

MEHMET DEMIRCI

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

DOKTORA TEZİ

İSTANBUL-2015

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(DOKTORA TEZİ)

**ERİŞKİN TIP 1 DİYABETLİ VE SAĞLIKLI KİŞİLERİN
DIŞKI FLORASINDAKİ BACTEROIDETES VE
FIRMICUTES GRUBU BAKTERİ MİKTARININ
KONAKTAKİ TLR2/TLR4 GEN EKSPRESYONLARI
ÜZERİNE ETKİSİ**

MEHMET DEMİRCİ

**DANIŞMAN
PROF. DR. HRİSİ BAHAR TOKMAN**

**TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANA BİLİM DALI
MİKROBİYOLOJİ PROGRAMI**



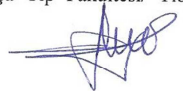

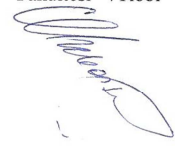
İSTANBUL-2015

TEZ ONAYI**TEZ ONAYI**

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Mikrobiyoloji Programında Mehmet DEMİRCİ tarafından hazırlanan "ERİŞKİN TİP 1 DİYABETLİ VE SAĞLIKLI KİŞİLERİN DIŞKI FLORASINDAKİ BACTEROİDETES VE FİRMİCUTES GRUBU BAKTERİ MİKTARININ KONAKTAKİ TLR2/TLR4 GEN EKSPRESYONLARI ÜZERİNE ETKİSİ" başlıklı Doktora tezi, yapılan tez sınavında Jürimiz tarafından başarılı bulunarak kabul edilmiştir.

28 / 12 / 2015

Tez Sınav Jürisi

- | <u>Ünvanı Adı Soyadı (Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı)</u> | <u>İmzası</u> |
|---|---|
| 1.Prof. Dr. Nuri KIRAZ İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi /Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı |  |
| 2.Prof. Dr. Bekir S.KOCAZEYBEK İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi./Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı |  |
| 3.Prof. Dr. Hrisi BAHAR TOKMAN(Danışman) İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi/ Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı |  |
| 4.Prof.Dr.Nurver Ü.TOPRAK Marmara Ü. Tıp Fakültesi /Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı |  |
| 5.Yard.Doç.Dr.Bariş Ata BORSA Kemerburgaz Üniversitesi Tıp Fakültesi /Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı |  |

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Mehmet Demirci



İTHAF

Canımdan çok sevdiğim biricik eşime ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, desteğini esirgemeyen, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı, değerli hocam Prof. Dr. Nuri KİRAZ'a teşekkürlerimi sunarım.

Mikrobiyoloji eğitimime başladığım ilk günden beri, bilgi ve tecrübeleriyle her zaman yanımda olan, bana mikrobiyolojiyi sevdiren ve ilerlemem için beni her zaman destekleyen değerli danışman hocam Prof. Dr. Hrisi BAHAR TOKMAN'a teşekkürlerimi bildiririm.

Mikrobiyoloji eğitimimim süresince, bilgi ve tecrübeleri ile beni geliştiren ve her zaman yakın ilgisini ve desteğini hissettiğim değerli hocam Prof. Dr. Bekir S. KOCAZEYBEK'e teşekkürü bir borç bilirim.

Mikrobiyoloji eğitimime başladığım ilk günden beri, bilgilerini ve desteğini benden esirgemeyen, yetişmemde büyük emeği geçen değerli hocam Prof. Dr. Müzeyyen MAMAL TORUN teşekkürü bir borç bilirim.

Yetişmemde emeği geçen değerli hocalarım, Prof. Dr. MUSTAFA SAMASTI'ya, Prof. Dr. Gökhan AYGÜN'e, Prof. Dr. Nevriye GÖNÜLLÜ'ye, Prof. Dr. Ömer KÜÇÜKBASMACI'ya, Prof. Dr. Murat HÖKELEK'e, Prof. Dr. Kenan MİDİLLİ'ye, Doç.Dr. Fatma KÖKSAL ÇAKIRLAR'a Doç. Dr.Suat SARIBAŞ'a, Doç.Dr. Mustafa ASLAN'a, Doç Dr.Sevgi ERGİN'e ve Yard. Doç. Dr. Erdal POLAT'a, teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin gerçekleşmesi için gereken örneklerin toplanmasında bana destek veren İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fak. Endokrinoloji ve Metabolizma Anabilim dalından Prof. Dr. Mücahit ÖZYAZAR'a, Uz.Dr. Ela TEMELOĞLU KESKİN'e, ayrıca hemşire Alev KAHRAMAN ve tüm diyabet polikliniği çalışanlarına teşekkürü bir borç bilirim.

Tezimin tüm istatistiksel hesaplamaları aşamasında bana destek olan değerli hocam Yard.Doç.Dr Penbe ÇAĞATAY'a teşekkürlerimi bildiririm.

Tezimin çalışmaları sırasında özellikle numunelerin toplanması aşamasında bana candan yardımcı olan İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fak. Mikrobiyoloji Anabilim dalından Msc. Zeynep TANER'e teşekkürü bir borç bilirim.

Beni her zaman destekleyerek yetişmemde büyük fedakarlıklarda bulunan tüm eğitimim süresince bana sonsuz emekler veren annem, babam ve tüm aileme canı gönülden şükranlarımı sunarım.

Eğitimim süresince bana sonsuz destek veren, her zaman yanımdan olan ve ilerlemem için beni her zaman destekleyen canım eşime teşekkürü bir borç bilirim.

Bu alışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 37749

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	Vİİ
TABLolar LİSTESİ.....	Xİ
ŞEKİLLER LİSTESİ	XİV
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	XVİ
ÖZET	XXİ
ABSTRACT.....	XXİİİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Normal Mikrobiyal Flora	3
2.1.1. Kalıcı Flora	3
2.1.2. Geçici Flora.....	3
2.2. İnsan Vücudunda Normal Mikrobiyal Floranın Bulunduğu Bölgeler	4
2.3. İnsan Bağırsak Florası ve Gelişimi	5
2.4. İnsan Bağırsak Florasının İmmun Sistemle İlişkisi	6
2.4.1. İnce Bağırsak Florası	9
2.4.2. Kalın Bağırsak Florası	9
2.4.3. Fekal Flora	10
2.5. İnsan Bağırsak Mikrobiyotasının İşlevleri	10
2.5.1. Koruyucu İşlevler.....	11
2.5.2. İmmunolojik İşlevler.....	12
2.5.3. Metabolik İşlevler	13
2.6. Bağırsak Florasını Etkileyen Faktörler	14
2.6.1. Yaş	14
2.6.2. Cinsiyet	16
2.6.3. Genetik Özellikleri.....	16
2.6.4. Coğrafik konum	17

2.6.5. Beslenme	17
2.6.6. Antibiyotik kullanımı	18
2.6.7. Sağlık Durumu, Yaşam Şartları ve Stres	19
2.7. Hijyen Hipotezi ve Hastalıklarla İlişkisi	19
2.8. Bağırsak florasının immun sisteme etkisi	20
2.8.1. Doğal İmmun Sistem ve Bağırsak Florası	21
2.8.2. Kazanılmış İmmun Sistem ve Bağırsak Florası	23
2.9. Toll-Like Reseptörler (TLR).....	24
2.9.1. TLR2	28
2.9.2. TLR4	29
2.10. Diyabetes Mellitus	30
2.10.1. Tip 1 Diyabetes Mellitus (T1DM)	31
2.10.1.1. Etyoloji ve Patogenez.....	32
2.11. Floradaki bakteriyel değişimlerin otoimmün hastalıklarla ilişkisi.....	33
2.12. Toll-like Reseptörler (TLR) ve Tip 1 Diyabet ilişkisi	34
2.13. Anaerop bakterilerle, Tip 1 diyabet ilişkisi:	35
2.13.1. <i>Bacteroidetes</i>	36
2.13.1.1. <i>Bacteroides</i> Sınıflandırması	36
2.13.1.2. <i>Bacteroides fragilis</i> grubu.....	36
2.13.1.3. <i>Bacteroides fragilis</i> genel özellikleri:	37
2.13.2. <i>Firmicutes</i>	38
2.13.2.1. <i>Lactobacillaceae</i> ailesi bakterileri	38
2.14. Mikrobiyom	40
2.15. Mikrobiyota çalışmaları için kullanılan teknikler.....	41
2.15.1. Kültür bağımlı teknikler.....	42
2.15.2. Kültür bağımsız teknikler.....	42
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	47
3.1. Çalışma Gruplarının Oluşturulması	47
3.1.1. Hasta grubu	47
3.1.2. Kontrol grubu.....	48
3.2. Örnekler ve Yapılan Analizler	48
3.2.1. Gaita örneklerinden yapılan analizler	48
3.2.2. Kan örneklerinden yapılan analizler	48

3.3. GEREÇLER	48
3.3.1. Kullanılan Besiyerleri	48
3.3.1.1. Bakterilerinin Üretimi ve Tanımı için Kullanılan Besiyerleri	48
3.3.1.2. Stok Solüsyonlar	51
3.3.2. Test kitleri	52
3.3.3. Diğer malzemeler	52
3.3.3.1. Primerler.....	52
3.3.3.2. Problar (florasan boya içeren spesifik oligonükleotidler)	53
3.3.3.3. 16S rRNA kantitasyon standartları	54
3.3.3.4. Pozitif kontroller	54
3.3.3.5. Sarf malzemeler	55
3.4. YÖNTEMLER	55
3.4.1. Hastalara ve Kontrollere Ait Bilgilerin Yer Aldığı Formların Doldurulması...56	
3.4.2. Hastalardan ve Kontrollerden Gaita ve Kan örneklerin toplanması	56
3.4.3. Kontrol Kökenlerinin Üretimi ve Plazmid Standart Oluşturulması.....57	
3.4.4. Dışkı numunelerinden bakteri DNA'sının izolasyonu:.....57	
3.4.5. Tam kan numunelerinden RNA izolasyonu:.....58	
3.4.6. RNA'lardan Komplementer DNA (cDNA) Sentezi:	59
3.4.7. DNA'lardan Bakteri Kantitasyon Çalışmalarının Yapılması:	60
3.4.7.1. <i>Bacteroidetes</i> , gerçek zamanlı PZR (qPZR) kantitasyon çalışması:.....60	
3.4.7.2. <i>Firmicutes</i> , gerçek zamanlı PZR (qPZR) kantitasyon çalışması:	62
3.4.7.3. <i>Bacteroides fragilis</i> , gerçek zamanlı PZR (qPZR) kantitasyon çalışması: ..64	
3.4.7.4. <i>Lactobacillus acidophilus</i> gerçek zamanlı PZR (qPZR) kantitasyon çalışması:.....66	
3.4.7.5. <i>Lactobacillus casei</i> gerçek zamanlı PZR (qPZR) kantitasyon çalışması:....68	
3.4.8. cDNA'lardan gen ekspresyon düzeyi qPZR çalışmalarının yapılması:.....70	
3.4.8.1. TLR2 qPZR çalışması	70
3.4.8.2. TLR4 qPZR çalışması	72
3.4.8.3. HPRT1 qPZR çalışması	74
3.5. İstatistiksel analiz	76
4. BULGULAR.....	77
5. TARTIŞMA	99
KAYNAKLAR	109

HAM VERİLER	149
FORMLAR	173
ETİK KURUL KARARI	174
PATENT HAKKI İZİNİ	176
TELİF HAKKI İZİNİ.....	177
ÖZGEÇMİŞ	178

TABLolar LİSTESİ

Tablo 2.1: Jejenum, ileum ve kolonda bulunan bakterilerin miktar dağılımı

Tablo 2.2: TLR ailesi ve ligandları

Tablo 3.1: *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *B.fragilis*, *L.acidophilus*, *L.casei* miktarının qPZR ile belirlenmesinde kullanılan primer setleri

Tablo 3.2: TLR2, TLR4 mRNA gen ekspresyon düzeylerinin qPZR ile belirlenmesinde kullanılan primer setleri

Tablo 3.3: CDC'nin belirlediği yaş aralıkları ve diyabet tanısı alma oranı

Tablo 3.4: *Bacteroidetes* mastermiks hazırlama protokolü

Tablo 3.5: *Bacteroidetes*, gerçek zamanlı PZR çalışma protokolü

Tablo 3.6: *Firmicutes* mastermiks hazırlama protokolü

Tablo 3.7: *Firmicutes*, gerçek zamanlı PZR çalışma protokolü

Tablo 3.8: *B.fragilis* mastermiks hazırlama protokolü

Tablo 3.9: *B.fragilis* gerçek zamanlı PZR çalışma protokolü

Tablo 3.10: *L.acidophilus* mastermiks hazırlama protokolü

Tablo 3.11: *L.acidophilus* gerçek zamanlı PZR çalışma protokolü

Tablo 3.12: *L.casei* mastermiks hazırlama protokolü

Tablo 3.13: *L.casei* gerçek zamanlı PZR çalışma protokolü

Tablo 3.14: TLR2 gen ekspresyon düzeyi mastermiks hazırlama protokolü

Tablo 3.15: TLR2 gen ekspresyon düzeyi gerçek zamanlı PZR çalışma protokolü

Tablo 3.16: TLR4 gen ekspresyon düzeyi mastermiks hazırlama protokolü

Tablo 3.17: TLR4 gen ekspresyon düzeyi gerçek zamanlı PZR çalışma protokolü

Tablo 3.18: HPRT1 gen ekspresyon düzeyi mastermiks hazırlama protokolü

Tablo 3.19: HPRT1 gen ekspresyon düzeyi gerçek zamanlı PZR çalışma protokolü

Tablo 4.1: Çalışmamıza dahil edilen hasta ve sağlıklı kontrollerin demografik özelliklerine ait verilerin karşılaştırılması

Tablo 4.2: Hasta ve kontrol grubumuzdaki erkeklerde yaş, VKI, AKŞ ve HbA1c düzeylerine ait verilerin karşılaştırması

Tablo 4.3: Hasta ve kontrol grubumuzdaki kadınlarda yaş, VKI, AKŞ ve HbA1c düzeylerine ait verilerin karşılaştırması

Tablo 4.4: Hasta ve kontrol grubumuzdaki erkeklerde, VKI, AKŞ ve HbA1c düzeylerine ait verilerin yaş gruplarına göre karşılaştırılması

Tablo 4.5: Hasta ve kontrol grubumuzdaki kadınlarda, VKI, AKŞ ve HbA1c düzeylerine ait verilerin yaş gruplarına göre karşılaştırılması

Tablo 4.6: Hasta ve kontrol grubundaki erkeklerde *Bacteroidetes* ve *Firmicutes* miktarlarının yaş gruplarına göre karşılaştırılması

Tablo 4.7: Hasta ve kontrol grubundaki kadınlarda *Bacteroidetes* ve *Firmicutes* miktarlarının yaş gruplarına göre karşılaştırılması

Tablo 4.8: Hasta ve kontrol grubundaki erkeklerde *B.fragilis*, *L.acidophilus*, *L.casei* miktarlarının yaş gruplarına göre karşılaştırılması

Tablo 4.9: Hasta ve kontrol grubundaki kadınlarda *B.fragilis*, *L.acidophilus*, ve *L.casei* miktarlarının yaş gruplarına göre karşılaştırılması

Tablo 4.10: Hasta ve kontrol grubundaki erkeklerde ortalama TLR2 ve TLR4 gen ekspresyon düzeylerinin ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) yaş gruplarına göre karşılaştırılması

Tablo 4.11: Hasta ve kontrol grubundaki kadınlarda ortalama TLR2 ve TLR4 gen ekspresyon düzeylerinin ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) yaş gruplarına göre karşılaştırılması

Tablo 4.12: T1DM'lu hastalarda saptanan *Bacteroidetes* ve *Firmicutes* miktarları ile, TLR2 ve TLR4 gen ekspresyon düzeyleri arasındaki korelasyonu belirten değerler

Tablo 4.13: T1DM'lu erkek hastalarda saptanan *Bacteroidetes* ve *Firmicutes* miktarları ile, TLR2 ve TLR4 gen ekspresyon düzeyleri arasındaki korelasyonu belirten değerler

Tablo 4.14: T1DM'lu kadınlarda saptanan *Bacteroidetes* ve *Firmicutes* miktarları ile, TLR2 ve TLR4 gen ekspresyon düzeyleri arasındaki korelasyonu belirten değerler

Tablo 4.15: Hasta ve kontrol grubunda saptanan ortalama *Firmicutes/Bacteroidetes* oranlarının karşılaştırılması

Tablo 4.16: Erkek hasta ve kontrol grubunda saptanan ortalama *Firmicutes/Bacteroidetes* oranlarının karşılaştırılması

Tablo 4.17: Kadın hasta ve kontrol grubunda saptanan ortalama *Firmicutes/Bacteroidetes* oranlarının karşılaştırılması

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1: Bağırsak florası ve bakterilerin bölgesel dağılımı

Şekil 2.2: Floranın ve immun sistemin zaman içinde değişimi

Şekil 2.3: TLR sinyal yolağı

Şekil 2.4: TLR'lerin uyarılması

Şekil 2.5: Organ disfonksiyonuna yönlendiren moleküler mekanizmalar

Şekil 4.1: Hasta ve kontrol grubundaki erkeklerde ortalama VKI nin yaş gruplarına göre dağılımı

Şekil 4.2: Hasta ve kontrol grubundaki erkeklerde ortalama HbA1c (%) düzeylerinin yaş gruplarına göre dağılımı

Şekil 4.3: Hasta ve kontrol grubundaki erkeklerde ortalama AKŞ düzeylerinin yaş gruplarına göre dağılımı

Şekil 4.4: Hasta ve kontrol grubundaki kadınlarda ortalama VKI'nin yaş gruplarına göre dağılımı

Şekil 4.5: Hasta ve kontrol grubundaki kadınlarda ortalama HbA1c (%) düzeyinin yaş gruplarına göre dağılımı

Şekil 4.6: Hasta ve kontrol grubundaki kadınlarda ortalama AKŞ düzeyinin yaş gruplarına göre dağılımı

Şekil 4.7: Hasta ve kontrol grubundaki erkeklerde *Bacteroidetes* ve *Firmicutes* miktarlarının yaş gruplarına göre karşılaştırılması

Şekil 4.8: Hasta ve kontrol grubundaki kadınlarda *Bacteroidetes* ve *Firmicutes* miktarlarının yaş gruplarına göre karşılaştırılması

Şekil 4.9: hasta ve kontrol grubundaki erkeklerde *B.fragilis*, *L.acidophilus* ve *L.casei* miktarlarının yaş gruplarına göre karşılaştırılması

Şekil 4.10: Hasta ve kontrol grubundaki kadınlarda *B.fragilis*, *L.acidophilus* ve *L.casei* miktarlarının yaş gruplarına göre karşılaştırılması

Şekil 4.11: Hasta ve kontrol grubundaki erkeklerde ortalama TLR2 ve TLR4 gen ekspresyon düzeylerinin ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) dağılımı

Şekil 4.12: Hasta ve kontrol grubundaki kadınlarda ortalama TLR2 ve TLR4 gen ekspresyon düzeylerinin ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) dağılımı.

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

- AIRE: Otoimmün düzenleyici (autoimmune regulator)
- AKŞ: Açlık Kan Şekeri
- AP1: Aktive edici protein 1 (activator protein 1)
- APC: Antijen sunan hücre (antigen presenting cell)
- APRIL: Çoğalmayı arttırıcı ligand (a proliferation-inducing ligand)
- AS: Ankilozan spondilit (ankylosing spondylitis)
- ATP: Adenozin trifosfat (adenosine triphosphate)
- BBA: Brucella kanlı agar (brucella blood agar)
- BB-DP: Biyoüretim diyabet eğilimli sıçan (biobreeding diabetes prone)
- BB-DR: Biyoüretim diyabet dirençlisiçan (biobreeding diabetes resistant)
- BBE: *Bacteroides* safra eskülin agar (bacteroides bile esculin)
- Bcl-x: B-hücre lenfoma x (B-cell lymphoma x)
- BLB: Bakteriyel lizis buffer (bacterial lysis buffer)
- BMI & VKI: Beden kitle indeksi & Vücut kitle indeksi (body mass index)
- CD: Küme farklılaştırıcılar (cluster of differentiation)
- cDNA: Komplementer DNA (complementer DNA)
- c-IAP-1: Apoptoz c inhibitör protein-1 (baculoviral IAP repeat-containing protein 2)
- c-IAP-2: Apoptoz c inhibitör protein-2 (baculoviral IAP repeat-containing protein 3)
- CMV: Sitomegalovirus (cytomegalovirus)
- CR: Kompleman reseptörü (compleman receptor)
- CRP: C-reaktif protein (c-reactive protein)
- Ct: Eşik döngü değeri (cycle Threshold)
- CXCR: Kemokin reseptör tip (C-X-C chemokine receptor type)
- DAMP: hasar ilişkili moleküler yapılar (damage-associated molecular pattern)
- DC: Dentritik hücre (dendritic cell)
- DGGE: Denature edici gradyent jel elektroforezi (denaturing gradient gel electrophoresis)
- DM : Diyabetes mellitus (diabetes mellitus)
- DN: Çift negatif (double negative)
- DNA: Deoksiribonükleik asit (deoxyribonucleic acid)
- DP: Çift pozitif (double positive)

- dsDNA: Çift iplikli DNA (double strand DNA)
- dsRNA: Çift iplikli RNA (double strand RNA)
- Eh: Oksidasyon-redüksiyon potansiyeli (eh veya reduction potential)
- FITC: Florasan izotiyosiyonat (fluorescein isothiocyanate)
- G+C: Guanin + Sitozin (guanine-cytosin)
- GALT: Bağırsak ilişkili lenfoid doku (gut-associated lymphoid tissue)
- GDF-5: Büyüme farklılaşma faktörü 5 (growth/differentiation factor 5)
- Gerçek zamanlı PZR: Real Time PCR
- GPI: Glikozilfosfatidilinozitol (Glycosylphosphatidylinositol)
- HbA1c: Glikozile hemoglobin (glycated hemoglobin)
- HCV: Hepatit C virüsü (hepatitis C virus)
- HGP: İnsan genom projesi (human genome project)
- HMP: İnsan mikrobiyom projesi (human microbiome project)
- HPRT1: Hipoksantin fosforibozil transferaz 1 (hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase 1)
- HSP: Isı şok proteinleri (heat shock proteins)
- IBD: İnflamatuvar bağırsak hastalığı (inflammatory bowel disease)
- IEC: Bağırsak epitel Hücresi (intestinal epithelial cell)
- IFN: İnterferon
- IgA: Immunoglobulin A
- IKK: κ B kinaz inhibitörü (I κ B kinase)
- IL: İnterlökin (interleukin)
- IL-1R: İnterlökin 1 reseptör (interleukin-1 receptor)
- IRAK-1: IL-1R ilişkili kinaz (interleukin-1 receptor-associated kinase 1)
- IRAK-4: IL-1R ilişkili kinaz (interleukin-1 receptor-associated kinase 4)
- IRF: IFN Regülatör Faktör (interferon regulatory factors)
- KV: Kanamisin - Vankomisin (kanamycin – vancomycin)
- KVLB: Kanamisin-vankomisin lize kanlı agar (kanamycin-vancomycin laked blood agar)
- LAM: Lipoarabinomannan
- LBP: Lipopolisakkarid bağlayan protein (lipopolysaccharide binding protein)
- LPDC: Lamina propria dentritik hücresi (Lamina propria dendritic cell)
- LPS: Lipopolisakkarit (lipopolysaccharide)

- LRR: Lösinden zengin tekrarlar (leucine-rich repeat)
- LTA: Lipoteikoik asit (lipoteichoic acid)
- MALDI-TOF: Matriks Yardımlı Lazer İyonizasyon Kütle Spektrometre (matrix-assisted laser desorption ionisation time-of-flight)
- MD-2: Lenfosit antijen 96 (lymphocyte antigen 96)
- MeV: Kızamık virüsü (measles virus)
- MHC: Temel doku uygunluğu kompleksi(major histocompatibility complex)
- MKK: Mitojen active edici protein kinaz kinaz (mitogen-activated protein kinase kinase)
- MMC: Migrating motor complex
- mRNA: Haberci RNA (messenger RNA)
- MS: Multiple skleroz (multiple sclerosis)
- mTEC: Medullar timik epitelyal hücre (medullar thymus epithelial cell)
- mV: Mega volt
- MyD88: Miyeloid farklılaşma birincil yanıt faktörü 88 (myeloid differentiation primary response gene 88)
- NDC: Sindirilemeyen karbonhidratlar (non-digestible carbohydrates)
- NF- κ B: Nuclear factor κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)
- NGS: Yeni jenerasyon sekanslama (Next generation sequencing)
- NIH: Amerikan ulusal sağlık enstitüsü (national institutes of health)
- NK: Doğal öldürücü hücre (natural killers)
- NLR: NOD benzeri reseptörler (NOD-like receptor)
- NLRP6: NOD benzeri reseptör pirin bölgesi 6 (NOD-like receptor family pyrin domain containing 6)
- NOD: Nükleotid bağlayan oligomerizasyon bölgesi (nucleotide-binding oligomerization domain)
- PAMP: Patojen ilişkili moleküler yapılar (pathogen-associated molecular pattern)
- PEA: Fenil etil alkol agar (phenylethy alcohol agar)
- PGN: Peptidoglikan (peptidoglycan)
- PRR: Patern tanımlama reseptörü (pattern recognition receptor)
- PZR (PCR): Polimeraz zincir reaksiyonu (polymerase chain reaction)
- qPZR (qPCR): kantitatif PZR (quantitative PCR)

- RA: Romatoid artrit (rheumatoid arthritis)
- RANK: NF κ B reseptör aktivatörü (receptor activator of nuclear factor κ B)
- Reg III γ : Yeniden oluşturulan adacık protein 3 gama (regenerating islet-derived protein 3 gamma)
- RIG-I: Retinoik asit indükleyici gen 1 (retinoic-Acid inducible Gene I)
- RIP1: Reseptör ilişkili protein 1 (receptor-interacting protein 1)
- RIPK2: Reseptör ilişkili serin/treonin kinaz 2 (receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 2)
- RNA: Ribonükleik asit (ribonucleic acid)
- RogA: Rogosa agar
- rRNA: Ribosomal RNA
- RSV: Respiratuar sinsityal virüs (respiratory syncytial virus)
- S.T.A.R.: Dışkı numuneleri transport ve geri kazanım solusyonu (stool transport and recovery buffer)
- SCFA: Kısa zincirli yağ asitleri (short-chain fatty acid)
- SLE: Sistemik lupus eritematozus (systemic lupus erythematosus)
- SP-A: Surfaktan protein A (Surfactant protein A)
- spp : Bir cinse ait tüm türler
- ssRNA: Tek-iplikli RNA (Single strand RNA)
- STAT: Sinyal iletilici ve transkripsiyon aktive edici protein (Signal transducer and activator of transcription)
- SYK: Dalak tirozin kinaz (Spleen Tyrosine Kinase)
- T1DM: Tip 1 diyabetes mellitus (Type 1 diabetes mellitus)
- T2DM: Tip 2 diyabetes mellitus (Type 2 diabetes mellitus)
- TAB: TAK1-bağlayıcı protein (TAK1-binding protein 1)
- TAK: TGF β -aktive kinaz (TGF β -activated kinase)
- TANK: TRAF ailesi üyesi NF κ B aktivatörü (TRAF family member-associated NF-kappa-B activator)
- TBK1: TANK-bağlayıcı kinaz 1 (Serine/threonine-protein kinase 1)
- TCR: T hücre reseptörü (T cell receptor)
- T_h: Foliküler yardımcı T hücresi (Follicular helper T cells)
- TGF- β : Transforming growth faktör beta (transforming growth factor beta)
- TGGE: Isıtıcı gradyent jel elektroforezi (temperature gradient gel electrophoresis)

T_h: Yardımcı T hücresi (T helper cell)

TIR: Toll/IL-1 reseptörü (toll/interleukin-1 receptor)

TIRAP: TIR domaini içeren adaptör protein (toll-interleukin 1 receptor (TIR) domain containing adaptor protein)

TJ: Sıkı bağlantı (tight junction)

TLR: Toll benzeri reseptör (Toll-like reseptör)

TNF: Tümör nekroz Faktör (tumor necrosis factor)

TRAF: TNF reseptörü ilişkili factor (TNF receptor-associated factor)

TRAM: Trif ilişkili molekül (Trif-related adaptor molecule)

TRAPS: Tümör nekroz faktör reseptörü ilişkili periyodik ateş sendromu (tumor necrosis factor receptor associated periodic fever syndrome)

T_{reg}: Düzenleyici T hücreleri (T regulatory cell)

TRIF: TIR domain içeren adaptör protein uyarıcı IFN-beta (TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β)

ÖZET

Demirci M. Erişkin Tip 1 diyabetli ve sağlıklı kişilerin dışkı florasındaki *Bacteroidetes* ve *Firmicutes* grubu bakteri miktarının konaktaki TLR2/TLR4 gen ekspresyonları üzerine etkisi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Cerrahpaşa Tıp Fak. Mikrobiyoloji ABD. Doktora Tezi. İstanbul. 2015.

Tip 1 diyabet, insülin üreten pankreatik beta hücrelerine vücudun kendi immün sisteminin saldırısı ile oluşan otoimmün bir hastalıktır. Gerçek patogenezi bilinmemektedir ancak genetik ve çevresel faktörlerin hastalığın gelişmesinde önemli etkileri vardır. Son yıllarda dışkı mikrobiyotasının diyabet gelişiminde rolü olduğu öne sürülmekte ve yapılan çalışmalarda, sağlıklı kişilere göre tip 1 diyabetli hastaların dışkı mikrobiyotasında *Bacteroidetes* miktarında artış *Firmicutes* miktarında ise düşüş saptandığı bildirilmektedir. Toll-like reseptörler (TLR) geniş bir alanda eksprese edilebilen transmembran proteinleridir. TLR4, Gram negatiflerin dış membranının ana komponenti olan lipopolisakkaritler (LPS) ve yağ asitleri ile uyarılır, plazma LPS seviyeleri ise dışkı mikrobiyotası tarafından düzenlenmektedir. TLR2, yine bakteriyel, fungal ve viral antijenleri tanır ve doğal immunitede makrofajları uyarır. Bunun insülin direncine karşı koruyucu etki yaptığı düşünülmektedir. Yine son yıllarda yapılan çalışmalarda TLR2 ve TLR4 gen ekspresyonlarının özellikle fare modellerinde dışkı mikrobiyotasının kompozisyonu ile değiştiği gösterilmiştir. Çalışmamızda tip 1 diyabet tanısı almış 28 erkek ve 25 kadın toplam 53 bireyden alınan dışkı örnekleri ile aynı yaş gruplarında sağlıklı 28 erkek ve 25 kadın olmak üzere toplam 53 bireyin dışkı örnekleri *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *B.fragilis*, *L.acidophilus* ve *L.casei* miktarları bakımından qPZR ile kantitatif olarak incelenmiş ve sonuçlar gruplar arasında karşılaştırılmıştır. Ayrıca hasta ve kontrol grubundaki tüm bireylerin dışkı örnekleri alındığı sırada EDTA'lı kan örnekleri de alınmış ve hücrtesel TLR2 ile TLR4'ün gen ekspresyonu düzeyleri qPZR ile kantitatif olarak incelenmiş ve sonuçlar gruplar arasında karşılaştırılmıştır.

Çalışmamıza katılan tüm T1DM'lu erkek ve kadın hastalarda saptanan *Bacteroidetes* ve *Firmicutes* miktarı, sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, hasta grubunda *Bacteroidetes* miktarının istatistiksel olarak ileri derecede yüksek olduğu, *Firmicutes* miktarının ise istatistiksel olarak ileri derecede düşük olduğu saptanmıştır ($p<0,001$,

p<0,001) Ayrıca T1DM'lu erkek ve kadın hastalarda ortalama *Firmicutes/Bacteroidetes* oranları sağlıklı kontrollere göre çok ileri derecede düşük bulunmuştur.

T1DM'lu hasta kadınların ve erkeklerin 1 gram dışkısında bulunan *B.fragilis* miktarının tüm kontrollerde saptanan miktarlara göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek olduğu (p<0,01), buna karşın *L.acidophilus* ve *L.casei* miktarları bakımından T1DM'lu hastalar ve sağlıklı kontroller arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadığı belirlenmiştir.(p>0,05).

T1DM'lu hasta grubunda saptanan ortalama TLR4 gen ekspresyon düzeylerinin, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak ileri derecede yüksek, ortalama TLR2 gen ekspresyon düzeylerinin, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak ileri derecede düşük olduğu saptanmıştır.

T1DM'lu erkek ve kadın hastalarda *Bacteroidetes* ve *Firmicutes* miktarları ile yine aynı grupta saptanan TLR2 ve TLR4 gen ekspresyon düzeyleri arasındaki ilişki incelendiğinde, *Bacteroidetes* düzeyinin, TLR4 gen ekspresyon düzeyi ile olan ilişkisinin çok güçlü olduğu ($r_s: >0,85$), TLR2 gen ekspresyon düzeyi ile olan ilişkisinin ise istatistiksel olarak zayıf olduğu saptanmıştır ($r_s: 0,25-0,50$). *Firmicutes* düzeyinin, TLR4 gen ekspresyon düzeyi ile olan ilişkisinin zayıf ($r_s: 0,25-0,50$), TLR2 gen ekspresyon düzeyi ile olan ilişkisinin ise çok güçlü olduğu ($r_s: >0,85$) belirlenmiştir

Anahtar Kelimeler: Tip 1 diyabet, Dışkı Mikrobiyotası, qPZR, TLR, Anaerop bakteriler

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No:37749

ABSTRACT

Demirci M (2015). Bacteroidetes and Firmicutes ratios on Gut Microbiota and effects of hosts TLR2 / TLR4 gene expression levels between Adult type 1 diabetes patients and healthy people. Istanbul University, Institute of Health Science, Cerrahpaşa School of Medicine. Microbiology. Doctorate Thesis. Istanbul.

Type 1 diabetes is an autoimmune disease caused by immune systems attacks to its own pancreatic insulin producing beta cells. Real pathogenesis still unknown but genetic and environmental factors have major effects for development of the disease. At last publications, Gut Microbiota have been proposed to play important role in the development of the disease and in these studies, increased amount of *Bacteroidetes*, decreased amount of *Firmicutes* have been reported at type 1 diabetes patients. Toll-like receptors (TLR) are transmembrane proteins which can be expressed widely. TLR4 are stimulated via fatty acids and plasma lipopolysaccharides (LPS) which is main compartment of gram negative outer membrane. Plasma LPS level is regulated with gut microbiota. TLR2 also recognizes bacterial, fungal and viral antigens and stimulates macrophage on natural immunity. It's believed to have protective effects on insulin resistance. Also, recent studies on mouse models shown that TLR2 and TLR4 gene expression pattern have changed with composition of the gut microbiota. In this study, we investigate the amount of *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *B.fragilis*, *L.acidophilus* and *L.casei* from 53 type 1 diabetes patient (28 male and 25 female) and 53 healthy control (28 male and 25 female) fecal samples via qPCR and the results were compared between the groups. Also, EDTA whole blood samples collected from these groups and TLR2 & TLR4 gene expression level were measured with qPCR and the results were compared between these groups.

In our study, the amount of *Bacteroidetes* and *Firmicutes* compared between type 1 diabetes patients and healthy control group. The amount of *Bacteroidetes* and *Firmicutes* were found significantly higher and lower respectively than healthy control groups ($p<0,001$, $p<0,001$).

Besides, both male and female, *Firmicutes* / *Bacteroidetes* ratios of type 1 diabetes were found significantly lower than healthy controls.

The amount of *B.fragilis* were found significantly higher than healthy controls ($p<0,01$) in both male and female participants but no significant differences were found for the amount of *L.acidophilus* and *L.casei* in both sexes ($p>0,05$).

In Type 1 diabetes patients, TLR2 and TLR4 gene expression levels were found to be statistically lower and higher respectively, compared to healthy controls.

Relationship between the amount of *Bacteroidetes* & *Firmicutes* and TLR2 & TLR4 gene expression level in male and female patients with type 1 diabetes were investigated. We determined that the *Bacteroidetes* level relationship with TLR4 gene expression level is very strong ($r_s: >0,85$) while the relationship with TLR2 gene expression level were found to be statistically weak ($r: .25-.50$). The *Firmicutes* levels relationship with the TLR4 gene expression level is weak ($r: 0.25$ to 0.50), but the relationship with TLR2 gene expression level is very strong ($r:> 0.85$).

Key Words: Type1 diabetes, Gut Microbiota, qPCR, TLR, Anaerobic bacteria

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. 37749

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Tip 1 diyabet, dünya çapında sorun olan multifaktoryal bir otoimmün hastalıktır (1). Genetik ve çevresel faktörlerin kompleks interaksyonu sonucu oluşur (2). Bağırsaklar, vücudun en geniş yüzeyini oluşturan, mikroplar, antijenler ve toksinlerle sürekli temas halinde olan sindirim sistemi organıdır. Bağırsak epiteli, patojenik ve nonpatojenik mikroorganizmaları birbirinden ayırabilme özelliğine sahiptir. Bağırsaklar, patojenik olmayan kommensal bakterilere tolerans gösterip, patojenik olan bakterilere karşı mukozal immunitiyi uyararak yanıt vermektedir. Böylelikle bağırsak epiteli, mukozal immunité ve bağırsağın kommensal florası, tip 1 diyabet, çölyak hastalığı, ülseratif kolit, romatoid artrit, multiple skleroz ve chron hastalığı gibi birçok otoimmün hastalık ve metabolik sendromdan sorumlu olabilir (3, 4). Bağırsak florası yaklaşık 1000 farklı tür ve 10^{14} kadar bakteri içeren, klasik yöntemlerle üretilemeyen mikroorganizmayı barındırmaktadır (5, 6, 7). Bağırsak florasının, diyabet oluşumu için çevresel nedenlerden biri olduğu öne sürülmüştür (8, 9). Bağırsak florası incelendiğinde 2 bakteri ailesi Gram negatif *Bacteroidetes* grubunun ve Gram pozitif düşük % Guanin + Sitozin (GC) oranlı *Firmicutes* grubu bakterilerin baskın olduğu görülmektedir (10, 11, 12, 13, 14, 15). Son yıllarda yapılan çalışmalarda kontrol gruplarına göre tip 1 diyabetli hastaların dışkı florasında artmış *Bacteroidetes* grubu oranları ve düşmüş düzeyde *Firmicutes* grubu oranlarının olduğu işaret edilmiştir (2, 3, 4, 10). Toll like reseptörler (TLR) geniş bir alanda eksprese edilebilen transmembran proteinleridir. Doğal bağışıklık aracılığıyla sitokin üretimini uyararak, patojen ilişkili moleküler yapıların (PAMP) tanınmasını sağlarlar (12). TLR'ler mikrobiyal ajanlara yanıtta ve doğal immun yanıtın düzenlenmesinde inflamatuvar yollarda önemli rol oynamaktadırlar (16, 17). TLR4 Gram negatiflerin dış membranının ana komponenti olan lipopolisakkaritler (LPS) ve yağ asitleri ile uyarılır, plazma LPS seviyeleri ise dışkı mikrobiyotası tarafından düzenlenmektedir (12, 13). TLR2, yine bakteriyel, fungal ve viral antijenleri tanır ve doğal immunitéde makrofajları uyarır. Bunun insülin direncine karşı koruyucu etki yaptığı düşünülmektedir (12). Yine son yıllarda yapılan çalışmalarda TLR2 ve TLR4 gen ekspresyonlarının özellikle fare ve sıçan modellerinde dışkı florasının kompozisyonu ile değiştiği görülmektedir (18, 19, 20, 21, 22).

Bu çalışmada, Tip 1 diyabet tanısı almış hastaların ve sağlıklı kişilerin dışkı florasında bulunan *Bacteroidetes* ve *Firmicutes* miktarlarının, aynı bireylerde saptanan

TLR2 ve TLR4 mRNA gen ekspresyon düzeyleri üzerindeki etkisinin gösterilmesi amaçlanmıştır. Ayrıca ileride yapılacak araştırmalara yol gösterici bir ön değerlendirme olabileceği düşünceyi ile son yıllarda otoimmün hastalıklarla ilişkilendirilen *Bacteroides fragilis*'in hasta ve kontrol grubu bireylerinin dışkı florasındaki miktarında bir fark bulunup bulunmadığının belirlenmesi, bunun dışında probiyotik özellikleri ile konakta koruyucu rolleri olduğu düşünölen *Lactobacillus acidophilus* ve *Lactobacillus casei*'nin miktarlarında hasta ve kontrol grupları arasında bir fark bulunup bulunmadığının saptanması amaçlanmaktadır. Elde edilen veriler ışığında, beslenme alışkanlıklarımız, coğrafik konumumuz ve mevsimsel faktörler varlığında ölkemiz insanlarında tip 1 diyabet ve bağırsak mikrobiyotası ilişkisine ilişkin ilk defa kesitsel bir veri sunulmuştur.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Normal Mikrobiyal Flora

Sağlıklı insan vücudunda, çeşitli bölgelerinde gruplaşmış olarak bulunabilen, kişiye zarar vermeden denge içinde yaşayan mikroorganizma toplulukları normal flora olarak tanımlanabilir. İnsan vücudunun içinde ve üzerinde bulunan normal floranın çeşitliliği, yaş, cinsiyet, diyet, hormonal durum, sağlık ve kişisel hijyen gibi değişik faktörlere bağlıdır (23). Gelişen moleküler araştırma teknikleri, insan vücudu, okyanuslar, atık sular ya da başka bir ortamda toplu yaşayan mikrobik topluluklar hakkında kapsamlı araştırmalar başlatılmasına imkan vermektedir (24). Son yıllarda bakteri topluluklarının rolü yoğun şekilde çalışılmaktadır. Bu çalışmalar sonucunda normal flora, mikroflora ve mikrobiyota terimleri benzer şekilde kullanılmaya başlanmıştır (25, 26). Mikrobiyota, esas olarak belli bir bölgedeki bakteri topluluklarını anlatırken, mikroflora veya normal florada bakteriler yanında virüsler, mantarlar ve protozoonlarında bulunduğu topluluğu belirtmektedir (25). Dış çevreyle temas halinde olan her yüzeyde normal mikrobiyal flora bulunmaktadır (26). Normal flora veya mikroflora 2 grupta ele alınır.

2.1.1. Kalıcı Flora

Belirli bölgelerde ve belirli yaşlarda, genellikle değişmeyen, kısa süreli ortadan kaldırılsa bile yeniden oluşabilen, genellikle sabit kabul edilen, süreklilik gösteren mikroorganizma topluluğudur (27).

Bu floranın bağırsaktaki bazı üyeleri K vitamini sentezi ve besinlerin absorpsiyonunda rol alırlar. Mukozalar ve deride “bakteriyal interferans” mekanizması ile patojen bakterilerin kolonizasyonunu engellerler. Bakteriyosin üreterek bazı bakterilerin üremesini engellerler. Patojen bakteriler ile; besinler, yerleşme yeri, hücre yüzey reseptörleri ve diğer bağlanma yerleri için yarışarak kişide etki gösterirler (27).

2.1.2. Geçici Flora

Kalıcı floranın yanında, çoğu hastalık oluşturmeyen, bazen patojen olabilen ve belirli vücut bölgelerinde birkaç saatten bir kaç haftaya kadar değişebilen sürelerde kalan mikroorganizma topluluğudur. Ortadan kaldırıldıklarında geri dönmezler (27,

28). Kalıcı florada sorunlar oluştuğunda geçici flora üyeleri konakta kolonize olur, çoğalır ve hastalık yapıcı özellik kazanabilirler (28).

2.2. İnsan Vücudunda Normal Mikrobiyal Floranın Bulunduğu Bölgeler

İnsan vücudunun dış çevreyle temas halinde olan her yüzeyinde flora bulunmaktadır (26). Normal floranın bulunduğu bu bölgeler; deri, burun, göz, üst solunum yolları, ürogenital sistemler, ağız, mide ve bağırsaklar gibi sindirim yollarıdır. Vücudun değişik bölgelerinde farklı içeriğe sahip floranın oluşmasının nedenleri, pH farklılığı, nem farklılığı, sekresyonların biyokimyasal ve antimikrobiyal bileşimindeki farklılıklardır (27). Deride, sıklıkla koagülaz negatif *Staphylococcus* spp. *Corynebacterium* spp. ve *Propionibacterium* spp. yer alır. Göz florası, kaynağını deriden alır. *S.epidermidis*, *Corynebacterium* spp. göz florasında sıklıkla yer almaktadır. Ağız boşluğu flora açısından mikroorganizmaların en heterojen bulunduğu bölgelerden birisidir. Ürogenital sistemde, üretranın üst kısımları, mesane, testisler, uterus ve ovariumlar steril kabul edilirler. Ürogenital sistemin geri kalan kısmında ise normal flora bulunmaktadır (26, 27). Sindirim sistemi florası, mikroorganizma çeşidi, toplam sayısı bakımından en kalabalık ve en karmaşık flora veya mikrobiyota olarak kabul edilir (26). Kolon tek başına insan vücudundaki tüm bakterilerin %70'ine ev sahipliği yapmaktadır (29). Jejunum, ileum ve kolon'da bulunan bakterilerin miktarları Tablo 2.1'de görülmektedir (26, 30).

Tablo 2.1: Jejunum, ileum ve kolonda bulunan bakterilerin miktar dağılımı (26, 30).

Mikroorganizma (cfu/gr)	Jejunum	ileum	Kolon
Toplam sayı	0 – 10 ⁵	10 ⁴ – 10 ⁸	10 ¹⁰ - 10 ¹²
Aerobik organizmalar			
Streptococcus spp.	0 – 10 ⁴	10 ² – 10 ⁴	10 ³ – 10 ⁵
Enterococcus spp.	0 – 10 ²	10 ² – 10 ⁴	10 ⁵ – 10 ¹⁰
Staphylococcus spp.	0 – 10 ³	10 ² – 10 ⁵	10 ⁴ – 10 ⁶
Enterobacteriaceae	0 – 10 ³	10 ² – 10 ⁷	10 ⁴ – 10 ¹⁰

<i>Candida spp.</i>	0 – 10 ²	10 ² – 10 ⁴	10 ² – 10 ⁵
Anaerobik organizmalar			
<i>Peptostreptococcus spp.</i>	0 – 10 ³	10 ² – 10 ⁶	10 ¹⁰ – 10 ¹²
<i>Bifidobacterium spp.</i>	0 – 10 ³	10 ³ – 10 ⁸	10 ⁸ – 10 ¹¹
<i>Lactobacillus spp.</i>	0 – 10 ⁴	10 ² – 10 ⁵	10 ⁶ – 10 ⁸
<i>Clostridium spp.</i>	Nadir	10 ² – 10 ⁴	10 ⁸ – 10 ¹²
<i>Eubacterium spp.</i>	Nadir	Nadir	10 ⁹ – 10 ¹²
<i>Veilonella spp.</i>	0 – 10 ³	10 ² – 10 ⁴	10 ³ – 10 ⁶
<i>Fusobacterium spp.</i>	0 – 10 ³	10 ³ – 10 ⁴	10 ⁶ – 10 ⁸
<i>Bacteroides spp.</i>	0 – 10 ³	10 ³ – 10 ⁷	10 ¹⁰ – 10 ¹²
<i>Prevotella spp.</i>	10 ² – 10 ⁴	10 ³ – 10 ⁴	10 ⁴ – 10 ⁵

Farklı dış faktörlerin etkisi ile insanların farklı flora bölgelerinde yer alan mikroorganizmaların sayısında ve tür dağılımında meydana gelen değişimlerin, bazı hastalıkların gelişmesini tetikleyebileceği konusundaki görüşlerin giderek artması sonucu son yıllarda flora ve mikrobiyotanın hastalıklarla ilişkisine yönelik araştırmalar hız kazandırmıştır (31, 32, 33). Kolon mikrobiyotasının, insan vücudundaki yerleşik tüm bakterilerin %70'ini içermesi (29), bağırsak mikrobiyotasının, hem doğal, hem de kazanılmış immun sistemin normal gelişiminde ana rol oynaması (34, 35), birey için gerekli çeşitli metabolik fonksiyonlara etki etmesi (36), insan ve hayvan modellerinde metabolik hastalıkların gelişiminde önemli rol oynadığının gittikçe fazla oranda gösteren veri alınması (34) dolayısıyla dikkatler bağırsak mikrobiyotasında yoğunlaşmıştır.

2.3. İnsan Bağırsak Florası ve Gelişimi

Doğum sırasında steril olan gastraintestinal sistem (GIS) mikrobiyotası annenin vajinasından ve fekal mikrobiyotasından alınan aerobik ve anaerobik mikroorganizmalarla saatler içinde kolonize olur (37, 38, 39). Karmaşık bir olay olan bu

kolonizasyon süreci çeşitli faktörlerin etkileşimi ile oluşur (40). Bağırsak ilişkili lenfoid doku (GALT) nedeniyle ömür boyu süren kolonizasyon süreci 4 dönemde incelenebilir (41)

1. Doğum sırası dönemi: Başlangıç kolonizasyonu olarak düşünülebilir ve anneden özellikle aerobik bakterilerin (*Enterobacteriaceae* vb.) alınmasıyla oluşur.
2. Doğum sonrası dönemi: Özellikle emzirme ile bağırsağa alınan kompleks karbonhidratları seven aerobik ve anaerobik bakteriler (*Lactobacillales* vb.) tarafından doğum sonrası 2. haftadan itibaren ilk floranın oluşmasıdır.
3. Normal beslenme dönemi: Süt dışında gıdaların alınması özellikle anaerobik bakterilerin hakimiyetinde çok sayıda mikroorganizmanın kolonizasyonu ile gelişen durumdur, özellikle yetişkin dönem buna örnek verilebilir.
4. Yaşlılık Dönemi: Yaşlılıkla beraber bozulan fizyolojik denge sonrasında anaeroplardan *Clostridium* spp. sayısında artış ile gözlenen dönemdir.

Normal beslenme döneminde 1000 farklı bakteri türü ve yaklaşık 10^{14} hücre/gr oranında bakteri içeren insan bağırsak mikrobiyotasının, insan vücudunda bulunan hücre sayısından yaklaşık 10 kat daha fazla bakteri içeren bir topluluk olduğu bilinmektedir (5, 42, 43). Bağırsak mikrobiyotasındaki bakterilerin çoğu kommensaldir. 13'den fazla sayıda, farklı bakteri ailesi bulunmuştur ama *Firmicutes* ve *Bacteroidetes* sayıca baskın ailelerdir. (44). Demografik nedenler ve coğrafik bölgeler bağırsak mikrobiyotasının mikrobiyal içeriğini etkileyebilir. Lokal çevre, kalıtım, beslenme ve yaşam tarzlarındaki farklılıklar bağırsak ekolojisinde farklılığın potansiyel nedenidir (45, 46, 47).

2.4. İnsan Bağırsak Florasının İmmun Sistemle İlişkisi

Bağırsak mikrobiyotası mukoza ile sıkı ilişkidir. Bunun yanında bağırsak mikrobiyotası ve onun ürünleri konağı, aynı şekilde konakta bağırsak mikrobiyotasını mutlaka etkiler. Burada bulunan bakteriler bağırsak epitel hücreleri (IEC) ile sıkı bir ilişki içindedirler, bu durum konağın immün sisteminin uyarılması ve bağırsak bütünlüğü için çok önemlidir. Bu ilişki dengeli bir sisteme dayanır. Konak, kommensal bu bakteriler ile sürekli temas halinde olduğu için inflamasyona neden olmamalıdır, yoksa bağırsak bütünlüğü bozulacak ve sürekli bir inflamasyon hali oluşacaktır, diğer taraftan bakteriyel invazyona karşı immün yanıtı her zaman tetikleyebilmelidir. Bu

nedenle konak hücreleri, bağırsak mikrobiyotasında bulunan bakteriler arasından, kommensal bakterileri mutlaka ayırabilmesi gereklidir (48). Konağın kommensal bakterileri ayırarak tanıması ve normal sağlıklı dokularda bu bakterilere karşı inflamatuvar yanıtı tetiklememesi “kommensal paradoks” olarak tanımlanmıştır (49). Epitel hücreleri ve dentritik hücrelerin patojen ilişkili moleküler paternleri (PAMP) tanıyan reseptörleri vardır. Peptidoglikanlar (PGN), lipoproteinler, flagellinler, lipopolisakkaritler (LPS) ve Teikoik asitler PAMP'lardır. Bu sayede konak hücreleri, bakterileri, farklı komponentlerine göre bağırsak mikrobiyotasından ayırırlar. Epitel hücreleri üzerinde bulunan ve PAMP'ları tanıyan bu reseptörler Toll-like reseptörler (TLR) ve nukleotid bağlayıcı oligomerizasyon bölge (NOD) benzeri reseptörlerdir (NLR) (48). TLR'ler epitel hücrelerinin dış yüzeylerinde ve endosomal membranlarında bulunurken, NOD benzeri reseptörler (NLR) sitoplazmada bulunur (50). TLR'ler mikrobiyal ajanlara yanıtta ve doğal immun yanıtın düzenlenmesinde inflamatuvar yollarda önemli rol oynamaktadırlar (16). Genelde TLR veya NOD benzeri reseptörlere, PAMP'lar bağlandığında nukleer faktör kappa B (NF- κ B) ile ilgili sinyal kaskatı başlatılır. Bunu izleyen yanıt hangi tip PAMP veya bakterinin bağlandığına bağlıdır. TLR veya NOD benzeri reseptörlerin aktivasyonu sonucu, proinflamatuvar sitokinleri uyaran kaskadın fosforilasyonu, sonucunda da inhibitor kappa B kinaz (IKK)'nin bozulması gerçekleşir, bu NF- κ B ile ilişkilidir ve bunun nukleusa transloke olmasına neden olarak burada proinflamatuvar genler için transkripsiyon faktör olarak görev yapar (48). Bu reaksiyon bağırsakta sürekli gerçekleşir. *Bifidobacterium breve*, *Bacteroides thetaiotaomicron* ve *Ruminococcus gnavus* gibi kommensal bakteriler NF- κ B aktivitesini etkilemezken, *Collinsella aerofaciens*, NF- κ B aktivitesini inhibe eder (51).

Immun sistemin kendi hücrelerine saldırıyı engellemek için immunolojik tolerans olarak tanımlanan özelliği vardır. Bu özellikle immun sistem, kendi hücre ve dokularına saldırabilecek veya kendi hücrelerine karşı reaktif olabilecek T ve B hücrelerini elemine eder. Tolerans'ın gelişebilmesi için bu hücreler, konağın kendisine ait bazı moleküllere karşı, hem timüs'da (merkezi tolerans), hemde periferal lenfoid organlarda (periferal tolerans) geliştirilir (52). Merkezi tolerans mekanizması, timüs'da çok aşamalı ve farklı kontrol noktaları olan bir işlemdir. Hemapoetik kök hücrelerden kaynaklanan T hücre öncüleri kemik iliğinden timüs'e gelir. Timüs'e girişleri sırasında, T hücre öncülerinde, T hücre reseptör (TCR) zinciri, küme farklılaştırıcı (CD)4 ve CD8 molekül

ekspresyonları eksiktir. Bu T hücreleri “çift negatif” (DN) hücreleri olarak bilinir. Timüs hücreleri, bu DN hücrelerinin, hem CD4+, hemde CD8+ koresptörlerini eksprese etmelerini sağlayarak “çift pozitif” (DP) hücre haline geçişinisağlar. Timüsta TCR zinciri de eksprese olunca, bu DP hücreleri pozitif ve negatif olarak adlandırılan 2 önemli seçim işlemine tabi tutulur. Pozitif seçimde DP hücreleri timüs hücrelerinde CD4 veya CD8 hücrelerini oluşturur ve TCR-CD3 kompleksi içerirler. Sadece ufak bir kısmında kendi moleküllerine karşı temel doku uygunluğu kompleksi (MHC) molekülleri vardır (53). Negatif seçimde, MHC kompleksi ve kendi molekülleri için TCR afinitesi ihtiva eden hücreler tespit edilir. T hücreleri korteksten timüs medüllasına geçiş yapar. Burada timüs epitel hücreleri (mTEC) ve dendritik hücreleri (DC) ile bağlantı kurar. Konakta kendi moleküllerine karşı yüksek afinite gösteren TCR ihtiva eden T hücreleri, antijen sunan hücrelere (APC) sinyal yollayarak apoptosise geçer fakat bu sinyali sunamayan düşük afiniteli TCR içeren T hücreleri elemine edilir. Buna karşın konakta kendi moleküllerine karşı düşük afinite gösteren TCR ihtiva eden T hücreleri, timüs’den sekonder lenfoid organlara göç ederler. mTEC’ler ile karşılaşma sırasında oluşan gen ekspresyonları, otoimmün düzenleyici (AIRE) olarak bilinen transkripsiyon faktörleri tarafından düzenlenir (54). Timüsde ki merkezi toleransın etkilenmesi ile kendi moleküllerine karşı tolerans kaybedilir ve otoimmün hastalıklar oluşabilir. Tüm bu fonksiyona karşın düşük afiniteli T hücreleri negatif seçimden kaçabilir (55). Periferal tolerans burada devreye girerek düşük afiniteli TCR ihtiva eden T hücrelerini düzenler. Bunun ana mekanizmaları anerji, delesyon ve immün baskılamadır. Anerji, yanıt vermeyen T hücrelerinin izlenmesi durumu olarak tanımlanırken, delesyon programlı hücre ölümünün gerçekleştirilmesidir (53, 55). Bağırsakta bulunan bağırsak ilişkili lenfoid doku (GALT) vücudun en büyük immün sistem komponentidir. GALT’ın fizyolojik rolü besinlerle alınan patojenlerden korunma ve önemli molekülleri işlemedir. Burada peyer plakları olarak isimlendirilen alan immün yanıtın gelişimi için önemlidir. Peyer plaklarında bulunan mikrobiyota önemli bir antijenik uyarı kaynağıdır. Burada bulunan özelleşmiş epitel hücreleri M hücreleri adını alır. Tek tabakalı bu epitel hücreleri immün sistemden bağırsak mikrobiyotasını ayırır. Antijen mutlaka mukus tabakasından ve hücre bariyerinden geçmelidir. Mukozal antijenlere karşı oluşan immün yanıt, düzenleyici T hücreleri (T_{reg}) tarafından olur (56). Epitel tabakasının homeostazı da TLR ve NOD benzeri reseptörlerin yerleşimi tarafından etkilenebilir. Örneğin TLR4 epitel hücrelerinin bazolateral tarafında

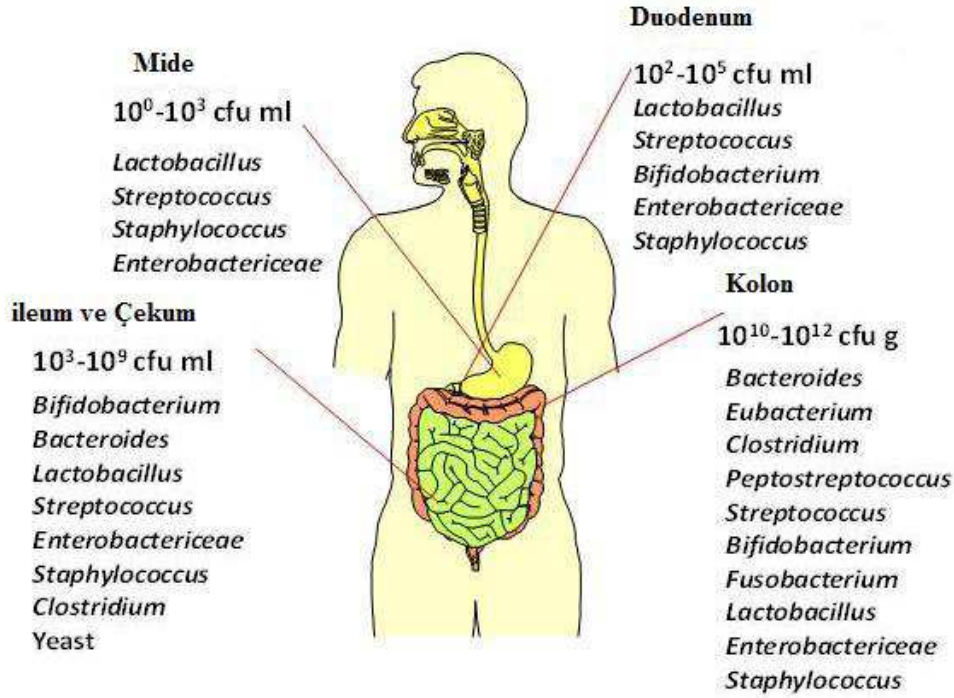
lokalizedir. Sadece IEC'nin bazolateral tarafına ulaşan bakteriler ve PAMP'lar TLR4'ü uyarabilir. Aynı şekilde NOD benzeri reseptörlerin aktive edilmesi için bakteri veya PAMP'ların sitoplazmaya ulaşması gerekir. Buna karşın bakteri epitel bariyeri aşıtıysa, immün yanıt her zaman başlayacaktır (48).

2.4.1. İnce Bağırsak Florası

İnce bağırsak, duodenum, jejunum ve ileum'u içeren, besinlerin enzimatik yıkım ve emiliminin yapıldığı immün sistemin ana parçasıdır. İnce bağırsağın üst kısmında safra, pankreatik sekresyonlar, düşük pH ve hızlı geçiş süresi bakteriyel yoğunluğu engellemektedir (57). Buna karşın ince bağırsağın distal kısmının bakteriyel içeriği ve yoğunluğu fazladır. (58). Numune alımındaki teknik zorluklar nedeniyle ince bağırsağın insanlarda mikrobiyotası iyi araştırılmamıştır. *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Fusobacteria*, *Verrucomicrobia* ve *Actinobacteria*'nın ince bağırsak mukozal mikrobiyotasında olduğu belirtilmiştir (59). İnce bağırsak lümeninin analizi yapıldığında yaşlılarda *Lactobacillus* spp, *Streptococcus* spp, *Enterococcus* spp ve γ -*Proteobacteria* baskın türlerdir (58).

2.4.2. Kalın Bağırsak Florası

İnsan'da kolon, yavaş geçiş zamanı ve zengin besleyici çevre nedeniyle fermentasyonun ana alanıdır. bakteri yoğunluğu fazladır (57). Taksonomik seviyede bakıldığında *Firmicutes* ve *Bacteroidetes* baskındır (60, 61). Sağlıklı bireylerde kolonik ekosistemde *Proteobacteria*'larda ufak farklılıklar görülmektedir (60). Son dönemde belirtilen verilere göre probiotik bakterilerin tüketilmesi bakteri çeşitliliğini arttırmaktadır (62). Şekil 2.1'de bağırsak florası bakteriler ve sayıları görülmektedir (30, 63).



Şekil 2.1: Bağırsak florası ve bakterilerin bölgesel dağılımı (30, 63).

