

**REBOKSETİN KULLANIMININ BAĞIRSAK
FLORASI ÜZERİNE ETKİSİNİN
BİYOİNFORMATİK ANALİZİ
Yüksek Lisans Tezi**

SİNEM TEKİNKOCA

Eskişehir 2019

**REBOKSETİN KULLANIMININ BAĞIRSAK FLORASI ÜZERİNE ETKİSİNİN
BİYOİNFORMATİK ANALİZİ**

Sinem TEKİNKOCA

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Hülya KARACA GENÇER

İkinci Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Ceren ÖZKUL KOÇAK

Anadolu Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Ocak 2019

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Sinem TEKİNKOCA'nın "Reboksetin Kullanımının Bağırsak Florası Üzerine Etkisinin Biyoinformatik Analizi" başlıklı tezi 17/01/2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek "Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği"nin ilgili maddeleri uyarınca, Farmasötik Mikrobiyoloji Ana Bilim dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Unvanı Adı Soyadı

İmza

Üye (Tez Danışman) : Dr. Öğr. Üyesi Hülya KARACA GENCER

Üye : Doç Dr. Özgür Devrim CAN

Üye : Doç Dr. Volkan KILIÇ

Prof. Dr. Nalan GÜNDOĞDU-KARABURUN

Enstitü Müdürü



ÖZET

REBOKSETİN KULLANIMININ BAĞIRSAK FLORASI ÜZERİNE ETKİSİNİN BİYOİNFORMATİK ANALİZİ

Sinem TEKİNKOCA

Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ocak 2019

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Hülya KARACA GENÇER

İkinci Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Ceren ÖZKUL KOÇAK

Mikrobiyom insan vücudunun en karmaşık bileşenleri arasında yer almaktadır. İkinci beyin olarak adlandırılan bağırsak florası en fazla sayıda ve çeşitlilikte mikroorganizma barındırmaktadır. Hastalıklar ve hastalıkların tedavisine olanak sağlayan ilaçlar mikrobiyata çeşitliliğinde ve metabolizma üzerinde etki göstermektedir. Bu tezde ise diyabetle birlikte sıkça gelişen depresyon tedavisinde kullanılan antidepresanlardan seçici noradrenalin geri alım inhibitörü bir antidepresan olan Reboksetinin farklı iki doz kullanımının ve sağlıklı-diyabetik kontrol gruplarının bağırsak florasının üzerindeki etkisinin biyoinformatik analizle ortaya koymayı amaçlamaktadır. Bu amaçla diyabetik ve sağlıklı farelere 8 mg/kg ve 16 mg/kg reboksetin uygulaması sonrası gaita örneklerinden DNA izole edilmiştir. Amplikasyon işlemi için 16S rRNA bölgesine spesifik V3-V4 primerler kullanılmış ve Illumina Miseq ile sekanslama yapılmıştır. Önişlemlerden sonra QIIME 1.90 biyoinformatik analiz programı kullanılmış olup alfa metrikler açısından fark gözlenmemiştir. Beta çeşitlilik tüm deney gruplarında, diyabetik-sağlıklı kontrol gruplarında, diyabetiklere uygulanan ilaç dozlarında ($p<0,005$) istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. LefSe Analizleri sonrası *Lactobacillus*, *Turicibacter*, *Streptococcus* anlamlı ($p<0,05$) olarak ilaçsız grupta artış gösterirken, *Prevotella*, *Parabacteroides*, *Bacteroides*, *Flexispira*, *Desulfovibrio* anlamlı olarak ($p<0,05$) reboksetin ilacı uygulanmış grupta artış gösterdiği ortaya konmuştur. Sonuçlar doğrultusunda reboksetinin mikrobiyotada diyabetik vakalara benzer disbiyozise neden olabileceği ortaya koyulmuştur.

Anahtar Sözcükler: Reboksetin, Bağırsak florası, Biyoinformatik mikrobiyata analizi.

ABSTRACT

IMPACT OF USING REBOXETINE ON GUT FLORA WITH BIOINFORMATIC ANALYZE

Sinem TEKİNKOCA

Department of Pharmaceutical Microbiology
Anadolu University, Graduate School of Health Sciences, January 2019

Supervisor: Hülya KARACA GENÇER

Co-supervisor: Ceren ÖZKUL KOÇAK

Microbiome is one of the most complex components of the human body. The intestinal flora called the second brain contains the largest number and variety of microorganism. Drugs that enable the treatment of diseases and diseases have an impact on microbiology and metabolism. The aim of this thesis is to reveal the effects of two different doses of reboxetine, one of the selective noradrenaline reuptake inhibitors, and the effect of healthy-diabetic control groups on the gut flora with bioinformatics analysis. After the administration of 8 mg/kg and 16 mg/kg reboxetine to diabetic and healthy rats, DNA was isolated from stool samples. V3-V4 primers specific to the 16S rRNA region were used for the application procedure and sequencing was performed with Illumina Miseq. After the preprocesses, alpha diversity beta diversity and relative taxa distributions were determined by using QIIME 1.90 bioinformatics analysis program. There was no difference in alpha metrics. Beta diversity was found statistically significant in all experimental groups, diabetic-healthy control groups, and in drug doses administered to diabetics ($p<0,005$). After the LefSe analyzes, *Lactobacillus*, *Turicibacter*, *Streptococcus* significantly increased ($p<0,05$). The analyze showed that *Parabacteroides*, *Bacteroides*, *Flexispira* and *Desulfovibrio* increase significantly ($p<0,05$) in the group treated with reboxetine. According to the results, it was shown that reboxetine may cause dysbiosis similar to diabetic cases in microbiota.

Keywords: Reboxetin, Gut flora, Bioinformatics microbiata analysis.

14.01.2019

TEŞEKKÜR

Bu tezi yazmamda emeği geçen ve yüksek lisans eğitimimin her aşamasında maddi manevi desteğini esirgemeyen danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Hülya KARACA GENÇER'e,

Biyoinformatik analizler aşamasında fikir ve tecrübeleriyle yol gösteren ikinci danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Ceren Özkul KOÇAK'a

Deneysel diyabet modelini gerçekleştiren ve gaitaların teminini sağlayan Doç Dr. Özgür Devrim CAN'a ve Arş. Gör. Nazlı Turan YÜCEL'e

Yüksek lisans eğitimimin her aşamasında maddi ve manevi destekleriyle her daim yanımda olan canım aileme, arkadaşlarıma ve Naci AYDIN'a teşekkür ederim.

Sinem TEKİNKOCA

Ocak, 2019

14.01.2019

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Anadolu Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programı”yla tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

Sinem TEKİNKOCA

14.01.2019

STATEMENT OF COMPLIANCE WITH ETHICAL PRINCIPLES AND RULES

I hereby truthfully declare that this thesis is an original work prepared by me; that I have behaved in accordance with the scientific ethical principles and rules throughout the stages of preparation, data collection, analysis and presentation of my work; that I have cited the sources of all the data and information that could be obtained within the scope of this study, and included these sources in the references section; and that this study has been scanned for plagiarism with “scientific plagiarism detection program” used by Anadolu University, and that “it does not have any plagiarism” whatsoever. I also declare that, if a case contrary to my declaration is detected in my work at any time, I hereby express my consent to all the ethical and legal consequences that are involved.

Sinem TEKİNKOCA

İÇİNDEKİLER

BAŞLIK SAYFASI	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI.....	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT.....	iv
TEŞEKKÜR	v
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ.....	vi
STATEMENT OF COMPLIANCE WITH ETHICAL PRINCIPLES AND RULES	vii
İÇİNDEKİLER	viii
TABLolar DİZİNİ.....	x
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiii
1.GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ.....	2
2.1. Mikrobiyom	2
2.1.1. İnsan genom projesi	2
2.1.2. Mikrobiyom projesi.....	2
2.1.3. Bağırsak florası.....	4
2.1.4. Bağırsak florası ve hastalıklarla ilişkisi	6
2.1.5. Bağırsak florası ve ilaçlar	10
2.2. Major Depresyon ve Diyabet.....	10
2.2.1. Major depresyon	10
2.2.2. Diyabet.....	12
2.2.3. Diyabet ve depresyon arasındaki ilişki.....	13

2.3. Antidepresanlar	14
2.3.1. Antidepresan ilaçlar ve türleri	14
2.3.2. Reboksetin.....	16
2.4. Mikrobiyom Analiz Yöntemleri	16
3.YÖNTEMLER	20
3.1. Deneylerde kullanılan hayvanlar	20
3.1.1. Deneylerde kullanılan hayvanlarda diyabetin oluşturulması	20
3.1.2. Deneylerde kullanılan diyabetik hayvanlara reboksetin uygulaması.....	20
3.1.3. Kullanılan deney hayvanlarından gaita örnek alınması.....	21
3.2. Gaita Örneklerinden DNA izolasyonu	21
3.3. Amplikon Kütüphanesi Oluşturulması ve Yeni Nesil Dizileme	22
3.4. Mikrobiyota Analizleri.....	23
3.5.Verilerin Değerlendirilmesi	24
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	25
4.1. Sekans Özeti.....	25
4.2. Alfa Çeşitlilik Değerlendirilmesi	25
4.3. Beta Çeşitlilik Değerlendirilmesi	27
4.4. Taksa Dağılımları Değerlendirilmesi.....	30
4.5. LefSe Analizleri Değerlendirilmesi	36
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	41
KAYNAKÇA	42
EK 1	

TABLÖLAR DİZİNİ

Sayfa

Tablo 2.1. Diyabet gruplarında disbiyosiz	7
Tablo 2.2. Antidepresanların etken maddelerine ait sınıflandırılması	15
Tablo 2.3. Kültür bağımlı olmayan moleküler tekniklerin özeti.....	17
Tablo 2.4. Sekanslama yöntemlerinin avantaj ve dezavantajları	18
Tablo 4.1. Sekans özeti	25
Tablo 4.2. Gözlenen OTU'ların gruplar arasında karşılaştırılması.....	26
Tablo 4.3. Tüm grupların alfa çeşitlilik metriklerinin sayısal değerleri	28
Tablo 4.4. Diyabetik ve sağlıklı gruplarda bakteri taksalarının FDR skorları	38
Tablo 4.5. Reboksetin uygulanmış diyabetik grup ve diyabetik kontrol gruplarına anlamlı olarak etki eden bakteri taksalarının LDA etki dereceleri	40

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. Mikrobiyota, konakçı ve çevresel faktörlerin etkileşimi.....	4
Şekil 2.2. Bağırsak florasının bölgesel dağılımı	5
Şekil 2.3. Bağırsak mikrobiyotasının proksimalden distale (A), epitelden lümene (B), yaşa göre (C) değişimi.....	6
Şekil 2.4. Mikrobiyatanın ürettiği metabolitlerin konak metabolizması üzerindeki etkisi.....	8
Şekil 2.5. Yağ oranı yüksek diyetin oluşturduğu disbiyosizin bağırsak geçirgenliğini etkileyerek diyabet patojenizi oluşumu	9
Şekil 2.6. Antidepresanların etki mekanizması	14
Şekil 2.7. Reboksetin kimyasal yapısı	16
Şekil 2.8. Geri dönüşümlü terminatör dizilemesi genel çalışma mekanizması	19
Şekil 3.1. Mikrobiyom analizlerinde kullanılan akış şeması.....	23
Şekil 4.1. Çalışma grupları arasında alfa çeşitlilik metrikleri. A. Gözlenen OTU, B. Shannon indeksi, C. Filogenetik çeşitlilik.....	27
Şekil 4.2. Tüm deney grupları arasında beta çeşitlilik, unweighted UniFrac analizleri (p=0.001, ANOSIM).....	29
Şekil 4.3. Diyabetik ve sağlıklı gruplar arasında beta çeşitlilik, unweighted UniFrac analizleri (p=0.001, ANOSIM)	29
Şekil 4.4. Kontrol ve reboksetin alan gruplarda beta çeşitlilik, unweighted UniFrac analizleri (p=0.001, ANOSIM)	30
Şekil 4.5. Tüm deney gruplarına ait relatif taksa dağılımları	32
Şekil 4.6. Tüm deney gruplarına ait relatif taksa dağılımlarına ait gösterge.....	33

Şekil 4.7. Tüm deney gruplarında cins düzeyinde relatif taksa dağılımları	34
Şekil 4.8. Diyabet grubu (A) ve sağlıklı kontrol grubunda (B) baskın taksaların dağılımı	35
Şekil 4.9. Reboksetin uygulanan diyabetik grup (A) ve diyabetik kontrol grubunda (B) taksa dağılımları.	36
Şekil 4.10. Diyabetik ve sağlıklı gruplara anlamlı olarak etki eden bakteri taksalarının LDA etki dereceleri.....	37
Şekil 4.11. Reboksetin uygulanmış diyabetik grup ve diyabetik kontrol gruplarına anlamlı olarak etki eden bakteri taksalarının LDA etki dereceleri	39

