



T.C.

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**AKSOLOTL KOL REJENERASYONUNDA FUNGUS VE
BAKTERİ PROFİLLERİNİN BOYLAMSAL DEĞİŞİMLERİNİN
İNCELENMESİ**

KEVSER HANNE ALTIN

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Prof. Dr. SÜLEYMAN YILDIRIM

İSTANBUL-2019

TEŞEKKÜR

Eğitim hayatım boyunca maddi manevi bütün desteğini eksik etmeyen sevgili babam Mehmet ALTIN'a ve sevgili annem Sultan KORKMAZ'a,

Yüksek lisans eğitim sürecinde bilgisinden ve deneyiminden faydalandığımız sayın danışmanım Prof. Dr. Süleyman YILDIRIM'a,

Tez dönemimde bilgisini ve fikrini eksik etmeyen sayın hocam Dr. Öğr. Üyesi Turan DEMİRCAN'a,

Yüksek lisans sürecim boyunca manevi desteklerini eksik etmeyen sevgili hocalarım Dr. Öğr. Üyesi Özlem GÜVEN hocam ve Dr. Öğr. Üyesi Deniz DURALI hocama,

İki yılda birlikte çalıştığım zor zamanlarımda yardımcı olan çalışma arkadaşlarım Damla Nur KORKMAZ'a, Oğuzhan KÖSE'ye, Arzuhan KOÇ'a ve Fatma KOÇ'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY FORMU.....	i
BEYAN.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
KISALTMALAR LİSTESİ.....	vi
TABLOLAR LİSTESİ.....	vii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	viii
ÖZET.....	1
1. ABSTRACT.....	2
2. GİRİŞ VE AMAÇ.....	3
4. GENEL BİLGİLER.....	6
4.1. Aksolotlardaki Uzun Rejenerasyon Mekanizmasının Aşamaları.....	6
4.2. Yara Kapanması ve Blastema Oluşumu.....	7
4.3. Blastema Oluşumunda Sinirlerin Önemi.....	8
4.4. Rejenerasyonun Tamamlanmasında Pozisyonel Bilginin Önemi.....	10
4.5. Mikrobiyota.....	16
4.5.1. Mikobiyom.....	17
4.6. Mikrobiyota ve MikobiyomKompozisyon Analizinde Kullanılan Araçlar.....	18
4.6.1. Yeni Nesil Dizinleme Teknolojisi.....	18
4.6.1.2. 16S rRNA Dizinleme Tekniği.....	19
4.6.1.3. ITS Dizinleme Tekniği.....	19
4.7. Mikrobiyota Rejenerasyon İlişkisi.....	21
4.8. Aksolotl Kol Rejenerasyonundaki Bakteri Mikrobiyota Profili.....	24
5. MATERYAL VE METOT.....	28
5.1. Etik Beyan.....	28
5.2. Hayvan Bakımı.....	28
5.3. Hayvan Seçimi ve Deney Dizaynı.....	28
5.4. Biyolojik Replika Oluşturma.....	29
5.5. Kullanılan Laboratuvar Malzemeleri.....	30
5.5.2. ITSPrimer sentezi.....	31
5.6. Anestezi.....	32

5.7. Ampütasyon ve Örneklerin Toplanması	32
5.8. Genomik DNA İzolasyonu	34
5.9. DNA'nın Analizi ve Konsantrasyon Ölçümü	36
5.10. Sekanslama İşlemi, Kümeleme ve Taksonomik Sınıflandırma	37
5.10.1. DNA'nın Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile Çoğaltılması	37
5.10.2. Kütüphanenin Denatürasyonu ve MiSeq Cihazına Yüklenmesi	39
5.10.3. Kümeleme ve Taksonomik Sınıflandırma	40
5.10.4. Topluluk Yapılarının ve Çeşitliliğinin Çok Değişkenli Analizi	41
6. BULGULAR	42
6.1. Biyoinformatik Analiz Verileri	42
6.1.2. Taksonomik Çeşitlilik	43
6.2. Alfa Çeşitlilik Analizi	55
6.3. Beta Çeşitlilik Analizi	58
6.4. Fungus ve Bakteri Profili Korelasyon Analizi	60
7. TARTIŞMA	65
8.SONUÇ	68
9.KAYNAKLAR	69
10.ETİK KURUL ONAYI	82
11. ÖZGEÇMİŞ	84

KISALTMALAR LİSTESİ

FGF : Fibroblastbüyüme faktörü

AEC : Apikalepidermal şapka

nAG : Anteriyorgradient proteini

HoxA : Homeobox geni

RAR- γ 2 : Retionik asit reseptör gama 2

EB : Erken Blastema

LB : Geç Blastema

Tbx5 : T box transkripsiyon faktörü

HMP : İnsan mikrobiyota projesi

ITS : İnternal ara bölgeleri

rRNA : Ribozomal ribonükleik asit

PZR: Polimer zincir reaksiyonu

NGS: Yeni nesil dizinleme

OTU : Operasyonel taksonomik birim

LAB: (laktik asit üreten Bakteriler)

PBS : (Fosfat tamponlu tuz çözeltisi)

T4 : (Tiroksin)

TABLULAR LİSTESİ

Tablo 5.5.1.:Deneyde kullanılan Sarflar.....**39**

Tablo 5.10.1.: PZR reaksiyonu.....**47**



ŞEKİLLER LİSTESİ

- Şekil 4.1.1.** (A) Aksolotl uzuvun da blastema oluşum ve gelişim safhaları. Soldan sağa doğru 1. gün, 7.gün, 9.gün, 11.gün, 13.gün, 15.gün, 17.gün, 21.gün, 25.gün ve 31.gün sonunda görülen blastema gelişimi şekilde gösterilmektedir. (B) Rejenerasyon mekanizması süreci boyunca rol alan hücre tipleri gösterilmektedir. Ampütasyon sonrası birkaç saat içinde, yara epiteli uzuvun kesilmiş kenarını kaplar. Birkaç gün sonrasında bu yara epiteli, nöronlarla etkileşime geçerek Apikal-epite kap (AEC) 'i oluşturur. AEC, ampütasyon sonrası uzuv da kalan dokudaki hücreleri uyararak onların farklılaşmasını sağlar. Hücreler AEC'nin altında birikerek çoğalmaya ve farklılaşmaya devam ederler [6]. **7**
- Şekil 4.4.1** Blastemadaki pozisyonel bilgilerin sıtabilizasyonu sinir sinyallerinin kontrolü ile sağlanır. (A-F) solda bulunan resimler; greft dokunun alındığı organizma), sağda doku nakli ile aşılansmış hücrelerin 1 ve 3 hafta sonra canlı görüntülerini gösteren ve en sağda, farklı blastema dokuları aşılansığında ektopik büyüme tepkisini özetlemek için bütün montaj iskelet boyaması gösterilmektedir. (A) posterior cilt anterior yerleşimli bir yara bölgesine sapmış bir sinirle aşılansdığı zaman deri modelinde ektopik uzuvların oluşumu gözlenmektedir. (B-C) Erken blastemanın (EB) greftleri, deri modeline aşılansdığı zaman ektopik uzuv oluşumu tetiklemediği; bununla birlikte,3.günün sonunda sinirlerinden arındırılmış erken blastemanın aşılansması ile segmentli ancak eksik bir rejenere oluşumu gözlenmektedir. (D) Geç blastemanın (LB) apikal ucunun greftleri ektopik uzuv oluşumunu tetiklemediği gözlenmektedir. (E) Denerve EB de gözlenen sonuca benzer şekilde, denerve apikal-LB'ler segmentli ancak eksik rejenere oluşumunu indüklediği gözlenmektedir. (F) LB'nin bazal bölgesinden alınan dokunun nakli sonucunda tam desenli anterior / posterior ve dorsal / ventral yapılarla uzuv rejenere oluşumu gözlenmektedir [16]. **14**
- Şekil 4.6.1** Pembe alanlar 16S rRNA geninde ki hiperdeğişken bölgeleri göstermektedir. Hiperdeğişkenler arasında bulunan bölgeler korunmuş bölgelerdir [116]. **19**
- Şekil 4.6.2** Fungal ribozomal gen kümeleri ve özel primerlerin bağlandığı primer dizileri gösterilmiştir [103]. **20**
- Şekil 4.8.1** Aksolotl rejenerasyonu sürecinde Beta çeşitlilik analizi [138] **25**
- Şekil 4.8.2** Aksolotl rejenerasyon sürecinde beta çeşitlilik analizine göre bakteri mikrobiyotasının hiyerarşik kümeleşmesi [138]..... **26**
- Şekil 4.8.3** Blastema öncesi ve blastema oluşum sürecinde günlere bağlı örneklerin biyolojik replikalarının filum düzeyinde taksonomik çeşitliliği [138] **27**
- Şekil 5.3.1** Ampütasyon sonrası kesilen bölgeden alınan örnek (Dpa0), ampütasyon sonrası (dpa1) 1.gün de alınan örnek, 4.gün (dpa4), 7.gün (dpa7), 30.gün (dpa30) ve 60.gün (dpa60) de alınan örneklerin biyolojik replikaları ile gösterimi. **29**
- Şekil 5.3.2.**Method işleyiş sırası **33**
- Şekil 6.1.**Miseq cihazına yüklenen örneklerden elde edilen ITS dizin sayısı tablosu. **42**

Şekil 6.2. Gruplara ait taksonomik filum grafiği	43
Şekil 6.3. Blastema öncesi ve blastema oluşum sürecinde günlere bağlı örneklerin biyolojik replikalarının filum düzeyinde ısı haritası.	44
Şekil 6.4. Gruplara ait taksonomik familya grafiği	45
Şekil 6.5. Blastema öncesi ve blastema oluşum sürecinde günlere bağlı örneklerin biyolojik replikalarının familya düzeyinde ısı haritası.....	47
Şekil 6.6. Gruplara ait taksonomik cins grafiği.	48
Şekil 6.7. Blastema öncesi ve blastema oluşum sürecinde günlere bağlı örneklerin biyolojik replikalarının cins düzeyinde ısı haritası	50
Şekil 6.8. Blastema öncesi ve blastema oluşum sürecinde günlere bağlı örneklerin biyolojik replikalarının tür düzeyinde ısı haritası	52
Şekil 6.9. Blastema oluşumu sürecinde deney gruplarında baskın olan fungus cinsleri.	54
Şekil 6.10. Günlere ait Alfa çeşitlilik analiz grafiği.	55
Şekil 6.11. Chao1 indeksiyle hesaplanan çeşitlilik analiz grafiği.....	56
Şekil 6.12. Shannon indeksi ile elde edilen alfa çeşitlilik analiz grafiği	57
Şekil 6.13. Bray-Curtis indeksi, gruplar arası mikobiyal topluluk farklılıklarının gösterildiği beta çeşitlilik grafiği	58
Şekil 6.14. Blastema öncesi ve blastema oluşum sürecindeki örneklerin Beta çeşitlilik PcoA plot indeksi ile gösterimi.	59
Şekil 6.15. Jaccard indeksi, gruplar arası mikobiyal topluluğu farklılıklarının gösterildiği beta çeşitlilik grafiği.	60
Şekil 6.16. Filum düzeyinde Bakteri ve Fungus korelasyon analizi.....	62

ÖZET

AKSOLOT KOL REJENERASYONUNDA FUNGUS VE BAKTERİ PROFİLLERİNİN BOYLAMSAL DEĞİŞİMLERİNİN İNCELENMESİ

Amfibiler sınıfında bulunan omurgalılar rejenerasyon mekanizmasına sahiptirler. Fakat amfibilerden urodole grubunda semender ailesinde yer alan aksolotlar, amfibi sınıfında ki diğer omurgalı canlılar arasında yüksek rejenerasyon kapasitesine sahip olan tek canlıdır. Günümüzde yapılan araştırmalarla, Aksolotlardaki bu yüksek rejenerasyon mekanizması derinlemesine araştırılıp, gözlemledikleri mekanizmayı memelilerdeki rejenerasyon mekanizmasıyla bağdaştırıp, gelecekte buldukları verilerle insanlardaki uzuv hasarını azaltmayı hedeflemişlerdir. Rejenerasyon mekanizmasını anlama adına birçok araştırma yapılmasına rağmen, günümüzde araştırmacıların odak noktası olan mikrobiyotaya ile kaynak yeteri kadar yoktur. Mikrobiyota konak ile birlikte yaşayan, çeşitli mekanizmalarla konak ile etkileşim halinde olan fungus, protozoa, virüs ve bakteri türlerini içeren kommensal mikroorganizma topluluğudur. Yapılan araştırmalar sonucu, aksolotl uzuv rejenerasyon sürecinde baskın olarak *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria* ve *Verrucomicrobia* bakteri filum profili gözlenmektedir. Ampütasyon sonrası uzuv rejenrasyon sürecinde ki fungal mikrobiyota topluluk profili halen bilinmemektedir. Bu nedenle, bu çalışmada ampütasyon sonrası, blastema öncesi sürecinden blastema oluşumu evresinin sonlarına kadar görülen mikobiyom topluluğu internal ara bölge (ITS) dizinleme yöntemiyle analiz edildi. Çıkan sonuçlara göre deney gruplarından elde edilen fungal topluluklar üç ana filum olan *Ascomycota*, *Basidiomycota* ve *Zygomcyota* gözlendi.

Anahtar Kelimeler: Blastema, ITS, 16S rRNA, Mikobiyom, Mikrobiyota

1. ABSTRACT

INVESTIGATION OF LONGITARY CHANGES OF FUNGUS AND BACTERIA PROFILES IN AXOLOTL ARM REGENERATION

Vertebrates in the class of amphibians have a regeneration mechanism. Axolotls in the urodole group have high regeneration capacity among other vertebrates in the amphibian class. This high regeneration mechanism has been investigated. Researchers aimed to reduce limb damage in humans by using this mechanism. Although a lot of research has been done to understand the regeneration mechanism, there is not enough resource with microbiota. Microbiota is a community of commensal microorganisms, including fungi, protozoa, viruses and bacteria that live with the host and interact with the host through various mechanisms. Although the profile of bacterial microbiota on axolotl's limb during regeneration has been investigated, composition of fungal microbiota on regeneration is still unknown. As a result of research, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria* and *Verrucomicrobia* bacterial phylum profile are observed predominantly during axolotl limb regeneration process. In this research, after limb amputation samples are taken from pre-blastema and during blastema formation process. Community of mycobioma is analyzed by ITS sequencing method. According to the results, three main phyla *Ascomycota*, *Basidiomycota* and *Zygomycota* were observed.

Key Words: Blastema, ITS sequencing, 16S rRNA, Mycobiome, Microbiota

2. GİRİŞ VE AMAÇ

Amfibiler soğukkanlı omurgalıdır, yaşamlarının bir kısmını suda bir kısmını ise karada geçirirler. Bu sınıfta bulunan omurgalılar rejenerasyon mekanizmasına sahiptirler. Fakat amfibilerden urodole grubunda semender ailesinde yer alan aksolotlar, amfibi sınıfında ki diğer omurgalı canlılar arasında yüksek rejenerasyon kapasitesine sahip olan tek canlıdır. Aksolotl (*Ambystoma mexicanum*) hayatları boyunca kaybettiği dokularını ve uzuvlarını bu mekanizma ile geri kazanırlar [1]. Bu özelliklerinden dolayı birçok araştırmacı, diğer amfibilerde sınırlı rejenerasyon mekanizması olmasına rağmen aksolotlarda neden yüksek rejenerasyon mekanizmasının olma sebebini anlamaya dayalı farklı alanlarda araştırmalar yapmaktadır. Bir araştırmada, aksolotlların metamorfoz evresini tamamlamadan, hücrelerinin embriyonik halde ki gibi kalmasından dolayı yüksek rejenerasyon kapasitesini tetiklediği vurgulandı [2]. Bu hipotezi destekleyen başka bir araştırmada ise, Afrika pençeli kurbağasının larva evresinde sahip olduğu rejenerasyon özelliğinin metamorfoz evresine girdiğinde kaybettiği gözlendi [3].

Aksolotllarda bulunan yüksek rejenerasyon kapasitesini anlamaya dayalı başka bir hipotez ise Urodele sınıfında bulunan omurgalıların daha ilkel edinsel immün sistemlerinin olmasından kaynaklı olan zayıf inflamatuvar yanıtının yüksek rejenerasyon mekanizmasının oluşumunda rol aldığını gözlemlendi [4]. Bu hipoteze dayalı olarak etkisi tetrapod türlerinde ki azaltılmış immün yanıtının tutarlı olarak rejenerasyon kapasitesini artırdığı anlaşıldı [5].

Yukarıda bahsedildiği gibi, aksolotlar uzuvlarını, gözlerinin bir kısmını, beyinlerini ve iç organlarını yenileme özelliğine sahiptir. Vücudunun birçok kısmını yenilemesine rağmen araştırmacılar, genellikle uzuv rejenerasyonu üzerine odaklanmış ve rejenerasyon sırasındaki blastema oluşumunu anlamaya çalışmaktadırlar [6]. Blastema oluşumu, başarılı bir rejenerasyon için en kritik aşamadır [7]. Bu kritik aşamayı uyaran bir takım sinyaller gözlenmektedir. Blastemayı uyaran ana mekanizmalardan biri bağ doku hücreleridir. Bu hücreler kök hücre özelliği taşıyarak farklı hücre gruplarına dönüşebilirler. Ayrıca amputasyon

sonrası yeterli miktarda sinir hücrelerinin ve yara epitel hücrelerinin varlığı blastema oluşumu için gereklidir [8], [9].

Aksolot rejenerasyonu sırasındaki gen aktiviteleri, öncül hücreleri ve dokular arası etkileşimi, farelerde parmak uçlarında görünen rejenerasyon mekanizmasında gerçekleşen olaylarla benzer olduğu gözlemlendi [75], [76]. Bu benzerlikler sebebiyle araştırmacılar aksolotlardaki uzuv rejenerasyonunu derinlemesine araştırıp, gözlemledikleri mekanizmayı memelilerdeki rejenerasyon mekanizmasıyla bağdaştırıp, gelecekte buldukları verilerle insanlardaki uzuv hasarını azaltmayı hedeflemiştirler [77]. Rejenerasyon mekanizmasını anlama adına birçok araştırma yapılmasına rağmen, günümüzde araştırmacıların odak noktası olan mikrobiyotaya ile kaynak yeteri kadar yoktur.

Mikrobiyota konak ile birlikte yaşayan, çeşitli mekanizmalarla konak ile etkileşim halinde olan fungus, protozoa, virüs ve bakteri türlerini içeren kommensal mikroorganizma topluluğudur [78]. Mikrobiyotanın konakla olan ilişkisini incelemek için yapılan birçok araştırmaya göre, kommensal mikroorganizmaların hastalık anındaki tür çeşitliliği ve miktarı sağlıklı bireylerde bulunan tür çeşitliliği ve yoğunluğu bakımından farklı olduğu gözlenmektedir. Bu araştırmalardan yola çıkılarak, mikrobiyotanın konak sağlığı üzerine önemli bir rolü olduğu ve konak içerisindeki hayati mekanizmaların çoğunda rol aldığı gözlenmektedir [79]. Aksolot uzuv rejenerasyon süreci boyunca mikrobiyotanın önemini anlatan araştırmaya göre tiroid hormonu ile indüklenerek metamorfoz geçiren aksolotl'tan ve neotenik aksolotl'tan toplanan deri, mide, bağırsak ve dışkı örneklerinden yapılan analiz sonucunda, iki evrede birbirinden farklı mikrobiyal toplulukların çeşitliliği gözlenmektedir [80].

Tezin amacı tek tip besinle beslenen bakımı yapılan aksolotllarda, amputasyon sonrası kol rejenerasyon süreci boyunca; blastema oluşumu başlangıcında, erken blastema oluşumunda, geç blastema oluşumunda alınan deri örneklerinden ve akvaryum suyundan alınan örneklerle yapılan analizler sonucunda;

- Aksolotl uzuv rejenerasyon sürecinde fungus mikrobiyotaya profil çeşitliliğini gözlemlemek

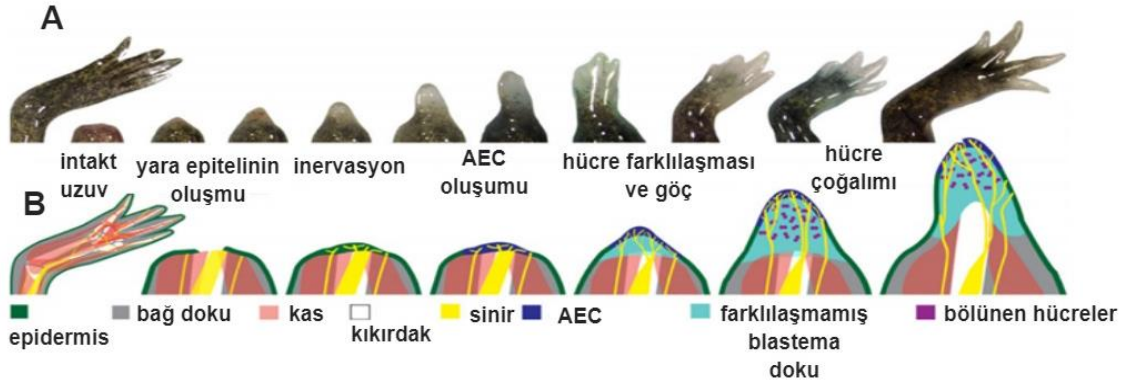
- Başka araştırmalar sonucu, aksolotl uzuv rejenerasyon s¼recinde bulunan bakteri mikrobiyota topluluğun değişimini incelemek.



4. GENEL BİLGİLER

4.1.Aksolotlardaki Uzun Rejenerasyon Mekanizmasının Aşamaları

Yaralanan uzuvda veya organda blastema oluşumundan önce yara iyileşimi gerçekleşir [10] [17]. Aksolotlarda ki rejenerasyona bağlı yara iyileşimi memelilerdeki normal yara iyileşiminden farklıdır. Memelilerde yara iyileşiminde görev alan hücreler ve sinyaller bir araya gelerek skar dokuyu oluştururken, aksolotlardaki hücreler ve sinyaller normal deri yapısını yenilediği gözlenmektedir [11], [12], [17]. Aksolottaki fibrozis transituvarıdır. Fibrozis sonrası fibrotik dokularda yeniden oluşum gerçekleşir. Bu oluşum sonrası normal deri yapısında onarım gözlenmektedir [13], [14]. Aksolotlardaki rejenerasyon sinir hücrelerin sinyallerine bağlıdır. Hasar sonucu kaybedilen sinir hücrelerinin yokluğunda sinyal eksikliğinden dolayı oluşan yaraya benzeyen bağ dokunun ve epitel eklentilerin rejenerasyonu gözlenmektedir [15], [16]. Memelilerdeki yara dokusu oluşumunun en önemli sebebi istikrarlı üretilen aşırı fibrotik dokudur. Bu sebeple memelilerde rejenerasyon gözlenmemektedir. Rejenerasyon öncesi yara iyileşimi rejenerasyon mekanizmasının uyarılması için önemli bir faktör olmasına rağmen tek başına blastema oluşumu için yeterli değildir [6].



Şekil 4.1.1. (A) Aksolotl uzuvun da blastema oluşum ve gelişim safhaları. Soldan sağa doğru 1. gün, 7.gün, 9.gün, 11.gün, 13.gün, 15.gün, 17.gün, 21.gün, 25.gün ve 31.gün sonunda görülen blastema gelişimi şekilde gösterilmektedir. (B) Rejenerasyon mekanizması süreci boyunca rol alan hücre tipleri gösterilmektedir. Ampütasyon sonrası birkaç saat içinde, yara epiteli uzuvun kesilmiş kenarını kaplar. Birkaç gün sonrasında bu yara epiteli, nöronlarla etkileşime geçerek Apikal-epite kap (AEC) 'i oluşturur. AEC, ampütasyon sonrası uzuv da kalan dokudaki hücreleri uyararak onların farklılaşmasını sağlar. Hücreler AEC'nin altında birikerek çoğalmaya ve farklılaşmaya devam ederler [6].

Blastemayı oluşumunu uyaran diğer mekanizmaları keşfetmek adına yapılan araştırmalarda, blastema oluşumu ve rejenerasyonun devamlılığı için sinir hücreleri tarafından üretilen sinyallerin belirli bir eşik düzeyinde olması gerektiği gözlemlendi. Eğer yeterli miktarda sinyal üretilmezse, yara dokusunun oluşumu gözlenmektedir [17]. Bu araştırma sonucunda araştırmacılar blastema oluşumu için; eşik düzeyinde üretilen sinir hücresi sinyalleri, yara epitel hücrelerinin varlığı, dermal hücrelerinin ve hücre dışı matriks varlığının önem taşıdığı gözlemlendi [17], [15], [16].

4.2.Yara Kapanması ve Blastema Oluşumu

Ampütasyon sonrası blastema oluşumundan önce ampüte edilen uzuvda yara iyileşmesi görülmektedir. Hasar sonrası yara çevresinde bulunan keratinositler yara yüzeyine doğru birbirlerini ittirerek hızlı bir şekilde yarayı kapatırlar [18]. Birkaç gün sonra, ampüte olan uzuvda kalan dokular ve yara epiteli blastema hücrelerinin çoğalmasını başlatırlar. Yara epiteli hücreleri sinir sinyalleri yardımıyla apikal epidermal şapkeyi (AEC) oluşumunu uyarırlar [19]. AEC oluşumu bölgede bulunan basal keratinositlere non-proliferatif özelliği kazandırır. Basal keratinositler

gönderdikleri özel sinyaller ile bağ dokudaki fibroblastların rekrutmanını sağlarlar [6]. Bağ dokudaki fibroblastlar farklılaşarak mesenchymal hücrelerine dönüşürler ve blastema oluşumunu başlatırlar [26], [27], [16], [29]. Hücrelerin farklılaşması organizmanın gelişmesinde katkıda bulunan sinyal yollarını tekrar aktifleştirir [27], [29].

Ampüte olan uzuvda kalan dokudaki hücrelerde blastema oluşumunda etkilidir. Bu hücreler blastema oluşumundan önce, gen ekspresyonuna uğrayarak yara merkezine doğru göç ederler [10], [17], [20], [21]. Uzuvda kalan doku hücrelerinin harekete geçmesi görülen hasarın derecesine bağlıdır. Ampüte edilen uzuvda görülen hasar büyük olduğu için uzuvda kalan doku hücrelerinde, hasara karşı farklı yanıtlar görülür. Memelilerdeki hasar sonrası kalan doku hücrelerinin hasara karşı gösterdiği yanıtlardan farklı olarak, aksolotlarda inflamasyon ve nekrozis görülür. Uzuvda kalan doku hücrelerinin oluşturduğu yanıtlar, blastema oluşumu uyarmak için yeterli olmamasına rağmen gereklidir [6]. Bu yanıtların önemini anlamak için örnek verecek olursak, eğer makrofajdan gelen inflamatuvar sinyalleri engellenirse dolaylı olarak uzuv rejenerasyonunun da engellendiği gözlenildi [23]. Hasar oluştuktan hemen sonra sinir hücreleri ve inflamatuvar hücreleri tarafından gönderilen erken yanıtlar, yara epitelyum hücrelerinin veya amputasyon sonrası uzuvda kalan doku hücrelerinin aktifleşmesini sağlamaktadır. Yanıtlar ve sinyalleri rejenerasyon mekanizmasındaki blastema oluşumunu tetikler [17].

