



**T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**DİYABET FARE MODELİNDE MISIR, YONCA VE ÇAYIROTU
KAYNAKLI FERMENTE BİTKİ SIVILARININ (PFJ) BAĞIRSAK
MİKROBİYOTASI PROFİLİ ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

ASLI NUR AYDEMİR

GENETİK ANA BİLİM DALI

**Şanlıurfa
2025**



**T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**DİYABET FARE MODELİNDE MISIR, YONCA VE ÇAYIROTU
KAYNAKLI FERMENTE BİTKİ SIVILARININ (PFJ) BAĞIRSAK
MİKROBİYOTASI PROFİLİ ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

ASLI NUR AYDEMİR

**GENETİK ANA BİLİM DALI
Tez Danışmanı: AKIN YİĞİN**

**Şanlıurfa
2025**

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmam süresince bilgi ve deneyimiyle yol gösteren; Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Genetik Anabilim Dalı öğretim üyesi, değerli tez danışmanım Doç. Dr. Akın YİĞİN'e, akademik katkıları ve yapıcı yönlendirmeleriyle bu süreci benim için öğretici ve geliştirici kıldığı için saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans sürecim boyunca bilgi ve desteğini esirgemeyen Genetik Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Faruk BOZKAYA'ya teşekkür ederim.

Akademik hayatıma yön vermemde büyük katkı sağlayan; yalnızca akademik anlamda değil, desteğiyle de her zaman yanımda olan kıymetli hocam Prof. Dr. Emine Ümran ÖRSÇELİK'e gönülden minnettarım.

Her daim güven veren varlığı, inancı ve desteğiyle beni güçlü kılan; çalışkanlığı ve dürüstlüğüyle hayat boyu yolumu aydınlatan kıymetli babam Prof. Dr. Salih AYDEMİR'e; sevgi, sabır ve sonsuz anlayışıyla her koşulda yanımda olan canım annem Kezban AYDEMİR'e; desteği benim için çok kıymetli olan ve her zaman yanımda hissettiğim biricik abim Ali Emre AYDEMİR'e ve hayatımın her döneminde varlığıyla bana güç veren canımın içi kardeşim Dr. Hatice Nurhayat AYDEMİR'e, yalnızca bu tez sürecinde değil, bugün olduğum birey olmamda sundukları tüm emek ve fedakârlıklar için sonsuz teşekkür ederim.

Ayrıca üniversite yıllarımdan bu yana dostluğunu ve desteğini hiç esirgemeyen, ailemizin bir parçası hâline gelen sevgili arkadaşım Başak AYDEMİR'e teşekkür ederim. Son olarak, biricik yeğenim Asya Karen AYDEMİR'e; bana halalık duygusunu tattırdığı ve varlığıyla dünyamı güzelleştirdiği için tarifsiz bir sevgiyle teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
ŞEKİLLER DİZİNİ	iii
ÇİZELGELER DİZİNİ	iv
KISALTMALAR	v
1. GİRİŞ	1
1.1. Diyabet	2
1.1.1. Tip 1 Diyabet	2
1.1.2. Tip 2 Diyabet	2
1.1.3. Gestasyonel Diyabet	2
1.1.4. Diğer Spesifik Tipler	3
1.2. Probiyotikler	3
1.3. Silaj	3
1.4. Fermente Edilmiş Laktik Asit Sıvısı (PFJ)	4
1.5. Yeni Nesil Dizileme (Next-Generation Sequencing, NGS)	5
1.6. Metagenomik Analiz	6
1.7. Mikrobiyota	7
1.8. 16SV3F ve 16SV3R Primerleri	8
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	10
3. GEREÇ VE YÖNTEM	11
3.1. Gereçler	11
3.1.1. Deney Hayvanları ve Gruplar	11
3.1.2. PFJ'lerin Hazırlanması	11
3.2. Yöntemler	11
3.2.1. Diyabet Modelinin Oluşturulması ve Örnek Toplama	11
3.2.2. Doku Homojenizasyonu ve DNA İzolasyonu	12
3.2.3. PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) Amplifikasyonu	13
3.2.4. PZR Ürünü Temizliği ve DNA Kütüphanesi	14
3.2.5. Biyoinformatik Analizler	15
3.2.6. DeneySEL Sürece Ait Görsel Kayıtları	16
4. BULGULAR	19
4.1. Moleküler Bulgular	19
4.1.1. Alfa Çeşitliliği	19
4.1.2. Beta Çeşitliliği	23
4.1.3. Taksonomik Dağılım	25
4.2. Biyokimyasal Bulgular	39
5. TARTIŞMA	46
6. SONUÇLAR	49
7. ÖNERİLER	50
KAYNAKLAR	51
ÖZGEÇMİŞ	58

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DIYABET FARE MODELİNDE MISIR, YONCA VE ÇAYIROTU KAYNAKLI FERMENTE BİTKİ SIVILARININ (PFJ) BAĞIRSAK MİKROBİYOTASI PROFİLİ ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

ASLI NUR AYDEMİR

**HARRAN ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
GENETİK ANA BİLİM DALI**

Yıl: 2025, Sayfa : 58

Bu çalışmada, diyabet fare modelinde mısır, yonca ve çayırotu bitkilerinden elde edilen fermente bitki sıvılarının (PFJ) bağırsak mikrobiyotası üzerindeki etkileri metagenomik yöntemlerle değerlendirilmiştir. Çalışmada 30 erkek Balb/c fare, beş gruba (Kontrol, Pozitif Kontrol, Çayırotu PFJ, Mısır PFJ ve Yonca PFJ) ayrılmıştır. Tip 2 diyabet modeli Streptozotosin (STZ) uygulamasıyla oluşturulmuş, deney süresince PFJ'ler içme suyuna ilave edilerek uygulanmıştır. Deney sonunda bağırsak örneklerinden DNA izolasyonu yapılmış, 16S rRNA geninin V3–V4 bölgeleri yeni nesil dizileme (NGS) yöntemiyle analiz edilmiştir. Alfa ve beta çeşitlilik analizleri, PFJ uygulamalarının bağırsak mikrobiyotasında dengeleyici etkiler oluşturduğunu göstermiştir. Kontrol grubunda mikrobiyal çeşitlilik en yüksek düzeyde iken, Pozitif Kontrol grubunda belirgin azalma gözlenmiştir. PFJ uygulamaları özellikle Mısır ve Çayırotu PFJ gruplarında çeşitliliğin yeniden arttığını göstermiştir. Taksonomik analizlerde bağırsak mikrobiyotasında temel şubeler olan Firmicutes ve Bacteroidota'nın baskın olduğu ve PFJ uygulamalarının bu dengeyi koruduğu belirlenmiştir. Buna ek olarak, metabolik parametrelerin değerlendirilmesi Yonca PFJ grubunun diğer tüm gruplara kıyasla en yüksek insülin düzeyini gösterdiği ve kan glukozunun anlamlı biçimde düştüğünü göstermiştir. Bu bulgular doğrultusunda, PFJ uygulamalarının diyabete bağlı mikrobiyal disbiyozisi hafiflettiği, bağırsak mikrobiyotasının yapısal çeşitliliğini desteklediği ve potansiyel bir biyoterapötik ajan olarak değerlendirilebileceği sonucuna varılmıştır.

ANAHTAR KELİMELELER: Bağırsak mikrobiyotası, Diyabet, PFJ, Metagenomik analiz

ABSTRACT

MASTER THESIS

EVALUATION OF THE EFFECTS OF FERMENTED PLANT JUICES (PFJ) DERIVED FROM CORN, ALFALFA, AND MEADOW GRASS ON GUT MICROBIOTA PROFILE IN A DIABETIC MOUSE MODEL

ASLI NUR AYDEMİR

**HARRAN UNIVERSITY
INSTITUTE OF GRADUATE EDUCATION
DEPARTMENT OF GENETICS**

Year: 2025, Page : 58

In this study, the effects of fermented plant juices (PFJs) obtained from corn, alfalfa, and meadow grass on the gut microbiota in a diabetic mouse model were evaluated using metagenomic methods. Thirty male Balb/c mice were divided into five groups (Control, Positive Control, Meadow Grass PFJ, Corn PFJ, and Alfalfa PFJ). The type 2 diabetes model was induced by streptozotocin (STZ) administration, and PFJs were administered by adding them to the drinking water throughout the experiment. At the end of the experiment, DNA was isolated from intestinal samples, and the V3–V4 regions of the 16S rRNA gene were analyzed using next-generation sequencing (NGS). Alpha and beta diversity analyses showed that PFJ treatments exerted a balancing effect on the gut microbiota. Microbial diversity was highest in the Control group, whereas a significant decrease was observed in the Positive Control group. PFJ treatments particularly increased diversity in the Corn PFJ and Meadow Grass PFJ groups. Taxonomic analyses revealed that the dominant phyla in the gut microbiota were Firmicutes and Bacteroidota, and PFJ treatments helped maintain this natural balance. Furthermore, metabolic parameter evaluations indicated that the Alfalfa PFJ group exhibited the highest insulin levels and a significant reduction in blood glucose compared to all other groups. Overall, these findings suggest that PFJ treatments alleviate diabetes-related microbial dysbiosis, support the structural diversity of the gut microbiota, and may be considered potential biotherapeutic agents.

KEYWORDS: Gut microbiota, Diabetes, PFJ, Metagenomic analysis

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1. Deney hazırlıkları →STZ çözeltisi hesaplanması ve hazırlanması (a-d), gruplandırmanın yapılması (e), PFJ lerin hazırlanması (f-h).	16
Şekil 3.2. Deney uygulaması → STZ enjeksiyonu (a,b), PFJ uygulaması (c-e), diseksiyon öncesi hazırlıklar (f-h), diseksiyon (ı-k) ve örneklerin analiz için kuru buz ile firmaya gönderimi (l).	17
Şekil 3.3. Glukoz ölçümleri sırasında kullanılan glukometre ile kan şekeri ölçümünün yapılışı (a), cihaz ekranına yansıyan ölçüm sonuçları (b-e), 600 mg/dL üzerinde kaydedilen bir değer örneği (e) ve biyokimyasal analizlerde kullanılmak üzere alınan kan örnekleri (f, g).	18
Şekil 4.1. Örnek gruplarına ait gözlenen tür (Observed Features) zenginliği.	21
Şekil 4.2. Örnek gruplarının tahmini tür zenginliği (Chao1 Zenginlik İndeksi).	21
Şekil 4.3. Örnek gruplarının çeşitlilik düzeyi (Shannon Çeşitlilik İndeksi)	22
Şekil 4.4. Örnek gruplarının çeşitlilik düzeyi (Simpson Çeşitlilik İndeksi).	22
Şekil 4.5. Örnek gruplarının filogenetik çeşitliliği (Faith Filogenetik Çeşitlilik (PD) İndeksi).	23
Şekil 4.6. Örnek gruplarının örnekleme yeterliliği (Good Kapsam İndeksi (Good coverage)).	23
Şekil 4.7. Örnek gruplarının mikrobiyal topluluk yapılarının PCoA analizi (PC1: %41,69; PC2: %34,52; PC3: %23,79).	24
Şekil 4.8. Filogenetik ağaç.	25
Şekil 4.9. Gruplara göre baskın bakteri şubelerinin yüzde (%) dağılımı.	25
Şekil 4.10. Kontrol grubu bağırsak mikrobiyotasında en baskın taksonların aile düzeyinde bağıl bolluk dağılımı (%).	27
Şekil 4.11. Pozitif Kontrol grubu bağırsak mikrobiyotasında en baskın taksonların aile düzeyinde bağıl bolluk dağılımı (%).	27
Şekil 4.12. Çayırotu PFJ grubu bağırsak mikrobiyotasında en baskın taksonların aile düzeyinde bağıl bolluk dağılımı (%).	28
Şekil 4.13. Mısır PFJ grubu bağırsak mikrobiyotasında en baskın taksonların aile düzeyinde bağıl bolluk dağılımı (%).	28
Şekil 4.14. Yonca PFJ grubu bağırsak mikrobiyotasında en baskın taksonların aile düzeyinde bağıl bolluk dağılımı (%).	29
Şekil 4.15. Kontrol grubu bağırsak mikrobiyotasında en baskın taksonların cins düzeyinde bağıl bolluk dağılımı (%).	31
Şekil 4.16. Pozitif Kontrol grubu bağırsak mikrobiyotasında en baskın taksonların cins düzeyinde bağıl bolluk dağılımı (%).	32
Şekil 4.17. Çayırotu PFJ grubu bağırsak mikrobiyotasında en baskın taksonların cins düzeyinde bağıl bolluk dağılımı (%).	32
Şekil 4.18. Mısır PFJ grubu bağırsak mikrobiyotasında en baskın taksonların cins düzeyinde bağıl bolluk dağılımı (%).	33
Şekil 4.19. Yonca PFJ grubu bağırsak mikrobiyotasında en baskın taksonların cins düzeyinde bağıl bolluk dağılımı (%).	33
Şekil 4.20. Kontrol grubuna ait Krona pasta grafiği.	34
Şekil 4.21. Pozitif Kontrol grubuna ait Krona pasta grafiği.	34
Şekil 4.22. Çayırotu PFJ grubuna ait Krona pasta grafiği.	35
Şekil 4.23. Mısır PFJ grubuna ait Krona pasta grafiği.	35
Şekil 4.24. Yonca PFJ grubuna ait Krona pasta grafiği.	36
Şekil 4.25. Grupların en baskın şube düzeyinde OTU dağılımını gösteren çubuk grafik.	37
Şekil 4.26. Grupların en baskın aile düzeyinde OTU dağılımını gösteren çubuk grafik.	38
Şekil 4.27. Grupların en baskın cins düzeyinde OTU dağılımını gösteren çubuk grafik.	39
Şekil 4.28. Gruplara göre diseksiyon günü elde edilen ortalama $\pm$ SD serum glukoz düzeylerinin karşılaştırılması.	41
Şekil 4.29. Gruplara göre diseksiyon günü elde edilen ortalama $\pm$ SD serum insülin düzeylerinin karşılaştırılması.	41
Şekil 4.30. Gruplara göre diseksiyon günü elde edilen ortalama $\pm$ SD serum alanin aminotransferaz (ALT) düzeylerinin karşılaştırılması.	42
Şekil 4.31. Gruplara göre diseksiyon günü elde edilen ortalama $\pm$ SD serum aspartat aminotransferaz (AST) düzeylerinin karşılaştırılması.	42

Şekil 4.32. Gruplara göre diseksiyon günü elde edilen ortalama $\pm$ SD serum üre düzeylerinin karşılaştırılması.	43
Şekil 4.33. Gruplara göre diseksiyon günü elde edilen ortalama $\pm$ SD serum kreatin düzeylerinin karşılaştırılması.	43
Şekil 4.34. Gruplara göre diseksiyon günü elde edilen ortalama $\pm$ SD serum kortizol düzeylerinin karşılaştırılması.	44

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1.	İzole edilen sürüntü örneklerinin DNA konsantrasyonları.	13
Çizelge 3.2.	PZR için kullanıların primerlerin nükleik asid dizileri.	14
Çizelge 4.1.	Denek gruplarına göre giriş yüzdeleri (%) ve diğer değerler.	19
Çizelge 4.2.	Alfa çeşitliliği indekslerine göre grupların değerleri.	19
Çizelge 4.3.	Gruplara göre baskın bakteri ailelerinin yüzde (%) dağılımı.	26
Çizelge 4.4.	Gruplara göre baskın bakteri cinslerinin yüzde (%) dağılımı	29
Çizelge 4.5.	Tespit edilen amplikon dizilerinin uzunluklarına ilişkin tanımlayıcı istatistikler (bp).	36
Çizelge 4.6.	Grupların en baskın aile düzeyinde OTU dağılımı.	37
Çizelge 4.7.	Grupların en baskın cins düzeyinde OTU dağılımı.	38
Çizelge 4.8.	Gruplar arası biyokimyasal parametrelerin karşılaştırılması (Ortalama $\pm$ SD). ANOVA ve Tukey çoklu karşılaştırma testi sonuçları.	44

KISALTMALAR

ASV	Amplikon Sekans Varyantı (Amplicon Sequence Variant)
DM	Diyabetes Mellitus (Diabetes Mellitus)
DNA	Deoksiribonükleik Asit (Deoxyribonucleic Acid)
FAO	Gıda ve Tarım Örgütü (Food and Agriculture Organization)
GLP-1	Glukagon Benzeri Peptid-1 (Glucagon-Like Peptide-1)
GLP-1	Glukagon Benzeri Peptid-1 (Glucagon-Like Peptide-1)
LAB	Laktik Asit Bakterileri (Lactic Acid Bacteria)
LPS	Lipopolisakkarit (Lipopolysaccharide)
MODY	Gençlerde Ortaya Çıkan Olgunluk Tipi Diyabet (Maturity Onset Diabetes of the Young)
NGS	Yeni Nesil Dizileme (Next-Generation Sequencing)
OTU	Operasyonel Taksonomik Birim (Operational Taxonomic Unit)
PBS	Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi (Phosphate Buffered Saline)
PCoA	Temel Koordinatlar Analizi (Principal Coordinates Analysis)
PCR / PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)
PD	Filogenetik Çeşitlilik (Phylogenetic Diversity)
PFJ	Fermente Bitki Kaynaklı Laktik Asit Sıvısı (Pressed Fermented Juice)
RNA	Ribonükleik Asit (Ribonucleic Acid)
RNase A	Ribonükleaz A (Ribonuclease A)
SBS	Sentezle Dizileme (Sequencing by Synthesis)
SCFA	Kısa Zincirli Yağ Asidi (Short Chain Fatty Acid)
STZ	Streptozotosin (Streptozotocin)
T2DM	Tip 2 Diyabetes Mellitus (Type 2 Diabetes Mellitus)
WHO	Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization)

1. GİRİŞ

Diyabetes mellitus (DM), insülin salgısındaki yetersizlik ya da vücudun insüline yanıt verebilme özelliğinin bozulması ile ortaya çıkan, kan glukoz düzeyinin sürekli yüksek seyretmesiyle tanımlanan bir metabolik hastalıktır (Petersmann vd., 2019). Dünya genelinde giderek artan görülme sıklığı nedeniyle önemli bir halk sağlığı sorunu haline gelen diyabet, yalnızca bireylerin yaşam kalitesini düşürmekle kalmayıp sağlık sistemlerine de ciddi ekonomik yükler getirmektedir (American Diabetes Association [ADA], 2023). Uluslararası Diyabet Federasyonu'nun 2021 verilerine göre dünya genelinde yaklaşık 537 milyon yetişkin diyabet hastası bulunmaktadır ve bu sayının 2030 yılına kadar 643 milyona ulaşacağı düşünülmektedir (International Diabetes Federation [IDF], 2021). Uzun dönemli komplikasyonlar arasında kardiyovasküler hastalıklar, nöropati, nefropati ve retinopati gibi birçok sistemik sorun yer almaktadır (ADA, 2023).

Geleneksel diyabet patofizyolojisi çoğunlukla pankreatik fonksiyonlar ve glukoz metabolizması üzerinden değerlendirilmiş olsa da, son yıllarda bağırsak mikrobiyotasının bu süreçlerde düşündüğümüzden çok daha önemli bir yere sahip olduğu anlaşılmıştır (Qin vd., 2012). Bağırsak mikrobiyotası, bağışıklık düzenlenmesi, enerji dengesi ve metabolik homeostaz gibi pek çok temel işlevde rol almaktadır (Sommer ve Bäckhed, 2013). Ancak diyabet gibi kronik hastalıklar bu mikrobiyal dengeyi bozarak disbiyozis adı verilen duruma neden olur. Bu da yararlı bakteri türlerinin azalması, patojen türlerin çoğalması, bağırsak bariyer bütünlüğünün zayıflaması ve sistemik inflamasyonun artması gibi sonuçlara yol açabilir (Cani ve Delzenne, 2009).

Bu mikrobiyal değişimlerin anlaşılması, diyabetin önlenmesi ve tedavisinde mikrobiyotaya yönelik yeni yaklaşımların önünü açmıştır. Son yıllarda, probiyotikler, prebiyotikler, simbiyotikler ve fermente bitkisel ürünler üzerine yapılan çalışmalar dikkat çekmektedir (Zmora vd., 2019). Bitki bazlı fermente ürünlerin içerdiği canlı mikroorganizmalar ve biyolojik olarak aktif bileşenlerin, özellikle mikrobiyota dengesini destekleme ve bağışıklık sistemini düzenleme yönünde olumlu etkiler sağlayabileceği bildirilmektedir (Sonnenburg ve Bäckhed, 2016).

PFJ (Plant Fermented Juice) olarak adlandırılan fermente bitki sıvıları, probiyotik ve prebiyotik özellikleri bir araya getirme potansiyeli taşır (Rezac vd., 2018). Mısır, yonca ve çayırotu gibi bitkiler fermente edildiğinde ortaya çıkan polifenoller, flavonoidler ve laktik asit bakterileri, bağırsak mikrobiyotasını

destekleyici yönde etkiler oluşturabilir (Zhang vd., 2018). Ancak PFJ'lerin diyabetle ilişkili mikrobiyal değişimler üzerindeki etkilerini inceleyen çalışma sayısı oldukça sınırlıdır. Bu konudaki mevcut bilgiler umut verici olsa da yeni araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

1.1. Diyabet

DM, insülinin yetersizliği ya da dokuların bu hormona yanıt verememesi sonucunda gelişen ve kalıcı hiperglisemi ile seyreden metabolik bir bozukluktur. Uzun süreli yüksek glukoz düzeyleri yalnızca karbonhidrat metabolizmasını değil, aynı zamanda yağ ve protein metabolizmasını da etkileyerek geniş kapsamlı fizyolojik hasarlara yol açabilir. Süreç ilerlediğinde sinir sistemi, renal yapı, retina ve kardiyovasküler sistem üzerinde geri dönüşü zorlaşan hasarlar görülebilir. DM, klinik özellikleri ve nedenleri temel alınarak dört ana kategoriye ayrılır (ADA, 2023).

1.1.1. Tip 1 Diyabet

Tip 1 diyabet, bağışıklık sisteminin pankreastaki beta hücrelerini hedef alması sonucunda gelişir ve insülin üretimi büyük ölçüde ortadan kalkar. Genellikle erken yaşta başlar ve yaşam boyu insülin uygulaması gerektirir.

1.1.2. Tip 2 Diyabet

Tip 2 diyabet, hücrelerin insüline duyarlılığının azalmasıyla ortaya çıkar ve zaman içinde insülin üretiminin görece yetersiz hale gelmesiyle ilerler. Başlangıçta pankreas üretimi telafi etmeye çalışsa da süreç içerisinde bu kapasite zayıflar. Hastalığın gelişiminde obezite, sedanter yaşam, beslenme alışkanlıkları ve genetik faktörler önemli rol oynar. Erken dönem belirti vermeden ilerlediği için tanı çoğu zaman gecikir ve bu da komplikasyon gelişimini kolaylaştırır (Zheng, 2018).

Son yıllarda bağırsak mikrobiyotası ile Tip 2 diyabet arasındaki ilişkiye dikkat çekilmiş; mikrobiyal dengenin bozulmasının inflamasyon ve metabolik endotoksemi yoluyla insülin direncine katkı sağlayabileceği öne sürülmüştür. Tedavide yaşam tarzı değişiklikleri temel yaklaşım olup, gerektiğinde farmakolojik tedaviler uygulanır. Güncel olarak probiyotiklerin, prebiyotiklerin ve bitkisel fermente ürünlerin destekleyici biyoterapötik seçenekler olarak kullanımına yönelik araştırmalar artmaktadır (Qin vd., 2012).

1.1.3. Gestasyonel Diyabet

Gestasyonel diyabet, gebeliğin ilerleyen dönemlerinde ortaya çıkan glukoz

tolerans bozukluğudur. Genellikle doğum sonrasında geriler ancak hem anne hem de çocuk için gelecekte Tip 2 diyabet geliştirme riskini artırır.

1.1.4. Diğer Spesifik Tipler

Bu grupta monojenik kökenli diyabetler (örneğin MODY), ekzokrin pankreas patolojilerine bağlı diyabetler ve bazı ilaçların (kortikosteroidler gibi) tetiklediği diyabet türleri yer alır.

1.2. Probiyotikler

Probiyotikler, yeterli miktarda alındıklarında konak canlı üzerinde yararlı etkiler oluşturabilen mikroorganizmalardır. En sık kullanılan probiyotik türler arasında *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Saccharomyces* ve bazı *Bacillus* türleri bulunmaktadır. Bu mikroorganizmalar, patojenlere karşı rekabet ederek bağırsakta kolonizasyon dengesini korur, bağışıklık sisteminin düzenlenmesine katkı sağlar ve mukozal bariyerin bütünlüğünü destekler. Bazıları ayrıca antienflamatuvar moleküllerin üretimini artırabilir ve kısa zincirli yağ asitleri oluşturarak bağırsak hücrelerine enerji sağlar. Metabolik hastalıklarla ilişkili çalışmalar, belirli probiyotik takviyelerin Tip 2 diyabet dâhil bazı bozukluklarda olumlu etkiler yaratabileceğini göstermektedir (Hill vd., 2014).