2.4.3. Fekal Flora

Toplanması ve ulaşımının kolaylığı nedeniyle bağırsak mikrobiyotası ile ilgili çoğu insan çalışması fekal veya dışkı mikrobiyotasından yapılmıştır. Fekal mikrobiyota mukozal bakteriler ile lümene yapışmayan mikrobiyota bakterilerinin karışımını temsil eder (64). Kolonik mukoza ilişkili mikrobiyal içeriğin dışkı içeriğinden farklı olduğu gösterilmiştir (65). Tam olarak bilinmemesine karşın, ince bağırsak mukozasına benzer şekilde dışkıda da aynı baskın türlerin oluşu nedeniyle fekal mikrobiyotanın kanalı mikrobiyotasının aynası olduğuna inanılmaktadır. İnsan fekal mikrobiyotasının araştırılması için son yıllarda sekans yöntemleri ile yapılan çalışmalarda elde edilen DNA dizilerinin %90'dan fazlasının *Firmicutes* ve *Bacteriotes*'e ait olduğu saptanmıştır (66).

2.5. İnsan Bağırsak Mikrobiyotasının İşlevleri

Bağırsak mikrobiyotasının işlevleri 3 başlık altında toplanabilir. Bunlar; koruyucu işlevler, immunolojik işlevler ve metabolik işlevlerdir.

2.5.1. Koruyucu İşlevler

Bağırsak yüzeyinde bulunan mikrobiyota, konakta kolonize olabilen potansiyel patojenlerden konağı korur. Epitel ve immunolojik hücreler arasında ilişkiyi sağlar. Ayrıca, gerekli substrat ve mukozal adezyon bölgeleri için dış kaynaklı bakterilerin kolonizasyonu sırasında onlarla yarışır. Bakteriler intestinal mukozaya farklı şekillerde bağlanabilir (67). Hidrojen peroksit, nitrojen oksit gibi antimikrobiyal maddeler ve farklı antimikrobiyal peptitler salabilirler (68, 69). Gastrointestinal sistemde tek katlı epitel hücresi hattı, vücutta luminal içeriği ayırır. Sıkı bağlantılar (TJ), enterositlerden apikal yapışma gösteren dinamik protein kompleksleridir. Bu formlar, paraselüler diffüzyonu ve bazolateral kompartıman ile direkt ilişki için gelen luminal içerikteki mikroorganizmaların ve makromoleküllerin korunması için efektif bir bariyerdirler (70). Bunun yanında proinflamatuvar sitokinleri içeren farklı uyarılar, ekspresyonunu artırabilir, örneğin zono occludens 1 ve occludin, TJ yapısının parçaları olup, geçirgenliğin değişmesine neden olur (71). Yüksek yağlı besinlerle beslenen kemirgenlerde, beslenmeyenlere göre *Lactobacillus* spp, *Bacteroides* spp. *Prevotella* spp. canlı bakteri sayıları düşmüştür. Denature edici gradyent jel elektroforezi (DGGE) analizi bu kemirgenlerde TJ proteinlerini kodlayan gen ekspresyon oranlarının düştüğünü ve bağırsak geçirgenliği artışı ile birlikte bağırsak mikrobiyotasının değişmiş olduğunu göstermiştir (72). Bağırsak geçirgenliği oral olarak laktuloz, mannitol, sukraloz solüsyonlarının uygulanması sonrası idrardan bunların atımının kontrolü ile değerlendirilebilir. Laktuloz/mannitol oranı ince bağırsak bariyer fonksiyonları için bir beliteçken, laktuloz/sukraloz oranı ise distal bağırsak bariyer fonksiyonlarının bir belirteçidir (73). Florasans izotiyosiyonat (FITC)-dekstran ayrıca oral uygulanımı sonrası plazmatik tespitle bağırsak geçirgenliğinin tespiti için kullanılabilir (74). *E.coli*'nin etkilediği bağırsak geçirgenliğinin, *L.plantarum* DSM9843 ile tedavi edilen sıçanlarda inhibe olduğu görülmüştür (75). *L.plantarum* DSM9843 ayrıca hem bağırsaktaki, hemde sistemik immunitiyi etkileyerek *E.coli* ile bağlanma ve kolonizasyon için yarışır, tek başına *E.coli* verilen sıçanlara göre *E.coli* ve *L. plantarum* DSM9843 verilen sıçanlarda immunglobulin A (IgA) konsantrasyonunun daha yüksek olduğu bildirilmiştir. Kommensal bakterilerin varlığının konakta pozitif etki gösterdiği görülmektedir (76). Bağırsak mikrobiyotasının obezitede değiştiği bilinmektedir (77, 78). Obez insanlarda inflamatuvar belirteçlerden biri olan C-reaktif proteini (CRP), seviyesi artmış olarak saptanmıştır. Bu bağırsak geçirgenliğinin değişmesi sonucudur

(73). Interleukin (IL)-6, tümör nekrosis faktör (TNF)- α ve interferon (IFN)- γ plazma konsantrasyonları gibi sistemik inflamasyon belirteçlerinin değişimi artan bağırsak geçirgenliği ile benzer bulunmuştur (79). Probiyotikler bariyer fonksiyonu göstermektedirler. İn vitro ve in vivo olarak probiyotik *L.plantarum WCFS1* alımı sonrası sağlıklı bireylerin duodenumlarında bariyer fonksiyonlarında artış gösterilmiştir (80). Sonuçta bağırsakta kolonize olan kommensal bakterilerin dış kaynaklı enteropatojenlere karşı direnç hattı oluşturarak ve bağırsakta bulunan epitelyal yüzeylerdeki bağlayıcı alanları kapatarak konağa bu patojenlere karşı savunmada katkı yaptıkları bilinmektedir. Ayrıca bu kommensal bakteriler, besin kaynaklarını tüketerek, spesifik bakterosidinler üreterek, intralüminal pH'ı düşürerek ve dış kaynaklı veya normalde bağırsakta kolonize olabilen fırsatçı patojenlerin çoğalmasını kontrol altında tutarak koruyucu etki gösterirler (81, 82, 83, 84).

2.5.2. İmmunolojik İşlevler

Doğumda, yenidoğan mikrop içermeyen intrauterin çevreyi bırakarak antijenden zengin ekstrauterin bölgeye geçer. Bu dönemde, vücudun potansiyel patojenleri ve kommensal bakterileri tanıyarak ayırması çok önemlidir. Böylelikle bu bakterilere karşı uygun yanıt vererek konağı hastalıklardan korur (85). 300-400 m²'yi bulan yüzey alanı nedeniyle gastrointestinal sistem besinsel antijenler, çevresel ajanlar ve patojenik mikroorganizmalarla karşılaşmakta fakat bunlara karşı intestinal epitelyal bariyer, mukozal immun sistem ve bağırsak mikrobiyotası aracılığı ile savunma yapmaktadır (86, 87, 88). Konak bağışıklık sistemi ve dış çevre arasında ana arayüz bağırsak mukozasıdır. Bağırsak ilişkili lenfoid doku (GALT) mezenterik lenf nodları ve payer plakları gibi vücudun en büyük organize olmuş lenf dokusudur (89). Mikrobiyota, payer plaklarında yerleşen bu bağırsak ilişkili lenfoid doku gelişimini etkiler (84). Bağırsaklar vücutta dolaşan lenfositlerin %70'ini içerir, bu nedenle GALT en büyük immunolojik organdır. Bağırsak mikrobiyotasına ait canlı ve cansız antijenler, payer plaklarının üzerinde bulunan özel M hücreleri tarafından alınarak lokal dentritik hücrelerle işlenir ve CD4⁺ regülatör T hücrelerine (T_{reg}) sunulur, bu sırada IL10 ve TGF- β gibi sitokinler aracılığıyla antijenlere tolerans sağlanması öğretilir (86). Bağırsak mikrobiyotasındaki bakteriler, toll benzeri reseptörler (TLR) gibi epitelyal hücre transmembran reseptörleri ile sinyal oluşturarak daha kompleks olan hücre içi sinyal yollarını aktive edebilirler (90). Birçok TLR epitelyal hücre yüzeyinde oluşturulabilir ve

bunların tercih ettikleri ligandları farklı olabilmektedir. Gram negatif bakterilerin lipopolisakkarit (LPS) sinyali TLR4 aracılığıyla (91), Gram pozitif bakterilerin lipoteikoik asit sinyali TLR2 aracılığıyla (92) etki etmektedir. Fötal immun sistem T_h2 fenotipi yönündedir. Doğru uyarım sonrası T_h1 ve T_h2 yanıtları arasında denge gözlenir. Allerji, immun sistemin T_h2 yönüne gidişi sonrası hücrelerden IgE üretiminin artışı ile gelişir (85). Yoğun uyarımı engelleyerek, mikrobiyal komponentleri yakalayan salgısal IgA, bağırsak humoral immun sistemin önemli komponentlerinden birisidir. Salgısal IgA seviyelerinin yaşamın ilk yılında *Bifidobacterium* spp. çeşitliliği ile benzer olduğu ve allerji riskini azalttığı saptanmıştır (93). Bağırsak mikrobiyotasındaki bakteriler, immun sistem hücrelerini farklı uyarırlar, örneğin Gram pozitif bakteriler IL-12 ve IFN-gama'yı uyarırlarken, Gram negatif bakteriler IL-6, IL-8 ve IL-10'u uyarırlar (94). Farklı immun yanıtların oluşmasına uyarımın ve farklı antijen tiplerinin katkı sağladığı ifade edilmektedir. Konak immun sistemi ile bağırsak mikrobiyotası arasında çok kompleks bir çapraz reaksiyon durumu bulunmaktadır. Örneğin *B.fragilis*, LPS'e sahip, Gram negatif bir bakteridir. Polisakkarit A etkisi ile ayrıca regülatuar hücrelerde anti-inflamatuvar sitokinlerin uyarımını sağlamaktadır (90).

2.5.3. Metabolik İşlevler

Bu işlevler; insanlarda bulunmayan biyokimyasal yolların ve enzimlerin konak için mikroflora tarafından sağlanmasıdır. Konağın metabolik işlevleri için gerekli olan kısa zincirli yağ asitlerinin (SCFA) korunması, Vitamin K yapımı, besinsel sindirilemeyen karbonhidratların (NDC) sindirilmeside bu işlevler arasındadır (95, 96). SCFA üreten bakteriler özellikle kolon epitelinin farklılaşması için trofik etkilidir. NDC'ler arasında asetat, propionat, bütirat ve laktat gibi ürünler kolon epiteli için önemli bir besin kaynağıdır ve konak metabolik fonksiyonları için gereklidir (97). Vitamin K, lipofilik bir vitamindir ve bağırsak'daki bakteriler tarafından sentezlenir. Bu vitamini *B.fragilis*'in ve *E.coli*'nin sentezleyebildiği, *Bifidobacterium* spp'nin ise sentezleyemediği gösterilmiştir (98, 99). Bu vitamin enzimler için esansiyel bir kofaktördür. Eksikliği yeni doğanlarda hemorajik hastalıklarla ilişkilendirilmiştir. Yeni doğanlarda endojen vitamin K yoktur ve anne sütünden sınırlı miktarda alır (99). Vitamin B12, yine bağırsaktaki bakterilerin ürettiği vitaminlerden biridir. Bu ince bağırsakta absorbe olur. Beslenme ile almalıdırlar, fötal yaşamda ve yeni doğanda vitamin B12 büyüme ve sinir sisteminin gelişimi için gereklidir (100). Bağırsak

bakterileri üre ve amonyumdan amino asitleri sentezleyebilirler (101). *Lactobacillus* spp, *Lactococcus* spp, *Bifidobacterium* spp, *Pediococcus* spp, *Enterococcus* spp, *Streptococcus* spp ve *Propionibacterium* spp gibi kommensal bakteriler linoleik asit gibi esansiyel yağ asitlerini ve bunların izomerlerini üretebilirler (102, 103). İnce bağırsakta enzimatik yıkılımdan kaçarak sindirilemeyen karbonhidratları bağırsaktaki bakteriler fermente edebilirler ve kısa zincirli yağ asitleri (SCFA) olan asetik asit, propionik asit ve bütirik asite çevirebilirler (104). Besinsel proteinler, pankreatik enzimler, mukus, parçalanmış epitel hücreleri ve ölü bakteriyal hücreler gibi substratlarda bağırsak bakterileri tarafından SCFA'ya çevrilir (57, 104). Kolon hücreleri için bütirik asit ana enerji kaynağıdır ama SCFA dolaşıma girer ve diğer dokularda metabolize olur (104). Bütirat, T hücrelerinin apoptoza girişini arttırırken, fas geninin düzenlenmesini arttırarak, inflamasyon halinde olan kolonik mukozaya T hücrelerin akışını azaltır (105). Anne sütünde bulunan oligosakkaritler *Bifidobacterium* spp ve *Bacteroides* spp gibi bakteriler tarafından fermente edilir (106).

2.6. Bağırsak Florasını Etkileyen Faktörler

Bağırsak florasını (mikrobiyotasını) etkileyen faktörler iç ve dış faktörlerdir. İç faktörler (yaş, cinsiyet, konağın genetik yapısı vb.) ve dış faktörler (stres, ilaç kullanımı, beslenme alışkanlıkları, coğrafik yerleşim..vb.) gastrointestinal mikrobiyotadaki kolonizasyonun çeşitliliğini etkileyebilmektedir (107).

2.6.1. Yaş

Yeni doğanların gastrointestinal yollarında bakteriyel kolonizasyon, doğum şekli, erken doğum, beslenme şekli, (anne sütü, hazır gıdalar), çocukların veya annenin antibiyotik kullanması, yaşam şekli ve yaşanan lokasyona göre etkilenebilir (108, 109, 110, 111, 112, 113, 114). En erken kolonize olan bakteriler genelde fakültatif anaerobik olan *Enterobacteriaceae*, *Streptococcus* spp ve *Staphylococcus* spp'dir Daha geç kolonize olma eğiliminde olan bakteriler zorunlu anaerob olan *Bifidobacterium* spp, *Clostridium* spp ve *Bacteroides* spp.'lerdir (108, 115, 116, 117, 118). Normal doğum yapan annelerin yeni doğan bebeklerinde, doğumdan sonra ilk 24 saatte rektal mikrobiyota, bebeğin doğum sırasında annesinden aldığı vajinal mikrobiyotaya benzemektedir. Özellikle baskın türler, *Lactobacillus* spp ve *Prevotella* spp.'dir. Sezeryanla doğum yapan annelerin yenidoğan bebeklerinde, bebeğin rektal mikrobiyotası, derideki bakterilere benzemektedir. Özellikle baskın tipler

Staphylococcus spp., *Corynebacterium* spp. ve *Propionibacterium* spp.'dir (119). Bağırsak mikrobiyotası incelendiğinde, sezeryanla doğmuş bebeklerin, normal doğan bebeklere göre *Bifidobacterium* spp. seviyesi düşük, *Bacteroides* spp. seviyesi yüksek saptanmıştır. 1 yaşına geldiklerinde toplam bağırsak mikrobiyotasındaki bakteri sayısı normal doğan bebeklerde, sezeryanla doğan bebeklere göre yüksektir (108, 120). Erken doğan bebeklerdeki bağırsak mikrobiyotası, zamanında ve normal doğmuş bebeklerdeki bağırsak mikrobiyotasına göre daha az çeşitlidir. Ana bakteriyel gruplar; *Enterococcus* spp., *Streptococcus* spp, *Staphylococcus* spp ve *Clostridium* spp.'dir. *Bifidobacterium* spp, *Bacteroides* spp. ve *Lactobacillus* spp. miktarları daha düşüktür (110, 113, 121, 122, 123). Çok sayıda çalışmada *Bifidobacterium* spp'nin anne sütü ile beslenen bebeklerde, beslenmeyenlere göre baskın olduğu belirtilmektedir (108, 114, 125, 126, 127, 128).

Özellikle anne sütü ile beslenen 3-6 haftalık bebeklerde *Bifidobacterium* spp. sayıları fazladır. 3-6 haftalık ama hazır gıda ile beslenen bebeklerin mikrobiyotası hazır gıda ile beslenenlere göre daha çeşitli olduğu saptanmıştır. *Bifidobacterium* spp. miktarı düşük, *Bacteroides* spp, *Lactobacillus* spp.ve *C. difficile* miktarları yüksektir (108, 111, 114, 127, 128). Anne sütü ile beslenen 2 yaşındaki çocuklarda hazır gıda ile beslenen çocuklara göre yüksek sayıda *Enterococcus* spp. bildirilmiştir (112). Yaşamlarının ilk yılı veya yıllarında antibiyotik alan çocukların mikroflorasında, *Enterococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Bacteroides* spp ve *Bifidobacterium* spp. miktarları antibiyotik almayanlara göre daha düşük saptanmıştır (111, 112). Yaşam tarzı bağırsak mikrobiyotasının gelişimi ile ilişkili görülmüştür. Kısıtlı antibiyotik kullanan, sebze tüketimi fazla olarak yaşayan “antroposofik” çocuklarda ki bağırsak mikrobiyotasında, herşeyi yiyen çocuklara ve çiftlikte hayvanlarla temas halinde yaşayan taze süt tüketimi fazla olan çocuklara göre daha yüksek bakteriyel çeşitlilik bildirilmiştir. Taze süt tüketimi fazla olan çocukların bağırsak mikrobiyotası, antroposofik ve herşeyi yiyen çocuklara göre en düşük bakteriyel çeşitlilik görülmüştür (129).

Yeni doğanların bağırsak mikrobiyotası, annenin doğum sırasındaki kilosunu ve hamilelik sırasında aldığı kilo ile de ilişkilidir. Anneleri aşırı kilolu, 6 aya kadar olan bebeklerde, anneleri normal kilolu ve hamileliği sırasında normal oranda kilo alan annelere göre dışkıda *Bacteroides* spp ve *Staphylococcus* spp. miktarlarının yüksek, *C.difficile* miktarının ise düşük olduğu belirtilmiştir (130). 1 yaşının sonunda ve

erişkinler ile aynı yemeği yiyen çocuklarda bağırsak mikrobiyotası erişkinler ile benzer olmaya başlamıştır (116, 131). Fekal bakteriyel çeşitlilik bu dönemde düşüktür (132). 2. yaşının sonunda olan çocuklarda ise filogenetik içeriği erişkin benzeri hal almıştır (133, 134). Ağız bakımı, tükürük fonksiyonları, sindirim, yavaş bağırsak geçiş süresi, beslenmenin değişmesi ve fiziksel aktivite gastrointestinal mikrobiyotayı yaşla birlikte etkileyebilir. Yaşlı bireylerde daha sabit bir mikrobiyota olduğu bildirilmiştir (135, 136, 137). Buna karşın, mikrobiyotaları daha çeşitlidir ve ana gruplar genç bireylere göre fark içerebilir (135, 136, 138). Yaşlı bireylerin çoğunun mikrobiyotalarında, genç bireylere göre bifidobakteriler daha düşük oranda bildirilmiştir (136, 137, 139, 140). Bifidobakterilerin düşüklüğü vitamin ve proteinlerin sentezi, sindirim ve emilimde supplementler gibi farklı fonksiyonları ve immun sistem fonksiyonlarını etkileyebilir (140, 141). Fransa, İtalya, İsveç, Hollanda ve Finlandiya gibi ülkelerden bildirilen çalışmalarda *Bacteroides* spp. – *Prevotella* spp. grubu yaşlı bireylerin bağırsak mikrobiyotasında bulunan bakteri sayısının, gençlere göre düşük, Almanya ve Avusturya'dan bildirilen çalışmalara göre ise yüksek sayıda olduğu görülmektedir (126, 135, 139).

2.6.2. Cinsiyet

Cinsiyetin bağırsak mikrobiyotasına etkisini inceleyen fazla çalışma bulunmamaktadır ancak bazı araştırmalarda cinsiyete göre saptanan farklar belirtilmiştir. Dışkıda *Bacteroides* spp.– *Prevotella* spp. bakterilerinin miktarının erkeklerde kadınlara göre daha yüksek olduğu gösterilmiştir (139, 142). Anatomik, hormonal ve diğer fizyolojik farklar gibi karıştırıcı faktörlerin olması dolayısıyla cinsiyetler arası farklılıkları tespit etmek kolay değildir. Hatta sağlıklı kadınlar arasında stres ve hormonal fark yaratabilecek, premenepozal ve post menepozal durum olması fark oluşturabilecek faktörler olabilirler (143).

2.6.3. Genetik Özellikleri

Genetik, bağırsak mikrobiyotasını etkileyen faktörlerden birisidir. Özellikle tek yumurta ikizlerinin birbiri ile ilişkisi olmayan bireylere göre benzer fekal mikrobiyotasının olduğu bildirilmiştir. Hatta ikizler ve onların annelerinin, akraba olmayan bireylere göre daha benzer fekal mikrobiyotası olduğu gözlenmiştir. Bu bulgular bağırsak mikrobiyotasını ve bağırsaktaki bakteriyel kompozisyona konağın genotipik etkisi olduğu sonucunun çıkarılmasına neden olmuştur (144, 145, 146, 147).

2.6.4. Coğrafik konum

Genetik faktörler yanında, konağın coğrafik konumunda bağırsak mikrobiyotası ilişkisi için incelenmiştir. Avrupada bazı ülkeler arasında farklılıklar bildirilmiştir. İtalyan erişkin çalışma grubunda diğer avrupa ülkelerinin çalışma gruplarına göre 2 veya 3 kat fazla oranda *Bifidobacterium* spp. saptanmıştır. Diğer bakteriler yönünden anlamlı fark saptanmamıştır (45, 139). Kuzey avrupa ülkelerindeki bebeklerin bağırsak mikrobiyotasında, güney avrupa ülkelerindeki bebeklerin bağırsak mikrobiyotasına kıyasla daha fazla *Bifidobacterium*spp. bildirilirken, güney avrupa ülkelerindeki bebeklerde ise, *Bacteroides*spp. sayısı ve mikrobiyota çeşitliliğinin fazla olduğu gösterilmiştir (108). Farklı kıtalar içinde bu çalışmalar yapılarak durum incelenmiştir. Avrupa ve kuzey amerika kıtasından katılan bireylerin dışkı mikrobiyotası, güney amerika, afrika ve çinli bireylerin fekal mikrobiyotasından farklıdır (46, 133, 142).

2.6.5. Beslenme

Genellikle sağlıklı yetişkinlerde mikrobiyal toplulukların kompozisyonunu etkileyen başlıca dış faktörler büyük besinsel değişiklikler ve antibiyotik tedavisidir. Beslenmenin mikrobiyota üzerindeki etkisi tümüyle açık değildir. Buna karşın normal kontrollü diyet değişimleri nedeniyle bazı bakteri gruplarında değişimler gözlenmiştir. Yüksek proteinli diyet (148, 149), prebiyotikler (150, 151, 152), probiyotikler (153, 154, 155, 156, 157), kilo kaybettiren beslenme (78, 158, 159) ve çilekle (160) beslenme durumu araştırılmıştır. Besinsel faktörler, bağırsak mikrobiyotası ve konak metabolizmasının interaksiyonunun konağın hemostazının ve sağlığının korunmasındaki rolünün giderek önem kazandığını belirtilmektedir (161, 162). Beslenme bakteriyel metabolizmayı etkileyebilir, spesifik besinlerle beslenme sağlık için fark yaratabilir. Örneğin, yüksek sığır etiyle beslenen bireylerin dışkı florasında, etsiz beslenen bireylerin dışkı florasına göre *Bacteroides* spp. *B.vulgatus*, *B.fragilis* ve *Clostridium* spp'lerin miktarlarının arttığı, *Bifidobacterium adolescentis*'in ise miktarının düştüğü gösterilmiştir (162, 163, 164). Yüksek sığır etiyle beslenen bireylerde, sülfid konsantrasyonu yüksektir. H₂S kolon epitelinde bazı sülfid kullanan bakterileri seçici olarak çoğaltarak toksik etki yapabilmektedir (162, 163, 164). Alışlagelen beslenme alışkanlıkları bağırsak mikrobiyotasını etkileyebilir. Örneğin yüksek karbonhidratla beslenen Japonya, Hindistan ve Uganda'lı bireylerin bağırsak mikrobiyotası batılı toplumlardaki bireylerle karşılaştırıldığında *Bacteroides* spp

miktarının düşük, *E.coli* ve *Enterococcus* spp. miktarının ise yüksek olduğu görülmüştür (165, 166). Dünyanın farklı bölgelerinin alışlagelmiş beslenme alışkanlıklarının da bağırsak mikrobiyotasını etkileyebildiği belirtilmektedir. Nişasta, lif ve bitki polisakkaritlerinden zengin, yağ ve hayvansal proteinlerden fakir beslenen africa'lı çocukların bağırsak mikrobiyotasında, düşük lifli, yüksek hayvansal protein, yağ, şeker ve nişasta içeren besinlerle beslenen Avrupa'lı çocuklara göre, *Bacteroidetes* ve *Actinobacteria*'ların yüksek, *Firmicutes* ve *Proteobacteria*'larının düşük sayıda olduğu belirtilmiştir (46). Sıkı vejeteryanların, herşeyi yiyen kişilere göre bağırsak mikrobiyotasında *E.rectale* – *B.coccoides* grup ve *C.ramosum* grubu bakterilerin oranının yüksek olduğu görülmektedir. (167).

Probiyotikler, sindirim sisteminde belirli sayıda bulunan ve tüketildiğinde bireyin bağırsaklarındaki bakterilerin sayıca dengesini sağlayarak sindirim sistemi ve bağırsak sağlığını koruyan canlı mikroorganizmalar ve/veya bileşenleri tanımlamaktadır (168). En önemli probiyotikler, *Lactobacillus* spp ve *Bifidobacterium* spp. türleridir (169). Bazı çalışmalar probiyotik kullanımının bağırsak mikrobiyotasını etkilediğini belirtmektedir. Örneğin probiyotik etkili *L.rhannosus* GG ile beslenme sonrası, yeni doğanların bağırsak mikrobiyotasının bakteriyel çeşitliliğinin, beslenmeyenlere göre artmış olduğu bildirilmiştir (154, 170). Erken doğan bebekler, *Bifidobacterium animalis subs lactis* Bp12 ile beslenmeleri durumunda, bu bebeklerin bağırsak mikrobiyotasında, bu şekilde beslenmeyen bebeklere göre *Enterobacteriaceae* ve *Clostridium* spp sayısı düşmüştür (155). Prebiyotikler, bağırsaklarda yaşayan yararlı bakterilerin sayısını, aktivitesini ve probiyotiklerin etkisini arttıran sindirilmeyen bileşenlerdir (171). Şu an bu tanımlamaya uyan prebiyotikler; inulin, fruktooligosakkaritler (FOS), galaktooligosakkaritler (GOS) ve laktulozdur (172). Bu prebiyotiklerin, *Bifidobacterium* spp. popülasyonu ve *Lactobacillus* spp. bakterilerini arttırdığına yönelik çalışmalar vardır (152, 172, 173).

2.6.6. Antibiyotik kullanımı

Antibiyotik tüketimi, konağın mikrobiyotasını etkileyen dış faktörlerden birisidir. Farklı tip antibiyotikler, farklı etki mekanizmaları ile bağırsak mikrobiyotasında farklı etki gösterirler, ayrıca konağın yanıtıda burada farklı olabilir (174, 175).

2.6.7. Sağlık Durumu, Yaşam Şartları ve Stres

Bağırsak mikrobiyotasını etkileyen diğer faktörler; sağlık durumu, konağın yaşam şartları ve konağın stres durumudur. İskoçyada hastanede yatan yaşlı bireylerin bağırsak mikrobiyotasındaki bakteriler, sağlıklı yaşlı bireylerle karşılaştırıldığında *Bacteroides* spp – *Prevotella* spp grubu bakterilerin mikrobiyotada düşük olduğu, *Enterococcus faecalis*'in ise mikrobiyota'da yüksek olduğu saptanmıştır. Tabii burada antibiyotik kullanımı ile birlikte *Bifidobacterium* spp'de de düşüş gözlenmiştir (176). Streste bağırsak mikrobiyotasını etkileyebilir. Sinirsel stres'in, dışkıda bulunan *Bacteroides thetaiotaomicron* sayısını arttırdığı, duygusal stresin ise dışkıda bulunan *Lactobacillus* spp. ve *Bifidobacterium* spp sayısını düşürdüğü bildirilmiştir (177, 178).

2.7. Hijyen Hipotezi ve Hastalıklarla İlişkisi

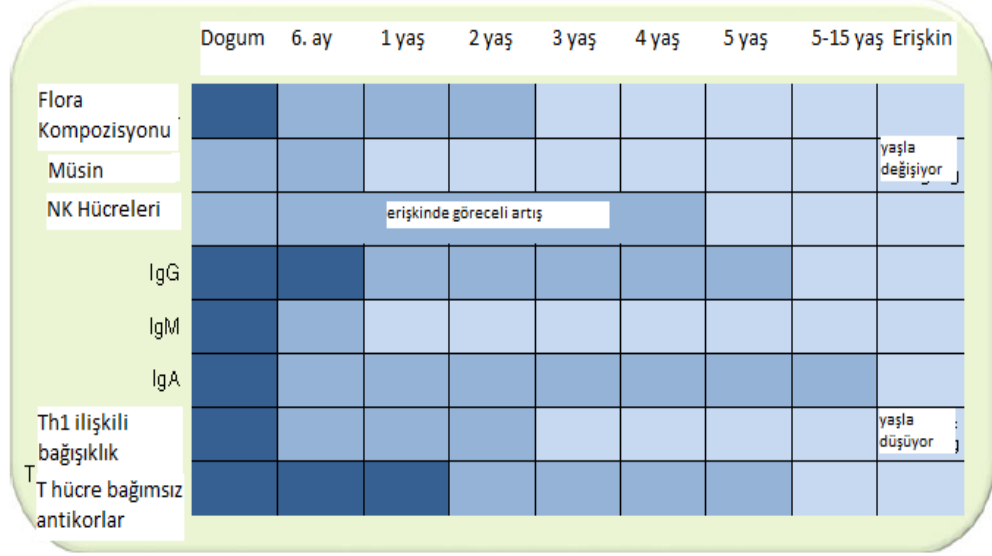
1989 yılında Strachan tarafından bildirilen hijyen hipotezine göre; mikroorganizmalara az maruz kalan kişilerde T_h2 yanıtının artması ve T_h1 ile ilişkili hücresel immun yanıt seviyesinin azalmasına bağlı olarak ilerleyen süreçte immun sistemle ilişkili hastalıklarda artış görülmektedir (179). Bu hipoteze göre kazanılmış immun sistemin gelişimi, hijyen düzeyinin artışı ile direkt ilişkilidir yani aşırı temiz ve hijyenik ortamda yetişen bireylerdeki immun sistem ilerleyen süreçte karşılaşacakları mikroorganizmalara karşı deneyimsiz ve yetersiz kalmaktadır (90, 179, 180). Bu hipotez, astım, allerjik dermatit, T1DM ve IBD gibi hastalıkların ekonomik ve sağlık alanında gelişmiş ülkelerdeki prevalanslarının, Peru, Kosta Rika, Brezilya ve Güney Afrika gibi ülkelere daha yüksek olmasına da böylelikle açıklama olabilmektedir (181, 182, 183).

Kazanılmış immun sistemin ana komponentlerinden biri $CD4+$ T hücreleridir. Bağırsakta lamina propria'da lokalizedirler. Saf $CD4+$ T hücreleri uyarı sonrası, yardımcı T hücreleri (T_h)1, T_h2 , T_h3 , T_h9 , T_h17 , düzenleyici T hücreleri (T_{reg}) ve foliküler yardımcı T hücreleri (T_{fh}) olmak üzere farklı alt tiplere dönüşür ve farklı immunmodulatorlerin salınması için aktive edilirler. (31, 105, 184, 185). T_h1 T lenfositleri, IL-2, interferon (IFN)-g ve TNF-a gibi hücre aracılı immunité ile ilişkilirken, T_h2 T lenfositleri, IL-4, IL-5, IL-6 ve IL-13 üreterek IgE üretimine ve allerjik yanıtla ilişkilidir (186). 1980'li yıllardan beri otoimmun etyopatogenezi bilinen T1DM'da çevresel faktörlerin etkisi ile MHC sınıf II molekülleri, makrofaj ve antijen sunan hücrelerin yüzeyinde çoğalır ve $CD4$ hücre yüzey reseptörleri ile birleşerek

pankreas beta hücrelerine karşı otoimmün aktivasyon başlar (187). Bunun sonucunda T hücre yüzeyindeki CD3 ile MHC sınıf II molekülleri birleşerek T lenfositlerinin aktivasyonu ve IL-1 β , TNF- β ve IFN- γ salınımı ile insulin üreten beta hücrelerinin yıkımı gerçekleşir (188, 189). Hijyen hipotezini destekleyen güçlü argümanlar infeksiyon hastalıkları görülme sıklığı ile allerjik ve otoimmün hastalıkların görülme sıklığı arasındaki ters oranlı verilerden gelmektedir (190, 191). Hijyen durumu ve T1DM görülme sıklığı arasında da negatif bir korelasyon gösterilmiştir. Kuzey İrlanda'da yapılan bir çalışmada en düşük T1DM görülme sıklığı, hijyen düzeyi en düşük durumda bulunan noktada olduğu görülmektedir (192). Ayrıca çocuklarda yapılan bir çalışmada da, en düşük infeksiyon oranının saptandığı noktada T1DM görülme sıklığının fazla olduğu bildirilmiştir (179). Hayvan modellerinde yapılan çalışmalarda da tek bir kommensal bakteri grubunun CD4+ T_h hücrelerinden T_h17'nin lamina propria'da IL-17 ve IL-22 üretimini arttırdığı ve mikrobiyotayı etkilediği göstermiştir (184, 193). Hatta ilginç şekilde bağırsak mikrobiyotasında bulunan *Candidatus arthromitus* gibi segmente filamantöz bakterilerin T1DM'dan koruduğu belirtilmiştir (194). Hijyen hipotezi ve otoimmün hastalıklar arasında tüm bu bilgilere rağmen kesin kanıtlar bulunamamıştır. Gelişmiş ülkelerde, T1DM frekansının artışı için infeksiyonların sıklığının azalması ana açıklamalardan sadece biridir (191).

2.8. Bağırsak florasının immün sisteme etkisi

Insan bağırsak mikrobiyotası hem doğal, hemde kazanılmış bağışıklığı etkilemektedir (31). Bu ve immün sistemin gelişimini şekil 2.2'de görebiliriz (195).



Şekil 2.2: Floranın ve immun sistemin zaman içinde değişimi

(Koyu Mavi – yetersiz, mavi – gelişen ve açık mavi – gelişmiş seviyeyi göstermektedir.) (195).

2.8.1. Doğal İmmun Sistem ve Bağırsak Florası

Antijen sunan hücreler, nötrofiller, monositler, makrofajlar, NK hücreleri, mast hücreleri ve bağırsak epitel hücreleri, bağırsaktaki doğal bağışıklığın önemli hücreleridir (31). Payer plaklarında bulunan antijen sunan hücrelerden olan dentritik hücreler (DC), yüksek seviyede IL-10 üretimini sağlarlar. DC'ler bağırsaklarda, PAMP'larla karşılaştığında TLR'leri uyarmak için proinflamatuvar sitokinleri uyardıktan sonra bunu yapabilen tek makrofaj grubu olan bağırsak makrofajlarını uyarırlar (196). DC'ler ayrıca bakteri kaynaklı adenosin trifosfatlarla (ATP) karşılaştığında yüzeyinde ekspres ettiği CD70 ve CXCR1 ile T_h hücrelerinin T_h17 'ye farklılaşmasını sağlayabilirler. Mast hücreleri bağırsağın lamina propriasında bulunan hücrelerdir ve düzenleyici fonksiyonları vardır. Özellikle bağırsak epitel hücrelerinin elektrolit dengesini kurmasını sağlarlar (31). Doğal bağışıklıkta bazı hücrelerin gelişimi direkt olarak bağırsak mikrobiyotasındaki bakterilere bağlıdır, özellikle dikkat çekici olan bağırsak epitel hücreleridir (IEC), çünkü bu hücreler farklı sitokin üretimlerine neden olan makrofajlar gibi bağışıklık sistemi hücreleri ile doğrudan ilişkilidir (10). Örneğin yapılan bir çalışmada mikrobiyotası olmayan farelerdeki IEC'lerin, normal mikrobiyotalı farelerdeki IEC'lere göre daha yavaş işlem yaptığı gözlemlenmiştir (197). IEC'ler antijen sunumunda ve antijenlerin içeri alınarak işlenmesinde görevleri olan

hücrelerdir, böylelikle CD8+T hücrelerinin aktiflenmesini (10,198), dentritik hücrelerin (DC) IL10 gibi faktörler üretimini sağlayarak tolerogenik DC yanıtının oluşmasını sağlar (199). Tüm bu görevleri dolayısıyla IEC, doğal bağışıklıkta çok önemli bir rol üstlenmiştir, bunun değişmiş bağırsak mikrobiyotası sonucu hatalı veya eksik çalışması sonrası otoimmünite gelişecektir (10). Doğal bağışıklık, bakterilere spesifik reseptör taşıyan hücrelerdeki, patern tanımlama reseptörleri (PRR) ve lizozim, komplement veya antimikrobiyal peptidlerden olan defensinler gibi moleküllere dayanır (200, 201). PRR'ler bağırsak lümenindeki patojen ilişkili moleküler yapıları (PAMP) tanıyarak doğal bağışıklığı başlatır. Birçok çalışmada PRR, TLR olarak belirtilir (43). Bunlar birlikte patojenlerin istilası durumunda inflamatuvar yanıtı tetikleyerek sınırlama sağlarlar. Patojenlerin hızlıca yok edilmesi yanında, doğal bağışıklık, mikrobiyota ile konağın simbiyotik ilişki göstermesine katkı sağlar. Myeloid farklılaşma faktörü 88 (MyD88) eksik farelerde yapılan bir çalışma bağırsak mikrobiyotası ile mutualizm'in doğal bağışık yanıt için ne kadar önemli olduğunu göstermiştir. TLR sinyal yolundaki adaptör proteinlerin eksikliği olduğu için mikropları tanıyamayan MyD88 eksik fareler bağırsak inflamasyonuna yatkın hale gelmişlerdir (200). Ayrıca MyD88 ve TLR5 eksik olan farelerde bakteriyel toplulukların normal farelere göre farklı olduğu bildirilmiştir (202, 203). Diğer doğal bağışıklığı tetikleyebilecek ligant NOD benzeri reseptörlerdir (NLR). NLR sinyalinin defekti de mikrobiyota kompozisyonunu etkiler. Örneğin, NOD1 eksikliği *Clostridium* spp., *Bacteroidetes* ve *Enterobacteriaceae* ailelerinin ince bağırsağın alt segmentinde sayılarının değişmesine neden olur (204). NOD2 eksikliği ise *Bacteroidetes*'lerin aşırı çoğalmasına, bu da IL-6'nın sürekli üretimini sağlayarak bağırsağın neoplastik değişimlerine ve ülserasyonuna neden olur. NOD2, panet hücrelerinde ekspresye olur eksikliğinde alfa defensin ve yeniden oluşturulan adacık protein 3 gama (Reg III γ) gibi antimikrobiyal etkinliği olan peptidlerin ekspresyonunda düşüş meydana gelmektedir (205, 206). Antimikrobiyal etkinlikleri olan bu peptitler bağırsak mikrobiyotasının içeriğinin şekillendirilmesi için önemlidir. α -defensin eksikliğinde bağırsak mikrobiyotasındaki bakteri dengesi *Firmicutes*'lere doğru kayar, *Firmicutes*'lerde artış ve *Bacteroidetes*'de düşüş meydana gelecektir (207). Reg III γ , MyD88 aracılı sinyali başlatır ve Gram pozitif bakterilerin kontrolünü sağlar (208). Diğer NLR proteini, inflamazom adı verilen sitoplazmik kompleks içeriğinde yer alan çeşitli NLRP üyeleridir. Farelerin kolon epitelinde NLRP6 eksikliği sonucunda IL-18 seviyesinde azalma ve fekal mikrobiyotada özellikle *Bacteroidetes* ailesinden

Prevotellaceae'nin artışı görülür (209). Sonuç olarak doğal bağışıklık, sadece bağırsak patojenlerinin elemine edilmesinde değil, ayrıca sağlık için bağırsak mikrobiyotasında mikrobiyal toplulukların ekolojik dengesinin korunmasında önemli rol oynar (201).

2.8.2. Kazanılmış İmmun Sistem ve Bağırsak Florası

Kazanılmış immün sistemde bağırsak florası tarafından etkilenmektedir (10, 210). Kazanılmış immün sistem veya adaptif immün sistemin ana komponentleri, T ve B hücre reseptörleri, onların ko-reseptörleri, MHC ailesi üyeleri veya Rag genini içeren transposable elementlerdir (211). CD4+ T hücreleri kazanılmış immün sistemin ana komponentlerinden biridir. Bağırsakta lamina propria'da lokalizedir. Saf CD4+ T hücreleri uyarı sonrası Yardımcı T hücreleri (T_h)1, T_h2, T_h3, T_h9, T_h17, foliküler yardımcı T hücreleri (T_{fh}) ve düzenleyici T hücreleri (T_{reg}) olmak üzere farklı alt tiplere dönüşür. T_h1 ve T_h17 uyarımı otoimmün hastalıklarla ilişkilidir (31, 105, 184, 185). Bağırsakta IL17 sekrete eden T_h17 hücreleri, bağırsak mikrobiyotasının gelişimi için gereklidir. (184, 193, 212, 213). Enfeksiyonlara karşı etkili bir B hücre yanıtı için, CD4+T yardımcı hücrelerinin B hücrelerine yardım etmesi gerekir. T_{fh} hücreleri ise bu CD4+T yardımcı hücreleri içinde, antijen spesifik B hücrelerine yardım eden T hücre grubudur. T_{fh} hücreleri antijenlere karşı humoral immün yanıtın uzun süreli canlı kalmasını sağlar (185). T_{reg}'ler, ağızdan alınan antijenlerin ve mikropların immunolojik toleransın sağlanmasında anahtar hücrelerdir. Bunun fonksiyonunun kaybı otoimmün hastalıklara yol açar (31, 214, 215). T_{reg}'ler, uyarıldıklarında, IL10 ve TGF- β gibi antiinflamatuvar sitokinlerin salgılanmasını da sağlayarak, hem doğal, hemde kazanılmış bağışıklıkta yer alırlar (10, 210, 216, 217). Bağırsak mukozasında yerleşen FoxP3+ T_{reg} hücreleri özellikle T1DM gibi otoimmün hastalıklarla ilişkilendirilmektedirler. Lamina propria'da bulunan CD103+CD11c+ dentritik hücreler (LPDC) FoxP3+ T_{reg} hücrelerinin gelişimini düzenler (218). Bağırsakta bu hücrelerin hatalı değişimi sonrasında GALT ve bağırsak mukozaları ile direkt ilişkili dokularda immunolojik tolerans kaybedilir (219). CD+8 T hücreleri, bağırsağın intraepitelyal kısmında diğer T hücrelerine göre yoğun oranda bulunan hücrelerden birdir. Bağırsak mikrobiyotasında, periferal immün sistem hücrelerinden B hücrelerinin, dentritik hücrelerin ve NK hücrelerinin ayarlanmasında önemli rol oynadıkları düşünülmektedir ana kommensal bakterilere etkisi tam olarak bilinmemektedir (201, 220). Diğer önemli bir komponent olan bağırsak ilişkili B hücreleri payer plaklarında bulunurlar ve IgA

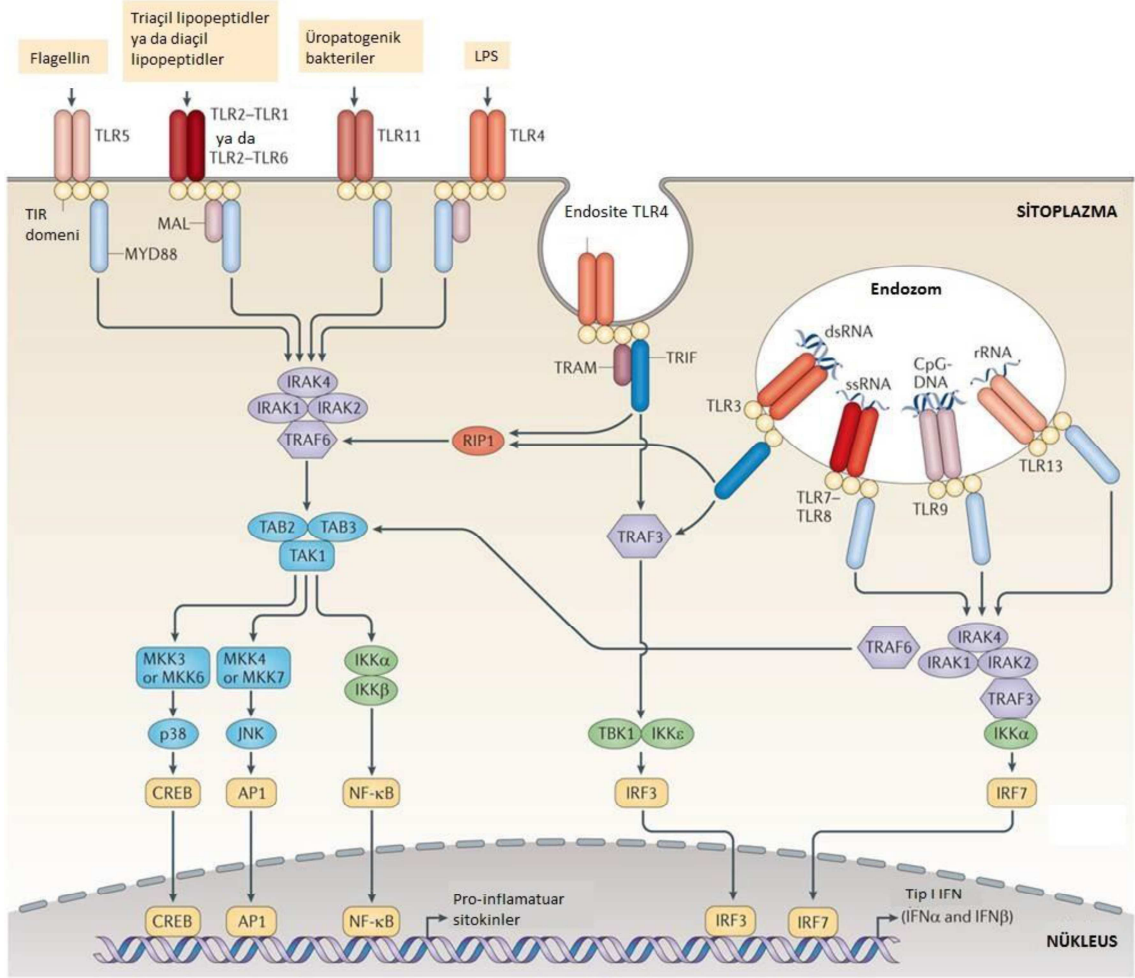
salgılayan plazma hücreleridir (31). Bağırsaktaki dentritik hücrelerinin (DC), B hücreleri uyarımı sonrası bu B hücrelerinin ürettikleri bu salgısal IgA (sIgA) ile mukozal immunitenin sağlanmasında anahtar işlev yapmaktadır. sIgA bağırsak patojenlerinin epitele yapışmasını ve konağa giriş yapmasını veya toksinlerini kullanmalarını engeller (201). Ayrıca sIgA bağırsak mikrobiyotasını kaplayabilir. Sıklıklar sIgA2 alt sınıfı bu işlevde baskındır. sIgA2 bakteriyel proteazların degregasyonuna daha dirençlidir. TLR'ler aracılığıyla uyarılan IEC'ler çoğalmayı arttırıcı ligand (APRIL)'ı arttırarak sIgA2'yi, sistemik sIgA1 formuna çevirebilir. Bu mekanizma bağırsakta dolaşan mikrobiyotaya yanıtın arttırılarak sistemik immün yanıtı geçişe engel olur (221).

2.9. Toll-Like Reseptörler (TLR)

Toll-like reseptörler (TLR), vücuda giren mikroorganizmalar tarafından üretilen PAMP'ları tanıyan, bağışık yanıt aracılığıyla doğal immün cevabın oluşmasını sağlayan tip 1 transmembran proteinleridir (222). 1985 yılında Toll geni ilk kez Nobel ödüllü Christiane Nüsslein-Volhard, Eric Weischaus ve arkadaşları tarafından *Drosophila melanogaster*'de tanımlanmıştır. Bu sineklerin embriyogenezinde önemli bir rol oynadığı mutant olan sineklerin fungal infeksiyonlara yatkın olduğu ortaya konulmuştur (223). Yıllar sonra 1997 yılında insanda homoloğu tarif edilebilmiş ve doğal immün sistemin bir parçası olduğu anlaşılmıştır (224).

Patojenler üzerinde bulunan korunmuş moleküler yapılar olarak "patojen ilişkili moleküler yapılar" (PAMP) ve bunları doğal immün sistem hücreleri üzerinde tanıyan reseptörlere de "Patern tanıma reseptörleri" (PRR) adı verilir (225, 226). 3 gruba ayrılan PRR'ler; salgılananlar, endotoksik olanlar ve sinyal iletenlerdir. TLR ailesi sinyal ileten reseptör grubunu oluşturmaktadır (227). TLR'ler, immün mekanizmaları ve inflamasyonu düzenleyen önemli bir PRR ailesidir (228, 229). Toll benzeri reseptörler (TLR), vücuda giren mikroorganizmalar tarafından üretilen PAMP'ları tanıyan, bağışık yanıt aracılığıyla doğal immün cevabın oluşmasını sağlayan tip 1 transmembran proteinleridir (21, 222, 228, 230, 231, 232). TLR'ler, ekstrasellüler domain (LRR), transmembran domain ve sitoplazmik domain olarak 3 farklı domain içerir. (226). LRR domainleri, ligand bağlama ve sinyal iletiminde görev alan lüsinden zengin tekrarlar içeren kısımdır (224, 233). Çeşitli ligantlar tarafından uyarılması sonucunda, sinyal kaskatları başlayarak sitokin üretimi üzerinden kazanılmış immün yanıtı başlatırlar

(228, 229). Sitoplazmik sinyal domaini interlökin 1 reseptör (IL-1R) ile benzer özelliktedir. Bu Toll/IL-1R reseptörü (TIR) bölgesi olarak adlandırılır. TIR domaini sinyal oluşumu için gereklidir (226, 227). TLR, mikroorganizmalardaki PAMP ile bağlanınca, TIR domaini ile bir dizi sinyal iletim yolunu aktive eder ve antimikrobiyal protein, inflamatuvar sitokinlerin sentezi ve dendritik hücrelerin matürasyonunu sağlayarak, doğal immün sistem, kazanılmış immün sistemi yönlendirir (234, 235). TLR'lerin PAMP'lar ile aktive olması ile TIR domaini içeren adaptör protein (TIRAP), TIR domain içeren adaptör protein uyaran IFN-beta (TRIF), TRIF ilişkili molekül (TRAM), myd88 adaptör proteinleri aracılığı ile NF-κB, mitoz aktive edici protein kinaz, Sinyal iletici ve transkripsiyon aktive edici protein (STAT) ve Aktive edici protein 1 (AP1) proteini aktive olur (236). Bu sinyal yollarının aktive olması ile interferon, tümör nekroz faktör alfa (TNF-a), interlökin (IL4, IL8, IL12) gibi çeşitli proinflamatuvar ve antiinflamatuvar sitokinler salınır. Bu sitokinlerin salınımı sonrasında B-hücre lenfoma x (Bcl-x), apoptoz c inhibitör protein-1 (c-IAP-1) ve apoptoz c inhibitör protein-2 (c-IAP-2) gibi antiapoptotik proteinler işlev kazanır (Şekil 2.3) (237).



Şekil 2.3: TLR sinyal yolağı (237).

(dsRNA, çift iplikli RNA; IKK, NF- κ B kinaz inhibitörü; LPS, lipopolisakarite; MKK, MAP kinaz kinaz; RIP1, reseptör-ilişkili protein 1; rRNA, ribosomal RNA; ssRNA, tek-iplikli RNA; TAB, TAK1-bağlayıcı protein; TAK, TGF β -aktive kinaz; TBK1, TANK-bağlayıcı kinaz 1).

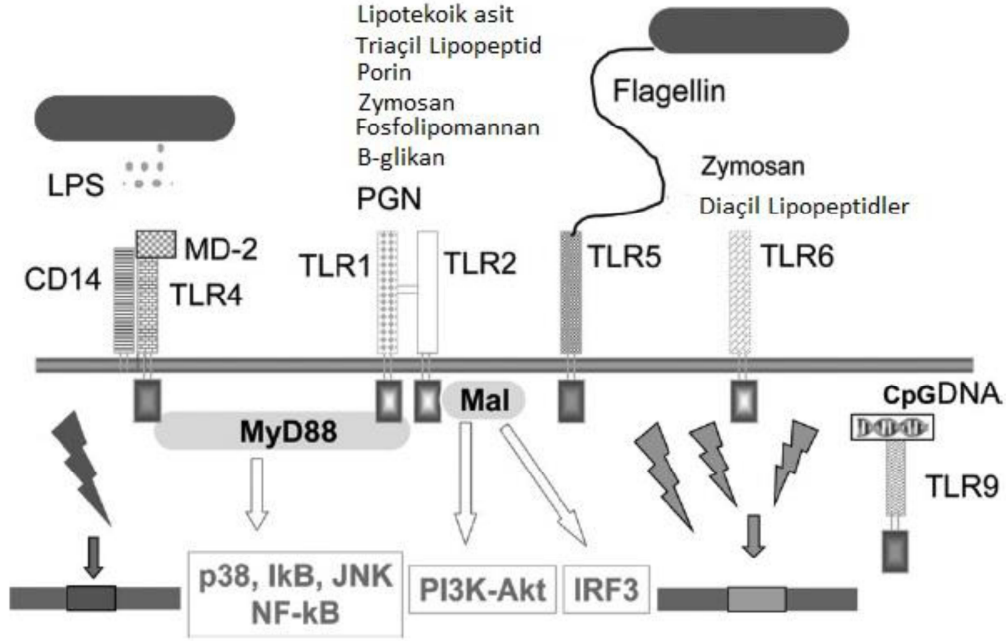
Canlılarda TLR ailesinde 13 üye saptanırken, insanda 11 TLR saptanabilmiştir (225, 226, 233). insanlarda bulunan bazı TLR'lerin karşılıklarının diğer hayvanlarda bulunmaması, deney hayvanlarının doğal immünite modeli olarak kullanımını zorlaştırmaktadır (238). Hücre yüzeyinde sunulup fagozomlara geç eden TLR-1, 2, 4, 5, 6 ve 10'a karşı TLR-3, 7, 8 ve 9 özellikle endozomlar ve endoplazmik retikulum başta olmak üzere hücre içi kompartmanlarda sunulur (239). TLR'ler ligandlarının yokluğunda nonkovalent dimerler oluştururlar (240). Her bir TLR'nin ligand spesifitesi farklıdır. Bunlardan TLR1-TLR9 arası ve TLR11'in ligandları belirlenmiş; TLR10, TLR12 ve TLR13'ün ligandları ise henüz bilinmemektedir (Şekil 2.4) (Tablo

2.2) (238). Patojensiz obez olmayan diyabetik farelerin Toll-like reseptörlerinin (TLR) adaptör proteinlerinin eksikliği durumunda bakteriyel ligandlara bağlanmayı becerememeleri nedeniyle diyabet gelişiminin olmadığı gözlemlenmiştir (203, 241). TLR'ler arasında TLR2 ve TLR4, insulin direncinde, diyabette ve aterosklerozda kritik rol oynarlar (231, 242). TLR2 ve TLR4, lipopolisakkarit (LPS), peptidoglikan (PGN) ve lipopeptidler gibi bakteri hücre duvar komponentlerini tanımaktadır. Doğal bağışıklık hücrelerinde bulunan reseptörlerin aktivasyonu ile hücre yüzeyindeki moleküller, sitokin ve kemokinlerin düzenlenmesinde artış olur (228). Yine son yıllarda yapılan çalışmalarda TLR2 ve TLR4 gen ekspresyon seviyelerinin özellikle fare modellerinde dışkı mikrobiyotasının içeriği ile değiştiği görülmektedir (18, 19, 20).

Tablo 2.2: TLR ailesi ve ligandları (238)

TLR	Klasik Ligand	Hücre Lokalizasyonu	Sitokin indüksiyonu
TLR1	<i>Mikobakteri:</i> tri-açıl peptidler	Hücre yüzeyi	inflamatuvar sitokinler (TNF-a, IL-6 vs.)
TLR2	<i>Gram-pozitif bakteri:</i> peptidoglikan, lipoprotein, ısı sok proteinleri	Hücre yüzeyi	inflamatuvar sitokinler (TNF-a, IL-6 vs.)
TLR3	Virüsler: çift sarmal DNA (dsDNA) Sentetik: polinosik polisitilik asid	Hücre içi	inflamatuvar sitokinler (TNF-a, IL-6 vs.), IFN-1
TLR4	Gram-negatif bakteri LPS	Hücre yüzeyi	inflamatuvar sitokinler (TNF-a, IL-6 vs.), IFN-1
TLR5	Bakteri flajellini	Hücre yüzeyi	inflamatuvar sitokinler (TNF-a, IL-6 vs.)
TLR6	Mikoplazma: diaçil lipoproteinler	Hücre yüzeyi	inflamatuvar sitokinler (TNF-a, IL-6 vs.)
TLR7	Virüsler: tek sarmal RNA Sentetik: imidazoquinolinler	Hücre içi	inflamatuvar sitokinler (TNF-a, IL-6 vs.), IFN-1
TLR8	Virüsler: tek sarmal RNA Sentetik: imidazoquinolinler	Hücre içi	inflamatuvar sitokinler (TNF-a, IL-6 vs.), IFN-1
TLR9	Virüsler ve bakteri: çift sarmal DNA Sentetik CpG olidodeoksinükleotidler	Hücre içi	inflamatuvar sitokinler (TNF-a, IL-6 vs.), IFN-1
TLR10	bilinmiyor	Hücre yüzeyi	Bilinmiyor

TLR11	Toxoplasma gondii profilin Üropatojen bakteri	Hücre yüzeyi	inflamatuar sitokinler (TNF-a, IL-6 vs.)
TLR12	Bilinmiyor	Bilinmiyor	Bilinmiyor
TLR13	Bilinmiyor	Bilinmiyor	Bilinmiyor



Şekil 2.4: TLR'lerin uyarılması (238).

2.9.1. TLR2

TLR2, insanda 4. Kromozomun 4q31-32 bölgesinde kodlanan, 784 aminoasitlikbir proteindir. 84kDa moleküler ağırlıktadır. TLR2 haberci RNA (mRNA) ekspresyonu beyin, kalp, akciğer ve dalak dokularında gözlenir ve özellikle lökositlerde en yüksek seviyededir (243). TLR2, çoğunlukla bakterilerdeki PAMP'ların geniş bir aralığını tanır (22, 244). Bunlar lipoarabinomannan (LAM), lipopolisakkarid (LPS), lipoteikoik asit (LTA), peptidoglikan (PGN) ve digerglikolipidler, glikoproteinler ve lipoproteinlerdir. TLR2'nin ligandları tanınması ve sinyaliletimi oluşturabilmesi için diğer TLR'ler ile dimerize olması gerekmektedir. Peptidoglikan, TLR2 ve TLR6'nın dimer oluşturduğu reseptör aracılığı ile sinyal iletirken, lipoproteinler, TLR6'ya ihtiyaç duymadan TLR2'yi aktive edebilmektedir. Benzer şekilde TLR2 ve TLR6 birlikte mikoplazma lipoproteininin tanınması için gereklidir. Gram negatif ve Gram pozitif bakterilerin lipoproteinleri tek başına TLR2 ile tanınmaktadır (245). TLR2, bakteriyel

antijenler yanında, fungal ve viral antijenleri de tanır ve doğal immunitede makrofajları uyarır. Bu reseptörün insulin direncine karşı koruyucu etki yaptığı düşünülmektedir (12). TLR2 kompleksleri aynı zamanda kızamık virüs (MeV), insan sitomegalovirus (CMV) ve hepatit C virüs (HCV) gibi virüsleri ve zimosan içeren mantar PAMP'larını tanıyabilir (246).

2.9.2. TLR4

Drosophila'larda keşfedilen Toll'unun insan homologu olarak tanımlanan ve ilk insan Toll'u (hToll) olarak adlandırılan TLR'dür. TLR4, insanda 9 kromozomun 9q32-33 bölgesinde kodlanan, 90 kDa moleküler ağırlığında 839 aminoasitlik bir proteindir. İn vivo olarak TLR4 mRNA'sı tek bir transkriptolarak sunulur ve en yüksek seviyelerde dalak ve lenfositlerde bulunur. TLR4; B hücreler, dentritik hücreler, monositler, makrofajlar, granülositler ve T hücreler tarafından sunulur (243).

TLR4, Gram negatiflerin dış membranının ana komponenti olan lipopolisakkaritler (LPS) ve yağ asitleri ile uyarılır. Plazma LPS seviyeleri ise dışkı mikrobiyotası tarafından düzenlenmektedir (12, 13). TLR4 uyarımı sonrası bir homodimer oluşturur ve Lenfosit antijen 96 (MD-2) ile birleşir. MD-2, LPS'nin TLR4 aracılığı ile tanınmasında gereklidir. MD-2 birlikteliği olmaması nedeniyle TLR2 kompleksleri LPS'yi tanıyabilmesine rağmen, TLR4 genellikle LPS reseptörü olarak düşünülür. LPS, ilk soluble olarak LPS bağlayan protein (LBP) ile bağlanır. LBP'de ya soluble veya glikozil fosfatidil inozitol (GPI)-bağlı CD14 ile bağlanır. Buna LPS tanıma kompleksi diyebileceğimiz CD14, TLR4 ve MD-2'yi içeren kompleks bu şekilde oluşur. TLR4 ve MD-2 sürekli olarak birbirleriyle birlikte iken CD14 LPS bağlandıktan sonrakomplekse katılır. Kesin mekanizması henüz anlaşılmasına rağmen LBP'nin LPS'yi CD14'e transfer ettiği ve TLR4'ün aktive olduğu düşünülmektedir. TLR4 ile LPS tanınmasında CXCR4, GDF-5, CD55, çeşitli ısı sok proteinleri (HSP70, HSP90) ve kompleman reseptörlerinin (CR) gerekli olduğu düşünülmektedir (94). TLR4 kompleksleri aynı zamanda respiratuar sinsityal virüs (RSV), HCV gibi virüsleri tanır. TLR4 kompleksi; HSP'ler, fibrinojen, fibronektin, surfaktan protein A (SP-A) ve beta defensinler gibi endojen ligandları tanıyabilir (247).

