



**DENEYSEL DİYABETİK SIÇANLARDA FEKAL MİKROBİYOTA
TRANSFERİ (FMT)'NİN TEDAVİ EDİCİ ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Server ŞAHİN

**DOKTORA TEZİ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

HAZİRAN 2017

Server ŞAHİN tarafından hazırlanan “Deneysel Diyabetik Sıçanlarda Fekal Mikrobiyota Transferi (FMT)’nin Tedavi Edici Etkilerinin Araştırılması” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ / ~~OY ÇOKLUĞU~~ ile Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. E. Sevda MENEVŞE

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik AD.

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum~~



Başkan : Doç. Dr. Taner AKAR

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Adli Tıp AD.

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum~~



Üye : Doç. Dr. H. İlke ÖNEN

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik AD.

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum~~



Üye : Yrd. Doç. Dr. Senem Ceren ÖZEN KARATAYLI

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hepatoloji Enstitüsü

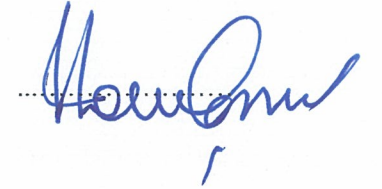
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum~~



Üye : Yrd. Doç. Dr. Faruk Metin ÇOMU

Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji AD.

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum~~



Tez Savunma Tarihi: 15/06/2017

Jüri üyeleri tarafından DOKTORA tezi olarak uygun görülmüş olan bu tez Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Mustafa ASLAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.


Server ŞAHİN

15/06/2017

DENEYSEL DİYABETİK SIÇANLARDA FEKAL MİKROBİYOTA TRANSFERİ (FMT)'NİN TEDAVİ EDİCİ ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

(Doktora Tezi)

Server ŞAHİN

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Haziran 2017

ÖZET

Fekal Mikrobiyota Transfer (FMT) metodu, hastalıkla ilişkili patolojik belirtilerin neden olduğu bağırsak disbiyozisini düzenlemek amacı ile sağlıklı bir donörün dışkı konsorsiyumunun, hasta bir alıcının gastrointestinal sistemine transfer edilmesi olarak tanımlanmaktadır. Bu tez çalışmasında deneysel diyabet modeli oluşturulan sıçanlarda yeni bir alternatif tedavi yöntemi olan FMT tedavisinin, insülin ve FMT-İnsülin kombine tedavileri ile karşılaştırılması ve bağırsak mikrobiyomunda, geçirgenliğinde ve konak metabolizmasında önemli rol oynayan biyokimyasal ve moleküler mekanizmalar üzerindeki etkilerini araştırdık. Deneysel diyabet oluşturulduktan sonra diyabetik gruplara FMT, insülin ve ins+FMT kombine tedavileri uygulandı. Tüm grupların bağırsak bakteri profilleri, PCR-DGGE yöntemi kullanılarak belirlendi ve dendogramlar UPGMA metodu kullanılarak çizildi. Kısa zincirli yağ asitlerinin miktarları, GC-MS cihazı ile ölçüldü. Tüm grupların plazma insülin değerleri ELİZA ile analiz edildi. Doku örneklerinde ZO-1 ve klaudin-1 genlerinin ekspresyon düzeylerindeki değişiklikler, qRT-PCR metodu ile belirlendi. FMT grubuna göre İns+FMT grubundaki hayvanların ağırlıklarının anlamlı olarak arttığı bulundu ($p=0,034$). Fekal ve sekum bakteri profillerinden oluşturulan dendogramda grupların farklı dallarda kümelandikleri görüldü. Diyabetik gruplarda ZO-1 mRNA düzeyinin anlamlı bir şekilde azaldığı belirlendi ($p=0,001$). Sağlıklı donör grubuna göre diyabet grubunun plazma insülin düzeylerinde anlamlı bir azalış gözlemlendi ($p=0,006$). Bu sonuçlar, FMT tedavisinin bağırsak mikroflorasının yeniden düzenlenmesinde, diyabet metabolizmasında ve bağırsak geçirgenliğinde önemli olan biyokimyasal ve moleküler mekanizmalar üzerinde etkili olabileceğini göstermiştir.

Bilim Kodu :1055.1

Anahtar Kelimeler :FMT, ZO-1, klaudin-1, Deneysel diyabet, SCFA, Mikrobiyota

Sayfa Adedi :102

Danışman :Prof. Dr. E. Sevda MENEVŞE

INVESTIGATION OF THE THERAPEUTICAL EFFECTS OF FECAL MICROBIOTA TRANSFER (FMT) IN EXPERIMENTAL DIABETIC RATS

(Ph. D. Thesis)

Server ŞAHİN

GAZI UNIVERSITY

INSTITUTE OF HEALTH SCIENCES

June 2017

ABSTRACT

Fecal Microbiota Transfer (FMT) method is defined as the infusion of a healthy donor stool consortium to the gastrointestinal tract of a recipient patient for the purpose of regulating intestine dysbiosis caused by pathological symptoms associated with the disease. In this thesis, we have investigated the effects of FMT treatment, a new alternative treatment method in experimental diabetes rat models, on the biochemical and molecular mechanisms that play an important role in intestinal microbiome, permeability and host metabolism, compared with insulin and FMT-insulin combination therapies. After experimental diabetes was established, diabetic groups were treated with FMT, insulin and ins+FMT combined treatments. Intestinal bacteria profiles of all groups were characterized by using PCR-DGGE and dendrograms were drawn using UPGMA method. Amounts of short chain fatty acids were measured by GC-MS device. Plasma insulin levels of all groups were analyzed by ELISA method. Changes in expression level of ZO-1 and claudin-1 genes were determined by qRT-PCR method in tissue samples. According to the FMT group, the weights of the animals in the Ins+FMT group increased significantly ($p=0,034$). It was observed that the groups were clustered in different branches in the dendrogram formed by fecal and secal bacterial profiles. ZO-1 mRNA levels were significantly decreased in diabetic groups ($p=0,001$). Plasma insulin levels of the diabetic group were significantly decreased according to the healthy donor group ($p=0,006$). These results demonstrate that FMT treatment might be effective on important biochemical and molecular mechanisms in rearrangement of intestinal microflora, diabetes metabolism and intestinal permeability.

Science Code :1055.1

Key Words :FMT, ZO-1, Claudin-1, Experimental diabetes, SCFA, Microbiota

Page Number :102

Advisor :Prof. Dr. E. Sevda MENEVSE

TEŞEKKÜR

Doktora eğitim sürecinde bana rehberlik eden, akademik anlamda bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, özverisi ile benden desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, iyi niyeti ve hoşgörüsü ile yoluma daima ışık tutan değerli hocam Sayın Prof. Dr. E. Sevda MENEVŞE'ye sonsuz şükranlarımı sunarım.

Doktora eğitimim süresince engin bilgi ve deneyimlerini büyük bir özveriyle aktaran, desteklerini her zaman hissettiğim çok değerli hocalarım Sn Doç. Dr. H. İlke ÖNEN'e ve Sn Yrd. Doç. Dr. Senem Ceren ÖZEN KARATAYLI'ya teşekkür ederim.

Tez çalışmam boyunca laboratuvarında deneyimlerini benden esirgemeyen, maddi ve manevi olarak her zaman yanımda olan Candaş! çalışma arkadaşlarım Uzm. Vet. Hekim Dr. Burcu EKİM'e, Arş. Gör. Selen GÜÇLÜ DURGUN'a ve Uzm. Mol. Bio. Caner ÖZDEMİR'e teşekkür ederim.

Doktora eğitimim boyunca bütün zorlukları benimle göğüsleyip sevgi ve ilgilerini daima hissettiren, bana güç veren, bu hayattaki en büyük dayanağım olan özellikle hayat arkadaşım Yıldız'ım ve sevgili oğlum Ömer Buğra başta olmak üzere tüm aileme ve son olarak hayat felsefesi "hiçbir canlıyı incitmemek, karşılıksız bir şekilde sevgiyi ve hoşgörüyü tüm kalplere aksettirmek" olan bu hayatta en çok özlediğim canım rahmetli babam Hasan ŞAHİN'e ebediyyen teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	xi
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xii
RESİMLERİN LİSTESİ	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Fekal Mikrobiyota Transferi (FMT)	3
2.1.1. Fekal mikrobiyota transfer tedavisinde sağlıklı donör kriterleri.....	3
2.1.2. Fekal mikrobiyota transfer tedavisinin yan etkileri	6
2.2. Tip 1 Diyabet (T1D).....	7
2.2.1. Tip 1 diyabet hayvan modelleri	9
2.3. Bağırsak Mikroflorası	10
2.3.1. Bağırsak mikroflorası ve bağışıklık sistemi.....	11
2.3.2. Bağırsak mikroflorasının patojenler ile rekabeti.....	13
2.3.3. Bağırsak mikroflorasının konak metabolizması ile ilişkisi.....	15
2.4. Bağışıklık Sisteminin Kısa Zincirli Yağ Asitleri (SCFA) İle Düzenlenmesi	16
2.4.1. G-protein eşlenikli reseptör 43 (GPR43) aktivasyonu	17
2.4.2. Histon deasetilaz inhibisyonu	17

	Sayfa
2.4.3. Otofaji düzenlenmesi	17
2.5. Bağırsak Geçirgenliği.....	18
2.5.1. Bağırsak geçirgenliğinin kısa zincirli yağ asitleri ile düzenlenmesi.....	19
2.5.2. Bağırsak geçirgenliğinin değişimi ve tip 1 diyabet.....	21
2.6. Bağırsak Bariyeri	22
2.7. Sıkı Bağlantılar.....	22
2.7.1. Zonula okludensler.....	23
2.7.2. Okludinler	24
2.7.3. Klaudinler.....	24
2.8. Zonulin Proteini ve Sinyal İletimi.....	25
2.9. T1D Bağırsak Mikroflorasında Farklılık Gösteren Bakteriler.	26
2.10. Diyabet İlaçlarının Bağırsak Mikroflorasında Oluşturduğu Değişimler.....	28
2.11. Bağırsak Mikroflorasının Yeniden Düzenlenmesi İle T1D'nin Tedavisi.....	28
3. GEREÇ VE YÖNTEM	31
3.1. Etik Kurul.....	31
3.2. Deney Hayvanları	31
3.3. Kullanılan Cihazlar	31
3.4. Kullanılan Sarf Malzemeleri.....	32
3.5. Kullanılan Kimyasal Maddeler	32
3.6. Kullanılan Kitler	34
3.7. Kullanılan Solüsyonların Hazırlanması	34
3.7.1. 0,5 M EDTA (pH:8) hazırlanışı	34
3.7.2. 5X Tris borik asit EDTA (TBE) hazırlanışı.....	34
3.7.3. 1X TBE (Running buffer) hazırlanması.....	34

Sayfa

3.7.4. %1'lik agaroz jel hazırlanması.....	35
3.7.5. %40'lık Akrilamid/Bisakrilamid (37.5:1) solüsyonu.....	35
3.7.6. 50X Tris asetik asit EDTA (TAE) tamponunun hazırlanışı.....	35
3.7.7. 1X TAE (Running Buffer) hazırlanması.....	35
3.7.8. %10'luk Amonyum Persülfat (APS) hazırlanışı	35
3.7.9. DCode boyama solüsyonunun hazırlanması	36
3.7.10. %8'lik %100 denatüre edici solüsyonun hazırlanışı	36
3.7.11. %8'lik %0 denatüre edici solüsyonun hazırlanması	36
3.7.12. %8'lik %80 denatüre edici (High) jelin hazırlanışı	36
3.7.13. %8'lik %20 denatüre edici (Low) jelin hazırlanması	36
3.7.14. 0,1 M sodyum sitrat tamponunun hazırlanışı.....	37
3.7.15. STZ solüsyonu	37
3.7.16. Fekal mikrobiyota transfer solüsyonunun hazırlanması	37
3.7.17. %25'lik Metafosforik Asit solüsyonu.....	37
3.7.18. Etidyum bromür hazırlanışı	37
3.8. Yöntemler.....	38
3.8.1. Deneysel diyabetik sıçan modelinin oluşturulması ve uygulamalar	38
3.8.2. Deney grupları	38
3.8.3. Hayvan uygulamalarının sonlandırılması	40
3.8.4. Dışkı örneklerinden total (prokaryotik+ökaryotik) DNA izolasyonu.....	41
3.8.5. PCR-DGGE yöntemi ile fekal ve sekum mikroflora profillerinin belirlenmesi	44
3.8.6. Distal kolon doku örneklerinden total RNA izolasyonu.....	48
3.8.7. Gen ifadenmesinin real-time PCR ile belirlenmesi.....	49
3.8.8. GAPDH, ZO-1 ve Klaudin-1 genlerinin RT-PCR tepkime karışımları....	50

	Sayfa
3.8.9. Applied Biosystems 7500 Fast RT-PCR sistemi deney programı	50
3.8.10. Gaz kromatografi (GC) cihazı ile uçucu yağ asitlerinin analizi.....	51
3.8.11. İnsülin düzeylerinin ELİZA yöntemi ile ölçülmesi	53
3.9. İstatistiksel analiz	54
4. BULGULAR	55
5. TARTIŞMA	71
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	83
KAYNAKLAR	87
EKLER.....	97
EK-1. Deney hayvanları etik kurul onayı	98
ÖZGEÇMİŞ	100

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. FMT tedavisinde sağlıklı donör olabilme kriterleri ve bu donörlerin dışkı ve kan parametrelerinin ve bazı demografik özelliklerinin incelenmesi....	4
Çizelge 2.2. FMT tedavisi yapılan hastalarda görülebilen kısa veya uzun süreli yan etkiler	7
Çizelge 2.3. Bağırsak mikroflorasının değişimi ile ilişkili hastalıklar.....	11
Çizelge 2.4. Tip 1 diyabet bağırsak mikroflora çalışmaları.....	27
Çizelge 3.1. Total DNA izolasyonu yapılan fekal örnekleri.....	41
Çizelge 3.2. Total DNA izolasyonu yapılan sekum içerikleri	42
Çizelge 3.3. Bakterilerin V3 16S rRNA bölgelerine özgün evrensel primerler ve sekansları.....	45
Çizelge 3.4. Touchdown PCR bileşenleri ve miktarları.....	45
Çizelge 3.5. Touchdown PCR tepkime programı	46
Çizelge 3.6. ZO-1, Klaudin-1 ve GAPDH genlerine ait primerler	49
Çizelge 3.7. GAPDH, ZO-1 ve Klaudin-1 genlerine ait Real Time PCR tepkime bileşenleri	50
Çizelge 3.8. GAPDH, ZO-1 ve klaudin-1 genlerinin mRNA düzeylerinin belirlenmesinde kullanılan qRT-PCR deney programı.....	51

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Tip 1 diyabet patogenezi.....	9
Şekil 2.2. Mikrofloranın patojenlere karşı geliştirdiği direkt ve indirekt direnç mekanizmaları	14
Şekil 2.3. Konak metabolizmasının bağırsak mikroflorası ile düzenlenmesi.....	16
Şekil 2.4. Bağışıklık sisteminin SCFA'lar ile düzenlenmesi	18
Şekil 2.5. Bağırsak geçirgenliği yolları.....	19
Şekil 2.6. Kısa zincirli yağ asitleri (SCFA)'nin fonksiyonları.....	20
Şekil 2.7. Sıkı bağlantı ve skaffold proteinleri	23
Şekil 2.8. ZO-1, ZO-2 ve ZO-3 integral skaffold sıkı bağlantı proteinleri ve diğer proteinler ile etkileşimleri	24
Şekil 2.9. Zonulin sinyal iletimi.....	26
Şekil 3.1. % 80-20'lik DGGE jel sistemi görünümü	47
Şekil 3.2. Uçucu yağ asidi kalibrasyon eğrisi	52
Şekil 3.3. Sırası ile asetik, propiyonik, izobütirik, bütirik, izovalerik ve valerik asit uçucu yağ asitlerinin kromatogramı.....	52

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 3.1. Ötanazi sonrası hayvanlardan örneklerin alınması	41



SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler

Açıklamalar

gr	Gram
M	Molar
mg	Miligram
ml	Mililitre
mM	Milimolar
nm	Nanometre
µl	Mikrolitre
cm²	Santimetrekare
°C	Santigrat
pmol	Pikomol
U	Ünite
mA	Miliamper

Kısaltmalar

Açıklamalar

AIDS	Edinilmiş bağışıklık eksikliği sendromu
APS	Amonyum persülfat
BBDP	Diyabete yatkın rat
BBDR	Diyabete dirençli rat
BCFA	Dallı zincirli yağ asidi
DGGE	Denatüre edici gradiyent jel elektroforezi
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
EGFR	Epidermal büyüme faktörü reseptörü
ERK1/2	Hücre dışı sinyal düzenleyici kinaz 1/2
FMT	Fekal mikrobiyota transferi
FOXP3	Forkhead-winged heliks transkripsiyon faktörü

Kısaltmalar**Açıklamalar**

GALT	Bağırsak-ilişkili lenfoid doku
GC	Gaz kromatografi
GLP-1	Glukagon-benzeri peptid-1
GPR41	G protein-eşlenikli reseptör 41
GPR43	G protein-eşlenikli reseptör 43
HDACs	Histon deasetiltransferazlar
HP2	İnsan pre-haptoglobin 2
Hsp-25	Isı şok protein-25
IBD	İnflamatuvar bağırsak hastalığı
IBS	İrritable bağırsak sendromu
IFN-γ	İnterferon-gama
IgA	İmmünoglobülin A
IgG	İmmünoglobülin G
IgM	İmmünoglobülin M
IL-10	İnterlökin-10
IL-12	İnterlökin-12
IL-18	İnterlökin-18
IL-1β	İnterlökin-1 beta
IL-23	İnterlökin-23
ILC	Doğal lenfoid hücreler
İGN	İntestinal glukoneogenez
JAMs	Bağlantı adezyon molekülleri
LEW1.WR1	Kilham rat virüs-uyarımlı T1D sıçan
LRR	Zengin lösin tekrarı
MAMPs	Mikrobiyal-ilişkili moleküler patern reseptörler
MCT-1	Monokarboksilat transporter-1
MHC	Major histokompatibilite kompleks
mRNA	Elçi RNA
MS	Multiple sklerozis
MUC-2	Musin-2
MyD88 KO	Miyeloid farklılaşma primer cevap geni 88 knock-out
NF-κB	Nükleer faktör-kappa B

Kısaltmalar**Açıklamalar**

NLRC4	NLR ailesi CARD kısmı taşıyan 4 inflamazom
NLRP3	NOD-LRR ailesi-pirin kısmı taşıyan 3 inflamazom
NOD	Nükleotid bağlayıcı oligomerizasyon domaini
NOD	Obez olmayan diyabetik fare
PAR₂	Proteinaz aktive eden reseptör 2
PAR3	Polarite protein 3
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PDZ	Postsynaptic density 95/Drosophila disc large/Zona occludens
PKCα	Protein kinaz C alfa
PRRs	Pattern tanıma reseptörler
PYY	Peptid YY
REGIIIγ	Regenerating işlet-derived protein 3 γ
RIG-I	Retinoik asit-uyarımli gen I
ROS	Reaktif oksijen türleri
rpm	Dakika başına dönme sayısı
RT-PCR	Ters transkripsiyon PCR
SCFAs	Kısa zincirli yağ asitleri
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SH3	Src homoloji-3
SPF	Spesifik patojen free
STZ	Streptozotosin
SYA	Serbest yağ asidi
T1D	Tip 1 diyabet
T2D	Tip 2 diyabet
TGF-β	Transforme edici büyüme faktörü-beta
TLR4	Toll benzeri reseptör 4
TLRs	Toll benzeri reseptörler
TNF-α	Tümör nekroz faktör alfa
Treg	Düzenleyici T hücreleri
VKİ	Vücut kitle indeksi
VLDL	Çok düşük dansiteli lipoprotein
ZO-1	Zonula okludens-1

1. GİRİŞ

Fekal Mikrobiyota Transferi (FMT), hastalıkla ilişkili patolojik belirtilerin neden olduğu bağırsak disbiyozisini düzenlemek amacıyla uygulanan yeni bir tedavi yöntemi olarak kabul edilmektedir. Bu yöntemle gerçekleştirilen bağırsak yeniden düzenlenmesi; *C. difficile* enfeksiyonu, irritabl bağırsak sendromu (İBS) ve obezite dışında otizm ve multiple skleroz benzeri nörolojik hastalıklarda da güncel tedavi olarak kullanılmaya başlanmıştır. Klinik denemelerde hastalara kolonoskopik, endoskopik yöntemler ile gerçekleştirilen FMT'den farklı olarak bütirat gibi bakteri metabolitleri de verilmektedir. Oral yolla zayıf bireylerden obez bireylere veya sağlıklı bireylerden İBS ve *C. difficile* enfeksiyonu olan bireylere verilmek üzere "fekal mikrobiyota bankası/dışkı bankası (stool bank)" oluşturulduğu görülmektedir. Ek olarak bahsi geçen hastalıkların tedavisinde güncel olarak "liyofilize fekal içerikli haplar (freeze-dried poop pills)"ın kullanımı söz konusu olabilmektedir.

Tip 1 Diyabet (T1D), insülin salgılayan pankreatik beta hücrelerinin bağışıklık sistemi hücreleri tarafından yıkılması sonucu oluşan otoimmün bir hastalıktır. Pankreatik β -hücreleri ve immün hücreleri arasındaki otoimmün etkileşimler T1D'nin gelişimine yol açmaktadır. Ülkemizde ve gelişmiş ülkelerde son yıllarda özellikle genç çocuklarda T1D'nin insidansı, her yıl %3-4 oranında süregelen bir artış göstermektedir. Tip 1 diyabet'in tedavisi ve önlenmesi amacıyla prebiyotikler, probiyotikler, antibiyotikler, diyet ve fekal mikrobiyota transferi gibi bağırsak mikroflorasının yeniden düzenlenmesi uygulamaları ile alternatif tedavi geliştirilmesi önemli olabilir.

İnsan sindirim sisteminde yaşayan kommensal bakteriler, patojenlerin invazyonuna karşı biyolojik bir bariyer sağlamaktadır ve immün sisteminin düzenlenmesine katkıda bulunmaktadır. Bağırsak mikroflorasının düzensizliği, mukozal bariyer fonksiyonunun bozulmasına ve patojen bakteri transferinin artmasına neden olmaktadır. Aynı zamanda pek çok sindirim sistemi hastalığı ile yakından ilişkili olan enfeksiyon ve metabolik düzensizlikler için risk oluşturmaktadır. Bağırsak mikroflorasında bulunan çoğu patojen olmayan bakteriler; enteropatojen invazyonundan korumada, fermente diyetle alınan besinlerin ekstraksiyonuyla kısa zincirli yağ asitlerinin üretilmesi ve enerjiye dönüştürülmesinde, normal immün sistem gelişimi ve fonksiyonu sağlanmasında konağa

yarar sağlamaktadır. Özellikle son yıllarda yapılan çalışmalarda bağırsak mikroflora çeşitliliğinin, stabilitesinin ve geçirgenliğinin artmasının obezite, yetersiz beslenme, otoimmün düzensizlikler ve nörolojik hastalıklar gibi pek çok hastalıkla ilişkili olduğu gösterilmiştir.

Mikrobiyota konusu ile ilgili birçok yayın olsa da, bildiğimiz kadarıyla deneysel diyabet oluşturulan sıçanlarda FMT tedavi yönteminin insülin ve FMT-İnsülin kombine tedavileri ile karşılaştırılması ve bağırsak mikrobiyomunda, geçirgenliğinde ve konak metabolizmasında önemli rol oynayan moleküler ve biyokimyasal mekanizmalar üzerindeki etkilerinin araştırılması üzerine bir çalışma yoktur. Bu bilgiler ışığında diyabetin tedavisinde FMT, insülin ve FMT-İnsülin kombine uygulamalarının; diyabet ile ilişkili olan bağırsak bakteri profillerine, plazma insülin düzeylerine ve bağırsak geçirgenliğinde etkili olan distal kolon ZO-1 ve klaudin-1 genlerinin ekspresyonuna, bağırsak mikroflorasında ve konak metabolizmasında önemli rol oynayan asetat, bütirat ve propiyonat gibi kısa zincirli yağ asitlerinin miktar farklılıklarına olan etkileri, deneysel diyabetik ratlarda araştırılmıştır. Sonuç olarak bu çalışmamız ile FMT tedavisinin alternatif olarak kullanıldığı gastrointestinal ve nörolojik hastalıklardaki tedavi edici yönlerinin diyabet üzerindeki etkileri belirlenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Fekal Mikrobiyota Transferi (FMT)

Mikrobiyota terimi, belirli bir bölgede yerleşmiş mikroorganizma topluluğunu ifade etmektedir. Patolojik hastalıkların neden olduğu enfeksiyonların bağırsak mikroflorasında bulunan mikroorganizmaların dengesinde bozukluklar meydana getirmesi “disbiyozis” olarak tanımlanmıştır. Bu bağırsak disbiyozisini düzenlemek amacı ile sağlıklı bir donörün dışkı konsorsiyumunun, hasta bir alıcının gastrointestinal sistemine transfer edilmesi işlemine FMT tedavisi denilmektedir. FMT tedavisi, “fekal bakteriyoterapi”, “intestinal mikrobiyom tedavisi”, “intestinal mikrobiyota transplantasyonu” olarak da adlandırılmaktadır. İlk olarak 4. yüzyılda yaşayan ve ünlü bir geleneksel Çin tıp doktoru olan Ge Hong, “sarı çorba” veya “altın şurup” olarak adlandırdığı FMT tedavisini, besin zehirlenmesi veya şiddetli ishali bulunan hastalarda uygulamıştır. Sonrasında 17. yüzyılda İtalyan anatomist Fabricius Aquapendente veteriner hekimliğinde sağlıklı hayvanların midesindeki mikroorganizmaları hasta hayvana “transfaunation” adında tanımladığı bir yöntemle transfer ederek tedavi etmeye çalışmıştır. FMT tedavisi hakkında literatüre giren ilk rapor ise Eiseman ve ark., (1958)’nin pseudomembranöz kolitis tedavisinde fekal lavman içeriğini kullandıklarını göstermektedir. Günümüzde ise FMT tedavisi, bağırsak mikroflora disbiyozisi ile ilişkili olan *Clostridium difficile* enfeksiyonu, inflamatuvar bağırsak hastalığı (IBD), irritable bağırsak sendromu (IBS), metabolik sendrom, obezite, tip 1 ve tip 2 diyabet, atopi, multiple sklerozis (MS), Parkinson hastalığı, fibromiyalji, insülin direnci, otizm ve kolonla ilgili kanserlerde kullanılabilmektedir [1,2].

2.1.1. Fekal mikrobiyota transfer tedavisinde sağlıklı donör kriterleri

Klinik uygulamalarda FMT tedavisi için ilk olarak enfeksiyon yapabilecek ajanların başka bireylere taşınma ihtimaline karşı, yukarıda bahsi geçen FMT ile ilişkili hastalıklar bakımından tamamen sağlıklı bir donör olabilecek kişilerin öyküleri ayrıntılı olarak incelenmektedir. Donör adaylarının kan örneklerinde hepatit virüsler başta olmak üzere serolojik parametreleri ve dışkı örneklerinde ise rotavirüs, parazitler ve çeşitli bakteri toksinleri araştırılmaktadır (Çizelge 2.1). İkinci olarak sağlıklı donörden alınan yaklaşık 50-60 gr dışkı örneği serum fizyolojik, distile su veya süt ile karıştırılarak homojenize edilir ve steril enjektörlere alınır. Son olarak ise bu FMT içerikleri nazogastrik veya

nazoenterik tüp yardımı ile gastroduodenoskopi, lavman, fleksibl sigmoidoskopi, kolonoskopi ve endoskopi yöntemlerinin farklı çeşitleri kullanılarak FMT tedavisi gerçekleştirilir [3,4].

Çizelge 2.1. FMT tedavisinde sağlıklı donör olabilme kriterleri ve bu donörlerin dışkı ve kan parametrelerinin ve bazı demografik özelliklerinin incelenmesi

1. Dışkı ve kan örneklerinin taranması	
➤ Dışkı Testleri ^a	• <i>C. difficile</i> toksini • Dışkı kültürü • Dışkı <i>Giardia</i> antijeni • Dışkı <i>Cryptosporidium</i> antijeni • Dışkı ova/kist/parazit (<i>B. Hominis</i> ve <i>D. fragilis</i>) • Norovirüs
➤ Kan testleri ^b	• Tam kan sayımı • Elektrolit, üre ve kreatinin • Karaciğer fonksiyon testleri • Eritrosit sedimentasyon oranı • C-Reaktif protein (CRP) • İnsan immün yetmezlik virüsü (Human Immunodeficiency Virus) (HIV) tip 1 ve 2 antikor • Hepatit A virüsü IgM • Hepatit B yüzey antijeni • Anti-Hepatit B yüzey antikor • Anti-Hepatit B core IgM ve IgG • Hepatit C antikor • İnsan T-hücre lenfotropik virüs 1 ve 2 • Sifiliz (<i>Tropenema pallidum</i>)
2. Donörlerin çalışmaya dahil edilme kriterleri	
➤ Dahil edilme kriterleri	• 18-65 yaş aralığı • Herhangi bir gastrointestinal hastalık geçirmemesi • Major bir tıbbi tedavi sürecinin olmaması • 3 ay süresince dışkı canlılığını etkileyebilecek herhangi bir antimikrobiyal (antibiyotik, antifungal ve antiviral) veya probiyotik kullanılmaması

Çizelge 2.1. (devamı) FMT tedavisinde sağlıklı donör olabilme kriterleri ve bu donörlerin dışkı ve kan parametrelerinin ve bazı demografik özelliklerinin incelenmesi

3. Donörlerin çıkarılma kriterleri	
➤ Enfeksiyona neden olabilecek ajanların riskleri	• Bilinen bir HIV, hepatit B veya hepatit C enfeksiyonu • Bir sene önce viral hepatit veya HIV enfeksiyon öyküsünün olması • Yüksek risk içeren cinsel aktivite (HIV/AIDS) • İlegal ilaçların kullanımı • Son 6 ay içinde vücuda dövme yaptırılması veya pirsing takılması • Uzun süre kapalı ortamda kalınması (cezaevi öyküsü) • Üst solunum yolu enfeksiyonuna benzer bulaşıcı hastalığının olması • Varyant Creutzfeldt–Jakob hastalığı için risk faktörlerini bulundurması • Son altı ay içerisinde diyare ile ilgili hastalıkların endemik olduğu veya yüksek oranda görüldüğü bölgelere seyahat edilmesi
➤ Gastrointestinal düzensizlikler	• IBD varlığı • IBS, kronik kabızlık, kronik diyare veya bireye özgün diğer gastrointestinal hastalıkların bulunması • Ailede güçlü kolorektal kanser veya gastrointestinal malignensi veya polipozis varlığı • Gastrik bypas ve parsiyel kolektomi gibi majör gastrointestinal operasyon
➤ Bağırsak kompozisyonunu etkileyebilecek faktörler	• 3 ay süresince herhangi bir antimikrobiyal (antibiyotik, antifungal ve antiviral) veya probiyotik kullanılması • Major bağışıklık sistemi baskılayıcı ilaçlarının kullanılması (kalsinörin inhibitörleri, biyolojik ajanlar, ekzojen glukokortikoidler) • Sistemik antineoplastik ajanlar • Aile bireylerinde halihazırda bir gastrointestinal enfeksiyon bulunması
➤ Diğer durumlar	• Sistemik otoimmün hastalıklar (MS, konnektif doku hastalığı) • Atopik düzensizlikler (orta veya şiddetli düzeyde astım, ekzama, sindirim sisteminin eozinofilik düzensizlikleri) • Metabolik sendrom, obezite (vücut kitle indeksi VKİ>30) veya yetersiz/kötü beslenme • Kronik ağrı sendromları (kronik yorgunluk sendromu, fibromiyalji) veya nörolojik-nörogelişimsel düzensizlikler • Malign hastalık veya devam eden onkolojik tedavi süreci

a; Ayda bir kez incelenir. **b;** Altı ayda bir kez incelenir.

2.1.2. Fekal mikrobiyota transfer tedavisinin yan etkileri

Enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde kullanılan antibiyotikler hastanın mikroflorasını önemli oranda değiştirmektedir ve patojen bakterilerin antibiyotiklere karşı direnç geliştirmesine neden olmaktadır. Antibiyotiklerin kullanımı, bağırsak mikroflorasında patojen bakteriler yanında faydalı bakterileri de mikrofloradan elimine etmektedir. Bu nedenle sağlıklı donörlerden alınan normal bağırsak mikroflorası hastaya transfer edilerek alternatif tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi amaçlanmaktadır. Örneğin, oral yolla zayıf bireylerden obez bireylere veya sağlıklı bireylerden IBS ve *C. difficile* enfeksiyonu olan bireylere verilmek üzere “fekal mikrobiyota bankası” oluşturulmaktadır. Ek olarak bahsi geçen hastalıkların tedavisinde güncel olarak enkapsüle edilmiş “liyofilize fekal içerikli haplar” kullanılabilmektedir. FMT, %90'nın üzerinde tedavi oranı ve nadir yan etkilerinden dolayı *C. difficile* enfeksiyonunun tedavisinde potansiyel olarak hayat-kurtarıcı bir “son şans” olarak kabul edilmektedir [5]. Ancak FMT tedavisi, bazı riskler içermektedir. Örneğin, *C. difficile* enfeksiyonu olan kadın bir hastaya fekal mikrobiyota transferi yapıldıktan sonra hastanın Vücut Kitle İndeksi (VKİ)'nin 26'dan 34,5'e çıktığı ve dolayısı ile hastanın obez olduğu görülmüştür. Obez hastaya uygulanan diyet ve yaptırılan egzersizler sonucunda da hastanın kilo veremediği, bu sonuca neden olan olgu araştırıldığında ise donör bireyin obez olduğu böylece fekal transferde kullanılacak donör seçimine yeterince dikkat edilmediği ortaya çıkmıştır. Bu olgudan başka Çizelge 2.2'de de belirtildiği gibi FMT transferi sonrasında hastalarda kısa-süreli veya uzun-süreli yan etkiler görülebilmektedir [3,6].

Çizelge 2.2. FMT tedavisi yapılan hastalarda görülebilen kısa veya uzun süreli yan etkiler

Kısa-süreli görülebilen yan etkiler		Muhtemel uzun-süreli görülebilen yan etkiler
Minor olaylar	Major olaylar	
Abdominal rahatsızlık (ağrı)	Endoskopi komplikasyonları (perforasyon/delinme, kanama)	FMT tedavisinin devamındaki yıllarda tanımlanamayan hepatit C ve HIV gibi enfeksiyon ajanlarının taşınımı
Karında şişkinlik	Sedasyon/sakinleşme esnasında olumsuz etkiler (aspirasyon/soluklanma)	FMT tedavisi, bağırsak mikroflorasını yeniden düzenleyebilmesine bağlı olarak kronik hastalıkların (obezite, diyabetler, aterosklerozis, IBD, kolon kanseri, alkolik olmayan yağlı karaciğer hastalığı, IBS, astım, otizm) uyarılabilmesi
Midede gaz birikmesi	Enterik patojenlerin taşınımı	
Diyare	Periton diyalizi sırasında hastada periton iltihabının gelişmesi	
Kabızlık	Pnomöni enfeksiyonu	
Karın uğultusu	IBD hastalığının aniden şiddetlenmesi	
Kusma		
Kısa süreli ateş		

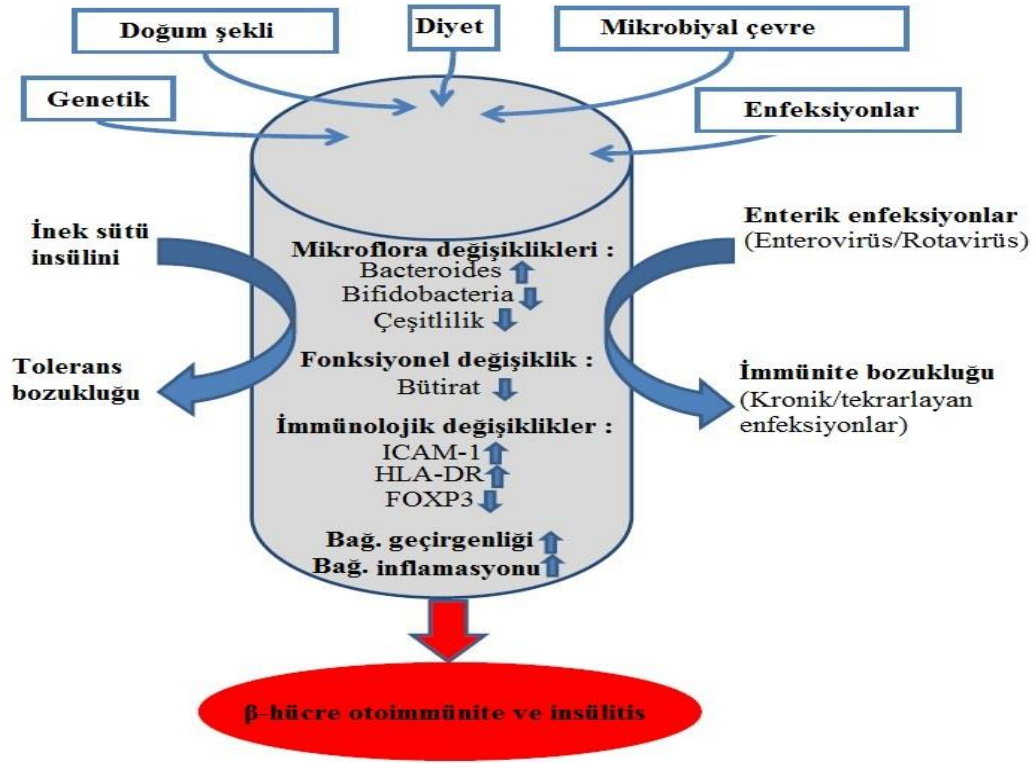
2.2. Tip 1 Diyabet (T1D)

T1D, pankreatik β hücrelerinin T-hücre aracılıklı harabiyeti ile karakterizedir ve devamında insülin eksikliğinin ve hipergliseminin görüldüğü kronik proinflatuar otoimmün bir hastalıktır [7]. Amerikan Diyabet Birliği (American Diabetes Association-ADA), T1D'yi otoimmünitenin varlığına göre Tip 1A ve Tip 1B olmak üzere iki grupta incelemektedir. Tip 1A, adacık otoantikorlarının bulunması ve insülitis gelişimi ile tanımlanan otoimmün formdur ve T1D vakalarının %90'ını oluşturmaktadır. Tip 1B ise otoimmün belirteçlerin negatif olduğu ve pankreatik β hücrelerinin idiyopatik yıkımı sonucunda ciddi insülin eksikliğinin görüldüğü formdur ve vakaların %10'unu kapsamaktadır [8].