1.3. Silaj

Silaj, taze ve nemli yem bitkilerinin oksijensiz bir ortamda fermente edilerek uzun süre saklanmasını sağlayan bir yem yöntemidir (McDonald vd., 1991). Bu yöntem özellikle ruminant beslenmesinde yaygın olup yeşil yemlerin besin değerini korumayı amaçlar. Mısır, sorgum, yonca ve çayırotu gibi bitkiler silaj üretiminde en sık tercih edilen türlerdir (Kung vd., 2018).

Fermente yemler kuru madde, ham protein, lif içeriği, laktik asit bakterileri ve organik asitler gibi bileşenlerden oluşur (Muck ve Shinnors, 2001). Silajın kalitesi kullanılan bitki materyalinin besin yapısına, hasat zamanına, doğrama uzunluğuna, sıkıştırılma derecesine ve fermentasyon sürecindeki mikrobiyal aktiviteye bağlı olarak şekillenir (Weinberg ve Muck, 1996).

Ruminant beslenmesinde silaj önemli bir enerji ve protein kaynağıdır. Süt sığırlarında laktasyon performansını desteklemek, yem tüketimini dengelemek ve maliyeti azaltmak için sıkça tercih edilir (Kolver ve Muller, 1998). Düzenli silaj kullanımı rumen mikrobiyal dengesinin korunmasına ve sindirimin daha verimli

olmasına katkı sağlar (Filya, 2003). Ayrıca yeşil yem eksikliğinin görüldüğü dönemlerde hayvanların beslenme sürekliliğini korur (Baytok vd., 2005).

Silaj üretimi sırasında oluşan laktik asit gibi organik asitler pH'nın düşmesine katkı sağlar ve bu durum ürünün bozulmasını geciktirir. Bu yönüyle silaj, hem sürdürülebilir hayvancılık hem de kaliteli yem üretimi açısından önemli bir yer tutar (Kung vd., 2018).

1.4. Fermente Edilmiş Laktik Asit Sıvısı (PFJ)

Fermente bitki bazlı laktik asit sıvısı (Pressed Fermented Juice – PFJ), belirli bitkilerin, uygun çevresel koşullar altında laktik asit bakterileri (LAB) ile fermente edilmesiyle elde edilen ve canlı mikroorganizmalarla birlikte çeşitli metabolitleri içeren biyolojik olarak aktif bir sıvıdır (Matsuoka vd., 2016). Bu ürün yalnızca probiyotik bakterileri değil, aynı zamanda bu bakterilerin sentezlediği ürettiği SCFA, enzimler ve antioksidan özellik taşıyan postbiyotik bileşenleri de barındırır (Marco vd., 2017). Bu bileşiklerin birlikte bulunması hem bağırsak mikrobiyotasının desteklenmesinde hem de konak sağlığı üzerinde olumlu etkilerin ortaya çıkmasında etkilidir.

Fermentasyon sürecinde karbonhidrat içeren bitkisel bileşikler LAB tarafından organik asitlere dönüştürülür. Bu dönüşüm fermente edilen ürünlerin yalnızca mikrobiyal stabilitesini ve raf ömrünü artırmakla kalmaz, aynı zamanda biyolojik işlevselliğini de zenginleştirir (Rezac vd., 2018; Saulnier vd., 2013).

PFJ'lerin içerdiği biyolojik bileşenlerin türü ve miktarı fermentasyonda kullanılan bitkinin yapısına bağlı olarak değişkenlik gösterir. Örneğin mısır, yonca ve çayırotu gibi bitkiler yüksek lif, fenolik madde ve flavonoid içerikleriyle bilinir. Bu maddeler fermentasyon süreciyle daha biyoyararlı formlara dönüşerek bağırsak tarafından daha kolay emilebilir hale gelir (Zhang vd., 2018). Bu özellik PFJ'leri probiyotik etkiler ile bitkisel biyoaktif bileşenlerin yararlarını bir araya getiren fonksiyonel bir ürün haline getirir (Choi vd., 2020).

Bağırsak sağlığına yönelik etkileri bağlamında değerlendirildiğinde, PFJ'lerde bulunan LAB kaynaklı organik asitlerin bağırsağın pH dengesini düşürerek zararlı mikroorganizmaların çoğalmasını engellediği ve buna karşılık faydalı bakterilerin tutunmasını kolaylaştırdığı görülmektedir (Hill vd., 2014). Ayrıca postbiyotik bileşenlerin bağırsak bariyerini güçlendirebildiği ve inflamatuvar süreçleri azaltabildiği bildirilmiştir (Sonnenburg ve Bäckhed, 2016).

Metabolik hastalıklarla ilişkilendirilen araştırmalar özellikle tip 2 diyabet gibi durumlarda bağırsak mikrobiyotasının bozulmasının insülin direnci, glikoz metabolizması ve sistemik inflamasyon üzerinde olumsuz sonuçlara yol açabileceğini ortaya koymuştur (Gurung vd., 2020). Bu çerçevede PFJ gibi hem probiyotik hem de postbiyotik yönü güçlü ürünlerin, mikrobiyal dengeyi yeniden kurma ve metabolik yanıtları iyileştirme konusunda potansiyel taşıdığı değerlendirilmektedir. Özellikle SCFA'ların bağırsakta Glukagon benzeri peptid-1 (GLP-1) hormonunun salgılanmasını artırarak glukoz kontrolü ve insülin hassasiyetini olumlu etkilediği ifade edilmiştir (Yadav vd., 2013).

PFJ, içerdiği mikroorganizmalar ve biyoaktif bileşenler sayesinde bağırsak odaklı biyoterapötik stratejilerde dikkat çeken doğal bir alternatiftir. Veteriner ve insan sağlığı alanında değerlendirilme potansiyeli taşımaktadır.

1.5. Yeni Nesil Dizileme (Next-Generation Sequencing, NGS)

Yeni Nesil Dizileme (Next Generation Sequencing – NGS), deoksiribonükleik asit (DNA) ve ribonükleik asit (RNA) örneklerinin çok kısa sürede ve yüksek verimle dizilenmesini sağlayan ileri bir moleküler biyoloji teknolojisidir. Geleneksel Sanger dizileme yöntemine göre çok daha fazla miktarda veriyi kısa sürede üretebildiği için genetik araştırmalarda yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Goodwin vd., 2013).

NGS yönteminde biyolojik materyalden elde edilen nükleik asitler parçalanır, kütüphane oluşturulur ve çok sayıda küçük DNA parçası aynı anda dizilenir (Mardis, 2017). Bu yöntem mikrobiyal çeşitlilik çalışmalarında büyük avantaj sağlar (Liu vd., 2012; Scholz vd., 2012).

Veteriner hekimlikten insan tıbbına kadar birçok alanda uygulama bulan NGS, özellikle bağırsak mikrobiyotası çalışmalarında 16S ribozomal RNA (rRNA) gen bölgesinin dizilenmesinde yaygındır. Prokaryotlara özgü ve evrimsel olarak korunan bu gen mikroorganizmaların taksonomik düzeyde tanımlanmasına olanak sağlar (Janda ve Abbott, 2007). V3–V4 gibi bölgelerin amplifikasyonu için kullanılan özgül primerler mikrobiyal kompozisyonun doğru şekilde belirlenmesine katkı sağlamaktadır (Klindworth vd., 2013). Elde edilen dizilim verileri, biyoinformatik analizlerle işlenerek mikrobiyal çeşitlilik, baskın türler, genetik varyasyonlar ve potansiyel işlevsel farklılıklar gibi parametrelerin ayrıntılı biçimde incelenmesine olanak tanımaktadır (Ranjan vd., 2016; Slatko vd., 2018).

NGS teknolojilerinin sunduğu yüksek doğruluk oranı ve güvenilir veri çıktısı, özellikle Illumina tabanlı platformları mikrobiyota araştırmalarında öne çıkarmıştır (Glenn, 2011; Mardis, 2013). Bu sayede, bağırsak mikrobiyotasında PFJ gibi uygulamaların neden olduğu mikrobiyal değişimlerin tür düzeyinde tespiti ve karşılaştırmalı metagenomik analizlerle değerlendirilmesi mümkün hale gelmiştir.

1.6. Metagenomik Analiz

Metagenomik, çevresel örneklerden elde edilen mikrobiyal DNA'nın kültür aşamasına ihtiyaç duyulmadan analiz edilmesine olanak sağlayan bir yöntemdir. Klasik mikrobiyolojik tekniklerin erişemediği, kültürlenemeyen mikroorganizmaları da kapsayarak mikrobiyal çeşitliliğin çok daha geniş bir çerçevede değerlendirilmesini mümkün kılar (Handelsman vd., 1998). Böylece mikroorganizmaların doğal ortamlarında sahip oldukları genetik içerikler, yapı ve işlev açısından bütüncül bir biçimde analiz edilebilmektedir.

Özellikle bağırsak gibi çok sayıda mikroorganizma barındıran karmaşık ekosistemlerde metagenomik yöntemlerin kullanımı ön plana çıkmıştır. Yeni nesil dizileme teknolojileri sayesinde aynı örnek içerisinde bulunan binlerce farklı mikroorganizmanın genomik içeriği eşzamanlı olarak ayrıntılı biçimde incelenebilir. Bu sayede yalnızca mikrobiyal türlerin oranları değil, genetik çeşitlilik ve potansiyel metabolik aktiviteler de belirlenebilmektedir (Qin vd., 2012).

Metagenomik analizler genel olarak iki temel yöntemle yapılır. İlki olan 16S rRNA gen dizilemesidir. Bu yöntem özellikle bakteriyel toplulukların sınıflandırılması ve filogenetik analizleri için tercih edilmektedir. Diğer yöntem olan shotgun metagenomik dizileme ise örnekte bulunan tüm DNA'nın rastgele dizilenmesine dayanır ve tür düzeyinin ötesinde gen, protein ve metabolik yolak gibi işlevsel düzeyde bilgi sağlar (Sharpton, 2014).

Bu teknikler başta diyabet olmak üzere çeşitli metabolik hastalıkların mikrobiyal bileşenlerle ilişkisini araştırmak için yaygın olarak kullanılmaktadır. Diyabetli bireylerde yapılan çalışmalar yararlı bakteri türlerinin azalabildiğini ve inflamasyonla ilişkili türlerin artabileceğini göstermiştir (Qin vd., 2012). Bu mikrobiyal değişimlerin sistemik inflamasyonun artışı ve insülin direnci gelişimi gibi olumsuz sonuçlara yol açabileceği düşünülmektedir.

Metagenomik yöntemler sadece mikrobiyal çeşitliliği değil, aynı zamanda bu organizmaların hangi biyokimyasal yolları aktive ettiğini de ortaya koyar. Örneğin,

bağırsak mikrobiyotasında yer alan genlerin enerji metabolizması, kısa zincirli yağ asitlerinin üretimi ve bağışıklık sisteminin düzenlenmesi gibi süreçlere nasıl katkı sağladığı bu sayede belirlenebilir (Gill vd., 2006).

Metagenomik analizler mikrobiyal toplulukların kompleks yapısını moleküler düzeyde anlamamıza olanak tanıyarak, kronik hastalıkların altında yatan mikrobiyal etkileşimleri ortaya çıkarmada etkili bir araç sunmaktadır. Bu sayede gelecekte kişiye özgü tanı ve tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesine önemli katkılar sağlanabilir (Qin vd., 2012).

1.7. Mikrobiyota

Mikrobiyota, belirli bir ekosistemde bir arada bulunan bakteri, arkea, mantar ve virüslerden oluşan mikrobiyal toplulukları ifade eder. Bu mikroorganizmalar, konak canlıyla karşılıklı yarar ilişkisi içinde olup, konak fizyolojisinin birçok yönünü etkileyen düzenleyici roller üstlenir (Marchesi ve Ravel, 2015).

İnsan mikrobiyotası yalnızca bağırsaklarla sınırlı olmayıp ağız boşluğu, cilt, solunum sistemi ve ürogenital yollar gibi çeşitli anatomik bölgelerde özel mikrobiyal topluluklar içerebilir (Sommer ve Bäckhed, 2013).

Gastrointestinal sistemde bulunan bağırsak mikrobiyotası, insan mikrobiyotasının en yoğun ve işlevsel parçası olarak kabul edilir. Vücut hücreleriyle yaklaşık eşit sayıda mikroorganizma içerdiği öne sürülmektedir (Sender vd., 2016). Bu topluluklar, enerji üretiminden bağışıklık sisteminin şekillenmesine kadar pek çok süreçte işlev görür (Sommer ve Bäckhed, 2013).

Bağırsak mikrobiyotası özellikle kompleks karbonhidratların fermentasyonu sonucu SCFA'lar üretir. Asetat, propiyonat ve bütirat gibi bileşikler, kalın bağırsak hücreleri için enerji sağlarken, aynı zamanda inflamatuvar süreçlerin baskılanması, epitel bütünlüğünün korunması ve glikoz metabolizmasının iyileştirilmesinde rol oynar (Wang vd., 2021).

Mikrobiyal çeşitlilik; genetik yapı, doğum şekli, erken dönem beslenme biçimi, çevresel koşullar, antibiyotik kullanımı, yaşam tarzı, yaş ve beslenme alışkanlıkları gibi birçok faktörden etkilenmektedir (Rodriguez vd., 2015). Bu değişkenlerin etkisiyle oluşan dengesizlikler, yani mikrobiyal çeşitliliğin azalması veya zararlı mikroorganizmaların artması “disbiyozis” olarak adlandırılır ve bu durum çeşitli kronik hastalıklarla ilişkilendirilmiştir (Cani, 2018). Disbiyotik

mikrobiyota örüntülerinin özellikle diyabet gibi metabolik hastalıklarla bağlantılı olduğu görülmektedir.

Diyabetli bireylerde yapılan çalışmalar, iltihap yapıcı özellik taşıyan bakterilerin oranında artış, buna karşın antiinflamatuvar türlerde azalma olduğunu ortaya koymuştur (Qin vd., 2012). Bu değişim, bağırsak geçirgenliğinde bozulmaya, dolaşıma zararlı maddelerin geçişine ve sistemik düzeyde inflamasyon artışına yol açarak insülin direnci gelişimini tetikleyebilir.

Bu nedenlerle, son yıllarda mikrobiyotanın düzenlenmesine yönelik yaklaşımlar ön plana çıkmıştır. Probiyotik, prebiyotik, postbiyotik ve simbiyotik bileşenlerin kullanımı, bu alanda başvuru stratejiler arasında yer alır. Ayrıca, PFJ'lardaki biyoaktif maddeler, mikrobiyal dengeyi olumlu yönde etkileyerek konak sağlığını destekleyici potansiyele sahiptir (Zmora vd., 2019).

Mikrobiyota, sadece sindirim sistemiyle sınırlı kalmayıp genel sağlık durumunun korunmasında da önemli bir rol üstlenmektedir. Sağlıklı mikrobiyal dengenin sürdürülmesi, bağışıklık sisteminin işleyişinden metabolik bozuklukların önlenmesine kadar birçok fizyolojik sürecin düzenlenmesinde belirleyici olmaktadır. Bu kapsamda, mikrobiyotanın hem yapısal hem de işlevsel özelliklerinin daha ayrıntılı biçimde anlaşılması, kişiselleştirilmiş tıp uygulamaları açısından büyük önem taşımaktadır (Cani, 2018).

1.8. 16SV3F ve 16SV3R Primerleri

NGS teknolojilerinde mikrobiyal toplulukların belirlenmesinde en yaygın kullanılan hedef gen, prokaryotlara özgü 16S rRNA genidir (Janda ve Abbott, 2007). Bu gen evrimsel olarak korunmuş ve aynı zamanda değişken bölgeler (V1-V9) içermesi sayesinde, bakterilerin hem sınıflandırılmasına hem de tür düzeyinde ayırımına olanak tanır (Clarridge, 2004). V3 bölgesi mikrobiyal çeşitlilik çalışmalarında sık tercih edilir ve 16SV3F (ileri primer) ile 16SV3R (geri primer) primer çifti bu bölgenin çoğaltılması için kullanılır (Klindworth vd., 2013).

16SV3F ve 16SV3R, 16S rRNA geninin V3 bölgesini hedefleyerek yaklaşık 200-250 baz çifti uzunluğunda bir DNA parçasının Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile çoğaltılmasını sağlar (Muyzer vd., 1993). Bu uzunluk Illumina platformları gibi kısa okuma teknolojileri için idealdir ve dizileme verilerinin yüksek doğrulukla elde edilmesini kolaylaştırır (Caporaso vd., 2012).

Primerlerin özgüllüğü, bakteriyel DNA üzerinde yüksek bağlanma verimliliği sağlarken, ökaryotik ya da çevresel kontaminantlara karşı düşük çapraz bağlanma eğilimi gösterir. Böylece dizileme sonuçları, bakteriyel topluluğun gerçek yapısını daha doğru yansıtır (Klindworth vd., 2013).

16SV3F ve 16SV3R primerlerinin kullanımıyla elde edilen veriler, mikrobiyal alfa ve beta çeşitliliği, taksonomik dağılım ve probiyotiklerin etkilerinin izlenmesi gibi konularda detaylı analizler yapılmasına olanak tanır. Özellikle bağırsak mikrobiyotasına yönelik çalışmalarda, bu primerler yardımıyla belirlenen bakteri grupları üzerinden probiyotiklerin etkisi, disbiyozis düzeyi ve mikrobiyal yanıtlar değerlendirilebilir (Lloyd-Price vd., 2016).

Bu çalışma, diyabetle ilişkili bağırsak mikrobiyotasındaki değişimleri daha bütüncül bir yaklaşımla ele alarak mısır, yonca ve çayırotundan elde edilen PFJ'lerin mikrobiyal çeşitlilik üzerindeki etkilerini karşılaştırmalı biçimde incelemeyi amaçlamaktadır. Böylece hem bitkisel kaynaklı fermente ürünlerin diyabet modelinde oluşturabileceği yapısal iyileşmeler değerlendirilmiş hem de PFJ'lerin klasik probiyotik uygulamalara alternatif olabilecek biyolojik potansiyeli ortaya konmuştur. Çalışmada kullanılan ileri metagenomik analizler, mikrobiyal kompozisyondaki farklılıkların daha ayrıntılı şekilde belirlenmesine olanak sağlamış ve PFJ'lerin bağırsak mikrobiyotasını hedefleyen yeni tedavi yaklaşımlarında değerlendirilebileceğine dair kapsamlı bir zemin sunmuştur. Bu yönüyle araştırma, hem mevcut literatürdeki eksikliklerin tamamlanmasına katkı sağlamış hem de metabolik hastalıkların yönetiminde mikrobiyota odaklı stratejilerin geliştirilmesine yönelik önemli bir adım oluşturmıştır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Diyabetes mellitus ile bağırsak mikrobiyotası arasındaki ilişkiyi inceleyen çalışmalar, özellikle son yıllarda belirgin biçimde artış göstermiştir. Metagenomik analizlere dayalı araştırmalar, tip 2 diyabetli bireylerde ve deneysel hayvan modellerinde mikrobiyal çeşitliliğin azaldığını; Firmicutes ve Bacteroidota oranlarında meydana gelen değişimlerin düşük dereceli inflamasyon ve insülin direnci ile ilişkili olduğunu ortaya koymuştur (Qin vd., 2012; Gurung vd., 2020).

Bağırsak mikrobiyotasını modüle etmeye yönelik yaklaşımlar kapsamında yürütülen çalışmalarda, probiyotikler, prebiyotikler ve fermente gıdaların glukoz metabolizması ve mikrobiyal denge üzerinde olumlu etkiler oluşturabildiği bildirilmiştir (Hill vd., 2014; Sonnenburg ve Bäckhed, 2016). Özellikle bitkisel kaynaklı fermente ürünlerin, içerdikleri laktik asit bakterileri ve biyoaktif bileşenler aracılığıyla bağırsak mikrobiyotasını desteklediği ve metabolik parametreler üzerinde iyileştirici etkiler gösterebildiği belirtilmektedir (Rezac vd., 2018; Zmora vd., 2019).

Fermente bitki sıvıları (PFJ) üzerine yapılan çalışmalar ise ağırlıklı olarak hayvan besleme, silaj kalitesi ve probiyotik özellikler çerçevesinde ele alınmıştır. Mısır, yonca ve çayırotu gibi bitkilerden elde edilen PFJ'lerin mikrobiyal aktiviteyi artırabildiği bildirilmekle birlikte, bu ürünlerin diyabet modeli bağlamında bağırsak mikrobiyotası üzerindeki etkilerinin metagenomik düzeyde değerlendirildiği çalışmaların sınırlı olduğu görülmektedir.

Bu bağlamda, mevcut çalışma; mısır, yonca ve çayırotu kaynaklı PFJ'lerin diyabet fare modelinde bağırsak mikrobiyotası profili üzerindeki etkilerini yeni nesil dizileme temelli metagenomik analizler kullanarak inceleyerek literatürdeki önemli bir boşluğa katkı sunmayı amaçlamaktadır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereçler

3.1.1. Deney Hayvanları ve Gruplar

Çalışma için gerekli deney hayvanları Harran Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (HRÜ-HADYEK) tarafından sağlanmıştır. Etik kurul onayı (Karar No: 2024.05.09) alınmış olup, çalışma Harran Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'nin 24144 numaralı projesi kapsamında desteklenmiştir.

Çalışmada, her biri 30-35 g ağırlığında olan 6'şar adet erkek Balb/c fareden oluşan toplam 5 grup (30 hayvan) kullanılmıştır (Eleazu vd., 2013). Birinci grubu, sağlıklı farelerden oluşan Kontrol grubu (n=6) oluşturmuştur. İkinci grup olan Pozitif Kontrol (PK) grubu (n=6) ise diyabet oluşturulmuş ancak probiyotik uygulaması yapılmamış farelerden oluşmaktadır. Kalan üç grup, ilgili bitkilerden elde edilen PFJ uygulanmış fareleri içermektedir: Çayırotu PFJ grubu (n=6), Mısır PFJ grubu (n=6) ve Yonca PFJ grubu (n=6).

3.1.2. PFJ'lerin Hazırlanması

Fermente laktik asit bakteri sıvıları, Aydın ve Denek (2022), Aydın (2024) ile Hatipoğlu vd. (2024) tarafından bildirilen yöntemler esas alınarak modifiye edilmiştir. Bu amaçla, 1000 g taze bitki materyali (çayırotu, yonca ve mısır silajı) ayrı ayrı 1000 ml steril su ile karıştırılmış ve 2 dakika boyunca parçalanmıştır. Elde edilen karışımlar tülbentten süzülerek steril falkon tüplerine aktarılmıştır. Çayırotundan elde edilen bitki sıvı karışımına %3 oranında melas, mısır silajından elde edilen karışıma %3 oranında melas ve yoncadan elde edilen karışıma ise %3 oranında glikoz ilave edilerek 30 °C'de 5'er gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda elde edilen fermente sıvı kültürleri, deneme süresince 0-4 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.2. Yöntemler

3.2.1. Diyabet Modelinin Oluşturulması ve Örnek Toplama

Çalışmada Kontrol grubundaki hayvanlar sağlıklı bırakılırken, diğer 24 hayvanda Streptozotosin (STZ) uygulaması ile tip 2 diyabet modeli oluşturulmuştur (Shu vd., 2009; Shen vd., 2009).

Diyabet indüksiyonunu takiben Mısır PFJ, Yonca PFJ ve Çayırotu PFJ gruplarına, içme suları aracılığıyla PFJ probiyotiği verilmiştir. Her bir grubun içme

suyuna, 1 L suya 0,5 mL olacak şekilde PFJ eklenmiştir.

PFJ'lerin bağırsak mikrobiyotası üzerindeki etkilerinin belirlenmesi amacıyla, deney süresi sonunda fareler eksanguinasyon yöntemiyle kurban edilmiştir. Kurban sonrası aseptik koşullarda abdominal bölge açılarak bağırsak dokuları dikkatlice çıkarılmıştır. Her bir örnek, steril Eppendorf tüplerine yerleştirilmiş ve DNA izolasyonu yapılmaya kadar -80 °C'de saklanmıştır.

3.2.2. Doku Homojenizasyonu ve DNA İzolasyonu

Örneklerin DNA Ayırma, RNeasy Lysis & Buffer DNA Purification Kit (Kat. No. E3551) yardımıyla, kitin kullanım kılavuzu belgesi gerçekleştirilmiştir.

Doku homojenizasyonu için çıkış dokuları soğutulmuş havan ve tokmak yardımıyla sıvı nitrojen altında ince toz haline getirilir, elde edilen toz (25 mg'a kadar) 2 mL'lik Eppendorf tüpüne aktarılır. Tüpün çökmesi sağlandıktan sonra 350 µL Lyse T tamponu eklenmiş ve çözelti karıştırılmıştır. Yüksek DNA verimi için dokuların tamamen öğütülmesi sağlandı. 25 mg'a kadar doku örneği 2 mL'lik Eppendorf tüpüne bağlandı, üzerine 100 µL Fosfat Tamponlu Tuz çözeltisi (Fosfat Tamponlu Salin - PBS) eklenmiş ve mekanik homojenizatör homojenize edilmiştir. Daha sonra 250 µL Lyse T tamponu eklenmiştir. Her örneğe 2 µL Ribonükleaz A (RNaz A) ve 20 µL Proteinaz K eklenmiş, tüpler vortekslenerek karıştırılmıştır. Doku tamamen parçalanana kadar 56 °C'de 3 saat inkübe edilmiş ve her 15–30 dakikada bir vorteksleme işlemi tekrarlanmıştır.

