

İnsan Bağırsak Mikrobiyomu ve İn Vivo Hayvan Modelleri

Human Intestinal Microbiome and In Vivo Animal Models

Hüseyin Hatipoğlu, Mehmet Köroğlu

Sakarya Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD, Sakarya

Hatipoğlu H., Köroğlu M. İnsan Bağırsak Mikrobiyomu ve İn Vivo Hayvan Modelleri. *J Biotechnol and Strategic Health Res.* 2017;1 (Special issue):148-156.

Özet

Yeni nesil dizileme teknolojisinin kullanıma girmesi ile mikrobiyota üzerine yapılan çalışmalar hız kazanmıştır. Mikrobiyota çalışmaları neticesinde insan vücudu ile kendi bağırsak mikrobiyotası arasındaki etkileşimin ayrıntıları ve kararlılıkta kalmış birçok alan aydınlanmaya başlamıştır. Bağırsak mikrobiyotasının stabil olmadığı, gün içindeki diyet, ilaç kullanımı (özellikle antibiyotik) gibi etkenlerle saatler içinde değişim gösterdiği saptanmıştır. Mikrobiyotanın bu dinamik yapısını ve insan-bağırsak mikrobiyotası etkileşimini daha iyi anlamak için uygulanan yöntemlerden birisi de hayvan modelleridir.

Hayvan modelleri, mikrobiyotanın ölçülebilirliği ve izlenebilirliği açısından çeşitli avantajlar sunmaktadır. Bu tip çalışmalar farklı hayvan modelleri üzerinde yapılabilmektedir. Bu sayede mikrobiyotanın insan metabolizması üzerindeki rolleri daha net gösterilebilmektedir. Gnotobiyotik ile steril hayvan modelleri ile tek bir mikrobiyota üyesi ve tüm mikrobiyota üyelerini kapsayacak şekilde hayvan modelleri oluşturabilmektedir.

Mikrobiyota çalışmalarının hemen hemen tamamı bakteriler üzerine yoğunlaşmış durumdadır. Virüsler, parazitler ve mantarlar da mikrobiyota kapsamında olduğundan göz ardı edilmemeli, bu tür mikroorganizmalar ile ilgili de hayvan modelleri geliştirilmelidir. Böylece kararlılıkta kalan diğer alanlar da aydınlığa kavuşacaktır.

Anahtar Kelimeler Mikrobiyota, hayvan modelleri, gnotobiyotik, mikrop, bağırsak

Abstract

Studies related to microbiota have increased enormously with the introduction of the next generation sequencing technology. Results of these studies have revealed the details of the interaction between the human body and its gut microbiota and the many mysterious and undefined topics. It is determined that gut microbiota is not stable, and it adapts to some factors in hours such as daytime diet, drug use (especially antibiotics).

One of the methods used for better understanding of this dynamic structure of microbiota and human-gut microbiota interaction is animal models. Animal models offer several advantages in terms of the tractability of microbiota. Many different animal models are suitable for such studies. In this respect, the role of microbiota on human metabolism can be determined more clearly. Sterile and gnotobiotic animal models can be designed to include even from a single microbiota member and to all microbiota members.

Almost all of the microbiota studies are concentrated on bacteria. Since viruses, parasites and fungi are also covered by microbiota, animal models should be developed for such microorganisms. By this way, other mysterious topics areas will also be revealed.

Key Words: Microbiota, animal models, gnotobiotic, microbes, gut

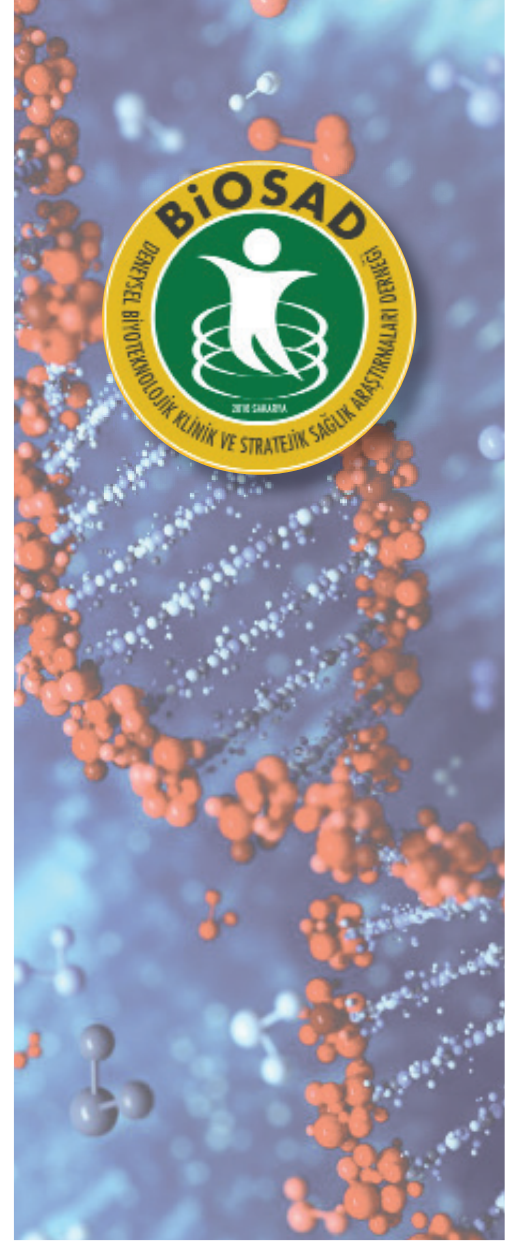
Geliş Tarihi / Received : 15.11.2017

Kabul Tarihi / Accepted : 20.11.2017

*Corresponding Author:

Arş. Gör. Dr. Hüseyin HATİPOĞLU
Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Mikrobiyoloji AD, Sakarya