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

5-HT	: 5-hydroxytryptamine (5-hidroksitriptamin)
BM	: Birleşmiş Milletler
CDE	: <i>Clostridium difficile</i> enfeksiyonu
DES	: DNase/Pyrogen free water (DNaz/pirojensiz su)
DGGE/TGGE	: Denaturing gradient gel electrophoresis/temperature gradient gel electrophoresis (Denatüre gradyan jel elektroforezi/sıcaklık gradyanı jel elektroforezi)
DMB	: 3,3-dimetil-1-butanol
DNA	: Deoxyribo nucleic acid (Deoksribo Nükleik Asit)
FDR	: Adjusted p value (Ayarlanmış p değeri)
FIAF	: Fasting-induced adipose factor (Açlıkla indüklenen adipöz faktör)
FISH	: Fluorescent <i>in situ</i> hybridization (Fluoresan <i>in situ</i> hibridizasyon)
FMT	: Fecal microbiota transplantation (Fekal mikrobiyota Transplantasyonu)
FODMAP	: Fermentable oligo-, di-, mono-saccharides and Polyols (Mayalanabilir oligosakkaritler, disakkaritler, monosakkaritler ve polioller)
GABA	: Gama-Aminobütrik asit
GDM	: Gestational diabetes mellitus (Gestasyonel diyabet)
GLP-1	: Glukagon benzeri Peptid-1
GPR	: G Protein aracılı reseptör
HLA	: Human Leukocyte Antigen (İnsan Lökosit Antijeni)
IBS	: Irritable bowel syndrome (İrritabl bağırsak sendromu)
IGT	: Irritable bowel syndrome (İrritabl bağırsak sendromu)
IL-10	: Interleukin 10 (İnterlökin)
IV	: Intravenous (İntravenöz)
KZYA	: Kısa Zincirli Yağ Asitleri

LDA	: Linear discriminant analysis (Lineer diskriminant analizi)
LPL	: Lipoprotein lipazı
MAOI	: Monoaminoksidaz inhibitörleri
MD	: Majör depresyon
MHC	: Major histocompatibility complex (Majör doku uygunluk kompleksi)
NaSSA	: Noradrenerjik ve Serotonerjik Antidepreanlar
NDGI	: Noradrenalin ve Dopamin Gerialım İnhibitörleri
OTU	: Operational taxonomic unit (Operasyonel taksonomik ünite)
PCoA	: Principle coordinate analysis (Temel koordinat analizi)
pH	: Hidrojen gücü
<i>p.o.</i>	: Per oral (ağız yoluyla)
PPS	: Protein Precipitation Solution (Protein çökeltme solüsyonu)
PRR	: Pattern Recognition Receptor (Kalıp tanıma reseptörleri)
qPZR	: Kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu
RNA	: Ribo Nükleik Asit
rRNA	: Ribozomal RNA
SGAI	: Serotonin Gerialım İnhibitörleri
SEWS-M	: Salt/ethanol wash solution (Tuz/etanol Yıkama Solüsyonu)
SNRI	: Selective noradrenergic reuptake inhibitors (Seçici Noradrenalin Gerialım İnhibitörleri)
SSRI	: Selective serotonine reuptake inhibitors (Seçici Serotonin Gerialım İnhibitörleri)
TGF-B	: Transforming Growth Factor B (Dönüşüm büyüme faktörü B)
TLR	: Toll-like Receptor (Toll benzeri reseptör)
TMA	: Trimetilamin
TMAO	: Trimetilamin N-oksit
T-RFLP	: Terminal restriction part length polymorphism (Terminal Kısıtlama Parçası Uzunluğu Polimorfizmi)
TSA	: Trisiklik Antidepresanlar
TÜDEP	: Türkiye diyabet epidemiyolojisi
WHO	: World health organization (Dünya sağlık örgütü)
ANOVA	: Analysis of Variance (Varyans analizi)

ANOSIM : Analysis of similarities (Benzerlik analizi)
p : Calculated probability (Hesaplanan olasılık)
LEfSE : Linear discriminant analysis effect size (Lineer diskriminant
Analizi etki boyu)

1.GİRİŞ

Mikrobiyom, florada bulunan bakteri, arkea, virus, mantar ve diğer tek hücreli ökaryotların genomlarını ve bunların bulunduğu ortamı ifade etmektedir. İnsan vücudunda bulunan mikrobiyal hücrelerin sayısının toplam insan hücreleri sayısından 10 kat fazla olduğu ortaya konulmuştur. Metabolom üretme ve proteom kodlama açısından insan genomundan daha yüksek potansiyele sahiptir (Goodacre, 2007). Mikrobiyotadaki bakteriler sindirime yardımcı olmak, bağışıklık sisteminin düzenlenmesi, patojenlere karşı koruma, vitamin üretilmesi gibi birçok metabolik fonksiyonda rol oynamaktadır (Gündoğdu, 2016). Bağırsak mikrobiyotası insan vücudunda en fazla sayı ve çeşitte mikroorganizma barındıran flora bölgesidir. Bu nedenle bilim dünyasında unutulmuş organ olarak ifade edilmektedir. Gastrointestinal sistemin kolonizasyonu doğumdan hemen sonra başlar. İlk bakteriyel kolonizasyon doğum şekline bağlı olarak normal ise anne vajina/dışkı florası ve oral beslenme türüne bağlı olarak şekillenir. Sağlıklı bağırsak florasında 1000'den fazla bakteri türü bulunmaktadır. *Firmicutes* 250'den fazla cinsle (*Lactobacillus*, *Mycoplasma*, *Bacillus*, *Clostridium* vb.), *Bacteroidetes* yaklaşık 20 cinsle floranın %90'ını, *Actinobacteria*, *Verrucomicrobia* bağırsak florasının temellerini oluşturmaktadır (Qin vd., 2010). Flora genetik faktörler, yaşlanma, beslenme şekli (pre-pro biyotik kullanımı), çevresel koşullar, stres ve ilaç (antibiyotik vb.) kullanımı gibi faktörler altında değişiklik göstermektedir (Gerritsen vd., 2011). Bağırsak mikrobiyotası sağlık ve hastalıkta kritik rol oynamaktadır. Bağırsak florasında meydana gelen çeşitlilik ve sayısal açıdan değişiklik obezite, tip 2 diyabet, IBS ve daha birçok metabolik hastalıkla ilişkilendirilmektedir (Guarner ve Malagelada, 2003). Yapılan diğer çalışmalarda ise ilaç kullanımlarının flora üzerine etkisi araştırılmaktadır. Sınırlı çalışmalarla antibiyotik kullanımının bağırsak florası üzerine etkisini gösterilmiştir. Bu tezde ise diyabetle birlikte sıkça gelişen depresyon tedavisinde yaygın kullanılan antidepresanlardan seçici noradrenerjik geri alım inhibitörlerinden olan reboksetinin farklı iki doz kullanımının ve sağlıklı-diyabetik kontrol gruplarının bağırsak florasının üzerindeki etkisinin biyoinformatik analizle ortaya konması amaçlanmaktadır. Yüksek verimli metotların ortaya çıkışı ve sofistike biyoinformatik analiz sistemlerin detaylandırılması mikrobiyal bileşimin detaylı tanımlanmasına olanak sağlamıştır.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. Mikrobiyom

2.1.1. İnsan genom projesi

İnsan genom haritasının oluşturulmasına yönelik başlatılan insan genom projesi devlet girişimi ve uluslararası iş birliğinin başarısı olarak gösterilmiştir. 1990 yılında 20 kurumun katılımı ve 3 milyar dolar bütçeyle başlatılan bu projede ABD, Fransa, İngiltere, Japonya ve Çin'den uzmanlar yer almış olup projenin amacı insan genomunun tamamını dizilemektir. Hedef 20000–25000 arası genin yani yaklaşık olarak 3 milyar baz çiftinin sırasını keşfetmektir. Araştırmaya dair sonuçlar Londra'dan Sanger Genetik Araştırmalar Merkezi ve Wellcome Vakfı tarafından analiz edildi. Pahalı ve teknik açıdan zor olan bu projenin %99'unun tamamlandığı 2000 yılında duyuruldu. Yapılan araştırmalar sonucu genlerin %97'sinin çözülebildiğini ve %85'inin doğru şekilde sıralandığını gösterdi (http-1). Elde edilen sonuçlar kanser, kalp hastalıkları, astım, alzheimer ve diğer birçok hastalığın teşhis ve tedavisinde devrim niteliği taşımaktadır (http-1).

Bu farklılıkların hastalıklar açısından değerlendirilmesi, yeni tanı test sistemlerinin geliştirilmesi, gen fonksiyonların belirlenmesi, kişiye özgü tedavilerin geliştirilmesini sağlamak gibi birçok yeni amaca hizmet edeceği düşünülmektedir (Bağcı, 2002).

Sonuç olarak İnsan Genom Projesi genomdaki baz çiftlerinin dizilişini bulmayı ve verileri sanal ortama sunmayı amaçlamıştır. Proje sonucunda da dizilerin hangi proteinleri kodladığı ve bu proteinlerin hücrede hangi fonksiyonlarda rol oynadığını bulmak buna bağlı olarak da hastalıklarla ilişkisi ve ilaç teknolojisine katkı sağlaması amaçlanmıştır (http-2).

2.1.2. Mikrobiyom projesi

İnsan Genom Projesi ve İnsan Mikrobiyom Projesi birbirini tamamlar şekilde büyük iki proje niteliği taşımaktadır. İnsan genom projesinin insanda var olan mikroplarla etkileşimi anlaşılana kadar eksik olacağı savunmuşlar (Davies, 2001). Relman ve Falkow (2001) ağız, bağırsak, vajina ve deri olmak üzere dört ana mikrobiyal kolonizasyon bölgesinin insanda var olduğunu savunmuşlar ve bu genlerin haritasının çıkarılması için ikinci insan genom projesi olarak adlandırılan mikrobiyom

projesi çağrısında bulunmuşlardır. İnsan hücrelerine nazaran çok küçük olan mikroorganizmaların çeşitlilik açısından insan genomunu oluşturan genlerden daha fazla olduğu düşünülüyordu. Bu durumun mikrobiyal çeşitlilik ve fonksiyon açısından daha da önemli hale gelmesiyle; 2007 yılında “İnsan Mikrobiyom Projesi” Amerikan Sağlık Enstitüsü liderliğinde insanda var olan mikroorganizmaların genetik dizilimlerini ortaya koymak, insan sağlığı üzerine etkilerini görmek için başlatıldı. Interdisipliner projedeki asıl dört amaç;

- Her insana özgü temel mikrobiyom olup olmadığını belirlemek,
- Mikrobiyotada meydana gelecek değişikliklerin hastalıklara neden olup olmadığını ortaya koymak,
- Biyoinformatik teknikleri geliştirmek,
- Projeyi etik, hukuki ve sosyal açıdan değerlendirmektir (Bozok vd., 2014).

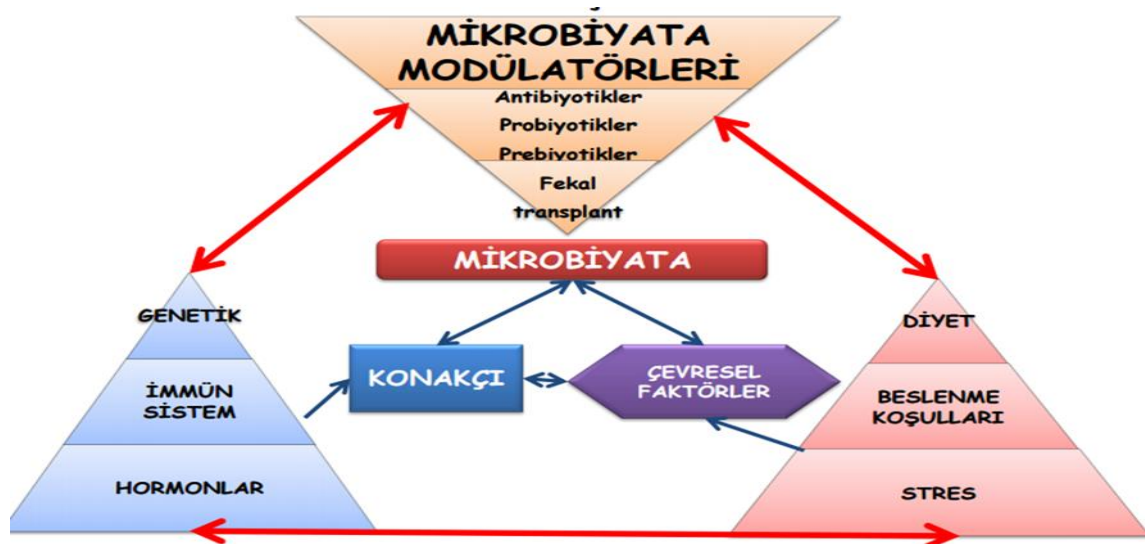
İnsan mikrobiyomu yaş, cinsiyet, beslenme koşulları, genetik faktörler, çevre, ilaç kullanımı gibi faktörlere bağlı değişiklik göstermektedir. Hastalıkla birlikte normal mikrobiyom florasında değişiklik hastalıkların mikrobiyotaya açısından oluşum nedenlerinin anlaşılmasına ve tedavi geliştirilmesine olanak sunacaktır (Peterson ve Garges, 2009). Deri, bağırsak, ağız vajina gibi insan vücudunun farklı bölgelerinde bulunan kommensal, simbiyotik ve patojenik mikroorganizmalara “mikrobiyotaya”, bu mikroorganizmaların genomu ise “mikrobiyom” olarak ifade edilmektedir. İnsan mikrobiyomu ifadesi ilk kez Joshua Lederberg tarafından kullanılmıştır (Lederbeg ve McCray, 2001). İnsan hücreleri ile mikrobiyal hücreler arasında güçlü simbiyotik bir ilişki vardır. İnsan vücudunda bulunan virüs, bakteri, arke ve ökaryotik mikroplar hem sağlığı hem de hastalık fizyolojisini etkilemektedir. Mikrobiyal flora metabolik fonksiyonlara katkı sağlamakta, bağışıklık sistemine destek olmakta, patojenlerden korumakta ve daha birçok işlev de dolaylı veya doğrudan rol oynamaktadır. İnsan vücudu sayı olarak aslında %90 mikroorganizma hücrelerinden ve sadece %10 insan hücrelerinden oluşmaktadır. Mikrobiyomun protein kodlama potansiyelinin insan genomundan çok daha fazla olduğu ortaya konmuştur (Gündoğdu, 2016).