Nükleik asit izolasyonu aşamasında her tüp 200 µL Sol T tamponu eklenmiş ve vortekslenmiştir. Karışım 70 °C'de 10 dakika inkübe edilmiştir. 200 µL %96–100 etanol eklenmiş ve birkaç kez ters çevrilerek karıştırılmıştır. Karışım 12.000 × g'de 1 dakika döndürülmüştür. Hücre artıkları üst fazdan 600 µL'ye kadar olan kısım, DNA koruyucu spin kolona aktarılmıştır. Spin kolonu 11.000 × g'de 1 dakika döndürülmüştür. Kolon çıkarılmış ve alt kısmı atılmış, kolon yeniden toplama düzeneği yerleştirilmiştir. Kalan lizant da aynı şekilde sütuna aktarılmış ve 11.000 × g'de 2 dakika döndürülmüştür. Kolon çıkarılmış, sıvı kısmı atılmış ve kolonun tekrar toplama ünitesi yerleştirilmiştir. 500 µL Wash TX1 tamponu eklenmiş ve 11.000 × g'de 1 dakika döndürülmüştür. Kolon yeniden toplama düzeneğine yerleştirilmiş ve sıvı kısımlar atılmıştır. 500 µL Wash TX2 tamponu eklenmiş ve 11.000 × g'de 1 dakika döndürülmüştür. Wash TX2 tamponunun kalıntılarını gidermek için kolon ek olarak 11.000 × g'de 1 dakika döndürülmüştür. DNA bağlayıcı spin kolon, 1,5 mL'lik

yeni bir Eppendorf tüpe aktarılmıştır. Kolona 50–150 µL Elüsyon tamponu eklenmiş ve verimi arttırmak amacıyla tampon 80 °C'ye kadar parçalara ayrılmıştır. Kolon, tüp içindeki oda içerisinde 2 dakika inkübe edilmiştir. Kolon 11.000 × g'de 1 dakika döndürülmüştür. Elde edilen DNA çözeltisi -20 °C'de, analiz aşamasına kadar saklanmıştır.

DNA miktarının arttırılması amacıyla Qubit 3 Florometre cihazı kullanılmıştır. Metagenom çalışmaları için örnekler DNA miktarı ve kalitesi belli standartlarda olmalıdır. Bu standartlar dokudan elde edilen DNA örnekleri için beklenen konsantrasyonu 50 ng/µL'dir ve DNA'ların A260/A280 oranlarının 1,8–2,0 aralığında olması saflık göstergesi olarak kabul edilmiştir. DNA sıcaklığı 50 ng/µL'den düşük izolasyon tekrarlanmıştır. İzole edilen sürüntü örneklerinin DNA bileşimleri Çizelge 3.1' de verilmiştir.

Çizelge 3.1. İzole edilen sürüntü örneklerinin DNA konsantrasyonları.

Örnek Numarası	A260/A280 Konsantrasyon (ng/µL)
Kontrol	235
Pozitif Kontrol	320
Çayırotu PFJ	324
Mısır PFJ	248
Yonca PFJ	298

3.2.3. PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) Amplifikasyonu

PZR işlemi için tür tespitinde en sık kullanılan değişken bölge, 16S rRNA geninin V3 ve V4 bölgeleridir. V3 ve V4 bölgelerinin çoğaltılması için kullanılan ileri ve geri yönlü primer dizileri Çizelge 3.2'de gösterilmiştir. Bu primer çifti yaklaşık 460 bazlık bir bölgeyi çoğaltır. Farelerin bağırsaklarından alınan doku örneklerinden elde edilen DNA izolatları, bakteri ve arkeler için evrensel metabarkodlama başlatıcı dizileri olan 16SV3F ve 16SV3R kullanılarak PZR yöntemiyle çoğaltılmıştır.

Hazırlanan her bir PZR karışımı 25 µL'lik reaksiyon karışımı şunları içermektedir: Microbial DNA (5 ng/µL) 2,5 µL, Forward Primer 1 µM 5 µL, Reverse Primer 1 µM 5 µL ve 2X KAPA HotStart PCR Mix 12,5 µL.

Hiperdeğişken bölgeler olan 16S V3 rDNA genleri, belirtilen özgül başlatıcı diziler kullanılarak çoğaltılmıştır.

PZR işlemi; 95 °C’de 3 dakikalık ilk ısıtma adımını takiben, 95 °C’de 30 saniye denatürasyon, 55 °C’de 30 saniye bağlanma (tavlama) ve 72 °C’de 30 saniye uzama adımlarından oluşan 25 döngü ile gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon, 72 °C’de 5 dakikalık son uzatma adımı ile tamamlanmıştır. Örnekler 4 °C’de saklanmıştır.

Çizelge 3.2. PZR için kullanılan primerlerin nükleik asid dizileri.

Adı	Primer Nükleik Asid Dizisi
16S PCR Forward Primer	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCW GCAG
16S PCR Reverse Primer	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC

3.2.4. PZR Ürünü Temizliği ve DNA Kütüphanesi

PZR ürünü temizliği için AMPure XP (Beckman Coulter) manyetik boncuklar kullanılarak primer dimerler ve serbest primerler uzaklaştırılmıştır. Bu aşama iki adımda gerçekleştirilmiştir. İlk adımda her örneğe 20 µL AMPure XP manyetik boncuk eklenmiş ve pipetleme ile karıştırılmıştır. Manyetik stand kullanılarak PZR ürünlerinin manyetik boncuklara tutunması sağlanmıştır. İkinci adımda ise kontaminasyonu önlemek amacıyla manyetik boncuk ekli örnekler, 200 µL %80’lik etanol ile iki kez yıkanmıştır. Yıkama sonrası saf PZR ürünü, 50 µL 10 mM pH 8.5 Tris solüsyonunda saklanmıştır.

Çalışmada kullanılacak DNA kütüphanesinin oluşturulması amacıyla örnekler, indeksli başlatıcı diziler aracılığıyla PZR işlemine tabi tutulmuştur. PZR sonrasında üretici firmanın protokolüne uygun olarak DNA Kütüphanesi hazırlanmıştır. Elde edilen DNA kütüphanesi, örnek başına yaklaşık 100.000 okuma hedefiyle Illumina NextSeq 550 cihazı kullanılarak dizilenmiştir (Johnson vd., 2019).

PZR tabanlı DNA Kütüphanesi oluşturulurken uygun enzim, ısı koşulları ve örnek seyreltme oranları dikkate alınmış; seçilen başlatıcı dizilere Illumina NextSeq 550 dizileme sistemine uygun adaptör dizileri eklenmiştir. Bu aşamada indeksli PZR uygulanmıştır. Elde edilen PZR ürünleri %2 oranında agaroz jel üzerine yüklenmiş ve 120 volt gerilim altında 45 dakika boyunca elektroforez işlemine tabi tutulmuştur. Bantlar UV görüntüleme sistemi ile değerlendirilmiş ve negatif kontrol durumu incelenmiştir. Aynı saha çalışmasına ait PZR ürünleri birleştirilmiş, DNA kalitesi ve miktarı Qubit™ 3,0 Florometre kullanılarak ölçülmüştür.

Kütüphane oluşturma aşamasında Illumina Nextera DNA Prep Library Prep Kit kullanılmıştır. Amplifikasyon sonrası PZR ürünleri %2 agaroz jelde değerlendirilmiş; bant boyu ve negatif kontroller UV görüntüleme sistemiyle incelenmiştir. İndeksli PZR ürünlerinin temizliği, üretici protokolüne uygun olarak AMPure XP Beads kullanılarak yapılmıştır. Aynı saha çalışmasına ait üçlü PZR ürünleri birleştirildikten sonra kalite ve miktar ölçümleri Qubit™ 3,0 Florometre ile gerçekleştirilmiştir. Dizileme kütüphaneleri, Nextera DNA Prep Kütüphane Hazırlık Kiti (Illumina, San Diego, CA, ABD) ile oluşturulmuş ve indeks kodları eklenmiştir. Örnekler, 2 × 50 bp PE (çift yönlü) dizileme kimyası kullanılarak Illumina NextSeq 550 platformunda dizilenmiştir.

3.2.5. Biyoinformatik Analizler

Biyoinformatik analizler, Linux/Unix tabanlı işletim sistemi terminali aracılığıyla yürütülmüştür. Illumina NextSeq 550 cihazından elde edilen ileri ve geri yönlü okuma dosyaları (".fastq" formatında) FASTQC programı ile kalite kontrolünden geçirilmiştir. Kalite kontrolü sonrasında 16S V3F-R başlatıcı dizileriyle çoğaltılan diziler için oluşturulan iş akışı QIIME2 platformuna (Bolyen vd., 2019) benzer şekilde yapılandırılmıştır. İlk olarak "Illuminapairedend" komutu kullanılarak kalitesi 30'dan yüksek olan çift uçlu diziler hizalanmış ve birleştirilmiştir. Birleştirilemeyen okumalar "Obigrep" komutu ile filtrelenmiş, ardından "Tagcleaner" programı kullanılarak ileri ve geri yönlü başlatıcı diziler, en fazla üç yanlış eşleşmeye izin verilerek çıkarılmıştır. "Obiuniq" komutu ile tekrarlayan veriler temizlenmiş, "Obiannotate" komutu aracılığıyla ise örnek başlıklarında yer alan gereksiz veriler silinmiştir.

Elde edilen tüm dizilerde "uniq" ifadesi kullanılarak benzersiz diziler belirlenmiştir. Bu diziler üzerinde üç aşamalı bir filtreleme süreci uygulanmıştır. İlk aşamada, okuma tekrarı 10'dan fazla olan "uniq" diziler "c10" olarak kaydedilmiştir. İkinci aşamada, PZR ve dizileme hatalarından arındırılmış "uniq.clean" diziler elde edilmiş, üçüncü aşamada ise "c10" dizilerden hatasız "c10.clean" dizileri oluşturulmuştur. Kalite ve filtreleme adımlarının ardından dizilerin kimerik kökenli olup olmadıkları kontrol edilmiş ve kimerik sekanslar analizden çıkarılmıştır.

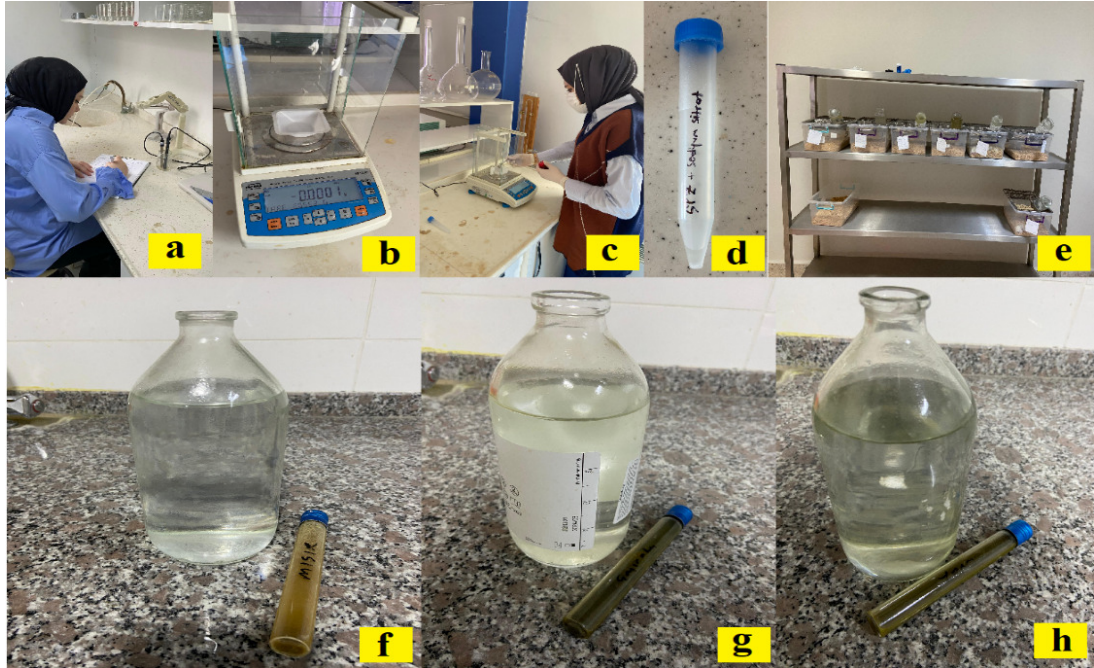
Filtrelenmiş ve yüksek kaliteli diziler, Operasyonel Taksonomik Birimler (Operational Taxonomic Unit, OTU) veya Amplikon Sekans Varyantları (Amplicon Sequence Variant, ASV) oluşturmak amacıyla %97 benzerlik eşiği ile kümelendirilmiştir (Edgar, 2013). Kümelenen diziler, Greengenes referans veritabanı kullanılarak taksonomik olarak sınıflandırılmıştır (DeSantis vd., 2006). Bu sınıflandırma,

mikrobiyomda yer alan türlerin zenginliği ve çeşitliliği hakkında kapsamlı bilgi elde edilmesini sağlamıştır. Çalışma boyunca olası kontaminasyonları tespit etmek amacıyla steril distile su örnekleri negatif kontrol olarak kullanılmış ve verilerin görselleştirilmesi için Krona grafikleri oluşturulmuştur.

Her örnek için uniq, c10, uniq.clean ve c10.clean olmak üzere dört veri seti oluşturulmuştur. Aynı başlatıcı ve filtreleme basamaklarından geçen veriler, çevrim içi analiz platformu SILVAngs sistemine yüklenmiştir. Yüklenen diziler hizalama, kalite kontrolü, tekrarlı dizilerin temizlenmesi ve %98'den fazla benzerliğe sahip dizilerin gruplanması işlemlerinden geçirilmiştir. Gruplandırılan diziler BLASTN veri tabanı ile karşılaştırılmış, dizileme verilerine ait özet sonuç dosyaları oluşturulmuş ve negatif kontrol örneklerinde tespit edilen diziler analizlerden çıkarılmıştır. Son olarak, Krona pasta grafikleri oluşturularak görselleştirme yapılmıştır.

3.2.6. Deneysel Sürece Ait Görsel Kayıtları

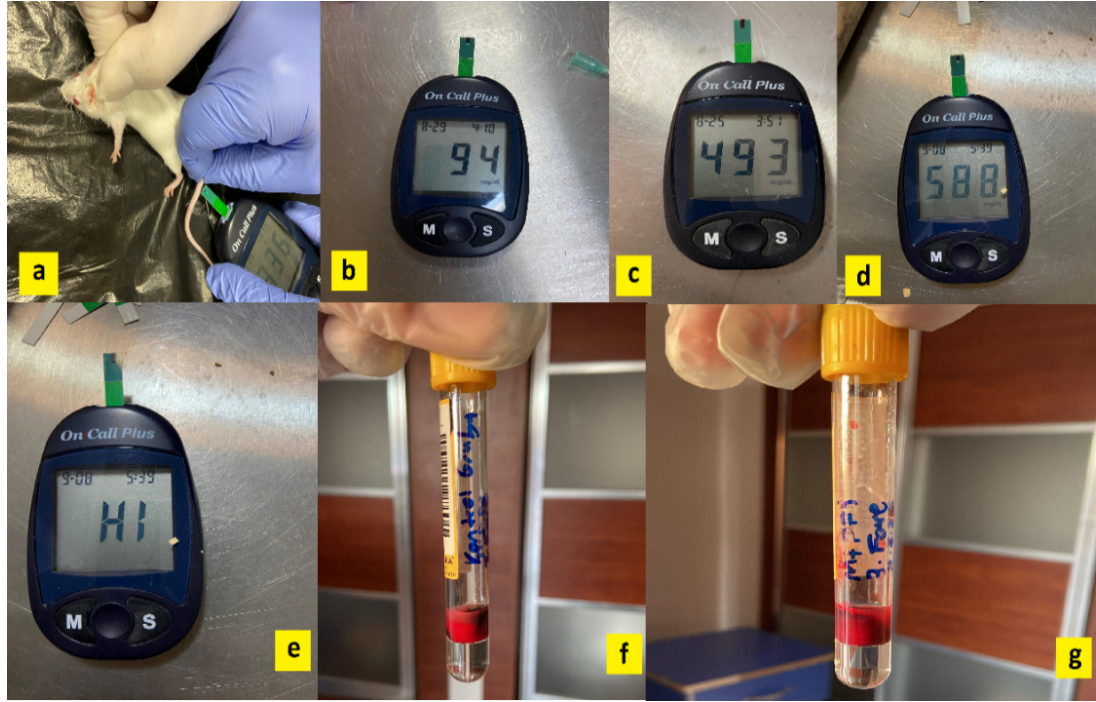
Bu çalışmada uygulanan gereç ve yöntem aşamalarına ilişkin bazı görseller, sürecin bütünlüğünü ve özgünlüğünü belgelemek amacıyla aşağıda sunulmuştur (Şekil 3.1-3.3). Tüm fotoğraflar çalışma sırasında çekilmiştir.



Şekil 3.1. Deney hazırlıkları →STZ çözeltisi hesaplanması ve hazırlanması (a-d), gruplandırmanın yapılması (e), PFJ lerin hazırlanması (f-h).



Şekil 3.2. Deney uygulaması → STZ enjeksiyonu (a,b), PFJ uygulaması (c-e), diseksiyon öncesi hazırlıklar (f-h), diseksiyon (ı-k) ve örneklerin analiz için kuru buz ile firmaya gönderimi (l).



Şekil 3.3. Glukoz ölçümleri sırasında kullanılan glukometre ile kan şekeri ölçümünün yapılışı (a), cihaz ekranına yansıyan ölçüm sonuçları (b–e), 600 mg/dL üzerinde kaydedilen bir değer örneği (e) ve biyokimyasal analizlerde kullanılmak üzere alınan kan örnekleri (f, g).

4. BULGULAR

4.1. Moleküler Bulgular

Bu çalışmada, örneklerden izole edilen DNA'lar 16S rRNA geninin V3–V4 bölgesine özgü primerlerle çoğaltılmış ve kütüphane hazırlanmıştır. İndeksleme aşamasında Illumina Nextera XT Index Kit kullanılmış, kütüphaneler normalize edilerek pooling yöntemiyle birleştirilmiştir.

Sekanslama, Illumina NovaSeq platformunda 2×250 bp okuma uzunluğu ile sequencing by synthesis (SBS) teknolojisine dayalı olarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen ham veriler FASTA formatına dönüştürülmüş, FastQC ile kalite kontrolü yapılmış ve QIIME2 ortamında DADA2 algoritması kullanılarak filtreleme ile kimerik diziler ayıklanmıştır.

Taksonomik sınıflandırma QIIME2 ile yapılmış, alfa ve beta çeşitlilik analizleri uygulanarak mikrobiyal toplulukların kompozisyonu değerlendirilmiştir. Çalışmada, dizilerin %97 benzerlik eşiğine göre OTU gruplandırması esas alınmış, ayrıca ASV yaklaşımı ile daha yüksek çözünürlüklü analizler gerçekleştirilmiştir.

4.1.1. Alfa Çeşitliliği

Çizelge 4.1. Denek gruplarına göre giriş yüzdeleri (%) ve diğer değerler.

Denek Kodu	Sayısal Giriş	Filtrelenmiş Giriş	Filtrelenen Giriş Yüzdesi (%)	Giriş Yüzdesi (%)	Girişin Birleşim Yüzdesi (%)	Kimerik Olmayan Giriş	Kimerik Olmayan Giriş Yüzdesi (%)
Kontrol	110855	99330	89,60	96371	76,67	74151	66,89
Pozitif Kontrol	44887	40617	89,48	38634	33,49	31049	69,17
Çayırotu PFJ	85355	76533	89,66	74402	63,95	59061	69,19
Mısır PFJ	61280	54994	89,74	54411	46,98	41990	68,52
Yonca PFJ	72936	63777	87,44	61682	74,83	82957	74,93

Her bir denek grubu için sayısal girişlerin filtrelenmesiyle elde edilen giriş yüzdesi belirtilmiş ve kimerik olmayan girişlerin yüzdesi de gösterilmiştir (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.2. Alfa çeşitliliği indekslerine göre grupların değerleri.

Grup	Gözlenen Tür	Chao1	Shannon	Simpson	Faith PD	Good Kapsama
Kontrol	397	522,27	7,13	0,98	23,40	0,94
Pozitif Kontrol	333	412,06	6,83	0,98	25,5	0,95
Çayırotu PFJ	353	409,64	6,87	0,98	17,71	0,95
Mısır PFJ	302	345,88	6,41	0,97	18,74	0,96
Yonca PFJ	122	232,63	5,53	0,95	7,36	0,91

Alfa çeşitliliği değerlendirmeleri için Gözlenen Tür (Observed features) Zenginliği, Chao1 Zenginlik İndeksi, Shannon Çeşitlilik İndeksi, Simpson Çeşitlilik İndeksi, Faith Filogenetik Çeşitlilik İndeksi (PD = Phylogenetic Diversity) ve Good Kapsama İndeksi (Good's Coverage) kullanılmıştır (Çizelge 4.2). Örnek gruplarına ait alfa çeşitliliği indekslerinin sayısal değerleri grafiksel olarak sunulmuş olup, bu gösterimler Şekil 4.1–4.6’da yer almaktadır. Grafikler, gruplar arasındaki alfa çeşitliliği farklılıklarının görsel olarak değerlendirilmesini mümkün kılmaktadır.

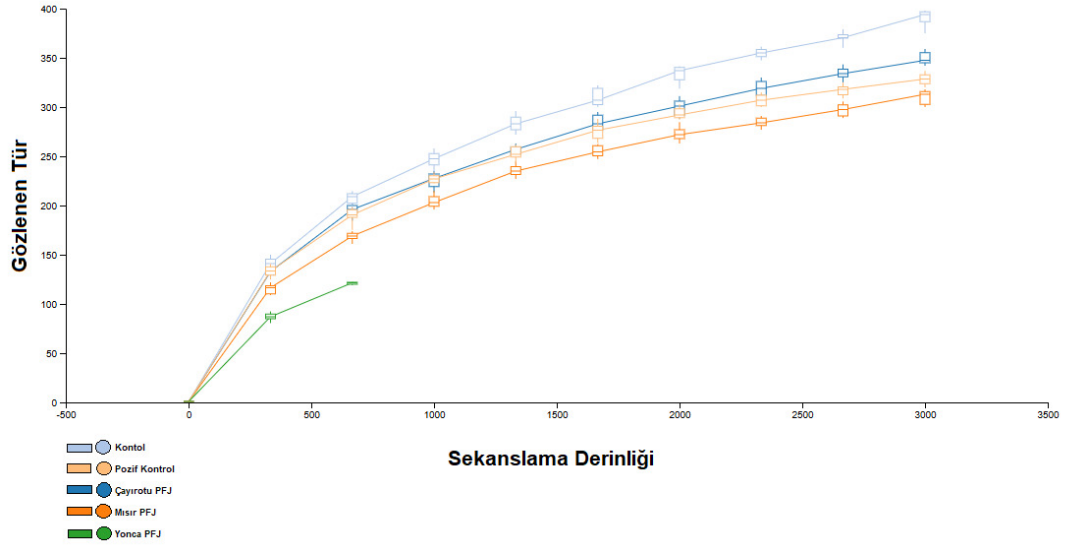
Kontrol grubunda tüm indekslerde en yüksek çeşitlilik değerleri kaydedilmiştir (Gözlenen Tür = 397, Chao1 = 522,27, Shannon = 7,13).

Pozitif Kontrol grubu, Kontrol grubuna kıyasla daha düşük çeşitlilik sergilemiştir (Gözlenen Tür = 333, Chao1 = 412,06). Shannon ve Simpson indekslerinde de azalma gözlenmiştir.