E-mail: huseyin.hatipoglu@gmail.com



Giriş

Konvansiyonel mikrobiyolojik çalışmalar vasıtasıyla uzun bir süreden beri insan vücut mikrobiyotası hakkında kapsamlı bir bilgi mevcut idi. Ancak, özellikle genetik dizileme/sekans analizi gibi moleküler mikrobiyolojik yöntemler, insan ile ilişkili mikrobiyotanın çeşitliliği ve karmaşıklığına yeni ışık tutmuştur¹⁻³. Bu çalışmalar, mikrobiyota biyolojisi ile insan biyolojisi arasındaki en az üç önemli fark olduğunu vurgulamaktadır. Birincisi; mikrobiyotamız ilk olarak doğumdan sonra aileden gelir, daha sonra uzun süren çevresel maruziyet, beslenme, antibiyotik kullanımı, seleksiyon ve mikrobiyal rekabet süreci sonucunda oluşur. Bu, genlerimizin doğrudan dikey geçişiyle bir tezat oluşturur. İkincisi; insan genomlarında yaklaşık olarak binde bir oranında nükleotid farklılık gösterir. Bunun aksine, insan bağırsak mikrobiyotası bireyler arasında daha fazla değişim göstermektedir. Üçüncü temel bir ayrım; insan genomlarının aksine mikrobiyomda kodlanan genetik materyalin, dinamik olduğu ve bu toplulukların diyetteki veya diğer düzen bozucu değişikliklere tepki olarak yeniden yapılanması ve kısa sürede (saatler içinde) değişme kapasitesine sahip olmasıdır³⁻⁶. Bu, insan vücut mikrobiyotasının hücrelerimizin % 90'ını ve genlerimizin % 99'unu oluşturduğu gözlemi ile birlikte ele alındığında, mikrobiyotanın; bağırsak ve bağışıklık gelişimi, enerji dengesi, enfeksiyona karşı direnç ve yabancı bileşiklerin işlenmesi gibi, insanoğlunun çeşitli yönleriyle ilişkili olması şaşırtıcı değildir^{1,7}. Bu ilişkilerin büyük bir kısmı, mikrobiyotaya veya bileşimine deneysel olarak müdahale edilebilen hayvan modellerinde yapılan çalışmalarla belirlenmiştir.

Mikrobiyota çalışmalarının yaklaşık 2/3'ü bağırsak mikrobiyotası üzerinde yapılmıştır/yapılmaktadır. Bu derleme yazısında; insan bağırsak mikrobiyom araştırmalarında hayvan modellerinin mevcut uygulamalarını açıklamaktadır. Bu uygulamalar, tek konak ile ilişkili mikrobiyal türlerin biyolojisinin incelenmesinden, yüzlerce tür nakledilmiş ve tüm insan mikrobiyomunun incelenmesine kadar uzanmaktadır. Her vücut bölgesi ayrı bir mikrobiyotaya ev sahipliği yapmaktadır. Ancak, kalın bağırsak en yüksek mikrobiyal yoğunluğu barındırmaktadır ve en kapsamlı olarak incelenen/incelenmekte olan kısımdır⁸.

İnsan Bağırsak Mikrobiyota Hayvan Modelleri İçin Durum

İnsan biyolojisinin herhangi bir yönünde olduğu gibi, mikrobiyom

model sistemlerinin yararı da, gözlemlenen özelliklerin doğal insan sistemini ne kadar iyi temsil ettiğine bağlıdır. İnsanlarla, laboratuvarlarda yaygın olarak kullanılan in vivo hayvan modelleri arasında bir kısım temel farklılıklar vardır^{3,4}. İn vivo hayvan modellerinin uygunluğu araştırılan soruna/konuya bağlı olarak değişebilmektedir. Bununla birlikte, simbiyotik insan-mikrobiyom etkileşimlerini anlamada hayvan modellerinin iki önemli avantajı vardır. Birincisi; konaktaki mikrobiyota değişimlerinin kontrol edilebilmesi imkânının sağlanması, ikincisi; deneysel olarak ölçülebilirlik ve izlenebilirliğin sağlanmasıdır^{3,4,7}.

Konakta Mikrobiyota Değişimlerinin Kontrolü

Hayvan modellerinde insan bağırsak mikrobiyomu üzerine yapılan çalışmalar; kontrol edilebilen, standartlaştırılmış ve tekrarlanabilir deneyler aracılığıyla hayvanların üzerinde insan mikrobiyotası ile insan vücudunun karmaşık özelliklerinin değerlendirilmesine olanak sağlar.

Genom sekanslamadaki gelişmeler gelecekte kişisel genom projelerini (kişisel tıp) gösterse de, genetik dizideki kişilerarası farklılıklar kolayca tespit edilememektedir (3). Bu farklılıklar çeşitli hasta topluluklarında ölçülebilir. Ancak genom dizisi bilgilerini ve mikrobiyom ile olan ilişkisini yorumlayabilme yeteneği sınırlıdır. Bu sorulara cevap vermeye başlamak için, idantik (monozigotik; MZ) ve fraternel (dizigotik; DZ) ikiz gruplarda bağırsak mikrobiyotası yapısındaki kişiler arası farklılıklar karşılaştırılmıştır (3). Mikrobiyotada MZ ikiz çiftlerinde DZ ikiz çiftlerine göre daha fazla benzerlik bulunmamıştır. Ancak, MZ ikiz çiftlerinde DZ ikizlerine göre daha fazla korelasyon gösteren bireysel türler tespit edilmiştir (9,10). Bu çalışmalarda, insan genotipinin mikrobiyotanın şekillenmesindeki rolünün belirsiz olduğu ileri sürülmektedir. Hayvan modellerinde konak genotipi kolayca kontrol edilebilmektedir. Oysaki; insanlarda genetik varyasyona ek olarak, bireysel farklılıklar da mikrobiyom çalışmalarını etkileyebilir ve bunları ölçmek veya kontrol etmek de oldukça zordur. Bu bireysel farklılıkları geçmişteki çevresel maruziyetler; toksinler, antibiyotikler, diğer düzensizlikler ve diyet (hem deneyden önce hem de bir deney sırasında) olarak sıralayabiliriz (4,11). Birçok insan mikrobiyom çalışması, antibiyotik maruziyeti olan bireyleri çalışmadan çıkarsa da, antibiyotiklerin uzun süre kullanımlarındaki etkisi karmaşıktır. Ayrıca antibiyotiklerin etkilerinin

ortadan kalkması için gereken süre net olarak bilinmemektedir^{3,4,11}. Benzer şekilde, özellikle çalışmadan önceki diyet ile ilgili olarak kişi tarafından belirtilen diyet bildirimlerine güvenilmesi zordur. Çalışmalarda, detaylı diyet bilgisi ve gıda tüketiminin yakından kontrolü gerekiyorsa, bireylerin hastaneye yatırılarak yürütülen bir deney tasarımı kullanılarak izlenmesi önerilmektedir^{4,6,12}.

