerde belirtilen anahtar kelimeler kullanılarak gerçekleştirildi. Böylece, sadece bakteriyel okumaların analiz edilmesi sağlandı.

2.6.3.3 Sayım Matrisi Oluşturulması

Filtrelenmiş verilerde, cins seviyesindeki ('G' rütbesi) taksonomik birimler seçildi. Bu birimlerin okumaları kullanılarak, satırları cins isimleri, sütunları örnekler ve değerleri okuma sayıları olan bir sayım matrisi oluşturuldu. Matris, istatistiksel analizler için gerekli formatta transpoze edildi.

2.6.3.4 Örnek Gruplarının Oluşturulması

Örnekler, çalışmanın amaçlarına ve deney tasarımına uygun olarak çeşitli gruplara ayrıldı. Gruplandırma, örnek numaralarına ve bakteri DNA miktarlarına göre yapıldı. Her gruba kısaltılmış isimler atandı (örneğin, "OB-High" obez yüksek bakteriyel DNA içeren örnekleri temsil eder). Bu gruplar, analizlerde ve görselleştirmelerde kullanıldı.

2.6.3.5 Ana Bileşenler Analizi (PCA)

Mikrobiyal kompozisyondaki varyasyonu incelemek için PCA uygulandı. Sayım matrisi üzerinde yapılan PCA sonucunda, ilk iki ana bileşen hesaplandı ve

bunların toplam varyansa katkıları belirlendi. Örneklerin bu iki bileşen üzerindeki dağılımı, gruplara göre renklendirilerek görselleştirildi. Bu analiz, örnekler arasındaki benzerliklerin ve farklılıkların anlaşılmasına yardımcı oldu.

2.6.3.6 UMAP Analizi

Yüksek boyutlu verilerin iki boyuta indirgenmesi ve örneklerin kümeleşme paternlerinin incelenmesi için UMAP kullanıldı. Sayım matrisi üzerinde yapılan UMAP analizi sonucunda, örneklerin iki boyutlu bir düzlemde dağılımları elde edildi ve gruplara göre renklendirildi. Bu yöntem, örneklerin mikrobiyal profillerine göre nasıl ayrıştığını veya benzerlik gösterdiğini ortaya koydu.

2.6.3.7 NMDS Analizi

Ekolojik veri setlerinde örnekler arasındaki ilişkiyi incelemek için NMDS analizi uygulandı. Bray-Curtis uzaklık matrisi hesaplanarak, NMDS ile örneklerin iki boyutlu bir düzlemdeki pozisyonları belirlendi. Analizin stres değeri hesaplanarak, modelin veriyi ne kadar iyi temsil ettiği değerlendirildi. Sonuçlar, gruplar arasındaki ekolojik farklılıkları görselleştirmek için kullanıldı.

2.6.3.8 Alfa Çeşitlilik Analizi

Örneklerin mikrobiyal çeşitliliğini değerlendirmek için çeşitli alfa çeşitlilik indeksleri hesaplandı. Bunlar arasında gözlenen cins sayısı (Observed Genera), Shannon ve Simpson çeşitlilik indeksleri bulunmaktadır. Her bir örnek için hesaplanan indeksler, gruplar arasında karşılaştırılarak mikrobiyal çeşitlilikteki farklılıklar incelendi.

2.6.3.9 Çeşitlilik İndekslerinin Görselleştirilmesi ve Karşılaştırılması

Alfa çeşitlilik indeksleri, gruplara göre kutu grafikleri ve saçılım noktaları kullanılarak görselleştirildi. Özellikle Shannon çeşitlilik indeksi için gruplar arasındaki farklılıklar vurgulandı. Grafikler, gruplar arasındaki potansiyel farklılıkları daha iyi anlamak için kullanıldı.

2.6.3.10 Alfa Çeşitlilik İçin İstatistiksel Testler

Çeşitlilik indekslerinin gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklar gösterip göstermediğini belirlemek için Kruskal-Wallis testi uygulandı. Anlamlı sonuçlar elde edildiğinde, Benjamini-Hochberg düzeltmesi kullanılarak ikili gruplar arasında Wilcoxon eşleşmemiş çiftler testi ile ayrıntılı karşılaştırmalar yapıldı.

2.6.3.11 Beta Çeşitlilik Analizi

Mikrobiyal topluluk kompozisyonlarının gruplar arasında farklılık gösterip göstermediğini belirlemek için beta çeşitlilik analizi yapıldı. Bray-Curtis uzaklık matrisi kullanılarak, PERMANOVA (Permutasyonlu Varyans Analizi) uygulandı. Bu analiz, gruplar arasındaki topluluk farklılıklarının istatistiksel olarak anlamlı olup olmadığını değerlendirdi.

2.6.3.12 Diferansiyel Bolluk Analizi

Gruplar arasındaki spesifik taksonların bolluklarında farklılık olup olmadığını belirlemek için DESeq2 paketi kullanıldı. Sayım verileri normalize edilerek, düşük bolluklu taksonlar filtrelendi ve gruplar arasındaki diferansiyel bolluk analizleri gerçekleştirildi. Sonuçlar, anlamlı farklılık gösteren taksonların belirlenmesinde kullanıldı.

2.6.3.13 Volkan Grafikleri ile Diferansiyel Bolluk Görselleştirmesi:

Diferansiyel bolluk analizlerinin sonuçları, volkan grafikleri kullanılarak görselleştirildi. Bu grafikler, log2 kat değişimi ve -log10 p-değeri eksenlerinde taksonların dağılımını gösterir. Anlamlı farklılık gösteren taksonlar kırmızı ile vurgulanarak, potansiyel biyobelirteçlerin belirlenmesine yardımcı oldu.

2.6.3.14 Isı Haritası Oluşturulması

En bol bulunan 20 cins seçilerek, örnekler arasındaki bolluk dağılımları ısı haritası ile görselleştirildi. Veriler, varyans dengeleyici dönüşüm ile normalize edildi ve gruplara göre örnek anotasyonları eklendi. Isı haritası, taksonların örnekler ve gruplar arasındaki bolluk paternlerini ortaya koydu.

2.6.3.15 Taksonomik Kompozisyonun Çubuk Grafiklerle Gösterilmesi

Filum düzeyinde taksonomik kompozisyon, çubuk grafikler kullanılarak görselleştirildi. Her bir örnek için filum seviyesindeki relatif bolluklar hesaplandı ve gruplara göre karşılaştırmalar yapıldı. Bu grafikler, mikrobiyal toplulukların genel yapısını ve gruplar arasındaki potansiyel farklılıkları göstermede kullanıldı.

2.6.3.16 Korelasyon Ağı Analizi

En bol bulunan 50 cins arasında Spearman korelasyon analizi yapıldı. Anlamlı ve güçlü korelasyonlar ($p < 0.05$ ve korelasyon katsayısı > 0.6) belirlenerek, taksonlar arasındaki ilişkiler bir ağ grafiği ile görselleştirildi. Igraph ve ggraph paketleri kullanılarak oluşturulan ağ grafiğinde, pozitif ve negatif korelasyonlar farklı renklerle gösterildi.

2.6.3.17 Kanonik Korelasyon Analizi (CCA)

Mikrobiyal topluluk kompozisyonları ile çevresel faktörler (örneğin, gruplar ve bakteriyel DNA yüzdesi) arasındaki ilişkileri incelemek için CCA uygulandı. Analiz sonuçları, örneklerin ve taksonların iki boyutlu düzlemdeki dağılımlarını gösteren bir grafik ile görselleştirildi. GGvegan paketi kullanılarak oluşturulan grafik, çevresel değişkenlerin mikrobiyal kompozisyon üzerindeki etkilerini ortaya koydu.

2.6.3.18 Random Forest Sınıflandırması

Örnek gruplarını sınıflandırmak ve önemli taksonları belirlemek için Random Forest modeli kullanıldı. Model, en bol bulunan taksonların sayım verileri ve gruplar kullanılarak eğitildi. Model performansı, doğru sınıflandırma oranı ve değişken önem skorları hesaplandı. Önemli taksonlar, modelin sınıflandırma yeteneğine en çok katkıda bulunan taksonlar olarak belirlendi.

2.6.3.19 Sonuçların Raporlanması

Analizlerin bulguları, tablolar ve grafikler ile detaylı olarak sunuldu. Örnek dağılımları, alfa ve beta çeşitlilik sonuçları, istatistiksel testlerin p-değerleri ve diferansiyel bolluk analizlerinin önemli sonuçları tablolar halinde raporlandı.

Ayrıca, oluşturulan grafikler (örneğin, PCA, UMAP, NMDS, volkan grafikleri, ısı haritaları ve ağ grafikleri) sonuçların görsel olarak desteklenmesini sağladı.

2.6.4. Shotgun Metagenomik Analizi

2.6.4.1 Veri İçerik Aktarma ve Ön İşleme:

OTU Tablosunun İçerik Aktarılması: BIOM formatındaki OTU tablosu içerik aktarıldı ve insan okumaları (takson numarası '9606' ile başlayan) verilerden çıkarıldı.

2.6.4.2 Taksonomi Tablosunun İçerik Aktarılması

Taksonomi bilgileri, TSV formatındaki bir dosyadan alındı ve Phyloseq nesnesi için uygun formata dönüştürüldü. Taksonomik seviyeler (Kingdom, Phylum, Class, Order, Family, Genus, Species) belirlendi.

2.6.4.3 Metaverinin İçerik Aktarılması

Örnek metaverisi, CSV formatında içerik aktarıldı ve örnek ID'leri ile eşleştirildi.

2.6.4.4 Phyloseq Nesnesinin Oluşturulması

OTU matrisi, taksonomi tablosu ve metaveri kullanılarak Phyloseq nesnesi oluşturuldu. Düşük bolluklu OTU'lar, belirli bir eşik değerine göre filtrelendi ve analizlerde kullanılmak üzere temiz bir veri seti hazırlandı.

2.6.4.5 Filogenetik Ağacın Oluşturulması

OTU'lar için rastgele bir filogenetik ağaç oluşturuldu ve Phyloseq nesnesine eklendi. Bu adım, filogenetik çeşitlilik analizleri için gereklidir.

2.6.4.6 Veri Kalitesinin Değerlendirilmesi ve Görselleştirme:

Filogenetik Ağacın Görselleştirilmesi: Örnek gruplarına göre renklendirilmiş filogenetik ağaçlar oluşturuldu.

2.6.4.7 Isı Haritaları ve Çubuk Grafikleri

Mikrobiyal bollukların ve taksonomik kompozisyonların görselleştirilmesi için ısı haritaları ve çubuk grafikleri oluşturuldu.

2.6.4.8 Alfa ve Beta Çeşitlilik Analizleri:

Alfa Çeşitlilik

Örneklerin çeşitlilik indeksleri hesaplandı ve gruplar arasında karşılaştırıldı. Wilcoxon Rank-Sum testi kullanılarak gruplar arasındaki farklar istatistiksel olarak test edildi.

Beta Çeşitlilik

Bray-Curtis uzaklık metriği kullanılarak PCoA ve NMDS analizleri yapıldı. PERMANOVA testi ile gruplar arasındaki farklılıklar değerlendirildi.

2.6.4.9 Diferansiyel Bolluk Analizi:

Gruplar arasındaki diferansiyel olarak bolluk gösteren taksonlar belirlenmek için DESeq2 kullanıldı. Düşük sayımlı taksonlar filtrelendi ve sonuçlar volkan grafikleri ile görselleştirildi.

2.6.4.10 Makine Öğrenmesi Sınıflandırması:

Örneklerin gruplarını tahmin etmek ve önemli taksonları belirlemek için Random Forest modeli eğitildi. Model performansı, hata oranları ve değişken önem skorları hesaplandı.

2.6.4.11 Korelasyon Ağı Analizi

En bol bulunan taksonlar arasında korelasyon analizi yapılarak, anlamlı ilişkiler ağ grafiği ile görselleştirildi.

2.6.4.12 Kanonik Korelasyon Analizi (CCA)

Mikrobiyal kompozisyon ile çevresel faktörler arasındaki ilişkileri incelemek için CCA uygulandı.

2.6.4.13 Sonuçların Raporlanması ve Dokümantasyon

Tüm analizlerin sonuçları, detaylı tablolar ve grafikler ile raporlandı. Önemli bulgular vurgulandı ve analizlerin tekrarlanabilirliği için kullanılan kodlar ve paketler dokümanite edildi.

2.7 Sınırlamalar ve Zorluklar

Düşük Biyokütle ve Kontaminasyon Riski

Kontaminasyonu önlemek ve izlemek için kapsamlı önlemler alınmıştır, ancak düşük mikrobiyal DNA içeriği bir sorun olmaya devam etmektedir.

Potansiyel Karıştırıcılar

Diyet ve çevresel maruziyetler gibi ölçülmemiş değişkenler sonuçları etkileyebilir.

Biyoinformatik Sınırlamalar

Referans veri tabanları eksik olabilir, bu da taksonomik atamaları etkileyebilir.



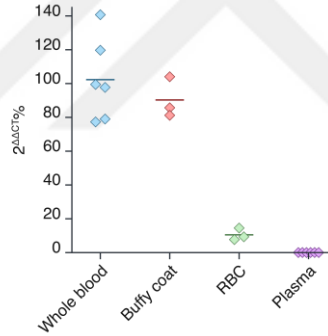
3.BULGULAR

3.1 Kan Bileşenlerinde Bakteriye DNA Dağılımı

Bakteriyel DNA'nın kandaki varlığını ve dağılımını araştırmak için öncelikle farklı kan bileşenlerinin kapsamlı bir analizini gerçekleştirdik. Kan örnekleri farklı bileşenlere ayrıldı: PMN hücreleri, PBMC hücreleri, kırmızı kan hücreleri (RBC'ler), plazma veya serum. Her fraksiyon, bakteriyel DNA konsantrasyonlarını belirlemek için bakteriyel 16S rRNA genini hedefleyen kantitatif PCR kullanılarak analiz edildi.

3.1.1. Bakteriyel DNA'nın Kan Bileşenleri Arasındaki Dağılım Modeli

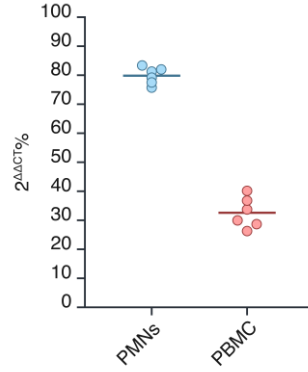
Kantitatif analiz, bakteriyel DNA'nın kan bileşenleri içinde belirgin bir şekilde bölümlere ayrıldığını ortaya koydu (Şekil 3.1). Buffy coat, dolaşımdaki toplam bakteriyel DNA'nın %89,77'sini içeren baskın rezervuar olarak ortaya çıktı (Şekil 3.1) .



Şekil 3.1. Bakteriyel DNA'nın kan bileşenleri arasında dağılımı.

Nokta grafik, bakteriyel DNA'nın farklı kan bileşenlerindeki yüzde dağılımını göstermektedir. Buffy coat, PMN'ler (%70,64) ve PBMC'ler (%29,36) arasında bölünen bakteriyel DNA'nın çoğunu (%89,77) içerir. Kırmızı kan hücreleri toplam bakteri DNA'sının %10,20'sini içerirken, plazma %0,03'ünü içermektedir.

Buffy coat içinde, polimorfonükleer lökositler (PMN'ler) ve periferik kan mononükleer hücreleri (PBMC'ler) arasında spesifik bir dağılım modeli gözlemlendi; PMN'ler bakteriyel DNA'nın %70,64'ünü barındırırken PBMC'ler %29,36'sını içerdiği belirlendi (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Bakteriyel DNA'nın buffy coat bileşenleri arasında dağılımı.

Buffy coat, PMN'ler (%70,64) ve PBMC'ler (%29,36) arasında bölünen bakteriyel DNA'nın çoğunu (%89,77) içerir.

Bu bulgular, bakteriyel DNA'nın tüm kan bileşenlerinde farklı bir bölümlenme modeliyle mevcut olduğunu gösterdi. Kanın hücre dışı kompartmanı bakteriyel DNA taşınan miktarı gösterdiği için tarama için serum örnekleri kullandık.

3.1.2. Kalite Kontrol ve Validasyon

Bulgularımızın güvenilirliğini sağlamak için titiz kalite kontrol önlemleri uyguladık:

- 1.Tüm deneyler, potansiyel kontaminasyonu hesaba katmak için uygun negatif kontrolleri içeriyordu,
- 2.Teknik kopyalar yüksek tekrarlanabilirlik gösterdi,
- 3.Bakteriyel DNA konsantrasyonları, 16S rRNA geninin farklı bölgelerini hedefleyen çoklu primer setleri kullanılarak doğrulandı.

3.2 Kohort Karakterizasyonu ve İlk Tarama

3.2.1. Çalışma Popülasyonu

Çalışma, astım ve obezite varlığına göre dört farklı gruba ayrılmış 131 katılımcıyı kapsamaktadır:

Kontrol-Normal: Kronik hastalık veya astım öyküsü olmayan ve VKİ 30 kg/m²'nin altında olan bireyler.

Kontrol-Obez: Kronik hastalık veya astım öyküsü olmayan ve VKİ 30 kg/m² veya üzerinde olan bireyler.

Astım-Normal: Astım tanısı konmuş ve Vücut Kitle İndeksi (VKİ) 30 kg/m²'nin altında olan bireyler.

Astım-Obez: Astım tanısı konmuş ve VKİ 30 kg/m² veya üzerinde olan bireyler.

Her katılımcıya çeşitli sağlık parametrelerini değerlendirmek üzere bir dizi demografik ve klinik değerlendirme uygulanmıştır.

3.2.2. Demografik Özellikler

Astım-Obez grubu en yüksek yaş ortalamasına ve VKİ'ye sahip olup, ağırlıklı olarak ilköğretim veya üniversite eğitimi almış ev hanımlarından oluşmaktadır. Kontrol-Normal grubu ise çoğunlukla daha genç, daha düşük VKİ'ye sahip ve başta öğrenciler olmak üzere çeşitli mesleklere sahip bireylerden oluşmuştur. *Tablo 3.1* çalışma katılımcılarının demografik özelliklerini özetlemektedir.

Tablo 3.1. Katılımcıların Demografik Özellikleri

<i>Hasta Grubu</i>	Katılımcı Sayısı	Ortalama Yaş (yıl)	Ortalama Yükseklik (cm)	Ortalama Ağırlık (kg)	Ortalama VKİ (kg/m²)
<i>Kontrol-Normal</i>	20	35.2	162.6	57.95	21.85
<i>Kontrol-Obez</i>	18	41.5	160.5	82.89	32.17
<i>Astım-Normal</i>	43	42.49	161.1	59.12	22.7

<i>Astım- Obez</i>	50	54.12	155.78	84.32	35.21
------------------------	----	-------	--------	-------	-------

3.2.3. Klinik Özellikler

Atopi ve eozinofili ağırlıklı olarak astım gruplarında mevcut olup astım şiddeti farklı derecelerdir. FEV₁ ve FVC yüzdeleri akciğer fonksiyon parametrelerini göstermekte olup Astım-Obez katılımcılar genellikle Astım-Normale kıyasla daha düşük değerler sergilemektedir. Astım-Normal ve Astım-Obez gruplarındaki katılımcılar astım atakları geçirmiş ve değişen derecelerde Oral Kortikosteroidlere (OKS) ihtiyaç duymuştur. Akciğer fonksiyonu parametreleri (FEV₁, FVC, FEV₁/FVC, MMF) Astım-Obez grubunda belirgin şekilde daha düşük olup daha ciddi hava yolu tıkanıklığına işaret etmektedir. *Tablo 3.2* katılımcıların klinik özelliklerini özetlemektedir.

Tablo 3.2. Katılımcıların Klinik Özellikleri

<i>Hasta Grubu</i>	Astım-Normal	Astım-Obez
<i>Atopi Varlığı (%)</i>	80	55
<i>Eozinofili Varlığı (%)</i>	53	64
<i>Alerji Teşhisi ile</i>	Deri Prick/Her İkisi	Deri Prick/Her İkisi
<i>Alerjik</i>	Polen, Mite, vs.	Polen, Mite, Küf
<i>Astım Başlangıç Yaşı</i>	Erken/Geç/Yetişkin	Erken/Geç/Yetişkin
<i>Hastalık Süresi (yıl)</i>	2-44	1-47
<i>FEV₁ (%)</i>	49-107	36-130
<i>FVC (%)</i>	68-119	63-159
<i>FEV₁/FVC (%)</i>	75-91	49-94
<i>MMF (%)</i>	52-119	12-159

Astım-Normal grubunun %53,3'ünde orta derecede astım, %26,7'sinde ağır astım ve %20'sinde hafif astım bulunmaktadır. Buna karşılık, Astım-Obez grubunda ağır astım (%18,2) ve hafif astıma (%27,3) kıyasla daha yüksek oranda orta derecede astım (%54,5) bulunmaktadır. Son bir yıldaki ortalama astım atağı sayısı her iki grupta da 0 ile 3 arasında değişirken, Oral Kortikosteroid (OKS) ihtiyacı 0 ile 2 arasında değişmektedir. *Tablo 3.3* katılımcılar arasındaki astım şiddetini kategorize etmektedir.

Tablo 3.3. Katılımcılar Arasında Astım Şiddeti

<i>Hasta Grubu</i>	Hafif (%)	Orta (%)	Şiddetli (%)	Ortalama Astım Atağı Sayısı (Son Bir Yıl)	Ortalama OCS İhtiyacı (Geçen Yıl)
<i>Astım-Normal</i>	20%	53.30%	26.70%	0-3	0-1
<i>Astım-Obez</i>	27.30%	54.50%	18.20%	0-3	0-2

Astım-Normal grubu erken ve yetişkin başlangıçlı astım arasında eşit bir dağılıma sahiptir ve daha küçük bir oranda geç başlangıçlı astım görülmektedir. Buna karşılık, Astım-Obez grubunda ağırlıklı olarak yetişkin başlangıçlı astım (%52,3) görülmüş, bunu geç başlangıçlı (%25) ve erken başlangıçlı (%22,7) astım izlemiştir. *Tablo 3.4*, katılımcılar arasında astım başlangıç yaşlarının dağılımını göstermektedir.

Tablo 3.4. Katılımcıların Astım Başlangıcına Göre Dağılımı

<i>Hasta Grubu</i>	Erken Başlangıçlı (<20 yaş) (%)	Yetişkin (20-40 yaş) (%)	Geç Başlangıçlı (≥41 yaş) (%)
<i>Astım-Normal</i>	16.3%	60.47%	23.26%
<i>Astım-Obez</i>	2%	48%	50%

Alerjik rinit, gıda alerjileri ve atopik dermatit astım gruplarında daha yaygındır. Diabetes Mellitus (DM), Hipertansiyon (HT), Gastroözofageal Reflü Hastalığı (GÖRH) ve guatr gibi sistemik komorbiditeler özellikle Astım-Obez grubunda Astım-Normal grubuna kıyasla daha yüksek prevalansını sergilemiştir. Kontrol gruplarında bu rahatsızlıkların varlığı ya çok az ya da hiç görülmemiştir. *Tablo 3.5*, katılımcılar arasında sistemik komorbiditelerin oranlarını detaylandırmaktadır.