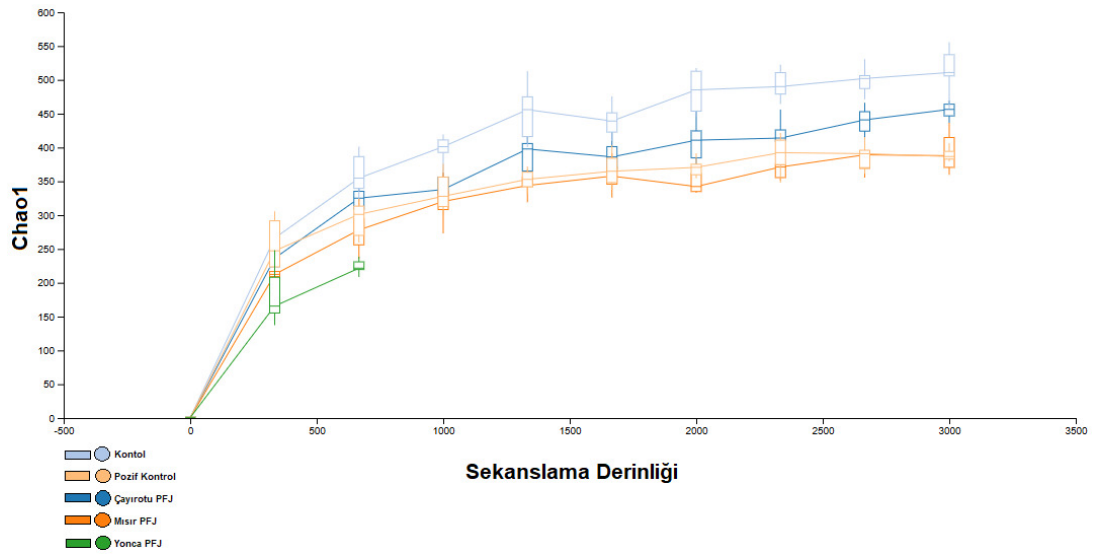
Probiyotik uygulanan gruplar incelendiğinde, Çayırotu PFJ grubunda (Gözlenen Tür = 353, Chao1 = 409,64, Shannon = 6,87) ve Mısır PFJ grubunda (Gözlenen Tür = 302, Chao1 = 345,88, Shannon = 6,41) çeşitlilik değerlerinde artışlar saptanmıştır.

Yonca PFJ grubunda ise (Gözlenen Tür = 122, Chao1 = 232,63, Shannon = 5,53) tüm indekslerde en düşük değerler elde edilmiştir.

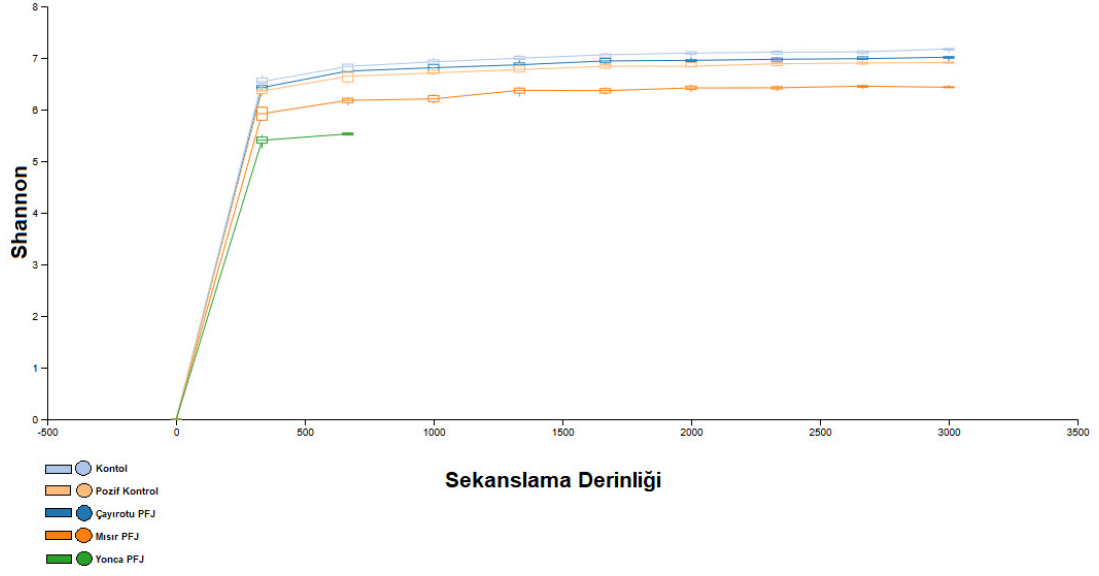
Faith PD değerleri Pozitif kontrol grubunda 25,5, Kontrol grubunda 23,40 olarak bulunmuştur. Good Kapsama değerleri tüm gruplarda %90’ın üzerinde ölçülmüştür.



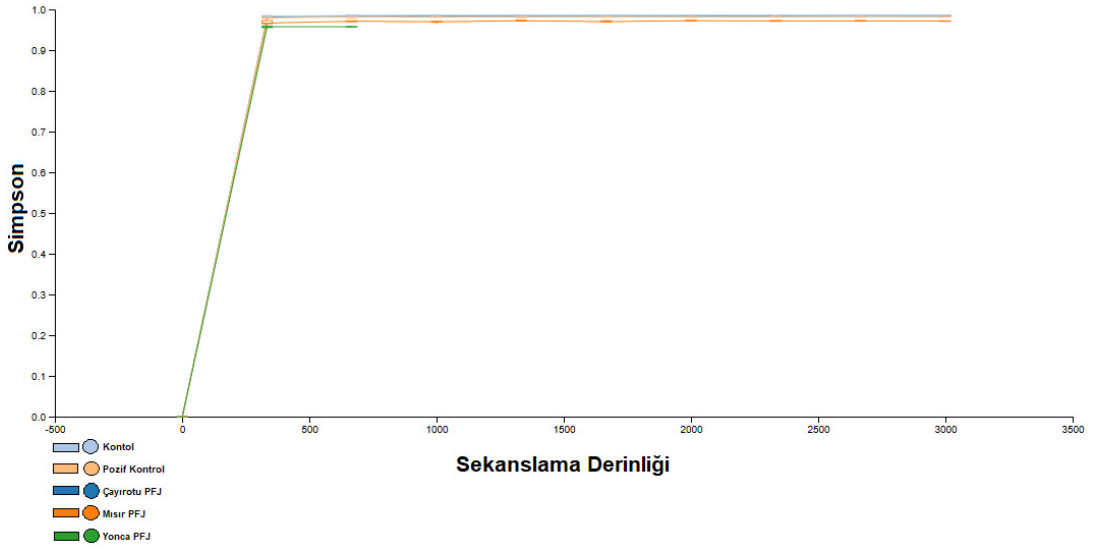
Şekil 4.1. Örnek gruplarına ait gözlenen tür (Observed Features) zenginliği.



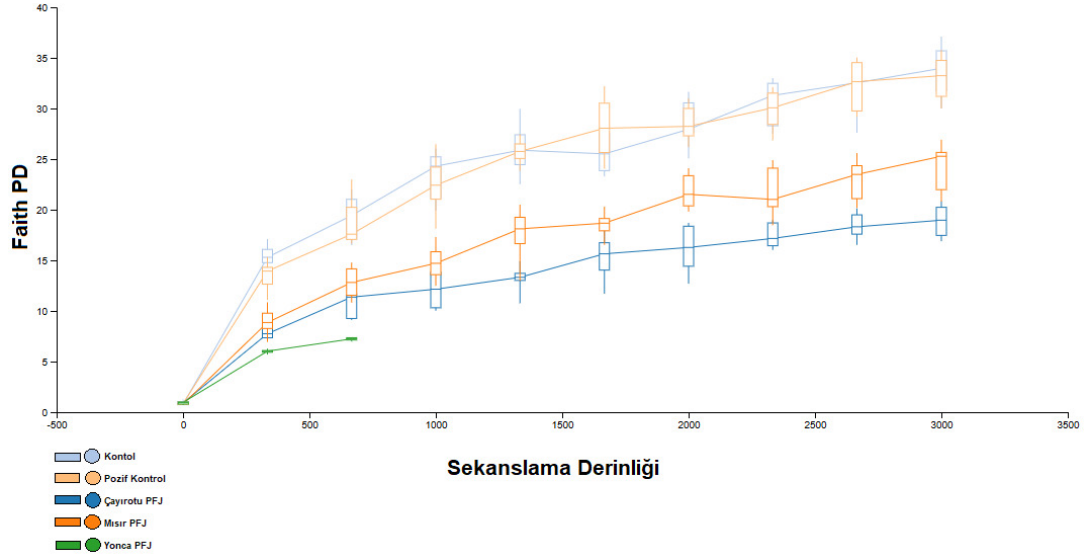
Şekil 4.2. Örnek gruplarının tahmini tür zenginliği (Chao1 Zenginlik İndeksi).



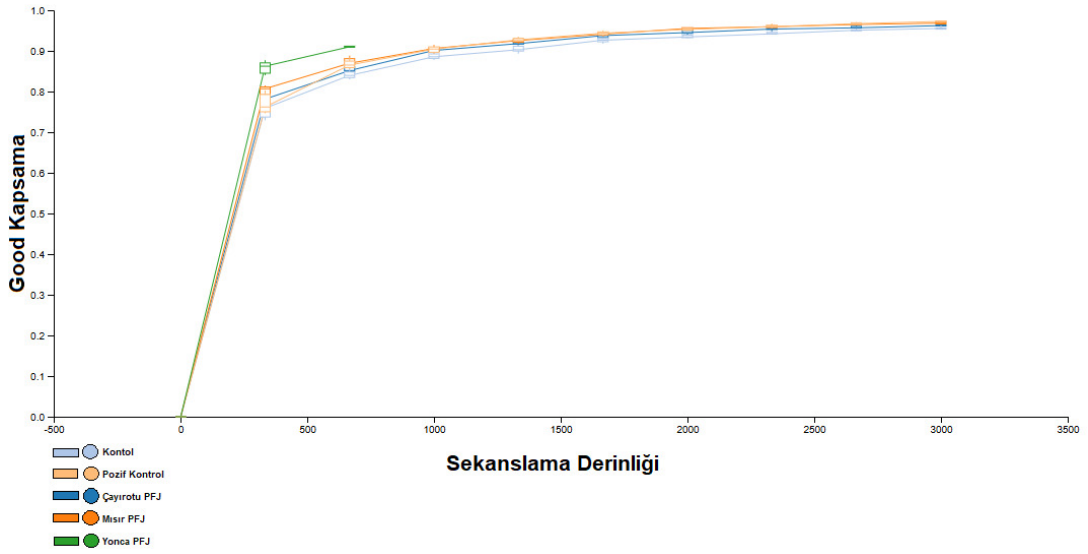
Şekil 4.3. Örnek gruplarının çeşitlilik düzeyi (Shannon Çeşitlilik İndeksi)



Şekil 4.4. Örnek gruplarının çeşitlilik düzeyi (Simpson Çeşitlilik İndeksi).



Şekil 4.5. Örnek gruplarının filogenetik çeşitliliği (Faith Filogenetik Çeşitlilik (PD) İndeksi).



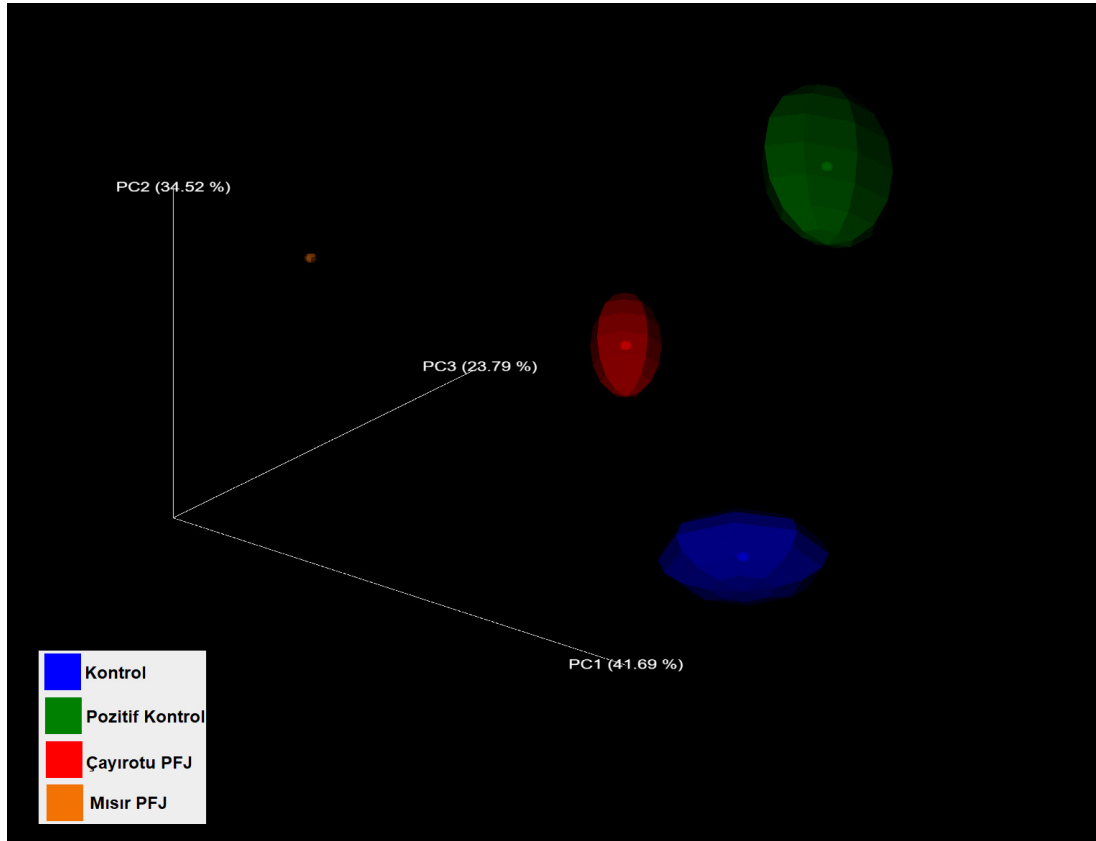
Şekil 4.6. Örnek gruplarının örnekleme yeterliliği (Good Kapsam İndeksi (Good coverage)).

4.1.2. Beta Çeşitliliği

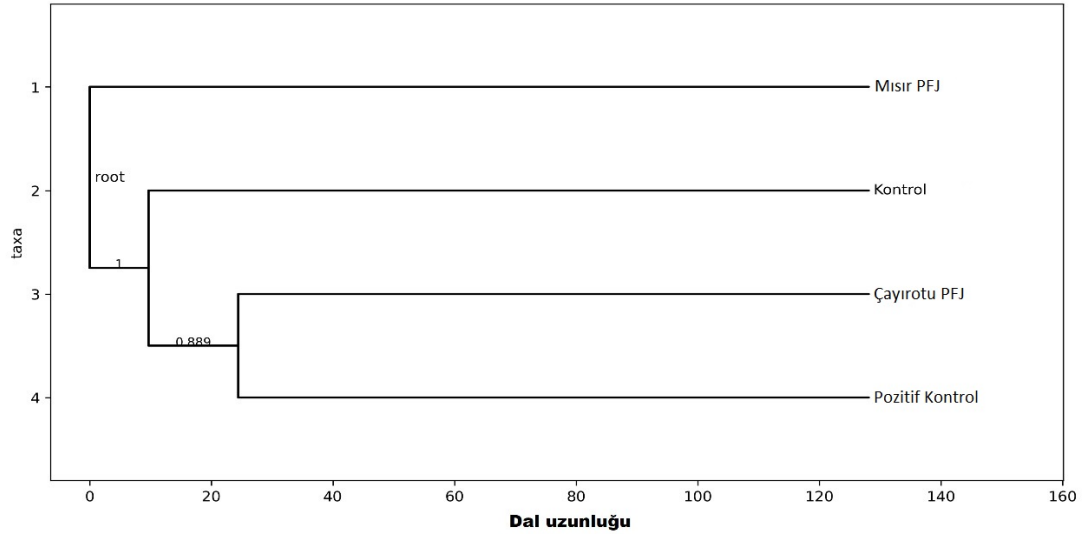
Beta çeşitliliğin değerlendirilmesi amacıyla Temel Koordinatlar Analizi (Principal Coordinates Analysis, PCoA) analizi yapılmıştır. Analiz sonucunda, PC1 eksenini toplam varyansın %41,69'unu, PC2 eksenini %34,52'sini ve PC3 eksenini %23,79'unu açıklamaktadır. Bu bulgular, örnekler arasındaki mikrobiyota farklılıklarının büyük ölçüde ilk üç bileşen tarafından açıklandığını göstermektedir.

PCoA grafiğinde, örnek gruplarının birbirinden farklı konumlarda kümelendiği gözlenmiştir (Şekil 4.7).

Filogenetik analiz sonuçlarına göre gruplar arasındaki mikrobiyal farklılıklar ortaya konmuştur. Kontrol grubunun, Mısır PFJ ile aynı dal üzerinde kümelenmesi, bu iki grubun mikrobiyal topluluk yapılarının benzerliğini göstermektedir. Buna karşılık Pozitif Kontrol grubu ve Çayırotu PFJ grubu farklı bir kolda yer almakta ve birbirine daha yakın bir ilişki sergilemektedir. Pozitif kontrol grubunun uzun dal mesafesi ise, mikrobiyal profilinde diğer gruplara kıyasla daha belirgin bir farklılaşmaya işaret etmektedir (Şekil 4.8).

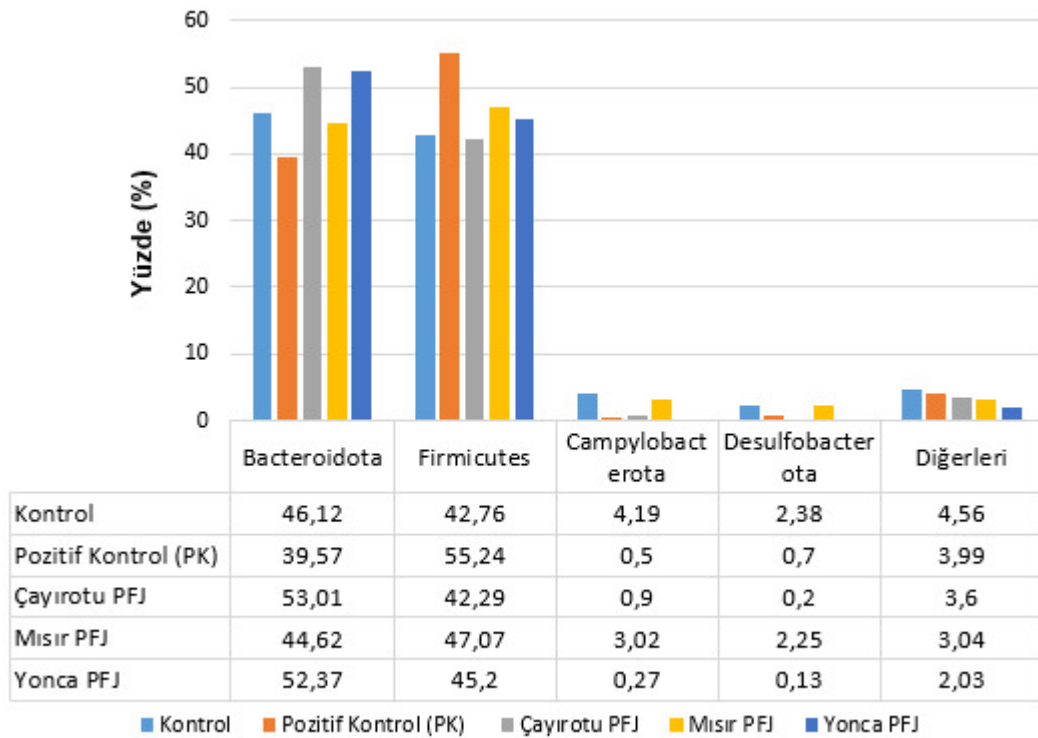


Şekil 4.7. Örnek gruplarının mikrobiyal topluluk yapılarının PCoA analizi (PC1: %41,69; PC2: %34,52; PC3: %23,79).



Şekil 4.8. Filogenetik ağaç.

4.1.3. Taksonomik Dağılım



Şekil 4.9. Gruplara göre baskın bakteri şubelerinin yüzde (%) dağılımı.

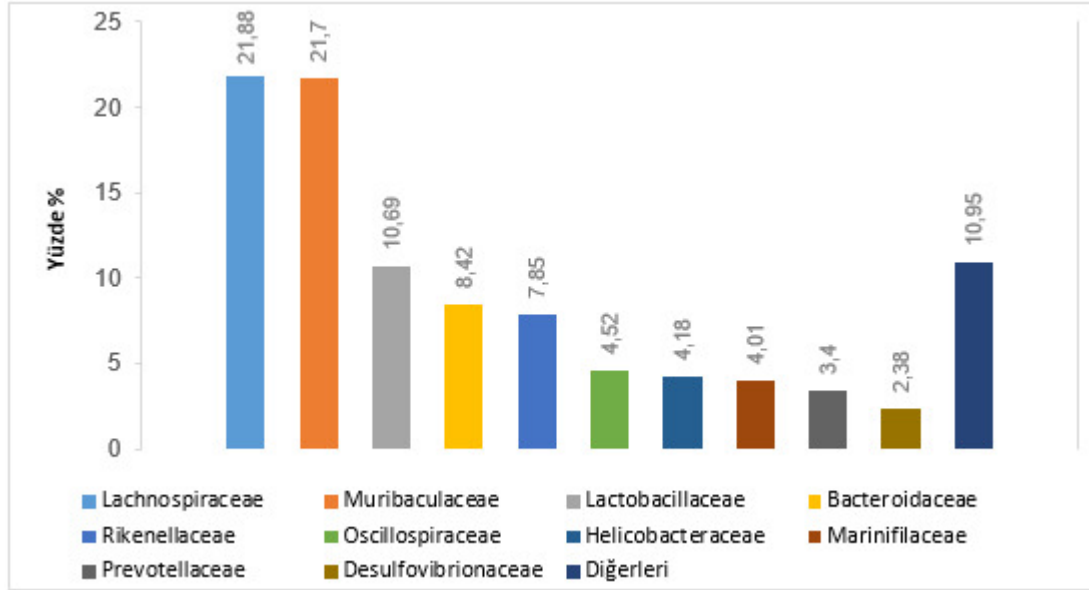
Taksonomik dağılım şube düzeyinde değerlendirildiğinde, tüm örneklerde Firmicutes ve Bacteroidota en baskın gruplar olarak belirlenmiştir. Pozitif kontrol grubunda (%55,24) ve Mısır PFJ grubunda (%47,07) Firmicutes oranı daha yüksek bulunurken; Çayırotu PFJ grubunda (%53,01), Yonca PFJ grubunda (%52,37)

ve Kontrol grubunda (%46,12) Bacteroidota baskın olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, bağırsak mikrobiyotasında yaygın olarak baskın şubeler arasında yer alan Firmicutes ve Bacteroidota'nın çalışmamızda da temel topluluk bileşenlerini oluşturduğunu göstermektedir (Şekil 4.9).

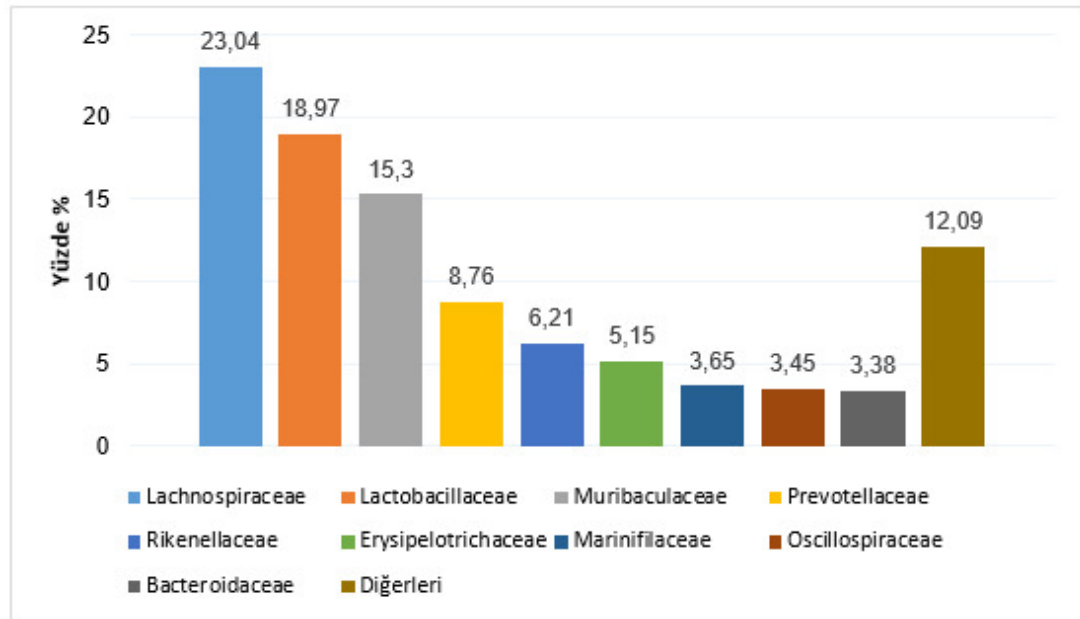
Çizelge 4.3. Gruplara göre baskın bakteri ailelerinin yüzde (%) dağılımı.