4.3.Blastema Oluşumunda Sinirlerin Önemi

Yukarıda bahsettiğimiz üzere blastema oluşumunu uyarılması ve rejenerasyonun devamı için belirli bir eşik sinyalinin sinir hücreleri tarafından gönderilmesi gereklidir. Yapılan in vitro çalışmalarında, hasara uğrayan dokudaki sinirin ektopik blastema formasyonunu sağladığı gözlenmektedir [24]. Sinir hücrelerinden gönderilen sinyallerin yeterli olmaması durumunda blastema oluşumu gözlenmemektedir. Bu eşik miktarı sadece blastema oluşumu içinde değil aynı zamanda büyüme ve blastemanın gelişimi içinde gereklidir [25]. Rejenerasyonun başlaması için sinyal gönderecek olan sinir hücrelerinin tipinden çok miktarı

önemlidir. Ancak istenen eşik değerine ulaşıldığı takdirde yara epitel hücreleri ile etkileşime girerek AEC oluşumunu ve yara iyileşmesini sağlayarak rejenerasyon mekanizmasını aktif hale getirirler [6].

Blastema oluşumu ve rejenerasyonun devamlılığı için birden fazla nörotrofik faktör gözlenmektedir. Bu faktörlere örnek verirsek; nöropeptidler, organik moleküller, cyclic nükleotitler, büyüme faktörleri ve biyo-elektirik sinyallerdir [32], [33], [34], [35], [36]. Sinyal gönderilen yolaklar hücrelerin göçünü, çoğalmasını ve blastema oluşumunda görev alan hücrelerin farklılaşmasını sağlayarak uzuv gelişimini kontrol eder. İnsanlarda bulunan fibroblast büyüme faktörü (FGF) sinyali uzuv gelişimi ve rejenerasyonu için önemlidir. FGFs sinir hücre sinyalleri ile bağlantılı olup apikal blastema içerisinde eksprese olurlar [37], [38], [39]. Hasar anında sinir hücreleri Keratinoksit büyüme faktörü (FGF7) ekspresyonu uyarırlar [40]. Yapılan araştırmalar sonucu insan büyüme faktörleri (FGSs) aksolotlardaki rejenerasyonu tetiklediği kanıtlanmıştır [42]. FGFs ile rejenerasyon mekanizması arasındaki ilişki insan-aksolot arasında kritik bir bağ oluşturmaktadır. Başka bir sinyal molekülü, semender anteriorgradient (nAG) protein Schwann sinir hücreleri ile etkileşime girerek deri glandları ile birlikte eksprese olarak rejenerasyonu başlatırlar [41].

Hasar sonrası sinir hücreleri devamlı bir şekilde kendilerini rejenere ederek yara epiteline ve AEC ile birleşirler. Bu işlem sırasında sinirler ve yara epiteli/AEC arasındaki sinyal yolaklarında geri dönüşümlü bir döngü vardır [43]. Yakın zamanda yapılan bir araştırmada, blastema hücrelerinden gönderilen sinyaller sinir hücrelerinin devamlı olarak yenilediği gözlenmektedir. Blastema hücrelerinden gönderilen bu tanımlanmış çoklu sinyal yolakları insanlarda ve aksolotlarda korunmuş bir bağ oluşturur [44]. Aksolotlarda hasar sonrası yara iyileşimindeki nöro-epitel etkileşimi amputasyon sonrası kalan uzuvdaki dokuda ve yara çevresindeki alt deride bağ doku hücrelerinin bir araya gelerek erken blastemayı oluşturduğu gözlemlendi [10], [26], [17], [45], [29]. Erken blastema oluşumundan sonra yara bölgesine hücre göçü birkaç günlüğüne ertelenir. Bu ertelenmenin sebebi yara bölgesinde var olan mezoderm dokunun etrafını saran hücre dışı matriksin yoğunluğunun azalması içindir [46].sinir hücrelerinin yara epiteli ve AEC ile etkileşimi sonrası lokal sinyaller aktif hale gelerek hücre göçlerini kontrol eder aynı

zamanda sınırların ve yara epitel/AEC hücrelerinin blastema oluşumunun olduğu bölge üzerinde yeniden konumlanacağı yerleri belirler [47], [48]. Sınır, yaraepitel ve AEC hücrelerinin birlikte gönderdikleri erken rejenerasyon sinyalleri sonucu blastema hücreleri AEC nin merkezine doğru göç eder [49]. Kas kök hücreleri (satellite hücreleri) amputasyon sonrası aktif hale gelerek kısa sürede çoğalmaya başlamasına rağmen bağ doku hücreleri (blastemaprogenitor hücreleri) tarafından başlatılan toplanma ve hücre bölünmelerine katılmaz [50]. Amputasyondan günler sonra kas kök hücreleri yara merkezine göç ederler ve bağ doku hücre bölünmesine katılırlar [10]. Bu araştırma sonucu kas kök hücrelerinin blastema oluşumunu uyarmada görev yapmadığı gözlemlendi. Blastema oluşumundan sonra satellite hücreler aktif hale gelip çoğalırlar. Çoğalan kas kök hücreleri blastemanın merkezine göç ederek amputasyon sonucu kaybedilen ve zarar gören kas dokuyu yenilediği gözlenmektedir [51], [52], [50]. Bazı semender türlerinde kas doku rejenerasyonu var olan miyotüplerin farklılaşması ve bölünmesiyle gerçekleşirken [53], [54] aksolotlarda bu tür rejenerasyon görülmez [54]. Sonuç olarak aksolotlardaki kas doku rejenerasyonu diğer omurgalılardan farklılığı ile ortaya çıkmaktadır.

Blastema oluşumu için gerekli başka bir mekanizma hücrelerel farklılaşmadır. Hücreler tekrardan programlanarak embriyonik hücrelere benzerler [55], [40]. Bu süreçte büyük sayıda gen topluluğu tekrardan ekspresyon maruz kalırlar. Bu gen toplulukların embriyonik gelişim süresinde görevleri gözlenmektedir [56], [57]. Gelişen ileri teknoloji sayesinde dedifferasyon süreci daha anlaşılabilir hale gelmiştir. Hücre programlanması teknolojisi ile sınır/yara epiteli/AEC hücrelerinin etkileşiminden dolayı gönderilen sinyaller ile yetişkin kök hücrelerinin rekrutmanı ve aktivasyonu bağ dokuda fibroblastlarını uyarak rejenerasyon-yetkili blastema hücrelerini oluşturduğu gözlemlendi [58].

4.4.Rejenerasyonun Tamamlanmasında Pozisyonel Bilginin Önemi

Yukarıda da bahsettiğim üzere blastema oluşumu sınır, yara epiteli ve AEC hücrelerinin birbirleri ile etkileşime girerek çeşitli sinyaller göndermesiyle gerçekleşir. Bağ dokudaki blastema progenitor hücrelerinin bölünmeleri blastema oluşumunun son evrelerinde gerçekleşir. Amputasyondan birkaç gün sonra

kaybedilen uzuv çevresindeki dermis hücreleri ve bağ doku hücreleri birlikte yara altındaki AEC tabakasına doğru göç ederek orada birikirler. AEC tabakasında biriken progenitor hücreler amputasyon sonrası aksolot vücudunda kalan kemik, kas ve sinir hücreleri ile birlikte bir katman oluşturur. Dermis hücreleri/ bağ doku hücreleri ve bu hücrelerin progeny olan diğer hücreler proksimal distal eksen ve yara çevresinde farklı pozisyona sahiptirler. Bu hücreler yaranın merkezinde toplanarak yara çevresindeki komşu hücreleri uyararak, hücrelerin tekrar bölünme evresine girmesine ve rejenerasyonu başlatırlar [8], [9]. Blastema oluşumu için gerekli olan hücre sinyalleri yeterli olmasına rağmen, uzvun farklı bölgesindeki hücrelerden gelen çeşitli pozisyonel bilgi olmadığı takdirde blastema gelişiminin sürmediği ve rejenerasyonun tamamlanmadığı gözlenmektedir [8], [9], [17]. Urodele üzerinde yapılan bir araştırmada, doku nakli yapılarak pozisyonel bilginin rejenerasyona ne gibi katkısı olduğunu sorgulandı. Araştırma sonucunda rejenerasyonun tamamlanması için proksimal distal boyunca uzuv çevresinde çeşitli pozisyonel bilgiye sahip hücreler bir araya geldiği gözlenmektedir. Bu posteriyor, anterior, dorsal ve ventral pozisyonlardaki hücreler blastemanın temeline yerleşerek rejenerasyonu sürdürürler. Eğer pozisyonel bilgiye sahip hücrelerden biri rejenerasyon sürecine katılamazsa, yara çevresindeki hücrelerin etkilişiminden kaynaklı eksik olan pozisyonel bilgide çoğalma ve rejenerasyon gözlenir [9]. Bağ doku içerisindeki fibroblastlar kendilerinin proksimaldistal eksen ve çevre eksenindeki pozisyon bilgilerini kodlayarak yara merkezinde toplanırlar. Pozisyonel bilgi ile toplanan fibroblastlar birikerek blastemayı oluştururlar. Uzuv çevresinden gelen farklı pozisyonel bilgiye sahip hücreler birbirleriyle etkilişime girerek büyümeyi ve yeni hücrelerin oluşumunu uyarırlar. Oluşan yeni hücreler arapozisyon bilgisini edinirler bu sürece arakatman adı verilir. Ara katman süreci farklı pozisyon bilgilerinin hepsi elimine olana kadar devam eder. Pozisyonel bilgilerinin elimine olması rejenerasyonun tamamlandığını göstermektedir [6]. Pozisyonel bilginin eksiliğinde rejenerasyon mekanizmasında ne gibi değişiklik olacağını gözlemlemek adına yapılan bir araştırmada, aksolotun ön kolunun (anterior) yarısı alınarak arka kolun yarısına doku nakli yapılıyor. Sonuç olarak doku nakli yapılan yerde simetrik (çift-posterior) ön kol oluşumu gözlemlendi. Daha sonrasında oluşan simetrik kola yapılan amputasyon sonrası değişken uzunlukta ve karmaşıklıkta simetrik kol

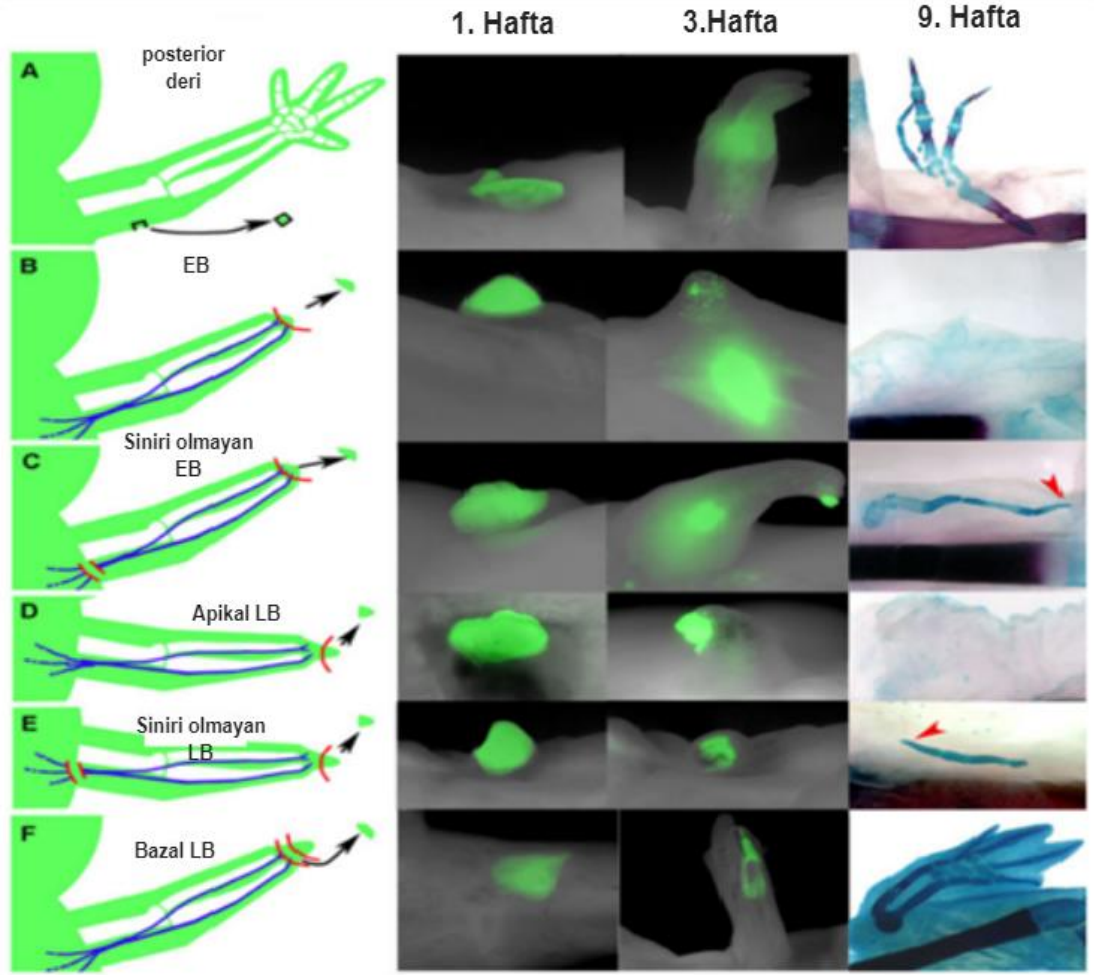
gözlendi. Araştırma sonucunda pozisyonel bilginin blastema oluşumunda ve rejenerasyonda kritik role sahip olduğu gözlendi [9].

Uzuvun proksimal lokasyondaki hücreleri blastema hücrelerini oluşturarak, bu hücrelerin pozisyonel bilgiyi edinmesi sağlarlar [59]. Rejenerasyon yanıt oluştuğu anda blastema hücrelerinin ve progeny hücrelerinin pozisyonel bilgileri tekrardan yapılandırılır. Bu özelliğe örnek verirsek, homeobox (HoxA) lokusunda ki genlerin ekspresyonu üzerine yapılan gözlemlerde bu genlerin ekspresyonunun erken rejenerasyon ve rejenerasyon sonrası evrelerde arttığı, aynı zamanda rejenerasyon yanıtıyla yeni pozisyonel bilginin oluştuğu gözlenmektedir [20], [60]. Oluşan yeni pozisyonel bilginin ilk başta plastik yapıda olması daha sonra farklılaşarak blastema hücreleri içinde sabit olduğu gösterildi [61], [62], [16]. Ampütasyon sonrası ampüte olan uzuvu dışarıdan verilen retinoik asitin farklılaşmamış blastema öncesi hücrelerin pozisyonel bilgisi ile blastema sonrası apikal uçtaki hücrelerin pozisyonel bilgisini tekrardan programlandığı gözlendi [62]. Ampüte sonrası uzuvda kalan farklılaşmış hücreler ve blastema sonrası oluşan tomurcuk basal bölgedeki hücreler, dışarıdan verilen retinoik asite karşı dayanıklı olduğu belirtilmiş ve pozisyonel bilgilerinde herhangi yeniden programlandırılma gözlenmemiştir [62], [31]. Retinoik asit reseptör (RAR- δ) pozisyonel programlamayı kontrol eder. Bu reseptör blastema öncesi plastik evrede ve hücrelerin blastema içine sıtabil olduğu evrede aktif hale gelir [63], [64], [65], [66], [67]. Pozisyonel bilginin yeniden programlanmasında reseptör kendi başına yeterli değildir [65].

Farklılaşmamış blastema hücresinin pozisyonel bilgisi değişmeye hazırdır. Bu hücreler aksolot üzerinde farklı bir bölgeye nakledildiğinde (erken blastema tomurcuk (EB) ve geç blastema (LB) apikal bölgesi gibi), o bölgelerin proksimaldistalında ve anterior ekseninde herhangi arta kalan yapı gözlenilmemektedir [16]. Doku nakli gerçekleştirilen EB bölgesinde T-box transkripsiyon faktör (Tbx5) ekspresyonunun kaybolduğu gözlenmektedir. Tbx5, hücrelerin orijinal bölgedeki pozisyonel bilgisini belirleyen markerdir [16]. Bunun yanı sıra, farklılaşmış blastema sonrası hücrelerin ve ampütasyon sonrası uzuvda kalan hücrelerin yeni bölgeleri nakli sonucunda arta kalan yapıların oluşumu

gözenmektedir. Gözlenen sonuçlara göre pozisyonel bilgi dereceli olarak blastema hücrelerinde sitabil olduğu kanıtlanmıştır [16].





Şekil 4.4.1 Blastemadaki pozisyonel bilgilerin sıtabilizasyonu sinir sinyallerinin kontrolü ile sağlanır. (A-F) solda bulunan resimler; greft dokunun alındığı organizma), sağda doku nakli ile aşıl原因mış hücrelerin 1 ve 3 hafta sonra canlı görüntülerini gösteren ve en sağda, farklı blastema dokuları aşıl原因ında ektopik büyüme tepkisini özetlemek için bütün montaj iskelet boyaması gösterilmektedir. (A) posterior cilt anterior yerleşimli bir yara bölgesine sapmış bir sinirle aşıl原因dığı zaman deri modelinde ektopik uzuvların oluşumu gözlenmektedir. (B-C) Erken blastemanın (EB) greftleri, deri modeline aşıl原因dığı zaman ektopik uzuv oluşumu tetiklemediği; bununla birlikte, 3.günün sonunda sinirlerinden arındırılmış erken blastemanın aşıl原因ması ile segmentli ancak eksik bir rejenerasyon oluşumu gözlenmektedir. (D) Geç blastemanın (LB) apikal ucunun greftleri ektopik uzuv oluşumunu tetiklemediği gözlenmektedir. (E) Denerve EB de gözlenen sonuca benzer şekilde, denerve apikal-LB'ler segmentli ancak eksik rejenerasyon oluşumunu indüklediği gözlenmektedir. (F) LB'nin bazal bölgesinden alınan dokunun nakli sonucunda tam desenli anterior / posterior ve dorsal / ventral yapılarla uzuv rejenerasyon oluşumu gözlenmektedir [16].

Sinir hücrelerinden farklılaşmamış blastema hücrelerine gönderilen sinyaller pozisyonel bilginin tekrardan programlanmasında önemli rol oynar. Rejenerasyon sürecinde olan bir uzvun sinirlerini kestikten sonra alınan blastema dokusunun yeni bölgeye nakledildikten sonra o bölgede ektopik uzuv oluşturduğu gözlenmektedir [16]. Araştırmacılar, nakledilen doku pozisyonunun çoktan plastik evreyi geçtiği için uzuv oluşumu gözlenmiş olabileceğini [16] ve aynı zamanda nöro-epitel etkileşiminin dolaylı sonucu olabileceğini fikir olarak beyan etmektedir [19], [37],

[15], [74], [44]. Nöron-AEC etkileşimi blastema hücrelerinin plastik evrede kalmasını sağlar. Ampüte edilen uzvun pozisyonel bilgisi oluşunca bu evreden çıkarlar. Sinir hücrelerinin pozisyonel bilgiye katkısını öğrenmek için yapılan bir araştırma sonucu, denervasyonun EB blastemasının yeni uzuv oluşturmasını engellediği gözlenmektedir [61]. Eğer denervasyon rejenerasyonun son evrelerinde uygulanırsa, rejenerasyon süresinde takip edilen pozisyonel bilgiye sadık kalınarak normal uzuv oluşumu görünür fakat olması gerekenden daha küçük boyda gözlenmiştir. Sonuç olarak, sinir hücreleri blastema hücrelerinin pozisyonel plastisitesini sürdürmek için gerekli olduğu gözlenmiştir [61].

Diğer hücre tiplerinde (kas ve Schwann hücreleri) pozisyonel bilgi hafızası yoktur. Bu hücre tipleri diğer hücreleri uyararak pozisyonel bilginin oluşumunu sağlayarak blastema sonrası EB oluşumuna katkıda bulunurlar [26].

Deri dokusu ile ilgili yapılan araştırmalarda, ampüte olan bölgede bulunan ve yan yana olan farklı pozisyona sahip deri dokularının rejenerasyon sırasında pozisyonel hafızaya sahip olduğu gözlenmiştir [69], [70], [74], [71], [26], [34], [17], [15]. Epitel katmanın kaldırılması ve katmanlar arası yer değişikliği rejenerasyon sürecinde bir etkisi olmadığı [69], [71], derideki motif-oluşturan hücrelerin dermis katmanında yer aldığı gözlenmektedir [70]. Dermal tabaka fibroblastlar ve deri pigment hücrelerinden oluşur. Pigment hücreleri rejenerasyon sırasında motif oluşumunda yer almadığı için, motif-oluşturan hücrelerin fibroblastlar olabileceği düşünülmektedir [72]. Schwann hücreleri yeni uzuv oluşumu için gerekli motif-oluşturan hücreleri takip ederek rejenerasyonu sürdürürler [27]. Bunun yanı sıra, kas doku hücreleri ektopik yapı oluşumunu uyarma kapasitesi vardır. İskelet-kas dokusu farklı hücre tiplerinden meydana gelir. Bu hücreler; satellite, bağ doku hücreleri ve miyoblastlardır. Kas hücrelerinin yeni uzva nakli sonucunda o bölgede yeni motif oluşumunun uyarılmadığı gözlenmektedir. Nakledilen hücrelerin konak ortamın pozisyonel bilgisini takip ettiği gösterildi. Bu sonuca bağlı olarak kas doku ile bağlantılı olan bağ doku hücrelerinin (fibroblast) motif-oluşturan hücreler olduğu varsayılmıştır [27], [29]. Kıkırdak doku hücrelerinin rejenerasyon sürecinde kıkırdak oluşumuna katkıda bulunduğu fakat bu rejenerasyon kapasitesinin organizmanın yaşıyla alakalı olduğu gözlenmektedir [27], [73]. Yaşlı organizmalarda bulunan

kıkırdak doku hücrelerinin rejenerasyon sürecinde pozisyonel hafızayı kaybettiği aynı zamanda sınırlı etkisi olduğu gözlemlendi. Genç organizmalarda bulunan kıkırdak dokunun pozisyonel hafızayı koruduğu bulundu. Peri-iskeletal bağ dokunun ise pozisyonel hafızayı yaşa bağlı olmadan koruduğu gözlenmiştir [26].

4.5. Mikrobiyota

Patojenik mikroorganizmalar, geçmişte mikrobiyoloji alanında geniş çapta çalışılmasına rağmen az sayıda kişi kommensal bakterilerin yararına odaklandı [81]. İnsan genom dizisi tamamlanıp yayınlandığında [82], [83]. Julian Davies, araştırmacıların insan vücudu ve mikroplar arasındaki etkileşimi bulana dek başarıya ulaşamadıklarını savundu [84]. Joshua Lederberg, İnsan mikrobiyomu terimini; canlı vücudunda yaşayan, patojenik ve simbiyotik olan, insan vücuduna fayda sağlayan mikroorganizmalar olarak tanımlayan ilk kişiydi [85]. İnsan mikrobiyotasının, özellikle insan bağırsak mikrobiyomunun incelenmesine ilgi, Kasım 2005'te Paris'te İnsan Mikrobiyom Projesi (HMP) başlatıldı. HMP, cilt, vajina, ağız ve gastrointestinal sistem dahil olmak üzere insan vücudunun birçok yerini ele aldı. HMP'nin amacı, çok sayıda vücut bölgesindeki insan mikrobiyomunun tipini tanımlamak, mikrobiyom popülasyonunu, genotipini, mikroorganizma metabolizmasını ve konak vücudunda patojenik ve kommensal mikrobiyota popülasyonun ayırımı yapılarak konağa yarar ve zararlarını araştırmaktır [86].

İnsan vücudunda yaşayan kommensal mikroorganizmalar bütününe mikrobiyota denir. Farklı vücut bölgelerinde farklı miktarda bulunan ve çeşitli mikroorganizma türlerini içeren mikrobiyotanın, anlamlı olarak konak canlıının biyolojik mekanizmalarında büyük rolü olduğu gözlenmektedir [87]. Yukarıda bahsedildiği üzere mikrobiyota konağın birçok farklı bölgesinde bulunurken bağırsakta yaşayan mikroorganizma çeşitliliği, popülasyonu ve konağa yararı bakımından diğer bölgelere oranla daha fazladır. Bağırsakta yaşayan mikrobiyal popülasyona bağırsak mikrobiyotası veya bağırsak florası denir. Bağırsakta binlerce farklı tür, trilyonlarca mikroorganizma içerir. Bağırsakta 35.000 farklı türün bulunduğu görülmüştür. Bu çeşitlilik, insan mikrobiyomunun, insan genlerinden yüz kat daha fazla olduğunu ve 3 milyondan fazla gen içerdiğini kanıtlamaktadır [115]. İnsan bağırsağı

mikrobiyotasının kolonizasyonu doğumda başlar. Mikroplar doğum kanalından yeni doğanlara geçmektedir. Bu geçiş sebebiyle vajinal mikrobiyota, bebeklerin bağırsak mikrobiyotası ile benzerdir. Sezaryen ile doğan bebekler, vajinal yolla doğanlardan farklı mikrobiyal bileşimlere sahiptir. Mikrobiyal bileşimin bireyler arasında farklı olmasının ilk nedeni budur. Mikrobiyal bileşimin değiştirilmesi de zamana bağlıdır. 1 yaşından sonra mikrobiyal bileşim, ilk bağırsak mikrobiyotasını stabilize eder ve yetişkinlikte yenden şekillenir [115]. Gut mikrobiyota, konakçıda bağırsak hareketliliğini düzenleme, esansiyel vitamin üretme, safra asidi ve steroidleri dönüştürme, ksénobiyotik maddeleri metabolize etme, mineralleri emme ve toksinleri, genotoksinleri ve mutajenleri aktive etme ve tahrip etme gibi birçok faydalı role sahiptir [114]. Gut bakterileri, keten tohumu, sebze, meyve ve içecekler gibi bitki kaynaklarında bulunan kimyasal bileşiklerin grubu olan liganların biyolojik dönüşümünde rol oynar. Liganlar vücudu kardiyovasküler hastalıklara, hiperlipidemi, meme kanseri, kolon kanseri, prostat kanseri, osteoporoz ve menopoz sendromuna karşı korur [113].Bağırsak mikrobiyotasının metabolik aktivitesi karaciğerin metabolik aktivitesine hemen hemen eşittir, bu nedenle bağırsak mikrobiyosunun ek bir organ olarak düşünülebilir [115].

Bütün bu değişkenler göz önüne alındığında mikrobiyotanın önemi ve etkisi, araştırmacıları bu alana doğru yönlendirmektedir. Mikrobiyota kompozisyonu bakterilerden, virüslerden, mantarlardan ve protozoalardan oluşmasına rağmen araştırmaların büyük kısmı çeşitli hastalığa sahip bireylerdeki bakteri kompozisyonuna dayalıdır. Sağlıklı bir bireyde olması gereken bakteri kompozisyonundaki tür çeşitliliğinin hastalık anında gelişen tür değişikliğinin hastalığın ilerlemesinde veya engellemesinde etkisi araştırılmaktadır. Mikrobiyotakompozisyonundaki mantar, protozoa ve virüsler ile ilgili literatür çalışma sayısı azdır [88].

4.5.1. Mikobiyom

"Mikobiyom" terimi, mikrobiyom mantar topluluğunu tanımlamak için kullanılmaktadır. Mikobiyom çalışmaları sırasında araştırmacılar birkaç zorlukla karşılaşmaktadır. Birincisi, bakteriyel biyokütle karşılaştırıldığında, küçük mantar

biyokütle yüzdesi bulunabilirliği [89], [90], İkincisi, mantar hücrelerinin nükleik asidini izole etmede zorluk, üçüncüsü, taksonomik görevlendirme için veri tabanı eksikliğinden dolayı mantar türlerini ayırt etmek zordur [91], [92], [93].

Mevcut fungaltaksonomik veritabanları, ITS için UNITE, mantara ait 18S ve 28S rRNA genleri için SILVA ve mantara ait 28S rRNA genleri için RDP çalışmalarından oluşur [94], [95], [96]. Her ne kadar bu zorlukların varlığı olsa da, mikrobiyom çalışmaları, konakçı ile ilişkilerini anlamayı ve insan mikrobiyomun, sağlık ve hastalık patolojisinde ayrılmaz bir rol oynadığını göstermiştir [97].