Tablo 3.5. Katılımcılar Arasında Komorbiditelerin Görülme Oranı

Hasta Grubu	Diabetes Mellitus (DM) (%)	Hipertansiyon (HT) (%)	Gastroözofageal Reflü Hastalığı (GÖRH) (%)	Guatr (%)	Mitral Stenoz (%)	Diğer Komorbiditeler (%)
<i>Astım-Normal</i>	13.3	6.7	6.7	0	0	6.7
<i>Astım-Obez</i>	22.7	36.4	11.4	9.1	2.3	18.2
<i>Kontrol-Normal</i>	6.7	3.3	0	3.3	0	0
<i>Kontrol-Obez</i>	6.7	6.7	0	6.7	0	0

Nonsteroidal Anti-İnflamatuar İlaç (NSAİİ) alerjileri, alerjik rinit, zehir alerjileri, gıda alerjileri, atopik dermatit, ürtiker ve lateks alerjileri değişen yaygınlık oranlarıyla sadece astım gruplarında gözlenmiştir. Venom alerjileri, gıda alerjileri, atopik dermatit, ürtiker ve lateks alerjileri Astım-Normal grubunda Astım-Obez grubuna kıyasla daha yüksek prevalansa sahiptir. *Tablo 3.6* çeşitli alerji türlerinin katılımcı grupları arasındaki dağılımını göstermektedir.

Tablo 3.6. Astmatik Katılımcılar Arasında Alerji Türleri

Hasta Grubu	NSAİİ Alerjisi (%)	Alerjik Rinit (%)	Venom Alerjisi (%)	Gıda Alerjisi (%)	Atopik Dermatit (%)	Ürtiker (%)	Lateks Alerjisi (%)
<i>Astım-Normal</i>	20	40	20	30	20	15	10
<i>Astım-Obez</i>	10	45	15	25	25	5	5

Astım gruplarının önemli bir kısmı çocukluk çağında astım, gıda alerjileri, atopik dermatit, egzama ve alerjik rinit öyküsü bildirirken, kontrol grupları hiçbiri bildirmemiştir. *Tablo 3.4* katılımcılar arasında çocukluk çağı alerjik durumlarının yaygınlığını göstermektedir.

Tablo 3.7. Astmatik Katılımcılar Arasında Çocukluk Çağı Alerjik Öyküsü

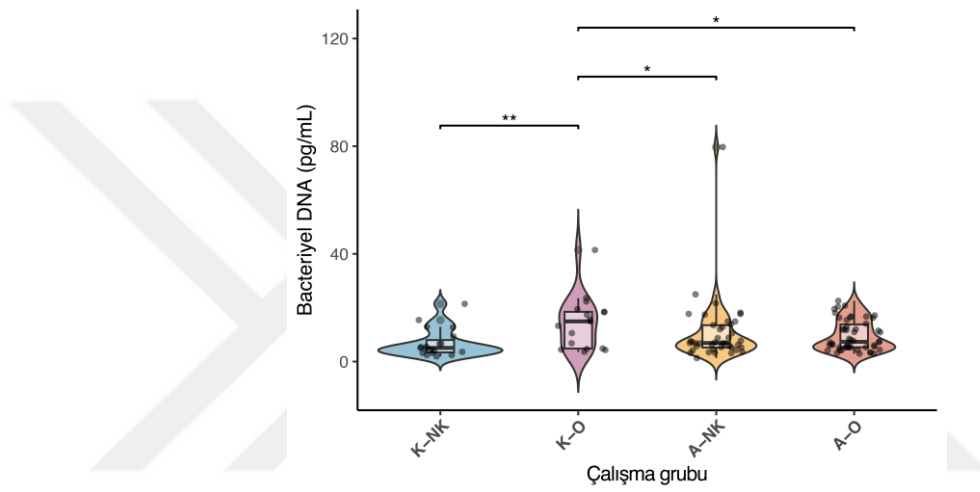
<i>Hasta Grubu</i>	<i>Çocukluk Çağı Astımı (%)</i>	<i>Çocukluk Çağı Gıda Alerjisi (%)</i>	<i>Çocukluk Çağı Atopik Dermatiti (%)</i>	<i>Çocukluk Çağı Egzaması (%)</i>	<i>Çocukluk Çağı Alerjik Riniti (%)</i>
<i>Astım-Normal</i>	20	15	10	5	15
<i>Astım-Obez</i>	30	20	15	10	20
<i>Kontrol-Normal</i>	0	0	0	0	0
<i>Kontrol-Obez</i>	0	0	0	0	0

Bu dört grubun oluşturulması, astım ve obezitenin bireylerin sağlık durumu üzerindeki etkilerini karşılaştırmalı olarak incelememize olanak tanıdı ve çalışma sonuçlarının daha kapsamlı ve anlamlı olmasını sağladı. Böylece hem astım hem de obezite faktörlerinin ayrı ayrı ve birlikte rol oynadığı sağlık parametrelerinin detaylı analizine imkan sağlanmış oldu. Bu yapılandırılmış popülasyon, demografik ve klinik özelliklerin derinlemesine değerlendirilmesi için sağlam bir temel oluşturmuş oldu ve yapılan derin metagenomik analizin sonuçların klinik ile ilişkilerinin daha net anlaşılmasını mümkün kıldı.

3.3 İlk Biyomarker Analizi

3.3.1. Bakteriyel DNA Miktar Tayini

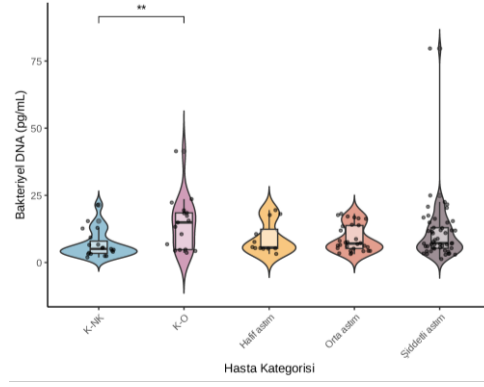
Bakteriyel DNA seviyeleri 131 katılımcının tamamında 16S rRNA genini hedefleyen qPCR kullanılarak ölçüldü. Analiz sonucunda çalışma grupları arasında önemli farklılıklar olduğunu bulduk (Şekil 3.3). Kontrol obez grubunda bakteriyel DNA seviyelerinin normal kilolu kontrollere göre anlamlı derecede yüksek olduğu gözlemlendi ($p < 0.01$). Bu yükselme özellikle astım grupları ile karşılaştırmada da gözlemlendi ($p < 0.05$).



Şekil 3.3 Çalışma grupları arasında serum bakteriyel DNA seviyelerinin (pg/mL) dağılımı.

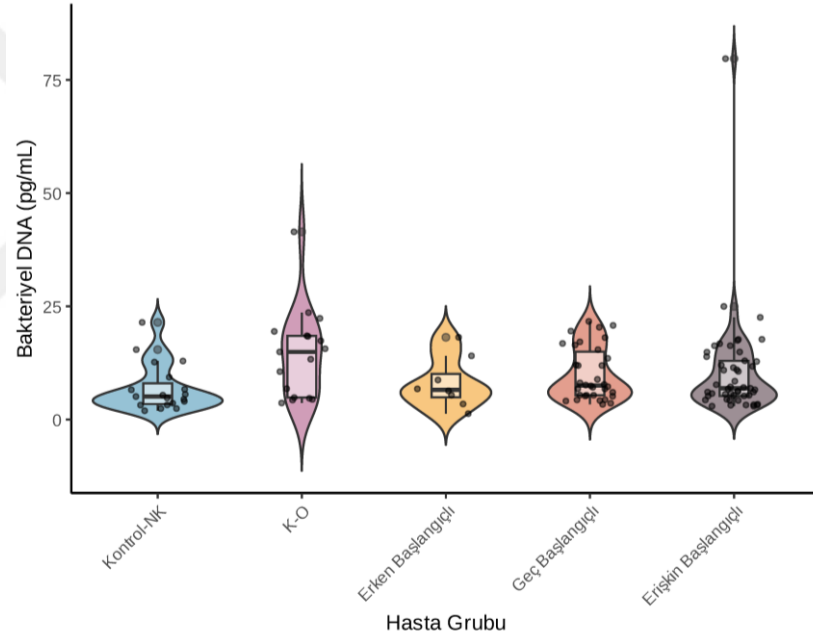
*Kutu grafikleri medyan, çeyrekler ve aralığı göstermektedir. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.*

Hastalık şiddetine göre yapılan analizlerde, bakteriyel DNA seviyelerinin hastalık şiddeti ile ilişkili olarak değişmediği gözlemlendi (Şekil 3.4).



Şekil 3.4 Astım şiddetine göre serum bakteriyel DNA düzeyleri

Hastalık başlangıç yaşına göre yapılan değerlendirmede (Şekil 3.5), bakteriyel DNA seviyelerinin gruplar arasında anlamlı olmadığı tespit edildi.

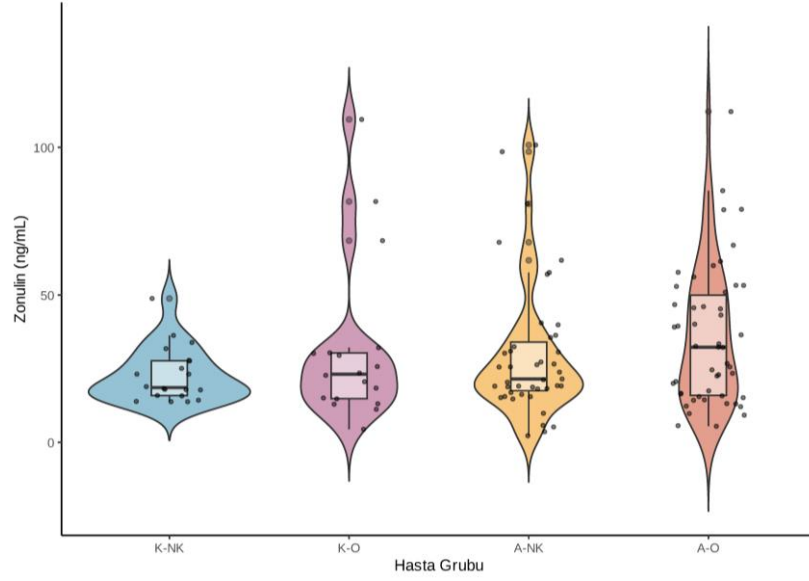


Şekil 3.5 Hastalık başlangıç yaşına göre serum bakteriyel DNA düzeyleri

Tüm bu bakteriyel DNA bulguları ışığında, araştırmamız bariyer bütünlüğünün bir göstergesi olan ZFP sonuçlarının değerlendirilmesiyle devam etti.

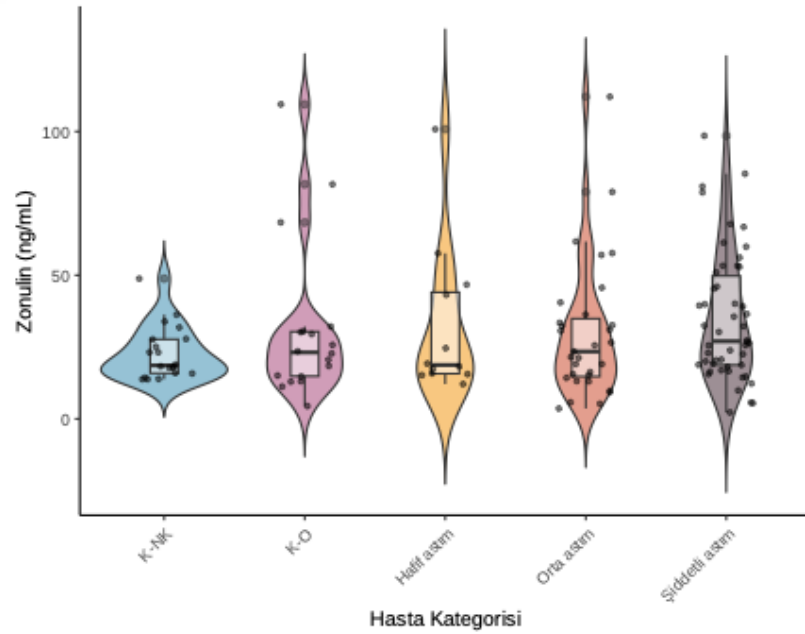
3.3.2. Zonulin Aile Peptidi (ZFP) Analizi

ZFP seviyeleri epitelyal bariyer bütünlüğünün bir belirteci olarak ölçüldü. Şekil 3.6'da gösterildiği gibi, çalışma grupları arasında serum zonulin düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı. Gruplar arası zonulin değerlerinin benzer dağılım gösterdiği gözlemlendi ($p > 0.05$).



Şekil 3.6 Çalışma gruplarına göre serum zonulin düzeyleri

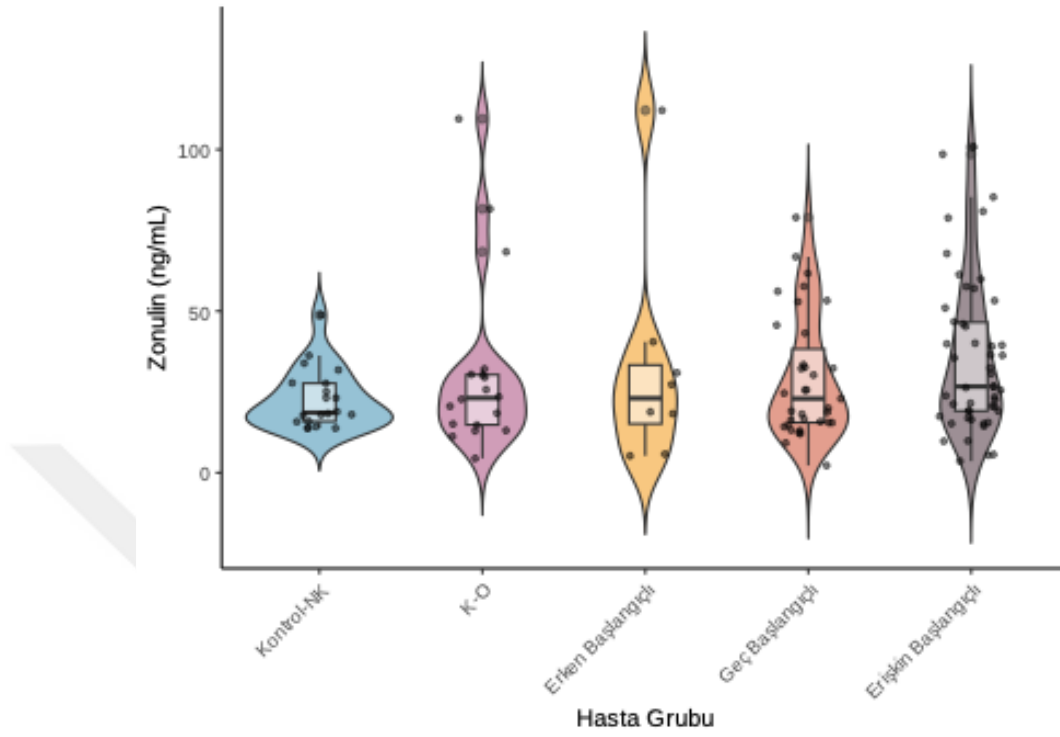
Benzer şekilde, astım şiddetine göre yapılan analizlerde de (Şekil 3.7) serum zonulin düzeylerinin hafif, orta ve ağır astım grupları arasında anlamlı farklılık göstermediği tespit edildi ($p > 0.05$).



Şekil 3.7 Astım şiddetine göre serum zonulin düzeyleri

Astım başlangıç yaşına göre yapılan değerlendirmede de (Şekil 3.8) erken, geç ve erişkin yaş başlangıçlı astım grupları arasında serum bakteriyel DNA düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($p > 0.05$). Bu

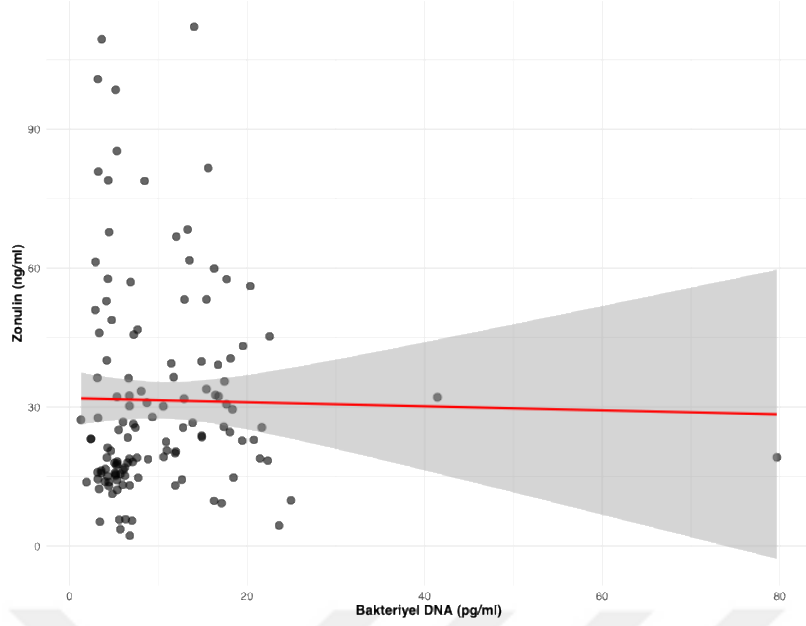
sonuç, bakteriyel DNA seviyelerinin hastalığın başlangıç zamanından etkilenmediğini gösterdi.



Şekil 3.8 Astım başlangıç yaşına göre serum bakteriyel DNA düzeyleri

3.3.3. Biyobelirteçlerin Korelasyon Analizi

Tüm gruplar birlikte değerlendirildiğinde bakteriyel DNA ve zonulin değerleri arasında zayıf bir pozitif korelasyon gözlemlendi (Spearman $\rho = 0.124$, $p = 0.1649$, Şekil 3.9).



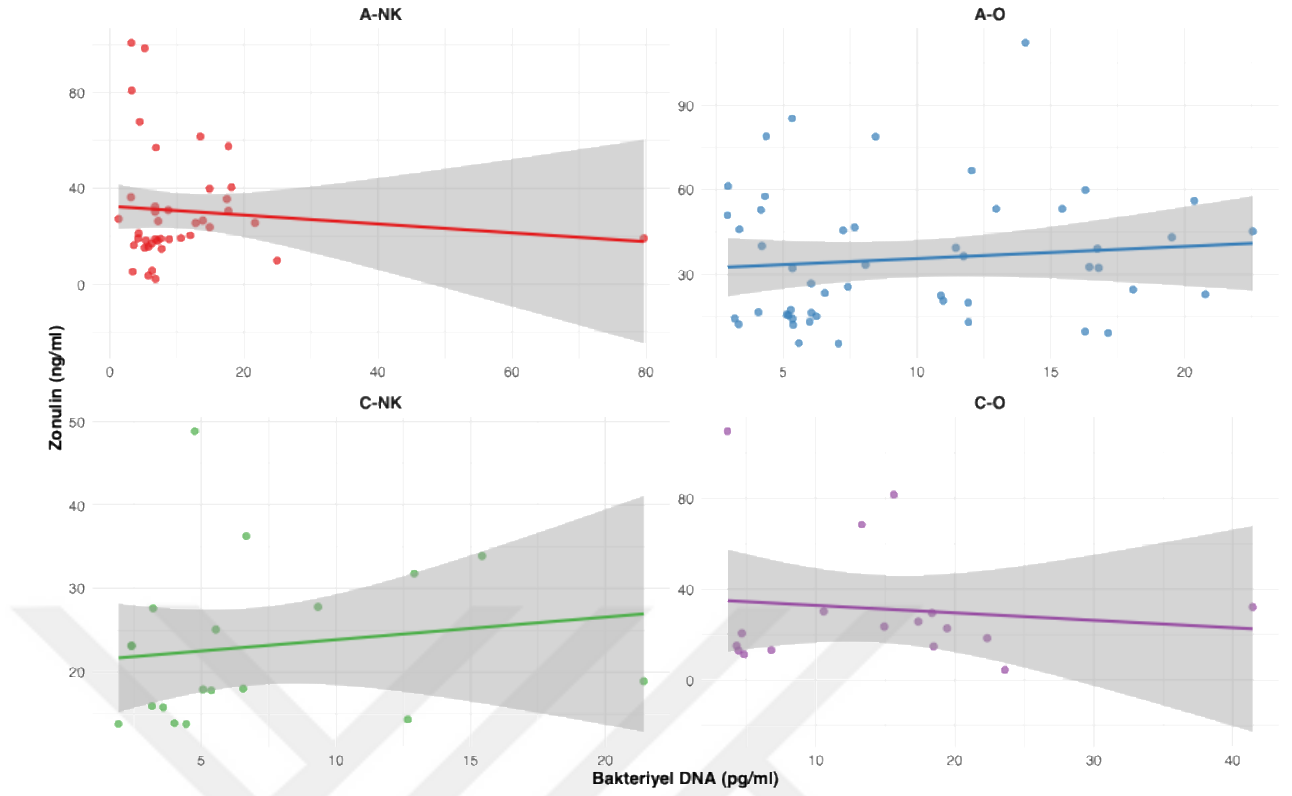
Şekil 3.9 Tüm gruplara göre Bakteriyel DNA – Zonulin düzeylerinin serpmme diagramı

Alt grup analizlerinde, kontrol-normal grupta (n=19) orta düzeyde pozitif bir korelasyon eğilimi görüldü ($\rho = 0.391$, $p = 0.0982$), ancak bu ilişki istatistiksel anlamlılık düzeyine ulaşmadı (Tablo 3.8). Astım gruplarında ise korelasyonlar oldukça zayıftı: astım-normal grupta (n=41) $\rho = 0.068$ ($p = 0.6704$) ve astım-obez grupta (n=50) $\rho = 0.088$ ($p = 0.5444$) olarak hesaplandı. En düşük korelasyon kontrol-obez grubunda (n=17) gözlemlendi ($\rho = 0.007$, $p = 0.9811$).

Tablo 3.8. Çalışma Gruplarında Bakteriyel DNA ve Zonulin Düzeyleri Arasındaki Spearman Korelasyon Analizi

Çalışma Grupları	n	Spearman P	P-Value
Tüm gruplar	127	0.124	0.1649
K-NK	19	0.391	0.0982
A-NK	41	0.068	0.6704
A-O	50	0.088	0.5444
K-O	17	0.007	0.9811

Not: K-NK: Kontrol-Normal Kilo, A-NK: Astım-Normal Kilo, A-O: Astım-Obez, K-O: Kontrol-Obez



Şekil 3.10 Çalışma Gruplarında Bakteriyel DNA ve Zonulin Düzeyleri Arasındaki Korelasyon Analizi

Bu sonuçlar, bakteriyel DNA ve zonulin düzeyleri arasında gruplar genelinde ve alt gruplarda istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmadığını gösterdi.

3.4 Seçilmiş Örneklerde Derin Mikrobiyom Analizi

3.4.1. Örnek Seçim Stratejisi

Başlangıçtaki 131 katılımcıdan oluşan kohortumuzdan, sistematik, çok kriterli bir yaklaşım kullanarak ayrıntılı mikrobiyom analizi için 67 örnek seçtik. Seçim, farklı fenotiplerin kapsamlı bir şekilde kapsanmasını sağlamak için bakteriyel DNA konsantrasyonlarına, klinik parametrelere ve grup temsiline dayanıyordu. Genellikle tüm gruplardan en yüksek bakteriyel DNA'ya sahip olan örnekleri ve kontrol için ilaveten düşük DNA düzeyleri olan örnekleri seçtik.