Bakteri Ailesi	Kontrol	PK	Çayırotu PFJ	Mısır PFJ	Yonca PFJ
Lachnospiraceae	21,88	23,04	19,37	16,74	13,53
Muribaculaceae	21,7	15,3	17,58	10,63	19,62
Lactobacillaceae	10,69	18,97	8,54	21,61	14,88
Bacteroidaceae	8,42	3,38	11,6	9,25	9,74
Rikenellaceae	7,85	6,21	6,55	5,8	5,68
Oscillospiraceae	4,52	3,45	3,7	3,31	0,27
Helicobacteraceae	4,18	0,68	1,42	3,01	0,27
Marinifilaceae	4,01	3,65	5,29	4,73	9,74
Prevotellaceae	3,4	8,76	8,83	9,97	4,74
Desulfovibrionaceae	2,38	1,12	1,2	2,25	0,13
Diğerleri	10,95	15,44	15,92	12,7	21,4

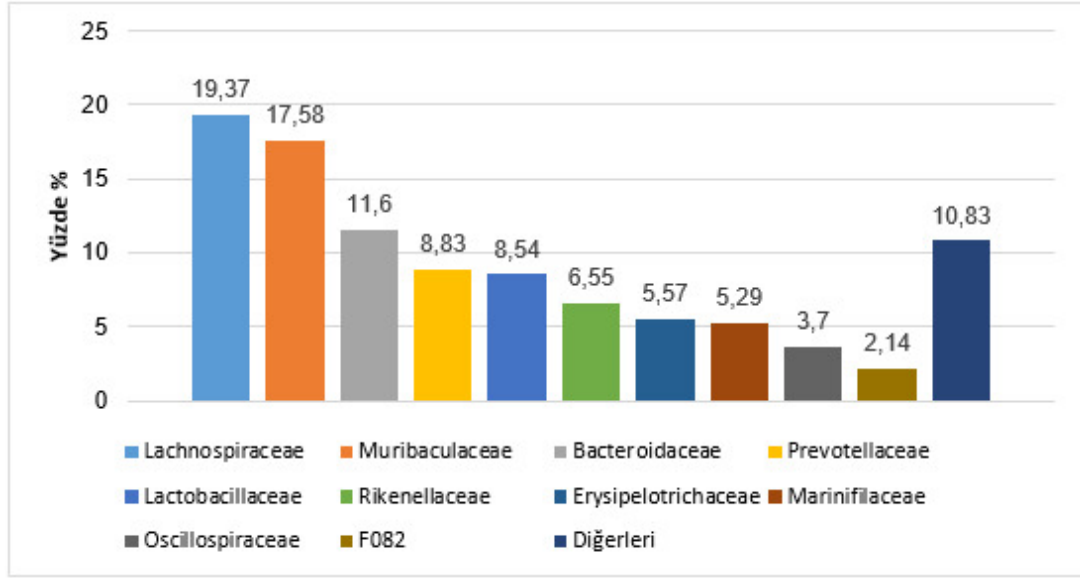
Tüm gruplarda en baskın aileler Lactobacillaceae, Lachnospiraceae ve Muribaculaceae olarak saptanmıştır. Kontrol ve PK gruplarında Lachnospiraceae yüksek oranlarda (%21,88 ve %23,04 sırasıyla) bulunmuştur. Mısır PFJ grubunda Lactobacillaceae en yüksek oranı (%21,61) göstermiştir. Yonca PFJ grubunda Muribaculaceae yüksek orana (%19,62) sahiptir. Diğer aileler gruplar arasında değişkenlik göstermektedir (Çizelge 4.3). Grupların bağırsak mikrobiyotasında en baskın taksonların aile düzeyindeki bağıl bolluk dağılımları Şekil 4.10–4.14'te sunulmuştur.



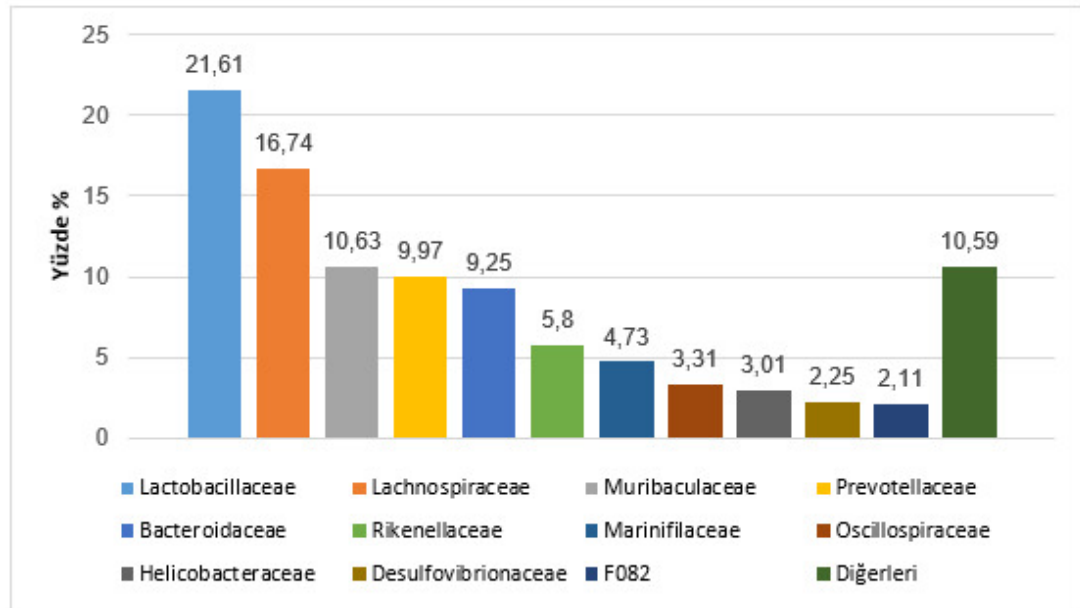
Şekil 4.10. Kontrol grubu bağırsak mikrobiyotasında en baskın taksonların aile düzeyinde bağıl bolluk dağılımı (%).



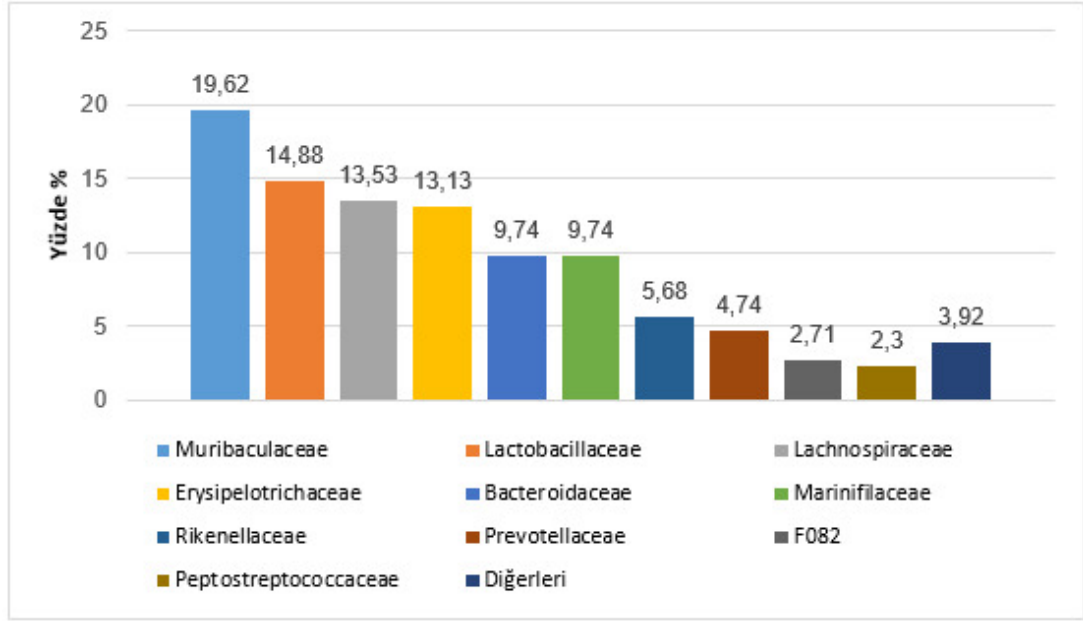
Şekil 4.11. Pozitif Kontrol grubu bağırsak mikrobiyotasında en baskın taksonların aile düzeyinde bağıl bolluk dağılımı (%).



Şekil 4.12. Çayırova PFJ grubu bağırsak mikrobiyotasında en baskın taksonların aile düzeyinde bağıl bolluk dağılımı (%).



Şekil 4.13. Mısır PFJ grubu bağırsak mikrobiyotasında en baskın taksonların aile düzeyinde bağıl bolluk dağılımı (%).



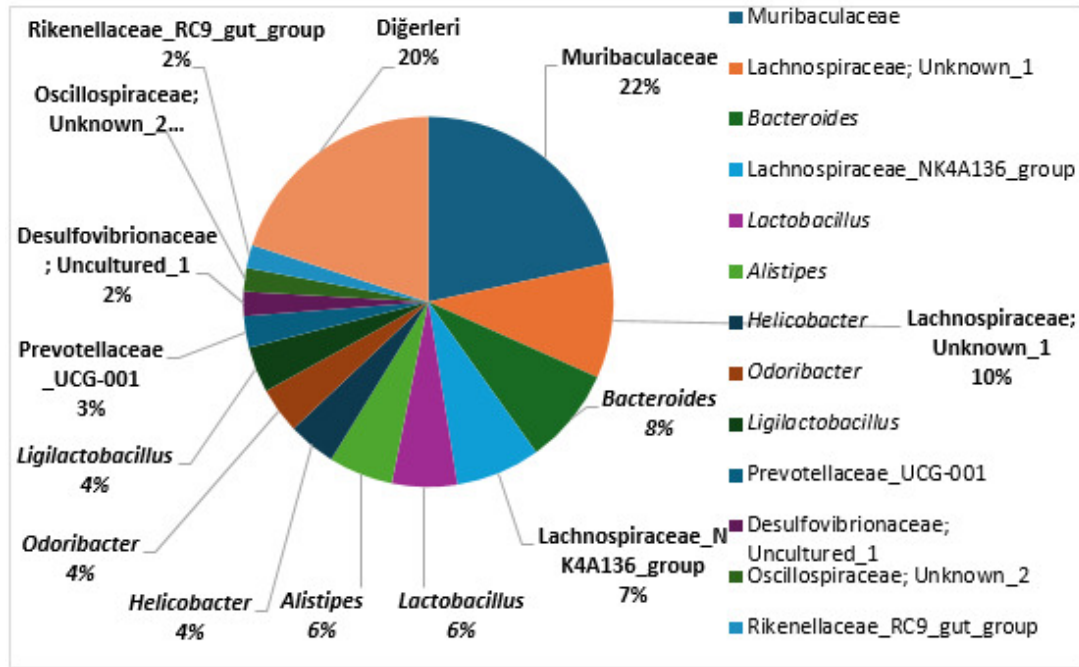
Şekil 4.14. Yonca PFJ grubu bağırsak mikrobiyotasında en baskın taksonların aile düzeyinde bağıl bolluk dağılımı (%).

Çizelge 4.4. Gruplara göre baskın bakteri cinslerinin yüzde (%) dağılımı

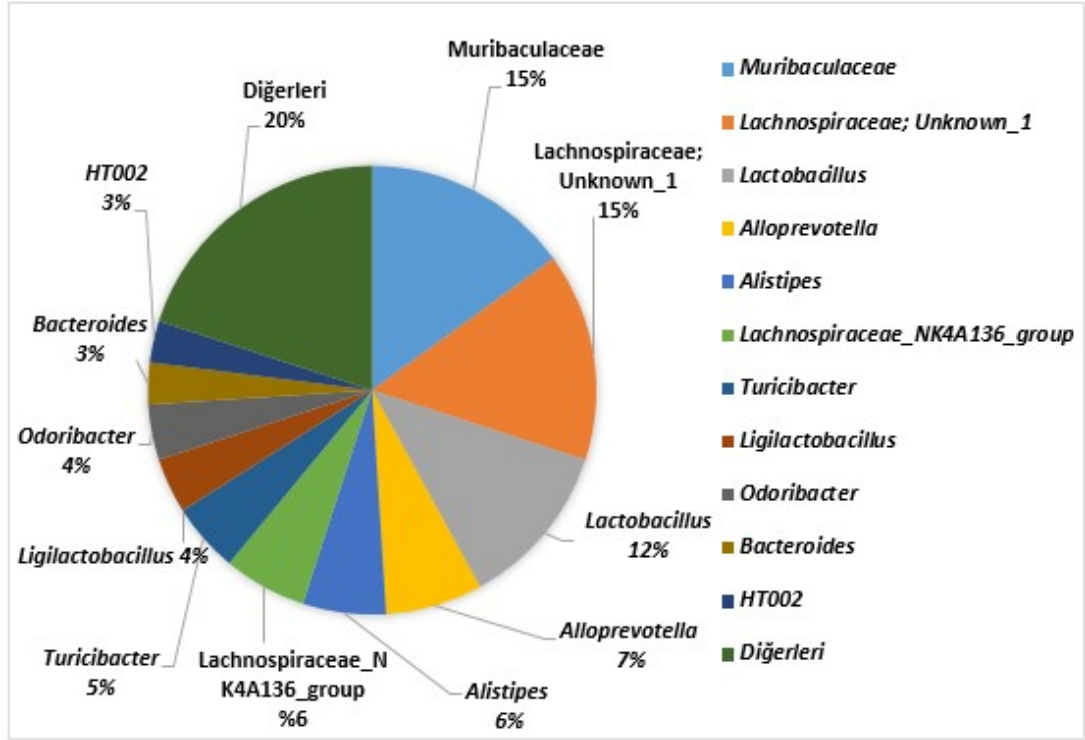
Bakteri Cinsi	Kontrol (%)	PK (%)	Çayırotu PFJ (%)	Mısır PFJ (%)	Yonca PFJ (%)
Muribaculaceae	21,61	15,11	17,18	10,21	19,51
Lachnospiraceae; Unknown_1	10,06	15,09	9,79	8,74	6,1
<i>Bacteroides</i>	8,42	3,39	11,6	9,25	9,76
Lachnospiraceae_NK4A136_group	7,39	5,6	8,14	6,2	7,18
<i>Lactobacillus</i>	5,68	12,17	3,28	12,03	7,99
<i>Alistipes</i>	5,63	5,92	6,2	5,17	5,15
<i>Helicobacter</i>	4,18	0,68	1,42	3,01	0,27
<i>Odoribacter</i>	4,01	3,65	5,29	4,72	9,76
<i>Ligilactobacillus</i>	4,01	4,2	4,46	7,85	5,01
<i>Alloprevotella</i>	0,65	6,84	7,42	9,06	3,93
<i>Turicibacter</i>	0,95	5,05	5,55	0	13,14
Diğerleri	27,40	22,30	19,67	23,76	12,2

Bacteroides, Lactobacillus ve Alistipes gibi taksonlar cins düzeyinde tanımlanmıştır. Muribaculaceae ve Lachnospiraceae gibi aile düzeyinde listelenenler ise alt cins düzeyinde tam tanımlama yapılamadığı için aile seviyesinde sunulmuştur. Genel olarak değerlendirildiğinde Muribaculaceae, Kontrol grubunda ve Yonca PFJ grubunda en baskın aile olarak öne çıkmıştır. Lachnospiraceae üyeleri (Unknown_1 ve NK4A136_group) özellikle Kontrol ve Çayırotu PFJ grubunda dikkate değer oranlarda bulunmuştur. Bacteroides ise tüm gruplarda varlığını sürdürmüş, Kontrol ve Çayırotu PFJ grubunda daha yüksek düzeylerde tespit edilmiştir. Lactobacillus ve Ligilactobacillus'un PK ve Mısır PFJ gruplarında belirgin şekilde arttığı gözlenmiştir. Alistipes tüm gruplarda benzer oranlarda bulunarak stabil bir dağılım sergilemiştir. Alloprevotella'nın PK ve Mısır PFJ gruplarında yüksek seviyelerde olduğu belirlenmiştir. Turicibacter PFJ gruplarında varlık gösterip, özellikle Yonca PFJ grubunda yüksek oranda tespit edilirken, Kontrol grubunda oldukça düşük seviyede bulunmuştur. Helicobacter'in ise Kontrol grubunda daha yüksek, PFJ gruplarında ise düşük düzeylerde olduğu kaydedilmiştir. Ayrıca Odoribacter'in Yonca PFJ grubunda diğer gruplara kıyasla daha yüksek oranda olduğu dikkati çekmiştir. Cins düzeyinde taksonların gruplara göre bağıl bollukları Çizelge 4.4'te

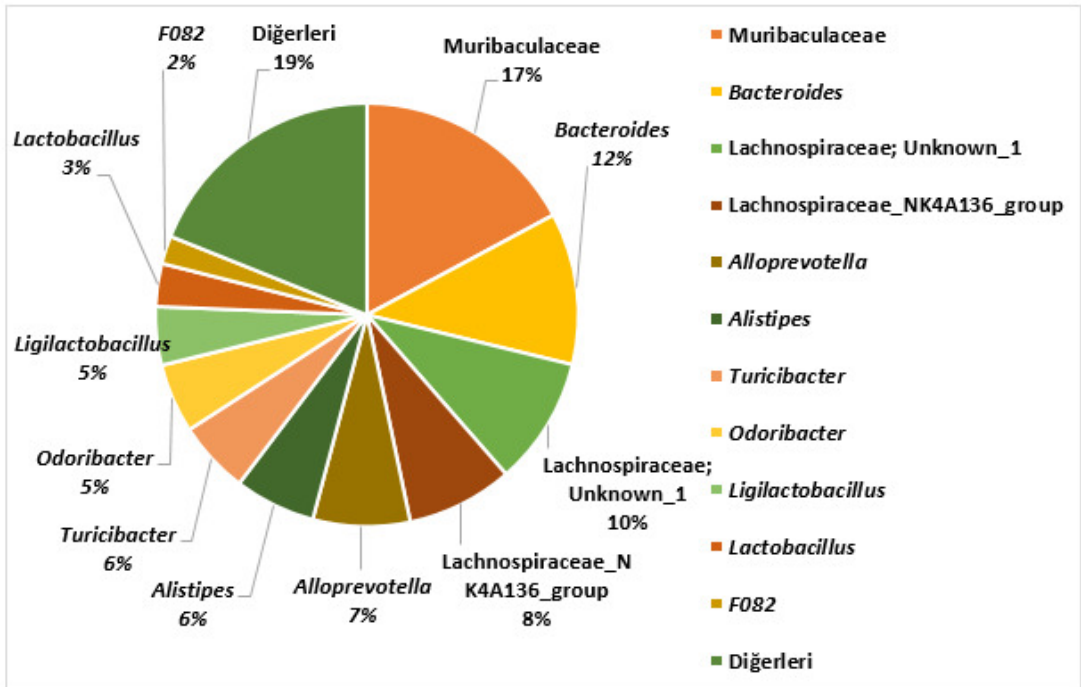
verilmiş; bu dağılımların görsel temsilleri Şekil 4.15–4.19’da, gruplara ait genel mikrobiyal kompozisyon ise Krona pasta grafikleriyle Şekil 4.20–4.24’te gösterilmiştir. Mikrobiyota sonuçlarımız PFJ’lerde tür bazında incelendiğinde Mısır Melas karışımının Mikrobiota analizinde *Limosilactobacillus panis* %91,1, *Lactiplantibacillus plantarum* %4, *Limosilactobacillus pontis* %1, *Levilactobacillus brevis* %0,7 ve *Latilactobacillus sakei* %0,5 olarak tespit edilmiştir. Çayırotu melas karışımında ise *Lactiplantibacillus plantarum* %31, *Enterococcus faecium* %28, *Levilactobacillus brevis* %17 ve *Leclercia pneumoniae* %3, Yonca glikoz PFJ karışımında ise *Limosilactobacillus panis* %75, *Lactiplantibacillus plantarum* %16, *Levilactobacillus brevis* %3, *Latilactobacillus sakei* %0,1 ve *Limosilactobacillus vaginalis* % 0,5 olarak tespit edilmiştir.



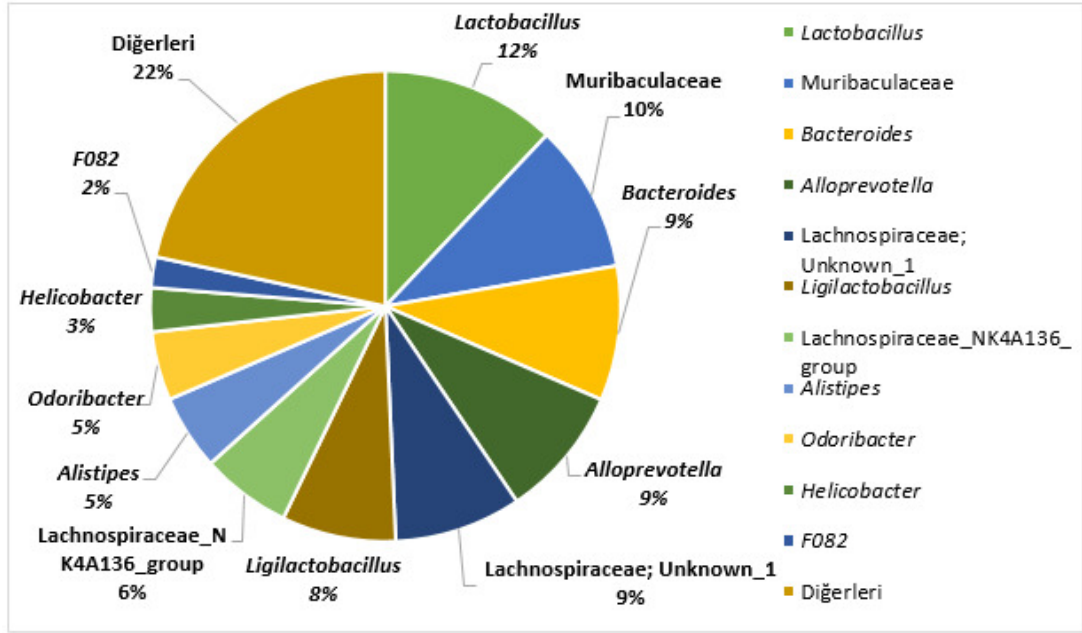
Şekil 4.15. Kontrol grubu bağırsak mikrobiyotasında en baskın taksonların cins düzeyinde bolluk dağılımı (%).



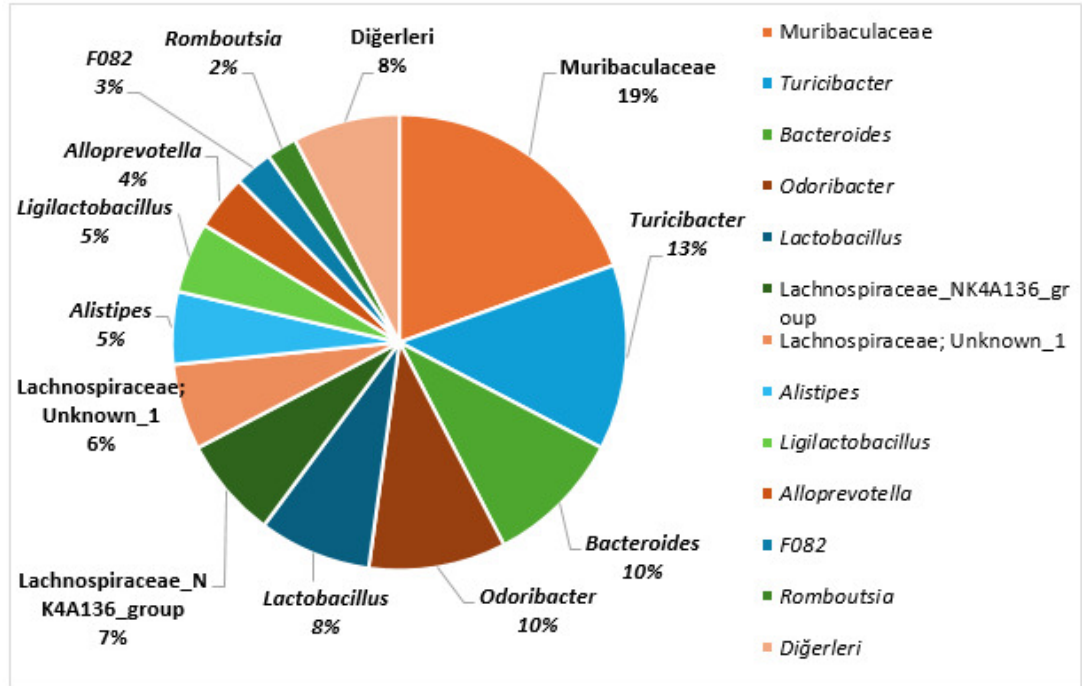
Şekil 4.16. Pozitif Kontrol grubu bağırsak mikrobiyotasında en baskın taksonların cins düzeyinde bağıl bolluk dağılımı (%).



