

Fibromiyalji Sendromu ile Bağırsak Mikrobiyotası Arasındaki İlişkinin Araştırılması

Investigating of Relation Between Fibromyalgia Syndrome and Intestinal Microbiota

Büşra ALBAYRAK¹(ID), Seda SÜSGÜN²(ID), Okan KÜÇÜKAKKAŞ³(ID), Fahri AKBAŞ²(ID), Ayşegül YABACI⁴(ID), Semra ÖZÇELİK^{5,6}(ID)

¹ Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi, İstanbul.

² Bezmialem Vakıf University, Faculty of Medicine, Istanbul, Turkey.

³ Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, İstanbul.

⁴ Bezmialem Vakıf University, Faculty of Medicine, Department of Medical Biology, Istanbul, Turkey.

⁵ Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi, Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon Anabilim Dalı, İstanbul.

⁶ Bezmialem Vakıf University, Faculty of Medicine, Department of Physical Medicine and Rehabilitation, Istanbul Turkey.

⁷ Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyoistatistik ve Bilişim Anabilim Dalı, İstanbul.

⁸ Bezmialem Vakıf University, Faculty of Medicine, Department of Biostatistics and Informatics, Istanbul Turkey.

⁹ Bezmialem Vakıf Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Tıbbi Laboratuvar Teknikleri Programı Anabilim Dalı, İstanbul.

¹⁰ Bezmialem Vakıf University, Vocational School of Health Services, Medical Laboratory Techniques Programme, Istanbul, Turkey.

¹¹ Bezmialem Vakıf Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

¹² Bezmialem Vakıf University, Institute of Health Science, Istanbul, Turkey.

Makale Atfı: Albayrak B, Süsgün S, Küçükakkaş O, Akbaş F, Yabacı A, Özçelik S. Fibromiyalji sendromu ile bağırsak mikrobiyotası arasındaki ilişkinin araştırılması. Mikrobiyol Bul 2021;55(2):146-160.

ÖZ

Fibromiyalji sendromu (FMS), yetişkin popülasyonda bildirilen prevalansı %3-10 olan, kronik yaygın ağrının sık görülen formlarından biridir. Tipik ağrının klinik görünümü ve ilişkili somatik ve psikolojik semptomların varlığı tanıya temel oluşturur. FMS sinir sistemi disfonksiyonu ile ilişkilidir ve nörotransmitterler fibromiyalji için onaylanmış bir dizi ilacın hedefi olarak rol oynamaktadır. Bununla birlikte, FMS’de altta yatan mekanizmalar kesin olarak henüz bilinmemekle birlikte birçok hipotez ortaya konmuştur. Fibromiyalji ve irritabl bağırsak sendromu (IBS) arasındaki ilişki göz önüne alındığında, değişen bağırsak mikrobiyomu fibromiyalji ile ilişkili olabilir. Bu çalışmada, FMS tanılı hastalarda sağlıklı kontrollere göre değişen bağırsak mikrobiyom düzeylerinin araştırılması amaçlanmıştır. Mikrobiyom çalışması için FMS tanılı 54 hastadan ve 36 sağlıklı kişiden oluşan kohorttan fekal örnekler toplanmıştır. Kontrol grubunda herhangi bir mental ve/veya fiziksel hastalığı olanlar çalışma dışında bırakılmıştır. FMS’li hasta grubu, “American College of Rheumatology (ACR)” 2010 tanı kriterlerine bağlı kalınarak belirlenmiştir. Fekal örnekler, kullanılabildiği kadar -80°C’de muhafaza edilmiş ve buz üzerinde çözülür; her ekstraksiyon için 0.3 g feçes tartılmıştır. DNA izolasyonu, ticari kit ile üreticinin protokolüne uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Örnekler, gerçek zamanlı polimeraz zincir yöntemi ile *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Enterobacter*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* ve *Bifidobacterium*’a özgül primerler ile 16S rRNA gen amplifikasyonu yapılarak karşılaştırılmıştır. Sonuçlara göre, hasta grubunda *Bacteroidetes* ve *Bifidobacterium* istatistiksel olarak anlamlı bir

İletişim (Correspondence): Prof. Dr. Semra Özçelik, Bezmialem Vakıf Üniversitesi, Adnan Menderes Bulvarı, Vatan Caddesi, 34093, Fatih, İstanbul, Türkiye. Tel (Phone): +90 (212) 523 22 88, E-posta (E-mail): semraozcelik@bezmialem.edu.tr

şekilde artarken ($p < 0.05$), *Firmicutes*'in azaldığı saptanmıştır ($p < 0.001$). *Enterobacter*, *Streptococcus* ve *Lactobacillus* için istatistiksel olarak anlamlı sonuç bulunamamıştır ($p > 0.05$). Bakteriler arasındaki ilişki değerlendirildiğinde, *Bacteroidetes* ile *Firmicutes* yüzdesi arasında istatistiksel olarak yüksek anlamlı ve negatif korelasyon bulunurken ($r = -0.778$, $p < 0.001$), *Enterobacter* ve *Bifidobacterium* yüzdesi arasında orta derecede istatistiksel anlamlılık ve pozitif korelasyon gözlenmiştir ($r = 0.460$, $p = 0.005$). Sonuçlar, bağırsak mikrobiyotasının fibromiyaljiye rol oynayabileceğini göstermektedir. Bağırsaktaki *Firmicutes* ve *Bacteroidetes* filumlarının dengesinin bağırsak homeostazı için önemli etkilere sahip olduğu bilinmektedir. Özetle, daha büyük kohortlarda yapılacak büyük ölçekli araştırmaların, bağırsak mikrobiyomu ve FMS arasındaki ilişkiyi anlamada ve olası tedavi seçeneklerini değerlendirmede etkili olacağı açıktır.

Anahtar kelimeler: *Fibromiyalji sendromu; Bacteroidetes; Firmicutes; Bifidobacterium; mikrobiyota.*

ABSTRACT

Fibromyalgia syndrome (FMS) is one of the most frequent forms of chronic widespread pain, with a reported prevalence of 3-10% in the adult population. Clinical presentation of the typical pain and the presence of associated somatic and psychological symptoms form the basis of the diagnosis. FMS is associated with nervous system dysfunction and neurotransmitters act as targets of a number of drugs approved for fibromyalgia. However, although the underlying mechanisms in FMS are not yet known precisely, many hypotheses have been put forward. Considering the relation between fibromyalgia and irritable bowel syndrome (IBS), altered gut microbiome could be associated with fibromyalgia. In this study, it was aimed to investigate the variation of intestinal microbiome levels in patients with FMS compared to healthy controls. For the investigation of the microbiome, fecal samples were collected from a cohort of 54 patients with FMS and 36 healthy individuals. Those with any mental and/or physical illness in the control group were excluded from the study. The FMS patient group was determined according to the "American College of Rheumatology (ACR)" 2010 diagnostic criteria. The fecal samples were stored at -80°C until use and were thawed on ice; for each extraction, 0.3 g of faeces were weighed. Extraction of DNA was carried out with commercial kit according to the manufacturer's recommendations. Samples were compared using 16S rRNA gene amplification with specific primers of *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Enterobacter*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* and *Bifidobacterium* by the real-time PCR method. According to our results, while the increase of *Bacteroidetes* and *Bifidobacterium* was statistically significant ($p < 0.05$), *Firmicutes* decreased ($p < 0.001$) in the patient group. No statistically significant results were found for *Enterobacter*, *Streptococcus* and *Lactobacillus* ($p > 0.05$). When the relationship between bacteria was evaluated, a high statistically significance and negative correlation was found between *Bacteroidetes* and the percentage of *Firmicutes* ($r = -0.778$, $p < 0.001$), while a moderate statistical significance and positive correlation was observed between the percentage of *Enterobacter* and *Bifidobacterium* ($r = 0.460$, $p = 0.005$). The results suggest that the gut microbiota may play a role in fibromyalgia. The balance of *Firmicutes* and *Bacteroidetes* phyla in the gut is known to have important effects on intestinal homeostasis. In summary, it is clear that large-scale further research in larger cohorts will be effective in understanding the relationship between the gut microbiome and FMS and evaluating possible treatment options.