2.10. Diyabetes Mellitus

Diyabetes Mellitus (DM) insülin sekresyonunda veya insülin etkisindeki yetersizlik sonucunda ortaya çıkan, hiperglisemi ile gözlemlenen, kronik seyirli endokrin ve metabolik bir hastalıktır. İnsülin hormonu pankreasın beta hücrelerinden sentezlenir diyabet hastalarında insülin hormonunun mutlak veya rölatif eksikliği karbonhidrat, yağ ve protein metabolizmalarının bozulmasına sebep olur (3, 4, 9, 248, 249). Pankreasın langerhans β hücrelerinin primer hasarına bağlı olarak gelişen insülin eksikliği ile kendini gösteren tip 1 diyabetes mellitus (T1DM) ve insulini sentezi ve salınımında sorun yokken, insulini direnci sonucu dokuların insulini kullanamaması ile kendini gösteren tip 2 diyabetes mellitus (T2DM) bilindik diyabet tipleridir. Bu iki grup genetik, patolojik, klinik ve prognoz açısından birbirinden farklılık gösterirler (250).

Diyabetes mellitusta (DM) etyolojik sınıflama aşağıda görülmektedir (251).

- I. Tip 1 diyabet (Beta hücre hasarı sonucu insulini eksikliği)
 - a. Otoimmün, b. İdiyopatik
- II. Tip 2 diyabet (kombine insulini eksikliği ve insulini direnci)
 - a. Tipik, b. Atipik
- III. Beta hücre işlevinde genetik kusurlar
 - a. MODY sendromları, b. Mitokondrial DNA mutasyonları, c. Wolfram sendromu (DIDMOAD), d. Tiyamine cevapsız diyabetes mellitus
- IV. İlaç ve kimyasal ajanlara bağlı diyabet
 - a. Siklosporin, b. Glukokortikoidler, c. Beta adrenerjik blokerler
- V. Ekzokrin pankreas hastalıkları
 - a. Kistik Fibroz, b. Travma – Pankreatektomi, c. Pankreatik iyonize radyasyon
- VI. Enfeksiyonlar
 - a. Konjenital rubella, b. Sitomegalovirüs, c. Hemolitik üremik sendrom
- VII. Tip 2 diyabet varyantları
 - a. İnsulini etkisindeki genetik kusurlar: Robson-Mendenhall sendromu, Leprechaunizm, Lipoatrofik diyabet sendromları, Tip A insulini

direnci sendromları - Akantosiz

b.İnsulin etkisinde edinsel kusurlar:Endokrin tümörler, anti-insulin reseptör antikorları

VIII. İnsulin direnci & insulin eksikliği ile giden genetik sendromlar

a.Prader-Willi sendromu, b.Down sendromu, c.Turner sendromu,
d.Klinefelter sendromu, e.Bardet-Biedel sendromu, f.Alstrom sendromu,
g.Werner sendromu

IX. Gestasyonel diyabet

Yeni doğan diyabeti: a.Geçici, b.Kalıcı – Pankreas agenezisi, c.Homozigot glukokinaz eksikliği

DM tanısı koymak için aşağıda sıralanan kriterlerden herhangi birinin bulunması yeterlidir (249):

- En az 8 saat açlık sonrası bakılan plazma glikoz değerinin 126 mg/dl veya üstünde bulunması,
- 75 gr glukoz ile yapılan Oral Glikoz Tolerans Testinin (OGTT) 2. Saatinde plazma glukozunun 200 mg/dl veya üstünde olması,
- Glikozillenmiş Hemoglobin (HbA1c) değerinin %6.5 veya üstünde olması.
- Rastgele ölçülen kan glikozunun 200 mg/dL'nin üzerinde olması ve diyabeti destekleyen poliüri, polidipsi gibi klinik bulguların olması.

2.10.1. Tip 1 Diyabetes Mellitus (T1DM)

En sık rastlanılan metabolik hastalıklar arasında yer alan T1DM; yaşam boyu süren, her yastaki bireyi ve yakınlarını doğrudan ilgilendiren, organ ve fonksiyon kayıplarına yol açarak insanın fiziksel, psikolojik ve sosyal yapısında değişime neden olan bir hastalıktır (248, 252). Birçok araştırmacıya göre diyabet otoimmün, genetik ve çevresel faktörlerin etkisiyle gelişen otoimmün bir hastalıktır (123, 163). T1DM'da beta hücrelerinin yıkımı sonucu insulin üretiminde sıkıntı yaşanır (3, 4, 9, 248, 254). Bu hasar genellikle HLA tipleri ile bağlantılı olarak hücre aracılıklı otoimmün süreç nedeniyle olmaktadır ve beta hücrelerine karşı oluşan otoantikörlerin kanda ölçülmesi ile gösterilebilir. Diyabetin bu formu çocukluk döneminde başladığı bilinmekle birlikte

her yaşta oluşabilir. İnsülin eksikliği katabolik metabolizmaya eğilim, kilo kaybı ve diyabetik ketoasidoza neden olur (255). Tüm ülkelerde T1DM insidansı giderek artmakta olup, ortalama % 3 yıllık olarak hastalığın arttığı belirtilmektedir. Hastalığın % 95'i 25 yaşın altında ortaya çıkmakla beraber, 5-7 yaş ve adölesan döneminde pik yapmaktadır (252).

2.10.1.1. Etiyoloji ve Patogenez

Tip 1 diabetes mellitus (T1DM) etyolojisinde genetik, çevresel ve otoimmün faktörler sorumlu tutulmaktadır (8, 9, 251, 256).

2.10.1.1.1. Genetik Faktörler:

T1DM'a yakalanma riski ırktan ırka değişiklik göstermektedir. T1DM genetik bir hastalık olmasına karşın diyabete karşı yatkınlığı belirler. Bildirilen diyabete yatkınlığın kalıtım şekli basit genetik kuralları ile açıklanamamaktadır. Monozigot ikizlerde bu oran %20-50 arasındadır. Monozigot ikizlerdeki bu % 100'e varmayan birliktelik, genetik olarak programlanmış bireylerde hastalığın gelişebilmesi için virüs, bakteri, toksin ve gıdalar gibi çevresel faktörlerin gerekli olduğunu düşündürür (144, 257, 258, 259).

T1DM gelişme riskini artıran bazı genler saptanmıştır. En önemlisi 6. kromozomun kısa kolu (6p21) üzerinde bulunan "Major histocompatibility complex" (MHC) kodlayan tiplerdir, bu kromozom üzerinde yer alan HLA bölgesi, makrofaj gibi antijen sunucu hücrelerin yüzeyinde bulunan MHC Klas II moleküllerini kodlayan genleri içerir. Antijenin MHC'ye bağlanması ile otoimmün sürecin ana hücreleri olan T hücrelerinde bulunan antijen reseptörlerine bu antijenlerin sunulmasına neden olur. Tip 1 diyabete yatkınlık yaratan ve diyabete karşı koruyucu olan HLA allelleri aşağıda verilmiştir. Beyaz ırkta T1DM hastalarının %95'inden fazlası HLA-DR3 DQA1*0501 - DQB1* 0201 ve/veya DR4 DQA1*0301 - DQB1* 0302 antijeni taşımaktadır. DR3 ve DR4'e ilave olarak DR1, DR8 ve DR16 antijenlerinde T1DM'a yatkınlıkta, DR2 DQA1*0102 - DQB1* 0602'ye sahip olmanın ise koruyucu rol oynadığı gözlenmiştir (260). DR3, DR4 pozitifliğinin diyabet oluşumunda direkt neden olmadığı fakat buradaki pozitifliğin insanlardaki bakteri, virüs ve diğer çevresel faktörlerle birlikte, beta hücrelere karşı immun cevapta değişikliğe yol açtığı bunun sonucu olarak hücre nekrozuna neden olduğu, böylece T1DM oluşturduğu düşünülür (257, 258, 259).

2.10.1.1.2. Çevresel Faktörler

Enfeksiyonlar, kimyasal maddeler, coğrafik bölgeler, gıdalar gibi çeşitli çevresel faktörler genetik yatkınlığın varlığında diyabet gelişimini etkilemektedir. T1DM ortaya çıkışındaki mevsimsel farklılıkların nedeni enfeksiyonların mevsimsel dağılımının bir etkisi olarak düşünülmektedir. Mevsimsel değişiklikler daha çok adolesan yaşlarında görülür (251, 261).

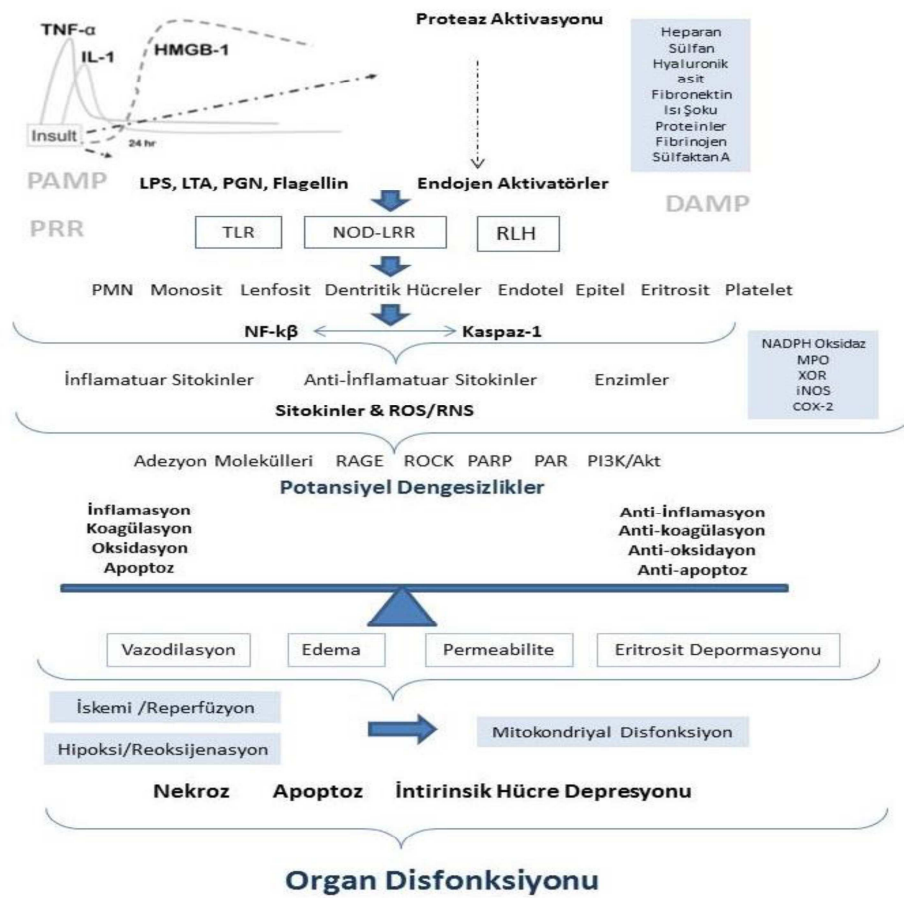
2.10.1.1.3. Otoimmünite

T1DM'un; tanı sırasında adacık hücrelerini çevreleyen lenfosit infiltrasyonu, adacık hücrelerine karşı oluşan otoantikorların ve dolaşımda aktive olmuş lenfositlerin varlığı ile ayrıca belirli HLA tiplerinin yatkınlığa neden olması nedeniyle otoimmün bir hastalık olduğu düşünülmektedir. Otoimmün etyoloji düşündürülen diğer nokta ise T1DM'un, hipotiroidi, graves hastalığı, addison ve çölyak hastalığı gibi diğer otoimmün hastalıklarla birlikte görülebilmesidir. T1DM'lu hastalarda antikor oluşumuna yol açtığı bilinen antijenler; pankreatik siyalokonjugatlar, insülin, glutamat dekarboksilaz, sığır serum albümini, karboksipeptidaz H, beta hücre transporteri, 37, 38, 40, 52 ve 69 kd adacık hücre proteinleridir (251, 262).

2.11. Floradaki bakteriyel değişimlerin otoimmün hastalıklarla ilişkisi

İmmün sistemin bireyde sorun yaratan patojenlerle, sağlıklı dokular arasında ne kadar önemli bir denge olduğu açıktır. Buna karşın otoimmün hastalıklarda bu denge bozulmakta ve immün sistem yanlışlıkla sağlıklı dokulara zarar vermektedir (Şekil 2.5) (263, 264, 265). Bağırsak mikrobiyotanın hem doğal, hemde kazanılmış bağışıklığı etkilediği gösterilmiş ve ayrıca bazı üyelerinin otoimmün hastalıklarla ilişkili olduğu son yıllarda yapılan çalışmalarla anlaşılmaya çalışılmıştır (31, 32, 33). birçok farklı hayvan ve insan modeli üzerinde İnflamatuvar bağırsak hastalığı (IBD) (266, 267), Romatoid artrit (RA) (268, 269, 270), Tip 1 diabetes mellitus (T1DM) (4, 203, 241 271), Multiple skleroz (MS) (272), Ankilozan spondilit (AS) (273). Otoimmün gastrit (73) ve sistemik lupus eritomozosus (SLE) (274) gibi otoimmün hastalıklar incelenmiştir. Bu çalışmalar mikrobiyotada ki değişimlerin belli oranlarda otoimmün hastalıklarla ilişkili olabileceğini bize göstermiştir. Bu ve bunlar gibi çalışmalar özellikle otoimmün hastalıklarla gastrointestinal sistemin ilişkili olabileceğini düşündürülen 3 noktayı belirtmektedir (275). Bunlar;

1. Otoimmün hastalıklar, doğal ve kazanılmış bağışıklık arasındaki iletişimsizlik kaynaklıdır.
2. Moleküler benzerlik (mimicry) tek başına bu hastalıkların gelişiminin açıklanması için yeterli değildir. Tanımlanamayan antijenlerin sürekli uyarımı için kompleks bir dış uyarıya ihtiyaç vardır.
3. Mukozal bariyerlerin koruyucu görevlerinin kaybı ile otoimmünite gelişiminde özellikle gastrointestinal ve akciğer mikrobiyotası kaynaklı dış faktörlerin rolü bulunmaktadır



Şekil 2.5: Organ disfonksiyonuna yönlendiren moleküler mekanizmalar (264, 265)

2.12. Toll-like Reseptörler (TLR) ve Tip 1 Diyabet ilişkisi

T1DM insülin üreten beta hücrelerinin kaybı sonucu gelişen bir otoimmün hastalıktır (276). T1DM'un son aşaması olan beta hücrelerinin kaybı basamağı bilinmesine karşın, bunu oluşturan doğal bağışıklıktaki "başlangıç adım" veya "başlatıcı olay" net değildir (277, 278). Diyabet ve onun komplikasyonlarının proinflamatuvar

sitokinlere dayandığı, C-reaktif protein (CRP) ve IL-1, TNF-a, IL-6 gibi sitokinlerin plazma seviyelerinin arttığı gösterilmiştir. Ayrıca TLR'ler, ve özellikle TLR2 ve TLR4'ün hem T1DM, hemde T2DM patogenezinde önemli bir rol oynadığı bildirilmektedir. TLR'lerin, T1DM'un patogenezinde önemli rolü olduğunun düşünülmesi esas olarak bu reseptörlerin 2 yeteneği olan antijen sunan hücrelerin gelişimini indüklemesi ile sitokinler ve inflamatuvar kemokinleri üretmesi nedeniyledir (276). Farklı yazarlar, dentritik hücrelerdeki (DC), TLR2'lerin beta hücrelerinde bulunan hasar ilişkili moleküler paternleri (DAMP) tanıyarak sunmasının diyabet gelişiminde doğal bağışıklığın “başlangıç adım” olduğunu öne sürmektedir (277, 278). Yapılan birçok çalışma da, TLR2 ve TLR4'ün T1DM oluşumu ile ilişkili olduğu bildirilmektedir (241, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287). Monositlerde TLR2 ve TLR4'ün mRNA ekspresyonlarının ve MyD88, TRIF ve NF-κB gibi alt hedeflerinin artışı kontrol gruplarına göre T1DM'lu hastalarda bildirilmiştir (228). Ayrıca, TLR2 ve TLR4 ekspresyonlarının gilisemi ile ilişkili olarak arttığı gösterilmiştir. TLR2 ve TLR4 genlerinin susturulması sonucu yüksek glikoz seviyesi ile ilişkili NF-κB yanıtında %76 düşüş olduğu görülmüştür (229, 279). Diyabet eğilimli farelerde, TLR2 baskılanınca otoimmün diyabetin gelişiminin baskılandığı bildirilmiştir (279). Bir başka çalışmada obez olmayan farelerde LPS'ye verilen yanıtta NF-κB, TLR2 ve TLR4 gen ekspresyonlarının benzer olduğu gösterilmiştir (280).

2.13. Anaerop bakterilerle, Tip 1 diyabet ilişkisi:

Tip 1 diyabet, çok yönlü, pankreas beta hücrelerinin yavaş ve ilerleyici bir biçimde yıkımı ile insulin üretiminin kaybına neden olan T hücre ilişkili otoimmün bir hastalıktır (288, 289). Patofizyolojisi henüz anlaşılmalıdır (2). Özellikle bağırsak mikrobiyotasında bulunan anaerop bakterilerin T1DM ile ilişkili olduğunu işaret eden hayvan ve insan modelli çalışmalar bulunmaktadır (4, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296). Obez olmayan diyabetik farelerin ve biyolojik üretilen diyabet eğilimli sıçanların (BB-DP) özellikle *Lactobacillus* spp. (*Lactobacillus casei* ve *Lactobacillus acidophilus*) ağırlıklı probiyotikler ile beslenmesi sonucu bu hayvanlarda diyabetin başlamasının geciktirildiği ve önlendiği gösterilmiştir (292, 293, 294, 297). Diğer bir çalışmada diyabet duyarlı BB-DP ve biyolojik olarak üretilen diyabet dirençli (BB-DR) sıçanların dışkı floraları incelendiğinde diyabet dirençli olan BB-DR sıçanların mikrobiyotasında probiyotik benzeri *Lactobacillus* spp ve *Bifidobacterium* spp. miktarlarının diyabet

duyarlı BB-DP sıçanlarının mikrobiyotasına göre yüksek olduğu, buna karşın BB-DP sıçanlarının mikrobiyotasında ise *Bacteroides* spp, *Eubacterium* spp. ve *Ruminococcus* spp. miktarının BB-DR sıçanlara göre yüksek olduğu saptanmıştır (295, 297). Bir çalışmada ise *L.johnsonii* N6.2 suşu ile beslenen diyabet eğilimli BB-DP sıçanlarında diyabet gelişiminin engellendiği gözlemlenmiştir (298). T1DM'lu çocuklarda yapılan bir çalışmada *Bacteroidetes* grubu içinde *Bacteroides ovatus*'un kontrol grubuna göre %24 daha yüksek olduğu gözlenmiştir (4). Yine T1DM'lu 16 çocuk ve kontrol grubunda yapılan bir çalışmada da *Firmicutes* grubunda azalma ama *Bacteroidetes* grubunda artış gözlemlendiği bildirilmiştir (2).

2.13.1. *Bacteroidetes*

Gram negatif bakteriler arasında *Bacteroidetes* şubesi *Bacteroides* spp. ve *Prevotella* spp. cinsi gibi tıbbi açıdan önemli anaerob Gram negatif cins bakterileri içeren önemli bir bakteriyel şubedir (299). Bu şube içinde klinik örneklerde en sık rastlanan anaerob *Bacteroides fragilis* grubudur, bunlar antibiyotiklere diğer anaeroplara göre her geçen gün artan bir direnç göstermektedir. (300).

2.13.1.1. *Bacteroides* Sınıflandırması

Günümüzde *Bacteroides* cinsi, safraya duyarlı ve safraya dirençli olarak ayrılabilir. Eskiden safraya duyarlı türler pigmentli ve pigmentless türler olarak ayrılırdı. Fakat çoğu pigmentli safraya duyarlı *Bacteroides* spp., *Porphyromonas* ve *Prevotella* genusu içinde yeniden sınıflandırıldı. Birçok pigmentless *Bacteroides* türü *Prevotella* genusuna transfer edildi. Safraya dirençli *Bacteroides* spp., *B.fragilis* grup ve 2 diğer tür (*B. splanchnicus* ve *B.eggerthii*) olarak tanımlanır (301).

2.13.1.2. *Bacteroides fragilis* grubu

Bacteroides fragilis grubu üyeleri özellikle bağırsak ve kolon mikrobiyotasında bol miktarda bulunan bakterilerdir. Ağız, üst solunum yolları, genital mukoza mikrobiyotasında da bulunabilen bu bakteriler, direnci kırılan kişilerde tek başlarına veya diğer aerob ve fakültatif anaerob bakteriler ile dokularda apse, gangren, sepsis gibi enfeksiyonlara neden olabilirler (302).

Bacteroides türleri diğer anaeroplara gibi genellikle fırsatçı olarak vücudun farklı bölgelerinde enfeksiyon oluşturabilirler. Miks enfeksiyonları, en sık intraabdominal bölge

olmakla beraber plöropulmoner bölge ve özellikle kadınlarda urogenital bölgelerde görülür (303).

Bacteroides fragilis grubu bakteriler 20'nin üzerinde tür içeren büyük bir gruptur. *Bacteroides fragilis* grubu bakteriler arasında florada en çok izole edilen *B.fragilis*, *B. ovatus*, *B. vulgatus*, *B. thetaiotaomicron*, *B. uniformmis*, *B.cacae*'dir (304, 305). Yakın zamana kadar *Bacteroides fragilis* grubu içinde florada sıklıkla izole edilen *Bacteroides distasonis*, *Bacteroides goldsteinii* ve *Bacteroides merdae*, 16S rRNA dizi analizi yöntemleri sonuçlarına göre *Parabacteroides distasonis*, *P. goldsteinii* ve *P.merdae* olarak yeniden isimlendirilmişlerdir (306). *B.fragilis*, bağırsak florasının ayrılmaz bir parçasıdır. Floranın küçük bir kısmını temsil etmesine karşın, klinik vakalarda sıklıkla izole edilen organizmalardan biridir (307). Proteolitik enterotoksinler gibi enzimleri ile sıkı bağlantı bölgelerinin (TJ) yıkımı sonrası, bağırsakta mikrovillusların kaybı, hücre hasarı ve lokal inflamasyonla paraselüler permeabilitenin artırılması önemli patojenik aktivitelerinden biridir. Bunların sonucunda vücudun kendi hücrelerine olan toleransın kaybı tetiklenerek T hücrelerinin dengesizliği sonrası bağırsakta inflamasyon ve bağırsak dışı inflamatuvar yanıt ilişkili T1DM'a neden olabileceği öne sürülmektedir (308).

2.13.1.3. *Bacteroides fragilis* genel özellikleri:

0.8-0.13 µm'den 0.8-1.6 µm uzunluğa kadar değişebilen büyüklükte, Gram negatif, hareketsiz, zorunlu anaeroptur. Hücre içerisinde vakuoller bulunabilir, gayet soluk boyanır, Bazı kökenler kapsüllü olabilir. Agar yüzeyinde koloniler 1.3 mm çapında konveks, yarıopak ve ışığa tutunca koloni çevresinde iç-içe halkalar görülür. Bazı türler ise hemolitik olabilir ancak %1 β hemoliz yapar. Buyyonda ise bulanık bir çökelti şeklinde ürer. Ancak hemin içeren ve Eh değerinin 100 mV civarında olduğu besiyerinde üretilebilirler, ürediklerinde kuvvetli asit oluştururlar, bu nedenle kültürleri kısa zamanda pasajlanmaz ise ürettikleri bu asit nedeniyle ölürlere, frajil (kırılgan) ismi buradan gelmektedir. %20 safraya dirençlidirler, 25-45°C de üreyebilirler. Üretimlerinde Vit K₁ yerine Vit B₁₂ de kullanılabilir. 3 atmosfer basınçlı saf oksijen gazına 18 saat dayanabilirler. pH=8,0 da çok zayıf ürerler. Hemin hem üreme için gereklidir, hem de üremeyi artırır. Hemin olmayan bir hücrenin bölünme zamanı 8 saattir ve yavru hücrede sitokrom tespit edilmemiştir. Hemin olan besiyerinde bölünme zamanı 6 saattir ve yavru hücreler sitokrom içerirler. Ortamda glukoz + hemin var ise

hücre bölünme zamanı 60 dakikadır. Hücrede sfingolipitler, demir içeren bir süperoksit dismutaz ve nöraminidazlar tespit edilmiştir. Hem %15 hem de %3 H₂O₂ ile yapılan testlerde katalaz pozitif bulunurlar (309). Penisilin dirençdirler ve β laktamaz üretirler. Birçok sefalosporinlere dirençlidirler, plazmid geçişli tetrasiklin, eritromisin ve klindamisin direnç mekanizmaları tespit edilmiştir. RNA sentezini baskılayan bakteriyosinleri vardır. Apandisit, peritonit, kalp kapak infeksiyonları, rektal abseler ve pironidal kistler, postoperatif yaralar, ürogenital kanal, ağız ve bazen vagina da izole edilirler. Normal bağırsak florasının daimi konakçısıdır. β-laktamaz inhibitörleri ile kombine edilmiş penisilin ve doksisisiklin tedavisinde sıklıkla terci edilen ilaçtır (302, 304).

2.13.2. *Firmicutes*

Gram pozitif bakteriler guanin+sitozin (G+C) oranlarına göre *Firmicutes* ve *Actinobacteria* olarak iki bakteriyel şubeye ayrılmıştır. *Firmicutes*'ler düşük G+C oranı ihtiva eden bakteriyel gruptur. *Firmicutes*'ler bilinen en geniş bakteri grubudur. 200'e yakın cinsi içerir (19, 290). Bu şube içinde spor oluşturan *Clostridium* spp, *Bacillus* spp., tıbbi açıdan önemli olan *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Enterococcus* spp., *Mycoplasma* spp ile laktik asit üretimi ile önemli bir yer tutan *Lactobacillaceae* ailesi ve *Lactobacillus* cinsi yer almaktadır (299).

2.13.2.1. *Lactobacillaceae* ailesi bakterileri

Lactobacillaceae ailesi şekerli fermente edebilen, Gram pozitif, spor oluşturmayan, katalaz negatif, sitokroma sahip olmayan, asidi tolere edebilen ve karbohidrat fermantasyonu sırasında başlıca son ürünü laktik asit olan çubuk ve kok biçiminde olan bakterilerdir (310). *Lactobacillaceae* ailesi içerisinde, biyokimyasal ve ekolojik özellikleriyle birlikte filogenetik olarak birbirine yakın olan “*Carnobacterium* spp., *Enterococcus* spp, *Lactobacillus* spp, *Lactococcus* spp, *Leuconostoc* spp, *Oenococcus* spp, *Pediococcus* spp, *Streptococcus* spp, *Tetragenococcus* spp, *Vagococcus* spp ve *Weissella* spp” yer almaktadır. Bu bakteriler, zorunlu homofermentatif ve zorunlu heterofermentatif olarak iki ana gruba ayrılmaktadır. *Lactobacillaceae* ailesi taksonomik olarak, morfolojik yapılarına, tuz asit ve alkali toleranslarına, yağ asitleri bileşimine ve DNA baz dizisi gibi genetik kriterlere göre sınıflandırılmaktadır (311). *Lactobacillaceae* ailesi içinde *Lactobacillus* spp. önemli

bir yer tutmaktadır. Bu cins içindeki bakteriler, gastrointestinal sistemden başka fermente gıdalarda da bulunabilmektedirler (312).

2.12.2.1.1. *Lactobacillus* spp.

Lactobacillus spp. çomak şeklinde hücrelere sahiptir. Hücreler düzgün veya hafif kıvrık, bazı türlerde T, Y ve V şeklindedir. Çomakların uçları düzgünce yuvarlanmış, uzun kenarlar birbirine paralel durumdadır. Çok az tür veya süşun dışında, hareketsizdirler. Hücreler türe göre tek veya çift olarak bulunabilmekte, bazılarında kısa veya uzun zincirlere rastlamak da mümkün olmaktadır. 0,6-0,9 x 1,5-6 um boyutlarındadır. *Lactobacillus* spp. optimum gelişme sıcaklıkları ise 35-38 °C arasındadır. Optimum pH'ları 5,5-6,2'dir. Bununla birlikte gelişmenin 5,0 veya altındaki pH'larda gerçekleştiği görülür. Alkali pH'larda gelişme yetenekleri düşüktür. Heksoz şekerlerinin homofermentasyon yolu ile laktik asite fermente eder. Patojen özellik göstermezler. Hatta oluşturdukları antibakteriyel özellikteki maddeler sayesinde patojen bakterilerin gelişmesini engellerler (310).

İnsan gastrointestinal sisteminde 17 farklı *Lactobacillus* spp türü moleküler teknikler kullanılarak tespit edilmiş olmasına karşın, gastrointestinal sistem bu bakterilerin esas yerleşim yeri değildir. *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. paracasei*, *L. rhamnosus*, *L. delbrueckii*, *L. brevis*, *L. johnsonii*, *L. plantarum* ve *L. fermentum* bağırsak florasının sabit üyeleri değildir. Bu türler sıklıkla fermente gıdalarda bulunur ve oral kavitenin florasında gözlemlenirler (313).

20. yüzyılın başlarından Metchnikoff'un *Lactobacillus* spp. ile üretilen fermente süt ürününü kullanan kişilerin daha uzun ömürlü olduğunu iddaa etmesinden sonra *Lactobacillus* spp. içeren ürünlere ilgi artmıştır. 1921 yılında *L. acidophilus* içeren süt Amerika'da piyasaya sürülmüş ve iyileştirici özelliklere sahip olduğu düşünülmüştür (314). *Lactobacillus* spp., insan ve hayvanların doğal mikrobiyotasının bir parçasıdır ve birçok üründe "güvenli bakteri" olarak tanımlanır. Probiyotik olarak en sık kullanılan bakterilerdir (315, 316). İnsanlarda oral olarak alınan, probiyotik olarak düşünülen bu mikroorganizmaların, konakta immunomodulatör etkisinin araştırılmasına olan ilgi son yıllarda artmıştır (316, 317, 318, 319).

2.12.2.1.1.1. *Lactobacillus acidophilus*

Lactobacillus acidophilus, *Lactobacillus* spp. içinde bulunan Gram pozitif bakterilerdir. Homofermentatif, mikroaerofilik türlerdir. Şekerleri fermente ederek laktik asit oluştururlar, büyümeleri için düşük pH'ları tercih ederler (320). *Lactobacillus*

spp. türleri arasında *L.acidophilus* ilk kez bebek dışkısından izole edilmiştir (310). Bu bakteriler probiyotik özellikleri gösterirler, 1921 yılında *L.acidophilus* içeren süt Amerika'da piyasaya sürülmüş ve iyileştirici özelliklere sahip olduğu düşünülmüştür (314). Son yıllarda *L.acidophilus* içeren probiyotik karışımların oral olarak alınımında immun sistem ve konak üzerinde etkisi sıklıkla incelenmektedir (321, 322, 323, 324, 325). Yüksek fruktozla beslenen diyabetik sıçanlara *L.acidophilus* içeren yoğurt verildiğinde, HbA1c ve kan şekeri seviyesini düşürdüğü belirtilmiştir (321). Bir diğer çalışmada 30 gün boyunca *L.acidophilus* içeren probiyotik karışımı alan diyabetik bireylerin kan şekeri seviyesinin düştüğü gösterilmiştir (323). Bir başka çalışmada 4 hafta boyunca *L.acidophilus* içeren probiyotik karışımı alan 45 diyabet hastası bireyde insulin duyarlılığının kontrol grubuna göre korunduğu gösterilmiştir (324).

2.12.2.1.1.2. *Lactobacillus casei*

Lactobacillus casei, *Lactobacillus* spp. içinde bulunan Gram pozitif bakterilerdir. Homofermentatif, mikroaerofilik türlerdir. Şekerleri fermente ederek laktik asit oluştururlar, büyümeleri için düşük pH'ları tercih ederler (320). Bu bakteriler probiyotik özellikleri gösterirler (314). Diğer probiyotiklerle kombine olarak *L.casei* verilen, antibiyotik ilişkili ishal ve *C.difficile* infeksiyonu olan bireylerde bu hastalıklara karşı önleyici etkisi gösterilmiştir (322). Son yıllarda *L.acidophilus* içeren probiyotik karışımların oral olarak alınımında immun sistem ve konak üzerinde etkisi sıklıkla incelenmektedir (321, 325, 326). Yüksek fruktozla beslenen diyabetik sıçanlar *L.casei* içeren yoğurt ile beslendiğinde, HbA1c ve şekeri seviyesinin düştüğü belirtilmiştir (321). Diyabetli farelerde yapılan bir başka çalışmada da 5 hafta boyunca *L.casei* içeren ve *L.casei* içermeyen diyet verilmiş ve bu farelerde değişimler incelenmiştir. İnsuline direnç gelişiminin *L.casei* ile engellendiği sonucu bildirilmiştir (326).

2.14. Mikrobiyom

Mikrobiyom; belirli bir çevrede bulunan tüm mikroorganizmaları, bu canlıların genomlarını ve buldukları çevre ile olan ilişkilerini kapsayan kavramdır. Burada bilinmesi gereken diğer bir kavram metagenomdur. Metagenom ise doğal çevreden doğrudan alınan genetik materyal olarak tanımlanabilir. Sonuç olarak varolan gen havuzu, o çevrede bulunan tüm genleri içermektedir (327, 328).

Yeni gelişen moleküler biyolojik tekniklerle yapılan araştırmalar sonrasında insan vücudunda insan genom projesinde saptanan insan genleriyle kıyaslandığında, insan

mikrobiyomunun (mikrobiyal genlerin) 100 kat daha fazla gen içerebileceği, insan vücudundaki mikrobiyal hücre sayısının, insan hücrelerine göre 10 kat fazla olduğu düşüncesi bu mikroorganizmaların görevlerinin ve fonksiyonlarının araştırılması açısından hep merak kaynağı olmuştur (329), fakat mikrobiyoloji laboratuvarlarında kullanılan klasik yöntemlerle kültürü yapılabilen bakterilere yoğunlaşmakta ve laboratuvarda üretilmeyen mikroorganizmaların göz ardı edilmesi nedeniyle bu merak giderilememektedir. 16S rRNA DNA dizileme tekniklerinin gelişmesi ile artık bu mikroorganizmaların doğal ortamlarından örneklerden direkt incelenmesini sağlanabilirdi, bu görüşler ışığında 2007 yılında İnsan Genom Projesinin (HGP) devamı olarak İnsan Mikrobiyom Projesi (HMP) planlanmış, bu Amerika Ulusal Sağlık Enstitüsü (NIH) girişimi ile mikrobiyal florada bulunan mikroorganizmaların tespit edilmesi amacıyla başlatılmıştır (327, 329, 330).

insan genomu ve birlikte yaşadığı mikroorganizmalara ait genomu barındıran mikrobiyom, metagenomik bir yapıdır. Bu metagenomik yapının incelenmesi, İnsan mikrobiyom projesi ile hastalık etiolojisindeki yerinin belirlenmesine öncülük etmiştir. İlk aşamada alınan sonuçlarda, 16S rRNA dizi analizleri ile yapılan çalışma sonuçları bağırsakta *Bacteroidetes* ve *Firmicutes*'lerin iki büyük bakteri filum'u olarak floranın %90'ından fazlasına hakim olan aileler olduğunu göstermiştir. Ayrıca bağırsakta bulunan bakteri profilinin, sadece bebekken değil, erişkin yaşta da kişiden kişiye değişiklik gösterdiği ortaya konmuştur (327, 331).

2.15. Mikrobiyota çalışmaları için kullanılan teknikler

Bağırsak mikrobiyotasını araştırmak için kullanılan tekniklerin başında mikrobiyolojik kültür kullanılmaktaydı. Buna karşın yeni gelişen moleküler tekniklerle kültürü yapılamayan mikroorganizmaların saptanması ve bakteri çeşitliliğinin daha iyi anlaşılması bu alanda devrim yaratmıştır. Güvenilir dizi datalarının artışı bu çalışmaları farklı bir aşamaya geçirmiştir (332). Burada kullanılan teknikleri, kültür bağımlı ve kültür bağımsız olarak 2'ye ayırabiliriz.

2.15.1. Kültür bağımlı teknikler

İlk çalışmalar yeni doğanların dışkı mikrobiyotasını araştırırken, farklı türlerin kültüre edilmesine ve üretilen kolonilerin koloni yapısı ve biyokimyasal metodlar gibi tekniklerle identifiye edilmesine dayalıydı (333, 334). Bağırsak mikrobiyotasındaki bakterilerin sadece %20'si kültüre edilebilmektedir (64). Mikroorganizmaların başarılı kültürleri fenotipik, metabolik kapasiteleri ve pasajlarındaki davranışlarının incelenmesine izin verir. gastrointestinal yollarda bulunan bakterilerin pasaj çalışmaları farklı bakteriler ile simbiotik özellikler oluşturan yeni ekolojiler göstermiştir. Örneğin siyanolitik *Roseburia intestinalis* ve H₂ kullanan *Ruminococcus hydrogenotrophicus* birlikte pasajlanırsa bütirat üretimleri anlamlı şekilde arttığı bildirilmiştir (335). Kültür bağımlı yaklaşımın bağırsak mikrobiyotasınının tam çeşitliliğini keşfetmek için yetersiz olduğu kabul edilse de seçici besiyerleri ve anaerobik inkubasyon uygulaması ile bu tekniği diğer tekniklerle birleştirilerek geliştirme çabası bulunmaktadır. Örneğin kütle spektrometri tekniği, MALDI-TOF ile birleştirilerek kültür sonrası elde edilen çok sayıdaki koloninin identifikasyonu için gerekli zaman kısaltılmıştır (336).

Araştırmalarda, önemli noktalara kültürün girmesi için halen yeterli gerekçeler bulunmaktadır. Örneğin düşük bakteri yüklü hastada kültürle, yeni jenerasyon sekans (NGS) 454 pirosekanslamaya göre daha fazla bakteriyel tür identifiye edildiği bildirilmiştir (337). Bunun dışında, moleküler tekniklerden edinilen bilgi sayesinde, önceden kültüre edilemediği düşünülen organizmaların üretilme imkanı da sağlanmıştır.

2.15.2. Kültür bağımsız teknikler

1990'dan beri moleküler teknikler klinik araştırmalarda uygulamaya konulmuş ve kültür bağımlı tekniklere göre mikrobiyal toplulukları karşılaştırmak açısından daha büyük bir veri sağlamıştır (338). Moleküler teknikler bağırsak mikrobiyotasını içeriği ve yapısı hakkında ön bilgimiz olmaksızın tanımlamak ve takip etmeye izin vermiştir. Moleküler tekniklerin temeli, numunelerden nükleik asitlerin (DNA ve/veya RNA) izolasyonudur (339). Hem deoksiribonükleik asit (DNA) hemde ribonükleik asit (RNA) moleküler yaklaşımlarda dışkıda mikrobiyal toplulukların analizi için kullanılabilir. DNA analizleri RNA'nın çalışma sırasında potansiyel parçalanması ve zorlukları nedeniyle daha sıktır. Taşıma sırasında numunelerdeki RNA'nın parçalanmasının önlenmesi için RNA sabitleyici solusyonlar kullanılabilir (340). Ekstrakte RNA'dan analizlerin yapılması özellikle metabolik olarak aktif toplulukların araştırılmasına izin

verir. Bu, özellikle etyoloji araştırmalarında metabolik olarak aktif patojenin araştırılması için önemlidir (341). Mikroorganizmalara ait nükleik asit izolasyonu sonrası, araştırmalarda, aşağıda sıralanan tekniklerden yararlanılabilmektedir.

2.14.2.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) moleküler biyolojide en geniş kullanımı olan tekniklerden biridir. Mullis ve ark. tarafından 1986 yılında tanımlanmıştır (342). Bu teknik, moleküler yaklaşımlarda kullanılan moleküler parmak izi tekniği ve yeni jenerasyon sekans sistemi gibi bazı tekniklere temel oluşturmaktadır. PZR kısaca döngüler boyunca uygulanan sıcaklık değişimleriyle, bir tp içerisinde bulunan kalıp DNA'nın (template, ana DNA), ısıya dayanıklı DNA polimeraz enziminin (Taq polimeraz), eşit konsantrasyonda A, T, G ve C bazlarının (dNTP'ler; Deoksi ribonkleosid trifosfatlar), katalizör amaçlı uygun iki değerli katyonların (Mg ve Mn gibi), tamponların (Tris-Cl) ve tek zincirli aranan hedefe spesifik oligonükleotidlerin (primer) varlığında, istenen DNA veya RNA dizisinin in vitro koşullarda çoğaltılması işlemidir. PZR, istenen hedef diziye komplementer oligonukleotid primerleri, DNA kalıbı, her bir deoksinukleozit trifosfatı (dNTP; dATP, dCTP, dGTP, dTTP), polimerazı ve kofaktörleri içeren bir reaksiyondur. Polimeraz olarak sıklıkla Taq polimeraz kullanılır, bu termofilik *Thermus aquaticus*'dan elde edilmiştir. Reaksiyon prensip olarak birbirini takip eden 3 ısı değişimi ile gerçekleşir. 1. Yüksek ısıda DNA'nın denatürasyonu, 2. Düşük ısılarda primerlerin bağlanması, 3. Orta düzey ısıda dNTP'ler ile komplementer dizinin oluşturulması. Oluşan elde edilen ürünün (amplikon) uzunluğu forward ve reverse primerler arasındaki fragmanın boyutuna bağlıdır. Elde edilen ürünün (amplikon) miktarı eksponansiyel olarak artar ve reaksiyondaki döngü sayısına bağlıdır (342). Tüm teknikler gibi sınırları ve kısıtlamaları vardır. Hedefin bilinmesi gerekir. Yalancı pozitiflikler, heterodupleks formasyonlar ve kimerik diziler dolayısıyla oluşabilir. Heterodupleks formasyon, PZR işlemi sırasında birbirinden farklı dizilerin birbiri üzerinde katlanarak varolmayan gen için görüntülenmesidir (343).

2.14.2.2. Kantitatif PZR (Gerçek Zamanlı PZR)

Kantitatif PZR (qPCR) veya gerçek zamanlı PZR (real time PCR), bir başka PZR tabanlı tekniktir ve hedef genin kantitasyonuna gerçek zamanlı olarak fırsat verir. qPZR, sağlam, oldukça güvenilir, tekrarlanabilir ve duyarlı bir metoddur. Mikrobiyoloji de bu yöntem bakterilerin, virüslerin doğru biçimde kantitasyonu için kullanılır. Bu teknik floresans tespitine dayanır. Tamamlanan her bir siklusta amplikonların sayısına bağlı olarak oluşan floresans sinyal toplanır. Aranılan DNA'nın miktarı, gerçek zamanlı PZR (qPZR) sistemleri tarafından çalışma sırasında oluşan floresans sinyalin ölçümü ile oluşturulan amplifikasyon eğrilerinde saptanan Ct (Cq veya Cp) değerleri üzerinden hesaplanır (344). qPZR'da floresans sinyalin toplanması için 2 farklı teknik kullanılmaktadır. Hedef spesifik olmayan birinci teknikte, SYBR green I kullanılmaktadır. SYBR green I, reaksiyon sırasında oluşan tüm çift zincirli DNA'lara (dsDNA) bağlanmakta ve sinyal vermektedir. Bu boya en sık kullanılan non spesifik boyadır (345). Her türlü çift zincirli DNA'ya bağlanabileceği için iyi optimize edilmiş olması önemlidir. Ayrıca amplikonların doğruluğu bu amplikonların erime eğrisi kontrol edilerek konfirme edilmelidir (346). Hedef spesifik olarak çalışılan ikinci teknikte ise raporlayıcı ve baskılayıcı ihtiva eden özel boyalar kullanılmaktadır. Bu teknikte kullanılan boyalar gerçek zamanlı PZR'da ikinci sıklıkta kullanılan boyalardır. Taqman veya hidroliz problemleri olarak adlandırılır. Bu boyada bulunan raporlayıcı boya 5' ucuna, baskılayıcı boya ise 3' bölgesine bağlanır. Hedefe spesifik olarak dizayn edilirler. Raporlayıcı ve baskılayıcı birbirine yakın oligonukleotidlerde dizayn edilmiştir. Yan yana oturduklarında floresans tespit edilmez (346). Yeni dizi oluştuğu sırada Taq polimeraz 5' ekzonukleaz aktivitesi ile prob'u 5' ucundan keser böylelikle raporlayıcı ve baskılayıcı birbirlerinden ayrılır. Raporlayıcı tarafından oluşturulan yoğun floresans tespit edilebilir hale gelir (344). qPZR, mikrobiyota çalışmalarında sıklıkla bakterilerin kantitasyonunun yapılması, ayrıca kültür ile üretilmeyen bakterilerin tespiti için sıklıkla kullanılmaktadır. Maliyetlerinin diğer yöntemlere kıyasla daha uygun olması, elde edilen verinin oldukça duyarlı olması, değerlendirme için biyoinformatik gereksinimlere ihtiyaç duymaması nedeniyle son yıllarda bu teknikle yapılmış birçok mikrobiyota çalışması bulunmaktadır (2, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 176).

2.14.2.3. Moleküler parmak izi tekniği

İlk jenerasyon moleküler parmak izi teknikleri denature edici gradyent jel elektroforezi (DGGE) ve ısıtıcı gradyent jel elektroforezidir (TGGE). Bu teknikler sadece 500 baz çiftini geçmeyen kısa ampikonların ayrılması için kullanılır (347). Bu teknik, G-C ve A-T baz çiftleri arasında farklı hidrojen bağları olmasına ve bunun sayısının kontrolüne dayanır. G-C bazları 3, A-T bazları arasında 2 hidrojen bağı bulunur. G-C baz çiftinin denatüre olarak ayrılması için daha fazla denatüran konsantrasyonuna ihtiyaç vardır. Denatüre edici kimyasallarla birbirinden ayrılan komplementer DNA iplikçikleri elektroforez sırasında, jelde göç edecek fakat bu sırada jele artan konsantrasyonda kimsayal eklenecektir. İplikçik denatüre olunca göç duracaktır. Yüksek G-C içeriği olan iplikçikler daha zor denatüre olarak jelde diğer iplikçiklere göre daha uzağa gidebilecektir (348). Jel boyanabilir ve mor ötesi (UV) ışık altında ampikonların pozisyonları görülebilir. Teoride tek baz farkının bile ayrılabilceği düşünölmekteyken, pratikte jelde bu ayrımın görönlenebilmesi sınırlıdır (349).

2.14.2.4. Yeni Jenerasyon Dizileme (NGS)

Yeni jenerasyon sekans sistemleri metagenomik alanında mikrobiyal toplulukların tespitinde devrim niteliğindedir. Önceden mümkün olmayan derinlikte ve keskinlikte, verinin sunulabilmesi en büyük avantajıdır (350). Yeni jenerasyon sekans sistemlerinin temeli, DNA polimeraz aktivitesinin kemilüminesan bir enzim aracılığıyla tespitine dayanmaktadır. Dizileme reaksiyonu, dizilenecek DNA'nın, tek sarmallı DNA (ssDNA) üzerinde, bunun tamamlayıcısı olan komplementer DNA (cDNA)'nın sentezlenmesi şeklindedir. Öncelikle çift zincirli DNA'nın (dsDNA) nebulizasyonu ile 400-800 baz çiftlik (bç) küçük fragmanlara ayrılır. Bu fragmanlara dizileme primerlerini taşıyan adaptörler eklenir. Adaptörleri taşıyan DNA parçacıklarının, özel kuyucuklar içerisinde emülsiyon bazlı klonal amplifikasyonu (em-PZR) yöntemi ile çoğaltımı gerçekleştirilir. Bu aşama sonrasında, yaklaşık olarak 10 milyon kopyaya çıkarılmış DNA fragmanları, özel pleytlere alınır, bu DNA üzerine ardışık olarak akan A, C, G, T bazları, DNA dizisinin tamamlayıcısı olması durumunda ortamda bir ışık oluşturur. Bu ışığı yaratan kemilüminesan sinyalin hangi bazın bağlanması sırasında olduğu tespit edilir. Bu kemilüminesan sinyalin şiddeti bazlarla doğru orantılıdır, bu sayede aynı dizi üzerindeki nükleotid tekrarları tespit edilebilir. Ortaya çıkan bu ışık yeni jenerasyon

sekans platformlarındaki kameralar tarafından kaydedilir ve bilgisayar program yardımıyla dizi verilerine (flogram) dönüştürülür (350). Bu yöntem kullanılarak, 7.5 saatte 100-500 milyon bazlık büyük bölgeler için dizileme yapmak mümkündür (350, 351). Farklı yeni jenerasyon platformları mevcuttur. Bu platformlar kullandığı enzim, kimya, yüksek çözünürlüklü optik gibi farklar içerirler. Her bir numune için spesifik adaptör kullanımı ile biyoinformatik süreçte numunelerdoğru biçimde haritalanabilir (352). Son yıllarda, bu yöntem ile mikrobiyom ve mikrobiyota üzerine birçok çalışma yapılmıştır (4, 5, 10, 133, 146, 147, 170, 296). Kapsamlı veri elde edilmesi dolayısıyla, özellikle mikrobiyom ve mikrobiyota çalışmalarında bu yöntem tercih edilse de, malzeme, cihaz ve bilgisayar maliyetlerinin yüksekliği, yetişmiş eleman gereksinimi, biyoinformatik değerlendirme sürecinin zorluğu nedeniyle her zaman kullanılamamaktadır (353).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma, olgu kontrol temelli çapraz kesitsel olarak, Ocak 2014 - Ekim 2014 tarihleri arasında, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Endokrinoloji Anabilim dalı polikliniğine başvuran ve tip 1 diyabet tanısı almış olan 53 erişkin hastadan ve 53 sağlıklı bireyden alınan gaita ve kan örnekleri ile Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı laboratuvarlarında gerçekleştirildi.

İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Etik Kurulu'nun onayı alınarak (Karar No: 83045809/30339) başlatılan bu çalışmaya katılmayı kabul eden tüm hastalara ve sağlıklı bireylere, çalışmayı anlatan bilgilendirilmiş hasta onam formu verilmiş ve katılımcıların imzalı onayları alınmıştır.

3.1. Çalışma Gruplarının Oluşturulması

3.1.1. Hasta grubu

Çalışmaya dahil olacak hasta grubu aşağıdaki kriterler dikkate alınarak randomize oluşturulmuştur.

a. Tip 1 diyabet tanısı almış olmak.

Hastalar tip 1 diyabet tanısını, aşağıda belirtilen kriterlerden en az birine sahip olmaları ile almışlardır (249).

- En az 8 saat açlık sonrası bakılan plazma glikoz değerinin 126 mg/dl veya üstünde bulunması,
- 75 gr glukoz ile yapılan Oral Glikoz Tolerans Testinin (OGTT) 2. Saatinde plazma glukozunun 200 mg/dl veya üstünde olması,
- Glikozillenmiş Hemoglobin (HbA1c) değerinin %6.5 veya üstünde olması.
- Rastgele ölçülen kan glikozunun 200 mg/dL'nin üzerinde olması ve diyabeti destekleyen poliüri, polidipsi gibi klinik bulguların olması.

b. Tip 1 diyabet dışında bir hastalığı olmamak.

c. Obez olmamak. (Uluslararası Obezite Görev Gücü (IOTF) ve Dünya Sağlık Örgütü (WHO)'nun belirlediği kriterlere göre VKI'nin >30 kg/m² olmaması) (354, 355).

d. Son iki hafta içinde antibiyotik kullanmamış olmak.

e. Son bir ay içinde probiyotik kullanmamış olmak.

f. Ergen olmak (≥ 18 yaş).

- g. Anne ve babanın tip 1 diyabet tanısı almamış olması.

3.1.2. Kontrol grubu

Çalışmaya dahil olan kontrol grubu bireylerinin aşağıdaki kriterleri sağlamış olmasına dikkat edildi. Kontrol grubu bireylerinin, hasta grubu randomize alındıktan sonra, yaş ve cinsiyet dağılımı yönünde hasta grubu ile birebir eşleşmesine dikkat edildi.

- Sağlıklı olmak (Başta diyabet olmak üzere hiçbir hastalığının bulunmaması)
- Son iki hafta içinde antibiyotik kullanmamış olmak.
- Son bir ay içinde probiyotik kullanmamış olmak.
- Ergen olmak (≥ 18 yaş).
- Obez olmamak.(Uluslararası Obezite Görev Gücü (IOTF) ve Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) belirlediği kritere göre VKI'nin >30 kg/m² olmaması) (354, 355).
- Anne ve babanın tip 1 diyabet tanısı almamış olması.

3.2. Örnekler ve Yapılan Analizler

3.2.1. Gaita örneklerinden yapılan analizler

- Tip 1 diyabetli hastaların ve sağlıklı kişilerin taze gaita (dışkı) örneklerinden *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Bacteroides fragilis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*' nin qPZR ile kantitasyonu yapıldı.

3.2.2. Kan örneklerinden yapılan analizler

- Tip 1 diyabetli hastaların ve sağlıklı kişilerin tam kan örneklerinden hücresel TLR2 ve TLR4 mRNA düzeylerinin belirlenmesi için gen ifadelerinin kantitasyonları yapıldı

3.3. GEREÇLER

Çalışma sırasında kullanılan besiyerleri, stok solüsyonlar, test kitleri, ayıraçlar ve diğer malzemeler aşağıda belirtilmiştir.

3.3.1. Kullanılan Besiyerleri

3.3.1.1. Bakterilerinin Üretimi ve Tanımı için Kullanılan Besiyerleri

Rogasa Agar Besiyeri (*Lactobacillus* spp. seçici agar)

Kazein pepton	10 gr
Maya özü	5 gr
D(+) glükoz	20 gr
Potasyum dihidrojen fosfat	6 gr
Amonyum sitrat	2 gr
Sodyum asetat	15 gr
Magnezyum sülfat	0,575 gr
Ferröz sülfat	0,034 gr
Manganöz sülfat	0,12 gr
Agar	15 gr
Distile su	1000 ml

73 gr Rogasa Agar içeriği 1000 ml distile su içinde çözülür. Bunun üzerine 10 ml steril %10 Tween 80 solüsyonu ilave edilir. Hazırlanan besiyeri 1.32 ml glasiyal asetik asit kullanılarak pH=5.5 olacak şekilde ayarlandı. 121 °C’de 15 dakika steril edildi. Petri kutularına döküldü. Bu besiyeri pozitif kontrol olarak kullanılan *L.acidophilus* ve *L.casei* ATCC kökenlerini çoğaltmak ve bu kökenlerle plazmid oluşturularak qPZR’da standart eğri oluşturulması için kullanıldı.(356)

Zenginleştirilmiş Tiyoglikolatlı Sıvı Besiyeri

Maya özütü	5 g
Tripton	15 g
Glikoz	5,5 g
Sodyum tiyoglikolat	0,5 g
Sodyum klorit	2,5 g
L-sistein	0,5 g
Resazurin	0,001 g
Hemin stok solüsyon	1 ml
Agar	0,75 g
Distile su	1000 ml

Besiyeri (Oxoid) 1000 ml distile suda ısıtılarak eritildikten sonra pH 7,1 ± 0,2’e ayarlandı. İçine 1 ml hemin stok solüsyonu ilave edildi ve tüplere 10 ml dağıtıldı. 121 °C’de 15 dakika otoklavlandıktan sonra 45° C ’ye gelinceye kadar soğutuldu. Bu

besiyeri parafilm ile kapatılıp 4 °C’de saklandı (174, 326).Bu besiyeri pozitif kontrol olarak kullanılan ATCC kökenlerinin Zenginleştirilmiş Schaedler ve Rogosa agar besiyerine ekimi sırasında süspansyon hazırlanması ve pasajlar için kullanıldı (356, 357).

Zenginleştirilmiş Schaedler Agar Besiyeri

Schaedler agar	45 g
Distile su	1000 ml

45 g Schaedler agar (Oxoid)[(Trypton Soya Agar (10 g), pepton (5 g), maya özütü (5 g), glikoz (5 g), hemin (0,01 g), tris buffer (0,75 g), agar (13,5 g)], 1000 ml distile suda eritildikten sonra 250 ml’lik balonlara bölündü. pH 7,4 ± 0,2’e ayarlandı 121 °C’de 15 dakika steril edildi. Kullanılacağı zaman 250 ml’lik besiyeri eritilip, 45 °C’ye kadar soğutuldu. Soğuyunca içine;

Vitamin K1 solüsyonu	0,25 ml
Koyun kanı	12,5 ml

İlave edildi, iyice karıştırıldıktan sonra 4 mm kalınlığında olacak şekilde Petri kutularına dağıtıldı. Bu besiyeri pozitif kontrol olarak kullanılan *B.fragilis* ATCC kökenini çoğaltmak ve bu kökenlerle plazmid standartlar oluşturularak qPZR’da standart eğri oluşturulması için kullanıldı. (356, 357, 358).

Çukulatamsı Agar Besiyeri

Agar base (oxoid)	40 g
Defibrine koyun kanı	50 ml
Distile Su	1000ml

Üretici firmadan (Oxoid) toz besiyeri 500 g’lık kutuda hazır olarak alındı 1000 ml distile suda 40 gr toz besiyeri [(Trypton (14 g), nötralize pepton (4,5 g), maya özütü (4,5 g), sodyum klorit (5 g), agar (12 g)] eritildi . pH 7,3 ± 0,2’e ayarlandı ve 121 °C’de 15 dakika otoklavlandıktan sonra 45 °C’ye kadar soğutuldu. 50 ml defibrine koyun kanı ilave edilerek iyice karıştırıldı. 2 dakika boyunca kaynayan suda tutuldu. İyice karıştırıldıktan sonra 4 mm kalınlıkta olacak şekilde Petri kutularına döküldü. Bu

besiyeri anaerop şartlarda üretilen kontrol kökenlerinin aerotolerans kontrolü için kullanıldı (356, 357).

3.3.1.2. Stok Solüsyonlar

Vitamin K1 Stok Solüsyonu (10 mg/ml)

K1 vitamini	0,1 g
Saf etanol	100 ml

K1 vitamini (Sigma) saf etanol ile karıştırılarak koyu renkli bir şişede buzdolabında saklandı (356). Zenginleştirilmiş schaedler agar besiyerinin hazırlanması için kullanıldı.

Tween 80 (%10) solüsyonu

Tween 80	1 ml
Distile su	9 ml

%10 Tween 80 (Sigma) solüsyonu için gerekli dilüsyon distile su ile yapıldı (356). Rogosa agar besiyerinin hazırlanması için kullanıldı.

Sodyum Fosfat Tamponu (PBS) (pH=6,8)

A Eriyiği=0,2 M monobazik sodyum fosfat stok çözelti:

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 31,2 gr

Saf su ile 1000 ml'ye tamamlanarak eritildi.

B Eriyiği=0,2 M dibazik sodyum fosfat stok çözelti:

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 28,39 gr

Saf su ile 1000 ml'ye tamamlanarak eritildi.

A çözeltisinden 51 ml, B çözeltisinden 49,0 ml karıştırılarak pH=6,8'e ayarlandı (357, 358). Ependorf tüplerde, üretilen kontrol kökenlerinin sıvı süspansiyonlarının hazırlanması için kullanıldı (358).

Dışkı numuneleri transport ve geri kazanım solüsyonu (S.T.A.R. buffer)

Dışkı numuneleri transport ve geri kazanım solüsyonu (S.T.A.R.buffer) (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim Almanya) edetik asit disodyum dihidrat tuzu ve sodyum sitrat içeren hazır ticari bir solüsyondur. Bu solüsyon, dışkıdan DNA izolasyonu için gereken ön hazırlıklarda kullanıldı.

3.3.2. Test kitleri

1. Magna Pure 96 DNA and Viral NA Small Volume kiti (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim Almanya). Bu kit, hasta ve kontrol gruplarındaki bireylerin dışkı örneklerinden bakterilere ait DNA'ların eldesi için kullanıldı (359).
2. Magna Pure 96 Cellular RNA Large Volume kiti (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim Almanya). Bu kit, hasta ve kontrol gruplarındaki bireylerin kan örneklerinden RNA eldesi için kullanıldı (360).
3. Fast Start Essential Probe Master kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim Almanya). Bu kit qPZR reaksiyonlarının gerçekleştirilmesinde mastermiks olarak kullanıldı (361).
4. Transcriptor First Strand cDNA synthesis kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim Almanya). Bu kit olgulardan alınan kan örneklerinden elde edilen RNA'dan komplementer DNA (cDNA) yapımı için kullanıldı (362).
5. Universal Probe Library probe #10 kiti (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim Almanya). Bu kit cDNA'lardan TLR4 mRNA düzeyinin saptanması için kullanıldı (363).
6. Universal Probe Library prob#14 kiti (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim Almanya). Bu kit cDNA'lardan TLR2 mRNA düzeyinin saptanması için kullanılmıştır (363).
7. Universal Probe Library prob#73 kiti (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim Almanya). Bu kit cDNA'lardan hipoksantin ribozil transferaz 1 (HPRT1) mRNA düzeyinin saptanması için kullanıldı (363).

3.3.3. Diğer malzemeler

3.3.3.1. Primerler.

Tablo 3.1 ve Tablo 3.2'de bunlar görülmektedir.

- *Bacteroidetes* F ve *Bacteroidetes* R primerleri *Bacteroidetes*'in qPZR çalışmaları için kullanıldı.
- *Firmicutes* F ve *Firmicutes* R primerleri *Firmicutes*'in qPZR çalışmaları için kullanıldı.

- *B.fragilis* F ve *B.fragilis* R primerleri *B.fragilis*'in qPZR çalışmaları için kullanıldı.
- *L.acidophilus* F ve *L.acidophilus* R primerleri *L.acidophilus*'un qPZR çalışmaları için kullanıldı.
- *L.casei* F ve *L.casei* R primerleri *L.casei*'nin qPZR çalışmaları için kullanıldı.
- TLR2 F ve TLR2 R primerleri TLR2'nin mRNA'sının qPZR ile tespiti için kullanıldı.
- TLR4 F ve TLR4 R primerleri TLR4'ün mRNA'sının qPZR ile tespiti için kullanıldı.
- HPRT1 F ve HPRT1 R primerleri referans gen olarak kullanılan HPRT1'in mRNA'sının qPZR ile tespiti için kullanıldı.

3.3.3.2. Problar (florasan boya içeren spesifik oligonükleotidler)

Tablo 3.1 ve Tablo 3.2'de bunlar görülmektedir.

Bacteroidetes prob, *Bacteroidetes*'in, *Firmicutes* prob, *Firmicutes*'in, *B.fragilis* prob *B.fragilis*'in, *L.acidophilus* prob, *L.acidophilus*'un ve *L.casei* prob, *L.casei*'nin qPZR ile tespitinde reaksiyonlardaki spesifik boyalar olarak kullanıldı.

Tablo 3.1: *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *B.fragilis*, *L.acidophilus*, *L.casei* miktarının qPZR ile belirlenmesinde kullanılan primer setleri.