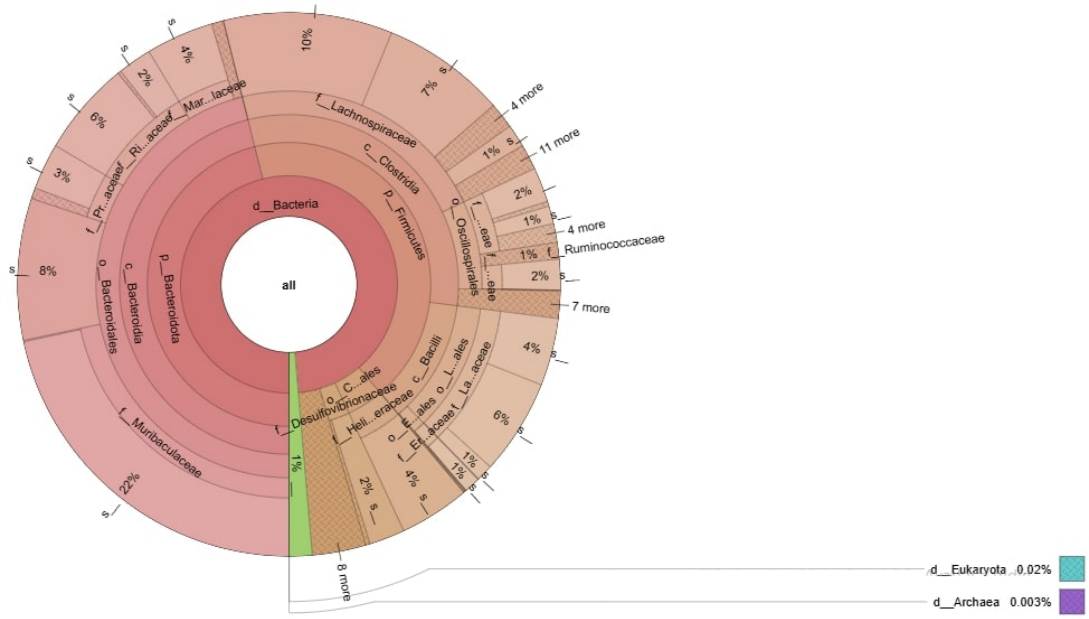
Şekil 4.17. Çayırotu PFJ grubu bağırsak mikrobiyotasında en baskın taksonların cins düzeyinde bağıl bolluk dağılımı (%).



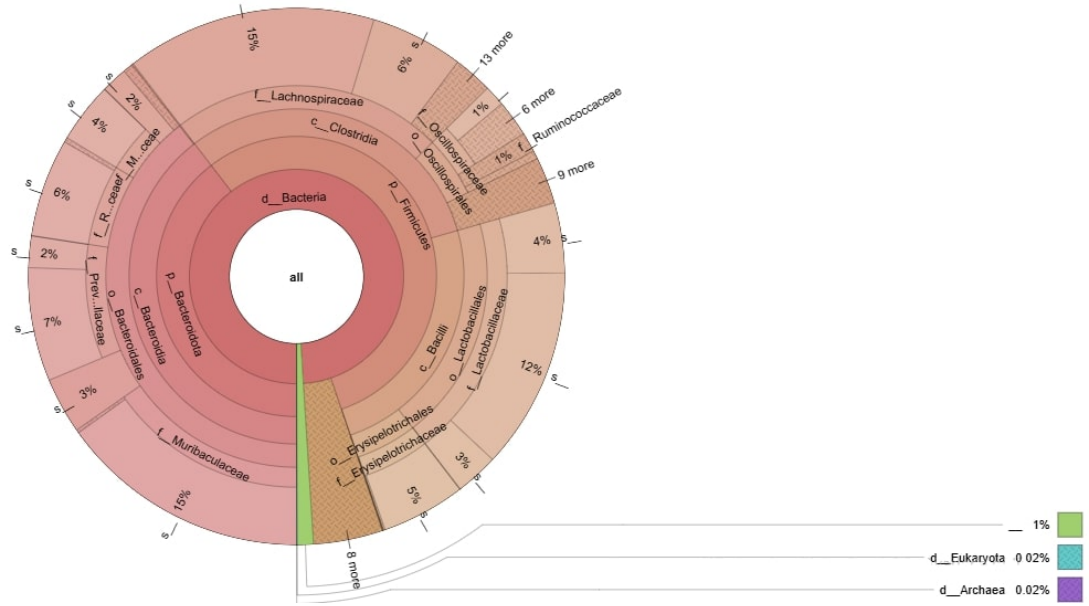
Şekil 4.18. Mısır PFJ grubu bağırsak mikrobiyotasında en baskın taksonların cins düzeyinde bağıl bolluk dağılımı (%).



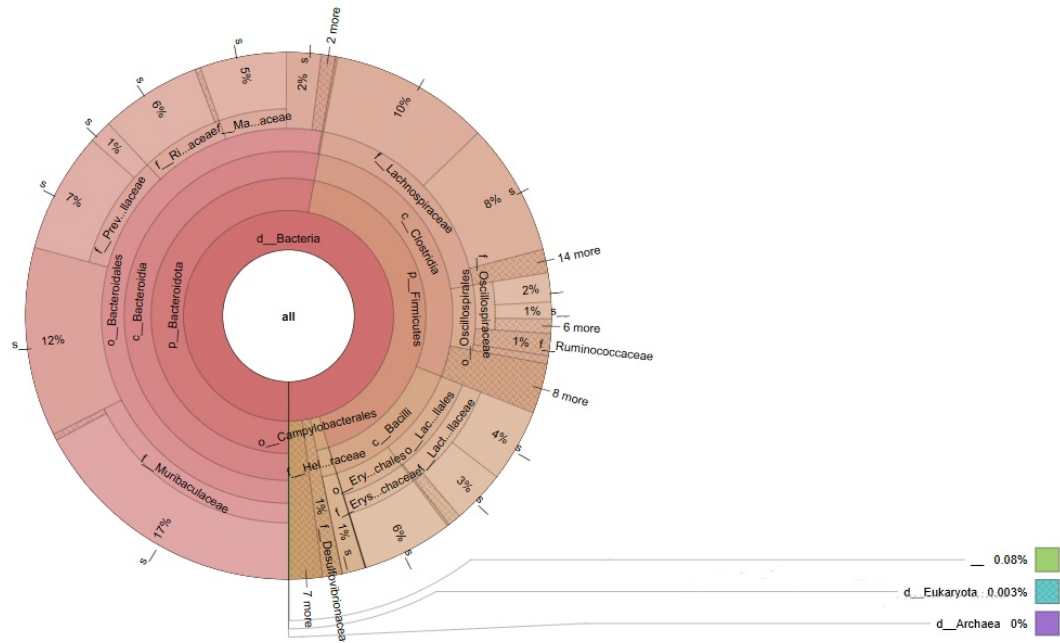
Şekil 4.19. Yonca PFJ grubu bağırsak mikrobiyotasında en baskın taksonların cins düzeyinde bağıl bolluk dağılımı (%).



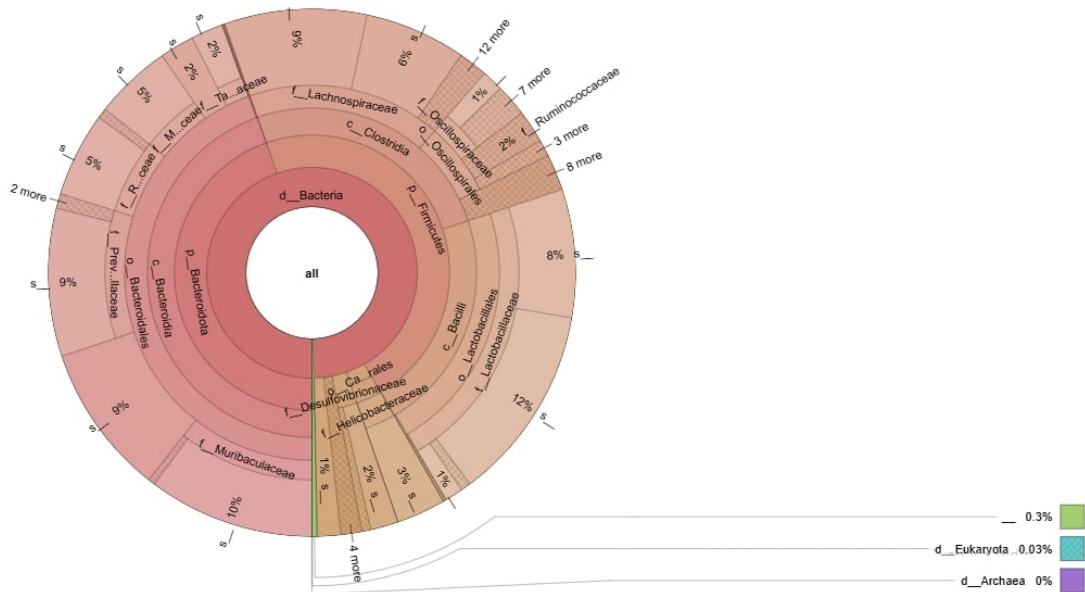
Şekil 4.20. Kontrol grubuna ait Krona pasta grafiği



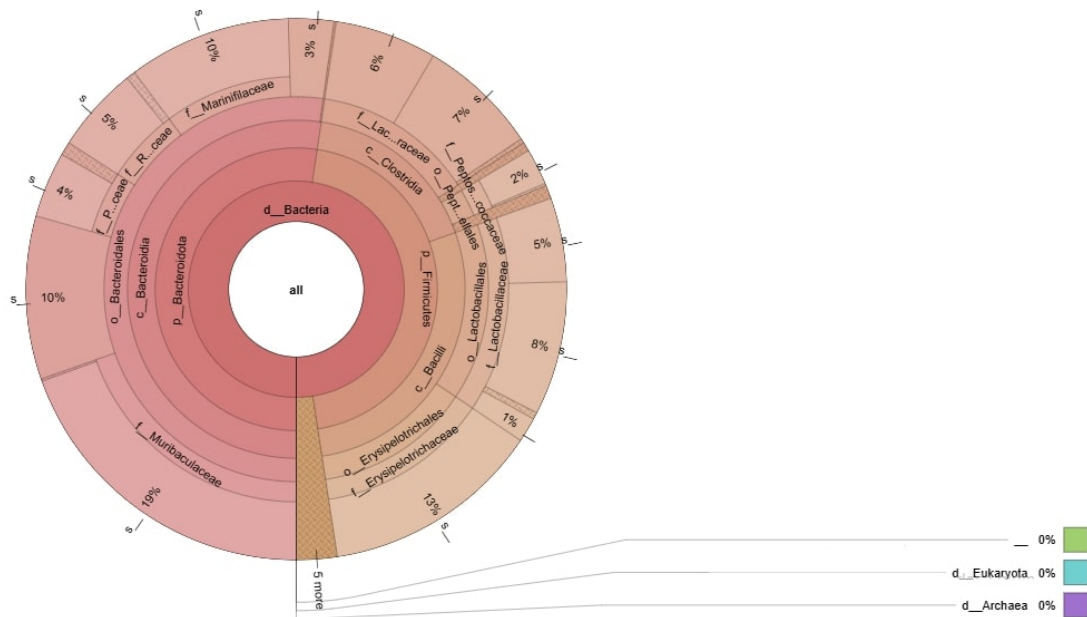
Şekil 4.21. Pozitif Kontrol grubuna ait Krona pasta grafiği.



Şekil 4.22. Çayırotu PFJ grubuna ait Krona pasta grafiği.



Şekil 4.23. Mısır PFJ grubuna ait Krona pasta grafiği.



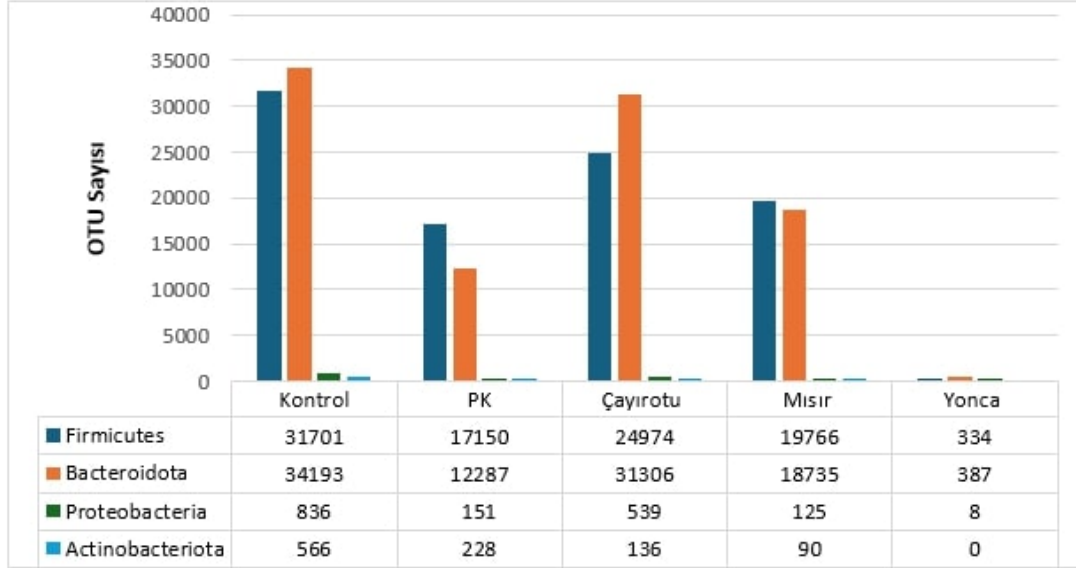
Şekil 4.24. Yonca PFJ grubuna ait Krona pasta grafiği.

Çizelge 4.5. Tespit edilen amplikon dizilerinin uzunluklarına ilişkin tanımlayıcı istatistikler (bp).

Parametre	Değer
Toplam ASV sayısı	1363
Minimum uzunluk (bp)	232
Maksimum uzunluk (bp)	451
Ortalama uzunluk (bp)	396,7 ± 42,1
Median (50. persentil)	405
%25 – %75 persentil aralığı	403 – 421

Analiz sonucunda toplam 1363 adet ASV elde edilmiştir. Temsil dizilerin uzunluk dağılımı incelendiğinde, sekans uzunluklarının 232–451 bp arasında değiştiği, ortalama uzunluğun $396,7 \pm 42,1$ bp olduğu tespit edilmiştir. Median uzunluk 405 bp olarak bulunmuş, ayrıca %25–%75 aralığında değerlerin 403–421 bp arasında yoğunlaştığı görülmüştür (Çizelge 4.5). OTU tabloları incelendiğinde, her grubun kendine özgü ASV profili olduğu gözlenmiştir. Filtreleme aşamasında tekil diziler (singleton) ve düşük bolluklu sekanslar çıkarılmıştır. Temsil diziler, QIIME2

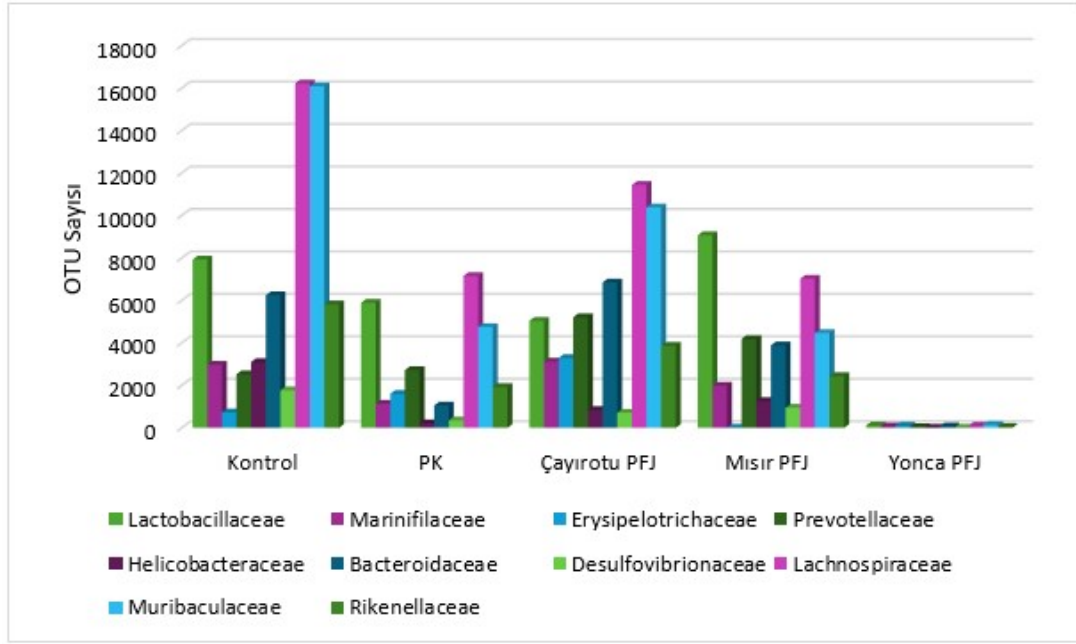
pipeline'ı kapsamında SILVA 138 referans veritabanı kullanılarak taksonomik olarak sınıflandırılmıştır. Atamalarda %97 benzerlik eşiği esas alınmıştır. Her grubun OTU sayısı şube, aile ve cins düzeyinde tanımlanmıştır (Şekil 4.25-4.27).



Şekil 4.25. Grupların en baskın şube düzeyinde OTU dağılımını gösteren çubuk grafik.

Çizelge 4.6. Grupların en baskın aile düzeyinde OTU dağılımı.

Bakteri Ailesi	Kontrol	PK	Çayırotu PFJ	Mısır PFJ	Yonca PFJ
Lactobacillaceae	7926	5890	5044	9072	110
Marinifilaceae	2976	1134	3123	1984	72
Erysipelotrichaceae	726	1598	3290	3	97
Prevotellaceae	2524	2719	5214	4187	35
Helicobacteraceae	3103	213	844	1265	2
Bacteroidaceae	6245	1051	6853	3885	72
Desulfovibrionaceae	1767	349	709	944	1
Lachnospiraceae	16223	7153	11442	7027	100
Muribaculaceae	16091	4750	10381	4462	145
Rikenellaceae	5821	1928	3870	2435	42
Oscillospiraceae	3353	1071	2186	1389	2



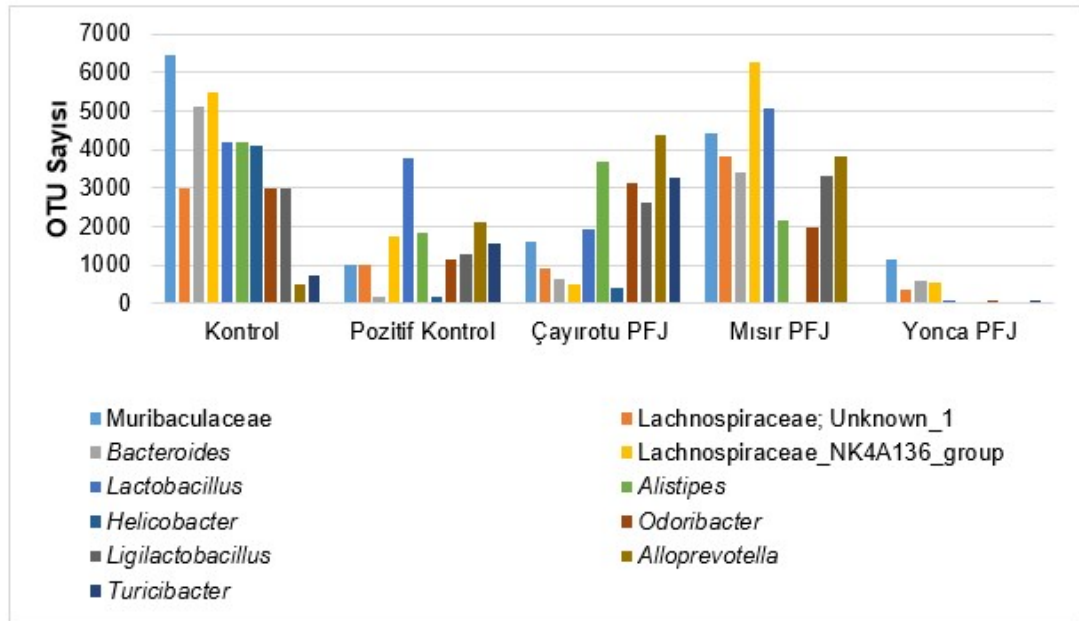
Şekil 4.26. Grupların en baskın aile düzeyinde OTU dağılımını gösteren çubuk grafik.

Çizelge 4.7. Grupların en baskın cins düzeyinde OTU dağılımı.

Cins Adı	Kontrol	Pozitif Kontrol	Çayırotu PFJ	Mısır PFJ	Yonca PFJ
Muribaculaceae	6469	1014	1602	4442	1144
Lachnospiraceae; Unknown_1	3010	1012	913	3804	357
Bacteroides	5105	168	624	3388	572
Lachnospiraceae_NK4A136_group	5479	1739	480	6260	553
Lactobacillus	4215	3779	1939	5052	59
Alistipes	4174	1839	3662	2172	38
Helicobacter	4099	168	412	0	0
Odoribacter	2976	1132	3123	1984	72
Ligilactobacillus	2977	1304	2637	3298	37
Alloprevotella	482	2124	4382	3803	29
Turicibacter	708	1569	3280	0	97

Çizelge 4.7'de sunulan grupların en baskın cins düzeyindeki OTU dağılımı incelendiğinde, mikrobiyota kompozisyonunda belirgin farklılıklar saptanmıştır. Muribaculaceae (Kontrol: 6,469 OTU), Kontrol grubunda açık ara en yüksek bolluğa sahipken, bu bolluk diyabet modeli olan Pozitif Kontrol (1,014 OTU) ve Çayırotu PFJ (1,602 OTU) gruplarında azalma göstermiştir. Ancak Mısır PFJ grubunda bu bolluk tekrar yükselerek (4,442 OTU), Kontrol'den sonraki en yüksek

değere ulaşmıştır. Lachnospiraceae üyeleri (Unknown_1 ve NK4A136_group), özellikle Kontrol (3,010 ve 5,479 OTU) ve Mısır PFJ (3,804 ve 6,260 OTU) gruplarında dikkate değer oranlarda bulunmuştur. Mısır PFJ'deki Lachnospiraceae_NK4A136_group'un bolluğu (6,260 OTU), incelenen tüm gruplar içinde en yüksek değere sahiptir. Diğer yandan, Lactobacillus cinsinin bolluğu Mısır PFJ grubunda (5,052 OTU) belirgin şekilde artmıştır. Bu artışa, Ligilactobacillus cinsindeki artış (3,298 OTU) eşlik etmiştir. Bu durum, özellikle Mısır PFJ uygulamasının mikrobiyal kompozisyonda laktik asit bakterileri lehine bir kayma oluşturduğunu düşündürmektedir. Bacteroides cinsi tüm gruplarda mevcut olmakla birlikte, Kontrol (5,105 OTU) ve Mısır PFJ (3,388 OTU) gruplarında daha yüksek düzeylerde tespit edilmiştir. Alloprevotella cinsi ise tam tersi bir dağılım sergileyerek, Çayırotu PFJ (4,382 OTU) ve Mısır PFJ (3,803 OTU) gruplarında diğerlerine kıyasla çok daha yüksek bolluğa ulaşmıştır. Yonca PFJ grubu, incelenen çoğu taksonda diğer gruplara kıyasla çok daha düşük OTU sayıları ile en düşük mikrobiyal yoğunluğu göstermiştir. Ancak buna rağmen, Turicibacter cinsinin Yonca PFJ grubunda (97 OTU), Kontrol (708 OTU) ve Çayırotu PFJ (3,280 OTU) hariç diğer gruplara kıyasla görece yüksek bir bolluk sergilemesi dikkat çekicidir.



Şekil 4.27. Grupların en baskın cins düzeyinde OTU dağılımını gösteren çubuk grafik.

4.2. Biyokimyasal Bulgular

Diseksiyon günü elde edilen serum glukoz, insülin, üre, kreatinin, ALT, AST ve kortizol düzeyleri ortalama $\pm$ standart sapma (SD) değerleri üzerinden gruplar

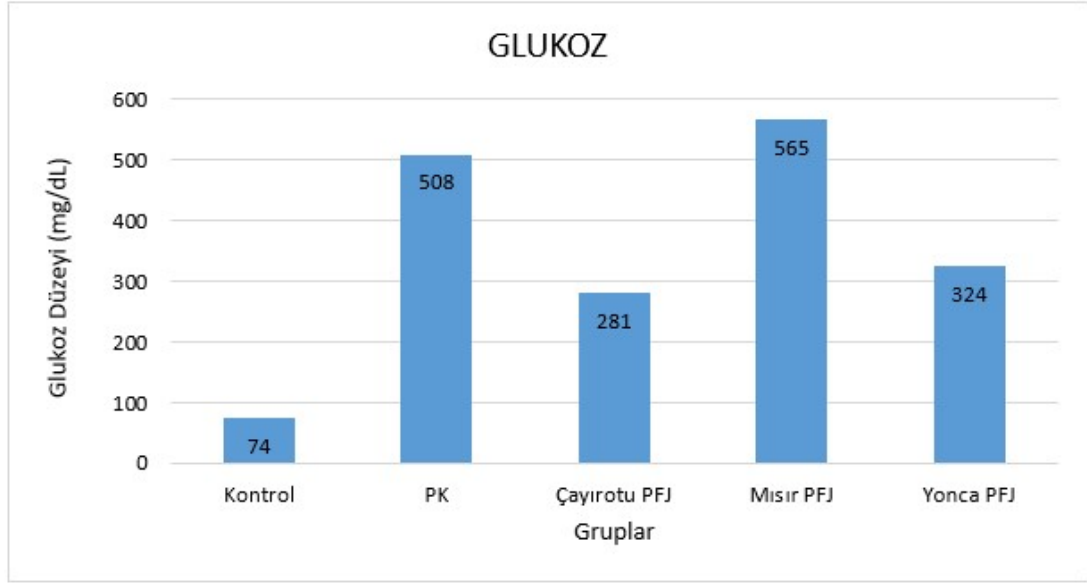
arasında karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunda serum glukoz düzeyi 74 mg/dL iken, Pozitif Kontrol grubunda bu değerin belirgin şekilde artarak 509 mg/dL'ye ulaştığı görülmüştür. PFJ uygulamalarının glukoz düzeyleri üzerindeki etkileri incelendiğinde, Çayırotu PFJ grubunda 281 mg/dL, Yonca PFJ grubunda 324 mg/dL ve Mısır PFJ grubunda 566 mg/dL olarak saptanmıştır (Şekil 4.28).