Keywords: *Fibromyalgia syndrome; Bacteroidetes; Firmicutes; Bifidobacterium; microbiota.*

GİRİŞ

Fibromiyalji sendromu (FMS), kas-iskelet sisteminde kronik, yaygın ağrı ve sertlik; fizik muayenede palpasyonla ağırlı hassas noktaların belirlenmesi ile karakterize olan ve özgül laboratuvar bulguları olmayan bir hastalıktır¹. FMS tanılı hastalarda fonksiyonel bozukluklar, dirençli yorgunluk, uyku bozuklukları, bilişsel bozukluklar, irritabl bağırsak sendromu (IBS), parestezi ve duygudurum bozukluğu da mevcuttur². FMS, en yaygın ikinci "romatizmal" hastalıktır. Bazı araştırmalar FMS'nin genel popülasyonun %3-10'unu etkilediğini göstermiştir³. FMS prevalansı yaşla birlikte artmaktadır ve sıklıkla 40-60 yaş aralığındaki kadınlarda gözlenmektedir⁴⁻⁶.

FMS'nin patofizyolojisinde çeşitli mekanizmalar yer almaktadır. FMS, merkezi sinir sisteminde duyarlılık, nöroendokrin ve otonom sinir sistemi disfonksiyonu ile ilişkilidir. Hastalarda mekanik, termal ve elektriksel uyarılara karşı psiko-fizyolojik hiperaleji bulguları görülmektedir. Bu durum hem merkezi hem de periferik sistemde nosiseptif anomali varsayımına yol açar⁷. Buna karşın enflamatuvar yumuşak doku anomalilerine dair tutarlı bir kanıt bulunmamış olması, FMS'nin etiopatolojisinde merkezi sinir sisteminin (MSS) önemini ortaya çıkarmaktadır^{8,9}. Merkezi sinir sistemi duyarlılık sendromu olan birçok hastada belirgin hiperaleji ve/veya allodini görülebilmektedir¹⁰. FMS hasta grubu ile sağlıklı kontrol grubunun karşılaştırıldığı bir çalışmada¹¹, FMS'li hastaların düşük seviyede sayılabilecek basınç değerlerinde bile (2.4 kg/cm²) kontrol grubuna göre yüksek düzeyde serebral aktivasyon ortaya çıkardığı izlenmiştir. Bu durum, FMS'li hastalara uygulanan etkinin kortikal veya subkortikal düzeyde ağrının algılanmasında artışa neden olduğu hipotezini güçlendirmektedir.

FMS'de bir yaklaşım da nörotransmitter disfonksiyonudur. FMS grubu ile yapılan bir çalışmada beyin omurilik sıvısında P maddesinin kontrol grubuna oranla üç kat daha yüksek olduğu bildirilmiştir. Ek olarak, FMS'li hastalarda serum serotonin düzeylerinin önemli ölçüde düşük olduğunu gösteren çalışmalar da mevcuttur^{12,13}.

Son yıllarda yapılan araştırmalarda ise, FMS ile bağırsak mikrobiyotası arasında ilişki olabileceği düşünülmektedir. Fibromiyalji ve IBS'nin birlikteliği düşünüldüğünde bu yaklaşım araştırmaya değer bir alan olarak görülmektedir. IBS'de bağırsak mikrobiyomu bileşiminde ve çeşitliliğinde değişiklikler bildirilmiştir ancak bu ilişki fibromiyaljide tam olarak anlaşılmamıştır¹⁴. Bağırsak mikrobiyotası ile insan fizyolojisi arasındaki bağlantı düşünüldüğünde çoğu hastalığın sağlıklı bağırsak mikrobiyotasının bozulması sonucu ortaya çıktığı öne sürülmektedir¹⁵. Literatürde bağırsak mikrobiyotasının bileşimindeki değişikliklerin gastrointestinal, metabolik, otoimmün, alerjik ve nöropsikiyatrik bozukluklarla ilişkili olduğu birçok çalışmada gösterilmiştir¹⁶.

Ayrıca insan bağırsak mikrobiyomu, beyin sağlığını birçok yönden etkileyebilir; lipopolisakaritler gibi bakteri yapısal bileşenleri bağırsıklık sistemine düşük tonik uyarılar yapabilir; ince bağırsakta bakterilerin aşırı çoğalması veya bağırsak geçirgenliğinin artması sonucu oluşan bakteriyel disbiyoz, MSS'de enflamasyonun uyarılmasına neden olabilir. Diğer bir mekanizma da bakteriyel proteinlerin insan antijenleri ile etkileşerek adaptif bağırsıklık sistemini uyarması ve bunun sonucunda disfonksiyonel yanıtlara neden olmasıdır. Ayrıca D-laktik asit ve amonyak gibi nörotoksik metabolitler, bakteriyel enzimler tarafından üretilir. Nörotoksikite, kısa zincirli yağ asitleri gibi uygun metabolitler tarafından da oluşabilir. Yapılan araştırmalar, mikrobiyotanın enterik sinir sisteminin afferent nöronlarını vagus siniri yoluyla beyne sinyaller göndermek için doğrudan aktive ettiğini göstermektedir. Bu farklı yollar boyunca, bağırsak mikrobiyomu hipotalamik-hipofiz-adrenal eksenin uyku ve stres reaktivitesini etkilemektedir. Sonuç olarak, bağırsak mikrobiyomu; hafızayı, davranışı ve bilişsel işlevleri etkileyebilir ve bu özelliğiyle birçok durum ve hastalık için önemlidir¹⁷.

Bu çalışmada FMS etiyopatogenezinde bağırsak mikrobiyotasının önemi, FMS tanılı hastalarda mikrobiyom karakteristiğinin ve disbiyoz nedenlerinin sağlıklı kontrollerle karşılaştırarak ortaya konması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma, Bezmialem Vakıf Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu onayı ile gerçekleştirildi (Tarih: 16.10.2018, Karar No: 19/252). Helsinki Deklarasyonu'nun etik kurallarına uygun olarak ve tüm katılımcılardan yazılı bilgilendirilmiş onam formları alınarak çalışılmıştır.