Primer adı	Sekans	Referans
<i>Bacteroidetes F</i>	5' AACGCTAGCTACAGGCTTAACA'3	364
<i>Bacteroidetes R</i>	5' ACGCTACTTGGCTGGTTCA'3	364
<i>Bacteroidetes Prob</i>	Fam'CAATATTCCTCACTGCTGCCTCCCGTA'Tamra	364
<i>B.fragilis F</i>	5' CACTTGACTGTTGTAGATAAAGC'3	365
<i>B.fragilis R</i>	5' CATCTTCATTGCAGCATTATCC'3	365
<i>B.fragilis Prob</i>	Fam'TGTGCTTGCTTCCAGTCGTCTATG'Tamra	365
<i>Firmicutes F</i>	5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG'3	366
<i>Firmicutes R</i>	5' ATTACCGCGGCTGCTGG'3	366
<i>Firmicutes Prob</i>	Fam'CTGATGGAGCAACGCCGCGT'Tamra	366
<i>L.acidophilus F</i>	5' ATGGAAAAGGTTGGCCA'3	367
<i>L.acidophilus R</i>	5' TCAGTTACCATGTATTGTGACA'3	367

<i>L. acidophilus Prob</i>	FAM'TCGAAGATTCACGTGGTATCAATAC'Tamra	367
<i>L.casei F</i>	5'CTATAAGTAAGCTTTGATCCGGAGATTT'3	368
<i>L.casei R</i>	5'CTTCCTGCGGGTACTGAGATGT'3	368
<i>L.casei Prob</i>	Fam'ACAAGCTATGAATTCACCTTGC'Tamra	368

F: Forward (ileri) primer ve R: reverse (geri) primer

Tablo 3.2: TLR2, TLR4 mRNA gen ekspresyon düzeylerinin qPZR ile belirlenmesinde kullanılan primer setleri.

Primer	Sekans	Pozisyon	Amplikon boyu	Tm	Ref.
TLR2 (NM_003264*) F	5'cggtctctcaggtgactgctc'3	39-59	63	60	363
TLR2 (NM_003264*) R	5'cctttggatcctgcttgc'3	84-101		59	363
TLR4 (NM_138554*) F	5'cctgcgtgagaccagaaag'3	347-365	76	59	363
TLR4 (NM_138554*) R	5'ttcagctccatgcattgataa'3	402-422		59	363
HPRT1 (NM_000194*) F	5'tgaccttgattattttgcatacc'3	218-241	102	59	363
HPRT1(NM_000194*) R	5'cgagcaagacggttcagctc'3	300-319		60	363

F: Forward (ileri) primer ve R: reverse (geri) primer

* NCBI Gene veritabanı erişim numaraları

3.3.3.3. 16S rRNA kantitasyon standartları

Dışkı numunelerinden elde edilen DNA'larda, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Bacteroides fragilis*, *L.acidophilus* ve *L.casei* miktarının belirlenmesi için qPZR çalışmalarında standart eğrilerin oluşturulmasında kullanılan miktarı bilinen plazmid standartlardır. Bu standartlar Bioeksen firmasından temin edilmiştir.

3.3.3.4. Pozitif kontroller

B.fragilis ATCC 25285, *L.acidophilus* ATCC 4356 ve *L.casei* ATCC 393 standart kökenleri.

Dışkılardan elde edilen DNA'larla yapılan qPZR çalışmalarında *B.fragilis*, *L.acidophilus* ve *L.casei* sonuçlarının kontrolü için pozitif kontrol olarak ayrıca plazmid standartların oluşturulmasında, *B.fragilis* için ATCC 25285, *L.acidophilus* için ATCC 4356 ve *L.casei* için ATCC 393 standart kökenleri kullanıldı.

3.3.3.5. Sarf malzemeler

- a. PAXgene Blood RNA tüpleri; mRNA'ların taşıma aşamasında parçalanmasını önleyecek koruyucu içermesi nedeniyle, gen ekspresyonu çalışmaları için hasta ve kontrol numunelerinin toplanılmasında kullanıldı.
- b. Dışkı kapları; *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Bacteroides fragilis*, *L.acidophilus* ve *L.casei* miktarlarının tespitinde kullanılacak, DNA eldesi için kullanıldı.
- c. Steril petri; *B.fragilis* *L.acidophilus* ve *L.casei* ATCC kökenlerinin plazmid oluşturulmasında kullanılmak üzere bu kökenlerin üretimi için kullanıldı.
- d. Lightcycler 480 çok kuyucuklu pleyt; tüm qPZR reaksiyonlarında cihaza çalışma yükleme amacıyla kullanıldı.
- e. Anaerobik ortam sağlayıcı (Gas-Pak); kontrol kökenlerinin üretimi sırasında jarlarda anaerobik ortamın sağlanması için kullanıldı.
- f. Steril filitreli pipet uçları; 0,5-10 µl, 10-100 µl ve 100-1000 µl tüm qPZR işlemleri sırasında kullanıldı.
- g. Steril 1,5 ml Ependorf tüpleri; tüm qPZR işlemleri sırasında kullanıldı.

3.4. YÖNTEMLER

Çalışmamızda numune alımından sonuçların elde edilmesine kadar olan aşamalarda kullandığımız yöntemler aşağıda özetlenmiştir.

- a. Hastalara ve kontrollere ait bilgilerin yer aldığı formların doldurulması
- b. Hastalardan ve kontrollerden gaita ve kan örneklerin toplanması
- c. Kontrol kökenlerinin üretimi ve plazmid standartlarının oluşturulması
- d. Gaita'dan bakterilere ait DNA izolasyonlarının gerçekleştirilmesi
- e. Gerçek zamanlı PZR (qPZR) ile elde edilen DNA'lardan *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *B.fragilis*, *L.casei* ve *L. acidophilus* kantitasyonunun yapılması
- f. Kan örneklerinden RNA izolasyonunun yapılması
- g. Elde edilen RNA'lardan cDNA sentezinin yapılması
- h. TLR2 ve TLR4 mRNA gen ekspresyon miktarlarının tespiti

3.4.1. Hastalara ve Kontrollere Ait Bilgilerin Yer Aldığı Formların Doldurulması

Çalışmamız sırasında İstanbul Üniversitesi Tıbbi Etik Kurul Yönergesi'ne göre hastalara ve kontrol grubunun sağlıklı bireylerine bilgilendirilmiş onam formu verilmiş ve onayları alınmıştır. İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Endokrinoloji anabilim dalı polikliniklerine gelen hastalardan ayrıca kontrol grubundaki bireylerden kan ve gaita numuneleri alınmadan önce çalışma için hazırladığımız formlar dolduruldu ve aranan kriterleri sağlayanlar çalışmaya dahil edildi. Bu formlarda bireylerin yaş, cinsiyet, boy, kilo, vücut kitle indeksi (VKI), açlık serum glukoz düzeyi, serum glikozile hemoglobin (HbA1C) seviyeleri, antibiyotik ve probiyotik kullanım durumu, hastalık varlığı/yokluğu bilgileri için sorular yer aldı (Form 1). Hasta ve kontrol grubunda yer alan bireylerin yaş aralıklarına göre gruplandırılmasında CDC'nin diyabet tanısı alma oranına göre belirlediği yaş aralıkları dikkate alındı (369). Yalnızca çalışma kriterlerimize uyan bireylerin numuneleri çalışmaya dahil edildi.

Tablo 3.3: CDC'nin belirlediği yaş aralıkları ve diyabet tanısı alma oranı (369).

Diyabet Tanısı Yaş Aralığı	Diyabet Tanısı Oran (%)
18-29	4.3
30-34	4.5
35-39	6.8
40-44	8.9
45-49	10.9
50-54	14.2
55-59	15.4
60-64	13.8
65-69	9.5
70-74	7.1
75-79	4.7

3.4.2. Hastalardan ve Kontrollerden Gaita ve Kan örneklerin toplanması

Örnek toplama aşamasında hasta ve kontrol grubundaki bireylerden çalışma için gaita ve tam kan örnekleri alındı. Alınan gaita örnekleri, plastik dışkı toplama kaplarına alınarak derhal anaerop jar içinde, anaerop ortamda laboratuvara getirildi. Bakterilere ait DNA izolasyon işlemleri yapılmaya kadar -20°C'de saklandı. Alınan tam kan örnekleri, "PAXgene blood RNA" kan tüplerine (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ) alınarak TLR2 ve TLR4 mRNA gen ekspresyon düzeyi çalışmalarının gerçekleştirilmesi için gereken RNA izolasyonu işlemine kadar -80°C'de saklandı.

3.4.3. Kontrol Kökenlerinin Üretimi ve Plazmid Standart Oluşturulması

B.fragilis ATCC 25285, *L.acidophilus* ATCC 4356 ve *L.casei* ATCC 393 kontrol kökenleri üretimi için laboratuvarında, zenginleştirilmiş schaedler agar besiyeri ve rogosa agar (RogA) (Fluka, Sigma isviçre) besiyerlerine ekimler yapıldı. Bu besiyerleri anaerop jarlarda anaerop ortam sağlayıcılar (Oxoid AnaerogenTM, BD GasPak EZ Anaerobe Container System) ile 37°C'de 72 saat inkübe edildi. Anaerop ortamda 72 saat inkübe edilen zenginleştirilmiş schaedler agar ve rogosa agar besiyerlerinde gözlemlenen farklı morfolojideki koloniler incelenerek not edildi.

Her farklı koloniden preparasyon hazırlanarak Gram boyama yöntemi ile boyandı ve boyanma özellikleri not edildi. Mikroskopik inceleme sonucunda Gram negatif çomak ve Gram pozitif çomak görünümünde olan bakteri kolonileri aerotolerans testine tabi tutuldu. Bunun için kolonilerden zenginleştirilmiş schaedler agar besiyeri, rogosa agar besiyerlerine hem de çukolatamsı agar besiyerine pasajlar alındı. zenginleştirilmiş schaedler agar besiyeri ve rogosa agar besiyerleri anaerop ortamda 37°C'de 72 saat inkübe edildi. Çukolatamsı agar besiyeri ise 24 saat 37 °C'de tutuldu. Bu test sonucunda çukolatamsı agarda üreme olmaması, anaerop besiyerlerinde üreme olması durumunda aerotolerans testi pozitif olarak değerlendirilerek, izolatanın anaerop olduğu kabul edildi (370). Plazmid standartların oluşturulması için 48 saatlik koloniler steril bir öze ile alınıp, ayrı ayrı ependorf tüplerindeki 1 ml'lik sodyum fosfat tamponu (PBS) içine inoküle edildi. Yoğunlukları 1 McFarland'a göre ayarlandı. Üretilen bu kökenlerden Bioeksen firması tarafından hazırlanan qPZR plazmid standartları teslim alındı.

3.4.4. Dışkı numunelerinden bakteri DNA'sının izolasyonu:

DNA izolasyonu için kullanılan farklı izolasyon yöntemleri kullanılmaktadır. Biz burada hızlı ve bir anda çok örneğin izolasyonuna izin verdiği için manyetik boncuk teknolojisi ile DNA ve RNA izolasyonu yapabilen Magna Pure 96 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim Almanya) sistemini seçtik. Bu cihaz, DNA ve RNA'nın yapısındaki fosfat gruplarından dolayı taşıdıkları eksi yükü bağlanabilecek artı yüklü manyetik boncuklar ve bu manyetik boncukları yakalayabilecek mıknatıslara sahip otomatik bir izolasyon prensibiyle çalışmaktadır.

Gerçek zamanlı PZR (qPZR) çalışmaları için dışkı numuneleri, dışkı numuneleri transport ve geri kazanım solusyonu (S.T.A.R. buffer) (Roche Diagnostics GmbH,

Mannheim Almanya) kullanılarak üretici direktifleri doğrultusunda aşağıdaki ön aşamalardan sonra cihaza aktarılarak izolasyon işlemine alındı.

1. Steril bir ependorf tüpüne 200 mg dışkı numunesi alındı.
2. Ependorf tüpleri üzerine 1000 µl PBS eklendi ve iyice karıştırıldı.
3. 14000g'de 1 dakika santrifüj edildi. Sıvı atılarak dışkı yıkandı.
4. Yıkama işlemi 2 kere daha tekrar edilerek PZR inhibitörlerinin uzaklaştırılması sağlandı (371)
5. Yıkama işlemi sonrası ependorf tüplerinin üzerine 550 µl PBS eklendi.
6. Bire bir oranında dışkı numuneleri transport ve geri kazanım solusyonu (S.T.A.R. buffer) ile karıştırıldı.
7. 1 dakika vortex edilerek iyice homojenize olması sağlandı.
8. Tüpler 500g'de 5 saniye spin/santrifüj edildi.
9. Yeni bir ependorf'a supernatant'dan 100 µl aktarıldı.
10. 100 µl Bakteriyel Lizis buffer (BLB) ve 20 µl Proteinaz K ilave edildi.
11. 850 rpm'de, 65°C'da 10 dakika inkübasyon gerçekleştirildi.

Elde edilen 200 µl lizat Magna Pure 96 cihazı kartuşlarına eklendi ve üretici firma direktifleri doğrultusunda Magna Pure 96 cihazında (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Almanya), Magna Pure 96 DNA/Viral NA Small volume kiti (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Almanya) ile pathogen universal 200 2.0 protokolü kullanılarak çalışıldı. İşlem tamamlandığında 100 µl DNA elde edildi. Dışkı örneklerinden elde edilen DNA'lar nanodrop spektrofotometre (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE, USA) aracılığıyla kontrol edilerek 260 nm'de konsantrasyonlarının ve 260/280 nm'de saflıklarının ölçümü yapıldı. Örnekler cihazdan çıktıktan sonra 1,5 ml'lik steril ependorf tüplerine alınıp -20 °C'de gerçek zamanlı PZR (qPZR) işlemi yapılincaya kadar saklandı.

3.4.5. Tam kan numunelerinden RNA izolasyonu:

Tam kan numunelerinden RNA elde etmek amacıyla Magna Pure 96 cihazı (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Almanya) ve Magna Pure 96 Cellular RNA Large Volume kiti (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Almanya) kullanılmıştır. Üretici firma direktifleri doğrultusunda PAXgene blood RNA tüplerinden (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ) 900 µl tam kan Magna Pure 96 cihaz kartuşuna yerleştirildi. RNA Blood LV 400 2.0 protokolü kullanılarak çalışma gerçekleştirildi.

İşlem tamamlandığında 100 µl RNA elde edildi. Kan örneklerinden elde edilen RNA'lar Nanodrop spektrofotometre (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE, USA) aracılığıyla 260 nm'de kontrol edilerek konsantrasyonları ve 260/280 nm'de kontrol edilerek saflıklarının ölçümü yapıldı. Örnekler cihazdan çıktıktan sonra 1,5 ml'lik steril ependorf tüplerine alınıp -80 °C'de gerçek zamanlı PZR (qPZR) işlemi yapılıncaya kadar saklandı.

3.4.6. RNA'lardan Komplementer DNA (cDNA) Sentezi:

Tam kan örneklerinden RNA izolasyonunun gerçekleştirilmesinin ardından Transcriptor First Strand cDNA kiti (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Almanya) ile üretici firma direktifleri doğrultusunda aşağıdaki aşamalar izlenerek komplementer DNA (cDNA) sentezi gerçekleştirildi.

1. T100 Termal Cycler (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) açılıp. 65⁰C'ye gelmesi sağlandı.
2. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 numaralı tüpler soğuk blok üzerinde çözüldü.
3. Çözülen tüpler kısa süreli santrifüj/spin edildi. Tekrar soğuk blok üzerine dizildi.
4. Numune sayısı kadar 0,2'lik PZR tüp çıkarıldı, soğuk blok üzerine dizildi.
5. Ayrı bir 0,5'lik ependorf tüp içinde aşağıdaki gibi miks hazırlandı.

1 numune için

Random Hexamer Primer (şişe 6).....1 µl x (çalışılan numune sayısı + 1)
 Oligo dT (şişe 5).....1 µl x (çalışılan numune sayısı + 1)
 Water (şişe 7).....1 µl x (çalışılan numune sayısı + 1)

6. Hazırladığımız bu miksten numuneler için işaretlenmiş 0,2'lik steril ependorf tüplerine 3 µl dağıtıldı.
7. Her bir tüpe 10 µl Total RNA numunelerinden eklendi.
8. 65C'de 10 dakika Thermal Cycler'da çalışıldı.
9. T100 Termal Cycler'dan (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) alınan tüpler vakit kaybetmeden soğuk blok üzerine dizildi.
10. Ters Transkripsiyon işlemi içingerekli miks aşağıdaki sıraya göre yeni bir 0,5µl'lik tüp içinde hazırlandı

1 numune için

Transcriptor Reverse Transcriptase Reaction Buffer (şişe 2) 4µl
 Protector RNase Inhibitor (şişe 3) 0,5µl

Deoxynucleotide Mix (şişe 4)	2µl
Transcriptor Reverse Transcriptase (şişe 1)	0,5µl

11. Örneklerin üzerine hazırlanan bu miksten 7 µl pipetlendi ve pipetajla karıştırıldı.
12. Tüpler kısa süreli spin/santrifüj edildi.
13. Aşağıdaki termal profilde T100 Termal Cyclers (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)'da çalışıldı;
 - 10 dakika 25⁰C
 - 60 dakika 55⁰C
 - 5 dakika 85⁰C
14. Elde edilen cDNA'lar çalışma yapılincaya kadar -20⁰C'de muhafaza edildi.

3.4.7. DNA'lardan Bakteri Kantitasyon Çalışmalarının Yapılması:

Tüm bakterilerin gerçek zamanlı PZR (qPZR) çalışmalarında aşağıda açıklanan yöntemler takip edildi. Sonuçların hesaplamasında, plazmid standartlar aracılığıyla sistem tarafından otomatik olarak oluşturulan standart eğriler numunelerin içeriklerindeki bakteri miktarlarının hesaplanmasında kullanıldı. Bu sonuçlara göre kontrol grubu ile hasta grupları karşılaştırıldı.

3.4.7.1. *Bacteroidetes*, gerçek zamanlı PZR (qPZR) kantitasyon çalışması:

Dışkı numunelerinden elde edilen DNA'larla *Bacteroidetes* çalışmasının yapılması için Tablo 3.1'de belirtilen *Bacteroidetes*'e spesifik forward ve reverse primerleri ile FAM işaretli hidroliz (taqman) probu (Integrated DNA Technologies, Coraville, IA) üretici firma direktifleri doğrultusunda Fast Start Essential Probe Master kiti (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim Almanya) içinden çıkan PZR kalite (grade) su ile çözüldü ve sulandırıldı, primerler için başlangıç konsantrasyonu 0,5 µM, prob için başlangıç konsantrasyonu 0,1 µM olacak şekilde ayarlandı. Çalışılacak her bir numune için mastermiks oluşturuldu (Tablo 3.4).

Tablo 3.4: *Bacteroidetes* mastermiks hazırlama protokolü

Malzeme	Miktar
PZR kalite su	4,7 μ l
<i>Bacteroidetes</i> primer F	0,1 μ l
<i>Bacteroidetes</i> primer R	0,1 μ l
<i>Bacteroidetes</i> probu	0,1 μ l
Prob Master	10 μ l
Toplam Miktar	15 μ l

F:Forward, R:Reverse

Oluşturulan mastermiks'den LightCycler 480 çok kuyucuklu beyaz pleyt'lerinde (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim Almanya) bulunan kuyucuklara 15 μ l mastermiks pipetlemesi yapıldı, ilgili kuyucukların üzerine elde edilen DNA'lardan, plazmid standartlardan ve negatif kontrolden 5 μ l ilave edildi ve toplam 20 μ l'lik qPZR miks + DNA karışımı oluşturuldu. Pipetasyonla iyice karıştırıldı. Hazırlanan pleyt'in üzeri folyo, (sealing foil - Roche Diagnostics GmbH, Mannheim Almanya) ile kapatılarak çalışma sırasında buharlaşmanın engellenmesi sağlandı, sonrasında pleyt üretici firma direktifleri doğrultusunda 2 dakika 1500xg'de santrifüj edildi. Santrifüj edilen pleyt, LightCycler 480 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim Almanya) qPZR cihazında çalışılmaya alındı (Tablo 3.5). Çizdirilen standart eğriye göre sistem yazılımı tarafından numunelere ait otomatik sonuçlar elde edildi.

Tablo 3.5: *Bacteroidetes*, gerçek zamanlı PZR çalışma protokolü

	Preinkübasyon	Amplifikasyon			Soğuma
Aşama	Preinkübasyon	Denatürasyon	Bağlanma	Uzama	Soğuma
Döngü sayısı	1 siklus	45 Siklus			1 Siklus
Sıcaklık	95 ⁰ C	95 ⁰ C	60 ⁰ C	72 ⁰ C	40 ⁰ C
Süre	10 dk.	10 sn	30 sn	1 sn	30 sn
Analiz modu	yok	Yok	yok	Okuma	yok

3.4.7.2. Firmicutes, gerçek zamanlı PZR (qPZR) kantitasyon çalışması:

Dışkı numunelerinden elde edilen DNA'larla *Firmicutes* çalışmasının yapılması için Tablo 3.1'de belirtilen *Firmicutes*'ye spesifik forward ve reverse primerleri ile FAM işaretli hidroliz (taqman) probu (Integrated DNA Technologies, Coraville, IA) üretici firma direktifleri doğrultusunda Fast Start Essential Probe Master kiti (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim Almanya) içinden çıkan PZR kalite su ile çözüldü ve sulandırıldı. Primerler için başlangıç konsantrasyonu 0,5 µM, prob için başlangıç konsantrasyonu 0,1 µM olacak şekilde ayarlandı. Sonrasında çalışılacak her bir numune için Tablo 3.6'daki protokol takip edilerek mastermiks oluşturuldu.

Tablo 3.6: Firmicutes mastermiks hazırlama protokolü

Malzeme	Miktar
PZR kalite su	4,7 μ l
<i>Firmicutes</i> primer F	0,1 μ l
<i>Firmicutes</i> primer R	0,1 μ l
<i>Firmicutes</i> probu	0,1 μ l
Prob Master	10 μ l
Toplam Miktar	15 μ l

F:Forward, R:Reverse

Oluşturulan mastermiks'den LightCycler 480 çok kuyucuklu beyaz pleyt'lerinde (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim Almanya) bulunan kuyucuklara 15 μ l mastermiks pipetlemesi yapıldığı kuyucukların üzerine elde edilen DNA'lardan, plazmid standartlardan ve negatif kontrolden 5 μ l ilave edildi ve toplam 20 μ l'lik qPZR miks + DNA karışımı oluşturuldu ve pipetasyonla iyice karıştırıldı. Hazırlanan pleyt'in üzeri folyo, (sealing foil - Roche Diagnostics GmbH, Mannheim Almanya) ile kapatılarak çalışma sırasında buharlaşmanın engellenmesi sağlandı, sonrasında pleyt üretici firma direktifleri doğrultusunda 2 dakika 1500xg'de santrifüj edildi. Santrifüj edilen pleyt, LightCycler 480 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim Almanya) qPZR cihazında çalışılmaya alındı (Tablo 3.7). Çizdirilen standart eğriye göre sistem yazılımı tarafından numunelere ait otomatik sonuçlar elde edildi.

Tablo 3.7: *Firmicutes*, gerçek zamanlı PZR çalışma protokolü

	Preinkübasyon	Amplifikasyon			Soğuma
Aşama	Preinkübasyon	Denatürasyon	Bağlanma	Uzama	Soğuma
Döngü sayısı	1 siklus	45 Siklus			1 Siklus
Sıcaklık	95 ⁰ C	95 ⁰ C	60 ⁰ C	72 ⁰ C	40 ⁰ C
Süre	10 dk.	10 sn	30 sn	1 sn	30 sn
Analiz modu	yok	Yok	yok	Okuma	yok

3.4.7.3. *Bacteroides fragilis*, gerçek zamanlı PZR (qPZR) kantitasyon çalışması:

Dışkı numunelerinden ve *B.fragilis* ATCC 25285 kültüründen elde edilen DNA'larla, *Bacteroides fragilis* kantitasyon çalışmasının yapılması için Tablo 3.1'de belirtilen *B.fragilis*'e spesifik forward ve reverse primerleri ile FAM işaretli hidroliz (taqman) probu (Integrated DNA Technologies, Coraville, IA) üretici firma direktifleri doğrultusunda Fast Start Essential Probe Master kiti (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim Almanya) içinden çıkan PZR kalite su ile çözüldü ve sulandırıldı. Primerler için başlangıç konsantrasyonu 0,5 µM, prob için başlangıç konsantrasyonu 0,1 µM olacak şekilde ayarlandı. Sonrasında çalışılacak her bir numune için Tablo 3.8'deki protokol takip edilerek mastermiks oluşturuldu.

Tablo 3.8: *B.fragilis* mastermiks hazırlama protokolü

Malzeme	Miktar
PZR Kalite su	4,7 μ l
<i>B.fragilis</i> primer F	0,1 μ l
<i>B.fragilis</i> primer R	0,1 μ l
<i>B. fragilis</i> probu	0,1 μ l
Prob Master	10 μ l
Toplam Miktar	15 μ l

F:Forward, R:Reverse

Oluşturulan mastermiks'den LightCycler 480 çok kuyucuklu beyaz pleyt'lerinde (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim Almanya) bulunan kuyucuklara 15 μ l mastermiks pipetlemesi yapıldı, ilgili kuyucukların üzerine elde edilen DNA'lardan, plazmid standartlardan, pozitif ve negatif kontrolden 5 μ l ilave edildi ve toplam 20 μ l'lik qPZR miks + DNA karışımı oluşturuldu ve pipetasyonla iyice karıştırıldı. Hazırlanan pleyt'in üzeri folyo, (sealing foil - Roche Diagnostics GmbH, Mannheim Almanya) ile kapatılarak çalışma sırasında buharlaşmanın engellenmesi sağlandı, sonrasında da pleyt üretici firma direktifleri doğrultusunda 2 dakika 1500xg'de santrifüj edildi. Santrifüj edilen pleyt LightCycler 480 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim Almanya) qPZR cihazında çalışılmaya alındı (Tablo 3.9). Çizdirilen standart eğriye göre sistem yazılımı tarafından numunelere ait otomatik sonuçlar elde edildi.

Tablo 3.9: *B.fragilis* gerçek zamanlı PZR çalışma protokolü

	Preinkübasyon	Amplifikasyon (çoğaltım)			Soğuma
Aşama	Preinkübasyon	Denatürasyon	Bağlanma	Uzama	Soğuma
Döngü sayısı	1 siklus	45 Siklus			1 Siklus
Sıcaklık	95 ⁰ C	95 ⁰ C	60 ⁰ C	72 ⁰ C	40 ⁰ C
Süre	10 dk.	10 sn	30 sn	1 sn	30 sn
Analiz modu	yok	Yok	yok	Okuma	Yok

3.4.7.4. *Lactobacillus acidophilus* gerçek zamanlı PZR (qPZR) kantitasyon çalışması:

Dışkı numunelerinden ve *L.acidophilus* ATCC 4356 kültüründen elde edilen DNA'larla *L.acidophilus* kantitasyon çalışmasının yapılması için Tablo 3.1'de belirtilen *L.acidophilus*'a spesifik forward ve reverse primerleri ile FAM işaretli hidroliz (taqman) probu (Integrated DNA Technologies, Coraville, IA) üretici firma direktifleri doğrultusunda Fast Start Essential Probe Master kiti (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim Almanya) içinden çıkan PZR kalite su ile çözüldü ve sulandırıldı. Primerler için başlangıç konsantrasyonu 0,5 µM, prob için başlangıç konsantrasyonu 0,1 µM olacak şekilde ayarlandı. Sonrasında çalışılacak her bir numune için Tablo 3.10'daki protokol takip edilerek mastermiks oluşturuldu.

Tablo 3.10: *L.acidophilus* mastermiks hazırlama protokolü

Malzeme	Miktar
PZR Kalite su	4,7 µl
<i>L.acidophilus</i> primer F	0,1 µl
<i>L.acidophilus</i> primer R	0,1 µl
<i>L.acidophilus</i> probu	0,1 µl
Prob Master	10 µl
Toplam Miktar	15 µl

F:Forward, R:Reverse

Oluşturulan mastermiks'den LightCycler 480 çok kuyucuklu beyaz pleyt'lerinde (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim Almanya) bulunan kuyucuklara 15 µl mastermiks pipetlemesi yapıldığı kuyucukların üzerine elde edilen DNA'lardan, plazmid standartlardan, pozitif ve negatif kontrolden 5 µl ilave edilmiş ve toplam 20 µl'lik qPZR miks + DNA karışımı oluşturulmuş ve pipetasyonla iyice karıştırıldı. Hazırlanan pleyt'in üzeri folyo, (sealing foil - Roche Diagnostics GmbH, Mannheim Almanya) ile kapatılarak çalışma sırasında buharlaşmanın engellenmesi sağlandı, sonrasında da pleyt üretici firma direktifleri doğrultusunda 2 dakika 1500xg'de santrifüj edildi. Santrifüj edilen pleyt LightCycler 480 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim Almanya) qPZR cihazında çalışılmaya alındı (Tablo 3.11). Çizdirilen standart eğriye göre sistem yazılımı tarafından numunelere ait otomatik sonuçlar elde edildi.

Tablo 3.11: *L.acidophilus* gerçek zamanlı PZR çalışma protokolü

	Preinkübasyon	Amplifikasyon (çoğaltım)			Soğuma
Aşama	Preinkübasyon	Denatürasyon	Bağlanma	Uzama	Soğuma
Döngü sayısı	1 siklus	45 Siklus			1 Siklus
Sıcaklık	95 ⁰ C	95 ⁰ C	60 ⁰ C	72 ⁰ C	40 ⁰ C
Süre	10 dk.	10 sn	30 sn	1 sn	30 sn
Analiz modu	yok	Yok	yok	Okuma	Yok

3.4.7.5. *Lactobacillus casei* gerçek zamanlı PZR (qPZR) kantitasyon çalışması:

Dışkı numunelerinden ve *L.casei* ATCC 393 kültüründen elde edilen DNA'larla *L.casei* kantitasyon çalışmasının yapılması için Tablo 3.1'de belirtilen *L.casei*'ye spesifik forward ve reverse primerleri ile FAM işaretli hidroliz (taqman) probu (Integrated DNA Technologies, Coraville, IA) üretici firma direktifleri doğrultusunda Fast Start Essential Probe Master kiti (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim Almanya) içinden çıkan PZR kalite su ile çözüldü ve sulandırıldı. Primerler için başlangıç konsantrasyonu 0,5 µM, prob için başlangıç konsantrasyonu 0,1 µM olacak şekilde ayarlandı. Sonrasında çalışılacak her bir numune için Tablo 3.12'deki protokol takip edilerek mastermiks oluşturuldu.

Tablo 3.12: *L.casei* mastermiks hazırlama protokolü

Malzeme	Miktar
PZR Kalite su	4,7 μ l
<i>L.casei</i> primer F	0,1 μ l
<i>L.casei</i> primer R	0,1 μ l
<i>L.casei</i> probu	0,1 μ l
Prob Master	10 μ l
Toplam Miktar	15 μ l

F:Forward, R:Reverse

Oluşturulan mastermiks'den LightCycler 480 çok kuyucuklu beyaz pleyt'lerinde (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim Almanya) bulunan kuyucuklara 15 μ l mastermiks pipetlemesi yapıldı, ilgili kuyucukların üzerine elde edilen DNA'lardan, plazmid standartlardan, pozitif ve negatif kontrolden 5 μ l ilave edildi ve toplam 20 μ l'lik qPZR miks + DNA karışımı oluşturuldu ve pipetasyonla iyice karıştırıldı. Hazırlanan pleyt'in üzeri folyo, (sealing foil - Roche Diagnostics GmbH, Mannheim Almanya) ile kapatılarak çalışma sırasında buharlaşmanın engellenmesi sağlandı. Sonrasındapleyt üretici firma direktifleri doğrultusunda 2 dakika 1500xg'de santrifüj edildi. Santrifüj edilen pleyt LightCycler 480 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim Almanya) qPZR cihazında çalışılmaya alındı (Tablo 3.13). Çizdirilen standart eğriye göre sistem yazılımı tarafından numunelere ait otomatik sonuçlar elde edildi.

Tablo 3.13: *L.casei* gerçek zamanlı PZR çalışma protokolü

	Preinkübasyon	Amplifikasyon (çoğaltım)			Soğuma
Aşama	Preinkübasyon	Denatürasyon	Bağlanma	Uzama	Soğuma
Döngü sayısı	1 siklus	45 Siklus			1 Siklus
Sıcaklık	95 ⁰ C	95 ⁰ C	60 ⁰ C	72 ⁰ C	40 ⁰ C
Süre	10 dk.	10 sn	30 sn	1 sn	30 sn
Analiz modu	yok	Yok	yok	Okuma	yok

3.4.8. cDNA'lardan gen ekspresyon düzeyi qPZR çalışmalarının yapılması:

TLR2 ve TLR4'de elde edilen hedef gen Ct sonuçları, HPRT1'den elde edilen referans gen Ct sonuçlarıyla karşılaştırılarak normalize edildi ve Livak & Schmittgen'in 2001 yılında yayınladığı $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (Delta delta Ct) yöntemi izlenerek analizi gerçekleştirildi (372). Hipoksantin-guanin fosforibozil transferaz (HPRT), pürin nükleotidlerinin kurtarılma yolunda görev alan ve çalışmamızda kullandığımız bir referans (housekeeping) gendir (373). Delta delta Ct yönteminde istenen genin analizi için ilgilenilen genin ekspresyon düzeyi, dokularda ekspresyonun değişmediği varsayılan referans (housekeeping) gen olarak kullanılan HPRT1 geninin ekspresyon düzeyine oranlandı. Böylece izole edilen RNA miktarı ve sentezlenen cDNA miktarının getirdiği deneysel hatalar ve farklılıklar normalize edildi (372, 374). Hasta grupları ve kontrol grupları için elde edilen rölatif gen ekspresyon düzeyleri arasındaki fark incelendi.

3.4.8.1. TLR2 qPZR çalışması

Bireylere ait PAXgene blood RNA tam kan tüplerindeki numunelerden elde edilen mRNA'lar, komplementer DNA (cDNA) aşamasını takiben qPZR çalışması yapılıncaya kadar -20⁰C'de muhafaza edildi. TLR2 çalışmasının yapılması için bu cDNA'lar, Tablo 3.2'de belirtilen TLR2'ye spesifik forward ve reverse primerler (Integrated DNA Technologies, Coraville, IA) ve Universal Probe Library probe #14 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim Almanya) üretici firma direktifleri doğrultusunda kullanıldı. Fast Start Essential Probe Master kiti (Roche Diagnostics

GmbH, Mannheim Almanya) içinden çıkan PZR kalite su ile primerler çözüldü ve sulandırıldı (tablo 3.2). Üretici firmanın belirlediği şekilde primerler için başlangıç konsantrasyonu 20 μM , prob için başlangıç konsantrasyonu 10 μM olacak şekilde ayarlandı. Çalışılacak her bir numune için master miks oluşturuldu (Tablo 3.14).

Tablo 3.14: TLR2 gen ekspresyon düzeyi mastermiks hazırlama protokolü

Malzeme	Miktar
PZR Kalite su	4,4 μl
TLR2 primer F	0,2 μl
TLR2 primer R	0,2 μl
UPL prob #14	0,2 μl
Prob Master	10 μl
Toplam Miktar	15 μl

F:Forward, R:Reverse

Oluşturulan mastermiks'den LightCycler 480 çok kuyucuklu beyaz pleyt'lerinde (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim Almanya) bulunan kuyucuklara 15 μl mastermiks pipetlemesi yapıldı, ilgili kuyucukların üzerine elde edilen cDNA'lardan ve negatif kontrol cDNA'sından 5 μl ilave edildi ve toplam 20 μl 'lik qPZR miks + cDNA karışımı oluşturuldu. Pipetasyonla iyice karıştırıldı. Hazırlanan pleyt'in üzeri folyo, (sealing foil - Roche Diagnostics GmbH, Mannheim Almanya) ile kapatılarak çalışma sırasında buharlaşmanın engellenmesi sağlandı. Sonrasında da pleyt üretici firma direktifleri doğrultusunda 2 dakika 1500xg'de santrifüj edildi. Santrifüj edilen pleyt Tablo 3.15'deki protokol takip edilerek LightCycler 480 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim Almanya) qPZR cihazında çalışılmaya alındı. Çalışmaların sonucunda numunelerin eşik döngü değeri (Ct (Cp) = Threshold Cycle) qPZR sistemi tarafından otomatik hesaplandı. Aynı numunenin referans gen Ct değerleri ile sistem tarafından otomatik olarak karşılaştırılarak delta delta Ct değerleri hesaplandı. Delta delta Ct değerleri, hedefimiz olan TLR2 geni miktarının, vücutta dokularda oranının

değişmediği varsayılan referans gen miktarı ile karşılaştırılma sonrası normalize edilerek, TLR2 gen miktarının normalize edilmiş halini belirlememize olanak sağladı.

Tablo 3.15: TLR2 gen ekspresyon düzeyi gerçek zamanlı PZR çalışma protokolü

	Preinkübasyon	Amplifikasyon (çoğaltım)			Soğuma
Aşama	Preinkübasyon	Denatürasyon	Bağlanma	Uzama	Soğuma
Döngü sayısı	1 siklus	45 Siklus			1 Siklus
Sıcaklık	95 ⁰ C	95 ⁰ C	60 ⁰ C	72 ⁰ C	40 ⁰ C
Süre	10 dk.	10 sn	30 sn	1 sn	30 sn
Analiz modu	yok	yok	yok	Okuma	yok

3.4.8.2. TLR4 qPZR çalışması

Bireylere ait PAXgene blood RNA kan tüplerindeki numunelerden elde edilen RNA'lar, komplementer DNA (cDNA) aşamasını takiben qPZR çalışması yapılincaya kadar -20⁰C'de muhafaza edildi. TLR4 çalışmasının yapılması için bu cDNA'lar, Tablo 3.2'de belirtilen TLR4'e spesifik forward ve reverse primerler (Integrated DNA Technologies, Coraville, IA) ve Universal ProbeLibrary probe #10 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim Almanya) üretici firma direktifleri doğrultusunda kullanıldı. Fast Start Essential Probe Master kiti (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim Almanya) içinden çıkan PZR kalite su ile primerler çözüldü ve sulandırıldı (tablo 3.2). Üretici firmanın belirlediği şekilde primerler için başlangıç konsantrasyonu 20 µM, prob için başlangıç konsantrasyonu 10 µM olacak şekilde ayarlandı. Çalışılacak her bir numune için master miks oluşturuldu (Tablo 3.16).

Tablo 3.16: TLR4 gen ekspresyon düzeyi mastermiks hazırlama protokolü

Malzeme	Miktar
PZR Kalite su	4,4 µl
TLR4 primer F	0,2 µl
TLR4 primer R	0,2 µl
UPL prob #10	0,2 µl
Prob Master	10 µl
Toplam Miktar	15 µl

F:Forward, R:Reverse

Oluşturulan mastermiks' den LightCycler 480 çok kuyucuklu beyaz pleyt'lerinde (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim Almanya) bulunan kuyucuklara 15 µl mastermiks pipetlemesi yapıldı. İlgili kuyucukların üzerine elde edilen cDNA'lardan ve negatif kontrol cDNA'sından 5 µl ilave edilmiş ve toplam 20 µl'lik qPZR miks + cDNA karışımı oluşturuldu ve pipetasyonla iyice karıştırıldı. Hazırlanan pleyt'in üzeri folyo, (sealing foil - Roche Diagnostics GmbH, Mannheim Almanya) ile kapatıldı. Çalışma sırasında buharlaşmanın engellenmesi sağlandı. Sonrasında pleyt üretici firma direktifleri doğrultusunda 2 dakika 1500xg'de santrifüj edildi. Santrifüj edilen pleyt Tablo 3.17'deki protokol takip edilerek LightCycler 480 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim Almanya) qPZR cihazında çalışılmaya alındı. Çalışmaların sonucunda numunelerin eşik döngü değeri (Ct (Cp) = Threshold Cycle) qPZR sistemi tarafından otomatik hesaplandı. Aynı numunenin referans gen Ct değerleri ile sistem tarafından otomatik olarak karşılaştırılarak delta delta Ct değerleri hesaplandı. Delta delta Ct değerleri, hedefimiz olan TLR4 geni miktarının, vücutta dokularda oranının değişmediği varsayılan referans gen miktarı ile karşılaştırılma sonrası normalize edilerek, TLR4 gen miktarının normalize edilmiş halini belirlememize olanak sağladı.

Tablo 3.17: TLR4 gen ekspresyon düzeyi gerçek zamanlı PZR çalışma protokolü

	Preinkübasyon	Amplifikasyon (çoğaltım)			Soğuma
Aşama	Preinkübasyon	Denatürasyon	Bağlanma	Uzama	Soğuma
Döngü sayısı	1 siklus	45 Siklus			1 Siklus
Sıcaklık	95 ⁰ C	95 ⁰ C	60 ⁰ C	72 ⁰ C	40 ⁰ C
Süre	10 dk.	10 sn	30 sn	1 sn	30 sn
Analiz modu	yok	yok	yok	Okuma	yok

3.4.8.3. HPRT1 qPZR çalışması

Bireylere ait PAXgene blood RNA kan tüplerindeki numunelerden elde edilen RNA'lar, komplementer DNA (cDNA) aşamasını takiben qPZR çalışması yapılincaya kadar -20⁰C'de muhafaza edildi. HPRT1 çalışmasının yapılması için bu cDNA'lar, Tablo 3.2'de belirtilen HPRT1'e spesifik forward ve reverse primerler (Integrated DNA Technologies, Coraville, IA) ve Universal Probe Library prob #73 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim Almanya) üretici firma direktifleri doğrultusunda kullanıldı. Fast Start Essential Probe Master kiti (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim Almanya) içinden çıkan PZR kalite su ile primerler çözüldü ve sulandırıldı (tablo 3.2). Üretici firmanın belirlediği şekilde primerler için başlangıç konsantrasyonu 20 µM, prob için başlangıç konsantrasyonu 10 µM olacak şekilde ayarlandı. Çalışılacak her bir numune için master miks oluşturuldu (Tablo 3.18).

Tablo 3.18: HPRT1 gen ekspresyon düzeyi mastermiks hazırlama protokolü

Malzeme	Miktar
PZR Kalite su	4,4 µl
HPRT1 primer F	0,2 µl
HPRT1 primer R	0,2 µl
HPRT1 prob #73	0,2 µl
Prob Master	10 µl
Toplam Miktar	15 µl

F:Forward, R:Reverse

Oluşturulan mastermiks'den LightCycler 480 çok kuyucuklu beyaz pleyt'lerinde (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim Almanya) bulunan kuyucuklara 15 µl mastermiks pipetlemesi yapıldı, ilgili kuyucukların üzerine elde edilen cDNA'lardan ve negatif kontrol cDNA'sından 5 µl ilave edildi ve toplam 20 µl'lik qPZR miks + cDNA karışımı oluşturulmuş ve pipetasyonla iyice karıştırıldı. Hazırlanan pleyt'in üzeri folyo, (sealing foil - Roche Diagnostics GmbH, Mannheim Almanya) ile kapatıldı, çalışma sırasında buharlaşmanın engellenmesi sağlandı. Pleyt üretici firma direktifleri doğrultusunda 2 dakika 1500xg'de santrifüj edildi. Santrifüj edilen pleyt Tablo 3.19'daki protokol takip edilerek LightCycler 480 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim Almanya) qPZR cihazında çalışılmaya alındı. Bu çalışmadan alınan HPRT1 gen ekspresyon düzeyi sonuçları, çalışmanın referans (housekeeping) geni olarak kullanıldı. Çalışmaların sonucunda numunelerin amplifikasyon eğrilerinde görülen eşik döngü değeri (Ct = Threshold Cycle) qPZR sistemi tarafından otomatik olarak hesaplandı. TLR2 ve TLR4 Ct değerleri ile elde ettiğimiz HPRT1 Ct değerleri ile sistem tarafından otomatik olarak karşılaştırıldı ve gen ekspresyon miktarı olarak ifade edilen delta delta Ct değerleri hesaplandı. Delta delta Ct değerleri, hedefimiz olan TLR2 ve TLR4 geni miktarının, vücutta dokularda oranının değişmediği varsayılan HPRT1 referans gen miktarı ile karşılaştırılması sonrası, TLR2 ve TLR4 gen miktarlarının normalize edilmiş halini belirlememize olanak sağladı.

Tablo 3.19: HPRT1 gen ekspresyon düzeyi gerçek zamanlı PZR çalışma protokolü

	Preinkübasyon	Amplifikasyon (çoğaltım)			Soğuma
Aşama	Preinkübasyon	Denatürasyon	Bağlanma	Uzama	Soğuma
Döngü sayısı	1 siklus	45 Siklus			1 Siklus
Sıcaklık	95 ⁰ C	95 ⁰ C	60 ⁰ C	72 ⁰ C	40 ⁰ C
Süre	10 dk.	10 sn	30 sn	1 sn	30 sn
Analiz modu	yok	yok	Yok	Okuma	yok

3.5. istatistiksel analiz

Çalışmada elde edilen veriler değerlendirilirken, istatistiksel analiz ve hesaplamalar için IBM SPSS Statistics vers. 20 (Statistical Package for the Social Sciences) paket programı kullanıldı. Tamamlayıcı istatistiksel metodlar olarak: ortalama, standart sapma, standart hata ve ortanca değerleri hesaplandı. Gruplara ait ortalamalar arasında niceliksel verilerin gruplar arası karşılaştırılmasında Mann-Whitney U Testi kullanıldı. Bu testlerde elde edilen p değerleri incelenerek $p < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı, $p < 0.01$ ileri derecede, $p < 0.001$ çok ileri derecede anlamlı kabul edildi. Anlamlı gruplar içindeki korelasyonlarının değerlendirilmesinde ise Spearman rho (r_s) korelasyon testi kullanıldı. Elde edilen r_s değerleri incelenerek $r_s < 0,25$ değeri istatistiksel olarak ilişki yok, 0,25-0,5 değeri zayıf ilişki, 0,5-0,75 orta ilişki, 0,76-0,85 güçlü ilişki ve $> 0,85$ çok güçlü ilişki olarak kabul edildi. (375, 376).

4. BULGULAR

Tip 1 diyabet tanısı almış 53 hasta ve 53 sağlıklı bireyle gerçekleştirdiğimiz bu çalışmada, hastaların 28'inin erkek, 25'inin ise kadın olduğu belirlenmiştir. Çalışmamıza katılan hastaların ve sağlıklı kontrollerin ortalama yaşları $32,87 \pm 12,68$ 'dir.

Sağlıklı kontrol grubunda ortalama vücut kitle indeksi (VKI) $20,23 \pm 1,70$ kg/m^2 'iken, T1DM hastalarında $23,25 \pm 1,63$ kg/m^2 olarak bulunmuştur. Ortalama HbA1c sağlıklı kontrol grubunda $\% 4,19 \pm 1,11$, T1DM hasta grubunda ise $\% 8,69 \pm 1,91$ olarak saptanmıştır. Diğer önemli bir parametre olan açlık kan şekeri (AKŞ) ortalama düzeyi sağlıklı kontrol grubunda $91,0 \pm 5,67$ mg/dl'iken, T1DM hasta grubunda $133,4 \pm 62,44$ mg/dl olarak belirlenmiştir. Hastalarda saptanan VKI, HbA1c ve AKŞ düzeylerinin, sağlıklı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak yüksek düzeyde anlamlı fark gösterdiği belirlenmiştir ($p < 0.001$) (Tablo 4.1).

Tablo 4.1: Çalışmamıza dahil edilen hasta ve sağlıklı kontrollerin demografik özelliklerine ait verilerin karşılaştırılması.

Özellikler	Tip 1 Diyabet hastaları S:53	Sağlıklı Kontrol grubu S:53	P**
Erkek S / Kadın S	28 / 25	28 / 25	
Yaş*	$32,87 \pm 12,68$	$32,87 \pm 12,68$	1,000
VKI (kg/m^2)	$23,25 \pm 1,63$	$20,23 \pm 1,70$,000
HbA1c (%)	$8,69 \pm 1,91$	$4,19 \pm 1,11$,000
AKŞ (mg/dl)	$133,4 \pm 62,44$	$91,0 \pm 5,67$,000

*Yaş ortalaması 19-61 yaş aralığına göre hesaplanmıştır, VKI:Vücut kitle indeksi, S:Sayı, AKŞ: Açlık Kan Şekeri, **: Mann whitney U ile hesaplanmıştır.

Hasta ve sağlıklı kontrol grubunda yer alan bireylerin her birine ait demografik veriler yanı sıra AKŞ ve HbA1c gibi biyokimyasal parametrelerin serum düzeyleri ham veriler bölümünde H1 ve H2 tablolarında gösterilmiştir.

Amerikan ulusal hastalık kontrol merkezi (CDC)'nin diyabet tanısı alma oranı bakımından bildirilen yaş aralıklarına göre T1DM'lu ve sağlıklı kontrol grubunda yer alan erkeklerin 3 değişik yaş grubuna ayrıldığı belirlenmiştir. Diyabet tanısı alma oranı en düşük ($\% 4.3$) olan yaş aralığına giren ve 15 bireyden oluşan 19 – 29 yaş grubunda

yaş ortalamalarının $23,2 \pm 2,88$ olduğu, diyabet tanısı alma oranı %10-%13,8 yaş aralığına giren ve 5 bireyden oluşan 49 – 61 yaş grubunda yaş ortalamalarının $56,40 \pm 5,27$ olduğu ve yine diyabet tanısı alma oranı orta değerlerde (%4,5-%8,9) olan yaş aralığına giren ve 8 bireyden oluşan 31 – 44 yaş grubunda yaş ortalamalarının $37,38 \pm 4,75$ olduğu görülmektedir (369) (Tablo 4.2).

Tablo 4.2: Hasta ve kontrol grubumuzdaki erkeklerde yaş, VKI, AKŞ ve HbA1c düzeylerine ait verilerin karşılaştırması.

Özellikler	Tip 1 Diyabet Hastaları	Sağlıklı Kontrol Grubu	P**
S	28	28	
Yaş*	$33,18 \pm 13,22$	$33,18 \pm 13,22$	1,000
VKI (kg/m²)	$23,21 \pm 1,61$	$20,47 \pm 1,51$,000
HbA1c (%)	$8,98 \pm 2,05$	$4,17 \pm 1,28$,000
AKŞ (mg/dl)	$128,89 \pm 62,88$	$92,04 \pm 6,05$,002

*Yaş ortalaması 19-61 yaş aralığına göre hesaplanmıştır, VKI: Vücut kitle indeksi, S: Sayı, AKŞ: Açlık Kan Şekeri, **: Mann whitney U ile hesaplanmıştır

T1DM'lu kadın hastaların ve kontrol grubunda yer alan sağlıklı kadınların 3 değişik yaş grubuna ayrıldığı belirlenmiştir. Diyabet tanısı alma oranı en düşük (% 4.3) olan yaş aralığına giren ve 12 bireyden oluşan 19 – 28 yaş grubunda yaş ortalamalarının $22,3 \pm 3,50$ olduğu, diyabet tanısı alma oranı orta değerlerde (%4,5 - %8,9) olan yaş aralığına giren ve 7 bireyden oluşan 31 – 42 yaş grubunda yaş ortalamasının $36,0 \pm 3,51$ olduğu, diyabet tanısı alma oranı % 8,9 - %15,4 yaş aralığına giren ve 6 bireyden oluşan 43 – 56 yaş grubunda yaş ortalamasının $48,83 \pm 4,79$ olduğu görülmektedir (369) (Tablo 4.3).

T1DM hasta grubumuzda ve sağlıklı kontrol grubumuzda yer alan kadınlar incelendiğinde 25'er bireyi kapsayan gruplarda, yaş ortalamaları hasta ve kontrol grubunda $32,52 \pm 11,64$ dır. Ortalama VKI, T1DM'lu kadınlarda $23,30 \pm 1,68$ kontrol grubundaki kadınlarda ise $19,95 \pm 1,90$ olarak belirlenmiştir. Ortalama HbA1c düzeyi T1DM'lu kadınlarda % $8,36 \pm 1,73$, kontrol grubundaki kadınlarda ise % $4,21 \pm 0,91$ olarak, ortalama AKŞ düzeyi ise T1DM'lu kadın hastalarda $138,44 \pm 62,84$, kontrol grubundaki kadınlarda ise $89,84 \pm 5,09$ olarak saptanmıştır (Tablo 4.3).

Tablo 4.3: Hasta ve kontrol grubumuzdaki kadınlarda yaş, VKI, AKŞ ve HbA1c düzeylerine ait verilerin karşılaştırması.

Özellikler	Tip 1 Diyabet hastaları	Sağlıklı Kontrol grubu	P**
S	25	25	
Yaş*.	32,52 ± 11,64	32,52 ± 11,64	1,000
VKI (kg/m²)	23,30 ± 1,68	19,95 ± 1,90	,000
HbA1c (%)	8,36 ± 1,73	4,21 ± 0,91	,000
AKŞ (mg/dl)	138,44 ± 62,84	89,84 ± 5,09	,001

*Yaş ortalaması 19-56 yaş aralığına göre hesaplanmıştır, VKI:Vücut kitle indeksi, S:Sayı, AKŞ:Açlık Kan Şekeri, **: Mann-Whitney U ile hesaplanmıştır.

T1DM hasta grubumuzda ve sağlıklı kontrol grubumuzda yer alan erkekler incelendiğinde 28'er bireyi kapsayan gruplarda, yaş ortalamaları hasta ve kontrol grubunda $33,18 \pm 13,22$ dir. VKI ortalamaları T1DM'lu erkek hastalarda $23,21 \pm 1,61$ sağlıklı kontrollerde ise $20,47 \pm 1,51$ olarak belirlenmiştir. Ortalama HbA1c düzeyleri T1DM'lu erkek hastalarda $8,98 \pm 2,05$ ve sağlıklı kontrol grubunda ise $4,17 \pm 1,28$ olarak, ortalama açlık kan şekeri (AKŞ) düzeyi ise T1DM'lu erkek hastalarda $128,89 \pm 62,88$ ve sağlıklı kontrol grubunda ise $92,04 \pm 6,05$ olarak saptanmıştır. T1DM hasta grubumuzda saptanan ortalama VKI, HbA1c ve AKŞ düzeylerinin sağlıklı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak ileri düzeyde yüksek olduğu belirlenmiştir ($p < 0.001$) (Tablo 4.4).

Hasta ve sağlıklı kontrol grubunda, 19-29 yaş aralığındaki erkeklerde VKI, HbA1c, AKŞ parametreleri incelendiğinde; hasta grubunda saptanan VKI ve HbA1c düzeylerinin, sağlıklı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak ileri dereceden yüksek olduğu belirlenmiştir ($p < 0.001$) (Tablo 4.4).

Hasta grubunda, 31-44 yaş aralığındaki erkeklerde saptanan VKI, HbA1c, AKŞ düzeylerinin, sağlıklı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek olduğu belirlenmiştir ($p < 0.01$) (Tablo 4.3)

Hasta ve sağlıklı kontrol grubunun 49-61 yaş aralığındaki erkeklerinde VKI, HbA1c, AKŞ parametreleri incelendiğinde; hasta grubunda HbA1c düzeyleri sağlıklı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak ileri düzeyde yüksek bulunurken ($p < 0.01$), AKŞ düzeylerinin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek olduğu belirlenmiştir.

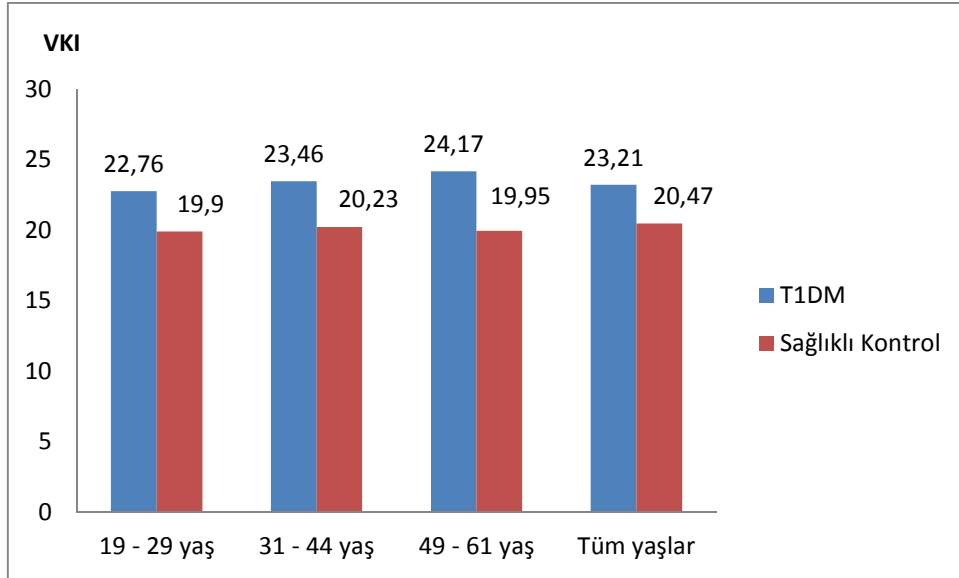
($p < 0,05$). Hasta ve sağlıklı kontrol grubunda VKI değerleri ise gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark göstermemiştir ($p > 0,05$) (Tablo 4.4)

Tablo 4.4: Hasta ve kontrol grubumuzdaki erkeklerde, VKI, AKŞ ve HbA1c düzeylerine ait verilerin yaş gruplarına göre karşılaştırılması.

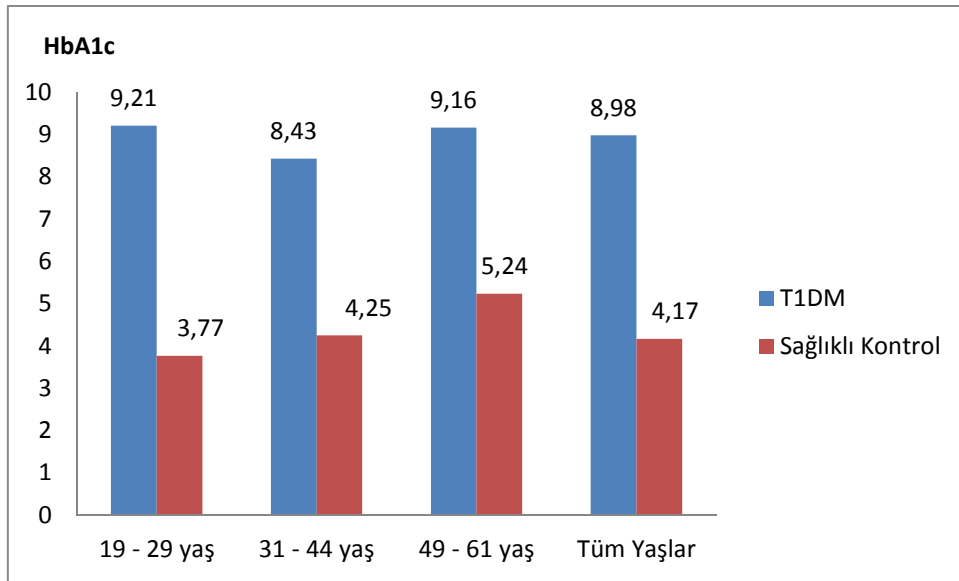
Özellik	T1DM grubu			Sağlıklı Kontrol grubu			İstatistiksel karşılaştırma sonuçları		
	19-29 S:15	31-44 S:8	49-61 S:5	19-29 S:15	31-44 S:8	49-61 S:5	19-29 P*	31-44 P*	49-61 P*
Yaş	23,2 ± 2,88	37,38 ± 4,75	56,40 ± 5,27	23,2 ± 2,88	37,38 ± 4,75	56,40 ± 5,27	1,000	1,000	1,000
VKI kg/ m²	22,76 ± 1,77	23,46 ± 1,29	24,17 ± 1,27	19,9 ± 1,27	20,23 ± 0,83	20,58 ± 1,27	,000	,001	,076
HbA1c (%)	9,21 ± 2,30	8,43 ± 1,43	9,16 ± 2,37	3,77 ± 1,22	4,25 ± 1,25	5,24 ± 1,01	,000	,001	,009
AKŞ (mg/dl)	121,6 ± 55,55	154,5 ± 88,08	109,8 ± 18,61	90,87 ± 5,88	94,0 ± 6,41	92,4 ± 6,43	,212	,009	,047

VKI:Vücut kitle indeksi, S:Sayı, AKŞ:Açlık Kan Şekeri - *Mann-Whitney U testi ile hesaplanmıştır

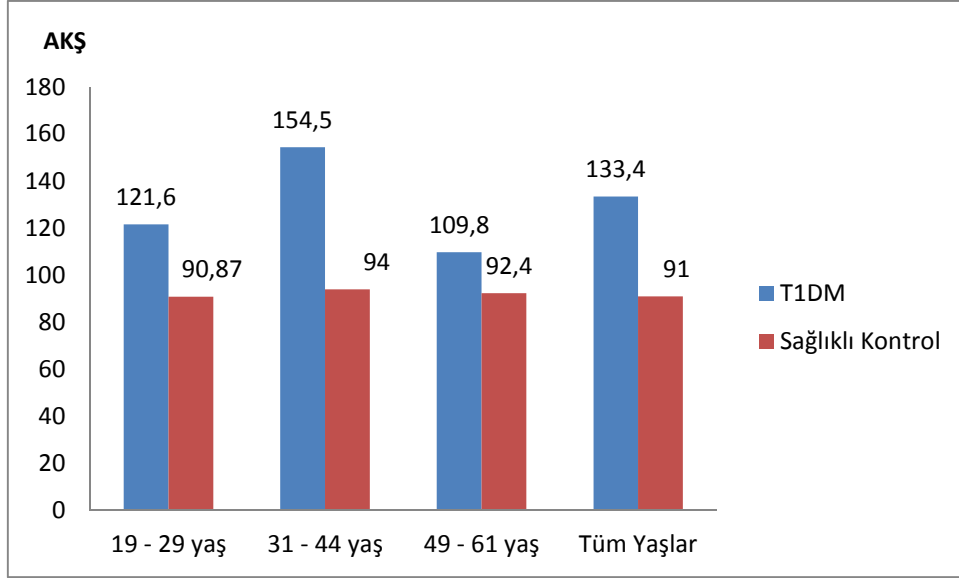
Çalışmamıza dahil olan erkek bireylerde yaş gruplarına göre VKI ve HbA1c değerleri tablo 4.5’de görülmektedir. En yüksek ortalama VKI nin 46-61 yaş grubunda, en yüksek ortalama HbA1c düzeyinin 19-29 yaş grubunda bulunduğu, en yüksek ortalama AKŞ seviyesinin ise 31-44 yaş grubunda bulunduğu belirlenmiştir (Şekil 4.1, Şekil 4,2, Şekil 4.3).



Şekil 4.1: Hasta ve kontrol grubundaki erkeklerde ortalama VKI nin yaş gruplarına göre dağılımı.



Şekil 4.2: Hasta ve kontrol grubundaki erkeklerde ortalama HbA1c (%) düzeylerinin yaş gruplarına göre dağılımı.



Şekil 4.3: Hasta ve kontrol grubundaki erkeklerde ortalama AKŞ düzeylerinin yaş gruplarına göre dağılımı.

Kadınlarda en yüksek ortalama VKI nin 43-56 yaş grubunda, en yüksek ortalama HbA1c düzeyinin 19-28 yaş grubunda, en yüksek ortalama AKŞ seviyesinin ise 43-56 yaş grubunda olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.4, Şekil 4.5, Şekil 4.6, Tablo 4.5).