Deneysel Ölçülebilirlik ve İzlenebilirlik

Mikrobiyom çalışmalarında hayvan modelleri uygulanabilirlik açısından önemli avantajlar sunmaktadır. Bağırsağın tüm kısımları kolaylıkla incelenebilir. İnsanda vitamin, hormon ve besin reseptörleri muazzam çeşitlilikte olup, kolondan ziyade ince bağırsakta bulunmaktadır. Buna ek olarak; oksijen, pH ve besin maddeleri ve bilinmeyen diğer faktörlerin değişkenlikleri mikrobiyotayı şekillendirir. Sonuç olarak, ince bağırsağın mikrobiyotası, dışkı örneklerinden farklı bir yapı ve kompozisyon göstermektedir³. İnsan ince bağırsak mikrobiyomunun örneklenmesi zordur. Bu sorunlardan dolayı hayvan modellerinin kullanımı ideal yöntemdir. Bağırsağın proksimal bölgelerinin örneklenmesi veya incelenmesi için artan olanaklara ek olarak, terminal araştırmalar (hayvanların feda edildiği) diğer biyocoğrafik deneyleri kolaylaştırmaktadır. Yukarıda bahsedilen sorunlara rağmen insanlardan kolaylıkla toplanan fekal örneklerle yapılan son çalışmalar, bağırsak mikrobiyotasının inanılmaz derecede dinamik olduğunu ve günlük diyetdeki değişikliklere uyum sağladığını ortaya koymaktadır^{6,9}. Bu gözlemler; deneysel çalışma öncesinde, deney sırasında ve sonrasında yapılabilen örneklemeler ile birlikte yapılan veri analizlerinin neticesinde elde edilen önemli bilgilerdir. Bu şekilde, her mikrobiyomun kendi kontrolü olarak kullanılabilir olduğu da görülmektedir³.

Her bireyin mikrobiyomu diğer bireylerden farklı olduğu için, insanlarda tekrarlı deneyler gerçekleştirmek ve tedavi edilmemiş kontrol gruplarının deneysel grup olarak tanımlanması zor olmaktadır. Hayvan modeli çalışmalarında; belirli bir mikrobiyota, istatistiksel analizler ve yeterli veri sağlamak amacıyla birden çok konağa nakledilebilir. Ancak, hayvan modellerinde de zorluklar bulunmakta olup, insan ve mikrobiyotası arasındaki eşsiz ilişkinin anlaşılmasında henüz çok yenidir^{3,4}.

İnsan Bağırsak Mikrobiyomunu İncelemek Amacıyla Hayvan Modellerinin Kullanımı

İnsan bağırsak mikrobiyomunu incelemek amacıyla geliştirilen hayvan modelleri serisini tanımlamadan önce, hayvan modellerinin, doğrudan insan ile yapılan çalışmalara göre bazı dezavantajlarını vurgulamak gerekir. Diğer biyolojik araştırmalarda olduğu gibi, bir hayvan modelinin kullanılıp kullanılmayacağı, araştırılan soruların/sorunların niteliğine bağlıdır. İnsan bağırsak mikrobiyomu gibi tam anlamıyla aydınlatılmamış bir konuda, insan biyolojisinin bir hayvan modeliyle gösterilmesi (aynalanması) genellikle zordur. Örneğin; 16S rRNA dizi analizi ile insanların ve farelerin bağırsaklarında aynı seviyede mikrobiyal grupları taşıdıkları ortaya çıkarılmıştır. Ancak bu mikrobiyota üyeleri tür seviyesinde değişiklik göstermektedir^{3,4,6}. Bu farklılıklar, farelerde immün regülasyonun konağa özel modellerinin ortaya çıkarmasını etkileyebilir. Buna rağmen mikrobiyotanın metabolizmadaki rolünü anlamada önemli avantajlar sağlayabilir. Ölçülebilirlik ve maliyet gibi faktörlerden dolayı memeli olmayan konaklar cazip deneysel modellerdir. Bunlar, insandan temel farklılıkları olan (aerobiğe karşı anaerobik, farklı pH, vb.) bir bağırsak ortamı sunmaktadırlar. Herhangi bir modelde olduğu gibi, bu özelliklerin etkisi, araştırılan soruna bağlı olacaktır^{3,4}.

İnsan Mikrobiyomunun Memeli Olmayan Modelleri

Basit organizmalar

Basit çok hücreli organizmalar konak-mikrobiyota ilişkisinin evrimsel olarak korunmuş özelliklerini tanımlama fırsatı sağlar. Örneğin; Cnidarian Hydra (tatlı sularda yaşayan omurgasız canlı), farklılaşmış dokuya sahip en basit hayvanları temsil eder. Bu canlının bağırsak epitelini doğrudan mikrobiyal ajanlara maruz kalır. İlkel hayvanlarla ilişkili mikrobiyal ajanların moleküler mikrobiyolojik analizleri, farklı Hydra türlerinin farklı mikrobiyotalara sahip olduğunu ve doğadan izole edilen hayvanlarda gözlemlenen mikrobiyal birliktelik kalıplarının 30 yılı aşkın süre sonrasında bile muhafaza edildiğini ortaya koymaktadır¹³. Bu sonuçlar, hayvan ile ilişkili mikrobiyotanın stabilite ve seleksiyon gibi temel ilkelerinden bazılarının daha basit modellerde ele alınabileceğini ortaya koymaktadır³.

Basit hayvan konakların ikinci önemli özelliği de; doğal mikrobiyotanın potansiyel olarak karmaşıklığını azaltmalarıdır. Yapılarının daha az oranda karmaşık olması sayesinde metagenomik shotgun

dizileme gibi moleküler mikrobiyolojik yöntemler ile mikrobiyota üyelerindeki bireylerin genom dizilerinin eksiksiz gösterilebilmesi bu canlıların önemli bir avantajıdır. Çoğu bakterinin kolayca kültürü yapılamadığı için bu önemli bir özelliktir³. Örneğin; *Oligochaeta* solucanının (kara tatlı su solucanı) kültürü yapılmamış/yapılamayan simbiyonlarının mikrobiyotanın metagenomik dizilenmesi ile tam genom dizileri gösterilebilir. Böylece bu canlının enerjisi nasıl işlendiğini açıklayan metabolik yolları ortaya konularak, ağız veya anüs olmadan atıkların üstesinden nasıl geldiği de açıklanmış olur³.