Çalışma Kohortunun Belirlenmesi

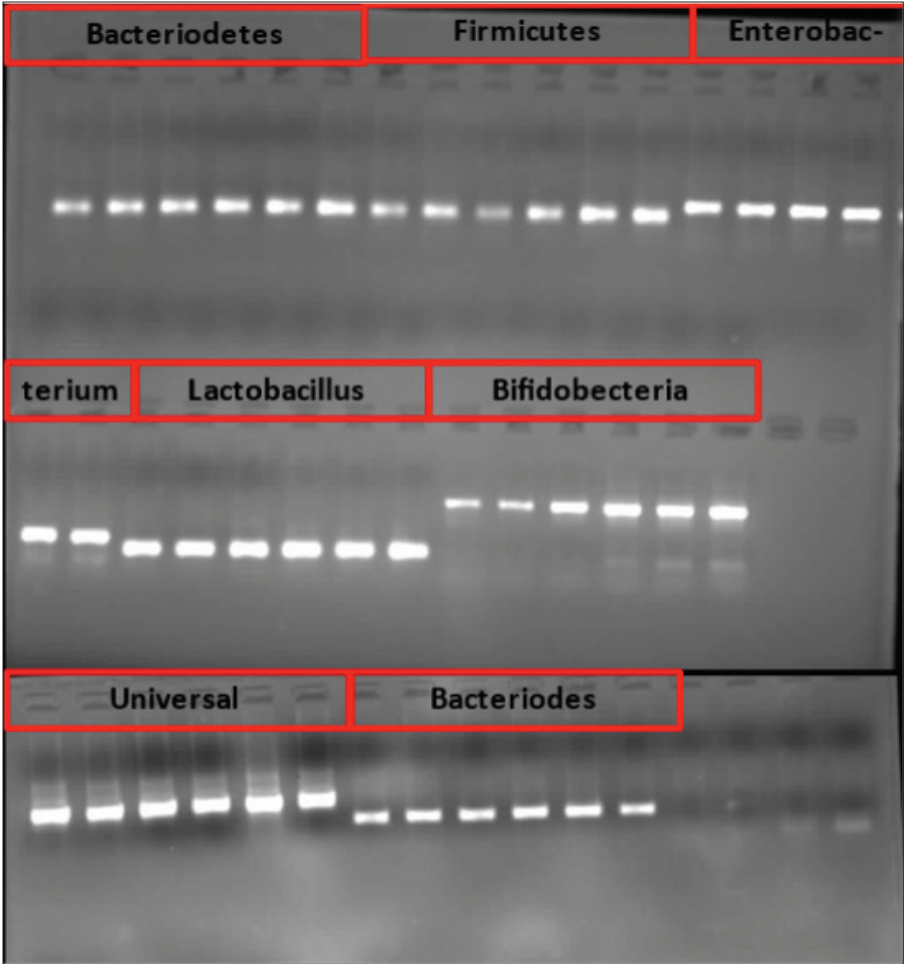
30 Şubat-30 Haziran 2019 tarihleri arasında Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon Anabilim Dalına başvuran fibromiyalji tanısı almış 54 hasta çalışmaya dahil edildi. FMS grubu, hasta raporuna göre ağrı semptomları ile ağrının yeri ve boyutunu baz alan "American College of Rheumatology (ACR)" 2010 yılı tanı kriterleri göz önünde bulundurularak çalışmaya dahil edildi¹⁸. Kontrol grubuna herhangi bir mental ya da fiziksel rahatsızlığı olmayan bireyler dahil edildi.

Ek olarak 30 yaş altı ve 60 yaş üstü bireyler, son üç ayda bağırsak mikrobiyotasını etkileyen ilaçlar, antibiyotikler, yüksek dozlarda probiyotikler ve biyolojik ajanlar kullanan bireyler ve son altı ayda önemli diyet değişiklikleri yaşayan bireyler çalışmadan dışlandı.

Çalışmaya dahil edilen tüm bireylerden anamnez alıntı ve FMS'li hastalar için hazırlanmış olan fibromiyalji etki anketi (FIQ) dolduruldu. FIQ skorlaması; hasta raporları, fonksiyonel durum verileri ve klinik gözlemlerden derlenen bilgilerden geliştirilmiş bir sistemdir. Bu sistemde son bir hafta içinde fiziksel fonksiyonlar, çalışma durumu (iş yükü ve çalışılmayan günlerin varlığı), depresyon, anksiyete, sabah yorgunluğu, ağrı ve sertlik, bitkinlik durumu ve iyi hissedilen günler değerlendirilmektedir.

16S rRNA için Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu Amplifikasyonu

FMS tanısı almış 54 bireyden ve sağlıklı 36 bireyden fekal örnekler toplanıp -80°C'de saklandı. Çalışma sırasında örnekler buz üzerinde çözülerek her biri için 0.3 g feçes tartıldı. DNA izolasyonu EZ-10 Spin Column Soil ve Fecal DNA Miniprep Kit (Bio Basic, Markham ON, Kanada) ile üreticinin protokolüne uygun olarak gerçekleştirildi. DNA izolasyonunun son basamağı olan elüsyon 100 µl olarak yapıldı; örnekler polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) aşamasına kadar -20°C'de saklandı. DNA'ların kalitatif ve kantitatif değerlendirmeleri Multiskan GO (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, ABD) cihazı ile yapıldı. Kantitatif gerçek zamanlı PCR (qRt-PCR) çalışmaları SensiFast SYBR No-ROX (Bioline, Londra, İngiltere) kullanılarak Bio-Rad CFX96 (Bio-Rad, ABD) cihazında gerçekleştirildi ve eşik değer döngü değerleri (Ct) analiz için kullanıldı. Her bir primer için qRt-PCR aşamasına geçilmeden önce konvansiyonel gradiyent PCR yöntemi uygulandı ve %2'lik agaroz jelde yürütülerek uygun erime sıcaklıkları tespit edildi (Şekil 1). Bakteriye özgül 16S rRNA primerleri ve belirlenen bağlanma sıcaklıkları Tablo 1'de verilmektedir¹⁹⁻²². Amplifikasyon koşulları; 95°C'de 5 dakika ve takiben 40 döngü olacak şekilde 95°C'de 10 saniye, 55-



Şekil 1. Konvansiyonel gradiyent polimeraz zincir reaksiyonu jel görüntüleri.