Tablo 4.5: Hasta ve kontrol grubumuzdaki kadınlarda, VKI, AKŞ ve HbA1c düzeylerine ait verilerin yaş gruplarına göre karşılaştırılması

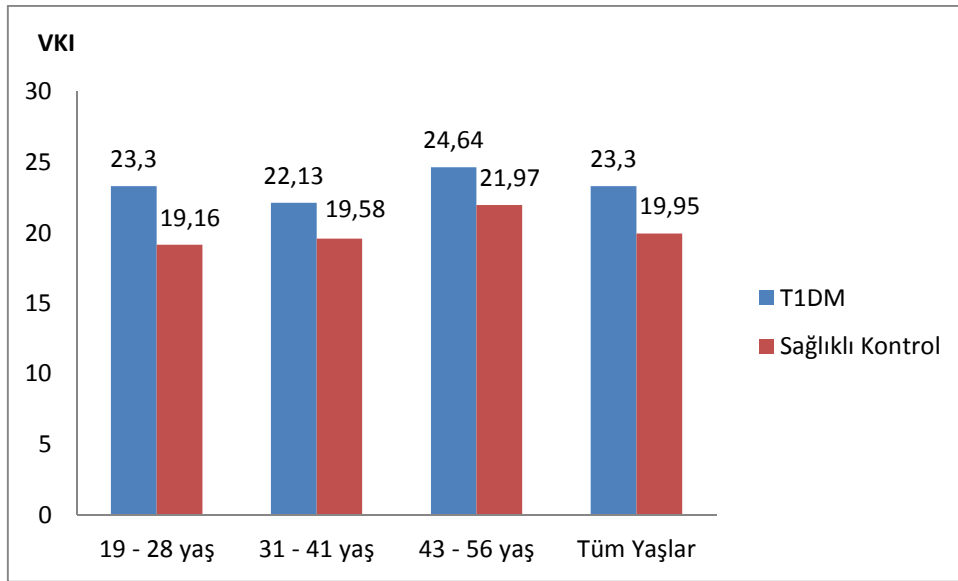
Özellik	T1DM grubu			Sağlıklı Kontrol grubu			İstatistiksel karşılaştırma sonuçları		
	19-28 S:12	31-41 S:7	43-56 S:6	19-28 S:12	31-41 S:7	43-56 S:6	19-28 P*	31-41 P*	43-56 P*
Yaş	22,3 ± 3,50	36 ± 3,51	48,83 ± 4,79	22,3 ± 3,50	36 ± 3,51	48,83 ± 4,79	1,000	1,000	1,000
VKI kg/ m ²	23,30 ± 1,60	22,13 ± 1,80	24,64 ± 0,21	19,16 ± 2,00	19,58 ± 0,77	21,97 ± 1,06	,000	,009	,004
HbA1c (%)	9,21 ± 2,30	8,41 ± 1,46	7,92 ± 1,14	4,18 ± 1,03	4,4 ± 0,73	4,05 ± 0,96	,000	,002	,004
AKŞ (mg/dl)	128,5 ± 59,67	143,14 ± 75,54	152,83 ± 61,29	90,75 ± 6,48	89,29 ± 3,45	88,67 ± 3,67	,248	,006	,037

VKI:Vücut kitle indeksi, S:Sayı, AKŞ:Açlık Kan Şekeri - * Mann-Whitney U ile hesaplanmıştır

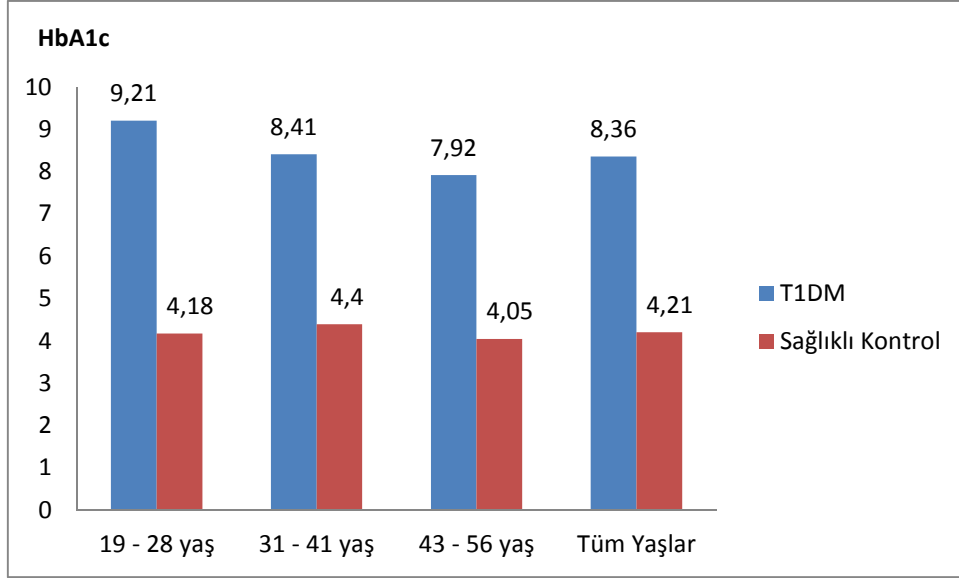
Hasta ve sağlıklı kontrol grubunda, 19-28 yaş grubundaki kadınlarda ortalama VKI, HbA1c ve AKŞ parametreleri incelendiğinde; hasta grubundaki kadınların ortalama VKI ve HbA1c düzeylerinin, kontrol grubundaki kadınlara göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek olduğu belirlenmiştir. ($p<0.001$) (Tablo 4.5).

Hasta ve sağlıklı kontrol grubunda, 31-41 yaş aralığındaki kadınlarda VKI, HbA1c ve AKŞ parametreleri incelendiğinde; hasta grubundaki kadınlarda saptanan VKI, HbA1c ve AKŞ düzeylerinin, kontrol grubundaki kadınlara göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek olduğu belirlenmiştir ($p<0,001$, $p<0,01$, $p<0.001$) (Tablo 4.5)

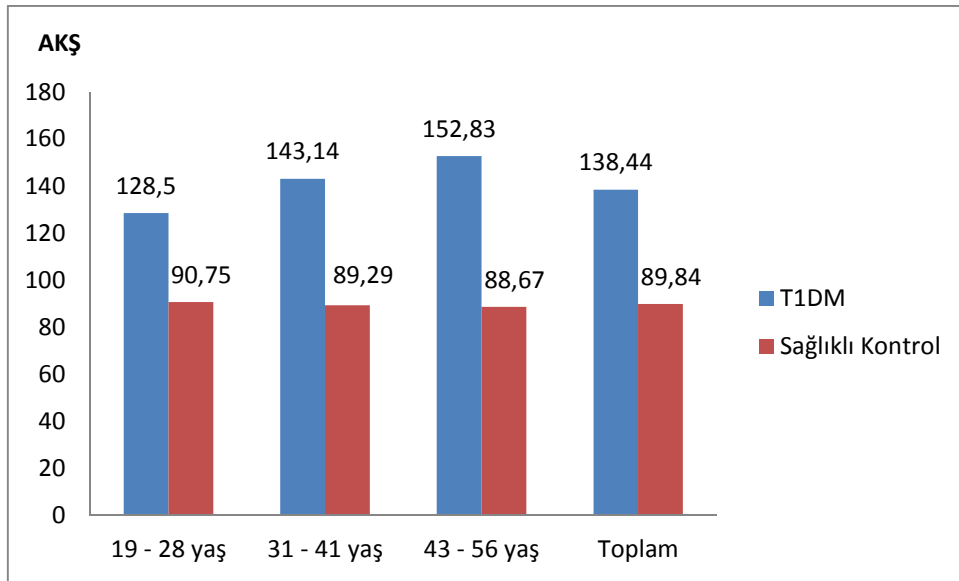
Hasta ve sağlıklı kontrol grubunun 43-56 yaş aralığındaki kadınlarında VKI, HbA1c ve AKŞ parametreleri incelendiğinde; hasta kadınlarda VKI, HbA1c ve AKŞ düzeylerinin, sağlıklı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek olduğu belirlenmiştir ($p<0,001$, $p<0,01$, $p<0.01$) (Tablo 4.5).



Şekil 4.4: Hasta ve kontrol grubundaki kadınlarda ortalama VKI'nin yaş gruplarına göre dağılımı.



Şekil 4.5: Hasta ve kontrol grubundaki kadınlarda ortalama HbA1c (%) düzeyinin yaş gruplarına göre dağılımı.



Şekil 4.6: Hasta ve kontrol grubundaki kadınlarda ortalama AKŞ düzeyinin yaş gruplarına göre dağılımı.

T1DM'lu hasta ve sağlıklı kontrol grubundaki erkeklerin ve kadınların dışkılarından izole edilen DNA'larından yapılan gerçek zamanlı PZR çalışması sonucunda her bir bireyin 1 gram dışkılarından elde edilen \log_{10} *Bacteroidetes* ve *Firmicutes*, *B.fragilis*, *L.acidophilus*, *L.casei* miktarlarının yaş gruplarına göre dağılımı ham veriler bölümü H3 ve H5'te, yine hasta ve sağlıklı kontrol grubundaki erkeklerin ve kadınların kanından izole edilen RNA'lardan elde edilen her bir bireye ait TLR2 ve

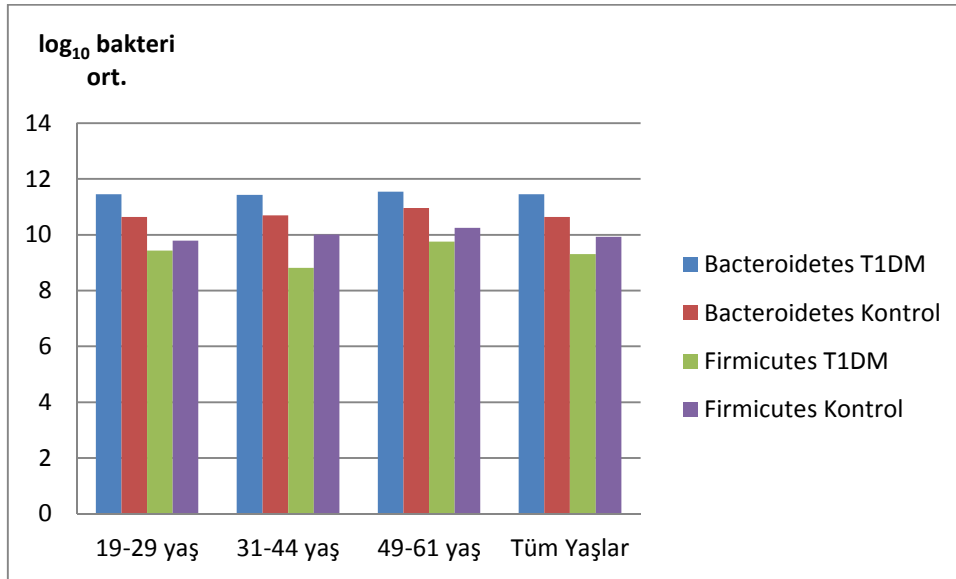
TLR4 gen ekspresyon düzeylerinin yaş gruplarına göre dağılımı ham veriler bölümü H4 ve H6'da gösterilmiştir.

T1DM'lu hasta ve sağlıklı kontrol grubundaki erkeklerin dışkılarından izole edilen DNA'lardan yapılan gerçek zamanlı PZR çalışması sonucunda 1 gram dışkıda elde edilen \log_{10} *Bacteroidetes* ve *Firmicutes* miktarlarının ortalama değerleri yaş gruplarına göre incelendiğinde, 19-29 yaş aralığındaki erkeklerde *Bacteroidetes* miktarı, sağlıklı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak ileri derecede yüksek bulunurken ($p<0,001$). *Firmicutes* miktarı ise sağlıklı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı fark göstermemiştir ($p<0,01$). 31-44 yaş aralığındaki erkeklerde ise hem *Bacteroidetes*, hem de *Firmicutes* miktarları sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, hasta grubunda *Bacteroidetes* miktarının istatistiksel olarak ileri derecede yüksek olduğu, *Firmicutes* miktarının ise istatistiksel olarak ileri derecede düşük olduğu saptanmıştır. ($p<0,001$). 49-61 yaş aralığındaki erkeklerde ise *Bacteroidetes* miktarı sağlıklı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek saptanırken ($p<0,01$), *Firmicutes* miktarında sağlıklı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0,05$). Yaş gruplarına bakılmaksızın çalışmamıza katılan tüm T1DM'lu erkek hastalarda saptanan *Bacteroidetes* ve *Firmicutes* miktarı, sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, hasta grubunda *Bacteroidetes* miktarının istatistiksel olarak ileri derecede yüksek olduğu, *Firmicutes* miktarının ise istatistiksel olarak ileri derecede düşük olduğu saptanmıştır ($p<0,001$) (Tablo 4.6 ve Şekil 4.7).

Tablo 4.6: Hasta ve kontrol grubundaki erkeklerde *Bacteroidetes* ve *Firmicutes* miktarlarının yaş gruplarına göre karşılaştırılması.

	Yaş Grupları	S	Tip 1 Diyabet Hastaları	Sağlıklı Kontrol grubu	P*
<i>Bacteroidetes</i>	19-29 Yaş	15	11,45 ± 0,25	10,64 ± 0,33	,000
	31-44 Yaş	8	11,43 ± 0,36	10,70 ± 0,23	,001
	49-61 yaş	5	11,54 ± 0,36	10,96 ± 0,14	,012
	Tüm yaşlar	28	11,45 ± 0,25	10,64 ± 0,33	,000
<i>Firmicutes</i>	19-29 Yaş	15	9,43 ± 0,49	9,79 ± 0,57	,097
	31-44 Yaş	8	8,81 ± 0,49	10,01 ± 0,45	,002
	49-61 yaş	5	9,75 ± 0,42	10,25 ± 0,36	,117
	Tüm yaşlar	28	9,31 ± 0,57	9,93 ± 0,52	,000

*Mann-Whitney U testi ile hesaplanmıştır



Şekil 4.7: Hasta ve kontrol grubundaki erkeklerde *Bacteroidetes* ve *Firmicutes* miktarlarının yaş gruplarına göre karşılaştırılması.

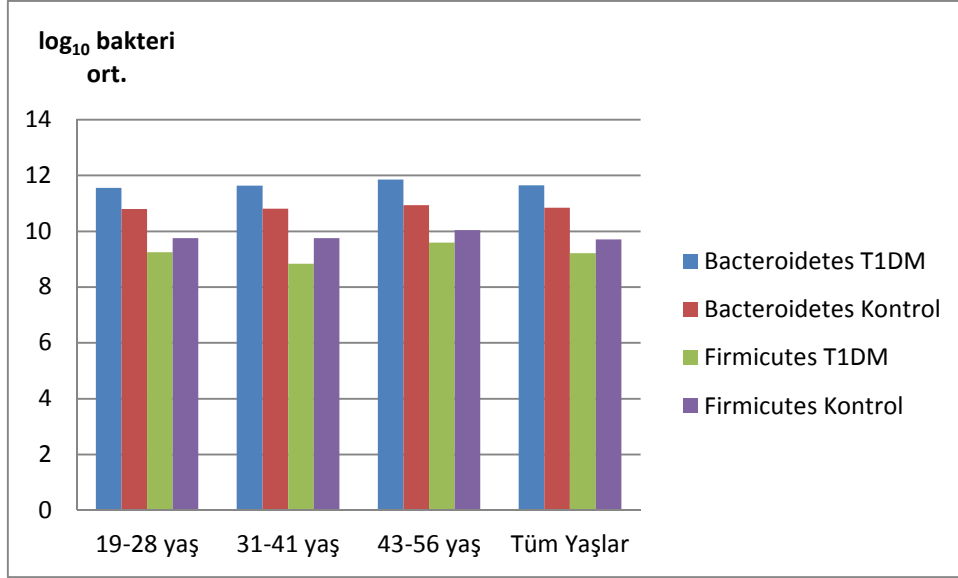
T1DM lu hasta ve sağlıklı kontrol grubundaki kadınların dışkılarından izole edilen DNA'larından yapılan gerçek zamanlı PZR çalışması sonucunda 1 gram dışkıda elde edilen log₁₀ Bacteroidetes ve Firmicutes bakteri miktarlarının ortalama değerleri yaş gruplarına göre incelendiğinde, 19-28 yaş aralığındaki kadınlarda *Bacteroidetes* miktarı, sağlıklı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak ileri derecede yüksek

bulunurken ($p<0,001$). *Firmicutes* miktarı ise sağlıklı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı fark göstermemiştir ($p>0,05$). 31-41 yaş aralığındaki kadınlarda ise hem *Bacteroidetes* ve *Firmicutes* miktarı, sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, hasta grubunda *Bacteroidetes* miktarının istatistiksel olarak ileri derecede yüksek olduğu, *Firmicutes* miktarının ise istatistiksel olarak ileri derecede düşük olduğu saptanmıştır. ($p<0,001$). 43-56 yaş aralığındaki kadınlarda ise *Bacteroidetes* miktarı sağlıklı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek saptanırken ($p<0,001$), *Firmicutes* miktarında sağlıklı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0,05$). Yaş gruplarına bakılmaksızın çalışmamıza katılan tüm T1DM'lu kadın hastalarda saptanan *Bacteroidetes* miktarı, sağlıklı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak ileri derecede yüksek bulunurken ($p<0,001$), *Firmicutes* miktarı, sağlıklı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur ($p<0,01$) (Tablo 4.7 ve Şekil 4.8).

Tablo 4.7: Hasta ve kontrol grubundaki kadınlarda *Bacteroidetes* ve *Firmicutes* miktarlarının yaş gruplarına göre karşılaştırılması.

	Yaş Grupları	S	Tip 1 Diyabet Hastaları	Sağlıklı Kontrol grubu	P*
<i>Bacteroidetes</i>	19-28 Yaş	12	11,55 ± 0,32	10,80 ± 0,29	,000
	31-41 Yaş	7	11,64 ± 0,38	10,81 ± 0,45	,009
	43-56 yaş	6	11,85 ± 0,33	10,94 ± 0,22	,004
	Tüm yaşlar	25	11,65 ± 0,35	10,84 ± 0,32	,000
<i>Firmicutes</i>	19-28 Yaş	12	9,25 ± 0,56	9,76 ± 0,72	,106
	31-41 Yaş	7	8,84 ± 0,28	9,76 ± 0,34	,002
	43-56 yaş	6	9,59 ± 0,32	10,04 ± 0,45	,109
	Tüm yaşlar	25	9,22 ± 0,51	9,71 ± 0,61	,007

*Mann-Whitney U testi ile hesaplanmıştır



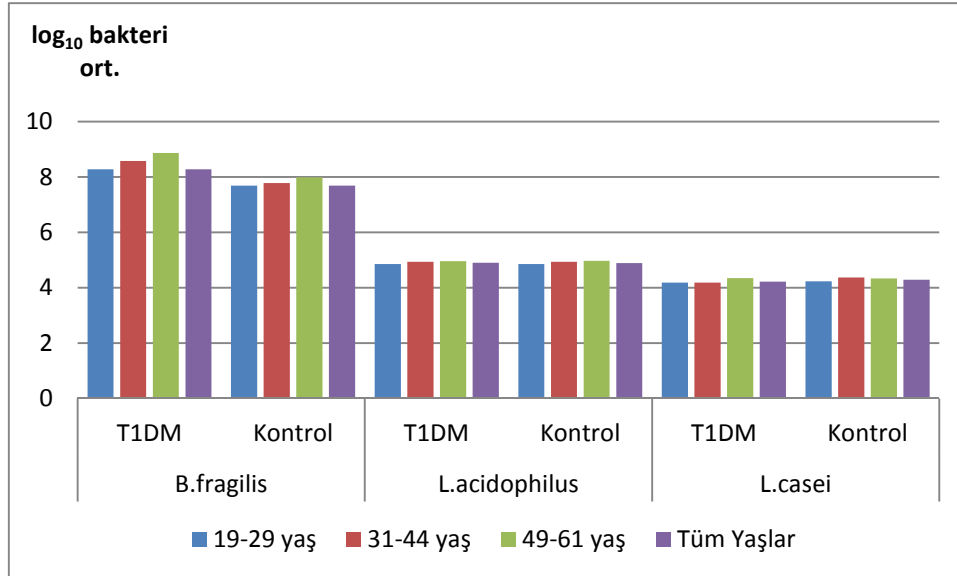
Şekil 4.8: Hasta ve kontrol grubundaki kadınlarda *Bacteroidetes* ve *Firmicutes* miktarlarının yaş gruplarına göre karşılaştırılması

Çalışmamızda T1DM'lu hasta ve sağlıklı kontrol grubundaki erkeklerin dışkılarından izole edilen DNA'larından yapılan gerçek zamanlı PZR çalışması sonucunda 1 gram dışkıda elde edilen \log_{10} *B.fragilis*, *L.acidophilus* ve *L.casei* miktarlarının ortalama değerleri yaş gruplarına göre incelendiğinde, 19-29 yaş aralığındaki erkeklerde ve 31-44 yaş aralığındaki erkeklerde *B.fragilis* miktarı, sağlıklı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak çok ileri derecede yüksek bulunurken ($p<0,001$), 49-61 yaş aralığındaki erkeklerde *B.fragilis* miktarı, sağlıklı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak ileri derecede yüksek bulunmuştur ($p<0,001$). Hasta erkeklerde saptanan *L.acidophilus* ve *L.casei* miktarı tüm yaş gruplarında sağlıklı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde fark göstermemiştir ($p>0,05$). Yaş gruplarına bakılmaksızın çalışmamıza katılan tüm T1DM'lu erkek hastalarda saptanan *B.fragilis* miktarı, sağlıklı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak çok ileri düzeyde yüksek bulunurken ($p<0,001$), *L.acidophilus* ve *L.casei* miktarlarında, sağlıklı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0,05$) (Tablo 4.8 ve Şekil 4.9).

Tablo 4.8: Hasta ve kontrol grubundaki erkeklerde *B.fragilis*, *L.acidophilus*, *L.casei* miktarlarının yaş gruplarına göre karşılaştırılması.

	Yaş Grupları	S	Tip 1 Diyabet Hastaları	Sağlıklı Kontrol grubu	P*
<i>B.fragilis</i>	19-29 Yaş	15	8,28 ± 0,19	7,69 ± 0,30	,000
	31-44 Yaş	8	8,58 ± 0,26	7,78 ± 0,27	,001
	49-61 yaş	5	8,87 ± 0,11	7,99 ± 0,25	,009
	Tüm yaşlar	28	8,28 ± 0,19	7,69 ± 0,30	,000
<i>L.acidophilus</i>	19-29 Yaş	15	4,86 ± 0,22	4,85 ± 0,21	,852
	31-44 Yaş	8	4,93 ± 0,08	4,93 ± 0,12	,833
	49-61 yaş	5	4,96 ± 0,15	4,97 ± 0,14	,834
	Tüm yaşlar	28	4,90 ± 0,18	4,89 ± 0,18	,854
<i>L.casei</i>	19-29 Yaş	15	4,19 ± 0,19	4,23 ± 0,17	,361
	31-44 Yaş	8	4,18 ± 0,22	4,37 ± 0,24	,156
	49-61 yaş	5	4,35 ± 0,19	4,33 ± 0,16	,917
	Tüm yaşlar	28	4,22 ± 0,20	4,29 ± 0,20	,125

*Mann-Whitney U testi ile hesaplanmıştır



Şekil 4.9: Hasta ve kontrol grubundaki erkeklerde *B.fragilis*, *L.acidophilus* ve *L.casei* miktarlarının yaş gruplarına göre karşılaştırılması.

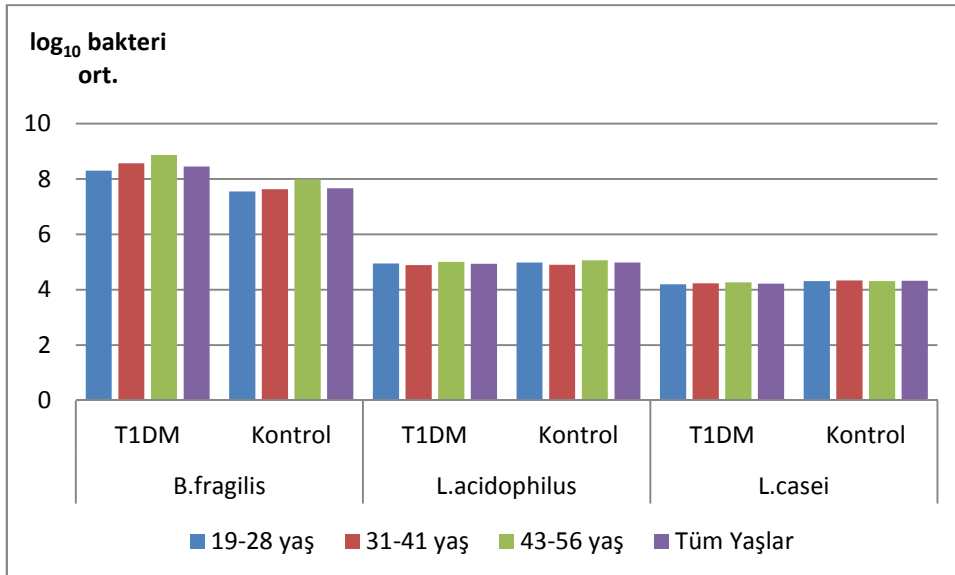
Çalışmamızda T1DM'lu hasta ve sağlıklı kontrol grubundaki kadınların dışkılarından izole edilen DNA'larından yapılan gerçek zamanlı PZR çalışması sonucunda 1 gram dışkıda elde edilen \log_{10} *B.fragilis*, *L.acidophilus* ve *L.casei* miktarlarının ortalama değerleri yaş gruplarına göre incelendiğinde, 19-28 yaş aralığındaki kadınlarda *B.fragilis* miktarı, sağlıklı kontrol grubuna göre çok ileri derecede yüksek bulunurken ($p<0,001$), 31-41 yaş aralığındaki ve 43-56 yaş aralığındaki kadınlarda saptanan *B.fragilis* miktarları, sağlıklı kontrol grubuna göre ileri derecede yüksek bulunmuştur ($p<0,001$). Buna karşın gerek 19-28 gerekse 31-41 ve 43-56 yaş aralıklarındaki kadınlarda saptanan *L.acidophilus* ve *L.casei* miktarı sağlıklı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde fark göstermemiştir ($p>0,05$). Yaş gruplarına bakılmaksızın çalışmamıza katılan tüm T1DM'lu kadın hastalarda saptanan *B.fragilis* miktarı, sağlıklı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak çok ileri derecede yüksek bulunurken ($p<0,001$), *L.acidophilus* ve *L.casei* miktarlarında, sağlıklı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0,05$, $p>0,05$) (Tablo 4.9 ve Şekil 4.10).

Çalışmamızda T1DM'lu hasta ve sağlıklı kontrol grubundaki erkeklerin kanlarından izole edilen RNA'larından yapılan gerçek zamanlı PZR çalışması sonucunda HPRT1 referans geni kullanılarak elde edilen ortalama TLR2 ve TLR4 gen ekspresyon düzeyi miktarları, yaş gruplarına göre incelendiğinde, 19-29 yaş aralığındaki erkeklerde saptanan TLR2 gen ekspresyon düzeyi, kontrol grubu ile kıyaslandığında, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmazken ($p>0,05$), TLR4 gen ekspresyon düzeyinin, sağlıklı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak çok ileri düzeyde yüksek olduğu belirlenmiştir. ($p<0,001$). 31-44 yaş aralığındaki erkeklerde ise hem TLR2, hem de TLR4 gen ekspresyon düzeyleri, sağlıklı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p<0,001$ ve $p<0,01$). 49-61 yaş aralığındaki erkeklerin hem TLR2, hem de TLR4 gen ekspresyon düzeylerinde, sağlıklı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0,05$). Yaş gruplarına bakılmaksızın çalışmamıza katılan tüm T1DM'lu erkek hastalarda saptanan TLR2 gen ekspresyon düzeyleri, sağlıklı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak çok ileri derecede düşük, TLR4 gen ekspresyon düzeyleri ise sağlıklı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak çok ileri derecede yüksek saptanmıştır ($p<0,001$). (Tablo 4.10 ve Şekil 4.11).

Tablo 4.9: Hasta ve kontrol grubundaki kadınlarda *B.fragilis*, *L.acidophilus*, ve *L.casei* miktarlarının yaş gruplarına göre karşılaştırılması.

	Yaş Grupları	S	Tip 1 Diyabet Hastaları	Sağlıklı Kontrol grubu	P*
<i>B.fragilis</i>	19-28 Yaş	12	8,30 ± 0,15	7,55 ± 0,20	,000
	31-41 Yaş	7	8,57 ± 0,21	7,63 ± 0,33	,002
	43-56 yaş	6	8,87 ± 0,11	7,99 ± 0,25	,009
	Tüm yaşlar	25	8,45 ± 0,24	7,66 ± 0,27	,000
<i>L.acidophilus</i>	19-28 Yaş	12	4,95 ± 0,14	4,98 ± 0,11	,664
	31-41 Yaş	7	4,89 ± 0,11	4,90 ± 0,09	,798
	43-56 yaş	6	5,01 ± 0,10	5,06 ± 0,14	,196
	Tüm yaşlar	25	4,94 ± 0,13	4,98 ± 0,12	,454
<i>L.casei</i>	19-28 Yaş	12	4,20 ± 0,21	4,31 ± 0,28	,340
	31-41 Yaş	7	4,23 ± 0,28	4,34 ± 0,27	,306
	43-56 yaş	6	4,26 ± 0,19	4,31 ± 0,16	,749
	Tüm yaşlar	25	4,22 ± 0,22	4,32 ± 0,24	,143

*Mann-Whitney U testi ile hesaplanmıştır

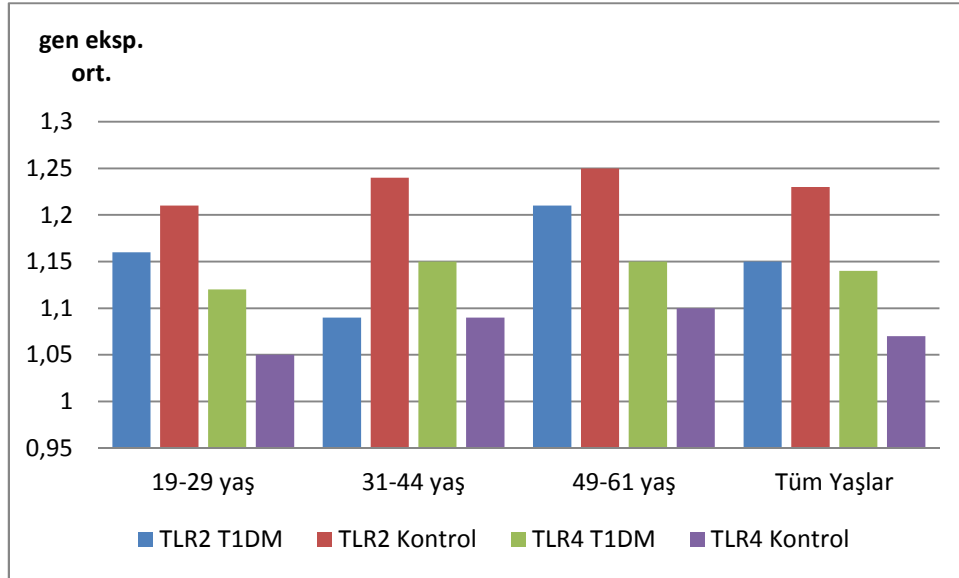


Şekil 4.10: Hasta ve kontrol grubundaki kadınlarda *B.fragilis*, *L.acidophilus* ve *L.casei* miktarlarının yaş gruplarına göre karşılaştırılması.

Tablo 4.10: Hasta ve kontrol grubundaki erkeklerde ortalama TLR2 ve TLR4 gen ekspresyon düzeylerinin ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) yaş gruplarına göre karşılaştırılması.

	Yaş Grupları	S	Tip 1 Diyabet Hastaları	Sağlıklı Kontrol grubu	P*
TLR2	19-29 Yaş	15	1,16 ± 0,06	1,21 ± 0,07	,093
	31-44 Yaş	8	1,09 ± 0,06	1,24 ± 0,06	,002
	49-61 yaş	5	1,21 ± 0,06	1,25 ± 0,04	,251
	Tüm yaşlar	28	1,15 ± 0,07	1,23 ± 0,07	,000
TLR4	19-29 Yaş	15	1,12 ± 0,03	1,05 ± 0,04	,000
	31-44 Yaş	8	1,15 ± 0,04	1,09 ± 0,11	,027
	49-61 yaş	5	1,15 ± 0,05	1,10 ± 0,05	,076
	Tüm yaşlar	28	1,14 ± 0,04	1,07 ± 0,07	,000

*Mann-Whitney U testi ile hesaplanmıştır



Şekil 4.11: Hasta ve kontrol grubundaki erkeklerde ortalama TLR2 ve TLR4 gen ekspresyon düzeylerinin ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) dağılımı.

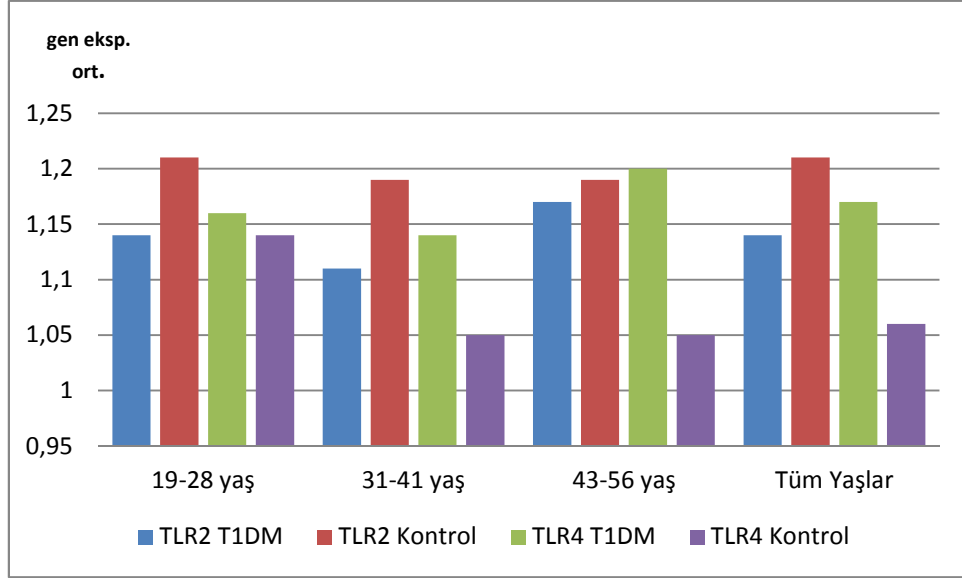
T1DM'lu hasta ve sağlıklı kontrol grubundaki kadınların kanlarından izole edilen RNA'larından yapılan gerçek zamanlı PZR çalışması sonucunda HPRT1 referans geni kullanılarak elde edilen TLR2 ve TLR4 gen ekspresyon düzeyleri yaş gruplarına göre incelendiğinde, 19-28 yaş aralığındaki kadınlarda saptanan TLR2 gen ekspresyon düzeyi sağlıklı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklı

bulunmamıştır ($p>0,05$). TLR4 gen ekspresyon düzeyinin ise sağlıklı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak çok ileri düzeyde yüksek olduğu belirlenmiştir. ($p<0,001$). 31-41 yaş aralığındaki çalışmamıza katılan T1DM'lu kadınlarda saptanan TLR2 gen ekspresyon düzeyleri, sağlıklı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük ($p<0,01$), TLR4 gen ekspresyon düzeyleri ise sağlıklı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek saptanmıştır ($p<0,01$). 43-56 yaş aralığındaki kadınlarda da yine diğer yaş gruplarında olduğu gibi TLR2 gen ekspresyon düzeyi, sağlıklı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklı bulunmazken ($p:0,109$), aynı yaş grubunda saptanan TLR4 gen ekspresyon düzeyi, sağlıklı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak ileri düzeyde yüksek bulunmuştur ($p:0,004$). Yaş gruplarına bakılmaksızın çalışmamıza katılan tüm T1DM'lu kadın hastalarda saptanan ortalama TLR2 gen ekspresyon düzeyi, sağlıklı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak ileri derecede düşük saptanırken ($p<0,01$), TLR4 gen ekspresyon düzeyi, sağlıklı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak çok ileri derecede yüksek bulunmuştur ($p<0,001$) (Tablo 4.11 ve Şekil 4.12).

Tablo 4.11: Hasta ve kontrol grubundaki kadınlarda ortalama TLR2 ve TLR4 gen ekspresyon düzeylerinin ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) yaş gruplarına göre karşılaştırılması.

	Yaş Grupları	S	Tip 1 Diyabet Hastaları	Sağlıklı Kontrol grubu	P*
TLR2	19-28 Yaş	12	1,14 ± 0,06	1,21 ± 0,09	,078
	31-41 Yaş	7	1,11 ± 0,05	1,19 ± 0,05	,025
	43-56 yaş	6	1,17 ± 0,05	1,19 ± 0,05	,109
	Tüm yaşlar	25	1,14 ± 0,06	1,21 ± 0,07	,001
TLR4	19-28 Yaş	12	1,16 ± 0,04	1,14 ± 0,06	,000
	31-41 Yaş	7	1,14 ± 0,03	1,05 ± 0,07	,013
	43-56 yaş	6	1,20 ± 0,05	1,05 ± 0,07	,004
	Tüm yaşlar	25	1,17 ± 0,04	1,06 ± 0,05	,000

*Mann-Whitney U testi ile hesaplanmıştır



Şekil 4.12: Hasta ve kontrol grubundaki kadınlarda ortalama TLR2 ve TLR4 gen ekspresyon düzeylerinin ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) dağılımı.

Çalışmamızda T1DM'lu hasta grubunda ve kontrol grubunda elde ettiğimiz veriler karşılaştırıldığında, hasta grubunda 1 gram dışkıda bulunan ortalama *Bacteroidetes* ve *Firmicutes* miktarının kontrol grubuna göre istatistiksel olarak ileri derecede farklı olduğu belirlenmiştir ($p < 0,001$). Cinsiyet ve yaş grupları yönünden incelendiğinde, erkek hastalarda 1 gram dışkıda bulunan ortalama *Bacteroidetes* miktarı, tüm yaş gruplarında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak yüksek bulunmuştur ($p < 0,01$), buna karşın ortalama *Firmicutes* miktarı yalnızca 31-44 yaş grubu hasta erkeklerde sağlıklı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0,001$). Benzer şekilde kadın hastalarda 1 gram dışkıda bulunan ortalama *Bacteroidetes* miktarı, tüm yaş gruplarında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak yüksek bulunmuştur ($p < 0,01$). Ortalama *Firmicutes* miktarı ise yalnızca 31-41 yaş grubu hasta kadınlarda sağlıklı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0,001$). Hem kadın, hem de erkek hastaların tüm yaş gruplarında *Bacteroidetes* miktarı, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak yüksek bulunmuştur ($p < 0,01$). *Firmicutes* miktarı ise yalnızca 31-44 yaş grubu hasta erkeklerde ve 31-41 yaş grubu hasta kadınlarda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak düşük bulunmuştur ($p < 0,01$).

Yaş gruplarına bakılmaksızın çalışmamıza katılan tüm T1DM'lu hastalarda saptanan TLR2 gen ekspresyon düzeyleri, sağlıklı kontrol grubuna göre istatistiksel

olarak çok ileri derecede düşük, TLR4 gen ekspresyon düzeyleri ise sağlıklı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak çok ileri derecede yüksek saptanmıştır ($p<0,001$). Cinsiyet ve yaş grupları yönünden incelendiğinde, ortalama TLR2 gen ekspresyon düzeylerinin yalnızca 31-44 yaş grubundaki erkek hastalarda, ortalama TLR4 gen ekspresyon düzeyinin ise hem 19-29 hem de 31-44 yaş grubu erkek hastalarda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı farklı olduğu saptanmıştır ($p<0,05$). Kadın hastalarda ise ortalama TLR2 gen ekspresyon düzeylerinin yalnızca 31-41 yaş grubunda sağlıklı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak düşük ($p<0,05$) saptanırken, ortalama TLR4 gen ekspresyon düzeyinin ise tüm yaş grubu kadın hastalarda kontrollere göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek olduğu belirlenmiştir ($p<0,05$).

T1DM'lu hasta erkeklerin 1 gram dışkıında bulunan *B.fragilis* miktarının tüm yaş gruplarında, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek olduğu ($p<0,01$), buna karşın *L.acidophilus* ve *L.casei* miktarları bakımından T1DM'lu hastalar ve sağlıklı kontroller arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadığı belirlenmiştir. ($p>0,05$). Benzer şekilde T1DM'lu hasta kadınların 1 gram dışkıında bulunan *B.fragilis* miktarının tüm yaş gruplarında, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek olduğu ($p<0,01$), buna karşın *L.acidophilus* ve *L.casei* miktarları bakımından T1DM'lu hastalar ve sağlıklı kontroller arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadığı belirlenmiştir ($p>0,05$). Böylece tüm yaş gruplarındaki T1DM'lu hasta kadınların ve erkeklerin 1 gram dışkıında bulunan *B.fragilis* miktarının tüm kontrollerde saptanan miktarlara göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek olduğu belirlenmiştir.

T1DM'lu hastalarda *Bacteroidetes* ve *Firmicutes* miktarları ile yine aynı grupta saptanan TLR2 ve TLR4 gen ekspresyon düzeyleri arasındaki ilişki incelendiğinde, hem kadın hem de erkek hastalarda tüm yaş gruplarında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunan *Bacteroidetes* miktarı ile TLR4 gen ekspresyon düzeyleri arasında güçlü bir ilişki bulunduğu ($r_s: >0,85$) belirlenmiştir. Buna karşın *Bacteroidetes* miktarı ile TLR2 gen ekspresyon düzeyleri arasında istatistiksel olarak zayıf bir ilişki saptanmıştır ($r_s: 0,25-0,50$). T1DM'lu hastalarda saptanan *Firmicutes* miktarı ile TLR2 ve TLR4 gen ekspresyon düzeyleri arasındaki ilişki incelendiğinde; *Firmicutes* miktarı ile TLR4 gen ekspresyon düzeyleri arasında zayıf bir ilişki bulunduğu ($r_s: 0,25-0,50$), buna karşın *Firmicutes* miktarı ile TLR2 gen ekspresyon

düzeyleri arasında güçlü bir ilişki bulunduğu belirlenmiştir ($r_s: >0,85$) (Tablo 4.12). (Ayrıntılı Spearman Rho korelasyon tablosu ham veriler bölümü H7' dedir.)

Tablo 4.12: T1DM'lu hastalarda saptanan *Bacteroidetes* ve *Firmicutes* miktarları ile, TLR2 ve TLR4 gen ekspresyon düzeyleri arasındaki korelasyonu belirten değerler.

*r_s	TLR2	TLR4
<i>Bacteroidetes</i>	-0,319	0,908
<i>Firmicutes</i>	0,901	-0,283

* r_s : Spearman korelasyon değeri, ($p<0,05$)'dir. $r_s<0,25$ değeri istatistiksel olarak ilişki yok, 0,25-0,5 değeri zayıf ilişki, 0,5-0,75 orta ilişki, 0,76-0,85 güçlü ilişki ve $>0,85$ çok güçlü ilişki olarak değerlendirildi.

T1DM'lu erkek hastalarda *Bacteroidetes* ve *Firmicutes* miktarları ile yine aynı grupta saptanan TLR2 ve TLR4 gen ekspresyon düzeyleri arasındaki ilişki incelendiğinde, *Bacteroidetes* düzeyinin, TLR4 gen ekspresyon düzeyi ile olan ilişkisinin çok güçlü olduğu ($r_s: >0,85$), TLR2 gen ekspresyon düzeyi ile olan ilişkisinin ise istatistiksel olarak zayıf olduğu saptanmıştır ($r_s: 0,25-0,50$). *Firmicutes* düzeyinin, TLR4 gen ekspresyon düzeyi ile olan ilişkisinin zayıf ($r_s: 0,25-0,50$), TLR2 gen ekspresyon düzeyi ile olan ilişkisinin ise çok güçlü olduğu ($r_s: >0,85$) belirlenmiştir (Tablo 4.13). (Ayrıntılı Spearman Rho korelasyon tablosu ham veriler bölümü H8' dedir.)

Tablo 4.13: T1DM'lu erkek hastalarda saptanan *Bacteroidetes* ve *Firmicutes* miktarları ile, TLR2 ve TLR4 gen ekspresyon düzeyleri arasındaki korelasyonu belirten değerler

*r_s	TLR2	TLR4
<i>Bacteroidetes</i>	-0,325	0,902
<i>Firmicutes</i>	0,967	-0,281

* r_s : Spearman korelasyon değeri, ($p<0,05$)'dir. $r_s<0,25$ değeri istatistiksel olarak ilişki yok, 0,25-0,5 değeri zayıf ilişki, 0,5-0,75 orta ilişki, 0,76-0,85 güçlü ilişki ve $>0,85$ çok güçlü ilişki olarak değerlendirildi.

T1DM'lu kadın hastalarda *Bacteroidetes* ve *Firmicutes* miktarları ile yine aynı grupta saptanan TLR2 ve TLR4 gen ekspresyon düzeyleri arasındaki ilişki

incelendiğinde, *Bacteroidetes* miktarının TLR4 gen ekspresyon düzeyi ile olan ilişkisinin çok güçlü olduğu ($r_s: >0,85$), TLR2 gen ekspresyon düzeyi ile olan ilişkisinin ise istatistiksel olarak zayıf olduğu saptanmıştır ($r_s: 0,25-0,50$). *Firmicutes* miktarının, TLR4 gen ekspresyon düzeyi ile olan ilişkisinin zayıf ($r_s: 0,25-0,50$), TLR2 gen ekspresyon düzeyi ile olan ilişkisinin ise güçlü olduğu ($r_s: 0,76-0,85$) bulunmuştur (Tablo 4.14). (Ayrıntılı Spearman Rho korelasyon tablosu ham veriler bölümü H9'dadır.)

Tablo 4.14: T1DM'lu kadınlarda saptanan *Bacteroidetes* ve *Firmicutes* miktarları ile, TLR2 ve TLR4 gen ekspresyon düzeyleri arasındaki korelasyonu belirten değerler

* r_s	TLR2	TLR4
<i>Bacteroidetes</i>	-0,247	0,921
<i>Firmicutes</i>	0,789	-0,243

* r_s : Spearman korelasyon değeri, ($p<0,05$)'dir. $r_s<0,25$ değeri istatistiksel olarak ilişki yok, 0,25-0,5 değeri zayıf ilişki, 0,5-0,75 orta ilişki, 0,76-0,85 güçlü ilişki ve $>0,85$ çok güçlü ilişki olarak değerlendirildi.

Araştırmamızda T1DM'lu hastalarda *Firmicutes* / *Bacteroidetes* oranı $0,8029 \pm 0,047$ olarak, sağlıklı kontrollerde ise $0,9134 \pm 0,061$ olarak saptanmıştır. T1DM'lu hastalarda saptanan ortalama *Firmicutes/Bacteroidetes* oranı ile sağlıklı kontrollerde saptanan *Firmicutes/Bacteroidetes* oranı karşılaştırıldığında, hastalarda bu oranın kontrol grubuna göre istatistiksel olarak çok ileri derecede düşük olduğu belirlenmiştir ($p<0,0001$) (Tablo 4.15).

Tablo 4.15: Hasta ve kontrol grubunda saptanan ortalama *Firmicutes/Bacteroidetes* oranlarının karşılaştırılması

	T1DM	Kontrol	P*
<i>Firmicutes</i> / <i>Bacteroidetes</i>	$0,8029 \pm 0,047$	$0,9134 \pm 0,061$,000

*Mann-Whitney U testi ile hesaplanmıştır. S:53.

T1DM'lu erkek hastalarda *Firmicutes/Bacteroidetes* oranları ile sağlıklı erkeklerde saptanan *Firmicutes/Bacteroidetes* oranları karşılaştırıldığında, erkek hastalarda kontrol grubuna göre bu oran istatistiksel olarak çok ileri derecede düşük bulunmuştur ($p<0,0001$) (Tablo 4.16).

Tablo 4.16: Erkek hasta ve kontrol grubunda saptanan ortalama *Firmicutes/Bacteroidetes* oranlarının karşılaştırılması

	T1DM	Kontrol	P*
<i>Firmicutes / Bacteroidetes</i>	0,8129 ± 0,051	0,9287 ± 0,0525	,000

*Mann-Whitney U testi ile hesaplanmıştır. S:28

T1DM'lu kadın hastalarda *Firmicutes/Bacteroidetes* oranları ile sağlıklı kontrollerde saptanan *Firmicutes/Bacteroidetes* oranları karşılaştırıldığında, kadın hastalarda kontrol grubuna göre bu oran istatistiksel olarak çok ileri derecede düşük bulunmuştur ($p<0,0001$) (Tablo 4.17).

Tablo 4.17: Kadın hasta ve kontrol grubunda saptanan ortalama *Firmicutes/Bacteroidetes* oranlarının karşılaştırılması

	T1DM	Kontrol	P*
<i>Firmicutes / Bacteroidetes</i>	0,7917 ± 0,04	0,8973 ± 0,066	,000

*Mann-Whitney U testi ile hesaplanmıştır. S:25

Cinsiyet yönünden araştırıldığında T1DM'lu erkek ve kadın hastalarda ortalama *Firmicutes/Bacteroidetes* oranları sağlıklı kontrollere göre çok ileri derecede düşük bulunmuştur.

5. TARTIŞMA

Dünyada en sık görülen endokrin hastalık olarak tanımlanan T1DM, genetik ve çevresel faktörlerin etkisi ile oluşan, multifaktoryal, otoimmün bir hastalık olarak bilinmektedir (1,2). Son yıllarda biyoinformatik gelişmeler ve ilerleyen moleküler teknikler toplu yaşayan mikroorganizmalar hakkında kapsamlı araştırmaların başlatılabilmesine imkan tanımıştır. Bu sayede başta gastrointestinal sistem (GİS) olmak üzere deri, genitouriner sistem ve solunum sisteminde kolonize olan ve floramızı oluşturan mikrobiyom adını verdiğimiz mikrobik topluluklar bu gelişmeler sayesinde araştırılmaya başlanmıştır. Bağırsak mikrobiyomu tarafından düzenlenebilen immün sistem ve mikrobiyom ilişkili değişikliklerin sağlık ve hastalık arasındaki dengeye etkili olabildiği bildirilmektedir (24, 105, 214, 215, 217, 327, 328). Özellikle hayvan modellerinde yapılan çalışmalar sonucunda mikroorganizmalarla indüklenen TLR miktarlarındaki değişimlerin immün sistemin oluşumunda ve düzenlemesinde önemli rol oynadıkları gösterilmiştir (200). Günümüzde, romatoid artrit, multiple skleroz ve ülseratif kolit gibi pek çok otoimmün ve allerjik hastalığın oluşumunda yer aldığı düşünülen bağırsak epiteli ve bağırsaktaki kommensal mikrobiyomun, T1DM da da rol oynadığı düşünülmektedir (144, 184, 203, 230).

T1DM, insülinin salgılanmasında ya da etkisindeki yetersizlik sonucu gelişen karbonhidrat, yağ ve protein metabolizmalarında bozukluklarla karakterizedir. Diyabetin metabolik kontrolü ile birçok komplikasyonun önlenilebileceği veya geciktirilebileceği bilinmektedir. Bu nedenle metabolik kontrolü gösteren glikozile hemoglobin (HbA1c) testinin önemi büyüktür. Ayrıca açlık kan şekeri düzeyi ile birlikte bu test diyabet tanısında kullanılan en önemli laboratuvar parametreleri olarak bilinmektedir (251). Altınova ve arkadaşları (377) 2008 yılında, 62 T1DM lu hasta ve 30 sağlıklı kontrol ile yaptıkları çalışmada T1DM hastalarının ortalama yaş, ortalama vücut kitle indeksi (VKI), HbA1c ve açlık kan şekeri (AKŞ) değerlerini sırasıyla 27,1±7,4, 21,8±2,6 kg/m², %8,9±2,2 ve 202,7±96,4 mg/dl olarak saptamışlar, sağlıklı kontrol gruplarında ise ortalama yaş, ortalama VKI ve AKŞ değerlerini sırasıyla; 26,9±6,4, 22,9±3,3 kg/m² ve 87,5±11 mg/dl olarak belirlemişlerdir. Zisser ve ark. (378), 2014 yılında 27 erişkin tip 1 diyabetli hastada ortalama yaş, ortalama VKI, HbA1c ve AKŞ'ni ; 41 ± 11, 24 ± 3 kg/m², %7,7 ± 0,6 ve 159 ± 25 mg/dl olarak bildirmişlerdir.

Devaraj ve ark (228) ise 2008 yılında erişkin tip 1 diyabetli hastalarda ortalama yaş, ortalama VKI, HbA1c ve AKŞ'ni sırasıyla; 32 ± 13 , 25 ± 4 kg/m², $\%7,8 \pm 1,1$ ve 131 ± 68 mg/dl olarak, sağlıklı kontrollerde ise ortalama yaş, ortalama VKI, HbA1c ve AKŞ'ni sırasıyla; 32 ± 13 , 25 ± 4 kg/m², $\%5,4 \pm 0,3$ ve 85 ± 11 mg/dl olarak saptamışlardır. Bizim çalışmamızda 53 kişiden oluşan T1DM hastalarımızın ortalama yaş, VKI, HbA1c ve AKŞ sırasıyla; $32,87 \pm 12,68$, $23,25 \pm 1,63$ kg/m², $\%8,69 \pm 1,91$, $133,4 \pm 62,44$ mg/dl olarak, sağlıklı kontrol grubumuzda ise ortalama yaş, VKI, HbA1c ve AKŞ sırasıyla; $32,87 \pm 12,68$, $20,23 \pm 1,70$ kg/m², $\%4,19 \pm 1,11$, $91,0 \pm 5,67$ mg/dl olarak saptanmıştır. Gerek ulusal, gerekse uluslararası çalışma sonuçları dikkate alındığında araştırmamızdaki hastalarımızda ve sağlıklı kontrol grubumuzda HbA1c, VKI ve AKŞ' nin ulusal ve uluslararası verilerle benzerlik gösterdiği gözlenmiştir.

İnsanda T1DM ve bağırsak mikrobiyotası ilişkisi üzerine ilk çalışma Giongo ve arkadaşları (4) tarafından 2011 yılında beta hücre otoimmunitesi gösteren 4 Finlandiyalı çocukta 16S rRNA pirosekanslama tekniği ile gerçekleştirilmiştir. Araştırmacılar çalışmadaki çocukların bağırsak mikrobiyotasında, kontrol grupları ile kıyasladıklarında *Bacteroidetes*'de artış, *Firmicutes*'de ise azalma saptamışlardır. Benzer şekilde, de Goffau ve ark. (15) 2013 yılında 16S rRNA pirosekanslama tekniği ile yaptıkları çalışmada, beta hücre otoimmun pozitifliği gösteren çocukların bağırsak mikrobiyotasında, negatif olanlara göre *Bacteroidetes* oranının daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Brown ve arkadaşlarının (296) 2011 yılında yine 16S rRNA pirosekanslama tekniği ile yaptıkları çalışmalarında, T1DM'lu hastaların bağırsak mikrobiyotasında, *Bacteroidetes*'in kontrol gruplarına göre yüksek, *Firmicutes*'in ise T1DM'lu hastalarda kontrol gruplarına göre düşük olduğunu belirtmişlerdir. Murri ve arkadaşları (2), 2013 yılında qPZR tekniği ile benzer şekilde T1DM'lu çocukların dışkısında *Bacteroidetes* miktarının kontrol gruplarına göre yüksek, *Firmicutes*'in ise düşük olduğunu bildirilmişlerdir. Her ne kadar yukarıda belirtilen çalışmalar, yaş grupları ve teknikler açısından bizim çalışmamızla kısmen benzerlik gösterse de, bu çalışmalarda elde edilen *Bacteroidetes* ve *Firmicutes* miktarları, bizim çalışmamızda T1DM'lu hastalarda saptadığımız yüksek *Bacteroidetes* miktarı ve düşük *Firmicutes* miktarı ile uyum göstermektedir. Bu durum T1DM'la *Bacteroidetes* miktarındaki artış ve *Firmicutes* miktarındaki düşüş arasında çalışma yönteminden bağımsız, fizyolojik ve ligant reseptör ilişkisine dayanan bir bağlantı olduğunu düşündürmüştür. Ülkemizde bu konuda yapılmış bir araştırma henüz bulunmadığından kendi popülasyonumuza ait

verilerimizi kıyaslama şansı bulamadık, bunun yanısıra uluslararası kaynaklarda bulgularımızın aksine bir sonuç teşkil edebilecek T1DM'lu hastalarda *Bacteroidetes*'te düşme, *Firmicutes*'de artma gösteren bir yayına da rastlayamadık. Bu sınırlı bilgiler ışığında bulgularımızın uluslararası kaynaklardaki verilerle uyumlu olduğunu belirledik.

Bağırsak mikrobiyotası ve diyabet ilişkisine dayanan uluslararası çalışmaların günümüzde çoğunlukla hayvan deneyleri aşamasında ilerlediği dikkatimizi çekmiştir. Özellikle kemirgenler ailesinde bulunan fare ve sıçanın bağırsak mikrobiyotasının 16S rRNA dizi analizi sonucu %98 oranında insanınki ile benzerlik göstermesi, insanlardaki gibi 1000 farklı mikrobiyal türü ve temelde insanda olduğu gibi 2 baskın filum olan *Bacteroidetes* ve *Firmicutes*'i kapsamaları nedeniyle, T1DM ve bağırsak mikrobiyotası ile ilişkili çalışmalarda bu hayvan modellerinden de yararlanılmıştır (32, 33).

Giongo ve ark. (331) 2011 yılında 16S rRNA pirosekanslama ile yaptıkları bir çalışmada *Firmicutes*'lerin diyabete eğilimli sıçanlarda %76 oranındayken, diyabete dirençli olanlarda %73,15'e düştüğünü, *Bacteroidetes*'in ise diyabete duyarlı olanlarda %9,42 iken, diyabete dirençli olanlarda %11,78'e yükseldiğini belirtmişlerdir. Araştırmacıların bu çalışmada kullandıkları teknik ve kullandıkları canlı bizim çalışmamızdan farklı olsa da, araştırmalarının sonucunda bizim bulgumuzun tam tersine *Bacteroidetes*'te düşme, *Firmicutes*'te yükselme saptamaları önemli bir tezat teşkil etmektedir.

Son yıllarda moleküler tanı yöntemlerinin gelişmesi ile bağırsak mikrobiyotasının yapısında bulunan ancak konvansiyonel yöntemlerle saptanması zor olan bakterilerin tanısına ve mikrobiyotadaki miktarlarına yönelik araştırmalar hız kazanmıştır. Bağırsak mikrobiyotasında baskın olan filumlardan *Firmicutes* ve *Bacteroidetes*'in yaşamın çocukluk, erişkin ve yaşlılık gibi değişik dönemlerinde veya cinsiyetle birlikte değişebileceği belirtilmektedir (379). Mariat D ve ark. (379), 2009 yılında Fransa'da bizim araştırmamıza benzer şekilde gerçek zamanlı PZR ile bağırsak mikrobiyotasındaki bakteri miktarlarını belirleme hedefi ile yaptıkları araştırmada Avrupa popülasyonundaki sağlıklı çocuklarda *Firmicutes/Bacteroidetes* oranının 0,4 olduğunu erişkinde ise bu oranın 10,9 a yükseldiğini yaşlılarda ise tekrar 0,6 düştüğünü belirtmişlerdir. Biagi ve ark (380) ise bundan farklı olarak İtalyan popülasyonunda *Firmicutes/Bacteroidetes* oranını erişkinde 3,9 iken, yaşlılarda giderek yükselerek 5,1 e ulaştığına, yüz yaşlarında ise 3,6 ya düştüğünü belirtmişlerdir. Marathe ve ark. (381),

2012 yılında Hindistan’da orta gelir düzeyine sahip 2 farklı ailede, yaşları birbirinden farklı toplam 6 bireyin dışkı florasında, yaş arttıkça *Firmicutes* miktarında azalma *Bacteroidetes* miktarında ise artma olduğunu belirlemişlerdir. Biz araştırmamızda sağlıklı bireylerimizde *Firmicutes/Bacteroidetes* oranını $0,9134 \pm 0,061$ olarak saptadık. Bu bulgumuz Biaggi ve arkadaşlarının (380) İtalyan populasyonunun erişkinlerindeki bildirdiği orandan oldukça düşüktür. Mariat ve arkadaşlarının (379), Avrupa populasyonundaki erişkinler için 10,9 olarak bildirdiği *Firmicutes/Bacteroidetes* oranına karşın bizim bulgumuzun yine düşük olduğu saptanmıştır. Araştırdığımız kadarıyla, T1DM’lu hastaların bağırsak mikrobiyotasındaki *Firmicutes/Bacteroidetes* oranını belirten bir makaleye rastlamadık. T1DM’lu hastalarımızda *Firmicutes/Bacteroidetes* oranını $0,8029 \pm 0,047$ olarak saptadık bu oranının sağlıklı bireylerde saptadığımız orandan çok ileri düzeyde düşük olduğu belirlenmiştir.

Makivuokko ve ark. (382), 2010 yılında, 16S rDNA dizi analizi yöntemi ile sağlıklı yaşlıların dışkısında, erişkinlere göre *Bacteroidetes*, *Bacteroides* spp. ve *Lactobacillus* spp.’nin arttığını bildirmişler, Greenhill ve ark (383) ise 2015 yılında, sağlıklı olan 4 çocuk, 22 ergen ve 89 erişkinin dışkısında RT-qPCR yöntemi ile yaptıkları çalışmada, *Bacteroidetes*, *Firmicutes* ve *Lactobacillus* spp.’nin yaşla birlikte düşüş gösterdiğine dikkat çekmişlerdir. De Carcer ve ark. (384) 2011 yılında $57.5 \pm 7,7$ yaş ortalamasındaki 5 sağlıklı kadın ve $54.3 \pm 9,9$ yaş ortalamasındaki 5 sağlıklı erkekten alınan dışkılarda yaptıkları DNA dizi analizi sonucunda mikrobiyota kompozisyonunda bulunan bakterilerin cinsiyetle birlikte değişebileceğini bildirmişlerdir. Buna karşın Greenhill ve ark (382), 2015 yılında sağlıklı 71 erkek ve 44 kadından alınan dışkı ile yaptıkları RT-qPCR çalışmasında *Bacteroidetes* ve *Firmicutes* miktarlarının cinsiyete bağlı olarak anlamlı değişim göstermediğini belirtmişlerdir. Bizim araştırmamızda sağlıklı kontrol grubunda yer alan bireylerin bağırsak mikrobiyotasında *Bacteroidetes* ve *Firmicutes* miktarlarının cinsiyete bağımlı olarak değişmediği belirlenmiş ve bu bulgumuz kaynaklarla uyum göstermiştir. T1DM’lu hastaların bağırsak mikrobiyotasında *Bacteroidetes* ve *Firmicutes* miktarlarında cinsiyete bağımlı olarak görülebilecek değişimleri ele alan bir araştırmaya rastlayamadık. Bizim araştırmamızda T1DM’lu hastaların bağırsak mikrobiyotasında *Bacteroidetes* ve *Firmicutes* miktarlarının cinsiyete bağımlı olarak değişmediği saptanmıştır.