4.6. Mikrobiyota ve Mikrobiyom Kompozisyon Analizinde Kullanılan Araçlar

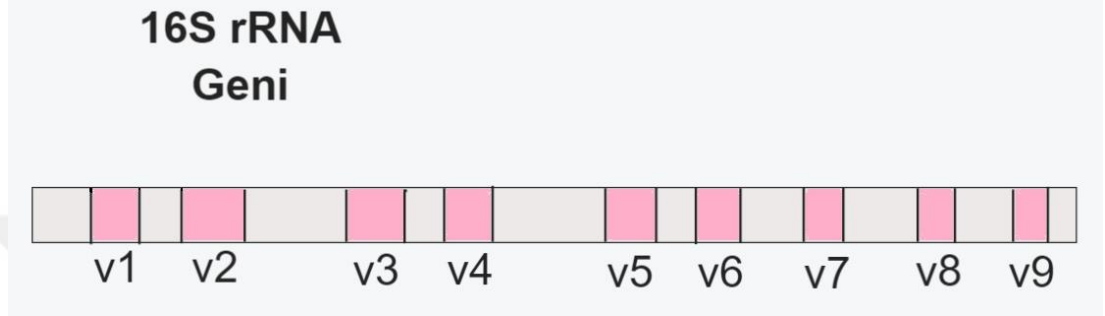
4.6.1. Yeni Nesil Dizinleme Teknolojisi

DNA dizinleme teknolojilerinin ve moleküler biyoloji tekniklerinin gelişmesi ile mikrobiyota analizleri kolaylıkla yapılmaktadır. Yeni nesil dizinleme (NGS) en çok kullanılan dizinleme teknolojisidir. Diğer dizinleme teknolojilere oranla daha ucuz ve hızlıdır. Yeni nesil dizinleme teknolojisi çeşitli uygulamaya olanak sağlamıştır [98]. Bu teknoloji genomik, transkriptomik, epigenomik ve metagenomik analizlerindeki önemli soruların çözümlenmesine yardımcı olmaktadır. Yeni nesil dizinleme teknolojisi genel üç ana iş akışından oluşur; kütüphane hazırlığı, sekanslama ve veri analizi [99].

Yeni nesil dizinleme teknolojisi konakta yaşayan kommensal mikrobiyotanın kompozisyonunu, popülasyonunu, mikroorganizma türlerini ve türler arasındaki genetik soy ağacını analiz etmemizi sağlamaktadır. Yeni nesil dizinleme teknolojisi hedef amplicona veya birkaç filogenetik marker genine odaklanır. Mikrobiyal çeşitlilik analizlerinde genellikle 16S rRNA geni kullanılırken [100], kommensal mantar kompozisyonunu analiz etmek için 18S rRNA geni ve internal ara bölgeler (ITS) bölgeleri kullanılır [94], [95], [96].

4.6.1.2. 16S rRNA Dizinleme Tekniği

Bakteriyel mikrobiyom, tüm prokaryotlarda bulunan eşsiz 16S ribozomal RNA (rRNA) genine sahiptir. 16S rRNA geni, ribozomun esansiyel bölümünü kodlar. Bu kısım, bakterilerin tanımlanması için belirleyici olan hiperdeğişken bölgelerden oluşmaktadır. Toplamda 9 tane (V1-V9) hiperdeğişken bölge vardır.



Şekil 4.6.1 Pembe alanlar 16S rRNA geninde ki hiperdeğişken bölgeleri göstermektedir. Hiperdeğişkenler arasında bulunan bölgeler korunmuş bölgelerdir [116].

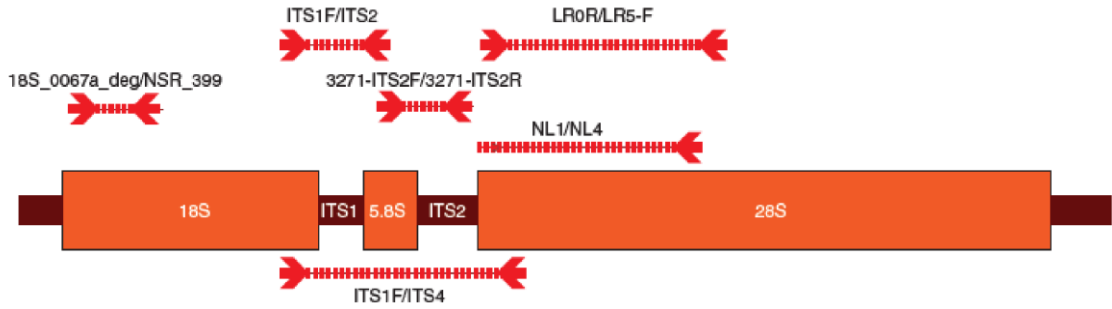
Bu hiperdeğişken bölgeler, özel primerler ile polimeraz zincir reaksiyonunun (PZR) da çoğaltılır. Çoğaltılacak hiperdeğişken bölge araştırmanın amacına göre değişkenlik gösterir. Araştırmalarda en çok kullanılan hiperdeğişken bölge genellikle V3-V4 bölgeleridir. PZR amplifikasyonu sonrası, 16S rRNA geni dizinlenmesi yapılır. Dizinleme sonrası ortaya çıkan databiyoinformatik araçlar ile analiz edilir[101].

4.6.1.3. ITS Dizinleme Tekniği

Mantar türleri 1920'den beri temel mantar kültürü tekniği ile ekilmiş ve analiz edilmiştir. Morfolojisi ve büyüyen yapısı, siteril sıvı ortam şişelerinde gözlemlenerek düşünölmüştür [102]. Ancak, temel kültür yöntemleri insan mikrobiyomunun en büyük bölümünü oluşturan tedavi edilemeyen mantarlar için yeterli değildir. Yeni nesil dizi (NGS) yöntemleri, mantar türlerini doğrudan ve verimli bir şekilde sıralayan kültürleme yöntemlerinin sınırlandırılmasından sonra geliştirilir [103]. NGS, 18S rRNA, 5.8S rRNA, 28S rRNA genlerinden ve dahili transkripsiyonlu aralık bölgelerinden (ITS) oluşan mantar ribozomal RNA (rRNA) gen kümesi içinde bulunan mantar temizlik genlerini hedeflenir. Bu ampikon bazlı teknoloji, hem

tedavi edilemeyen hem de yetiştirilebilen mantar türlerini karakterize etmek için kullanılır [104]. NGS, numune toplama, DNA ekstraksiyonu, polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) amplifikasyonu, sıralama ve veri montaj analizi dahil olmak üzere birkaç önemli işlemde oluşur.

Numune toplama, mikrobiyomun haritalandırılması için ilk işlemdir. Her bir vücut bölgesi farklı örnekleme işlemlerine sahiptir, örneğin cilt mikrobiyomu kazıma ve temizleme teknikleri kullanılarak toplanır, ancak gastrointestinal mikrobiyom için dışkı mikrobiyom analizinde kullanılır [105], [106], [107]. Örnek toplama sonrası, 16S rRNA dizinleme işlemi için üretilen ticari DNA izolasyon kitleri ile örneklerden DNA izolasyonu yapılır [88]. DNA izolasyon protokolü sona erdiğinde, yeni nesil sekanslama yöntemi ile hedef alınan mantara ait rRNA genlerinin özel bölgelerini hedef alan alternatif primer setleri ile büyütülür [103].



Şekil 4.6.2 Fungal ribozomal gen kümeleri ve özel primerlerin bağlandığı primer dizileri gösterilmiştir [103].

Tüm 18S rRNA uzunluğu diziliminin kısıtlanması, dokuz hiperdeğişken bölgeye odaklanmasına neden olur; V1 ila V9 (9-12). V4 bölgesi ökaryotlardaki en büyük değişken bölgedir, bu nedenle en belirgin olan ökaryotik çeşitlilik çalışmaları çoğunlukla V4 ve V9 bölgelerine odaklanır [108]. Hiperdeğişken ve ITS bölgeleri için primer setleri seçimi, biyolojik çeşitlilik sonuçlarının verimliliğini etkiler, bu nedenle primer tasarımı önemlidir. Tüm ökaryotların rRNA bölgeleri için aynı primerin kullanılması biyolojik çeşitlilik değerlendirmesinin derinliğini sınırlar [109].

Farklı numunelerin PCR ile elde edilen amplikonlar, Roche 454, IlluminaHiSeq-MiSeq ve Ion Torrent gibi farklı sekans teknolojileri ile sekanslanır [110]. Bu sıralama teknolojileri bilişim analizinde işlenen yüksek veri çıktısını sağlar. Biyoinformatik araçları, filogenetik analizlere, fungal grupların β ve α çeşitlerine ve operasyonel taksonomik birimlerin (OTU'lar) atanmasına olanak tanır [111], [112]. Son olarak, veritabanları amplikon dizileri ile karşılaştırılır.

4.7. Mikrobiyota Rejenerasyon İlişkisi

Mikrobiyotanın rejenerasyona katkısı henüz tam anlamıyla anlaşılmamaktadır. Mikrobiyota rejenerasyon ilişkisini anlamaya dayalı yapılan araştırmalarda, mikrobiyotanın rejenerasyon mekanizmasındaki etkisi değişkenlik göstermektedir. Kök hücrelerin çoğalması ve farklılaşma süreci üzerine yapılan birkaç araştırmada, mikrobiyotanın rejenerasyon mekanizmasındaki rolünün olumlu veya olumsuz olabileceği gözlenmektedir [144], [145]. Memelilerin bağırsak epitel 3-5 gün arasında sürekli yenilenerek bağırsakta oluşabilecek hasarları engellerler. Bağırsak epitel katmanlarının yenilenmesini üstlenen kök hücreler çeşitli hücre tiplerine farklılaşarak yeni fonksiyonel hücreler oluştururlar. Memelilerdeki bağırsak kök hücreleri bağırsak duvarındaki kör geçit adı verilen özel çukurlarda bulunurlar [139]. Kök hücre farklılaşmasında konağa ait metabolik olayların ve faktörlerin rol oynadığı bilinmesine rağmen komşu gut mikrobiyotanın rolü kesin olarak bulunamamaktadır [140]. Yukarıda bahsedildiği gibi, çeşitli konak fonksiyonlarının yerine gelmesinde, metabolik, immün yanıt oluşumu ve vasküler gelişimin üzerinde mikrobiyotanın etkisi olduğu gözlenmektedir [141]. Bu fonksiyonların düzenlenmesindeki en önemli etkenin mikrobiyal metabolitler olabileceği düşünülmektedir. Mikrobiyal metabolitler konak hücrelerinde ve hücreler arasında hızlıca yayılabilen küçük moleküllerdir [142]. Mikrobiyal metabolitlerin bağırsak kök hücre farklılaşmasında ve çoğalmasındaki etkisini anlamak için yapılan bir araştırmada, vahşi tip farelere farklı dozlarda oral yolla bütirat verildi [144]. Bütirat lifli yiyeceklerin tüketimi ile bakteri fermentasyonu sonucu üretilen mikrobiyal metabolittir [143]. Çoğunlukla

memelilerin kolonik lümeninde fazlaca vardır. Mikrobiyota tarafından üretilen bütiratın bağırsak duvarında bulunan kör geçitlere ulaşarak orda bulunan kök hücrelerin çoğalıp farklılaşmasını engellediği gözlemlendi. Küçük dozlarla beslenen farelerdeki kök hücre çoğalımı bir süre sonra geri dönüştürebilir olmasına rağmen yüksek dozla beslenen farelerde hücre ölümleri ve buna bağlı hasarın kalıcı olduğu gözlemlendi. Kör geçitin kök hücre farklılaşması ve hareketliliğindeki önemini anlamak için deney hayvanı olarak zebra balığı kullanılmaktadır. Zebra balığının bağırsak duvarında doğuştan kör geçitlere rastlanılmamaktadır. Kör geçitlerinin olmaması sebebiyle kök hücreler direkt bağırsak lümenine maruz kalır. Zebra balığında aynı zamanda bütirat üreten enzime sahip bakterilere sahip değildir [144].

Zebra balığı vahşi farelerde olduğu gibi bütiratla tedavi edilmektedir. Bütiratın etkisi gözlemlendiğinde, bağırsak çıkıntılarında bulunan epitel hücrelerinin çoğalımını baskıladığı gözlemlendi. İki deney grubunu karşılaştırılırsa, kör geçitler bütiratın kök hücrelere ulaşmasını engellediği dolaylı olarak kök hücreler üzerindeki baskılayıcı etkisini azalttığı gözlenmektedir. Sonuçları desteklemek için yapılan son deney grubunda, dekstran sodyum sülfat ile tedavi edilen farelerde kolonik ülser oluşumu gözlenmiş ve sonuç olarak yok olan kör geçitler bütiratın kök hücrelere ulaşmasını engelleyemediği için epitel hücrelerde yenilenmenin durduğu gözlenmektedir. Bu çalışma bazı organizmalar vücut içerisinde özel mimari yapılara sahip olduğu, kör geçit gibi, ve bu mimari yapıların mikrobiyal metabolitlerin kök hücre çoğalımı üzerindeki etkisini kısıtladığı gözlenmektedir. Bu araştırmada kullanılan mikrobiyal metabolit bütiratın kolon epitel hücreleri için enerji kaynağı olduğu da gözlenmektedir. Bu epitel hücreler bütiratı yakarak kök hücrelere ulaşmasını engeller. Araştırma sonucu bütiratın rejenerasyon üzerinde negatif etkisi olmasına rağmen araştırmacılar, bütiratın bağırsak epiteli üzerindeki hasar sonucu kök hücre çoğalımını kısa süreliğine etki etmesine rağmen aslında uzun süreli olarak konağa yardımcı olabileceğini düşünmektedirler. Bağırsak epitelinde hasar sonucu bütirat genotoksik lümen içerisinde kök hücre bölünmesini engelleyerek kolon kök hücrelerinin kanser hücrelere dönüşme riskini azaltabilir ve kök hücrelerin yayılımının gecikmesi epitel tabakanın yarayı veya ülseri kapatmasına izin vermesi sayesinde direkt lümen ile temasını engelleyerek kök hücreler için güvenli bir ortam sağlanmış olabileceği savunulmaktadır [144].

Mikrobiyotanın gut epitel rejenerasyonunda ki etkisini anlamaya dayalı yapılan bir diğer araştırmada, Lgr5-GFP fareleri içeriğinde laktik asit üreten bakterileri (LAB) içeren, *Bifidobacterium* and *Lactobacillus spp.*, probiyotikle 5 gün boyunca beslenilmektedir. Diğer yandan başka deney grubu fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) ile beslenilmektedir. 5 günün sonunda probiyotikle beslenen farelerin kör geçitlerdeki epitel katmanda artış ve buna bağlı olarak kök hücrelerinde, Paneth hücrelerinde ve Goblet hücrelerinde artış gözlenmektedir aynı zamanda bağırsak içerisinde diğer mikrobiyal metabolitlere oranla fazla miktarda laktik asit gözlenildi. Diğer yandan PBS ile beslenen farelerde ise kör geçitin yapısında ve diğer fonksiyonel hücrelerde artış gözlenilmemektedir. LAB tarafından üretilen laktik asitin bağırsak kör geçitine nasıl ulaştığını anlamak için, fareler 5 gün boyunca içerisinde laktik asit bulunan içme suyu ile beslenilmektedir. Deneyin sonunda kör geçitteki oksijen tüketim oranı ve hücre dışı asitleme oranı (glikoliz göstergesi) ölçülmektedir. Kör geçitin bazal katmanında ölçülen oksijen tüketim oranının laktik asit ile beslenen hayvanlarda PBS ile beslenenlere göre daha fazla olduğu gözlenilmektedir. Hücre dışı asitleme oranında PBS ile beslenenlerle laktik asit ile beslenenlerde anlamlı bir farklılık gözlenilmektedir. Bu sonuçlara göre laktik asit ile beslenen farelerin kör geçitlerinde mitokondriye bağlı solunumda artış gözlenilmektedir. Buna bağlı olarak laktik asitlerin kör geçitlerin dibine kadar ulaştığı gözlenmektedir. Laktik asit üreten bakterilerin kök hücreye etkisini anlamak için, vahşi tip *L.plantarum* ve laktik dehidrogenaz faaliyeti eksik olan *L. Plantarum* ile yapılan hücre kültürün sonucuna göre, laktik dehidrogenaz faaliyeti eksik olan *L. Plantarum* kültürde kök hücre ve diğer fonksiyonel hücrelerde azalma gözlenmektedir [145].

Karaciğer hızlı rejenerasyon kapasitesi sahip organdır. Birçok metabolik ve fonksiyonel mekanizmalar bu rejenerasyonda görev almaktadır. En önemli kimyasallardan olan safra asidi karaciğer yenilenmesinde anahtar metabolittir [146]. Safra adisinin rejenerasyona katkısını araştırmacılar gut-karaciğer eksenindeki gut mikrobiyota ve safra asidi arasında olan çift yönlü iletişimin büyük bir etken olabileceği düşünölmektedir. Gut mikrobiyotasının safra asit homeostazını düzenlemede önemli role sahiptir [147]. Mikrobiyotanın karaciğer rejenerasyonundaki etkisini incelemek için yapılan araştırmada, deney farelerin

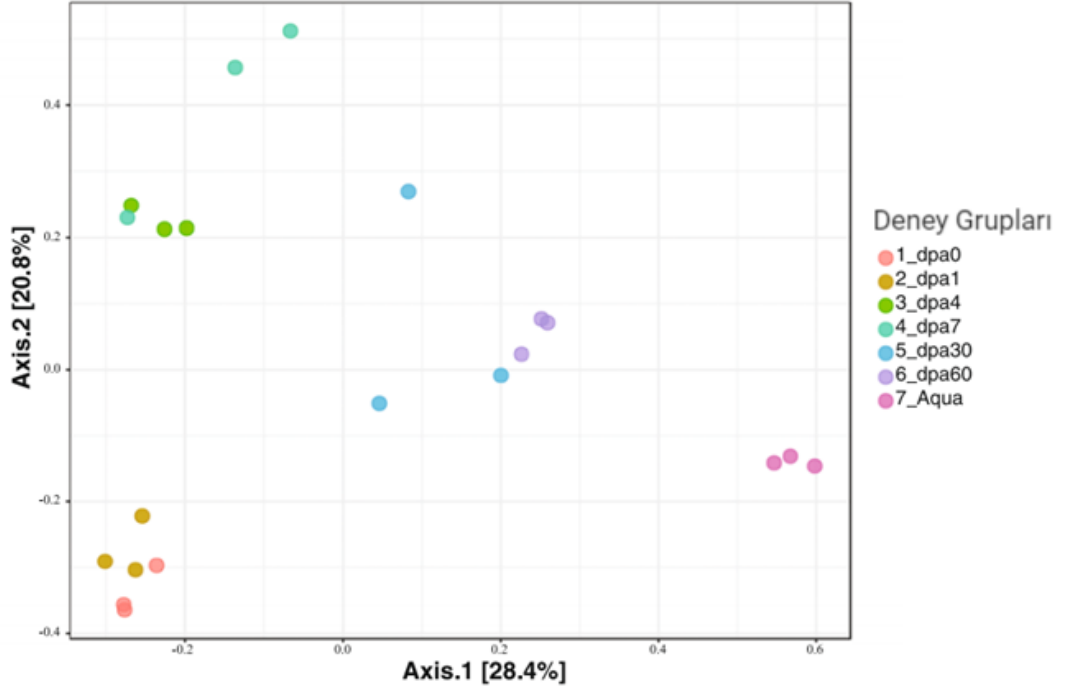
karaciğerinin 2/3 ü kesilip atılıyor kesilme sonrası karaciğer rejenerasyonu sürecinde bakteri mikrobiyota profili gözlenmektedir. Kesim sonrası 9 gün sonra karaciğer eski haline dönmektedir. 16S rRNA tekniği ile 9 gün boyunca gelişen mikrobiyal çeşitlilik analizi yapılmaktadır. 1.gün ve 9.gün arasında gözlenen bakteri profilinde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak değişiklik gözlenilmemektedir. En çok görülen filumlar *Bacterioidetes* ve *Firmicutes*'tir. Analizler sonucu karaciğer yenilenmesi boyunca *Bacterioidetes* miktarında artış görünürken karşılıklı olarak *Firmicutes* miktarında azalma gözlenmektedir. Bakteri mikrobiyota profilini çıkardıktan sonra karaciğer yenilemesine katkısını analiz etmek için karaciğer gen profilleri çıkarılmaktadır. Sonuçlara göre özel biyolojik yollar karaciğer yenilenmesinin düzenlenmesinde önemli rol oynadığı gözlenmektedir. bu sonuçlar incelendiğinde safra asidinin gut mikrobiyota ile ilişkisi karaciğer yenilenmesinde büyük rolü olduğu gözlenmektedir.

Bakteri mikrobiyota rejenerasyon ilişkisi hakkında birçok araştırma olmasına rağmen fungal mikrobiyota rejenerasyon ilişkisi literatürde bulunmamaktadır.

4.8. Aksolotl Kol Rejenerasyonundaki Bakteri Mikrobiyota Profili

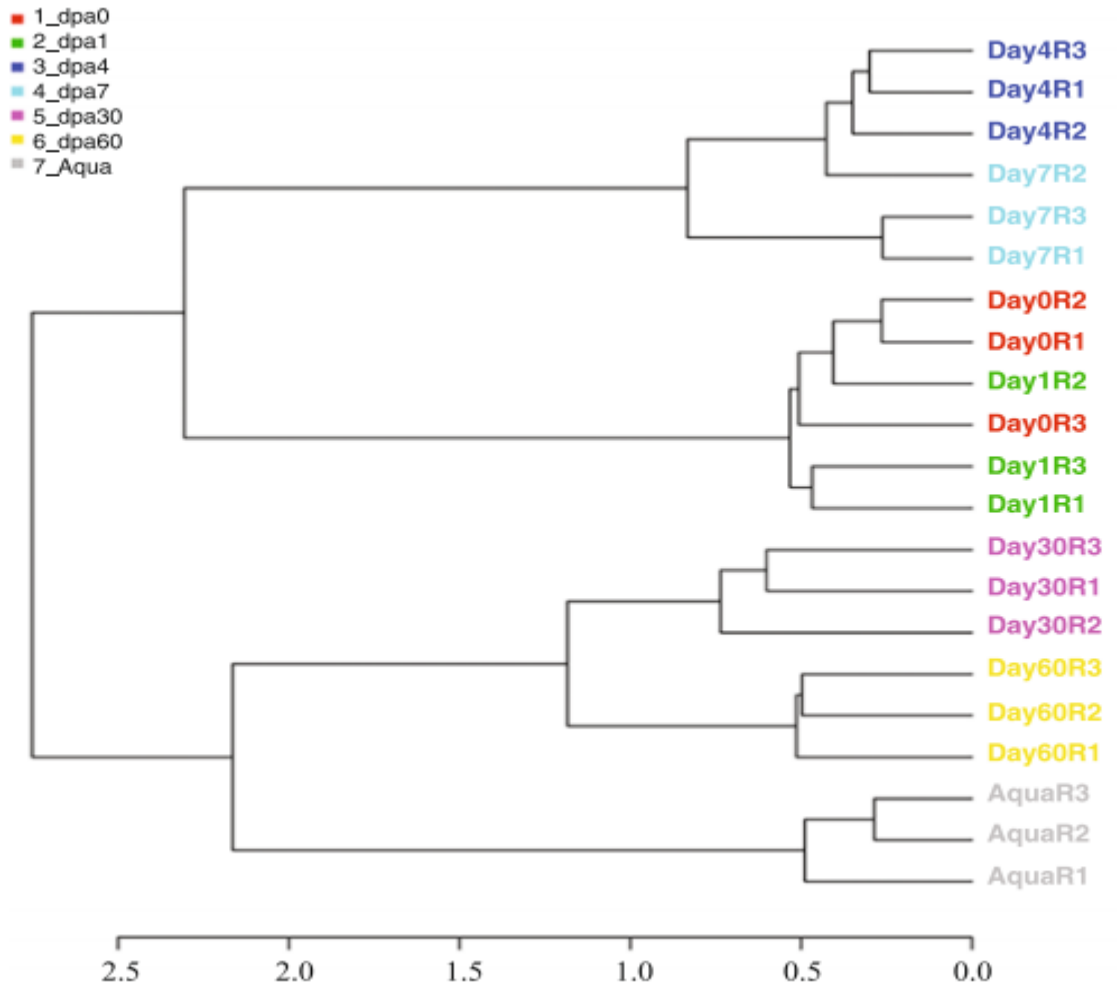
Aksolotl organizmasının ampütasyon sonrası blastema öncesi ve blastema oluşumu sürecindeki bakteri profillerinin değişimini inceleyen araştırmada rastgele seçilen 54 aksolotlтан 6 deney grubu oluşturulmaktadır. Her deney grubunda 3 replika gözlenmektedir. Bu deney grupları, rejenerasyon mekanizmasındaki en önemli zaman dilimlerine göre ayrılmaktadır. Ampütasyon sonrası 0.gün ve 1.gün de alınan örnekler rejenerasyon başlangıç safhası olan yara epiteli oluşumunu, 4.gün ve 7.gün de alınan örnekler erken rejenerasyon safhası olan yara çevresindeki epitelyum hücrelerin ve sinir sinyalleri ile etkileşime girip apikal epitel şapka oluşumunu uyararak kök hücrelerin farklılaşmasıyla blastema oluşumunu, 30.gün ve 60.gün de alınan örnekler ise yeniden gelişim safhası olan hücrelerin sürekli bölünerek çoğalması ve ampütasyon sırasında kaybedilen dokuların bir araya gelerek yeni uzuv oluşumunu temsil etmektedir. Kontrol grubu olarak 0.gün, 30.gün ve 60.gün deney

gruplarının akvaryumundan alınan 100 ml lik su gözlenmektedir. Her bir deney grubundan alınan örnekler 16S rRNA tekniği ile dizinlenip biyoinformatik araçlarla mikrobiyal çeşitlilik ve zenginliği analiz edilmektedir. Beta çeşitlilik analizine göre her deney grubu kendi içerisinde kümeleşme oluşturarak anlamlı olarak ayrılmaktadır.



Şekil 4.8.1 Aksolotl rejenerasyonu sürecinde Beta çeşitlilik analizi [138]

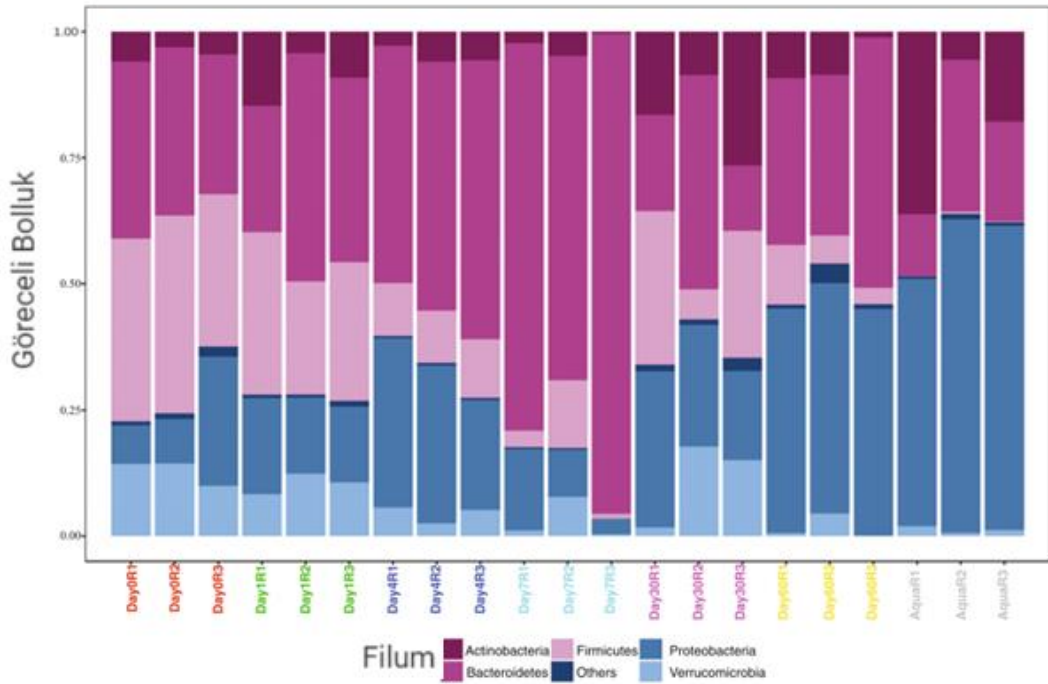
Beta çeşitlilik analizine göre 0.gün ve 1.gün örnekleri diğer deney gruplarından ayrı birbirleri ile kümeleştiği, kontrol grubu aqua örnekleri kendi içerisinde bağımsız olarak kümeleştiği, indeksin orta kısmında 30.gün ve 60.gün örneklerinin bir araya kümeleştiği gözlenmektedir. 4.gün ve 7.gün örnekleri kendi içerisinde kümeleşmesine rağmen 7.gün örnek replikalarının bu kümeleşmeden ayrıldığı gözlenmektedir. 30.gün replikalarında da bu ayrışma gözlenmektedir.