T1D'nin gelişiminde genetik yatkınlık, çevresel faktörler ve özellikle mikrobiyal enfeksiyonlar anahtar rol oynamaktadır. Genetik yatkınlıkta HLA klas II (IDDM1) ve insülin gen lokusu (IDDM2) bölgeleri etkilidir ve bu genlerin birlikteliği T1D gelişimine %50 oranında katkıda bulunur. 6. kromozomun kısa kolunda (6p21) bulunan MHC bölgesinde lokalize HLA genotipleri DR ve DQ, T1D gelişiminde yüksek riskli veya koruyucu haplotipleri içermektedir [9,10]. T1D'nin monozygot ikizlerde yaklaşık %50

olarak bildirilen konkordans hızı, hastalığın gelişiminde çevresel faktörlerin etkisini göstermektedir [11]. Bu çevresel faktörlerin başında virüsler gelmektedir. T1D başlangıcında sitomegalovirüs, koksaki B, kabakulak, rubella, Epstein-Barr, rotavirüs ve varisella zoster virüsleri görülebilmektedir. Bu virüslerin otoimmün mekanizmaları nasıl tetiklediği tam olarak bilinmemektedir. Virüslerin direkt olarak β hücrelerini hasara uğratabilecekleri veya otoimmün reaksiyonları tetikleyebilecekleri ileri sürülmektedir [12]. Virüsler dışında inek sütü ve gluten gibi çeşitli besinlerin veya besin bileşenlerinin yanında sezaryen doğum şeklinin de T1D gelişimini etkilediği gösterilmiştir. İnek sütündeki insülin, oral tolerans gelişmeden önce insülin-spesifik otoimmüniteyi aktive edebilmektedir. Yine inek sütünde bulunan kazein gibi diğer bileşikler, bağırsak geçirgenliğini değiştirebilir ve T1D uyarılmasını tetikleme potansiyeline sahiptirler. Besin-türevli gluten de bağırsak geçirgenliğini değiştirerek T1D gelişimine neden olabilir. Gluten içermeyen diyetle beslenen T1D’li farelerin bağırsak mikroflorasında oluşturulan modifikasyon sonucunda diyet tedavisinin koruyucu etkisinin olduğu gösterilmiştir [13,14]. Bağırsak mikroflorası ile T1D gelişimi arasındaki ilişkinin temelini pankreasın bağırsak endoderminden gelişmesi oluşturmaktadır ve pankreas adacıklarının inflamasyonu ile gelişen insülitiste bağırsağın düzenleyici bir faktör olarak rol alabileceği ileri sürülmektedir [15].

Genetik faktörlerin yanısıra diyet ve doğum şeklinin de içerisinde olduğu çevresel faktörler, bağırsak mikroflorasını etkilemektedir. T1D’de *Bacteroides* grubu bakterilerin görece fazla ve bütirat üreten bakterilerin az olması dikkat çekmektedir. Bu değişiklikler, bağırsakta immünolojik homeostaziyi ve bağırsak geçirgenliğini etkilemektedir. İnek sütü ve besin antijenlerine karşı immün cevapların artması, oral toleransın gelişimini desteklemez ve dolayısı ile bağırsakta inflamasyon oluşabilmektedir. Bununla birlikte meydana gelen bağırsak mikroflorasının değişimi, T1D ile ilişkili enterovirüs enfeksiyonlarına karşı immün sistemin koruma görevini etkileyebilmektedir. T1D ve β -hücre otoimmünitenin gelişiminde çevresel ve genetik faktörler, bağırsak mikroflorası ve konak arasındaki kompleks etkileşimler şekil 2.1’de verilmiştir [16].



Şekil 2.1. Tip 1 diyabet patogenezi

2.2.1. Tip 1 diyabet hayvan modelleri

Bağırsak mikrobiyotika çalışmalarında T1D hayvan modeli olarak spesifik patojen içermeyen (SPF) diyabete dirençli sıçan (BBDR)'lar, diyabete yatkın sıçan (BBDP)'lar, obez olmayan diyabetik fare (NOD)'ler, miyeloid farklılaşma primer cevap geni 88 knock-out NOD fareler (MyD88 KO NOD) ve Kilham rat virüs-uyarımlı T1D (LEW1.WR1) sıçanlar kullanılmaktadır. SPF hayvanlar, çok fazla beslenmesine rağmen besin ekstraksiyonunu konvansiyonel farelere kıyasla diyetten yeterince elde edemediğinden vücutlarındaki yağ miktarı daha az ve zayıf hayvanlardır. İlave olarak SPF şartlarında biyolojik olarak üretilen ırkların (bio-breeding) bağırsak mikrobiyotası belirgin bir şekilde annelerine benzeyebilmektedir. Bu nedenle istenilen hastalık modelinin yapılabilmesi için bu türlere sütten kesilme döneminde ayrıca özel hazırlanmış mikrobiyotika kompozisyonunun SPF şartlarında verilmesi ile bu soylar da bir nevi konvansiyonel olabilmektedirler [17,18]. Bağırsak mikrobiyotika çalışmalarında T1D hayvan modeli olarak Streptozotosin (STZ)-uyarımlı Sprague-Dawley ve Wistar cinsi konvansiyonel sıçanlarda kullanılabilmektedir [19,20].

2.3. Bağırsak Mikroflorası

Bağırsak mikroflorasında bulunan çoğu patojen olmayan bakteriler; enteropatojen bakterilerin bağırsak mukozasına invazyonundan korumada, fermente diyetle alınan besinlerin ekstraksiyonu ile kısa zincirli yağ asitleri (SCFAs)'nin üretilmesinde ve enerjiye dönüştürülmesinde ve normal immün sistemin gelişiminin ve fonksiyonunun sağlanmasında konağa yarar sağlamaktadır [21].

İnsan bağırsak mikroflorasında ortalama olarak 1 ml lümen içeriğinde 10^{14} mikroorganizma ve 5000'in üzerinde bakteri türü bulunmaktadır. Bu bakteri türlerinin yaklaşık %90'ını, sırasıyla Gram (-) ve Gram (+) bakterilerin çoğunlukta olduğu *Bacteroides* ve *Firmicutes* grupları oluşturmaktadır. Son zamanlarda yapılan birçok çalışmada bağırsak mikroflorasının kompozisyonu ile allerjiler, intestinal inflamatuvar hastalıklar, kanser, diyabet ve kardiyovasküler gibi gastrointestinal sistem ile ilgili olan veya olmayan bu hastalıklar arasında ilişki olduğu görülmektedir (Çizelge 2.3). Bu ilişki, değişen bağırsak mikroflora kompozisyonunun bağırsak geçirgenliğini ve mukozal immün cevaplarını arttırması ile açıklanmaktadır. Söz konusu bu hastalıkların alternatif tedavisinde bağırsak mikroflora kompozisyonunun yeniden düzenlenmesini sağlayan FMT tedavisi kullanılarak olumlu sonuçlar elde edilmiştir [22,23].

Çizelge 2.3. Bağırsak mikrobiyotasının değişimi ile ilişkili hastalıklar

Gastrointestinal hastalıklar	Diğer hastalıklar
İdiyopatik konstipasyon [†]	Otizm [†]
IBD [†]	Kronik yorgunluk [†]
IBS [†]	Diyabetes mellitus ve insülin direnci [†]
<i>C. difficile</i> enfeksiyonu [†]	Fibromiyalji [†]
Kolon kanseri	İdiyopatik trombositopenik purpura [†]
Kolelitiazis (safra kesesi taşı)	Metabolik sendrom [†]
Hepatik ensefalopati	Multiple sklerozis [†]
Ailevi akdeniz ateşi (FMF)	Miyoklonus distoni [†]
Gastrik karsinoma ve lenfoma	Parkinson hastalığı [†]
	Artrit iltihabı
	Astım
	Atopi
	Otoimmün düzensizlik
	Egzama
	Bahar nezlesi
	Hiperkolesterolemi
	İskemik kalp hastalığı
	Duygudurumu bozuklukları
	Alkole bağlı olmayan yağlı karaciğer hastalığı

“†” FMT tedavisinin rastgele klinik denemelerde ve vaka olgularında faydalı bir tedavi olduğunu belirtmektedir.

2.3.1. Bağırsak mikrobiyotası ve bağışıklık sistemi

Mikroorganizmalar ve konak arasında milyonlarca yıldır süregelen evrimsel birliktelik mutualistik ilişkilerin gelişimini sağlamıştır. Mikrobiyota, pek çok yönden konağın fizyolojik süreçlerine katkıda bulunurken, konakta mikrobiyotanın yaşayabilmesi ve gelişebilmesi için uygun bir “niş” ve besin sunmaktadır [24].

Bağırsak mikrobiyotası, özellikle patojenlerin epitel hücreleri üzerinde kolonizasyonunu önlemek için bağırsak-ilişkili lenfoid doku (Gut-associated lymphoid tissue-GALT)’ların

gelişimini sağlamaktadır [24]. GALT; Peyer plakalarını, kript yapılarını ve izole lenfoid foliküllerini içermektedir. İzole lenfoid foliküllerinin ve kript yapılarının aktifleşebilmesi için özellikle bu hücrelerin bağırsak mikroflorası tarafından uyarılması gerekir. Fetusta bağırsak mikroflorası henüz gelişmediğinden dolayı bu hücrelerin aktifleşemedikleri görülmüştür. İzole lenfoid foliküllerinin gelişiminde mikrofloranın uyarımı ile aktive edilen patern tanıma reseptör (pattern recognition receptors-PRRs)'leri [toll-benzeri reseptör (toll-like receptors-TLR)'ler, nükleotid bağlayıcı oligomerizasyon domain-benzeri reseptör (nucleotid-binding oligomerization domain-(NOD)-like receptors)'ler ve retinoik asit-uyarımli gen I-benzeri reseptör (retinoic acid-inducible gene I (RIG-I)-like receptor)] önemli rol oynamaktadır. Böylelikle GALT, antijen sunan hücreler tarafından sunulan antijeni alarak inflamasyon ve tolerans mekanizmalarının fonksiyonunu düzenler ve bağırsağa özgü immün cevapları oluşturur [25].

Bağırsakta mukozal dokularca üretilen IgA, intestinal lümene salgılanarak kommensal bakteriler ve çözünen antijenlerin lamina propria'ya ve epitel hücrelerine tutunmasını önlemektedir. Salgısal IgA, bağırsakta bariyer fonksiyonu görerek konak ile kommensal bakteriler arasındaki mutualist etkileşimleri düzenlemektedir. Benzer bir şekilde bağırsak mikroflorası tarafından uyarılan dentritik hücreler retinoik asit sentezlemektedir. Retinoik asit ise B lenfositlerinin farklılaşmasını ve IgA üretmesini sağlamaktadır [26].

Th17 hücrelerinin bağırsak mikroflorası tarafından uyarılması ile pro-inflamatuar sitokinlerin ekspresyonu artmaktadır ve devamında Th17 hücreleri otoimmün hastalıkların gelişiminde ve konağın savunma mekanizmasında önemli rol oynayan $CD4^+$ T hücrelerini aktive etmektedir. Bağırsak mikroflorası T hücrelerinin farklı alt ünitelerini aktive edebilmektedir. Kommensal bakteriler ayrıca Th1 ve Th2 hücrelerinin bağırsakta birikimini sağlayarak Th17 hücrelerinin uyarılmasına aracılık edebilir. Segmentli filamentöz bakterilerin bağırsakta kolonizasyonu, Th17 hücrelerinin farklılaşmasını uyarak *Citrobacter rodentium* enfeksiyonuna karşı koruyucu bir işlev görmektedir [27].

Bağırsak mikroflorasında bulunan bakterilerin salgıladıkları metabolitler periferik düzenleyici T (Treg) hücrelerini uyarmaktadır. Böylelikle Treg hücreleri, inflamasyonu baskılayan bir transkripsiyon faktörü Foxp3'ü eksprese etmektedir. Foxp3, bağırsakta $CD4^+$ T hücrelerini aktive ederek bağırsak homeostazisini düzenler. Treg hücrelerinin yokluğunda $CD4^+$ T hücreleri bağırsakta inflamasyonu tetiklemektedir. Enfeksiyona maruz

kalan bağırsak mukozası deforme olabilmektedir. Kommensal bakteriler ile aktive olan Treg hücreleri enfeksiyon sonrası hasar gören mukozal dokuların onarılmasını ve anti-inflamatuvar sitokinlerden IL-10'un üretilmesini sağlamaktadır [28,29].

Lamina propria'da bulunan mononükleer fagositik hücrelerden makrofajlar ve dentritik hücreler, bağırsak mikroflorasına karşı bazal seviyede immünolojik bir cevap oluştururlar. Mikrobiyal ligandlar ve kommensal bakterilere duyulan tolerans nedeniyle pro-inflamatuvar moleküllerin üretimi istenilen düzeyde değildir. Özellikle bağırsak mikroflorası, immün yanıtı oluşturan öncül IL-1 β 'nın bazal düzeyde sentezlenmesi için gereklidir ve öncül IL-1 β 'yı aktif ve olgun IL-1 β 'ya dönüştüremez. Ne zamanki bir enterik patojenin neden olduğu enfeksiyon durumu oluşursa kaspaz-1, NLR ailesi CARD kısmı taşıyan 4 (NLR family CARD Domain Containing 4-NLRC4) inflamasyon kompleksi tarafından aktive edilerek öncül IL-1 β , aktif ve olgun IL-1 β 'ya dönüştürülür ve böylece immün yanıtın oluşması sağlanır [30,31].

Bağırsak mikroflorası ayrıca bağırsakta sindirelemeyen karbonhidratlardan kısa zincirli yağ asitlerini sentezleyebilmektedir. Fermente ürünlerden sentezlenen asetat, propiyonat ve bütirat SCFA'larının spesifik patojen içermeyen ortamda bulunan farelere verilmesi sonucunda kolon Treg hücrelerinin çoğalmasının yanında bu hücrelerin inflamasyonu baskılayıcı fonksiyonlarının da arttığı görülmektedir. Bu üç yağ asidi arasından en önemli olan bütirat, T hücrelerinin Treg hücrelerine farklılaşmasını uyarırken asetat ve propiyonat Treg hücrelerinin bağırsağa taşınmasında görev almaktadır [32].

2.3.2. Bağırsak mikroflorasının patojenler ile rekabeti

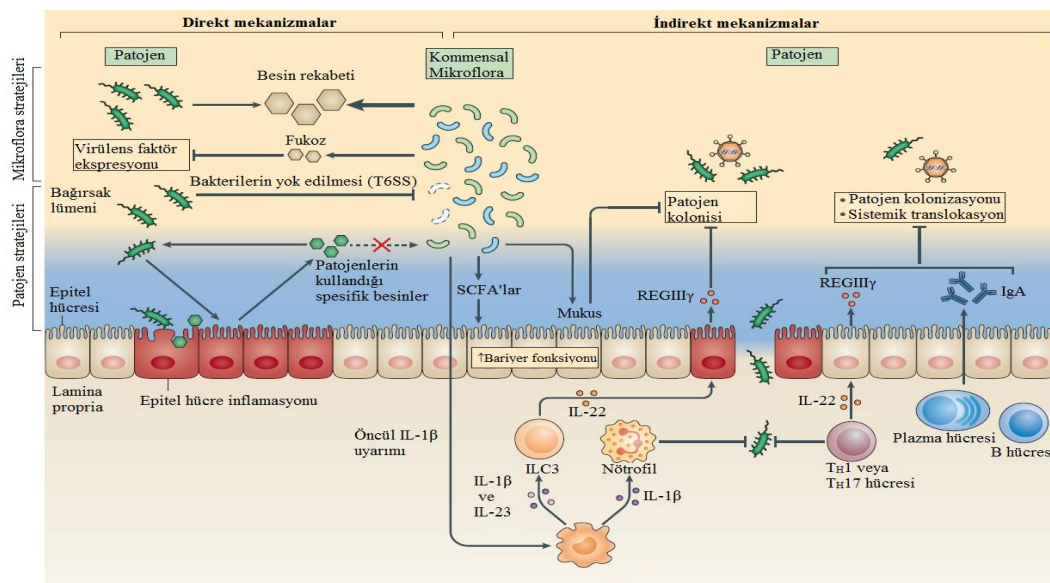
Direkt mekanizmalar

Bağırsak mikroflorasında bulunan mikroorganizmalar, direkt olarak enterik patojenlerin çoğalmasını ve/veya koloni oluşturmalarını önlemektedir. Kommensal bakteriler, karbonhidratlar, amino asitler ve organik asitler gibi besinler için patojenler ile rekabet içerisinde. *Bacteroides thetaiomicron* benzeri kommensal bakteri suşları musin'i katabolize ederek "fukoz" üretmektedirler ve fukoz aracılığı ile patojen *E. coli*'nin virülens faktör ekspresyonu baskılanmaktadır [33]. Buna karşılık enterik patojenler kommensal bakterilere karşı farklı stratejiler geliştirirler. Bazı patojenler, kommensal

rekaberçilerinin tip VI salgı sistemini (T6SS) baskılayarak direkt olarak öldürürler. Patojen bakteriler, epitel hücrelerinde inflamasyon başlatarak (epithelial cell turnover) kendileri için gerekli olan besinleri epitel hücrelerinden almayı tercih edebilirler. Bazı patojenler ise kommensal bakterilerin olmadığı epitel hücrelerine yakın bölgelere yerleşirler ve kommensal bakteriler ile rekabet etmekten kaçarak epitel hücrelerin besinlerinden faydalanırlar. Kommensal ile patojen bakterilerin rekabetinde etkili olan direkt mekanizmalar Şekil 2.2’de verilmiştir [34].

İndirekt mekanizmalar

Kommensal bakteriler, bağırsak epitel hücrelerinin bariyer fonksiyonunu artıran asetat gibi SCFA’ları polisakkaritlerden sentezlemektedirler. Örneğin, asetat, *E. Coli* O157:H7 tarafından üretilen “Shiga” toksininin transferini inhibe etmektedir [35]. İlave olarak kommensal bakteriler mukus sentezlenmesini sağlamaktadırlar ve epitel hücrelerinin regenerating islet-derived protein 3 γ (REGIII γ) gibi antimikrobiyal peptidlerin salgılanmasını uyararak patojenlerin kolonizasyonunu ve çoğalmasını sınırlandırır. Şekil 2.2’de gösterildiği gibi ayrıca bağırsak mukozasında bulunan makrofajlar, nötrofiller ve bazı grup 3 doğal lenfoid hücreler (ILC3), Th1, Th17, IgA-üreten B hücreler ve plazma hücreleri gibi doğal immün sistem hücreleri, yine mikrobiyot tarafından uyarılmaktadır ve böylelikle patojenlerin kolonizasyonu önlenmektedir [36,37].

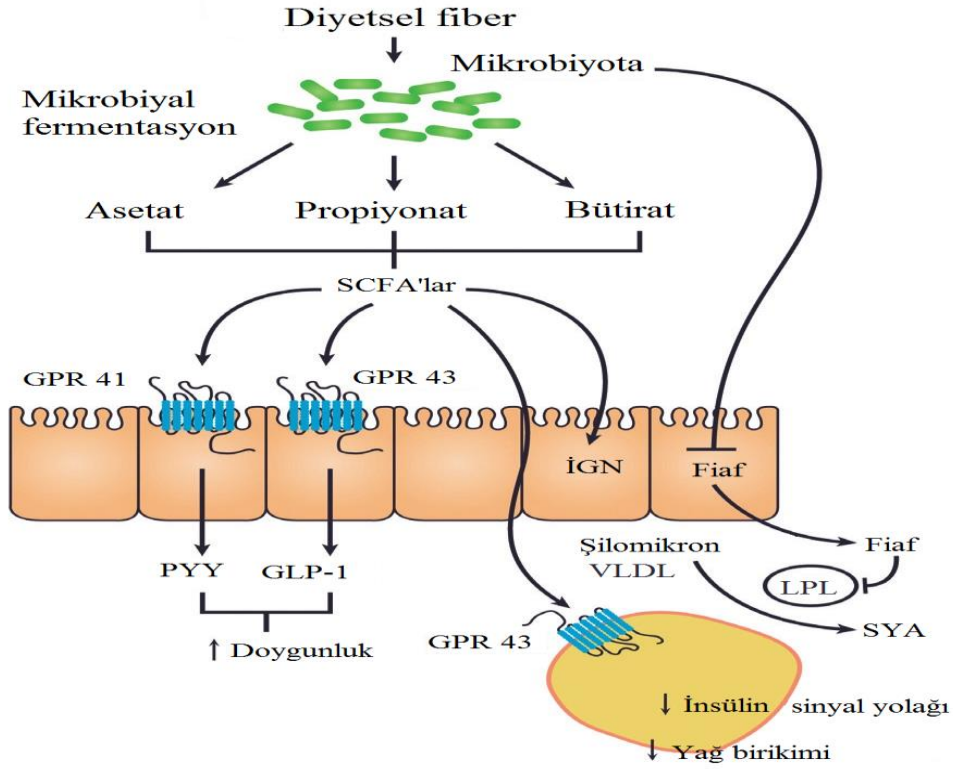


Şekil 2.2. Mikrofloranın patojenlere karşı geliştirdiği direkt ve indirekt direnç mekanizmaları

2.3.3. Bağırsak mikroflorasının konak metabolizması ile ilişkisi

Bağırsak mikroflorasının konak metabolizması üzerinde gösterdiği etkiler, daha çok obezite, T2D ve T1D hastalıklarında belirtilen bazı mekanizmalar ile açıklanmaktadır. Bu mekanizmalar; diyetten besin alınımının artması, bağırsaktan transfer süresinin uzatılması, entero-hepatik döngüde safra asitlerinin değişimi, dolaşımdaki trigliseridlerin hücreye alınımının artması, *de novo* lipojenezisin hızlanması, serbest yağ asidi oksidasyonunun azalması, biyolojik olarak aktif çoklu doymamış yağ asidinin doku bileşimindeki değişimi, endotoksin toll benzeri reseptör 4 (TLR4) yolağı üzerinden tetiklenen kronik düşük-dereceli inflamasyon ve bağırsak bariyer fonksiyonunun değişimi şeklinde özetlenmektedir [38].

Bağırsak mikroflorası bakterileri tarafından sentezlenen asetat, bütirat ve propiyonat kısa zincirli yağ asitlerinin her biri en nihayetinde farklı organlar tarafından kullanılmak üzere alınmaktadır ve metabolik yönden farklı son ürünlere dönüştürülmektedir [39]. Kolonik epitelyal hücreler, enerji ihtiyacının %60-70'ini çoğunlukla tercih ettiği bütirattan sağlamaktadır ve bu bütirat, son ürün olarak keton cisimciklerine veya okside karbondioksit'e çevrilmektedir. Propiyonat, karaciğer hücrelerinde en çok glukoneojenezis için kullanılırken asetat; kolon hücrelerinde, yağ hücrelerinde ve karaciğer hücrelerinde *de novo* lipojeneziste kullanılmaktadır [40]. Şekil 2.3'te gösterildiği gibi kısa zincirli yağ asitleri, G protein-eşlenikli reseptör 41 (GPR41) aracılığı ile enteroendokrin hücrelerine etki ederek peptid YY (PYY)'nin salınmasını uyarmaktadır. Böylece bağırsak hareketliliği baskılanır, bağırsak geçiş süresi artar ve diyetten enerji eldesi azalmaktadır. G protein-eşlenikli reseptör 43 (GPR43) ise insülin duyarlılığını artırmak için glukagon-benzeri peptid 1 (GLP-1)'in salınmasını başlatmaktadır. PYY ve GLP-1 birlikteliği sonucunda iştah baskılanmakta ve doyumluk hissi oluşmaktadır. GPR43 ayrıca adipoz dokuda insülin salgılanmasını baskılayarak eş zamanlı bir şekilde yağ birikimini önlemektedir. Bağırsak mikroflorası, ileumda yağ oluşumunu uyarıcı adipoz faktör (fasting-induced adipose factor-FIAF)'ünün ekspresyonunu etkili bir şekilde baskılar ve böylelikle beyaz yağ dokusunda lipoprotein lipaz aktivitesini ve yağ depolanmasını inhibe eder. SCFA'lar ayrıca bağırsak-beyin aksisi aracılığı ile intestinal glukoneojenezisi (İGN) aktive ederek glukoz metabolizmasını uyarır ve besin alımını azaltır [41].



Şekil 2.3. Konak metabolizmasının bağırsak mikroflorası ile düzenlenmesi (serbest yağ asidi-SYA, çok düşük dansiteli lipoprotein-VLDL).

2.4. Bağışıklık Sisteminin Kısa Zincirli Yağ Asitleri İle Düzenlenmesi

Kısa zincirli yağ asitleri, 1-6 karbon uzunluğunda olup selüloz gibi bitki türevli sindirilemeyen polisakkaritlerin bakteriyel fermentasyonu ile kolonda sentezlenirler. Bağırsak lümeninde en fazla bütirat (C_4), propiyonat (C_3) ve asetat (C_2) SCFA'ları bulunur (Şekil 2.4-A). Bu yağ asitlerinin sentezlenmesi için bağırsak mikroflorasında kommensal bakterilerinin bulunması gerekmektedir [42].

SCFA'lar immün sistemi ve metabolizmayı düzenleyerek konağa fayda sağlamaktadır. SCFA'lar bağışıklık sistemini; GPR 43 aktivasyonu, histon deasetilaz inhibisyonu ve otofaji düzenlenmesi olmak üzere üç farklı yönden düzenleyebilmektedir.

2.4.1. G-protein eşlenikli reseptör 43 (GPR43) aktivasyonu

GPR43; asetat, bütirat ve propiyonat endojen SCFA'larının bağlandığı G-protein eşlenikli reseptördür ve özellikle nötrofiller, makrofajlar ve monosit hücrelerinde eksprese edilir. Kommensal bakterilerce sentezlenen asetat ve propiyonat nötrofil kemotaksisini uyarmaktadır. Bu uyarım ile hücre içi Ca^{+2} düzeyleri artar ve cAMP konsantrasyonu azalır (Şekil 2.4-B). Böylelikle hematopoietik dokularda lökositlerin farklılaşması ve aktifleşmesine yol açan ERK1/2 yolağı aktive olmaktadır [43].

Bu yağ asitleri periferel mononükleer kan hücrelerinde de kemotaksisi uyarmaktadır. Bunun yanında ROS üretimini ve fagositik aktiviteyi artırmaktadır (Şekil 2.4-C). Sonuç olarak SCFA'lar periferel mononükleer kan hücrelerinde IL-10 benzeri anti-inflamatuar sitokinlerin üretimini artırmaktadır [44].

Dentritik hücrelerde bütirat aktif bir şekilde rol almaktadır. Bütirat, pro-inflamatuar sitokinlerden IL-12 ve IFN- γ 'nın ekspresyonunu azaltırken, anti-inflamatuar sitokinlerden IL-10 ve IL-23 ekspresyonunu artırır. Bütirat ayrıca CD40, CD80, CD86 ve MHCII antijen sunan mekanizmaların baskılanmasını sağlayarak dentritik hücrelerin fonksiyonunu düzenleyebilmektedir [45,46]. $CD4^{+}$ T hücrelerinde ise SCFA'lar direkt olarak bu hücrelerin çoğalmasını baskılar ve apoptozu uyarır (Şekil 2.4-C) [47].

2.4.2. Histon deasetilaz inhibisyonu

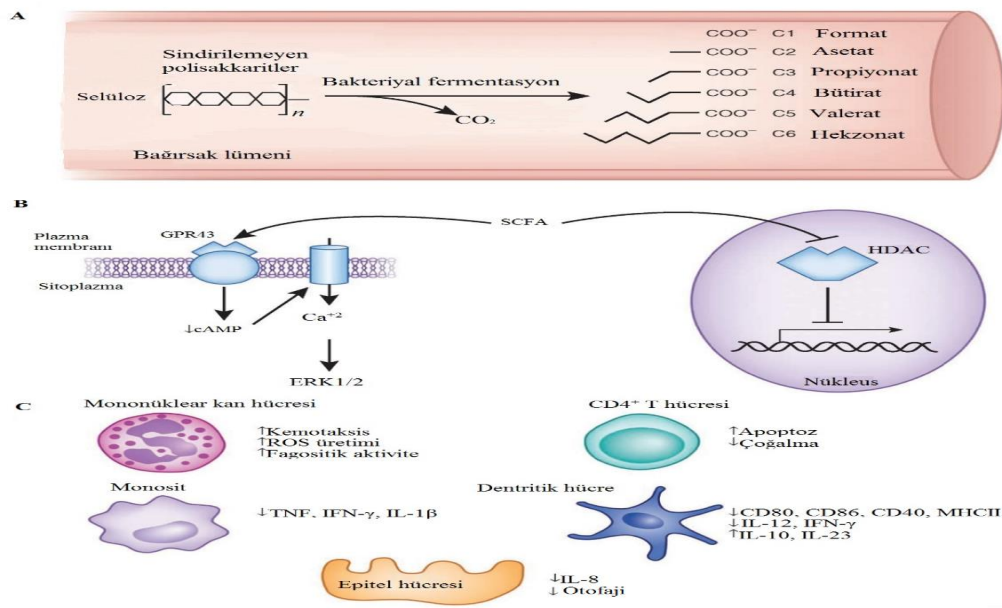
Bütirat, direkt olarak histon deasetilasyonunu baskılayarak histonların hiperasetilasyonunu ve doğal bağışıklık sistemi hücrelerinin farklılaşmasını uyarmaktadır (Şekil 2.4-B). Böylece anti-inflamatuar etki gösteren sitokin yolları aktive olurken pro-inflamatuar sitokinlerin ve NF- κ B'nin baskılanması sağlanır. İlave olarak apoptozun aktive edilmesine katkıda bulunarak kanser hücrelerinin elimine edilmesini sağlamaktadır [48].

2.4.3. Otofaji düzenlenmesi

Otofaji, sitoplazmik içeriklerin ve organellerin çift katlı bir membrandan oluşan vezikül (otofagozom) ile lizozime taşınması sonucunda meydana gelen evrimsel olarak korunmuş katabolik bir süreçtir. Doku gelişimi, farklılaşması ve yeniden düzenlenmesi süreçlerinde

önemli rol oynayan otofaji, hücre içinde bulunan uzun ömürlü proteinlerin ve zarar gören organellerin yıkılması ve tekrar oluşumunu sağlayarak hücre homeostazisini düzenlemektedir [49].

Kolonik epitel hücrelerinde SCFA “eksikliği”, enerji üretiminde bir yoksunluk durumu oluşturması ile doğal ve kazanılmış bağışıklık sistemi ve epitelyal bütünlüğün korunumu ile pek çok yönden bağlantılı olan otofajinin aktivasyonuna yol açmaktadır [50].



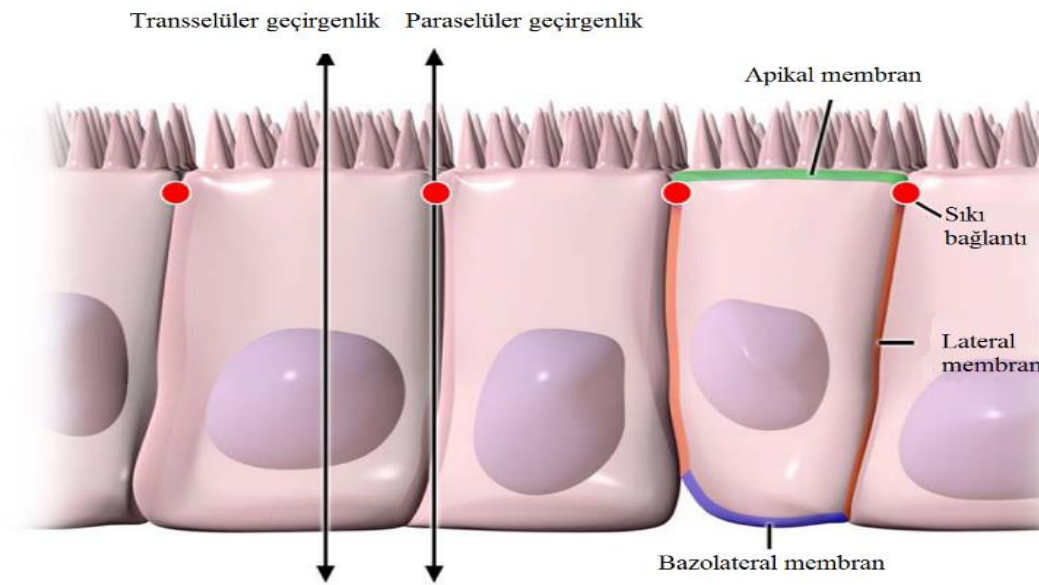
Şekil 2.4. Bağışıklık sisteminin SCFA’lar ile düzenlenmesi

2.5. Bağırsak Geçirgenliği

Bağırsak epiteli, bağırsak lümeninde sıralanmış tek tabakalı hücrelerden oluşmaktadır ve iki önemli fonksiyonu vardır. Bunlar:

- Antijenler, mikroorganizmalar ve bunların toksinlerini içeren zararlı moleküllerin bağırsak mukozasına geçmesini engellemek,
- Bağırsak lümeninden dolaşıma geçmesi gerekli olan diyetsetel ürünler, elektrolitler ve suyun seçici bir şekilde geçirgenliği’dir.

Bu seçici geçirgenlik görevi iki majör yolla gerçekleştirilir (Şekil 2.5). Transselüler geçirgenlikte, genellikle büyük moleküllerin endositoz aracılığı ile ve şekerlerin, SCFA'ların, elektrolitlerin ve aminoasitlerin seçici bir transport proteini aracılığıyla taşınmasında görev almaktadır. Bu yolla ile moleküler ağırlığı >600 Da ve çapları yaklaşık $75 \text{ \AA}$ olan moleküller geçebilmektedir. Paraselüler geçirgenlikte ise moleküler ağırlığı <600 Da olan moleküllerin yaklaşık $8-9 \text{ \AA}$ çapındaki porlardan geçebildiği bu yolla; sıkı bağlantı, transmembran, skaffold, sitoskeleton ve adezyon proteinleri ile düzenlenir [51-53].



Şekil 2.5. Bağırsak geçirgenliği yolları

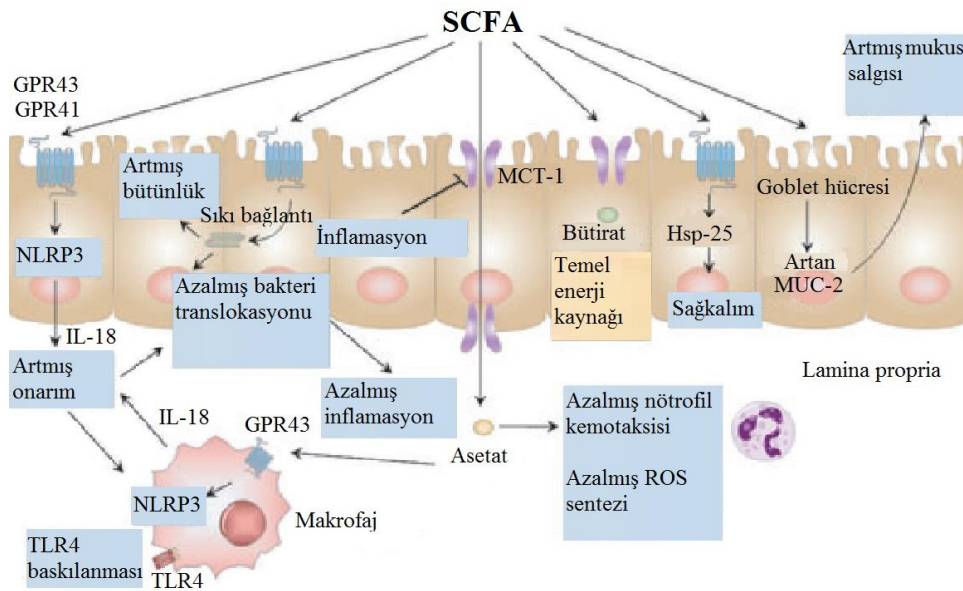
2.5.1. Bağırsak geçirgenliğinin kısa zincirli yağ asitleri ile düzenlenmesi

Epitel ve bağışıklık sistemi hücreleri üzerinde GPR41/43 sinyal yolağı aracılığı ile SCFA'lar, sitoplazmik çoklu-protein komplekslerinden oluşan ve doğal bağışıklık sistemini uyaran NOD-zengin lösin tekrarı (LRR) ailesi-pirin kısmı taşıyan 3 (NLRP3) inflamasyon kompleksini aktive ederek IL-18 sitokininin ekspresyonunu artırmaktadır ve epitelyal bütünlüğü korumaktadır. Şekil 2.6'da fonksiyonları belirtilen SCFA'lar, sıkı bağlantı proteinlerine etki ederek epitel bütünlüğünü korumaktadır. Monokarboksilat transporter-1 (MCT-1), SCFA'ların taşınımını sağlayarak immün hücrelerin uyarılmasını ve dolayısıyla makrofajların ve nötrofillerin kemotaksisini düzenleyebilmektedir. Bakterilerin lamina propriaya taşınımı engellenmiş olmakla birlikte inflamasyon da azalır

ve epitelyal bütünlük korunur. Öte yandan artmış inflamasyon MCT-1 transport proteinlerini baskılayarak SCFA'ların taşınımını engelleyebilmektedir. SCFA'lar ayrıca Hsp-25 ekspresyonunu artırarak hücrelerin sağ kalımını artırmaktadır ve goblet hücrelerinde musin 2 (MUC-2) geninin ifadesini artırarak mukus salgılanmasını sağlamaktadır [54].

TLR ve NLRP gibi önemli reseptörlerin içerisinde olduğu mikrobiyal-ilişkili moleküler patern (MAMPs) reseptörleri doğal bağışıklık sistemini aktive ederek epitelyal geçirgenlikte önemli rol oynamaktadırlar. Bu savunma mekanizmasının bütirat ve propiyonat SCFA'larının Hsp-72 ve Hsp-25 genlerinin ifadelerini artırması ile uyarıldığı ve devamında epitel geçirgenliğin azaldığı görülmektedir. Asetat ve bütirat da aynı fonksiyonu yapmakla birlikte MUC-2 gen ifadesini de artırarak mukus salgılanmasını uyarmaktadır [55].