Otoimmün hastalıkların oluşumundaki rolü tartışılan *Bacteroides fragilis*'in bağırsak mikrobiyotasındaki miktarlarını T1DM'lu hastalarda sağlıklı kontrollere göre fark gösterip göstermediğinin belirlenmesi araştırmamızın bir diğer bölümünü kapsamaktadır. T1DM'lu hastalarda bağırsak mikrobiyotasındaki *B.fragilis*'in oran ve miktarlarını belirten kapsamlı bir araştırma henüz bulunmamaktadır. Her ne kadar erişkinlerde yapılmamış olsa da, Murri ve arkadaşları (2) 2013 yılında T1DM'lu çocukların bağırsak mikrobiyotasında *Bacteroides* spp. miktarının kontrol grubuna göre yüksek olduğunu gözlemlemişlerdir. Özellikle T1DM'lu hastaların bağırsak mikrobiyotasında bulunan bakteri türlerine yönelik araştırmalar çok kısıtlı olduğundan ve yukarıda da belirttiğimiz gibi araştırmaların birçoğu hayvan deneyleri ile yürütüldüğünden tartışmamızı zenginleştirmek için hayvan deneylerine ait verileri de irdeledik. Roesch ve ark. (295), sıçanlarla yaptıkları bir çalışmada T1DM gelişecek olan BB-DP (Diyabet eğilimli sıçan) sıçanlarda *Bacteroides* spp. miktarının, T1DM dirençli olan BB-DR (Diyabet dirençli sıçan) sıçanlara göre anlamlı düzeyde yüksek olduğunu belirtmişlerdir. Murri ve ark (2) ile Roesch ve ark'nın (295) çalışmalarından, T1DM varlığında bağırsak mikrobiyotasında bulunan *Bacteroides* cinsinde bir artış eğilimi olduğu anlaşılmaktadır. Bu araştırmalarda *B.fragilis* hakkında bir bilgi belirtilmediğinden, bulgularımızı kıyaslayabilecek yeterli veri elimizde bulunmamaktadır. Araştırmamızda *B.fragilis*'in T1DM'lu hastalarda, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek olduğu belirlenmiştir. *B.fragilis*, *Bacteroides* cinsinde bulunan bir tür olduğundan T1DM'lu hastalarda bu türün artmış olması bugünkü şartlarda elimizde olan kaynaklardaki verilere göre şaşırtıcı değildir (308). Ancak ileride bu alandaki çalışmalar arttıkça bulgularımızın daha fazla anlam kazanacağı kanaatindeyiz.

Ulusal ve uluslararası kaynaklarda, erişkin T1DM tanısı almış bireylerin bağırsak mikrobiyotasındaki *L.casei* ve *L.acidophilus* türleri hakkında yayınlanmış bir veriye rastlayamadık. Her ne kadar araştırmamızdaki veriler erişkinlere ait olsa da, bu konuyu tartışabileceğimiz erişkinlere ait verileri içeren makaleler henüz bulunmadığından, verilerimiz çocuklar üzerine yapılmış çalışmalarla kıyaslanmıştır. Murri ve arkadaşları (2) 2013 yılında T1DM'lu çocukların bağırsak mikrobiyotasında *Lactobacillus* spp. miktarının kontrol grubuna göre düşük olduğunu, Brown ve arkadaşları (296), ise T1DM'lu 8 çocuğun gaita örneklerinde yaptıkları 16S rRNA analizi sonucunda, *Lactobacillus* spp. miktarlarının, kontrol gruplarına göre yüksek

olduğunu belirtmişlerdir. Bu araştırmacıların çalıştıkları olgu sayısı çok düşük ve kullandıkları test yöntemi, bizimkinden farklı olduğu ve tür düzeyinde değil de yalnızca *Lactobacillus* cinsi düzeyinde bir bilgi sundukları halde bu konudaki yayınlar çok sınırlı olduğundan bu ilgili bu bilgi tartışmamıza alınmıştır. Bizim verilerimize göre probiyotik olarak önemli olan *L.casei* ve *L.acidophilus* miktarlarında hasta ve sağlıklı kontrol grubu arasında bir fark olmadığı tespit edilmiştir.

T1DM'lu hastalarda *Lactobacillus* türlerinin miktarlarına ait veriler içeren bir makaleye rastlamadık. Bu nedenle her ne kadar araştırmamız insanlar üzerine veriler içersede bulgularımızı yapılmış olan hayvan deneyleri ile karşılaştırdık. Valladares ve ark. (298) diyabet dirençli BB-DR sıçanlardan izole ettikleri *Lactobacillus johnsonii* ile besledikleri diyabet eğilimli BB-DP sıçanlarda normalde 69. günde saptadıkları T1DM'un 141. güne kadar gelişmediğini ve bu sıçanların ileal mukozalarından aldıkları örneklerde *Lactobacillus* türlerini incelediklerinde bu bakteri oranlarını yüksek saptadıklarını bildirmişlerdir. Araştırmacıların bu verilerine göre bağırsak mikrobiyotasında bazı *Lactobacillus* türlerindeki artışa bağlı olarak T1DM'un etkilendiği düşünülebilir. Bizim araştırmamızda incelediğimiz *Lactobacillus* türleri farklı olmakla beraber, T1DM'lu hastalarda saptadığımız ortalama *L.acidophilus* ve *L.casei* miktarlarında kontrol gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadığını belirledik. Ancak ileride yapılacak hayvan deneyleri ile *L.acidophilus* ve *L.casei* türlerinin uzun süre BB-DP (diyabet eğilimli sıçan) sıçanlara verilmesi sonucunda ne gibi değişimler görülebileceğini belirlemek için kapsamlı araştırmalar gerekmektedir.

Toll-like Reseptörler (TLR), hücre yüzeyinde yada hücre içinde bulunabilen ve çeşitli mikrobiyal infeksiyonlarda rol oynayan etkenlere spesifik patojen ilişkili moleküler yapıları (PAMP) veya otoimmün süreçlerde yer alan hasar ilişkili moleküler yapıları (DAMP) tanıyan reseptörlerdir (230, 234). Gerek in vivo, gerekse in vitro yapılmış olan araştırmalarda, inflamasyon ve diyabetin patogeneğinde kritik rol oynayan TLR'lerin, Gram pozitif bakteri duvarına ait yapıları tanıyan TLR2 ve Gram negatif bakteri duvarına ait yapıları tanıyan TLR4 olduğu bildirilmiştir (21, 22, 231).

Devaraj ve arkadaşları (228), 2008 yılında 18 yaş üzerinde olan 31 T1DM ve 31 sağlıklı kontrolle yaptıkları çalışmada, sağlıklı kontrollerde TLR2 ve TLR4 mRNA gen ekspresyonu düzeylerinin T1DM'lu hastalara göre yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Bu

TLR gen ekspresyon düzeylerindeki artışta, T1DM'la birlikte bağırsak mikrobiyotasındaki bakteri metabolik ürünlerine bağlı olarak vücutta artan serbest yağ asitlerinin de etkisi olduğunu belirtmişlerdir. Yine Devaraj ve ark (229) 2011 yılında yaptıkları bir başka çalışmada da, T1DM'lu hastalarda, sağlıklı kontrollere göre artmış TLR2 ve TLR4 gen ekspresyonu düzeyi bulunduğunu bildirmişlerdir. Benzer şekilde Keizer ve ark. (254) 2007 yılında yaptıkları çalışmada 43 T1DM'lu çocukta, kontrol grubuna göre artmış TLR4 gen ekspresyonu düzeyi saptamışlardır. Özellikle T1DM'lu hastalarda gerek TLR2, gerekse TLR4 gen ekspresyon düzeylerinde artış bildiren bu araştırmalara karşın, Du ve ark'ları (242), 2009 yılında yaş ortalaması 45 olan 23 kontrol ve yaş ortalaması 35 olan 18 T1DM'lu hastada yaptıkları çalışmada, TLR2 ve TLR4 gen ekspresyonu düzeylerinin, hasta ve kontrol grubu arasında fark göstermediğini bildirmişlerdir. Bizim araştırmamızda ise T1DM'lu tüm hasta popülasyonumuzda saptadığımız TLR2 gen ekspresyon düzeyleri, sağlıklı kontrol popülasyonunda saptanan düzeyler ile kıyaslandığında hasta bireylerde TLR2'nin istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük çıktığı saptanmıştır. Verilerimiz cinsiyet yönünden değerlendirildiğinde, TLR2'nin tüm kadın ve erkek hastalarda benzer şekilde kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük olduğu görülmüştür ($p < 0,001$). Yaş grupları yönünden de 31-44 yaş grubu erkeklerde TLR2 gen ekspresyon düzeyinin kontrollere göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olduğu, 19-29 ile 49-61 yaş grubu erkeklerde ise bu düzeyin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı fark göstermediği saptanmıştır. Bunun nedenini kesin olarak tahmin etmek mümkün olmamakla birlikte bu durum araştırmamızda 31-44 yaş grubu hasta erkeklerde bağırsak mikrobiyotasında bulunan *Firmicutes* miktarında sağlıklıları nazaran düşüş saptanmasına karşın, 19-29 ve 49-61 yaş grubu erkeklerde bağırsak mikrobiyotasında bulunan *Firmicutes* miktarının sağlıklıları nazaran fark göstermemesi ile kısmen ilişkili olabilir. *Bacteroidetes* miktarının tüm yaş gruplarındaki hasta erkeklerde sağlıklıları nazaran yüksek olması TLR2 gen ekspresyon düzeyindeki değişimlerin kaynaklara uygun şekilde, yaşa bağımlı olmaksızın bağırsak mikrobiyotasında bulunan ve Gram negatif bakterileri kapsadığı bilinen *Bacteroidetes*'in miktarından etkilenmediğini belirtmektedir. TLR2 gen ekspresyon düzeyi yaş grupları yönünden kadınlarda değerlendirildiğinde ise 31-41 yaş grubu kadınlarda TLR2 gen ekspresyon düzeyi kontrollere göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olduğu, 19-28 ile 43-56 yaş grubu erkeklerde kontrol grubuna göre

istatistiksel olarak anlamlı fark göstermediği saptanmıştır. Bunun nedenini kesin olarak tahmin etmek mümkün olmamakla birlikte araştırmamızda 31-41 yaş grubu hasta kadınlarda bağırsak mikrobiyotasında bulunan *Firmicutes* miktarında sağlıklılara nazaran düşüş saptanmasına karşın, 19-28 ve 43-56 yaş grubu kadınlarda bağırsak mikrobiyotasında bulunan *Firmicutes* miktarının sağlıklılara nazaran fark göstermemesi ile kısmen ilişkili olabilir. *Bacteroidetes* miktarının erkeklerde olduğu gibi tüm yaş gruplarındaki hasta kadınlarda da sağlıklılara nazaran yüksek olması TLR2 gen ekspresyon düzeyindeki değişimlerin yaş grupları ve *Bacteroidetes* miktarından etkilenmediğini belirtmektedir.

Miura ve Ohnishi, 2014 yılında yaptıkları bir çalışmada (385), *Bacteroidetes* ve *Firmicutes* miktarları ile TLR2 ve TLR4 gen ekspresyonu düzeyleri arasında bir korelasyon olduğunu bildirilmişlerdir. Bizim çalışmamızda; *Bacteroidetes* miktarlarının, TLR2 ve TLR4 gen ekspresyon düzeyleri ile olan korelasyonunu incelediğimizde, T1DM'lu hem kadınlarda, hem de erkeklerde sağlıklı kontrollerde saptanan miktarlara göre beklendiği gibi *Bacteroidetes*'in TLR4 gen ekspresyon düzeyi ile olan ilişkisinin çok güçlü, TLR2 gen ekspresyon düzeyi ile olan ilişkisinin ise istatistiksel olarak zayıf olduğunu saptadık. *Firmicutes* miktarlarının, TLR2 ve TLR4 gen ekspresyon düzeyleri ile olan korelasyonunu incelediğimizde, T1DM'lu hem kadınlarda, hemde erkeklerde, sağlıklı kontrollere göre, beklendiği gibi TLR4 gen ekspresyon düzeyi ile olan ilişkisinin zayıf, TLR2 gen ekspresyon düzeyi ile olan ilişkisinin ise çok güçlü olduğu belirledik. Bu veriler, bütün kaynaklarda belirtilen bilgilerle uyumlu olarak TLR2 gen ekspresyonu ile *Firmicutes* ilişkisini ve TLR4 gen ekspresyonu ile *Bacteroidetes* ilişkisini ifade etmektedir.

Son yıllarda bağırsak mikrobiyotasının bir motor kompleksle (migrating motor complex, MMC) kumanda edildiği, bu kompleksin etkisiyle bağırsakta normal ya da anormal aktivitenin geliştiği bildirilmiştir. Birbiri ile ilişkili bir çok fenomenden oluşan bir döngü şeklinde ifade edilen bu kompleks, bir çok faktörün etkisi ile modüle edildiğinden, ne zaman başlayacağı, ne zaman sonlanacağı ve ne kadar devam edeceği konusunda henüz kesin bir bilgi bulunmamaktadır. Bugün, MMC'yi kumanda eden mekanizma tam olarak bilinmemekle beraber, hem vücudun içinden hem de dışarıdan gelen etkiler sonucu beyinden nöronlar aracılığı ile kumanda edildiği şeklindeki görüşler öne çıkmaktadır. Hormonal değişimler, stres ve beslenme alışkanlıklarının

MMC'yi uyaran önemli faktörler olduğu belirtilmiştir (386). Bu bilgi bize özellikle T1DM hastalarında insulin hormonundaki değişimlerin, MMC'yi uyaran önemli faktörler arasında yer alabileceğini düşündürmüştür.

Bir yönden vücutta iç ve dış faktörler etkisiyle ve nörolojik uyarılar sonucu bağırsak motilitesindeki değişimin vücudu T1DM'a duyarlı hale getirdiği görüşü üzerinde durulurken, diğer bir yönden de bağırsak mikrobiyotasının, bağırsak hareketleri ile ilişkili olarak sürekli değişim yaşadığı göz önünde bulundurularak özellikle T1DM'ta gelişen nöropatlere bağlı olarak bağırsak hareketlerinin yavaşladığı ve mikrobiyotanın dinamiklerinde değişimler olduğu görüşü de desteklenmektedir (387).

Bağırsak mikrobiyotasında bulunan bakteri miktarı 10^4 - 10^6 CFU/ml olarak belirtilmiştir ancak vücutta belli patolojilerin gelişmesine bağlı olarak, bakteri transit geçişindeki aksamalar nedeniyle bu miktarın bazen çok fazla yükselebileceğine işaret edilmiştir (388). Bağırsak mikrobiyotasında bulunan bakteri miktarının beklenenden çok daha fazla artması bu mikrobiyotadaki bakterilerin, besinler için insan vücudu ile yarışmasına bağlanmıştır (389). Özellikle T1DM olan ve kronik ishal şikayeti bulunan kişilerin %43'ünde bakterilerin bağırsakta aşırı çoğaldığına dikkat çekilmiştir (390, 391).

Kaynaklarda yer alan verilerden anlaşılacağı üzere sağlıklı bireylerde bağırsakta bulunan *Firmicutes* ve *Bacteroidetes* miktarı ya da *Firmicutes/Bacteroidetes* oranı hakkında bu güne kadar standart bir sayı belirlenmemiştir. Bunun nedeni insan yaşamının ruhsal ve bedensel dinamikler süreci olduğuna ve bu dinamiğin bağırsak mikrobiyotasını her bedende farklı şekilde etkilediği görüşüne dayandırılmıştır (386).

Sonuç olarak:

T1DM'lu hem kadın, hem de erkeklerde, sağlıklı kontrollere göre *Bacteroidetes* miktarında ileri düzeyde artış olduğunu *Firmicutes* miktarında ise yalnızca T1DM'lu 31-41 yaş grubu kadınlarda ve 31-44 yaş grubu erkeklerde sağlıklı kontrollere göre ileri derecede düşüş olduğunu belirledik.

T1DM'lu hem kadın, hem de erkek hastalarımızda beklendiği şekilde *Firmicutes*'deki düşüğe bağlı olarak, TLR2 gen ekspresyon düzeylerinde düşüş olduğunu ve *Bacteroidetes*'deki artışa bağlı olarak TLR4 gen ekspresyon düzeylerinde yükselme olduğunu belirledik.

Dünyada ilk defa bu çalışma ile T1DM'lu kadın ve erkeklerin bağırsak mikrobiyotasında *B.fragilis* miktarının sağlıklı kişilere göre çok ileri derecede artmış olduğunu belirledik.

Dünyada ilk defa bu çalışma ile probiyotik özellikleri ile tanınan *L.acidophilus* ve *L.casei*'nin T1DM'lu kadın ve erkek hastalarda sağlıklı kişilere göre miktar bakımından fark göstermediğini dolayısı ile T1DM ile bağırsak mikrobiyotasının birbirini karşılıklı tetikleyen döngüsü içinde bu bakterilerin miktarlarında değişim olmadığını belirledik.

T1DM ile bağırsak mikrobiyotası arasında her iki yönde gelişen T1DM/mikrobiyota ve TLR2, TLR4 ilişkisine yönelik ön bilgiler verebilmek için başlangıç niteliğinde olan bu çalışmanın yapılması gerektiği sonucuna varılmıştır. Olgu sayılarını genişleterek ileri moleküler tekniklere dayanan prospektif çalışmalarla ortaya çıkan verilerin desteklenmesi gerektiği kanısındayız.

KAYNAKLAR

1. Saleh NM., Raj S.M., Smyth DJ., Wallace C, Howson JMM., Bell L., Walker N.M., Stevens HE., Todd JA. Genetic association analyses of atopic illness and proinflammatory cytokine genes with type 1 diabetes. *Diabetes Metab res rev.* 2011; 27; 838 – 843.
2. Murri M., Leiva I., Gomez J.M., Cardona F., Soriguer F., Tinahones F.J., Queipo M. Gut microbiota in children with type 1 diabetes differs from that in healthy children: a case control study. *BMC Medicine.* 2013; 11; 46
3. Giongo A., Athkinson MA., Triplett EW. Microbiology of Type 1 diabetes, possible implication for management of the disease *Diabetes Manage.* 2011 Jan: (3); 325-331.
4. Giongo A, Gano KA, Crabb DB, Mukherjee N, Novelo LL, Casella G, Drew JC, Ilonen J, Knip M, Hyöty H, Veijola R, Simell T, Simell O, Neu J, Wasserfall CH, Schatz D, Atkinson MA, Triplett EW. Toward defining the autoimmune microbiome for type 1 diabetes. *ISME J.* 2010; 5: 82–91.
5. Gill SR, Pop M, Deboy RT, Eckburg PB, Turnbaugh PJ, Samuel BS, Gordon JI, Relman DA, Frasser-Liggett CM, Nelson KE. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science.* 2006 Jun 2; 312 5778:1355-9.
6. Hooper LV. Bacterial contributions to mammalian gut development. *Trends Microbiol* 2004; 12: 129 –134.
7. Hooper LV, Gordon JI. Commensal host-bacterial relationships in the gut. *Science* 2001; 292: 1115–1118
8. Kort S., Keszthelyi D., Masclee AAM. Leaky gut and diabetes mellitus, what is the link?. *Obesity reviews.* 2010; 10;1111, 1467
9. Luopajarvi K. The development of immune responses and gut microbiota in children at genetic risk of type 1 diabetes. *Natioal institute for health and welfare book Finland.* 2012
10. Boerner BP., Sarvetnick NE. Type 1 diabetes, role of intestinal microbiome in humans and mice. *Ann NY Acad. Sci.* 2011: 1243; 103-118.
11. Furet JP., Kong LC., Tap J., Poitue C, Basdevant A., Bouillot JL., Mariat D., Cothier G., Dore J., Henegar C., Rizkalla S., Clement K. Differential Adaptation

- of Human Gut Microbiota to Bariatric Surgery–Induced Weight Loss. *Diabetes*. 2010; 59; 3049-3057.
12. Hara N., Alkanani AK., Ir D., Robertson CE., Wagner BD., Frank DN., Zipris D. The role of the intestinal microbiota in type 1 diabetes. *Clinical immunology*. 2013; 146; 112-119.
 13. Ismail AN., Ragab SH., Elbaky AA., Shoeib ARS., Alhosary Y., Fekry D. Frequency of Firmicutes and Bacteroidetes in gut microbiota in obese and normal weight Egyptian children and adults. *Arc Med Sci*. 2011; 7,3; 501-507.
 14. Wu X., Ma C., Han L., Nawaz M., Gao F., Zhang X., Yu P., Zhao C., Li L., Zhou A., Wang J., Moore JE., Millar BC., Xu J. Molecular Characterisation of the Faecal Microbiota in Patients with Type II Diabetes. *Curr Microbiol*. 2010; 61; 69-78.
 15. de Goffau MC, Luopajarvi K, Knip M, Ilonen J, Ruohtula T, Härkönen T, Orivuori L, Hakala S, Welling GW, Harmsen HJ, Vaarala O. Fecal microbiota composition differs between children with β -cell autoimmunity and those without. *Diabetes*. 2013 Apr;62(4):1238-44.
 16. Reyna SM., Ghosh S., Tantiwong P., Meka CS., Eagan P., Jenkinson CP., Cersosimo E., Defronzo RA. Colletta DK., Sriwijitkamol A., Musi N. Elevated Toll-Like Receptor 4 Expression and Signaling in Muscle From Insulin-Resistant Subjects. *Diabetes*. 2008 Jul; 57; 2595 – 2602.
 17. Mansour M., Salam R., Rashed L., Salam H. Role of toll receptors in diabetic nephropathy. *Journal of Diabetes Mellitus*, 2014, 4, 26-32. doi: 10.4236/jdm.2014.41005.
 18. Bensussan NC, Routhiau VG. The immune system and the gut microbiota, friends or foes? *Nature Reviews*. 2010; 10; 735-744.
 19. Caricilli AM., Saad MJA. The Role of Gut Microbiota on Insulin Resistance. *Nutrients*. 2013; 5; 829-851.
 20. Greiner T., Backhed F. Effects of the gut microbiota on obesity and glucose homeostasis. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 2011 Apr; 22:, 117.
 21. Jialal I, Kaur H, Devaraj S. Toll-like receptor status in obesity and metabolic syndrome: a translational perspective. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014 Jan;99(1):39-48. doi: 10.1210/jc.2013-3092. Epub 2013 Dec 20.

22. Beutler, B. Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling. *Nature*, 2004, 430, 257-263. <http://dx.doi.org/10.1038/nature02761>
23. Bilgehan H. Temel Mikrobiyoloji ve Bağışıklık Bilimi, *Barış Yayınları Fakülteler Kitabevi*, İzmir, 1999.
24. NIH HMP Working Group, Peterson J, Garges S, Giovanni M, McInnes P, Wang L, Schloss JA, Bonazzi V, McEwen JE, Wetterstrand KA, Deal C, Baker CC, Di Francesco V, Howcroft TK, Karp RW, Lunsford RD, Wellington CR, Belachew T, Wright M, Giblin C, David H, Mills M, Salomon R, Mullins C, Akolkar B, Begg L, Davis C, Grandison L, Humble M, Khalsa J, Little AR, Peavy H, Pontzer C, Portnoy M, Sayre MH, Starke-Reed P, Zakhari S, Read J, Watson B, Guyer M.. *The NIH Human Microbiome Project. Genome Res* 2009; 19: 2317-23.
25. Tlaskalová-Hogenová H, Stěpánková R, Kozáková H, Hudcovic T, Vannucci L, Tučková L, Rossmann P, Hrnčář T, Kverka M, Zákostelská Z, Klimešová K, Přibyllová J, Bártová J, Sanchez D, Fundová P, Borovská D, Srůtková D, Zídek Z, Schwarzer M, Drastich P, Funda DP. The role of gut microbiota (commensal bacteria) and the mucosal barrier in the pathogenesis of inflammatory and autoimmune diseases and cancer: contribution of germ-free and gnotobiotic animal models of human diseases. *Cell Mol Immunol*. 2011 Mar;8(2):110-20. doi: 10.1038/cmi.2010.67. Epub 2011 Jan 31.
26. Sekirov I, Russell SL, Antunes LC, Finlay BB. Gut microbiota in health and disease. *Physiol Rev*. 2010 Jul;90(3):859-904. doi: 10.1152/physrev.00045.2009.
27. Ceyhan N, Alıç H. Bağırsak Mikroflorası ve Probiyotikler. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi* 5 (1): 107-113, 2012
28. Ustaçelebi Ş. Temel ve Klinik Mikrobiyolojisi, *Güneş Kitabevi*, Ankara, 975-7467-77-4, 1999.
29. Ley RE, Peterson DA, Gordon JI. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell*. 2006 Feb 24;124(4):837-48.
30. Tsabouri S, Priftis KN, Chaliasos N, Siamopoulou A. Modulation of gut microbiota downregulates the development of food allergy in infancy. *Allergol Immunopathol (Madr)*. 2014 Jan – Feb ; 42 (1): 69 - 77. doi: 10.1016/j.aller.2013.03.010. Epub 2013 Jul 1.
31. Wu HJ, Wu E. The Role of Gut Microbiota in immune homeostasis and autoimmunity. *Gut Microbes* 2012; 3:1: 4-14. doi:10.4161/gmic.19320.

32. Spor A, Koren O, Ley R. Unravelling the effects of the environment and host genotype on the gut microbiome. *Nat Rev Microbiol* 2011; 9:279–290.
33. Hehemann JH, Correc G, Barbeyron T, Helbert W, Czjzek M, Michel G. Transfer of carbohydrate-active enzymes from marine bacteria to Japanese gut microbiota. *Nature* 2010; 464:908–912.
34. Karlsson F, Tremaroli V, Nielsen J, Bäckhed F. Assessing the human gut microbiota in metabolic diseases. *Diabetes*. 2013 Oct;62(10):3341-9. doi: 10.2337/db13-0844.
35. Macpherson AJ, Uhr T. Induction of protective IgA by intestinal dendritic cells carrying commensal bacteria. *Science*. 2004 Mar 12;303(5664):1662-5. doi:10.1126/science.1091334
36. Sommer F, Bäckhed F. The gut microbiota--masters of host development and physiology. *Nat Rev Microbiol*. 2013 Apr;11(4):227-38. doi: 10.1038/nrmicro2974. Epub 2013 Feb 25.
37. Collins MD., Gibson GR.. Probiotics, prebiotics synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut. *American Journal of Clinical Nutrition*. 1999; 69; 1052 – 1057
38. Goulet O. Potential role of the intestinal microbiota in programming health and disease. *Nutr Rev*. 2015 Aug;73 Suppl 1:32-40. doi: 10.1093/nutrit/nuv039.
39. Martin R, Nauta AJ, Amor KB, Knippels LMJ, Knol J, Garssen J. Early life: gut microbiota and immune development in infancy. *Benefic Microbes* 2010; 1:367–382.
40. Yılmaz M. Prebiyotik ve Probiyotikler. *Güncel Pediatri* 2004; 2: 142-145.
41. Finegold SM, Sutter VL, Mathisen GE. Normal indigenous intestinal flora. İçinde Hentges DJ, editor. *Human Intestinal Flora in Health and Disease*. Newyork, London, Paris: Academic Press; 1983.
42. Backhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, Peterson DA, Gordon JI. Host Bacterial Mutualism in the Human Intestine. *Science* 2005: March; 307 5717: 1915-1920.
43. Pagliari D, Piccirillo CA, Larbi A, Cianci R. The Interactions between Innate Immunity and Microbiota in Gastrointestinal Diseases. *J Immunol Res*. 2015;2015:898297. doi: 10.1155/2015/898297. Epub 2015 May 20.
44. Dethlefsen L, McFall-Ngai M., Relman DA. An ecological and evolutionary perspective on human-microbe mutualism and disease. *Nature*, 2007, 449:811-8.

45. Lay C., Rigottier-Gois L., Holmström K., Rajilic M., Vaughan EE., de Vos WM., Collins MD., Thiel R., Namsolleck P., Blaut M., Dore J. Colonic microbiota signatures across five northern European countries. *Appl Environ Microbiol*, 2005, 71:4153-5.
46. De Filippo C., Cavalieri D., Di Paola M., Ramazzotti M., Poullet JB., Massart S., Collini S., Pieraccini G., Lionetti P. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107:14691-6.
47. Biagi E., Nylund L., Candela M., Ostan R., Bucci L., Pini E., Nikkila J., Monti D., Satokari R., Franceschi C., Brigidi P., De Vos W. Through ageing, and beyond: gut microbiota and inflammatory status in seniors and centenarians. *PLoS One*, 2010, 5:e10667.
48. den Abbeele PV, de Wiele TV, Werstraete W, Possemiers S. The host selects mucosal and luminal associations of coevolved gut microorganisms: a novel concept: The host selects mucosal and luminal gut microorganisms. *FEMS Microbiology reviews* 35.4, 2011, pp. 681–704.
49. Tlaskalová-Hogenová H, Stepánková R, Hudcovic T, Tucková L, Cukrowska B, Lodinová-Zádníková R, Kozáková H, Rossmann P, Bártová J, Sokol D, Funda DP, Borovská D, Reháková Z, Sinkora J, Hofman J, Drastich P, Kokesová A. Commensal bacteria (normal microflora), mucosal immunity and chronic inflammatory and autoimmune diseases. *Immunol Lett* 2004, 93:97-108.
50. Fukata M, Arditi M. The role of pattern recognition receptors in intestinal inflammation. *Mucosal immunology* 6.3 (2013), pp. 451–463.
51. Lakhdari O, Tap J, Béguet-Crespel F, Le Roux K, de Wouters T, Cultrone A, Nepelska M, Lefèvre F, Doré J, Blottière HM. Identification of NF- κ B modulation capabilities within human intestinal commensal bacteria. *J Biomed Biotechnol*. 2011: 282 - 356. doi: 10.1155/2011/282356. Epub 2011 Jun 14.
52. Starr TK, Jameson SC, Hogquist KA. Positive and negative selection of T cells, *Annu Rev Immunol*. 2003;21:139-76. Epub 2002 Oct 16.
53. Takahama Y. Journey through the thymus: stromal guides for T-cell development and selection. *Nat Rev Immunol*. 2006 Feb;6(2):127-35.

54. Anderson MS, Venanzi ES, Chen Z, Berzins SP, Benoist C, Mathis D. The cellular mechanism of Aire control of T cell tolerance. *Immunity*. 2005 Aug;23(2):227-39.
55. von Boehmer H, Melchers F. Checkpoints in lymphocyte development and autoimmune disease. *Nat Immunol*. 2010 Jan;11(1):14-20. doi: 10.1038/ni.1794. Epub 2009 Dec 17.
56. Mowat AM. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat Rev Immunol*. 2003 Apr;3(4):331-41.
57. Guarner F., Malagelada JR. Gut flora in health and disease. *Lancet*, 2003, 361:512-9.
58. Hayashi H., Takahashi R., Nishi T., Sakamoto M., Benno Y. Molecular analysis of jejunal, ileal, caecal and recto-sigmoidal human colonic microbiota using 16S rRNA gene libraries and terminal restriction fragment length polymorphism. *J Med Microbiol*, 2005, 54:1093-101.
59. Wang M., Ahrné S., Antonsson M., Molin G. T-RFLP combined with principal component analysis and 16S rRNA gene sequencing: an effective strategy for comparison of fecal microbiota in infants of different ages. *J Microbiol Methods*, 2004, 59:53-69.
60. Wang M., Ahrné S., Jeppsson B., Molin G. Comparison of bacterial diversity along the human intestinal tract by direct cloning and sequencing of 16S rRNA genes. *FEMS Microbiol Ecol*, 2005, 54:219-31.
61. Walker AW., Ince J., Duncan SH., Webster LM., Holtrop G., Ze X., Brown D., Stares MD., Scott P., Bergerat A., Louis P., McIntosh F., Johnstone AM., Lopley GE., Parkhill J., Flint H. J. Dominant and diet-responsive groups of bacteria within the human colonic microbiota. *ISME J*, 2011, 5:220-30.
62. Karlsson C., Ahrné S., Molin G., Berggren A., Palmquist I., Fredrikson GN., Jeppsson B. Probiotic therapy to men with incipient arteriosclerosis initiates increased bacterial diversity in colon: A randomized controlled trial. *Atherosclerosis*, 2010, 208:228-33.
63. Cavalieri LB. MICROBIOMA E COMPORTAMENTO.
http://www.letiziabernardi.it/index.php?option=com_content&view=article&id=133:microbioma-e-comportamento&catid=8&Itemid=106 [web page on the internet] Erişim. 01.09.2015

64. Eckburg, PB., Bik EM., Bernstein CN., Purdom E., Dethlefsen L., Sargent M., Gill SR., Nelson KE., Relman DA. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*, 2005, 308:1635-8.
65. Zoetendal EG., Collier CT., Koike S., Mackie RI., Gaskins HR. Molecular ecological analysis of the gastrointestinal microbiota: a review. *J Nutr*, 2004, 134:465-72.
66. Larsen N., Vogensen FK., van den Berg FW., Nielsen DS., Andreasen AS., Pedersen BK., Al-Soud WA., Sorensen SJ., Hansen LH., Jakobsen M. Gut microbiota in human adults with type 2 diabetes differs from non-diabetic adults. *PLoS One*, 2010, 5:e9085.
67. von Ossowski I, Reunanen J, Satokari R, Vesterlund S, Kankainen M, Huhtinen H, Tynkkynen S, Salminen S, de Vos WM, Palva A. Mucosal adhesion properties of the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG SpaCBA and SpaFED pilin subunits. *Appl Environ Microbiol.* 2010 Apr;76(7):2049-57. doi: 10.1128/AEM.01958-09. Epub 2010 Jan 29.
68. Stecher B., Hardt WD. The role of microbiota in infectious disease. *Trends Microbiol*, 2008, 16:107-14.
69. Valore EV., Park CH., Igteti SL., Ganz T. Antimicrobial components of vaginal fluid. *Am J Obstet Gynecol*, 2002, 187:561-8.
70. Pacha J. Development of intestinal transport function in mammals. *Physiol Rev*, 2000, 80:1633-67.
71. Schneeberger EE., Lynch RD. The tight junction: a multifunctional complex. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2004, 286:C1213-28.
72. Cani PD., Bibiloni R., Knauf C., Waget A., Neyrinck AM., Delzenne NM., Burcelin R. Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes*, 2008, 57:1470-81.
73. Brignardello J, Morales P, Diaz E, Romero J, Brunser O, Gotteland M. Pilot study: alterations of intestinal microbiota in obese humans are not associated with colonic inflammation or disturbances of barrier function. *Aliment Pharmacol Ther.* 2010 Dec;32(11-12):1307-14. doi: 10.1111/j.1365-2036.2010.04475.x. Epub 2010 Sep 29.

74. de La Serre CB, Ellis CL, Lee J, Hartman AL, Rutledge JC, Raybould HE. Propensity to high-fat diet-induced obesity in rats is associated with changes in the gut microbiota and gut inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2010 Aug;299(2):G440-8. doi: 10.1152/ajpgi.00098.2010. Epub 2010 May 27.
75. Nébot-Vivinus M, Harkat C, Bziouche H, Cartier C, Plichon-Dainese R, Moussa L, Eutamene H, Pishvaie D, Holowacz S, Seyrig C, Piche T, Theodorou V. Multispecies probiotic protects gut barrier function in experimental models. *World J Gastroenterol*. 2014 Jun 14;20(22):6832-43. doi: 10.3748/wjg.v20.i22.6832.
76. Herías MV, Hesse C, Telemo E, Midtvedt T, Hanson LA, Wold AE. Immunomodulatory effects of *Lactobacillus plantarum* colonizing the intestine of gnotobiotic rats. *Clin Exp Immunol*. 1999 May;116(2):283-90.
77. Bäckhed F, Ding H, Wang T, Hooper LV, Koh GY, Nagy A, Semenkovich CF, Gordon JI. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Nov 2;101(44):15718-23. Epub 2004 Oct 25.
78. Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, Gordon JI. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature*. 2006 Dec 21;444(7122):1022-3.
79. Hietbrink F, Besselink MG, Renooij W, de Smet MB, Draisma A, van der Hoeven H, Pickkers P. Systemic inflammation increases intestinal permeability during experimental human endotoxemia. *Shock*. 2009 Oct;32(4):374-8. doi: 10.1097/SHK.0b013e3181a2bcd6.
80. Karczewski J, Troost FJ, Konings I, Dekker J, Kleerebezem M, Brummer RJ, Wells JM. Regulation of human epithelial tight junction proteins by *Lactobacillus plantarum* in vivo and protective effects on the epithelial barrier. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2010 Jun;298(6):G851-9. doi: 10.1152/ajpgi.00327.2009. Epub 2010 Mar 11.
81. Bernet MF, Brassart D, Neeser JR, Servin AL. *Lactobacillus acidophilus* LA 1 binds to cultured human intestinal cell lines and inhibits cell attachment and cell invasion by enterovirulent bacteria. *Gut* 1994 Apr;35(4):483-9.
82. Silva M, Jacobus NV, Deneke C, Gorbach SL. Antimicrobial substance from a human *Lactobacillus* strain. *Antimicrob Agents Chemother* 1987 Aug;31(8):1231-3.

83. Wilson KH, Perini F. Role of competition for nutrients in suppression of *Clostridium difficile* by the colonic microflora. *Infect Immun* 1988 Oct;56(10):2610-4.
84. Robert A. The role of the gut microbiota in inflammatory diseases of childhood. Glaskow unv MD thesis, [web page on the internet] Erişim. 14.09.2014 <http://theses.gla.ac.uk/2204/>
85. Levy O. Innate immunity of the newborn: basic mechanisms and clinical correlates. *Nat Rev Immunol*. 2007 May;7(5):379-90.
86. Kültürsay N. Bebeklikte bağırsak florası gelişimi ve immun sisteme etkileri. *Çocuk Enf Derg*. 2009; 3: 75-78.
87. Saevedra JM. Use of probiotics in pediatrics: rationale, mechanisms of action, and practical aspects. *Nutr Clin Pract*. 2007; 22: 351-365.
88. 40. Tezcan Fİ. İntestinal immun sistem. *Türkiye klinikleri J Pediatr Sci*. 2007; 3: 65-67.
89. Forchielli ML, Walker WA. The role of gut-associated lymphoid tissues and mucosal defence. *Br J Nutr*. 2005 Apr;93 Suppl 1:S41-8.
90. Round, JL., Mazmanian, SK. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nat Rev Immunol*. 2009; 9:313-23.
91. Hedlund, M., Frendeus, B., Wachtler, C., Hang, L., Fischer, H., Svanborg, C. Type 1 fimbriae deliver an LPS- and TLR4-dependent activation signal to CD14-negative cells. *Mol Microbiol* 2001; 39:542-52.
92. Grangette, C., Nutten, S., Palumbo, E., Morath, S., Hermann, C., Dewulf, J., Pot, B., Hartung, T., Hols, P., Mercenier, A. Enhanced antiinflammatory capacity of a *Lactobacillus plantarum* mutant synthesizing modified teichoic acids. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102:10321-6.
93. Sjögren YM, Tomicic S, Lundberg A, Böttcher MF, Björkstén B, Sverremark-Ekström E, Jenmalm MC. Influence of early gut microbiota on the maturation of childhood mucosal and systemic immune responses. *Clin Exp Allergy*. 2009 Dec;39(12):1842-51. doi: 10.1111/j.1365-2222.2009.03326.x. Epub 2009 Sep 3.
94. Skovbjerg S, Martner A, Hynsjö L, Hessle C, Olsen I, Dewhirst FE, Tham W, Wold AE. Gram-positive and gram-negative bacteria induce different patterns of cytokine production in human mononuclear cells irrespective of taxonomic

- relatedness. *J Interferon Cytokine Res.* 2010 Jan;30(1):23-32. doi: 10.1089/jir.2009.0033.
95. Romagnani S. T-cell subsets (Th1 versus Th2). *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2000 Jul;85(1):9-18; quiz 18, 21.
96. Rowland IR. Interactions of the gut microflora and the host in toxicology. *Toxicol Pathol* 1988; 16 (2):147-53.
97. Gassull MA. Review article: the intestinal lumen as a therapeutic target in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2006 Oct;24 Suppl 3:90-5.
98. Parker P, Jones G, Smith S. Mixed Cultures of Food-grade Probiotic Bacteria and Enteric Bacteria Demonstrate Both Synergism and Inhibition of Menaquinone Production *Journal of Food Science* 68(7): 2325-2330. 10.1111/j.1365-2621.2003.tb05767.x
99. Shearer MJ. "Vitamin K." *The Lancet* 1995, 345 (8944): 229-234.
100. Dror DK, Allen LH. Effect of vitamin B12 deficiency on neurodevelopment in infants: current knowledge and possible mechanisms. *Nutr Rev.* 2008 May;66(5):250-5. doi: 10.1111/j.1753-4887.2008.00031.x.
101. Metges CC, Petzke KJ, El-Khoury AE, Henneman L, Grant I, Bedri S, Regan MM, Fuller MF, Young VR. Incorporation of urea and ammonia nitrogen into ileal and fecal microbial proteins and plasma free amino acids in normal men and ileostomates. *Am J Clin Nutr.* 1999 Dec;70(6):1046-58.
102. Wall R, Ross RP, Shanahan F, O'Mahony L, O'Mahony C, Coakley M, Hart O, Lawlor P, Quigley EM, Kiely B, Fitzgerald GF, Stanton C. Metabolic activity of the enteric microbiota influences the fatty acid composition of murine and porcine liver and adipose tissues. *Am J Clin Nutr.* 2009 May;89(5):1393-401. doi: 10.3945/ajcn.2008.27023. Epub 2009 Apr 8.
103. Ross RP, Mills S, Hill C, Fitzgerald GF, Stanton C. Specific metabolite production by gut microbiota as a basis for probiotic function. *International Dairy Journal*, 2010, 20:269-76.
104. Blaut M, Clavel T. Metabolic diversity of the intestinal microbiota: implications for health and disease. *J Nutr.* 2007 Mar;137(3 Suppl 2):751S-5S.
105. Manzo VE, Bhatt AS. The human microbiome in hematopoiesis and hematologic disorders. *Blood.* 2015 Jul 16;126(3):311-8. doi: 10.1182/blood-2015-04-574392. Epub 2015 May 26.

106. Marcobal A, Barboza M, Froehlich JW, Block DE, German JB, Lebrilla CB, Mills DA. Consumption of human milk oligosaccharides by gut-related microbes. *J Agric Food Chem*. 2010 May 12;58(9):5334-40. doi: 10.1021/jf9044205.
107. Turan İ, Özütemiz Ö. İntestinal mikroflora. *Güncel Gastroenteroloji* 2005; 9: 126-144.
108. Fallani M, Young D, Scott J, Norin E, Amarri S, Adam R, Aguilera M, Khanna S, Gil A, Edwards CA, Doré J, Other Members of the INFABIO Team. Intestinal microbiota of 6-week-old infants across Europe: geographic influence beyond delivery mode, breast-feeding, and antibiotics. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2010 Jul;51(1):77-84. doi: 10.1097/MPG.0b013e3181d1b11e.
109. Fallani M, Amarri S, Uusijärvi A, Adam R, Khanna S, Aguilera M, Gil A, Vieites JM, Norin E, Young D, Scott JA, Doré J, Edwards CA, INFABIO team. Determinants of the human infant intestinal microbiota after the introduction of first complementary foods in infant samples from five European centres. *Microbiol* 2011;157(5):1385–92 doi: 10.1099/mic.0.042143-0. Epub 2011 Feb 17.
110. Rougé C, Goldenberg O, Ferraris L, Berger B, Rochat F, Legrand A, Göbel UB, Vodovar M, Voyer M, Rozé JC, Darmaun D, Piloquet H, Butel MJ, de La Cochetière MF. Investigation of the intestinal microbiota in preterm infants using different methods. *Anaerobe*. 2010 Aug;16(4):362-70. doi: 10.1016/j.anaerobe.2010.06.002. Epub 2010 Jun 9.
111. Penders J, Thijs C, Vink C, Stelma FF, Snijders B, Kummeling I, van den Brandt PA, Stobberingh EE. Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. *Pediatrics*. 2006 Aug;118(2):511-21.
112. Alm JS, Swartz J, Björkstén B, Engstrand L, Engström J, Kühn I, Lilja G, Möllby R, Norin E, Pershagen G, Reinders C, Wreiber K, Scheynius A. An anthroposophic lifestyle and intestinal microflora in infancy. *Pediatr Allergy Immunol*. 2002 Dec;13(6):402-11.
113. Schwartz A, Gruhl B, Löbnitz M, Michel P, Radke M, Blaut M. Development of the intestinal bacterial composition in hospitalized preterm infants in comparison with breast-fed, full-term infants. *Pediatr Res*. 2003 Sep;54(3):393-9. Epub 2003 Jun 4.
114. Bezirtzoglou E, Tsiotsias A, Welling GW. Microbiota profile in feces of breast- and formula-fed newborns by using fluorescence in situ hybridization (FISH).

- Anaerobe*. 2011 Dec;17(6):478-82. doi: 10.1016/j.anaerobe.2011.03.009. Epub 2011 Apr 8.
115. Favier CF, de Vos WM, Akkermans AD. Development of bacterial and bifidobacterial communities in feces of newborn babies. *Anaerobe*. 2003 Oct;9(5):219-29. doi:10.1016/j.anaerobe.2003.07.001
116. Palmer C, Bik EM, DiGiulio DB, Relman DA, Brown PO. Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS Biol*. 2007 Jul;5(7):e177. Epub 2007 Jun 26. 10.1371/journal.pbio.0050177
117. Favier CF, Vaughan EE, De Vos WM, Akkermans AD. Molecular monitoring of succession of bacterial communities in human neonates. *Appl Environ Microbiol*. 2002 Jan;68(1):219-26. 10.1128/AEM.68.1.219-226.2002
118. Karlsson CL, Molin G, Cilio CM, Ahrné S. The pioneer gut microbiota in human neonates vaginally born at term-a pilot study. *Pediatr Res*. 2011 Sep;70(3):282-6. doi: 10.1038/pr.2011.507.
119. Dominguez-Bello MG, Costello EK, Contreras M, Magris M, Hidalgo G, Fierer N, Knight R. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Jun 29;107(26):11971-5. doi: 10.1073/pnas.1002601107. Epub 2010 Jun 21.
120. Huurre A, Kalliomäki M, Rautava S, Rinne M, Salminen S, Isolauri E. Mode of delivery - effects on gut microbiota and humoral immunity. *Neonatology*. 2008;93(4):236-40. Epub 2007 Nov 16.
121. Magne F, Abély M, Boyer F, Morville P, Pochart P, Suau A. Low species diversity and high interindividual variability in faeces of preterm infants as revealed by sequences of 16S rRNA genes and PCR-temporal temperature gradient gel electrophoresis profiles. *FEMS Microbiol Ecol*. 2006 Jul;57(1):128-38. 10.1111/j.1574-6941.2006.00097.x
122. Arboleya S, Binetti A, Salazar N, Fernández N, Solís G, Hernández-Barranco A, Margolles A, de Los Reyes-Gavilán CG, Gueimonde M. Establishment and development of intestinal microbiota in preterm neonates. *FEMS Microbiol Ecol*. 2012 Mar;79(3):763-72. doi: 10.1111/j.1574-6941.2011.01261.x. Epub 2011 Dec 15.

123. Hall MA, Cole CB, Smith SL, Fuller R, Rolles CJ. Factors influencing the presence of faecal lactobacilli in early infancy. *Arch Dis Child*. 1990 Feb;65(2):185-8.
124. Torun MM, Bahar H, Gür E, Taştan Y, Alikasıfoğlu M, Arvas A. Anaerobic Fecal Flora in Healthy Breast-Fed Turkish Babies Born by Different Methods. *Anaerobe* 2002, 7 (2) 63-67. doi:10.1006/anae.2002.0415
125. Mättö J, Malinen E, Suihko ML, Alander M, Palva A, Saarela M. Genetic heterogeneity and functional properties of intestinal bifidobacteria. *J Appl Microbiol*. 2004;97(3):459-70. 10.1111/j.1365-2672.2004.02340.x
126. Mariat D, Firmesse O, Levenez F, Guimarães V, Sokol H, Doré J, Corthier G, Furet JP. The Firmicutes/Bacteroidetes ratio of the human microbiota changes with age. *BMC Microbiol*. 2009 Jun 9;9:123. doi: 10.1186/1471-2180-9-123.
127. Harmsen HJ, Wildeboer-Veloo AC, Raangs GC, Wagendorp AA, Klijn N, Bindels JG, Welling GW. Analysis of intestinal flora development in breast-fed and formula-fed infants by using molecular identification and detection methods. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2000 Jan;30(1):61-7.
128. Magne F, Hachelaf W, Suau A, Boudraa G, Mangin I, Touhami M, Bouziane-Nedjadi K, Pochart P. A longitudinal study of infant faecal microbiota during weaning. *FEMS Microbiol Ecol*. 2006 Dec;58(3):563-71. 10.1111/j.1574-6941.2006.00182.x
129. Dicksved J, Flöistrup H, Bergström A, Rosenquist M, Pershagen G, Scheynius A, Roos S, Alm JS, Engstrand L, Braun-Fahrländer C, von Mutius E, Jansson JK. Molecular fingerprinting of the fecal microbiota of children raised according to different lifestyles. *Appl Environ Microbiol*. 2007 Apr;73(7):2284-9. Epub 2007 Feb 9. 10.1128/AEM.02223-06
130. Collado MC, Isolauri E, Laitinen K, Salminen S. Effect of mother's weight on infant's microbiota acquisition, composition, and activity during early infancy: a prospective follow-up study initiated in early pregnancy. *Am J Clin Nutr*. 2010 Nov;92(5):1023-30. doi: 10.3945/ajcn.2010.29877. Epub 2010 Sep 15.
131. Guaraldi F, Salvatori G. Effect of breast and formula feeding on gut microbiota shaping in newborns. *Front Cell Infect Microbiol*. 2012 Oct 16;2:94. doi: 10.3389/fcimb.2012.00094. eCollection 2012.

132. Maukonen J, Saarela M. Human gut microbiota: does diet matter? *Proc Nutr Soc.* 2015 Feb;74(1):23-36. doi: 10.1017/S0029665114000688. Epub 2014 Aug 26.
133. Yatsunenko T, Rey FE, Manary MJ, Trehan I, Dominguez-Bello MG, Contreras M, Magris M, Hidalgo G, Baldassano RN, Anokhin AP, Heath AC, Warner B, Reeder J, Kuczynski J, Caporaso JG, Lozupone CA, Lauber C, Clemente JC, Knights D, Knight R, Gordon JI. Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature.* 2012 May 9;486(7402):222-7. doi: 10.1038/nature11053.
134. Hentges DJ. The anaerobic microflora of the human body. *Clin Infect Dis.* 1993 Jun;16 Suppl 4:S175-80. 10.1093/clinids/16.Supplement_4.S175
135. Rajilić-Stojanović M, Heilig HG, Molenaar D, Kajander K, Surakka A, Smidt H, de Vos WM. Development and application of the human intestinal tract chip, a phylogenetic microarray: analysis of universally conserved phylotypes in the abundant microbiota of young and elderly adults. *Environ Microbiol.* 2009 Jul;11(7):1736-51. doi: 10.1111/j.1462-2920.2009.01900.x. Epub 2009 Mar 11.
136. Claesson MJ, Cusack S, O'Sullivan O, Greene-Diniz R, de Weerd H, Flannery E, Marchesi JR, Falush D, Dinan T, Fitzgerald G, Stanton C, van Sinderen D, O'Connor M, Harnedy N, O'Connor K, Henry C, O'Mahony D, Fitzgerald AP, Shanahan F, Twomey C, Hill C, Ross RP, O'Toole PW. Composition, variability, and temporal stability of the intestinal microbiota of the elderly. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 Mar 15;108 Suppl 1:4586-91. doi: 10.1073/pnas.1000097107. Epub 2010 Jun 22.
137. Woodmansey EJ, McMurdo ME, Macfarlane GT, Macfarlane S. Comparison of compositions and metabolic activities of fecal microbiotas in young adults and in antibiotic-treated and non-antibiotic-treated elderly subjects. *Appl Environ Microbiol.* 2004 Oct;70(10):6113-22. 10.1128/AEM.70.10.6113-6122.2004
138. Blaut M, Collins MD, Welling GW, Doré J, van Loo J, de Vos W. Molecular biological methods for studying the gut microbiota: the EU human gut flora project. *Br J Nutr.* 2002 May;87 Suppl 2:S203-11.
139. Mueller S, Saunier K, Hanisch C, Norin E, Alm L, Midtvedt T, Cresci A, Silvi S, Orpianesi C, Verdenelli MC, Clavel T, Koebnick C, Zunft HJ, Doré J, Blaut M. Differences in fecal microbiota in different European study populations in relation to age, gender, and country: a cross-sectional study. *Appl Environ Microbiol.* 2006 Feb;72(2):1027-33. 10.1128/AEM.72.2.1027-1033.2006

140. Hopkins MJ, Sharp R, Macfarlane GT. Age and disease related changes in intestinal bacterial populations assessed by cell culture, 16S rRNA abundance, and community cellular fatty acid profiles. *Gut*. 2001 Feb;48(2):198-205. doi: 10.1136/gut.48.2.198
141. Mitsuoka T. Intestinal flora and aging. *Nutr Rev*. 1992 Dec;50(12):438-46. doi: 10.1111/j.1753-4887.1992.tb02499.x
142. Li M, Wang B, Zhang M, Rantalainen M, Wang S, Zhou H, Zhang Y, Shen J, Pang X, Zhang M, Wei H, Chen Y, Lu H, Zuo J, Su M, Qiu Y, Jia W, Xiao C, Smith LM, Yang S, Holmes E, Tang H, Zhao G, Nicholson JK, Li L, Zhao L. Symbiotic gut microbes modulate human metabolic phenotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Feb 12;105(6):2117-22. doi: 10.1073/pnas.0712038105. Epub 2008 Feb 5.
143. Bertazzoni Minelli E, Benini A, Beghini AM, Cerutti R, Nardo G. Bacterial faecal flora in healthy women of different ages. *Microbial Ecol Health Dis* 1993;6:43–51. doi: 10.3109/08910609309141561
144. Dicksved J, Halfvarson J, Rosenquist M, Jarnerot G, Tysk C, Apajalahti J, Engstrand L, Jansson JK. Molecular analysis of the gut microbiota of identical twins with Crohn's disease. *ISME J* 2008; 2:716–727.
145. Zoetendal EG, Akkermans ADL, Akkermans-van Vliet WM, De Visser JAGM, De Vos WM. The host genotype affects the bacterial community in the human gastrointestinal tract. *Microb Ecol Health Dis* 2001;13(3):129–34. doi: 10.3402/mehd.v13i3.8013
146. Turnbaugh PJ, Hamady M, Yatsunenko T, Cantarel BL, Duncan A, Ley RE, Sogin ML, Jones WJ, Roe BA, Affourtit JP, Egholm M, Henrissat B, Heath AC, Knight R, Gordon JI. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature*. 2009 Jan 22;457(7228):480-4. doi: 10.1038/nature07540. Epub 2008 Nov 30.
147. Turnbaugh PJ, Quince C, Faith JJ, McHardy AC, Yatsunenko T, Niazi F, Affourtit J, Egholm M, Henrissat B, Knight R, Gordon JI. Organismal, genetic, and transcriptional variation in the deeply sequenced gut microbiomes of identical twins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Apr 20;107(16):7503-8. doi: 10.1073/pnas.1002355107. Epub 2010 Apr 2.

148. Hentges DJ, Maier BR, Burton GC, Flynn MA, Tsutakawa RK. Effect of a high-beef diet on the fecal bacterial flora of humans. *Cancer Res.* 1977 Feb;37(2):568-71.
149. Russell WR, Gratz SW, Duncan SH, Holtrop G, Ince J, Scobbie L, Duncan G, Johnstone AM, Lobley GE, Wallace RJ, Duthie GG, Flint HJ. High-protein, reduced-carbohydrate weight-loss diets promote metabolite profiles likely to be detrimental to colonic health. *Am J Clin Nutr.* 2011 May;93(5):1062-72. doi: 10.3945/ajcn.110.002188. Epub 2011 Mar 9.
150. Tuohy KM, Kolida S, Lustenberger AM, Gibson GR. The prebiotic effects of biscuits containing partially hydrolysed guar gum and fructo-oligosaccharides--a human volunteer study. *Br J Nutr.* 2001 Sep;86(3):341-8. doi: 10.1079/BJN2001394
151. Walton GE, van den Heuvel EG, Kosters MH, Rastall RA, Tuohy KM, Gibson GR. A randomised crossover study investigating the effects of galacto-oligosaccharides on the faecal microbiota in men and women over 50 years of age. *Br J Nutr.* 2012 May;107(10):1466-75. doi: 10.1017/S0007114511004697. Epub 2011 Sep 13.
152. Langlands SJ, Hopkins MJ, Coleman N, Cummings JH. Prebiotic carbohydrates modify the mucosa associated microflora of the human large bowel. *Gut.* 2004 Nov;53(11):1610-6. doi: 10.1136/gut.2003.037580
153. Tannock GW, Munro K, Harmsen HJ, Welling GW, Smart J, Gopal PK. Analysis of the fecal microflora of human subjects consuming a probiotic product containing *Lactobacillus rhamnosus* DR20. *Appl Environ Microbiol.* 2000 Jun;66(6):2578-88.
154. Rinne M, Kalliomäki M, Salminen S, Isolauri E. Probiotic intervention in the first months of life: short-term effects on gastrointestinal symptoms and long-term effects on gut microbiota. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2006 Aug;43(2):200-5.
155. Mohan R, Koebnick C, Schildt J, Schmidt S, Mueller M, Possner M, Radke M, Blaut M. Effects of *Bifidobacterium lactis* Bb12 supplementation on intestinal microbiota of preterm infants: a double-blind, placebo-controlled, randomized study. *J Clin Microbiol.* 2006 Nov;44(11):4025-31. Epub 2006 Sep 13. doi: 10.1128/JCM.00767-06
156. Gueimonde M, Sakata S, Kalliomäki M, Isolauri E, Benno Y, Salminen S. Effect of maternal consumption of *Lactobacillus* GG on transfer and establishment of

- fecal bifidobacterial microbiota in neonates. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2006 Feb;42(2):166-70. 10.1097/01.mpg.0000189346.25172.fd
157. Lyra A, Krogius-Kurikka L, Nikkilä J, Malinen E, Kajander K, Kurikka K, Korpela R, Palva A. Effect of a multispecies probiotic supplement on quantity of irritable bowel syndrome-related intestinal microbial phylotypes. *BMC Gastroenterol.* 2010 Sep 19;10:110. doi: 10.1186/1471-230X-10-110.
158. Duncan SH, Lobley GE, Holtrop G, Ince J, Johnstone AM, Louis P, Flint HJ. Human colonic microbiota associated with diet, obesity and weight loss. *Int J Obes (Lond).* 2008 Nov;32(11):1720-4. doi: 10.1038/ijo.2008.155. Epub 2008 Sep 9.
159. Nadal I, Santacruz A, Marcos A, Warnberg J, Garagorri JM, Moreno LA, Martín-Matillas M, Campoy C, Martí A, Molerés A, Delgado M, Veiga OL, García-Fuentes M, Redondo CG, Sanz Y. Shifts in clostridia, bacteroides and immunoglobulin-coating fecal bacteria associated with weight loss in obese adolescents. *Int J Obes (Lond).* 2009 Jul;33(7):758-67. doi: 10.1038/ijo.2008.260. Epub 2008 Dec 9.
160. Puupponen-Pimiä R1, Seppänen-Laakso T, Kankainen M, Maukonen J, Törrönen R, Kolehmainen M, Leppänen T, Moilanen E, Nohynek L, Aura AM, Poutanen K, Tomás-Barberán FA, Espín JC, Oksman-Caldentey KM. Effects of ellagitannin-rich berries on blood lipids, gut microbiota, and urolithin production in human subjects with symptoms of metabolic syndrome. *Mol Nutr Food Res.* 2013 Dec;57(12):2258-63. doi: 10.1002/mnfr.201300280. Epub 2013 Aug 12.
161. Flint HJ, Duncan SH, Scott KP, Louis P. Interactions and competition within the microbial community of the human colon: links between diet and health. *Environ Microbiol.* 2007 May;9(5):1101-11. 10.1111/j.1462-2920.2007.01281.x
162. Magee EA, Richardson CJ, Hughes R, Cummings JH. Contribution of dietary protein to sulfide production in the large intestine: an in vitro and a controlled feeding study in humans. *Am J Clin Nutr.* 2000 Dec;72(6):1488-94.
163. Pitcher MC, Cummings JH. Hydrogen sulphide: a bacterial toxin in ulcerative colitis? *Gut.* 1996 Jul;39(1):1-4.
164. Cummings JH, Macfarlane GT. Colonic microflora: nutrition and health. *Nutrition.* 1997 May;13(5):476-8. 10.1016/S0899-9007(97)00114-7

165. Drasar BS, Crowther JS, Goddard P, Hawksworth G, Hill MJ, Peach S, Williams RE, Renwick A. The relation between diet and the gut microflora in man. *Proc Nutr Soc.* 1973 Sep;32(2):49-52. 10.1079/PNS19730014
166. Finegold SM, Attebery HR, Sutter VL. Effect of diet on human fecal flora: comparison of Japanese and American diets. *Am J Clin Nutr.* 1974 Dec;27(12):1456-69.
167. Hayashi H, Sakamoto M, Benno Y. Fecal microbial diversity in a strict vegetarian as determined by molecular analysis and cultivation. *Microbiol Immunol.* 2002;46(12):819-31. 10.1111/j.1348-0421.2002.tb02769.x
168. Mishra S, Mishra HN. Effect of Synbiotic Interaction of Fructooligosaccharide and Probiotics on the Acidification Profile, Textural and Rheological Characteristics of Fermented Soy Milk. *Food and Bioprocess Technology* 2013, 6(11): 3166-3176. 10.1007/s11947-012-1021-4
169. Champagne CP, Ross RP, Saarela M, Hansen KF, Charalampopoulos D. Recommendations for the viability assessment of probiotics as concentrated cultures and in food matrices. *Int J Food Microbiol.* 2011 Oct 3;149(3):185-93. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.07.005. Epub 2011 Jul 14.
170. Cox MJ, Huang YJ, Fujimura KE, Liu JT, McKean M, Boushey HA, Segal MR, Brodie EL, Cabana MD, Lynch SV. Lactobacillus casei abundance is associated with profound shifts in the infant gut microbiome. *PLoS One.* 2010 Jan 18;5(1):e8745. doi: 10.1371/journal.pone.0008745.
171. Gibson GR, Roberfroid MB. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J Nutr.* 1995 Jun;125(6):1401-12.
172. Gibson GR, Probert HM, Loo JV, Rastall RA, Roberfroid MB. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutr Res Rev.* 2004 Dec;17(2):259-75. doi: 10.1079/NRR200479.
173. Rinne MM, Gueimonde M, Kalliomäki M, Hoppu U, Salminen SJ, Isolauri E. Similar bifidogenic effects of prebiotic-supplemented partially hydrolyzed infant formula and breastfeeding on infant gut microbiota. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2005 Jan 1;43(1):59-65. 10.1016/j.femsim.2004.07.005

174. Kohanski MA, Dwyer DJ, Collins JJ. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nat Rev Microbiol*. 2010 Jun;8(6):423-35. doi: 10.1038/nrmicro2333. Epub 2010 May 4.
175. Sullivan A, Edlund C, Nord CE. Effect of antimicrobial agents on the ecological balance of human microflora. *Lancet Infect Dis*. 2001 Sep;1(2):101-14. doi:10.1016/S1473-3099(01)00066-4
176. Bartosch S, Fite A, Macfarlane GT, McMurdo MET. Characterization of Bacterial Communities in Feces from Healthy Elderly Volunteers and Hospitalized Elderly Patients by Using Real-Time PCR and Effects of Antibiotic Treatment on the Fecal Microbiota. *Applied and Environmental Microbiology*. 2004;70(6):3575-3581. doi:10.1128/AEM.70.6.3575-3581.2004.
177. Wang S-X, Wu W-C. Effects of psychological stress on small intestinal motility and bacteria and mucosa in mice. *World Journal of Gastroenterology: WJG*. 2005;11(13):2016-2021. doi:10.3748/wjg.v11.i13.2016.
178. Mikelsaar M, Zilmer M. Lactobacillus fermentum ME-3 – an antimicrobial and antioxidative probiotic. *Microbial Ecology in Health and Disease*. 2009;21(1):1-27. doi:10.1080/08910600902815561.
179. Strachen DP. Hay fever, Hygiene and household size. *BMJ*. 1989; 299; 259 – 260.
180. Laursen MF, Zachariassen G, Bahl MI, Bergström A, Høst A, Michaelsen KF, Licht TR. Having older siblings is associated with gut microbiota development during early childhood. *BMC Microbiol*. 2015 Aug 1; 15:154. doi: 10.1186/s12866-015-0477-6.
181. Eder W, Ege MJ, von Mitius E. the asthma epidemic. *N Eng J Med*, 2006; 355; 2226 – 2235
182. Bieber T. Atopic dermatitis. *N Engl J Med* 2008; 358:1483–94.
183. Harjutsalo V, Sjoberg L, Tuomilehto J. Time trends in the incidence of type 1 diabetes in Finnish children: a cohort study. *Lancet* 2008; 371:1777–82.
184. Chow J, Mazmanian SK. Getting the bugs out of the immune system: do bacterial microbiota “fix” intestinal T cell responses? *Cell Host Microbe* 2009; 5:8–12.
185. Hale JS, Ahmed R. Memory T Follicular Helper CD4 T Cells. *Frontiers in Immunology*. 2015;6:16. doi:10.3389/fimmu.2015.00016.
186. Okada H, Kuhn C, Feillet H, Bach JF. The “hygiene hypothesis” for autoimmune and allergic diseases : an update. *Clin Exp Imm* 2010; 160; 1-9.