Yapılan çoğu çalışmada mikrobiyal kompozisyonun bakteriyel bileşenlerini tanımlamak için türlere ait 16S rRNA kodlayan gen sekanslanmakta ve sonrasında bilinen bakteriyel sekans veri tabanlarıyla karşılaştırılması ile yapılmaktadır. Tüm mikrobiyal DNA'nın sekanslanmasıyla yapılan metagenomik analiz, mikrobiyal

popülasyonun genetik potansiyelinin değerlendirilmesini sağlamaktadır (Friedricks, 2013). 16S rRNA gen dizileme tekniği kullanılarak mikropların sayısını ve filogenetik ilişkileri belirlenebilmiştir (Botero vd., 2016). Bu alanda birçok çalışma yapılmakla birlikte ve bu çalışmalar hız kazanmıştır. Yapılan çalışmalar ile bebeklerde mikrobiyom evrimi (Palmer vd., 2007) obez ve zayıf bireylerde flora farklılığı ortaya konulmuştur (Ley vd., 2006). Bunun yanı sıra 16S rRNA gen dizileme tekniğiyle birey bağırsak florasındaki çeşitlilik (Eckburg vd., 2005), ağız içi (Faveri vd., 2008), deri (Gao vd., 2007) ve vajinadaki florasal değişiklik ve çeşitlilik ortaya konmuştur (Hyman vd., 2005).

2.1.3. Bağırsak florası

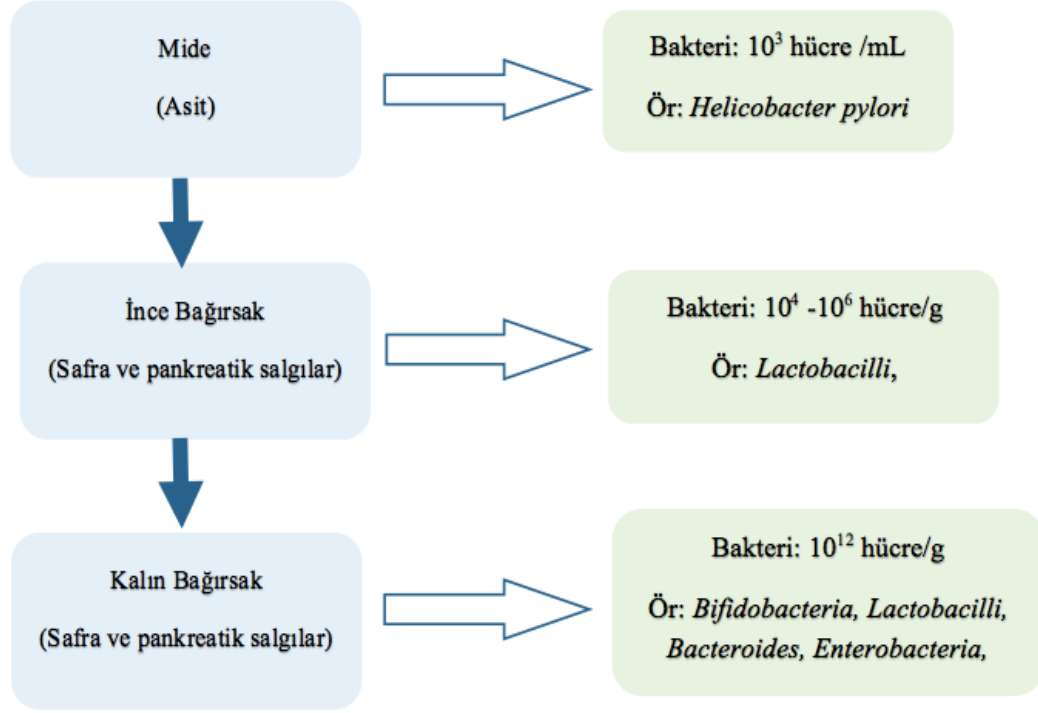
Bağırsak florası insan vücudunda en fazla bakteri barındıran flora bölgesidir yaklaşık 10^{14} kadar mikroorganizma kolonize olmuştur (Turnbaugh vd., 2007). Doğumdan hemen sonra şekillenmeye başlayan bağırsak florası genetik, yaşlanma, beslenme şekli (pre-pro biyotik kullanımı), coğrafi koşullar, stres ve ilaç (antibiyotik vb.) kullanımı gibi çevresel ve genetiksel faktörler altında değişiklik göstermektedir (Gerritsen vd., 2011), (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Mikrobiyota, konakçı ve çevresel faktörlerin etkileşimi (<http-3>)

Bağırsağın farklı bölümlerinde pH ve anatomik değişikliklerden dolayı türlerin çeşitliliği ve sayıları farklılık göstermektedir. İncebağırsak kalın bağırsağa nazaran

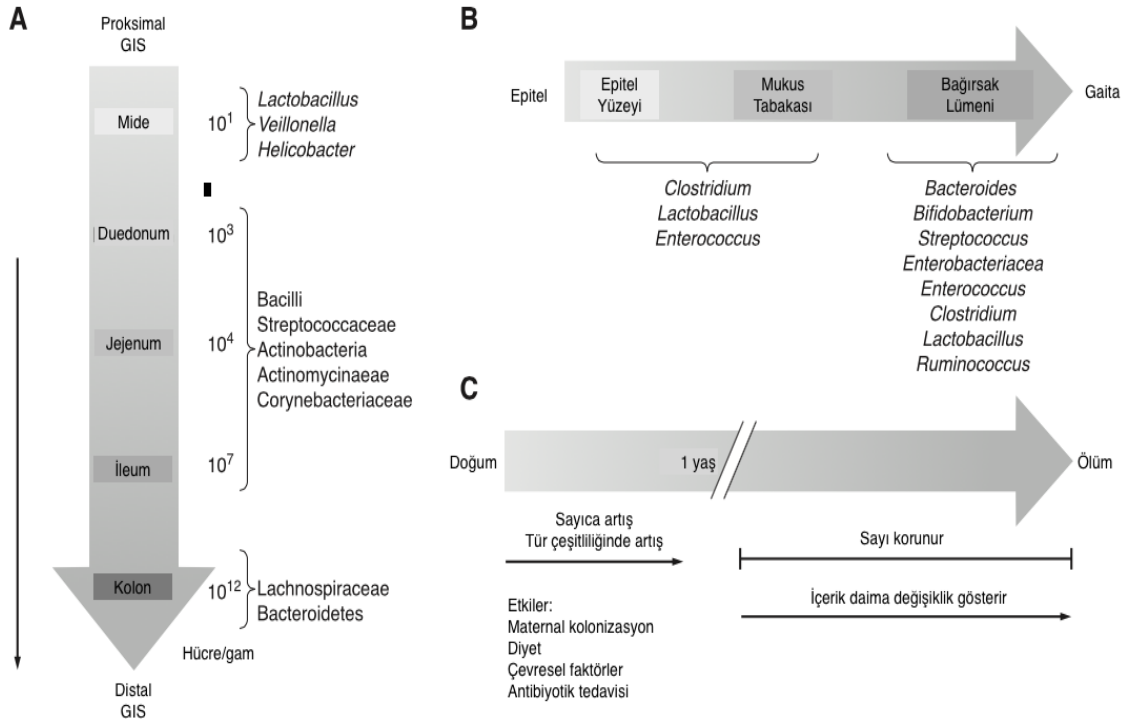
mideye daha yakın olması ve pH koşullarından etkilenmesinden dolayı daha az sayıda bakteri barındırmaktadır (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Bağırsak florasının bölgesel dağılımı (Gerritsen vd., 2011)

Homeostazi halindeki bağırsak mikrobiyotasında dominant olarak *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* ve *Proteobacteria* filumları bunun yanı sıra birçok alt tür bulunmaktadır (Khanna ve Tosh, 2014). Bağırsak florasında yer alan bakteri gruplarına ait taksonomik sınıflandırma proksimalden distale, epitelden lümeneye, doğumdan ölüme kadar farklılık göstermektedir (Sekirov vd., 2010), (Şekil 2.3).

Bağırsak florasında bulunan mikroorganizmaların birçok görevi bulunmaktadır örneğin potasyum mineralini üremek, metanogenesiz, nitrat-sülfat redüksiyon tepkimelerini yapmak, selüloz sindirimine yardımcı olmak, bağırsak sinir fonksiyonlarını düzenlemek, immün sisteme patojenlere bariyer oluşturmak ve antijenlerin tanınmasını sağlayarak destek olmak bu görevlerin başlıcalarıdır (Zhang vd., 2015).



Şekil 2.3. Bağırsak mikrobiyotasının proksimalden distale (A), epitelden lümene (B), yaşa göre (C) değişimi (Sekiroy vd., 2010).

Bağırsak florasında bulunan bakteriler aktif metabolitler üretmektedirler ve bu metabolitler homeostazi de büyük rol oynamaktadır. Örneğin *Lactobacillus* ve *Bifidobacterialar* monosodyum glutamattan gama amino butirik asit (GABA) sentezleyebilmektedir (Barrett vd., 2012). *Bacillus* ve *Sacromicesler* noradrenalin, *Streptococcus* ve *Escherichia* serotonin üretirken *Bacillus* ve *Serracialar* dopamin üretmektedir (Lyte, 2011).

2.1.4. Bağırsak florası ve hastalıklarla ilişkisi

Mikrobiyotanın vücutta bağışıklık, inflamasyon, beslenme, hormonal sistem, epitel doku olgunlaşması gibi daha birçok fonksiyonu olduğundan hastalık patogenezinde önemli rol oynamaktadır.

Mikrobiyotanın yapısının içsel veya dışsal faktörler nedeniyle değişmesi veya bozulması disbiyozis olarak adlandırılmaktadır. Disbiyozis oluşumu, kişide ciddi metabolik ve inflamatuvar patolojilere yol açarak birçok hastalığın oluşmasına neden olmaktadır (Guarner ve Malagelada, 2003).

Bağırsaklarda bulunan bakterilerle insan hücreleri arasında etkileşim vardır ve bu etkileşim IL-10 (Interleukin 10) ve TGF-B (transforming growth factor B) gibi çeşitli sitokinlerin üretimini düzenlemektedir (Neish, 2009). Bağışıklık sisteminde olan TLR

toll-like receptor), PRR (pattern recognition receptor) reseptörlerdendir nöronlarda yaygın olarak bulunmaktadır ve sitokin üretimin ilk kademesinde yer almaktadır (Evrensel ve Ceylan, 2015). İnflamatuvar sitokinlerden interferon alfa depresyona neden olmaktadır (Udina vd., 2012). Antidepresanlarla tedavi edilebilen bozukluklar immunoregulator sitokin IL-10 aktivitesiyle inflamasyonu baskılayarak da antidepresan rolü oynamaktadır (Maes vd., 2005). Probiyotikler ise IL-10 seviyesini arttırmaktadır (Levkovich vd., 2013).

Yapılan çalışmalarla birçok hastalığın oluşmasına neden olan stres; çeşitli şekillerde oluşturularak bağırsak florasında yarattığı değişiklik gösterilmiştir (Shreiner, Kao ve Young, 2015). Örneğin rhesus maymunlarını annelerinden ayırarak oluşturan stresin bağırsak florasında *Bifidobakter* ve *Laktobasillerin* azalmasına neden olduğu gösterilmiştir (Bailey ve Coe, 1999).

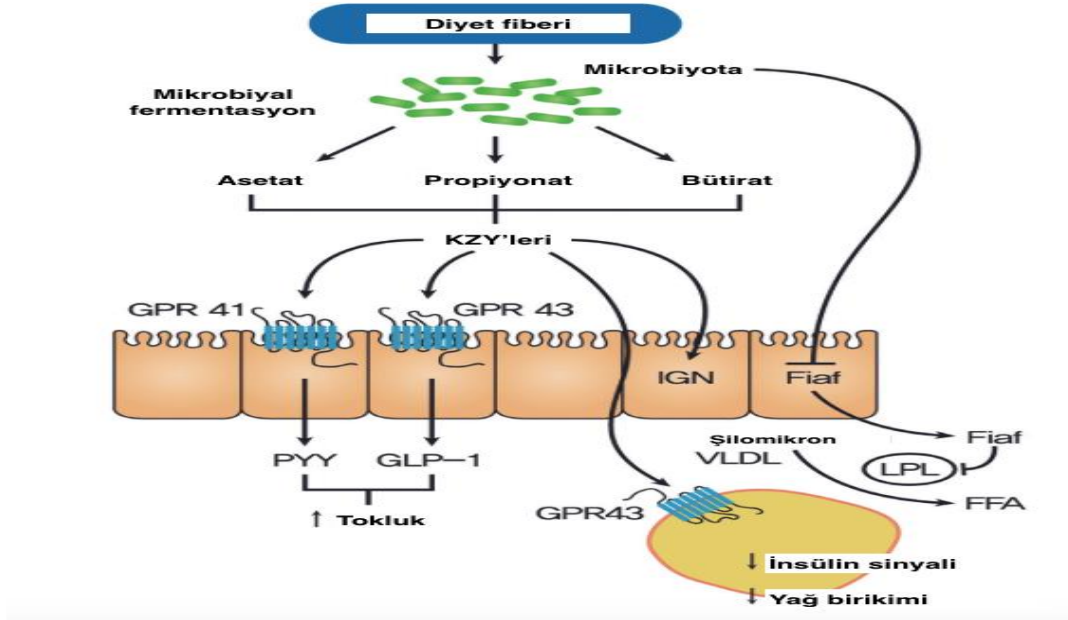
Obezite, tip 2 diyabetli, tip 1 diyabetli hastaların bağırsak florasında *Firmicutes* ve *Bifidobacterium*'lar azalırken *Bacterioidetes* filumlarında artış göstermektedir (Zhang vd., 2015), (Tablo 2.1).