3.4.1.1 Gruplar Arasında Örneklem Dağılımı

Klinik özellikleri ve bakteriyel DNA içeriklerine göre **10 farklı gruba** ayrılan toplam **67 numune** çalışmaya dahil edilmiştir. Örneklerin bu gruplar arasındaki dağılımı aşağıdaki gibidir:

Kontrol Grupları (Toplam n=15)

- K-Y (Kontrol-Yüksek): n=5
- K-D (Kontrol-Düşük): n=10

Normal Kilolu Astım Grupları (Toplam n=14)

- NK-HA-Y (Normal Kilo-Hafif Astım-Yüksek): n=2
- NK-OA-Y (Normal Kilo-Orta Astım-Yüksek): n=4
- NK-ŞA-Y (Normal Kilo-Şiddetli Astım-Yüksek): n=8

Obez Astım Grupları (Toplam n=38)

- O-Y (Obez-Yüksek): n=10
- O-HA-Y (Obez-Hafif Astım-Yüksek): n=2
- O-OA-Y (Obez-Orta Astım-Yüksek): n=6
- O-ŞA-Y (Obez-Şiddetli Astım-Yüksek): n=10
- O-ŞA-D (Obez-Şiddetli Astım-Düşük): n=10

Not: K: Kontrol, NK: Normal Kilo, O: Obez, HA: Hafif Astım, OA: Orta Astım, ŞA: Şiddetli Astım, Y: Yüksek, D: Düşük

3.4.1.2 Seçilen ve Seçilmeyen Örneklerin Karşılaştırılması

Potansiyel seçim yanlılığını değerlendirmek için, seçilen ve seçilmeyen örnekler arasındaki temel özellikleri karşılaştırdık (Tablo 3.9).

Tablo 3.9. Seçilen ve Seçilmeyen Örneklerin Karşılaştırılması

<i>Karakteristik</i>	<i>Seçilenler (n=67)</i>	<i>Seçilmeyenler (n=64)</i>
<i>Demografik Bilgiler</i>		
<i>Yaş (yıl)*</i>	42.8 ± 13.6	41.2 ± 14.2
<i>Kadın (%)</i>	79.1	82.8
<i>BMI (kg/m²)*</i>	28.4 ± 5.8	27.9 ± 5.4
<i>Klinik Parametreler</i>		
<i>Astım Şiddeti (%)</i>		
- <i>Hafif</i>	23.9	25.0
- <i>Orta düzeyde</i>	53.7	51.6
- <i>Şiddetli</i>	22.4	23.4
<i>Laboratuvar Değerleri</i>		
<i>Bakteriyel DNA (ng/μL)*</i>	0.48 ± 0.22	0.31 ± 0.18
<i>ZFP (ng/mL)*</i>	54.6 ± 12.4	51.8 ± 11.8

*Değerler ortalama ± SD olarak sunulmuştur

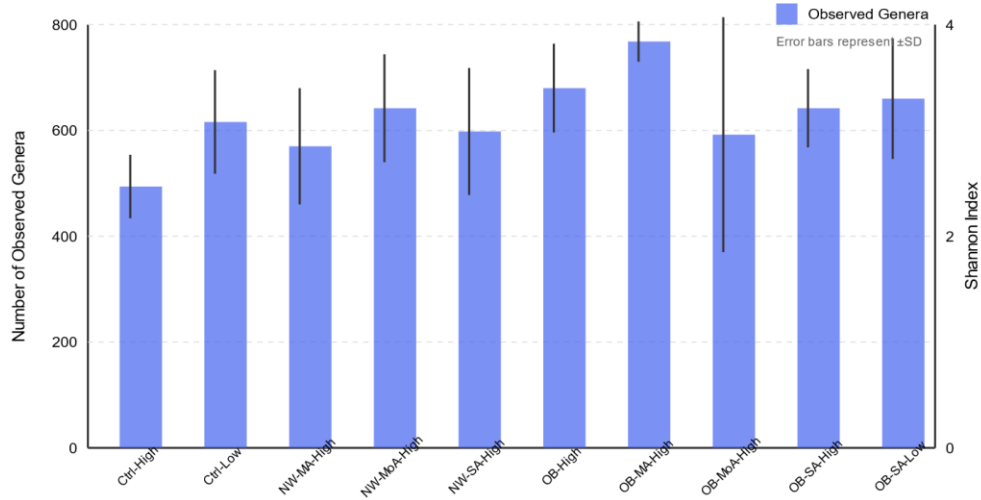
3.4.2. 16S rRNA Sekanslama Sonuçları

İlk kohorttan 67 numune 16S rRNA sekanslama kullanılarak analiz edildi.

3.4.2.1 Alfa Çeşitlilik Analizi

Her bir numune grubundaki mikrobiyal toplulukların zenginliğini ve düzgünlüğünü değerlendirmek için alfa çeşitlilik metrikleri hesaplanmıştır. Üç endeks değerlendirilmiştir: **Gözlemlenen Cinsler**, **Shannon Çeşitlilik Endeksi** ve **Simpson Çeşitlilik Endeksi**.

Alfa çeşitlilik metrikleri, örnek grupları arasında farklı modeller ortaya koymuştur. Obez-Orta Astım-Yüksek grubu en yüksek ortalama gözlenen cins sayısını (768,00 ± 38,18) sergilerken, Kontrol-Yüksek grubu en düşük sayıyı (493,60 ± 59,89) göstermiştir (Şekil 3.10). Kruskal-Wallis testi, gruplar arasında mikrobiyal zenginlik açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar olduğunu göstermiştir ($\chi^2 = 16.934$, $df = 9$, $p = 0.0498$).



Şekil 3.11 Seçilmiş Gruplarda Alfa Çeşitlilik Metriklerinin Karşılaştırılması

Shannon çeşitlilik endeksi Kontrol-Yüksek grubunda 1.84 ± 0.56 ile O-OA-Y grubunda 3.07 ± 0.21 arasında değişmiştir. Ancak Kruskal-Wallis testi, gruplar arasında Shannon çeşitliliğinde önemli bir farklılık olmadığını göstermiştir ($\chi^2 = 12.434$, $df = 9$, $p = 0.1899$). Benzer şekilde, Simpson çeşitlilik endeksi Kontrol-Yüksek grubunda 0.63 ± 0.15 'ten hem Normal Kilo-Orta Astım-Yüksek hem de Obez-Orta Astım-Yüksek gruplarında 0.88 ± 0.01 'e kadar değişmiştir, ancak farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı değildir ($\chi^2 = 12.003$, $df = 9$, $p = 0.2132$).

3.4.3. Gözlemlenen Cinsler

Mikrobiyal zenginliği temsil eden gözlenen cins sayısı gruplar arasında farklılık göstermiştir (Tablo 8). *OB-MA-Yüksek* grubu en yüksek ortalama gözlenen cins sayısını (**768,00**) sergilerken, *Kontrol-Yüksek* grubu en düşük sayıya (**493,60**) sahip olmuştur. Bu sonuçlar, farklı klinik ve fizyolojik durumlarla ilişkili mikrobiyal zenginlikte değişkenlik olduğunu göstermektedir.

Tablo 3.10 Gruplara Göre Gözlemlenen Cinslerin Sayısı

Grup	Ortalama gözlemlenen cins sayısı	Gözlemlenen sayının standart sapması
KONTROL-YÜKSEK	493.60	59.89

<i>KONTROL-DÜŞÜK</i>	616.40	97.66
<i>NK-HA-Y</i>	569.50	109.60
<i>NK-OA-Y</i>	642.50	101.26
<i>NK-ŞA-Y</i>	598.62	119.26
<i>O-Y</i>	680.60	84.12
<i>O-HA-Y</i>	768.00	38.18
<i>O-OA-Y</i>	591.00	222.30
<i>O-ŞA-Y</i>	642.70	74.21
<i>O-ŞA-D</i>	659.30	113.73

Tablo 3.11 Gözlemlenen Cinsler için Kruskal-Wallis Testi

<i>Test</i>	χ^2	<i>df</i>	<i>p değeri</i>
<i>Kruskal-Wallis</i>	16.934	9	0.0498

Gruplar arasında gözlenen cins sayısındaki farklılıkların istatistiksel anlamlılığını değerlendirmek için **Kruskal-Wallis testi** yapılmıştır (Tablo 9). Test, **9 serbestlik derecesi** ile **16,934** ki-kare değeri vermiştir ve bu da 0,05 anlamlılık eşiğinin hemen altında olan **0,0498** p-değeri ile sonuçlanmıştır. Bu da gruplar arasında mikrobiyal zenginlik açısından **istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar** olduğunu göstermektedir.

Gözlemlenen cinsler için önemli Kruskal-Wallis testi sonucu göz önüne alındığında, belirli grup farklılıklarını belirlemek için **ikili Wilcoxon karşılaştırmaları** yapılmıştır (Tablo 10).

Tablo 3.12 Gözlemlenen Cinsler için İkili Karşılaştırmalar

Grup1	Grup2	Düzeltilmiş p değeri
<i>OB-Yüksek</i>	Kontrol-Yüksek	0.03
<i>OB-Yüksek</i>	OB-SA-Yüksek	0.39
<i>OB-Yüksek</i>	OB-SA-Düşük	0.51
<i>Kontrol-Yüksek</i>	OB-SA-Yüksek	0.0000
<i>Kontrol-Yüksek</i>	OB-SA-Düşük	0.0000
<i>Kontrol-Düşük</i>	OB-Yüksek	0.14

Not: Tablonun tamamı tüm ikili grup karşılaştırmalarını içermektedir. Düzeltilmiş p-değerleri < 0,05 anlamlı farklılıkları göstermektedir.

3.4.4. Shannon Çeşitlilik Endeksi

Cinslerin hem bolluğunu hem de düzgünlüğünü hesaba katan Shannon Çeşitlilik Endeksi tüm örnek gruplarında hesaplanmıştır (Tablo 2). Endeks *Kontrol-Yüksek* grubunda **1,84** ile *OB-MA-Yüksek* grubunda **3,07** arasında değişmektedir. En yüksek ortalama çeşitlilik *OB-MA-Yüksek* grubunda, en düşük ise *Kontrol-Yüksek* grubunda gözlenmiştir.

Tablo 3.13 Gruba Göre Shannon Çeşitlilik Endeksi

<i>Grup</i>	<i>Shannon değeri ortalaması</i>	<i>Shannon değeri standart sapması</i>
<i>Kontrol-Yüksek</i>	1.84	0.56
<i>Kontrol-Düşük</i>	2.57	0.64
<i>NK-HA-Y</i>	2.91	0.02
<i>NK-OA-Y</i>	2.35	0.77
<i>NK-ŞA-Y</i>	2.46	1.05
<i>O-Y</i>	2.75	0.45
<i>O-HA-Y</i>	3.07	0.21
<i>O-OA-Y</i>	2.44	1.16
<i>O-ŞA-Y</i>	2.46	0.65
<i>O-ŞA-D</i>	2.43	0.57

Shannon Çeşitlilik Endeksinde gruplar arasında önemli farklılıklar olup olmadığını belirlemek için **Kruskal-Wallis testi** yapılmıştır (Tablo 3). Test sonucunda **9 serbestlik dereceli 12,434** ki-kare değeri elde edilmiş ve p-değeri **0,1899** olarak **bulunmuştur**. P-değeri 0,05'i aştığından, gruplar arasında Shannon Çeşitlilik İndeksinde **önemli bir farklılık** bulunmamıştır. Sonuç olarak, bu indeks için **ikili karşılaştırmalar** yapılmamıştır.

Tablo 3.14 Shannon Çeşitlilik Endeksi için Kruskal-Wallis Testi

Test	χ^2	df	p değeri
Kruskal-Wallis	12.434	9	0.1899

3.4.5. Simpson Çeşitlilik Endeksi

Bir örnekten rastgele seçilen iki bireyin aynı cinse ait olma olasılığını ölçen Simpson Çeşitlilik Endeksi de değerlendirilmiştir (Tablo 5). Endeks değerleri *Kontrol-Yüksek* grubunda **0,63** ile *NK-HA-Y* ve *O-HA-Y* gruplarında **0,88** arasında değişmektedir. Daha yüksek değerler, bu gruplar içinde belirli cinslerin daha baskın olduğunu göstermektedir.

Tablo 3.15 Gruba Göre Simpson Çeşitlilik Endeksi

Grup	Simpson	SD Simpson
Kontrol-Yüksek	0.63	0.15
Kontrol-Düşük	0.80	0.12
NK-HA-Y	0.88	0.01
NK-OA-Y	0.74	0.20
NK-ŞA-Y	0.72	0.29
O-Y	0.83	0.07
O-HA-Y	0.88	0.03
O-OA-Y	0.73	0.34
O-ŞA-Y	0.77	0.17
O-ŞA-D	0.78	0.13

Gruplar arasında Simpson Çeşitlilik Endeksindeki farklılıkları değerlendirmek için **Kruskal-Wallis testi** yapılmıştır (Tablo 6). Test, **9 serbestlik derecesi** ile **12,003** ki-kare değeri ve **0,2132** p-değeri ile sonuçlanmıştır. P-değeri 0,05'ten büyük olduğu için Simpson Çeşitlilik Endeksinde gruplar arasında **önemli bir farklılık** gözlenmemiştir. Bu nedenle, bu endeks için **ikili karşılaştırmalar** yapılmamıştır.

Tablo 3.16 Simpson Çeşitlilik Endeksi için Kruskal-Wallis Testi

Test	χ^2	df	p değeri
Kruskal-Wallis	12.003	9	0.2132

3.4.6. Beta Çeşitlilik Analizi

Bray-Curtis farklılığı kullanılarak gruplar arasındaki mikrobiyal topluluk kompozisyonundaki farklılıkları değerlendirmek için beta çeşitlilik analizi yapılmıştır. Bu farklılıkların anlamlılığını test etmek için **PERMANOVA (Permütasyonel Çok Değişkenli Varyans Analizi)** yapılmıştır.

Tablo 3.17 Bray-Curtis Farklılığı için PERMANOVA Sonuçları

<i>Dönem</i>	<i>Df</i>	<i>SumOfSqs</i>	<i>R2</i>	<i>F</i>	<i>Pr(>F)</i>
<i>Model</i>	9	1.2988	0.1413	1.0421	0.38
<i>Artık</i>	57	7.8937	0.8587	NA	NA
<i>Toplam</i>	66	9.1926	1	NA	NA

PERMANOVA analizi, **grup** değişkeninin mikrobiyal topluluk kompozisyonundaki varyasyonun yaklaşık **%14,13'ünü** açıkladığını ($R^2 = 0,1413$), ki-kare değerinin **1,2988** ve p-değerinin **0,38** olduğunu ortaya koymuştur (Tablo 11). Bu, Bray-Curtis farklılığına dayalı olarak gruplar arasında mikrobiyal topluluk kompozisyonunda **istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar** olmadığını göstermektedir.

3.4.7. Diferansiyel Bolluk Analizi

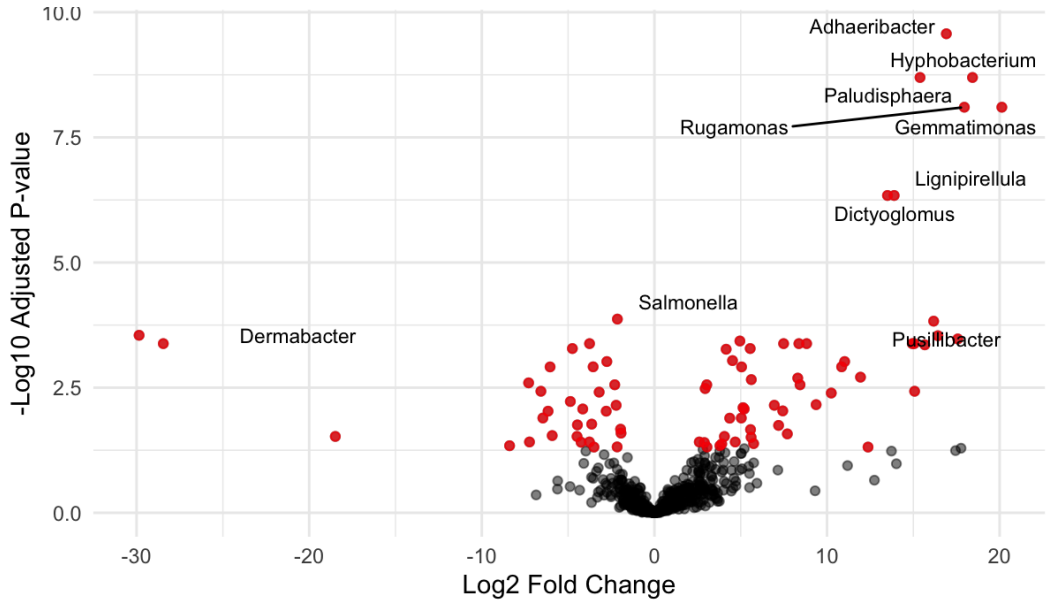
DESeq2 kullanılarak '**Obez-Yüksek**' ve '**Kontrol-Yüksek**' grupları arasında önemli ölçüde bol bulunan cinsleri belirlemek için diferansiyel bolluk analizi yapılmıştır.

Tablo 3.18 Önemli Farklılık Gösteren Türler (Obez-Yüksek ve Kontrol-Yüksek karşılaştırması)

<i>Cins</i>	Log2 Kat Değişimi	P-değeri	Düzeltilmiş P-değeri
<i>Adhaeribacter</i>	16.913	0	0
<i>Paludisphaera</i>	15.3882	0	0
<i>Hyphobacterium</i>	18.4281	0	0
<i>Gemmatimonas</i>	20.1272	0	0
<i>Rugamonas</i>	17.9547	0	0
<i>Lignipirellula</i>	13.8905	0	0
<i>Dictyoglomus</i>	13.5028	0	0
<i>Salmonella</i>	-2.1448	0	0.0001
<i>Pusillibacter</i>	16.1771	0	0.0001
<i>Dermabacter</i>	-29.8545	0	0.0003
<i>Phreatobacter</i>	16.4229	0	0.0003
<i>Metilovirgula</i>	17.5755	0	0.0003
<i>Roseimicrobium</i>	15.6651	0	0.0004
<i>Luteolibacter</i>	5.5498	0	0.0005
<i>Aquicella</i>	-4.7529	0	0.0005
<i>Sedimentibacter</i>	4.1556	0	0.0005
<i>Moraxella</i>	4.5233	0	0.0033
<i>Basilea</i>	-2.7565	0	0.0037
<i>Rhodanobacter</i>	11.0204	0	0.0037
<i>Cryptomeria</i>	-3.5503	0.0001	0.0039
<i>Bremerella</i>	10.8467	0.0001	0.0041
<i>Telmatocola</i>	5.0497	0.0001	0.0041
<i>Pleomorphomonas</i>	-6.0442	0.0001	0.0041
<i>Aquibium</i>	11.9392	0.0001	0.002
<i>Nordella</i>	8.3037	0.0001	0.002
<i>Sphingobacterium</i>	5.6132	0.0001	0.0022
<i>Caloramator</i>	-7.2871	0.0001	0.0025
<i>Cutibacterium</i>	-2.2981	0.0002	0.0028
<i>Mikoplazma</i>	3.0324	0.0002	0.0028
<i>Stieleria</i>	8.4364	0.0002	0.0028
<i>Verrucomicrobium</i>	2.9395	0.0002	0.0033
<i>Kocuria</i>	-6.5762	0.0002	0.0037
<i>Rhodopirellula</i>	15.0741	0.0002	0.0037
<i>Candidatus</i>	-3.2008	0.0003	0.0039
<i>Kinetoplastibacterium</i>			
<i>Candidatus Bandiella</i>	10.2462	0.0003	0.0041
<i>Chitinophaga</i>	-4.8705	0.0004	0.0385
<i>Mesorhizobium</i>	9.3684	0.0005	0.0385
<i>Mycoplasmopsis</i>	-2.2168	0.0005	0.0395
<i>Slackia</i>	6.9471	0.0005	0.0395
<i>Oenococcus</i>	5.1338	0.0006	0.039
<i>Aeoliella</i>	5.2036	0.0006	0.0415
<i>Stella</i>	-4.1518	0.0006	0.0415
<i>Candidatus</i>	7.4353	0.0007	0.0421
<i>Gromoviella</i>			

<i>Zea</i>	-6.162	0.0007	0.0457
<i>Streptococcus</i>	-2.7912	0.0008	0.0457
<i>Acetobacterium</i>	5.034	0.0011	0.0128
<i>Maioricimonas</i>	-6.4628	0.0011	0.0128
<i>Alistipes</i>	4.3621	0.0011	0.0129
<i>Camelina</i>	-3.6339	0.0015	0.0169
<i>Deinococcus</i>	-4.4612	0.0016	0.0176
<i>Hyphomicrobium</i>	7.194	0.0016	0.018
<i>Oligella</i>	-1.96	0.002	0.0214
<i>Arcobacter</i>	5.5684	0.002	0.0218
<i>Persicobacter</i>	-1.9346	0.0024	0.0256
<i>Magnetospirillum</i>	7.7006	0.0026	0.0265
<i>Dissulfurimicrobium</i>	-5.9226	0.0028	0.0287
<i>Urbifossiella</i>	-4.4826	0.003	0.0298
<i>Hypericibacter</i>	-18.486	0.003	0.0298
<i>Leptospira</i>	4.0558	0.0031	0.0298
<i>Cryptomonas</i>	5.6019	0.0032	0.031
<i>Pedobacter</i>	4.6819	0.0042	0.0385
<i>Allomeiothermus</i>	-3.7666	0.0042	0.0385
<i>Tichowungia</i>	2.5995	0.0043	0.0385
<i>Fluviibacter</i>	-7.2378	0.0042	0.0385
<i>Capnocytophaga</i>	-4.2473	0.0044	0.039
<i>Herbaspirillum</i>	2.8947	0.0045	0.0395
<i>Yinghuangia</i>	5.7468	0.0048	0.0415
<i>Christensenella</i>	3.9009	0.0049	0.0421
<i>Marinilactibacillus</i>	3.7951	0.0054	0.0457
<i>Wohlfahrtiimonas</i>	-8.3913	0.0055	0.0457
<i>Raineyella</i>	-2.1597	0.0059	0.0483
<i>Symbiobacterium</i>	12.3759	0.006	0.0487
<i>Selenomonas</i>	-3.5021	0.0061	0.0487
<i>Cellvibrio</i>	3.0452	0.0061	0.0487

OB-Yüksek ve *Kontrol-Yüksek* grupları arasında farklı şekilde bol bulunan cinsleri görselleştirmek için bir **volkan grafiği** oluşturulmuştur (Şekil 1). Çizim, önemli düzeltilmiş p-değerlerine (**padj < 0,05**) ve önemli log2 kat değişikliklerine sahip cinsleri vurgulamakta ve bu gruplar arasında ayırım yapmadaki potansiyel rollerini göstermektedir.