Şekil 4.8.2 Aksolotl rejenerasyon sürecinde beta çeşitlilik analizine göre bakteri mikrobiyotasının hiyerarşik kümeleşmesi [138]

Beta çeşitlilik analizinin hiyerarşik kümeleşmesine göre, deney gruplarındaki bakteri mikrobiyota çeşitliliğine göre anlamlı olarak birbirinden farklılık göstermektedir.

Taksonomik çeşitlilik incelendiğinde deney grupları arasındaki mikrobiyal çeşitlilik deney grupları içerisindeki mikrobiyal çeşitliliğe göre daha fazla olduğu gözlemlendi. kontrol aqua örnekleri diğer deney gruplarından tamamen ayrı olarak bağımsız bakteri mikrobiyal çeşitlilik gözlenmektedir. Taksonomik çeşitlilik analizlerine göre *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria* ve *Verrucomicrobia* filumları gözlenmektedir.



Şekil 4.8.3 Blastema öncesi ve blastema oluşum sürecinde günlere bağlı örneklerin biyolojik replikalarının filum düzeyinde taksonomik çeşitliliği [138]

Filum düzeyindeki bakteri mikrobiyota zenginliği deney gruplarında çeşitlilik göstermesine rağmen her deney grubundaki replikalarındaki bakteri mikrobiyota zenginliğini anlamlı olarak birbirine yakın olduğu gözlenmektedir. Filum düzeyindeki taksonomik çeşitlilik şekline göre az miktarda belirlenemeyen filum düzeyi gözlenmektedir [138].

5. MATERYAL VE METOT

5.1.Etik Beyan

Bu çalışma Mart-Haziran 2019 tarihleri arasında İstanbul Medipol Üniversitesi Rejeneratif Ve Restoratif Tıp Araştırmaları Merkezi (REMER)'de gerçekleştirildi. Yapılan deneysel çalışma 38828770-604.01.01-E.10834 sayı ile İstanbul Medipol Üniversitesi, Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulundan onay alındı.

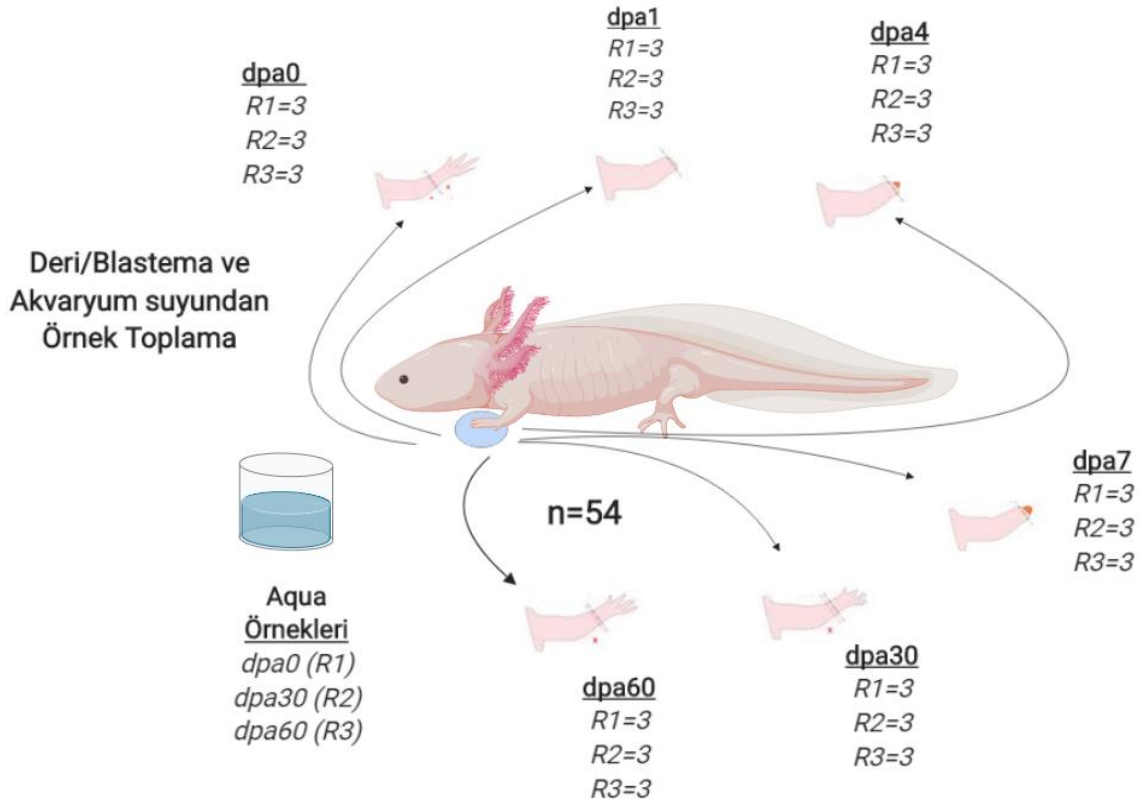
5.2.Hayvan Bakımı

Çalışmada kullanılan aksolotlar Amerika'nın Kentucky eyaletinden getirilip, İstanbul Medipol Üniversitesinin Tıbbi Araştırmalar Merkezi'nde (MEDİTAM) canlıların bakımı ve yetiştirilmesi yapıldı.

Akvaryumların içerisine Holtfreter solüsyonu konularak canlılar için uygun bir ortam oluşturuldu. Ortamın sıcaklığı 18 ± 2 °C arasında deney boyunca sabit tutuldu. Aksolotlar günde bir kez temel gıda ile beslendi (JBL Novo LotIM, Neuhofen, Germany).

5.3.Hayvan Seçimi ve Deney Dizayını

Araştırmada kullanılmak üzere, kardeşler arasından rastgele 54 adet aksolot seçildi. Aksolotların boyları 15-12 cm arasında değişmektedir. Seçilen aksolotlar her bir akvaryumda 9 ar hayvan olacak şekilde küboid şeklindeki 6 farklı akvaryuma ayrılmıştır. Akvaryuma yerleştirilen aksolotlar kendi içlerinde gruplara ayrılmıştır. Her grupta, 9 hayvan rastgele üç biyolojik replikaya (R1, R2 ve R3) ayrılarak sonuçların tekrarlanabilirliği değerlendirildi. Alt gruplara ayrılan aksolotlar, deney boyunca tek bir canlı olarak varsayıldı.



Şekil 5.3.1 Ampütasyon sonrası kesilen bölgeden alınan örnek (Dpa0), ampütasyon sonrası (dpa1) 1.gün de alınan örnek, 4.gün (dpa4), 7.gün (dpa7), 30.gün (dpa30) ve 60.gün (dpa60) de alınan örneklerin biyolojik replikaları ile gösterimi.

5.4. Biyolojik Replika Oluşturma

1.Grup

Blastema oluşumu öncesi 0.gün replika 1: Deri

Blastema oluşumu öncesi 0.gün replika 2: Deri

Blastema oluşumu öncesi 0.gün replika 3: Deri

2.Grup

Blastema oluşumu öncesi 1.gün replika 1: Deri

Blastema oluşumu öncesi 1.gün replika 2: Deri

Blastema oluşumu öncesi 1.gün replika 3: Deri

3.Grup

Erken blastema safhası 4.gün replika 1: Deri

Erken blastema safhası 4.gün replika 2: Deri

Erken blastema safhası 4.gün replika 3: Deri

4.Grup

Erken blastema safhası 7.gün replika 1: Deri

Erken blastema safhası 7.gün replika 2: Deri

Erken blastema safhası 7.gün replika 3: Deri

5.Grup

Blastema sonrası safha 30.gün replika 1: Deri

Blastema sonrası safha 30.gün replika 2: Deri

Blastema sonrası safha 30.gün replika 3: Deri

6.Grup

Blastema sonrası safha 60.gün replika 1: Deri

Blastema sonrası safha 60.gün replika 2: Deri

Blastema sonrası safha 60.gün replika 3: Deri

5.5. Kullanılan Laboratuvar Malzemeleri

5.5.1. Sarflar

Sarf Malzeme Adı	Firma	Katalog Numarası
%0.1 TrikainMesilat	Sigma	E10521 veya MS-222
DNeasy kan ve doku kiti	Qiagen	69504
Metagenomik DNA izolasyon kiti	Epicentre	MGD08420
Qubit dsDNA BR assay	ThermoFisher	Q32850
Taq 2x Mastermiks	NEB	M0270L
AgencourtAMPure XP Kiti	Beckman	A63881

MiSeqV2 500 döngü Kit	Illumina	MS-102-2003
Nextera	Illumina	20018705
Agarose	Wisent Bio Products	800-015-EG
10x Bluejuice Loading Tamponu	ThermoFisher Scientific	10816015
2-Log DNA Ladder (0.1- 10.0 kb)	NEB	N3200L
SYBR™ Safe DNA Gel Stain	ThermoFisher Scientific	S33102

Tablo 5.5.1.:Deneyde kullanılan Sarflar.

5.5.2. ITSPrimer sentezi ITS primer setleri;

F primer : ITS1-30F

TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGTCCTGCCCTTTGTAC
ACA

R primer : ITS1-217R

GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGTTTCGCTGCGTTCTTC
ATCG

5.5.3. Cihazlar

- Termal Döngü Cihazı
- Qubit Cihazı
- Sekanslama Cihazı
- AMPureMagnetik Çekici
- Pipet Takımı
- Elektroforez
- Santrifüj
- Vortex

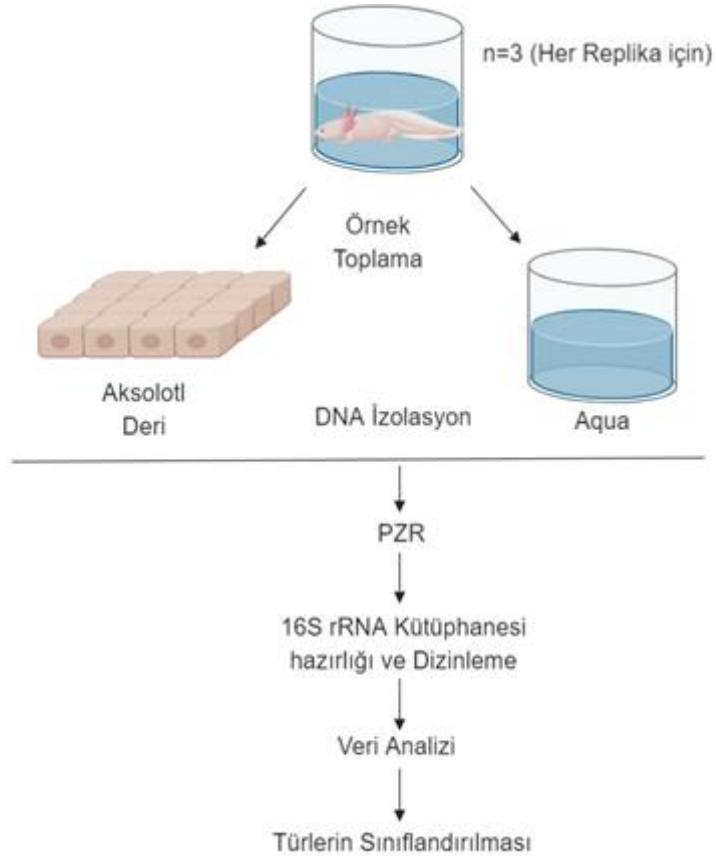
5.6. Anestezi

Ampütasyon işlemi gerçekleşmeden önce, aksolotlar Trikain Mesilat anestezi (Katalog numarası. E10521/ MS-222, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) ile anestezi altına alındı.

5.7. Ampütasyon ve Örneklerin Toplanması

Anestezi altına alınan hayvanlar, sağ ön uzvun zeugopod bölgesinin orta kısmından ampüte edildi. Ampütasyon sonrası aksolotlar 6 ayrı gruba bölünerek uzun rejenerasyon sürecinde gerçekleşen üç ana safhanın gözlemi yapıldı. Gruplar rejenerasyonun başlama süresine göre; 0. ve 1. gün (dpa0 ve dpa1) rejenerasyon başlangıç safhası, 4. ve 7. gün (dpa4 ve dpa7) erken blastema ve 30. ve 60. gün (dpa30 ve dpa60) geç blastema oluşumu olarak isimlendirildi. Günlere göre ayrılan gruplardan deri örnekleri toplandı. Aksolotlar arası varyasyonu azaltmak için, aksolotlardan alınan her üç örnekten havuz hazırlanarak, bu havuz bütün olarak kabul edildi. Örnekler toplandıktan hemen sonra sıvı azot ile hızlıca donduruldu ve -80 e konularak genomic DNA izolasyonu için muhafaza edildi. Dpa0 ve dpa1 deri örnekleri, kesim bölgesi çevresindeki yaklaşık 1 mm dokudan izole edildi. Dpa4 ve dpa7 deri örnekleri, yeni oluşturulan blastemanın kaldırılmasıyla, ampüte edilen bölgenin 0.5 mm arka doku bölgesinden çıkarılarak izole edildi, 0.5 mm arka dokunun seçilmesinin sebebi, kök / progenitör hücrelerin farklılaştırılması için önemli bir bölge olduğu bildirildi. Yeni oluşturulan uzuvlarda restore edilen dokuların mikrobiyom örneklerini almak için dpa30 ve dpa60 örnekleri, tekrar orijinal kesim bölgesinden toplandı.

Ayrıca akvaryumdaki sıvı içerisinde mikrobiyom kompozisyonunu analiz etmek için 3 aksolotldan 0. Günde, 3 aksolotldan 30.günde ve 3 aksolotldan 60.günde 100 mL su alındı. Alınan sular havuz haline getirilerek “Aqua” kontrol grubu oluşturuldu.



Şekil 5.3. Method işleyiş sırası

5.8. Genomik DNA İzolasyonu

Toplanandı örneklerinden genomik DNA'yı izole etmek için DNeasy Kan ve Doku Kiti (Qiagen, Katalog No. 69504) kullanıldı.

DNeasy Kan ve Doku Kiti protokolü:

- Sıvı azotla dondurulan -80 de bekleyen deri örnekleri bulunduğu dolaptan çıkarıldı.
- Ependorf tüpleri içerisindeki deri örneklerine 180 µl ATL tamponu ve 20 µl Proteinaz K Solüsyonu eklendi.
- Deri örnekleri tamamen çözülene dek 56 °C'de inkübe edildi.
- Ependorf tüpler homojenize olmaları adına 5 – 10 dakikada bir vortekslendi.
- Tamamen çözülen dokuların üzerine 200 µl AL tamponu eklenip tekrar vortekslendi.
- Örnekler 56 °C'de 5 dakika inkübe edildi.
- Ardından tüplere 200 µl saf etanol eklenerek homojenize olmaları için vortekslendi.
- Doku çözeltileri iyice pipetle karıştırılarak, DNeasy Mini kolon tüplerine aktarıldı.
- 1 dakika, 6000 x g'de santrifüj edildi. DNA, kolonlardaki membrana yapışması beklenildi.
- Toplama tüplerindeki sıvı kısım atık çöpüne döküldü.
- Spin kolonlarına 500 µl AW1 tamponu eklenerek 1 dakika, 6000 x g'de santrifüj edildi.
- Toplama tüplerindeki sıvılar atık çöpüne döküldü.
- Spin kolonlarına 500 µl AW2 tamponu eklenerek 3 dakika, 20000 x g'de santrifüj edildi.
- 1,5 ml hacimli siterilependorf tüpleri kolonların altına yerleştirildi.
- Spin kolonlarına 100-200 µl AE tamponu eklendi ve oda sıcaklığında, 1 dakika inkübe edildi.
- İnkübe ettikten sonra 1 dakika, 20000 x g'de santrifüj edildi.
- Bu basamakta membrana yapışan DNA, membrandan alındı.

Akvaryumdan alınan su örneklerinin izolasyonu için Metagenomik DNA izolasyon Kiti (Epicentre, katalog no: MGD08420) kullanıldı.

Metagenomik DNA izolasyon Protokolü:

- Alınan su örnekleri içerisinde bulunan atıkların ayrıştırılması için, örnekler siteril filtreden geçirildi.
- Hücreler filtrenin membranında birikir. Membran, siteril makas veya siteril pens yardımıyla alındı. Alınan membran 4 parçaya kesildi. Kesilen parçalar 50 ml likfalkon içerisine, membranda ki hücrelerin bulunduğu yüzey falkonun merkezinde olacak şekilde yerleştirildi.
- Falkon içindeki membran kurumadan önce, kit içerisinde bulunan 1 ml lik filtre yıkama tamponunun içine 2 µl Tween 20 eklendi. Hazırlanan %0.2 lik Tween 20- filtre yıkama tamponundan 1 ml alınarak, membranlarımızın bulunduğu 50 ml likfalkona eklendi. Yıkama sonucu membran yüzeyinde bulunan mikroorganizmalara ulaşıldı.
- Filtre parçalarını yeniden ıslatmak için tüpü düşük ayarda vortekslendi. Daha sonra ara ara 2 dakika boyunca ayarı en yüksek hıza yükseltilerek vortekslendi.
- Hücre süspansiyonunu temiz birmikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. Ardından hücreleri peletlemek için tüpü 2 dakika boyunca 14,000 x g'de santrifüjlendi. Santrifüj sonrasında süpernant atılarak pellet üzerinde deneye devam edildi.
- Pelleti 300 µl TE Tampon içinde yeniden süspanse edildi. Daha sonra hücre süspansiyonuna 2 µl Ready-Lyse Lysozyme solüsyonu ve 1 µl RNase A eklendi. Ardından vortekslendi.
- 37 °C de 30 dakika boyunca inkübe edildi.
- Tüpe 300 µl Metal Meta-Lizis Solüsyonu (2X) ve 1 µl Proteinaz K eklenerek vortekslendi.
- Tüm çözeltinin tüpün dibinde olmasını sağlamak için tüpü kısa süreli olarak santrifüjlendi.
- 65 °C de 15 dakika boyunca inkübe edildi.

- Oda sıcaklığına soğutun, daha sonra 3-5 dakika boyunca buza koyuldu.
- Tüpe 3 µl MPC Protein Precipitation Reaktifi eklenerek 10 saniye boyunca kuvvetlice vortekslendi
- Vorteks sonrası, 4 °C'de 14.000 x g'de 10 dakika boyunca santrifüjlendi.
- Santrifüj sonrası, 1,7 ml lik hacimli siteril yeni tüpe süpernant alınarak pellet biyoatığa atıldı.
- Süpernantın üzerine 570 µl izopropanol eklenerek tüp aşağı yukarı çevirilerek karıştırıldı.
- Karıştırılan tüp 4 °C'de 14.000 x g'de 10 dakika boyunca santrifüjlendi.
- Santrifüj sonrası tüpün içerisinde izopropanöl pipet yardımıyla alındı. Tüpün içerisinde sıvı bitene kadar bu işleme devam edildi.
- Pelletin üzerine 500 µl %70 ethanol eklenerek °C'de 14.000 x g'de 10 dakika boyunca santrifüjlendi.
- Santrifüj sonrası tüpün içerisinde ethanol pipet yardımıyla alındı. Tüpün içerisinde sıvı bitene kadar bu işleme devam edildi.
- Tüpün dibinde kalan pellet 8 dakika boyunca oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı.
- Pellet 50 ul' TE Tamponunun eklenerek yeniden süspanse edildi.

İzole edilmiş genomik DNA örneklerinin konsantrasyonlarını ölçmek için Qubit 2.0 Florometre (Thermo Fisher Scientific, MA, ABD) cihazı kullanıldı.

5.9. DNA'nın Analizi ve Konsantrasyon Ölçümü

İzolasyon sonrası elde edilen DNA'ların konsantrasyonlarını ölçmek için Qubit BR Test (ThermoFisher Kat. No. Q32850) kiti kullanıldı. Kit içerisinde bulunan özel reaktif boyar madde heliks yapıdaki DNA molekülüne bağlanır. Florometrik temele dayanan qubit cihazı reaktif madde ile boyanan DNA molekülünün konsantrasyonunu ölçer.

Qubit BR Test (ThermoFisher Kat. No. Q32850) kit Protokolü:

- Qubit BR Kit içerisinde bulunan reaktif boyar madde, 1:200 oranıyla kitin içinde yer alan BR Tamponu ile seyreltilerek ölçüm solüsyonu hazırlandı.
- Örnek ve standart ölçüm tüplerinin toplam hacmi 200 μ L olarak belirlendi.
- Her örnek için, hazırlanan ölçüm solüsyondan 197 μ L alınarak qubit tüpüne konuldu. Üzerine 3 μ L izole edilen örnekten eklenerek reaktif maddesinin daha iyi bağlanması için oda sıcaklığında iki dakika bekletildi.
- Kitin içinde yer alan 0.0 ng/ μ L ve 10 ng/ μ L konsantrasyonlara sahip standartlar ayrı tüplere her birinden 10 μ L hacminde alınarak boş qubit tüplerine konuldu. Üzerine 190 μ L hacminde hazırlanan ölçüm solüsyonundan eklendi. Oda sıcaklığında bekletildi.
- Oda sıcaklığında bekletilen ölçüm tüpleri, Qubit 2.0 cihazında okutuldu ve sıvı içindeki DNA konsantrasyonu ng/ μ L cinsinden tayin edildi.

5.10. Sekanslama İşlemi, Kümeleme ve Taksonomik Sınıflandırma

5.10.1. DNA'nın Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile Çoğaltılması

DNA izolasyonu ve konsantrasyon ölçümü yapılan örnekler ITS dizinlemesi için, özel primer setleri kullanılarak istenen bölge polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) termal döngü cihazında çoğaltıldı.

ITS dizinlemesi için kullanılan özel F ve R primerlerin 5' uçlarına Miseq dizileme adaptör sekansları eklenerek, her örnek için 2X KAPA HiFi Hot Start ReadyMix PCR Kiti kullanıldı. Toplam hacmi 25 μ l olan reaksiyon karışımının PZR amplifikasyonu için 12.5 ng saflaştırılmış DNA kullanıldı.

PZR protokolünde kullanılan sarflar ve miktarları;

- 1 µl genomik DNA (gDNA)
- 0,5 µl F primer
- 0,5 µl Rprimer
- 12,5 µl 2X KAPA HiFi Hot Start ReadyMix
- 10,5 µl dH₂O

Polimeraz Zincir Reaksiyonubasamakları tablo 3'te gösterilmektedir.

95°C de ilk denatürasyon	3 dakika
95°Cdedenatürasyon	30 saniye
55°Cdeprimer bağlanma	30 saniye
72°C de uzama	30 saniye
72°Cdeson uzama	5 dakika
12°C de	∞

Tablo 5.10.1: PZR reaksiyonu

25 döngü sonunda PCR ürünleri %1'lik agaroz jel elektroforezi ile analiz edildi. PCR döngüleri sırasında oluşan primer dimerlerinin temizlenmesi amacıyla, Agencourt AMPure XP kiti kullanılarak DNA pürifikasyonu yapıldı.

Saflaştırma sonrasında, örneğe özgü barkodlar eklenerek ikinci PZR işlemi gerçekleştirildi. İkinci PZR sonrasında tekrar DNA pürifikasyonu yapıldı. Pürifikasyonu

yapılan örneklerden havuz hazırlanarak, IlluminaMiSeq platformunda MiSeq Reaktif v2 500 döngü kiti kullanılarak dizilenme işlemi gerçekleştirildi.

5.10.2. Kütüphanenin Denatürasyonu ve MiSeq Cihazına Yüklenmesi

Sekanslama öncesi Phix kütüphanesinin hazırlığı yapıldı. 10nM Phix kütüphanesinden 2µl alınarak boş tüpe aktarıldı. Üzerine 3µl EB (Elüsyon tampon) eklendi. Phix-EBkarışımın üstüne 5 µl 0.2 N NaOH eklendi. Oda sıcaklığında 5 dakika bekletilerek Phix kütüphanesinin hazırlığı tamamlandı. Hazırlanan Phix kütüphanesi 990 µl HT1 Hibridizasyon çözeltisi ile karıştırıldı. Oluşan karışımın molaritesi 20 pM'dır. IlluminaMiSeq protokolünde karışımın molaritesini 12.5 pM yapmak için, hazırlanan son karışımdan 375 µl alındı ve üzerine 225 µl HT1 Hibridizasyon çözeltisi eklendi.

Daha önce hazırlanan ITS havuzumuz qubit ölçümü yapılması için -20 den çıkartıldı oda sıcaklığında buzun çözülmesi için beklenildi. IlluminaMiSeq dizinleme protokolüne göre havuzumuzun son qubit ölçümü 4nM olması veya 4 nM a yakın olması yeterli. Buzu çözülen havuzumuzdan 2 µl alınarak yeni qubit tüpüne konuldu üzerine 198 µl WS eklendi. 2 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra qubit ölçümü yapıldı. Qubit sonucu 5,5ng/µl olarak hesaplandı. Bu değeri 4 nM yapmak için;

$$\frac{5.5 \frac{ng}{\mu l} \times 1000000}{660 \times 630} = 13.2 \text{ nM}$$

$$13.2 \text{ nM} \times ? \mu l = 4 \text{ nM} \times 26 \mu l$$

$$? = 8 \mu l \text{ ITS havuz, } 26 \mu l - 8\mu l = 18\mu l \text{ EB}$$

Yapılan işlem sonucuna göre, 8 µl ITS havuzundan alındı ve 18 µl EB ile yeni tüpte karıştırıldı. Oluşan son karışımın qubit ölçümü yapıldı ve 1.53 ng/µl olarak gözlemlendi. Son karışımımızın 4 nM değerine yakınlığını ölçtük;

$$\frac{1.53 \frac{ng}{\mu l} \times 1000000}{(660 \times 630)} = \sim 3.7 \text{ nM}$$

Bulduğumuz sonuç, 4 nM e yakınlığından dolayı kabul edilebilir bir değer olduğu daha önce yapılan çalışmalarda gözlenmektedir.

IlluminaMiseq kütüphane dizinleme protokolüne devam edilerek bir sonraki adıma geçildi. Hazırladığımız 3,7 nM değerindeki karışımdan 5 µl alınarak üzerine 5 µl 0.2 N NaOH eklendi. Vortexlendikten sonra oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası 990 µl HT1 Hibridizasyon çözeltisi eklendi. Hazırlanan yeni karışım 20 pM olduğu gözlemlendi. 20 pM olan yeni karışımdan 360 µl alınarak üzerine tekrardan 990 µl HT1 Hibridizasyon çözeltisi eklendi. Karışımın son değeri 12 pM olduğu not alındı. Kullanılan Miseq dizinleme kiti V2 olduğu için, protokolde yazıldığı üzere, 12 pM olan son kütüphaneden 120 µl alınarak üzerine 120 µl ilk başta hazırladığımız 12,5 pM phix kütüphanesi eklendi ve vortexlendikten sonra flowcell distile su ile dikkatlice yıkanarak ve silinerek cihaza yerleştirildi. Hazırlanan 12 pM son kütüphane- 12,5 pM phix kütüphanesi karışımıMiSeq dizinleme cihazına yüklendi.