Tablo 2. 1. *Diyabet gruplarında disbiyosiz (Zhang vd.,2015)*

Hastalık	Kaynak/örnek	Disbiyosiz
Tip 1 Diyabet	Çocuk/Gaita	<i>Lactobacillus</i>
		↓
		<i>Bifidobacterium</i>
		↓
		<i>Blautia coccoides</i>
		↓
		<i>Eubacterium rectal</i>
		↓
Tip 2 Diyabet	İnsan/Gaita	<i>Prevotella</i>
		↓
		<i>Clostridium</i>
		↑
		<i>Bacteroides</i>
		↑
		<i>Veillonella</i>
		↑
		<i>Clostridia</i>
		↓
		<i>Firmicutes</i>
		↓
		<i>Betaproteobacteria</i>
		↑

Bakteriler sayesinde sindirilemeyen fiberlerden üretilen KZYA (Kısa zincirli yağ asitleri), insülin duyarlılığını artırır. KZYA ligantları ve GPR-41 ve GPR-43 (G protein aracılı reseptör) reseptörlerine bağlandığında enteroendokrin hücreler uyarılır, bağırsak hareketleri yavaşlar, bağırsaktan yapılan emilimlerin hızı artar. Emilimin azalmasına bağlı olarak enerji üretimi düşer, glukagon benzeri peptid (GLP)-1 insülin duyarlılığı artar ve lipoprotein lipazı (LPL) bloklar, açlık durumunda devreye giren açlıkta indüklenen adipöz faktörü (Fiaf) de yağ birikimini ve insülin sinyalini azaltır. Bu

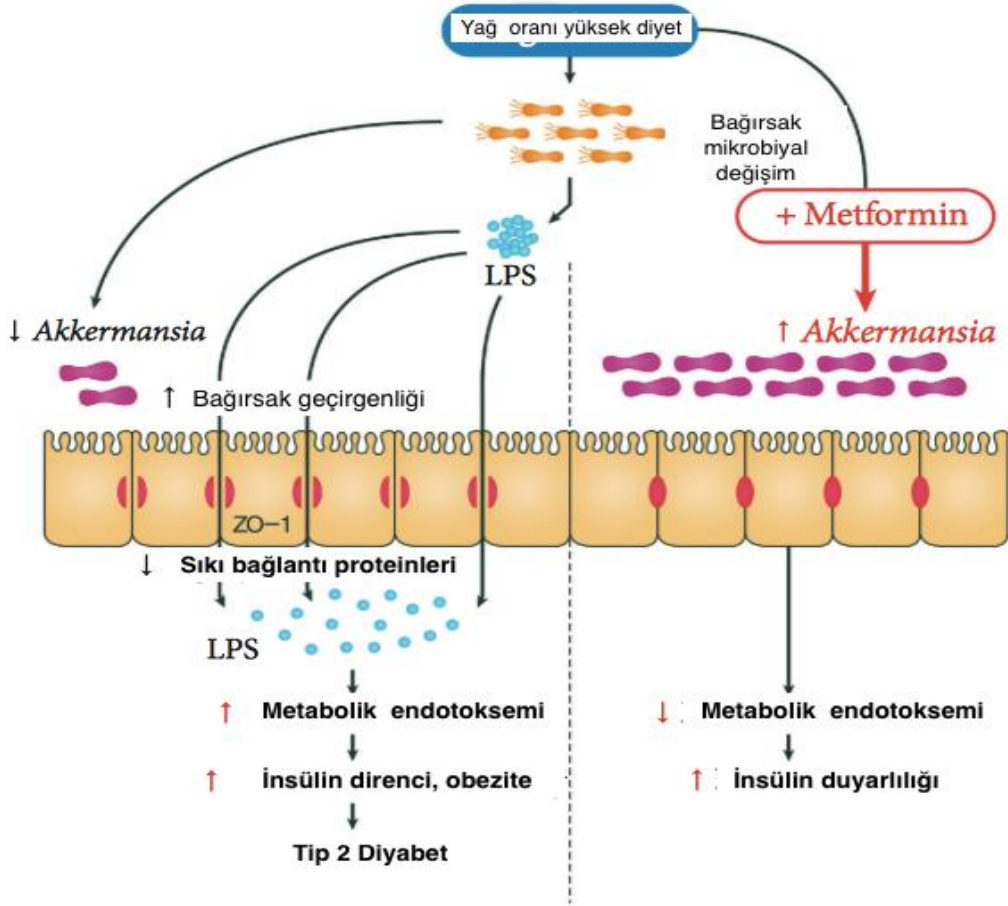
yolakla bağırsak florasındaki mikroorganizmalar konak metabolizmasını düzenlemektedir (Hur ve Lee, 2015), (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Mikrobiyatanın ürettiği metabolitlerin konak metabolizması üzerindeki etkisi (Hur ve Lee,2015)

Yapılan başka bir çalışma göstermiştir ki diyet yağ bakımından yüksek içerikli olduğunda bağırsak florasında disbiyosize neden olur. Disbiyosiz bağırsak geçirgenliğini etkiler, bariyer fonksiyonunu çeşitli yollarla etkileyerek bozar insülin direnci ve tip 2 diyabetin patogenezi oluşturur. Mikrobiyota da *Akkermansia muciniphila* arttığında metabolik endotokseminin azalması ve insülin direncini düşmesi tedavi olanakları sunmaktadır. Bu amaçla obezite ve tip 2 diyabet tedavisi için bu bakteri umut vericidir (Hur ve Lee, 2015), (Şekil 2.5).

Mikrobiyota bağımlı yolların kardiyovasküler hastalıkların tanısında ve terapötik potansiyelinde etkili olduğu yapılan bazı çalışmalar ile ortaya konmuştur. Kırmızı et, yumurta ve çok yağlı ürünlerle beslenenlerde yağların sindirimi sırasında ortaya çıkan metabolik yan ürün TMAO (trimetilamin N-oksit) olup kalp hastalıklarıyla ilişkilidir. DMB (3,3-dimetil-1-butanol) adlı bir inhibitör, TMAO seviyesini düşürmektedir. Yapılan bir çalışmada ilk olarak, TMAO ve kommensal mikrobik trimetilamin (TMA) üretimini DMB kullanarak yüksek kolin ve karnitin içerikli beslenen farelerde engellenmiştir. Bu çalışmada beslenme kaynaklı kalp hastalıklarında mikrobiyoma ilaç (DMB) vererek ve flora zarar vermeden bağırsak bakterileri



Şekil 2.5. Yağ oranı yüksek diyetin oluşturduğu disbiyozisin bağırsak geçirgenliğini etkileyerek diyabet patogenizi oluşumu (Hur ve Lee, 2015).

tarafından TMAO yan ürününün oluşumu engellenmiştir. Bağırsak mikrobik yolunu hedef alarak kalp hastalıklarının bu açıdan da tedavi edilebileceği ortaya konmuştur (Koeth, Wang ve Levison, 2013).

İrritabl bağırsak sendromunda (IBS) beslenme değişiklikleri, probiyotikler ve antibiyotiklerle mikrobiyotayı değiştiren tedaviler yararlı sonuçlar vermiştir (Simren, Barbara ve Flint, 2013). IBS'li az sayıda Avustralyalı hastada klasik Avustralya diyeti yerine düşük FODMAP (mayalanabilir oligosakkaritler, disakkaritler, monosakkaritler ve polioller) içeren diyetle beslenenlerin IBS semptomlarının düzeldiği raporlanmıştır (Halmos, Christophersen ve Bird, 2014). IBS'de, bağırsaktaki değişiklikleri merkezi sinir sisteminde iletildiği yönünde yapılan çalışmalarda tedavi ve tanı için yeni olanaklar oluşabileceğini göstermiştir (Tillisch, Labus ve Kilpatrick, 2013).

Clostridium difficile enfeksiyonu (CDE), bağırsak florasındaki kompozisyonun bozulması sonucu oluşan mikrobiyota bazlı tedavi ile kontrol edilebildiğini gösteren hastalıklardandır (Britton ve Young, 2014). Tekrarlanan CDE'lerin önlenmesi için fekal

mikrobiyota transplantasyon (FMT) kullanımının standart vankomisin antibiyotik tedavisine ve bağırsak lavajına nazaran yaklaşık %90 etkinlik sağladığı tespit edilmiştir. FMT sonrası yapılan metagenomik analizde donör mikrobiyotasına benzer mikrobiyom oluştuğu, çeşitliliğin arttığı *Firmicutes* ve *Bacteroidetes*'in arttığı ve *Proteobacteria* ise azaldığı gözlenmiştir.

2.1.5. Bağırsak florası ve ilaçlar

İnsan vücudunun kompleks bileşenlerinden olan mikrobiyata ilaç kullanımından etkilenmektedir. Son dönemlerde kullanımı artan antibiyotiklerin mikrobiyom kompozisyonunun özellikle de bağırsak florasını etkilediği gösterilmiştir. Bu duruma en popüler örnek antibiyotik kullanımına bağlı oluşan diyaredir. Sınırlı sayıda yapılan çalışmalarda başta beta laktam antibiyotikler olmak üzere birçok antibiyotik mikrobiyatayı etkilemiştir. Antibiyotik kullanımı özellikle *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* ve *Firmicutes* türlerini etkilemektedir. Antibiyotik spesifik yapılan çalışmalarda ise amoksisilin ve klindamisin *Fusabakteria* grubuna Kinolonlar *Firmicutes* ve *Proteobakteria* grubuna, Sefalosporin ve seftriakson *Verrucomicrobia* grubuna (Panda vd., 2014) polimiksin ve sulfonamidelerin *Firmicutes* ve *Bakteroidetes* grubuna etkili olduğu gösterilmiştir (Iapichino vd., 2008). Antibiyotik kullanımı sonrası azalan mikroorganizmalar patojenlere karşı bariyer görevini yerine getirememekte ve hastalıkların oluşumuna neden olmaktadır. Bağırsak florasında az sayıda bulunan *Clostridium difficile* geniş spektrumlu antibiyotik kullanım sonrası florada baskın hale gelmekte ve pseudomembranöz kolite neden olmaktadır (Bartlett, 2002). Bu anlamda yapılan çalışmalar artış göstermektedir. Metagenom ve metaproteomik analizlerle antibiyotik tedavisinin kısa ve uzun vadede etkileri ve bu etkilerin hangi metabolizmaları etkileyebileceği ortaya konmaktadır.

Bağırsak florasındaki antibiyotik kaynaklı disbiyozisin etkilerinin eski forma dönmesi birkaç haftayı bulmaktadır ama bazı grupların geri dönüşümü mümkün olmadığı gözlenmiştir (Gosalbes, Vazquez-Castellanos ve Angebault, 2016).

2.2. Major Depresyon ve Diyabet

2.2.1. Major depresyon

Major depresyon (MD) dünya genelinde yaygın olarak görülen ciddi ama tedavi edilebilen bir bozukluktur ve birçok rahatsızlığın sebebi olarak gösterilmektedir

(Kessler ve Bromet , 2013). Yaygın olarak görülen bu hastalığı yaşamları boyunca bir dönemde her beş kişiden biri geçirmektedir. Herhangi bir zamanda toplum içinde yapılan kontrollerde her 100 erkekten üçünde, her 100 kadından altısında depresyon görülmektedir. Veriler kadınların erkeklerden iki kat daha fazla depresyonla karşı karşıya kaldığını göstermektedir (Mete, 2018).

Yapılan bir araştırmada şeker ve kalp yetmezliği kronik rahatsızlıkları olan 890 yetişkin telefonla aranıp depresif belirtileri sorgulanmış ve %51 major depresif bulguları açısından pozitif değerlendirilmiş ve eczane kayıtları sorgulandığında araştırılan her dokuz kişiden ikisinin antidepresan tedavisi aldığı görülüp depresif bulunmuştur (Ackermann, Rosenman ve Downs, 2005).

Depresyon sözcüğü çökkün, kederli hissetme, fiziksel ve psikolojik aktivitenin azalması gibi duygularını içeren duygusal bir yaşam halidir. Kelimenin kökeni olan “depress” latince kökenlidir “alçakta olmak, bastırmak” anlamına gelmektedir (Işık, Işık ve Taner, 2013).

Uzun ve yüksek oranda yinelenme atakları olan, psikolojik ve fiziksel yeti kaybına neden olan bir rahatsızlıktır. Depresif bozukluğun oluşumunda biyolojik, genetik ve psikososyal üç faktör rol oynamaktadır. Biyolojik etmenler biyojenik aminler, serotonin, nöradrenalin, dopamin, glutamerjik sistem, nöroanatomik bulgular, nörotrofinler, nöropeptitler başlığı altında toplanmaktadır (Helvacı ve Hocaoglu, 2016). Hastalığın seyrinde mide rahatsızlıkları, kilo kaybı, kusma gibi semptomlar gözlenmektedir. Yaşam boyunca görülme sıklığı %1,5 ile %19 arasında değişen klinik bozukluk tedaviye yanıt vermediğinde ya da uygun tedavi sağlanamadığında yüksek ölüm ve morbidite yüzdeleriyle toplumsal problemlere neden olmaktadır (Olchanski vd., 2013).

Belirtileri uyku bozukluğu, konsantre olmakta zorluk çekme, yorgun hissetme hali, çökkün duygu durumu, enerji düşüklüğü, yeme sorunları, değersiz hissetme, özsaygıyı yitirme, ölüm isteği şeklinde sıralanır.

Major depresyon psikoterapi ve farmakoterapi ile tedavi edilebilen bir bozukluktur. Tedavi temel olarak psikoterapiler, ışık tedavisi, elektro konvülsif tedavi ve ilaç tedavileri başlıkları altında toplanmaktadır.