Clostridium XIVa ve *IV* bakterileri bütirat üretmektedirler. Bağırsak enfeksiyonu sırasında bu bakterilerin miktarlarının azalması ile bütirat, asetat ve propiyonat taşıyıcısı MCT-1 gen ekspresyonunun da azaldığı belirtilmektedir. Bu nedenle kolon hücreleri yağ asitlerini kullanamamaktadır ve epitel hücrelerinde ROS üretiminde bir artış görülmektedir [54].



Şekil 2.6. Kısa zincirli yağ asitleri (SCFA)'nin fonksiyonları

2.5.2. Bağırsak geçirgenliğinin değişimi ve Tip 1 diyabet

Bağırsak yüzey bariyeri, doğal bağışıklık sisteminin en önemli fonksiyonunu yerine getirmektedir. Bağırsak bariyerinde küçük moleküllerin ve antijenlerin transferinde paraselüler ve transselüler yollar görev almaktadır. Bağırsağın apikal ve lateral yüzeylerindeki bu transfer yollarında, bağırsak geçirgenliğinde ve hücre-hücre etkileşiminde kladin, okludin ve zonulin sıkı bağlantı proteinleri rol almaktadır [56,57]. Epitel hücrelerindeki bu sıkı bağlantı proteinleri diyetel ürünler, viral veya bakteriyel ajanlara cevap olarak açılıp kapanmaktadır. Çeşitli bağırsak ve otoimmün hastalıklarda bu proteinlerin mRNA ifade düzeyleri değişiklik göstermektedir. Bu değişiklikler bağırsak geçirgenliğini etkileyerek bağırsak bakterileri kaynaklı antijenlerin transfer yollarını aracılığı ile lümene geçmesine ve hastalığın tetiklenmesine neden olmaktadır [58,59].

Bağırsak geçirgenliği; T1D, pre-diyabetik hastalar ve NOD farelerde artmaktadır [60,61]. Bağırsak geçirgenliğinin değişimine ilave olarak BBDR ile BBDR sıçanlarının hastalık öncesi farklı bakteri kompozisyonu içerdiği görülmektedir [62]. Özellikle hücresel düzeyde BBDR sıçanlarda bağırsak geçirgenliğinin artmasına ilave olarak bağırsak mukozal kript derinliği ve goblet hücrelerinin artması gibi bağırsak morfolojisinde yapısal olarak önemli değişiklikler bulunmaktadır [60,63,64]. Moleküler düzeyde ise BBDR ve BBDR sıçanlarda kladin 1 mRNA düzeyinin kontrol olarak kullanılan Wistar sıçanlara nazaran azaldığı, bağırsak geçirgenliğinin ise arttığı görülmektedir [60]. BBDR sıçanlarda bağırsak geçirgenliğinin artması ile bir başka sıkı bağlantı proteini zonulinin ifade düzeyinin artması arasında bir ilişki olduğu vurgulanmaktadır [64]. T1D hastalarında yapılan çalışmada ise bağırsak geçirgenliğinin artması ile birlikte serum zonulin düzeylerinin de arttığı ifade edilmektedir [65]. *Lactobacillus johnsonii* N6.2 probiyotik bakterisi ile mikroflora modifikasyonu yapılan BBDR sıçanlarda kladin 1 ifade düzeyinin arttığı ve probiyotik bakterinin bağırsak geçirgenliğini azalttığı görülmektedir [66].

Kısa zincirli yağ asitlerini fermente eden *Bacteroidetes* gibi bakterilerin bağırsak geçirgenliği üzerine etkilerinin olduğu belirtilmektedir. Anti-inflamatuar özelliği olan bütiratın sıkı bağlantı proteinleri aracılığıyla bağırsak bariyer fonksiyonunu artırarak bağırsak geçirgenliğini etkilemektedir. Otoimmün diyabetli çocuklarda bütirat üreten *Clostridium XIVa* ve *IV* suşlarının ve laktat üreten *Bifidobacterium adolescentis* gibi bakterilerin azaldığı görülmektedir. Yapılan bu çalışmalar, bağırsak mikroflorası

tarafından üretilen metabolitlerin bağırsak geçirgenliğini önemli düzeyde etkilediğini ve bağırsak mikroflorasının otoimmün diyabet ile ilişkili olduğunu göstermektedir [67].

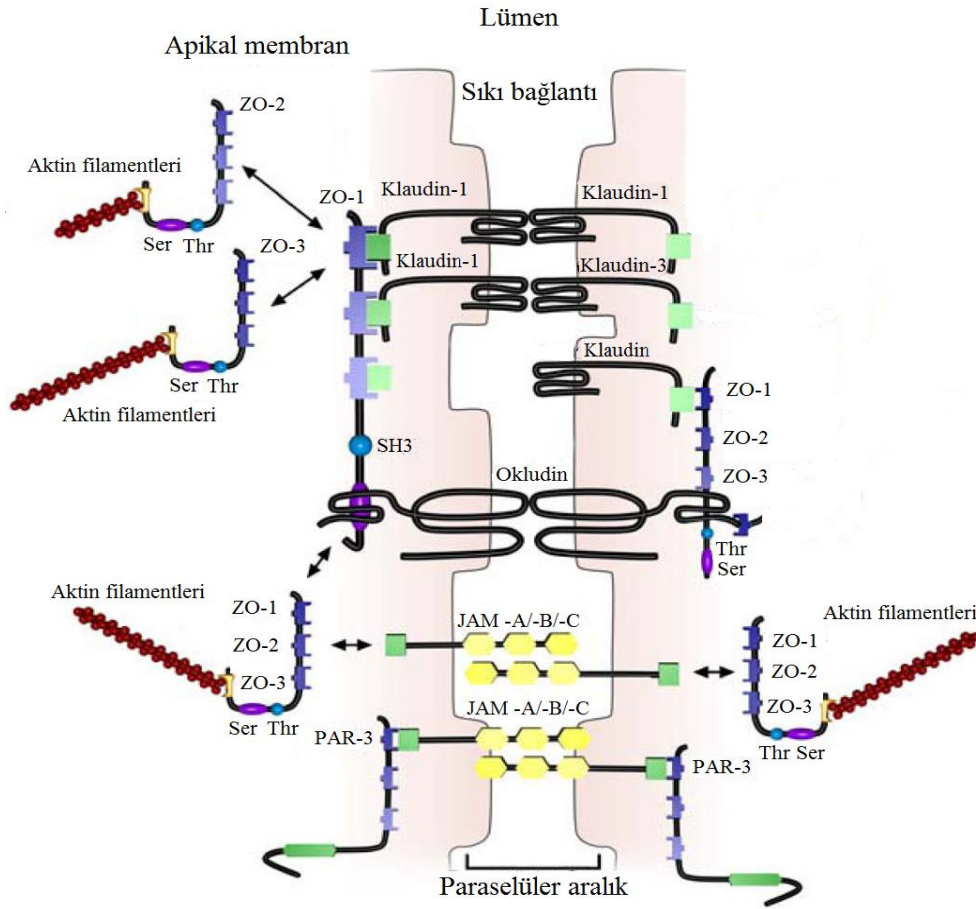
2.6. Bağırsak Bariyeri

Bağırsak epitel bariyerinde epitel hücrelerinin yanında antimikrobiyal peptidler ve mukus tabakası yer almaktadır. Mukus tabakası dış ve iç tabaka olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Dış tabaka bakterilerce yoğundur. İç tabaka ise yoğun bir yapıda olmakla birlikte bakterilerin lümeneye geçişini engellemektedir. Mukus, goblet hücrelerinde bulunan MUC-2 geni aracılığı ile sentezlenmektedir. Mukus miktarı enfeksiyon durumlarında azalmaktadır ve bu nedenle de bakterilerin bağırsak mukozasına geçişi kolaylaşmaktadır [68].

Bağırsak bariyerinde; enterosit, goblet, paneth ve enterokramaffin hücreleri olmak üzere dört hücre grubu görev yapmaktadır. Bu hücreler, zonulin, klaudin ve okludin sıkı bağlantı proteinleri ile apikal bölgede sıkı bir etkileşim içerisinde ve mikrobiyal metabolitlerin bağırsak lümenine taşınımını önlemektedir. Bağırsak enfeksiyonları durumunda bu sıkı bağlantı proteinlerinin baskılandığı görülmektedir. Paneth hücreleri, ürettiği antimikrobiyal peptidler ile bağışıklık sistemini uyarmaktadır ve bağırsak mikroflorasının homeostazisini düzenleyerek de bariyer fonksiyonunu gerçekleştirmektedir [69,70].

2.7. Sıkı Bağlantılar

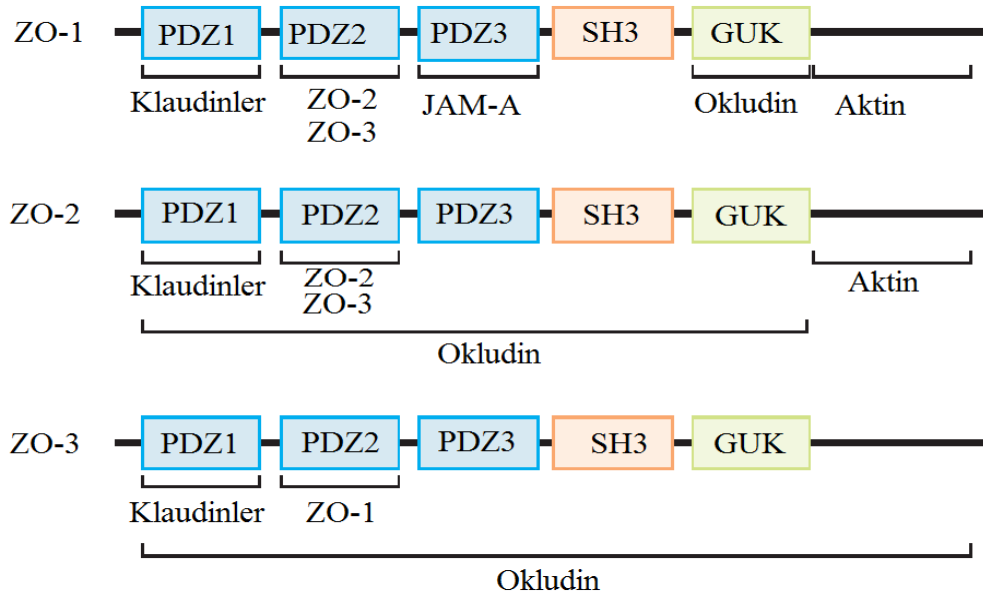
Sıkı bağlantı proteinleri, evrimsel olarak adezyon bağlantıları ve dezmozom proteinlerinin füzyonu ile oluşmuştur. Bu integral transmembran proteinler, apikal-lateral bağlantı bölgesinde lokalizedir ve okludin, klaudin ve bağlantı adezyon molekülü (junctional adhesion molecule-JAM)’nden oluşmaktadır (Şekil 2.7). Bu proteinler, homofilik (klaudin-1/klaudin-1) ve heterofilik (klaudin-1/klaudin-3) etkileşimler ile epitelde bariyer fonksiyonu görürler. Bu transmembran proteinlerin hücre içi bölgeleri skaffold (ZO-1, ZO-2, ZO-3, hücre polarite proteini-PAR3) ve adaptör proteinlerinin Post-synaptic density 95/Drosophila disc large/Zona-occludens (PDZ) domainlerinin etkileşimleri ile hücre iskeletini, polaritesini, sinyalini ve vezikül taşınımını düzenleyebilmektedirler. Sıkı bağlantı proteinleri kinazların, fosfatazların ve diğer sinyal moleküllerinin fosforilasyonu ile düzenlenirler [56,71,72].



Şekil 2.7. Sıkı bağlantı ve skaffold proteinleri

2.7.1. Zonula okludensler

ZO proteinleri; ZO-1, ZO-2 ve ZO-3 olmak üzere ilk tanımlanan üç spesifik sıkı bağlantı proteinleridir. Bu proteinler, membran ilişkili guanilat kinaz protein ailesindendir ve üç PDZ yapısal bölgesi, bir Src homoloji-3 (SH3) bölgesi ve bir de guanilat kinaz (GUK) homoloji bölgesinden oluşmaktadır. Şekil 2.8’de gösterildiği gibi bu yapısal bölgeler, hücre içi skaffold yapıların oluşumunu sağlar ve sıkı bağlantı komplekslerinin düzenlenmesi için gereklidir. ZO-1 geni, sıkı bağlantı protein 1 (tight junction protein 1- TJP1) olarak da adlandırılmaktadır. ZO-1 geni, 33 ekzondan oluşmaktadır ve 15. kromozomun q13.1 bölgesinde lokalizedir [73].



Şekil 2.8. ZO-1, ZO-2 ve ZO-3 integral skaffold sıkı bağlantı proteinleri ve diğer proteinler ile etkileşimleri

2.7.2. Okludinler

Okludin, integral membran proteini olarak ilk tanımlanan spesifik bir sıkı bağlantı proteini. Daha çok epitel ve endotel hücrelerinde ifadenmektedir. 60-80 kDa ağırlığında zarı kateden dört transmembran kısmı ve ekstraselüler ve intraselüler bölgelerden oluşmaktadır. Ekstraselüler bölgesi, seçici paraselüler geçirgenlikte rol alırken intraselüler bölgesi ZO-1 proteininin PDZ domaini ile etkileşerek aktin filamentlerine bağlanmaktadır [74,75].

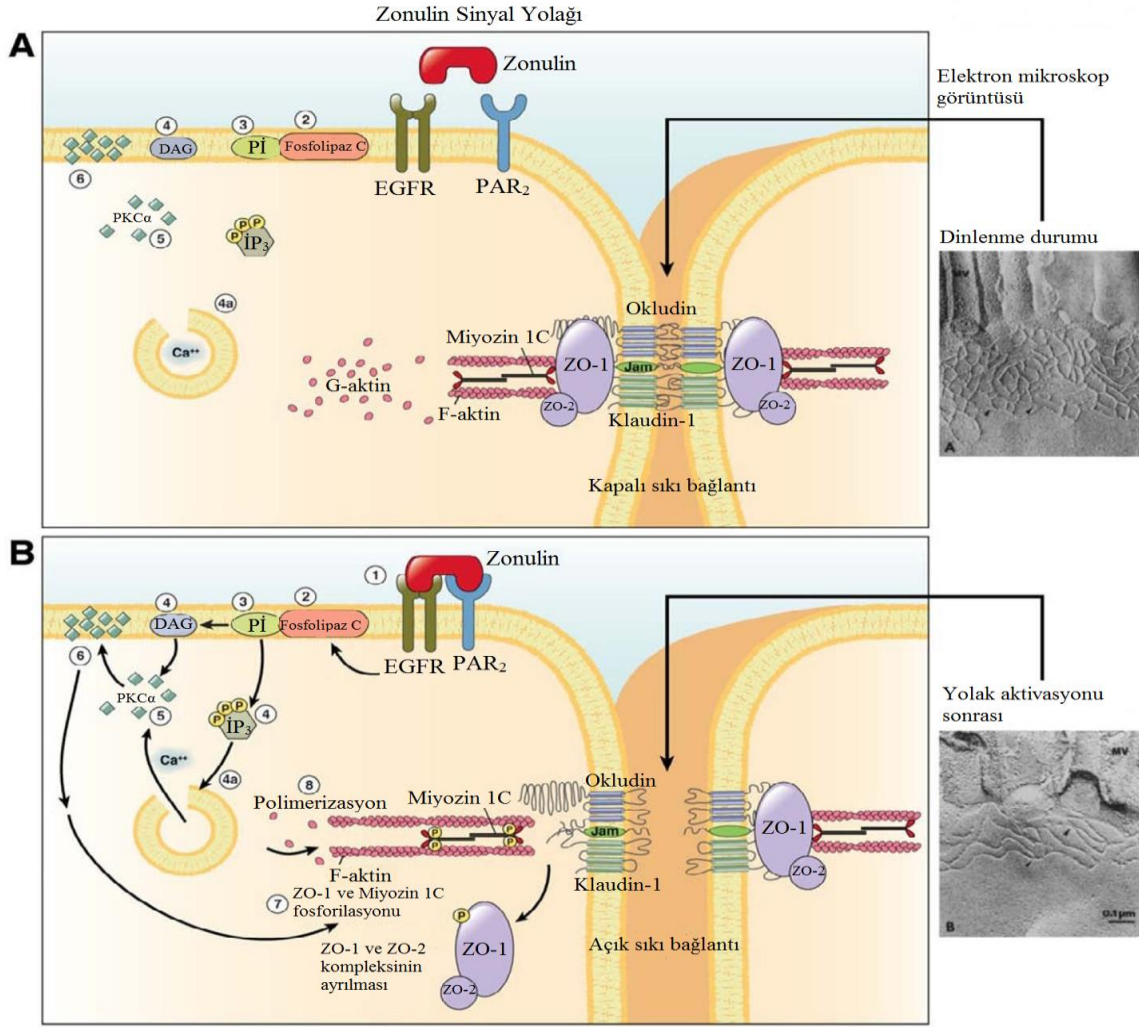
2.7.3. Klaudinler

Klaudinler, 20-27 kDa ağırlığında dört hidrofobik transmembran bölgesinden oluşan integral membran proteinleridir ve ZO-1 proteini ile birlikte paraselüler geçirgenlikte rol almaktadırlar [76]. IFN- γ ve TNF α sitokinleri, sıkı bağlantı proteinlerinin fosforillenmesine yol açarak bağırsak geçirgenliğini artırır. Bağırsak enfeksiyonları ve bazı otoimmün hastalıklarda bu proteinlerin farklı şekilde düzenlenmeleri ile bağırsak geçirgenliğinin arttığı görülmektedir [77].

2.8. Zonulin proteini ve sinyal iletimi

İnsan pre-haptoglobin 2 (HP2), iki-zincir formundan oluşan çok fonksiyonlu bir proteindir. İlk olarak bu proteinin tek zincir formunun zonulin olduğu keşfedilmiştir. Zonulin, proteinaz aktive eden reseptör 2 (PAR₂) aracılığı ile epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR)'nü aktive etmektedir ve hücreler arası sıkı bağlantı proteinleri ile birlikte bağırsak geçirgenliğini düzenlemektedir [78].

Bağırsak ve otoimmün hastalıkların olmadığı normal hallerde zonulin reseptörüne bağlanamamaktadır ve böylece fosfolipaz C-PKC α yolağı aktif değildir. G-aktin monomerleri F-aktin (filamentöz) filamentlerine polimerleşmemektedir. Okludin, kladin-1, ZO-1 ve miyozin 1C protein kompleksi sıkı halde bağlıdır ve bağırsak bariyer fonksiyonu normaldir (Şekil 2.9A). *C. difficile* ve IBD benzeri bağırsak enfeksiyonlarında ve otoimmün T1D durumlarında zonulin düzeyleri artmaktadır. Zonulin, PAR₂ aracılığı ile EGFR'yi aktive etmektedir. Bu sayede fosfolipaz C yolağı aktive edilir. ZO-1 ve miyozin 1C proteinleri PKC α ile fosforillenir ve sıkı bağlantı proteinlerinin yapısı bozulur. Ayrıca G- aktin monomerleri F-aktin şekline polimerleşerek paraselüler geçirgenliğin artmasına neden olmaktadır (Şekil 2.9B) [79].



Şekil 2.9. Zonulin sinyal iletimi

2.9. Tip 1 Diyabet Bağırsak Mikroflorasında Farklılık Gösteren Bakteriler

Mikroflora kompozisyonunun hastalığın başlangıcı ve ilerlemesinde önemli olduğu ve konağın sağlığını etkileyebildiği yönünde çalışmalar değer kazanmaktadır. STZ-uyarımli T1D modeli oluşturulan Sprague-Dawley sıçanlarda yapılan çalışmada *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* gibi laktik asit üreten bakterilerin miktarlarının arttığı; T1D erken döneminde ise *Bacteroidetes/Firmicutes* oranının değişimi görülmesine rağmen laktat miktarının değişmediği ifade edilmektedir. Sonuç olarak değişen bağırsak mikroflorası ve azalan bakteri çeşitliliği T1D ile ilişkili olduğunu göstermektedir [20]. Farklı olarak T1D'li çocuklarda yapılan çalışmada ise *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Clostridium* sayılarında ve *Bacteroidetes/Firmicutes* oranında anlamlı farklılıkların olduğu görülmektedir [80]. Özet olarak T1D'li insan ve hayvan çalışmalarında farklılık gösteren bakteriler, hayvan

modeli veya çalışma grubu ve sonuç olacak şekilde bağırsak mikroflora çalışmaları aşağıdaki tablo'da verilmiştir [81].

Çizelge 2.4. Tip 1 diyabet bağırsak mikroflora çalışmaları

Bakteri	Hayvan modeli/Çalışma grubu	Sonuç	Kaynak
<i>Bifidobacteria, Clostridium</i>	LEW1. WR1 sıçan	Virüs-uyarımli T1D ile artan <i>Bifidobacteria</i> ve <i>Clostridium</i> korelasyonu	[17]
<i>Klebsiella</i>	Wistar Rat	Fazla sayıda	[19]
<i>Lactobacillus, Bifidobacterium</i>	Sprague-Dawley sıçan	Fazla sayıda	[20]
<i>Lactobacillus johnsonii</i> N6.2	BB-DP sıçan	Diyabet başlangıcının geciktirilmesi	[66]
Laktat ve bütirat üreticiler	Seropozitif bireyler	Laktat ve bütirat üreten bakterilerin azalması	[67]
<i>Bifidobacterium, Lactobacillus</i>	T1D'li çocuklar	<i>Bifidobacterium</i> ve <i>Lactobacillus</i> sayılarında azalma	[80]
<i>Clostridium, Bacteroides, Veillonella</i>	T1D'li çocuklar	<i>Clostridium, Bacteroides</i> ve <i>Veillonella</i> miktarlarında artış	[80]
<i>Bacteroides, Eubacterium, Ruminococcus</i>	BB-DR sıçanlar	Çok fazla sayıda	[82]
<i>Clostridium hylemonae</i>	BB-DR sıçanlar	Çok fazla sayıda	[82]
<i>Firmicutes, Bacteroidetes</i>	NOD fareler	<i>Firmicutes</i> az ve <i>Bacteroidetes</i> fazla sayıda	[83]
<i>Prevotella ve Akkermansia</i>	T1D'li çocuklar	Fazla miktarda azalma	[84]
<i>Bacteroidetes</i>	Serokonversiyonlu T1D bireyler	Adacık otoimmünite ile pozitif ilişkili	[85]
<i>A. muciniphila</i>	NOD fareler	T1D gelişiminde koruyucu rolü bulunmaktadır.	[86]
<i>Bacteroides ovatus, Bacteroides fragilis</i>	T1D'li çocuklar	<i>Bacteroides ovatus</i> artmışken <i>Bacteroides fragilis</i> azalmıştır.	[87]
<i>B. adolescentis</i> DSM 20083	T1D gelişme riski bulunan çocuklar	Muhtemel β hücreli otoimmüniteye yatkınlık	[88]

2.10. Diyabet ilaçlarının bağırsak mikrobiyotasında oluşturduğu değişimler

Diyabet tedavisinde başlıca insülin, metformin ve berberin gibi ilaçlar kullanılmaktadır. Bu ilaçlar bağırsak mikrobiyota çeşitliliğini ve bazı bağırsak bakterilerinin miktarını artırabilmektedir. Metformin, yüksek yağlı diyetle beslenen farelerin bağırsak mikrobiyotasında bir musin-parçalayan Gram (-) anaerob olan *Akkermansia muciniphila*'nın miktarını artırabilmektedir. Ayrıca yapılan ilave kontrol deneylerde de metformin veya *Akkermansia muciniphila* verilen farelerde musin-sentezleyen goblet hücrelerinin sayısının arttığı ve Treg hücrelerinin sayısının azaldığı görülmektedir [89]. Yüksek yağlı diyetle uyarılan obez ratların hem metformin hem de berberin ile tedavi edildiği benzer çalışmada ise bakteri çeşitliliğinin anlamlı bir şekilde azaldığı ve kısa zincirli yağ asidi ürettiği kabul edilen *Allobaculum*, *Bacteriodes*, *Blautia*, *Butyricoccus* ve *Phascolarctobacterium* bakterilerinin önemli derecede arttığı ifade edilmektedir [90].

Deneysel diyabetik ratlarda normal bağırsak mikrobiyotası yenilenmemesine rağmen insülin tedavisinden sonra mikrobiyota kompozisyonu ve çeşitliliğinde karakteristik yeniden düzenlenmeler oluşabilmektedir. *Proteobacteria*'ler T1D sıçan modelinde predominant şubelerden (*Firmicutes* ve *Bacteroidetes*) daha belirgin değişiklikler göstermektedir. Proteobakteri şubesine ait *Klebsiella* cinsi bakterilerin diyabetli sıçanlarda fazla olması, bağırsak duvarında patolojik yolakların uyarılmasına, inflamasyonun başlaması ile birlikte otoimmün diyabetin gelişmesine neden olabilmektedir. Bu nedenle proteobakteri şubesi üyesi bakteriler tanı ve potansiyel tedavinin ana noktası olarak, *Klebsiella* cinsi bakteriler ise T1D'nin biyobelirteçleri olarak incelenebilmektedir [19].

2.11. Bağırsak mikrobiyotasının yeniden düzenlenmesi ile tip 1 diyabetin tedavisi

T1D'li hastalar ve hayvan modellerinde yapılan çalışmalarda bağırsak bakterilerinin ve fonksiyon çeşitliliğinin azaldığı, Treg hücrelerinin uyarılmasının baskılandığı, dolayısıyla inflamasyon gelişmesi ve bağırsak bariyer fonksiyonunun bozulması sonucunda T1D'nin geliştiği görülmektedir [87,91]. Deneysel bağırsak mikrobiyota yeniden düzenlenmesi yapılan NOD farelerde T1D gelişmediği fakat bu yeniden düzenlenmenin genetik olarak diyabete yatkın bireylerde yapılmasının daha etkili bir tedavi olacağı öngörülmektedir [92,93]. NOD farelere patojen olmayan bağırsak bakterisi veya VSL#3 probiyotik bileşeninin uzun süre uygulanması, bu farelerde interlökin-10 sitokini veya transforme

edici büyüme faktörü- β (TGF- β) bağımlı mekanizmanın düzenlenmesiyle ilişkili olarak T1D gelişmesini engellemektedir [93,94]. İlave olarak genetik olarak modifiye edilen bağırsak bakterilerinin verilmesiyle de diyabet tedavi edilebilmektedir. Genetik olarak modifiye edilen *Lactococcus lactis* bakterisinin obez olmayan farelere oral olarak verilmesi sonucunda; henüz başlangıç aşamasında olan T1D iyileştirilebilmektedir [95,96]. Bebeklik döneminde bağırsak çevresi büyük gelişimsel değişikliklere uğramaktadır ve bağırsak mikrobiyotası geniş ölçüde yeniden oluşturulmaktadır. Fakat ergenlik sonrasında mikrobiyota, bağırsak immünitesi tarafından düzenlendiğinden dolayı mikrobiyotada değişim yavaşlamaktadır [97,98]. Bu nedenle hayatın ilk yıllarında meydana gelen küçük yeniden düzenlenmeler, yetişkinlikte normal bağırsak immün homeostazisi üzerinde çok derin etkiler yapmaktadır. Doğumdan sonraki ilk yıllarda bağırsak yeniden düzenlenmesi ile gerçekleştirilen bu tedavilerin tümü bağırsak bariyer fonksiyonu, sitokin üretimi ve diyabet gelişimi üzerinde kritik bir öneme sahiptir [99,100].



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Etik Kurul

Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı tarafından G.Ü.ET-15.041 kod numarası ile çalışmanın kurul yönergesine uygun olduğu saptanarak oy birliği ile onaylanmıştır. Hayvan uygulamaları, Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun etik kurallarına uygun olarak yapılmıştır. Bu çalışma ile ilgili tüm deneyler Gazi Üniversitesi Yaşam Bilimleri Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde yapılmıştır.

3.2. Deney Hayvanları

Bu çalışmada Gazi Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezi'nden (GÜDAM) sağlanan toplam 36 tane Wistar cinsi erkek albino rat ile çalışıldı ve 180-200 gr ağırlığındaki ratlar deneylere dahil edildi.

3.3. Kullanılan Cihazlar

- Azot tankı (Einox)
- Buzdolabı (Arçelik)
- Derin dondurucu (-20 °C) (Sanyo)
- Derin dondurucu (-86 °C) (Sanyo)
- Elektroforez tankı (Thermo Scientific)
- Glukometre (PlusMed Accuro)
- Güç kaynağı (BIO-RAD)
- Biyogüvenlik kabini (Nuair Cellgard, Class II)
- Hassas terazi (Libror AEG-220, Shimadzu)
- Kuru ısıtıcı blok (Biosan CH-100)
- Manyetik karıştırıcı (VMS-C4 Advanced VWR)
- Mikropipetler (10 µL, 100 µL, 1000 µL, 10ml) (Eppendorf)
- pH metre (WTW 422)
- Real-time PCR cihazı, (The Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, ThermoFisher Scientific)
- Su banyosu, (Nüve BM 402)

- Soğutmalı santrifuj (Hettich Mikro 220 R)
- Spektrofotometre (NanoDrop ND-1000) (Thermo Scientific)
- Spin vorteks (Biosan)
- Isı döngü cihazı (Applied Biosystems Veriti 96 Fast Thermal Cycler)
- Denatüre edici gradiyent jel elektroforezi (DGGE) (The DCode Mutation Detection System, BioRad)
- Vorteks (FINEPCR, Fine Vortex)
- Jel görüntüleme sistemi (Kodak)
- Mikrodalga fırın (Arçelik)
- Anaerobik çalışma kabini (Labconco)
- Gaz kromatografi cihazı (Shimadzu)
- Eliza okuyucu (Thermo Multiskan GO)
- Mikroplate yıkayıcı (Rayto)
- Otoklav (Nüve)

3.4. Kullanılan Sarf Malzemeleri

- Steril 0.2–0.5–1.5-2 ml’lik ependorf tüpler (İsolab)
- Filtre kağıdı (Whatman)
- Steril mikropipet uçları (10 µL, 100 µL, 1000 µL, 10ml) (İsolab)
- İnsülin enjektörü (Hayat)
- Steril enjektörler (2, 5, 10, 50 ve 60 ml) (Hayat)
- Steril falkon tüpler (15 ml ve 50 ml) (İsolab)
- 0,45 µm’lik filtre (Millex)
- Supelco 30m x 0,25 mm x 0,25 µm kolon (Nukol™ 24107) (Sigma)
- Sintilasyon vialleri (Z190527) (Sigma)
- EDTA’lı tüp (5 ml) (İsolab)

3.5. Kullanılan Kimyasal Maddeler

- 100 bp DNA Markır (BioLabs)
- 5x PCR master mix (Firepol)
- 6x yükleme tamponu (BioLabs)
- Absolut etanol (Sigma)

- Agaroz (Prona)
- Akrilamid (Sigma)
- Amonyum asetat (Merck)
- Amonyum persülfat (APS) (Sigma)
- Bis-akrilamid (Ambresco)
- Borik asit (Scharlau)
- Bromfenol mavisi-ksilen siyanol (Sigma)
- Etilen diamin tetraasetik asit (EDTA) (AppliChem)
- Etanol (Sigma)
- Etidyum bromür (EtBr) (Sigma)
- Fenol (AppliChem)
- Deiyonize formamid (Fluka)
- Glasiyal asetik asit (Carlo Erba)
- Gliserol (Sigma)
- İnsülin (Humulin 100 IU/ml M70/30)
- İzoamilalkol (Merck)
- Alfamin %10 (Ketamin hidroklorür) (EGE-VET)
- Kloroform (Merck)
- Basilazin %2 (Ksilazin hidroklorid) (baVET)
- PBS (Tuzlu fosfat tamponu) tabletler (Invitrogen)
- Safe-T-Stain (EtBr alternatifi DNA görüntüleme boyası) (BioShop)
- Sodyum dodesil sülfat (SDS) (Sigma)
- Sodyum hidroksit (NaOH) (Merck)
- Hidroklorik asit (HCl) (%36,5-38) (Merck)
- Sodyum sitrat tribazik dihidrat (Sigma)
- Streptozotosin (STZ) (powder %98) (Sigma)
- Tetrametilendiamin (TEMED) (Sigma)
- Tris (Ambresco)
- Üre (Kimetsan)
- GAPDH, ZO-1 ve Claudin-1 genlerine özgü primerler (Macrogen)
- 338F 16S rDNA V3-F, 534R 16S rDNA V3-R ve V3 F+GC (GC Clamp) Kuyruklu primer (Metabion)
- Metafosforik asit (Sigma)
- Trizol (Thermo Scientific)

- Dnaz I rekombinant (Sigma)
- Steril dietil prokarbonat (DEPC)'lı su (Sigma)

3.6. Kullanılan Kitler

- Gen matriks dışkıdan DNA izolasyon kiti (Eurx)
- Ekzosap PCR sonrası temizleme kiti (Exosap IT) (Thermo Fisher Scientific)
- GoTaq 1-Step qRT-PCR kiti (Promega)
- Uçucu yağ asidi analiz kiti (Volatile free acid mix) (Supelco 46975-U 10 mmol/L) (Sigma)
- Rat insülin eliza kiti (SunRed)

3.7. Kullanılan Solüsyonların Hazırlanması

3.7.1. 0,5 M EDTA (pH:8) hazırlanışı

27,9 gr EDTA hassas terazide tartılıp, çözünme işlemi için yaklaşık 2 gr NaOH ilave edildikten sonra 100 ml distile suda çözdürüldü. Sodyum hidroksit ve hidroklorik asit kullanılarak pH metre ile çözelti pH'sı 8'e ayarlandıktan sonra 150 ml'ye tamamlandı. Daha sonra solüsyon 121 °C'de 20 dk otoklavlandı ve 0,45 µm'lik filtreden geçirilip oda sıcaklığında muhafaza edildi.

3.7.2. 5X Tris borik asit EDTA (TBE) hazırlanışı

54 gr tris ve 27,5 borik asit üzerine 20 ml 0,5 M EDTA ilave edildikten sonra 800 ml distile suda çözdürüldükten sonra 1000 ml'ye tamamlandı.

3.7.3. 1X TBE (Running buffer) hazırlanması

%1'lik agaroz jel ve elektroforez tankının doldurulmasında kullanılmak üzere 200 ml 5X TBE mezür ile ölçülerek üzerine 800 ml distile su eklendi.

3.7.4. %1'lik agaroz jel hazırlanması

1 gr agaroz tartılıp üzerine 100 ml 1X TBE eklendi. Solüsyon, mikrodalga fırında kaynatıldıktan sonra muslukta akan suda biraz soğutulup üzerine 5 µl DNA jel boyası (Safe-Tstain, 1 ml, ETB666) eklendi. Elektroforez kaset sistemine tarak yerleştirildikten sonra baloncuk kalmamasına dikkat edilerek jel döküldü ve yarım saat polimerleşmesi için beklendi.

3.7.5. %40'lık Akrilamid/Bisakrilamid (37:5:1) solüsyonu

38,93 gr akrilamid ve 1,07 gr bis-akrilamid tartılıp 80 ml distile suda çözdürüldükten sonra 100 ml'ye tamamlandı ve 0,45 µm'lik filtreden geçirilip +4 °C buz dolabında saklandı.

3.7.6. 50X Tris asetik asit EDTA (TAE) tamponunun hazırlanışı

242 gr Tris tartılıp 600 ml dH₂O ile çözdürüldükten sonra üzerine 100 ml 0,5 M EDTA (pH 8) ve 57,1 ml Glasiyal asetik asit eklenip son hacim distile su ile 1 L'ye tamamlandı. Manyetik karıştırıcıda homojen hale gelene dek karıştırıldıktan sonra 121 °C'de 20 dakika otoklavlanarak sterilize edildi.

3.7.7. 1X TAE (Running Buffer) hazırlanması

DGGE yönteminde 7 L 1X TAE kullanılmaktadır. 140 ml 50X TAE mezür ile ölçülüp 6860 ml distile su ile 7L'ye tamamlandı ve alt üst edilerek iyice karıştırıldı.

3.7.8. %10'luk Amonyum Persülfat (APS) hazırlanışı

APS, jel dökülmeden önce taze olacak şekilde hazırlandı. 0,1 gr APS tartılıp 1 ml distile suda pipetaj yapılarak çözüldü ve kullanılacağı zamana dek -20 °C dolapta saklandı.

3.7.9. DCode boyama solüsyonunun hazırlanması

0,05 gr Bromfenol mavisi ve 0,05 gr Ksilen siyanol tartılıp 10 ml 1X TAE içerisinde çözdürüldü. Boyama solüsyonu, alüminyum folyo ile sarılarak ışık almayacak şekilde oda sıcaklığında muhafaza edildi.

3.7.10. %8'lik %100 denatüre edici solüsyonun hazırlanışı

%100'lük solüsyon, her bir poliakrilamid jel yapılmadan önce taze hazırlanması gerektiği için 25 ml hazırlandı. 10,5 gr üre tartılıp 25 ml'lik balon jojeye kondu. Üzerine 10 ml formamid, 5 ml %40'lık Akrilamid/Bis (37.5:1) ve 500 µl 50X TAE eklenip manyetik karıştırıcıda 1-2 saat, üre iyice çözününceye dek karıştırıldı. Solüsyon, homojen hale geldikten sonra balon jojenin içindeki balık çıkarılıp distile su ile 25 ml'ye tamamlandı ve gözenek boyutu 0,45 µm olan hidrofilik membran filtreden geçirildi.

3.7.11. %8'lik %0 denatüre edici solüsyonun hazırlanması

20 ml %40'lık Akrilamid/Bis (37.5:1), 2 ml 50X TAE ve 78 ml distile su karıştırılarak 100 ml'ye tamamlandı. %0'lık solüsyon, 0,45 µm'lik filtreden geçirilip +4 °C dolapta muhafaza edildi.

3.7.12. %8'lik %80 denatüre edici (High) jelin hazırlanışı

Hazırlanan %100'lük denatüre edici solüsyondan 16 ml, %0'lık solüsyondan ise 4 ml alınarak karıştırıldı. Solüsyonun üzerine 300 µl DCode boyama solüsyonu eklendi. Daha sonra jel dökülmeden hemen önce 20 µl TEMED ve 200 µl APS eklendi.