Memeli olmayan omurgalılar ve omurgasızlar

Drosophila melanogaster (meyve sineği); gelişim, davranış ve bağışıklık gibi biyolojinin birçok yönü için önemli bir model görevi görür. Bu modelin iki önemli avantajı (büyük ölçekli deneylerin genetik ölçülebilirliği ve izlenebilirliği) vardır. Ayrıca meyve sineği, bağırsak mikrobiyomunun in vivo çalışmalarında önemli bir sistem olarak kurulma potansiyeline sahiptir. İlk çalışmalar, bu canlının bağırsak mikrobiyomunun ~ 20 türden oluşan nispeten basit yapıda olduğunu ortaya koymuştur^{14,15}. *D. melanogaster* bağırsak mikrobiyomu bileşenlerinin aerob olması (bu organizmanın bağırsağı oksijene geçirendir), bu topluluğa deneysel olarak müdahale edilmesini kolaylaştırabilir. Bununla birlikte, insan bağırsak mikrobiyomunun baskın üyeleri meyve sineğinde bulunmayan anaeroblardır. Bu farklılıklara rağmen, bu canlının bağırsak mikrobiyomu ve konak-mikrobiyal etkileşiminin büyüleyici yönleri sayesinde insan biyolojisine benzeme potansiyeli bulunmaktadır. Örneğin; *D. melanogaster*'in mikrobiyotasında bulunan *Acetobacter pomorum* tarafından üretilen asetik asit; insülin sinyalizasyonunda rol oynar¹⁶. Ancak *Acetobacter* spp. insan bağırsak mikrobiyomunun önde gelen üyelerinden değildir. Asetik asit insan bağırsağında merkezi bir metabolik bileşendir³. Ayrıca, *D. melanogaster*'da bulunan bağırsak bakterileri çiftleşme tercihi ile ilişkilendirilmiştir¹⁷. Bu canlıdaki mikrobiyomun bazı üyelerinin insülin sinyalinde rol oynadığı gibi, insan bağırsak mikrobiyotasının farklı üyelerinin de benzer bir rol oynayabileceğini düşündürmektedir.

Zebra balığı da (*Danio rerio*) insan mikrobiyotası biyolojisini anlamak için önemli bir model olarak ortaya çıkmaktadır. Bu türün gelişim biyolojisinin kullanılan özelliklerinden bazıları; yetişkinlik öncesi transparan (yarı şeffaf) bağırsak, hızlı gelişim ve ileri gene-

tik müdahale teknikleri de dahil olmak üzere bağırsak mikrobiyom ekoloji çalışmalarına fayda sağlaması olarak sıralanabilir³. Özellikle zebra balığı embriyoları; eliza plaklarda muhafaza edilebilmesi, simbiyozu aracılık eden bir kısım konak veya mikrobiyal faktörlerin geniş çaplı taranmasını kolaylaştırır. Zebra balığı, yerleşik bir mikrobiyota veya belirlenmiş bir mikrobiyal bileşen (gnotobiyotik) bulunmayan ortamda muhafaza edilebildiğinden, konakların mikrobiyotalarını seçme becerileri ile ilgili temel sorularını ele almak için kullanılmıştır. Örneğin; fare bağırsak Mikrobiyotasının, steril (mikroorganizma barındırmayan) zebra balığına ve zebra balığı mikrobiyotasının da steril bir fareye karşılıklı nakli, bu mikrobiyotanın alıcı konak tarafından yeniden şekillendirildiğini göstermektedir¹⁸. Başka bir deyişle, nakilden sonraki mikrobiyota yapısı, alıcı organizmanın doğal mikrobiyotasıyla eşleşecek şekilde yeniden düzenlenir. Bu dönüşümü tetikleyen faktörler tanımlanmamıştır. Bu faktörler; konak immün mekanizmaları, pH, oksijen gradyanları, diyet farklılıklarını veya bunların ve diğer faktörlerin kombinasyonunu içerebilir^{3,4,6}.

Gnotobiyotik: üzerinde hangi tür mikroorganizma barındırdığı bilinen veya üzerinde hiç bir tür mikroorganizma barındırmayan canlılara (ki burada canlıdan kasıt yüksek memelilerdir) verilen isim. Aseptik koşullarda (tamamen steril ortamlarda) üretilirler konakta olabilecek mikroorganizmaların türlerini ve bu mikroorganizmaların hayvanın üzerinde veya iç organlarında barınırken hayvana ne tür yarar veya zararlar verdiğinin araştırılmasında kullanılırlar.³

İnsan Mikrobiyomunun Memeli Modelleri

İnsan mikrobiyomunun memeli modelleri, yukarıda tarif edilen memeli olmayan modellerin ölçülebilirliğini sunmamakla birlikte, mikrobiyotanın deneysel çalışmaları için ana temeli sağlamıştır. Çeşitli memelilerden fekal Mikrobiyotanın kültürden bağımsız 16S rRNA dizilişi, memeliler arasında, Mikrobiyota yapısının en azından filum seviyesinde önemli ölçüde korunmuş olduğu ortaya koymuştur¹⁹. İnsanlar da dahil olmak üzere memeliler, iki bakteri filumunun hakimiyeti altındadır. Bunlar; Gram negatiflerden Bacteroidetes ve Gram pozitiflerden Firmicutes tir. Her iki grubun üyeleri de zorunlu anaeroblardır^{3,4}.

Fare Modelleri: mikroorganizmalardan arındırılması durumu

Laboratuvar faresi (*Mus musculus*), bir model sistem olarak insan biyolojisiyle birçok özellik bakımından benzerlik gösterdiği için, insan bağırsak mikrobiyotası için en yaygın kullanılan modeldir. Bu özelliklerden bazıları; küçük boyutlu olması, büyük yavruları olması, hızlı üreme süresi gibi araştırma alanlarında uygulanan genel avantajlardır. Bununla birlikte, bu özellikler hayvanları steril veya gnotobiyotik bir durumda tutmak için kullanılan tekniklerle birlikte önemli hale gelmektedir.

Birkaç şirket, steril hayvanlar üretse de, şu anda ticari olarak az sayıda tür bulunmaktadır. Steril fare serisi üretiminde genellikle iki yaklaşım kullanılır. Birincisi; yavrular modifiye sezaryen ile alınır ve steril bir anneye emzirmek için verilir²⁰. Alternatif olarak; embriyoları konvansiyonel (steril olmayan) anneden alınarak psödo gebe olan steril dişiye, aseptik şartlarda nakledilen bir embriyo transfer modeli kullanılmaktadır. Bu yaklaşımda, steril konak dişi, embriyo implantasyonundan önce bir vazektomili erkekle eşleştirilir²⁰.