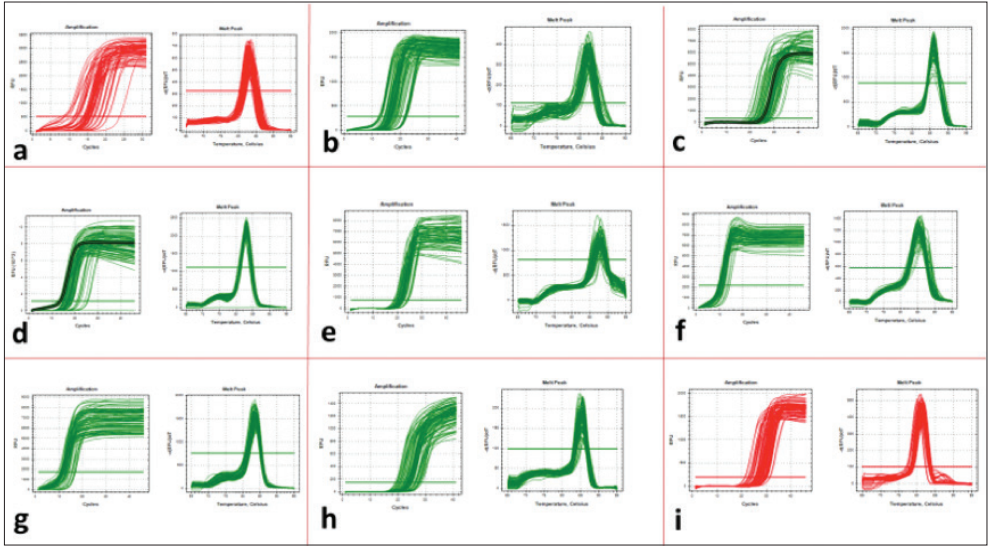
60°C'de 7 saniye, 72°C'de 5 saniye şeklinde uygulandı. Ek olarak, özgül amplifikasyon ürününden elde edilen floresan sinyali artefaktlardan ayırt etmek için qRt-PCR'den sonra erime eğrisi analizi gerçekleştirildi. Erime eğrileri, 65°C'den 95°C'ye yavaş ısıtma ile elde edildi ve her 0.5°C sıcaklık artışında floresan ölçümleri saptandı (Şekil 2).

Elde edilen hedef bakteriye ait Ct değerleri, universal dizi Ct değerleri kullanılarak normalize edildi ardından hasta grubu ile kontrol grubu arasında karşılaştırma yapıldı. Bakteriyel taksonların 16S rRNA sekanslarını kodlayan gen hedeflerinin göreceli miktarları ve göreceli oranları sırasıyla $2^{-\Delta\Delta CT}$ ve $2^{\Delta CT}$ (taksa örneği)/ $2^{\Delta CT}$ (toplam bakteri) değerleri kullanılarak hesaplandı.

Verilerin dağılımı Shapiro Wilk testi ile incelendi. Normal dağılıma sahip değişkenlerin ortalamaları arasındaki fark bağımsız örneklem t testi ile, parametrik olmayan dağılıma

Tablo 1. 16S rRNA Amplifikasyonu için Kullanılan Primerlerin Dizileri ve Tm Değerleri

Bakteri cinsi	İleri primer (5'-3')	Geri primer (5'-3')	Tm (°C)	Kaynak
<i>Bacteroidetes</i>	CAT GTG GTT TAA TTC GAT GAT	AGC TGA CGA CAA CCA TGC AG	55.0	19
<i>Firmicutes</i>	ATG TGG TTT AAT TCG AAG CA	AGC TGA CGA CAA CCA TGC AC	55.0	19
<i>Enterobacter</i>	CAT TGA CGT TAC CCG CAG AAG AAG C	CTC TAC GAG ACT CAA GCT TGC	55.0	21
<i>Lactobacillus</i>	GAG GCA GCA GTA GGG AAT CTT C	GGC CAG TTA CTA CCT CTA TCC TTC TTC	55.0	19
<i>Bifidobacterium</i>	CTC CTG GAA ACG GGT GG	GGT GTT CTT CCC GAT ATC TAC A	55.0	19
<i>Bacteroides</i>	GAG AAG AAG GTC CCC CAC	CGC TAC TTG GCT GGT TCA G	55.0	19
<i>Enterococcus</i>	CCC TTA TTG TTA GTT GCC ATC ATT	ACT CGT TCT TCC CAT GT	55.5	19
<i>Streptococcus</i>	GTA CAG TTG CTT CAG GAC GTA TC	ACG TTC GAT TTC ATC ACG TTG	60.0	22
<i>Universal</i>	ACT CCT ACG GGA GGC AGC AGT	GTA TTA CCG CGG CTG CTG GCA C	56.0	20



Şekil 2. Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) amplifikasyon ve erime eğrisi görselleri. Her qRT-PCR programı sonuna erime eğrisi analizi eklendi ve aynı noktada Tm değerleri alındı.

a. *Bacteroidetes*, b. *Firmicutes*, c. *Enterobacter*, d. *Lactobacillus*, e. *Bifidobacterium*, f. Universal g. *Bacteroides*, h. *Enterococcus*, i. *Streptococcus*.

sahip değişkenlerin ortalamaları arasındaki fark ise Mann-Whitney U testi ile incelendi. Sayısal değişkenler arasındaki ilişkiyi araştırmak için Spearman korelasyon analizi kullanıldı. Verilerin tanımlayıcı istatistikleri ortalama \pm standart sapma, medyan (minimum-maksimum) ve n (%) olarak verildi. Tüm istatistiksel analizler, IBM SPSS Statistics 22.0 programında $\alpha=0.05$ anlamlılık düzeyinde ve %95 güven düzeyinde analiz edildi.

BULGULAR

Bu çalışmada, FMS tanısı almış 54 hasta ve 36 sağlıklı kontrole ait fekal örnekler toplanmış ve *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Enterobacter*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* ve *Streptococcus* açısından mikrobiyomlar incelenmiştir. Her bakteri filumu için hasta-kontrol grupları arasında bulunma yüzdeleri karşılaştırıldığında *Bacteroidetes*, *Firmicutes* ve *Bifidobacterium* için istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmuştur (sırasıyla $p=0.004$, $p<0.001$, $p=0.005$). Buna göre, *Bacteroidetes* ve *Bifidobacterium* yüzdeleri hasta grubunda artmış, *Firmicutes* yüzdesi azalmıştır.

Ek olarak, hastalarda tanı için kullanılan skorlama verileri arasındaki korelasyon incelenmiş ve sonuçlar Tablo II'de verilmiştir. Bu amaçla, fibromiyalji etki anketi "fibromyalgia impact questionnaire (FIQ)", geniş ağrı indeksi "wide pain index (WPI)", semptom şiddet skoru "symptom severity score (SSS)", FIQ skorunun üçüncü (FIQ3) ve dördüncü (FIQ4) sorusu karşılaştırılmıştır. Buna göre, toplam skor ile WPI, SSS ve FIQ3 skorları arasında istatistiksel olarak anlamlı ve pozitif korelasyon saptanmıştır. Şiddet derecesi incelendiğinde, SSS ile FIQ3 skoru ve toplam skor arasında istatistiksel olarak yüksek anlamlı

Tablo II. Fibromiyalji Sendromunda Fibromiyalji Etki Anketi (FIQ) Skoru, Geniş Ağrı İndeksi (WPI) ve Semptom Şiddet Skoru (SSS) Karşılaştırmaları