3.7.13. %8'lik %20 denatüre edici (Low) jelin hazırlanması

Hazırlanan %100'lük denatüre edici solüsyondan 4 ml, %0'lık solüsyondan 16 ml alınarak karıştırıldı.

3.7.14. 0,1 M sodyum sitrat tamponunun hazırlanışı

2,94 g sodyum sitrat tribazik dihidrat tartılıp (294,1 g/mol) 80 ml dH₂O ile çözdürüldükten sonra 1 M HCl ile pH'sı 4,5'a ayarlandı ve 100 ml'ye tamamlandı. Solüsyon, gözenek boyutu 0,45 µm olan hidrofilik membran filtreden geçirildikten sonra +4 °C dolapta muhafaza edildi.

3.7.15. STZ solüsyonu

Ortalama ağırlıkları yaklaşık 200 gr kabul edilen sıçanlar için sıçan başına 12 mg STZ, 250 µl sodyum sitrat solüsyonunda çözüldü.

3.7.16. Fekal mikrobiyota transfer (FMT) solüsyonunun hazırlanması

Tamamen sağlıklı 3 hayvandan aseptik bir şekilde alınan sekum içeriği, hemen bir anaerobik kabine transfer edilerek havuz oluşturuldu. Bu havuzdan alınan 5 ml sekum içeriği, 50 ml gliserol ve 150 ml PBS ile karıştırılıp iki katlı steril gazlı bezden süzüldü. Solüsyon, FMT uygulamalarında kullanılmak üzere 15 ml'lik falkon tüplere porsiyonlanarak -80 °C dolaba kaldırıldı.

3.7.17. %25'lik Metafosforik Asit solüsyonu

6,25 gr metafosforik asit tartılıp 15 ml distile suda çözdürüldükten sonra 25 ml'ye tamamlandı. Solüsyon, manyetik karıştırıcıda homojen hale gelene dek karıştırıldı ve oda sıcaklığında muhafaza edildi.

3.7.18. Etidyum bromür hazırlanışı

0,1 gr Etidyum bromür 10 ml distile su içerisinde bir gece boyunca manyetik karıştırıcıda çözdürüldü ve falkon tüp alüminyum folyo ile kaplanarak +4 °C dolapta saklandı.

3.8. Yöntemler

3.8.1. Deneysel diyabetik sıçan modelinin oluşturulması ve uygulamalar

Çalışmada ağırlıkları yaklaşık olarak 180-200 gr olan 36 adet Wistar albino erkek sıçan kullanıldı. Sıçanlar, Gazi Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezi'nden (GÜDAM) temin edildi. Gazi Üniversitesi Yaşam Bilimleri Uygulama ve Araştırma Merkezi'ne nakledilen hayvanların yeni ortama adaptasyonları için 1 hafta beklendi. Sıçanlar, 12 saat aydınlık ve 12 saat karanlık döngüde 22 °C sıcaklıkta ve %30-40 nispi nemde tutuldu. Hayvanlar, yem ve suya serbest erişecek şekilde (Ad libitum) beslendi. Sıçanlar, kafeslerinin altlarında talaş olacak şekilde barınmaları sağlandı. Adaptasyon süresinin ardından toplam 8 hafta süren deneylerin ilki olan STZ enjeksiyonu ile pankreas harabiyeti oluşturuldu. STZ, bir glukoz taşıyıcı (GLUT2) aracılığı ile β hücrelerine girer ve DNA'nın alkilenmesinin devamında nekrozise yol açarak β hücrelerinin harabiyetini gerçekleştirir. Kan şekerinin yükselmesi için 1 hafta beklendi, ardından 7 hafta boyunca her gün deney düzeneğine göre gruplara intraperitoneal (i.p) insülin enjeksiyonu ve oral gavaj yolu ile FMT solüsyonu uygulandı.

Sham (Kontrol) ve sağlıklı donör grupları hariç geriye kalan 24 hayvana i.p olarak tek doz 0.1 M sodyum sitrat tamponu (pH 4,5) içerisinde çözödürölen hayvan başına 60 mg/kg olacak şekilde STZ enjeksiyonu yapıldı. Sham grubuna pH'sı 4.5 olan sodyum sitrat tamponu i.p enjeksiyon ile verildi. Enjeksiyondan 1 hafta sonra sıçanların kuyruklarından intravenöz (i.v) yolla alınan kandan glukometre ile 24 saat açlık kan glukoz konsantrasyonları ölçöldü. Bu çalışmada normal kan şekeri değeri 90-110 mg/dL olarak kabul edilmiş olup kan şekeri 250 mg/dL ve üzerinde olan hayvanlar diyabetik kabul edildi. Diyabetik olduğu belirlenen deney gruplarına uygun olarak günlük uygulamalar yapıldı ve her hafta tüm grupların aynı gün ve saatlerde 24 saat açlık kan şekerleri ölçöldü, tartıldı ve dışkıları toplandı.

3.8.2. Deney grupları

Çalışmada 36 adet sıçan, 6 gruba ayrıldı:

Sağlıklı donör grubu (n=6)

Sham (Kontrol) grubu (n=6)

Diyabet grubu (n=6)

İnsülin grubu (n=6)

FMT grubu (n=6)

İnsülin ve FMT grubu (n=6)

Sağlıklı donör grubu

Deney başında sağlıklı donör grubu oluşturularak, bu sıçanlara hiçbir madde uygulaması yapılmaksızın deney sonuna kadar serbest diyet ve içme suyu ile beslendi. Bu gruptaki hayvanlar, deney süresince diğer gruplardaki sıçanlarla beraber her hafta tartıldı, açlık kan şekerleri ölçüldü ve fekal örnekleri toplandı.

Sham (Kontrol) grubu

Bu gruptaki sıçanlara pH'sı 4,5 olan sodyum sitrat tamponu, tek doz ve i.p olarak verildi. Bu sıçanların da her hafta açlık kan şekerleri ölçüldü, tartıldı ve fekal örnekleri toplandı. Deney süresince bu gruba başka bir uygulama yapılmadı. Ratlar, serbest diyet ve içme suyu ile beslendi.

Diyabet grubu

pH'sı 4,5 olan sodyum sitrat tamponu içerisinde çözdürülen STZ, hayvan başına tek doz 60 mg/kg olacak şekilde i.p olarak verildi. Kan şekeri 250 mg/dL ve üzerinde olan hayvanlar diyabetik kabul edildi. Sıçanlar, başka bir uygulama yapılmaksızın deney sonuna kadar serbest diyet ve içme suyu ile beslendi. Bu gruptaki sıçanların da her hafta açlık kan şekerleri ölçüldü, tartıldı ve fekal örnekleri toplandı.

İnsülin grubu

pH'sı 4,5 olan sodyum sitrat tamponu içerisinde çözdürülen STZ, hayvan başına tek doz 60 mg/kg olacak şekilde i.p olarak verildi. Kan şekeri 250 mg/dL ve üzerinde olan hayvanlar

diyabetik kabul edildi. Serbest diyet ve içme suyu ile beslendirilen bu sıçanların her hafta açlık kan şekerleri ölçüldü, tartıldı ve fekal örnekleri toplandı. Deney süresince her gün (haftasonu dahil) aynı saatte tek doz 3-4 ünite i.p olarak insülin enjeksiyonu yapıldı.

FMT grubu

Sodyum sitrat tamponu (pH 4,5) içerisinde çözdürülen STZ, hayvan başına tek doz 60 mg/kg olacak şekilde i.p olarak verildi. Kan şekeri 250 mg/dL ve üzerinde olan hayvanlar diyabetik kabul edildi. Diyabetik olduğu belirlenen hayvanlara her gün 1 ml olacak şekilde oral gavaj yolu ile FMT solüsyonu verildi. Serbest diyet ve içme suyu ile beslendirilen sıçanların her hafta açlık kan şekerleri ölçüldü, tartıldı ve fekal örnekleri toplandı.

İnsülin ve FMT grubu

0,1 M sodyum sitrat tamponu (pH 4,5) içerisinde çözdürülen STZ, hayvan başına 60 mg/kg olacak şekilde i.p olarak verildi. Kan şekeri 250 mg/dL ve üzerinde olan hayvanlar diyabetik kabul edildi. Bu hayvanlara, deney süresince her gün (haftasonu dahil) aynı saatte tek doz 3-4 ünite i.p olarak insülin enjeksiyonu ve oral gavajla 1 ml FMT solüsyonu verildi. Hayvanlar serbest diyet ve içme suyu ile beslendi ve her hafta açlık kan şekerleri ölçüldü, tartıldı ve fekal örnekleri toplandı.

3.8.3. Hayvan uygulamalarının sonlandırılması

Beş hafta uygulamanın son insülin enjeksiyonu ve FMT uygulamasından 1 gün sonra sıçanlara ötanazi uygulandı. Ötenaziden önce sıçanlar tartıldı, dışkıları toplandı ve kuyruktan i.v olarak kan glukoz seviyeleri ölçüldü. Tüm sıçanlara kas içi (intra muscular (i.m) enjeksiyon ile 50 mg/kg Ketamin hidroklorür (Alfamin) ve 5 mg/kg Ksilazin hidroklorid (Basilazin) olacak şekilde hayvan başına 0.05 ml basilazin (1 mg) ve 0.2 ml alfamin (10 mg) enjekte edildi. Cerrahi anestezi olarak adlandırılan dönemde, hayvanlarda kas gevşemesi ve bilinçsizlik görüldüğünde, deneylerde kullanılmak üzere EDTA'lı tüplere intrakardiyak kan alınarak ötanazi gerçekleştirildi. Ötanazi sonrası tüm gruplardaki hayvanların tüm sekal bölgelerinin bağırsak çeperleri bistüri ile kazınarak sekum içerikleri alındı (Şekil 3.1). Steril bir şekilde çıkarılan distal kolon doku örnekleri ise steril serum fizyolojik ile yıkandıktan sonra sıvı azot içerisinde donduruldu ve -80 °C dolapta saklandı.



Resim 3.1: Ötanazi sonrası hayvanlardan örneklerin alınması

3.8.4. Dışkı örneklerinden total (prokaryotik+ökaryotik) DNA izolasyonu

Sekum içeriğinden ve fekal örneklerinden mikroflora profilendirilmesinin yapılması aşamasında her bir grubun dışkı örnekleri karıştırılarak deney süresince o grubun bakteri profilinin değişimi belirlenebilmektedir. Deney sonrasında her bir grupta bulunan 6 hayvanın deneyin 3. haftasında toplanan fekal örnekleri steril güvenlik kabini içerisinde steril 50 ml'lik falkonlarda iyice karıştırıldı. Deney sonunda ötanazi yapılmadan önce her grubun 8. haftadaki toplanan fekal örnekleri de aynı şekilde karıştırıldı (Çizelge 3.1). 3. ve 8. haftalarda toplanan bu fekal örnekler hızlı bir şekilde sıvı azot içinde donduruldu ve analiz gününe kadar -80°C 'de saklandı.

Çizelge 3.1. Total DNA izolasyonu yapılan fekal örnekleri

Deney grupları	Deneyin 3. haftasında 6 rattan toplanan fekal örneklerin karışımı (n=6)	Deneyin 8. haftasında 6 rattan toplanan fekal örneklerin karışımı (n=6)
Sağlıklı donör grubu (n=6)	3. haftadaki sağlıklı donörlerin fekal örneği	8. haftadaki sağlıklı donörlerin fekal örneği
Sham (Kontrol) grubu (n=6)	3. haftadaki sham grubunun fekal örneği	8. haftadaki sham grubunun fekal örneği
Diyabet grubu (n=6)	3. haftadaki diyabet grubunun fekal örneği	8. haftadaki diyabet grubunun fekal örneği
İnsülin grubu (n=6)	3. haftadaki insülin grubunun fekal örneği	8. haftadaki insülin grubunun fekal örneği
FMT grubu (n=6)	3. haftadaki FMT grubunun fekal örneği	8. haftadaki FMT grubunun fekal örneği
İnsülin ve FMT grubu (n=6)	3. haftadaki insülin ve FMT grubunun fekal örneği	8. haftadaki insülin ve FMT grubunun fekal örneği

Ötanazi sonrasında ise her grupta bulunan 6 hayvanın sekum içerikleri 3'erli (3+3) olacak şekilde steril güvenlik kabini içerisinde steril 50 ml'lik falkonlarda iyice karıştırılıp A ve B olmak üzere iki gruba ayrıldı. Aşağıdaki tabloda belirtildiği gibi her bir 3'lü gruptaki hayvanın sekum içerikleri ayrı olacak şekilde farklı 50 ml'lik steril falkon tüplere alındı ve hemen sıvı azot içinde donduruldu ve analiz gününe kadar -80°C 'de saklandı.

Çizelge 3.2. Total DNA izolasyonu yapılan sekum içerikleri

Deney grupları	Sekum içerikleri (n=12)	
	3 ratın sekum içeriklerinin karışımı A grubu (n=6)	3 ratın sekum içeriklerinin karışımı B grubu (n=6)
Sağlıklı donör grubu (n=6)	Sağlıklı donör A grubu	Sağlıklı donör B grubu
Sham (Kontrol) grubu (n=6)	Sham A grubu	Sham B grubu
Diyabet grubu (n=6)	Diyabet A grubu	Diyabet B grubu
İnsülin grubu (n=6)	İnsülin A grubu	İnsülin B grubu
FMT grubu (n=6)	FMT A grubu	FMT B grubu
İnsülin ve FMT grubu (n=6)	İnsülin ve FMT A grubu	İnsülin ve FMT B grubu

Böylelikle donmuş dışkı örneklerinden kısa sürede yüksek kalitede DNA izolasyonuna imkan veren bir kit kullanılarak 3. ve 8. haftalardaki 12 fekal örnekten ve ötanazi sonrası çıkarılan 12 sekum (6A+6B) içeriğinden aşağıdaki kit protokolü takip edilerek DNA saflaştırıldı. Kontaminasyonu önlemek için işlemler güvenlik kabini içerisinde gerçekleştirildi. Kit talimatları sırasıyla örneklerin lizis edilmesi, kolona bağlanması, yıkanması ve elüsyon basamaklarını içermektedir.

Dışkıdan DNA izolasyon protokolü

1. 40 µl ST tamponu (Buffer ST), toplama tüpü içindeki DNA'nın bağlandığı filtre üzerine kondu ve lizat kolonlara transfer olana dek oda sıcaklığında bekletildi. Buffer ST, kolonun tam ortasına kondu. Islanan membran sayesinde DNA bağlanma oranı maksimuma ulaşmaktadır. Bu membran aktivasyonu, izolasyon prosedürüne başlamadan önce yapıldı.
2. 200 mg dışkı örneği, içinde boncuk (Bead) bulunan tüp üzerine kondu. Tüp içerisindeki boncuklar dışkı örneğinin dağılmasını ve hücrelerin lizis olmasını sağlamaktadır.

3. Dışkı örnekleri boncuklu tüp duvarından ayrılıp tamamen çözülene dek şiddetlice karıştırıldı.
4. Boncuklu tüp üzerine 60 µl Lizis ST tamponu eklendi. Lizis ST tamponunun bileşenleri, 20 °C'nin altında çökmektedir. O yüzden lizis çözeltisini kullanmadan önce 37 °C su banyosunda tutulup ardından berrak hale gelenek dek iyice karıştırılması gerekmektedir.
5. Örnekler, 1 dakika vorteks yapıldı.
6. Örnekler, 70 °C'de 5 dakika inkübe edildi.
7. Boncuklu tüpler, yatay biçimde tüp tutucu adaptör ya da ped içeren vorteks kullanılarak maksimum hızda 10 dakika vortekslendi.
8. Boncuklu tüpler, 2 dakika 14000 rpm'de santrifüj edildi ve 400 µl süpernatant 2 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı.
9. Mikrosantrifüj tüp üzerine 400 µl PR tamponu (+4 °C'de muhafaza edilir) eklendi ve 5 saniye vorteks yapıp buz üstüne alınarak 5 dakika tutuldu. PR tamponu, DNA ile ilişkili olmayan inhibitörler, hücre artığı, proteinler gibi organik ve inorganik materyalleri presipite etmektedir.
10. Örnekler, 2 dakika 14000 rpm'de santrifüj yapıldı.
11. 550 µl süpernatant yeni bir 2 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne alındı. 550 µl'den az miktarda süpernatant olması durumunda var olan sıvı alınıp kalan hacim sonraki basamaklarda eklenecek olan Sol ST tamponu ve %96'lık etanolün miktarı arttırılarak tamamlandı.
12. 650 µl Sol ST tamponu, 2 ml'lik ependorf tüpünün üzerine eklendi.
13. 2 ml'lik ependorf tüp üzerine bir de 400 µl % 96'lık etanol eklenerek pek çok kez alt üst edildi ya da iyice vortekslendi.
14. 2 ml'lik ependorf tüpün kapağındaki damlacıkları uzaklaştırmak için kısa süre santrifüj edildi.
15. 600 µl lizat, toplama tüpünden filtre üzerine transfer edildi.
16. Örnekler, 1 dakika 12000 rpm'de santrifüj edildi.
17. Toplama tüpünden filtre çıkarılıp altta kalan sıvı uzaklaştırıldı ve filtre yerine yeniden yerleştirilir.
18. 15, 16, ve 17. basamaklar 2 ml'lik ependorf tüp içerisindeki lizat bitene dek tekrarlandı.

19. Filtre, toplama tüpüne transfer edildi ve 1 dakika 12000 rpm’de santrifüj edilerek lizatın geri kalanının filtreden geçmesi sağlandı. Eğer lizatın tamamı geçmemişse 14000 rpm’de santrifüje devam edildi.
20. Filtre çıkarılıp altta kalan sıvı uzaklaştırıldı ve filtre yerine yeniden yerleştirildi.
21. Filtre üzerine 500 µl yıkama çözeltisi (Wash STX buffer) kondu ve 1 dakika 12000 rpm’de santrifüj edildi.
22. Filtre çıkarılıp altta kalan sıvı uzaklaştırıldı ve spin kolon yerine yeniden yerleştirildi.
23. Filtre üzerine 500 µl yıkama çözeltisi kondu ve 2 dakika 12000 rpm’de santrifüj edildi.
24. Filtre yeni bir 1,5-2 ml’lik toplama tüpüne alındı ve 100-200 µl seyreltme çözeltisi (Elution buffer, 10 mM Tris-HCl, pH 8,5) kondu. Seyreltme solüsyonu 70 °C’de ısıtılınca filtreye bağlı DNA kolondan ayrılmaktadır.
25. Toplama tüpü, 2 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
26. Toplama tüpü, 30 sn 12000 rpm’de santrifüj edildi.
27. Filtre çıkarıldı ve toplama tüpünün kapağı kapatıldı. Elde edilen DNA’ların miktarları ve saflığı “Nanodrop” cihazında ölçülerek PCR uygulamalarında kısa sürede kullanılacaksa 2-8 °C ya da uzun süre beklenilecekse -20 °C dolapta saklandı.

3.8.5. PCR-DGGE yöntemi ile fekal ve sekum mikroflora profillerinin belirlenmesi

Touchdown (İniş kademeli) Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Mikroflora analizi için pek çok bakteriye spesifik bölgeler içeren 16S rRNA üzerindeki V3 bölgesi, V3-GCF ve V3-R primerleri ve izole edilen fekal ve sekum DNA örneklerinin kullanılması ile amplifikasyonlar gerçekleştirildi. Aşağıdaki tabloda belirtilen 16S rRNA bölgelerine özgü evrensel primerler ile touchdown PCR reaksiyonları yapıldı.

Çizelge 3.3. Bakterilerin V3 16S rRNA bölgelerine özgün evrensel primerler ve sekansları

Primer adı	Sekansı
338F 16S rDNA V3-F	GAC TCC TAC GGG AGG CAG CAG
534R 16S rDNA V3-R	ATT ACC GCG GCT GCT GG
V3 F+GC Kuyruklu primer	CGC CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GAC TCC TAC GGG AGG CAG CAG

Touchdown PCR reaksiyonu sırasında kullanılan bileşenler ve miktarları tablo 3.4’de gösterildi.

Çizelge 3.4. Touchdown PCR bileşenleri ve miktarları

Bileşenler	Son Konsantrasyon	Hacim
Nükleaz içermeyen su	-	14,2 µl
Master Mix	5X	4 µl
V3 F+GC Kuyruklu primer (100 pmol/ µl)	10 pmol	0,4 µl
534R 16S rDNA V3-Revers (100 pmol/ µl)	10 pmol	0,4 µl
DNA	100 ng/ µl	1 µl

Otomatik ısı döngü cihazı programı

Otomatik ısı döngü cihazı, aşağıda belirtilen programa ayarlanarak touchdown PCR gerçekleştirildi.

Çizelge 3.5. Touchdown PCR tepkime programı

PCR aşamaları	Sıcaklık	Süre	Döngü sayısı
İlk Denatürasyon	95 °C	5 dk	1
Ayrılma/Denatürasyon Bağlanma/Hibridizasyon Uzama/Polimerizasyon	94 °C	5 dk	1
	65 °C	1 dk	
	72 °C	3 dk	
	94 °C	1 dk	9 (Her döngüde sıcaklık 1 °C azalmıştır; 64-55 °C)
	64 °C	1 dk	
	72 °C	3 dk	
	94 °C	1 dk	20
	55 °C	1 dk	
	72 °C	3 dk	
	94 °C	1 dk	1
	55 °C	1 dk	
	72 °C	3 dk	
	94 °C	1 dk	1
	55 °C	1 dk	
	72 °C	10 dk	
Soğutma	4 °C	∞	

Touchdown PCR ürünlerinin temizlenmesi ve %1'lik agaroz jelde yürütülmesi

10 µl PCR ürünü üzerine 4 µl PCR sonrası temizleme çözeltisi (Exzosap IT) pipetaj yapılarak eklendi. Ardından enzimin aktive olması için fekal ve sekum PCR örnekleri kuru ısıtıcı blokta 37 °C'de 15 dk ve inaktive olması için de 80 °C'de 15 dk inkübe edildi. Primer dimerleri ve artık nükleotidler uzaklaştırıldı.

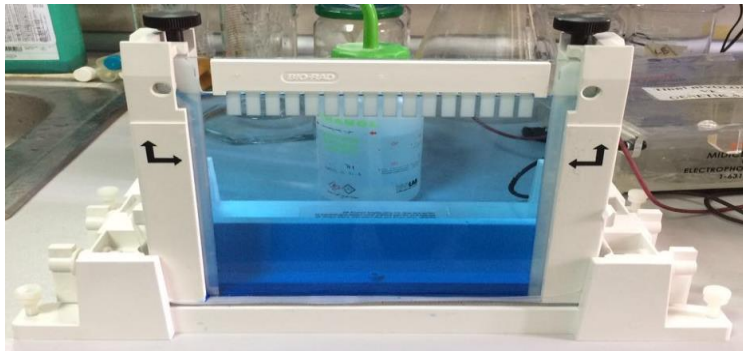
%1'lik polimerleşen agaroz jelden tarak çıkarılarak jel, 1X TBE dolu elektroforez tankına yerleştirildi. 5 µl fekal ve sekum PCR örnekleri ile 1-2 µl 6X yükleme boyası karıştırılıp

farklı jel kuyularına yüklendi. Bu örnekler 90 voltta yaklaşık 40 dakika yürütüldü ve kodak jel görüntüleme sisteminde görüntülendi.

Denatüre Edici Gradyent Jel Elektroforezi (DGGE) ve poliakrilamid jelin hazırlanması

DCode Universal Mutation Detection sistemi (Bio-Rad) kullanılarak fekal ve sekum örneklerinin DGGE analizi yapıldı.

20 µl TEMED ve 200 µl APS, 20'şer ml hazırlanan yüksek (%80) ve düşük (%20) konsantrasyonlu solüsyonların ikisine de jel dökülmeden hemen önce eklenip hafifçe karıştırıldı. Solüsyonlar, hızlıca iki farklı DCode sistemi enjektörleri içine çekilip hava kabarcığı kalmamasına dikkat edilerek “Y” şeklindeki ince hortum enjektör uçlarına tutturuldu. Y şeklindeki hortumun ucuna enjektör iğnesi takılarak jelin döküleceği camlar arasına bantla sabitlendi. Yavaş bir şekilde DCode sisteminin tekerleği çevrilerek jel 10 ml/dk hızla döküldü. Camlar arasındaki bölge dolduktan sonra kuyucukların oluşması için tarak yerleştirildi (Şekil 3.1). Jelin polimerleşmesi için yaklaşık 2 saat beklendi. Tarak çıkarıldıktan sonra jel, 1X TAE yürütme tamponu ile dolu olan 60 °C'ye ısıtılmış DCode sistemi içerisine yerleştirildi. Kuyucuklar, 5 ml'lik bir enjektör yardımı ile DCode sistemi içerisinde bulunan 1X TAE tamponu ile yıkanarak temizlendi.



Şekil 3.1. % 80-20'lik DGGE jel sistemi görünümü

1X TAE tamponu içerisinde 60 °C'de %20-80 konsantrasyonlar arasında üre-formamid içeren %8 poliakrilamid jelde 10 µl fekal ve sekum PCR örnekleri 3-4 µl 6X yükleme boyası ile karıştırılıp farklı DGGE jellerine yüklendi. Bu örnekler 50 voltta 10 dk ve ardından 130 voltta 6 saat 30 dk yürütüldü. Sonrasında bu DGGE jelleri, DCode

sisteminden çıkarılarak yaklaşık 300 ml steril distile su içerisinde 10 µl etidyum bromür ile 10dk süresince muamele edildi. Bu poliakrilamid jeller, kodak sisteminde görüntülenmeden önce etidyum bromür kalıntılarının uzaklaştırılması için yaklaşık 300 ml steril distile su içerisinde 10 dk süreyle yıkandı.

3.8.6. Distal kolon doku örneklerinden total RNA izolasyonu

Distal kolon doku örnekleri steril bistüri yardımıyla 100 mg büyüklüklerde parçalara ayrıldı ve aşağıdaki total RNA izolasyon protokolü kullanılarak RNA'ları saflaştırıldı. Kontaminasyonu ve RNA'ların degradasyonunu önlemek için saflaştırma işlemleri, güvenlik kabini içerisinde ve buz üzerinde olacak şekilde gerçekleştirildi.

Dokudan RNA izolasyon protokolü

1. -80 °C dolaptan çıkarılan distal kolon doku örnekleri steril 15 ml'lik falkon tüplere kondu ve her 100 mg örnek için 1 ml Trizol örnekler üzerine eklendi.
2. Örnekler, homojenizatörde 30 sn homojenize edildikten sonra çözeltinin çok ısınmasını engellemek için 15 sn buzda bekletildi ve tekrardan homojenizatörde 30 sn olacak şekilde toplamda 1 dakika homojenize edildi.
3. Homojen hale gelen örnekler steril 1,5 ml'lik ependorf tüplere aktarılıp +4 °C, 2.500 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi.
4. Süpernatant yeni bir steril 1,5 ml'lik ependorf tüpe alındı ve her 1 ml örnek için 200 µl kloroform (1:5) örnek üzerine eklendi.
5. Tüplerin kapak çevresinden tutularak 15 sn hafifçe vortekslendi ve örnekler, 2 dakika oda sıcaklığında bekletildi.
6. 15.000 rpm'de 20 dakika +4 °C'de örnekler santrifüj edildi.
7. Üstteki sıvı faz, ara faza dokunulmadan yeni bir steril 1,5 ml'lik ependorf tüpe aktarıldı. Bu steril tüplerdeki sıvı faz üzerine 500 µl izopropanol eklendi.
8. Tüpler 15 defa aşağı yukarı hafifçe çalkalandı ve -20 °C'de 30 dk bekletildi.
9. DNA kontaminasyonunu önlemek için 60 µl Dnaz (µg başına 5U Dnaz), 300 µl Dnaz buffer I (200 mM Tris-HCl (pH:8.4), 20 mM MgCl₂, 500 mM KCl) ve 400 µl DEPC'li su eklenerek 30 dk 37 °C'de bekletildi.
10. Örneklerin üzerine 300 µl 25 mM EDTA eklenerek 65 °C'de 10 dk bekletildi ve 15.000 rpm'de 20 dakika +4 °C'de santrifüj edildi.

11. Pelet pipetaj yapılmadan süpernatant uzaklaştırıldı. Görünür haldeki pelet üzerine taze hazırlanan 1 ml %75'lik etil alkol eklendi. Pipet ucu ile pelet hafifçe itilerek yerinden kalkması sağlandı. Örnekler, 8.000 rpm'de 8 dk +4 °C'de santrifüj edildi.
12. Üst kısımda bulunan süpernatant uzaklaştırıldı ve pelet çözülmeden üzerine 1 ml %100'lük saf etanol eklendi. Örnekler, 8.000 rpm'de 8 dk +4 °C'de santrifüj edildi.
13. Süpernatant uzaklaştırıldı ve pelet oda sıcaklığında yaklaşık 10 dakika kurutuldu.
14. Pelet üzerine 75 µl DEPC'li su eklendi ve tüpe hafifçe vurularak peletin çözünmesi sağlandı. Pelet, kısa sürede çözünmediğinde 55 °C kuru ısıtıcı blokta 3 dk bekletildi. Çözünen RNA örnekleri hızlıca buz üzerine alındı. 75 µl'lik RNA örnekleri, 25'şer µl olacak şekilde 3 farklı steril ependorf tüplerine alikotlandı ve -80 °C dolapta saklandı.

3.8.7. Gen ifadenmesinin real-time PCR ile belirlenmesi

Distal kolon doku örneklerinden izole edilen RNA'lar, Nanodrop cihazında ölçülerek son konsantrasyonları 100 ng/µl olacak şekilde steril DEPC'li su ile seyreltilti. Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz (GAPDH), ZO-1 ve Klaudin-1 genlerinin mRNA miktarları, Real-time PCR yöntemi ile Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR sistemi kullanılarak belirlendi. Amplifikasyonlar, 20 µl toplam tepkime hacmi içerisinde RNA, GoTaq^R qPCR Master Mix, mRNA'ya özgün primerler (Çizelge 3.6), GoScriptTM 1-Step qRT-PCR mix ve nükleaz içermeyen su kullanılarak gerçekleştirildi. ZO-1 ve Klaudin-1 genlerinin mRNA ifade miktarlarını normalize etmek için GAPDH mRNA düzeyi referans olarak alındı.

Çizelge 3.6. ZO-1, Klaudin-1 ve GAPDH genlerine ait primerler

Gen Adı	Accession no	Sekansı (Forward/Revers)	PCR ürün uzunluğu
Zonula Okludens 1 (Tight junction protein 1)	XM_218747	F:5'-GTATCCGATTGTTGTGTTCC-3' R:5'-TCACTTGTAGCACCATCCGC-3'	270 bp
Klaudin-1	NM_031699	F: AGGTCTGGCGACATTAGTGG R: TGGTGTTGGGTAAGAGGTTG	202 bp
GAPDH	NM_017008	F: AGTCTACTGGCGTCTTCAC R: TCATATTTCTCGTGGTTCAC	133 bp

3.8.8. GAPDH, ZO-1 ve Klaudin-1 genlerinin RT-PCR tepkime karışımları

GoTaq^R 1-Step qRT-PCR sisteminin kiti, tek-aşamalı bir kantitatif ters (revers) transkripsiyon PCR protokolünün kullanılması ile RNA miktarının belirlenmesi esasına dayanmaktadır. Tek-aşamalı qRT-PCR yönteminde kit içerisinde bulunan GoTaq^R Revers Transcriptase (RT) ve GoTaq^R qPCR Master Mix bileşenlerinin kombine olarak çalışması çok kapsamlı RNA miktarlarının belirlenmesinde daha duyarlı ve verimli olmaktadır.

100 ng/μl RNA'lar ile GoTaq^R 1-Step qRT-PCR sistemi kiti kullanılarak önce cDNA sentezi ardından da GAPDH, ZO-1 ve klaudin-1 genlerinin mRNA miktarları eş zamanlı olacak şekilde belirlendi. Real time PCR tepkimesinde yer alan bileşenler ve miktarları aşağıdaki tabloda gösterildi.

Çizelge 3.7. GAPDH, ZO-1 ve Klaudin-1 genlerine ait Real Time PCR tepkime bileşenleri

Bileşenler	Son Konsantrasyon	Hacim
Nükleaz içermeyen su	-	4,6 μl
GoTaq ^R qPCR Master Mix	1X	10 μl
Primer F (100 pmol/ μl)	10 pmol	0,5 μl
Primer R (100 pmol/ μl)	10 pmol	0,5 μl
GoTaq ^R RT Mix	1X	0,4 μl
RNA	100 ng/ μl	4 μl

3.8.9. Applied Biosystems 7500 Fast RT-PCR sistemi deney programı

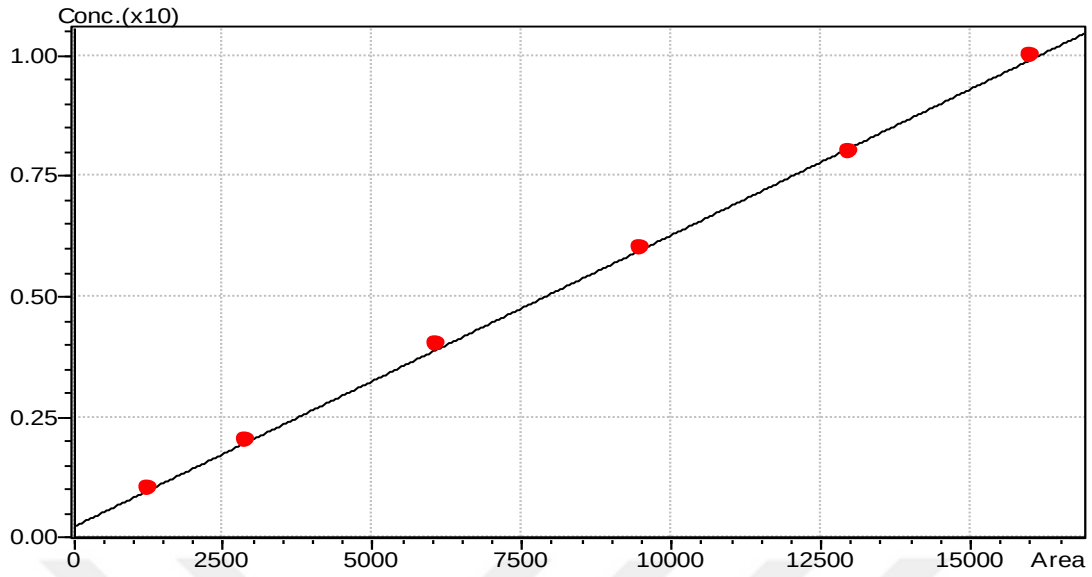
Real Time PCR reaksiyonu için gerekli bileşenler, 96 kuyudan oluşan plakanın her bir kuyusuna eşit şekilde dağıtıldı ve son olarak RNA'lar üzerlerine eklendi. Hava kabarcığı kalmamasına dikkat edilerek plate'in üzeri şeffaf kapatıcısı ile örtüldü. Real Time cihazına aşağıdaki belirtilen deney programı girildi ve amplifikasyon gerçekleştirildi.

Çizelge 3.8. GAPDH, ZO-1 ve klaudin-1 genlerinin mRNA düzeylerinin belirlenmesinde kullanılan qRT-PCR deney programı

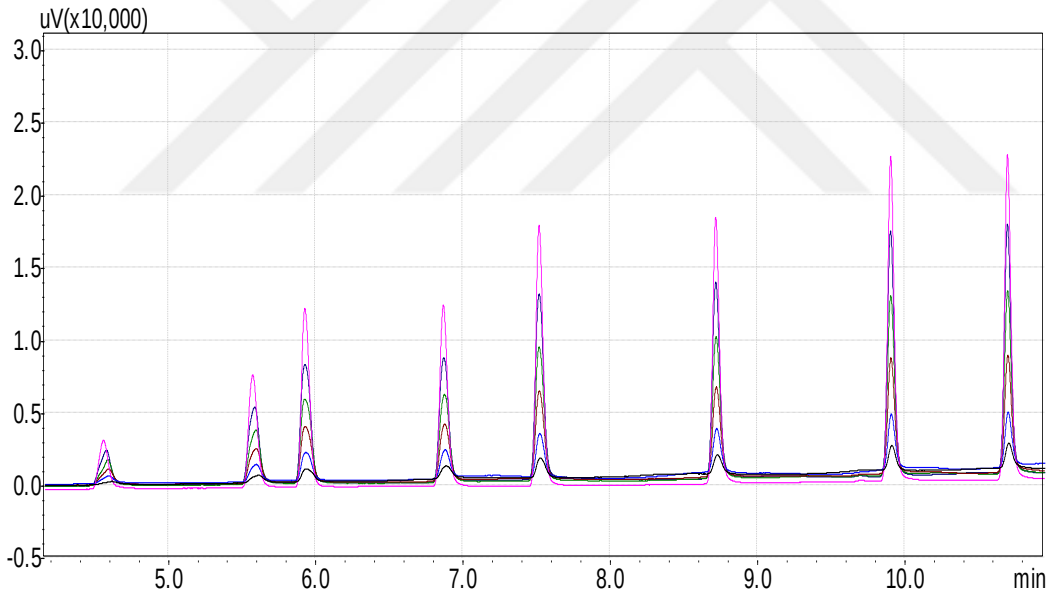
Aşamalar	Döngü Sayısı	Sıcaklık	Zaman
1. Ters transkripsiyon	1	37 °C	15 dk
2. Ters transkripsiyonun inaktivasyonu	1	95 °C	10 dk
3. qPCR	40	95 °C	10 sn
▪ Denatürasyon		60 °C	30 sn
▪ Primer bağlanması/Data toplanma aşaması		72 °C	30 sn
▪ Uzama			
4. Ayrılma-Melting curve (Dissociation)	40	95 °C	15 sn
		60 °C	1 dk
		95 °C	15 sn
		55 °C	30 sn

3.8.10. Gaz kromatografi cihazı ile uçucu yağ asitlerinin analizi

Deneyin 1. 3. ve 8. haftalarında tüm gruplardan toplanan fekal örnekler ve ötanazi sonrasında çıkarılan sekum içeriklerinden uçucu yağ asidi analizi yapıldı. Her bir haftada her gruptaki 6 hayvandan toplanan fekal örnekler ve deney sonunda alınan sekum içerikleri (3+3) şeklinde ikiye ayrılarak A ve B olarak etiketlendi ve karıştırıldı. Böylelikle her sekum örneğinin paraleli olacak şekilde deney tasarlandı. Bu fekal ve sekum örneklerinin asetik asit, propiyonik asit, izobütirik asit, bütirik asit, izovalerik asit ve valerik asit konsantrasyonları, gaz kromatografi (GC) cihazında (Shimadzu) Nukol™ marka (Supelco 24107, 30m x 0,25 mm x 0,25 µm) kolon kullanılarak belirlendi. Taşıyıcı gaz olarak helyum (He) kullanılan cihazda, kolon sıcaklığı analiz esnasında 120 °C'de 1 dk ve 185 °C'ye dakikada 5 °C artacak şekilde programlandı. Toplam analiz süresi 14 dk olarak ayarlandı. Ayrıca Flame Ionization Detector (FID) sıcaklığı ve enjektör bloğu sıcaklığı 220 °C olarak ayarlandı. Analizler öncesinde standart olarak Supelco Volatile Free Acid Mix, 46975-U (10 mmol/L) kullanılarak 1, 2, 4, 6, 8 ve 10 mmol/L konsantrasyonlarında altı farklı kalibrasyon eğrisi oluşturuldu (Şekil 3.2). Şekil 3.3'de gösterildiği gibi sırası ile asetik, propiyonik, izobütirik, bütirik, izovalerik ve valerik asit uçucu yağ asitlerinin kromatogram pikleri belirlendi.