Şekil 3.12 Kontrol-Obez ve Kontrol-Yüksek Grupları Arasındaki Farklı Bolluğun Volkan Grafiği

Not: Volkan grafiği, her cins için log2 kat değişimi ile -log10 düzeltilmiş p-değerleri arasındaki ilişkiyi göstermektedir. Kırmızı noktalar önemli ölçüde farklı bolluğa sahip cinsleri temsil etmektedir.

3.4.8. Rastgele Orman Sınıflandırması

Örnekleri cins düzeyindeki okuma sayılarına göre *OB-Yüksek* ve *Kontrol-Yüksek* gruplarına sınıflandırmak için bir **Rastgele Orman** modeli oluşturulmuştur. Model 500 ağaç kullanılarak eğitilmiş ve her bölünmede **41 değişken** denenmiştir. Out-Of-Bag (OOB) hata oranı tahmini **%33,33** olup modelin sınıflandırma doğruluğunu göstermektedir.

3.5 Normal Kilolu ve Obez Kontrol Gruplarında Serumdan Shotgun Metagenomik Analizi

3.5.1. Numune Dağıtımı ve Kalite Kontrol

Toplam 15 kontrol numunesi (5 Kontrol-Yüksek, 10 Kontrol-Düşük) ve 10 obez numune (Obes-Yüksek) shotgun metagenomik sekanslama kullanılarak analiz edilmiştir. Dizileme, örnek başına ortalama 20 milyon okuma sağlandı ve insan DNA dizileri çıkarıldıktan sonra kalan okumaların yaklaşık %1'i, sonraki analizler için yeterli derinlik sağladı.

3.5.2. Taksonomik Kompozisyon Analizi

Taksonomik profillemeye, normal kilolu ve obez kontroller arasında farklı modeller ortaya koydu. Üç bakteri ailesi tüm örneklerde baskın olarak ortaya çıktı:

- *Burkholderiaceae*
- *Propionibacteriaceae*
- *Alcaligenaceae*

Diğer yaygın aileler arasında *Flavobacteriaceae*, *Moraxellaceae*, *Burkholderiales*, *Pseudomonadaceae*, *Sphingomonadaceae*, *Streptococcaceae* ve *Lactobacillaceae* yer almaktadır.

3.5.3. Taksonomik Kompozisyon ve Filogenetik Analiz

Filogenetik analiz, obez ve sağlıklı kontrol grupları arasında farklı kümelenme modelleri ortaya koymuştur (Şekil 1). Filogenetik ağaç, özellikle *Cupriavidus*, *Burkholderia* ve *Herbaspirillum* olmak üzere bazı bakteri cinslerinin çalışma grupları arasında bolluk açısından kayda değer farklılıklar gösterdiğini ortaya koymuştur. Burkholderiales takımından taksonlar her iki grupta da ağırlıklı olarak temsil edilmiştir ve bu da genel mikrobiyom yapısındaki önemlerine işaret etmektedir.

3.5.4. Alfa Çeşitlilik Metrikleri

Alfa çeşitlilik ölçütlerinin analizi, obez ve sağlıklı kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığını ortaya koymuştur. Shannon çeşitlilik endeksi sağlıklı kontroller (ortalama $\pm$ SD: $4,37 \pm 0,523$) ve obez denekler ($4,52 \pm 0,399$; Wilcoxon rank-sum testi, $p = 0,495$) arasında karşılaştırılabilir değerler göstermiştir. Benzer şekilde, Simpson çeşitlilik indeksleri sağlıklı kontroller (0,942

$\pm 0,052$) ve obez bireyler ($0,962 \pm 0,027$; $p = 0,397$) arasında anlamlı bir farklılık göstermemiştir. Gözlenen cins sayısı da gruplar arasında karşılaştırılabilir (sağlıklı kontroller: 429 ± 89.3 ; obez: 446 ± 76.8 ; $p = 0.723$).

3.5.5. Beta Çeşitliliği ve Topluluk Yapısı

Bray-Curtis farklılığına dayalı Temel Koordinatlar Analizi (PCoA), obez ve sağlıklı kontrol grupları arasında kısmi bir ayrım olduğunu göstermiş ve ilk iki eksen toplam varyasyonun sırasıyla %43,6 ve %15,5'ini açıklamıştır. Metrik Olmayan Çok Boyutlu Ölçekleme (NMDS) analizi bu bulguları desteklemiş ve 0,146'lık bir stres değeri elde ederek topluluk yapısının azaltılmış boyutlu uzayda makul bir temsili göstermiştir.

3.5.6. Diferansiyel Zenginleşme Analizi

DESeq2 analizi, OB-Yüksek ve Kontrol-Yüksek grupları arasında önemli ölçüde bol miktarda bulunan birkaç cinsi tanımlamıştır. Kayda değer bulgular şunlardır:

Obez kontrollerde artan cinsler:

- *Cupriavidus* (log2 kat değişimi: 2,84, düzeltilmiş $p < 0,05$)
- *Ralstonia* (log2 kat değişimi: 1,76, düzeltilmiş $p < 0,05$)

Obez kontrollerde azalan cinsler:

- *Herbaspirillum* (log2 kat değişimi: -1,93, düzeltilmiş $p < 0,05$)

3.5.7. Makine Öğrenimi Sınıflandırması

Metagenomik profillere dayalı olarak Obez-Yüksek ve Kontrol-Yüksek grupları arasında ayrım yapmak için bir Rastgele Orman sınıflandırıcısı geliştirildi. Yapılan sınıflandırma analizinde modelin genel doğruluk oranı %53.9 olarak hesaplandı. Doğruluk oranları gruplar arasında farklılık gösterdi; sağlıklı kontrol grubunda %73.3 gibi yüksek bir doğruluk oranı elde edilirken, obez örneklerde bu oran %30'a düşmekteydi. Mikrobiyal topluluk yapısının sınıflandırılmasında en belirleyici özelliklerin *Cupriavidus*, *Burkholderia* ve *Herbaspirillum* cinslerine ait operasyonel taksonomik birimler (OTU'lar) olduğu belirlendi. Bu bulgular, özellikle sağlıklı kontrol grubunda mikrobiyal yapının daha belirgin ve tutarlı bir pattern sergilediğini, ancak obezite varlığında bu örüntünün daha değişken ve öngörülmesi zor bir hal aldığını düşündürdü.

Bu bulgular çapraz doğrulama ve özellik önem analizi ile doğrulandı. Modelin performansı, metagenomik profillerin öngörücü bilgiler içermesine rağmen, sağlam sınıflandırma için ek faktörlere ihtiyaç duyulabileceğini gösterdi.

3.5.8. Korelasyon Ağı Analizi

En bol bulunan 50 cinsin ağ analizi yapıldığında, mikrobiyom topluluğu içinde karmaşık bir etkileşim ağı ortaya çıktı. Bu analizde, özellikle *Cupriavidus* cinsine ait farklı operasyonel taksonomik birimler (OTU'lar) arasında güçlü pozitif korelasyonlar gözlemlendi. Bu korelasyonlar istatistiksel olarak anlamlıydı ve Spearman korelasyon katsayıları 0.6'nın üzerindeydi (düzeltilmiş $p < 0.05$).

İlginç bir şekilde, Burkholderiales ve Sphingomonadales takımlarına ait üyeler arasında negatif korelasyonlar tespit edildi, bu da bu iki takımın birbirlerinin varlığından ters yönde etkilendiğini düşündürdü. Ayrıca, ağ analizi normal kilolu ve obez örneklerde farklı kümelenme paternleri olduğunu gösterdi. Bu durum, vücut kitle indeksinin mikrobiyal topluluk yapısını ve bakteriler arası etkileşimleri etkileyebileceğine işaret etti.

Çalışma grupları arasında genel mikrobiyal çeşitlilik ölçütleri benzer görünmesine rağmen, daha detaylı analizler belirli taksonların ve bunlarla ilişkili işlevsel yolların obez bireyleri normal kilolu kontrollerden ayırt edebildiğini ortaya koydu. Bu spesifik bakteriyel imzaların ve metabolik yolların tanımlanması, kan mikrobiyomunun obezite ile nasıl ilişkili olabileceğine dair önemli mekanistik ipuçları sağladı.

3.5.9. Kanonik Korelasyon Analizi

Kanonik Korelasyon Analizi (CCA), bakteri topluluğu yapısının hem grup durumundan (obez vs. sağlıklı kontrol) hem de bakteri DNA yüzdesinden önemli ölçüde etkilendiğini göstermiştir. İlk iki CCA eksenini, topluluk kompozisyonundaki kısıtlı varyasyonun %37,8'ini açıklarken, grup durumu birincil eksenle daha güçlü bir korelasyon göstermiştir (korelasyon katsayısı: 0,82).

Bu sonuçlar toplu olarak, obez ve sağlıklı kontrol denekleri arasındaki mikrobiyom kompozisyonunda, özellikle *Burkholderiales* takımındaki belirli bakteri cinslerinin bolluğu ve dağılımında ince ama tutarlı farklılıklar olduğunu göstermektedir. Genel çeşitlilik ölçütleri gruplar arasında benzer olsa da,

tanımlanan farklı şekilde bol bulunan taksonlar ve bunların ağ etkileşimleri, obezite ile ilişkili potansiyel mikrobiyal imzalar hakkında içgörü sağlamaktadır.

Bu bulgular toplu olarak, obezitenin kandaki bakteriyel DNA içeriğinin artmasıyla ilişkili olduğunu, ancak bu artışın genel mikrobiyal çeşitlilik veya topluluk yapısındaki değişikliklere karşılık gelmediğini göstermektedir. Bu çalışma, kan bileşenleri arasında bakteriyel DNA dağılımının ilk ayrıntılı karakterizasyonunu sunmakta ve özellikle RBC'lerin bakteriyel DNA barındırmadaki daha önce tanınmayan rolüne vurgu yapmaktadır. Bakteriyel DNA'nın plazmadaki ihmal edilebilir varlığı, mikrobiyal translokasyon ve epitelyal bariyer bütünlüğünü değerlendirmek için pratik bir belirteç olarak potansiyel faydasını ortaya koymakta ve sağlık ve hastalık durumlarının daha az invaziv izlenmesi için olanaklar sunmaktadır.

4. TARTIŞMA

4.1 Obez Bireylerde Artan Bakteriyel DNA Seviyeleri ve Epitel Bariyer Bozukluğu

Bu çalışma, obez bireylerin kan dolaşımında anlamlı derecede yüksek bakteriyel DNA seviyeleri olduğunu ortaya koymaktadır. Bu bulgu, epitel bariyer bütünlüğünün bozulduğunu ve mikrobiyal translokasyonun arttığını göstermektedir. Epitel bariyerleri, özellikle gastrointestinal sistem ve cilt, patojenlere ve mikroorganizmalara karşı ilk savunma hattını oluşturur. Obezitede, bu bariyerlerin yapısal ve işlevsel bütünlüğü bozulabilir, bu da bakteriyel ürünlerin ve canlı bakterilerin sistemik dolaşıma geçmesine yol açabilir (Cani vd., 2007).

Bağırsak bariyeri disfonksiyonu, artmış bağırsak geçirgenliği veya "sızdıran bağırsak" olarak da bilinir. Yüksek yağlı ve düşük lifli diyetler, bağırsak mikrobiyotasının kompozisyonunu değiştirerek inflamasyona ve sıkı bağlantı proteinlerinin ekspresyonunda azalmaya neden olabilir 01/17/2025 10:12:00. Bu değişiklikler, bakteriyel endotoksinlerin ve diğer mikrobiyal ürünlerin dolaşıma geçişini kolaylaştırır. Daha önceki çalışmalarda obez bireylerde plazma lipopolisakkarit (LPS) seviyelerinin arttığını ve bunun metabolik endotoksemiye yol açtığını bildirmiştir (Cani vd., 2007; K. E. Kim vd., 2016). Bu bulgular, çalışmamızdaki artmış bakteriyel DNA seviyeleriyle uyumludur ve obezitenin mikrobiyal translokasyonla ilişkili olduğunu desteklemektedir.

Ayrıca, obezitede cilt bariyerinin bütünlüğü de etkilenebilir. Artan vücut kütlesi ve deri altı yağ dokusunun genişlemesi, ciltte mikrotravmalara ve bariyer fonksiyonunun bozulmasına yol açabilir (Y. Li vd., 2024). Çalışmamızda, obez bireylerin kan dolaşımında cilt kommensal bakterilerinin (örneğin, *Cutibacterium acnes*) tespit edilmesi, cilt bariyerinin de mikrobiyal translokasyona katkıda bulunabileceğini göstermektedir.

Obez bireylerde artan bakteriyel DNA seviyeleri, sistemik inflamasyon ve bağışıklık sistemi aktivasyonu ile ilişkilidir. Bakteriyel DNA, Toll-benzeri reseptörler (TLR'ler) aracılığıyla bağışıklık hücrelerini aktive edebilir; özellikle TLR9, bakteriyel DNA'daki CpG motiflerini tanıyarak pro-inflamatuar sitokinlerin salınımını tetikler (Hemmi vd., 2003). Kronik düşük dereceli inflamasyon, insülin

direnci ve tip 2 diyabet gibi metabolik bozuklukların gelişimine katkıda bulunabilir (Ellulu & Samouda, 2022; Okdahl vd., 2022).

4.2 Mikrobiyom-Metabolom Etkileşimleri ve Kronik İnflamasyon

Bağırsak mikrobiyotası, özellikle kısa zincirli yağ asitleri (SCFA'lar) gibi metabolitlerin üretimi yoluyla konak metabolizmasının ve bağışıklık tepkilerinin modüle edilmesinde çok önemli bir rol oynamaktadır. Ferreira ve arkadaşları (2014), bağırsak mikrobiyotasının kronik enflamatuar hastalıklardaki önemli rolünü vurgulayarak, bağışıklık modülasyonu ve enflamasyon üzerindeki etkisini vurgulamıştır (F. C. vd., 2014). Diyet liflerinin bağırsak bakterileri tarafından fermantasyonu sırasında üretilen SCFA'ların, Koh ve arkadaşları (2016) tarafından belirtildiği gibi, anti-enflamatuar etkiler gösterdiği ve bağırsak bariyer fonksiyonunu geliştirdiği gösterilmiştir (Koh vd., 2016). Bu metabolitler yalnızca yerel bağırsak sağlığını etkilemekle kalmaz, aynı zamanda çeşitli fizyolojik süreçleri etkileyen sistemik etkilere de sahiptir.

Obezitede, bağırsak mikrobiyotasının kompozisyonunda belirgin değişiklikler meydana gelir. Özellikle, *Firmicutes* ve *Bacteroidetes* phylum'ları arasındaki dengenin bozulması ve Proteobakterilerin artışı, enerji homeostazını ve yağ depolanmasını etkileyebilir (Turnbaugh vd., 2009). Gill ve ark. (2006), insan distal bağırsak mikrobiyomunun, karbonhidrat metabolizması ve amino asit biyosentezi gibi metabolik yollarda zenginleştiğini ve bu fonksiyonların obezitede değişebileceğini bildirmiştir (Gill vd., 2006).

Metagenomik ve metabolomik yaklaşımlar, mikrobiyomun fonksiyonel potansiyelini ve metabolik aktivitesini ortaya çıkarmada kritik öneme sahiptir (Holmes vd., 2011). Mayneris-Perxachs ve Fernández-Real (2019), metagenomik ve metabolomik verilerin entegrasyonunun, mikrobiyomun konak sağlığı ve hastalığı ile ilişkili yeni mekanizmaları ortaya çıkarmada önemli olduğunu vurgulamıştır (Mayneris-Perxachs & Fernández-Real, 2020). Bu teknolojiler, mikrobiyal metabolitlerin konakçı fizyolojisi üzerindeki etkilerini daha iyi anlamamıza olanak tanır.

4.3 Mikrobiyom ve Bağışıklık Sistemi Etkileşimi

Mikrobiyom ve bağışıklık sistemi arasındaki etkileşimler, kronik inflamasyon ve otoimmün hastalıkların gelişiminde kritik bir rol oynar. Pabst

(2017), mikrobiyomun bağışıklık sisteminin olgunlaşmasında ve fonksiyonunda temel bir öneme sahip olduğunu belirtmiştir(Pabst, 2017). Germ-free (mikropsuz) hayvan modelleri, mikrobiyomun bağışıklık sistemi üzerindeki etkilerini anlamada önemli bir araç olmuştur; bu hayvanlarda bağışıklık sistemi gelişimi yetersizdir ve mikrobiyota ile kolonizasyon bu durumu düzeltir.

Bağırsak mikrobiyotasındaki disbiyozis, bağışıklık yanıtlarında dengesizliklere yol açabilir ve inflamatuvar bağırsak hastalıkları (IBD), romatoid artrit (RA) ve sistemik lupus eritematozus (SLE) gibi otoimmün hastalıkların patogeneze katkıda bulunabilir(Coit & Sawalha, 2016; Kostic vd., 2014). Disbiyozis, mikrobiyal metabolitlerin ve antijenlerin değişmesine neden olarak bağışıklık sisteminin tolerans mekanizmalarını bozabilir (Chen vd., 2017).

4.4 Obezite ve Astım Arasındaki İlişki: Mikrobiyomun Rolü

Obezite ve astım arasındaki ilişki karmaşık olup, mikrobiyomun bu etkileşimde önemli bir rolü olabilir. Obezitede artan sistemik inflamasyon ve mikrobiyal translokasyon, hava yolu inflamasyonunu şiddetlendirebilir ve astım semptomlarının kötüleşmesine katkıda bulunabilir (Shore & Cho, 2016). Chiu ve ark. (2020), astımlı çocuklarda hava yolu mikrobiyotasının spesifik imzalarını ve fonksiyonlarını ortaya çıkarmak için metagenomik ve metabolomik verilerin entegrasyonunun önemini vurgulamıştır (C. C. vd., 2020).

Ancak, çalışmamızda astımlı bireylerde bakteriyel DNA seviyelerinde belirgin bir artış gözlenmemiştir. Bu durum, astım patogenezinde mikrobiyal translokasyonun rolünün net olmadığını ve daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulduğunu göstermektedir. Bağırsak-akciğer eksen kavramı, bağırsak mikrobiyotasının uzak organlardaki bağışıklık yanıtlarını etkileyebileceğini ve alerjik inflamasyon riskini artırabileceğini öne sürmektedir (Budden vd., 2017).

4.5 Mikrobiyom Temelli Terapötik Yaklaşımlar ve Gelecekteki Yönelimler

Mikrobiyal translokasyonu azaltmaya ve epitel bariyer fonksiyonunu iyileştirmeye yönelik terapötik stratejiler, obezite ve ilişkili inflamatuvar durumların yönetiminde potansiyel faydalar sunabilir. Probiyotik ve prebiyotiklerin kullanımı, bağırsak mikrobiyotasının kompozisyonunu düzenleyerek bariyer bütünlüğünü destekleyebilir ve inflamasyonu azaltabilir (Vallianou vd., 2018). Ayrıca, fekal

mikrobiyota transplantasyonu (FMT) gibi yaklaşımlar, disbiyozisi düzeltmeye ve metabolik parametreleri iyileştirmeye yardımcı olabilir (Aron-Wisniewsky vd., 2021).

Fonksiyonel metagenomik ve metabolomik yaklaşımların entegrasyonu, mikrobiyom-bağıışıklık etkileşimlerini daha iyi anlamamızı sağlar (Sardar vd., 2024). Bu, kişiselleştirilmiş tıp uygulamalarında mikrobiyom temelli tedavilerin geliştirilmesine olanak tanıyabilir. Mikrobiyom ve epigenom verilerinin entegrasyonu, otoimmün hastalıkların patogeneğinde yeni biyobelirteçlerin ve terapötik hedeflerin belirlenmesine katkıda bulunabilir (Chen vd., 2017).

4.6 Kronik İnflamasyon ve Metabolik Bozukluklarda

Mikrobiyomun Rolü

Bağırsak mikrobiyotasının disbiyozisi, obezite, tip 2 diyabet ve kardiyovasküler hastalıklar gibi metabolik bozukluklarla ilişkilendirilmiştir (B. C. vd., 2016). Metwaly ve ark. (2022), mikrobiyom imzalarının inflamatuvar ve metabolik bozuklukların risk profillerini belirlemede biyobelirteç olarak kullanılabileceğini önermiştir (Metwaly vd., 2022). Bağırsak mikrobiyotasının metabolik ve immünolojik fonksiyonlarının anlaşılması, bu hastalıkların önlenmesi ve tedavisi için yeni stratejilerin geliştirilmesine yardımcı olabilir.

Rüb ve ark. (2021), mikrobiyom disbiyozisinin belirlenmesinde ve insan hastalıklarıyla ilişkilendirilmesinde çeşitli metabolitlerin biyobelirteç olarak kullanılabileceğini belirtmiştir (Rüb vd., 2021). Özellikle, trimetilamin-N-oksit (TMAO), kısa zincirli yağ asitleri ve sekonder safra asitleri gibi metabolitler, metabolik bozuklukların patogeneğinde önemli rol oynayabilir.

4.7 Mikrobiyom ve Otoimmün Hastalıklar

Mikrobiyomun otoimmün hastalıkların patogeneğindeki rolü giderek daha fazla kabul görmektedir. Coit ve Sawalha (2016), romatizmal otoimmün hastalıklarda mikrobiyomun disbiyozisinin hastalık patogeneğine katkıda bulunduğunu belirtmiştir (Coit & Sawalha, 2016). La Barbera ve ark. (2022), disbiyozisin bağ dokusu hastalıkları ve vaskülitlerde bağışıklık sistemini etkileyerek inflamasyona yol açtığını vurgulamıştır (L. vd., 2022).

Chen ve ark. (2017), mikrobiyal metabolitlerin epigenetik modifikasyonlara neden olarak otoimmün hastalıkların gelişimine katkıda bulunabileceğini

önermiştir (Chen vd., 2017). Mikrobiyom ve epigenomun entegrasyonu, otoimmün hastalıkların mekanizmalarını anlamada ve yeni terapötik hedefler belirlemede önemlidir.

4.8 Sonuç ve Gelecekteki Araştırma Perspektifleri

Bu çalışma, obez bireylerde artan bakteriyel DNA seviyelerinin ve spesifik mikrobiyal taksonların varlığının, epitel bariyer bozukluğu ve mikrobiyal translokasyon ile ilişkili olduğunu göstermektedir. Mikrobiyal translokasyonun sistemik inflamasyonu tetikleyerek obeziteyle ilişkili komplikasyonlara katkıda bulunabileceği önerilmektedir. Astım patogeneğinde mikrobiyal translokasyonun rolü ise net değildir ve daha fazla araştırma gerekmektedir.