187. Drash AL. The etiology of Diabetes mellitus. *N Eng J Med.* 1979; 300; 1211 – 1216.
188. Zucman SC, Garchon HJ, Timsit J, Assan R, Boitard C, Saiah ID, Bougnères P, Bach JF. Age-dependent HLA genetic heterogeneity of Type 1 insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* 1992; 90: 2242-2250.
189. Glisic S, Jailwala P. Interaction between Treg apoptosis pathways, Treg function and HLA risk evolves during type 1 diabetes pathogenesis. *PLoS One.* 2012;7(4):e36040. doi: 10.1371/journal.pone.0036040. Epub 2012 Apr 26.
190. Bach J-F. The Effect of Infections on Susceptibility to Autoimmune and Allergic Diseases." *New England Journal of Medicine* 2002, 347(12): 911-920. 10.1056/NEJMra020100
191. Bach J-F, Chatenoud L. The Hygiene Hypothesis: An Explanation for the Increased Frequency of Insulin-Dependent Diabetes. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine.* 2012;2(2):a007799. doi:10.1101/cshperspect.a007799.
192. Patterson CC, Carson DJ, Hadden DR. Epidemiology of childhood IDDM in Northern Ireland 1989-1994: low incidence in areas with highest population density and most household crowding. Northern Ireland Diabetes Study Group. *Diabetologia.* 1996 Sep;39(9):1063-9.
193. Ivanov II, Frutos Rde L Manel N, Yoshinaga K, Rifkin DB, Finlay BB, Litman DR. Specific microbiota direct the differentiation of IL-17-producing T-helper cells in the mucosa of the small intestine. *Cell Host Microbe* 2008; 4: 337–349.
194. Kriegel MA, Sefik E, Hill JA, Wu H-J, Benoist C, Mathis D. Naturally transmitted segmented filamentous bacteria segregate with diabetes protection in nonobese diabetic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2011; 108 (28): 11548 - 11553. doi:10.1073/pnas.1108924108.
195. Hase K, Takahashi D, Ebisawa M, Kawano S, Itoh K, Ohno H. Activation-induced cytidine deaminase deficiency causes organ-specific autoimmune disease. *PLoS One* 2008; 3:e3033.
196. Smythies LE, Shen R, Bimczok D, et al. Inflammation Anergy in Human Intestinal Macrophages Is Due to Smad-induced I κ B α Expression and NF- κ B Inactivation. *The Journal of Biological Chemistry.* 2010;285(25):19593-19604. doi:10.1074/jbc.M109.069955.

197. Pull, S.L., Doherty JM, Mills JC, Gordon JI, Stappenbeck TS. Activated macrophages are an adaptive element of the colonic epithelial progenitor niche necessary for regenerative responses to injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2005;102 (1): 99–104.
198. Shao L, Kamalu O, Mayer L. Non-classical MHC class I molecules on intestinal epithelial cells: mediators of mucosal crosstalk. *Immunol Rev.* 2005 Aug;206:160-76.
199. Jarry A., Bossard C, Bou-Hanna C, Masson D, Espaze D, Denis MG, Laboissee CL. Mucosal IL-10 and TGF-beta play crucial roles in preventing LPS-driven, IFN-gamma-mediated epithelial damage in human colon explants. *J. Clin. Invest.* 2008; 118: 1132–1142.
200. Rakoff-Nahoum, S., Paglino J, Eslami-Varzaneh F., Edberg S., Medzhitov R. Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell* 2004; 118: 229–241.
201. Kato LM, Kawamoto S, Maruya M, Fagarasan S. The role of the adaptive immune system in regulation of gut microbiota. *Immunol Rev.* 2014 Jul;260(1):67-75. doi: 10.1111/imr.12185.
202. Vijay-Kumar M, Aitken JD, Carvalho FA, Cullender TC, Mwangi S, Srinivasan S, Sitaraman SV, Knight R, Ley RE, Gewirtz AT. Metabolic syndrome and altered gut microbiota in mice lacking Toll-like receptor 5. *Science.* 2010 Apr 9;328(5975):228-31. doi: 10.1126/science.1179721. Epub 2010 Mar 4.
203. Peng J, Narasimhan S, Marchesi JR, Benson A, Wong FS, Wen L. Long term effect of gut microbiota transfer on diabetes development. *J Autoimmun.* 2014 Sep;53:85-94. doi: 10.1016/j.jaut.2014.03.005. Epub 2014 Apr 22.
204. Bouskra D, Brézillon C, Bérard M, Werts C, Varona R, Boneca IG, Eberl G. Lymphoid tissue genesis induced by commensals through NOD1 regulates intestinal homeostasis. *Nature.* 2008 Nov 27;456(7221):507-10. doi: 10.1038/nature07450. Epub 2008 Nov 5.
205. Kobayashi KS, Chamaillard M, Ogura Y, Henegariu O, Inohara N, Nuñez G, Flavell RA. Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract. *Science.* 2005 Feb 4;307(5710):731-4. 10.1126/science.1104911
206. Vaishnava S, Behrendt CL, Ismail AS, Eckmann L, Hooper LV. Paneth cells directly sense gut commensals and maintain homeostasis at the intestinal host-

- microbial interface. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008; 105 (52): 20858 - 20863. doi:10.1073/pnas.0808723105.
207. Salzman NH, Hung K, Haribhai D, et al. Enteric defensins are essential regulators of intestinal microbial ecology. *Nature immunology*. 2010;11(1):76-83. doi:10.1038/ni.1825.
208. Brandl K, Plitas G, Schnabl B, DeMatteo RP, Pamer EG. MyD88-mediated signals induce the bactericidal lectin RegIII γ and protect mice against intestinal *Listeria monocytogenes* infection. *The Journal of Experimental Medicine*. 2007;204(8):1891-1900. doi:10.1084/jem.20070563.
209. Vaishnava S, Yamamoto M, Severson KM, et al. The antibacterial lectin RegIII γ promotes the spatial segregation of microbiota and host in the intestine. *Science* (New York, NY). 2011;334(6053):255-258. doi:10.1126/science.1209791.
210. Campbell D.J, Koch MA. Phenotypical and functional specialization of FOXP3 +regulatory T cells. *Nature reviews Immunology* 2011; 11: 119–130.
211. Flajnik MF, Du Pasquier L. Evolution of innate and adaptive immunity: can we draw a line? *Trends Immunol*. 2004 Dec;25(12):640-4. 10.1016/j.it.2004.10.001
212. Hu Y., Shen F, Crellin NK, Ouyang W. The IL-17 pathway as a major therapeutic target in autoimmune diseases. *Ann. N.Y. Acad. Sci*. 2011; 1217: 60–76.
213. Gaboriau-Routhiau,V., Rakotobe S, Lecuyer E, Mulder I, Lan A, Bridonneau C, Rochet V, Pisi A, DePaepe M, Brandi G, Eberl G, Snel J, Kelly D, Cerf-Bensussan N. The key role of segmented filamentous bacteria in the coordinated maturation of gut helper T cell responses. *Immunity* 2009; 31: 677–689.
214. Singh B, Read S, Asseman C, Malmstrom V, Mottet C, Stephens LA, Stepankova R, Tlaskalova H, Powrie F. Control of intestinal inflammation by regulatory T cells. *Immunol Rev* 2001; 182: 190–200.
215. Baumgart DC, Carding SR. Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. *Lancet* 2007; 369:1627–1640.
216. Dubois B., Joubert G, Agüero MG, Gouanvic M, Goubier A, Kaiserlian D. Sequential role of plasmacytoid dendritic cells and regulatory T cells in oral tolerance. *Gastroenterology* 2009; 137: 1019–1028.
217. Hand T, Belkaid Y. Microbial control of regulatory and effector T cell responses in the gut. *Curr Opin Immunol* 2010; 22:63–72.

218. Badami E, Sorini C, Coccia M, et al. Defective Differentiation of Regulatory FoxP3⁺ T Cells by Small-Intestinal Dendritic Cells in Patients With Type 1 Diabetes. *Diabetes*. 2011;60(8):2120-2124. doi:10.2337/db10-1201.
219. Turley SJ, Lee J-W, Dutton-Swain N, Mathis D, Benoist C. Endocrine self and gut non-self intersect in the pancreatic lymph nodes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005;102(49):17729-17733. doi:10.1073/pnas.0509006102.
220. Wei B, Wingender G, Fujiwara D, et al. Commensal Microbiota and CD8⁺ T Cells Shape the Formation of Invariant NKT Cells. *Journal of immunology* (Baltimore, Md : 1950). 2010;184(3):1218-1226. doi:10.4049/jimmunol.0902620.
221. He B, Xu W, Santini PA, Polydorides AD, Chiu A, Estrella J, Shan M, Chadburn A, Villanacci V, Plebani A, Knowles DM, Rescigno M, Cerutti A. Intestinal bacteria trigger T cell-independent immunoglobulin A(2) class switching by inducing epithelial-cell secretion of the cytokine APRIL. *Immunity*. 2007 Jun;26(6):812-26. DOI: 10.1016/j.immuni.2007.04.014.
222. Himanshu Kumar, Taro Kawai, Shizuo Akira Toll-like receptors and innate immunity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2009;388:621–625.
223. Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA. The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 1996;86: 973–83.
224. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway Jr CA. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 1997;388:394–397.
225. Medzhitov R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* 2007;449: 819–826.
226. Beutler BA. TLRs and innate immunity. *Blood* 2009;113: 1399–1407.
227. Underhill DM, Ozinsky A. Toll-like receptors: key mediators of microbe detection. *Curr Opin Immunol* 2002; 14: 103-10.
228. Devaraj S, Dasu MR, Rockwood J, Winter W, Griffen SC, Jialal I. Increased toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 expression in monocytes from patients with type 1 diabetes: further evidence of a proinflammatory state. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008 Feb;93(2):578-83. Epub 2007 Nov 20.

229. Devaraj S, Jialal I, Yun JM, Bremer A. Demonstration of increased toll-like receptor 2 and toll-like receptor 4 expression in monocytes of type 1 diabetes mellitus patients with microvascular complications. *Metabolism*. 2011 Feb;60(2):256-9. doi: 10.1016/j.metabol.2010.01.005. Epub 2010 Feb 12.
230. Wong, FS, Wen, L. Toll-like receptors and diabetes. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2008, 1150, 123-132. <http://dx.doi.org/10.1196/annals.1447.063>
231. Dasu MR, Devaraj S, Park S, Jialal I. Increased toll-like receptor (TLR) activation and TLR ligands in recently diagnosed type 2 diabetic subjects. *Diabetes Care*. 2010 Apr;33(4):861-8. doi: 10.2337/dc09-1799. Epub 2010 Jan 12.
232. Rojo-Botello NR, García-Hernández AL, Moreno-Fierros L. Expression of toll-like receptors 2, 4 and 9 is increased in gingival tissue from patients with type 2 diabetes and chronic periodontitis. *J Periodontal Res*. 2012 Feb;47(1):62-73. doi: 10.1111/j.1600-0765.2011.01405.x. Epub 2011 Aug 17.
233. Ahmad R, Al-Mass A, Atizado V, Al-Hubail A, Al-Ghimlas F, Al-Arouj M, Bennakhi A, Dermime S, Behbehani K. Elevated expression of the toll like receptors 2 and 4 in obese individuals: its significance for obesity-induced inflammation. *J Inflamm (Lond)*. 2012 Nov 28;9(1):48. doi: 10.1186/1476-9255-9-48.
234. Uematsu, S., Akira, S. Toll-like receptors and innate immunity. *Journal of Molecular Medicine*, 2006, 84, 712-725. <http://dx.doi.org/10.1007/s00109-006-0084-y>
235. Modlin RL. Mammalian toll-like receptors. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2002;88: 543-7.
236. Kumagai Y, Takeuchi O, Akira S: Pathogen recognition by innate receptors. *J Infect Chemother* 2008; 14:86–92.
237. O'Neill LA, Golenbock D, Bowie AG. The history of Toll-like receptors - redefining innate immunity. *Nat Rev Immunol*. 2013; 13(6):453-60.
238. Kaisho T, Akira S. Toll-like receptor function and signaling. *J Allergy Clin Immunol* 2006;117: 979-87
239. Cario E. Bacterial interactions with cells of the intestinal mucosa: Toll-like receptors and NOD2. *Gut* 2005;54: 1182-93.

240. Kanzler H, Barrat FJ, Hessel EM, Coffman RL. Therapeutic targeting of innate immunity with Toll-like receptor agonists and antagonists. *Nat Med* 2007;13: 552-9.
241. Wen L, Ley RE, Volchkov PY, Stranges PB, Avanesyan L, Stonebraker AC, Hu C, Wong FS, Szot GL, Bluestone JA, Gordon JI, Chervonsky AV. Innate immunity and intestinal microbiota in the development of Type 1 diabetes. *Nature* 2008; 455:1109-13.
242. Du T, Zhou ZG, You S, Lin J, Yang L, Zhou WD, Huang G, Chao C. Regulation by 1, 25-dihydroxy-vitamin D3 on altered TLRs expression and response to ligands of monocyte from autoimmune diabetes. *Clin Chim Acta*. 2009 Apr;402(1-2):133-8. doi: 10.1016/j.cca.2008.12.038. Epub 2009 Jan 11.
243. Rock FL, Hardiman G, Timans JC, Kastelein RA, Bazan JF. A family of human receptors structurally related to Drosophila Toll. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 588- 93.
244. Chiu, YC., Lin, CY., Chen, CP., Huang, KC., Tong, KM., Tzeng, CY., Lee, TS., Hsu, HC., Tang, C.-H. Peptidoglycan enhances IL-6 production in human synovial fibroblasts via TLR2 receptor, focal adhesion kinase, Akt, and AP-1-dependent pathway. *The Journal of Immunology*, 2009, 183, 2785-2792. <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.0802826>
245. Ozinsky A, Underhill DM, Fontenot JD, Hajjar AM, Smith KD, Wilson CB, Schroeder L, Aderem A. The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between Toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 13766-71.
246. Romagne F. Current and future drugs targeting one class of innate immunity receptors: the Toll-like receptors. *Drug Discov Today* 2007;12: 80-7.
247. Janeway Jr CA., Medzhitov R. Innate immune recognition, *Annu. Rev. Immunol* 2002;20: 197–216.
248. Mathis D., Benoist C. The influence of the microbiota on type-1 diabetes, on the threshold of a leap forward in our understanding. *Immunological review*. 2012: 245, 239-249.
249. American Diabetes Association. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes. *Diabetes Care* 2015, 38(Supplement 1): S8-S16.

250. Soyucen E: Tip 1 Diyabetes mellitus olan çocuklarda otoimmün tiroidit ve gluten duyarlı enteropati birlikteliği (tez). Trakya Üniversitesi, Trakya Tıp Fakültesi, 2001.
251. Saka HN. Diabetes mellitus. In: Günöz H, Öcal G, Yordam N (eds), *Pediatric Endokrinoloji* (1st ed) *Pediatric Endokrinoloji ve Oksoloji Derneği Yayınları*, Ankara; 2003: s. 415-457.
252. Abacı A, Böber E, Büyükgebiz A. Tip 1 diabet, *Güncel Pediatri* 2007; 5: 1-10.
253. Prazny M, Skrha J, Limanova Z, Vanickova Z, Higertova J, Prazna J, Jaresova M, Strize Đ. Screening for Associated Autoimmunity in Type 1 DM With Respect to Diabetes Control. *Physiol. Res.* 2005; 54: 41–48.
254. Kaizer EC, Glaser CL, Chaussabel D, Banchereau J, Pascual V, White PC. Gene expression in peripheral blood mononuclear cells from children with diabetes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007 Sep;92(9):3705-11. Epub 2007 Jun 26.
255. Dunger DB, Sperling MA, Acerini CL, Bohn DJ, Daneman D, Danne TPA, Glaser NS, Hanas R, Hintz RL, Levitsky LL, Savage MO, Tasker RC. Wolfsdorf JI ESPE / LWPES consensus statement on diabetic ketoacidosis in children and adolescents. *Arch Dis Child.* 2004; 89: 188 194.
256. Alemzadeh R, Wyatt D.T. Diabetes Mellitus in children. In: Behrman RF, Kliegman RM, Jenson HB (eds), *Nelson Textbook of Pediatrics* (17 th ed) W.B. Saunders Company, Philadelphia; 2000: pp. 1947-1972.
257. Bodansky HJ, Staines A, Stephenson C, Haigh D, Cartwright R: Evidence for an environmental effect in the aetiology of insülin-dependent diabetes in a transmigratory population. *BMJ* 1992; 304: 1020-1022.
258. Zucman SC, Garchon HJ, Timsit J, Assan R, Boitard C, Saiah ID et all: Age-dependent HLA genetic heterogeneity of Type 1 insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* 1992; 90: 2242-2250
259. Baisch JM, Weeks T, Gilles R, Hoover M, Stastny P, Capra JD: Analysis of HLA-DQ Genotypes and susceptibility in insulin-dependent diyabetes mellitus. *N Eng J Med* 1990; 322: 1836-1841
260. Hanas, R., Donaghue, K.C., Klingensmith, G., and Swift, P.G. ISPAD clinical practice consensus guidelines 2009 compendium. Introduction. *Pediatric diabetes.* 2009; 10(12), 1-2.

261. Williams RM, Amin R, Saukkonen T, Dunger D. Recent advances in diabetes mellitus. *Current Pediatrics* 2003; 13: 128-133.
262. Devendra D, Liu E, Eisenbarth GS. Type 1 diabetes: recent developments. *British J Med* 2004; 328: 750-4.
263. Goodnow CC, Sprent J, Fazekas de St Groth B, Vinuesa CG. Cellular and genetic mechanisms of self tolerance and autoimmunity. *Nature* 2005; 435:590-7.
264. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O: Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 2006; 124:783–801
265. Mollen KP, Anand RJ, Tsung A, et al: Emerging paradigm: Toll-like receptor 4-sentinel for the detection of tissue damage. *Shock* 2006; 26: 430–437.
266. Schultz M, Tonkonogy SL, Sellon RK, Veltkamp C, Godfrey VL, Kwon J, Grenther WB, Balish E, Horak I, Sartor RB. IL-2-deficient mice raised under germfree conditions develop delayed mild focal intestinal inflammation. *Am J Physiol* 1999; 276: G1461-72.
267. Mazmanian SK, Round JL, Kasper DL. A microbial symbiosis factor prevents intestinal inflammatory disease. *Nature* 2008; 453:620-5.
268. Wu HJ, Ivanov II, Darce J, Hattori K, Shima T, Umesaki Y, Littman DR, Benoist C, Mathis D. Gut-residing segmented filamentous bacteria drive autoimmune arthritis via T helper 17 cells. *Immunity* 2010; 32:815-27.
269. Abdollahi-Roodsaz S, Joosten LA, Koenders MI, Devesa I, Roelofs MF, Radstake TR, Heuvelmans-Jacobs M, Akira S, Nicklin MJ, Riberio-Dias F, van den Berg WB. Stimulation of TLR2 and TLR4 differentially skews the balance of T cells in a mouse model of arthritis. *J Clin Invest* 2008; 118:205-16.
270. Rashid T, Ebringer A. Rheumatoid arthritis is linked to *Proteus*—the evidence. *Clinical Rheumatology* 2007; 26 (7) 1036–1043.
271. Alam C, Bittoun E, Bhagwat D, Valkonen S, Saari A, Jaakkola U, Eerola E, Huovinen P, Hanninen A. Effects of a germ-free environment on gut immune regulation and diabetes progression in non-obese diabetic (NOD) mice. *Diabetologia* 2011; 54:1398-406.
272. Lavasani S, Dzhambazov B, Nouri M, Fåk F, Buske S, Molin G, Thorlacius H, Alenfall J, Jeppsson B, Weström B. A novel probiotic mixture exerts atherapeutic effect on experimental autoimmune encephalomyelitis mediated by IL-10 producing regulatory T cells. *PLoS One* 2010; 5:e9009.

273. Rashid T, Ebringer A, Ankylosing spondylitis is linked to *Klebsiella*—the evidence. *Clinical Rheumatology*. 2007; 26 (6) 858–864.
274. Maldonado MA, Kakkanaiah V, MacDonald GC, Chen F, Reap EA, Balish E, Farkas WR, Jennette JC, Madaio MP, Kotzin BL, Cohen PL, Emsberg RA. The role of environmental antigens in the spontaneous development of autoimmunity in MRL-lpr mice. *J Immunol* 1999; 162:6322-30.
275. Fasano A, Shea-Donohue T. Mechanisms of disease: the role of intestinal barrier function in the pathogenesis of gastrointestinal autoimmune diseases. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2005; 2:416–422.
276. Santoni M, Andrikou K, Sotte V, Bittoni A, Lanese A, Pellei C, Piva F, Conti A, Nabissi M, Santoni G, Cascinu S. Toll like receptors and pancreatic diseases: From a pathogenetic mechanism to a therapeutic target. *Cancer Treat Rev*. 2015 Jul;41(7):569-76. doi: 10.1016/j.ctrv.2015.04.004. Epub 2015 Apr 11.
277. Lee M-S. Treatment of Autoimmune Diabetes by Inhibiting the Initial Event. *Immune Network*. 2013;13(5):194-198. doi:10.4110/in.2013.13.5.194.
278. Gülden E, Wen L. Toll-Like Receptor Activation in Immunity vs. Tolerance in Autoimmune Diabetes. *Frontiers in Immunology*. 2014;5:119. doi:10.3389/fimmu.2014.00119.
279. Kim DH, Lee JC, Kim S, Oh SH, Lee MK, Kim KW, Lee MS. Inhibition of autoimmune diabetes by TLR2 tolerance. *J Immunol*. 2011 Nov 15;187(10):5211-20. doi: 10.4049/jimmunol.1001388. Epub 2011 Oct 12.
280. Devaraj S, Tobias P, Jialal I. Knockout of toll-like receptor-4 attenuates the pro-inflammatory state of diabetes. *Cytokine*. 2011 Sep;55(3):441-5. doi: 10.1016/j.cyto.2011.03.023. Epub 2011 Apr 16.
281. Filippi CM, Ehrhardt K, Estes EA, Larsson P, Oldham JE, von Herrath MG. TLR2 signaling improves immunoregulation to prevent type 1 diabetes. *European journal of immunology*. 2011;41(5):1399-1409. doi:10.1002/eji.200939841.
282. Kim HS, Han MS, Chung KW, Kim S, Kim E, Kim MJ, Jang E, Lee HA, Youn J, Akira S, Lee MS. Toll-like receptor 2 senses beta-cell death and contributes to the initiation of autoimmune diabetes. *Immunity*. 2007 Aug;27(2):321-33. Epub 2007 Aug 16.

283. Karumuthil-Melethil S, Perez N, Li R, Vasu C. Induction of Innate Immune Response through Toll-like Receptor 2 and Dectin 1 prevents type 1 diabetes. *Journal of immunology* (Baltimore, Md : 1950). 2008;181(12):8323-8334.
284. Al Shamsi M, Shahin A, Iwakura Y, Lukic ML, Mensah-Brown EP. Pam3CSK(4) enhanced beta cell loss and diabetogenesis: the roles of IFN-gamma and IL-17. *Clin Immunol.* 2013 Oct;149(1):86-96. doi: 10.1016/j.clim.2013.06.001. Epub 2013 Jun 13.
285. Aumeunier A, Grela F, Ramadan A, et al. Systemic Toll-Like Receptor Stimulation Suppresses Experimental Allergic Asthma and Autoimmune Diabetes in NOD Mice. Bozza PT, ed. *PLoS ONE.* 2010;5(7):e11484. doi:10.1371/journal.pone.0011484.
286. Gülden E, Ihira M, Ohashi A, et al. Toll-Like Receptor 4 Deficiency Accelerates the Development of Insulin-Deficient Diabetes in Non-Obese Diabetic Mice. Lynn FC, ed. *PLoS ONE.* 2013;8(9):e75385. doi:10.1371/journal.pone.0075385.
287. Li M, Song L, Gao X, Chang W, Qin X. Toll-like receptor 4 on islet β cells senses expression changes in high-mobility group box 1 and contributes to the initiation of type 1 diabetes. *Experimental & Molecular Medicine.* 2012;44(4):260-267. doi:10.3858/emm.2012.44.4.021.
288. 276. Gianani R., Eisenbarth GS. The stages of type 1A diabetes:. *Immunol. Rev* 2005; 204: 232–249.
289. Harrison LC, Honeyman MC, Morahan G, Wentworth JM, Elkassaby S, Colman PG Furlanas S. Type 1 diabetes: lessons for other autoimmune diseases? *J Autoimmun* 2008; 31 (3): 306–310.
290. Musso G., Gambino R., Cassader M. Interactions Between Gut Microbiota and Host Metabolism Predisposing to Obesity and Diabetes. *Annu Rev Med.* 2011; 62: 361-380.
291. TEDDY Study Group. The Environmental Determinants of Diabetes in the Young (TEDDY) Study. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*2008;1150:1–13.
292. Calcinaro F, Dionisi S, Marinaro M, Candeloro P, Bonato V, Marzotti S, Corneli LB, Ferretti E, Gulino A, Grasso F, De Simone C, Di Mario U, Falorni A, Boirivant M, Dotta F. Oral probiotic administration induces interleukin-10 production and prevents spontaneous autoimmune diabetes in the non-obese diabetic mouse. *Diabetologia* 2005; 48: 1565–1575.

293. Hsieh F-C, Lee C-L, Chai C-Y, Chen W-T, Lu Y-C, Wu C-S. Oral administration of *Lactobacillus reuteri* GMNL-263 improves insulin resistance and ameliorates hepatic steatosis in high fructose-fed rats. *Nutrition & Metabolism*. 2013;10:35. doi:10.1186/1743-7075-10-35.
294. Atkinson MA, Chervonsky A. Does the gut microbiota have a role in type 1 diabetes? Early evidence from humans and animal models of the disease. *Diabetologia*. 2012 Nov;55(11):2868-77. doi: 10.1007/s00125-012-2672-4. Epub 2012 Aug 9.
295. Roesch LF, Lorca GL, Casella G, Giongo A, Naranjo A, Pionzio AM, Li N, Mai V, Wasserfall CH, Schatz D, Atkinson MA, Neu J, Triplett EW. Culture-independent identification of gut bacteria correlated with the onset of diabetes in a rat model. *ISME J* 2009; 3: 536–548.
296. Brown CT, Davis-Richardson AG, Giongo A, Gano KA, Crabb DB, Mukherjee N, Casella G, Drew JC, Ilonen J, Knip M, Hyöty H, Veijola R, Simell T, Simell O, Neu J, Wasserfall CH, Schatz D, Atkinson MA, Triplett EW: Gut microbiome metagenomics analysis suggests a functional model for the development of autoimmunity for type 1 diabetes. *PLoS One* 2011, 6:e25792.
297. Brugman S, Klatter FA, Visser JT, Wildeboer-Veloo AC, Harmsen HJ, Rozing J, Bos NA. Antibiotic treatment partially protects against type 1 diabetes in the Bio-Breeding diabetes-prone rat. Is the gut flora involved in the development of type 1 diabetes? *Diabetologia*. 2006 Sep;49(9):2105-8. Epub 2006 Jul 1.
298. Valladares R, Sankar D, Li N, Williams E, Mahmou ASA, Lai K-K, Abdelgeliel AS, Gonzales CF, Wasserfall CH, Larkin III J, Schatz D, Atkinson MA, Triplett EW, Neu J, Lorca GL. *Lactobacillus johnsonii* N6.2 mitigates the development of type 1 diabetes in BB-DP rats. *PLoS One* 2010; 5: e10507
299. Tortora GJ, Funke BR, Case LC. Microbiology an introduction. İçinde Hentges DJ, editor. *Firmicutes p.314. Bacteroidetes p.322*. Pearson Education 11th ed. 2013.
300. Holdeman, L.V., Good, I.J. and Moore, W.E. Human fecal flora: variation in bacterial composition within individuals and a possible effect of emotional stress. *Appl. Environ. Microbiol.* 1976(31): 359-375.

301. Rabizedeh S, Rhee KJ, Wu S, Huso D, Gan CM, Golub JE, Wu X, Zhang M, Sears CL. Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*: a potential instigator of colitis. *Inflamm Bowel Dis*. 2007; 13(12): 1475-1483.
302. Fang H, Edlund C, Nord CE, Hedberg M. Selection of Cefoxitin-resistant *Bacteroides thetaiotaomicron* mutants and mechanisms involved in beta-lactam resistance. *Clin Infect Dis*, 2002; 35: 47-53.
303. Wexler HM. Bacteroides: the good, the bad, and the nitty-gritty. *Clin Microbiol Rev*. 2007 Oct;20(4):593-621.
304. Snyderman DR, Jacobus NV, McDermott LA, Ruthazer R, Golan Y, Goldstein EJC, et al. National survey on the susceptibility of *Bacteroides fragilis* group: report and analysis of trends in United States from 1997 to 2004. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007;51:1649-55, doi:10.1128/AAC.01435-06.
305. Hecht DW. Prevalence of antibiotic resistance in anaerobic bacteria: worrisome developments. *Clin Infect Dis* 2004;39:92-7.
306. Sakamoto M, Benno Y. Reclassification of *Bacteroides distasonis*, *Bacteroides goldsteinii* and *Bacteroides merdae* as *Parabacteroides distasonis* gen. nov., comb. nov., *Parabacteroides goldsteinii* comb. nov. and *Parabacteroides merdae* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2006 Jul;56(Pt 7):1599-605. doi: 10.1099/ijs.0.64192-0
307. Surana NK, Kasper DL. The yin yang of bacterial polysaccharides: Lessons learned from *B. fragilis* PSA. *Immunological reviews*. 2012;245(1):13-26. doi:10.1111/j.1600-065X.2011.01075.x.
308. Mejía-León ME, Petrosino JF, Ajami NJ, Domínguez-Bello MG, de la Barca AMC. Fecal microbiota imbalance in Mexican children with type 1 diabetes. *Scientific Reports*. 2014;4:3814. doi:10.1038/srep03814.
309. Johnson JL. Taxonomy of *Bacteroides* Desoxyribonucleic acid homologies among *Bacteroides fragilis* and other saccharolytic *Bacteroides* species. *Journal of systematic Bacteriology* 1978; 28: 245-256
310. Kandler O, Weiss N. Regular nonsporulating Gram positive Rods (ed. Sneath, PHA; Mair Ns, Sharpe ME, Holt JG) *Bergey's Manual of Systematic bacteriology* Volume 2. Williams and Williams. Baltimore. 1208 – 1260. 1986.
311. Axelsson L. Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. in: Salminen, S. von Wright, A. and Ouwehand A. (Eds.), *Lactic Acid Bacteria: Microbiological*

- and Functional Aspects. 3rd rev. and exp. ed. Marcel Dekker, Inc., New York, pp.1-66. 2004.
312. Teuber M., Meile L., Schwarz F. Acquired Antibiotic Resistance in Lactic Acid Bacteria From Food. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 1999; 76, 115-137.
 313. Walter J. Ecological Role of Lactobacilli in the Gastrointestinal Tract: Implications for Fundamental and Biomedical Research. *Applied and Environmental Microbiology*. 2008;74(16):4985-4996. doi:10.1128/AEM.00753-08.
 314. Tamime AY., Marshall VME. Microbiology and technology of fermented milks. Microbiology and Biochemistry of Cheese and Fermented Milk. B. A. Law, Springer, US: 57-152. 1997.
 315. Rosaria M., Modesto M., Biavati B. Antibiotic Resistance of Lactic Acid Bacteria and *Bifidobacterium* Spp. Isolated From Dairy And Pharmaceutical Products. *International Journal Of Microbiology* 2007; 115, 35-42.
 316. Imani Fooladi AA, Yazdi MH, Pourmand MR, et al. Th1 Cytokine Production Induced by Lactobacillus acidophilus in BALB/c Mice Bearing Transplanted Breast Tumor. *Jundishapur Journal of Microbiology*. 2015;8(4):e17354. doi:10.5812/jjm.8(4)2015.17354.
 317. Kirjavainen PV, El-Nezami HS, Salminen SJ, Ahokas JT, Wright PF. The effect of orally administered viable probiotic and dairy lactobacilli on mouse lymphocyte proliferation. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 1999 Nov;26(2):131-5. doi: 10.1111/j.1574-695X.1999.tb01380.x.
 318. Liévin-Le Moal V, Servin AL. Anti-Infective Activities of Lactobacillus Strains in the Human Intestinal Microbiota: from Probiotics to Gastrointestinal Anti-Infectious Biotherapeutic Agents. *Clinical Microbiology Reviews*. 2014;27(2):167-199. doi:10.1128/CMR.00080-13.
 319. Wells JM. Immunomodulatory mechanisms of lactobacilli. *Microbial Cell Factories*. 2011;10(Suppl 1):S17. doi:10.1186/1475-2859-10-S1-S17.
 320. Bâati L, Fabre-Gea C, Auriol D, Blanc PJ. Study of the cryotolerance of Lactobacillus acidophilus: effect of culture and freezing conditions on the viability and cellular protein levels. Study of the cryotolerance of Lactobacillus acidophilus: effect of culture and freezing conditions on the viability and cellular

- protein levels. *Int J Food Microbiol.* 2000 Sep 10;59(3):241-7. doi:10.1016/S0168-1605(00)00361-5
321. Yadav H, Jain S, Sinha PR. Antidiabetic effect of probiotic dahi containing *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* in high fructose fed rats. *Nutrition.* 2007;23:62–68.
322. McFarland LV. Evidence-based review of probiotics for antibiotic-associated diarrhea and *Clostridium difficile* infections. *Anaerobe.* 2009 Dec;15(6):274-80. doi: 10.1016/j.anaerobe.2009.09.002. Epub 2009 Oct 13.
323. Moroti C, Souza Magri LF, de Rezende Costa M, Cavallini DC, Sivieri K. Effect of the consumption of a new symbiotic shake on glycemia and cholesterol levels in elderly people with type 2 diabetes mellitus. *Lipids in Health and Disease.* 2012;11:29. doi:10.1186/1476-511X-11-29.
324. Andreasen AS, Larsen N, Pedersen-Skovsgaard T, Berg RM, Møller K, Svendsen KD, Jakobsen M, Pedersen BK. Effects of *Lactobacillus acidophilus* NCFM on insulin sensitivity and the systemic inflammatory response in human subjects. *Br J Nutr.* 2010 Dec;104(12):1831-8. doi: 10.1017/S0007114510002874. Epub 2010 Sep 6.
325. Gomes AC, Bueno AA, de Souza RGM, Mota JF. Gut microbiota, probiotics and diabetes. *Nutrition Journal.* 2014;13:60. doi:10.1186/1475-2891-13-60.
326. Naito E, Yoshida Y, Makino K, Kounoshi Y, Kunihiro S, Takahashi R, Matsuzaki T, Miyazaki K, Ishikawa F. Beneficial effect of oral administration of *Lactobacillus casei* strain Shirota on insulin resistance in diet-induced obesity mice. *J Appl Microbiol.* 2011 Mar;110(3):650-7. doi: 10.1111/j.1365-2672.2010.04922.x. Epub 2011 Feb 1.
327. Human Microbiome Project (HMP). Erişim. 14.09.2014 <http://nihroadmap.nih.gov/hmp/>, <http://hmpdacc.org/>
328. Lederberg J, McCray AT. ‘Ome Sweet’ Omics-a genealogical treasury of words. *Scientist.* 2001;15:8.
329. Bozok T, Şimşek T, Kömür S, Ulu A. Normal Mikrobiyal Floranın İnsan Sağlığı üzerine Etkisi ve İnsan Mikrobiyom Projesi. *Archives Medical Review Journal* 2014; 23 (3) :420-426.
330. Karaçay B. İçimizdeki Dünya: Mikrobiyom. *Bilim ve Teknik.* 2010; (9) :36 – 43.

331. Giongo A, Crabb DB, Davis-Richardson AG, Chauillac D, Mobberley JM, Gano KA, Mukherjee N, Casella G, Roesch LF, Walts B, Riva A, King G, Triplett EW. PANGEA: pipeline for analysis of next generation amplicons. *ISME J*. 2010 Jul;4(7):852-61.
332. Sutcliffe IC, Trujillo ME, Goodfellow M. A call to arms for systematists: revitalising the purpose and practises underpinning the description of novel microbial taxa. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2012 Jan;101(1):13-20. doi: 10.1007/s10482-011-9664-0. Epub 2011 Oct 30.
333. Stark PL, Lee A. The bacterial colonization of the large bowel of pre-term low birth weight neonates. *J Hyg (Lond)*. 1982 Aug;89(1):59-67.
334. Westra-Meijer CM, Degener JE, Dzoljic-Danilovic G, Michel MF, Mettau JW. Quantitative study of the aerobic and anaerobic faecal flora in neonatal necrotising enterocolitis. *Arch Dis Child*. 1983 Jul;58(7):523-8.
335. Chassard C, Bernalier-Donadille A. H₂ and acetate transfers during xylan fermentation between a butyrate-producing xylanolytic species and hydrogenotrophic microorganisms from the human gut. *FEMS Microbiol Lett*. 2006 Jan;254(1):116-22.
336. Seng P, Drancourt M, Gouriet F, La Scola B, Fournier PE, Rolain JM, Raoult D. Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Infect Dis*. 2009 Aug 15;49(4):543-51. doi: 10.1086/600885.
337. Dubourg G, Lagier JC, Armougom F, Robert C, Hamad I, Brouqui P, Raoult D. The gut microbiota of a patient with resistant tuberculosis is more comprehensively studied by culturomics than by metagenomics. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2013 May;32(5):637-45. doi: 10.1007/s10096-012-1787-3. Epub 2013 Jan 6.
338. Petrosino JF, Highlander S, Luna RA, Gibbs RA, Versalovic J. Metagenomic pyrosequencing and microbial identification. *Clin Chem*. 2009 May;55(5):856-66. doi: 10.1373/clinchem.2008.107565. Epub 2009 Mar 5.
339. Nechvatal JM, Ram JL, Basson MD, Namprachan P, Niec SR, Badsha KZ, Matherly LH, Majumdar AP, Kato I. Fecal collection, ambient preservation, and DNA extraction for PCR amplification of bacterial and human markers from human feces. *J Microbiol Methods*. 2008 Feb;72(2):124-32. Epub 2007 Nov 21.

340. Hernandez GE, Mondala TS, Head SR. Assessing a novel room-temperature RNA storage medium for compatibility in microarray gene expression analysis. *Biotechniques*. 2009 Aug;47(2):667-8, 670. doi: 10.2144/000113209.
341. Prosser JI, Bohannon BJ, Curtis TP, Ellis RJ, Firestone MK, Freckleton RP, Green JL, Green LE, Killham K, Lennon JJ, Osborn AM, Solan M, van der Gast CJ, Young JP. The role of ecological theory in microbial ecology. *Nat Rev Microbiol*. 2007 May;5(5):384-92. doi:10.1038/nrmicro1643
342. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1986;51 Pt 1:263-73.
343. Thompson JR, Marcelino LA, Polz MF. Heteroduplexes in mixed-template amplifications: formation, consequence and elimination by “reconditioning PCR”. *Nucleic Acids Res*, 2002, 30(9), pp.2083–8.
344. Smith C, Osborn AM. Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. *FEMS Microbiol Ecol*, 2009, 67(1), pp.6–20.
345. Valasek MA, Repa JJ. The power of real-time PCR. *Adv Physiol Educ*, 2005, 29(3), pp.151–159.
346. Gibson N. The use of real-time PCR methods in DNA sequence variation analysis. *Clin Chim Acta*. 2006 Jan;363(1-2):32-47. Epub 2005 Sep 22.
347. Temmerman R, Masco L, Vanhoutte T, Huys G, Swings J. Development and validation of a nested-PCR-denaturing gradient gel electrophoresis method for taxonomic characterization of bifidobacterial communities. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69(11), pp.6380–6385.
348. Muyzer G., de Waal EC, Uitterlinden AG. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol*, 1993, 59(3), pp.695–700.
349. Muyzer G, Smalla K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek*, 1998, 73(1), pp.127–41.
350. Siqueira JF, Fouad AF, Rôças IN. Pyrosequencing as a tool for better understanding of human microbiomes. *J Oral Microbiol*, 2012, 4, pp.1–15.

351. Üstek D, Abacı N, Sırma S, Çakarıs A. Yeni Nesil DNA Dizileme (New Generation DNA Sequencing). *Deneyisel Tıp Araştırma Enstitüsü Dergisi*, [S.l.], vol.1, n.1, p.11-18, oct. 2011. Erişim Adresi: <<http://www.journals.istanbul.edu.tr/iudtaed/article/view/1023008342>>. Erişim Tarihi: 01 Ekim. 2015
352. Ronaghi M. Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing. *Genome Res.* 2001 Jan;11(1):3-11.
353. Schloss PD, Gevers D. Westcott SL. Reducing the Effects of PCR Amplification and Sequencing Artifacts on 16S rRNA-Based Studies. *PLoS One*, 2011, 6(12), p.e27310.
354. Xavier Pi Sunyer F, Obesity: criteria and classification. *Proceedings of the Nutrition Society*, 2000, 59, 505–509
355. Adapted from WHO, 1995, WHO, 2000 and WHO 2004. http://apps.who.int/bmi/index.jsp?introPage=intro_3.html [web page on the internet] Erişim. 30.08.2015.
356. Summanen P, Baron E.J, Citron D.M, Strong C.A. Wexler H.M, Finegold S.M: Wadsworth Anaerobic Bacteriology Manual, 5th ed Star Publ.Co. Belmont 1993.
357. Jousimies-Somer H, Summanen P, Citron DM, Baron EJ, Wexler, HM, Finegold SM. Wadsworth-KTL Anaerobic bacteriology. Manual, 6th ed, California: Star Publishing, 43-54. 2002.
358. Unat EK. Tıp Bakteriyolojisi Ve Virolojisi. 2nd. ed. İstanbul:Dergah Yayınları; 1986.
359. Mengelle C, Mansuy JM, Prere MF, Grouteau E, Claudet I, Kamar N, Huynh A, Plat G, Benard M, Marty N, Valentin A, Berry A, Izopet J. Simultaneous detection of gastrointestinal pathogens with a multiplex Luminex-based molecular assay in stool samples from diarrhoeic patients. *Clin Microbiol Infect.* 2013 Oct;19(10):E458-65. doi: 10.1111/1469-0691.12255. Epub 2013 May 28.
360. Kalmár A, Wichmann B, Galamb O, et al. Gene-expression analysis of a colorectal cancer-specific discriminatory transcript set on formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) tissue samples. *Diagnostic Pathology.* 2015;10:126. doi:10.1186/s13000-015-0363-4.
361. Shaw JL, Monis P, Weyrich LS, Sawade E, Drikas M, Cooper AJ. Using Amplicon Sequencing To Characterize and Monitor Bacterial Diversity in

- Drinking Water Distribution Systems. *Appl Environ Microbiol.* 2015 Sep 15;81(18):6463-73. doi: 10.1128/AEM.01297-15. Epub 2015 Jul 10.
362. Sánchez-Muñoz F, Fonseca-Camarillo G, Villeda-Ramírez MA, et al. Transcript levels of Toll-Like receptors 5, 8 and 9 correlate with inflammatory activity in Ulcerative Colitis. *BMC Gastroenterology.* 2011;11:138. doi:10.1186/1471-230X-11-138.
363. Universal Probe library assay design center. <https://lifescience.roche.com/webapp/wcs/stores/servlet/CategoryDisplay?tab=Assay+Design+Center&identifier=Universal+Probe+Library&langId=-1> [web page on the internet] Erişim. 14.10.2015
364. Dick LK, Field KG. Rapid estimation of numbers of fecal Bacteroidetes by use of a quantitative PCR assay for 16S rRNA genes. *Appl Environ Microbiol* 2004; 70: 5695-7.
365. Papaparaskevas J, Mela V, Houhoula DP, Pantazatou A, Petrikkos LG, Tsakris A. Comparative Evaluation of Conventional and Real-Time PCR Assays for Detecting *Bacteroides fragilis* in Clinical Samples. *J Clin Microbiol.* 2013; 51 (5): 1593–1595.
366. Haakensen M, Dobson CM, Deneer H, Ziola B. Real-time PCR detection of bacteria belonging to the Firmicutes Phylum. *Int J Food Microbiol.* 2008 Jul 31;125(3):236-41. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2008.04.002. Epub 2008 Apr 12..
367. Herbel SR, Von Nickisch-Rosenegk M, Kuhn M, Murugaiyan J, Wieler LH, Guenther S. Specific TaqMan Probes for the Identification and Quantification of Lactobacilli in Pharmaceuticals. *J Prob Health* 2014, 2:1
368. Monique H, Knol J. Quantitative Real-Time PCR Analysis of Fecal Lactobacillus Species in Infants Receiving a Prebiotic Infant Formula. *App. Env. Mic.* 2006; 4: 2359–2365.
369. CDC. Distribution of Age at Diagnosis of Diabetes Among Adult Incident Cases Aged 18–79 Years, United States, 2011. <http://www.cdc.gov/diabetes/statistics/age/fig1.htm> [web page on the internet] Erişim. 26.10.2015.
370. Finegold SM. Anaerobic bacteria: general concepts. İn: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds). Principles and Practice of Infectious diseases. 5th ed. Pennsylvania: Churchill Livingstone, 2519-36. 2000.

371. Matsuki T, Watanabe K, Fujimoto J, Takada T, Tanaka R. Use of 16S rRNA gene Targeted group specific primers for Real-Time PCR analysis of Predominant bacteria in human Feces. *App Env Mic.* 2004 70 (12); 7220–7228.
372. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 22-DDCT Method. 2001: *Methods* 25, 402–408.
373. Kang TH, Park Y, Bader JS, Friedmann T. The Housekeeping Gene Hypoxanthine Guanine Phosphoribosyltransferase (HPRT) Regulates Multiple Developmental and Metabolic Pathways of Murine Embryonic Stem Cell Neuronal Differentiation. Cooney AJ, ed. *PLoS ONE*. 2013;8(10):e74967. doi:10.1371/journal.pone.0074967.
374. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*. 2001;29(9):e45.
375. Boyacıoğlu H, Güneri P. Sağlık Araştırmalarında Kullanılan Temel İstatistik Yöntemler. *Hacettepe Dişhekimliği Fakültesi Dergisi* (2006), 30:(3); 33-39.
376. Er F, Peker KÖ. *Biyoistatistik. Anadolu Üniversitesi Yayın No: 1932*. 2009.
377. Altınova AE, Yetkin I, Akbay E, Bukan N, Arslan M. Serum IL-18 levels in patients with type 1 diabetes: Relations to metabolic control and microvascular complications. *Cytokine* 42 (2008) 217–221.
378. Zisser H., Renard E., Kovatchev B., Cobelli C., Avogaro A., Nimri R., Beck R. W. Multicenter Closed-Loop Insulin Delivery Study Points to Challenges for Keeping Blood Glucose in a Safe Range by a Control Algorithm in Adults and Adolescents with Type 1 Diabetes from Various Sites. *Diabetes Technology & Therapeutics*, 16(10), 613–622. 2014. <http://doi.org/10.1089/dia.2014.0066>
379. Mariat D, Firmesse O, Levenez F, Guimarães VD, Sokol H, Doré J, Corthier G, Furet JP. The Firmicutes/Bacteroidetes ratio of the human microbiota changes with age. *BMC Microbiology* 2009, 9:123. doi:10.1186/1471-2180-9-123.
380. Biagi E, Candela M, Fairweather-Tait S, Franceschi C, Brigidi P. Ageing of the human metaorganism: the microbial counterpart. *Age*. 2012;34(1):247-267. doi:10.1007/s11357-011-9217-5.
381. Marathe N, Shetty S, Lanjekar V, Ranade D, Shouche Y. Changes in human gut flora with age: an Indian familial study. *BMC Microbiology* 2012, 12:222. doi:10.1186/1471-2180-12-222

382. Mäkivuokko H, Tiihonen K, Tynkkynen S, Paulin L, Rautonen N. The effect of age and non-steroidal anti-inflammatory drugs on human intestinal microbiota composition. *Br J Nutr.* 2010, Jan; 103 (2): 227 - 34. doi: 10.1017/S0007114509991553. Epub 2009 Aug 25.
383. Greenhill AR, Tsuji H, Ogata K, Natsuhara K, Morita A, Soli K, Larkins JA, Tadokoro K, Odani S, Baba J, Naito Y, Tomitsuka E, Nomoto K, Siba PM, Horwood PF, Umezaki M. Characterization of the Gut Microbiota of Papua New Guineans Using Reverse Transcription Quantitative PCR. *PLoS ONE*, 2015, 10(2), e0117427. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0117427>.
384. De Cárcer DA, Cuív PÓ, Wang T, Kang S, Worthley D, Whitehall V, Gordon I, McSweeney C, Leggett B, Morrison M. Numerical ecology validates a biogeographical distribution and gender-based effect on mucosa-associated bacteria along the human colon. *The ISME journal.* 2011;5(5):801-809. doi:10.1038/ismej.2010.177.
385. Miura K, Ohnishi H. Role of gut microbiota and Toll-like receptors in nonalcoholic fatty liver disease. *World Journal of Gastroenterology: WJG.* 2014;20(23):7381-7391. doi:10.3748/wjg.v20.i23.7381.
386. Romanski KW. Migrating motor complex in biological sciences: Characterization, animal models and disturbances. *Indian J Exp Biol.* 2009 Apr;47(4):229-44.
387. Alkanani AK, Hara N, Gottlieb PA, Ir D, Robertson CE, Wagner BD, Frank DN, Zipris D. Alterations in Intestinal Microbiota Correlate with Susceptibility to Type 1 Diabetes. *Diabetes* 2015;64:3510–3520, DOI: 10.2337/db14-1847
388. Quigley EMM, Small intestinal bacterial overgrowth: what it is and what it is not. *Curr Opin Gastroenterol* 2014, 30:141–146, DOI: 10.1097/MOG.0000000000000040
389. Donaldson RM Jr. Normal bacterial populations of the intestine and their relation to intestinal function. *N Engl J Med* 1964; 270:938-945. DOI: 10.1056/NEJM196404302701806
390. Virally-Monod M, Tielmans D, Kevorkian JP, Bouhnik Y, Flourie B, Porokhov B, Ajzenberg C, Warnet A, Guillausseau PJ. Chronic diarrhoea and diabetes mellitus: prevalence of small intestinal bacterial overgrowth. *Diabetes Metab.* 1998 Dec;24(6):530-6.

391. Rana SV, Bhardwaj SB. Small intestinal bacterial overgrowth. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 2008, 43:9, 1030-1037. DOI: 10.1080/00365520801947074

HAM VERİLER

H1: çalışmamıza dahil olan hasta grubunun demografik verileri (VKI, serum açlık kan şekeri (AKŞ) ve HbA1c düzeyleri).

Hasta No	Ad Soyad	Cinsiyet	Yaş	VKI kg/m ²	AKŞ (mg/dl)	HbA1c (%)
1	BA	K	19	22,21	144,00	11,50
2	KK	K	19	20,43	80,00	6,90
3	BU	K	19	24,24	90,00	9,00
4	PAŞ	K	20	24,80	133,00	8,20
5	GT	K	20	20,20	83,00	13,50
6	SA	K	21	23,07	118,00	9,90
7	HB	K	21	24,35	152,00	6,60
8	BY	K	23	24,80	78,00	7,80
9	CK	K	23	23,14	85,00	8,50
10	EÇ	K	27	24,61	96,00	6,60
11	AB	K	28	23,95	216,00	7,00
12	YP	K	28	23,83	267,00	7,20
13	FG	K	31	24,22	153,00	8,20
14	ŞED	K	33	20,96	117,00	7,80
15	ZÖ	K	35	19,81	90,00	8,10
16	ST	K	35	24,54	115,00	10,00
17	AE	K	38	22,03	108,00	10,50

Hasta No	Ad Soyad	Cinsiyet	Yaş	VKI Kg/m ²	AKŞ (mg/dl)	HbA1c (%)
18	AT	K	39	22,72	110,00	6,10
19	ÖD	K	41	20,66	309,00	8,20
20	AT	K	43	24,30	103,00	7,00
21	AK	K	46	24,57	153,00	7,00
22	MD	K	47	24,92	250,00	7,60
23	CŞ	K	48	24,77	195,00	7,90
24	KD	K	53	24,67	85,00	7,90
25	FT	K	56	24,62	131,00	10,10
26	SS	E	19	19,26	190,00	13,20
27	İY	E	20	24,80	93,00	8,00
28	BÇ	E	21	20,76	150,00	13,50
29	HK	E	21	23,36	95,00	8,60
30	EB	E	22	24,62	71,00	11,20
31	VE	E	22	21,47	166,00	7,00
32	OA	E	22	23,72	91,00	7,90
33	SÇ	E	23	22,60	84,00	7,60
34	HÖ	E	23	22,34	274,00	9,60
35	BÖ	E	23	22,84	122,00	9,30
36	ÜŞ	E	24	22,39	87,00	8,30
37	OÖ	E	25	24,91	140,00	12,40
38	EK	E	25	20,06	78,00	6,70

Hasta No	Ad Soyad	Cinsiyet	Yaş	VKI Kg/m ²	AKŞ (mg/dl)	HbA1c (%)
39	İÖ	E	29	24,86	112,00	6,90
40	VK	E	29	23,39	71,00	7,90
41	AKR	E	31	21,80	104,00	8,50
42	ME	E	33	24,59	120,00	11,30
43	SHS	E	34	23,81	258,00	7,30
44	AŞ	E	35	22,10	120,00	9,30
45	İİ	E	39	24,93	88,00	8,80
46	BS	E	41	22,92	110,00	8,00
47	AA	E	42	24,97	108,00	7,40
48	ŞA	E	44	22,53	328,00	6,80
49	BD	E	49	21,91	110,00	11,90
50	MK	E	53	24,84	108,00	7,20
51	MAY	E	58	24,52	140,00	7,00
52	MY	E	61	24,80	101,00	11,50
53	CT	E	61	24,77	90,00	8,20

H2: çalışmamıza dahil olan kontrol grubunun demografik verileri (VKI, serum açlık kan şekeri (AKŞ) ve HbA1c düzeyleri).