Şelik 3.2. Uçucu yağ asidi kalibrasyon eğrisi (1, 2, 4, 6, 8 ve 10 mmol/L)



Şekil 3.3. Sırası ile asetik, propiyonik, izobütirik, bütirik, izovalerik ve valerik asit uçucu yağ asitlerinin kromatogramı

Fekal ve sekum örneklerinin GC cihazında analiz edilebilmesi için tüm dışkı örnekleri uygun bir şekilde hazırlandı. Hayvanlardan toplanan fekal örneklerinin ve sekum içeriklerinin $+4^{\circ}\text{C}$ dolapta çözünmesi sağlandı. Her bir örnekten 1 gr tartılıp 15 ml'lik steril falkonların içerisine kondu ve üzerine 4 ml bidistile su ilave edildi. Örnekler, uzun süre vorteks yapılarak çözdürüldü. Çözünme işlemi sonrasında falkon tüplerdeki örnekler

+4 °C’de 4.000 rpm’de 15 dk santrifüj edildi. 1 ml süpernatant, steril 1,5 ml’lik ependorf tüplere alındı ve üzerine 0,2 ml %25’lik metafosforik asit solüsyonu eklenip yavaşça vortekslendi. Sonrasında proteinlerin çökmesini sağlamak için örnekler 30 dk buz içerisinde bekletildi. Fekal ve sekum örnekleri son kez +4 °C’de 11.000 rpm’de 10 dk santrifüj edildi. GC cihazında uçucu yağ asitlerinin analizi yapılmak üzere süpernatant kısımlar sentilasyon viallerine aktarıldı. Total kısa zincirli yağ asidi (SCFA); asetik, propiyonik, bütirik, izobütirik, izovalerik ve valerik asit konsantrasyonlarının toplamını belirtmektedir. Dallı zincirli yağ asidi (BCFA) ise izobütirik, izovalerik ve valerik asit konsantrasyonlarının toplamını ifade etmektedir.

3.8.11. İnsülin düzeylerinin ELİZA yöntemi ile ölçülmesi

Ötanazi sırasında EDTA’lı tüplere alınan kan örnekleri, 20dk 2000-3000 rpm’de santrifüj edilerek plazma kısımları ayrıldı ve plazma örnekleri steril mikrosantrifüj tüplerine alındı. Plazma örnekleri, bekletilmeden -80 °C dolapta analiz edilinceye kadar saklandı. Plazma örneklerinden insülin miktarının ölçülmesinde aşağıda belirtilen SunRed eliza kit protokolü kullanıldı. Eliza analizi öncesinde plazma örneklerinin oda ısısında çözülmesi sağlandı.

SunRed ELİZA kit protokolü

1. Plazma örneklerinden insülin miktarının ölçülebilmesi için gerekli olan beş farklı standart (24 mIU/L, 12 mIU/L, 6 mIU/L, 3 mIU/L, 1,5 mIU/L) hazırlandı.
2. Mikroplate’in ilk kuyucuğu “blank” olarak seçilip boş bırakıldı. “Blank” kuyucuğuna sadece stop, kromojen A ve B solüsyonları konuldu.
3. Mikroplate’in diğer kuyucuklarına hazırlanan her bir standarttan 50 µl + 50 µl Streptavidin-HRP eklendi. Standartların devamındaki farklı kuyulara ise 40’ar µl plazma örnekleri + 10 µl insülin antikoru + 50 µl Streptavidin-HRP koyuldu. Plate hafifçe çalkalandı ve şeffaf kapaticısı ile kapatılarak 37 °C’de 60 dk boyunca inkübe edildi.
4. Mikroplate’in her bir kuyusu, 350 µl yıkama solüsyonu ile mikroplate yıkama cihazında 5 kez yıkandı.
5. Her bir kuyucuğa 50’şer µl kromojen solüsyonu A ve B konuldu.

6. Plate hafifce çalkalandı ve şeffaf kapaticısı ile kapatılarak 37 °C'de 10 dk boyunca inkübe edildi.
7. Her bir kuyucuğa 50 µl stop solüsyonu konuldu. Kuyucuklardaki mavi renkli solüsyonun sarı renge dönüşümü gözlemlendi.
8. Mikroplate ELİZA okuyucu cihazına konuldu. "Blank" kuyucuğu sıfır olarak kabul edilerek örneklerin 450 nm dalga boyunda optik dansite (OD) değerleri ölçüldü.

3.9. İstatistiksel analiz

Elde edilen bilgiler IBM SPSS (Statistical Package for Social Sciences) Statistics 20 istatistik programı ile tanımlayıcı istatistikler, Kruskal-Wallis testi, Tek Yönlü Varyans Analizi (Anova), çoklu karşılaştırma testlerinden Bonferroni ve Dunnett T3 testleri ve Tekrarlı Ölçümlerde Anova kullanılarak değerlendirildi. P değerlerinin 0,05'den küçük olan değerler istatistiksel açıdan anlamlı olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Diyabetik bulgular

Bu çalışmada, deneysel diyabetik sıçanlarda fekal mikrobiyota transfer tedavisinin bağırsak mikroflorasının profili üzerindeki etkileri incelenmiştir. İlave olarak FMT tedavisinin bağırsak geçirgenliğinde rolü bulunan ZO-1 ve klaudin-1 genlerinin ifadelenmelerine, bağırsak bariyerinde, epitelyal bütünlüğün korunmasında ve bağırsak epitel hücrelerinin enerji ihtiyacının karşılanmasında görevli olan bağırsak bakterileri tarafından sentezlenen kısa zincirli yağ asitlerinin düzeylerine ve plazma insülin seviyelerine olan etkileri araştırılmıştır. Tüm deneylerden elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

Çalışmada ağırlıkları 180-200 gr olan toplam 36 adet Wistar albino erkek rat kullanılmıştır. Hayvanlar her grupta 6 rat olacak şekilde ayrıldı. Haftada bir kez olmak üzere 8 hafta boyunca ratların ağırlıkları ve kan şekeri ölçüldü. Normal kan şekeri değeri 90-110 mg/dl olarak kabul edildi. Açlık kan şekeri değeri, 250 mg/dl'nin üzerindeki hayvanlar diyabet olarak kabul edildi ve çalışmaya dahil edildi. Deney bitiminde elde edilen ortalama ağırlık ve kan şekeri değerlerinin sonuçları aşağıda verilmiştir.

Çizelge 4.1. Tüm grupların ağırlık değerlerinin (Ort±Standart sapma) haftalara göre dağılımı

Gruplar Haftalar	Sağlıklı donör	Sham	Diyabet	FMT	İnsülin	İns+FMT	*P değeri
1. hafta	195,6±4,3	183,3±13,8	191,6±5,1	192,5±7	188,5±7,9	189,5± 4,6	0,165
2. hafta	210,1±4,7	188,1±20	179,5±6,9	174±7,61	177±8	187,5±7,6	0,001
3. hafta	221,8±4,4	198,8±23,5	179,1±10,5	166,6±13	172,5±10,9	175,3±7	0,001
4. hafta	232,8±5,3	207,8±23,8	191,3±5,7	180±10,2	191,3±15,6	195±8,6	0,001
5. hafta	241,1±7,5	215±30,5	202±8,7	180,6±14,5	197,5±22,2	201,6±11,6	0,001
6. hafta	249,1±9,3	219±34,9	202,6±12,5	188,1±15,9	208,5±24,3	216,5±19,4	0,001
7. hafta	257,3±7,3	223,6±37	208,1±11,6	189,1±18	213,5±29,2	230,3±23,9	0,001
8. hafta	261,5±8,5	223,3±37,8	215,1±12,2	201±16,5	215,5±33,5	245,6±12,7	0,001
#P değeri	0,001	0,118	0,001	0,002	0,005	0,001	

*P gruplar arası anlamlılığı; #P ise haftalar arası anlamlılığı ifade etmektedir.

Sham grubunun haftalarına ait ağırlık değerleri incelendiğinde %5 hata payı ile haftalar arasında ağırlık değişkeninin ortalamaları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yok iken ($p>0,05$); diğer gruplara ait haftaların ortalama ağırlık değerleri açısından %95 güvenle istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık vardır ($p<0,05$).

Birinci haftaya ait ağırlık değerleri incelendiğinde %5 hata payı ile gruplar arasında ağırlık değişkeninin ortalamaları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yok iken ($p>0,05$); diğer haftalara ait grupların ortalama ağırlık değerleri açısından %95 güven düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık vardır ($p<0,05$).

Deney sonunda ortalama ağırlık değerleri açısından sağlıklı donör grubuna göre diyabet ($p=0,024$), FMT ($p=0,001$) ve insülin ($p=0,026$) gruplarının ortalama ağırlık değerlerinin azalışı %95 güvenle istatistiksel olarak anlamlıdır ve FMT grubuna göre ise ins+FMT ($p=0,034$) grubundaki hayvanların ortalama ağırlık değerlerinin artışı %95 güvenle istatistiksel olarak anlamlıdır.

Çizelge 4.2. Tüm grupların kan şekeri değerlerinin (Ort±Standart sapma) haftalara göre dağılımı

Gruplar Haftalar	Sağlıklı donör	Sham	Diyabet	FMT	İnsülin	İns+FMT	*P değeri
1. hafta	95,3±4,5	96±11	99,1±5,9	101,3±5,4	103,3±3,6	103,6±5,7	0,139
2. hafta	99,6±3,6	91,1±8	291,6±40,4	291,5±98,1	396,1±50,2	272,5±97,7	0,001
3. hafta	100,6±4,5	75±7,5	351,6±103,4	395,3±108	436,1±94,8	354,5±65,7	0,001
4. hafta	100±5,1	87,1±6,4	288,3±22,8	381±94,8	201,8±179,7	123,8±106,6	0,001
5. hafta	95,5±8	79±13	275,1±35,4	295,3±124,9	300,5±137,9	323±28,7	0,001
6. hafta	105,8±12	80,8±13,9	297,3±96,9	297,5±121,1	306,1±132,4	267,1±37,5	0,001
7. hafta	99,8±7,7	86,1±10,3	246,5±85,7	291,1±72,3	303,1±99	204,5±104,2	0,001
8. hafta	91,8±5,8	97±16	281,1±75,9	289,8±32,5	240,1±140,8	230,5±87,6	0,001
#P değeri	0,049	0,013	0,001	0,001	0,001	0,001	

*P gruplar arası anlamlılığı; #P ise haftalar arası anlamlılığı ifade etmektedir.

Sağlıklı donör, sham, diyabet, FMT, insülin ve ins+FMT gruplarının haftalarına ait ortalama kan şekeri değerleri açısından %95 güven düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık vardır.

Birinci haftaya ait kan şekeri değerleri incelendiğinde %5 hata payı ile gruplar arasında kan şekeri değişkeninin ortalamaları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yok iken ($p>0,05$); diğer haftalara ait grupların ortalama kan şekeri değerleri açısından %95 güven düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık vardır ($p<0,05$).

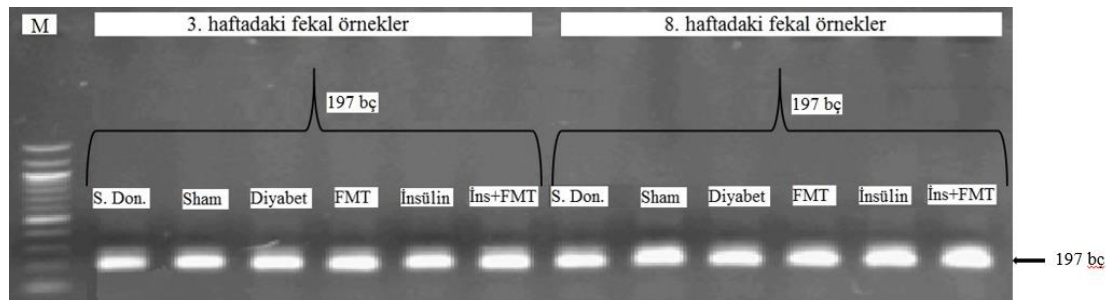
Deney sonunda diyabet grubunun ortalama kan şekeri değerlerine göre insülin grubunun ortalama kan şekeri değerleri arasındaki fark 41 birim ve ins+FMT grubunun ortalama kan şekeri değerleri arasındaki fark ise 50,6 birimdir ve bu farklar istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0,05$).

4.2. Fekal ve sekum içeriklerinin mikrobiyotik profili

DGGE jellerindeki bantların profili, belirli bir seviyede bir bantın varlığı pozitif kod “1” ve yokluğu ise negatif kod “0” şeklinde değerlendirilerek örnekler arasındaki benzerlik matrisleri oluşturuldu. Fekal ve sekum örneklerin DGGE jel profillerinin benzerlik skoru ve küme analizi, Dice eşitliğini temel alan benzerlik matrisi aritmetik ortalamayı kullanan ağırlıksız çift grup metodu=Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Averages (UPGMA) algoritması kullanılarak yapıldı ve örneklerin mikrobiyotik dendogramları (genetik ağaçlar) çizildi. Tüm analizler NTSYS 2.1 (Numerical Taxonomy ve Multivariate Analysis System) programı kullanılarak yapıldı.

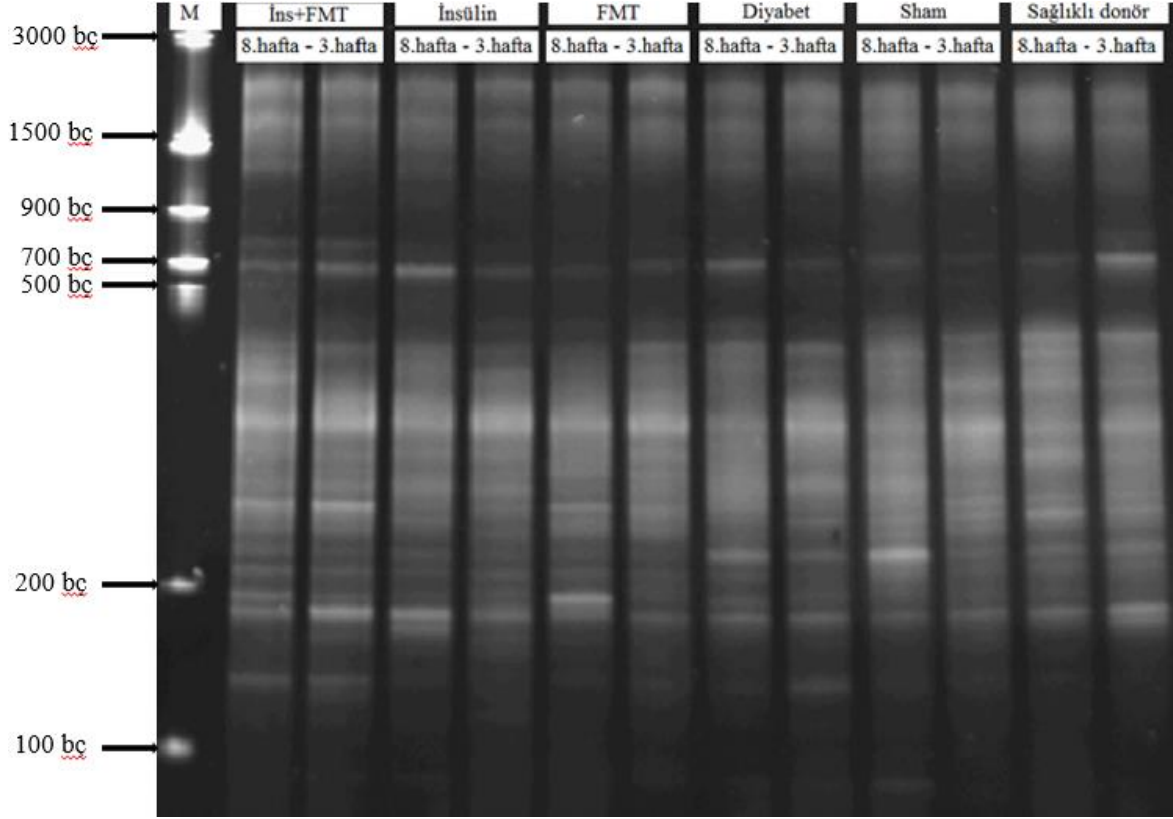
4.2.1. Fekal örneklerinin mikrobiyotik profili

DGGE jeline yükleme yapılmadan önce deneyin 3. ve 8. haftalarındaki fekal touchdown PCR örnekleri %1’lik agaroz jeli 100 bp’lik marker ile yüklenip Şekil 4.1’de görüldüğü gibi jel görüntüsü elde edilmiştir.



Şekil 4.1. Fekal örneklerin agaroz jel görüntüsü

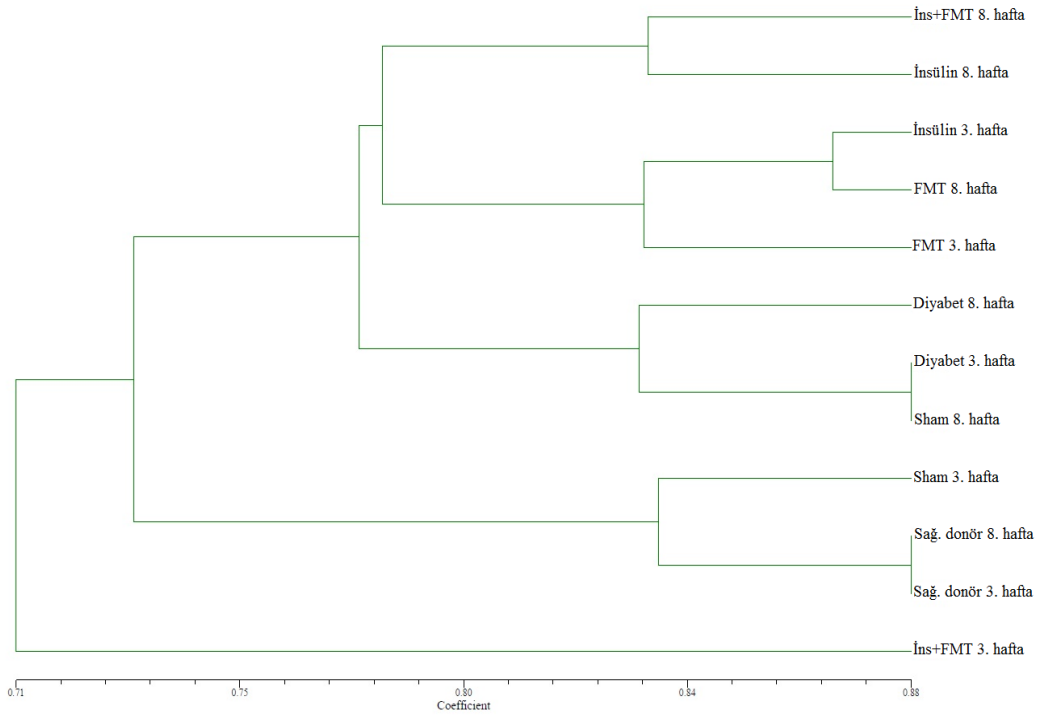
%20-80 konsantrasyonlar arasında üre-formamid içeren %8 poliakrilamid DGGE jelinde her grubun 3. ve 8. haftalarındaki 10 µl fekal touchdown PCR örnekleri, 50 voltta 10 dk ve ardından 130 voltta 6 saat 30 dk yürütülüp görüntülenmiştir (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Fekal örneklerdeki bakterilerin 16SrRNA (V3) bölgesine göre PCR-DGGE profili

3. ve 8. haftadaki fekal örneklerden oluşan 12 grubun mikrobiyotik profilinde toplam 36 bant görüldü (Şekil 4.2) ve bu bantların varlığı ve yokluğuna bakılarak dendrogram oluşturuldu.

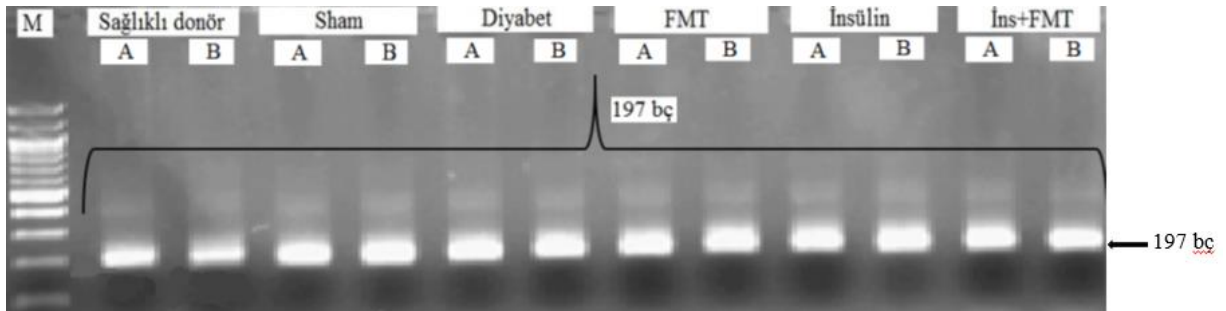
Dice eşitliği temel alınarak oluşturulan dendrograma göre fekal örneklerin mikrobiyotik profili, %71 benzerlik oranı ile iki ana grup altında toplanmıştır. İlk ana grup kendi içinde 2 alt gruba ayrılmıştır. 1. alt grupta ins+FMT 8. hafta, insülin 8. hafta, insülin 3. hafta, FMT 8. hafta, FMT 3. hafta, diyabet 8. hafta, diyabet 3. hafta ve sham 8. hafta; 2. alt grupta ise sham 3. hafta, sağlıklı donör 8. ve 3. hafta örnekleri yer almıştır. İkinci ana grupta sadece ins+FMT 3. hafta örneği kümelenmiştir. Sağlıklı donör 3. ve 8. haftalarıyla birlikte sham 8. ve diyabet 3. haftaları % 88 ile ve devamında %86,8 ile FMT 8. hafta ve insülin 3. hafta grupları en yüksek benzerlik göstermektedir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. Evrensel primerler (V3) ile DGGE profili oluşturulan fekal örneklerin UPGMA metodu ile gruplandırılması

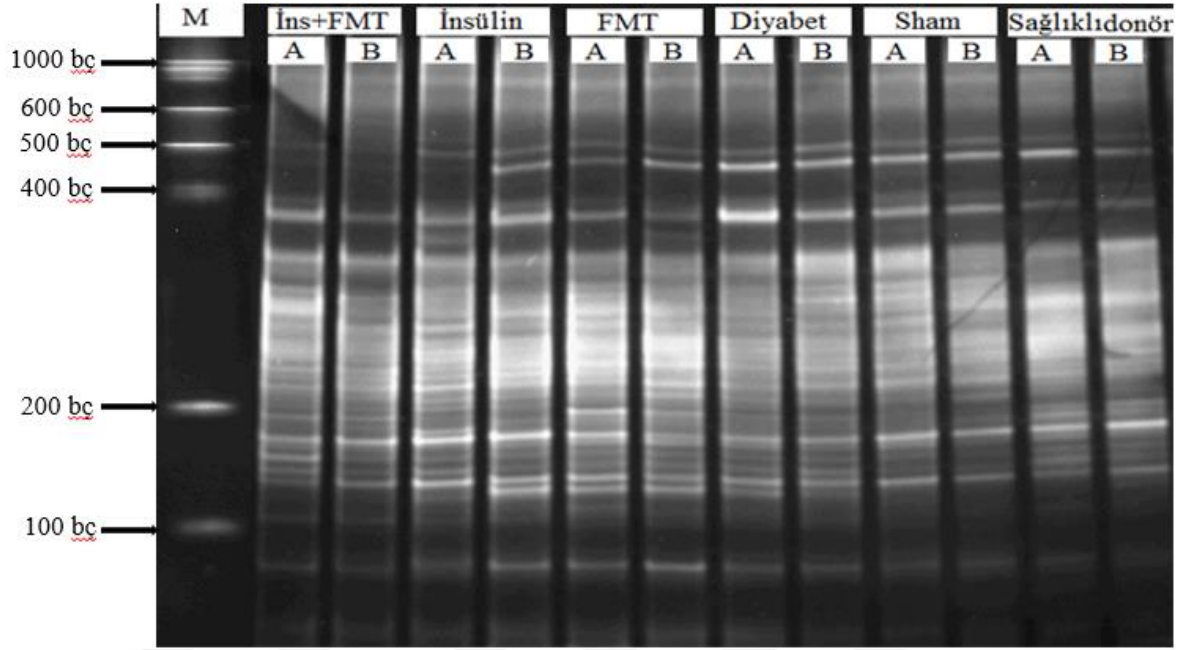
4.2.2. Sekum içeriğinin mikroflora profili

Her grubun A ve B olmak üzere sekum touchdown PCR örneklerinin ve 100 bç'lik markerın %1'lik agaroz jel görüntüsü şekil 4.4'de verilmiştir.



Şekil 4.4. Grupların sekum içeriklerinin agaroz jel görüntüsü

Fekal örneklerinde olduğu gibi yine %20-80 konsantrasyonlar arasında olan DGGE jelinde her grubun A ve B olmak üzere 10 µl sekum içeriklerinin touchdown PCR örnekleri, 50 voltta 10 dk ve ardından 130 voltta 6 saat 30 dk yürütülüp görüntülenmiştir (Şekil 4.5).

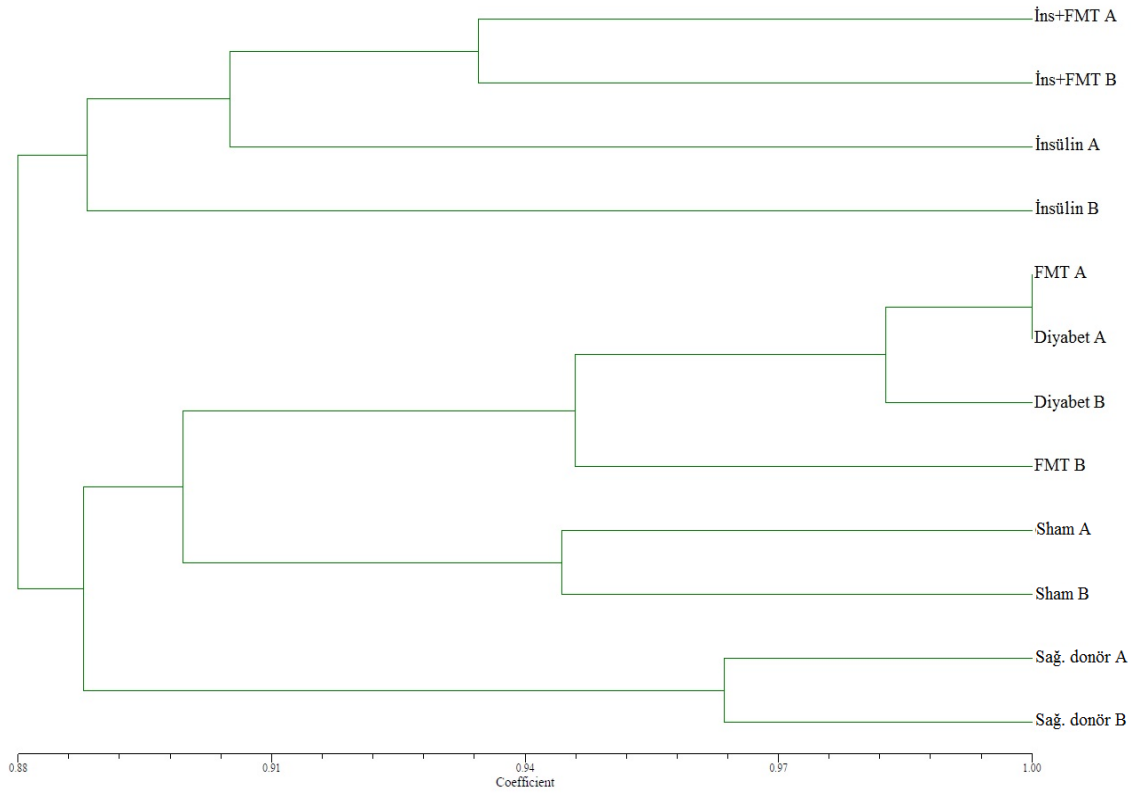


Şekil 4.5. Sekum içeriklerindeki bakterilerin 16SrRNA (V3) bölgesine göre PCR-DGGE profili

Birbirlerinin paraleli olacak şekilde A ve B sekum içeriklerinden oluşan 12 grubun mikroflora profilinde toplam 38 bant görüldü ve bu bantların profili kullanılarak UPGMA dendogramı çizildi.

Şekil 4.6'daki dendogram incelendiğinde sekum içeriklerinin mikroflora profili, %88 benzerlik oranı ile iki ana grup altında toplanmıştır. İlk ana grup kendi içinde 2 alt gruba ayrılmıştır. 1. alt grupta ins+FMT A, ins+FMT B ve insülin A; 2. alt grupta ise insülin B yer almıştır. İkinci ana grupta kendi içinde 2 alt gruba ayrılmıştır. Birinci alt grupta FMT A, diyabet A, diyabet B, FMT B, sham A ve Sham B; ikinci alt grupta sağlıklı donör A ve sağlıklı donör B örnekleri kümelenmiştir.

Kümelenme analizine göre birbirinin paraleli sekum içerikleri aynı dallarda, grup bazında değerlendirildiğinde ise farklı dallarda toplanmışlardır. En yüksek benzerlik %100 ile FMT A ve Diyabet A arasında ve bu gruplar ile diyabet B grubu arasında ise % 98,2 benzerlik görülmektedir. Sağlıklı donör A ve B örnekleri birbirleri arasında %96,4 ve ins+FMT örnekleri ise % 93,4 benzerlik gösterirken, bu iki grup birbirinden %12 düzeyinde farklılık ile ayrılmaktadırlar (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. Evrensel primerler (V3) ile DGGE profili oluşturulan sekum içeriklerinin UPGMA metodu ile gruplandırılması

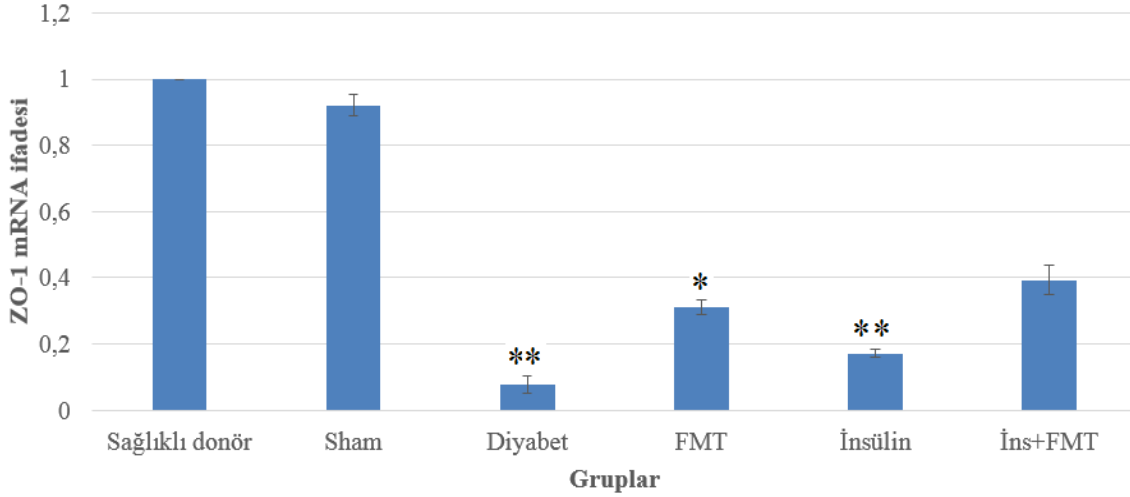
4.3. ZO-1 ve Klaudin-1 genlerinin mRNA ifadenme düzeylerinin kantitatif olarak değerlendirilmesi

Distal kolon doku örneklerinde ZO-1 ve Klaudin-1 genlerinin mRNA miktarları, Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR sistemi kullanılarak çalışıldı. ZO-1 ve klaudin-1 genlerinin mRNA ifade miktarlarını normalize etmek için GAPDH mRNA düzeyi referans olarak alındı. Real-Time PCR reaksiyonlarında RNA, GoTaq^R qPCR Master Mix, mRNA'ya özgün primerler ve GoScriptTM 1-Step qRT-PCR mix kullanılmıştır.

Reaksiyonlar sonrasında rölatif gen ifadenme sonuçları, Pfaffl denklemi kullanılarak hesaplanmıştır. Pfaffl denklemine göre ekspresyon oranı (R) aşağıda verilmiştir;

$$R = \frac{E(\text{hedef})^{\Delta C_t(\text{kontrol- hasta})}}{E(\text{referans})^{\Delta C_t(\text{kontrol- hasta})}}$$

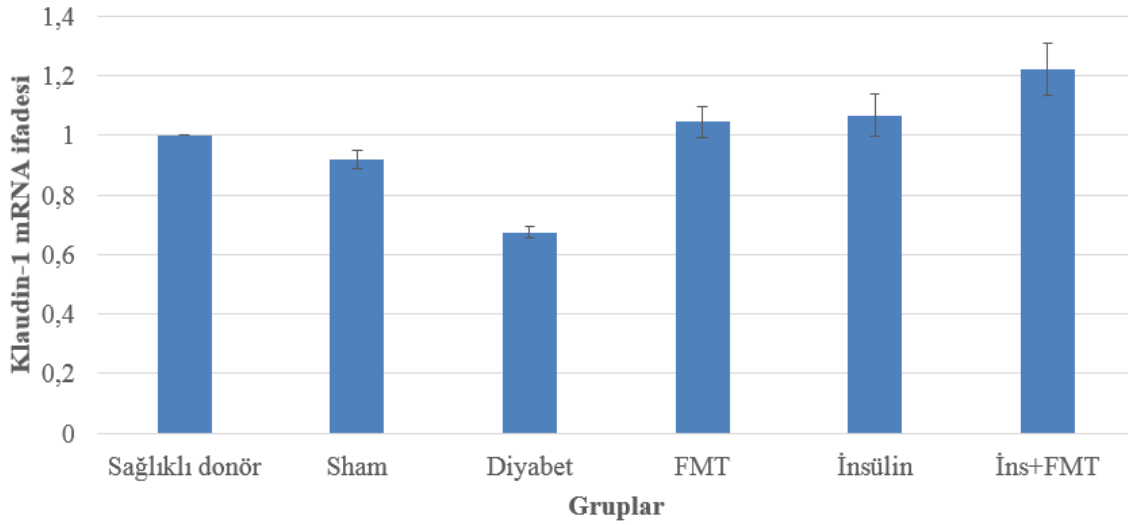
Formülde belirtilen Ct değeri, tepkime başında mevcut olan cDNA miktarı ile ters orantılıdır ve reaksiyon sırasında oluşan floresan sinyalin eşik değeri geçtiği andaki döngü sayısını gösterir. E, PCR etkinliğini, Δ Ct değeri ise kontrol ile hasta örneklerinin Ct değerleri arasındaki farkı ifade eder.



Şekil 4.7. Gruplar arası ZO-1 geninin mRNA ifadesindeki değişiklikler. GAPDH geni mRNA düzeyi referans alınarak normalizasyon sağlandı **; $p<0,001$ *; $p<0,05$

Yukarıdaki şekil 4.7 incelendiğinde, sağlıklı donör, sham, diyabet, FMT, İnsülin ve İns+FMT gruplarına ait ortalama ZO-1 mRNA ifadenme değerleri görülmektedir. Gruplar ikili karşılaştırıldığında, diyabet grubunun sağlıklı donör grubuna göre ZO-1 mRNA ifadenmesinin 14 kat azalışı istatistiksel olarak anlamlıdır ($p=0,001$). Aynı şekilde FMT grubunun sağlıklı donör grubuna göre ZO-1 mRNA ifadenmesinin 3 kat azalışı ($p=0,009$) ve insülin grubunun sağlıklı donör grubuna göre ZO-1 mRNA ifadenmesinin ise 5,8 kat azalışı ($p=0,001$) istatistiksel açıdan 0,05 hata payı ile anlamlıdır.

Diyabet grubuna göre FMT grubunda ZO-1 mRNA ifadenmesinin 4 kat, insülin grubunda 2 kat ve ins+FMT grubunda ise 5 kat artışı 0,05 hata payı ile istatistiksel açıdan anlamlı olmadığı görüldü ($p>0,05$).



Şekil 4.8. Gruplar arası Klaudin-1 geninin mRNA ifadesindeki değişiklikler. GAPDH geni mRNA düzeyi referans alınarak normalizasyon sağlandı

Şekil 4.8 incelendiğinde; sağlıklı donör, sham, diyabet, FMT, İnsülin ve İns+FMT gruplarına ait ortalama klaudin-1 mRNA ifadenme değerleri vardır. Gruplar ikili karşılaştırıldığında, sırasıyla İns+FMT grubunun klaudin-1 mRNA ifadenmesinin sağlıklı donör grubuna göre 0,81 kat artışı ($p=1,000$), diyabet grubunun klaudin-1 mRNA ifadenmesinin sağlıklı donör grubuna göre 1,5 kat azalışı ($p=0,115$), FMT grubunun diyabet grubuna göre ve insülin grubunun diyabet grubuna göre klaudin-1 mRNA ifadenmesinin 1,5 kat artışı ($p=1,000$), İns+FMT grubunun diyabet grubuna göre ise 1,8 kat artışı ($p=1,000$), 0,05 hata payı ile istatistiksel açıdan anlamlı olmadığı görüldü ($p>0,05$).