Gelecekteki çalışmalar, mikrobiyom ve metabolom etkileşimlerinin kronik inflamasyon ve metabolik bozuklukların gelişimindeki rolünü daha derinlemesine incelemelidir. Epitel bariyer bütünlüğünü hedef alan ve mikrobiyal translokasyonu azaltan terapötik stratejilerin etkinliği değerlendirilmelidir. Ayrıca, mikrobiyomun bağışıklık sistemi ile olan etkileşimlerinin ve bu etkileşimlerin epigenetik düzenlemeler üzerindeki etkilerinin araştırılması, hastalıkların patogeneğini anlamada ve yeni tedavi yaklaşımları geliştirmede önemli olacaktır.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu kapsamlı çalışma, obez bireylerin kan dolaşımındaki bakteriyel DNA'nın varlığını ve etkilerini sağlıklı kontrollere kıyasla araştırmış ve özellikle astım gibi bağışıklık ile ilgili bozukluklardaki potansiyel rolünü anlamaya odaklanmıştır. Kantitatif PCR (qPCR), 16S rRNA amplikon sekanslama ve shotgun metagenomik kullanarak bakteriyel DNA seviyelerini ölçtük, taksonomik bileşimi karakterize ettik ve klinik parametreler ve enflamatuvar belirteçlerle korelasyonları araştırdık. Mikrobiyal verilerin klinik değerlendirmelerle entegrasyonu obezite, mikrobiyal translokasyon ve sistemik inflamasyon arasındaki ilişki hakkında anlamlı sonuçlar çıkarmamızı sağladı.

Bulgularımız, obez bireylerin, buffy coat, kırmızı kan hücreleri ve plazma dahil olmak üzere analiz edilen tüm kan bileşenlerinde önemli ölçüde yüksek dolaşımdaki bakteri DNA seviyeleri sergilediğini göstermiştir. İstatistiksel analizler, bu farklılıkların sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında anlamlı olduğunu doğrulamış ve obezitenin kan dolaşımına artan bakteriyel translokasyonla ilişkili olduğunu göstermiştir. Beyaz kan hücreleri ve trombositleri içeren buffy coat, bakteriyel DNA'nın çoğunu barındırmıştır; bu da bağışıklık hücrelerinin fagositoz veya doğrudan translokasyon gibi mekanizmalar yoluyla bakteriyel DNA'nın taşınmasında rol oynayabileceğini düşündürmektedir.

Obez bireylerdeki yüksek bakteri DNA seviyeleri, özellikle bağırsak ve deride epitelyal bariyer bütünlüğünün bozulduğuna işaret etmektedir. Genellikle "sızdıran bağırsak" olarak adlandırılan artan bağırsak geçirgenliği, obezitede bilinen bir olgudur ve bağırsak kaynaklı bakterilerin ve bileşenlerinin dolaşıma geçmesini kolaylaştırabilir. Benzer şekilde, potansiyel olarak yağ dokusu genişlemesiyle ilişkili yapısal değişiklikler nedeniyle cilt bariyeri işlevindeki değişiklikler, cilt kommensallerinin kan dolaşımına girmesine izin verebilir. Bariyer işlevindeki bu bozulmalar, bakteriyel ürünlere sistemik maruziyete katkıda bulunabilir ve bu da bağışıklık tepkilerini ve iltihabı tetikleyebilir.

Taksonomik analizler, obez bireylerin kan dolaşımında daha yaygın olan belirli bakteri taksonlarını ortaya çıkarmıştır. Özellikle, *Escherichia/Shigella* gibi bağırsakla ilişkili bakterilerin yanı sıra *Cutibacterium acnes* gibi cilt kommensallerinin bolluğu artmıştır. *Escherichia coli*'nin tespit edilmesi, muhtemelen bağırsak geçirgenliğinin artması nedeniyle bağırsaktan bakteriyel

translokasyonun gerçekleřtiđini dűřűndűrmektedir. Deri kaynaklı bakterilerin varlıđı, deri bariyeri iřlev bozukluđunun da obezitede mikrobiyal translokasyona katkıda bulunabileceđini gűstermektedir.

Dolařımdaki bakteriyel DNA seviyeleri ile C-reaktif protein (CRP) ve interlűkin-6 (IL-6) dahil olmak űzere sistemik enflamatuar belirteçler arasında gűlű pozitif korelasyonlar gűzlemledik. Bakteriyel DNA seviyeleri yűksek olan obez bireylerde bu enflamatuar belirteçlerin seviyeleri de yűksekti; bu da bakteriyel translokasyonun obezitenin karakteristik űzelliđi olan kronik dűřűk dereceli enflamasyona katkıda bulunabileceđini dűřűndűrmektedir. Kronik enflamasyon, insűlin direnci, tip 2 diyabet ve kardiyovaskűler hastalıklar dahil olmak űzere çeřitli metabolik bozukluklar için bilinen bir risk faktűrűdűr. Toll benzeri reseptűrler (TLR'ler) gibi űrűntű tanıma reseptűrleri aracılıđıyla dolařımdaki bakteriyel DNA tarafından bađıřıklık tepkilerinin etkinleřtirilmesi, bu enflamatuar durumu sűrekli kılabilir.

LPS űretimiyle ilgili bakteriyel genlerin varlıđı, sistemik enflamasyonda bakteriyel translokasyonun rolűnű daha da belirginleřtirmektedir. LPS, bađıřıklık hűcrelerini aktive edebilen ve enflamatuar tepkilere neden olabilen gűlű bir endotoksindir. Buna karřılık, bakteriyel metabolizma tarafından űretilen SCFA'lar anti-enflamatuar űzelliklere sahiptir ve bađırsak bariyer bűtűnlűđűnűn korunmasında rol oynar. Dolařımdaki pro-inflamatuar ve anti-inflamatuar bakteriyel metabolitler arasındaki denge konak metabolizmasını ve bađıřıklık dűzenlemesini etkileyebilir.

Bulgularımız, astım gibi bağışıklıkla ilgili hastalıkların patogenezinin anlaşılması açısından űnemli çıkarımlara sahiptir. Bağırsak-akciğer ekseyi, bağırsak mikrobiyotası ile solunum sağlığı arasındaki etkileşimi vurgular ve mikrobiyal translokasyon akciğerlerdeki bağışıklık dűzenlemesini etkileyebilir. Bakteriyel DNA ve bileşenlerin kan dolaşımındaki varlığı, solunum sistemi de dahil olmak űzere uzak organları etkileyebilecek sistemik bağışıklık tepkilerini aktive edebilir. Bu durum, űzellikle ortak enflamatuar yollar nedeniyle zaten yűksek risk altında olan obez bireylerde astım ve diğer enflamatuar hava yolu hastalıklarının gelişmesine veya alevlenmesine katkıda bulunabilir.

Çoklu analitik tekniklerin kullanımı ve mikrobiyal verilerin klinik parametrelerle entegrasyonu dahil olmak űzere çalıřmamızın gűlű yűnlerine rađmen, kabul edilmesi gereken sınırlamalar vardır. Çalıřmanın kesitsel tasarımı,

bakteriyel DNA seviyeleri, bariyer disfonksiyonu ve immün yanıtlar arasında nedensellik veya zamansal ilişki kurma yeteneğini sınırlamaktadır. Yüksek bakteriyel DNA seviyelerinin sistemik enflamasyon ve bağışıklıkla ilgili bozuklukların gelişiminden önce mi geldiğini yoksa mevcut koşulların bir sonucu mu olduğunu belirlemek için uzunlamasına çalışmalar gereklidir.

Ayrıca, çalışma popülasyonunun nispeten küçük örneklem büyüklüğü ve homojenliği bulguların genellenebilirliğini etkileyebilir. Tüm katılımcılar sigara içmemekte ve ilaç kullanmamaktadır; bu durum, karıştırıcı faktörleri kontrol altında tutarken, sonuçların daha geniş popülasyonlara uygulanabilirliğini sınırlayabilir. Gelecekteki çalışmalar, bulguları doğrulamak ve farklı demografik gruplarla ilgisini artırmak için daha büyük, daha çeşitli kohortları içermelidir.

Potansiyel kontaminasyon ve tespit hassasiyeti gibi düşük biyokütleli numunelerle ilişkili teknik zorluklar da sınırlamalar getirmektedir. Titiz aseptik tekniklere ve negatif kontrollerin dahil edilmesine rağmen kontaminasyon olasılığı tamamen ortadan kaldırılamaz. Protokollerin standartlaştırılması ve doğrulama için birden fazla bağımsız yöntemin kullanılması, gelecekteki araştırmalarda doğruluğu ve tekrarlanabilirliği artırmak için gereklidir.

Çalışmamız epitelyal bariyer bütünlüğünün korunmasının önemini vurgulamakta ve bariyer işlevini iyileştirmeyi amaçlayan müdahalelerin terapötik potansiyele sahip olabileceğini düşündürmektedir. Diyet değişiklikleri, probiyotik takviyesi ve sıkı bağlantı proteinlerini hedef alan farmakolojik ajanlar gibi stratejiler bariyer bütünlüğünü artırabilir, mikrobiyal translokasyonu azaltabilir ve sistemik enflamasyonu hafifletebilir. Prebiyotikler veya probiyotikler aracılığıyla bağırsak mikrobiyota bileşiminin ele alınması da bakteriyel translokasyonu ve bağışıklık tepkilerini etkileyebilir ve obezite ile ilişkili enflamasyon ve ilişkili bağışıklık bozukluklarını yönetmek için potansiyel yollar sunabilir.

Bulgularımız, dolaşımdaki bakteri DNA'sının immün düzensizlik ve enflamasyon için bir biyobelirteç olarak kullanılma potansiyelini vurgulamaktadır. Biyobelirteçler erken teşhis, hastalığın ilerlemesinin izlenmesi ve tedaviye verilen yanıtların değerlendirilmesi için değerli araçlardır. Obez bireyler ve sağlıklı kontroller arasında gözlemlenen önemli farklılıklar, dolaşımdaki bakteriyel DNA seviyelerinin bariyer disfonksiyonu ve sistemik inflamasyonun hassas göstergeleri olarak hizmet edebileceğini düşündürmektedir. Mikrobiyal biyobelirteçlerin klinik

uygulamaya dahil edilmesi tanısal doğruluğu artırabilir ve kişiselleştirilmiş tedavi stratejilerini destekleyebilir.

Çalışmamızda kullanılan Rastgele Orman sınıflandırıcısı gibi makine öğrenimi modellerinin başarılı bir şekilde uygulanması, hastalık durumlarını tahmin etmek için karmaşık veri kümelerini entegre etme potansiyelini göstermektedir. Mikrobiyal profilleri, enflamatuvar belirteçleri ve klinik parametreleri birleştirerek, tahmin yeteneklerini geliştirebilir ve kişiselleştirilmiş tıbbı doğru ilerleyebiliriz. Bu yaklaşım, klinisyenlerin bağışıklıkla ilgili bozukluklar geliştirme riski taşıyan bireyleri belirlemelerine ve hastalığın ilerlemesini önlemek veya azaltmak için erken müdahaleler uygulamalarına olanak sağlayabilir.

Gelecekteki araştırmalar, mikrobiyal translokasyon, sistemik inflamasyon ve astım gibi bağışıklıkla ilgili bozuklukların gelişimi arasındaki zamansal dinamikleri ve nedensel ilişkileri değerlendirmek için boylamsal ve girişimsel çalışmalara odaklanmalıdır. metatranskriptomik, metabolomik ve bütünleştirici omik gibi gelişmiş analitik yaklaşımlar, dolaşımdaki bakteriyel DNA'nın işlevsel rollerini ve konak fizyolojisi üzerindeki etkisini daha da aydınlayabilir. Ayrıca, otoimmün hastalıkları veya alerjileri olan bireyler gibi diğer popülasyonlarda mikrobiyomun araştırılması, mikrobiyal translokasyonun bağışıklık düzenlemesindeki rolü hakkında daha geniş bilgiler sağlayabilir.

Kan mikrobiyomundaki değişiklikleri ölçmek için standartlaştırılmış testler ve bir mikrobiyom skorlama sistemi geliştirmek klinik uygulamaları kolaylaştırabilir. Bu tür araçlar, klinisyenlerin epitelyal bariyer bütünlüğünü değerlendirmesini, hastalığın ilerlemesini izlemesini ve mikrobiyom profillerine dayalı tedavi stratejilerini kişiselleştirmesini sağlayacaktır. Mikrobiyal biyobelirteçlerin klinik veriler ve makine öğrenimi modelleriyle entegre edilmesi tanısal doğruluğu artırabilir ve kişiselleştirilmiş tıp yaklaşımlarını destekleyebilir.

Sonuç olarak, çalışmamız obez bireylerin sistemik inflamasyon ve bağırsak ve cilt mikrobiyotası ile ilişkili spesifik bakteri taksonlarının varlığı ile korelasyon gösteren yüksek seviyelerde dolaşımdaki bakteri DNA'sına sahip olduğuna dair kanıtlar sunmaktadır. Bu bulgular, bağışıklık düzensizliğinde ve astım gibi durumların patogeneğinde epitelyal bariyerlerin ve mikrobiyal translokasyonun potansiyel rolünü vurgulamaktadır. Bakteriyel translokasyonun ele alınması ve mikrobiyomun modüle edilmesi, obezite ve bağışıklıkla ilgili bozukluklarda

enflamasyonu azaltmayı ve sağlık sonuçlarını iyileştirmeyi amaçlayan yeni terapötik stratejiler sunabilir. Çalışmamız, mikrobiyom, bariyer fonksiyonu ve bağışıklık sağlığının birbiriyle bağlantılı olduğunu vurgulayan ve giderek artan kanıtlara katkıda bulunmakta ve mekanizmaları tam olarak anlamak ve etkili müdahaleler geliştirmek için bu alanda sürekli araştırma yapılması gerektiğinin altını çizmektedir.

Bu karmaşık etkileşimlere dair anlayışımızı geliştirerek, mikrobiyomu sağlık ve hastalıkta kilit bir faktör olarak gören kişiselleştirilmiş tıp yaklaşımlarına yaklaşabiliriz. Bu, obezite ile ilişkili enflamasyon ve bağışıklık bozuklukları için daha etkili önleme ve tedavi stratejilerine yol açabilir ve sonuçta hasta sonuçlarını ve yaşam kalitesini iyileştirebilir. Bu çalışmanın bulguları gelecekteki araştırmalar için bir temel teşkil etmekte ve obezite ve bağışıklık sağlığı bağlamında mikrobiyal translokasyon ve bariyer bütünlüğünün ele alınmasının önemini vurgulamaktadır.

KAYNAKLAR

- Abdel-Aziz, M. I., Vries, R. de, Lammers, A., Xu, B., Neerincx, A. H., Vijverberg, S., Dagelet, Y. W. F., Kraneveld, A. D., Frey, U., Lutter, R., Sterk, P. J., Zee, A. H. M. der, & Sinha, A. (2020). Cross-sectional Biomarker Comparisons in Asthma Monitoring Using a Longitudinal Design: The eNose Premise. *Allergy*, 75(10), 2690-2693. <https://doi.org/10.1111/all.14354>
- Agache, I., & Akdiş, C. A. (2019). Precision Medicine and Phenotypes, Endotypes, Genotypes, Regiotypes, and Theratypes of Allergic Diseases. *Journal of Clinical Investigation*, 129(4), 1493-1503. <https://doi.org/10.1172/jci124611>
- Agache, I., Beltrán, J., Akdiş, C. A., Akdiş, M., Canelo-Aybar, C., Canonica, G. W., Casale, T. B., Chivato, T., Corren, J., Giacco, S. D., Eiwegger, T., Firinu, D., Gern, J. E., Hamelmann, E., Hanania, N. A., Mäkelä, M. J., Hernández-Martín, I., Nair, P., O'Mahony, L., ... Jutel, M. (2020). Efficacy and Safety of Treatment With Biologicals (Benralizumab, Dupilumab, Mepolizumab, Omalizumab and Reslizumab) for Severe Eosinophilic Asthma. A Systematic Review for the EAACI Guidelines - Recommendations on the Use of Biologicals in Severe Asthma. *Allergy*, 75(5), 1023-1042. <https://doi.org/10.1111/all.14221>
- Aghapour, M., Raee, P., Moghaddam, S. J., Hiemstra, P. S., & Heijink, I. H. (2018). Airway Epithelial Barrier Dysfunction in Chronic Obstructive Pulmonary Disease: Role of Cigarette Smoke Exposure. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 58(2), 157-169. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2017-0200tr>
- Akdis, C. A. (2021). Does the epithelial barrier hypothesis explain the increase in allergy, autoimmunity and other chronic conditions? *Nature Reviews Immunology*, 21(11), 739-751. <https://doi.org/10.1038/s41577-021-00538-7>
- Almeida, A., Mitchell, A. L., Boland, M., Forster, S. C., Gloor, G. B., Tarkowska, A., Lawley, T. D., & Finn, R. D. (2019). A New Genomic Blueprint of the Human Gut Microbiota. *Nature*, 568(7753), 499-504. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-0965-1>
- Alneberg, J., Bjarnason, B. S., Bruijn, I. de, Schirmer, M., Quick, J., Ijaz, U. Z., Lahti, L., Loman, N. J., Andersson, A. F., & Quince, C. (2014). Binning Metagenomic Contigs by Coverage and Composition. *Nature Chemical Biology*, 11(11), 1144-1146. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3103>
- Antipov, D., Korobeynikov, A., McLean, J. S., & Pevzner, P. A. (2015). hybridSPAdes: An Algorithm for Hybrid Assembly of Short and Long Reads. *Bioinformatics*, 32(7), 1009-1015. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv688>
- Aron-Wisnewsky, J., Warmbrunn, M. V., Nieuwdorp, M., & Clément, K. (2021). Metabolism and Metabolic Disorders and the Microbiome: The Intestinal Microbiota Associated With Obesity, Lipid Metabolism, and Metabolic Health—Pathophysiology and Therapeutic Strategies. *Gastroenterology*, 160(2), 573-599. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.10.057>
- Bach, J. (2002). The Effect of Infections on Susceptibility to Autoimmune and Allergic Diseases. *New England Journal of Medicine*, 347(12), 911-920. <https://doi.org/10.1056/nejmra020100>
- Bachert, C., Gevaert, P., Holtappels, G., Johansson, S. G. O., & Cauwenberge, P. V. (2001). Total and Specific IgE in Nasal Polyps Is Related to Local Eosinophilic Inflammation. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 107(4), 607-614. <https://doi.org/10.1067/mai.2001.112374>
- Bailey, C., Wagland, R., Dabbour, R., Caress, A. L., Smith, J. A., & Molassiotis, A. (2010). An Integrative Review of Systematic Reviews Related to the Management of Breathlessness

in Respiratory Illnesses. *BMC Pulmonary Medicine*, 10(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2466-10-63>

Bălgrădean, M., Pavelescu, C., Cîrstoveanu, C., Toma, C., Ionescu, M. D., & Bumbăcea, R. S. (2021). Clinical Experience With Anti-IgE Monoclonal Antibody (Omalizumab) in Pediatric Severe Allergic Asthma—A Romanian Perspective. *Children*, 8(12), 1141. <https://doi.org/10.3390/children8121141>

Bartemes, K. R., & Kita, H. (2018). Innate and adaptive immune responses to fungi in the airway. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 142(2), 353-363. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2018.06.015>

Beaulaurier, J., Schadt, E. E., & Fang, G. (2018). Deciphering Bacterial Epigenomes Using Modern Sequencing Technologies. *Nature Reviews Genetics*, 20(3), 157-172. <https://doi.org/10.1038/s41576-018-0081-3>

Beghini, F., McIver, L. J., Blanco-Míguez, A., Dubois, L., Asnicar, F., Maharjan, S., Mailyan, A., Manghi, P., Scholz, M., Thomas, A. M., Valles-Colomer, M., Weingart, G., Zhang, Y., Zolfo, M., Huttenhower, C., Franzosa, E. A., & Segata, N. (2021). Integrating Taxonomic, Functional, and Strain-Level Profiling of Diverse Microbial Communities With bioBakery 3. *Elife*, 10. <https://doi.org/10.7554/elife.65088>

Berman, H. M. (2000). The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research*, 28(1), 235-242. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.235>

Bervoets, I., & Charlier, D. (2019). Diversity, Versatility and Complexity of Bacterial Gene Regulation Mechanisms: Opportunities and Drawbacks for Applications in Synthetic Biology. *Fems Microbiology Reviews*, 43(3), 304-339. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuz001>

Blackley, C. H. (1873). *Experimental researches on the causes and nature of catarrhus aestivus (hay-fever or hay-asthma)*. Baillière, Tindall & Cox.

Blanco-Míguez, A., Beghini, F., Cumbo, F., McIver, L. J., Thompson, K. N., Zolfo, M., Manghi, P., Dubois, L., Huang, K., Thomas, A. M., Nickols, W. A., Piccinno, G., Piperni, E., Punčochář, M., Valles-Colomer, M., Tett, A., Giordano, F., Davies, R., Wolf, J., ... Segata, N. (2023). Extending and Improving Metagenomic Taxonomic Profiling With Uncharacterized Species Using MetaPhlAn 4. *Nature Biotechnology*, 41(11), 1633-1644. <https://doi.org/10.1038/s41587-023-01688-w>

Blow, M. J., Clark, T. A., Daum, C., Deutschbauer, A. M., Fomenkov, A., Fries, R., Froula, J., Kang, D., Malmstrom, R. R., Morgan, R. D., Pósfai, J., Singh, K. P., Visel, A., Wetmore, K. M., Zhao, Z., Rubin, E. M., Korlach, J., Pennacchio, L. A., & Roberts, R. J. (2016). The Epigenomic Landscape of Prokaryotes. *Plos Genetics*, 12(2), e1005854. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005854>

Bonser, L., & Erle, D. (2017). Airway Mucus and Asthma: The Role of MUC5AC and MUC5B. *Journal of Clinical Medicine*, 6(12), 112. <https://doi.org/10.3390/jcm6120112>

Borna, E. C., Nwaru, B. I., Bjerg, A., Mincheva, R., Rådinger, M., Lundbäck, B., & Ekerljung, L. (2019). Changes in the Prevalence of Asthma and Respiratory Symptoms in Western Sweden Between 2008 and 2016. *Allergy*, 74(9), 1703-1715. <https://doi.org/10.1111/all.13840>

Bosi, E., Molteni, L., Radaelli, M. G., Folini, L., Fermo, I., Bazzigaluppi, E., Piemonti, L., Pastore, M. R., & Paroni, R. (2006). Increased Intestinal Permeability Precedes Clinical Onset of Type 1 Diabetes. *Diabetologia*, 49(12), 2824-2827. <https://doi.org/10.1007/s00125-006-0465-3>

Bostock, J. (1819). Case of a Periodical Affection of the Eyes and Chest. *Medico-chirurgical transactions*, 10(Pt 1), 161-165.