Steril fareler esnek plastik film izolatörlerinde muhafaza edilir ve beslenir. Bunlar genellikle HEPA filtre ile filtrelenen giriş ve çıkış portları ve çift kapılı bir ön kamarası olan, kapalı merkezi bir bölmeden oluşurlar (Şekil 1a ve b). Hava, özel bir pompa ile sağlanır ve besleme pompası bağlantısı kesildiğinde kirli havanın akışını önlemek için çıkış portları HEPA filtrelidir (örneğin, izolatör taşınırken). Sarf malzemeleri, paslanmaz çelik bir taşıma silindirinde, ince-dayanıklı polyeater bir film tabakasıyla kaplanmış olarak otoklavlanır (Şekil 1c). Silindir, esnek bir plastik aktarma manşonu yoluyla ön kamaraya bağlandıktan sonra, manşon, aerosol haline getirilmiş bir sterilizasyon maddesi ile muamele edilir ve izolatörün iç tarafından mylar tabakası delinir. Sonrasında, sarf malzemeleri kullanılmak üzere izolatör içine çekilir. Steril koşullar, aerobik ve anaerobik kültürlerle ve mikrobiyolojik moleküler yöntemlerden 16S rRNA gen sekanslarıyla, rutin olarak takip edilir. Mikrobiyotanın konak fizyolojisine katkısını ele alabilmek için, steril fareler, steril olmayanlarla ve konvansiyonel farelerden mikrobiyota kolonize edilmiş eski steril farelerle karşılaştırılabilir. Bu karşılaştırmalar, kolonize ve steril hayvanlar arasında 100'den fazla fenotipik ayrımı ortaya çıkarmıştır⁷. Bunlar morfolojik özellikler (çekum boyu, villus uzunluğu), nutrisyonel farklılıklar (vitamin gereksinimleri, kalori çıkışı)

ve geniş kapsamlı immün regülasyon bozulmasıdır. Özellikle, bu özelliklerden sorumlu türler veya tür grupları veya altta yatan mekanizmalar çoğu durumda bilinmemektedir. Bu gözlemler, mikrobiyotanın sağlık ve hastalıklara olan katkısını araştırmak için önemli temeller oluşturmaktadır³.

Monoassosiasyon (tek bir bakteri türü içeren mikrobiyota)

Steril fareler, bilinen mikrobiyal türler veya konsorsiyumlarla kolonizasyon için bir platform görevi görürler (gnotobiyotikler; Şekil 2). Steril farelere belirgin, genom sekanslı insan bağırsak mikroplarının tek bir türünün sokulması, mikrobiyotik konak etkileşimini keşfetmek için basit bir gnotobiyotik sistem sağlar. Örneğin; gnotobiyotik farelerde, belirgin insan bağırsak simbiyonu olan *Bacteroides thetaiotaomicron*'un genom çapında transkripsiyonel kesitleri, konak diyet tarafından şekillendirilen adaptif beslenme mekanizmalarını ortaya çıkarmıştır. Bitki polisakaritlerinden zengin bir standart fare yemi bulunması durumunda *B. thetaiotaomicron*, sindirilemez substratların bozulması ve taşınmasıyla ilgili genlerin ekspresyonunu artırır. Gnotobiyotik fareler basit bir şeker diyetinde tutulduğunda, *B. thetaiotaomicron* bu genleri bastırır ve bunun yerine konakçı mukus glikanlarının alımında rol alan genlerin ekspresyonunu artırır³. Farklı gen bölgelerini etkileme ya da ortam koşullarına göre gen ekspresyonunda değişiklik yapabilme kabiliyeti; konak ve mikrobiyota uyumu için gereklidir. Ayrıca bu özellik, normal koşullar altında konağa yerleşmesi mümkün olmayan bazı insan bağırsak mikrobiyotası üyelerinin de konağa uyumunu açıklamak için yeterlidir^{3,21}. Symbiont uyumunun genetik belirleyicileri, sekans ekleme (INSeq) kullanılarak genom büyüklüğü ölçeği ile değerlendirilebilir²². Bu yaklaşımda, hücreler rasgele yerleştirilen bir transpozon ile mutagenезe tabi tutulur ve popülasyon seçici bir koşula tabi tutulur (örneğin, steril bir fare büyümesi). Popülasyondaki her transpozonun yerleştirme konumu ve göreceli bolluğu, yüksek işleme sıralaması kullanılarak değerlendirilir ve uygunluk için gerekli genlerdeki mutantların seçimden sonra popülasyon zenginliğinde azalması beklenir. Deneysel parametrelerin değiştirilmesi (örneğin; konak hayvanın diyet, genotip veya mikrobiyotanın değiştirilmesi), hedef genler ve konak biyolojisinin farklı yönleri arasındaki spesifik ilişkileri tanımlar^{3,4,6}. Yeni çalışmalarla bu ve buna benzer konak-mikrobiyota etkileşim mekanizmaları ortaya konulduğunda, insandaki birçok hastalığın mikrobiyota ile ilişkisi de aydınlatılmış olacaktır.

Monoassosiye gnotobiyotik fareler, insan bağırsak mikroplarının in vivo kolonize olma ve rekabet etme mekanizmalarıyla ilgili bilgiler vermesinin yanı sıra, mikrobiyotaya konak tepkisinin temel ilkelelerini belirlemede önemli bir platform olarak hizmet eder. Örneğin, bir insan bağırsak mikropu olan *Bacteroides fragilis*, bir mukozal kolonize olmasına izin veren IL-10 üreten düzenleyici T hücrelerini indükler²². Bu konak-mikrobiyal etkileşimi, gnotobiyotik ve monoassosiye farelerde gözlenebildiğinden, bu etkileşimi yönlendiren spesifik bir bakteriyel simbiyoz faktörünü (yüzey polisakarit A) ve yanıtı yönlendiren konak molekülü (Toll benzeri reseptör 2) belirlemek mümkün olmuştur²³. Daha da önemlisi, gnotobiyotik farelerin bu mono-kolonizasyonları, laboratuvarında henüz kültürü yapılamayan mikroorganizmalara karşı verilen konak tepkileri bile ortaya çıkarabilir. Örneğin, fare bağırsağındaki Th17 hücrelerinin farklılaşması, ince bağırsağın epiteline yakın bir şekilde bağlanan kloroforma dirençli parçalanmış filamentöz bir bakteri (SFB) tarafından indüklenir²⁴. Bu mikrop laboratuvarında hiçbir zaman başarılı bir şekilde üretilmemesine rağmen, konvansiyonel farelerden steril alıcılara kloroformla muamele edilmiş küçük bağırsak epitel preparatlarıyla nakledilerek, gnotobiyotik farelerde saf kültürde muhafaza edilebilir³. Kültürü yapılmış ve kültürü yapılmamış/yapılamamış mikrobiyal çeşitlilik arasındaki fark, bu tip hayvan modelleriyle gösterilebilir. Bu modeller konak yanıtının immünojenik çalışmalarını için önemli bir temel sağlamış ve SFB'nin genom sekansını belirlenmesine olanak sağlamıştır²⁵

Özellikle, monoassosiyasyon modeli de reversibl kolonizasyonu içerecek şekilde genişletilmiştir³. Bu yaklaşımda, steril fareler, bakteri peptidoglikanının iki esas bileşeni olan ve fare ve diğer memelilerde bulunmayan, D-alanin ve diaminopimelik asit için oksotropik bir *E. coli* mutanıyla kolonize edilir. Bu suş, bu bileşiklerin mevcudiyetinde in vitro muhafaza edilebilmesine rağmen, steril farelerin kolonizasyonundan sonra etkili bir şekilde temizlenir ve böylece tekrar steril olurlar. Bu model bağırsak kolonizasyonu bağlamında immün belleği incelemek için kullanılmıştır.^{3,4}