4.4. Sekum içeriği ve fekal örneklerin uçucu yağ asidi konsantrasyonları

4.4.1. Sekum içeriği uçucu yağ asidi bulguları

Çizelge 4.3. Sekum içeriği uçucu yağ asitlerinin konsantrasyonları (Ort±Standart sapma)

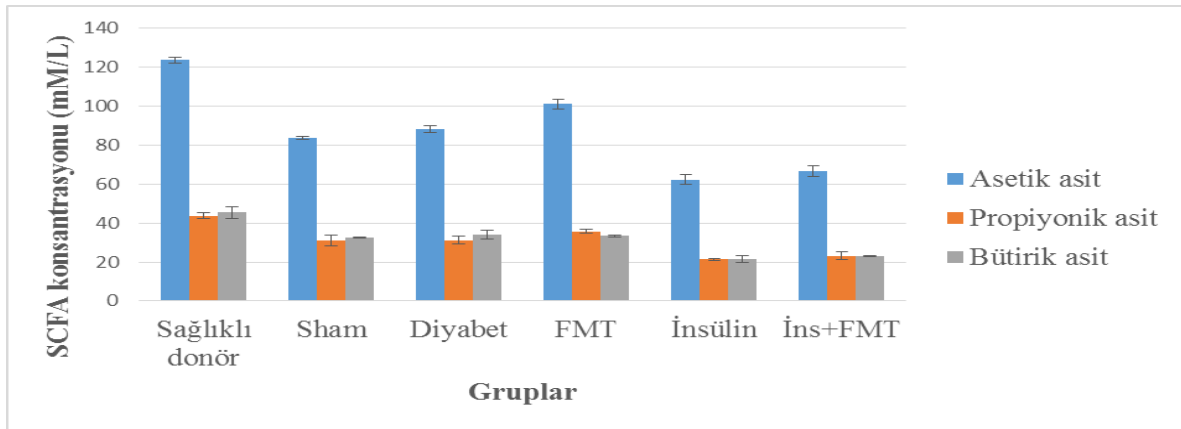
Gruplar Yağ asidi	Sağlıklı donör	Sham	Diyabet	FMT	İnsülin	İns+FMT	P değeri
Asetik asit	123,76±1,59	83,77±0,85	88,15±1,73	101,22±2,56	62,39±2,72	66,71±2,85	0,056
Propiyonik asit	43,75±1,55	31,17±2,75	31,24±2,00	35,80±1,01	21,36±0,62	23,14±2,03	0,065
İzobütirik asit	0,65±0,07	0,86±0,33	0,52±0,08	0,68±0,20	0,43±0,21	0,29±0,03	1,160
Bütirik asit	45,41±3,03	32,47±0,37	33,88±2,21	33,42±0,44	21,43±1,84	23,04±0,29	0,073
İzovalerik asit	1,28±0,02	1,54±0,26	1,35±0,09	1,56±0,20	1,05±0,03	0,94±0,05	0,088
Valerik asit	1,73±0,23	1,27±0,04	1,17±0,42	1,67±0,07	0,71±0,07	0,41±0,20	0,071
BCFA	3,66±0,33	3,67±0,63	3,04±0,59	3,91±0,48	2,19±0,31	1,64±0,28	0,097
Total SCFA	216,59±6,51	151,11±4,61	156,34±6,53	174,37±4,51	107,40±5,48	114,55±5,45	0,061

BCFA, dallı zincirli yağ asitleri (izobütirik, izovalerik ve valerik asit); Total SCFA, total kısa zincirli yağ asitleri (asetik, propiyonik, bütirik, izobütirik, izovalerik ve valerik asit).

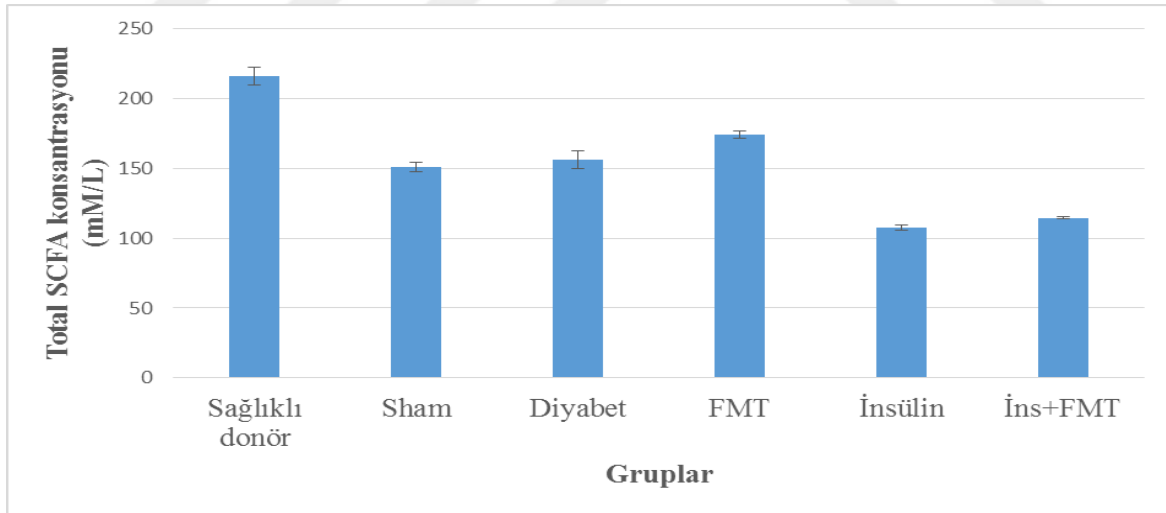
Yukardaki sekum içeriği uçucu yağ asidi konsantrasyonları verilen tablo incelendiğinde asetik, propiyonik, izobütirik, bütirik, izobütirik, valerik, BCFA ve total SCFA değişkenlerine ait grupların ortalama kısa zincirli yağ asidi değerleri açısından %95 güven düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yoktur ($p>0,05$). Sağlıklı donör grubuna göre diğer gruplardaki tüm kısa zincirli yağ asitlerinin düzeyleri azalmış olmasına rağmen bu farklılık %5 hata payı ile istatistiksel olarak bir anlam ifade etmemektedir. Sağlıklı donör grubundan sonra ortalama BCFA ve total SCFA kısa zincirli yağ asidi değerleri en yüksek olan grup FMT tedavisi yapılan gruptur. FMT grubuna göre BCFA ve total SCFA değişkenlerine ait ortalama kısa zincirli yağ asidi düzeyleri sham, diyabet, insülin ve ins+FMT gruplarında azalmıştır ve bu farklılık istatistiksel açıdan anlamlı değildir ($p>0,05$).

Şekil 4.9’da sekum içeriğinin ortalama asetik, propiyonik ve bütirik asit kısa zincirli yağ asitlerinin değerleri verilmiştir. Sağlıklı donör ve FMT gruplarına göre diğer grupların ortalama asetik, propiyonik ve bütirik asit düzeyleri azalmış olmasına rağmen gruplar

arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yoktur (Şekil 4.9). Benzer bir şekilde Şekil 4.10'da da sekum içeriği ortalama total SCFA değerleri verilmiştir. Sağlıklı donör ve FMT gruplarına göre diğer gruplarda sekum içeriği total SCFA düzeylerinin azalışı, özellikle insülin grubunda diğer gruplara nazaran daha fazla azalmış olmasına rağmen gruplar arasında %5 hata payı ile istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmemiştir ($p>0,05$) (Şekil 4.10).



Şekil 4.9. Sekum içeriği SCFA kompozisyonu



Şekil 4.10. Sekum içeriği total SCFA kompozisyonu

4.4.2. Fekal örneklerin uçucu yağ asidi bulguları

Çizelge 4.4. Fekal örneklerin farklı haftalardaki uçucu yağ asitlerinin konsantrasyonları (Ort±Standart sapma)

Hafta	Yağ asidi	Gruplar						P değeri
		Sağlıklı donör	Sham	Diyabet	FMT	İnsülin	İns+FMT	
1. Hafta	Asetik asit	55,75±0,56	49,73±0,23	47,61±0,97	54,47±2,33	56,33±0,81	54,88±3,91	0,156
	Propiyonik asit	17,10±1,74	15,40±2,18	14,52±1,51	17,44±0,28	18,16±0,69	18,88±0,89	0,136
	İzobütirik asit	0,82±0,14	0,57±0,28	0,41±0,06	0,45±0,07	0,40±0,06	0,40±0,05	0,380
	Bütirik asit	7,28±1,26	7,43±0,73	8,66±0,03	8,09±2,22	6,95±0,68	6,79±0,05	0,517
	İzovalerik asit	1,53±0,19	1,23±0,24	0,93±0,06	1,12±0,16	1,08±0,09	0,95±0,01	0,104
	Valerik asit	0,46±0,30	0,38±0,50	0,03±0,04	0,20±0,28	0,10±0,14	0,04±0,05	0,529
	BCFA	2,81±0,65	2,18±1,03	1,37±0,17	1,77±0,51	1,58±0,30	1,39±0,12	0,354
	Total SCFA	82,94±4,23	74,74±4,18	72,16±2,69	81,77±5,36	83,02±2,49	81,94±4,98	0,161
3. Hafta	Asetik asit	56,58±1,35	60,35±0,06	46,85±2,41	46,52±2,66	50,59±0,88	55,86±4,63	0,069
	Propiyonik asit	21,37±1,62	21,99±2,23	16,68±2,34	13,95±3,14	14,56±1,83	18,47±0,55	0,103
	İzobütirik asit	0,57±0,09	0,49±0,07	0,45±0,01	0,34±0,03	0,59±0,1	0,47±0,01	0,140
	Bütirik asit	9,91±0,61	6,01±0,99	9,48±0,93	6,98±2,62	6,57±0,66	5,88±2,37	0,226
	İzovalerik asit	1,27±0,11	1,25±0,06	1,28±0,04	1,55±0,24	1,31±0,03	1,34±0,06	0,397
	Valerik asit	0,55±0,08	0,26±0,15	0,41±0,11	0,41±0,07	0,27±0,12	0,28±0,17	0,388
	BCFA	2,39±0,29	2,01±0,29	2,14±0,18	2,31±0,35	2,18±0,28	2,10±0,26	0,507
	Total SCFA	90,27±3,89	90,38±3,59	75,16±5,87	69,77±8,79	73,92±3,66	82,33±7,82	0,089
8. Hafta	Asetik asit	40,10±0,02	40,19±3,31	67,93±2,80	37,17±4,24	53,52±1,04	49,69±1,63	0,087
	Propiyonik asit	13,42±0,03	16,05±2,38	20,61±0,17	13,13±3,20	16,12±0,004	16,07±3,01	0,161
	İzobütirik asit	0,16±0,0007	0,36±0,02	0,38±0,01	0,19±0,01	0,77±0,19	0,28±0,07	0,061
	Bütirik asit	3,97±0,38	7,69±0,77	13,26±0,98	4,82±0,13	11,55±2,28	5,55±1,38	0,069
	İzovalerik asit	0,94±0,01	1,00±0,03	1,14±0,06	0,88±0,05	1,37±0,25	0,97±0,01	0,061
	Valerik asit	0±0	0,21±0,04	0,15±0,08	0±0	0,41±0,2	0±0	0,060
	BCFA	1,11±0,01	1,57±0,10	1,68±0,16	1,08±0,07	2,55±0,66	1,25±0,09	0,068
	Total SCFA	58,61±0,47	65,51±6,58	103,49±4,12	56,21±7,65	83,75±3,99	72,58±6,12	0,082

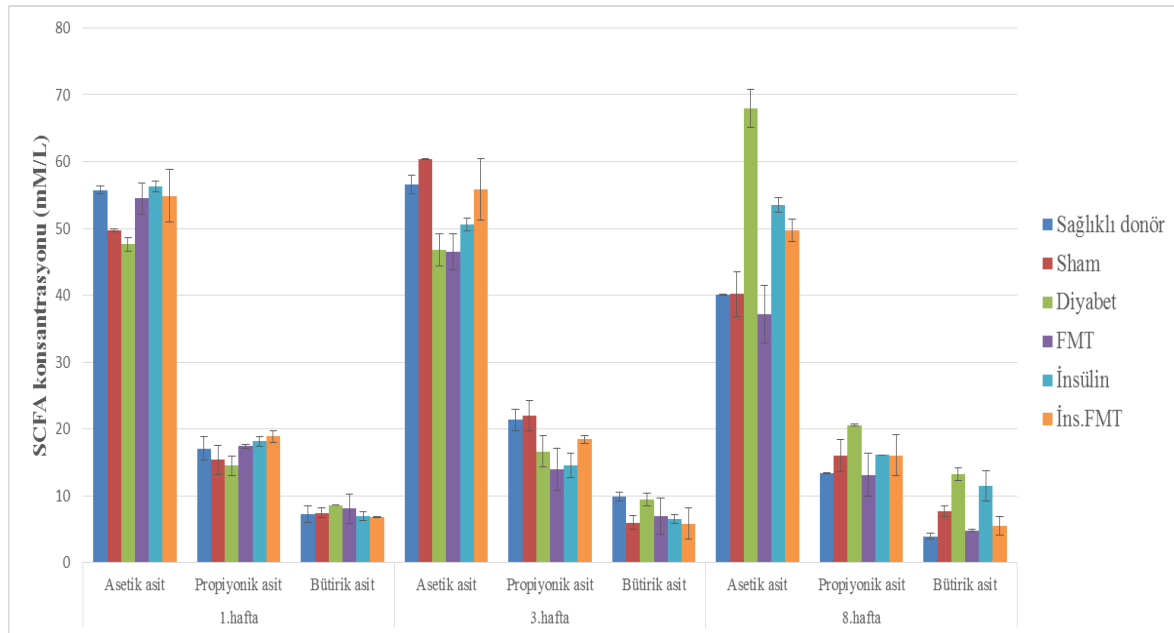
BCFA, dallı zincirli yağ asitleri (izobütirik, izovalerik ve valerik asit); Total SCFA, total kısa zincirli yağ asitleri (asetik, propiyonik, bütirik, izobütirik, izovalerik ve valerik asit).

Yukarıdaki tablo incelendiğinde fekal örneklerin 1. 3. ve 8. haftadaki tüm değişkenlere ait ortalama kısa zincirli yağ asidi düzeyleri açısından %5 hata payı ile gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yoktur ($p>0,05$).

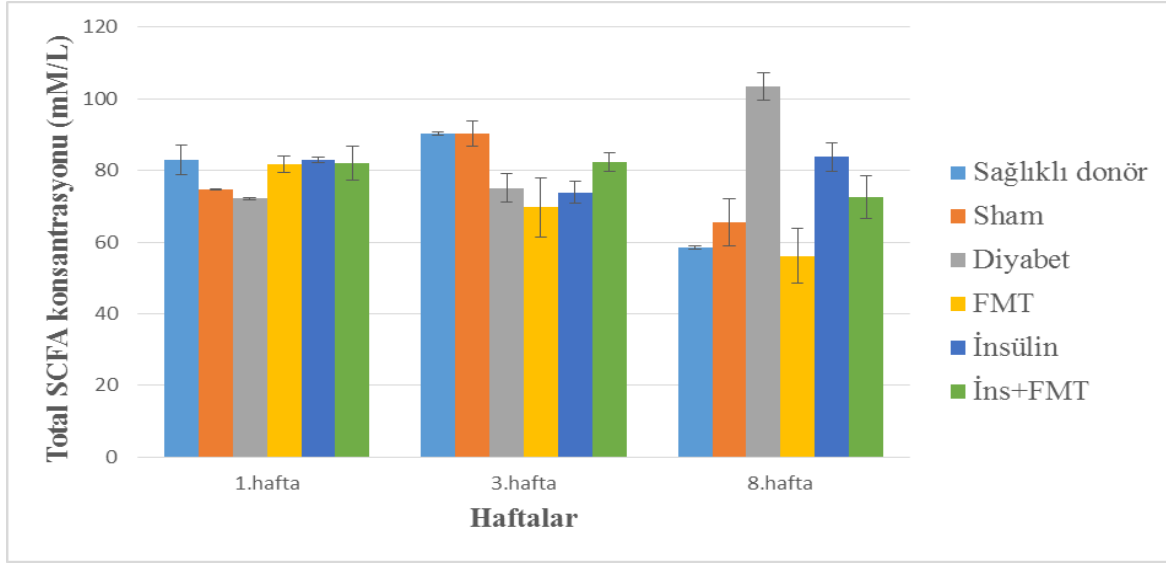
3. haftadaki fekal örneklerin ortalama total SCFA düzeyleri sağlıklı donör ve sham grubuna göre diyabet, FMT, insülin ve ins+FMT gruplarında azalmış olmasına rağmen gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmemiştir ($p>0,05$) (Çizelge 4.4, Şekil 4.12).

8. haftadaki fekal örneklerin ortalama total SCFA düzeyleri diyabet grubunda diğer gruplara nazaran artmış olmasına rağmen gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık görülmedi ($p>0,05$) (Çizelge 4.4, Şekil 4.12). İlave olarak diyabet grubunda ortalama asetik, propiyonik ve bütirik asit değerleri açısından diğer gruplara ve haftalara nazaran bir artış gözlenmesine rağmen istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yoktur ($p>0,05$) (Çizelge 4.4, Şekil 4.11).

Deney sonunda FMT grubunun fekal örneklerinin ortalama total SCFA düzeyleri diğer haftalara nazaran azalmış olmasına rağmen haftalar arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık yoktur ($p>0,05$) (Çizelge 4.4, Şekil 4.12). Bu sonuca benzer şekilde sekizinci haftada sağlıklı donör grubuna ait ortalama total SCFA değerleri diğer haftalara nazaran azalmış olmasına rağmen haftalar arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık gözlenmedi ($p>0,05$) (Çizelge 4.4, Şekil 4.12). Bu sonuçlardan farklı olarak insülin grubuna ait ortalama total SCFA değerleri diğer haftalara nazaran artmış olmasına rağmen haftalar arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık yoktur ($p>0,05$) (Çizelge 4.4, Şekil 4.12). İnsülin grubunun fekal örneklerinin sekizinci haftaya ait ortalama bütirik asit değerleri diğer haftalara nazaran artmış olmasına rağmen istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık yoktur ($p>0,05$) (Çizelge 4.4, Şekil 4.11).



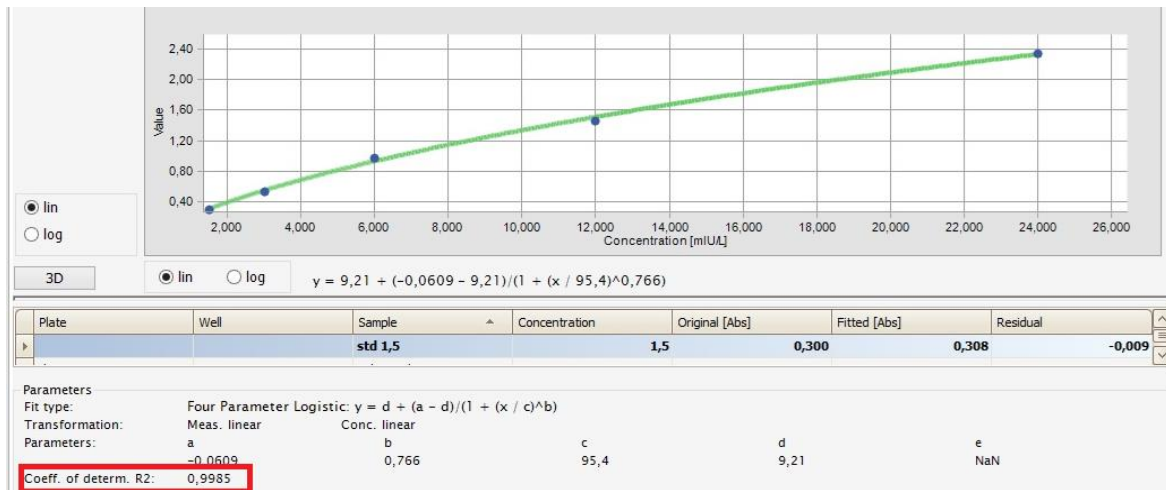
Şekil 4.11. 1. 3. ve 8. haftalardaki fekal örneklerin SCFA kompozisyonu



Şekil 4.12. 1. 3. ve 8. haftalardaki fekal örneklerin total SCFA kompozisyonu

4.5. Plazma insülin

Plazma insülin düzeylerinin ölçümünde kullanılan 24 mIU/L, 12 mIU/L, 6 mIU/L, 3 mIU/L ve 1,5 mIU/L olan beş farklı standardın grafiği Şekil 4.11’de verilmiştir. Coeff. (R²), değerinin 1’e yakın olması standartların doğruluğunu göstermektedir.

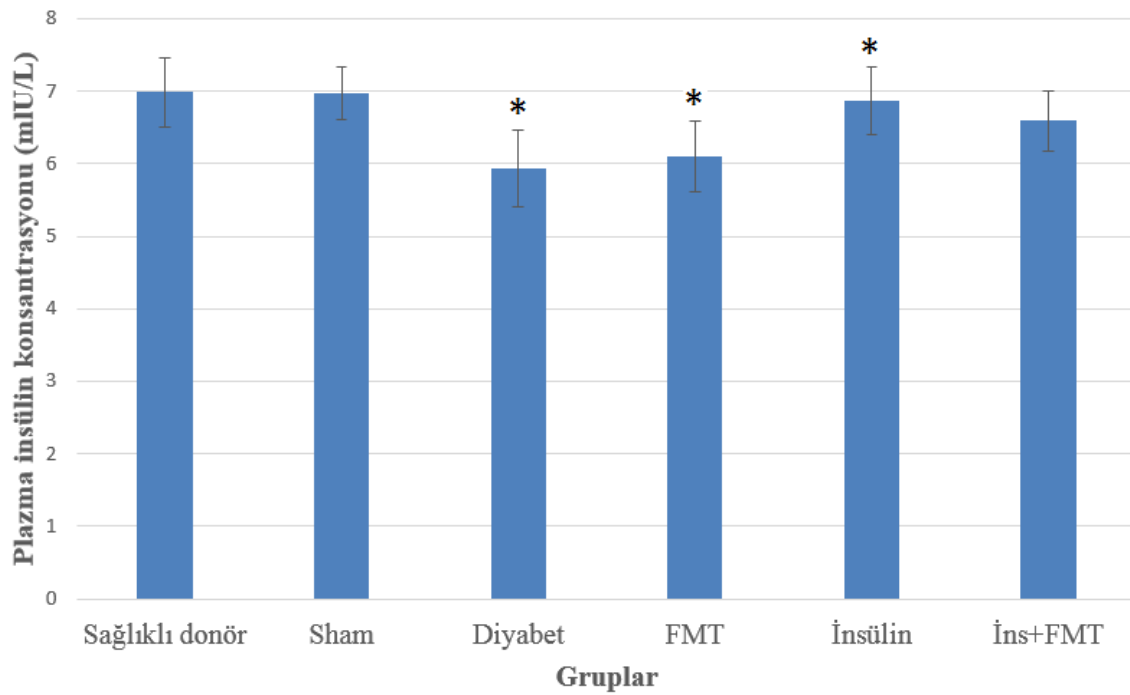


Şekil 4.11. Plazma insülin düzeyinin standart grafiği

Plazma insülin düzeyleri değerlendirildiğinde ikili karşılaştırmalarda sağlıklı donör grubuna göre diyabet (p=0,006) ve FMT (p=0,032) gruplarında plazma insülin seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalış görüldü. Yine sham grubuna göre

diyabet ($p=0,008$) ve FMT ($p=0,040$) gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bir azalış görüldü. Diyabet grubuna göre insülin grubunda ($p=0,021$) plazma insülin düzeylerinin yüksek oluşu istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olduğunu göstermektedir (Şekil 4.12).

İns+FMT ($p=0,295$) ve FMT ($p=1,000$) gruplarında diyabet grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olmasada plazma insülin seviyesinde artış gözlemlendi. İnsülin grubunun plazma insülin düzeyleri FMT grubundan yüksek olmasına rağmen aralarındaki fark istatistiksel açıdan anlamlı değildir ($p=0,104$).



Şekil 4.12. Deney gruplarının plazma insülin düzeylerinin değişikliği *; $p<0,05$



5. TARTIŞMA

Fekal mikrobiyota transfer tedavisi, hastalıkla ilişkili patolojik belirtilerin neden olduğu bağırsak disbiyozisini düzenlemek amacıyla sağlıklı donörden alınan fekal içeriğin hastaya transfer edilmesi, faydalı dominant bakterilerin görece sayılarının artırılması ve böylece alıcının bağırsak mikroflora kompozisyonunun yeniden düzenlenmesini sağlayan yeni bir tedavi yöntemi olarak kabul edilmektedir [3].

Fekal mikrobiyota transferi, özellikle antibiyotik tedavisine rağmen tekrarlayan *C. difficile* enfeksiyonunun tedavisinde kullanılan yöntemler arasında güvenilirliği, etkinliğinin yüksek ve görece ucuz bir tedavi olması ile göze çarpmaktadır. Tedavi; bağırsak mikroflorasının dengelenmesini, toksijenik *C. difficile* suşlarının çoğalmasını baskılayarak konağın savunma sisteminin güçlendirilmesini ve neticede normal bağırsak fonksiyonlarının idame ettirilmesini sağlamaktadır [101]. Bu yöntem *C. difficile* enfeksiyonu, irritable bağırsak sendromu, diyabet ve obezite dışında otizm ve multipl skleroz benzeri nörolojik hastalıklarda da güncel ve alternatif tedavi olarak kullanılmaktadır. FMT tedavisi yapılan multipl skleroz hastalarında yürüme işlevlerinin düzelmesi ve motor aktivitelerinde gözle görülür bir artışın olması tedavinin etkinliğini göstermektedir. Başka bir çalışmada kronik yorgunluğu bulunan kişilerde de yorgunluk şikayetlerinin azalmasını ve uyku düzensizliklerinin iyileşmesini sağlamıştır. Fekal mikrobiyota transferi yapılan metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* enterokolit enfeksiyonlu hastalarda hastalıkla ilişkili semptomların iyileştiği ve fekal örneklerinde bulunan ilgili bakterinin tamamen temizlendiği görülmüştür. Sonuç olarak enfeksiyon sonrası oluşan bağırsak disbiyozisi FMT ile yeniden restore edilebilmektedir [4,102,103].

Bağırsak mikroflorası, metabolik fonksiyonların ve otoimmün mekanizmaların düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır ve tümör, otoimmün hastalıklar, insülin direnci ve obezite gibi pek çok hastalıkla ilişkilidir. Germ-free NOD ve BBDP farelerde yapılan çalışmalarda insülitis gelişme oranının daha yüksek ve beta hücre fonksiyonlarının ise daha kötü olduğu, aksine antibiyotik ve probiyotik uygulamaları sonrasında ise diyabet gelişiminin geciktirilebildiği rapor edilmiştir [104].

T1D hayvan modellerinde en çok kullanılan NOD farelerdir. Fakat klinik göstergelere bakıldığında tam olarak insan T1D'yi karşılamamaktadır. Örnek verilirse, NOD farelerin

β -hücre adacıkları insan β -hücre adacıkları ile histopatolojik olarak kıyaslandığında NOD farelerde daha güçlü insülitis görülebilmektedir ve bu histopatolojik sonuçlar iki farklı hastalık gibi gözükmemektedir. Bu nedenle bazı başarılı tedavilerin NOD farelere uygulanması ile olumlu sonuçlar alınamamaktadır [105]. Konvansiyonel ve germ-free fareler mukayese edildiğinde ise bağırsak mikrobiyotasının barındırılmasına bağlı olarak besin alımı ve immün sistemin gelişmesi bakımından konvansiyonel farelerin evrimsel olarak iki avantajı bulunmaktadır. İlk olarak, diyetel ürünlerden elde edilen SCFA'lardır. Bu kısa zincirli yağ asitleri, dolaşım sistemi aracılığı ile karaciğere gelir ve burada hepatik glukoneogenez ve *de novo* lipojenezde substrat olarak kullanılırlar. Böylelikle konvansiyonel farelerin vücut ağırlıkları artmaktadır. Diğer taraftan germ-free farelerde fermentasyonda görevli mikrobiyota olmadığı için SCFA üretilmez ve konvansiyonel farelere nazaran zayıf hayvanlardır. Germ-free farelerde var olan bu dezavantaj obez bireylerin aşırı besin tüketmesine karşılık azalmış fiziksel aktivitelerine benzetilmektedir. İkinci olarak, bağırsak mikrobiyotası hem bağırsaktan enerji elde edilmesini hızlandırır hem de adi poz dokuda kalori depolanmasını sağlamaktadır. Örnek olarak, bağırsak mikrobiyotası lipoprotein lipaz'ın düzenlenmesinde rol alarak enerji kullanımını ve depolanmasını sağlar. Germ-free farelerde bu lipoprotein lipaz inaktif olduğundan enerji eldesini ve depolanmasını gerçekleştiremez [106]. Konvansiyonel hayvanlarda STZ ile uyarılan deneysel diyabet modeli pek çok yönden insan T1D ile uyumaktadır ve tüm bu veriler, bağırsak mikrobiyota çalışmamızın konvansiyonel olan Wistar sıçanlarda da yapılabileceğini göstermektedir [19,20].

Tip 1 diyabet, insülin sentezleyen beta hücrelerin T hücre-aracılı yıkılması ile ortaya çıkan bir otoimmün düzensizliktir. Son yıllarda yapılan çalışmalar, otoimmün diyabetin gelişiminde intestinal mikrobiyotanın inflamasyonu tetikleyici etkisinin olabileceğini göstermektedir. Pankreasın bağırsak endoderminden gelişmesi ve pankreas adacıklarının inflamasyonu ile gelişen insülitiste bağırsağın etkili bir faktör olabilmesi, bağırsak mikrobiyotası ile T1D gelişimi arasındaki ilişkinin temelini oluşturmaktadır [15]. Bağırsak mikrobiyotası ve otoimmün diyabetin gelişimi arasındaki bir diğer bağlantı, bağırsağın ve inflamasyonlu pankreasın aynı lenfosit-reseptör kümelerini paylaşmalarıdır [62,66]. T1D'de genellikle gastrointestinal hareketlerin çok çeşitli anormallikleri görülebilmektedir. İnsan ve hayvan çalışmalarında bu anormalliklerin devamında seçici nitrojenik miyenterik nöropatinin geliştiği bilinmektedir. Bir immün-aracılı hastalık olan diyabet-iliskili enterik nöropatide miyenterik ganglia'ya bitişik olan miyenterik nöronlar ve

kılcal damarlar, diyabetin direkt hedefidirler ve bu nöronların hasarının derecesi ve oranı, özel nöronların veya kapillerin bulunduğu intestinal segment ile sıkı bir şekilde bağlantılıdır. İlave olarak bu nöronların insülin replasmanına vermiş oldukları cevaplar da intestinal-segment bağımlıdır. Bu gözlemler ışığında diyabet-ilişkili patolojik mikroçevrenin intestinal segment-spesifik bir yol ile önemli derecede bağlantılı olan nöronların zarar görmesine ve aynı zamanda uygun glisemik kontrol durumlarına bağlı olduğunu göstermektedir [19]. STZ-uyarımlı diyabetik sıçanların ileumunda miyenterik nöronların önemli derecede azalması ile birlikte mezenterik kapillerin yapısal olarak ciddi hasarlanması belirgin bir şekilde görülmektedir [103, 107]. Bu durum, kitle halinde *Klebsiella* invazyonu ile karakterizedir. *Klebsiella*, insanlarda şiddetli bağırsak inflamasyonuna neden olan gram negatif bakterilerin en önemlilerindendir. Mukozal inflamasyonun görülmesini takiben epitelyal geçirgenlik artmaktadır ve otoimmün T1D'nin gelişiminde ve diyabet ile ilişkili enterik nöropatide etkili olan intestinal immünolojik sistem tetiklenebilmektedir [57,61,108]. Diyabetik ve kontrol gruplarına nazaran insülin tedavisi, ileumun lümen içeriğinde mikrobiyal komünitenin güçlü bir şekilde yeniden düzenlenmesine neden olmaktadır ve Proteobakterilerden *Klebsiella*'nın azalmasını sağlamaktadır. Mikroflora kompozisyonunda görülen bu değişimler, glisemik kontrol ile korelasyon gösterebilir ve kapiller duvarların yapısal olarak hasarının ve nöronal hücrelerin azalmasının önüne geçen enterik mikroçevrenin restorasyonunu sağlayabilir [19]. Bu çalışmalar ile uyumluluk gösteren çalışmamızda deney sonunda diyabet grubunun ortalama kan şekeri değerlerine göre insülin ile tedavi edilen grubunun ortalama kan şekeri değerleri arasındaki fark 41 birim ve ins+FMT grubunun ortalama kan şekeri değerleri arasındaki fark ise 50,6 birimdir (Bkz. Çizelge 4.2). Bu farklar istatistiksel olarak anlamlı olmamasına rağmen kan şekeri değerlerinin kontrol altına alınması ile birlikte insülin grubunun fekal ve sekum mikroflora profilinin diğer gruplara nazaran dendogramda farklı gruplarda kümелendiği görülmüştür (Bkz. Şekil 4.3, Bkz. Şekil 4.6). Özellikle üçüncü haftada toplanan ins+FMT grubuna ait fekal mikroflora profilinin diğer gruplardan %71 benzerlik ile ayrılarak tek bir ana dalda kümелendiği gözlemlendi (Bkz. Şekil 4.3). Benzer şekilde insülin ve ins+FMT tedavileri yapılan grupların sekum mikroflora profillerinin de diğer gruplardan ayrılarak dendogramda farklı dallarda kümелendiği saptandı (Bkz. Şekil 4.6). Çalışmamız ile benzer sonuçların ortaya çıktığı farklı bir çalışmada diyabet tedavisinde insülin haricinde kullanılan metformin ve berberin gibi ilaçların da diyabetik farelerin bağırsak mikroflorasının çeşitliliğini, özellikle kısa zincirli yağ asidi sentezleyen ve musin-parçalayan bazı bakterilerin sayısını arttırdığı bilinmektedir

[89]. Obez farelerin metformin ve berberinin ile kombine tedavisinin yapıldığı farklı bir çalışmada ise bağırsak bakteri çeşitliliğinin azaldığı ancak bazı SCFA sentezleyen bakterilerin görece sayılarının arttığı gözlenmiştir [90].

Fekal mikrobiyota transferinin metabolizmayı düzenlediği yönünde çalışmalar son dönemde ağırlık kazanmaktadır. Konvansiyonel farelerden germ-free farelere FMT yapılması ile germ-free farelerin vücut yağ oranlarında %60'a kadar varan bir artış olmasının yanında insülin dirençlerinin de artmasında etkili olmuştur. Benzer olarak zayıf ve obez donörlerin kullanılması ile germ-free farelere uygulanan fekal mikrobiyota transferleri karşılaştırıldığında obez farelerden yapılan transferin germ-free farelerin vücut yağını daha fazla artırdığı görülmüştür [109]. Obez farelerin donör olarak kullanıldığı başka bir çalışmada germ-free fareler yerine antibiyotik ile bağırsak disbiyozisi oluşturulan yetişkin erkek ve dişi farelere FMT inokülasyonunun yapılması ile cinsiyet gözetmeksizin tüm farelerin vücut ağırlıklarının zayıf donör farelerden yapılan FMT inokülasyonuna nazaran arttığı belirtilmiştir [110]. Çalışma verilerimiz değerlendirildiğinde ise ortalama ağırlık değerleri açısından sağlıklı donör grubuna göre diyabet ($p=0,024$), FMT ($p=0,001$) ve insülin ($p=0,026$) gruplarının ortalama ağırlık değerlerinin azalışı %95 güvenle istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür (Bkz. Çizelge 4.1). Böylece sadece FMT ve insülin tedavilerinin diyabetik hayvanların ağırlıklarının artmasında bir etkilerinin olmadığı saptanmıştır. Diğer çalışmalardan farklı olarak çalışmamızda sağlıklı donör ve normal kilodaki sıçanlardan alınan fekal mikrobiyota transfer içeriği kullanılmıştır. Uygulamalar neticesinde FMT grubuna göre ins+FMT ($p=0,034$) grubundaki hayvanların ortalama ağırlık değerlerinin artışı %95 güvenle istatistiksel olarak anlamlı olduğu ve insüline-FMT kombine tedavisinin sıçanların kilo alımında etkili olduğu göze çarpmaktadır (Bkz. Çizelge 4.1). Klinik çalışmalardan örnek verilecek olursa *C. difficile* enfeksiyonu olan kadın bir hastaya fekal mikrobiyota transferi yapıldıktan sonra hastanın VKİ'nin 26'dan 34,5'e çıktığı ve dolayısı ile hastanın obez olduğu ortaya çıkmıştır. Donör araştırıldığında kişinin obez olması ve yanlışlıkla obez bireyden FMT yapıldığı fark edilmiştir [6]. Unutmamak gerekir ki bağırsak mikroflora kompozisyonu bozulmuş *C. difficile* enfeksiyonlu kadın hastaya aynı zamanda antibiyotik tedavisi uygulanmıştır. Antibiyotik ile birlikte uygulanan FMT kombine tedavisinin sonuçlarının, bizim çalışmamızdaki insülin-FMT kombine tedavisinin sonuçlarına klinik olarak iki farklı hastalık olsa dahi vücut ağırlığını artırması bakımından benzerliği dikkat çekmektedir. Bu değerlendirmeler ışığında, FMT tedavisinin ve bu tedavinin uygulanmasında tamamen

sağlıklı donörlerin seçilmesinin metabolik ve gastrointestinal hastalıkların tedavisinde oldukça önemli olduğu aşikardır.