		FIQ total skor	WPI	SSS	FIQ3	FIQ4
FIQ total skor	r	1	0.479**	0.802**	0.728**	0.788**
	p		p< 0.001	p< 0.001	p< 0.001	p< 0.001
WPI	r	0.479**	1	0.475**	0.317*	0.538**
	p	p< 0.001		p< 0.001	.025	p< 0.001
SSS	r	0.802**	0.475**	1	0.695**	0.752**
	p	p< 0.001	p< 0.001		p< 0.001	p< 0.001
FIQ3	r	0.728**	0.317*	0.695**	1	0.681**
	p	p< 0.001	.025	p< 0.001		p< 0.001
FIQ4	r	0.788**	0.538**	0.752**	0.681**	1
	p	p< 0.001	p< 0.001	p< 0.001	p< 0.001	

FIQ: Fibromiyalji etki anketi, WPI: Geniş ağrı indeksi, SSS: Semptom şiddet skoru, p: Spearman korelasyon katsayısının değerleri, r: Korelasyon katsayısı.
 *İstatistiksel olarak anlamlı değer.
 **İstatistiksel olarak ileri derecede anlamlı değer.

korelasyon olduğu görülmüştür. Anketten alınan toplam puan arttıkça WPI, FIQ3, FIQ4 ve SSS skorları lineer olarak artmaktadır. Ardından FIQ (Tablo III), WPI ve SSS (Tablo IV) skorları ile bakteri yüzdeleri arasındaki korelasyonlara bakılmıştır. Yalnız WPI skorlaması ile bakteri yüzdeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmuştur. WPI skoru ile *Enterobacter* ($r = -0.698$, $p < 0.001$), *Bifidobacterium* ($r = -0.356$, $p = 0.033$) ve *Streptococcus* ($r = -0.356$, $p = 0.033$) yüzdeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı negatif korelasyon bulunmuştur (Tablo IV).

Literatürden seçilen primerlerin özgüllüğü ve uygun erime sıcaklıkları gradiyent PCR yöntemi ile analiz edilmiş ve %2'lik agaroz jelde görüntülenmiştir.

Her qRt-PCR programı sonuna erime eğrisi analizi eklendi ve aynı noktada Tm değerleri alındı.

Bakteriler arasındaki korelasyonlara bakıldığında ise, *Bacteroidetes* ve *Firmicutes* yüzdeleri arasında istatistiksel olarak yüksek anlamlı ve negatif korelasyon bulunmuştur ($r = -0.778$, $p < 0.001$). Buna göre, *Bacteroidetes* yüzdesi yüksek çıkan hastalarda *Firmicutes* yüzdelerinin azaldığı tespit edilmiştir. Aynı zamanda *Enterobacter* ile *Bifidobacterium* yüzdeleri arasında ($r = 0.460$, $p = 0.005$), *Lactobacillus* ile *Firmicutes* yüzdeleri arasında ($r = 0.347$, $p = 0.038$), *Streptococcus* ile *Enterobacter* yüzdeleri arasında ($r = 0.334$, $p = 0.047$) ve *Bifidobacterium* ile *Streptococcus* yüzdeleri arasında ($r = 0.354$, $p = 0.034$) istatistiksel olarak anlamlı pozitif korelasyonlar tespit edilmiştir.

FMS tanılı hastaların cinsiyet ve yaş durumuna göre bakteri yüzdeleri ile ağrı skorları (WPI ve SSS) karşılaştırıldığında ise Tablo V'teki sonuçlara ulaşılmıştır. Buna göre, cinsiyete göre bakteri yüzdeleri ve WPI, SSS skorlamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı

Tablo III. Fibromiyalji Sendromu Olan Hastalarda Fibromiyalji Etki Skoru (FIQ) ve Bakteri Filum Yüzdeleri Karşılaştırmalarının Total Skorlamaları

		FIQ total skor		Bacteroidetes	Firmicutes	Enterobacter	Lactobacillus	Bifidobacteria	Streptococcus
FIQ total score	r	1							
	p								
Bacteroidetes	r	-	1						
	p	0.136							
Firmicutes	r	0.007		-.778**	1				
	p	0.969		0					
Enterobacter	r	-	0.044		-0.075	1			
	p	0.179							
Lactobacillus	r	0.295		0.801	0.662		0.224		
	p	-	0.187	-0.286	.347*	0.208	1		
Bifidobacterium	r	0.275		0.09	0.038	0.224		0.154	
	p	-	0.203	-0.188	0.226	.460**			
Streptococcus	r	0.234		0.272	0.186	0.005	0.37		
	p	-	0.087	-0.195	0.195	.334*	0.184	.354*	1
	p	0.612		0.254	0.255	0.047	0.283	0.034	

FIQ: Fibromiyalji etki anketi, p: Spearman korelasyon katsayısının değerleri, r: Korelasyon katsayısı.
 *İstatistiksel olarak anlamlı değer.
 **İstatistiksel olarak ileri derecede anlamlı değer.

Tablo IV. Fibromiyalji Sendromlu Hastalarda Geniş Ağrı İndeksi (WPI), Semptom Şiddet Skoru (SSS) ve Bakteri Filumları Arasındaki İlişki

			WPI	SSS
Spearman's rho	<i>Bacteroidetes</i>	r	.164	.003
		p	.340	.985
	<i>Firmicutes</i>	r	-.012	-.006
		p	.943	.973
	<i>Enterobacter</i>	r	-.698**	-.086
		p	p< 0.001	.619
	<i>Lactobacillus</i>	r	-.322	-.067
		p	.056	.697
	<i>Bifidobacterium</i>	r	-.356*	-.085
		p	0.033	.621
	<i>Streptococcus</i>	r	-.356*	.085
		p	0.033	.624

WPI: Geniş Ağrı İndeksi, SSS: Semptom şiddet skoru, p: Spearman korelasyon katsayısı değerleri, r: Korelasyon katsayısı.
*İstatistiksel olarak anlamlı değer.
**İstatistiksel olarak ileri derecede anlamlı değer.

Tablo V. Araştırma Sonuçlarının Cinsiyete Göre Karşılaştırılması

	Cinsiyet		p
	Kadın	Erkek	
<i>Bacteroidetes</i>	23.57 ± 11.169	18.25 ± 15.525	0.447*
<i>Firmicutes</i>	23.54 ± 11.256	24.976 ± 15.980	0.839*
<i>Enterobacter</i>	0.13 (0-21.47)	0.002 (0.001-0.333)	0.220**
<i>Lactobacillus</i>	0.007 (0-0.455)	0.003 (0.002-0.010)	0.705**
<i>Bifidobacteria</i>	0.12 (0.001-1.853)	0.029 (0.011-2.452)	0.665**
<i>Streptococcus</i>	0.004 (0-0.08)	0.001 (0-0.008)	0.377**
WPI	11.57 ± 3.648	14.66 ± 5.131	0.181*
SSS	9 (6-12)	7 (6-9)	0.144**
Toplam puan	54.05 ± 9.864	49.19 ± 0.589	0.009*
Yaş	46.63 ± 11.163	36 ± 9	0.120*

WPI: Geniş ağrı indeksi, SSS: Semptom şiddet skoru.
*Bağımsız t testi p değeri.
**Mann-Whitney U testi p değeri.

bir fark bulunmamıştır ($p > 0.05$). Toplam puan cinsiyete göre incelendiğinde kadınlarda ortalama ağrı skoru erkeklere oranla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yüksek tespit edilmiştir ($p = 0.009$).