Belirli mikrobiyal topluluklarda çeşitliliğin artırılması

Genom sekans ile tanımlanmış insan bağırsak simbiyonları, steril fare modellerinde orta seviyede bir çeşitlilik seviyesini temsil eder. Örneğin, insan bağırsağında bulunan iki major filumun (*Bacteroi-*

des ve *Firmicutes*), tüm insan mikrobiyotasında oluşması muhtemel eş metabolizma özelliklerini tanımlamak için steril farelerde birlikte kültürü yapılmıştır³. Basitleştirilmiş mikrobiyal topluluklar, mikrobiyal topluluk kompozisyonu, mikrobik genom içeriği ve konak diyeti arasındaki ilişkileri tanımlama girişimlerini de kolaylaştırır. Yapılan bir çalışmada, genom dizisi tanımlanmış on adet bakteriden oluşan mikrobiyotanın farklı diyet koşulları altında konak ile etkileşimi araştırılmıştır. Farklı diyet koşulları altında her bir mikrobiyotaya üyesinin miktarı matematiksel olarak hesaplanmış ve sonuç olarak bazı besin maddelerinin eksikliğinin bir kısım bakterilerin sayısında belirgin derecede azalmaya neden olduğu saptanmıştır²⁶. Önemli olan, bu modellerin, değişik gıda içerikleri ile ve kompleks gıda kombinasyonları ile doğrulanabilir olmasıdır. Her mikrobiyal topluluğun tam genom dizisi bilindiği için, miktarı, mikrobiyal topluluğun doğrudan gen içeriğini ve dağılımını (metagenome) çıkarmak için kullanılabilir ve potansiyel olarak diyet bağımlı mikrobiyal topluluğun yeniden yapılanmasına yol açan altta yatan mekanizmalar hakkında fikir sahibi olunabilir²⁶. Bu basitleştirilmiş, tanımlanmış mikrobiyal topluluklar tek tek arşivlenmiş suşlardan toplandığından, önemli suşların dışlanması sonuçları incelenebilir. Yedi türden oluşan bir mikrobiyal konsorsiyum (basitleştirilmiş insan bağırsak mikrobiyotası) dahil olmak üzere diğer bazı mikrobiyal kültür koleksiyonlarının, steril hayvanları nesiller boyunca istikrarlı bir şekilde kolonize ettiği gösterilmiştir²⁷

Bu tanımlı mikrobiyotaya çalışmaları, az sayıda türle kısıtlanmış olsa da, kişiselleştirilmiş kültür koleksiyonlarının geliştirilmesi, bu deneylerin genişletilmesi için yarar sağlayabilir²². Bu koleksiyonlarda, tek bir donör örneğinden binlerce izolat, çok kuyulu formatta canlı stoklar olarak arşivlenir. Multiplex PCR stratejisi, her kuyucuktaki izolataın 16S rRNA gen dizisinin tanımlanmasını sağlar. Bu koleksiyonlar, orijinal topluluğun filum, sınıf ve takım düzeyinin %99'unu temsil eder. Cins (genus) seviyesinde, tam kültürlenmemiş numundeki hücrelerin yaklaşık % 70'i oranında bu türden üretilmiş örnekler bulunur. Bu koleksiyonlar, tanımlanmış ve basitleştirilmiş mikrobiyal topluluklar arasındaki boşluğu kapatma çabalarına ve insan bağırsak mikrobiyotasındaki karmaşıklığı tanımlamaya yararlı bir temel sağlayabilir.

İnsan bağırsak mikrobik toplulukları

Steril fare modeli, in vivo olarak tam fraksiyone olmayan insan bağırsak mikrobiyotasının işlevini incelemek için bir ortam olarak kullanılmıştır. Bu modeli moleküler mikrobiyolojik yöntemler kullanarak test etmek için, Turnbaugh ve ark. steril farelere insan fekal numuneleri transfer ederek 16S rRNA dizilimi ile transplante edilmiş mikrobiyotayı monitörize etmişlerdir⁹. Yazarlar, transplantasyondan sonra çeşitliliğin asgari düzeyde kaybolduğunu ve verici numunede bulunan filogenetik grupların çoğunun muhafaza edildiğini göstermişlerdir. Dahası, farklı insan vericilerinden alınan mikrobiyota kompozisyonları, transplantasyondan sonra belirgin bir düzende kalmaktadır²². Bu gözlemlerin insan dışkı numuneleri ile kolonize edilmiş steril hayvanların, insan donörlerinin belirli metabolik özelliklerini sergilediği önceki raporlarla uyumlu olduğu görülmektedir³. Bu yaklaşım, insan bağırsak mikrobiyotalarının diyetteki değişime olan tepkisini araştırmak için kullanılmış ve bu mikrobiyota kompozisyonlarının, diyet değişikliğinin tek bir gününde bile değişebileceğini ortaya koymuştur⁹. Yakın zamanda, gebe ve gebe olmayan kadınların mikrobiyomlarının metabolik kapasitelerini araştırmak için yapılan bir çalışmada, üçüncü trimesterdeki kadınlardan toplanan fekal örneklerin steril farelere nakli, alıcı hayvanlarda kilo artışı ile sonuçlanmıştır Aynı kadınların üçüncü trimesterdeki toplanan fekal numuneleri nakledilen fareler, ilk üç ayda aynı kadınlardan toplanan fekal numuneleri nakledilen farelere göre daha fazla kilo almıştır. Bu durum, gebelik sırasında ortaya çıkan bağırsak mikrobiyotasının yeniden biçimlenmesinin konakta metabolik değişiklikler ve metabolik sonuçlar doğurduğunu düşündürmektedir²⁸. Bununla birlikte, bu modelin önemli bir sorunu, farklı bir konak hayvandan türetilen yabancı mikrobiyomların (örneğin, farelere verilen insan mikrobiyomları), mikrobiyotaya tüm konak yanıtını göstermemesidir. Örneğin, steril farelerin ince bağırsaklarında CD8 ve CD4 T hücre sayısı düşüktür. Bu durum tam fare mikrobiyotası kolonizasyonu ile düzeltilebilir³. Bununla birlikte, sıçanlardan veya insanlardan alınan bağırsak mikrobiyotaları, aynı genişlikte filogenetik grupları içermesine ve fare mikrobiyotası ile aynı kolonizasyon yoğunluğuna sahip olmasına rağmen, steril farelere karşı olan bağışıklık yanıtı eski haline getirmede yetersiz kalmaktadır³. Konak özgülüğün temeli ve kapsamı araştırılmaya devam etmektedir.