Bağırsak mikroflorası ve konak arasındaki karşılıklı olarak birbirlerine yarar sağlayan evrimsel birliktelikler, bakteriler tarafından fermente diyetlerden kısa zincirli yağ asitlerinin sentezlenmesinde ve doğal bağışıklık sisteminin gelişmesinde etkilerinin olduğu kaçınılmaz bir olgudur [21]. İnsan bağırsak mikroflorasında ortalama olarak 10^{14} mikroorganizma bulunmaktadır ve bakteri türlerinin yaklaşık %90'ının *Bacteroides* ve *Firmicutes* gruplarından oluştuğu bilinmektedir. Birçok çalışmada bu bakteri grupları ile diyabet gibi gastrointestinal sistem ile ilgili olmayan hastalıkların ilişkili olduğu görülmektedir (Bkz. Çizelge 2.3) [22]. Bağırsak mikroflorasının kompozisyonundaki değişiklikler ile T1D arasında bağlantı olduğu yapılan pek çok çalışma ile gösterilmiştir (Bkz. Çizelge 2.4) [81]. STZ ile diyabet oluşturulan wildtype farelerde bağırsak mikroflorasının değiştiği, antibiyotik tedavisi uygulanan wildtype fareler ile kıyaslandığında intestinal sistemden pankreatik lenf nodüllerine kommensal bakterilerin transfer olduğu ve böylelikle hastalığın gelişimde bağırsak mikroflorasının önemli olduğu gözlenmiştir [105]. Bu çalışmalar haricinde hayvan ve insanlarda yapılan diğer çalışmalarda da T1D gelişimi ile bağırsak mikroflora kompozisyonu arasındaki ilişkinin olduğu fakat çalışmalar karşılaştırıldığında ise çelişkili sonuçlar görülebilmektedir [67,80,82,84,91]. Özellikle farklı hayvan modelleri ile yapılan çalışmalar az sayıdadır. Sprague-Dawley sıçanlarda STZ-uyarımli oluşturulan T1D modelinde bağırsak mikroflora kompozisyonu incelendiğinde, deneyin sıfırıncı haftasında gruplar arasındaki bağırsak mikroflorası kompozisyonu benzerlik gösterirken STZ sonrası ve beşinci hafta sonunda bağırsak mikroflora kompozisyonu önemli oranda değişiklik göstermiştir. Kontrol grubundaki hayvanlara nazaran T1D'li hayvanların beş hafta süresince bağırsak bakteri çeşitliliğinin azaldığı ve bu grupların kümeleme analizine göre ise yine çeşitlilikte görülen farklılığa benzer olacak şekilde dendogramda T1D ve kontrol gruplarının farklı dallarda kümeleniği görülmüştür [20]. Wistar albino sıçanlarda deneysel diyabet modeli oluşturulan çalışmamızda ise üçüncü ve sekizinci haftalarda toplanan fekal örneklerin bakteri profili incelendiğinde her grubun farklı haftalardaki bakteri profillerinin dendogramda aynı dalda kümeleniği görüldü. Çarpıcı bir şekilde sadece ins+FMT grubunun üçüncü ve sekizinci haftalarına ait bakteri profili, dendogramda %71 benzerlik ile farklı dalda kümeleniği belirlendi. Sağlıklı donör grubuna ait fekal mikroflora profilinin üçüncü ve sekizinci haftaları arasında %88 benzerlik olduğu ve sekiz hafta

geçmesine rağmen mikrobiyotika profilinde önemli düzeyde bir farklılığın olmadığı saptanmıştır. Aynı şekilde diyabet grubuna ait üçüncü ve sekizinci haftaların bakteri profillerinin % 83,2 benzerlik gösterdiği ve dendrogramda aynı dalda kümelendiği ortaya çıkmıştır (Bkz. Şekil 4.3). Dice eşitliği temel alınarak oluşturulan dendrograma göre fekal örneklerin mikrobiyotika profili, %71 benzerlik oranı ile iki ana grup altında toplanmıştır. İlk ana grup kendi içinde 2 alt gruba ayrılmıştır. 1. alt grupta ins+FMT 8. hafta, insülin 8. hafta, insülin 3. hafta, FMT 8. hafta, FMT 3. hafta, diyabet 8. hafta, diyabet 3. hafta ve sham 8. hafta; 2. alt grupta ise sham 3. hafta, sağlıklı donör 8. ve 3. hafta örnekleri yer almıştır. İkinci ana grupta sadece ins+FMT 3. hafta örneği kümelenebilir. Sağlıklı donör 3. ve 8. haftalarıyla birlikte sham 8. ve diyabet 3. haftaları % 88 ile ve devamında %86,8 ile FMT 8. hafta ve insülin 3. hafta grupları en yüksek benzerlik göstermektedir (Bkz. Şekil 4.3).

Sindirilemeyen diyetel karbonhidratların fermentasyonu sonucunda üretilen kısa zincirli yağ asitleri, intestinal mikrobiyotika ile beslenme veya diyet arasındaki ilişkinin temelini oluşturmaktadır. Asetat insanlarda bulunan dominant SCFA'dır. Propiyonat gibi SCFA'lar *de novo* glukoz veya lipid sentezi için kullanılabilirler ve konağın enerji ihtiyacını karşılamaktadırlar. Germ-free farelerde bu SCFA'ların bulunmaması bağırsak mikrobiyotasının önemini öne çıkarmaktadır. Genellikle oral anti-diyabetik olarak kullanılan α -glukozidaz inhibitörleri gibi ilaçlar, plazma SCFA konsantrasyonunu etkileme kapasitesine sahiptirler ve potansiyel SCFA üretiminin önemini vurgulamaktadırlar. Yüksek yağlı diyetle beslenen obez farelere bütirat verilmesi ile insülin direnci eski haline döndürülebilmektedir. Bütirat üreten bakteriler ve fekal bütirat konsantrasyonları, karbonhidrat oranı az olan bir diyetle beslenildiğinde azalma eğilimi göstermektedirler [109]. Zayıf bireylerden metabolik sendromu olan bireylere FMT yapılması ile bağırsak mikrobiyotika çeşitliliğinde anlamlı olarak bir artış görülmüştür. İlave olarak hastaların fekal örneklerinde ortalama asetat, bütirat ve propiyonat kısa zincirli yağ asitlerinin konsantrasyonları anlamlı bir şekilde azalmıştır [111]. Wistar sıçanlarda deneysel diyabet modeli oluşturulan çalışmamızda ise diğer çalışmalar ile uyumlu sonuçların görüldüğü ve 3. haftadaki fekal örneklerin ortalama total SCFA düzeyleri, sağlıklı donör ve sham gruplarına göre diyabet, FMT, insülin ve ins+FMT gruplarında azalmış olmasına rağmen gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmemiştir ($p>0,05$) (Bkz. Çizelge 4.4, Bkz. Şekil 4.12). Hafta bazında değerlendirme yapıldığında ise deney sonunda FMT ve sağlıklı donör gruplarının fekal örneklerinin ortalama total SCFA düzeyleri diğer

haftalara nazaran azalmış olmasına rağmen haftalar arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık yoktur ($p>0,05$) (Bkz. Çizelge 4.4, Bkz. Bkz. Şekil 4.12). FMT tedavisi uygulanan grup ile sağlıklı donör grubunun deney sonunda ortalama total SCFA değerlerinin diğer haftalara nazaran azalmış olması dikkat çekmektedir. Çalışmamızın sekizinci haftasındaki fekal örneklerin ortalama total SCFA düzeyleri, diyabet grubunda diğer gruplara nazaran artmış olmasına rağmen gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık görülmedi ve bu sonuçların diyabet grubunun üçüncü haftasındaki total SCFA değerlerinden farklı olduğu ortaya çıkmıştır ($p>0,05$) (Bkz. Çizelge 4.4, Bkz. Şekil 4.12). İlave olarak diyabet grubunda ortalama asetik, propiyonik ve bütirik asit değerleri açısından diğer gruplara ve ayrıca haftalara nazaran da bir artış gözlenmesine rağmen istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığı belirlenmiştir ($p>0,05$) (Bkz. Çizelge 4.4, Bkz. Şekil 4.11). Sonuç olarak FMT ve sağlıklı donör gruplarının literatür ile benzerlik, fakat diyabet grubu ile farklılık göstermesi FMT tedavisinin diyabet ve metabolizma arasındaki ilişki bağlamında bir etkisinin olabileceğini göstermektedir.

STZ-uyarımli deneysel diyabet modeli oluşturulan Sprague-Dawley sıçanlarda sekal örneklerindeki kısa zincirli yağ asidi profilinin araştırıldığı çalışmada propiyonat ve bütirat konsantrasyonlarında anlamlı derecede azalış görölürken, asetat ve laktat düzeylerinde önemli oranda artış olduğu belirlenmiştir [20]. Çalışmamızda ise dikkat çekecek derecede sağlıklı donör grubuna göre diğer gruplardaki tüm kısa zincirli yağ asitlerinin düzeyleri azalmış olmasına rağmen bu farklılık %5 hata payı ile istatistiksel olarak bir anlam ifade etmediği göröldü. Özellikle sağlıklı donör grubundan sonra ortalama BCFA ve total SCFA kısa zincirli yağ asidi değerleri en yüksek olan grup FMT tedavisi yapılan grubun olması önemlidir. FMT grubuna göre BCFA ve total SCFA değişkenlerine ait ortalama kısa zincirli yağ asidi düzeyleri sham, diyabet, insülin ve ins+FMT gruplarında azalmıştır, fakat bu farklılık istatistiksel açıdan anlamlı değildir ($p>0,05$) (Bkz. Çizelge 4.3, Bkz. Şekil 4.9). Sağlıklı donör ve FMT gruplarına göre diğer grupların özellikle yapılan çalışmalarda en çok bağırsak mikroflorası, diyabet ve SCFA arasındaki ilişkide önemli olan ortalama asetik, propiyonik ve bütirik asit düzeyleri azalmış olmasına rağmen gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı (Bkz. Şekil 4.9). Sağlıklı donör ve FMT gruplarına göre diğer gruplarda sekum içeriği total SCFA düzeylerinin azalışı, özellikle insülin grubunda diğer gruplara nazaran daha fazla azalmış olmasına rağmen gruplar arasında %5 hata payı ile istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görölmemiştir ($p>0,05$) (Bkz. Şekil 4.10). Bu veriler ışığında fekal ve sekal örneklerdeki total SCFA düzeylerinin

FMT tedavisi yapılan grup ile sağlıklı donör grubu arasında benzerlik göstermesi ve diğer grupların sekal örneklerinin total SCFA düzeylerinde görülen her ne kadar anlamlı olmasa da azalış göze çarpmaktadır. Böylece deneysel diyabet modelinde FMT tedavisi ile kısa zincirli yağ asidi profilinin değişikliğe uğratılması diyabet metabolizması açısından önem arz etmektedir.

Bağırsak bariyeri, doğal bağışıklık sisteminin gelişiminde ve bazı otoimmün hastalıkların patogeneğinde etkili olduğu bilinmektedir. Bu bariyer fonksiyonu, paraselüler ve transselüler yollar ile kontrol edilmektedir. Bağırsak bakterileri tarafından üretilen antijenlerin ve mikrobiyal metabolitlerin bu transfer yolları aracılığı ile lümene geçmesi sonucunda bazı bağırsak ve otoimmün hastalıklar uyarılabilmektedir. Diyetel metabolitler, viral veya bakteriyel ajanlar ile oluşabilen bazı enfeksiyon durumları; hücre-hücre etkileşiminde klaudin, okludin ve zonulin sıkı bağlantı proteinlerinin mRNA ifadenmelerini baskılayarak bağırsak geçirgenliğini arttırmaları [56,59,70].

Evrimsel mekanizmalar aracılığı ile adezyon bağlantıları ve dezmozom proteinlerinin füzyonu ile oluşan sıkı bağlantı proteinleri, apikal-lateral bağlantı bölgesinde lokalizedir. Bu proteinler, homofilik (klaudin-1/klaudin-1) ve heterofilik (klaudin-1/klaudin-3) etkileşimler ile epitel hücrelerde bariyer fonksiyonu ile birlikte hücre iskeletini, polaritesini, sinyalini ve vezikül taşınımını da düzenleyebilmektedirler [56,71,72].

ZO proteinleri; ZO-1, ZO-2 ve ZO-3 ilk tanımlanan spesifik sıkı bağlantı proteinleridir. Bu proteinler, hücre içi skafold yapıların oluşumunu sağlar ve sıkı bağlantı komplekslerinin düzenlenmesi için gereklidir [73]. Klaudin proteinleri ise 20-27 kDa ağırlığında dört hidrofobik transmembran bölgesinden oluşan integral membran proteinleridir ve ZO-1 proteini ile birlikte paraselüler geçirgenlikte rol almaktadırlar [76]. IFN- γ ve TNF α sitokinleri, sıkı bağlantı proteinlerinin fosforillenmesine yol açarak bağırsak geçirgenliğini artırırlar. Bağırsak enfeksiyonları ve bazı otoimmün hastalıklarda bu proteinlerin farklı şekilde düzenlenmeleri ile bağırsak geçirgenliğinin arttığı bilinmektedir [77].

T1D ve pre-diyabetik hastalar ve NOD farelerde bağırsak geçirgenliği artmaktadır [60,61]. Bağırsak geçirgenliğinin değişimine ilave olarak BBDR ile BBDR sıçanlarının hastalık öncesi farklı bakteri kompozisyonu içerdiği görülmektedir [62]. BBDR ve BBDR sıçanlarda klaudin 1 mRNA düzeyinin kontrol olarak kullanılan Wistar sıçanlara nazaran

azaldığı, bağırsak geçirgenliğinin ise arttığı görülmektedir [60]. *Lactobacillus johnsonii* N6.2 probiyotik bakterisi ile mikrobiyotik modifikasyonu yapılan BBBDP sıçanlarda kladin 1 ifade düzeyinin arttığı ve probiyotik bakterinin bağırsak geçirgenliğini azalttığı görülmektedir [66]. Çalışmamızda ise diyabet grubunun sağlıklı donör grubuna göre kladin-1 mRNA ifadenmesinin istatistiksel olarak anlamlı olmamasına rağmen 1,5 kat azaldığı görüldü ($p=0,115$). Diyabet grubuna nazaran FMT ve insülin ile tedavi edilen gruplarda kladin-1 mRNA ifadenmesinin istatistiksel açıdan anlamlı olmamasına rağmen 1,5 kat ve ins+FMT kombine tedavisi uygulanan grupta ise 1,8 kat arttığı belirlendi ($p>0,05$) (Bkz. Şekil 4.8). Sonuçlarımız istatistiksel olarak anlamlı olmasada bağırsak geçirgenliğinde etkili olan kladin-1 mRNA ifadenmesinin diyabetik sıçanlarda azalması diğer çalışmalar ile benzerlik gösterebilmektedir.

BBBDP sıçanlarda bağırsak geçirgenliğinin artması ile bir başka sıkı bağlantı proteini zonulinin ifade düzeyinin artması arasında bir ilişki olduğu vurgulanmaktadır [64]. Kolitisi modeli BALB/c farelere probiyotik *E. Coli* Nissle 1917 uygulanması ile intestinal epitel hücrelerinde ZO-1 ekspresyonunun arttığı ve bağırsak geçirgenliğinin ise azaldığı gözlenmiştir. İlave olarak farelerin zayıflaması önlenmiş ve kolitiste görülen kolon kısalması ile birlikte epitel zayıflığını düzelttiği belirtilmektedir [112]. Başka bir çalışmada *Lactobacillus plantarum*'un insan ince bağırsağında ZO-1 ve transmembran okludin'in ekspresyonunu artırarak epitelyal sıkı bağlantılarını etkilediği gösterilmiştir. Devamında *in vitro* ortamda da Caco-2 hücrelerinde ZO-1'in sıkı bağlantı bölgesine doğru translokasyonunun epitelyal geçirgenliği azalttığı gösterilmiştir [113]. Okludin ve ZO-1'in miktarlarının azalması ile epitelyal bariyer bozukluğunun ve geçirgenliğinin artması arasında ilişkinin olduğu farklı bir çalışmada belirtilmiştir [114]. Yine ZO-1 ve okludin proteinlerinin sıkı bağlantı bölgelerinde birikmesi ile epitelyal bariyerin korunması arasında ilişki başka çalışmalarda da gösterilmiştir [113,115]. Bu çalışmalar ile benzer sonuçların görüldüğü deneysel diyabet modeli oluşturulan çalışmamızda ise dikkat çekecek derecede diyabet grubunun sağlıklı donör grubuna göre ZO-1 mRNA ifadenmesinin 14 kat azalışı istatistiksel olarak anlamlıdır ($p=0,001$) (Bkz. Şekil 4.7). Aynı şekilde FMT grubunun sağlıklı donör grubuna göre ZO-1 mRNA ifadenmesinin 3 kat azalışı ($p=0,009$) ve insülin grubunun sağlıklı donör grubuna göre ZO-1 mRNA ifadenmesinin ise 5,8 kat azalışı ($p=0,001$) istatistiksel açıdan anlamlıdır (Bkz. Şekil 4.7). Diyabet grubuna göre FMT grubunda ZO-1 mRNA ifadenmesinin 4 kat, insülin grubunda 2 kat ve ins+FMT grubunda ise 5 kat artışı 0,05 hata payı ile istatistiksel açıdan anlamlı

olmadığı görüldü ($p>0,05$) (Bkz. Şekil 4.7). Diyabet grubuna nazaran FMT, insülin ve ins+FMT kombine tedavileri uygulanan gruplarda ZO-1 mRNA ifadenmesinin istatistiksel açıdan anlamlı olmasada sırasıyla 4, 2 ve 5 kat arttığı görüldü. Sonuç olarak sağlıklı donör grubuna nazaran tedavi edilmeyen diyabet grubunda ZO-1 mRNA ifadenmesinin 14 kat azalışı ile bağırsak geçirgenliğinin artması arasındaki ilişki göze çarpmaktadır.

Kısa zincirli yağ asitlerini fermente eden *Bacteroidetes* gibi bakterilerin bağırsak geçirgenliği üzerine etkilerinin olduğu belirtilmektedir. Anti-inflamatuvar özelliği olan bütiratın sıkı bağlantı proteinleri aracılığıyla bağırsak bariyer fonksiyonunu arttırarak bağırsak geçirgenliğini etkilemektedir. Otoimmün diyabetli çocuklarda bütirat üreten *Clostridium XIVa* ve *IV* suşlarının ve laktat üreten *Bifidobacterium adolescentis* gibi bakterilerin azaldığı görülmektedir. Yapılan bu çalışmalar, bağırsak mikrobiyotası tarafından üretilen metabolitlerin bağırsak geçirgenliğini önemli düzeyde etkilediğini ve bağırsak mikrobiyotasının otoimmün diyabet ile ilişkili olduğunu göstermektedir [67]. Çalışmamızda fekal örneklerin ortalama total SCFA düzeyleri, diyabet grubunda diğer gruplara nazaran istatistiksel açıdan anlamlı olmamasına karşın artmış olması ($p>0,05$) (Bkz. Çizelge 4.4, Bkz. Şekil 4.12) ile bağırsak geçirgenliğinde etkili olan ZO-1 gen ifadenmesinin anlamı derecede azalması ($p=0,001$) (Bkz. Şekil 4.7) ve klaudin-1 mRNA ifadenmesinin anlamlı olmamasına rağmen 1,5 kat azalması ($p=0,115$) (Bkz. Şekil 4.7) arasında bir çelişki gözükmemektedir. Fakat yukarıda tartışıldığı gibi özellikle kısa zincirli yağ asitlerinin fermente besinlerden sekum içeriğindeki bağırsak mikrobiyotası tarafından sentezlendiği bilinmektedir. Bu nedenle çalışma sonuçlarımız ZO-1 ve klaudin-1 gen ifadenmelerinin diyabet grubunda azalması ile sekum içeriğindeki total SCFA düzeylerinin de azalması arasında bir tutarlılık olduğuna işaret etmektedir. Bu olgu, özellikle diyabet grubuna nazaran FMT tedavisi yapılan grupta klaudin-1 mRNA ifadenmesinin 1,5 kat ve ZO-1 mRNA ifadenmesinin ise 4 kat artması ile birlikte sekum içeriği total SCFA düzeylerinin de artması arasındaki bağlantının doğrulandığını görmekteyiz. Bu sonuçlar bize FMT tedavisinin bağırsak geçirgenliğinde rolü bulunan ZO-1 ve klaudin-1 sıkı bağlantı genleri ve diyabet metabolizması yanında bağırsak geçirgenliği ile de ilişkili olan kısa zincirli yağ asitleri üzerinde bir etkinliğinin olabileceğini göstermektedir.

Bütirat üreten bakterilerin (*Roseburia intestinalis*, *E. Ballii*) sırası ile fekal ve ince bağırsak mukozasında FMT sonrası artması insülin direncinin düşürülmesinde önemli rol oynamaktadır. Bağırsak mikroflorasındaki çeşitliliğin artması veya bazı bakterilerin miktarlarındaki artışların etkilerinin tam olarak bilinmemesine rağmen özellikle bütirat üreten bakterilerin bağırsak mikroflorası tarafından üretilen endotoksik bileşenlerin mukozaya translokasyonunu önlemesi ile insülin direncinin düzenlenmesinde etkili olabileceğini göstermektedir [111]. FMT inokülasyonun yapıldığı ve bağırsak mikroflora kompozisyonunun incelendiği başka bir çalışmada deney süresince grupların bakteri profilleri ile oluşturulan kümelenme analizinin önemli düzeyde değişmediği, fakat zamanla değişen alıcı mikroflorasının kompozisyonuna bağlı olarak metabolizma ile ilgili karakteristiklerinin stabil olmadığı gözlenmiştir [110]. Bu çalışma ile uyumlu sonuçların elde edildiği çalışmamızda ise Dice eşitliği temel alınarak oluşturulan dendogram incelendiğinde sekum içeriklerinin mikroflora profili, %88 benzerlik oranı ile iki ana grup altında toplanmıştır. İlk ana grup kendi içinde 2 alt gruba ayrılmıştır. 1. alt grupta ins+FMT A, ins+FMT B ve insülin A; 2. alt grupta ise insülin B yer almıştır. İkinci ana grupta kendi içinde 2 alt gruba ayrılmıştır. Birinci alt grupta FMT A, diyabet A, diyabet B, FMT B, sham A ve Sham B; ikinci alt grupta sağlıklı donör A ve sağlıklı donör B örnekleri kümelenmiştir. Kümelenme analizine göre birbirinin paraleli sekum içerikleri aynı dallarda, grup bazında değerlendirildiğinde ise farklı dallarda toplanmışlardır. En yüksek benzerlik %100 ile FMT A ve Diyabet A arasında ve bu gruplar ile diyabet B grubu arasında ise % 98,2 benzerlik görülmektedir. Sağlıklı donör A ve B örnekleri birbirleri arasında %96,4 ve ins+FMT örnekleri ise % 93,4 benzerlik gösterirken, bu iki grup birbirinden %12 düzeyinde farklılık ile ayrılmaktadırlar (Bkz. Şekil 4.6). Sonuç olarak sekum içeriği bağırsak mikroflora kompozisyonu açısından gruplar arasında dikkat çekecek derecede bir farklılık olmamasına rağmen FMT, insülin ve ins+FMT kombine tedavileri ile diyabet metabolizmasına özgü vücut ağırlığı, kan şekeri ve plazma insülin değerleri gibi karakteristik bileşenlerin alıcı mikroflorasına bağlı olarak değişkenlik gösterebileceği görüşü ağır basmaktadır.

FMT tedavisinin konak metabolizmasını düzenlemesi ile ilgili çalışmalar incelendiğinde obez donör farelerden yetişkin erkek ve dişi farelere FMT inokülasyonu yapılması ile cinsiyet gözetmeksizin tüm farelerin vücut ağırlıklarının zayıf donör farelerden yapılan FMT inokülasyonuna nazaran arttığı görülmüştür. Obez farelerden zayıf farelere FMT inokülasyonunun yapılması ile zayıf farelerin klinik parametrelerinin obez farelere

benzeyebildiği özellikle obez farelere inokülasyon yapıldığında bu farelerin β hücre hiperaktivitesi yani serum insülin düzeylerinin arttığı saptanmıştır. Sonuç olarak antibiyotik ile bağırsak disbiyozisi gerçekleştirilen konvansiyonel farelere farklı mikrobiyal kompozisyon içeren başarılı bir bağırsak mikroflorasının inokülasyonu ile en azından belirli bir süre içerisinde mikrofloranın kalıcı olarak önemli konak fonksiyonlarını modüle edebildiği görülmüştür [109,110]. Diyabetik sıçanlara FMT inokülasyonu yapılan çalışmamızda ise plazma insülin düzeyleri sağlıklı donör grubuna göre diyabet ($p=0,006$) ve FMT ($p=0,032$) gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bir azalış gösterdi. Yine sham grubuna göre diyabet ($p=0,008$) ve FMT ($p=0,040$) gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bir azalış görüldü. Diyabet grubuna göre insülin grubunda ($p=0,021$) plazma insülin düzeylerinin yüksek oluşu istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olduğunu göstermektedir (Bkz. Şekil 4.12). Bu sonuçlarımız Wistar sıçanlarda deneysel diyabet modelinin oluşturulabildiğini ve insülin tedavisi ile plazma insülin düzeylerinin normal değerlerine ulaşabildiğini göstermektedir. İns+FMT ($p=0,295$) ve FMT ($p=1,000$) gruplarında diyabet grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olmasada plazma insülin seviyesinde artış gözlemlendi (Bkz. Şekil 4.12). Sonuç olarak FMT inokülasyonunun diyabet grubuna nazaran plazma insülin düzeylerini istatistiksel olarak anlamlı olmamasına rağmen artırdığı ortaya çıktı. İns+FMT kombine tedavisinin ise benzer şekilde diyabet grubuna göre plazma insülin düzeylerini istatistiksel olarak anlamlı olmamasına rağmen artırdığı gözlemlendi. İns+FMT kombine tedavisinin insülin tedavisine göre plazma insülin düzeyleri üzerinde istatistiksel açıdan anlamlı bir katkısının olmadığı sonucuna varılmıştır. Plazma insülin değerlerinin aksine FMT grubuna göre ins+FMT ($p=0,034$) grubundaki hayvanların ortalama ağırlık değerlerinin artışı %95 güvenle istatistiksel olarak anlamlı olduğu ve insülin-FMT kombine tedavisinin sıçanların kilo alımında etkili olduğu göze çarpmaktadır (Bkz. Çizelge 4.1). İlave olarak deney sonunda diyabet grubunun ortalama kan şekeri değerlerine göre insülin ile tedavi edilen grubunun ortalama kan şekeri değerleri arasındaki fark 41 birim ve ins+FMT grubunun ortalama kan şekeri değerleri arasındaki fark ise 50,6 birimdir (Bkz. Çizelge 4.2). Bu farklar istatistiksel olarak anlamlı olmamasına rağmen kan şekeri değerlerinin de azda olsa kontrol altına alınabilmesi ins+FMT kombine tedavisinin etkili olduğunu göstermektedir. Yukarıda bahsi geçen çalışmalarda da ifade edildiği gibi FMT inokülasyonunun metabolizmayı kan şekeri, vücut ağırlığı ve plazma insülin değerleri üçgeninde bir nebze olsa modüle edebildiği ve bizim çalışmamız ile uyumlu sonuçlar gösterdiği açıktır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada diyabetin tedavisinde FMT, insülin ve FMT-İnsülin kombine uygulamalarının; diyabet ile ilişkili olan bağırsak bakteri profillerine, plazma insülin düzeylerine, bağırsak geçirgenliğinde etkili olan distal kolon ZO-1 ve klaudin-1 genlerinin ekspresyonuna ve bağırsak mikrobiyotasında ve konak metabolizmasında önemli rol oynayan uçucu yağ asitlerinin miktar farklılıklarına olan etkileri araştırılmıştır. Böylelikle aşağıda verildiği gibi FMT tedavisinin alternatif olarak kullanıldığı gastrointestinal ve norolojik hastalıklardaki tedavi edici yönlerinin diyabet üzerindeki etkileri belirlenmiştir.

- Dice eşitliği temel alınarak oluşturulan dendograma göre sağlıklı donör ve diyabet gruplarının 3. ve 8. haftada toplanan fekal örneklerinin ve deney sonunda çıkarılan sekum içeriklerinin mikrobiyota profilleri; FMT, insülin ve ins+FMT gruplarından farklılık gösterdiği ve dendogramın farklı dallarında kümelenedikleri belirlenmiştir. Uygulanan tedavilerin bağırsak mikrobiyota profillerinde değişiklikler oluşturabileceği gözlenmiştir.
- Deney sonunda ortalama ağırlık değerleri açısından sağlıklı donör grubuna göre diyabet, FMT ve insülin gruplarının ortalama ağırlık değerleri anlamlı bir şekilde azalmıştır. Özellikle FMT grubuna göre ins+FMT grubundaki hayvanların ortalama ağırlık değerlerinin artması anlamlı bir farklılık göstermiştir. İns+FMT kombine tedavisinin diyabetik hayvanların ağırlıklarının artmasında etkili olabileceği belirlenmiştir.
- Deney sonunda diyabet grubunun ortalama kan şekeri değerlerine göre istatistiksel olarak anlamlı olmamasına rağmen insülin grubunun ortalama kan şekeri değerleri 41 birim ve ins+FMT grubunun ortalama kan şekeri değerleri ise 50,6 birim azalmıştır. Böylece kombine tedavinin kan şekeri değerlerinin belirli düzeyde de olsa kontrol altına alınmasında faydalı olabileceği görülmüştür.
- Sağlıklı donör grubuna göre diyabet, FMT ve insülin gruplarının ZO-1 mRNA ifadenmesi sırasıyla 14, 3 ve 5,8 kat azalışı istatistiksel olarak anlamlıdır. Böylelikle bağırsak geçirgenliğinin diyabetik gruplarda arttığı gözlemlendi. Ayrıca diyabet grubuna göre FMT grubunda ZO-1 mRNA ifadenmesinin 4 kat, insülin grubunda 2 kat ve ins+FMT grubunda ise 5 kat artışı istatistiksel açıdan anlamlı

olmasa da arttığı görüldü ve FMT, insülin ve özellikle ins+FMT kombine tedavileri ile bağırsak geçirgenliğinin azalabileceği ortaya çıkmıştır.

- Sağlıklı donör grubuna göre diyabet grubunun klaudin-1 mRNA ifadenmesi istatistiksel açıdan anlamlı olmamasına rağmen 1,5 kat azalmıştır. Ayrıca diyabet grubuna göre FMT ve insülin gruplarının klaudin-1 mRNA ifadenmesinin 1,5 kat ve İns+FMT grubunun ise 1,8 kat artışı, istatistiksel açıdan anlamlı olmamasına rağmen bağırsak geçirgenliğinin azalması ile uygulanan tedaviler arasında bir ilişkinin olabileceğini göstermiştir.
- Sekum içeriği kısa zincirli yağ asidi profili incelendiğinde istatistiksel olarak anlamlı olmamasına rağmen sağlıklı donör grubuna göre diyabetik grupların tüm kısa zincirli yağ asitlerinin düzeyleri azalmıştır. Sağlıklı donör grubundan sonra ortalama BCFA ve total SCFA kısa zincirli yağ asidi değerleri en yüksek olan grup FMT tedavisi yapılan gruptur. Böylece FMT tedavisinin istatistiksel açıdan anlamlı olmamasına rağmen total SCFA düzeylerini arttırdığı ve ayrıca bağırsak geçirgenliğinde rol alan ZO-1 ve klaudin-1 genlerinin ifadenme düzeylerini de artırdığı göz önüne alınırsa tedavinin bağırsak geçirgenliği ile total SCFA düzeyleri arasındaki etkileşimde önemli olabileceği düşünülmektedir.
- Fekal örneklerin kısa zincirli yağ asidi düzeyleri değerlendirildiğinde ise 3. haftadaki fekal örneklerin ortalama total SCFA düzeyleri sağlıklı donör ve sham grubuna göre diyabet, FMT, insülin ve ins+FMT gruplarında azalmış olmasına rağmen gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmemiştir. Çarpıcı bir şekilde deney sonunda fekal örneklerin ortalama total SCFA düzeyleri diyabet grubunda diğer gruplara nazaran artmış olmasına rağmen gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. Ayrıca FMT ve sağlıklı donör gruplarının fekal örneklerinin ortalama total SCFA düzeyleri diğer haftalara nazaran azalmış olmasına rağmen haftalar arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık yoktur. FMT tedavisi ile total SCFA düzeylerinin sağlıklı donör grubuna benzetilmesi yönünde bir etkisinin olabileceği dikkat çekmektedir.
- Plazma insülin düzeyleri değerlendirildiğinde sağlıklı donör grubuna göre diyabet ve FMT gruplarının plazma insülin seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalış görüldü. Diyabet grubuna göre insülin grubunda plazma insülin düzeylerinin yüksek oluşu istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olduğunu göstermektedir. İns+FMT ve FMT gruplarında diyabet grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olmasada plazma insülin seviyesinde artış gözlemlendi. Sonuç olarak FMT

tedavisinin anlamlı derecede bir fark oluşturmamasına rağmen plazma insülin düzeylerinde etkili olabileceği görülmüştür.

Son zamalarda yapılan pekçok araştırmada birkaç tedavi yöntemi ile disbiyozis yeniden düzenlenebilmektedir ve böylece bazı hastalıkların riskleri azaltılabilmektedir. FMT tedavisinin kolitis tedavisinde önemli derecede etkili olabildiği gözlenmiştir ve kolitis ile ilgili olan negatif klinik belirtilerin önlenmesinde en iyi tedavi yöntemlerinden birisi olduğu belirtilmektedir. İlave olarak FMT'nin tip 2 diyabet hastalarında yararlı etkileri kalıcı olmasa da insülin duyarlılığının düzenlenmesinde başarılı olduğu gözükmemektedir. FMT uygulamalarının yapıldığı IBD hastalarından ve otizm ile aynı spektrumda bulunan düzensizliklerden elde edilen başarılı sonuçlar dikkat çekmektedir. Tüm bu veriler ekseninde, FMT tedavisinin standart bir uygulama şeklinin bulunmaması, sağlık açısından tehlike oluşturabilecek etmenlerin alıcıya transfer olabilmesine karşılık faydalı etkileri de aktarılan mikropların identifikasyonunun eksikliği ve uygulama esnasında oksijene duyarlı türlerin canlılıklarını kaybetmesi de dahil uygulanabilirlik açısından çok geniş skalada tedavi edici bir strateji olarak gözükmemektedir. Bu nedenle diyabet ile ilişkili bağırsak mikrobiyotasının ve üretilen metabolitlerin metabolik yollar ve otoimmün mekanizmalar üzerine olan etkilerinin tam olarak belirlenebilmesi yönünde tüm araştırmacıların bir konsensüs oluşturarak detaylı çalışmalar yapabilmesi arzu edilmektedir.



KAYNAKLAR

1. Zhang, F., Luo, W., Shi, Y., Fan, Z., and Ji, G. (2012). Should we standardize the 1,700-year-old fecal microbiota transplantation? *The American Journal of Gastroenterology*, 107, 1755.
2. Eiseman, B., Silen, W., Bascom, G. S., and Kauvar, A. J. (1958). Fecal enema as an adjunct in the treatment of pseudomembranous enterocolitis. *Surgery*, 44, 854-859.
3. Choi, H. H., and Cho, Y. S. (2016). Fecal Microbiota Transplantation: Current Applications, Effectiveness, and Future Perspectives. *Clinical Endoscopy*, 49, 257-265.
4. Paramsothy, S., Borody, T. J., Lin, E., Finlayson, S., Walsh, A. J., Samuel, D., Bogaerde, J., Leong, R. W. L., Connor, S., Ng, W., Mitchell, H. M., Kaakoush, N., and Kamm, M. A. (2015). Donor Recruitment for Fecal Microbiota Transplantation. *Inflammatory Bowel Disease*, 21, 1600–1606.
5. Leber, A., Viladomiu, M., Hontecillas, R., Abedi, V., Philipson, C., Hoops, S., Howard, B., and Bassaganya-Riera, J. (2015). Systems Modeling of Interactions between Mucosal Immunity and the Gut Microbiome during *Clostridium difficile* Infection. *Public Library of Science*, 10(7), e0134849.
6. Alang, N., and Kelly, C. R. (2015). Weight Gain After Fecal Microbiota Transplantation. *Open Forum Infectious Diseases*, 2 (1), ofv004.
7. Dabelea, D. (2009). The accelerating epidemic of childhood diabetes. *Lancet*, 373, 1999–2000.
8. Eisenbarth, G. S. (2005). *Type 1 Diabetes mellitus: Joslin's Diabetes mellitus* (14. Edition) Kahn, C. R., Weir, G. C., King, G. L., Jacobson, A. M., Moses, A. C., and Smith, R. J. Joslin Diabetes Center USA, 399-424.
9. Anjos, S., and Polychronakos, C. (2004). Mechanisms of genetic susceptibility to type 1 diabetes: beyond HLA. *Molecular Genetics and Metabolism*, 81, 187–195.
10. Redondo, M. J., Fain, P. R., and Eisenbarth, G. S. (2001). Genetics of type 1A diabetes. *Recent Progress Hormone Research*, 56, 69-89.
11. Alper, C. A., Husain, Z., Larsen, C. E., Dubey, D. P., Stein, R., Day, C., Baker, A., Beyan, H., Hawa, M., Ola, T. O., and Leslie, R. D. (2006). Incomplete penetrance of susceptibility genes for MHC determined immunoglobulin deficiencies in monozygotic twins discordant for type 1 diabetes. *Journal of Autoimmunity*, 27, 89–95.
12. Hara, N., Alkanani, A. K., Ir, D., Robertson, C. E., Wagner, B. D., Frank, D. N., and Zipris, D. (2013). The role of the intestinal microbiota in type 1 diabetes. *Clinical Immunology*, 146, 112–119.
13. Marietta, E. V., Gomez, A. M., Yeoman, C., Tilahun, A. Y., Clark, C. R., Luckey, D. H., Murray, J. A., White, B. A., Kudva, Y. C., and Rajagopalan, G. (2013). Low incidence of spontaneous type 1 diabetes in non-obese diabetic mice raised on gluten-

free diets is associated with changes in the intestinal microbiome. *Public Library of Science*, 8, e78687.