2.2.2. Diyabet

Diyabet günümüzde toplum sağlığını tehdit eden en önemli hastalıklardan birisi olarak kabul görmektedir. Görülme sıklığı ve hasta sayısı her geçen gün artış göstermektedir (http-4). Gerekli bilinçlendirme ve tedaviler sağlanmadığında daha fazla insanı tehdit etmeye devam edeceği düşünülmektedir bu nedenle Birleşmiş Milletler (BM) Genel Kurulu 2006 yılında diyabeti salgın olmayan bir hastalık olmamasına rağmen küresel bir tehdit olarak görmüş ve tüm ülkelere mücadele planı önerilmiştir. Hedefte iyi ve erken tanılama, önleme, komplikasyonları en aza indirmeye vardır (http-5).

Diyabet kanda bulunan glukoz düzeyinin yüksek olması ile kronik olarak ortaya çıkan akut ve kronik komplikasyonların eşlik ettiği bir rahatsızlıktır. Diğer bir ifadeyle pankreas tarafından salgılanan insülin hormonunun yeterli salgılanamaması ya da bazı problemler nedeniyle insülinin işlevini yerine getirememesine bağlı olarak hücrelerin karbonhidrat, yağ ve proteinden yeterli düzeyde yararlanamamasına bağlı olarak oluşan metabolik bir hastalıktır (http-6).

İnsülin, 51 aminoasitli, 6000 Dalton moleküler ağırlığında olan bir polipeptittir. Pankreastaki Langerhans adacıklarında bulunan beta hücresi 84 aminoasitli tek zincir şeklinde bir ön hormon olarak pro-insülini oluşturmaktadır. Pro-insülin işlenir ve insülin haline getirilerek hücre zarına yakın yerde tutulur. Sık idrara çıkma, bol su içme, sinirli olma hali, kilo kaybı gibi klinik belirtilerle ortaya çıkmaktadır. Diyabetle ortaya çıkan akut ve kronik komplikasyonlar sakatlık ve ölümlere yol açabilmektedir (http-5).

Diyabet, tip 1, tip 2, gestasyonel diyabet (GDM) ve diğer spesifik tipler olmak üzere 4 farklı grupta incelenmektedir.

Tip 1 diyabet pankreastaki langerhans adacıklarında üretilen beta hücre hasarına bağlı olarak genellikle otoimmün kaynaklı ortaya çıkan insülin eksikliğidir. Yaygın olarak çocuk ve gençlerde görülür. Tip 1 diyabet için majör sorumlu gen kromozom 6bp'de yer alan HLA bölgesindedir. MHC genleri çok önemli olsa da poligenik kalıtım dolayısıyla tek başına yeterli değildir (Çetinkalp, 2010).

Tip 2 diyabet insülin rezistansı ve insülin sekresyon bozukluğu ile ortaya çıkar. En yaygın görülen tipi %90-95 ile bu grup oluşturmaktadır. Hareketsiz yaşam, doymuş yağ açısından zengin beslenme tip 2 görülme sıklığını artırmaktadır.

Gestasyonel diyabet ise gebelik sırasında ortaya çıkmaktadır. Doğum sonrası ortadan kalkabilir ancak ilerleyen süreçlerde tip 2 diyabet olma olasılığı yüksektir.

Diğer spesifik tip diyabet ise insülin hormonu salgılayan pankreasa etki eden birçok faktörle (endokrin hastalıkları, ilaç ve kimyasal maddeler, enfeksiyon, insülin ve beta hücre fonksiyonunda genetiksel rahatsızlıklar) kan şekerinin yükselmesi olarak tanımlanır.

Türkiye Diyabet Epidemiyolojisi (TÜDEP) tarafından yapılan çalışmaya göre diyabetin görülme sıklığı 20-80 yaşları arasında %7,2 bozulmuş glikoz toleransı (IGT) oranı ise %6,7 olarak belirlenmiştir (http-7).

Diyabet tanı ve tedavisi açısından doğrudan maliyetinin yanı sıra dolaylı olarakta gider oluşturan bir metabolik rahatsızlıktır. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) verilerine göre 2025 yılında tüm dünyada 300 milyondan fazla diyabetli bireyin olacağı tahmin edilmektedir. Tip 1 diyabet tüm diyabet vakalarının yaklaşık %25'ini oluşturmaktadır (Satman vd., 2002). İnsülinin keşfinden önce diyabet beslenme ana tedaviyi oluştururken, insülinin ve oral anti diyabetiklerin keşfinden sonra beslenme ikinci plana atılmış ancak son zamanlarda beslenme de eş değer tedavi olarak görülmektedir (Pastors, Warshaw ve Daly, 2002).

2.2.3. Diyabet ve depresyon arasındaki ilişki

Diyabet yaşam boyu süren kronik komplikasyonlara, diyet sınırlamasına, uzun dönemde böbrek ve göz hastalıkları riskinin artmasına, yaşam kalitesinin düşmesine neden olur. Diyabete bağlı gelişen bu komplikasyonlarla kişide isyan, keder, öfke patlamaları, anksiyete gelişir ve depresyona yatkınlık yaratabilir. Stres ve mutsuzluk hali hem nöroendokrin mekanizmaları hem de diyabetli bireyin yaşam şekli haline gelmesi gereken beslenme, egzersiz programlarına uymayı zorlaştırarak hastalığı negatif yönde etkiler. Diyabet ve depresyon arasında nedensel birliktelik söz konusudur. Ayrıca diyabetle depresyon arasındaki ilişkiyi 17.yy'da Dr. Thomas Willis diyabet sıklıkla öncesinde stres ve üzüntü yaşamış kişilerde ortaya çıkar diyerek ortaya koymuştur (Willis, 1971).

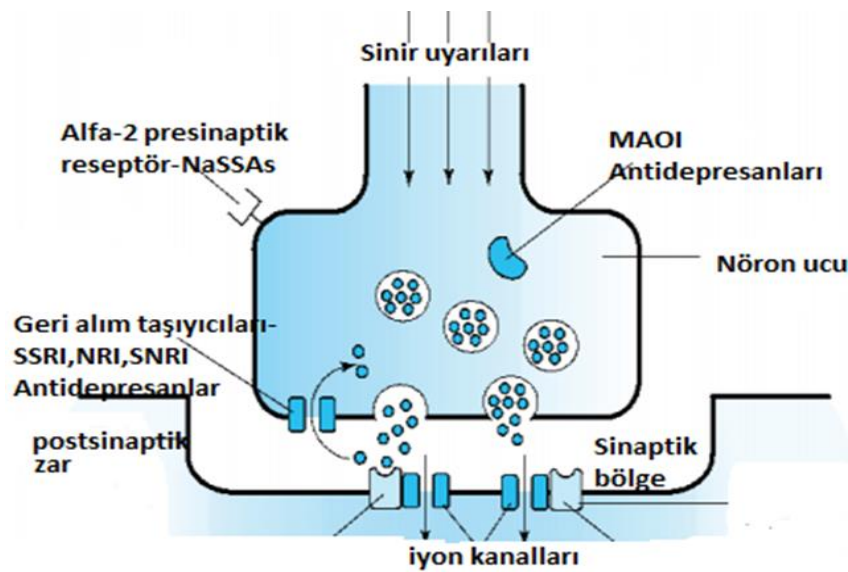
Ruhsal durumda oluşan değişiklikler kan şekerini, kan şekerindeki değişiklikler ise kişinin ruh halini etkiler. Hipoglisemi ataklarını sık yaşayan bireylerde kan şekeri düşüklüğü ile bilişsel fonksiyonları bozarak bayılacak gibi olma hissinde artma, baş ağrısı gibi semptomlar artar ve bu semptomlar kan şekerini yükselterek insülin ihtiyacını artırır. Kan şekeri ve ruhsal belirtiler birbirini etkiler. Yani anksiyete ve depresyon kan şekerini yükseltip insülin gereksinimini arttırabilir. Depresyon

tedavisinde kullanılan antidepresanlar diyabetik nöropati ağrıları için de kullanılabilir. SSRI (Seçici Serotonin Geri Alım İnhibitörleri) antidepresan gruplarının diyabetik nöropatide etkin olduğuna yönelik çalışmalar yapılmıştır (Mete, 2018).

2.3. Antidepresanlar

2.3.1. Antidepresan ilaçlar ve türleri

Antidepresan ilaçların etki mekanizması monoaminlerin geri alımları engelleyip, reseptör ya da enzimleri inhibe ederek çalışmaktadır (http-8), (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. Antidepresanların etki mekanizması (http-8)

Tedavinin yanıtı 3-4 hafta içinde görülebilir ama tedavi süreci ve iyileşme durumu önceden depresyon geçirip geçirmediğine eğer geçirdiyse atak sayısına bağlı olarak yanıt ve iyileşme süreci değişiklik gösterir (Mete, 2018). Antidepresanların etki mekanizmaları monoaminler üzerinde 3 ana başlıkta toplanabilir. Enzim inhibitörleri (Monoaminoksidaz inhibitörleri-MAOI), Geri alım inhibitörleri (Trisiklik Antidepresanlar (TSA), Serotonin-Noradrenalin Geri Alım İnhibitörü, Noradrenalin Geri Alım İnhibitörü, Noradrenalin- Dopamin Geri Alım İnhibitörü), Reseptör blokörleri (Noradrenerjik-Spesifik Serotonerjik Antidepresan (NaSSA), Serotonin-2 Reseptör Antagonisti ve Geri Alım İnhibitörleri) (Westernberg, 1999). Bu kategorilerde yer alan antidepresanlardan Türkiye satışı olanlara ilişkin etken maddeler listelenmiştir (Tablo 2.2).

Tablo 2.2. Antidepresanların Türkiye’de var olan etken maddeleri ait sınıflandırılması (Stahl, 2000)

Antidepresan grupları	Etken madde
Seçici Serotonin Geri Alım İnhibitörleri	Sertralin Fluoksetin Paroksetin Fluvoksamin Sitalopram Escitalopram
Alfa 2 adrenoreseptör antagonistleri	Mianserin Mirtazapin
Seçici Noradrenerjik Geri Alım İnhibitörleri (NRI)	Reboksetin Maprotilin
Noradrenalin ve Dopamin Geri Alım İnhibitörleri (NDGI)	Bupropion
Serotonerjik ve Noradrenalin Geri Alım İnhibitörleri (SNRI)	Venlafaksin Milnasipran Duloksetin

MAOI geliştirilen ilk antidepresan gruplarından (Örsel, 2004). Monoaminoksidaz enzimi nörotransmitterlerden dopamin, serotonin ve noradrenalin beyinden uzaklaştırır, MAOI’nin görevi ise bunu engellemektir. Monoaminoksidaz enzimi geri dönüşümlü ve geri dönüşümsüz monoaminoksidaz inhibitörleri tarafından inhibe edilerek biyojenik aminlerin yıkımlarını yavaşlatır. Beslenmeyle birlikte alımlarında ani tansiyon değişikliği yapma durumu nedeniyle kullanımı sınırlıdır bu yan etkinin azaltılması adına geri dönüşümlü MAOI geliştirilmiştir. Potansiyel yan etkileri ağız kuruluğu, baş ağrısı, mide bulantısı, ishal veya kabızlık, insomnia, baş dönmesidir.

TSA grubu serotonin, dopamin ve noradrenalin geri alım pompalarını inhibe eder. Kilo artışı, bulanık görme, baş dönmesi gibi yan etkileri ilacın dezavantajıdır. Trisiklik antidepresanlar nöropatik kaynaklı ağrı, fibromiyalji gibi rahatsızlıklarda etkili bulunmuştur (O'Malley vd., 2000). TSA grupları SSRI gruplarından daha avantajlı olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Fishbain, 2000).

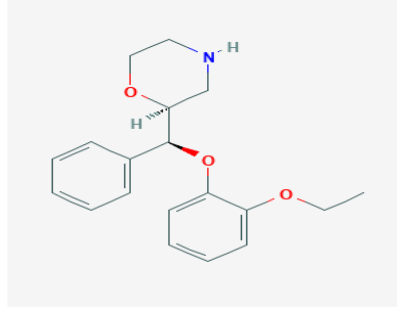
Seçici serotonin geri alım inhibitörleri yan etkilerinin kısa sürmesi, az ilaç etkileşimi nedeniyle depresyon tedavisinde daha fazla kullanılmaya başlanmıştır (Carter ve Sullivan 2002).

Seçici noradrenalin geri alım inhibitörleri diğer antidepresanlara etkinlik açısından benzer özelliklere sahiptir. NRI grubu enerji azlığı, dikkat dağınıklığı gibi durumlara daha iyi gelmesi beklenir (Örsel, 2004). NDGI grubu depresyon tedavisinden daha çok sigara bırakma tedavisinde kullanılır. SNRI benzer etki profili gösterdiği TSA lardan farkı diğer reseptör yollarını etkilememektedir bu durum da az yan etki göstermesini

sağlar. NaSSA'nın monoamin geri alım gruplardan farkı serotonin ve noradrenalin seviyelerini artırırken monoaminleri-monoamin geri alım pompalarını inhibe etmez. Serotonin geri alım inhibitörleri (SGAI) serotonin 2A reseptörlerini ve serotonin geri alımını baskılar.

2.3.2. Reboksetin

Reboksetin major depresyonun ilk basamakta kullanılan seçici noradrenalin geri alım inhibitörleri grubunda yer alan ilk antidepresandır (http-9), (Şekil 2.7).