TARTIŞMA

Bağırsak mikrobiyotası ile insan fizyolojisi arasındaki bağlantı düşünüldüğünde, çoğu hastalığın sağlıklı bağırsak mikrobiyotasının bozulmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu çalışmada, fibromiyalji ile bağırsak mikrobiyotası arasındaki ilişki, hasta ve sağlıklı bireyler arasındaki *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Enterobacter*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* ve *Streptococcus* bakteriyüzdeleri incelenerek araştırılmıştır.

Sağlıklı yetişkinlerde tanımlanan fekal mikrobiyotanın %80'i üç baskın filumda sınıflandırılabilir: *Bacteroides*, *Firmicutes* ve *Actinobacteria*. Genel anlamda, *Firmicutes/Bacteroides* oranı, insan bağırsak mikrobiyotası bileşimiyle önemli ölçüde ilişkili kabul edilmektedir²³.

Firmicutes filumu *Catenibacterium*, *Clostridium*, *Eubacterium*, *Dorea*, *Faecalibacterium*, *Lactobacillus*, *Roseburia*, *Ruminococcus* ve *Veillonella* dahil olmak üzere 200'den fazla farklı cinsten gram-pozitif organizmaları içerirken, *Bacteroidetes* filumu *Bacteroides*, *Odoribacter*, *Prevotella* ve *Tannerella* dahil olmak üzere yaklaşık 20 cins gram-negatif mikroorganizmayı içerir²⁴.

Bağırsaktaki *Firmicutes* ve *Bacteroidetes* filumlarının dengesinin bağırsak homeostazi için önemli etkileri olabileceği bilinmektedir²⁵. Çeşitli araştırmalar, kronik gastrointestinal hastalıkların beyin iltihabını ve dopaminerjik nöronların ölümünü uyardığını göstermiştir^{26,27}. Bu durum göz önüne alındığında bağırsak mikrobiyotasındaki değişikliklerin FMS patogenezinde rol oynadığı düşünülebilir. Ayrıca FMS'de; mide-bağırsak şikayetleri, karın ağrısı/krampları, ishal, kabızlık, IBS hastalığa eşlik eder ve IBS prevalansı %30-35 ile %70 arasında değişmektedir. FMS'nin etiyopatogenezinde azalmış dopamin ve metabolitlerin de rol oynadığı bilinmektedir²⁸.

Bu çalışmanın hipotezi, bağırsak mikrobiyomunda gerçekleşen değişikliklerin FMS etiyopatogenezinde etkili olduğu yönündedir. Bu durum, hastalarda gastrointestinal şikayetleri açıklayabilir ve değişen mikrobiyota kompozisyonu vagal sinir yoluyla beyin omurilik sıvısında (BOS) dopamin, norepinefrin ve serotonin metabolitlerinin seviyesini etkileyebilir.

Hayvan çalışmaları, bağırsakta bulunan mikroorganizmaların vagus sinirini uyurabildiğini ve bu aktivasyonun beyin ve davranışsal etkilerin düzenlenmesinde oldukça kritik bir rol oynadığını göstermiştir. P maddesi, bağırsak-beyin eksenini etkileşimde olan önemli bir nöropeptittir^{29,30}. P maddesi gibi mikrobiyota ile bağırsak-beyin ekseninde yer alan diğer nöropeptitlerin özgül işlevleri henüz tam olarak bilinmese de, kalsitonin ile ilişkili peptit, nöropeptit Y (NPY), vazoaktif intestinal polipeptit, somatostatin ve kortikotropin salgılama faktörünün (CRF) bu konuda önemli rol oynamaya aday olduğu düşünülmektedir³¹.

Gastroenterolojik, metabolik, romatolojik, nörolojik ve psikiyatrik bozukluklar dahil olmak üzere çok sayıda patolojinin bağırsak mikrobiyomundaki değişikliklerle ilişkili olduğu bildirilmiştir. Ayrıca, son yapılan çalışmalar bağırsakta lokalize bakterilerin kronik ağrıda ve özellikle fibromiyaljide rol oynayabileceğini göstermiştir³². Minerbi ve arkadaşları³³,

FMS hastalarından alınan fekal örneklerde tüm genom dizileme analizi yöntemiyle geniş kapsamlı bir araştırma yapmış ve FMS'de bağırsak mikrobiyomunun değiştiğine dair kanıtlar sunmuşlardır. IBS'li hastalarda yapılan geniş çaplı bir araştırmada, sağlıklı kontrollere kıyasla IBS'de *Firmicutes* oranının arttığı, *Bacteroidetes* oranının azaldığı ve dolayısıyla *Firmicutes/Bacteroidetes* oranının (F/B oranı, yaklaşık 1.2-3.5) arttığı tespit edilmiştir³⁴.

Diğer taraftan, yüksek *Firmicutes* ve düşük *Bacteroides* oranının, genellikle sağlıklı ve çeşitli bir mikrobiyomla ilişkili olduğu bilinmektedir²³. Bu açıdan bakıldığında, çalışmamızda FMS'li hastalarda sağlıklı kontrollere oranla düşen *Firmicutes* ve artan *Bacteroidetes* oranı bağırsak mikrobiyom dengesinin olumsuz yönde değiştiğini göstermektedir. Ek olarak, bulgularımız FMS'de bağırsak disbiyozu olduğunu ve mikrobiyota kompozisyonunun değiştiğini göstermesi açısından önemlidir.

Güncel bir çalışmada, sağlıklı kontrollere oranla majör depresif bozukluğu bulunan hastalarda *Firmicutes* oranının oldukça düştüğü gösterilmiştir ve bu durumun kısa zincirli yağ asitlerinin beyindeki enflamasyonu tetiklemesi nedeniyle olabileceği düşünülmüştür³⁵. FMS hastalarında, IBS dışında dirençli yorgunluk, uyku bozuklukları, bilişsel bozukluklar ve duygudurum bozukluğu bulgularını göz önüne alırsak düşük *Firmicutes* oranı anlamlı olabilir.

Bacteroidetes türleri normalde sağlıklı bağırsak florasında bulunur. Ancak iyi huylu kommensal yaşayan bazı bakteri türlerinin bu ortaklık sırasında bazı etkenler nedeniyle önemli morbidite ve mortaliteye sahip enfeksiyonlardan da sorumlu olabileceği bilinmektedir. Bu durum, bağırsak florasındaki diğer organizmalarla gen paylaşımı ile açıklanabilir. Ayrıca, *Bacteroidetes* gibi oldukça zengin gen bankasına sahip türlerde, yeni beslenme yolları bulmak, hücreyi toksik substratlardan uzaklaştırmak için dışarı akış pompalarını aktive etmek veya yeni yüzey epitoplarnı geliştirmek için bazı genler sonradan aktive edilebilir³⁶. Her durumda, sağlıklı mikrobiyom dengesindeki değişimin olumsuz sonuçlar doğurabileceği açıktır.