14. Hansen, C. H., Krych, L., Buschard, K., Metzdorff, S. B., Nellemann, C., Hansen, L. H., Nielsen, D. S., Frokiaer, H., Skov, S., and Hansen A. K. (2014). A maternal gluten-free diet reduces inflammation and diabetes incidence in the offspring of NOD mice. *Diabetes*, 63, 2821–2832.
15. Vaarala, O. (2011). The gut as a regulator of early inflammation in type 1 diabetes. *Current Opinion in Endocrinology Diabetes Obesity*, 18, 241–247.
16. Vaarala, O. (2012). Gut Microbiota and Type 1 Diabetes. *The Review of Diabetic Studies*, 9(4), 251–259.
17. Hara, N., Alkanani, K. A., Ir, D., Robertson, E. C., Wagner, D. B., Frank, N. D., and Zipris, D. (2012). Prevention of virus-induced type 1 diabetes with antibiotic therapy. *Journal of Immunology*, 189, 3805–3814.
18. Hansen, C. H., Metzdorff, S. B., and Hansen, A. K. (2013). Customizing laboratory mice by modifying gut microbiota and host immunity in an early “window of opportunity”. *Gut Microbes*, 4, 241–245.
19. Wirth, R., Bodi, N., Maroti, G., Bagyanszki, M., Talapka, P., Fekete, E., Bagi, Z., and Kovacs, K. L. (2014). Regionally Distinct Alterations in the Composition of the Gut Microbiota in Rats with Streptozotocin-Induced Diabetes. *Public Library of Science*, 9(12), e110440.
20. Patterson, E., Marques, M. T., O’Sullivan, O., Fitzgerald, P., Fitzgerald, F. G., Cotter, D. P., Dinan, G. T., Cryan, F. C., Stanton, C., and Ross, P. R. (2015). Streptozotocin-induced type-1-diabetes disease onset in Sprague–Dawley rats is associated with an altered intestinal microbiota composition and decreased diversity. *Microbiology*, 161, 182–193.
21. Hu, C., Wong, S. F., and Wena, L. (2015). Type 1 diabetes and gut microbiota: Friend or foe? *Pharmacological Research*, 98, 9–15.
22. Holmes, E., Li, J. V., Athanasiou, T., Ashrafian, H., and Nicholson, J. K. (2011). Understanding the role of gut microbiome-host metabolic signal disruption in health and disease. *Trends Microbiology*, 19, 349–359.
23. Xu, M. Q., Cao, H. L., Wang, W. Q., Wang, S., Cao, X. C., Yan, F., and Wang, B. M. (2015). Fecal microbiota transplantation broadening its application beyond intestinal disorders. *World Journal of Gastroenterology*, 21, 102–111.
24. Hooper, L. V., and Macpherson, A. J. (2010). Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. *Nature Reviews Immunology*, 10, 159–169.
25. Stecher, B., and Hardt, W. D. (2011). Mechanisms controlling pathogen colonization of the gut. *Current Opinion In Microbiology*, 14, 82–91.
26. Macpherson, A. J., Geuking, M. B., and McCoy, K. D. (2012). Homeland Security: IgA immunity at the frontiers of the body. *Trends in Immunology*, 33, 160–167.

27. Littman, D. R., and Rudensky, A. Y. (2010). Th17 and regulatory T cells in mediating and restraining inflammation. *Cell*, 140, 845–858.
28. Arpaia, N., Campbell, C., Fan, X., Dikiy, S., van der Veeken, J., de Roos P., Liu, H., Cross, J. R., Pfeffer, K., Coffey, P. J., and Rudensky, A. Y. (2013). Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation. *Nature*, 504, 451–5.
29. Furusawa, Y., Obata, Y., Fukuda, S., Endo, T. A., Nakato, G., Takahashi, D., Nakanishi, Y., Uetake, C., Kato, K., Kato, T., Takahashi, M., Fukuda, N. N., Murakami, S., Miyauchi, E., Hino, S., Atarashi, K., Onawa, S., Fujimura, Y., Lockett, T., Clarke, J. M., Topping, D. L., Tomita, M., Hori, S., Ohara, O., Morita, T., Koseki, H., Kikuchi, J., Honda, K., Hase, K., and Ohno, H. (2013). Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature*, 504, 446–50.
30. Denning, T. L., Wang, Y. C., Patel, S. R., Williams, I. R., and Pulendran, B. (2007). Lamina propria macrophages and dendritic cells differentially induce regulatory and interleukin 17 producing T cell responses. *Nature Immunology*, 8, 1086–1094.
31. Franchi, L., Kamada, N., Nakamura, Y., Burberry, A., Kuffa, P., Suzuki, S., Shaw, M. H., Kim, Y. G., and Nunez, G. (2012). NLR4 driven production of IL 1 β discriminates between pathogenic and commensal bacteria and promotes host intestinal defense. *Nature Immunology*, 13, 449–456.
32. Smith, P. M., Howitt, M. R., Panikov, N., Michaud, M., Gallini, C. A., Bohlooly, Y. M., Glickman, J. N., and Garrett, W. S. (2013). The microbial metabolites, short-chain fatty acids, regulate colonic Treg cell homeostasis. *Science*, 341, 569–73.
33. Momose, Y., Hirayama, K., and Itoh, K. (2008). Competition for proline between indigenous *Escherichia coli* and *E. coli* O157:H7 in gnotobiotic mice associated with infant intestinal microbiota and its contribution to the colonization resistance against *E. coli* O157:H7. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 94, 165–171.
34. Gueguen, E., and Cascales, E. (2013). Promoter swapping unveils the role of the *Citrobacter rodentium* CTS1 type VI secretion system in interbacterial competition. *Applied Environmental Microbiology*, 79, 32–38.
35. Fukuda, S., Toh, H., Hase, K., Oshima, K., Nakanishi, Y., Yoshimura, K., Tobe, T., Clarke, J. M., Topping, D. L., Suzuki, T., Taylor, T. D., Itoh, K., Kikuchi, J., Morita, H., Hattori, M., and Ohno, H. (2011). Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. *Nature*, 469, 543–547.
36. Cash, H. L., Whitham, C. V., Behrendt, C. L., and Hooper, L. V. (2006). Symbiotic bacteria direct expression of an intestinal bactericidal lectin. *Science*, 313, 1126–1130.
37. Kamada, N., Seo, S., Chen, G. Y., and Núñez, G. (2013). Role of the gut microbiota in immunity and inflammatory disease. *Nature Reviews Immunology*, 13, 321–335.
38. Musso, G., Gambino, R., and Cassader, M. (2011). Interactions Between Gut Microbiota and Host Metabolism Predisposing to Obesity and Diabetes. *Annual Review of Medicine*, 62, 361–80.

39. Louis, P., Scott, K. P., Duncan, S. H., and Flint, H. J. (2007). Understanding the effects of diet on bacterial metabolism in the large intestine. *Journal of Applied Microbiology*, 102, 1197–208.
40. Elia, M., and Cummings, J. H. (2007). Physiological aspects of energy metabolism and gastrointestinal effects of carbohydrates. *European Journal of Clinical Nutrition*, 61, S40–74.
41. Hur, K. Y., and Lee, M. S. (2015). Gut Microbiota and Metabolic Disorders. *Diabetes Metabolism Journal*, 39, 198–203.
42. Macfarlane, S., and Macfarlane, G. T. (2003). Regulation of short-chain fatty acid production. *Proceedings of the Nutrition Society*, 62, 67–72.
43. Poul, E. L., Loison, C. C., Struyf, S., Springael, J. Y., Lannoy, V., Decobecq, M. E., Brezillon, S., Dupriez, V., Vassart, G., Damme, J. V., Parmentier, M., and Detheux, M. (2003). Functional Characterization of Human Receptors for Short Chain Fatty Acids and Their Role in Polymorphonuclear Cell Activation. *The Journal Of Biological Chemistry*, 278, 25481–25489.
44. Cox, M. A., Jackson, J., Stanton, M., Rojas-Triana, A., Bober, L., Lavery, M., Yang, X., Zhu, F., Liu, J., Wang, S., Monsma, F., Vassileva, G., Maguire, M., Gustafson, E., Bayne, M., Chou, C. C., Lundell, D., and Jenh, C. H. (2009). Short-chain fatty acids act as anti-inflammatory mediators by regulating prostaglandin E(2) and cytokines. *World Journal Gastroenterology*, 15, 5549–5557.
45. Berndt, B. E., Zhang, M., Owyang, S. Y., Cole, T. S., Wang, T. W., Luther, J., Veniaminova, N. A., Merchant, J. L., Chen, C. C., Huffnagle, G. B., and Kao, J. Y. (2012). Butyrate increases IL-23 production by stimulated dendritic cells. *American Journal Physiology Gastrointestinal Liver Physiology*, 303, G1384–G1392.
46. Liu, L., Li, L., Min, J., Wang, J., Wua, H., Zeng, Y., Chen, S., and Chu, Z. (2012). Butyrate interferes with the differentiation and function of human monocyte-derived dendritic cells. *Cell Immunology*, 277, 66–73.
47. Zimmerman, M. A., Singh, N., Martin, P. M., Thangaraju, M., Ganapathy, V., Waller, J. L., Shi, H., Robertson, K. D., Munn, D. H., and Liu, K. (2012). Butyrate suppresses colonic inflammation through HDAC1-dependent Fas upregulation and Fas-mediated apoptosis of T cells. *American Journal of Physiology, Gastrointestinal Liver Physiology*, 302, G1405–G1415.
48. Shakespear, M. R., Halili, M. A., Irvine, K. M., Fairlie, D. P., and Sweet, M. J. (2011). Histone deacetylases as regulators of inflammation and immunity. *Trends Immunology*, 32, 335–343.
49. Tang, Y., Chen, Y., Jiang, H., and Nie, D. (2011). Short-chain fatty acids induced autophagy serves as an adaptive strategy for retarding mitochondria-mediated apoptotic cell death. *Cell Death and Differentiation*, 18, 602–618.
50. Brestoff, J. R., and Artis, D. (2013). Commensal bacteria at the interface of host metabolism and the immune system. *Nature Immunology*, 14(7), 676–684.
51. Tsukita, S., Furuse, M., and Itoh, M. (2001). Multifunctional strands in tight junctions. *Nature Review Molecular Cell Biology*, 2, 285–93.

52. Kunzelmann, K., and Mall, M. (2002). Electrolyte transport in the mammalian colon: Mechanisms and Implications for disease. *Physiology Review*, 82, 245–89.
53. Fihn, B. M., Sjoqvist, A., and Jodal, M. (2000). Permeability of the rat small intestinal epithelium along the villus-crypt axis: effects of glucose transport. *Gastroenterology*, 119, 1029 – 1036.
54. Maslowski, K. M., Vieira, A. T., Ng, A., Kranich, J., Sierro, F., Yu, D., Schilter, H. C., Rolph, M. S., Mackay, F., Artis, D., Xavier, R. J., Teixeira, M. M., and Mackay, C. R. (2009). Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor gpr43. *Nature*, 461, 1282–1286.
55. Arvans, D. L., Vavricka, S. R., Ren, H., Musch, M. W., Kang, L., Rocha, F. G., Lucioni, A., Turner, J. R., Alverdy, J., and Chang, E. B. (2005). Luminal bacterial flora determines physiological expression of intestinal epithelial cytoprotective heat shock proteins 25 and 72. *American Journal of Physiology Gastrointestinal Liver Physiology*, 288, G696–G704.
56. Groschwitz, R. K., and Hogan, P. S. (2009). Intestinal Barrier Function: Molecular Regulation and Disease Pathogenesis. *Journal Allergy Clinical Immunology*, 124(1), 3-22.
57. Vaarala, O. (2008). Leaking gut in type 1 diabetes. *Current Opinion in Gastroenterology*, 24, 701–706.
58. De Kort, S., Keszthelyi, D., and Masclee, M. A. A. (2011). Leaky gut and diabetes mellitus: what is the link? *Obesity Reviews*, 12, 449-458.
59. Daft, G. J., and Lorenz, G. R. (2015). Role of the gastrointestinal ecosystem in the development of type 1 diabetes. *Pediatric Diabetes*, 16, 407-418.
60. Neu, J., Reverte, C. M., Mackey, A. D., Liboni, K., Tuhacek-Tenace, L. M., Hatch, M., Li, N., Caicedo, R. A., Schatz, D. A., and Atkinson, M. (2005). Changes in intestinal morphology and permeability in the biobreeding rat before the onset of type 1 diabetes. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 40, 589–95.
61. Vaarala, O., Atkinson, M. A., and Neu, J. (2008). The "perfect storm" for type 1 diabetes: the complex interplay between intestinal microbiota, gut permeability, and mucosalimmunity. *Diabetes*, 57, 2555–2562.
62. Brugman, S., Klatter, F. A., Visser, J. T., Wildeboer-Veloo, A. C., Harmsen, H. J., Rozing, J., and Bos, N. A. (2006). Antibiotic treatment partially protects against type 1 diabetes in the Bio-Breeding diabetes-prone rat. Is the gut flora involved in the developmentof type 1 diabetes? *Diabetologia*, 49, 2105–2108.
63. Graham, S., Courtois, P., Malaisse, W. J., Rozing, J., Scott, F. W., and Mowat, A. M. (2004). Enteropathy precedes type 1 diabetes in the BB rat. *Gut*, 53, 1437–44.
64. Watts, T., Berti, I., Sapone, A., Gerarduzzi, T., Not, T., Zielke, R., and Fasano, A. (2005). Role of the intestinal tight junction modulator zonulin in the pathogenesis of type I diabetes in BB diabetic-prone rats. *Proceedings National Academy Sciences USA*, 102, 2916–2921.

65. Sapone, A., de Magistris, L., Pietzak, M., Clemente, M. G., Tripathi, A., Cucca, F., Lampis, R., Kryszak, D., Carteni, M., Generoso, M., Lafusco, D., Prisco, F., Laghi, F., Riegler, G., Carratu, R., Counts, D., and Fasano, A. (2006). Zonulin upregulation is associated with increased gut permeability in subjects with type 1 diabetes and their relatives. *Diabetes*, 55, 1443–1449.
66. Valladares, R., Sankar, D., Li, N., Williams, E., Lai, K. K., Abdelgeliel, S. A., Gonzalez, F. C., Wasserfall, H. C., Larkin, J., Schatz, D., Atkinson, A. M., Triplett, W. E., Neu, J., Lorca, L. G. (2010). *Lactobacillus johnsonii* N6.2 mitigates the development of type 1 diabetes in BB-DP rats, *Public Library of Science*, 5, e10507.
67. de Goffau, M. C., Luopajarvi, K., Knip, M., Ilonen, J., Ruotula, T., Harkonen, T., Orivuori, L., Hakala, S., Welling, G. W., Harmsen, H. J., and Vaarala, O. (2013). Fecal microbiota composition differs between children with beta-cell autoimmunity and those without. *Diabetes*, 62, 1238–1244.
68. Johansson, M. E., Larsson, J. M., Hansson, G. C. (2011). The two mucus layers of colon are organized by the muc2 mucin, whereas the outer layer is a legislator of host antimicrobial interactions. *Proceedings National Academy Sciences USA*, 108, 4659–4665.
69. Poritz, L. S., Garver, K. I., Green, C., Fitzpatrick, L., Ruggiero, F., and Koltun, W. A. (2007). Loss of the tight junction protein ZO-1 in dextran sulfate sodium induced colitis. *The Journal of Surgical Research*, 140, 12–19.
70. Cani, P. D., Possemiers, S., Van de Wiele, T., Guiot, Y., Everard, A., Rottier, O., Geurts, L., Naslain, D., Neyrinck, A., Lambert, D. M., Muccioli, G. G., and Delzenne, N. M. (2009). Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving glp-2-driven improvement of gut permeability. *Gut*, 58, 1091–1103.
71. Matter, K., and Balda, M. S. (2007). Epithelial tight junctions, gene expression and nucleo-junctional interplay. *Journal of Cell Science*, 120, 1505–1511.
72. Macia, L., Thorburn, A. N., Binge, L. C., Marino, E., Rogers, K. E., Maslowski, K. M., Vieira, A. T., Kranich, J., and Mackay, C. R. (2012). Microbial influences on epithelial integrity and immune function as a basis for inflammatory diseases. *Immunological Reviews*, 245, 164–176.
73. Lee, H. S. (2015). Intestinal Permeability Regulation by Tight Junction: Implication on Inflammatory Bowel Diseases. *Intestinal Research*, 13(1), 11-18.
74. Furuse, M., Itoh, M., Hirase, T., Nagafuchi, A., Yonemura, S., Tsukita, S., and Tsukita, S. (1994). Direct association of occludin with ZO-1 and its possible involvement in the localization of occludin at tight junctions. *Journal of Cell Biology*, 127, 1617–1626.
75. Mitic, L. L., Van Itallie, C. M., and Anderson, J. M. (2000). Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions I. Tight junction structure and function: lessons from mutant animals and proteins. *American Journal Physiology Gastrointestinal Liver Physiology*, 279, G250–G254.

76. Morita, K., Furuse, M., Fujimoto, K., and Tsukita, S. (1999). Claudin multigene family encoding four-transmembrane domain protein components of tight junction strands. *Proceedings National Academy Sciences USA*, 96, 511–516.
77. Mankertz, J., Tavalali, S., Schmitz, H., Mankertz, A., Riecken, E. O., Fromm, M., and Schulzke, J. D. (2000). Expression from the human occludin promoter is affected by tumor necrosis factor alpha and interferon gamma. *Journal of Cell Science*, 113, 2085–2090.
78. Tripathi, A., Lammers, K. M., Goldblum, S., Shea-Donohue, T., Netzel-Arnett, S., Buzza, M. S., Antalis, T. M., Vogel, S. N., Zhao, A., Yang, S., Arrietta, M. C., Meddings, J. B., and Fasano, A. (2009). Identification of human zonulin, a physiological modulator of tight junctions, as prehaptoglobin-2. *Proceedings National Academy Sciences USA*, 106, 16799–16804.
79. Fasano, A. (2012). Intestinal Permeability and its Regulation by Zonulin: Diagnostic and Therapeutic Implications. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 10, 1096–1100.
80. Murri, M., Leiva, I., Gomez-Zumaquero, M. J., Tinahones, J. F., Cardona, F., Soriguer, F., and Queipo-Ortuño, I. M. (2013). Gut microbiota in children with type 1 diabetes differs from that in healthy children: a case-control study. *BMC Medicine*, 11,46.
81. Gülden, E., Wong, S. F., and Wen, L. (2015). The gut microbiota and Type 1 Diabetes. *Clinical Immunology*, 159, 143–153.
82. Roesch, F. W. L., Lorca, L. G., Casella, G., Giongo, A., Naranjo, A., Pionzio, M. A., Li, N., Mai, V., Wasserfall, H. C., Schatz, D., Atkinson, A. M., Neu, J., and Triplett, W. E. (2009). Culture-independent identification of gut bacteria correlated with the onset of diabetes in a rat model. *ISME Journal*, 3(5), 536–548.
83. Wolf, J. K., Daft, G. J., Tanner, M. S., Hartmann, R., Khafipour, E., and Lorenz, G. R. (2014). Consumption of Acidic Water Alters the Gut Microbiome and Decreases the Risk of Diabetes in NOD Mice. *Journal of Histochemistry Cytochemistry*, 62(4), 237–250.
84. Brown, T. C., Davis-Richardson, G. A., Giongo, A., Gano, A. K., Crabb, B. D., Mukherjee, N., Casella, G., Drew, C. J., Ilonen, J., Knip, M., Hyoty, H., Veijola, R., Simell, T., Simell, O., Neu, J., Wasserfall, H. C., Schatz, D., Atkinson, A. M., and Triplett, W. E. (2011). Gut microbiome metagenomics analysis suggests a functional model for the development of autoimmunity for type 1 diabetes. *Public Library of Science*, 6, e25792.
85. Dunne, L. J., Triplett, W. E., Gevers, D., Xavier, R., Insel, R., Danska, J., and Atkinson, AM. (2014). The intestinal microbiome in type 1 diabetes. *Clinical and Experimental Immunology*, 177, 30-37.
86. Hansen, H. C., Krych, L., Nielsen, S. D., Vogensen, K. F., Hansen, H. L., Sorensen, J. S., Buschard, K., and Hansen, K. A. (2012). Early life treatment with vancomycin propagates *Akkermansia muciniphila* and reduces diabetes incidence in the NOD mouse. *Diabetologia*, 55, 2285–2294.

87. de Goffau, M. C., Fuentes, S., van den Bogert, B., Honkanen, H., de Vos W. M., Welling, G. W., Hyöty, H., and Harmsen, H. J. M. (2014). Aberrant gut microbiota composition at the onset of type 1 diabetes in young children. *Diabetologia*, 57, 1569–1577.
88. Talja, I., Kubo, A. L., Veijola, R., Knip, M., Simell, O., Ilonen, J., Vähä-Mäkilä, M., Sepp, E., Mikelsaar, M., Utt, M., and Uibo, R. (2014). Antibodies to Lactobacilli and Bifidobacteria in Young Children with Different Propensity to Develop Islet Autoimmunity. *Journal of Immunology Research*, 325938.
89. Shin, N. R., Lee, J. C., Lee, H. Y., Kim, M. S., Whon, T. W., Lee, M. S., and Bae, J. W. (2014). An increase in the Akkermansia spp. population induced by metformin treatment improves glucose homeostasis in diet-induced obese mice. *Gut*, 63, 727–35.
90. Zhang, X., Zhao, Y., Xu, J., Xue, Z., Zhang, M., Pang, X., Zhang, X., and Zhao, L. (2015). Modulation of gut microbiota by berberine and metformin during the treatment of high-fat diet induced obesity in rats. *Nature Scientific Reports*, 5, 14405.
91. Giongo, A., Gano, K. A., Crabb, D. B., Mukherjee, N., Novelo, L. L., Casella, G., Drew, J. C., Ilonen, J., Knip, M., Hyöty, H., Veijola, R., Simell, T., Simell, O., Neu, J., Wasserfall, C. H., Schatz, D., Atkinson, M. A., and Triplett, E. W. (2011). Toward defining the autoimmune microbiome for type 1 diabetes. *ISME Journal*, 5, 82–91.
92. Markle, J. G., Frank, D. N., Mortin-Toth, S., Robertson, C. E., Feazel, L. M., Rolfe-Kampczyk, U., von Bergen, M., McCoy, K. D., Macpherson, A. J., and Danska, J. S. (2013). Sex differences in the gut microbiome drive hormone-dependent regulation of autoimmunity. *Science*, 339, 1084–1088.
93. Peng, J., Narasimhan, S., Marchesi, J. R., Benson, A., Wong, F. S., and Wen, L. (2014). Long term effect of gut microbiota transfer on diabetes development. *Journal of Autoimmunity*, 53, 85–94.
94. Calcinaro, F., Dionisi, S., Marinaro, M., Candeloro, P., Bonato, V., Marzotti, S., Corneli, R. B., Ferretti, E., Gulino, A., Grasso, F., De Simone, C., Di Mario, U., Falorni, A., Boirivant, M., and Dotta, F. (2005). Oral probiotic administration induces interleukin-10 production and prevents spontaneous autoimmune diabetes in the non-obese diabetic mouse. *Diabetologia*, 48, 1565–1575.
95. Takiishi, T., Korf, H., Van Belle, T. L., Robert, S., Grieco, F. A., Caluwaerts, S., Galleri, L., Spagnuolo, I., Steidler, L., Van Huynegem, K., Demetter, P., Wasserfall, C., Atkinson, M. A., Dotta, F., Rottiers, P., Gysemans, C., and Mathieu, C. (2012). Reversal of autoimmune diabetes by restoration of antigen-specific tolerance using genetically modified Lactococcus lactis in mice. *Journal Clinical Investigation*, 122, 1717–1725.
96. Robert, S., Gysemans, C., Takiishi, T., Korf, H., Spagnuolo, I., Sebastiani, G., Van Huynegem, K., Steidler, L., Caluwaerts, S., Demetter, P., Wasserfall, C. H., Atkinson, M. A., Dotta, F., Rottiers, P., Van Belle, T. L., and Mathieu, C. (2014). Oral delivery of glutamic acid decarboxylase (GAD)-65 and IL10 by Lactococcus lactis reverses diabetes in recent-onset NOD mice. *Diabetes*, 63, 2876–2887.

97. Palmer, C., Bik, E. M., Di Giulio, D. B., Relman, D. A., and Brown, P. O. (2007). Development of the human infant intestinal microbiota. *Public Library of Science Biology*, 5, e177.
98. Yatsunenkov, T., Rey, F. E., Manary, M. J., Trehan, I., Dominguez-Bello, M. G., Contreras, M., Magris, M., Hidalgo, G., Baldassano, R. N., Anokhin, A. P., Heath, A. C., Warner, B., Reeder, J., Kuczynski, J., Caporaso, J. G., Lozupone, C. A., Lauber, C., Clemente, J. C., Knights, D., Knight, R., and Gordon, J. I. (2012). Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature*, 486, 222–227.
- Sudo, N., Yu, X. N., Aiba, Y., Oyama, N., Sonoda, J., Koga, Y., and Kubo, C. (2002). An oral introduction of intestinal bacteria prevents the development of a long-term Th2-skewed immunological memory induced by neonatal antibiotic treatment in mice. *Clinical and Experimental Allergy*, 32, 1112–1116.
99. Scott, F. W., Rowsell, P., Wang, G. S., Burghardt, K., Kolb, H., and Flohe, S. (2002). Oral exposure to diabetes-promoting food or immunomodulators in neonates alters gut cytokines and diabetes. *Diabetes*, 51, 73–78.
100. Ponte, A., Pinho, R., Mota, M., Silva, J., Vieira, N., Oliveira, R., Pinto-Pais, T., Fernandes, C., Ribeiro, I., Rodrigues, J., Lopes, P., Teixeira, T., and Carvalho, J. (2015). Initial experience with fecal microbiota transplantation in *Clostridium difficile* infection - transplant protocol and preliminary results. *Revista Espanola De Enfermedades Digestivas*, 107(7), 402-7.
101. Wei, Y., Gong, J., Zhu, W., Guo, D., Gu, L., Li, N., and Li, J. (2015). Fecal microbiota transplantation restores dysbiosis in patients with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* enterocolitis. *BMC Infectious Diseases*, 15, 265.
102. Han, S., Shannahan, S., and Pellish, R. (2016). Fecal Microbiota Transplant: Treatment Options for *Clostridium difficile* Infection in the Intensive Care Unit. *Journal of Intensive Care Medicine*, 31(9), 577-86.
103. Qi, C. J., Zhang, Q., Yu, M., Xu, J. P., Zheng, J., Wang, T., and Xiao, X. H. (2016). Imbalance of Fecal Microbiota at Newly Diagnosed Type 1 Diabetes in Chinese Children. *Chinese Medical Journal*, 129, 1298-304.
104. Costa, F. R., Françoze, M. C., de Oliveira, G. G., Ignacio, A., Castoldi, A., Zamboni, D. S., Ramos, S. G., Câmara, N. O., de Zoete, M. R., Palm, N. W., Flavell, R. A., Silva, J. S., and Carlos, D. (2016). Gut microbiota translocation to the pancreatic lymph nodes triggers NOD2 activation and contributes to T1D onset. *Journal of Experimental Medicine*, 27, 213(7):1223-39.
105. Scheithauer, T. P. M., Dallinga-Thie, G. M., de Vos, W. M., Nieuwdorp, M., Daniël H. van Raalte, D. H. (2016). Causality of small and large intestinal microbiota in weight regulation and insulin resistance. *Molecular Metabolism*, 5, 759-770.
106. Bódi, N., Talapka, P., Poles, M. Z., Hermes, E., Jancsó, Z., Katarova, Z., Izbéki, F., Wittmann, T., Fekete, É., and Bagyánszki, M. (2012). Gut region-specific diabetic damage to the capillary endothelium adjacent to the myenteric plexus. *Microcirculation*, 19(4), 316-26.
107. Izbéki, F., Wittman, T., Rosztóczy, A., Linke, N., Bódi, N., Fekete, E., and Bagyánszki, M. (2008). Immediate insulin treatment prevents gut motility alterations

and loss of nitrergic neurons in the ileum and colon of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Diabetes Research Clinical Practice*, 80(2), 192-8.

108. Kootte, R. S., Vrieze, A., Holleman, F., Dallinga-Thie, G. M., Zoetendal, E. G., de Vos, W. M., Groen, A. K., Hoekstra, J. B., Stroes, E. S., and Nieuwdorp, M. (2012). The therapeutic potential of manipulating gut microbiota in obesity and type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Obesity Metabolism*, 14(2), 112-20.
109. Ellekilde, M., Selfjord, E., Larsen, C. S., Jaksevic, M., Rune, I., Tranberg, B., Vogensen, F. K., Nielsen, D. S., Bahl, M. I., Licht, T. R., Hansen, A. K., and Hansen, C. H. (2014). Transfer of gut microbiota from lean and obese mice to antibiotic-treated mice. *Scientific Reports*, 1, 4:5922.
110. Vrieze, A., Van Nood, E., Holleman, F., Salojärvi, J., Kootte, R. S., Bartelsman, J. F., Dallinga-Thie, G. M., Ackermans, M. T., Serlie, M. J., Oozeer, R., Derrien, M., Druesne, A., Van Hylckama Vlieg, J. E., Bloks, V. W., Groen, A. K., Heilig, H. G., Zoetendal, E. G., Stroes, E. S., de Vos, W. M., Hoekstra, J. B., and Nieuwdorp, M. (2012). Transfer of intestinal microbiota from lean donors increases insulin sensitivity in individuals with metabolic syndrome. *Gastroenterology*, 143(4), 913-6.e7.
111. Ukena, S. N., Singh, A., Dringenberg, U., Engelhardt, R., Seidler, U., Hansen, W., Bleich, A., Bruder, D., Franzke, A., Rogler, G., Suerbaum, S., Buer, J., Gunzer, F., and Westendorf, A. M. (2007). Probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 inhibits leaky gut by enhancing mucosal integrity. *Public Library of Science*, 2, e1308.
112. Karczewski, J., Troost, F. J., Konings, I., Dekker, J., Kleerebezem, M., Brummer, R. J., and Wells, J. M. (2010). Regulation of human epithelial tight junction proteins by *Lactobacillus plantarum* in vivo and protective effects on the epithelial barrier. *American Journal of Physiology Gastrointestinal Liver Physiology*, 298(6), G851-9.
113. Oshitani, N., Watanabe, K., Nakamura, S., Fujiwara, Y., Higuchi, K., and Arakawa, T. (2005). Dislocation of tight junction proteins without F-actin disruption in inactive Crohn's disease. *International Journal of Molecular Medicine*, 15, 407-410.
114. Walsh-Reitz, M. M., Huang, E. F., Musch, M. W., Chang, E. B., Martin, T. E., Kartha, S., and Toback, F. G. (2005). AMP-18 protects barrier function of colonic epithelial cells: role of tight junction proteins. *American Journal of Physiology Gastrointestinal Liver Physiology*, 289, G163-G171.



Ek-1. Deney hayvanları etik kurul onayı

Evrak Tarih ve Sayısı: 30/05/2016-E.66991



**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ**
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı


* 8 5 2 6 3 3 2 0 4 7 *

Sayı : 66332047-604.01.02-
Konu : Değerlendirme ve Onay

Sayın Doç. Dr. Turgay TEKİNAY
Yaşam Bilimleri Uygulama ve Araştırma Merkezi Müdürlüğü - Merkez Müdürü

Daha önce onay alan, G.Ü.ET-15.041 kod numaralı "**Deneysel Diyabetik Sıçanlarda Bağırsak Florasının Araştırılması**" adlı çalışmanız hakkında vermiş olduğunuz 10.05.2016 tarihli dilekçeniz incelenmiş olup,

Çalışmanızın isminin "**Deneysel Diyabetik Sıçanlarda Fekal Mikrobiyota Transferi (FMT)'nin Tedavi Edici Etkilerinin Araştırılması**" (Investigation of the Therapeutical Effects of Fecal Microbiota Transfer (FMT) in Experimental Diabetic Rats) olarak değiştirilmesi ile ilgili talebiniz Başkanlığımızca uygun görülmüştür.

Bilgilerinizi rica ederim.


e-imzalıdır
Prof. Dr. Leyla AÇIK
Kurul Başkanı

EK :
1 Liste

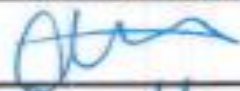
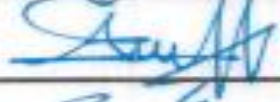
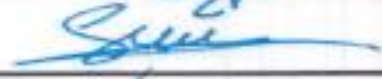
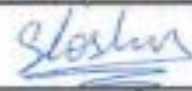
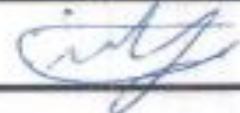
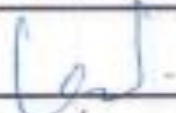

Aslı GİBİDİR
T.C.G.Ü. HAYVAN DENEYLERİ
YEREL ETİK KURUL BAŞKANLIĞI
Prof. Dr. Leyla AÇIK
Kurul Başkanı

Ankara
Tel:0 (312) 202 20 57 Faks:0 (312) 202 20 63
e-Posta :hadyek@gazi.edu.tr İnternet Adresi :http://hadyek.gazi.edu.tr/

Bilgi için :Nursel Güner
Genel Evrak Sorumlusu
Telefon No:202 20 57

Ek-1. (devam) Deney hayvanları etik kurul onayı

GAZİ ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU TOPLANTI KATILIM LİSTESİ

TOPLANTI TARİHİ :20.05.2016		TOPLANTI SAYISI : 08	
ADI-SOYADI		İMZA	
Prof.Dr.Leyla AÇIK (Başkan)			
Uzman Dr.Şeyda DİKER (Başkan Yrd.)			
Prof.Dr.Esra AKKOL			
Prof.Dr.Suna ÖMEROĞLU			
Prof.Dr.Tuncay PEKER			
Prof.Dr.Şule COŞKUN CEVHER			
Doç.Dr.Turgay TEKİNAY		KATILAMADI	
Doç.Dr.Süleyman YEŞİL			
Yrd.Doç.Dr.İhsan YIKILGAN			
Uzm.Dr.Bureu EKİM		KATILAMADI	
Dr.Kadir BAŞAR		KATILAMADI	
Osman İÇ			


 T.C.G.Ü. HAYVAN DENEYLERİ
 YEREL ETİK KURUL BAŞKANLIĞI
 Prof. Dr. Leyla AÇIK
 Kurul Başkanı

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : Şahin Server
Uyruğu : T.C.
Doğum tarihi ve yeri : 01.01.1986 Bayburt
Medeni hali : Evli
Telefon : 0 507 005 57 29
e-mail : sahinserver69@gmail.com



Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Doktora	Gazi Üniversitesi Sağlık Bil. Ens. Tıbbi Biyoloji ve Genetik AD.	Devam Ediyor
Yüksek Lisans	Gaziosmanpaşa Üniversitesi Sağlık Bil. Ens. Tıbbi Biyoloji	2011
Lisans	Gaziosmanpaşa Üniversitesi Biyoloji AD.	2008
Lise	Demirözü lisesi	2003

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2012-	Dumlupınar Üniversitesi	Araştırma Görevlisi

Yabancı Dil

İngilizce

Yayınlar (YÖKSİS)

- Toru Ümran, Ayada Ceylan, Genç Osman, Akcılar Raziye, Şahin Server, Erken Gülten, Erken Haydar Ali, Turgut Günfer, Turgut Sebahat (2015). Possible Activation of the Immune System by Chronic Peripheral Nesfatin 1 Application at the Acute Phase of Ischemia Reperfusion Injury. Erciyes Medical Journal (Yayın No: 2320366).
- Toru Ümran, Ayada Ceylan, Genç Osman, Yaşar Zehra, Şahin Server, Bulut İsmet, Acat Murat (2015). Evaluation of multidrug resistance 1 gene C T polymorphism frequency in patients with asthma. Clinics, 70(10), 670-674., Doi: 10.6061/clinics/2015(10)02 (Yayın No: 1656160).
- Ayada Ceylan, Toru Ümran, Genç Osman, Şahin Server, Bulut İsmet, Arık Özlem, Acat Murat (2015). Evaluation of Serum Levels of Renin Angiotensin System Components in Asthmatic Patients. Erciyes Medical Journal, 37(3), 87-90. (Yayın No: 1657721).
- Toru Ümran, Ayada Ceylan, Genç Osman, Şahin Server, Arık Özlem, Acat Murat, Bulut İsmet, Çetinkaya Erdoğan (2015). Visfatin and ghrelin can they be forthcoming biomarkers or new drug targets for asthma. International Journal of Clinical and Experimental Medicine (Yayın No: 1523393).
- Ayada Ceylan, Toru Ümran, Genç Osman, Şahin Server, Turgut Sebahat, Turgut Günfer (2015). Angiotensinogen gene M235T and angiotensin II type 1 receptor gene A C1166 polymorphisms in chronic obstructive pulmonary disease. International Journal of Clinical and Experimental Medicine (Yayın No: 1511272).
- Toru Ümran, Ayada Ceylan, Genç Osman, Akcılar Raziye, Şahin Server (2015). Balanced oxidative status by nesfatin 1 in intestinal ischemia reperfusion. International Journal of Clinical and Experimental Medicine (Yayın No: 1511273).
- Ayada Ceylan, Toru Ümran, Genç Osman, Yerlikaya Azmi, Şahin Server, Turgut Sebahat, Turgut Günfer (2014). Evaluation of whether the ACE gene I D polymorphism constitutes a risk factor for chronic obstructive pulmonary disease in the Turkish population. Genetics and Molecular Research, 13(4), 10427-10433, (Yayın No: 1267004).
- Rüstemoğlu Aydın, Gümüş Akay Güvem, Nevin Yiğit, Yiğit Serbülent, Şahin Server, Taşlıyurt Türker (2014). Association analysis of three MDR1 gene variants C1236T G2677A T and C3435T and their genotype haplotype combinations with the Familial Mediterranean Fever. Xenobiotica, (Yayın No: 1042168).
- Tekcan Akın, Yiğit Serbülent, Rüstemoğlu Aydın, Gürel Çevik, Şahin Server, Taşlıyurt Türker (2013). The Investigation of Obesity Susceptibility with IL 4 Gene Intron 3 VNTR and IL 6 Gene 597G A Polymorphisms in a Turkish Population. International Journal of Human Genetic, 13(4), 209-213. (Yayın No: 262845).

Şahin Server, Rüstemoğlu Aydın, Tekcan Akın, Taşlıyurt Türker, Güven Hasan, Yiğit Serbürent (2013). Investigation of Associations between Obesity and LEP G2548A and LEPR 668A G Polymorphisms in a Turkish Population. Disease Markers, 35(6), 673-677, (Yayın No: 138517).

Hobiler

Türk halk müziği dinlemek





GAZİLİ OLMAK AYRICALIKTIR...