Şekil 2.7. Reboksetin kimyasal yapısı (http- 9)

Etki mekanizması noradrenalin taşıyıcı molekülüne bağlanarak ekstraselüler noradrenalin geri alımını engellemeye dayalıdır. İn vitro ve in vivo farmakolojik çalışmalar reboksetin etken maddesinin noradrenalin taşıyıcısı serotonin ve dopamin üzerinde yüksek etki ve seçiciliğe sahip olduğunu göstermiştir. noradrenalin taşıyıcısına karşı seçici olan reboksetin, serotonin (5-HT) taşıyıcıları ve monoamin, histamin ve asetilkolin için düşük etkiye sahiptir. Geleneksel grup tedavilerden SSRI, TSA ve monoamin oksidaz inhibitörlerine vb. dirençli hastalar için alternatif sunmaktadır (Hajos vd., 2004). Seçiciliği sayesinde diğer grup ilaçlarla karşılaştırıldığında kardiyovasküler, gastrointestinal ve ürogenital açıdan yan etkilerinin daha az olduğu gösterilmiştir (Wong, Sonders ve Amara, 2000). İlk olarak 1997 yılında İngiltere de onaylanan reboksetin sonrasında Avrupa ülkelerinde de onay almıştır. Etkin günlük doz 8-10 mg arasındadır (Scates ve Doraiswamy, 2000). Diyabetik hastalarda antidepresan ilaçlardan reçete edilen grupta yer almaktadır. Yapılan klinik araştırmalar sonrası yaygın görülen yan etkiler uykusuzluk, kabızlık, ağız kuruluğu, terleme olarak sıralanmıştır. Fluoksetin ile karşılaştırıldığında ise ishal, bulantı ve sersemlik yan etkilerine reboksetinde daha az rastlanmaktadır.

2.4. Mikrobiyom Analiz Yöntemleri

Bağırsak mikrobiyotası fazla sayı ve türde mikroorganizma içerdiğinden geleneksel kültür yöntemleriyle izole etmek ve tanımlamak zordur. Bağırsak florası anatomik yapısı itibarıyla anaerobik mikroorganizmalar için elverişlidir. Anaerob kültür yöntemlerinin gelişmesiyle bazı baskın türler belirlenmiştir. Örneğin; *Bacteroides*, *Clostridium* ve *Bifidobacterium* filumları bağırsak florasında dominant oldukları kültür çalışmalarıyla gösterilmiştir (Lagier vd., 2015). Mikrobiyotanın kompleks yapısı mikroskopik ve kültüre dayalı yöntemlerin identifikasyonda yetersiz kalması nedeniyle genomaya dayalı moleküler yöntemler geliştirilmiştir (Süzük, 2015).

Bağırsak flora çalışmalarında gaita örnekleri toplanıp onlardan DNA izole edilmelidir. DNA ekstrasyonu sonrasında yeterli miktar ve saflıkta elde edilen DNA sekanslama işlemine girer. Kültür bağımlı olmayan moleküler teknolojiler qPCR, DGGE/TGGE, T-RFLP, FISH, Mikroarray, Flow sitometri, 16S rRNA olarak özetlenmiştir (Süzük, 2015), (Tablo 2.3).

Tablo 2. 3. Kültür bağımlı olmayan moleküler tekniklerin özeti (Süzük, 2015)

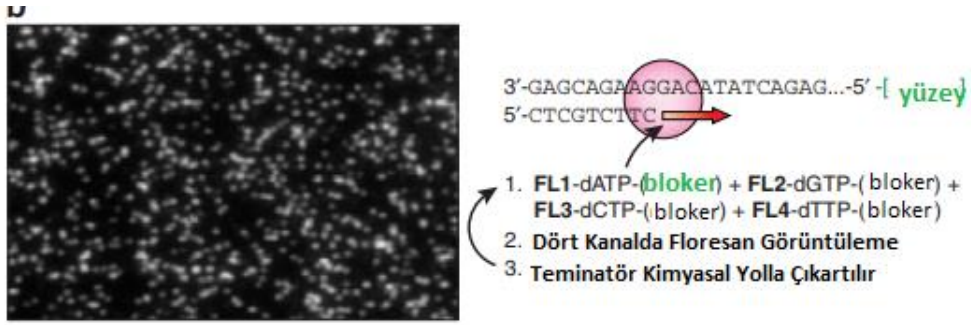
Yöntem	Avantaj	Dezavantaj
qPCR	*Fiolojenetik tanımlama *Hızlı *Yüksek duyarlılık	*PZR bias *Yüksek duyarlılık
DGGE/TGGE	*Yarı kantitatif *Hızlı	*PZR bias *Fiolojenetik tanımlama yok
T-RFLP	*Yarı kantitatif *Hızlı, maliyet etkin	*PZR bias *Fiolojenetik tanımlama yok
FISH	*Fiolojenetik tanımlama *Yarı kantitatif *Yüksek duyarlılık *in situ tanımlama	*Prob bağımlı *Bilinmeyen türlere uygulanamaz *PZR bias yoktur
Mikroarray	*Fiolojenetik tanımlama *Yarı kantitatif	*Çapraz hibridizasyon *PZR bias *Düşük düzeydeki bakteriler için düşük duyarlılık
16S rRNA	*Fiolojenetik tanımlama *Kantitatif	*PZR bias *Zahmetli, pahalı *Klonlama bias
Flow Sitometri	*Kantitatif ve kalitatif *Metabolik analiz *Zaman etkin *DNA izolasyonu gerekli değildir	*Kompleks analize ihtiyaç duyar *Hücre boyutu bias

16S rRNA gen sekansı fonksiyonel olarak korunmuştur ve tüm bakterilerde bulunur. Bu özelliği sayesinde cins veya tür seviyesinde identifikasyon sağlar ve kantitatif sonuçlar verir (Baker, Smith ve Cowan, 2003). Elde edilen 16S rRNA gen sekansı veritabanı ile karşılaştırılarak mikroorganizma tayinini sağlar. Sanger sekanslama ya da yeni nesil sekanslama teknolojileri (pirodizileme, geri dönüşümlü terminatör dizileme, ligasyon, ion torrent dizileme) gerçek zamanlı sekans kullanılarak mikrobiyaya analizleri yapılır (Süzük, 2015), (Tablo 2.4).

Tablo 2.4. Sekanslama yöntemlerinin avantaj ve dezavantajları (Süzük, 2015)

Yöntem (Üretici Firma)	Avantaj	Dezavantaj
Prodizileme (454 GS FLX+, Roche)	*Okuma süresi uzun *Yüksek verimlilik, duyarlı *Eş zamanlı birden fazla örnek *Koloni biası yok	*Kısa sekans okuma *Homopolimerlerde hata oranı yüksek *Yüksek maliyet *Kapsamlı biyoinformatik analiz ihtiyacı
Geri dönüşümlü terminatör dizileme (HiSeq2000/2500, Illumina)	*Yüksek verimlilik *Etkili *Manuel iş azlığı	*Geliştirilme aşamasında *Uzun çalışma süresi *Kısa okuma uzunlukları
Ligasyon (5500x1 SOLID Life Technologies)	*Düşük hata oranı *Yüksek verimlilik	*Çok kısa uzunluklar *Uzun çalışma süresi
Gerçek zamanlı sekans (PacBio RS, Pacific Bioscience)	*Örnek hazırlaması kolay *Çok uzun okuma uzunluğu *Reaktif maliyeti düşük	*Sistem maliyeti yüksek *Hata oranı yüksek *Sistemkurulumu zor
Ion Torrent dizileme (Ion torrent, Life Technologies)	*Kısa okuma süresi *Esnek çip reaktifler	*Geliştirilme aşamasında

Illumina sekanslama teknolojisi, geri dönüşümlü terminatör dizilemesi grubunda yer almaktadır. DNA molekülleri slide üzerinde bulunan spesifik primerlere bağlanıp çoğaltılır. Her bir yıkama sonrası bir nükleotid uzar. Florasanla işaretlenmiş nükleotidler belirlenir ve 3' ucundaki terminatör kimyasal yolla çıkartılır bir sonraki sıklusa geçer (Shendure ve Ji, 2008), (Şekil 2.8).



Şekil 2.8. Geri dönüşümlü terminatör dizilemesi genel çalışma mekanizması (Shendure ve Ji,2008)

Sekanslama sonrası elde edilen veriler hayali okumalar içerir, büyük hacimlidir. Biyoinformatik analizler kontamine halde olan ürünlerin temizlenmesini ve identifikasyona uygun hale gelmesini sağlar. Sekans verilerinin istatistiksel analizi yapılarak aynı bireyde tür farklılığını ifade eden alfa çeşitlilik ve bireyler arasında tür farklılığını tanımlayan beta çeşitlilik ortaya konur (Jandhyala vd., 2015).

3. YÖNTEMLER

3.1. Deneylerde kullanılan hayvanlar

Çalışmaya ait etik kurul onayı Anadolu Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından alınmıştır.

Deneyler; aynı yaşta Sprague-Dawley erkek sıçanlar (300-350 gram) ile gerçekleştirilmiştir. Deney hayvanları 12 saat karanlık 12 saat aydınlık döngüsünde yaşatılmış, bulundukları odanın $24\pm1^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta olması ve iyi havalandırılması sağlanmıştır. Hayvanlar standart hayvan yemi ile beslenmişlerdir. Deneyler süresince su ya da yem kısıtlaması uygulanmamış, her hayvanın yiyeceğe ve suya rekabete gerek duymaksızın ulaşabilmesi sağlanmıştır. Hayvanlar deneye alınmadan en az 48 saat önce, deney süresince bulunacakları bakım odasına getirilerek ortam koşullarına adaptasyonları gerçekleştirilmiştir. İşlemler Farmakoloji Anabilim Dalı tarafından yapılmıştır.

Etik Kurul onayı EK-1’de sunulmuştur.

3.1.1. Deneylerde kullanılan hayvanlarda diyabetin oluşturulması

Diyabet oluşturulacak sıçan grupları için, kuyruk veninin içine (IV) 50 mg/kg tek doz streptozotosin (STZ, Sigma, St. Louis, MO, ABD) uygulanmıştır. Uygulanan STZ, pH = 4,5, 0,1 M sitrat tamponu içerisinde hazırlanmıştır (Üçel vd., 2015). Enjeksiyon yapıldıktan 72 saat sonra kuyruk veninden alınan kan örneklerinden Accu-Chek Performa Nano® glukoz ölçüm cihazı (Roche, Basel, İsviçre) ile kan glukoz ölçümleri yapılmıştır. Kan glukoz düzeyi 300 mg/dl üzerinde olan hayvanlar diyabetik olarak kabul edildi. İşlemler Farmakoloji Anabilim Dalı tarafından yapılmıştır.

3.1.2. Deneylerde kullanılan diyabetik hayvanlara reboksetin uygulaması

Diyabetik hayvanlarda görülmesi beklenen mikrobiyota ve davranış parametreleri değişimlerinin ortaya çıkması amacıyla 4 hafta beklenmesinin ardından ilaç uygulaması gerçekleştirilmiştir (Yan vd., 2012). Reboksetin (Edronax ®) (Pfizer, NY, ABD), diyabet oluşturulan deney hayvanlarına, iki hafta süre ile 8 ve 16 mg/kg (p.o.) dozlarında uygulanmıştır (Cegielski-Perun vd., 2014). Sağlıklı kontrol ve diyabetik

kontrol gruplarında tedavili grupların çözücüsü olarak kullanılacak olan serum fizyolojik aynı süre boyunca *p.o.* olarak uygulanmıştır. İşlemler Farmakoloji Anabilim Dalı tarafından yapılmıştır.

3.1.3. Kullanılan deney hayvanlarından gaita örnek alınması

Deney hayvanlarına yüksek dozda anestezi uygulaması yapıldıktan sonra diseksiyon işlemleri gerçekleştirilmiştir. Sıçanların ince bağırsak ve kalın bağırsakları steril koşullar altında çıkarılarak ayrı ayrı steril tüplere yerleştirilmiştir ve hemen ardından bu tüpler sıvı azot içeren kaplara alınmıştır. Deney hayvanlarından bağırsak numuneleri alımını tamamlandıktan sonra bu örnekler DNA izolasyon işlemleri gerçekleştirilinceye kadar -80 °C sıcaklıktaki dondurucuda kadar saklanmıştır. İşlemler Farmakoloji Anabilim Dalı tarafından yapılmıştır.

3.2. Gaita Örneklerinden DNA izolasyonu

MP Biyomedikal üretici firmanın Fast DNA Spin Kit for Soil ticari DNA izolasyon kiti tarafından sağlanan protokol kullanılarak DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir (<http-10>). Farelerden elde edilen gaita örnekleri DNA izolasyonu yapılana kadar -80 °C saklanmıştır. -80 °C den alınan örnekler çözünmesi için bir süre oda sıcaklığında bekletilmiştir. Her bir gaita örneğinden alınıp 50 mg tartıldı içinde boncuklar bulunan lysing matris E tüplerine konulmuştur. 978 µl sodyum fosfat ve 122 µl MT tampon solüsyonu eklenmiştir. İçerisinde seramik boncuk bulunan tüpler MagNa lyser (Roche) cihazı ile en yüksek hızda 40 sn vortekslenmiş ve böylece hücreler mekanik parçalanmaya maruz bırakılmıştır. Homojenizatör işlemi sonrası örnekler 14000 x *g*'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant temiz 2.0 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine aktarılmıştır. 250 µl PPS (Protein Precipitation Solüsyonu) eklenmiştir. El ile 10 kere çalkalanmıştır. 14000 x *g*'de 5 dakika santrifüj edildi ardından supernatant temiz 15 ml tüplere aktarılmıştır. Resuspend binding matrix solüsyonu tekrar homojen hale getirildikten sonra 1.0 ml'i 15 ml tüpte bulunan supernatantın üzerine eklenmiştir. DNA bağlanması için 2 dakika boyunca elle invert edilmiştir. Silika matriksin çökmesi için tüpler 3 dakika boyunca tüplükte inkübe edilmiştir. 500 µl supernatant binding matrikse dokunmadan uzaklaştırılmıştır. 600 µl supernatant karışımından altında temiz toplama tüpü olan SPIN filtreli tüpe transfer edilmiştir. 14,000 x *g*'de 3

1 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası toplama tüpündeki örnek boşaltılmıştır. Bu işlem 15 ml tüpteki örnek bitene kadar tekrarlanmıştır. Konsantre halde bulunan SEWS-M içine 100 ml %100 ethanol eklenip solüsyon protokole göre hazırlanmıştır. Hazırlanan SEWS-M solüsyonundan 500 µl SPIN filtre tüpünde kalan peletin üzerine eklenmiştir. Hafifçe pipetin ucuyla tekrar çözündürülmüştür.