Ek olarak, sunulan bu çalışmada hasta raporları doğrultusunda hazırlanan ağrı skorlama sistemleri arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif korelasyon ve WPI skorlaması ile bakteri yüzdeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmuştur. Bu durum da FMS'de mikrobiyota etkisini destekler niteliktedir. Ayrıca, skorlama sistemlerinde cinsiyete göre dağılım incelendiğinde, toplam puan bazında kadınlarda ortalama ağrı skorunun erkeklere oranla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yüksek bulunması literatürle uyumlu ek bir bulgudur.

Bilindiği üzere, bakterilerde ribozomal alt birimler 5S, 16S ve 23S rRNA'yı içermektedir. Bu rRNA gen dizileri, türler arasında büyük oranda korunmuş olmasına rağmen filogenetik farklılıkları yansıtan değişken bölgeler içermektedir. Özellikle 16S rRNA geni, PCR temelli çalışmalar için korunan alanların ve evrimsel kronometreler olarak hareket eden değişken bölgelerin en izlenebilir kombinasyonunu sağlamaktadır ve bu nedenle filogenetik tanımlamada sıklıkla tercih edilmektedir³⁷.

Bağırsak mikrobiyotasını karakterize etmek için kullanılan en yaygın ve hassas yöntem 16S rRNA'nın yeni nesil dizileme yöntemleri ile analiz edilmesidir. Bu yöntemin avantajları filogenetik sınıflandırmada kantitatif deteksiyon sağlaması, hızlı olması, bilinmeyen bakteriler için de analizin gerçekleştirilebilmesidir; dezavantajları ise PCR kaynaklı teknik sorunların görülmesinin yanı sıra, zahmetli ve pahalı olması ve veri analizi gerektirmesidir³⁷.

Yaygın kullanılan diğer bir yöntem ise, kantitatif PCR temelli 16S rRNA'nın amplifikasyonudur. Bu çalışmalarda çift zincire bağlanan çeşitli floresan boyalar kullanılarak (örn. SYBR Green) gerçek zamanlı olarak amplifikasyon izlenebilir. Bu yöntemin avantajı hızlı ve uygun maliyetli bir şekilde kantitatif olarak filogenetik saptama yapmasıdır ancak yine PCR nedenli aksaklıkların olacağı ve bilinmeyen bakterilerin tespit edilemeyeceği, hedefe yönelik çalışma gerektirdiği göz önünde bulundurulmalıdır.

qRt-PCR çalışmalarında göreceli veya mutlak kantifikasyon analiz yöntemleri uygulanabilmektedir. Mutlak kantifikasyonda pozitif kontrol aracılığıyla bir standart eğri çizilerek bulunan Ct değerleri bu standarta göre işlenmekte ve hedef genin tam kopya konsantrasyonu belirlenmektedir. Göreceli kantifikasyonda ise, hedef gen ile bir referans gen de analiz edilerek Ct değerlerini normalize edecek bir kalibratör hesaplanmakta ve kalibratöre göre bir numunedeki hedef gen miktarı belirlenmektedir. Lee ve arkadaşları³⁸, 16S rRNA'nın amplifikasyon sonuçlarını hem göreceli hem de mutlak yöntemlerle karşılaştırmış ve her iki yöntemin avantaj/dezavantaj durumuna rağmen benzer sonuçlar sergilediğini göstermiştir. Dolayısıyla mikrobiyota çalışmalarında her iki yöntemde de tercih edilebilir ancak pozitif kontrol olarak bilinen bir örneğin kullanılması çalışmanın hassasiyeti için ön koşuldur.

Bu çalışmada görece uygun maliyeti, uygulama kolaylığı ve hızlı sonuç vermesi nedeniyle kantitatif PCR yöntemi tercih edilmiştir. Ancak çalışmamızın en önemli kısıtlılığı göreceli kantifikasyon uygulanırken pozitif kontrol kullanılmamasıdır. Burada, 16S rRNA amplifikasyonu aracılığıyla hedef bakteri miktarı total bakteri miktarına oranlanarak dolaylı yoldan kantifikasyon yapılmıştır ve bu durum ileri konfirmasyonlar gerektirmektedir. Bir diğer kısıtlılık ise bakterilerin filum düzeyinde incelenmiş olmasıdır. Çalışmamız filum düzeyinde genel manzarayı sunmaktadır; türe özgü analizler yapılmamıştır. Bu nedenle FMS kliniğine yönelik bir yorum yapmak doğru olmayacaktır. Bu eksiklikler verilerimizin hassasiyetini azaltmakla birlikte ileride gerçekleştirilecek olası farklı tekniklerle türe özgü çalışmaların önünü açması bakımından önemli bulgular içermektedir.

Sonuç olarak, çalışmamızda *Bacteroidetes*, *Firmicutes* ve *Bifidobacterium* filumları ile FMS arasında anlamlı ilişki bulunmuştur. Daha çok sayıda bireyi içeren kohortlarda yeni nesil dizileme teknolojileri kullanılarak yapılacak kapsamlı ve ileri araştırmalar fibromiyalji ile mikrobiyota ilişkisini daha çarpıcı bir şekilde ortaya çıkarabilir ve olası tedavi seçeneklerini değerlendirmede yol gösterici olabilir.

TEŞEKKÜR

Entelektüel katkıları ve yardımları için tıbbi biyolog Doç. Dr. Emrah Yücesan'a teşekkürlerimizi sunarız.

ETİK KURUL ONAYI

Bu çalışma, Bezmialem Vakıf Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu onayı ile gerçekleştirildi (Tarih: 16.10.2018, Karar No: 19/252). Helsinki Deklarasyonu'nun etik kurallarına uygun olarak ve tüm katılımcılardan yazılı bilgilendirilmiş onam formları alınarak çalışılmıştır.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