- Bożek, A., Fischer, A., Bogacz-Piaseczyńska, A., & Canonica, G. W. (2023). Adding a Biologic to Allergen Immunotherapy Increases Treatment Efficacy. *Erj Open Research*, 9(2), 00639-02022. <https://doi.org/10.1183/23120541.00639-2022>
- Braga, F. A. V., Kar, G., Berg, M., Carpaij, O. A., Polański, K., Simon, L. M., Brouwer, S., Gomes, T., Hesse, L., Jiang, J., Fasouli, E. S., Efremova, M., Vento-Tormo, R., Talavera-López, C., Jonker, M., Affleck, K., Palit, S., Strzelecka, P. M., Firth, H. V., ... Teichmann, S. A. (2019). A Cellular Census of Human Lungs Identifies Novel Cell States in Health and in Asthma. *Nature Medicine*, 25(7), 1153-1163. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0468-5>
- Branco, P. T. B. S., Alvim-Ferraz, M. C. M., Martins, F. G., Ferraz, C., Vaz, L. G., & Sousa, S. (2020). Asthma in Urban and Rural Pre- and Primary Schoolchildren According to the Latest GINA Definition. *Allergy*, 75(7), 1771-1776. <https://doi.org/10.1111/all.14201>
- Brandt, E. B., Bolcas, P. E., Ruff, B. P., & Hershey, G. K. K. (2020). IL33 Contributes to Diesel Pollution-mediated Increase in Experimental Asthma Severity. *Allergy*, 75(9), 2254-2266. <https://doi.org/10.1111/all.14181>
- Braunstahl, G., Chlumský, J., Peachey, G., & Chen, C. (2013). Reduction in Oral Corticosteroid Use in Patients Receiving Omalizumab for Allergic Asthma in the Real-World Setting. *Allergy Asthma & Clinical Immunology*, 9(1). <https://doi.org/10.1186/1710-1492-9-47>
- Breitwieser, F. P., Baker, D., & Salzberg, S. L. (2018). KrakenUniq: Confident and Fast Metagenomics Classification Using Unique K-Mer Counts. *Genome Biology*, 19(1). <https://doi.org/10.1186/s13059-018-1568-0>
- Brown, C. T., Hug, L., Thomas, B. C., Sharon, I., Castelle, C. J., Singh, A. K., Wilkins, M. J., Wrighton, K., Williams, K. H., & Banfield, J. F. (2015). Unusual Biology Across a Group Comprising More Than 15% of Domain Bacteria. *Nature*, 523(7559), 208-211. <https://doi.org/10.1038/nature14486>
- Buchfink, B., Xie, C., & Huson, D. H. (2014). Fast and Sensitive Protein Alignment Using DIAMOND. *Nature Chemical Biology*, 12(1), 59-60. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3176>
- Budden, K. F., Gellatly, S. L., Wood, D. L. A., Cooper, M. A., Morrison, M., Hugenholtz, P., & Hansbro, P. M. (2017). Emerging pathogenic links between microbiota and the gut-lung axis. *Nature Reviews Microbiology*, 15(1), 55-63. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.142>
- C., B., A., N., J., C., J., N., & M., D. (2016). Impact of the gut microbiota on inflammation, obesity, and metabolic disease. *Genome Medicine*. <https://doi.org/10.1186/s13073-016-0303-2>
- C., C., Hsin-Cheng, C., L., C., W., F., Michael, C. V. D., Y., K., W., C., H., L., Wen-Ping, H., & S., S. (2020). Integration of metagenomics-metabolomics reveals specific signatures and functions of airway microbiota in mite-sensitized childhood asthma. *Allergy. European Journal of Allergy and Clinical Immunology*. <https://doi.org/10.1111/all.14438>
- C., F., A., T. V., M., V., Fernando, A. O., R., C., & F., M. (2014). The Central Role of the Gut Microbiota in Chronic Inflammatory Diseases. *Journal of Immunological Research*. <https://doi.org/10.1155/2014/689492>
- Cait, A., Hughes, M. R., Antignano, F., Cait, J., Dimitriu, P. A., Maas, K. R., Reynolds, L. A., Hacker, L., Mohr, J., Finlay, B. B., Zaph, C., McNagny, K. M., & Mohn, W. W. (2018). Microbiome-driven allergic lung inflammation is ameliorated by short-chain fatty acids. *Mucosal Immunology*, 11(3), 785-795. <https://doi.org/10.1038/mi.2017.75>
- Camacho, C., Coulouris, G., Avagyan, V., Ma, N., Papadopoulos, J. S., Bealer, K., & Madden, T. (2009). BLAST+: Architecture and Applications. *BMC Bioinformatics*, 10(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-421>
- Camara-Lemarroy, C. R., Silva, C., Greenfield, J., Liu, W.-Q., Metz, L. M., & Yong, V. W. (2020). Biomarkers of intestinal barrier function in multiple sclerosis are associated with disease

- activity. *Multiple Sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*, 26(11), 1340-1350. <https://doi.org/10.1177/1352458519863133>
- Camargo, A. P., Roux, S., Schulz, F., Babinski, M., Xu, Y., Hu, B., Chain, P. S. G., Nayfach, S., & Kyrpides, N. C. (2023). Identification of Mobile Genetic Elements With geNomad. *Nature Biotechnology*, 42(8), 1303-1312. <https://doi.org/10.1038/s41587-023-01953-y>
- Cani, P. D., Amar, J., Iglesias, M. A., Poggi, M., Knauf, C., Bastelica, D., Neyrinck, A. M., Fava, F., Tuohy, K. M., Chabo, C., Waget, A., Delmée, E., Cousin, B., Sulpice, T., Chamontin, B., Ferrières, J., Tanti, J.-F., Gibson, G. R., Casteilla, L., ... Burcelin, R. (2007). Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes*, 56(7), 1761-1772. <https://doi.org/10.2337/db06-1491>
- Canonica, G. W., Rottoli, P., Bucca, C., Zappa, M. C., Giovanni, M., Macciocchi, B., Caruso, C., Santus, P., Bartezaghi, M., & Rigoni, L. (2018). Improvement of Patient-Reported Outcomes in Severe Allergic Asthma by Omalizumab Treatment: The Real Life Observational PROXIMA Study. *World Allergy Organization Journal*, 11, 33. <https://doi.org/10.1186/s40413-018-0214-3>
- Caporaso, J. G., Lauber, C. L., Walters, W. A., Berg-Lyons, D., Huntley, J. S., Fierer, N., Owens, S. M., Betley, J. R., Fraser, L., Bauer, M., Gormley, N., Gilbert, J. A., Smith, G., & Knight, R. (2012). Ultra-High-Throughput Microbial Community Analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq Platforms. *The Isme Journal*, 6(8), 1621-1624. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.8>
- Caraballo, J. C., Yshii, C., Westphal, W., Moninger, T. O., & Comellas, A. P. (2011). Ambient Particulate Matter Affects Occludin Distribution and Increases Alveolar Transepithelial Electrical Conductance. *Respirology*, 16(2), 340-349. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1843.2010.01910.x>
- Carter, M. M., Olm, M. R., Merrill, B. D., Dahan, D., Tripathi, S., Spencer, S. P., Yu, F. B., Jain, S., Neff, N., Jha, A. R., Sonnenburg, E. D., & Hryckowian, A. J. (2023). Ultra-Deep Sequencing of Hadza Hunter-Gatherers Recovers Vanishing Gut Microbes. *Cell*, 186(14), 3111-3124.e13. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2023.05.046>
- Chanin, R. B., West, P. T., Park, R. M., Wirbel, J., Green, G. Z. M., Miklos, A. M., Gill, M. O., Hickey, A. S., Brooks, E. F., & Bhatt, A. S. (2023). *Intragenic DNA Inversions Expand Bacterial Coding Capacity*. <https://doi.org/10.1101/2023.03.11.532203>
- Chen, B., Sun, L., & Zhang, X. (2017). Integration of microbiome and epigenome to decipher the pathogenesis of autoimmune diseases. *Journal of Autoimmunity*, 83, 31-42. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2017.03.009>
- Choi, Y., Kim, M., Kim, S. J., Yoo, H., Kim, S. H., & Park, H. (2020). Metabolic Shift Favoring C18:0 Ceramide Accumulation in Obese Asthma. *Allergy*, 75(11), 2858-2866. <https://doi.org/10.1111/all.14366>
- Ciprandi, G., Miraglia del Giudice, M., & Drago, L. (2024). Progress on probiotics as add-on therapy for allergic rhinitis. *Revue Française d'Allergologie*, 64(2), 103766. <https://doi.org/10.1016/j.reval.2023.103766>
- Coit, P., & Sawalha, A. H. (2016). The human microbiome in rheumatic autoimmune diseases: A comprehensive review. *Clinical Immunology*, 170, 70-79. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2016.07.026>
- Contreras-Moreira, B., & Vinuesa, P. (2013). GET_HOMOLOGUES, a Versatile Software Package for Scalable and Robust Microbial Pangenome Analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(24), 7696-7701. <https://doi.org/10.1128/aem.02411-13>
- Cox, M. J., Huang, Y. J., Fujimura, K. E., Liu, J. T., McKean, M., Boushey, H. A., Segal, M. R., Brodie, E. L., Cabana, M. D., & Lynch, S. V. (2010). Lactobacillus casei Abundance Is

- Associated with Profound Shifts in the Infant Gut Microbiome. *PLoS ONE*, 5(1), e8745. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008745>
- D'Amato, G., Annesi-Maesano, I., Cecchi, L., & D'Amato, M. (2019). Latest News on Relationship Between Thunderstorms and Respiratory Allergy, Severe Asthma, and Deaths for Asthma. *Allergy*, 74(1), 9-11. <https://doi.org/10.1111/all.13616>
- Dang, A. T., & Marsland, B. J. (2019). Microbes, Metabolites, and the Gut–lung Axis. *Mucosal Immunology*, 12(4), 843-850. <https://doi.org/10.1038/s41385-019-0160-6>
- Danko, D., Bezdan, D., Afshin, E. E., Ahsanuddin, S., Bhattacharya, C., Butler, D., Chng, K. R., Donnellan, D., Hecht, J., Jackson, K., Kuchin, K., Karasikov, M., Lyons, A., Mak, L., Meleshko, D., Mustafa, H., Mutai, B., Neches, R. Y., Ng, A. H. Q., ... Zubenko, S. (2021). A Global Metagenomic Map of Urban Microbiomes and Antimicrobial Resistance. *Cell*, 184(13), 3376-3393.e17. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.05.002>
- Darling, A. E., Mau, B., Blattner, F. R., & Perna, N. T. (2004). Mauve: Multiple Alignment of Conserved Genomic Sequence With Rearrangements. *Genome Research*, 14(7), 1394-1403. <https://doi.org/10.1101/gr.2289704>
- Das, M., Thajuddin, N., Patra, S., & Pundir, M. (2024). Mind-body techniques on stress-induced gut microbiota dysbiosis in Asthmatics: A narrative review. *Brain Behavior and Immunity Integrative*, 5, 100040. <https://doi.org/10.1016/j.bbii.2023.100040>
- Davies, A. M., Jefferis, R., & Sutton, B. J. (2014). Crystal structure of deglycosylated human IgG4-Fc. *Molecular Immunology*, 62(1), 46-53. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2014.05.015>
- Davies, D. E. (2014). Epithelial Barrier Function and Immunity in Asthma. *Annals of the American Thoracic Society*, 11(Supplement 5), S244-S251. <https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.201407-304AW>
- Delmont, T. O., Quince, C., Shaiber, A., Esen, Ö. C., Lee, S. T. M., Rappé, M. S., McLellan, S. L., Lückner, S., & Eren, A. M. (2018). Nitrogen-Fixing Populations of Planctomycetes and Proteobacteria Are Abundant in Surface Ocean Metagenomes. *Nature Microbiology*, 3(7), 804-813. <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0176-9>
- Deng, Z.-L., Münch, P., Mreches, R., & McHardy, A. C. (2022). Rapid and Accurate Identification of Ribosomal RNA Sequences via Deep Learning. *Nucleic Acids Research*, 50(10), e60-e60. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac112>
- Du, Y., & Sun, F. (2022). HiCBin: Binning Metagenomic Contigs and Recovering Metagenome-Assembled Genomes Using Hi-C Contact Maps. *Genome Biology*, 23(1). <https://doi.org/10.1186/s13059-022-02626-w>
- Dubin, K., Callahan, M. K., Ren, B., Khanin, R., Viale, A., Ling, L., No, D. J., Gobourne, A., Littmann, E. R., Huttenhower, C., Pamer, E. G., & Wolchok, J. D. (2016). Intestinal Microbiome Analyses Identify Melanoma Patients at Risk for Checkpoint-Blockade-Induced Colitis. *Nature Communications*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/ncomms10391>
- Durbin, R., Eddy, S. R., Krogh, A., & Mitchison, G. (1998). *Biological Sequence Analysis*. <https://doi.org/10.1017/cbo9780511790492>
- Eckburg, P. B., Bik, E. M., Bernstein, Ç. N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., Gill, S. R., Nelson, K. E., & Relman, D. A. (2005). Diversity of the Human Intestinal Microbial Flora. *Science*, 308(5728), 1635-1638. <https://doi.org/10.1126/science.1110591>
- Eder, W., Ege, M., & Mutius, E. von. (2006). The Asthma Epidemic. *New England Journal of Medicine*, 355(21), 2226-2235. <https://doi.org/10.1056/nejmra054308>
- Ellulu, M. S., & Samouda, H. (2022). Clinical and biological risk factors associated with inflammation in patients with type 2 diabetes mellitus. *BMC Endocrine Disorders*, 22(1), 16. <https://doi.org/10.1186/s12902-021-00925-0>

- Eren, A. M., Esen, Ö. C., Quince, C., Vineis, J. H., Morrison, H. G., Sogin, M. L., & Delmont, T. O. (2015). Anvi'o: An Advanced Analysis and Visualization Platform for 'Omics Data. *PeerJ*, 3, e1319. <https://doi.org/10.7717/peerj.1319>
- Farzan, N., Vijverberg, S. J. H., Hernandez-Pacheco, N., Bel, E. H., Berce, V., Bønnelykke, K., Bisgaard, H., Burchard, E. G., Canino, G., Celedón, J. C., Chew, F. T., Chiang, W. C., Cloutier, M. M., Forno, E., Francis, B., Hawcutt, D. B., Herrera-Luis, E., Kabesch, M., Karimi, L., ... Zee, A. H. M. der. (2018). 17q21 Variant Increases the Risk of Exacerbations in Asthmatic Children Despite Inhaled Corticosteroids Use. *Allergy*, 73(10), 2083-2088. <https://doi.org/10.1111/all.13499>
- Feng, H., Xun, P., Pike, K., Wills, A. K., Chawes, B. L., Bisgaard, H., Cai, W., Wan, Y., & He, K. (2017). In utero exposure to 25-hydroxyvitamin D and risk of childhood asthma, wheeze, and respiratory tract infections: A meta-analysis of birth cohort studies. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 139(5), 1508-1517. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.06.065>
- Ferretti, P., Pasolli, E., Tett, A., Asnicar, F., Gorfer, V., Fedi, S., Armanini, F., Truong, D. T., Manara, S., Zolfo, M., Beghini, F., Bertorelli, R., Sanctis, V. D., Bariletti, I., Canto, R., Clementi, R., Cologna, M., Crifò, T., Cusumano, G., ... Segata, N. (2018). Mother-to-Infant Microbial Transmission From Different Body Sites Shapes the Developing Infant Gut Microbiome. *Cell Host & Microbe*, 24(1), 133-145.e5. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.06.005>
- Filippo, M. D., Votto, M., Caminiti, L., Carella, F., Castro, G. D., Landi, M., Olcese, R., Panasiti, I., Vernich, M., Barberi, S., Ciprandi, G., & Marseglia, G. L. (2022). Omalizumab and Allergen Immunotherapy for Respiratory Allergies. *Allergologia Et Immunopathologia*, 50(6), 47-52. <https://doi.org/10.15586/aei.v50i6.495>
- Fiorentino, M., Sapone, A., Senger, S., Camhi, S., Kadzielski, S. M., Buie, T., Kelly, D. L., Cascella, N. G., & Fasano, A. (2016). Blood-brain Barrier and Intestinal Epithelial Barrier Alterations in Autism Spectrum Disorders. *Molecular Autism*, 7(1). <https://doi.org/10.1186/s13229-016-0110-z>
- Fremin, B. J., Sberro, H., & Bhatt, A. S. (2020). MetaRibo-Seq Measures Translation in Microbiomes. *Nature Communications*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17081-z>
- Frolova, M. S., Suvorova, I. A., Iablokov, S. N., Petrov, S. N., & Rodionov, D. A. (2022). Genomic Reconstruction of Short-Chain Fatty Acid Production by the Human Gut Microbiota. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2022.949563>
- Frost, L. S., Leplae, R., Summers, A. O., & Toussaint, A. (2005). Mobile Genetic Elements: The Agents of Open Source Evolution. *Nature Reviews Microbiology*, 3(9), 722-732. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1235>
- Gao, Z., Fu, W., Sun, Y., Gao, B., Wang, H., Liu, M., Luo, F., Zhou, X., Jin, J., Zhao, L., Wu, S., Liu, Y., Wu, L., Wang, X., Tang, N., Guo, B.-H., Feng, Y., Zhou, J., Gadermaier, G., ... Ree, R. van. (2018). Artemisia Pollen Allergy in China: Component-resolved Diagnosis Reveals Allergic Asthma Patients Have Significant Multiple Allergen Sensitization. *Allergy*, 74(2), 284-293. <https://doi.org/10.1111/all.13597>
- Georas, S. N., & Rezaee, F. (2014). Epithelial Barrier Function: At the Front Line of Asthma Immunology and Allergic Airway Inflammation. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 134(3), 509-520. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2014.05.049>
- Ghatak, S., King, Z. A., Sastry, A. V., & Kim, J. (2019). The Y-Ome Defines the 35% Of Escherichia Coligenes That Lack Experimental Evidence of Function. *Nucleic Acids Research*, 47(5), 2446-2454. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz030>
- Gill, S. R., Pop, M., DeBoy, R. T., Eckburg, P. B., Turnbaugh, P. J., Samuel, B. S., Gordon, J. I., Relman, D. A., Fraser-Liggett, C. M., & Nelson, K. E. (2006). Metagenomic Analysis of

the Human Distal Gut Microbiome. *Science*, 312(5778), 1355-1359. Crossref. <https://doi.org/10.1126/science.1124234>

- Goretzki, A., Lin, Y. J., & Schülke, S. (2021). Immune Metabolism in Allergies, Does It Matter?—A Review of Immune Metabolic Basics and Adaptations Associated With the Activation of Innate Immune Cells in Allergy. *Allergy*, 76(11), 3314-3331. <https://doi.org/10.1111/all.14843>
- Gorlanova, O., Illi, S., Toncheva, A. A., Usemann, J., Latzin, P., Kabesch, M., Dalphin, J.-C., Lauener, R., Pekkanen, J., Mutius, E. von, Riedler, J., Kuehni, C. E., Rössli, M., Frey, U., Bild, & groups, P. study. (2018). Protective Effects of Breastfeeding on Respiratory Symptoms in Infants With 17q21 Asthma Risk Variants. *Allergy*, 73(12), 2388-2392. <https://doi.org/10.1111/all.13568>
- Gregory, A. C., Zayed, A. A., Conceição-Neto, N., Temperton, B., Bolduc, B., Alberti, A., Ardyna, M., Arkhipova, K., Carmichael, M., Cruaud, C., Dimier, C., Domínguez-Huerta, G., Ferland, J., Kandels, S., Liu, Y., Marec, C., Picheral, M., Pisarev, S., Poulain, J., ... Wincker, P. (2019). Marine DNA Viral Macro- And Microdiversity From Pole to Pole. *Cell*, 177(5), 1109-1123.e14. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.03.040>
- Groussin, M., Sistiaga, A., Kearney, S. M., Moniz, K., Noel, M., Hooker, J., Gibbons, S. M., Ségurel, L., Froment, A., Said-Mohamed, R., Fezeu, A., Juimo, V. A., Lafosse, S., Tabe, F. E., Girard, C., Iqaluk, D., Nguyen, L. T. T., Shapiro, B., Lehtimäki, J., ... Alm, E. J. (2021). Elevated Rates of Horizontal Gene Transfer in the Industrialized Human Microbiome. *Cell*, 184(8), 2053-2067.e18. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.02.052>
- Haahtela, T., Holgate, S. T., Pawankar, R., Akdiş, C. A., Benjaponpitak, S., Caraballo, L., Demain, J. G., Portnoy, J. M., & Hertzen, L. von. (2013). The Biodiversity Hypothesis and Allergic Disease: World Allergy Organization Position Statement. *World Allergy Organization Journal*, 6, 3. <https://doi.org/10.1186/1939-4551-6-3>
- Hackett, T.-L., Warner, S. M., Stefanowicz, D., Shaheen, F., Pechkovsky, D. V., Murray, L. A., Argentieri, R., Kicic, A., Stick, S. M., Bai, T. R., & Knight, D. A. (2009). Induction of Epithelial–Mesenchymal Transition in Primary Airway Epithelial Cells from Patients with Asthma by Transforming Growth Factor-β1. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 180(2), 122-133. <https://doi.org/10.1164/rccm.200811-1730OC>
- Hartmann, M., & Six, J. (2022). Soil Structure and Microbiome Functions in Agroecosystems. *Nature Reviews Earth & Environment*, 4(1), 4-18. <https://doi.org/10.1038/s43017-022-00366-w>
- Hemmi, H., Kaisho, T., Takeda, K., & Akira, S. (2003). The Roles of Toll-Like Receptor 9, MyD88, and DNA-Dependent Protein Kinase Catalytic Subunit in the Effects of Two Distinct CpG DNAs on Dendritic Cell Subsets1. *The Journal of Immunology*, 170(6), 3059-3064. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.6.3059>
- Hillmann, B., Al-Ghalith, G. A., Shields-Cutler, R. R., Zhu, Q., Gohl, D. M., Beckman, K. B., Knight, R., & Knights, D. (2018). Evaluating the Information Content of Shallow Shotgun Metagenomics. *Msystems*, 3(6). <https://doi.org/10.1128/msystems.00069-18>
- Hitch, T. C. A., Afrizal, A., Riedel, T., Kioukis, A., Haller, D., Lagkouvardos, I., Overmann, J., & Clavel, T. (2021). Recent Advances in Culture-Based Gut Microbiome Research. *International Journal of Medical Microbiology*, 311(3), 151485. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2021.151485>
- Holgate, S. T., Holloway, J. W., Wilson, S. J., Bucchieri, F., Puddicombe, S. M., & Davies, D. E. (2004). Epithelial-Mesenchymal Communication in the Pathogenesis of Chronic Asthma. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 1(2), 93-98. <https://doi.org/10.1513/pats.2306034>

- Holmes, E., Li, J. V., Athanasiou, T., Ashrafian, H., & Nicholson, J. K. (2011). Understanding the role of gut microbiome–host metabolic signal disruption in health and disease. *Trends in Microbiology*, 19(7), 349-359. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2011.05.006>
- Holt, P. G., & Strickland, D. H. (2009). Soothing signals: Transplacental transmission of resistance to asthma and allergy. *The Journal of Experimental Medicine*, 206(13), 2861-2864. <https://doi.org/10.1084/jem.20092469>
- Honarpisheh, P., Reynolds, C. R., Conesa, M. P. B., Moruno-Manchon, J. F., Putluri, N., Bhattacharjee, M. B., Urayama, A., McCullough, L. D., & Ganesh, B. P. (2020). Dysregulated Gut Homeostasis Observed Prior to the Accumulation of the Brain Amyloid-B in Tg2576 Mice. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(5), 1711. <https://doi.org/10.3390/ijms21051711>
- Hou, K., Wu, Z., Chen, X.-Y., Wang, J., Zhang, D., Xiao, C., Zhu, D., Koya, J., Wei, L., Li, J., & Chen, Z. (2022). Microbiota in Health and Diseases. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41392-022-00974-4>
- Huber, J. A., Welch, D. B. M., Morrison, H. G., Huse, S. M., Neal, P. R., Butterfield, D. A., & Sogin, M. L. (2007). Microbial Population Structures in the Deep Marine Biosphere. *Science*, 318(5847), 97-100. <https://doi.org/10.1126/science.1146689>
- Huffnagle, G. B. (2010). The Microbiota and Allergies/Asthma. *PLOS Pathogens*, 6(5), e1000549. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000549>
- Humbert, M., Albers, F. C., Bratton, D. J., Yancey, S. W., Liu, M. C., Hozawa, S., Llanos, J.-P., & Kwon, N. (2019). Effect of Mepolizumab in Severe Eosinophilic Asthma According to Omalizumab Eligibility. *Respiratory Medicine*, 154, 69-75. <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2019.06.004>
- Irvine, A. D., McLean, W. H. I., & Leung, D. Y. M. (2011). Filaggrin Mutations Associated With Skin and Allergic Diseases. *New England Journal of Medicine*, 365(14), 1315-1327. <https://doi.org/10.1056/nejmra1011040>
- Ivanova, O., Richards, L. B., Vijverberg, S. J. H., Neerincx, A. H., Sinha, A., Sterk, P. J., & Zee, A. H. M. der. (2019). What Did We Learn From Multiple Omics Studies in Asthma? *Allergy*, 74(11), 2129-2145. <https://doi.org/10.1111/all.13833>
- Jain, C., Rodriguez-R, L. M., Phillippy, A. M., Konstantinidis, K. T., & Aluru, S. (2018). High Throughput ANI Analysis of 90K Prokaryotic Genomes Reveals Clear Species Boundaries. *Nature Communications*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07641-9>
- Jin, Y., Liang, L., Tu, W., Luo, T., & Fu, Z. (2019). Impacts of Polystyrene Microplastic on the Gut Barrier, Microbiota and Metabolism of Mice. *The Science of the Total Environment*, 649, 308-317. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.08.353>
- Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., Tunyasuvunakool, K., Bates, R., Židek, A., Potapenko, A., Bridgland, A., Meyer, C., Kohl, S. A. A., Ballard, A. J., Cowie, A., Romera-Paredes, B., Nikolov, S., Jain, R., Adler, J., ... Hassabis, D. (2021). Highly Accurate Protein Structure Prediction With AlphaFold. *Nature*, 596(7873), 583-589. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>
- Kang, D., Li, F., Kirton, E., Thomas, A., Egan, R., An, H., & Zhong, W. (2019). MetaBAT 2: An Adaptive Binning Algorithm for Robust and Efficient Genome Reconstruction From Metagenome Assemblies. *PeerJ*, 7, e7359. <https://doi.org/10.7717/peerj.7359>
- Kempen, M. van, Kim, S. S., Tumescheit, C., Mirdita, M., Lee, J.-J., Gilchrist, C. L. M., Söding, J., & Steinegger, M. (2023). Fast and Accurate Protein Structure Search With Foldseek. *Nature Biotechnology*, 42(2), 243-246. <https://doi.org/10.1038/s41587-023-01773-0>
- Khedkar, S., Smyshlyaev, G., Letunić, I., Maistrenko, O. M., Coelho, L. P., Orakov, A., Forslund, K., Hildebrand, F., Lütge, M., Schmidt, T. S. B., Barábas, O., & Bork, P. (2022).