5.10.3. Kümeleme ve Taksonomik Sınıflandırma

Yeni nesil dizinlemesinden sonra elde edilen ham okumalar Cutadapt programı vasıtasıyla dizinlerdeki primer bölgeleri kesildi [133]. Primer bölgeleri kesilen ham okuma MG-RAST boru hattı ile analiz edilerek karşılıklı okumalar birleştirilerek ortalama kalitesinin altında kalan okumalar bir sonraki analizler için dışlandı. Daha önce birleştirilen okumaları operasyonel taksonomik üniteleri (OTU) oluşturuldu [134]. OTU tablosu elde edildikten sonra UCHIME (v.42) programı ile bütünleşmiş motoru (v.1.39.5) programı kullanılarak kimerik okumalar tarandı [135].

Grup içerisindeki fungal çeşitlilik ve zenginlik analizi için Alfa çeşitlilik analizi kullanıldı. Alfa çeşitlilik analizi içerisinde yer alan Shannon, Chao1 ve Gözlemsel OTU (Observed OTU) indeksleri kullanıldı. Sonuçlar birbirleriyle karşılaştırılarak gruplara ait OTU sayıları incelendi. İstatistiksel analiz Kruskal Wallis testi kullanılarak yapıldı.

5.10.4. Topluluk Yapılarının ve Çeşitliliğinin Çok Değişkenli Analizi

Gruplar arası fungal çeşitliliğın birbirine uzaklığı ve yakınlığının analizi için Beta çeşitlilik analiz yöntemi kullanıldı. Bray-Curtis benzerlik indeksi ve JACCARD, indeksi kullanılarak gruptaki mikobiyom benzerlikleri ve uzaklıkları gözlemlendi.

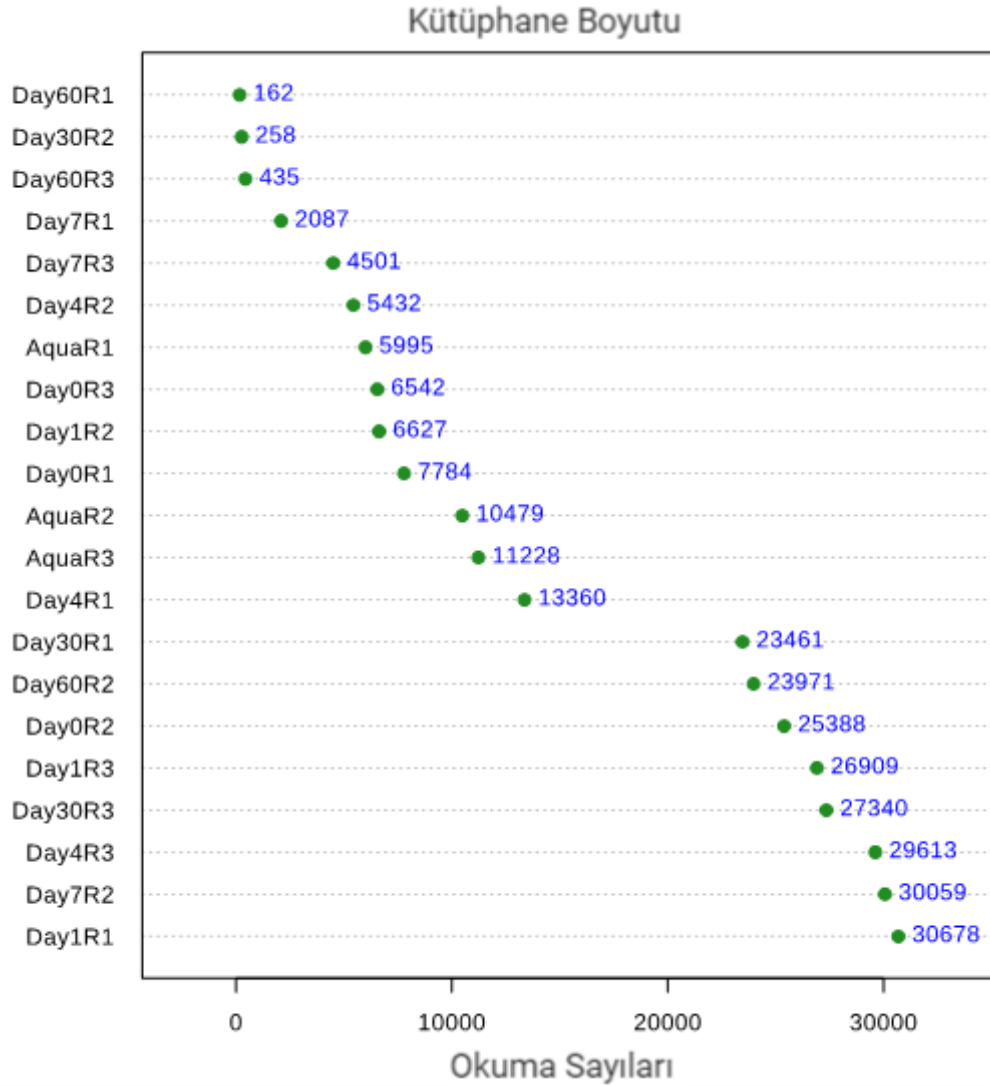
Gruplarda ki fungal topluluk farklılığı için DESeq2 analizi kullanıldı [136]. Grupların ısı haritası ve dilim korelasyonu için MicrobiomeAnalyst programı kullanılarak sonuçlar elde edildi [137].



6. BULGULAR

6.1. Biyoinformatik Analiz Verileri

Aksolotl uzvunda ki blastema oluşum s¼recinde mikobiyom yoğunluğunun ele alındığı bu tez çalışmasında ITS1/ITS2 hedefli uygun primer setleriyle çalışılarak, ileri nesil dizinlenme platformundan elde edilen sonuçlara g¼re, 18 aksolotl deri ¼rneęinden ve 3 akvaryum suyu ¼rneęinden 162 ile 30,678 arasında okuma sayısı elde edildi. Bu diziler de 3 filum, 23 familya, 20 t¼r g¼zlendi (şekil 6.1.).



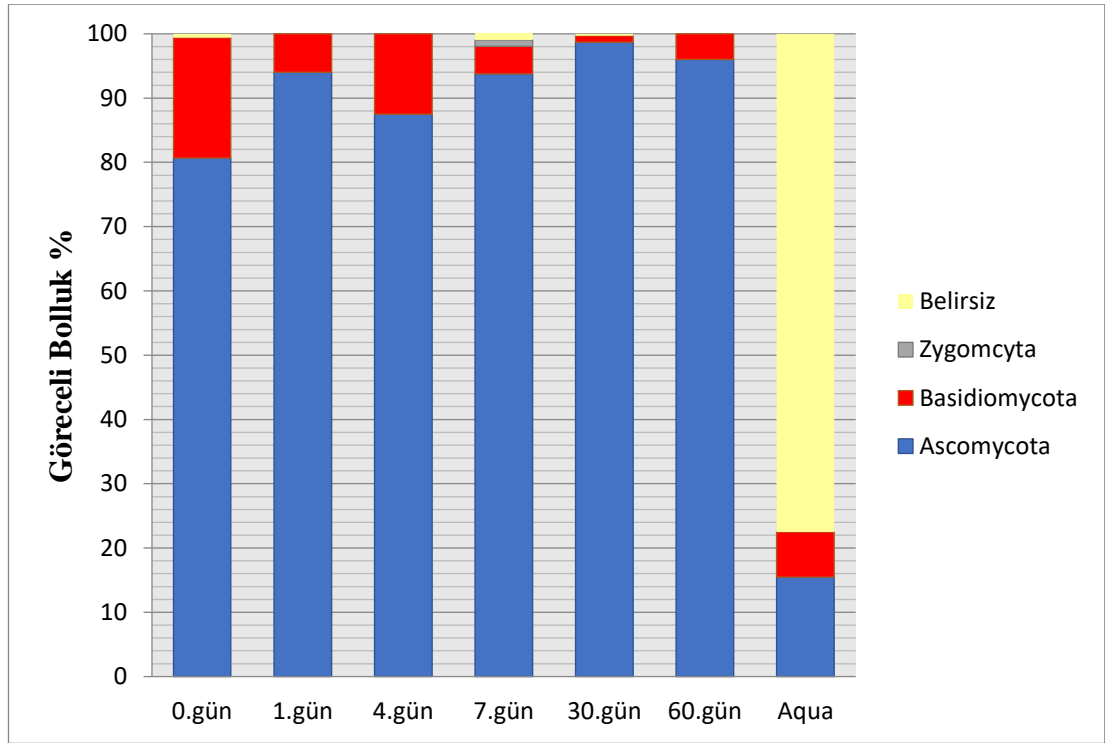
şekil 6.1. Miseq cihazına y¼klenen ¼rneklere elde edilen ITS dizin sayısı tablosu.

Dizin sayısı tablosunu incelediğimizde aynı deney g¼n¼ne ait replikalarda farklı okuma sayısı g¼zlendi (şekil 6.1.)

6.1.2. Taksonomik Çeşitlilik

Dizlenme sonrası yapılan analizler sonucu blastema oluşumu sürecinde ve akvaryum suyunda görülen mikrobiyal çeşitliliklerin sınıf, tür ve cinsinden taksonomik tabloları ve ısı haritaları aşağıda yer almaktadır.

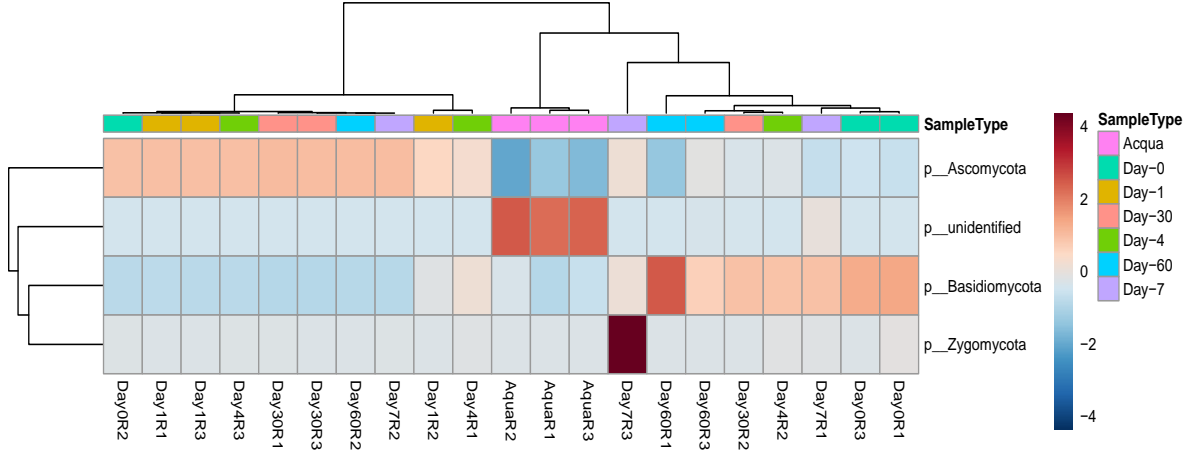
Ampütasyon sonrası, blastema öncesi sürecinden blastema oluşumu sonrasına kadar görülen mikrobiyom sınıf çeşitlilik grafiğinde, *Ascomycota* filumundaki fungus çeşitliliği diğer *Basidiomycota* ve *Zygomycota* filumlarda ki fungus çeşitliliğine göre fazladır. Fazla miktarda belirlenemeyen tür içeren akvaryum suyunda ki fungus çeşitliliği, diğer günlere oranla fungus çeşitliliğine ve zenginliğinin değişken olduğu gözlemlendi (Şekil 6.2).



Şekil 6.2. Gruplara ait taksonomik filum grafiği

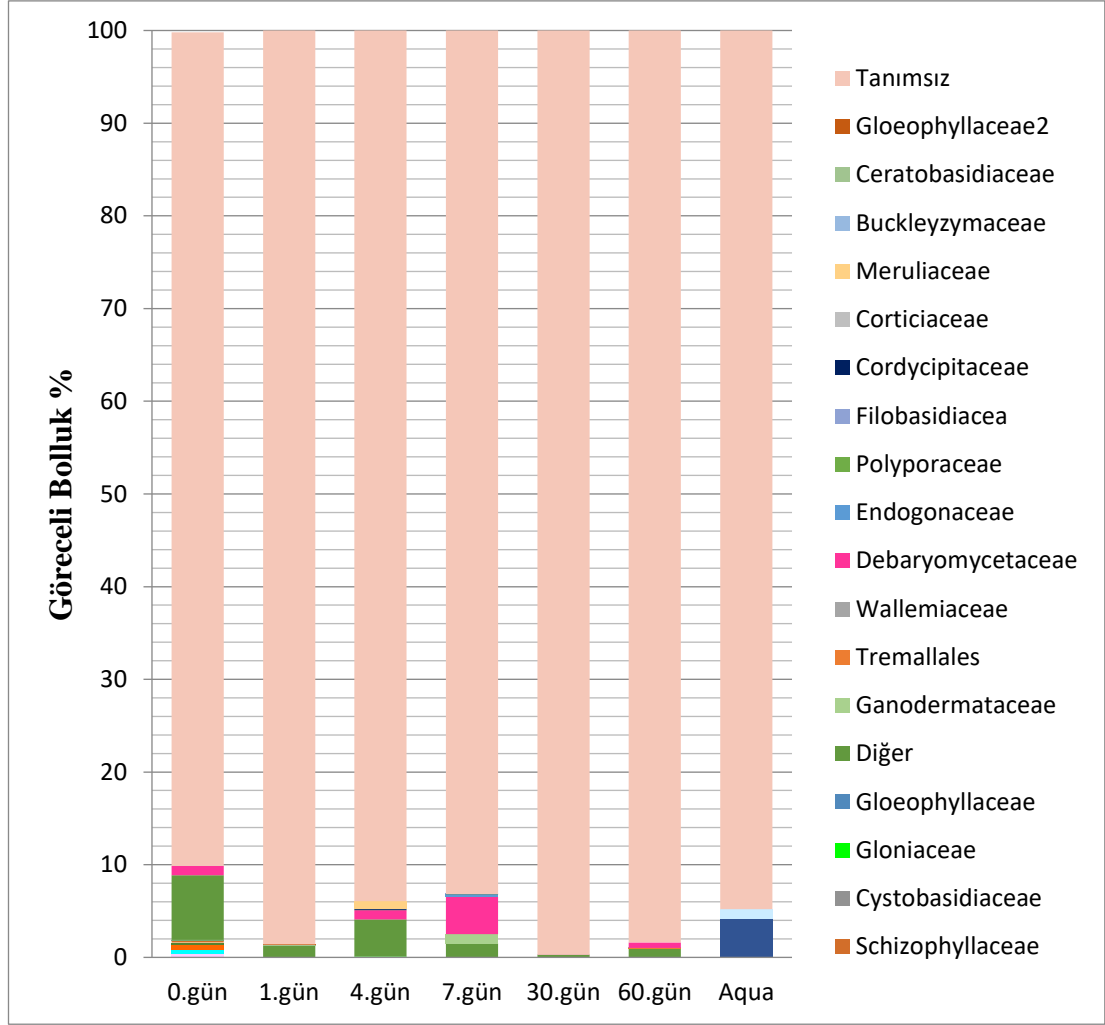
Blastema öncesi 0.gün örneğinde %18,75 *Basidiomycota*, %80,85 *Ascomycota* ve %0,6 belirsiz, 1, gün örneğinde %94 *Ascomycota* ve %6 *Basidiomycota* gözlemlendi. Erkenblastema 4.gün örneğinde %85,5 *Ascomycota* ve %12,5 *Basidiomycota*, 7.gün örneğinde ise %93,75 *Ascomycota*, %4,9 *Basidiomycota*, %1 *Zygomycota* ve %1,3

belirsiz filum gözlemlendi. Blastema 30.gün örneğinde %98,7 *Ascomycota*, %1 *Basidiomycota* ve %0,3 belirsiz filum, 60.gün örneğinde ise %96 *Ascomycota* ve %4 *Basidiomycota* filum gözlemlendi. Bu analizler blastema öncesi ve oluşumu boyunca incelenen günler arasında incelenen mikrobiyom çeşitlilik farkının az olduğunu göstermektedir (Şekil 6.3).



Şekil 6.3. Şekil blastema öncesi ve blastema oluşum sürecinde günlere bağlı örneklerin biyolojik replikalarının filum düzeyinde ısı haritası.

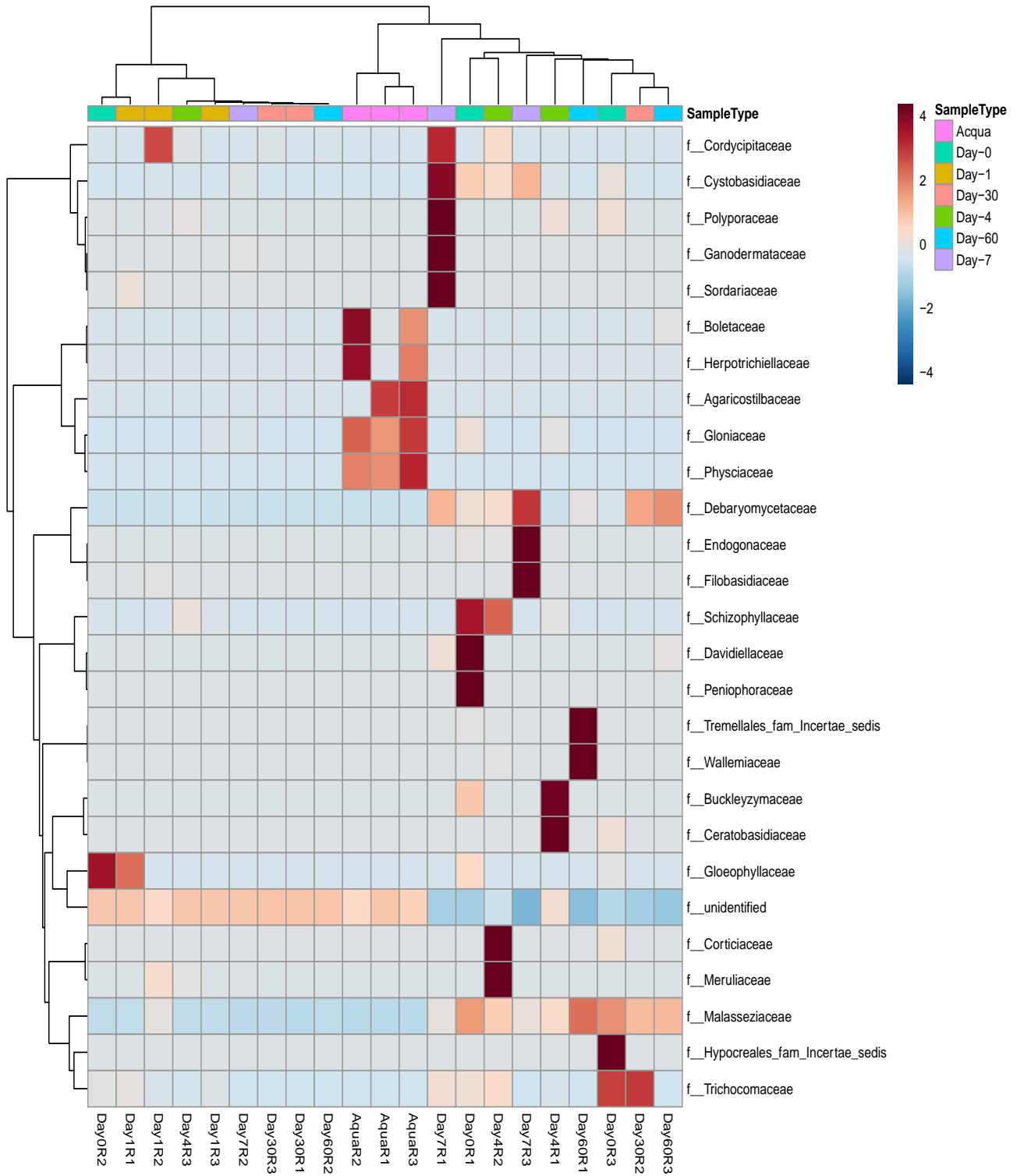
Filum düzeyindeki ısı haritasını incelersek (Şekil 6.3), 7.günün 3.replikasında diğer günlerden farklı olarak *Zygomycota* filumu baskındır.



Şekil 6.4. Gruplara ait taksonomik familya grafiği

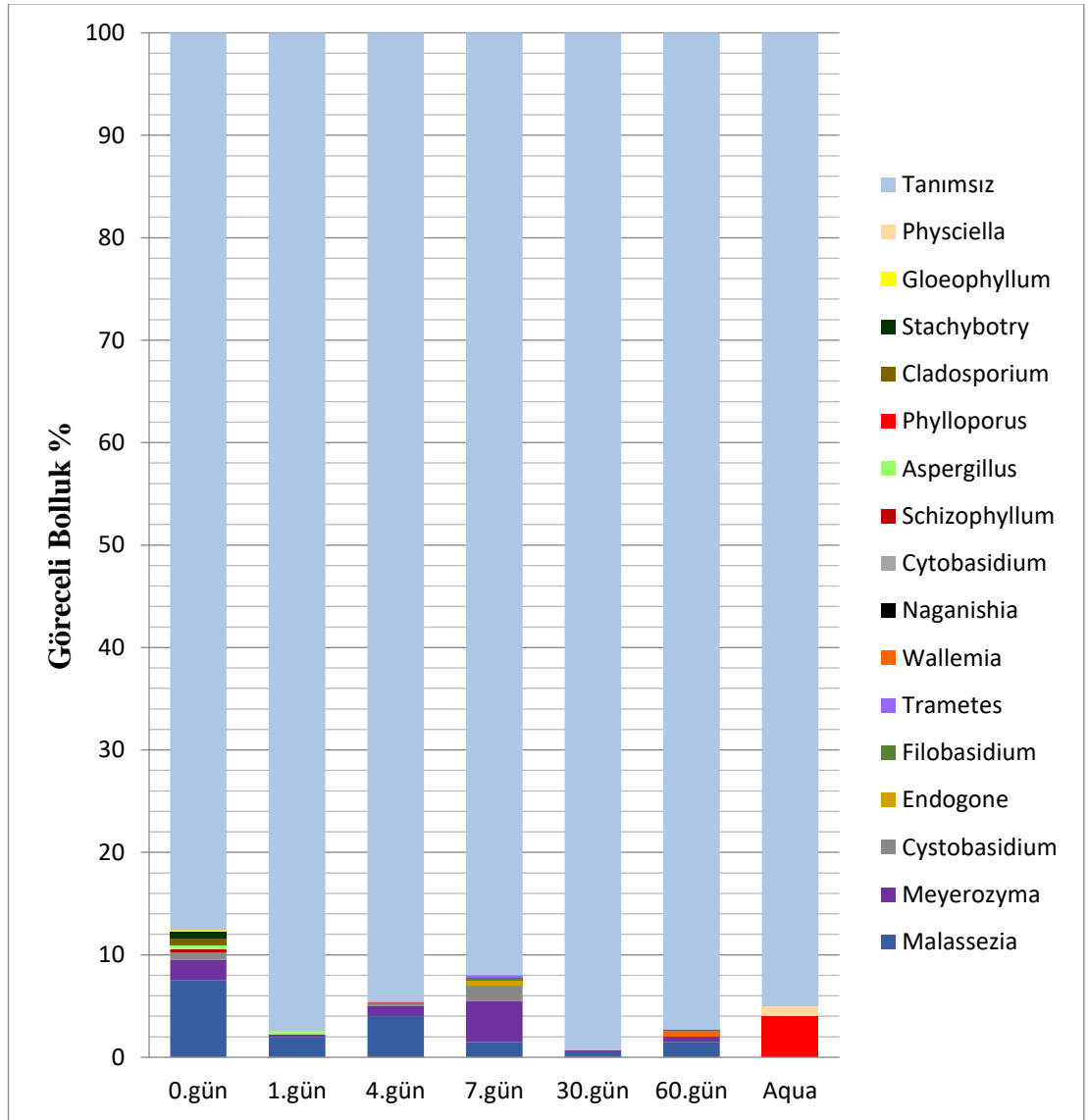
Familya düzeyinde ise (Şekil 6.4), yukardaki grafikte görüldüğü üzere günlere bağlı mikrobiyom topluluğunda farklılıklar gözlenmektedir. Ampütasyon sonrasında kesilen dokudan alınan 0.gün örneği mikrobiyom çeşitliliği bakımından gözle görülür şekilde diğer günlerden ayrılmaktadır. Ampütasyon sonrası yara epiteli oluşmuş olan 1.gün örneğinde mikrobiyom çeşitliliği biranda azalmaktadır. 1.günde %0,06 *Buckleyzymaceae*, %0,05 *Ceratobasidiaceae* ve %0,05 *Gloeophyllaceae* familyaları gözlenildi. 4.gün de mikrobiyom çeşitliliği artmaya başlamıştır; %1 *Debaryomycetacea*, %0,007 *Polyporaceae*, %0,1 *Gloniaceae*, %0,08 *Cordycipitaceae*, %0,08 *Corticiaceae*, %0,8 *Meruliaceae* ve %0,007 *Schizophyllaceae* familyaları gözlemlendi. 7.günde 4.güne oranla bazı familya çeşitliliği aynı kalmakla beraber değişiklik gösteren familyalarda gözlemlendi. %4

Debaryomycetacea, %0,3 *Endogonaceae*, %0,015 *Polyporaceae*, %1 *Ganodermataceae*, %0,009 *Filobasidiaceae* ve %0,009 *Cordycipitaceae* familyaları gözlemlendi. 4.gün ve 7.gün karşılaştırıldığında aynı olan üç familyada, *Debaryomycetacea*, *Cordycipitaceae* ve *Polyporaceae*, 7.gün de bir artış gözlenmektedir. 30.günde mikobiyom çeşitliliğinde bir azalma gözlemlendi. 30.günde %0,008 *Debaryomycetacea* ve %0,3 belirlenemeyen familya çeşitliliği gözlemlendi. 60.günde alınan örneklerde ise, azalan mikobiyom çeşitliliğinde bir artış gözlenmektedir. %0,6 *Debaryomycetacea*, %0,009 *Tremallales*, %0,006 *Malasseziaceae* ve %0,009 *Wallamiaceae* familyaları gözlenmiştir (Şekil 6.4).



Şekil 6.5. Blastema öncesi ve blastema oluşum sürecinde günlere bağlı örneklerin biyolojik replikalarının ailesel düzeyinde ısı haritası.