- Bellato E, Marini E, Castoldi F, Barbasetti N, Mattei L, Bonasia DE, et al. Fibromyalgia syndrome: etiology, pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Pain Res Treat* 2012; (2012): 426130.
- Schwarz MJ, Spath M, Muller-Bardorff H, Pongratz DE, Bondy B, Ackenheil M. Relationship of substance P, 5-hydroxyindole acetic acid and tryptophan in serum of fibromyalgia patients. *Neurosci Lett* 1999; 259(3): 196-8.
- Russell IJ, Orr MD, Littman B, Vipraio GA, Alboukrek D, Michalek JE, et al. Elevated cerebrospinal fluid levels of substance P in patients with the fibromyalgia syndrome. *Arthritis Rheum* 1994; 37(11): 1593-601.
- Bengtsson A, Henriksson KG, Jorfeldt L, Kagedal B, Lennmarken C, Lindstrom F. Primary fibromyalgia. A clinical and laboratory study of 55 patients. *Scand J Rheumatol* 1986; 15(3): 340-7.
- Wolfe F, Smythe HA, Yunus MB, Bennett RM, Bombardier C, Goldenberg DL, et al. The American College of Rheumatology 1990 Criteria for the Classification of Fibromyalgia. Report of the Multicenter Criteria Committee. *Arthritis Rheum* 1990; 33(2): 160-72.
- Yunus M, Masi AT, Calabro JJ, Miller KA, Feigenbaum SL. Primary fibromyalgia (fibrositis): clinical study of 50 patients with matched normal controls. *Semin Arthritis Rheum* 1981; 11(1): 151-71.
- Staud R, Smitherman ML. Peripheral and central sensitization in fibromyalgia: pathogenetic role. *Curr Pain Headache Rep* 2002; 6(4): 259-66.
- Staud R, Rodriguez ME. Mechanisms of disease: pain in fibromyalgia syndrome. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2006; 2(2): 90-8.
- Sugerman DT. JAMA patient page. Fibromyalgia. *JAMA* 2014; 311(15): 1577.
- Clauw DJ, Crofford LJ. Chronic widespread pain and fibromyalgia: what we know, and what we need to know. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2003; 17(4): 685-701.
- Gracely RH, Petzke F, Wolf JM, Clauw DJ. Functional magnetic resonance imaging evidence of augmented pain processing in fibromyalgia. *Arthritis Rheum* 2002; 46(5): 1333-43.
- Stratz T, Samborski W, Hrycaj P, Pap T, Mackiewicz S, Mennet P, et al. [Serotonin concentration in serum of patients with generalized tendomyopathy (fibromyalgia) and chronic polyarthritis]. *Med Klin (Munich)* 1993; 88(8): 458-62.
- Wolfe F, Russell IJ, Vipraio G, Ross K, Anderson J. Serotonin levels, pain threshold, and fibromyalgia symptoms in the general population. *J Rheumatol* 1997; 24(3): 555-9.
- Erdrich S, Hawrelak JA, Myers SP, Harnett JE. Determining the association between fibromyalgia, the gut microbiome and its biomarkers: A systematic review. *BMC Musculoskelet Disord* 2020; 21(1):181.
- Duvallet C, Gibbons SM, Gurry T, Irizarry RA, Alm EJ. Meta-analysis of gut microbiome studies identifies disease-specific and shared responses. *Nat Commun* 2017; 8(1): 1784.
- Thurm T, Ablin J, Buskila D, Maharshak N. Fecal microbiota transplantation for fibromyalgia: a case report and review of the literature. *Open J Gastroenterol* 2017; 7(4): 131-9.
- Galland L. The gut microbiome and the brain. *J Med Food* 2014; 17(12): 1261-72.

18. Wolfe F, Clauw DJ, Fitzcharles MA, Goldenberg DL, Katz RS, Mease P, et al. The American College of Rheumatology preliminary diagnostic criteria for fibromyalgia and measurement of symptom severity. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 2010; 62(5): 600-10.
19. Murri M, Leiva I, Gomez-Zumaquero JM, Tinahones FJ, Cardona F, Soriguer F, et al. Gut microbiota in children with type 1 diabetes differs from that in healthy children: a case-control study. *BMC Med* 2013; 11: 46.
20. Nordeste R, Tessema A, Sharma S, Kovac Z, Wang C, Morales R, et al. Molecules produced by probiotics prevent enteric colibacillosis in pigs. *BMC Vet Res* 2017; 13(1): 335.
21. Obermajer T, Lipoglavsek L, Tompa G, Treven P, Lorbeg PM, Matijasic BB, et al. Colostrum of healthy Slovenian mothers: microbiota composition and bacteriocin gene prevalence. *PLoS One* 2014; 10(4): e0123324.
22. Picard FJ, Ke D, Boudreau DK, Boissinot M, Huletsky A, Richard D, et al. Use of tuf sequences for genus-specific PCR detection and phylogenetic analysis of 28 streptococcal species. *J Clin Microbiol* 2004; 42(8):3686-95.
23. Kenyon J CS, Izadi H. A retrospective outcome study of 42 patients with Chronic Fatigue Syndrome, 30 of whom had Irritable Bowel Syndrome. Half were treated with oral approaches, and half were treated with Faecal Microbiome Transplantation. *Human Microbiome Journal* 2019; 13: 100061.
24. Tremaroli V, Bäckhed F. Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. *Nature* 2012; 489(7415):242-9.
25. Assas BM, Miyan JA, Pennock JL. Cross-talk between neural and immune receptors provides a potential mechanism of homeostatic regulation in the gut mucosa. *Mucosal Immunol* 2014; 7(6): 1283-9.
26. Hawkes CH, Del Tredici K, Braak H. Parkinson's disease: a dual-hit hypothesis. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2007; 33(6): 599-614.
27. Zheng LF, Song J, Fan RF, Chen CL, Ren QZ, Zhang XL, et al. The role of the vagal pathway and gastric dopamine in the gastroparesis of rats after a 6-hydroxydopamine microinjection in the substantia nigra. *Acta Physiol (Oxf)* 2014; 211(2): 434-46.
28. Russell IJ, Vaeroy H, Javors M, Nyberg F. Cerebrospinal fluid biogenic amine metabolites in fibromyalgia/fibrositis syndrome and rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1992; 35(5): 550-6.
29. Holzer P, Farzi A. Neuropeptides and the microbiota-gut-brain axis. *Adv Exp Med Biol* 2014; 817: 195-219.
30. Morais LH, Schreiber HLT, Mazmanian SK. The gut microbiota-brain axis in behaviour and brain disorders. *Nat Rev Microbiol* 2020; 19(4): 241-55.
31. Forsythe P, Bienenstock J, Kunze WA. Vagal pathways for microbiome-brain-gut axis communication. *Microbial endocrinology: the microbiota-gut-brain axis in health and disease: Springer* 2014; 817: 115-33.
32. Minerbi A, Fitzcharles MA. Gut microbiome: pertinence in fibromyalgia. *Clin Exp Rheumatol* 2020; 38 Suppl 123(1): 99-104.
33. Minerbi A, Gonzalez E, Brereton NJB, Anjarkouchian A, Dewar K, Fitzcharles MA, et al. Altered microbiome composition in individuals with fibromyalgia. *Pain* 2019; 160(11): 2589-602.
34. Duan R, Zhu S, Wang B, Duan L. Alterations of gut microbiota in patients with irritable bowel syndrome based on 16S rRNA-Targeted Sequencing: A Systematic Review. *Clin Transl Gastroenterol* 2019; 10(2): e00012.
35. Huang Y, Shi X, Li Z, Shen Y, Shi X, Wang L, et al. Possible association of *Firmicutes* in the gut microbiota of patients with major depressive disorder. *Neuropsychiatr Dis Treat* 2018; 14: 3329-37.
36. Wexler HM. *Bacteroides*: the good, the bad, and the nitty-gritty. *Clin Microbiol Rev* 2007; 20(4): 593-621.
37. Fraher MH, O'Toole PW, Quigley EM. Techniques used to characterize the gut microbiota: a guide for the clinician. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2012; 9(6): 312-22.
38. Lee C, Lee S, Shin SG, Hwang S. Real-time PCR determination of rRNA gene copy number: absolute and relative quantification assays with *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* 2008; 78(2): 371-6.