- Landscape of Mobile Genetic Elements and Their Antibiotic Resistance Cargo in Prokaryotic Genomes. *Nucleic Acids Research*, 50(6), 3155-3168. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac163>
- Kim, D., Song, L., Breitwieser, F. P., & Salzberg, S. L. (2016). Centrifuge: Rapid and Sensitive Classification of Metagenomic Sequences. *Genome Research*, 26(12), 1721-1729. <https://doi.org/10.1101/gr.210641.116>
- Kim, H. S., Park, I., Song, C. H., Lee, K., Yun, J. W., Kim, H. K., Jeon, M., Lee, J., & Han, K. M. (2019). Development of a daily PM₁₀ and PM_{2.5} prediction system using a deep long short-term memory neural network model. *Atmospheric Chemistry and Physics*, 19(20), 12935-12951. <https://doi.org/10.5194/acp-19-12935-2019>
- Kim, K. E., Cho, Y. S., Baek, K. S., Li, L., Baek, K.-H., Kim, J. H., Kim, H.-S., & Sheen, Y. H. (2016). Lipopolysaccharide-binding protein plasma levels as a biomarker of obesity-related insulin resistance in adolescents. *Korean Journal of Pediatrics*, 59(5), 231-238. <https://doi.org/10.3345/kjp.2016.59.5.231>
- Koh, A., Vadder, F. D., Kovatcheva-Datchary, P., & Bäckhed, F. (2016). From Dietary Fiber to Host Physiology: Short-Chain Fatty Acids as Key Bacterial Metabolites. *Cell*, 165(6), 1332-1345. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.05.041>
- Kolmogorov, M., Bickhart, D. M., Behsaz, B., Gurevich, A., Rayko, M., Shin, S. B., Kuhn, K. L., Yuan, J., Polevikov, E., Smith, T. P. L., & Pevzner, P. A. (2020). metaFlye: Scalable Long-Read Metagenome Assembly Using Repeat Graphs. *Nature Chemical Biology*, 17(11), 1103-1110. <https://doi.org/10.1038/s41592-020-00971-x>
- Koren, S., Walenz, B. P., Berlin, K., Miller, J. R., Bergman, N. H., & Phillippy, A. M. (2017). Canu: Scalable and Accurate Long-Read Assembly via Adaptivek-Mer Weighting and Repeat Separation. *Genome Research*, 27(5), 722-736. <https://doi.org/10.1101/gr.215087.116>
- Kostic, A. D., Xavier, R. J., & Gevers, D. (2014). The Microbiome in Inflammatory Bowel Disease: Current Status and the Future Ahead. *Gastroenterology*, 146(6), 1489-1499. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2014.02.009>
- Kuruvilla, M., Lee, F. E., & Lee, G. (2018). Understanding Asthma Phenotypes, Endotypes, and Mechanisms of Disease. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, 56(2), 219-233. <https://doi.org/10.1007/s12016-018-8712-1>
- L., L. B., F., M., S., F., G., G., F., C., & G., G. (2022). Microbiome Changes in Connective Tissue Diseases and Vasculitis: Focus on Metabolism and Inflammation. *International Journal of Molecular Sciences*. <https://doi.org/10.3390/ijms23126532>
- Lad, N., Murphy, A. M., Parenti, C., Nelson, C. P., Williams, N. C., Sharpe, G. R., & McTernan, P. G. (2021). Asthma and obesity: Endotoxin another insult to add to injury? *Clinical Science*, 135(24), 2729-2748. <https://doi.org/10.1042/CS20210790>
- Lane, D., Pace, B., Olsen, G. J., Stahl, D. A., Sogin, M. L., & Pace, N. R. (1985). Rapid Determination of 16S Ribosomal RNA Sequences for Phylogenetic Analyses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 82(20), 6955-6959. <https://doi.org/10.1073/pnas.82.20.6955>
- Lee, J. J., Kim, S. H., Lee, M. J., Kim, B. K., Song, W. J., Cho, S. H., Hong, S. J., Chang, Y.-S., & Kim, B. S. (2018). Different Upper Airway Microbiome and Their Functional Genes Associated With Asthma in Young Adults and Elderly Individuals. *Allergy*, 74(4), 709-719. <https://doi.org/10.1111/all.13608>
- Lee, Y.-G., Lee, S.-H., Hong, J., Lee, P.-H., & Jang, A.-S. (2021). Titanium dioxide particles modulate epithelial barrier protein, Claudin 7 in asthma. *Molecular Immunology*, 132, 209-216. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2021.01.004>

- Leino, M., Loxham, M., Blume, C., Swindle, E. J., Jayasekera, N., Dennison, P., Shamji, B., Edwards, M., Holgate, S. T., Howarth, P. H., & Davies, D. E. (2013). Barrier Disrupting Effects of *Alternaria Alternata* Extract on Bronchial Epithelium From Asthmatic Donors. *Plos One*, 8(8), e71278. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071278>
- Li, D., Liu, C.-M., Luo, R., Sadakane, K., & Lam, T. W. (2015). MEGAHIT: An Ultra-Fast Single-Node Solution for Large and Complex Metagenomics Assembly via Succinct de Bruijn Graph. *Bioinformatics*, 31(10), 1674-1676. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv033>
- Li, J., Wang, C., Liu, C., Kang, J., Kong, L., Huang, Y., Liu, S., Huang, M., Wang, L., Fogel, R., Jaumont, X., Yang, J., & Zhong, N. (2020). Efficacy Predictors of Omalizumab in Chinese Patients With Moderate-to-Severe Allergic Asthma: Findings From a Post-Hoc Analysis of a Randomised Phase III Study. *World Allergy Organization Journal*, 13(12), 100469. <https://doi.org/10.1016/j.waojou.2020.100469>
- Li, X., Saadat, S., & Hu, H. (2019). BHap: A Novel Approach for Bacterial Haplotype Reconstruction. *Bioinformatics*, 35(22), 4624-4631. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz280>
- Li, Y., Long, J., Zhang, Z., & Yin, W. (2024). Insights into the unique roles of dermal white adipose tissue (dWAT) in wound healing. *Frontiers in Physiology*, 15. <https://doi.org/10.3389/fphys.2024.1346612>
- Liang, G., & Bushman, F. D. (2021). The Human Virome: Assembly, Composition and Host Interactions. *Nature Reviews Microbiology*, 19(8), 514-527. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00536-5>
- Liu, X., Andersen, S. L., Olsen, J., Agerbo, E., Schlünssen, V., Dharmage, S. C., & Munk-Olsen, T. (2017). Maternal Hypothyroidism in the Perinatal Period and Childhood Asthma in the Offspring. *Allergy*, 73(4), 932-939. <https://doi.org/10.1111/all.13365>
- Love, M. I., Huber, W., & Anders, S. (2014). Moderated Estimation of Fold Change and Dispersion for RNA-seq Data With DESeq2. *Genome Biology*, 15(12). <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>
- Lucks, J. B., Mortimer, S., Trapnell, C., Luo, S., Aviran, S., Schroth, G. P., Pachter, L., Doudna, J. A., & Arkin, A. P. (2011). Multiplexed RNA Structure Characterization With Selective 2'-Hydroxyl Acylation Analyzed by Primer Extension Sequencing (SHAPE-Seq). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(27), 11063-11068. <https://doi.org/10.1073/pnas.1106501108>
- Lugli, G. A., Milani, C., Mancabelli, L., Turrone, F., Ferrario, C., Duranti, S., Sinderen, D. van, & Ventura, M. (2017). Ancient Bacteria of the Ötzi's Microbiome: A Genomic Tale From the Copper Age. *Microbiome*, 5(1). <https://doi.org/10.1186/s40168-016-0221-y>
- Lunjani, N., Walsh, L. J., Venter, C., Power, M., MacSharry, J., Murphy, D. M., & O'Mahony, L. (2022). Environmental influences on childhood asthma—The effect of diet and microbiome on asthma. *Pediatric Allergy and Immunology*, 33(12), e13892. <https://doi.org/10.1111/pai.13892>
- Lynch, S. V., & Boushey, H. A. (2016). The microbiome and development of allergic disease. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, 16(2), 165. <https://doi.org/10.1097/ACI.0000000000000255>
- Ma, P., Amemiya, H. M., He, L. L., Gandhi, S. J., Nicol, R., Bhattacharyya, R. P., Smillie, C. S., & Hung, D. T. (2023). Bacterial Droplet-Based Single-Cell RNA-seq Reveals Antibiotic-Associated Heterogeneous Cellular States. *Cell*, 186(4), 877-891.e14. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2023.01.002>
- Madi, N., Chen, D., Wolff, R., Shapiro, B. J., & Garud, N. R. (2023). Community Diversity Is Associated With Intra-Species Genetic Diversity and Gene Loss in the Human Gut Microbiome. *Elife*, 12. <https://doi.org/10.7554/elif.78530>

- Mayneris-Perxachs, J., & Fernández-Real, J.-M. (2020). Exploration of the microbiota and metabolites within body fluids could pinpoint novel disease mechanisms. *The FEBS Journal*, 287(5), 856-865. <https://doi.org/10.1111/febs.15130>
- Medini, D., Donati, C., Tettelin, H., Massignani, V., & Rappuoli, R. (2005). The Microbial Pan-Genome. *Current Opinion in Genetics & Development*, 15(6), 589-594. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2005.09.006>
- Metwally, A., Reitmeier, S., & Haller, D. (2022). Microbiome risk profiles as biomarkers for inflammatory and metabolic disorders. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 19(6), 383-397. <https://doi.org/10.1038/s41575-022-00581-2>
- Mitchell, E. A. (1985). International trends in hospital admission rates for asthma. *Archives of Disease in Childhood*, 60(4), 376-378. <https://doi.org/10.1136/ad.60.4.376>
- Mitchell, P. D., & O'Byrne, P. M. (2017). Biologics and the lung: TSLP and other epithelial cell-derived cytokines in asthma. *Pharmacology & Therapeutics*, 169, 104-112. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2016.06.009>
- Moss, E. L., Maghini, D. G., & Bhatt, A. S. (2020). Complete, Closed Bacterial Genomes From Microbiomes Using Nanopore Sequencing. *Nature Biotechnology*, 38(6), 701-707. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0422-6>
- Müller, A. C., Hundt, C., Hildebrandt, A., Hankeln, T., & Schmidt, B. (2017). MetaCache: Context-Aware Classification of Metagenomic Reads Using Minhashing. *Bioinformatics*, 33(23), 3740-3748. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx520>
- Nakano, Y., Domon, Y., & Yamagishi, K. (2023). Phylogenetic Trees of Closely Related Bacterial Species and Subspecies Based on Frequencies of Short Nucleotide Sequences. *Plos One*, 18(4), e0268847. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0268847>
- Nayfach, S., Rodriguez-Mueller, B., Garud, N. R., & Pollard, K. S. (2016). An Integrated Metagenomics Pipeline for Strain Profiling Reveals Novel Patterns of Bacterial Transmission and Biogeography. *Genome Research*, 26(11), 1612-1625. <https://doi.org/10.1101/gr.201863.115>
- Nayfach, S., Roux, S., Seshadri, R., Udway, D. W., Varghese, N., Schulz, F., Wu, D., Páez-Espino, D., Chen, I.-M. A., Huntemann, M., Palaniappan, K., Ladau, J., Mukherjee, S., Reddy, T. B. K., Nielsen, T., Kirton, E., Faria, J. P., Edirisinghe, J. N., Henry, C. S., ... Elie-Fadrosh, E. A. (2020). A Genomic Catalog of Earth's Microbiomes. *Nature Biotechnology*, 39(4), 499-509. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0718-6>
- Nazeen, S., Yu, Y. W., & Berger, B. (2020). Carnelian Uncovers Hidden Functional Patterns Across Diverse Study Populations From Whole Metagenome Sequencing Reads. *Genome Biology*, 21(1). <https://doi.org/10.1186/s13059-020-1933-7>
- Nies, L. de, Lopes, S., Busi, S. B., Galata, V., Heintz-Buschart, A., Laczny, C. C., May, P., & Wilmes, P. (2021). PathoFact: A Pipeline for the Prediction of Virulence Factors and Antimicrobial Resistance Genes in Metagenomic Data. *Microbiome*, 9(1). <https://doi.org/10.1186/s40168-020-00993-9>
- Nurk, S., Meleshko, D., Korobeynikov, A., & Pevzner, P. A. (2017). metaSPAdes: A New Versatile Metagenomic Assembler. *Genome Research*, 27(5), 824-834. <https://doi.org/10.1101/gr.213959.116>
- Odoardi, F., Sie, C., Streyl, K., Ulaganathan, V. K., Schläger, C., Lodygin, D., Heckelsmiller, K., Nietfeld, W., Ellwart, J. W., Klinkert, W. E. F., Lottaz, C., Nosov, M., Brinkmann, V., Spang, R., Lehrach, H., Vingron, M., Wekerle, H., Flügel-Koch, C., & Flügel, A. (2012). T Cells Become Licensed in the Lung to Enter the Central Nervous System. *Nature*, 488(7413), 675-679. <https://doi.org/10.1038/nature11337>

- Ojala, T., Häkkinen, A., Kankuri, E., & Kankainen, M. (2023). Current Concepts, Advances, and Challenges in Deciphering the Human Microbiota With Metatranscriptomics. *Trends in Genetics*, 39(9), 686-702. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2023.05.004>
- Okdahl, T., Wegeberg, A.-M., Pociot, F., Brock, B., Størling, J., & Brock, C. (2022). Low-grade inflammation in type 2 diabetes: A cross-sectional study from a Danish diabetes outpatient clinic. *BMJ Open*, 12(12), e062188. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2022-062188>
- Olafsdottir, T. A., Theódórs, F., Bjarnadóttir, K., Björnsdóttir, U. S., Agustsdottir, A. B., Stefansson, O. A., Ívarsdóttir, E. V., Sigurdsson, J. K., Benónisdóttir, S., Eyjolfsson, G. I., Gíslason, D., Gíslason, Þ., Guðmundsdóttir, S., Gylfason, A., Halldórsson, B. V., Halldorsson, G. H., Juliusdottir, T., Kristinsdottir, A. M., Lúdvíksdóttir, D., ... Stefánsson, K. (2020). Eighty-Eight Variants Highlight the Role of T Cell Regulation and Airway Remodeling in Asthma Pathogenesis. *Nature Communications*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-14144-8>
- Ödling, M., Andersson, N., Ekström, S., Bergström, A., & Kull, I. (2018). Characterization of Asthma in the Adolescent Population. *Allergy*, 73(8), 1744-1746. <https://doi.org/10.1111/all.13469>
- Pabst, O. (2017). Correlation, consequence, and functionality in microbiome-immune interplay. *Immunological Reviews*, 279(1), 4-7. <https://doi.org/10.1111/imr.12584>
- Pachter, L., Alexandersson, M., & Cawley, S. (2002). Applications of Generalized Pair Hidden Markov Models to Alignment and Gene Finding Problems. *Journal of Computational Biology*, 9(2), 389-399. <https://doi.org/10.1089/10665270252935520>
- Page, A. J., Cummins, C., Hunt, M., Wong, V., Reuter, S., Holden, M. T. G., Fookes, M., Falush, D., Keane, J. A., & Parkhill, J. (2015). Roary: Rapid Large-Scale Prokaryote Pan Genome Analysis. *Bioinformatics*, 31(22), 3691-3693. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv421>
- Parks, D. H., Imelfort, M., Skennerton, C. T., Hugenholtz, P., & Tyson, G. W. (2015). CheckM: Assessing the Quality of Microbial Genomes Recovered From Isolates, Single Cells, and Metagenomes. *Genome Research*, 25(7), 1043-1055. <https://doi.org/10.1101/gr.186072.114>
- Parks, D. H., Rinke, C., Chuvochina, M., Chaumeil, P.-A., Woodcroft, B. J., Evans, P. N., Hugenholtz, P., & Tyson, G. W. (2017). Recovery of Nearly 8,000 Metagenome-Assembled Genomes Substantially Expands the Tree of Life. *Nature Microbiology*, 2(11), 1533-1542. <https://doi.org/10.1038/s41564-017-0012-7>
- Pasolli, E., Asnicar, F., Manara, S., Zolfo, M., Karcher, N., Armanini, F., Beghini, F., Manghi, P., Tett, A., Ghensi, P., Collado, M. C., Rice, B. L., DuLong, C., Morgan, X. C., Golden, C. D., Quince, C., Huttenhower, C., & Segata, N. (2019). Extensive Unexplored Human Microbiome Diversity Revealed by Over 150,000 Genomes From Metagenomes Spanning Age, Geography, and Lifestyle. *Cell*, 176(3), 649-662.e20. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.01.001>
- Peer, Y. V. de, Auwera, G. V. der, & Wächter, R. D. (1996). The Evolution of Stramenopiles and Alveolates as Derived by "Substitution Rate Calibration" of Small Ribosomal Subunit RNA. *Journal of Molecular Evolution*, 42(2), 201-210. <https://doi.org/10.1007/bf02198846>
- Perdijk, O., Butler, A., Macowan, M., Chatzis, R., Bulanda, E., Grant, R. D., Harris, N. L., Wypych, T. P., & Marsland, B. J. (2024). Antibiotic-driven dysbiosis in early life disrupts indole-3-propionic acid production and exacerbates allergic airway inflammation in adulthood. *Immunity*, 57(8), 1939-1954.e7. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2024.06.010>
- Peterson, L. W., & Artis, D. (2014). Intestinal Epithelial Cells: Regulators of Barrier Function and Immune Homeostasis. *Nature Reviews Immunology*, 14(3), 141-153. <https://doi.org/10.1038/nri3608>

- Piro, V. C., Dadi, T. H., Seiler, E., Reinert, K., & Renard, B. Y. (2020). Ganon: Precise Metagenomics Classification Against Large and Up-to-Date Sets of Reference Sequences. *Bioinformatics*, 36(Supplement_1), i12-i20. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btaa458>
- Platts-Mills, T. A. E. (2015). The allergy epidemics: 1870-2010. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 136(1), 3-13. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2015.03.048>
- Podlesny, D., Arze, C., Dörner, E., Verma, S., Dutta, S. K., Walter, J., & Fricke, W. F. (2022). Metagenomic Strain Detection With SameStr: Identification of a Persisting Core Gut Microbiota Transferable by Fecal Transplantation. *Microbiome*, 10(1). <https://doi.org/10.1186/s40168-022-01251-w>
- Postma, D. S., Brightling, C. E., Baldi, S., Berge, M. van den, Fabbri, L. M., Gagnatelli, A., Papi, A., Molen, T. van der, Rabe, K. F., Siddiqui, S., Singh, D., Nicolini, G., Kraft, M., Pizzichini, E., Cukier, A., Stelmach, R., Olivenstein, R., Zhang, Q., Badorrek, P., ... Hanania, N. A. (2019). Exploring the Relevance and Extent of Small Airways Dysfunction in Asthma (ATLANTIS): Baseline Data From a Prospective Cohort Study. *The Lancet Respiratory Medicine*, 7(5), 402-416. [https://doi.org/10.1016/s2213-2600\(19\)30049-9](https://doi.org/10.1016/s2213-2600(19)30049-9)
- Pothoven, K. L., & Schleimer, R. P. (2017). The Barrier Hypothesis and Oncostatin M: Restoration of Epithelial Barrier Function as a Novel Therapeutic Strategy for the Treatment of Type 2 Inflammatory Disease. *Tissue Barriers*, 5(3), e1341367. <https://doi.org/10.1080/21688370.2017.1341367>
- Qin, Z. (2023). Immunometabolism in the Pathogenesis of Asthma. *Immunology*, 171(1), 1-17. <https://doi.org/10.1111/imm.13688>
- Raby, K. L., Michaeloudes, C., Tonkin, J., Chung, K. F., & Bhavsar, P. K. (2023). Mechanisms of airway epithelial injury and abnormal repair in asthma and COPD. *Frontiers in Immunology*, 14, 1201658. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1201658>
- Raybould, H. E. (2012). Gut Microbiota, Epithelial Function and Derangements in Obesity. *The Journal of Physiology*, 590(3), 441-446. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2011.222133>
- Ro, M. J., Kwon, S. Y., & Kim, J. H. (2019). Leukotriene B4 Receptors Mediate the Production of IL-17, Thus Contributing to Neutrophil-dominant Asthmatic Airway Inflammation. *Allergy*, 74(9), 1797-1799. <https://doi.org/10.1111/all.13789>
- Ro, M., Lee, A.-J., & Kim, J. H. (2017). 5-/12-Lipoxygenase-linked Cascade Contributes to the IL-33-induced Synthesis of IL-13 in Mast Cells, Thus Promoting Asthma Development. *Allergy*, 73(2), 350-360. <https://doi.org/10.1111/all.13294>
- Roberts, C. L., Rushworth, S., Richman, E., & Rhodes, J. M. (2013). Hypothesis: Increased Consumption of Emulsifiers as an Explanation for the Rising Incidence of Crohn's Disease. *Journal of Crohn's and Colitis*, 7(4), 338-341. <https://doi.org/10.1016/j.crohns.2013.01.004>
- Robinson, M. D., McCarthy, D. J., & Smyth, G. K. (2009). edgeR: A Bioconductor Package for Differential Expression Analysis of Digital Gene Expression Data. *Bioinformatics*, 26(1), 139-140. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp616>
- Rodríguez del Río, Á., Giner-Lamia, J., Cantalapiedra, C. P., Botas, J., Deng, Z., Hernández-Plaza, A., Munar-Palmer, M., Santamaría-Hernando, S., Rodríguez-Herva, J. J., Ruscheweyh, H.-J., Paoli, L., Schmidt, T. S. B., Sunagawa, S., Bork, P., López-Solanilla, E., Coelho, L. P., & Huerta-Cepas, J. (2023). Functional and Evolutionary Significance of Unknown Genes From Uncultivated Taxa. *Nature*, 626(7998), 377-384. <https://doi.org/10.1038/s41586-023-06955-z>
- Rook, G. A. W., Adams, V., Hunt, J., Palmer, R., Martinelli, R., & Brunet, L. R. (2004). Mycobacteria and Other Environmental Organisms as Immunomodulators for