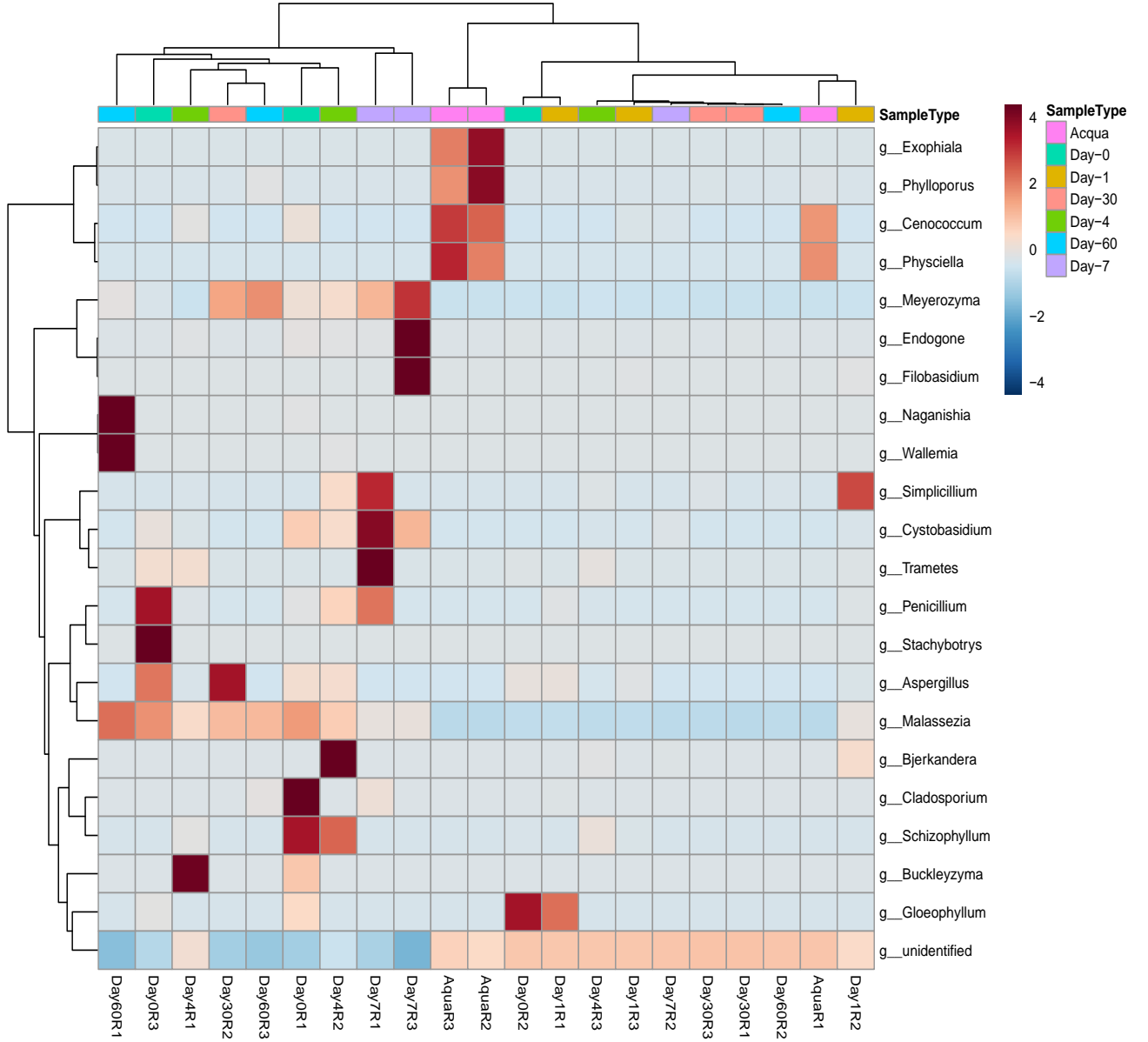
Taksonomik ailya düzeyinde ısı haritasına göre (Şekil 6.5), aqua replikalarında grlen fungus ailyaları diğer deney günlerinden anlamlı olarak ayrılmıştır. 7.günde grlen fungus ailyaları da diğer deney gruplarından farklı olarak anlamlı olarak ayrılmıştır. 0.günde diğer deney gruplarında görülmeyen *Schizopyllaceae*, *Davidiellaceae*, *Peniophoraceae* gibi ailyalar fazla miktarda gözlendi. 4.günde fazla miktarda *Buckleyzyma*, *Corticiaceae* ve *Meruliaceae* ailyaları gözlendi.



Şekil 6.6. Gruplara ait taksonomik cins grafiği.

Cins düzeyinde yapılan analizler sonucu (Şekil 6.6), 0.günde %7,5 *Malassezia*, %2 *Meyerozyma*, %0,7 *Cladosporium*, %0,35 *Aspergillus*, %0,35 *Schizophyllum*, %0,7 *Cystobasidium*, %0,7 *Stachybotry*, %0,10 *Gloeophyllum* cinsi gözlemlendi. 1.günde %2 *Malassezia* ve %0,25 *Meyerozyma* ve %0,25 *Aspergillus* cinsi gözlenmektedir. 4.günde %4 *Malassezia*, %1 *Meyerozyma*, %0,30 *Cystobasidium* ve %0,10 *Schizophyllum* cinsleri gözlemlendi. 7.günde %1,5 *Malassezia*, %4 *Meyerozyma*, %1,5 *Cystobasidium*, %0,5 *Endogone*, %0,25 *Filobasidium* ve %0,25 *Trametes* cinsi gözlemlendi. 30.günde %0,5 *Malassezia* ve %0,2 *Meyerozymacinsleri* gözlemlendi. 60.günde ise %1,5 *Malassezia*, %0,55 *Meyerozyma*, %0,5 *Wallemia* ve %0,1 *Naganishia* cinsi gözlemlendi. Diğer grafiklerde de görüldüğü gibi güne bağlı olarak mikrobiyom cinslerinde artış ve azalmalar gözlenmektedir.

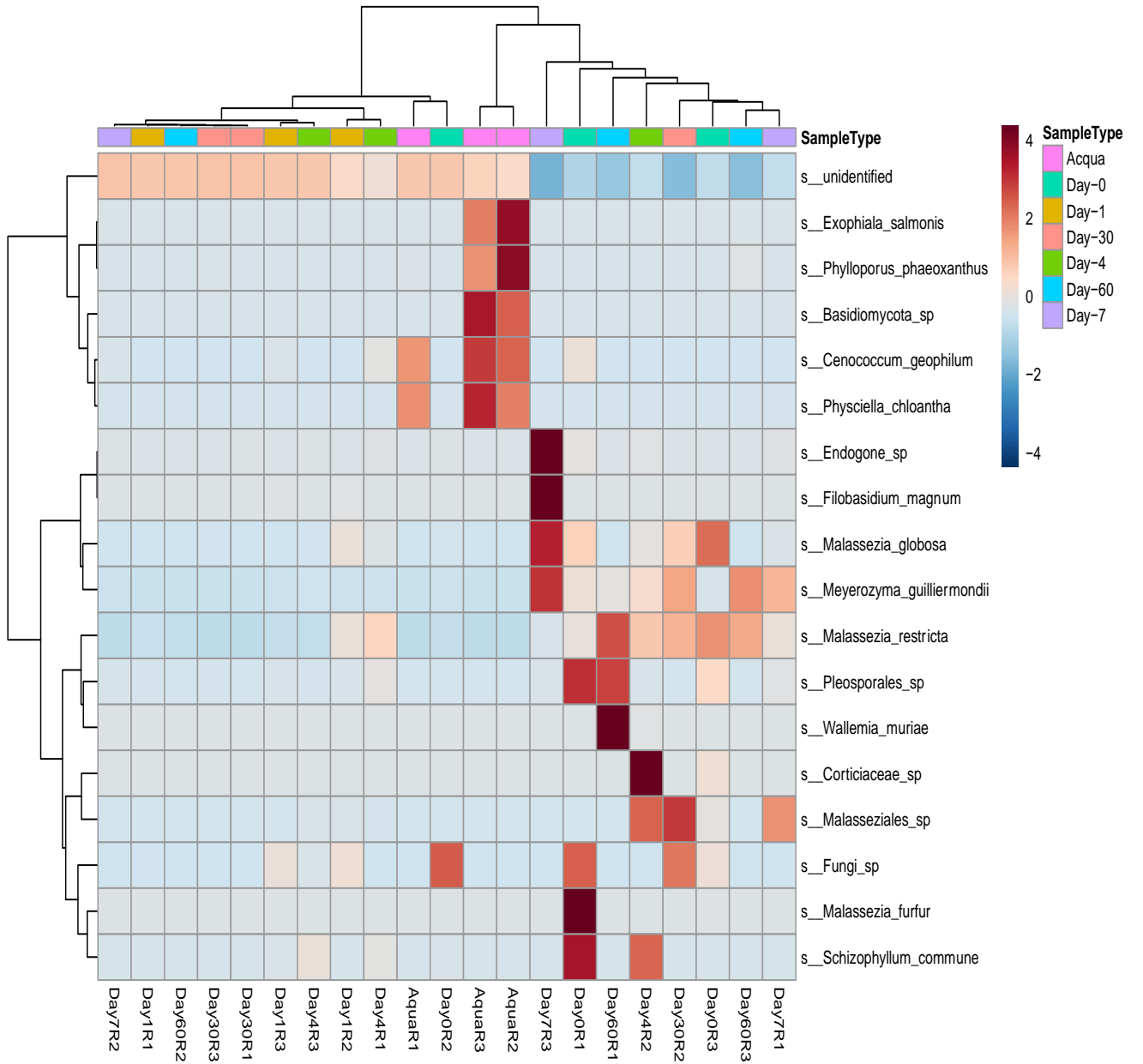




Şekil 6.7. Blastema öncesi ve blastema oluşum sürecinde günlere bağlı örneklerin biyolojik replikalarının cins düzeyinde ısı haritası

Taksonomik cins düzeyinde ısı haritasına göre (Şekil 6.7), aqua replikalarında görülen fungus cinsleri diğer deney günlerinden anlamlı olarak ayrılmıştır. 7.günde görülen fungus cinsleri de diğer deney gruplarından farklı olarak anlamlı olarak ayrılmıştır. 60.günde diğer deney gruplarında görülmeyen *Wallemia* ve *Naganishia* cinsleri fazla miktarda gözlendi. 4.günde fazla miktarda *Bucklezyma* cinsi gözlendi.



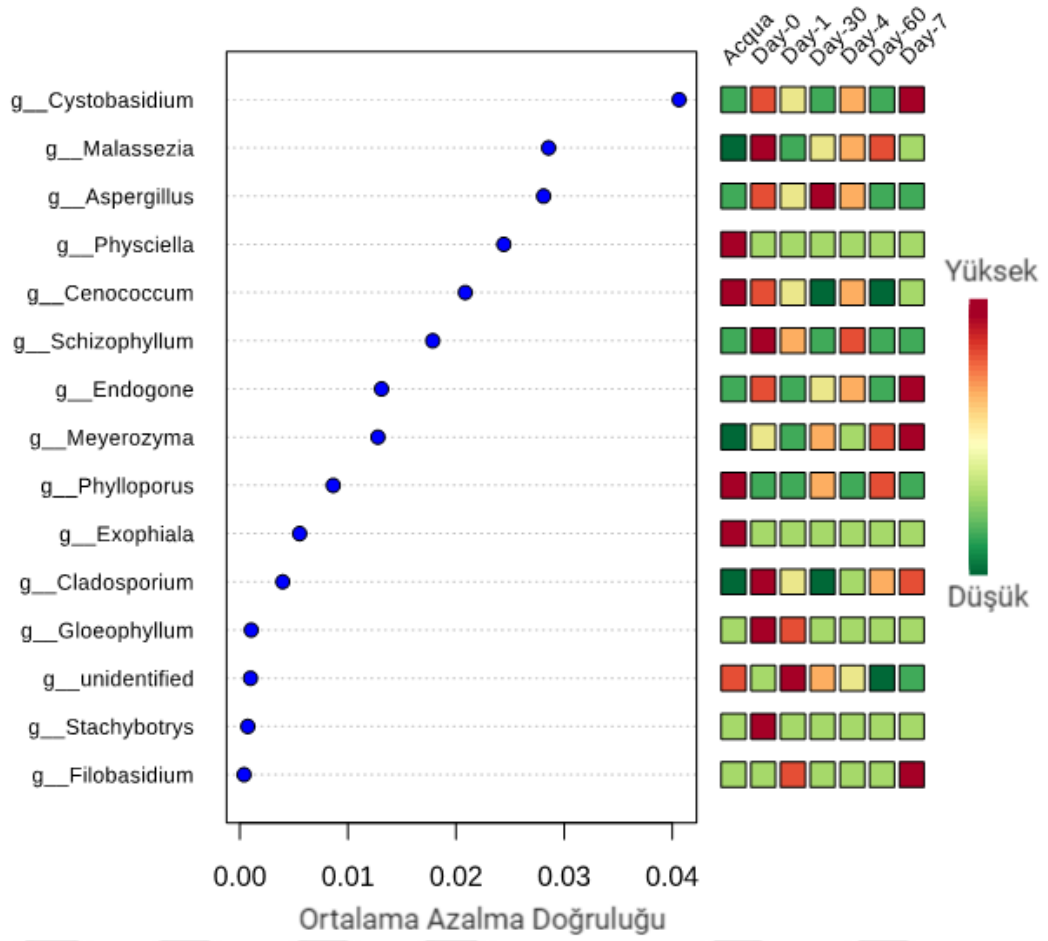


Şekil 6.8. Blastema öncesi ve blastema oluşum sürecinde günlere bağlı örneklerin biyolojik replikalarının tür düzeyinde ısı haritası

Taksonomik tür düzeyinde ısı haritasına göre (Şekil 6.8), aqua replikalarında görülen fungus türleri diğer deney günlerinden anlamlı olarak ayrılmıştır. 7.gün R3 grubunda görülen fungus türleri diğer deney gruplarından farklı olarak anlamlı olarak ayrılmıştır. 60.günde diğer deney gruplarında görülmeyen *Wallemia spp.* fazla miktarda gözlemlendi.

İnsan deri mikrobiyotasında yer alan *Malassezia spp.* 0.gün ve 30.gün de fazla miktarda gözlemlendi (Şekil 6.8).



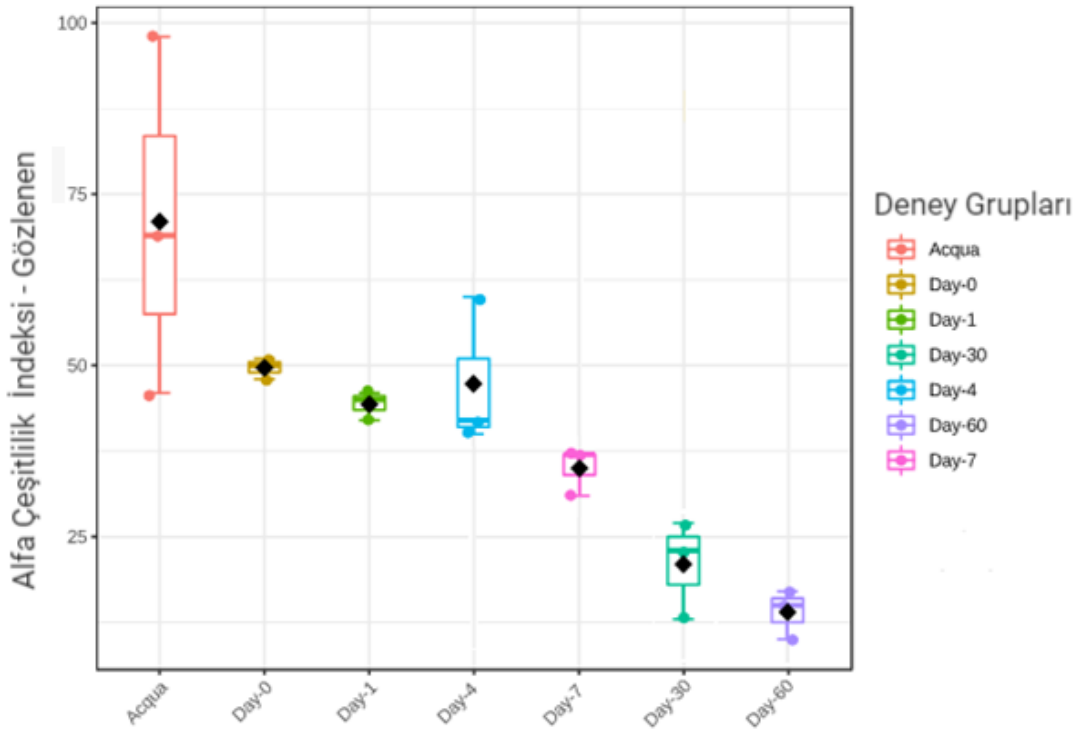


Şekil 6.9. Blastema oluşumu sürecinde deney gruplarında baskın olan fungus cinsleri.

Şekil 6.9 yi incelediğimizde insan deri fungus mikrobiyotasının üyesi olan *Malassezia* spp. 0.gün ve 60.gün fazla olduğu gözlemlendi. *Meyerozyma* cinsi 7.günde gözlemlendi.

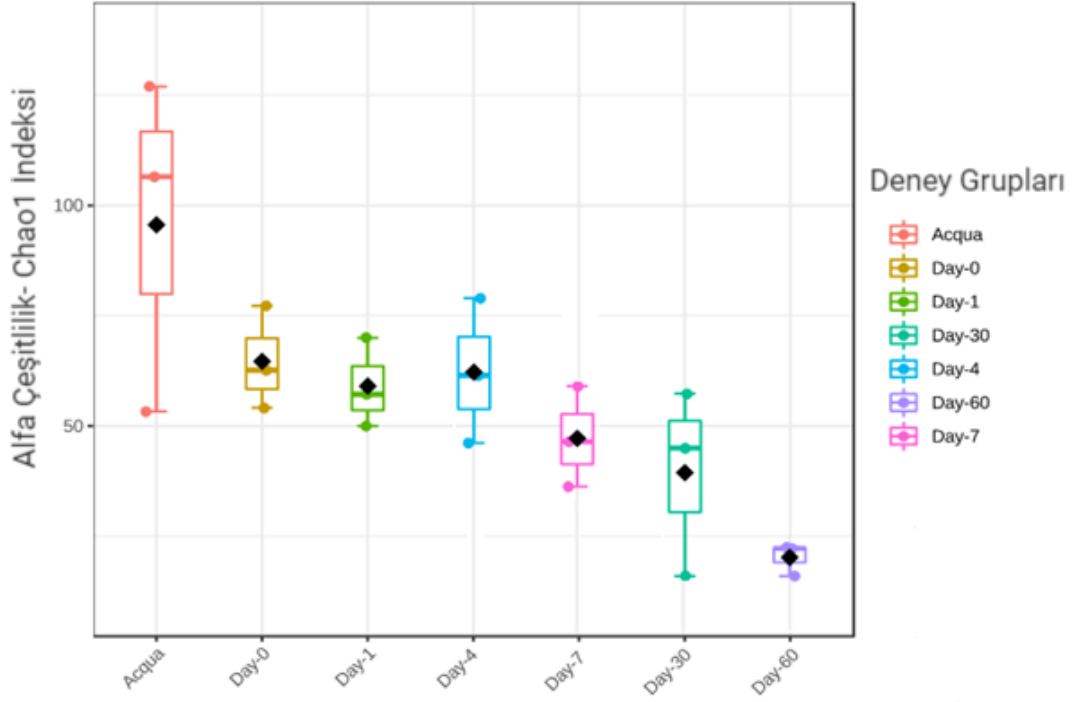
6.2. Alfa Çeşitlilik Analizi

Blastema öncesi ve blastema oluşum sürecindeki mikrobiyom tür çeşitliliği ve zenginliğini anlamak için alfa çeşitlilik ölçümleri kullanıldı. Alfa çeşitlilik analizine göre, kontrol olarak kullanılan akvaryum suyundan alınan örneklerde ki mikrobiyom zenginliği ve çeşitliliği diğer örneklerle oranla daha fazla olduğu gözlemlendi. Blastema öncesi (0.gün ve 1.gün) alınan örneklerde ise, erken blastema oluşumuna ve blastema sonrasına oranla mikrobiyal çeşitliliği fazla olduğu gözlemlendi. Blastema oluşumu sürecinde 30.gün ve 60.gün de alınan örneklerde mikrobiyal çeşitlilik diğer örneklerle oranla görülür bir şekilde azdır (Şekil 6.10.).



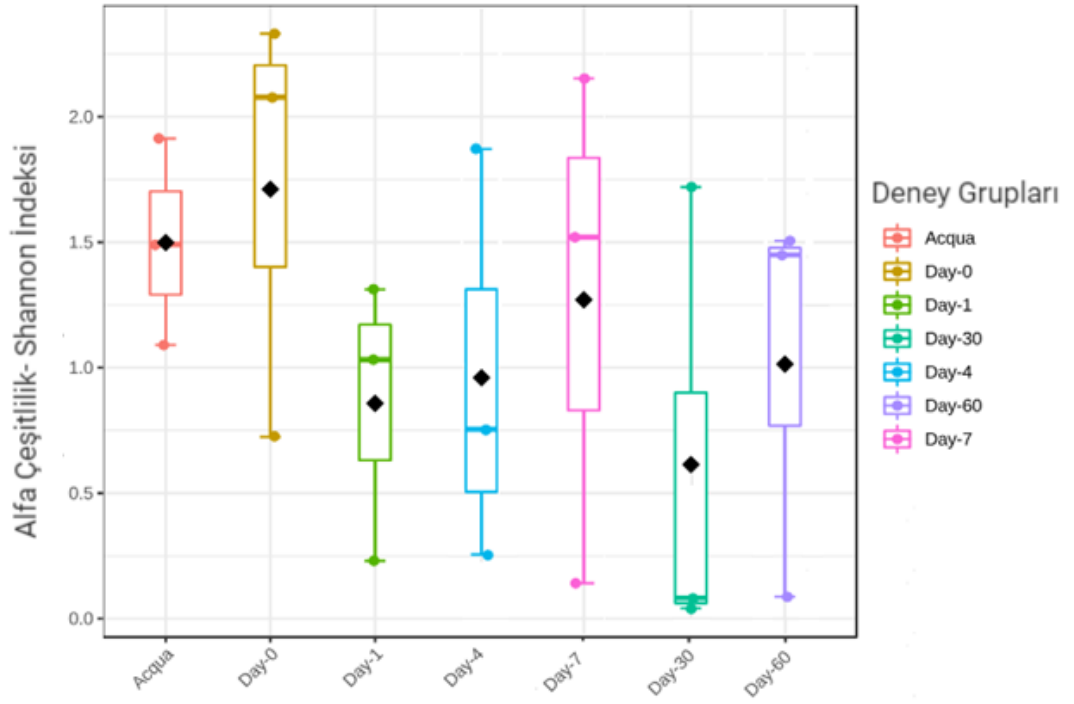
Şekil 6.10. Günlere ait Alfa çeşitlilik analiz grafiği.

Farklı indeksler kullanılarak elde edilen grupların karşılaştırmalı alfa çeşitlilik grafikleri; Chao1 indeksi ve Shannon indeksi aşağıda yer almaktadır.



Şekil 6.11. Chao1 indeksiyle hesaplanan çeşitlilik analiz grafiği

Chao1 indeksi tahmin analizidir. Eğer bütün mikrobiyal data dizinlenmiş ve analiz edilmiş olsaydı deney gruplarındaki fungus mikrobiyota zenginlik ve çeşitliliğinde ne gibi değişiklik olabileceği hakkında bilgi verir. Bu indeksin grafiğini incelediğimizde aqua kontrol grubu içeriisindeki fungus mikrobiyota çeşitliliği diğer deney gruplarına göre anlamlı olarak fazladır. Ampütasyon sonrası blastema oluşum süreci ve uzuv gelişimi boyunca dolaylı olarak fungus mikrobiyal çeşitliliğinde azalma gözlemlendi (Şekil 6.11).

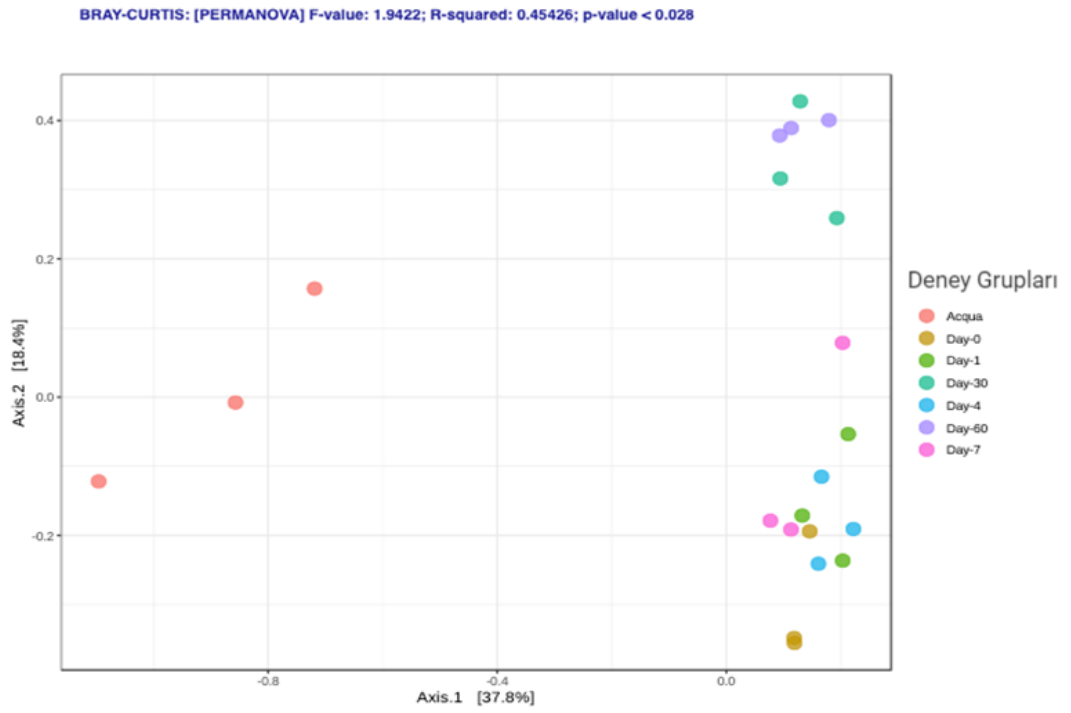


Şekil 6.2. Shannon indeksi ile elde edilen alfa çeşitlilik analiz grafiği

Shannon indeksi deney grupları içerisindeki fungus mikrobiyota çeşitliliğinin ne kadar farklı olduğuna aynı zamanda fungus mikrobiyal dağılıma bakar. Grafik incelendiğinde bazı baskın fungus türlerinin dağılımı günlere göre değişiklik gösterdiği gözlemlendi (Şekil 6.12).

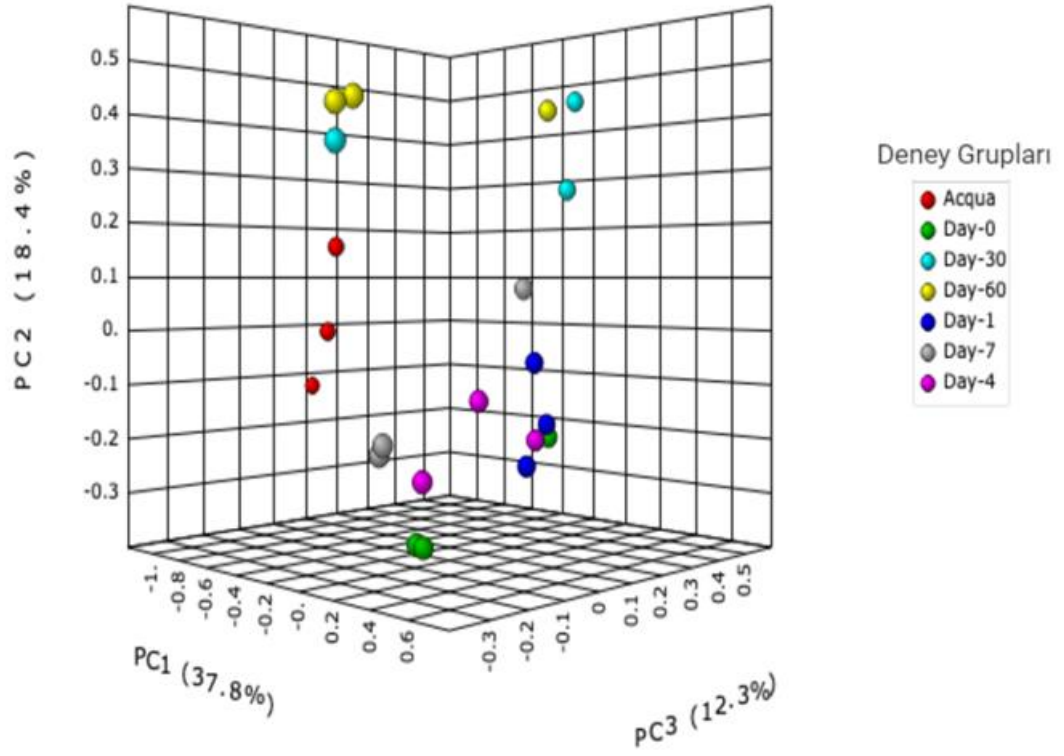
6.3. Beta Çeşitlilik Analizi

Sekanslama sonrası elde edilen OTUs tablosu kullanılarak örnekler arası mikrobiyal çeşitlilik beta analizi yapıldı. Beta çeşitlilik analizleri deney grupları arasındaki mikrobiyal zenginliğini karşılaştırır. Bray-Curtis ve Jaccard Distance indeksleri kullanılarak deney grupları arasındaki fungus mikrobiyota çeşitliliği gözlemlendi.