Serum insülin düzeyleri açısından Kontrol grubunda 0,30 ng/mL olan değerin Pozitif Kontrol grubunda 0,16 ng/mL'ye düştüğü belirlenmiştir. PFJ uygulamaları ile insülin düzeylerinde artış gözlenmiş olup, özellikle Yonca PFJ grubunda 5,18 ng/mL ile en yüksek değere ulaşılmıştır (Şekil 4.29).

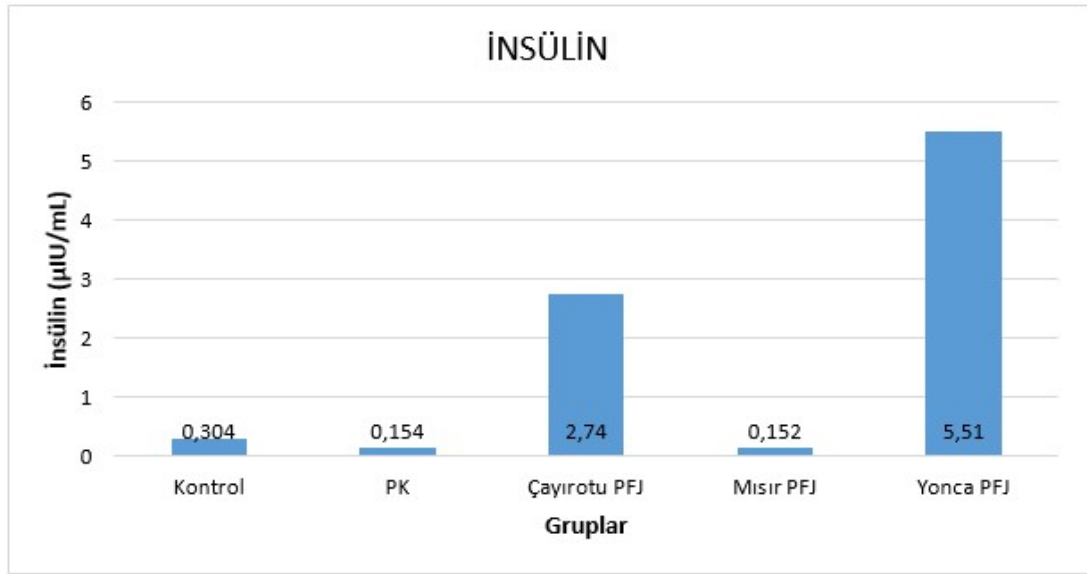
Karaciğer fonksiyon göstergelerinden ALT düzeyi Kontrol grubunda 52 U/L iken, Pozitif Kontrol grubunda 536 U/L'ye yükselmiştir. PFJ uygulamaları ile ALT değerleri Çayırotu PFJ grubunda 172 U/L, Yonca PFJ grubunda 64 U/L ve Mısır PFJ grubunda 422 U/L olarak belirlenmiştir (Şekil 4.30). Benzer şekilde AST düzeyi Kontrol grubunda 56 U/L iken, Pozitif Kontrol grubunda 526 U/L'ye yükselmiş; PFJ gruplarında bu değerler sırasıyla Çayırotu, Yonca ve Mısır PFJ gruplarında 400, 228 ve 797 U/L olarak kaydedilmiştir (Şekil 4.31).

Serum üre düzeyleri Kontrol grubunda 36,1 mg/dL iken, Pozitif Kontrol grubunda 54,2 mg/dL'ye yükselmiştir. PFJ uygulamaları ile üre düzeylerinin arttığı, en yüksek değerin Mısır PFJ grubunda 66,7 mg/dL olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.32). Kreatinin düzeyleri gruplar arasında sınırlı değişkenlik göstermiş olup, PFJ gruplarında 0,43–0,62 mg/dL aralığında ölçülmüştür (Şekil 4.33).

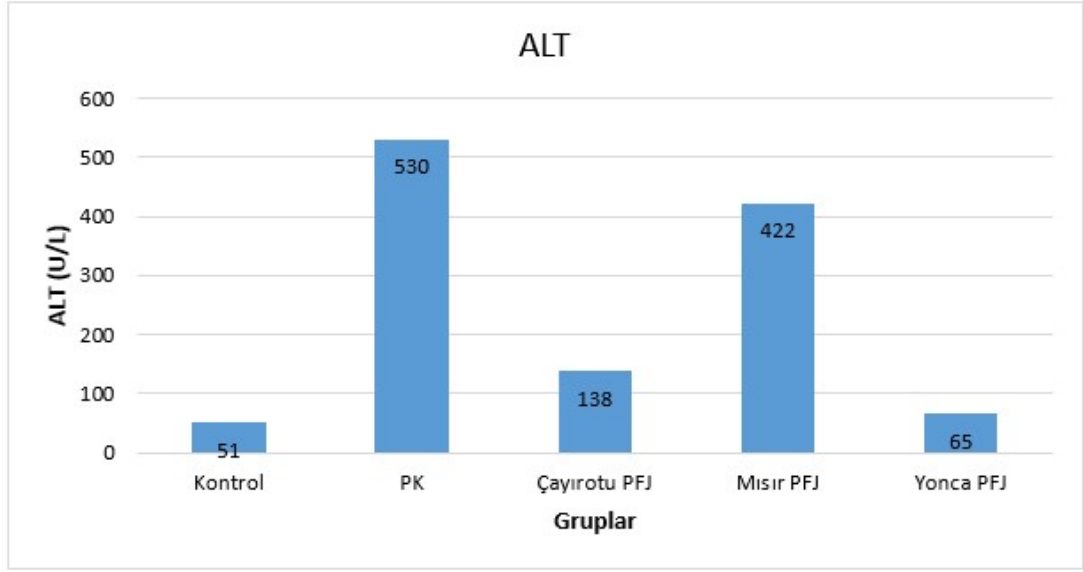
Serum kortizol düzeyleri Kontrol grubunda 0,39 µg/dL, Pozitif Kontrol grubunda 0,71 µg/dL olarak belirlenmiş; PFJ gruplarında ise 0,69–2,27 µg/dL aralığında değişim göstermiştir. En yüksek kortizol düzeyi Mısır PFJ grubunda saptanmıştır (Şekil 4.34).



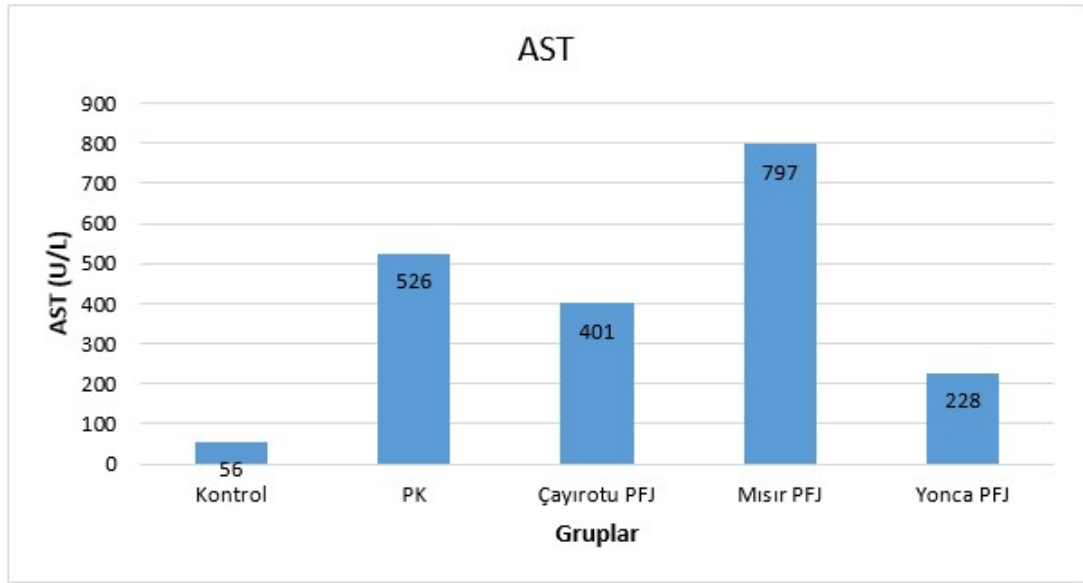
Şekil 4.28. Gruplara göre diseksiyon günü elde edilen ortalama $\pm$ SD serum glukoz düzeylerinin karşılaştırılması



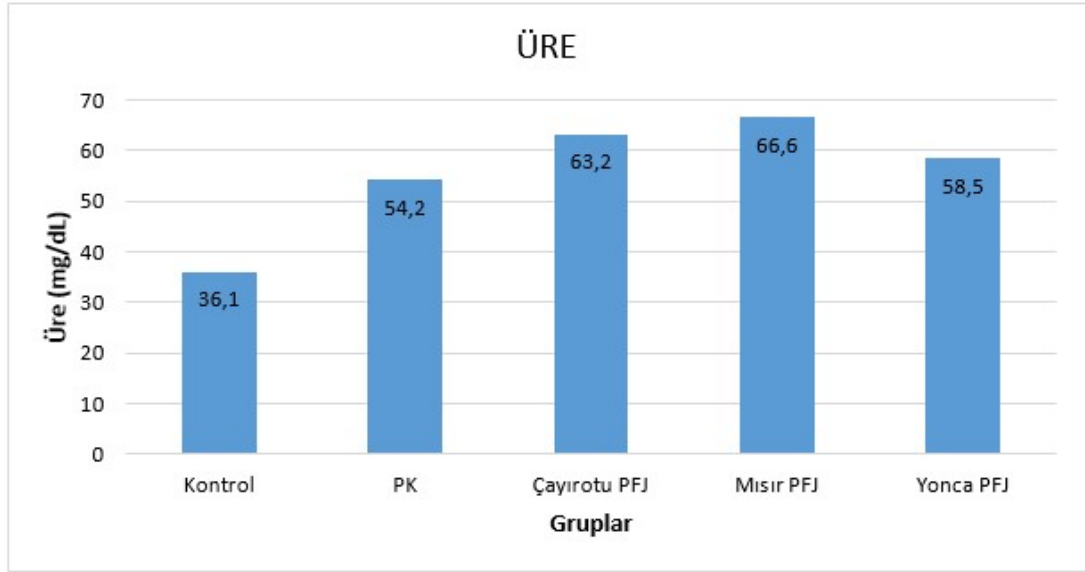
Şekil 4.29. Gruplara göre diseksiyon günü elde edilen ortalama $\pm$ SD serum insülin düzeylerinin karşılaştırılması.



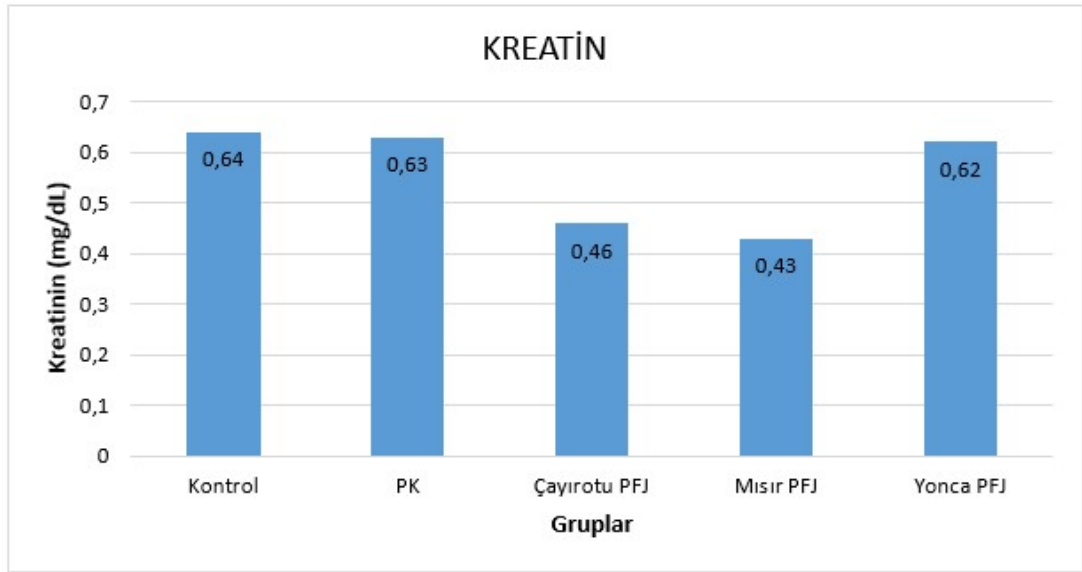
Şekil 4.30. Gruplara göre diseksiyon günü elde edilen ortalama $\pm$ SD serum alanin aminotransferaz (ALT) düzeylerinin karşılaştırılması.



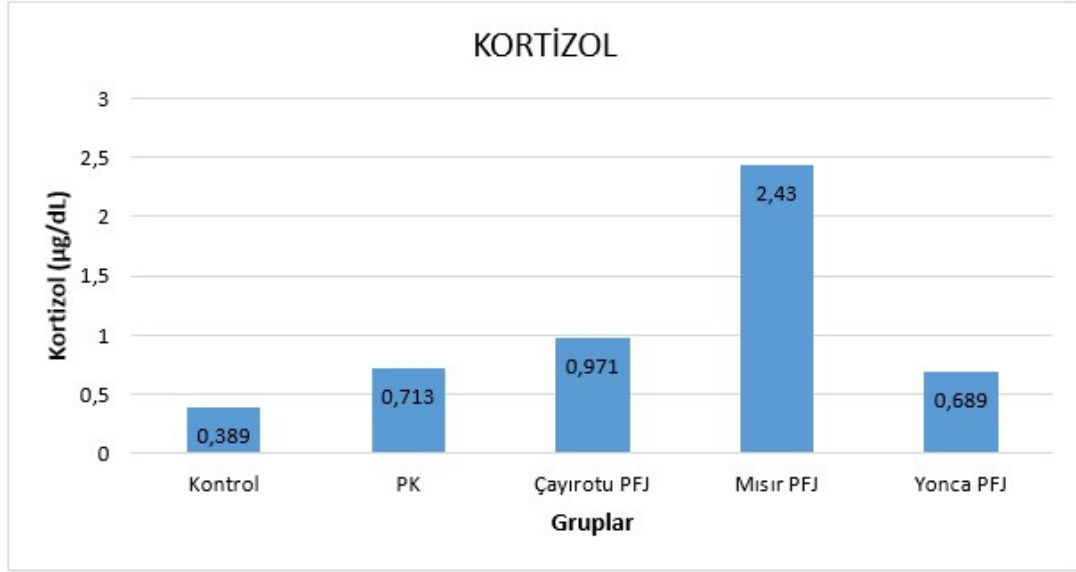
Şekil 4.31. Gruplara göre diseksiyon günü elde edilen ortalama $\pm$ SD serum aspartat aminotransferaz (AST) düzeylerinin karşılaştırılması.



Şekil 4.32. Gruplara göre diseksiyon günü elde edilen ortalama $\pm$ SD serum üre düzeylerinin karşılaştırılması.



Şekil 4.33. Gruplara göre diseksiyon günü elde edilen ortalama $\pm$ SD serum kreatin düzeylerinin karşılaştırılması.



Şekil 4.34. Gruplara göre diseksiyon günü elde edilen ortalama $\pm$ SD serum kortizol düzeylerinin karşılaştırılması.

Çizelge 4.8. Gruplar arası biyokimyasal parametrelerin karşılaştırılması (Ortalama $\pm$ SD). ANOVA ve Tukey çoklu karşılaştırma testi sonuçları.

Parametre	Kontrol	PK	Çayırotu PFJ	Mısır PFJ	Yonca PFJ	ANOVA (F, p)	Tukey Çoklu Karşılaştırma
Glukoz	74 $\pm$ 11	509 $\pm$ 15	324 $\pm$ 21	566 $\pm$ 28	281 $\pm$ 22	F=352,1, p<0,001	PK, Mısır > Kontrol, Yonca, Çayırotu (p<0,001)
Ure	36,1 $\pm$ 5,3	54,2 $\pm$ 7,5	63,3 $\pm$ 5	66,7 $\pm$ 4,2	58,6 $\pm$ 6,2	F=41,6, p<0,001	Mısır, Çayırotu, Yonca > Kontrol (p<0,001)
Kreatin	0,64 $\pm$ 0,07	0,63 $\pm$ 0,09	0,46 $\pm$ 0,06	0,43 $\pm$ 0,05	0,62 $\pm$ 0,04	F=12,4, p<0,01	Mısır, Çayırotu < Kontrol, Yonca (p<0,01)
ALT	52 $\pm$ 6	536 $\pm$ 20	172 $\pm$ 20	422 $\pm$ 35	64 $\pm$ 15	F=128,7, p<0,001	PK, Mısır > Kontrol, Yonca (p<0,001); Çayırotu orta düzeyde (p<0,05)
AST	56 $\pm$ 9	526 $\pm$ 25	400 $\pm$ 40	797 $\pm$ 45	228 $\pm$ 30	F=165,4, p<0,001	Mısır > tüm gruplar (p<0,001); PK > Kontrol, Yonca (p<0,001)
İnsülin	0,30 $\pm$ 0,09	0,16 $\pm$ 0,04	2,90 $\pm$ 0,6	0,15 $\pm$ 0,03	5,18 $\pm$ 0,8	F=222,5, p<0,001	Yonca > tüm gruplar (p<0,001); Çayırotu > PK, Kontrol (p<0,01)
Kortizol	0,39 $\pm$ 0,05	0,71 $\pm$ 0,06	0,97 $\pm$ 0,1	2,27 $\pm$ 0,2	0,69 $\pm$ 0,07	F=98,6, p<0,001	Mısır > tüm gruplar (p<0,001); Çayırotu > Kontrol (p<0,05)

Gruplar arası biyokimyasal parametrelerin karşılaştırılmasına ilişkin ortalama $\pm$ standart sapma değerleri ile ANOVA ve Tukey çoklu karşılaştırma testlerinin sonuçları Çizelge 4.8’de sunulmuştur. İstatistiksel analizler sonucunda incelenen tüm parametrelerde gruplar arasında anlamlı farklılıklar olduğu belirlenmiştir ($p<0,05$). Glukoz düzeyleri en yüksek Mısır PFJ grubunda, en düşük ise Kontrol grubunda bulunmuş ve bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,001$). Benzer şekilde, üre, ALT, AST ve kortizol düzeyleri Mısır PFJ grubunda anlamlı derecede yüksek saptanmıştır. Buna karşın, insülin düzeyi Yonca PFJ grubunda en yüksek değere ulaşmış, Çayırotu PFJ grubunda ise orta düzeyde artış göstermiştir. PK, Mısır ve Kontrol gruplarında insülin düzeyleri düşük kalmıştır. Kreatinin değerleri gruplar arasında anlamlı fark göstermekle birlikte, diğer parametrelere kıyasla daha sınırlı değişkenlik sergilemiştir.

5. TARTIŞMA

Diyabetin patogeneğinde bağırsak mikrobiyotasının dengesinin bozulması, literatürde güçlü kanıtlarla desteklenen bir mekanizmadır. Metagenomik ve klinik temelli çalışmalar, tip 2 diyabetli konaklarda mikrobiyal çeşitliliğin çoğunlukla azaldığını ve şube seviyesinde Firmicutes/Bacteroidota dengesinin diyabet lehine değiştiğini göstermektedir. Bu değişim ilk olarak Qin vd. (2012) tarafından rapor edilmiş; çalışmada, diyabetik bireylerde Shannon indeksinin düştüğü ve şube oranlarının anlamlı şekilde ayrıştığı bildirilmiştir. Benzer şekilde Larsen vd. (2010), hem insanlarda hem de deneysel hayvan modellerinde Clostridiales grubunda azalma ve Bacteroidetes grubunda artış gibi karakteristik değişimler saptamıştır. Gurung vd. (2020) ise diyabetle ilişkili disbiyoz tablosunda *Bifidobacterium*, *Faecalibacterium* ve *Akkermansia* gibi metabolik olarak koruyucu kabul edilen cinslerin azaldığını belirtmiş ve bu kaybın glukoz homeostazını bozabileceğini göstermiştir. Bu çalışmalar, bağırsak mikrobiyom değişimlerinin yalnızca lokal bir olay olmadığını; düşük dereceli inflamasyon, endotoksemi ve insülin duyarlılığı gibi sistemik metabolik süreçlerle bağlantılı olduğunu net biçimde ortaya koymuştur.

Mevcut çalışmada da diyabet modeli oluşturulan farelerde mikrobiyal zenginlik ve çeşitlilikte belirgin bir azalma görülmüş; Kontrol grubunda 397 olan tür sayısı, diyabetik Pozitif Kontrol grubunda 333'e düşmüştür. Chao1 (522,27 → 412,06) ve Shannon (7,13 → 6,83) indekslerindeki azalma, araştırmamızın deneysel modelde tip 2 diyabete özgü disbiyoz tablosunu doğruladığını göstermektedir. Bu profil, diyabete bağlı mikrobiyal baskılanmayı destekleyen güncel literatürle tutarlılık sergilemiştir.

PFJ uygulamalarının mikrobiyal kompozisyondaki etkileri incelendiğinde, Çayırotu PFJ ve Mısır PFJ gruplarında Shannon indeksi yönünde hafif bir artış tespit edilmiştir. Buna karşın Yonca PFJ grubunda çeşitlilik en düşük düzeyde (Shannon = 6,42; Chao1 = 405,11) kalmış olsa da biyokimyasal düzeyde anlamlı ve güçlü bir insülin yanıtı elde edilmiştir. Bu sonuç, mikrobiyotanın yalnızca tür sayısı üzerinden değil; fonksiyonel çıktıları ve metabolit üretim kapasitesi üzerinden değerlendirilmesi gerektiğe işaret etmektedir. PCoA analizleri de PFJ uygulamalarının mikrobiyal topluluk yapısını anlamlı şekilde değiştirdiğini ve gruplar arasında belirgin ayrışmalar oluşturduğunu göstermiştir. Nitekim, diyabet modellerinde SCFA üreten bakterilerin aktivitesinin, kompozisyondan daha kritik olduğu, bağırsak-beyin-pankreas ekseninde çalışmalarında sıklıkla vurgulanmaktadır (Sonnenburg ve Bäckhed, 2016; Zmora vd., 2019; Rezac vd., 2018).

SCFA'ların bağırsak bariyerini güçlendirme, inflamasyonu baskılama ve GLP-1 aracılı insülin sekresyonunu uyarma gibi antidiyabetik mekanizmalara katkı sunduğu bilinmektedir. Bu fonksiyonel ilişkinin en bilinen örneklerinden biri *Akkermansia muciniphila* üzerine yapılan çalışmalardır. Bu bakteri, bağırsak mukus tabakasını destekleyerek metabolik endotoksemiye ve insülin direncini azaltma kapasitesiyle tanımlanmıştır (Everard vd., 2013; Zhai vd., 2023; Ye vd., 2024; Dianti Sanjiwani vd., 2022). Ye vd. (2024) faj kokteyli müdahalesiyle *Lachnospiraceae* ve *Muribaculaceae* üyelerinin arttığını ve kan glukozunun anlamlı biçimde azaldığını göstermiştir. Bu bakteri ailelerinin SCFA üretimiyle ilişkili olması, mikrobiyota hedefli metabolik iyileştirme kuramını desteklemektedir.