Sıçan ve domuz modelleri

Sıçanlar, steril durumlarda başarıyla yeniden türetilen ilk kemirgenlerdi. Sıçanlarda insan biyolojisinin birçok yönü (kardiyovasküler hastalık, toksikoloji ve davranış dahil) farelerden daha iyi modellenmiştir ve yeni teknikler sıçanlarda hedeflenmiş genetik çalışmalara da izin vermektedir²⁹. İnsan bağırsak mikrobiyotası ile steril farelerin kolonize edilmesi, bu mikrobiyotanın farelerden sıçanlara transplantasyondan sonra orijinal yapılarını ve kompozisyonlarını daha fazla muhafaza ettiğini ortaya koymaktadır. Bu da sıçanların insan bağırsak mikrobiyomu çalışmaları için üstün bir model oluşturabileceğini düşündürmektedir³⁰.

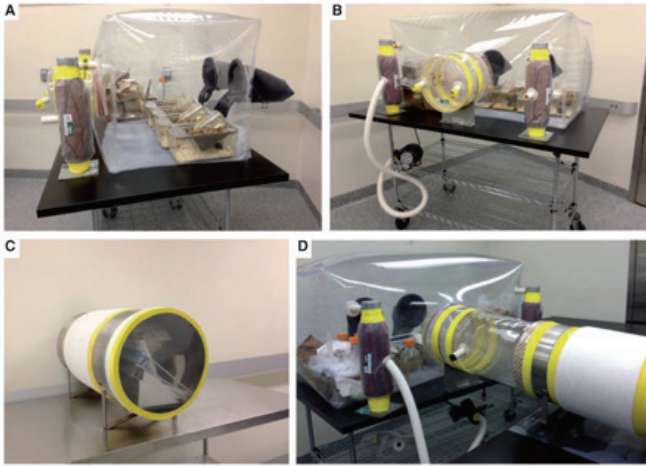
Steril farelerin, tam insan bağırsak mikrobiyotası ile kolonize edilmesi, mikrobiyotanın nakledildikten sonra sıçanlarda farelere göre orijinal yapısını ve kompozisyonunu daha fazla muhafaza ettiğini ortaya konmaktadır. Bu durum sıçanların insan bağırsak mikrobiyomu için üstün bir model sağlayabileceğini düşündürmektedir³⁰. Özellikle Firmicutes filumu sıçanlarda, Clostridia cluster IV gibi insan bağırsak filotipleri de dahil olmak üzere farelerden daha iyi temsil edilmektedir³⁰. Bununla birlikte, sıçanların artan boyutu, bu hayvanların steril beslenmesinin karmaşıklığını ve maliyetini de artırır.

Bu karmaşıklık, gnotobiyotik domuzlarla daha da artmaktadır, çünkü bu hayvanlar yetişkinliğe kadar steril halde kalamazlar/yetiştirilemezler. Bununla birlikte, gnotobiyotik izolatörler içinde sezeryan ile doğan domuz yavruları, haftalarca steril halde muhafaza edilebilir ve insan bağırsak mikrobiyotası ile kolayca kolonize edilebilir³. Domuz, insan gastrointestinal biyolojisinin birçok yönü için iyi bir model sağladığı için, bu alan olgunlaştığında insan mikrobiyotasının giderek daha önemli bir modelini temsil edebilir³¹.

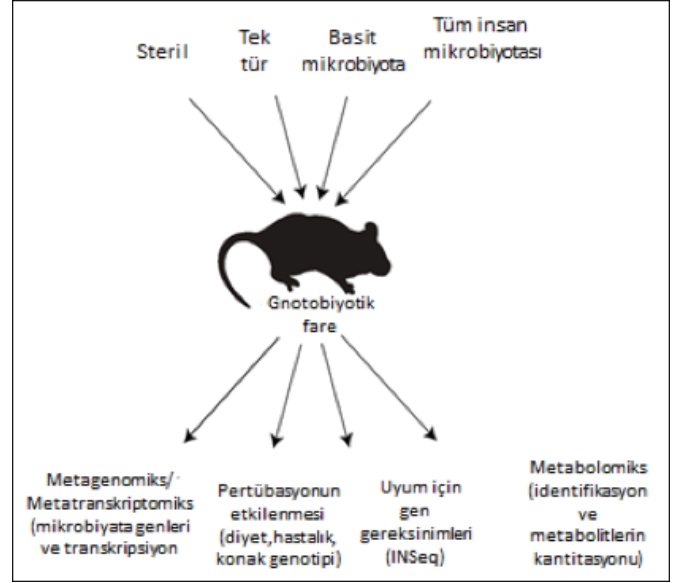
Sonuç

İnsan bağırsak mikrobiyotasını ve etkilerini incelemek amacıyla hayvan modelleri kullanımının; tekrarlanabilir olması, ölçeklendirilebilir ve izlenebilir olması, örnek alma kolaylığı, müdahale edilebilir olması gibi birçok avantajı bulunmaktadır. Böyle avantajların olmasına rağmen, steril farelere aktarılan mikrobiyotaya gerekli bağışık yanıtın az olması, bağırsak-mikrobiyom etkileşiminin hayvan modelinin kendi türüne özgü olarak yeniden şekillenmesi gibi

dezavantajları bulunmaktadır. Yeni nesil genom sekans cihazlarının gelişmesi, maliyetlerin azalması ile insan-mikrobiyota ilişkisinin karanlıkta kalan bir çok alanı aydınlığa kavuşacaktır. Mikrobiyota çalışmaları genellikle bakteriler üzerine yoğunlaşmaktadır. Bu durum; virüsler, parazitler ve mantarların da mikrobiyom üyesi olduğu düşünüldüğünde önemli bir eksiklik olarak göze çarpmaktadır. Bu açıdan hayvan modelleri kullanımı hakkında literatürde çok az sayıda yayın bulunmaktadır. Bu mikroorganizmalar üzerine de yoğunlaşılmalı, konak etkileşimi ve etkileşim mekanizmaları ortaya konmalıdır. Hayvan modelleri, tam anlamıyla insan mikrobiyotası ve etkileşimini temsil etmese de, gelecekte de mikrobiyota çalışmalarının ayrılmaz bir parçası olmaya devam edecektir.



Şekil 1. Steril hayvan yetiştirme. Esnek plastik izolatörler (a, b) steril bir çevre oluşturur. Sarf malzemeleri, bir aktarım düzeneği (d) vasıtasıyla izolatöre bağlanan otoklavlanmış bir silindir (c) vasıtasıyla taşınır.