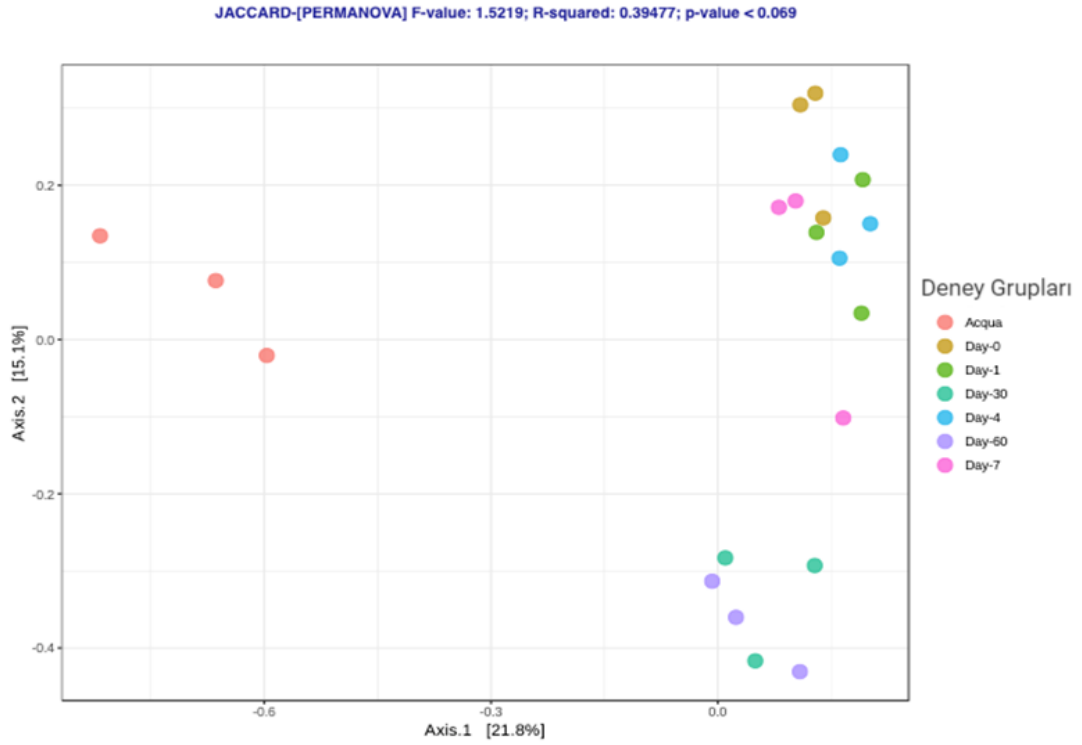
Şekil 6.3. Bray-Curtis indeksi, gruplar arası mikrobiyal topluluk farklılıklarının gösterildiği beta çeşitlilik grafiği

Bray-Curtis indeksine göre aqua grubuna ait replikaların bir arada kümeleştiği gözlemlendi (Şekil 6.13.) Diğer deney gruplarının kümeleşmesi çok net görünmediği için 3 boyutlu grafikte Bray-Curtis indeksi analizi yapıldı. $P < 0.028$ değerine göre gruplar arasında fungus mikrobiyota topluluk çeşitlerinde anlamlı sonuç gözlemlendi.



Şekil 6.14. Blastema öncesi ve blastema oluşum sürecindeki örneklerin Beta çeşitlilik PcoA plot indeksi ile gösterimi.

3 boyutlu Bray-Curtis indeksine göre, her deney grubundaki replikalar birbirinden ayrıldığı ve 0.gün örnekteki fungus mikrobiyota çeşitliliğinin 30.gün ve 60.gün örneklerindeki çeşitliliğe göre anlamlı olarak ayrıştığı gözlemlendi (Şekil 6.14).



Şekil 6.15. Jaccard indeksi, gruplar arası mikrobiyal topluluğu farklılıklarının gösterildiği beta çeşitlilik grafiği.

Jaccard indeksine göre Bray-Curtis indeksinde gözlenen sonuca benzer sonuç gözlemlendi. Aqua örnekleri kendi arasında kümeleştirme oluştururken diğer örneklerde bir karışıklık gözlemlendi (Şekil 6.15). $P < 0.069$ değerine göre gruplar arası fungus mikrobiyota topluluk çeşitlerinde anlamlı sonuç gözlemlenmedi (Şekil 6.15.).

6.4.Fungus ve Bakteri Profili Korelasyon Analizi

Akvaryum suyundan toplanan örneklerden elde edilen taksonomik çeşitlilik ve beta çeşitlilik sonuçlarına göre, mikrobiyal çeşitlilik blastema oluşum sürecinde görülen mikrobiyal çeşitlilikten oldukça farklı olduğu gözlemlenmiştir. Bu sonucu yorumlarsak, akvaryum suyunda gözlenen organizmaların deri üzerinde koloni olamadığını, koloni olmaları için uygun çevre koşullarının yoksunluğunun en büyük etken olabileceği düşünülmektedir.

Aksolotl kol rejenerasyonundaki bakteri mikrobiyota profil analizinin taksonomik filum düzeyinde 0.gün, 1.gün, 4.gün, 30.gün ve 60.gün örnek replikalarında görülen bakteri topluluk çeşitliliği birbirine yakın olmasına rağmen 7.gün R3 örneği diğer 7.gün replikalarından bakteri topluluk çeşitliliği bakımından anlamlı olarak ayrılmaktadır. 7.gün R3 örneğinde *Verrucomicrobia* filumu gözlenmemektedir [138]. Aksolotl kol rejenerasyonundaki fungus mikrobiyota profil analizindeki filum düzeyindeki topluluğa göre, deney günlerinde görülen filum düzeyindeki fungus çeşitliliği replikalarda farklılık gösterdi. Özellikle 7.gün R3 örneğinde gözlenen *Zygomycota* filumu diğer deney gruplarında gözlenmedi.

Aksolotl rejenerasyonundaki bakteri profil analiz sonuçlarındaki kontrol aqua grubunda gözlenen filumlar *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Bacterioidetes*, *Proteobacteria* and *Verrucomicrobia* diğer deney gruplarda gözlenen filumlar ile aynıdır [138]. Fungus mikrobiyota profil analizlerine göre aqua kontrol grubunda görülen filumlar belirlenemeyen ve bu filumların diğer deney gruplarından tamamen farklı olduğu gözlemlendi.

Aksolotl rejenerasyonundaki bakteri profil analizindeki beta çeşitlilik sonucunda 4.gün örnekleri ve 7.gün örneklerinin bir arada kümeleşmesi beklenirken 7.gün R1 ve R3 örnekleri kümeden uzaklaşmaktadır. Rejenerasyon mekanizmasında gözlenen en önemli safhaları temsil eden deney günleri kendi içlerinde kümeleşmiştir [138]. Fungus mikrobiyota profil analizindeki beta çeşitlilik indeksinde deney günleri replikaları kendi içlerinde kümeleşmediği gözlemlendi.

Veriler normal dağılım göstermediği için (Shapiro-Wilk testi sonucu $p < 0.05$) Spearman korelasyon testi kullanıldı. Filum düzeyindeki fungus ve bakteri profil korelasyon analiz sonuçlarına göre, aşağıda belirtildiği gibi bazı filumlar arasında pozitif korelasyon bazılarında ise negatif korelasyon gözlemlendi (Şekil 6.16).

		Basidiomycota	Zygomycota	Actinobacteria	Firmicutes	Bacteroidetes	Proteobacteria	Verrucomicrobia	Diğer (Fungus)	Diğer (Bakteri)
Ascomycota	Correlation Coefficient	-.524 [*]	-.200	.035	.332	-.043	-.207	.235	-.124	.239
	Sig. (2-tailed)	.015	.386	.880	.142	.852	.368	.305	.593	.297
	N	21	21	21	21	21	21	21	21	21
Basidiomycota	Correlation Coefficient		-.184	-.332	.280	.244	-.086	.265	-.294	-.082
	Sig. (2-tailed)		.424	.141	.219	.287	.711	.245	.196	.725
	N		21	21	21	21	21	21	21	21
Zygomycota	Correlation Coefficient			-.371	-.260	.370	-.370	-.353	-.140	-.383
	Sig. (2-tailed)			.097	.254	.099	.099	.117	.546	.087
	N			21	21	21	21	21	21	21
Actinobacteria	Correlation Coefficient				.044	-.754 ^{**}	.285	.181	.262	.320
	Sig. (2-tailed)				.860	.000	.210	.432	.252	.157
	N				21	21	21	21	21	21
Firmicutes	Correlation Coefficient					-.292	-.579 ^{**}	.699 ^{**}	-.397	.429
	Sig. (2-tailed)					.200	.006	.000	.075	.053
	N					21	21	21	21	21

Şekil 6.16. Filum düzeyinde Bakteri ve Fungus korelasyon analizi.

		Basidiomycota	Zygomycota	Actinobacteria	Firmicutes	Bacterioidetes	Proteobacteria	Verrucomicrobia	Diger (Fungus)	Diger (Bakteri)
Bacterioidetes	Correlation Coefficient						-,207	-,302	-,322	-,624**
	Sig. (2-tailed)						,367	,183	,155	,002
	N						21	21	21	21
Proteobacteria	Correlation Coefficient							-,550**	,356	,153
	Sig. (2-tailed)							,010	,113	,507
	N							21	21	21
Verrucomicrobia	Correlation Coefficient								-,328	,350
	Sig. (2-tailed)								,147	,120
	N								21	21
Diger (fungus)	Correlation Coefficient									-,031
	Sig. (2-tailed)									,894
	N									21

- Ascomycota*Basidiomycota ($r = - 0.524$; $p = 0.015$)
- Actinobacteria*Bacteroidetes ($r = - 0.754$; $p = 0.000$)
- Firmicutes* Proteobacteria ($r = - 0.579$; $p = 0.006$)
- Firmicutes* Verrucomicrobia ($r = 0.699$; $p = 0.000$)
- Bacteroidetes*Diğer Bakteri ($r = -0.624$; $p = 0.002$)
- Proteobacteria* Verrucomicrobia ($r = -0.550$; $p = 0.010$)



7. TARTIŞMA

Aksolotl, yüksek rejenerasyon kapasitesine sahip, hayat boyu neotenik formda kalan amfibidir. Bu yüksek rejenerasyon kapasitesine sahip olması sebebiyle birçok araştırma konusunda başrol olarak yer almaktadır. Rejenerasyon çalışmalarında kullanılan bu model organizmanın mekanizmasını anlamak, gelecekteki rejenerasyona çalışmalarına ışık tutmaktadır. Son zamanların önemli konularından olan mikrobiyota ve konak ilişkisi, konağın vucüt içerisinde ki fonksiyonlarını anlamamıza yardımcı olmaktadır.

Bu tez çalışmasında aksolotl uzuv ampütasyon sonrası blastema oluşumu sürecinde, mikrobiyom topluluk profilinin ve önceki çalışmalarla ortaya konan bakteri mikrobiyota topluluk profilinin aksolotl uzuv rejenerasyon sürecindeki değişimlerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Blastema öncesi, erken blastema oluşumunda ve blastema oluşumu sürecin içerisinde doku örnekleri toplanarak DNA izolasyonu ardından PZR amplifikasyondan elde edilen özel bölgeleryeni nesil dizinleme teknolojisi ve biyoinformatik araçlar yardımıyla fungus çeşitliliği analizi yapıldı.

Taksonomik çeşitlilik sonuçlara göre, tüm örneklerde 3 ana filum olan *Ascomycota*, *Basidiomycota* ve *Zygomycota* filum gözlenmiştir. Bu sonuç rejenerasyon kapasitesi yüksek olan zebra balığı organizması üzerinde yapılan mikrobiyom analizi ile örtüşmektedir. Blastema öncesinden ve blastema yapısı tamamlanmasına kadar geçen sürede mikrobiyal çeşitliliğe göre *Ascomycota* filumunun da artış, *Basidiomycota* filumunda ise azalma görülmüştür.

Isı haritası sonuçlarına göre, *Malasseziaceae* ailesi uzuv ampütasyonu sonrası 0.gün de ve 4.gün de bir miktar görülmesine rağmen blastema sonrası 30.gün ve 60.gün de toplanan örneklerden elde edilen analize göre *Malasseziaceae* ailesinde artış görülmüştür. *Malassezia* spp. deri mikrobiyotasının bir üyesidir.

Ampütasyon sonrası kesilen bölgeden (0.gün) ve blastema oluşumu sürecinde farklı günlerde alınan dokudan (7.gün ve 30.gün) elde edilen analizler sonucu gözlenen *Malassezia globosa* türü, sağlıklı insan deri mikrobiyom içerisinde yer almaktadır.

Malassezia spp. yağ seven maya olarak adlandırılır. Yağ asitlerini sentezleyen enzimlere sahip olmadıkları için yaşayabileceği yağ asidi kaynaklarına ihtiyaçları vardır. Yağ asitlerini elde etmek için, lipaz ve fosfolipaz enzimlerini ortama salarlar. Bu enzimler doymamış yağ asitlerini açığıkartarak inflamasyonu uyarırlar. Araşidonik asit pro-inflamatuvar eikozanoidleri üreterek sitokinleri, kemokinleri ve antimikrobiyal peptidleri uyararak inflamasyona yön verir (118). İmmün yanıtı artıran diğler bir tür olan *Aspergillus* 0.gün ve 30.gün de gözölmüştür. Pro-inflamatuvar sitokinleri artırdığı gözlenmiştir (119). Proinflamatuvarsitokinler yara iyileşmesinde rol oynadığı araştırmalar sonucu gözlenmektedir (120).

Aksolotllar üzerinde yapılan bir araştırma sonucu inflamasyonun uzuv rejenerasyonunda ve yara iyileşmesine katkısı olduğu gözlenmektedir. Bu araştırmaya göre, pro-inflamtuvar ve anti-inflamatuvar sinyaller ampütasyon sonrası rejenerasyon süreci boyunca eş zamanlı uyarıldığı gözlenmektedir. Salgılanan sitokinler lökosit infiltrasyonunu, hücresele çoğalımını, anjiyogenezi ve kolajenin yeniden şekillenmesine katkısı gözlenmektedir (121).

Taksonomik mikobiyalçeşitlilik analizine göre 7.gün de görölen *Meyerozyma guilliermondii* türü, insan deri mikobiyom topluluğu içindedir. Mukoza bölgelerinde yer alan *Meyerozyma guilliermondii* aynı zamanda kanda da bulunduğu gözlenmektedir (122).

Ampütasyon sonrası kesilen parçadan alınan örnekte (0.gün) ve 60.gün sonunda alınan örnekte ortak gözlenen *Pleosporales* takımı, deri altında yer alır. Hücre duvarlarında melanin bulundurarak deriyi güneş ışıklarından korurlar (123). Denizden izole edilmiş *Pleosporale* stakımı antibiyotik ürettiği gözlenmektedir (124). Başka bir araştırmada, *Pleosporales* takımının ikincil metabolitler ürettiği bu metabolitlerin antikanser, anti-inflamatuvar, antivirüs ve antioksidant etkisi olduğu gözlenmektedir. Aynı zamanda, *Candida albicans* ve *Clavibacter michiganensis* türlere karşı anti-mikrobiyal etkisi gözlenmektedir (125).

Antimikrobiyal etkisi gösteren diğler bir tür olan *Penicillum* 0.gün ve 7.gün de gözlenmiştir. Diyabet hastalarında görölen diyabetik yaralarda bulunan *Penicillum* türünün zararlı mikroorganizmaların yara bölgesine gelmesini engelleyerek,diyabetik

yaraların kronikleşmesini ilerlemesini engellediği gözlenmektedir (126). Başka bir araştırmaya göre yara bölgesindeki fazla üretilen azot oksit (NO) ve prostaglandin E2 engelleyerek anti-inflamasyonu etkisi gösterdiği gözlenmektedir. (127). 7.günde gözlenen *Trametes* türünde anti- inflamatuvar etkisi gösterdiği gözlenmektedir. NO, tümör nekroz faktörü alfa (TNF-alfa) ve interlökin 6 üretimini engellediği gözlenmektedir (128). Aynı zamanda sitotoksik aktivite göstererek antikanser ve *Aspergillus* ve *Candida* türlerine karşı antimikrobiyal etkisi gözlenmektedir (129).

0.günde gözlenen diğer bir tür *Cladosporium*'dur. Yaraüzzerindeki mikobiyom analiz çeşitliliği üzerinde yapılan araştırmasonucu *Cladosporium* türünün yara iyileştirme, antioksidant ve anti-anjiojenik etkisi olduğu gözlenmektedir. Anjiojenesi normal yara iyileşmesi için gerekli olan bir mekanizmadır. Anjiojenesi, tümör gelişimi ve büyümesi, metastaz etkeni olduğu gözlenmektedir. Anti-anjiojeniktedavi ile kanserin gelişimini engellediği gözlenmektedir (130). *Phylloporus* türünden alınan polisakkaritler kanser beyaz farelere 300mg veriliyor. Araştırma sonucu olarak %90 kanser hücrelerinin öldüğü gözlenmektedir (131).

İmmünomodülatör ajanlar üreten *Schizophyllum commune*türü 0.gün ve 4.gün de gözlenmiştir. Üretilen bu ajanlar fazla immün yanıtı baskılayıcı özelliğe sahiptir. *Schizophyllum commune* hydrophobin sentezleyerek antikanser etkisi gösterdiği gözlenmektedir (132).

Taksonomik çeşitliliği incelediğimizde, 7.gün deki *Zygomcyta* filum miktarının fazla olduğu saptandı.

Beta çeşitlilik indekslerinde gözlenen, deney gruplarının anlamlı olarak kendi içerisinde kümeleşmemesi, özellikle replikaların aynı kümede olmaması, deney sırasında yapılan bir hata sonucundan kaynaklı olabileceği düşünülmektedir. Ya da analiz edilen bu sonuçlar beklenen şekilde gerçekleşti.

8.SONUÇ

Mikrobiyota, bulunduğu organizma içerisinde birçok metabolik olayla ilişkilendirilmektedir. Bu özelliklerinden dolayı, mikrobiyotanın konakçı ile bağlantısı ve konakçıya yararlı-zararlı etkileri son zamanların en önemli araştırma konusu olduğu gözlenmektedir [86]. Bu tez çalışmasıyla, yüksek rejenerasyon kapasitesine sahip olan Aksolotl'un rejenerasyon sürecinde mikrobiyota fungus kompozisyonunun çeşitliliği ve zenginliği belirlendi. Ampütasyon sonrası kesilen uzuvun rejenere olmasını sağlayan en önemli yapı blastema'dır. Bu süreçte yara epiteli oluştuktan sonra, AEC tabakasının oluşmasından sonra başkalaşmamış hücrelerin birikmesi ve ardından çoğalarak özel dokulara farklılaşarak yeni uzvun oluşmasını sağlarlar [19].

Aksolotl uzuv rejenerasyon sürecinde günlere bağlı olarak, fungal mikrobiyota topluluğu ve bakteri mikrobiyota topluluk çeşitlerinde değişkenlikler gözlemlendi [138]. Bu çalışma ile ortaya konan veriler, aksolotl rejenerasyon mekanizmasını anlamaya dayalı değerli kaynak olup aynı zamanda rejenerasyon üzerine yapılan diğer çalışmalarla karşılaştırılmalı veya korelasyonel ilişki kurularak gelecekteki çalışmalara katkı sağlayacağını tahmin ediyoruz.

9.KAYNAKLAR

- [1] Carlson, B. M. Principles of regenerativebiology. 2007, Amsterdam; Burlington, Mass.
- [2] Galliot, B., & Ghila, L. (2010). Cell plasticity in homeostasis and regeneration. *Molecular reproduction and development*, 77(10), 837-855.
- [3] Suzuki, M., Yakushiji, N., Nakada, Y., Satoh, A., Ide, H., & Tamura, K. (2006). Limbregeneration in *Xenopus laevis* froglet. *The Scientific World Journal*, 6, 26-37.
- [4] Mescher, A. L., & Neff, A. W. (2005). Regenerative capacity and the developing immune system. In *Regenerative medicine I* (pp. 39-66). Springer, Berlin, Heidelberg.
- [5] Godwin, J. W., & Brockes, J. P. (2006). Regeneration, tissue injury and the immuneresponse. *Journal of anatomy*, 209(4), 423-432.
- [6] McCusker, C., Bryant, S. V., & Gardiner, D. M. (2015). The axolotl limb blastema: cellular and molecular mechanisms driving blastema formation and limb regeneration in tetrapods. *Regeneration*, 2(2), 54-71.
- [7] Goss, R. J. (1969). Regeneration in fishes. *Principles of regeneration*. New York: Academic Press Inc. p, 113-139.
- [8] French, V., Bryant, P. J., & Bryant, S. V. (1976). Pattern regulation in epimorphic fields. *Science*, 193(4257), 969-981.
- [9] Bryant, S. V., French, V., & Bryant, P. J. (1981). Distal regeneration and symmetry. *Science*, 993-1002.
- [10] Gardiner, D. M., Muneoka, K., & Bryant, S. V. (1986). The migration of dermal cells during blastema formation in axolotls. *Developmental biology*, 118(2), 488-493.
- [11] Seifert, A. W., Monaghan, J. R., Voss, S. R., & Maden, M. (2012). Skin regeneration in adult axolotls: a blueprint for scar-free healing in vertebrates. *PloS one*, 7(4), e32875.
- [12] Neufeld, D. A., & Day, F. A. (1996). Perspective: a suggested role for basement membrane structures during newt limb regeneration. *The Anatomical Record*, 246(2), 155-161.
- [13] Salley, J. D., & Tassava, R. A. (1981). Responses of denervated adult newt limb stumps to reinnervation and reinjury. *Journal of Experimental Zoology*, 215(2), 183-189.
- [14] Mescher, A. L., White, G. W., & Brokaw, J. J. (2000). Apoptosis in regenerating and denervated, nonregenerating urodele forelimbs. *Wound Repair and Regeneration*, 8(2), 110-116.

- [15] Satoh, A., Gardiner, D. M., Bryant, S. V., & Endo, T. (2007). Nerve-induced ectopic limb blastemas in the Axolotl are equivalent to amputation-induced blastemas. *Developmental Biology*, 312(1), 231-244.
- [16] McCusker, C. D., & Gardiner, D. M. (2013). Positional information is reprogrammed in blastema cells of the regenerating limb of the axolotl (*Ambystoma mexicanum*). *PLoS One*, 8(9), e77064.
- [17] Endo, T., Bryant, S. V., & Gardiner, D. M. (2004). A stepwise model system for limb regeneration. *Developmental Biology*, 270(1), 135-145.
- [18] Ferris, D. R., Satoh, A., Mandefro, B., Cummings, G. M., Gardiner, D. M., & Rugg, E. L. (2010). Ex vivo generation of a functional and regenerative wound epithelium from axolotl (*Ambystoma mexicanum*) skin. *Development, Growth & Differentiation*, 52(8), 715-724.
- [19] Singer, M., & Inoue, S. (1964). The nerve and the epidermal apical cap in regeneration of the forelimb of adult *Triturus*. *Journal of Experimental Zoology*, 155(1), 105-115.
- [20] Gardiner, D. M., Blumberg, B., Komine, Y., & Bryant, S. V. (1995). Regulation of HoxA expression in developing and regenerating axolotl limbs. *Development*, 121(6), 1731-1741.
- [21] Satoh, A., Bryant, S. V., & Gardiner, D. M. (2008). Regulation of dermal fibroblast differentiation and redifferentiation during wound healing and limb regeneration in the Axolotl. *Development, Growth & Differentiation*, 50(9), 743-754.
- [22] Satoh, A., Hirata, A., & Satou, Y. (2011). Blastema induction in a neurogenic state and Prrx-1 regulation by MMPs and FGFs in *Ambystoma mexicanum* limb regeneration. *Developmental Biology*, 355(2), 263-274.
- [23] Godwin, J. W., Pinto, A. R., & Rosenthal, N. A. (2013). Macrophages are required for adult salamander limb regeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(23), 9415-9420.
- [24] Singer, M. (1946). The nervous system and regeneration of the forelimb of adult *Triturus*. V. The influence of number of nerve fibers, including a quantitative study of limb innervation. *Journal of Experimental Zoology*, 101(3), 299-337.
- [25] Singer, M. (1974). Neurotrophic control of limb regeneration in the newt. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 228(1), 308-321.

- [26] Muneoka, K., Fox, W. F., & Bryant, S. V. (1986). Cellular contribution from dermis and cartilage to the regenerating limb blastema in axolotls. *Developmental biology*, 116(1), 256-260.
- [27] Kragl, M., Knapp, D., Nacu, E., Khattak, S., Maden, M., Epperlein, H. H., & Tanaka, E. M. (2009). Cells keep a memory of their tissue origin during axolotl limb regeneration. *Nature*, 460(7251), 60.
- [28] McCusker, C., Lehrberg, J., & Gardiner, D. (2014). Position-specific induction of ectopic limbs in non-regenerating blastemas on axolotl forelimbs. *Regeneration*, 1(1), 27-34.
- [29] Nacu, E., Glausch, M., Le, H. Q., Damanik, F. F. R., Schuez, M., Knapp, D., ... & Tanaka, E. M. (2013). Connective tissue cells, but not muscle cells, are involved in establishing the proximo-distal outcome of limb regeneration in the axolotl. *Development*, 140(3), 513-518.
- [30] Stewart, S., Tsun, Z. Y., & Belmonte, J. C. I. (2009). A histone demethylase is necessary for regeneration in zebrafish. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(47), 19889-19894.
- [31] McCusker, C. D., & Gardiner, D. M. (2014). Understanding positional cues in salamander limb regeneration: implications for optimizing cell-based regenerative therapies. *Disease models & mechanisms*, 7(6), 593-599.
- [32] Singer, M. (1978). On the nature of the neurotrophic phenomenon in urodele limb regeneration. *American zoologist*, 18(4), 829-841.
- [33] Wallace, H. (1981). *Vertebrate limb regeneration* (p. 132). New York: Wiley.
- [34] Mescher, A. L. (2004). The cellular basis of limb regeneration in urodeles. *International Journal of Developmental Biology*, 40(4), 785-795.
- [35] Bryant, S. V., Endo, T., & Gardiner, D. M. (2004). Vertebrate limb regeneration and the origin of limb stem cells. *International Journal of Developmental Biology*, 46(7), 887-896.
- [36] Satoh, A., James, M. A., & Gardiner, D. M. (2009). The role of nerve signaling in limb genesis and agenesis during axolotl limb regeneration. *JBJS*, 91(Supplement_4), 90-98.
- [37] Mullen, L. M., Bryant, S. V., Torok, M. A., Blumberg, B., & Gardiner, D. M. (1996). Nerve dependency of regeneration: the role of Distal-less and FGF signaling in amphibian limb regeneration. *Development*, 122(11), 3487-3497.