Hasta No	Ad Soyad	Cinsiyet	Yaş	VKI kg/m ²	AKŞ (mg/dl)	HbA1c (%)
1	AP	K	19	23,61	94,00	3,70

Hasta No	Ad Soyad	Cinsiyet	Yaş	VKI kg/m²	AKŞ (mg/dl)	HbA1c (%)
2	DT	K	19	17,91	92,00	2,60
3	FK	K	19	19,02	86,00	3,90
4	SK	K	20	18,29	89,00	3,70
5	EÖ	K	20	16,96	95,00	5,70
6	EB	K	21	17,44	94,00	4,80
7	SY	K	21	17,24	104,00	5,60
8	FT	K	23	17,93	94,00	3,90
9	İMŞ	K	23	19,29	78,00	2,80
10	Nİ	K	27	21,07	87,00	4,60
11	TÇ	K	28	21,37	85,00	5,30
12	SD	K	28	19,82	91,00	3,50
13	OS	K	31	19,71	88,00	3,80
14	MT	K	33	19,98	85,00	4,90
15	K	K	35	19,05	91,00	5,60
16	EA	K	35	21,09	93,00	3,90
17	MT	K	38	19,27	88,00	3,50
18	FK	K	39	19,15	94,00	4,60
19	SŞ	K	41	18,83	86,00	4,50
20	MŞ	K	43	21,26	91,00	2,40
21	GB	K	46	22,28	92,00	3,90
22	İA	K	47	23,94	88,00	4,10

Hasta No	Ad Soyad	Cinsiyet	Yaş	VKI Kg/m ²	AKŞ (mg/dl)	HbA1c (%)
23	GU	K	48	21,08	83,00	4,90
24	NT	K	53	21,37	92,00	5,10
25	AY	K	56	21,91	86,00	3,90
26	BD	E	19	18,64	88,00	5,50
27	OS	E	20	21,97	88,00	5,00
28	MM	E	21	19,23	86,00	3,30
29	SS	E	21	21,27	92,00	4,20
30	OD	E	22	19,57	88,00	1,90
31	AB	E	22	20,08	90,00	2,40
32	FK	E	22	18,62	102,00	4,10
33	HIÜ	E	23	21,47	89,00	2,90
34	DŞ	E	23	22,28	105,00	5,70
35	SK	E	23	19,80	88,00	2,80
36	HİK	E	24	18,83	82,00	3,60
37	EE	E	25	18,31	88,00	3,10
38	ÇY	E	25	19,25	92,00	5,30
39	EH	E	29	19,32	94,00	4,40
40	AA	E	29	19,92	91,00	2,40
41	FÖ	E	31	19,16	85,00	3,70
42	SA	E	33	21,06	98,00	1,90
43	HA	E	34	20,31	103,00	5,90

Hasta No	Ad Soyad	Cinsiyet	Yaş	VKI kg/m ²	AKŞ (mg/dl)	HbA1c (%)
44	EY	E	35	20,45	102,00	3,70
45	DA	E	39	18,83	93,00	5,40
46	AK	E	41	21,05	90,00	3,80
47	İB	E	42	20,80	89,00	4,90
48	GK	E	44	20,18	92,00	4,70
49	AK	E	49	20,45	98,00	3,50
50	İB	E	53	23,46	85,00	5,80
51	MA	E	58	23,57	86,00	6,00
52	EK	E	61	22,49	95,00	5,30
53	KY	E	61	22,91	98,00	5,60

H3: çalışmamıza dahil olan erkeklerde gerçek zamanlı PZR çalışması sonucunda 1 gram dışkıda elde edilen log₁₀ *Bacteroidetes* ve *Firmicutes*, *B.fragilis*, *L.acidophilus*, *L.casei* miktarlarının yaşa göre dağılımı

Cinsiyet	Yaş	<i>Bacteroidetes</i>		<i>Firmicutes</i>		<i>B.fragilis</i>		<i>L.acidophilus</i>		<i>L.casei</i>	
		T1DM	Kontrol	T1DM	Kontrol	T1DM	Kontrol	T1DM	Kontrol	T1DM	Kontrol
E	19	11,25	10,81	8,98	9,26	8,62	7,36	4,83	4,81	4,08	4,05
E	20	10,94	10,21	9,40	10,19	8,25	7,59	4,85	4,91	4,03	4,03
E	21	11,31	10,41	9,13	9,17	8,39	7,89	4,36	4,53	4,01	4,16
E	21	11,62	10,56	9,60	10,26	8,58	7,85	4,86	4,98	4,20	4,19
E	22	11,78	10,81	9,80	9,95	8,13	7,73	4,99	4,95	3,97	4,01
E	22	11,69	11,02	9,26	9,42	8,21	7,7	5,02	4,52	4,38	4,45
E	22	11,51	10,85	9,83	10,46	8,03	8,02	4,39	4,41	4,59	4,42

Cinsiyet	Yaş	<i>Bacteroidetes</i>		<i>Firmicutes</i>		<i>B.fragilis</i>		<i>L.acidophilus</i>		<i>L.casei</i>	
		T1DM	Kontrol	T1DM	Kontrol	T1DM	Kontrol	T1DM	Kontrol	T1DM	Kontrol
E	23	11,59	10,61	9,92	10,59	8,12	8,13	4,81	4,95	4,12	4,03
E	23	11,26	10,05	9,45	10,05	8,09	8,15	4,94	4,99	4,39	4,14
E	23	11,19	10,18	9,50	9,59	8,07	8,01	4,99	5,02	4,22	4,17
E	24	11,68	10,49	9,14	9,25	8,41	7,42	4,89	4,82	4,01	4,28
E	25	11,82	10,59	10,08	10,38	8,46	7,37	5,12	5,05	4,16	4,26
E	25	11,31	10,81	8,67	8,93	8,39	7,29	5,05	5,10	4,19	4,39
E	29	11,23	10,94	10,15	10,31	8,25	7,34	5,03	4,95	4,02	4,41
E	29	11,52	11,25	8,53	9,05	8,13	7,56	4,81	4,73	4,49	4,53
E	31	11,15	11,02	9,23	10,35	8,35	7,98	4,86	4,97	4,65	4,45
E	33	10,98	10,81	8,81	10,49	8,71	7,53	5,04	5,04	4,13	4,03
E	34	11,59	10,48	8,14	9,25	8,15	7,83	5,01	5,14	4,26	4,08
E	35	11,94	10,53	8,64	9,94	8,59	8,03	4,83	4,73	4,01	4,16
E	39	11,82	10,61	9,51	9,64	8,48	8,12	4,86	4,85	4,03	4,42
E	41	11,54	10,86	9,31	10,58	8,56	7,49	4,91	4,88	3,96	4,67
E	42	11,42	10,91	8,46	9,99	8,82	7,86	5,02	4,91	4,19	4,59
E	44	11,02	10,38	8,41	9,82	8,96	7,43	4,90	4,92	4,21	4,52
E	49	11,15	10,84	9,96	10,62	8,75	7,92	4,76	4,75	4,12	4,31
E	53	11,38	11,05	9,12	9,71	8,83	7,58	4,85	4,99	4,26	4,18
E	58	11,95	11,15	9,81	10,54	8,96	8,13	5,05	5,12	4,59	4,25
E	61	11,89	10,94	9,62	10,15	8,82	8,21	5,12	5,04	4,29	4,32
E	61	11,31	10,83	10,24	10,22	9,01	8,11	5,02	4,97	4,51	4,60

H4: Erkeklerde kandan izole edilen RNA'lardan elde edilen TLR2 ve TLR4 gen ekspresyon düzeylerinin yaşa göre dağılımı

Cinsiyet	Yaş	TLR4		TLR2	
		T1DM	Kontrol	T1DM	Kontrol
E	19	1,106	1,070	1,159	1,152
E	20	1,073	1,004	1,154	1,252
E	21	1,112	1,053	1,122	1,128
E	21	1,131	1,036	1,189	1,284
E	22	1,161	1,068	1,218	1,219
E	22	1,152	1,083	1,129	1,174
E	22	1,136	1,065	1,207	1,296
E	23	1,138	1,058	1,223	1,315
E	23	1,108	0,970	1,161	1,248
E	23	1,098	1,000	1,150	1,179
E	24	1,147	1,031	1,123	1,136
E	25	1,178	1,040	1,248	1,279
E	25	1,112	1,068	1,067	1,096
E	29	1,094	1,075	1,248	1,267
E	29	1,119	1,108	1,047	1,115
E	31	1,096	1,085	1,134	1,291
E	33	1,078	1,062	1,072	1,286
E	34	1,139	1,026	1,000	1,147
E	35	1,185	1,035	1,061	1,224
E	39	1,201	1,042	1,168	1,184
E	41	1,150	1,107	1,143	1,314
E	42	1,195	1,363	1,027	1,268
E	44	1,147	1,029	1,150	1,206
E	49	1,094	1,062	1,224	1,304
E	53	1,124	1,085	1,126	1,192
E	58	1,219	1,195	1,265	1,273
E	61	1,178	1,090	1,194	1,263
E	61	1,123	1,084	1,261	1,239

H5: Kadınlarda gerçek zamanlı PZR çalışması sonucunda 1 gram dışkıda elde edilen \log_{10} *Bacteroidetes* ve *Firmicutes*, *B.fragilis*, *L.acidophilus*, *L.casei* miktarlarının yaşa göre dağılımı

Cinsiyet	Yaş	<i>Bacteroidetes</i>		<i>Firmicutes</i>		<i>B.fragilis</i>		<i>L.acidophilus</i>		<i>L.casei</i>	
		T1DM	Kontrol	T1DM	Kontrol	T1DM	Kontrol	T1DM	Kontrol	T1DM	Kontrol
K	19	11,04	10,49	8,31	7,42	9,12	9,24	5,03	4,99	4,03	4,52
K	19	11,19	10,53	8,27	7,47	8,94	9,05	4,71	4,81	4,24	4,13
K	19	11,28	10,96	8,26	7,69	8,86	9,58	4,63	4,76	4,09	4,07
K	20	12,06	10,71	8,18	7,58	9,95	10,69	4,84	4,95	4,15	4,09
K	20	11,41	11,04	8,39	7,41	8,52	8,93	4,96	5,02	4,41	4,74
K	21	11,59	11,19	8,61	7,49	8,98	9,14	4,99	5,08	3,98	4,20
K	21	11,31	11,22	8,53	7,92	8,26	9,05	5,03	5,09	4,01	4,48
K	23	11,48	10,31	8,12	7,21	9,32	10,49	5,10	5,02	4,49	4,54
K	25	11,81	10,85	8,24	7,36	9,81	10,10	5,01	4,89	4,20	4,03
K	27	11,85	10,58	8,18	7,72	9,75	10,51	5,04	4,96	4,12	3,97
K	28	11,86	10,94	8,15	7,75	9,96	10,82	5,01	5,06	4,01	4,18
K	28	11,73	10,81	8,31	7,52	9,53	9,49	4,99	5,14	4,63	4,75
K	31	11,07	10,28	8,53	7,47	8,93	9,62	4,91	5,05	4,12	4,25
K	33	12,01	10,35	8,34	7,89	8,57	9,38	4,84	4,93	4,81	4,79
K	35	11,24	10,51	8,41	7,83	8,92	8,96	4,96	4,82	4,21	4,14
K	35	11,82	10,92	8,63	8,02	9,37	9,93	4,93	4,86	4,10	4,59
K	38	11,48	10,85	8,85	7,25	8,82	9,26	5,01	4,88	3,99	4,04
K	39	12,04	11,31	8,84	7,18	8,78	9,38	4,68	4,79	4,04	4,19
K	41	11,82	11,43	8,41	7,76	8,52	8,99	4,92	4,94	4,32	4,39
K	43	11,49	11,28	8,24	7,94	9,71	10,14	4,85	4,82	4,41	4,48
K	46	11,85	11,02	8,75	7,63	9,74	10,16	5,01	5,03	4,51	4,21
K	47	12,32	10,95	8,69	8,02	9,96	10,31	5,03	5,06	4,02	4,19
K	48	11,95	10,88	8,59	8,13	9,28	9,59	4,96	5,18	4,05	4,50
K	53	12,02	10,92	8,43	7,78	9,13	9,41	5,15	5,06	4,31	4,35
K	56	11,47	10,61	8,93	7,94	9,74	10,62	5,03	5,21	4,26	4,10

H6: Kadınlarda kandan izole edilen RNA'lerden elde edilen TLR2, TLR4 gen ekspresyon düzeylerinin yaşa göre dağılımı

Cinsiyet	Yaş 19-28	TLR4		TLR2	
		T1DM	Kontrol	T1DM	Kontrol
K	19	1,096	1,042	1,129	1,138
K	19	1,104	1,038	1,082	1,173
K	19	1,118	1,086	1,096	1,194
K	20	1,196	1,062	1,103	1,345
K	20	1,138	1,063	1,118	1,110
K	21	1,158	1,089	1,204	1,129
K	21	1,218	1,114	1,018	1,125
K	23	1,205	1,032	1,152	1,294
K	25	1,178	1,059	1,209	1,247
K	27	1,164	1,042	1,208	1,296
K	28	1,206	1,081	1,227	1,354
K	28	1,159	1,067	1,178	1,174
K	31	1,094	1,003	1,095	1,230
K	33	1,179	1,012	1,052	1,163
K	35	1,109	0,969	1,097	1,100
K	35	1,167	0,989	1,118	1,227
K	38	1,145	1,086	1,095	1,164
K	39	1,153	1,135	1,117	1,213
K	41	1,161	1,149	1,216	1,208
K	43	1,117	1,113	1,198	1,267
K	46	1,189	1,043	1,196	1,254
K	47	1,275	1,079	1,236	1,292
K	48	1,193	1,079	1,178	1,170
K	53	1,186	1,074	1,140	1,165
K	56	1,217	0,991	1,096	1,324

H7. Çalışmaya katılan tüm hasta ve sağlıklı kontrollerde verilerin korelasyon değerlendirme tablosu

		Correlations ^c								
Spearman's rho Tüm Grup (rs)		Bacteroidetes	B.fragilis	Firmicutes	L.acidophilus	L.casei	TLR4	TLR2		
Spearman's rho	Bacteroidetes	Correlation Coefficient	1,000	,679**	-,317**	,009	-,084	,908**	-,319**	
		Sig. (2-tailed)		,000	,001	,926	,393	,000	,001	
	B.fragilis	Correlation Coefficient	,679**	1,000	-,323**	,029	-,198*	,655**	-,334**	
		Sig. (2-tailed)	,000		,001	,770	,042	,000	,000	
	Firmicutes	Correlation Coefficient	-,317**	-,323**	1,000	,150	,037	-,283**	,901**	
		Sig. (2-tailed)	,001	,001		,125	,708	,003	,000	
	L.acidophilus	Correlation Coefficient	,009	,029	,150	1,000	,062	,065	,137	
		Sig. (2-tailed)	,926	,770	,125		,527	,508	,161	
	L.casei	Correlation Coefficient	-,084	-,198*	,037	,062	1,000	-,053	,041	
		Sig. (2-tailed)	,393	,042	,708	,527		,592	,676	
	TLR4	Correlation Coefficient	,908**	,655**	-,283**	,065	-,053	1,000	-,281**	
		Sig. (2-tailed)	,000	,000	,003	,508	,592		,004	
	TLR2	Correlation Coefficient	-,319**	-,334**	,901**	,137	,041	-,281**	1,000	
		Sig. (2-tailed)	,001	,000	,000	,161	,676	,004		
	** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).									
	* . Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).									
	c. Listwise N = 106									

H8. Çalışmaya katılan tüm erkek hasta ve sağlıklı kontrollerde verilerin korelasyon değerlendirme tablosu

Correlations ^c										
Spearman's rho Erkek grubu tümü		Bacteroidetes	B.fragilis	Firmicutes	L.acidophilus	L.casei	TLR4	TLR2		
Spearman's rho	Bacteroidetes	Correlation Coefficient	1,000	,655**	-,339*	,036	-,044	,902**	-,325*	
		Sig. (2-tailed)		,000	,011	,791	,746	,000	,015	
	B.fragilis	Correlation Coefficient	,655**	1,000	-,327*	,099	-,203	,610**	-,273*	
		Sig. (2-tailed)	,000		,014	,469	,133	,000	,042	
	Firmicutes	Correlation Coefficient	-,339*	-,327*	1,000	,142	,137	-,281*	,967**	
		Sig. (2-tailed)	,011	,014		,297	,314	,036	,000	
	L.acidophilus	Correlation Coefficient	,036	,099	,142	1,000	-,027	,085	,132	
		Sig. (2-tailed)	,791	,469	,297		,845	,531	,331	
	L.casei	Correlation Coefficient	-,044	-,203	,137	-,027	1,000	,048	,160	
		Sig. (2-tailed)	,746	,133	,314	,845		,727	,238	
	TLR4	Correlation Coefficient	,902**	,610**	-,281*	,085	,048	1,000	-,238	
		Sig. (2-tailed)	,000	,000	,036	,531	,727		,077	
	TLR2	Correlation Coefficient	-,325*	-,273*	,967**	,132	,160	-,238	1,000	
		Sig. (2-tailed)	,015	,042	,000	,331	,238	,077		
	** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).									
	* . Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).									
c. Listwise N = 56										

H9: Çalışmaya katılan tüm erkek hasta ve sağlıklı kontrollerde verilerin korelasyon değerlendirme tablosu

Correlations ^c										
Spearman's rho Kadınlar tüm grup		Bacteroidetes	B.fragilis	Firmicutes	L.acidophilus	L.casei	TLR4	TLR2		
Spearman's rho	Bacteroidetes	Correlation Coefficient	1,000	,727**	-,240	-,084	-,133	,921**	-,247	
		Sig. (2-tailed)		,000	,093	,560	,357	,000	,084	
	B.fragilis	Correlation Coefficient	,727**	1,000	-,352*	-,019	-,200	,705**	-,420**	
		Sig. (2-tailed)	,000		,012	,898	,164	,000	,002	
	Firmicutes	Correlation Coefficient	-,240	-,352*	1,000	,268	-,028	-,243	,789**	
		Sig. (2-tailed)	,093	,012		,060	,846	,090	,000	
	L.acidophilus	Correlation Coefficient	-,084	-,019	,268	1,000	,146	,023	,196	
		Sig. (2-tailed)	,560	,898	,060		,312	,875	,173	
	L.casei	Correlation Coefficient	-,133	-,200	-,028	,146	1,000	-,169	-,067	
		Sig. (2-tailed)	,357	,164	,846	,312		,240	,643	
	TLR4	Correlation Coefficient	,921**	,705**	-,243	,023	-,169	1,000	-,302*	
		Sig. (2-tailed)	,000	,000	,090	,875	,240		,033	
	TLR2	Correlation Coefficient	-,247	-,420**	,789**	,196	-,067	-,302*	1,000	
		Sig. (2-tailed)	,084	,002	,000	,173	,643	,033		
	** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).									
	* . Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).									
c. Listwise N = 50										

H10. TLR2 için UPL prob ve primer dizaynı

1. NM_003264.3

ProbeFinder has designed an optimal real-time PCR assay for:
NM_003264.3 Homo sapiens toll-like receptor 2 (TLR2), mRNA

Assay rank 1

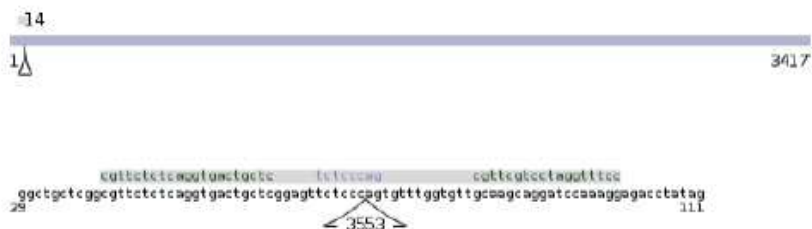
Use probe #14 (cat. no. 04685130001)

Primer	Length	Position	Tm	%GC	Sequence
Left	21	39 - 59	60	57	cgttctctcagggtgactgctc
Right	18	84 - 101	59	56	cctttggatcctgcttgc
Amplicon (63 nt)					
cgttctctcagggtgactgctcagggtctctccagtggttgggtgtgcaagcaggatccaaagg					

The search was for intron spanning assays.

This assay has: [All criteria met.](#)

Length of intron(s) spanned by this assay: 3553 nt



H11. TLR4 için UPL prob ve primer dizaynı

1. NM_138554.3

ProbeFinder has designed an optimal real-time PCR assay for:
NM_138554.3 Homo sapiens toll-like receptor 4 (TLR4), transcript variant 1, mRNA

Assay rank 1

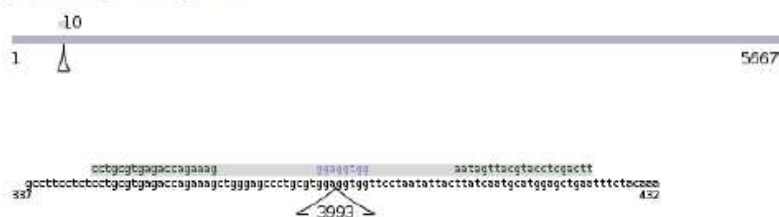
Use probe #10 (cat. no. 04685091001)

Primer	Length	Position	Tm	%GC	Sequence
Left	19	347 - 365	59	58	cctgcgtgagaccagaaag
Right	21	402 - 422	59	38	ttcagctccatgcattgataa
Amplicon (76 nt)					
cctgcgtgagaccagaaagctggggccctgcgtggaggtggttcccaatatacttatcaatgcctggagctgaa					

The search was for intron spanning assays.

This assay has: [All criteria met.](#)

Length of intron(s) spanned by this assay: 3993 nt



H12. HPRT1 için UPL prob ve primer dizaynı

1. NM_000194.2

ProbeFinder has designed an optimal real-time PCR assay for:
NM_000194.2 Homo sapiens hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (HPRT1), mRNA

Assay rank 1

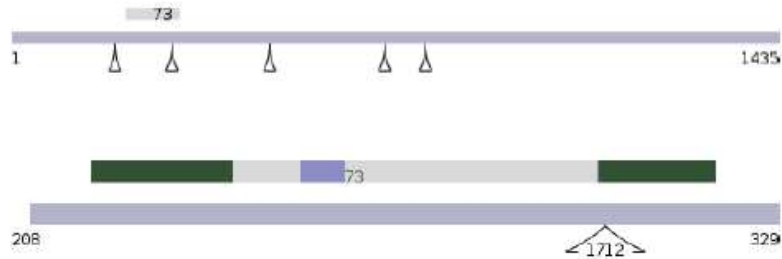
Use probe #73 (cat. no. 04688861001)

Primer	Length	Position	Tm	%GC	Sequence
Left	24	218 - 241	59	33	tgaccttgattatatttgcatacc
Right	20	300 - 319	60	55	cgagcaagacgttcagtcct
Amplicon (102 nt)					
tgaccttgattatatttgcataccatacattatgctgaggatttggaagggtgttattcctcatggactattatggacaggactg aacgtcttgctcg					

The search was for intron spanning assays.

This assay has: **All criteria met.**

Length of intron(s) spanned by this assay: 1712 nt



H13. Magna Pure 96 sistemi Dışkıdan Bakteriye DNA izolasyon çalışma raporu

Purification Information

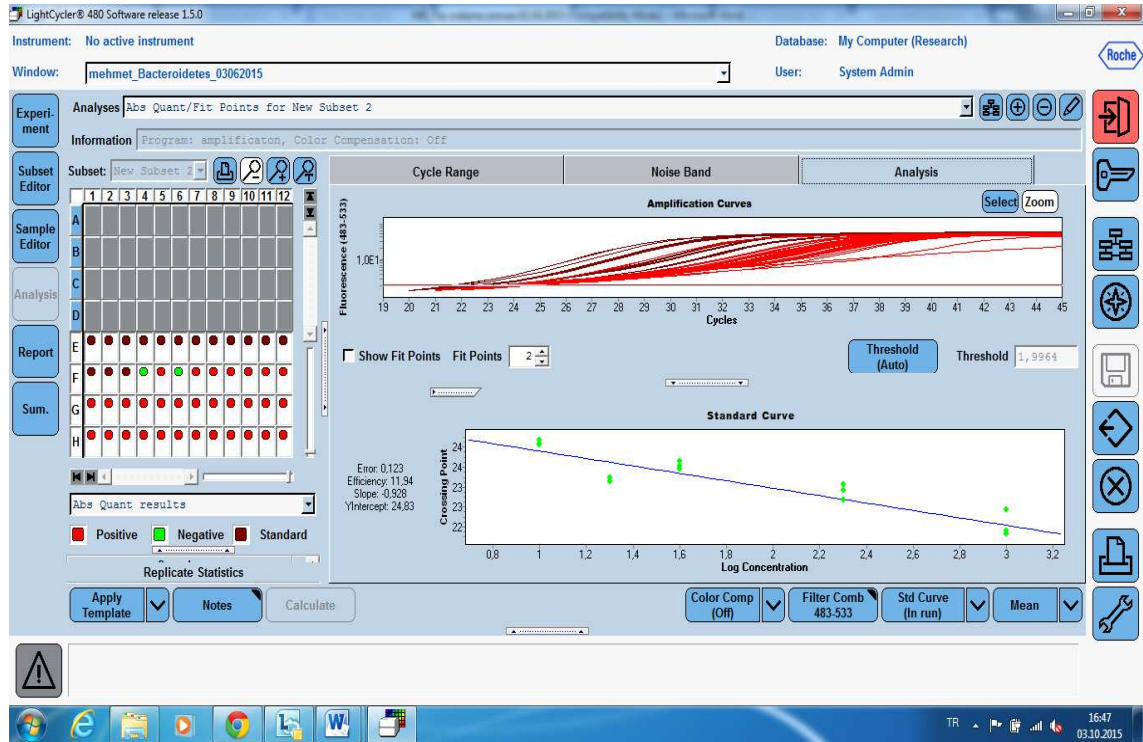
Batch ID:	1259_201404081404	Order Name:	mehmet deneme
Operator:	Biogenetik	Software Version:	2.0.3
Internal Control Name:	<none>	IS Software Version:	3.0.5.1201
Internal Control Barcode:	<none>	Instr. Serial Nr:	1259
Target Plate ID:	0501130000019452	Test Parameter	
Source Plate ID:	0405130000164459	Kit Name:	DNA/Viral NA SV 2.0
Start Time:	08-Apr-2014 14:06:09	Protocol:	Pathogen Universal 200 2.0
End Time:	08-Apr-2014 15:02:54	Sample Volume:	200 µl
Load Flap Open:	08-Apr-2014 15:14:36	Elution Volume:	100 µl
Run State:	Passed		
Comment:			

H14. Magna Pure 96 kandan RNA izolasyon çalışma raporu

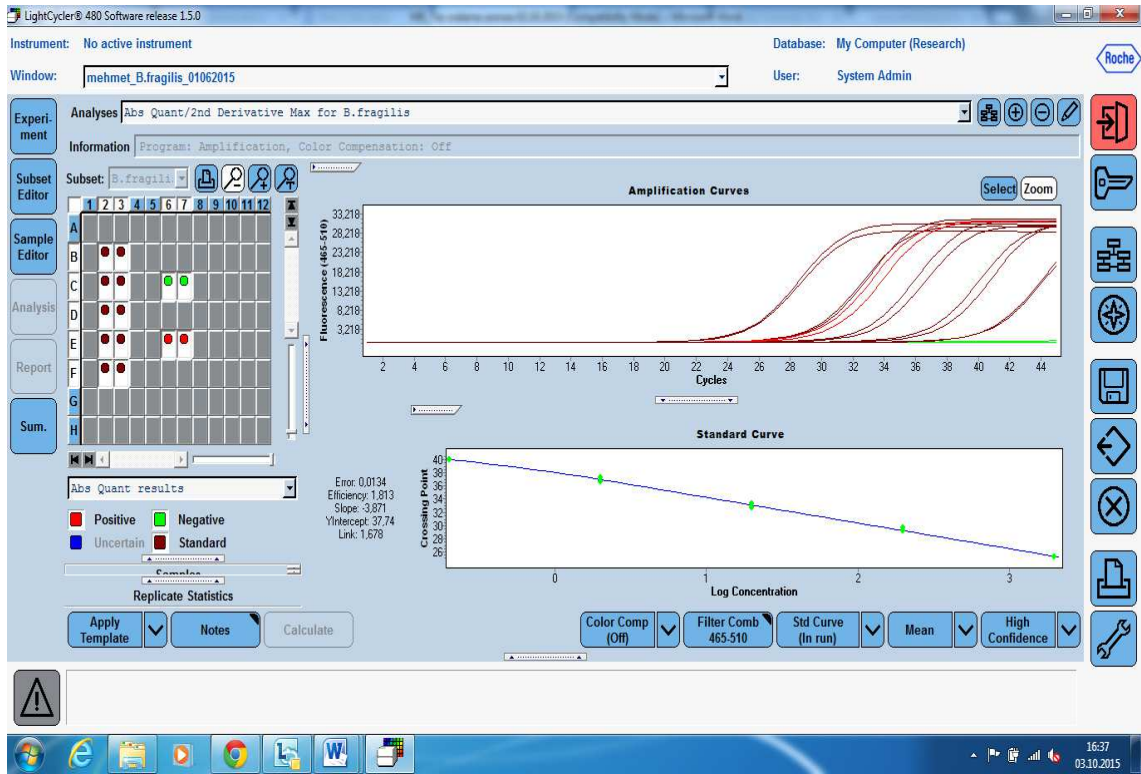
Purification Information

Batch ID:	1259_201407250939	Order Name:	25.07.2014 mehmet
Operator:	Biogenetik	Software Version:	2.0.3
Internal Control Name:	<none>	IS Software Version:	3.0.5.1201
Internal Control Barcode:	<none>	Instr. Serial Nr:	1259
Target Plate ID:	0512130000156612	Test Parameter	
Source Plate ID:	0405130000168730	Kit Name:	Cellular RNA LV 2.0
Start Time:	25-Jul-2014 09:42:49	Protocol:	RNA Blood LV 400 2.0
End Time:	25-Jul-2014 11:14:47	Sample Volume:	900 µl
Load Flap Open:	25-Jul-2014 11:15:11	Elution Volume:	100 µl
Run State:	Passed		
Comment:			

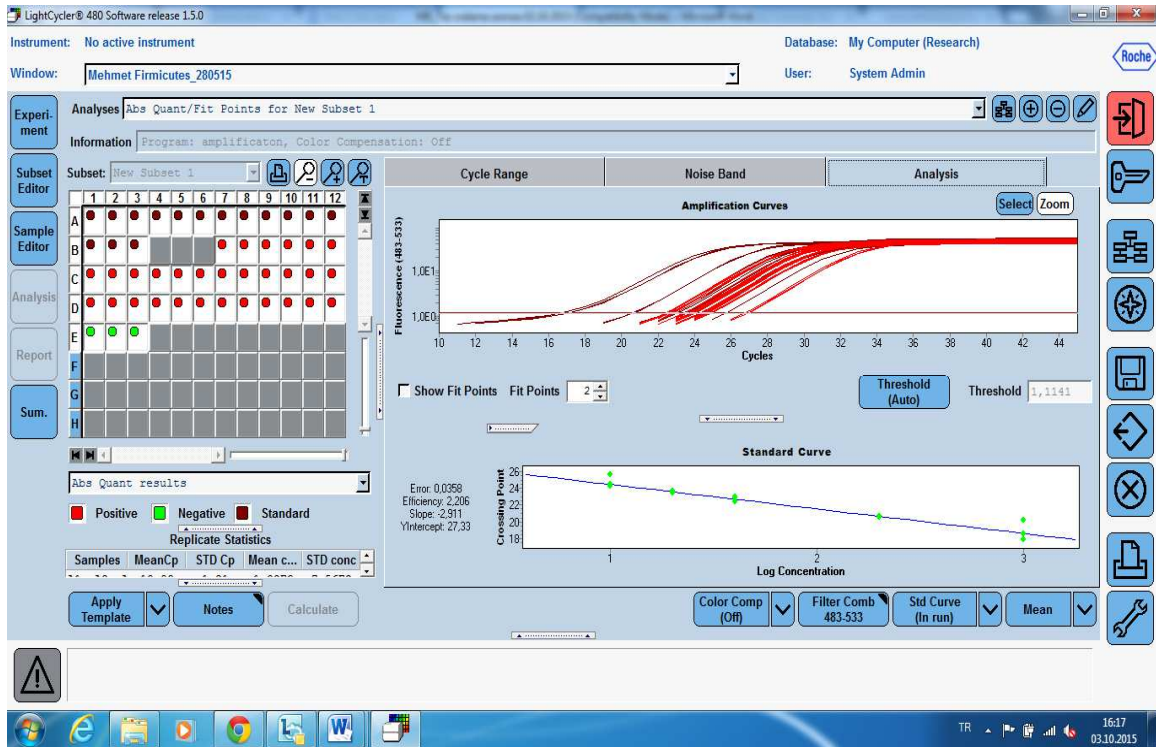
H15. Bacteroidetes çalışması Light Cycler 480 software deney görüntüsü.



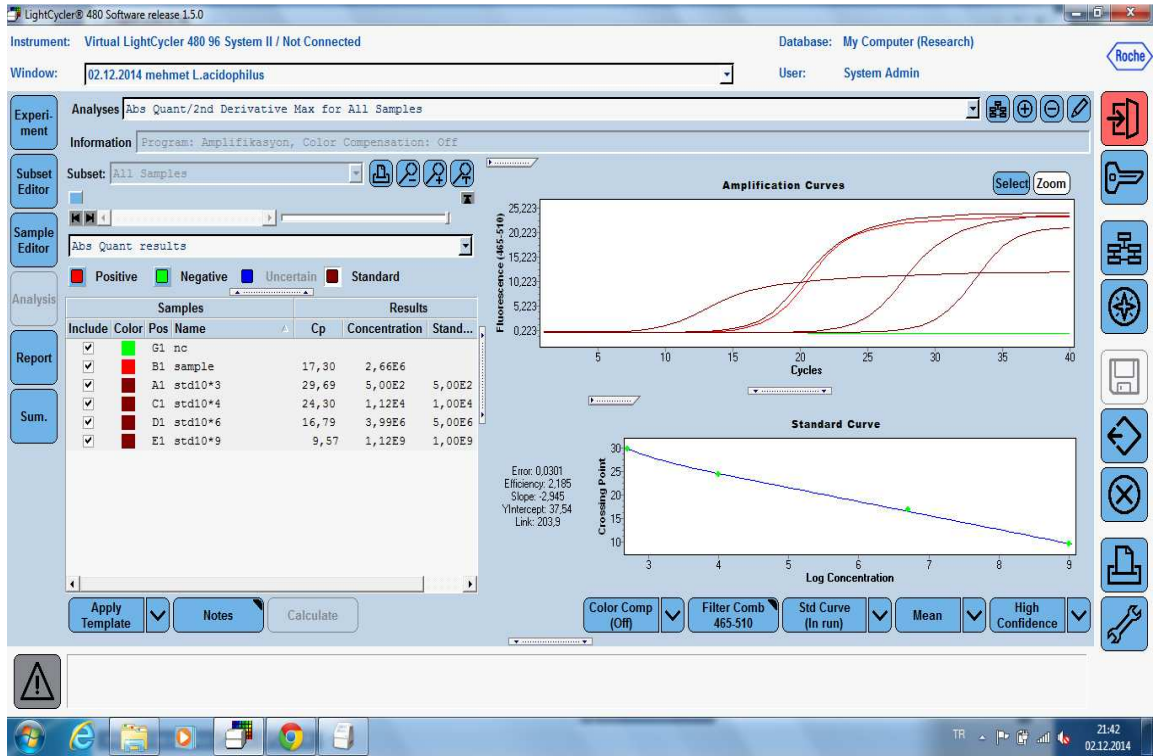
H16. *B.fragilis* çalışması Light Cycler 480 software deney görüntüsü.



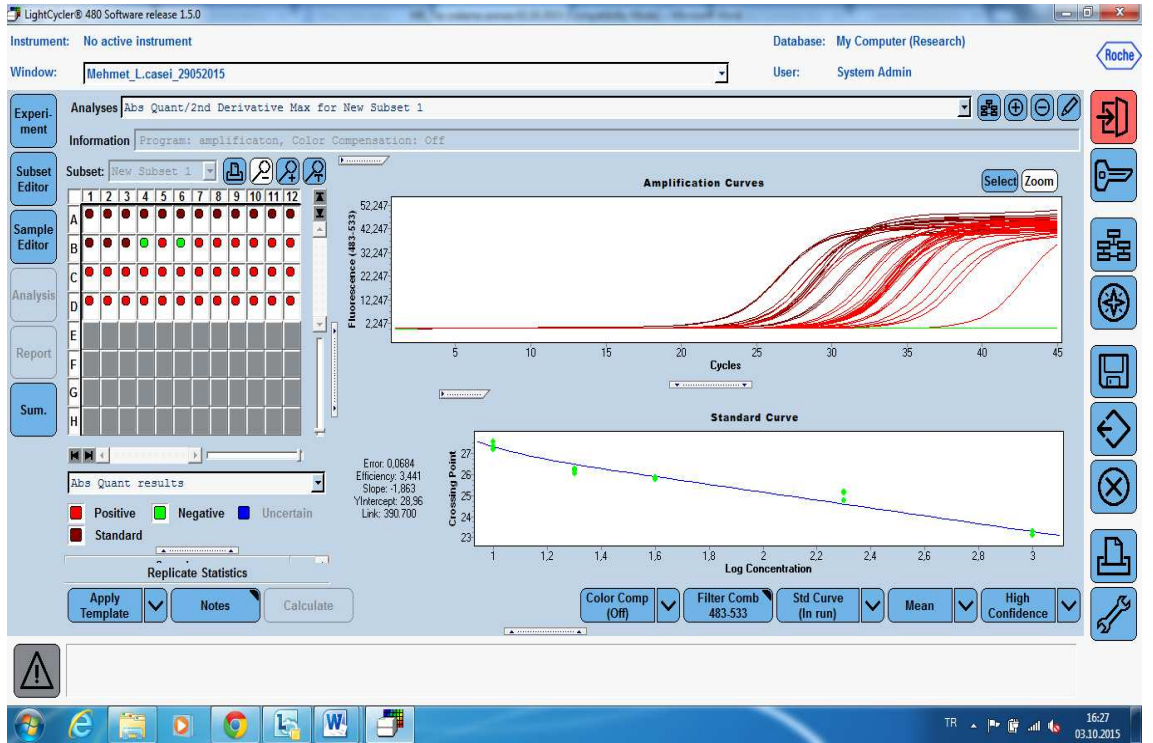
H17. *Firmicutes* çalışması Light Cycler 480 software deney görüntüsü.



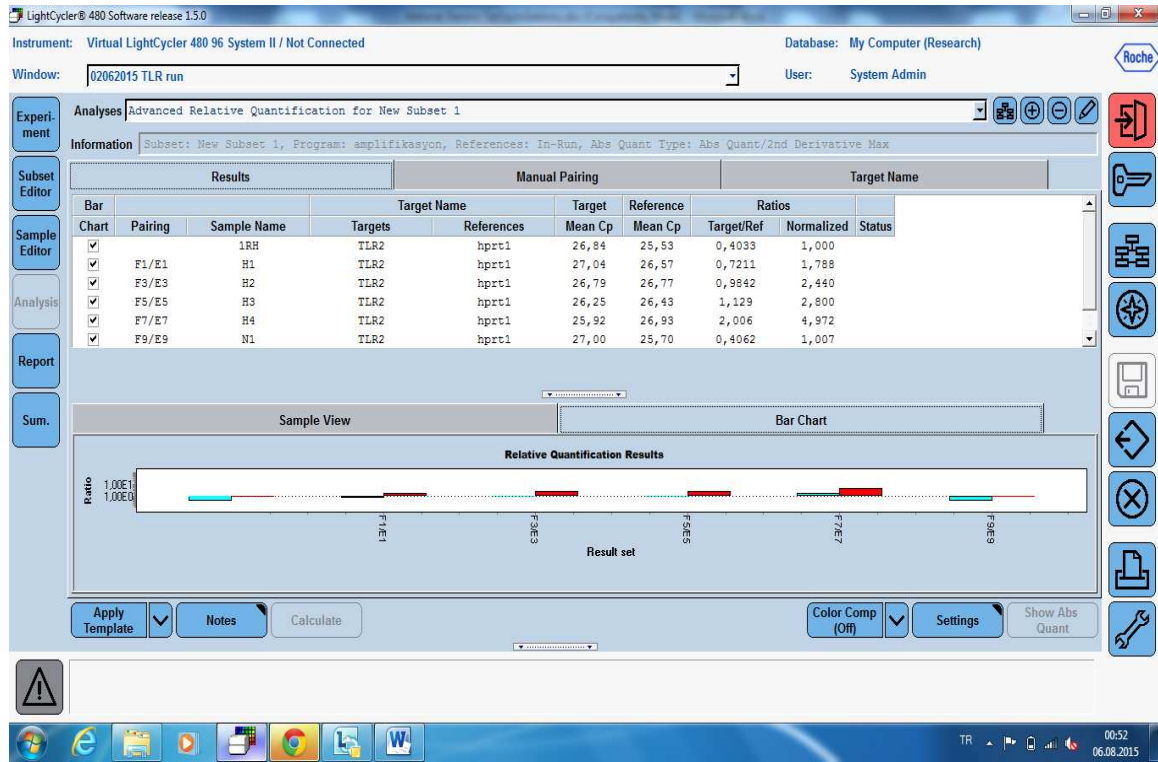
H18. *Lactobacillus acidophilus* çalışması Light Cyclor 480 software deney görüntüsü.



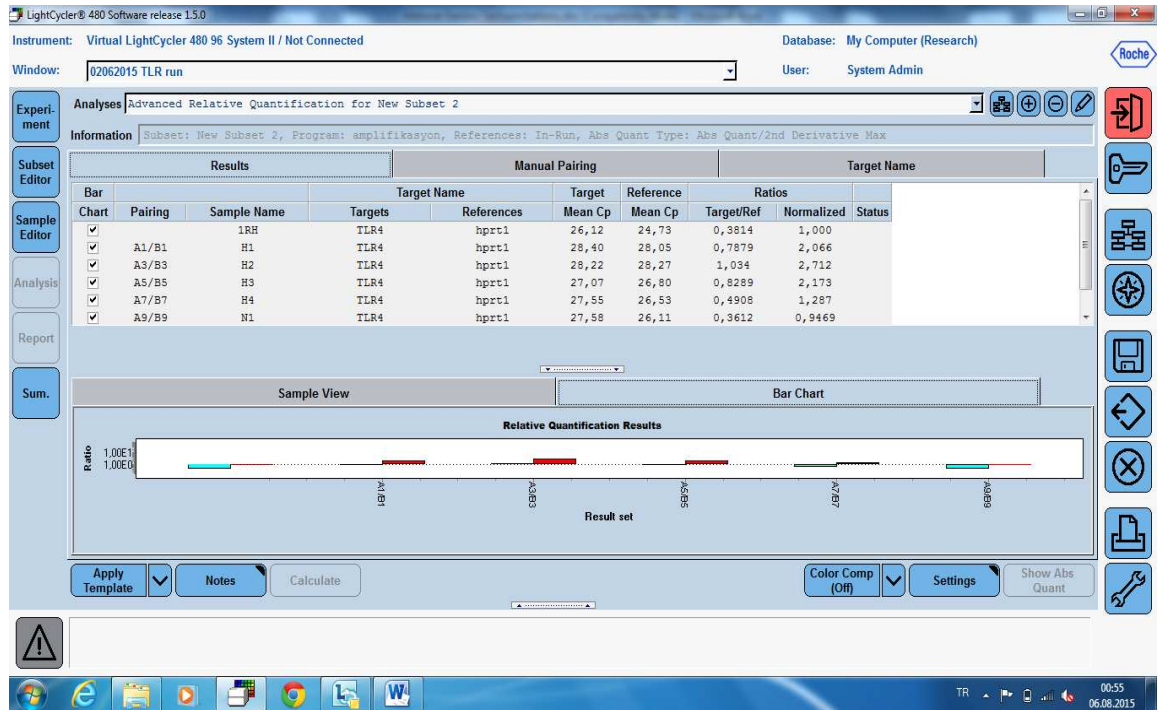
H19. *Lactobacillus casei* çalışması Light Cyclor 480 software deney görüntüsü.



H20. TLR2 gen ekspresyonu çalışması LightCycler 480 software deney görüntüsü



H21. TLR4 gen ekspresyonu çalışması Light Cycler 480 software deney görüntüsü



Tüm grup değerleri	T1DM		Sağlıklı kontrol		Mann Whitney U	
	Ortalama ± Standart sapma	Medyan (Min - Maks)	Ortalama ± Standart sapma	Medyan (Min - Maks)	P*	P**
Yaş	32,87 ± 12,68	29 (19 - 61)	32,87 ± 12,68	29 (19 - 61)	1,000	1,000
VKI	23,25 ± 1,63	23,81 (19,26 - 24,97)	20,23 ± 1,70	19,98 (16,96 - 23,94)	,000	,000
HBA1C	8,69 ± 1,91	8,10 (6,10 - 13,50)	4,19 ± 1,11	4,10 (1,90 - 6,00)	,000	,000
Bacteroidetes	11,55 ± 0,33	11,52 (10,94 - 12,32)	10,77 ± 0,31	10,83 (10,05 - 11,43)	,000	,000
B.fragilis	8,46 ± 0,27	8,41 (8,03 - 9,01)	7,72 ± 0,29	7,73 (7,18 - 8,21)	,000	,000
Firmicutes	9,27 ± 0,54	9,28 (8,14 - 10,24)	9,83 ± 0,57	9,93 (8,93 - 10,82)	,000	,000
L.acidophilus	4,92 ± 0,16	4,96 (4,36 - 5,15)	4,93 ± 0,16	4,95 (4,41 - 5,21)	,681	,681
L.casei	4,22 ± 0,21	4,19 (3,96 - 4,81)	4,30 ± 0,22	4,25 (3,97 - 4,79)	,034	,034
TLR4	1,15 ± 0,04	1,15 (1,07 - 1,28)	1,07 ± 0,06	1,06 (0,97 - 1,36)	,000	,000
TLR2	1,15 ± 0,07	1,15 (1,00 - 1,27)	1,22 ± 0,07	1,22 (1,10 - 1,35)	,000	,000

*Mann-Whitney U test, ** Levene's T test

Tümü	T1DM	Sağlıklı kontrol	İstatistiksel analiz	
	Ortalama ± Standart sapma	Ortalama ± Standart sapma	P*	P**
Yaş	32,87 ± 12,68	32,87 ± 12,68	1,000	1,000
Boy	1,69 ± 0,09	1,73 ± 0,09	,000	,000
Kilo	66,8 ± 9,09	60,66 ± 8,10	,000	,043
VKI	23,25 ± 1,63	20,23 ± 1,70	,000	,000
HBA1C	8,69 ± 1,91	4,19 ± 1,11	,000	,000
Açlık Kan Şekeri	133,39 ± 62,44	91,0 ± 5,67	,000	,000
Bacteroidetes	11,55 ± 0,33	10,77 ± 0,31	,000	,000
B.fragilis	8,46 ± 0,27	7,72 ± 0,29	,000	,000
Firmicutes	9,27 ± 0,54	9,83 ± 0,57	,000	,000
L.acidophilus	4,92 ± 0,16	4,93 ± 0,16	,681	,696
L.casei	4,22 ± 0,21	4,30 ± 0,22	,034	,046
TLR4	1,15 ± 0,04	1,07 ± 0,06	,000	,000
TLR2	1,15 ± 0,07	1,22 ± 0,07	,000	,000

*Mann-Whitney U test, ** Levene's T test,

Erkek Grubu	T1DM		Sağlıklı kontrol		P*
	Ortalama ± Standart sapma	Medyan (Min - Maks)	Ortalama ± Standart sapma	Medyan (Min - Maks)	
Yaş	33,18 ± 13,22	29 (19 - 61)	33,18 ± 13,22	29 (19 - 61)	1,000
VKI	23,21 ± 1,61	23,38 (19,26 - 24,97)	20,47 ± 1,51	20,25 (18,31 - 23,57)	,000
HBA1C	8,98 ± 2,05	8,25 (6,70 - 13,50)	4,17 ± 1,28	4,15 (1,90 - 6,00)	,000
Bacteroidetes	11,45 ± 0,25	11,51 (10,94 - 11,82)	10,64 ± 0,33	10,61 (10,05 - 11,25)	,000
B.fragilis	8,28 ± 0,19	8,25 (8,03 - 8,62)	7,69 ± 0,30	7,70 (7,29 - 8,15)	,000
Firmicutes	9,31 ± 0,57	9,36 (8,14 - 10,24)	9,93 ± 0,52	10,02 (8,93 - 10,62)	,000
L.acidophilus	4,90 ± 0,18	4,91 (4,36 - 5,12)	4,89 ± 0,18	4,95 (4,41 - 5,14)	,954
L.casei	4,22 ± 0,20	4,19 (3,96 - 4,65)	4,29 ± 0,20	4,27 (4,01 - 4,67)	,125
TLR4	1,14 ± 0,04	1,13 (1,07 - 1,22)	1,07 ± 0,07	1,06 (0,97 - 1,36)	,000
TLR2	1,15 ± 0,07	1,15 (1,00 - 1,27)	1,23 ± 0,07	1,24 (1,10 - 1,32)	,000

*Mann-Whitney U test,

Bayan Grubu	T1DM		Sağlıklı kontrol		P*
	Ortalama ± Standart sapma	Medyan (Min - Maks)	Ortalama ± Standart sapma	Medyan (Min - Maks)	
Yaş	32,52 ± 11,64	31 (19 - 56)	32,52 ± 11,64	31 (19 - 56)	1,000
VKI	23,30 ± 1,68	23,89 (19,81 - 24,80)	19,95 ± 1,90	19,50 (19,50 - 21,37)	,000
HBA1C	8,36 ± 1,73	7,90 (6,10 - 13,50)	4,21 ± 0,91	3,90 (2,40 - 5,70)	,000
Bacteroidetes	11,65 ± 0,35	11,73 (11,04 - 12,32)	10,84 ± 0,32	10,88 (10,28 - 11,43)	,000
B.fragilis	8,45 ± 0,24	8,41 (8,12 - 8,93)	7,66 ± 0,27	7,69 (7,18 - 8,13)	,000
Firmicutes	9,22 ± 0,51	9,13 (8,26 - 9,96)	9,71 ± 0,61	9,58 (8,93 - 10,82)	,007
L.acidophilus	4,94 ± 0,13	4,99 (4,63 - 5,15)	4,98 ± 0,12	4,99 (4,76 - 5,21)	,454
L.casei	4,22 ± 0,22	4,15 (3,98 - 4,81)	4,32 ± 0,24	4,21 (3,97 - 4,79)	,143
TLR4	1,17 ± 0,04	1,16 (1,09 - 1,28)	1,06 ± 0,05	1,06 (0,97 - 1,15)	,000
TLR2	1,14 ± 0,06	1,13 (1,02 - 1,24)	1,21 ± 0,07	1,21 (1,10 - 1,35)	,001

*Mann-Whitney U test,

19-29	T1DM		Sağlıklı kontrol		P*
Yaş grubu	Ortalama ± Standart sapma	Medyan (Min - Maks)	Ortalama ± Standart sapma	Medyan (Min - Maks)	
Erkek					
Yaş	23,2 ± 2,88	23 (19 - 29)	23,2 ± 2,88	23 (19 - 29)	1,000
VKI	22,76 ± 1,77	22,84 (19,26 - 24,91)	19,9 ± 1,27	19,57 (18,31 - 22,28)	,000
HBA1C	9,21 ± 2,30	8,3 (6,70 - 13,5)	3,77 ± 1,22	3,60 (1,90 - 5,70)	,000
Bacteroidetes	11,45 ± 0,25	11,51 (10,94 - 11,82)	10,64 ± 0,33	10,61 (10,05 - 11,25)	,000
B.fragilis	8,28 ± 0,19	8,25 (8,03 - 8,62)	7,69 ± 0,30	7,70 (7,29 - 8,15)	,000
Firmicutes	9,43 ± 0,49	9,45 (8,53 - 10,15)	9,79 ± 0,57	9,95 (8,93 - 10,59)	,097
L.acidophilus	4,86 ± 0,22	4,89 (4,36 - 5,12)	4,85 ± 0,21	4,95 (4,41 - 5,10)	,852
L.casei	4,19 ± 0,19	4,16 (3,97 - 4,59)	4,23 ± 0,17	4,19 (4,01 - 4,53)	,361
TLR4	1,12 ± 0,03	1,12 (1,07 - 1,18)	1,05 ± 0,04	1,06 (0,97 - 1,11)	,000
TLR2	1,16 ± 0,06	1,16 (1,05 - 1,25)	1,21 ± 0,07	1,22 (1,10 - 1,32)	,093

*Mann-Whitney test,

31-44	T1DM		Sağlıklı kontrol		P*
Yaş grubu	Ortalama ± Standart sapma	Medyan (Min - Maks)	Ortalama ± Standart sapma	Medyan (Min - Maks)	
Erkek					
Yaş	37,38 ± 4,75	37 (31 - 44)	37,38 ± 4,75	37 (31 - 44)	1,000
VKI	23,46 ± 1,29	23,37 (21,80 - 24,97)	20,23 ± 0,83	20,38 (18,83 - 21,06)	,001
HBA1C	8,43 ± 1,43	8,25 (6,80 - 11,30)	4,25 ± 1,25	4,25 (1,90 - 5,90)	,001
Bacteroidetes	11,43 ± 0,36	11,48 (10,98 - 11,94)	10,70 ± 0,23	10,71 (10,38 - 11,02)	,001
B.fragilis	8,58 ± 0,26	8,58 (8,15 - 8,96)	7,78 ± 0,27	7,85 (7,43 - 8,12)	,001
Firmicutes	8,81 ± 0,49	8,73 (8,14 - 9,51)	10,01 ± 0,45	9,97 (9,25 - 10,58)	,002
L.acidophilus	4,93 ± 0,08	4,91 (4,83 - 5,04)	4,93 ± 0,12	4,92 (4,73 - 5,14)	,833
L.casei	4,18 ± 0,22	4,16 (3,96 - 4,65)	4,37 ± 0,24	4,44 (4,03 - 4,67)	,156
TLR4	1,15 ± 0,04	1,15 (1,08 - 1,20)	1,09 ± 0,11	1,05 (1,03 - 1,36)	,027
TLR2	1,09 ± 0,06	1,10 (1,00 - 1,17)	1,24 ± 0,06	1,25 (1,15 - 1,31)	,002

*Mann-Whitney U test,

49 - 61	T1DM		Sağlıklı kontrol		P*
	Ortalama ± Standart sapma	Medyan (Min - Maks)	Ortalama ± Standart sapma	Medyan (Min - Maks)	
Yaş grubu					
Erkek					
Yaş	56,40 ± 5,27	58 (49 - 61)	56,40 ± 5,27	58 (49 - 61)	1,000
VKI	24,17 ± 1,27	24,77 (21,91 - 24,84)	20,58 ± 1,27	22,91 (20,45 - 23,57)	,076
HBA1C	9,16 ± 2,37	8,20 (7,00 - 11,90)	5,24 ± 1,01	5,60 (3,50 - 6,00)	,009
Bacteroidetes	11,54 ± 0,36	11,38 (11,15 - 11,95)	10,96 ± 0,14	10,94 (10,83 - 11,15)	,012
B.fragilis	8,87 ± 0,11	8,83 (8,75 - 9,01)	7,99 ± 0,25	8,11 (7,58 - 8,21)	,009
Firmicutes	9,75 ± 0,42	9,81 (9,12 - 10,24)	10,25 ± 0,36	10,22 (9,71 - 10,62)	,117
L.acidophilus	4,96 ± 0,15	5,02 (4,76 - 5,12)	4,97 ± 0,14	4,99 (4,75 - 5,12)	,834
L.casei	4,35 ± 0,19	4,29 (4,12 - 4,59)	4,33 ± 0,16	4,31 (4,18 - 4,60)	,917
TLR4	1,15 ± 0,05	1,12 (1,09 - 1,22)	1,10 ± 0,05	1,09 (1,06 - 1,20)	,076
TLR2	1,21 ± 0,06	1,22 (1,13 - 1,27)	1,25 ± 0,04	1,26 (1,19 - 1,30)	,251

*Mann-Whitney U test,

19-28 Yaş grubu Bayan	T1DM		Sağlıklı kontrol		P*
	Ortalama ± Standart sapma	Medyan (Min - Maks)	Ortalama ± Standart sapma	Medyan (Min - Maks)	
Yaş	22,3 ± 3,50	21 (19 - 28)	22,3 ± 3,50	21 (19 - 28)	1,000
VKI	23,30 ± 1,60	23,89 (20,20 - 24,80)	19,16 ± 2,00	18,66 (16,96 - 23,61)	,000
HBA1C	9,21 ± 2,30	8,0 (6,70 - 13,5)	4,18 ± 1,03	3,90 (2,60 - 5,70)	,000
Bacteroidetes	11,55 ± 0,32	11,54 (11,04 - 12,06)	10,80 ± 0,29	10,83 (10,31 - 11,22)	,000
B.fragilis	8,30 ± 0,15	8,27 (8,12 - 8,61)	7,55 ± 0,20	7,51 (7,21 - 7,92)	,000
Firmicutes	9,25 ± 0,56	9,22 (8,26 - 9,96)	9,76 ± 0,72	9,54 (8,93 - 10,82)	,106
L.acidophilus	4,95 ± 0,14	5,00 (4,63 - 5,10)	4,98 ± 0,11	5,01 (4,76 - 5,14)	,664
L.casei	4,20 ± 0,21	4,14 (3,98 - 4,63)	4,31 ± 0,28	4,19 (3,97 - 4,75)	,340
TLR4	1,16 ± 0,04	1,16 (1,10 - 1,22)	1,14 ± 0,06	1,06 (1,03 - 1,11)	,000
TLR2	1,14 ± 0,06	1,16 (1,05 - 1,25)	1,21 ± 0,09	1,18 (1,11 - 1,35)	,078

*Mann-Whitney U test,

31-41 Yaş grubu Bayan	T1DM		Sağlıklı kontrol		P*
	Ortalama ± Standart sapma	Medyan (Min - Maks)	Ortalama ± Standart sapma	Medyan (Min - Maks)	
Yaş	36 ± 3,51	35 (31 - 41)	36 ± 3,51	35 (31 - 41)	
VKI	22,13 ± 1,80	22,03 (19,81 - 24,54)	19,58 ± 0,77	19,27 (18,83 - 21,09)	,009
HBA1C	8,41 ± 1,46	8,20 (6,10 - 10,5)	4,4 ± 0,73	4,50 (3,50 - 5,60)	,002
Bacteroidetes	11,64 ± 0,38	11,82 (11,07 - 12,04)	10,81 ± 0,45	10,85 (10,28 - 11,43)	,009
B.fragilis	8,57 ± 0,21	8,53 (8,34 - 8,85)	7,63 ± 0,33	7,76 (7,18 - 8,02)	,002
Firmicutes	8,84 ± 0,28	8,82 (8,52 - 9,37)	9,76 ± 0,34	9,38 (8,96 - 9,93)	,006
L.acidophilus	4,89 ± 0,11	4,92 (4,68 - 5,01)	4,90 ± 0,09	4,88 (4,79 - 5,05)	,798
L.casei	4,23 ± 0,28	4,12 (3,99 - 4,81)	4,34 ± 0,27	4,25 (4,04 - 4,79)	,306
TLR4	1,14 ± 0,03	1,15 (1,09 - 1,18)	1,05 ± 0,07	1,01 (0,97 - 1,15)	,013
TLR2	1,11 ± 0,05	1,10 (1,05 - 1,22)	1,19 ± 0,05	1,21 (1,10 - 1,23)	,025

*Mann-Whitney U test,

43-56 Yaş grubu Bayan	T1DM		Sağlıklı kontrol		P*
	Ortalama ± Standart sapma	Medyan (Min - Maks)	Ortalama ± Standart sapma	Medyan (Min - Maks)	
Yaş	48,83 ± 4,79	47,5 (43 - 56)	48,83 ± 4,79	47,5 (43 - 56)	1,000
VKI	24,64 ± 0,21	24,65 (24,30 - 24,92)	21,97 ± 1,06	21,64 (21,08 - 23,94)	,076
HBA1C	7,92 ± 1,14	7,75 (7,0 - 10,10)	4,05 ± 0,96	4,00 (2,40 - 5,10)	,009
Bacteroidetes	11,85 ± 0,33	11,90 (11,47 - 12,32)	10,94 ± 0,22	10,94 (10,61 - 11,28)	,004
B.fragilis	8,61 ± 0,24	8,64 (8,24 - 8,93)	7,91 ± 0,18	7,94 (7,63 - 8,13)	,004
Firmicutes	9,59 ± 0,32	9,73 (9,13 - 9,96)	10,04 ± 0,45	10,15 (9,41 - 10,62)	,109
L.acidophilus	5,01 ± 0,10	5,02 (4,85 - 5,15)	5,06 ± 0,14	5,06 (4,82 - 5,21)	,196
L.casei	4,26 ± 0,19	4,29 (4,02 - 4,51)	4,31 ± 0,16	4,28 (4,10 - 4,50)	,749
TLR4	1,20 ± 0,05	1,19 (1,12 - 1,28)	1,05 ± 0,07	1,08 (0,99 - 1,11)	,004
TLR2	1,17 ± 0,05	1,19 (1,10 - 1,24)	1,19 ± 0,05	1,26 (1,17 - 1,32)	,109

*Mann-Whitney U test,

FORMLAR

Form 1:

Tıbbi Mikrobiyoloji –Endokrinoloji ve Metabolizma Hast..

HASTA VE KONTROL GRUPLARI

BİLGİ FORMU

Tarih...../...../.....

Hasta Adı Soyadı:

Cinsiyeti..... Yaş.....

Tel No..... Hasta Prot. No:.....

Klinik Tanı

TİP 1 Diyabet ...[]..... TİP 2 Diyabet...[]..... Sağl. Kontrol...[].....

Kan Numunesi Alım Tarihi/...../.....

Gaita Numunesi Alım Tarihi...../...../.....

Başka bir hastalığı varmı?.....

Son 1 haftada antibiyotik kullandı mı?.....

Son 1 ayda probiyotik kullandı mı?.....

BMI (kg/m²):.....

Kilo:..... Boy:.....

OGTT (glukoz – mmol/l):.....Açlık Şekeri.....

HbA1c:.....

Mehmet DEMİRCİ

Tel: 23046 / 21647

ETİK KURUL KARARI



T.C
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU



Sayı : 83045809/ 30339

İstanbul/...../.....

Konu:

Temel Tıp Bilimleri Bölümü
Başkanlığına

3 1 Ekim 2013

İLGİ: 02.09.2013 tarihli, 1836 sayılı yazınıza:

Bölümünüze bağlı Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç.Dr.Hrisi Bahar TOKMAN'ın danışmanlığında Doktora Öğrencisi Mehmet DEMİRCİ'nin yürütücülüğünde Prof.Dr.Mücahit ÖZYAZAR ve Uzm.Dr.Ela Temeloğlu KESKİN'in yardımcılıklarında "Erişkin Tip 1 Diyabetli ve Sağlıklı Kişilerin Dışkı Florasındaki Bacteroidetes ve Firmicutes Grubu Bakteri Miktarının Konaktaki TLR2/TLR4 Gen Ekspresyonları Üzerine Etkisi" başlıklı Doktora Tezi hakkında ilgi yazınız ve ekleri 01Ekim 2013 tarihinde toplanan Fakültemiz Klinik Araştırmalar Etik Kurulunca müzakere edilmiş olup; Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) desteği alınması koşuluyla etik açıdan uygun olduğuna karar verilmiştir.

Bilgilerinizi,durumun adı geçen anabilim dalı başkanlığına bildirilmesini rica ederim.

Prof.Dr.Fatih ALTINDAŞ
Klinik Araştırmalar
Etik Kurulu Başkanı

Eki
1 dosya

Not: Yanıtlarımızda yazımızın gün ve sayısını belirtmesi rica olunur.
İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi 34303 Cerrahpaşa/İSTANBUL
Telefon 0 (212) 414 32 52 Dahili: 22300 Faks: 0(212) 632 00 40 e-posta:efetik@istanbul.edu.tr.

Karar No: A-03	Tarih:01 Ekim 2013
Doç.Dr.Hrisi BAHAR TOKMAN'ın danışmanlığında Doktora. Öğr. Mehmet DEMİRCİ'nin sorumluluğunda yapılması tasarlanan ve yukarıda başvuru bilgileri verilen klinik araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, gerçekleştirilmesinde etik sakınca bulunmadığına toplantıya katılan etik kurul üyelerinin oy birliği ile karar verilmiştir.	

ÇALIŞMA ESASI	İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
ETİK KURUL BAŞKANI UNVANI/ADI/SOYADI: Prof. Dr. Fatış ALTINDAŞ	

ETİK KURUL ÜYELERİ						
Unvani/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	İlişki *	Katılım **	İmza
Prof. Dr. Fatış ALTINDAŞ (başkan)	Anesteziyoloji ve Reanimasyon	İÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	K	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	<i>Fatih</i>
Prof. Dr. Öner SÜZER (başkan yardımcısı)	Tıbbi Farmakoloji	İÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	E	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	Ankara'da
Prof. Dr. Özgür KASAPÇOPUR (raportör)	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	İÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	E	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	<i>Özgür</i>
Prof. Dr. Mehmet Rıza ALTIPARMAK	İç Hastalıkları	İÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	E	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	<i>Mehmet Rıza</i>
Prof. Dr. Mahmut Reha BAYAR	Ruh Sağlığı ve Hastalıkları	İÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	E	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	<i>Mahmut Reha</i>
Prof. Dr. Sebahattin SAİP	Nöroloji	İÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	E	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	<i>Sebahattin</i>
Prof. Dr. Fahri ERDOĞAN	Ortopedi ve Travmatoloji	İÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	E	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	<i>Fahri</i>
Prof. Dr. Mehmet Faik ÖZÇELİK	Genel Cerrahi	İÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	E	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	<i>Mehmet Faik</i>
Prof. Dr. Nuran Şenel BEŞE	Radyasyon Onkolojisi	İÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	K	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	<i>Nuran Şenel</i>
Doç. Dr. Suphi VEHİD	Halk Sağlığı	İÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	E	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	<i>Suphi</i>
Prof. Dr. Ertan YURDAKOŞ	Fizyoloji	İÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	E	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	<i>Ertan</i>
Prof. Dr. Hatun Hanzade DOĞAN	Deontoloji	İÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	K	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	<i>Hatun</i>
Doç. Dr. Muhlis Cem AR	İç Hastalıkları	İst. Eğitim ve Araştırma Hast.	E	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	<i>Muhlis Cem</i>
Avukat Ayfer DİKMEN	Ticaret ve Sağlık Hukuku	Serbest Hukuk Bürosu	K	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	<i>Ayfer</i>
Zümrüt GAMLI	Emekli Öğretmen	Sivil Üye	K	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	<i>Zümrüt</i>

* :Araştırma ile ilişki

** :Toplantıda Bulunma

PATENT HAKKI İZİNİ

TELİF HAKKI İZİNİ

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Mehmet	Soyadı	Demirci
Doğ.Yeri	Tekirdağ	Doğ.Tar.	23.07.1979
Uyruğu	T.C.	TC Kim No	15776103190
Email	demircimehmet@hotmail.com	Tel	05337106295

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora	İstanbul üniv. Sağlık Bilimleri enst. Cerrahpaşa Mikrobiyoloji	
Yük.Lis.	İstanbul üniv. Sağlık Bilimleri enst. Cerrahpaşa Mikrobiyoloji	2003
Lisans	İstanbul Üniv. Cerrahpaşa Tıp Fak. Tıbbi Biyolojik Bilimler	2000
Lise	İstanbul Fatih Davutpaşa Lisesi	1996

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Uygulama Uzmanı	Roche Diagnostics Turkey	2006 -
2.	Ürün Müdürü	Pera Medikal	2004 - 2006
3.	Araştırma Görevlisi	Cerrahpaşa Tıp Fak. Mikrobiyoloji	2000 - 2003

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	Çok iyi	İyi	Çok iyi	66,250	

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı	71.390	71.272	69,877
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Windows 7	Çok iyi
Microsoft Office	Çok iyi

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

Özel İlgi Alanları (Hobileri):Basketbol, Bilgisayar oyunları