Şekil 2. İnsan bağırsak mikrobiyomunun incelenmesi için gnotobiyotik yaklaşımlar. Gnotobiyotik teknikler, tam ya da kısmi insan bağırsak mikrobiyotasının (üstte) hassas bir konağa girmesine izin verir. Kolonizasyona mikrobik ve konakçı yanıtları, genler, transkriptler, proteinler, metabolitler ve konak tepkisi seviyesi (altta) olarak ölçülebilir (3 nolu kaynaktan alınmıştır).

Kaynaklar

1. Qin J., Li R., Raes J., Arumugam M., Burgdorf K.S., Manichanh C., et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 2010; 464, 59–65.
2. Arumugam M., Raes J., Pelletier E., Le Paslier D., Yamada T., Mende D.R., et al. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* 2011; 473, 174–80
3. Julian R. Marchesi, *The Human Microbiota and Microbiome* 2014; 124-35
4. Fredricks DN. *The Human Microbiota: How Microbial Communities Affect Health and Disease*, First Edition 2013.
5. Conrad R. et al. *The Human Microbiota: Composition, Functions, and Therapeutic Potential* *Med Sci Rev*, 2015; 2:
6. K.E. Nelson *Metagenomics of the Human Body* Springer Science+Business Media, LLC 2011
7. Smith K, McCoy KD. and Macpherson AJ. Use of axenic animals in studying the adaptation of mammals to their commensal intestinal 2007
8. Costello EK, Lauber CL, Hamady M, Fierer N, Gordon JI and Knight R. Bacterial community variation in human body habitats across space and time. *Science* 2009; 326, 1694–97.
9. Turnbaugh PJ, Ridaura VK, Faith JJ, Rey F.E., Knight R. and Gordon J.I. The effect of diet on the human gut microbiome: a metagenomic analysis in humanized gnotobiotic mice. *Science Translational Medicine* 2009; 1, 6-14.
10. Hansen E.E., Lozupone C.A., Rey F.E., Wu M., Guruge J.L., Narra A., et al. Pangenome of the dominant human gut-associated archaeon, *Methanobrevibacter smithii*, studied in twins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2011;108-1, 4599–06
11. Dethlefsen L., Huse S., Sogin M.L. and Relman D.A. The pervasive effects of an antibiotic on the human gut microbiota, as revealed by deep 16S rRNA sequencing. *PLoS Biology* 2008, 6, 280.
12. Wu G.D., Chen J., Hoffmann C., Bittinger K., Chen Y.Y., Keilbaugh S.A., et al. (2011) Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science* 2011 334, 105–08
13. Fraune S. and Bosch T.C. Long-term maintenance of species-specific bacterial microbiota in the basal metazoan Hydra. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2007;104, 13146–151.
14. Woyke T., Teeling H., Ivanova N.N., Huntemann M., Richter M., Gloeckner F.O., et al. Symbiosis insights through metagenomic analysis of a microbial consortium. *Nature* 2006; 443, 950–55.
15. Wong C.N., Ng P. and Douglas A.E. Lowdiversity bacterial community in the gut of the fruitfly *Drosophila melanogaster*. *Environmental Microbiology* 2011;13, 1889–00
16. Shin S.C., Kim S.H., You H., Kim B., Kim A.C., Lee K.A., et al. *Drosophila* microbiome modulates host developmental and metabolic homeostasis via insulin signaling. *Science* 2011; 334, 670–74.
17. Sharon G., Segal D., Ringo J.M., Hefetz A., Zilber-Rosenberg I. and Rosenberg E. Commensal bacteria play a role in mating preference of *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2010; 107, 20051–56.
18. Rawls J.F., Mahowald M.A., Ley R.E. and Gordon J.I. Reciprocal gut microbiota transplants from zebrafish and mice to germ-free recipients reveal host habitat selection. *Cell* 2006; 127, 423–33.
19. Ley R.E., Hamady M., Lozupone C., Turnbaugh P.J., Ramey R.R., Bircher J.S., et al. Evolution of mammals and their gut microbes. *Science* 2008; 320, 1647–51
20. Faith J.J., Rey F.E., O'Donnell D., Karlsson M., McNulty N.P., Kallstrom G., et al. Creating and characterizing communities of human gut microbes in gnotobiotic mice. *The ISME Journal* 2010; 4, 1094–98.
21. Martens E.C., Chiang H.C. and Gordon J.I. Mucosal glycan foraging enhances fitness and transmission of a saccharolytic human gut bacterial symbiont. *Cell Host and Microbe* 2008;4, 447–57.
22. Goodman A.L., Kallstrom G., Faith J.J., Reyes A., Moore A., Dantas G., et al. Extensive personal human gut microbiota culture collections characterized and manipulated in gnotobiotic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2011; 108, 6252–57
23. Round J.L. and Mazmanian S.K. Inducible Foxp3+ regulatory T-cell development by a commensal bacterium of the intestinal microbiota. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2010;107, 12204–09.
24. Gaboriau-Routhiau V., Rakotobe S., Lecuyer E., Mulder I., Lan A., Bridonneau C., et al. The key role of segmented filamentous bacteria in the coordinated maturation of gut helper T cell responses. *Immunity* 2009; 31, 677–89.
25. Kuwahara T., Ogura Y., Oshima K., Kurokawa K., Ooka T., Hirakawa H., et al. The lifestyle of the segmented filamentous bacterium: a nonculturable gut-associated immunostimulating microbe inferred by whole-genome sequencing. *DNA Research* 2011; 18, 291–03.
26. Faith J.J., McNulty N.P., Rey F.E. and Gordon J.I. Predicting a human gut microbiota's response to diet in gnotobiotic mice. *Science* 2011; 333, 101–04.
27. Becker N., Kunath J., Loh G. and Blaut M. Human intestinal microbiota: characterization of a simplified and stable gnotobiotic rat model. *Gut Microbes* 2011; 2, 25–33
28. Koren O., Goodrich J.K., Cullender T.C., Spor A., Laitinen K., Backhed H.K., et al. Host remodeling of the gut microbiome and metabolic changes during pregnancy. *Cell* 2012; 150, 470–80,
29. Zheng S., Gekhman K., Shenoy S. and Li C. Retake the center stage – new development of rat genetics. *Journal of Genetics and Genomics* 2012; 39, 261–68
30. Wos-Oxley M., Bleich A., Oxley A.P., Kahl S., Janus L.M., Smoczek A., et al. Comparative evaluation of establishing a human gut microbial community within rodent models. *Gut Microbes* 2012; 3, 234–49.
31. Litten-Brown J.C., Corson A.M. and Clarke L. Porcine models for the metabolic syndrome, digestive and bone disorders: a general overview. *Animal* 2010; 4, 899–20.