SPIN Filtre tüpün altına temiz toplama tüpü yerleştirdikten sonra 14,000 x *g*'de 1 dakikalığına santrifüj edilmiştir. Toplama tüpü boşaltılıp yenisi yerleştirilmiştir. 14,000 x *g*'de 2 dakikalığına tekrar santrifüj edilmiştir. Toplama tüpü atılıp yenisi yerleştirilmiştir. SPIN Filtre tüpler 5 dakikalığına hava ile kuruması için oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. SPIN filtreli tüpteki pellet 50 µl DES (DNase /Pyrogen free water) çözeltisiyle hafifçe resuspense edilmiştir. Verimi artırmak için 5 dakikalığına sıcak su banyosunda 55 °C inkübe edilmiştir. Inkübasyon sonrası SPIN filtre 14,000 x *g*'de 1 dakikalığına santrifüj edilmiştir. SPIN filtre atıldı. DNA toplama tüpünde toplanmıştır. Toplanan DNA örneklerinden 1 µl Thermo Scientific™ NanoDrop ile ölçülmüştür. DNA miktarları ve saflığı belirlenmiştir. Saflığında ve miktarında sorun olmayan DNA örnekleri -20 °C'de PZR işlemi için kullanılabilecek kadar saklanmıştır.

3.3.Amplikon Kütüphanesi Oluşturulması ve Yeni Nesil Dizileme

Amplikon kütüphanesi oluşturmak için 16S rRNA bölgesi V3-V4 bölgesi spesifik primerlerle çoğaltılmıştır. Amplifikasyon ürünlerinin saflaştırılması gerçekleştirilmiş ve Nanodrop ölçümleri yapılarak DNA miktarları belirlenmiştir. Sekans için Illumina Miseq platformu kullanılarak V3-V4 bölgesinin çift yönlü okuması yapılmıştır. Örneklerin çoğaltılma aşamasında 12 baz çifti uzunluğunda Golay barkodu içeren primerler kullanıldığı için sekanslama havuzlanarak yapılmış ve sekans sonrası barkod dizilerine göre örnekler ayrılmıştır. Örnek toplanmasından çeşitlilik analizine kadar izlenen mikrobiyom analizi biyoinformatik iş akış yolu özetlenmiştir (Şekil3.1).

Örneklerin toplanması

DNA İzolasyonu

- Homojenizasyon+İzolasyon

Amplikon Kütüphanesi Oluşturulması

- PCR-16S V3-V4 barkod işaretli primerler - 254 bç
- Örneklerin havuzlanması, saflaştırma, kalite kontrol

Sekans

- Illumina Miseq – çift yönlü 2X150 bç

Ön işlemler

- 'chimeric'-hayali okumaların filtrelenmesi
- Çift yönlü okumaların birleştirilmesi
- 'Demultiplexing' – okumaların ilgili barkoda atanması
- 'Quality Filtering' – barkod ile eşleşmeyen okumaların elenmesi
- 'OTU Picking' (open reference) – okumalara uygun OTU'ların kümelendirilmesi - % 97 benzerlik
- OTU'lara taksa atanması-Greengenes veri tabanı kullanıldı

Mikrobiyota çeşitlilik analizleri

- Alpha Çeşitlilik
- Beta Çeşitlilik
- Relatif taksa dağılımı
- Lefse Analizleri

Şekil 3.1. Mikrobiyom analizlerinde kullanılan akış şeması

3.4. Mikrobiyota Analizleri

Sekans analizleri sonrası elde edilen ham fasta sekansları Quantitative Insights Into Microbial Ecology-QIIME 1.90 biyoinformatik analiz programı kullanılarak yapılmıştır (Caporaso vd., 2010). Sekans okumalarından 2000 okumadan daha düşük örnekler filtrelenmiş ve çıkarılmıştır. Daha sonra “chimeri (hayali, yanlış okuma)” diziler ChimeraSlayer programı kullanılarak tanımlanıp elemine edilmiştir. Okumalara en az %97 benzerlik olacak şekilde UCLUST programı ile Greengenes veri tabanı kullanılarak OTU (operasyonel taksonomik ünite) atanmıştır (Gevers vd., 2005).

Önişlemlerden sonra QIIME analiz programı kullanılarak alfa çeşitlilik (filogenetik çeşitlilik, Shannon indeksi, gözlenen OTU), beta çeşitlilik (unweighted UniFrac analizleri) ve relatif taksa dağılımları belirlenmiştir (Caporaso vd., 2010).

3.5. Verilerin Değerlendirilmesi

Relatif dağılımlar ve baskın taksalar, gruplar arasında non parametrik Kruskal-Wallis testi ile karşılaştırılmıştır. Alfa metriklerinin gruplar arasında karşılaştırılması çift yönlü ANOVA analizleri kullanılarak yapılmıştır. Beta çeşitlilik analizlerinde çalışma grupları arasında PCoA (principle coordinate analysis) grafiğindeki uzaklıkların karşılaştırılması için non parametrik ANOSIM testi kullanılmıştır. Mikrobiyota analizleri ile ilgili verilerin istatistiksel testi QIIME 1.90 biyoinformatik programı ile yapılmıştır. Gruplara anlamlı olarak etki eden bakteriyel grupları belirleyebilmek için LeFSe analizleri yapılmış ve LDA (Linear discriminant analysis) etki dereceleri belirlenmiştir (Segata vd., 2011). Verilerin istatistiksel değerlendirilmesinde $p < 0,05$ anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Sekans Özeti

Sekanslama öncesi elde edilen DNA miktar ve saflık açısından sağlıklı analiz için yeterli oranda elde edilmesi gerekmektedir. Bu nedenle gaitadan DNA elde etmek için kullanılan ticari kitler karşılaştırılmıştır. Gaita ve bağırsak içeriğinden DNA izolasyonunda DNA miktar ve kalitesi açısından Fast DNA Spin Kit for Soil daha etkili bulunmuştur (Ferrand vd., 2014). 29 örneğe ait izolasyon Fast DNA Spin Kit for Soil ile yapılmıştır. Toplam 29 örnekte Illumina Miseq platformu ile 756949 okuma yapılmış ve toplam 3729 OTU gözlenmiştir. Sekans özeti Tablo 4.1’de verilmiştir.

Tablo 4.1. *Sekans özeti*

	Sonuçlar
Örnek sayısı	29
Gözlenen operasyonel taksonomik unite (OTU) sayısı	3728
Toplam okuma	756949
Sayım/örnek özeti	
Örnek başı min okuma	6175
Örnek başı maksimum okuma	77553
Örnek başı okuma (ortalama±SD)	26101±13589

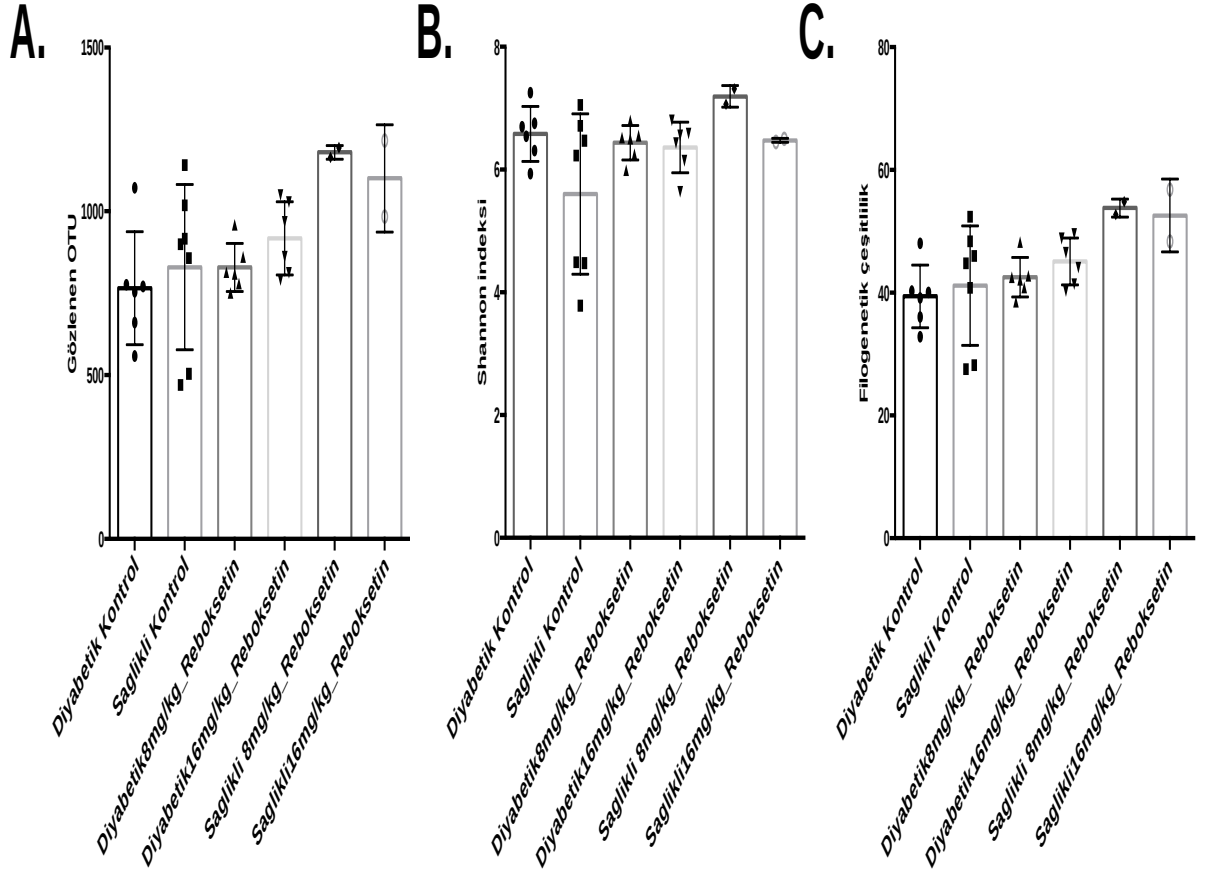
4.2. Alfa Çeşitlilik Değerlendirilmesi

Alfa çeşitlilik metrikleri mikrobiyom toplulukları içerisinde ve birbirleriyle arasındaki uzaklığı ölçmek için kullanılan metriklerdir. QIIME analiz programı kullanılarak %97 benzerlik olan mikroorganizmalardan 3728 OTU elde edilmiştir. Referans olarak kullanılan veritabanı sayesinde de oluşturulan OTU’lara filogenetik sınıflar atanmıştır. OTU seçimleri sonrasında QIIME analiz programında da bu uzaklıklar hesaplanmıştır. Biyolojik tür çeşitliliğin gruplar arasında gösterilmesinde

Shannon indeksi kullanılmıştır. Alfa çeşitlilik metriklerinin gruplar arasındaki farklılıkları tek yönlü ANOVA testi ile değerlendirilmiştir. Çalışma grupları arasında alfa çeşitlilik bakımından değerlendirildiğinde zenginlik, dağılım ve filogenetik çeşitlilik açısından değerlendirildiğinde (p değerleri > 0,05) anlamlı fark gözlenmemiştir (Tablo 4.2), (Tablo 4.3), (Şekil 4.1).