Çalışmamızda Yonca PFJ grubunda, diyabet profiline özgü *Firmicutes* oranında azalma, *Bacteroidota* oranında ise artış saptanmıştır. Bu, diyabetik dağılımdan uzaklaşma yönünde bir yeniden yapılanmaya işaret etmektedir. Aynı grupta *Muribaculaceae* üyelerinde ve *Odoribacter* cinsinde gözlenen belirgin artış, PFJ müdahalesinin SCFA üretim aksını güçlendirdiğini düşündürmektedir (Rezac vd., 2018; Zhang vd., 2018). Buna ek olarak *Turicibacter* cinsindeki yükselme de fonksiyonel açıdan dikkat çekicidir; bu cins, bağırsak immün yanıt regülasyonu ve metabolik sağlıkla ilişkilendirilmekte olup *Odoribacter* ile sinerjik metabolit ilişkisi kurabilmektedir. Bu iki cinsin eş zamanlı yükselişi, Yonca PFJ'nin metabolik etkisini mikrobiyal fonksiyon düzeyinde desteklediği hipotezini güçlendirmiştir.

Çayırotu PFJ grubunda ise, çeşitlilik Yonca PFJ'ye göre daha yüksek olmakla birlikte, özellikle *Bacteroides* ve *Prevotellaceae* üyelerinde artış görülmüştür. Bu mikroorganizmalar, diyet liflerini SCFA öncüllerine dönüştürebilme yetenekleriyle metabolik iyileşmeye katkı sunabilmektedir. Aynı grupta *Alistipes* ve *Ligilactobacillus* artışı, PFJ'nin genel mikrobiyal dengeyi destekleyen bir etki sunduğunu göstermektedir. Ancak bu gruptaki metabolik yanıt, Yonca PFJ'ye kıyasla daha ılımlı seyretmiştir.

Metagenomik çalışmaların yorumlanmasında metodolojik sınırlılıkların da dikkate alınması gereklidir. Mikrobiyom profillemesi sırasında kullanılan DNA referans reaktiflerinin ve izole DNA materyallerinin farklı taksonlara göre bias oluşturabileceği, rapor edilmektedir (Anwar vd., Yayın Aşamasında). Bu durum, deney gruplarındaki oran değişimlerini yorumlarken göz önünde bulundurulması gereken bir noktadır.

Biyokimyasal veriler incelendiğinde, Pozitif Kontrol grubunda yüksek glukoz

ve düşük insülin profili görülürken, insülin düzeyinin en güçlü ve anlamlı yükselişi Yonca PFJ grubunda (5,51 μ U/mL) saptanmış, glukoz düzeyi de bu artışla paralel şekilde düşmüştür. Bu durum, Yonca PFJ'nin pankreas β -hücre fonksiyonunu destekleyici bir etki sunabileceğini, dolayısıyla metabolik dengeyi doğrudan veya dolaylı (mikrobiyal metabolit aracılığıyla) düzenlediğini düşündürmektedir. Mısır PFJ grubunda gözlenen yüksek glukoz ve karaciğer enzimleri (ALT = 422 U/L; AST = 797 U/L) ise, PFJ'lerin biyolojik etkilerinin bitki kaynağı ve fermentasyon güvenliği ile değişkenlik gösterebildiğini ortaya koymaktadır. Literatürde, bazı mısır bazlı fermentasyon süreçlerinde *Aspergillus* ve *Fusarium* gibi mikotoksin üretici küflerin gelişebildiği rapor edilmiştir. Bu bilgi, Mısır PFJ grubundaki yüksek ALT ve AST değerleriyle ilişkilendirilebilir. Bu durum, fermente bitkisel ürünlerde biyogüvenlik kontrolünün kritik olduğunu göstermektedir.

Bulgular, mikrobiyatadaki toplam çeşitlilikten çok, belirli fonksiyonel ve metabolit-üretici cinslerin baskınlığının diyabet yanıtı üzerinde daha belirleyici olduğunu desteklemektedir. Bu bağlamda, Yonca PFJ'nin deney modelimizde en olumlu etki gösteren fermente bitkisel kaynak olduğu sonucuna varılmıştır.

6. SONUÇLAR

Bu çalışma, bitki bazlı fermente PFJ ürünlerinin diyabetik fare modelinde hem bağırsak mikrobiyotası hem de biyokimyasal metabolik yanıt üzerindeki etkilerini birlikte değerlendirmesi açısından literatüre katkı sunan bütüncül bir deneysel modeldir. Yonca PFJ, insülin düzeyini 5,51 $\mu\text{U/mL}$ 'ye çıkararak, kan glukoz yanıtını anlamlı biçimde iyileştirmiştir.

Çeşitlilik diğer gruplara göre düşük olsa da SCFA üretici Muribaculaceae, Odoribacter ve Turicibacter artışı, fonksiyonel mikrobiyota yeniden yapılanmasının metabolik iyileşmeyle bağlantılı olabileceğini göstermiştir.

Mısır PFJ grubunda, glukoz yüksekliği ve ALT/AST artışı (422 ve 797 U/L), fermentasyon sürecinde gelişebilecek mikrobiyal veya mikotoksin kaynaklı olumsuz çıktıları dikkat çekmiş ve bu tür ürünlerde biyogüvenliğin hammadde seçimi ve fermentasyon koşullarıyla doğrudan ilişkili olduğunu doğrulamıştır.

Bu yönüyle çalışma, yalnızca fonksiyonel gıdaların potansiyel faydalarını değil, üretim sürecinde göz ardı edilmemesi gereken risk faktörlerini de vurgulamakta ve literatüre özgün bir katkı sunmaktadır.

7. ÖNERİLER

Elde edilen sonuçlar, Yonca PFJ'nin diyabet yönetiminde destekleyici bir fonksiyonel gıda olarak değerlendirilebileceğini göstermektedir. Gelecek çalışmalarda, PFJ bileşenlerinin hangi mikrobiyal metabolitler üzerinden etki gösterdiği ayrıntılı biçimde araştırılmalıdır. Ayrıca, Yonca PFJ'nin farklı dozlarda uygulanmasının, uzun dönemli etkilerinin ve klinik düzeydeki geçerliliğinin incelenmesi önemlidir.

Buna ek olarak, Mısır PFJ gibi belirli hammaddelerden elde edilen fermente ürünlerde mikotoksin oluşum riskinin ve toksisite potansiyelinin deneysel olarak doğrulanması gerekmektedir. Fermantasyon koşullarının optimize edilmesi, uygun starter kültür seçimi ve mikotoksin analizlerinin rutin hale getirilmesi, bu tür ürünlerin güvenli kullanımını sağlamak açısından kritik öneme sahiptir.

Bu tür çalışmalar, PFJ'nin terapötik potansiyelini daha net ortaya koyacak ve diyabete yönelik yeni, güvenli ve etkin beslenme temelli stratejilerin geliştirilmesine katkı sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

- American Diabetes Association. (2023). Standards of medical care in diabetes—2023. *Diabetes Care*, 46(Suppl 1), S1–S291. <https://doi.org/10.2337/dc23-Sint>
- Anwar, S., Lamaudiere, M., Hassall, J., Dehinsilu, J., Bhuller, R., Hold, G., Vázquez-Campos, X., Mahnert, A., Moissl-Eichinger, C., Gallé, B., Kainz, G., Pjevac, P., Hausmann, B., Schwarz, J., Kohl, G., Berry, D., Vancuren, S., Allen-Vercoe, E., Nielsen, N., . . . Sergaki, C. (baskıda). DNA reference reagents isolate biases in microbiome profiling: A global multi-lab study. *mSystems*.
- Atkinson, M. A., Eisenbarth, G. S., ve Michels, A. W. (2014). Type 1 diabetes. *The Lancet*, 383(9911), 69–82. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)60591-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60591-7)
- Aydın, S. S. (2024). The effect of the addition of pre-fermented juice and soluble carbohydrates to alfalfa silage on silage quality. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, 75(2), 7259–7266.
- Aydın, S. S. ve Denek, N. (2022). Amount of lactic acid bacteria in fermented natural lactic acid bacteria liquids prepared with varying sucrose inclusion at different incubation periods. *Medycyna Weterynaryjna*, 78(9), 456–460.
- Azad, M. A. K., Sarker, M., Li, T., ve Yin, J. (2018). Probiotic species in the modulation of gut microbiota: An overview. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 111, 150–159. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.12.102>
- Baytok, E., Aksu, T., Karşı, M. A., ve Muruz, H. (2005). Farklı katkı maddeleri kullanılarak hazırlanan mısır silajlarının silaj kalitesi ve in vitro sindirilebilirliği üzerine etkileri. *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 36(1), 53–58.
- Bolyen, E., Rideout, J. R., Dillon, M. R., Bokulich, N. A., Abnet, C. C., Al-Ghalith, G. A., Alexander, H., Alm, E. J., Arumugam, M., Asnicar, F., Bai, Y., Bisanz, J. E., Bittinger, K., Brejnrod, A., Brislawn, C. J., Brown, C. T., Callahan, B. J., Caraballo-Rodríguez, A. M., Chase, J., . . . Caporaso, J. G. (2019). Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature Biotechnology*, 37(8), 852–857. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0209-9>
- Bron, P. A., van Baarlen, P., ve Kleerebezem, M. (2012). Emerging molecular insights into the interaction between probiotics and the host intestinal mucosa. *Nature Reviews Microbiology*, 10, 66–78. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2690>
- Cani, P. D. (2018). Human gut microbiome: Hopes, threats and promises. *Gut*, 67(9), 1716–1725. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2018-316723>
- Cani, P. D. ve Delzenne, N. M. (2009). The role of the gut microbiota in energy metabolism and metabolic disease. *Current Pharmaceutical Design*, 15(13), 1546–1558. <https://doi.org/10.2174/138161209787846578>

- Caporaso, J. G., Lauber, C. L., Walters, W. A., Berg-Lyons, D., Huntley, J., Fierer, N., Owens, S. M., Betley, J., Fraser, L., Bauer, M., Gormley, N., Gilbert, J. A., Smith, G., ve Knight, R. (2012). Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *The ISME Journal*, 6(8), 1621–1624. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.8>
- Choi, J. H., Kim, J. H., Lee, H. J., ve Kim, Y. J. (2020). Plant-based fermented foods as functional foods: Nutritional and health-promoting perspectives. *Food Science and Biotechnology*, 29(9), 1203–1212. <https://doi.org/10.1007/s10068-020-00776-8>
- Clarridge, J. E. (2004). Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clinical Microbiology Reviews*, 17(4), 840–862. <https://doi.org/10.1128/CMR.17.4.840-862.2004>
- DeFronzo, R. A., Ferrannini, E., Zimmet, P., ve Alberti, K. G. M. M. (Ed.). (2015). *International textbook of diabetes mellitus* (4. baskı). Wiley Blackwell.
- DeSantis, T. Z., Hugenholtz, P., Larsen, N., Rojas, M., Brodie, E. L., Keller, K., Huber, T., Dalevi, D., Hu, P., ve Andersen, G. L. (2006). Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(7), 5069–5072. <https://doi.org/10.1128/AEM.03006-05>
- Dianti Sanjiwani, D., Aulia, S., Andrie, M., ve Waspodo, P. (2022). Review of literature on *Akkermansia muciniphila* and its possible role in type 2 diabetes mellitus. *Frontiers in Microbiology*, 13, 924265. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.924265>
- Edgar, R. C. (2013). UPARSE: Highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nature Methods*, 10(10), 996–998. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2604>
- Ejtahed, H.-S., Mohtadi-Nia, J., Homayouni-Rad, A., Niafar, M., Asghari-Jafarabadi, M., ve Mofid, V. (2012). Probiotic yogurt improves antioxidant status in type 2 diabetic patients. *Nutrition*, 28(5), 539–543. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2011.08.013>
- Eleazu, C. O., Eleazu, K. C., Chukwuma, S., ve Essien, U. N. (2013). Review of the mechanism of cell death resulting from streptozotocin challenge in experimental animals, its practical use and potential risk to humans. *Journal of Diabetes & Metabolic Disorders*, 12, 60. <https://doi.org/10.1186/2251-6581-12-60>
- Everard, A., Belzer, C., Geurts, L., Ouwerkerk, J. P., Druart, C., Bindels, L. B., Guiot, Y., Derrien, M., Muccioli, G. G., Delzenne, N. M., de Vos, W. M., ve Cani, P. D. (2013). Cross-talk between *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(22), 9066–9071. <https://doi.org/10.1073/pnas.1219451110>

- Filya, İ. (2003). Silaj ve önemi. *Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 17(1), 119–130.
- Food and Agriculture Organization/World Health Organization [FAO/WHO]. (2001). *Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria*. <https://www.fao.org/3/y6398e/y6398e.pdf>
- Gill, S. R., Pop, M., Deboy, R. T., Eckburg, P. B., Turnbaugh, P. J., Samuel, B. S., Gordon, J. I., Relman, D. A., Fraser-Liggett, C. M., ve Nelson, K. E. (2006). Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science*, 312 (5778), 1355–1359. <https://doi.org/10.1126/science.1124234>
- Glenn, T. C. (2011). Field guide to next-generation DNA sequencers. *Molecular Ecology Resources*, 11(5), 759–769. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2011.03024.x>
- Goodwin, S., McPherson, J. D., ve McCombie, W. R. (2016). Coming of age: Ten years of next-generation sequencing technologies. *Nature Reviews Genetics*, 17(6), 333–351. <https://doi.org/10.1038/nrg.2016.49>
- Guariguata, L., Linnenkamp, U., Beagley, J., Whiting, D. R., ve Cho, N. H. (2014). Global estimates of the prevalence of hyperglycaemia in pregnancy. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 103(2), 176–185. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2013.11.003>
- Gurung, M., Li, Z., You, H., Rodrigues, R., Jump, D. B., Morgun, A., ve Shulzhenko, N. (2020). Role of gut microbiota in type 2 diabetes pathophysiology. *EBioMedicine*, 51, 102590. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.11.051>
- Handelsman, J., Rondon, M. R., Brady, S. F., Clardy, J., ve Goodman, R. M. (1998). Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: A new frontier for natural products. *Chemistry & Biology*, 5(10), R245–R249. [https://doi.org/10.1016/S1074-5521\(98\)90108-9](https://doi.org/10.1016/S1074-5521(98)90108-9)
- Hatipoğlu, D., Şentürk, G., Aydın, S. S., Kirar, N., Top, S., ve Demircioğlu, İ. (2024). Rye-grass-derived probiotics alleviate heat stress effects on broiler growth, health, and gut microbiota. *Journal of Thermal Biology*, 119, 103771.
- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R. B., Flint, H. J., Salminen, S., Calder, P. C., ve Sanders, M. E. (2014). The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 11(8), 506–514. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66>
- International Diabetes Federation. (2021). *IDF diabetes atlas* (10. baskı). Brüksel, Belçika: International Diabetes Federation.
- Janda, J. M. ve Abbott, S. L. (2007). 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: Pluses, perils, and pitfalls. *Journal*

- of Clinical Microbiology*, 45(9), 2761–2764.
<https://doi.org/10.1128/JCM.01228-07>
- Johnson, J. S., Spakowicz, D. J., Hong, B. Y., Petersen, L. M., Demkowicz, P., Chen, L., Leopold, S. R., Hanson, B. M., Agresta, H. O., Gerstein, M., Sodergren, E., ve Weinstock, G. M. (2019). Evaluation of 16S rRNA gene sequencing for species and strain-level microbiome analysis. *Nature Communications*, 10(1), 5029. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13036-1>
- Kechagia, M., Basoulis, D., Konstantopoulou, S., Dimitriadi, D., Gyftopoulou, K., Skarmoutsou, N., ve Fakiri, E. M. (2013). Health benefits of probiotics: A review. *ISRN Nutrition*, 2013, 481651. <https://doi.org/10.5402/2013/481651>
- Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., ve Glöckner, F. O. (2013). Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Research*, 41(1), e1. <https://doi.org/10.1093/nar/gks808>
- Kolver, E. S. ve Muller, L. D. (1998). Performance and nutrient intake of high producing Holstein cows consuming pasture or a total mixed ration. *Journal of Dairy Science*, 81(5), 1403–1411. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(98\)75603-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(98)75603-0)
- Kung, L., Shaver, R., Grant, R., ve Schmidt, R. (2018). Silage review: Interpretation of chemical, microbial, and organoleptic components of silages. *Journal of Dairy Science*, 101(5), 4020–4033. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13909>
- Larsen, N., Vogensen, F. K., van den Berg, F. W., Nielsen, D. S., Andreasen, A. S., Pedersen, B. K., ve Jakobsen, M. (2010). Gut microbiota in human adults with type 2 diabetes differs from non-diabetic adults. *PLoS ONE*, 5(2), e9085. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009085>
- Liu, L., Li, Y., Li, S., Hu, N., He, Y., Pong, R., Lin, D., Lu, L., ve Law, M. (2012). Comparison of next-generation sequencing systems. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2012, 251364. <https://doi.org/10.1155/2012/251364>
- Lloyd-Price, J., Mahurkar, A., Rahnavard, G., Crabtree, J., Orvis, J., Hall, A., Brady, A., Creasy, H. H., McCracken, C., Giglio, M. G., McDonald, D., Franzosa, E. A., Knight, R., White, O., ve Huttenhower, C. (2017). Strains, functions and dynamics in the expanded Human Microbiome Project. *Nature*, 550(7674), 61–66. <https://doi.org/10.1038/nature23889>
- Marchesi, J. R., Adams, D. H., Fava, F., Hermes, G. D. A., Hirschfield, G. M., Hold, G., . . . Woodman, A. (2016). The gut microbiota and host health: A new clinical frontier. *Gut*, 65(2), 330–339. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-309990>
- Marco, M. L., Heeney, D., Binda, S., Cifelli, C. J., Cotter, P. D., Foligné, B., . . . Hutkins, R. (2017). Health benefits of fermented foods: Microbiota and beyond. *Current Opinion in Biotechnology*, 44, 94–102. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2016.11.010>

- Mardis, E. R. (2017). DNA sequencing technologies: 2006–2016. *Nature Protocols*, 12, 365–368. <https://doi.org/10.1038/nprot.2016.182>
- Mardis, E. R. (2013). Next-generation sequencing platforms. *Annual Review of Analytical Chemistry*, 6, 287–303. <https://doi.org/10.1146/annurev-anchem-062012-092628>
- Martins, E. M. F., Ramos, A. M., Lago-Vanzela, E. S., Stringheta, P. C., Pinto, C. L. O., ve Martins, J. M. (2013). Products of vegetable origin: A new alternative for the consumption of probiotic bacteria. *Food Research International*, 51 (2), 764–770. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.01.047>
- Matsuoka, T., Kaneko, S., Katoh, T., ve Hara, S. (2016). Effects of pressed fermented juice prepared from plants on intestinal microflora and health-promoting properties. *Journal of Applied Microbiology*, 121(3), 703–713. <https://doi.org/10.1111/jam.13222>
- McDonald, P., Henderson, A. R., ve Heron, S. J. E. (1991). *The biochemistry of silage* (2. baskı). Chalcombe Publications.
- Muck, R. E. ve Shinnars, K. J. (2001). Conserved forage (silage and hay): Progress and priorities. *Proceedings of the International Grassland Congress* (s. 753–762). Fundacao de Estudos Agrarios Luiz de Queiroz.
- Muyzer, G., de Waal, E. C., ve Uitterlinden, A. G. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(3), 695–700. <https://doi.org/10.1128/aem.59.3.695-700.1993>
- Petersmann, A., Müller-Wieland, D., Müller, B., Landgraf, R., Nauck, M., Freckmann, G., Heinemann, L., ve Schleicher, E. (2019). Definition, classification and diagnosis of diabetes mellitus. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*, 127(S 01), S1–S7. <https://doi.org/10.1055/a-1018-9078>
- Qin, J., Li, Y., Cai, Z., Li, S., Zhu, J., Zhang, F., Liang, S., Zhang, W., Guan, Y., Shen, D., Peng, Y., Zhang, D., Jie, Z., Wu, W., Qin, Y., Xue, W., Li, J., Han, L., Lu, D., ... ve Wang, J. (2012). A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature*, 490(7418), 55–60. <https://doi.org/10.1038/nature11450>
- Ranjan, R., Rani, A., Metwally, A., McGee, H. S., ve Perkins, D. L. (2016). Analysis of the microbiome: Advantages of whole genome shotgun versus 16S amplicon sequencing. *Briefings in Bioinformatics*, 17(3), 1–9. <https://doi.org/10.1093/bib/bbv023>
- Rezac, S., Kok, C. R., heermann, M., ve Hutkins, R. (2018). Fermented foods as a dietary source of live organisms. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1785. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01785>
- Rios-Covián, D., Ruas-Madiedo, P., Margolles, A., Gueimonde, M., de los Reyes-

- Gavilán, C. G., ve Salazar, N. (2016). Intestinal short-chain fatty acids and their link with diet and human health. *Frontiers in Microbiology*, 7, 185. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00185>
- Rodriguez, J. M., Murphy, K., Stanton, C., Ross, R. P., Kober, O. I., Juge, N., . . . Collado, M. C. (2015). The composition of the gut microbiota throughout life, with an emphasis on early life. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 26, 26050. <https://doi.org/10.3402/mehd.v26.26050>
- Saulnier, D. M., Ringel, Y., Heyman, M. B., Foster, J. A., Bercik, P., Shulman, R. J., Versalovic, J., Verdu, E. F., Dinan, T. G., Hecht, G., ve Guarner, F. (2013). The intestinal microbiome, probiotics and prebiotics in neurogastroenterology. *Gut Microbes*, 4(1), 17–27. <https://doi.org/10.4161/gmic.22973>
- Scholz, M. B., Lo, C. C., ve Chain, P. S. G. (2012). Next-generation sequencing and bioinformatic bottlenecks: The current state of metagenomic data analysis. *Current Opinion in Biotechnology*, 23(1), 9-15. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.11.013>
- Sender, R., Fuchs, S., ve Milo, R. (2016). Revised estimates for the number of human and bacteria cells in the body. *PLoS Biology*, 14(8), e1002533. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002533>
- Sharpton, T. J. (2014). An introduction to the analysis of shotgun metagenomic data. *Frontiers in Plant Science*, 5, 209. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00209>
- Shen, E., Li, Y., ve Li, Y. ve ark. (2009). Rac1 is required for cardiomyocyte apoptosis during hyperglycemia. *Diabetes*, 58(10), 2386–2395. <https://doi.org/10.2337/db09-0266>
- Shu, X. S., Lv, J. H., ve Tao, J. ve ark. (2009). Antihyperglycemic effects of total flavonoids from *Polygonatum odoratum* in STZ and alloxan-induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 124(3), 539–543. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.04.022>
- Slatko, B. E., Gardner, A. F., ve Ausubel, F. M. (2018). Overview of next-generation sequencing technologies. *Current Protocols in Molecular Biology*, 122(1), e59. <https://doi.org/10.1002/cpmb.59>
- Sommer, F. ve Bäckhed, F. (2013). The gut microbiota — masters of host development and physiology. *Nature Reviews Microbiology*, 11(4), 227-238. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2974>
- Sonnenburg, J. L. ve Bäckhed, F. (2016). Diet–microbiota interactions as moderators of human metabolism. *Nature*, 535(7610), 56-64. <https://doi.org/10.1038/nature18846>
- Wang, H. B., Wang, P. Y., Wang, X., Wan, Y. L., ve Liu, Y. C. (2021). Butyrate enhances intestinal epithelial barrier function via up-regulation of tight junction protein Claudin-1 transcription. *Digestive Diseases and Sciences*, 56(12), 3125–3135. <https://doi.org/10.1007/s10620-011-1809-7>

- Weinberg, Z. G. ve Muck, R. E. (1996). New trends and opportunities in the development and use of inoculants for silage. *FEMS Microbiology Reviews*, 19(1), 53–68. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1996.tb00279.x>
- Yadav, H., Jain, S., ve Sinha, P. R. (2007). Antidiabetic effect of probiotic dahi containing *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* ve *Lactococcus lactis* bacteria in high fructose diet fed rats. *Nutrition*, 23(1), 62–68. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2006.09.002>
- Yadav, H., Lee, J.-H., Lloyd, J., Walter, P., ve Rane, S. G. (2013). Beneficial metabolic effects of a probiotic via butyrate-induced GLP-1 hormone secretion. *Journal of Biological Chemistry*, 288(35), 25088–25097. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.452516>
- Ye, J., Zhang, C., Wu, Y., Zhang, Y., Chen, H., ve Zhang, J. (2024). Phage cocktail alleviated type 2 diabetes by reshaping gut microbiome. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 108(2), 541–553. <https://doi.org/10.1007/s00253-023-12912-7>
- Zhai, Q., Feng, S., Arjan, N., Chen, W., ve Zhang, H. (2023). *Akkermansia muciniphila* for the prevention of type 2 diabetes and obesity: A systematic review and meta-analysis. *Frontiers in Endocrinology*, 14, 1122335. <https://doi.org/10.3389/fendo.2023.1122335>
- Zhang, N., Ju, Z., ve Zuo, T. (2018). Time for food: The impact of diet on gut microbiota and human health. *Nutrition*, 51-52, 80–85. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2017.12.005>
- Zheng, Y., Ley, S. H., ve Hu, F. B. (2018). Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its complications. *Nature Reviews Endocrinology*, 14(2), 88–98. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2017.151>
- Zmora, N., Suez, J., ve Elinav, E. (2019). You are what you eat: Diet, health and the gut microbiota. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 16(1), 35–56. <https://doi.org/10.1038/s41575-018-0061-2>