- Immunoregulatory Disorders. *Springer Seminars in Immunopathology*, 25(3-4), 237-255. <https://doi.org/10.1007/s00281-003-0148-9>
- Rossum, T. V., Ferretti, P., Maistrenko, O. M., & Bork, P. (2020). Diversity Within Species: Interpreting Strains in Microbiomes. *Nature Reviews Microbiology*, 18(9), 491-506. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0368-1>
- Ruscheweyh, H., Milanese, A., Paoli, L., Sintsova, A., Mende, D., Zeller, G., & Sunagawa, S. (2021). mOTUs: Profiling Taxonomic Composition, Transcriptional Activity and Strain Populations of Microbial Communities. *Current Protocols*, 1(8). <https://doi.org/10.1002/cpz1.218>
- Rüb, A. M., Tsakmaklis, A., Gräfe, S. K., Simon, M.-C., Vehreschild, M. J., & Wuethrich, I. (2021). Biomarkers of Human Gut Microbiota Diversity and Dysbiosis. *Biomarkers in Medicine*, 15(2), 139-150. <https://doi.org/10.2217/bmm-2020-0353>
- Sardar, P., Almeida, A., & Pedicord, V. A. (2024). Integrating functional metagenomics to decipher microbiome-immune interactions. *Immunology & Cell Biology*, 102(8), 680-691. <https://doi.org/10.1111/imcb.12798>
- Sberro, H., Fremin, B. J., Zlitni, S., Edfors, F., Greenfield, N., Snyder, M., Pavlopoulos, G. A., Kyrpides, N. C., & Bhatt, A. S. (2019). Large-Scale Analyses of Human Microbiomes Reveal Thousands of Small, Novel Genes. *Cell*, 178(5), 1245-1259.e14. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.07.016>
- Scher, J. U., & Abramson, S. B. (2011). The microbiome and rheumatoid arthritis. *Nature Reviews Rheumatology*, 7(10), 569-578. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2011.121>
- Schmidt, T. S. B., Li, S. S., Maistrenko, O. M., Akanni, W., Coelho, L. P., Dolai, S., Fullam, A., Glazek, A. M., Hercog, R., Herrema, H., Jung, F., Kandels, S., Orakov, A., Thielemann, R., Stetten, M. von, Rossum, T. V., Beneš, V., Borody, T. J., Vos, W. M. de, ... Bork, P. (2022). Drivers and Determinants of Strain Dynamics Following Fecal Microbiota Transplantation. *Nature Medicine*, 28(9), 1902-1912. <https://doi.org/10.1038/s41591-022-01913-0>
- Shakya, M., Lo, C., & Chain, P. (2019). Advances and Challenges in Metatranscriptomic Analysis. *Frontiers in Genetics*, 10. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00904>
- Sharma, S., & Tripathi, P. (2019). Gut Microbiome and Type 2 Diabetes: Where We Are and Where to Go? *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 63, 101-108. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2018.10.003>
- Shore, S. A., & Cho, Y. (2016). Obesity and Asthma: Microbiome-Metabolome Interactions. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 54(5), 609-617. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2016-0052PS>
- Simonsen, A. K. (2021). Environmental Stress Leads to Genome Streamlining in a Widely Distributed Species of Soil Bacteria. *The ISME Journal*, 16(2), 423-434. <https://doi.org/10.1038/s41396-021-01082-x>
- Simpson, E. L., Bieber, T., Guttman-Yassky, E., Beck, L. A., Blauvelt, A., Cork, M. J., Silverberg, J. I., Deleuran, M., Kataoka, Y., Lacour, J., Kingo, K., Worm, M., Poulin, Y., Wollenberg, A., Soo, Y., Graham, N. M. H., Pirozzi, G., Akinlade, B., Staudinger, H., ... Ardeleanu, M. (2016). Two Phase 3 Trials of Dupilumab Versus Placebo in Atopic Dermatitis. *New England Journal of Medicine*, 375(24), 2335-2348. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1610020>
- Simpson, E. L., Chalmers, J. R., Hanifin, J. M., Kim, T., Cork, M. J., McLean, W., Brown, S. J., Chen, Z., Chen, Y., & Williams, H. C. (2014). Emollient Enhancement of the Skin Barrier From Birth Offers Effective Atopic Dermatitis Prevention. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 134(4), 818-823. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2014.08.005>

- Sohn, K.-H., Baek, M., Choi, S.-M., Bae, B., Kim, R. Y., Kim, Y.-C., Kim, H.-Y., Yi, H., & Kang, H.-R. (2020). Alteration of Lung and Gut Microbiota in IL-13-Transgenic Mice Simulating Chronic Asthma. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30(12), 1819-1826. <https://doi.org/10.4014/jmb.2009.09019>
- Song, Z., Li, X., Xie, J., Han, F., Wang, N., Hou, Y., & Yao, J. (2024). Associations of inflammatory cytokines with inflammatory bowel disease: A Mendelian randomization study. *Frontiers in Immunology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1327879>
- Söllinger, A., Tveit, A. T., Poulsen, M., Noel, S. J., Bengtsson, M. M., Bernhardt, J., Hellwing, A. L. F., Lund, P., Riedel, K., Schleper, C., Højberg, O., & Urich, T. (2018). Holistic Assessment of Rumen Microbiome Dynamics Through Quantitative Metatranscriptomics Reveals Multifunctional Redundancy During Key Steps of Anaerobic Feed Degradation. *Msystems*, 3(4). <https://doi.org/10.1128/msystems.00038-18>
- Spacova, I., Petrova, M., Fremau, A., Pollaris, L., Vanoirbeek, J., Ceuppens, J. L., Seys, S., & Lebeer, S. (2018). Intranasal Administration of Probiotic *Lactobacillus Rhamnosus* GG Prevents Birch Pollen-induced Allergic Asthma in a Murine Model. *Allergy*, 74(1), 100-110. <https://doi.org/10.1111/all.13502>
- Spang, A., Saw, J. H., Jørgensen, S. L., Zaremba-Niedzwiedzka, K., Martijn, J., Lind, A.-L., Eijk, R. van, Schleper, C., Guy, L., & Ettema, T. J. G. (2015). Complex Archaea That Bridge the Gap Between Prokaryotes and Eukaryotes. *Nature*, 521(7551), 173-179. <https://doi.org/10.1038/nature14447>
- Stalder, T., Press, M. O., Sullivan, S., Liachko, I., & Top, E. M. (2019). Linking the Resistome and Plasmidome to the Microbiome. *The ISME Journal*, 13(10), 2437-2446. <https://doi.org/10.1038/s41396-019-0446-4>
- Storz, G., Vogel, J., & Wassarman, K. M. (2011). Regulation by Small RNAs in Bacteria: Expanding Frontiers. *Molecular Cell*, 43(6), 880-891. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.08.022>
- Süzek, B. E., Huang, H., McGarvey, P. B., Mazumder, R., & Wu, C. H. (2007). UniRef: Comprehensive and Non-Redundant UniProt Reference Clusters. *Bioinformatics*, 23(10), 1282-1288. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm098>
- Taj, B., Adeolu, M., Xiong, X., Ang, J., Nursimulu, N., & Parkinson, J. (2023). MetaPro: A Scalable and Reproducible Data Processing and Analysis Pipeline for Metatranscriptomic Investigation of Microbial Communities. *Microbiome*, 11(1). <https://doi.org/10.1186/s40168-023-01562-6>
- Tajik, N., Frech, M., Schulz, O., Schälter, F., Lucas, S., Azizov, V., Dürholz, K., Steffen, F., Omata, Y., Rings, A., Bertog, M., Rizzo, A., Iljazović, A., Basic, M., Kleyer, A., Culemann, S., Krönke, G., Luo, Y., Überla, K., ... Zaiss, M. M. (2020). Targeting Zonulin and Intestinal Epithelial Barrier Function to Prevent Onset of Arthritis. *Nature Communications*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15831-7>
- Tajiri, T., Suzuki, M., Kutsuna, T., Nishiyama, H., Ito, K., Takeda, N., Fukumitsu, K., Kanemitsu, Y., Fukuda, S., Uemura, T., Ohkubo, H., Maeno, K., Ito, Y., Takemura, M., & Yoshikawa, K. (2023). Specific IgE Response and Omalizumab Responsiveness in Severe Allergic Asthma. *Journal of Asthma and Allergy, Volume 16*, 149-157. <https://doi.org/10.2147/jaa.s393683>
- Tan, A., Murugapiran, S., Mikalaukas, A., Koble, J., Kennedy, D., Hyde, F., Ruotti, V., Law, E., Jensen, J., Schroth, G. P., Macklaim, J. M., Kuersten, S., LeFrançois, B., & Gohl, D. M. (2023). Rational Probe Design for Efficient rRNA Depletion and Improved Metatranscriptomic Analysis of Human Microbiomes. *BMC Microbiology*, 23(1). <https://doi.org/10.1186/s12866-023-03037-y>
- Tepetam, F. M., Akyıldız, A. B., Özden, Ş., Örcen, C., Yakut, T., & Atik, Ö. (2023). Comparison of Omalizumab and Mepolizumab Treatment Efficacy in Patients With Atopic and Eosinophilic “Overlap” Severe Asthma: Biological Agent Preference in Atopic-

- Tourancheau, A., Mead, E. A., Zhang, X., & Fang, G. (2021). Discovering Multiple Types of DNA Methylation From Bacteria and Microbiome Using Nanopore Sequencing. *Nature Chemical Biology*, 18(5), 491-498. <https://doi.org/10.1038/s41592-021-01109-3>
- Trischler, J., Bottoli, I., Janocha, R., Heusser, C., Jaumont, X., Lowe, P. J., Gautier, A., Pethe, A., Woessner, R., Zerwes, H., & Zielen, S. (2021). Ligelizumab Treatment for Severe Asthma: Learnings From the Clinical Development Programme. *Clinical & Translational Immunology*, 10(3). <https://doi.org/10.1002/cti2.1255>
- Truong, D. T., Tett, A., Pasolli, E., Huttenhower, C., & Segata, N. (2017). Microbial Strain-Level Population Structure and Genetic Diversity From Metagenomes. *Genome Research*, 27(4), 626-638. <https://doi.org/10.1101/gr.216242.116>
- Tsang, M. S., Cheng, S.-W., Zhu, J., Atli, K., Chan, B. P., Liu, D., Chan, H. Y., Sun, X., Chu, I. M., Hon, K. E., Lam, C. W., Shaw, P., Leung, P., & Wong, C. (2018). Anti-Inflammatory Activities of Pentaherbs Formula and Its Influence on Gut Microbiota in Allergic Asthma. *Molecules*, 23(11), 2776. <https://doi.org/10.3390/molecules23112776>
- Turnbaugh, P. J., Hamady, M., Yatsunenko, T., Cantarel, B. L., Duncan, A., Ley, R. E., Sogin, M. L., Jones, W. J., Roe, B. A., Affourtit, J. P., Egholm, M., Henrissat, B., Heath, A. C., Knight, R., & Gordon, J. I. (2009). A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature*, 457(7228), 480-484. <https://doi.org/10.1038/nature07540>
- Uritskiy, G., Press, M. O., Sun, C., Gd, H., Zayed, A. A., Wiser, A. H., Grove, J. R., Auch, B., Eacker, S., Sullivan, S., Bickhart, D. M., Smith, T. P., & Mb, S. (2021). *Accurate Viral Genome Reconstruction and Host Assignment With Proximity-Ligation Sequencing*. <https://doi.org/10.1101/2021.06.14.448389>
- Ünüvar, S., Erge, D., Kılıçarslan, B., Bag, H. G., Çatal, F., Girgin, G., & Baydar, T. (2019). Neopterin Levels and Indoleamine 2,3-Dioxygenase Activity as Biomarkers of Immune System Activation and Childhood Allergic Diseases. *Annals of Laboratory Medicine*, 39(3), 284-290. <https://doi.org/10.3343/alm.2019.39.3.284>
- Vallianou, N. G., Stratigou, T., & Tsagarakis, S. (2018). Microbiome and diabetes: Where are we now? *Diabetes Research and Clinical Practice*, 146, 111-118. Crossref. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2018.10.008>
- Valverde-Molina, J., & García-Marcos, L. (2023). Microbiome and Asthma: Microbial Dysbiosis and the Origins, Phenotypes, Persistence, and Severity of Asthma. *Nutrients*, 15(3), 486. <https://doi.org/10.3390/nu15030486>
- Venter, C., Meyer, R., Nwaru, B. I., Roduit, C., Untersmayr, E., Adel-Patient, K., Agache, I., Agostoni, C., Akdis, C. A., Bischoff, S. C., Toit, G. D., Feeney, M., Frei, R., Garn, H., Greenhawt, M., Hoffmann-Sommergruber, K., Lunjani, N., Maslin, K., Mills, C., ... O'Mahony, L. (2019). EAACI Position Paper: Influence of Dietary Fatty Acids on Asthma, Food Allergy, and Atopic Dermatitis. *Allergy*, 74(8), 1429-1444. <https://doi.org/10.1111/all.13764>
- Ver Heul, A., Planer, J., & Kau, A. L. (2019). The Human Microbiota and Asthma. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, 57(3), 350-363. <https://doi.org/10.1007/s12016-018-8719-7>
- Versi, A., Azim, A., Ivan, F. X., Abdel-Aziz, M. I., Bates, S., Riley, J., Uddin, M., Zounemat Kermani, N., Maitland-Van Der Zee, A., Dahlen, S., Djukanovic, R., Chotirmall, S. H., Howarth, P., Adcock, I. M., & Chung, K. F. (2024). A severe asthma phenotype of excessive airway Haemophilus influenzae relative abundance associated with sputum neutrophilia. *Clinical and Translational Medicine*, 14(9), e70007. <https://doi.org/10.1002/ctm2.70007>

- Wang, L., Zhu, L., & Qin, S. (2019). Gut Microbiota Modulation on Intestinal Mucosal Adaptive Immunity. *Journal of Immunology Research*, 2019, 1-10. <https://doi.org/10.1155/2019/4735040>
- Wang, M., Tan, G., Eljaszewicz, A., Meng, Y., Wawrzyniak, P., Acharya, S., Altunbulakli, C., Westermann, P., Dreher, A., Yan, L., Wang, C., Akdis, M., Zhang, L., Nadeau, K. C., & Akdis, C. A. (2019). Laundry detergents and detergent residue after rinsing directly disrupt tight junction barrier integrity in human bronchial epithelial cells. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 143(5), 1892-1903. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2018.11.016>
- Wang, W., Li, Y., Lv, Z., Chen, Y., Li, Y., Huang, K., Corrigan, C. J., & Ying, S. (2018). Bronchial Allergen Challenge of Patients with Atopic Asthma Triggers an Alarmin (IL-33, TSLP, and IL-25) Response in the Airways Epithelium and Submucosa. *The Journal of Immunology*, 201(8), 2221-2231. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1800709>
- Wawrzyniak, P., Wawrzyniak, M., Wanke, K., Sokolowska, M., Bendelja, K., Rückert, B., Globinska, A., Jakiela, B., Kast, J. I., Idzko, M., Akdis, M., Sanak, M., & Akdis, C. A. (2017). Regulation of bronchial epithelial barrier integrity by type 2 cytokines and histone deacetylases in asthmatic patients. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 139(1), 93-103. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.03.050>
- Wibowo, M. C., Yang, Z., Borry, M., Hübner, A., Huang, K., Tierney, B. T., Zimmerman, S. M., Barajas-Olmos, F., Contreras-Cubas, C., Garcia-Ortiz, H., Martínez-Hernández, A., Lubner, J. M., Kirstahler, P., Blohm, T., Smiley, F. E., Arnold, R. R., Ballal, S. A., Pamp, S. J., Russ, J., ... Kostic, A. D. (2021). Reconstruction of Ancient Microbial Genomes From the Human Gut. *Nature*, 594(7862), 234-239. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03532-0>
- Wick, R. R., Judd, L. M., Gorrie, C. L., & Holt, K. E. (2017). Unicycler: Resolving Bacterial Genome Assemblies From Short and Long Sequencing Reads. *Plos Computational Biology*, 13(6), e1005595. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005595>
- Willits, E., Park, M. A., Hartz, M. F., Schleck, C. D., Weaver, A. L., & Joshi, A. Y. (2018). Food Allergy: A Comprehensive Population-Based Cohort Study. *Mayo Clinic Proceedings*, 93(10), 1423-1430. <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2018.05.031>
- Wilson, N. G., Hernandez-Leyva, A., Rosen, A. L., Jaeger, N., McDonough, R. T., Santiago-Borges, J., Lint, M. A., Rosen, T. R., Tomera, C. P., Bacharier, L. B., Swamidass, S. J., & Kau, A. L. (2023). The gut microbiota of people with asthma influences lung inflammation in gnotobiotic mice. *iScience*, 26(2), 105991. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2023.105991>
- Woese, C. R., & Fox, G. E. (1977). Phylogenetic Structure of the Prokaryotic Domain: The Primary Kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(11), 5088-5090. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.11.5088>
- Wood, D. E., Lu, J., & Langmead, B. (2019). Improved Metagenomic Analysis With Kraken 2. *Genome Biology*, 20(1). <https://doi.org/10.1186/s13059-019-1891-0>
- Wood, D. E., & Salzberg, S. L. (2014). Kraken: Ultrafast Metagenomic Sequence Classification Using Exact Alignments. *Genome Biology*, 15(3). <https://doi.org/10.1186/gb-2014-15-3-r46>
- Wright, P. R., Georg, J., Mann, M., Sorescu, D. A., Richter, A. S., Lott, S. C., Kleinkauf, R., Hess, W. R., & Backofen, R. (2014). CopraRNA and IntaRNA: Predicting Small RNA Targets, Networks and Interaction Domains. *Nucleic Acids Research*, 42(W1), W119-W123. <https://doi.org/10.1093/nar/gku359>
- Wu, Y. W., Tang, Y. H., Tringe, S. G., Simmons, B. A., & Singer, S. W. (2014). MaxBin: An Automated Binning Method to Recover Individual Genomes From Metagenomes Using an Expectation-Maximization Algorithm. *Microbiome*, 2(1). <https://doi.org/10.1186/2049-2618-2-26>

- Xavier, R. J., & Podolsky, D. K. (2007). Unravelling the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease. *Nature*, 448(7152), 427-434. <https://doi.org/10.1038/nature06005>
- Xian, M., Wawrzyniak, P., Rückert, B., Duan, S., Meng, Y., Sokolowska, M., Globinska, A., Zhang, L., Akdis, M., & Akdis, C. A. (2016). Anionic surfactants and commercial detergents decrease tight junction barrier integrity in human keratinocytes. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 138(3), 890-893.e9. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.07.003>
- Xiao, C., Puddicombe, S. M., Field, S., Haywood, J., Broughton-Head, V., Puxeddu, I., Haitchi, H. M., Vernon-Wilson, E., Sammut, D., Bedke, N., Cremin, C., Sones, J., Djukanović, R., Howarth, P. H., Collins, J. E., Holgate, S. T., Monk, P., & Davies, D. E. (2011). Defective epithelial barrier function in asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 128(3), 549-556.e12. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2011.05.038>
- Xie, Z., & Tang, H. (2017). ISEScan: Automated Identification of Insertion Sequence Elements in Prokaryotic Genomes. *Bioinformatics*, 33(21), 3340-3347. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx433>
- Yassour, M., Jason, E., Hogstrom, L., Arthur, T. D., Tripathi, S., Siljander, H., Selvenius, J., Oikarinen, S., Hyöty, H., Virtanen, S. M., Ilonen, J., Ferretti, P., Pasoli, E., Tett, A., Asnicar, F., Segata, N., Vlamakis, H., Lander, E. S., Huttenhower, C., ... Xavier, R. J. (2018). Strain-Level Analysis of Mother-to-Child Bacterial Transmission During the First Few Months of Life. *Cell Host & Microbe*, 24(1), 146-154.e4. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.06.007>
- Yuksel, H., Ocalan, M., & Yilmaz, O. (2021). E-Cadherin: An Important Functional Molecule at Respiratory Barrier Between Defence and Dysfunction. *Frontiers in Physiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.720227>
- Zairina, E., Stewart, K., Abramson, M. J., & George, J. (2014). The Effectiveness of Non-Pharmacological Healthcare Interventions for Asthma Management During Pregnancy: A Systematic Review. *BMC Pulmonary Medicine*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2466-14-46>
- Zhao, D., Leng, Y. X., Liu, Y., & Zhou, X. (2023). Effect of Calcium Hydrothermal Treatment of Zirconia Abutments on Human Gingival Fibroblasts. *Journal of Biomedical Materials Research Part B Applied Biomaterials*, 111(11), 1883-1889. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.35291>
- Zheng, W., Zhao, S., Yin, Y., Zhang, H., Needham, D. M., Evans, E. D., Cl, D., Lu, P. J., Alm, E. J., & Weitz, D. A. (2022). High-Throughput, Single-Microbe Genomics With Strain Resolution, Applied to a Human Gut Microbiome. *Science*, 376(6597). <https://doi.org/10.1126/science.abm1483>
- Zhu, A., Sunagawa, S., Mende, D. R., & Bork, P. (2015). Inter-Individual Differences in the Gene Content of Human Gut Bacterial Species. *Genome Biology*, 16(1). <https://doi.org/10.1186/s13059-015-0646-9>