- [38] Han, M. J., An, J. Y., & Kim, W. S. (2001). Expression patterns of Fgf-8 during development and limb regeneration of the axolotl. *Developmental Dynamics*, 220(1), 40-48.
- [39] Christensen, R. N., Weinstein, M., & Tassava, R. A. (2002). Expression of fibroblast growth factors 4, 8, and 10 in limbs, flanks, and blastemas of *Ambystoma*. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*, 223(2), 193-203.
- [40] Satoh, A., Graham, G. M. C., Bryant, S. V., & Gardiner, D. M. (2008). Neurotrophic regulation of epidermal dedifferentiation during wound healing and limb regeneration in the axolotl (*Ambystoma mexicanum*). *Developmental biology*, 319(2), 321-335.
- [41] Kumar, A., Godwin, J. W., Gates, P. B., Garza-Garcia, A. A., & Brockes, J. P. (2007). Molecular basis for the nerve dependence of limb regeneration in an adult vertebrate. *Science*, 318(5851), 772-777.
- [42] Makanae, A., Mitogawa, K., & Satoh, A. (2014). Co-operative Bmp- and Fgf- signaling inputs convert skin wound healing to limb formation in urodele amphibians. *Developmental biology*, 396(1), 57-66.
- [43] Stocum, D. L. (2011). The role of peripheral nerves in urodele limb regeneration. *European Journal of Neuroscience*, 34(6), 908-916.
- [44] Athipposhy, A., Lehrberg, J., Monaghan, J. R., Gardiner, D. M., & Voss, S. R. (2014). Characterization of in vitro transcriptional responses of dorsal root ganglia cultured in the presence and absence of blastema cells from regenerating salamander limbs. *Regeneration*, 1(2), 1-10.
- [45] Hirata, A., Gardiner, D. M., & Satoh, A. (2010). Dermal fibroblasts contribute to multiple tissues in the accessory limb model. *Development, growth & differentiation*, 52(4), 343-350.
- [46] Yang, E. V., Gardiner, D. M., Carlson, M. R., Nugas, C. A., & Bryant, S. V. (1999). Expression of Mmp-9 and related matrix metalloproteinase genes during axolotl limb regeneration. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*, 216(1), 2-9.
- [47] Thornton, C. S. (1960). Influence of an eccentric epidermal cap on limb regeneration in *Amblystoma* larvae. *Developmental biology*, 2(6), 551-569.
- [48] Thornton, C. S., & Thornton, M. T. (1965). The regeneration of accessory limb parts following epidermal cap transplantation in urodeles. *Experientia*, 21(3), 146-148.

- [49] Li, S., & Muneoka, K. (1999). Cell migration and chick limb development: chemotactic action of FGF-4 and the AER. *Developmental Biology*, 211(2), 335-347.
- [50] Cameron, J. A., Hilgers, A. R., & Hinterberger, T. J. (1986). Evidence that reserve cells are a source of regenerated adult newt muscle in vitro. *Nature*, 321(6070), 607.
- [51] Carlson, B. M. (1970). Relationship between the tissue and epimorphic regeneration of muscles. *American Zoologist*, 10(2), 175-186.
- [52] Cameron, J. A., & Hinterberger, T. J. (1984). Regional differences in the distribution of myogenic and chondrogenic cells in axolotl limb blastemas. *Journal of Experimental Zoology*, 232(2), 269-275.
- [53] Brockes, J. P. (1997). Amphibian limb regeneration: rebuilding a complex structure. *Science*, 276(5309), 81-87.
- [54] Sandoval-Guzmán, T., Wang, H., Khattak, S., Schuez, M., Roensch, K., Nacu, E., ... & Simon, A. (2014). Fundamental differences in dedifferentiation and stem cell recruitment during skeletal muscle regeneration in two salamander species. *Cell Stem Cell*, 14(2), 174-187.
- [55] Han, M., Yang, X., Taylor, G., Burdsal, C. A., Anderson, R. A., & Muneoka, K. (2005). Limb regeneration in higher vertebrates: developing a roadmap. *The Anatomical Record Part B: The New Anatomist*, 287(1), 14-24.
- [56] Bryant, S. V., Gardiner, D. M., & Muneoka, K. (1987). Limb development and regeneration. *American Zoologist*, 27(2), 675-696.
- [57] Gardiner, D. M., & Bryant, S. V. (1996). Molecular mechanisms in the control of limb regeneration: the role of homeobox genes.
- [58] Satoh, A., Cummings, G. M., Bryant, S. V., & Gardiner, D. M. (2010). Neurotrophic regulation of fibroblast dedifferentiation during limb skeletal regeneration in the axolotl (*Ambystoma mexicanum*). *Developmental Biology*, 337(2), 444-457.
- [59] Rose, S. M. (1962). Tissue-arc control of regeneration in the amphibian limb. In *Regeneration* (Vol. 20, pp. 153-176). Ronald Press New York.
- [60] Roensch, K., Tazaki, A., Chara, O., & Tanaka, E. M. (2013). Progressive specification rather than intercalation of segments during limb regeneration. *Science*, 342(6164), 1375-1379.
- [61] Singer, M. (1952). The influence of the nerve in regeneration of the amphibian extremity. *The Quarterly Review of Biology*, 27(2), 169-200.

- [62] Niazi, I. A., Pescitelli, M. J., & Stocum, D. L. (1985). Stage-dependent effects of retinoic acid on regenerating urodele limbs. *Wilhelm Roux's archives of developmental biology*, 194(6), 355-363.
- [63] Ragsdale Jr, C. W., Petkovich, M., Gates, P. B., Chambon, P., & Brockes, J. P. (1989). Identification of a novel retinoic acid receptor in regenerative tissues of the newt. *Nature*, 341(6243), 654.
- [64] Ragsdale Jr, C. W., Gates, P. B., & Brockes, J. P. (1992). Identification and expression pattern of a second isoform of the newt alpha retinoic acid receptor. *Nucleic acids research*, 20(21), 5851.
- [65] Ragsdale Jr, C. W., Gates, P. B., Hill, D. S., & Brockes, J. P. (1993). Delta retinoic acid receptor isoform $\delta 1$ is distinguished by its exceptional N-terminal sequence and abundance in the limb regeneration blastema. *Mechanisms of development*, 40(1-2), 99-112.
- [66] Pecorino, L. T., Entwistle, A., & Brockes, J. P. (1996). Activation of a single retinoic acid receptor isoform mediates proximal-distal respecification. *Current Biology*, 6(5), 563-569.
- [67] Monaghan, J. R., & Maden, M. (2012). Visualization of retinoic acid signaling in transgenic axolotls during limb development and regeneration. *Developmental biology*, 368(1), 63-75.
- [68] Monaghan, J. R., Epp, L. G., Putta, S., Page, R. B., Walker, J. A., Beachy, C. K., ... & Bryant, S. V. (2009). Microarray and cDNA sequence analysis of transcription during nerve-dependent limb regeneration. *BMC biology*, 7(1), 1.
- [69] Glade, R. W. (1963). Effects of tail skin, epidermis, and dermis on limb regeneration in *Triturus viridescens* and *Siredon mexicanum*. *Journal of Experimental Zoology*, 152(2), 169-193.
- [70] Carlson, B. M. (1975). The effects of rotation and positional change of stump tissues upon morphogenesis of the regenerating axolotl limb. *Developmental biology*, 47(2), 269-291.
- [71] Rollman-Dinsmore, C., & Bryant, S. V. (1982). Pattern regulation between hind- and forelimbs after blastema exchanges and skin grafts in *Notophthalmus viridescens*. *Journal of Experimental Zoology*, 223(1), 51-56.
- [72] Holder, N., & Glade, R. (1984). Skin glands in the axolotl: the creation and maintenance of a spacing pattern. *Development*, 79(1), 97-112.

- [73] Steen, T. P. (1968). Stability of chondrocyte differentiation and contribution of muscle to cartilage during limb regeneration in the axolotl (*Siredon mexicanum*). *Journal of Experimental Zoology*, 167(1), 49-77.
- [74] Tank, P. W. (1981). The ability of localized implants of whole or minced dermis to disrupt pattern formation in the regenerating forelimb of the axolotl. *American Journal of Anatomy*, 162(4), 315-326.
- [75] Simkin, J., Sammarco, M. C., Dawson, L. A., Schanes, P. P., Yu, L., & Muneoka, K. (2015). The mammalian blastema: regeneration at our fingertips. *Regeneration*, 2(3), 93-105.
- [76] Zielins, E. R., Ransom, R. C., Leavitt, T. E., Longaker, M. T., & Wan, D. C. (2016). The role of stem cells in limb regeneration. *Organogenesis*, 12(1), 16-27.
- [77] Stocum, D. L. (2017). Mechanisms of urodele limb regeneration. *Regeneration*, 4(4), 159-200.
- [78] Levy, M., Blacher, E., & Elinav, E. (2017). Microbiome, metabolites and host immunity. *Current opinion in microbiology*, 35, 8-15.
- [79] Palmer, C., Bik, E. M., DiGiulio, D. B., Relman, D. A., & Brown, P. O. (2007). Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS biology*, 5(7), e177.
- [80] Demircan, T., Ovezmyradov, G., Yıldırım, B., Keskin, İ., İlhan, A. E., Feşcioğlu, E. C., ... & Yıldırım, S. (2018). Experimentally induced metamorphosis in highly regenerative axolotl (*Ambystoma mexicanum*) under constant diet restructures microbiota. *Scientific reports*, 8(1), 10974.
- [81] Relman, D. A., & Falkow, S. (2001). The meaning and impact of the human genome sequence for microbiology. *Trends in microbiology*, 9(5), 206-208.
- [82] Venter, J. C., Adams, M. D., Myers, E. W., Li, P. W., Mural, R. J., Sutton, G. G., ... & Gocayne, J. D. (2001). The sequence of the human genome. *science*, 291(5507), 1304-1351.
- [83] International Human Genome Sequencing Consortium. (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 409(6822), 860.
- [84] Davies, J. (2001). In a map for human life, count the microbes, too. *Science*, 291(5512), 2316-2316.
- [85] Lederberg, J., & McCray, A. T. (2001). Ome Sweet Omics--A Genealogical Treasury of Words. *The Scientist*, 15(7), 8-8.

- [86] Peterson, J., Garges, S., Giovanni, M., McInnes, P., Wang, L., Schloss, J. A., ... & Baker, C. C. (2009). The NIH human microbiome project. *Genome research*, 19(12), 2317-2323.
- [87] Pflughoeft, K. J., & Versalovic, J. (2012). Human microbiome in health and disease. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 7, 99-122.
- [88] Seed, P. C. (2015). The human mycobiome. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 5(5), a019810.
- [89] Baker, J. L., Bor, B., Agnello, M., Shi, W., & He, X. (2017). Ecology of the oral microbiome: beyond bacteria. *Trends in microbiology*, 25(5), 362-374.
- [90] Huffnagle, G. B., & Noverr, M. C. (2013). The emerging world of the fungal microbiome. *Trends in microbiology*, 21(7), 334-341.
- [91] Vesty, A., Biswas, K., Taylor, M. W., Gear, K., & Douglas, R. G. (2017). Evaluating the impact of DNA extraction method on the representation of human oral bacterial and fungal communities. *PloS one*, 12(1), e0169877.
- [92] Dollive, S., Peterfreund, G. L., Sherrill-Mix, S., Bittinger, K., Sinha, R., Hoffmann, C., ... & Custers-Allen, R. (2012). A tool kit for quantifying eukaryotic rRNA gene sequences from human microbiome samples. *Genome biology*, 13(7), R60.
- [93] Diaz, P. I., Hong, B. Y., Dupuy, A. K., & Strausbaugh, L. D. (2017). Mining the oral mycobiome: Methods, components, and meaning. *Virulence*, 8(3), 313-323.
- [94] Kõljalg, U., Nilsson, R. H., Abarenkov, K., Tedersoo, L., Taylor, A. F., Bahram, M., ... & Douglas, B. (2013). Towards a unified paradigm for sequence-based identification of fungi. *Molecular ecology*, 22(21), 5271-5277.
- [95] Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., ... & Glöckner, F. O. (2012). The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic acids research*, 41(D1), D590-D596.
- [96] Cole, J. R., Wang, Q., Fish, J. A., Chai, B., McGarrell, D. M., Sun, Y., ... & Tiedje, J. M. (2013). Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucleic acids research*, 42(D1), D633-D642.
- [97] Iliev, I. D., & Leonardi, I. (2017). Fungal dysbiosis: immunity and interactions at mucosal barriers. *Nature Reviews Immunology*, 17(10), 635.
- [98] Collins, F. S., Green, E. D., Guttmacher, A. E., & Guyer, M. S. (2003). A vision for the future of genomics research. *nature*, 422(6934), 835.
- [99] Schadt, E. E., Turner, S., & Kasarskis, A. (2010). A window into third-generation sequencing. *Human molecular genetics*, 19(R2), R227-R240.

- [100] Tringe, S. G., & Rubin, E. M. (2005). Metagenomics: DNA sequencing of environmental samples. *Nature reviews genetics*, 6(11), 805-814.
- [101] Hugenholtz, P., & Pace, N. R. (1996). Identifying microbial diversity in the natural environment: a molecular phylogenetic approach. *Trends in biotechnology*, 14(6), 190-197.
- [102] Marloth, R. H. (1929). An apparatus for the study of mat-forming fungi in culture. *Science*, 69(1794), 524-525.
- [103] Cui, L., Morris, A., & Ghedin, E. (2013). The human mycobiome in health and disease. *Genome medicine*, 5(7), 63.
- [104] Delhaes, L., Monchy, S., Fréalle, E., Hubans, C., Salleron, J., Leroy, S., ...& Sime- Ngando, T. (2012). The airway microbiota in cystic fibrosis: a complex fungal and bacterial community—implications for therapeutic management. *PloS one*, 7(4), e36313.
- [105] Park, H. K., Ha, M. H., Park, S. G., Kim, M. N., Kim, B. J., & Kim, W. (2012). Characterization of the fungal microbiota (mycobiome) in healthy and dandruff-afflicted human scalps. *PloS one*, 7(2), e32847.
- [106] Findley, K., Oh, J., Yang, J., Conlan, S., Deming, C., Meyer, J. A., ...& Becker, J. (2013). Topographic diversity of fungal and bacterial communities in human skin. *Nature*, 498(7454), 367.
- [107] LaTuga, M. S., Ellis, J. C., Cotton, C. M., Goldberg, R. N., Wynn, J. L., Jackson, R. B., & Seed, P. C. (2011). Beyond bacteria: a study of the enteric microbial consortium in extremely low birth weight infants. *PloS one*, 6(12), e27858.
- [108] Dunthorn, M., Klier, J., Bunge, J., & Stoeck, T. (2012). Comparing the hyper-variable V4 and V9 regions of the small subunit rDNA for assessment of ciliate environmental diversity. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 59(2), 185-187.
- [109] Polz, M. F., & Cavanaugh, C. M. (1998). Bias in template-to-product ratios in multi-template PCR. *Applied and environmental Microbiology*, 64(10), 3724-3730.
- [110] Di Bella, J. M., Bao, Y., Gloor, G. B., Burton, J. P., & Reid, G. (2013). High throughput sequencing methods and analysis for microbiome research. *Journal of microbiological methods*, 95(3), 401-414.
- [111] Caporaso, J. G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F. D., Costello, E. K., ...& Huttley, G. A. (2010). QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature methods*, 7(5), 335.

- [112] Schloss, P. D., Westcott, S. L., Ryabin, T., Hall, J. R., Hartmann, M., Hollister, E. B., ...&Sahl, J. W. (2009). Introducingmothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparingmicrobialcommunities. *Applied and environmentalmicrobiology*, 75(23), 7537-7541.
- [113]Landete, J. M. (2012). Plant and mammalianlignans: a review of source, intake, metabolism, intestinal bacteria and health. *Food Research International*, 46(1), 410-424.
- [114]Macfarlane, S., Steed, H., &Macfarlane, G. T. (2009). Intestinal bacteria and inflammatorybowel disease. *Critical reviews in clinicallaboratorysciences*, 46(1), 25-54.
- [115] Sekirov, I., Russell, S. L., Antunes, L. C. M., & Finlay, B. B. (2010). Gutmicrobiota in health and disease. *Physiological reviews*, 90(3), 859-904.
- [116] Shahi, S. K., Freedman, S. N., & Mangalam, A. K. (2017). Gut microbiome in multiple sclerosis: the players involved and the rolesthey play. *Gutmicrobes*, 8(6), 607-615.
- [117] Bowman, B. A., & Kwon, D. S. (2016). Efficientnucleic acid extraction and 16S rRNA gene sequencing for bacterialcommunitycharacterization. *JoVE (Journal of VisualizedExperiments)*, (110), e53939.
- [118]Velegriaki, A., Cafarchia, C., Gaitanis, G., Iatta, R., & Boekhout, T. (2015). Malasseziainfections in humans and animals: pathophysiology, detection, and treatment. *PLoS pathogens*, 11(1), e1004523.
- [119]Carvalho, A., Cunha, C., Iannitti, R. G., De Luca, A., Giovannini, G., Bistoni, F., & Romani, L. (2012). Inflammation in aspergillosis: the good, the bad, and the therapeutic. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1273(1), 52-59.
- [120] Kalan, L., Loesche, M., Hodkinson, B. P., Heilmann, K., Ruthel, G., Gardner, S. E., & Grice, E. A. (2016). Redefining the chronic-wound microbiome: fungalcommunities are prevalent, dynamic, and associated with delayedhealing. *MBio*, 7(5), e01058-16.
- [121] Godwin, J. W., Pinto, A. R., & Rosenthal, N. A. (2013). Macrophages are required for adultsalamanderlimbregeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(23), 9415-9420.
- [122] Güler, N. C., Tosun, I., &Aydin, F. (2017). The identification of Meyerozymaguilliermondii from bloodcultures and surveillancesamples in a university hospital in Northeast Turkey: A ten-yearsurvey. *Journal de MycologieMÚdicale*, 27(4), 506-513.

- [123] Chowdhary, A., Perfect, J., & de Hoog, G. S. (2015). Black molds and melanized yeasts pathogenic to humans. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 5(8), a019570.
- [124] Portero Pico, C. E., & Narváez Trujillo, A. (2016). *Biatriospora* (Ascomycota: Pleosporales) is an ecologically diverse genus including facultative marine fungi and endophytes with biotechnological potential.
- [125] Chen, C. J., Zhou, Y. Q., Liu, X. X., Zhang, W. J., Hu, S. S., Lin, L. P., ... & Ge, H. M. (2015). Antimicrobial and anti-inflammatory compounds from a marine fungus *Pleospora* sp. *Tetrahedron letters*, 56(45), 6183-6189.
- [126] Rozman, N. A. S. B., Nor Hamin, N. S. B. M., Ring, L. C., Nee, T. W., Mustapha, M. B., & Yenn, T. W. (2017). Antimicrobial Efficacy of *Penicillium* *mestolkia* eel v609 Extract Treated Cotton Fabric for Diabetic Wound Care. *Mycobiology*, 45(3), 178-183.
- [127] Ha, T., Ko, W., Lee, S., Kim, Y. C., Son, J. Y., Sohn, J., ... & Oh, H. (2017). Anti-Inflammatory Effects of *Curvularin*-Type Metabolites from a Marine-Derived Fungal Strain *Penicillium* sp. SF-5859 in Lipopolysaccharide-Induced RAW264.7 Macrophages. *Marine drugs*, 15(9), 282.
- [128] Jin, M., Zhou, W., Jin, C., Jiang, Z., Diao, S., Jin, Z., & Li, G. (2018). Anti-inflammatory activities of the chemical constituents isolated from *Trametes versicolor*. *Natural product research*, 1-4.
- [129] Knežević, A., Stajić, M., Sofrenić, I., Stanojković, T., Milovanović, I., Tešević, V., & Vukojević, J. (2018). Antioxidative, antifungal, cytotoxic and anti-neurodegenerative activity of selected *Trametes* species from Serbia. *PLoS one*, 13(8), e0203064.
- [130] Hulikere, M. M., Joshi, C. G., Ananda, D., Poyya, J., & Nivya, T. (2016). Antiangiogenic, wound healing and antioxidant activity of *Cladosporium cladosporioides* (Endophytic Fungus) isolated from seaweed (*Sargassum wightii*). *Mycology*, 7(4), 203-211.
- [131] Ohtsuka, S., Ueno, S., Yoshikumi, C., Hirose, F., Ohmura, Y., Wada, T., ... & Takahashi, E. (1973). Polysaccharides having an anticarcinogenic effect and a method of producing them from species of Basidiomycetes. *UK Patent*, 1331513(26), 02.
- [132] Ooi, V. E., & Liu, F. (2000). Immunomodulation and anti-cancer activity of polysaccharide-protein complexes. *Current medicinal chemistry*, 7(7), 715-729.
- [133] Martin, M. (2011). Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet journal*, 17(1), 10-12.

- [134] Meyer, F., Paarmann, D., D'Souza, M., Olson, R., Glass, E. M., Kubal, M., ... & Wilkening, J. (2008). The metagenomics RAST server—a public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes. *BMC bioinformatics*, 9(1), 386.
- [135] Schloss, P. D., & Handelsman, J. (2005). Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71(3), 1501-1506.
- [136] The, H. C., Florez de Sessions, P., Jie, S., Pham Thanh, D., Thompson, C. N., Nguyen Ngoc Minh, C., ... & Rabaa, M. A. (2018). Assessing gut microbiota perturbations during the early phase of infectious diarrhea in Vietnamese children. *Gut microbes*, 9(1), 38-54.
- [137] Dhariwal, A., Chong, J., Habib, S., King, I. L., Agellon, L. B., & Xia, J. (2017). MicrobiomeAnalyst: a web-based tool for comprehensive statistical, visual and meta-analysis of microbiome data. *Nucleic acids research*, 45(W1), W180-W188.
- [138] Demircan, T., İlhan, A. E., Ovezmyradov, G., Öztürk, G., & Yıldırım, S. (2019). Longitudinal 16S rRNA data derived from limb regenerative tissue samples of axolotl *Ambystoma mexicanum*. *Scientific data*, 6(1), 70.
- [139] Stappenbeck, T. S., Wong, M. H., Saam, J. R., Mysorekar, I. U., & Gordon, J. I. (1998). Notes from some crypt watchers: regulation of renewal in the mouse intestinal epithelium. *Current opinion in cell biology*, 10(6), 702-709.
- [140] Van Der Flier, L. G., & Clevers, H. (2009). Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium. *Annual review of physiology*, 71, 241-260.
- [141] Erny, D., de Angelis, A. L. H., Jaitin, D., Wieghofer, P., Staszewski, O., David, E., ... & Schwierzeck, V. (2015). Host microbiota constantly control maturation and function of microglia in the CNS. *Nature neuroscience*, 18(7), 965.
- [142] Donohoe, D. R., Garge, N., Zhang, X., Sun, W., O'Connell, T. M., Bunger, M. K., & Bultman, S. J. (2011). The microbiome and butyrate regulate energy metabolism and autophagy in the mammalian colon. *Cell metabolism*, 13(5), 517-526.
- [143] Louis, P., & Flint, H. J. (2007). Development of a semiquantitative degenerate real-time PCR-based assay for estimation of numbers of butyryl-coenzyme A (CoA) CoA transferase genes in complex bacterial samples. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73(6), 2009-2012.
- [144] Kaiko, G. E., Ryu, S. H., Koues, O. I., Collins, P. L., Solnica-Krezel, L., Pearce, E. J., ... & Stappenbeck, T. S. (2016). The colonic crypt protects stem cells from microbiota-derived metabolites. *Cell*, 165(7), 1708-1720.

- [145] Lee, Y. S., Kim, T. Y., Kim, Y., Lee, S. H., Kim, S., Kang, S. W., ... & Hwang, S. W. (2018). Microbiota-derived lactate accelerates intestinal stem-cell-mediated epithelial development. *Cell host & microbe*, 24(6), 833-846.
- [146] Liu, H. X., Keane, R., Sheng, L., & Wan, Y. J. Y. (2015). Implications of microbiota and bile acid in liver injury and regeneration. *Journal of hepatology*, 63(6), 1502-1510.
- [147] Islam, S., Felin, J., Jantti, S., Hyotylainen, T., Wahlstrom, A., Marschall, H. U., ... & Bäckhed, F. (2012). 1414 GUT MICROBIOTA REGULATES BILE ACID METABOLISM BY REDUCING THE LEVELS OF TAURO-BETAMURICHOIC ACID, A NATURALLY OCCURRING FXR ANTAGONIST. *Journal of Hepatology*, 56, S556.
- [148] Liu, H. X., Rocha, C. S., Dandekar, S., & Wan, Y. J. Y. (2016). Functional analysis of the relationship between intestinal microbiota and the expression of hepatic genes and pathways during the course of liver regeneration. *Journal of hepatology*, 64(3), 641-650.

10.ETİK KURUL ONAYI



T.C.
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı

E-İmzalıdır

Sayı : 38828770-604.01.01-E.10834
Konu : Etik Kurulu Kararı

13/03/2019

Sayın Kevser Hanne Altın

Üniversitemiz Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kuruluna yapmış olduğunuz “Aksolotl Kol Rejenerasyonunda Fungus ve Bakteri Profillerinin Boylamsal Değişimlerinin İncelenmesi” isimli başvurunuz incelenmiş olup, etik kurulu kararı ekte sunulmuştur.

Bilgilerinize rica ederim.

Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
(İMÜ-HADYЕК) Başkanı

Ek:
-Karar Formu (1 sayfa)

Bu belge 5070 sayılı e-İmza Kanununa göre Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK tarafından 13.03.2019 tarihinde e-imzalanmıştır. Evrağınızı <https://ebys.medipol.edu.tr/e-imza> linkinden 32D74768XC kodu ile doğrulayabilirsiniz.



T.C.
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (İmü-Hadyek) Kararı

Toplantı Tarihi	Karar No	İlgi	Proje Yürütücüsü
13/03/2019	13		Kevser Hanne Altın

“Akslotl Kol Rejenerasyonunda Fungus ve Bakteri Profillerinin Boylamsal Değişimlerinin İncelenmesi” başlıklı bilimsel araştırma etik kurulumuzda görüşülmüş olup, çalışmanın etik kurallara uygun olduğuna “Oybirliği” ile karar verilmiştir.

Etik Onay Geçerlilik Süresi: Mart 2019, 6 ay

GÖREVİ	ADI SOYADI	İMZA
Başkan	Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK	
Üye	Dr. Öğr. Üyesi Turan DEMİRCAN	
Üye	Dr. Öğr. Üyesi Sultan Sibel ERDEM	
Üye	Dr. Öğr. Üyesi Mehmet OZANSOY	
Üye	Dr. Öğr. Üyesi Taha KELEŞTEMUR	
Üye	Uzm.Vet. Hek. Ekrem Musa ÖZDEMİR	
Üye	Cem GÜNEŞ	
Üye	Burak Sefa DERİBAŞ	

11. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Kevser Hanne	Soyadı	ALTIN
------------	--------------	---------------	-------

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Yüksek Lisans	İstanbul Medipol Üniversitesi- Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	2019
Lisans	Uluslararası Saraybosna Üniversitesi, Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi, Genetik ve Biyomühendislik	2017
Lise	Özel Kızılırmak Anadolu Lisesi	2011

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*					
İngilizce	Çok iyi	Çok İyi	Çok İyi					
Yabancı Dil Sınav Notu <input type="checkbox"/>								
KPDS	YÖKDİL/YD S	IELTS	TOEFLIB T	TOEFLPB T	TOEFLCB T	FCE	CAE	CPE

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	70,77	68,29	63,36
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma Becerisi
SPSS	Orta
Microsoft Office	Orta
C++	Orta