Tablo 4.2. Gözlenen OTU'ların gruplar arasında karşılaştırılması

Deney grupları	p değerleri
Diyabetik Kontrol-Sağlıklı Kontrol	0,9816
Diyabetik Kontrol-Diyabetik8mg/kg_Reboksetin	0,9850
Diyabetik Kontrol-Diyabetik16mg/kg_Reboksetin	0,6203
Diyabetik Kontrol-Sağlıklı 8mg/kg_Reboksetin	0,0586
Diyabetik Kontrol-Sağlıklı16mg/kg_Reboksetin	0,1818
Sağlıklı Kontrol-Diyabetik8mg/kg_Reboksetin	> 0,9999
Sağlıklı Kontrol-Diyabetik16mg/kg_Reboksetin	0,9289
Sağlıklı Kontrol-Sağlıklı 8mg/kg_Reboksetin	0,1359
Sağlıklı Kontrol-Sağlıklı16mg/kg_Reboksetin	0,3647
Diyabetik8mg/kg_Reboksetin-Diyabetik16mg/kg_Reboksetin	0,9369
Diyabetik8mg/kg_Reboksetin-Sağlıklı 8mg/kg_Reboksetin	0,1471
Diyabetik8mg/kg_Reboksetin-Sağlıklı16mg/kg_Reboksetin	0,3815
Diyabetik16mg/kg_Reboksetin-Sağlıklı 8mg/kg_Reboksetin	0,4202
Diyabetik16mg/kg_Reboksetin-Sağlıklı16mg/kg_Reboksetin	0,7652
Sağlıklı 8mg/kg_Reboksetin-Sağlıklı16mg/kg_Reboksetin	0,9966



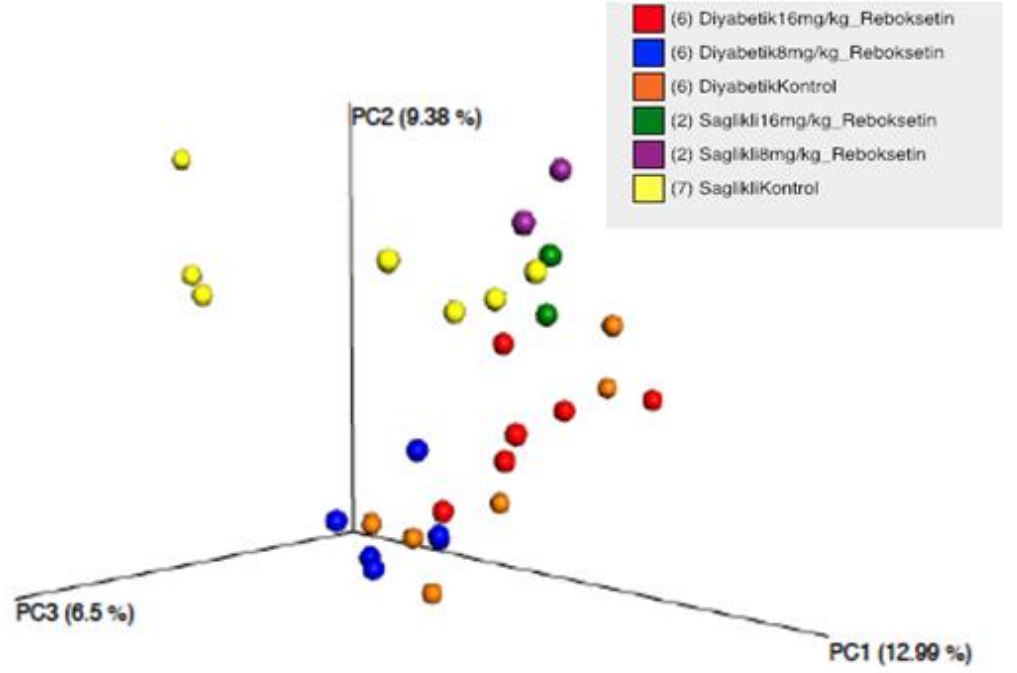
Şekil 4.1. Çalışma grupları arasında alfa çeşitlilik metrikleri. A. Gözlenen OTU, B. Shannon indeksi, C. Filogenetik çeşitlilik

4.3. Beta Çeşitlilik Değerlendirilmesi

Tüm deney grupları mikrobiyal yapı ve kompozisyon bakımından UniFrac analizleri kullanılarak yapılan beta çeşitlilik ölçümlerinde anlamlı olarak farklı bulunmuştur (p -değeri=0.001), (Şekil 4.2).

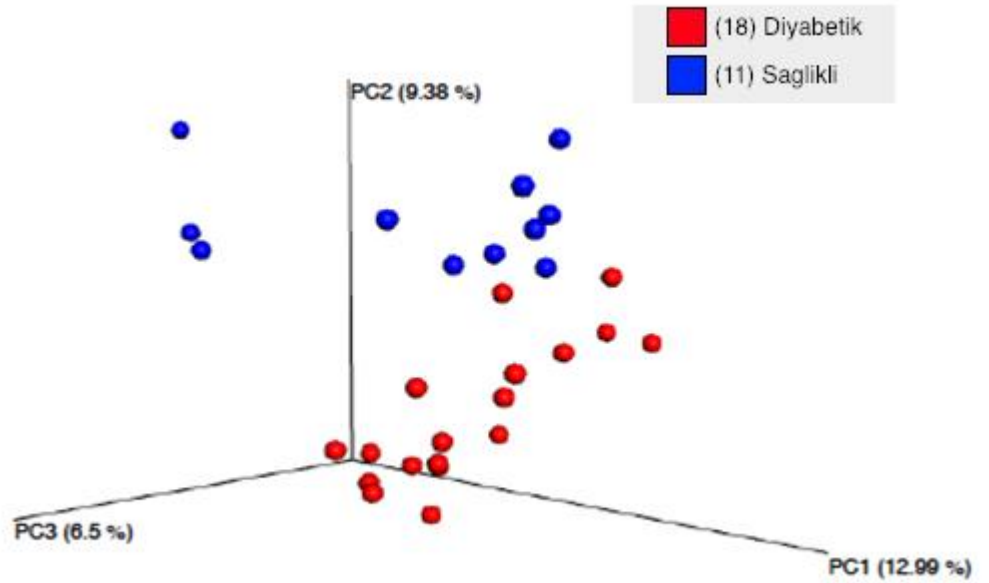
Tablo 4.3. *Tüm grupların alfa çeşitlilik metriklerinin sayısal değerleri*

	Örnek	Gözlenen OTU	Shannon	Simpson	Filogenetik çeşitlilik
Diyabetik kontrol	DK1	1072,00	7254480782,00	0,981330601	4805726,00
Diyabetik kontrol	DK2	776,00	6543732887,00	0,969987686	4004611,00
Diyabetik kontrol	DK3	771,00	6311542652,00	0,950311871	3916247,00
Diyabetik kontrol	DK4	558,00	6756685534,00	0,970289997	3283738,00
Diyabetik kontrol	DK5	754,00	5934012208,00	0,946072866	4026957,00
Diyabetik kontrol	DK6	660,00	6699315622,00	0,967956079	360522,00
Sağlıklı Kontrol	K1	916,00	7055782128,00	0,980256003	4479134,00
Sağlıklı Kontrol	K2	899,00	4494680155,00	0,902922744	4599434,00
Sağlıklı Kontrol	K3	1018,00	6471504331,00	0,950081643	4837441,00
Sağlıklı Kontrol	K4	504,00	3785142762,00	0,826988713	281997,00
Sağlıklı Kontrol	K5	857,00	6231417455,00	0,94333173	4083846,00
Sağlıklı Kontrol	K6	470,00	4478234206,00	0,897511701	275133,00
Sağlıklı Kontrol	K7	1141,00	6715997982,00	0,968000686	5238755,00
Diyabetik 8 mg/kg Reboksetin	D81	809,00	6252173391,00	0,958284337	4279195,00
Diyabetik 8 mg/kg Reboksetin	D82	814,00	6522930036,00	0,962657518	4215292,00
Diyabetik 8 mg/kg Reboksetin	D83	750,00	6804450416,00	0,974440956	3854402,00
Diyabetik 8 mg/kg Reboksetin	D84	861,00	599228762,00	0,940765571	4252576,00
Diyabetik 8 mg/kg Reboksetin	D85	780,00	6505791381,00	0,967112079	4087551,00
Diyabetik 8 mg/kg Reboksetin	D86	958,00	6557326683,00	0,960765187	4828496,00
Diyabetik 16 mg/kg Reboksetin	D161	1028,00	6559319111,00	0,966532394	495773,00
Diyabetik 16 mg/kg Reboksetin	D162	1049,00	6586843574,00	0,963344619	4882062,00
Diyabetik 16 mg/kg Reboksetin	D163	790,00	6431368427,00	0,958286336	4028252,00
Diyabetik 16 mg/kg Reboksetin	D164	812,00	5639317294,00	0,9243813	4138132,00
Diyabetik 16 mg/kg Reboksetin	D165	967,00	6803029528,00	0,97202319	4651917,00
Diyabetik 16 mg/kg Reboksetin	D166	861,00	6144890164,00	0,951465559	4404988,00
Sağlıklı 8 mg/kg Reboksetin	N81	1165,00	7318452112,00	0,978199828	5274042,00
Sağlıklı 8 mg/kg Reboksetin	N82	1194,00	707019195,00	0,973645898	5481547,00
Sağlıklı 16 mg/kg Reboksetin	N161	1216,00	6501121439,00	0,934864018	5678507,00
Sağlıklı 16 mg/kg Reboksetin	N162	984,00	6453790245,00	0,934401311	4835778,00



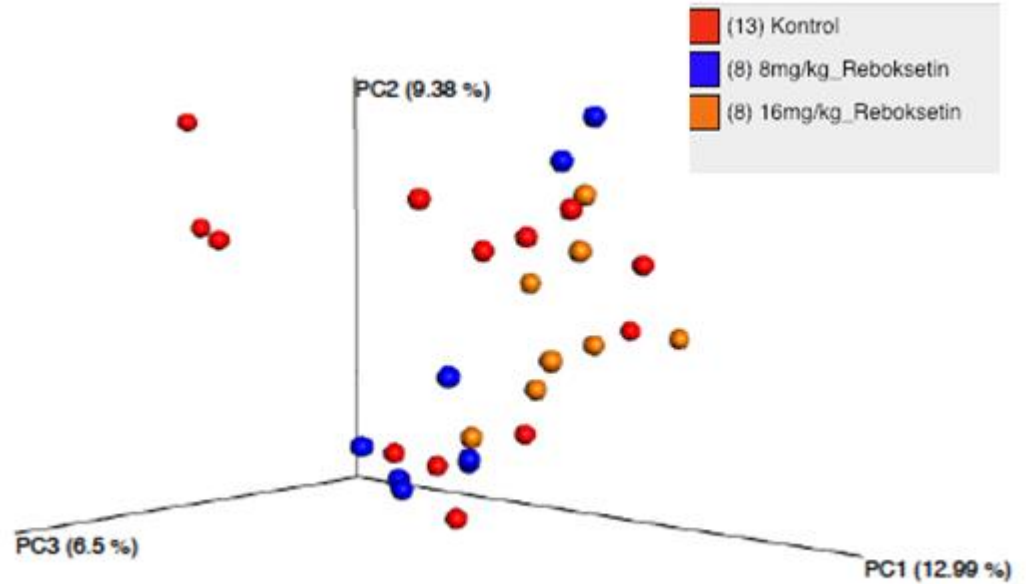
Şekil 4.2. Tüm deney grupları arasında beta çeşitlilik, unweighted UniFrac analizleri ($p=0.001$, ANOSIM)

Sadece kontrol ve diyabetik gruplar karşılaştırıldığında yine beta çeşitlilik anlamlı olarak farklı bulunmuştur ($p=0.001$, ANOSIM), (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. Diyabetik ve sağlıklı gruplar arasında beta çeşitlilik, unweighted UniFrac analizleri ($p=0.001$, ANOSIM)

Reboksetinin mikrobiyal yapı ve kompozisyona etkisini değerlendirebilmek amacıyla diyabetik grupta reboksetin alan ve almayanlar karşılaştırılmış ve yine beta çeşitlilik anlamlı olarak farklı bulunmuştur ($p=0.001$, ANOSIM), (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. Kontrol ve reboksetin alan gruplarda beta çeşitlilik, unweighted UniFrac analizleri ($p=0.001$, ANOSIM)

4.4. Taksa Dağılımları Değerlendirilmesi

Tüm deney gruplarına ait relatif taksa dağılımları Şekil 4.5’de göstergesiyle birlikte ifade edilmiştir.

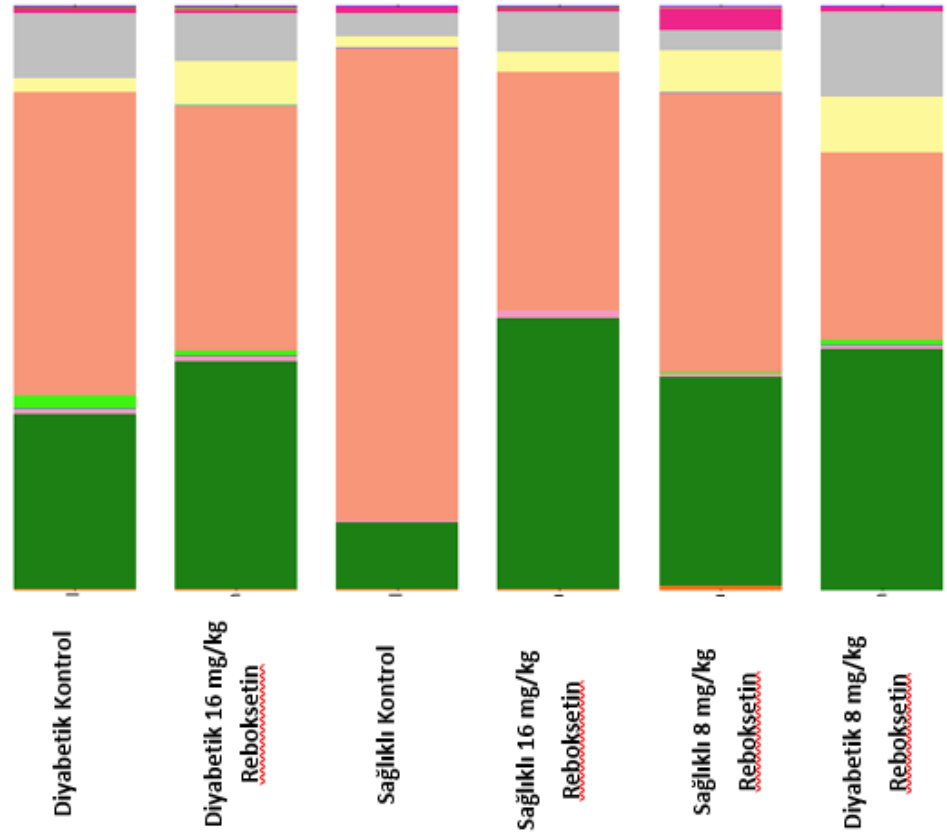
Sağlıklı florada düşük oranda bulunan *Bacteroidetes*, diyabetik kontrolde artış göstermektedir (Larsen vd., 2010). Diyabetik ve sağlıklı grupların karşılaştırılması daha önceki yapılan çalışmaları desteklemektedir. Reboksetin ilacının bağırsak florası üzerindeki etkinliğinin araştırılması açısından özgün bir değer taşımaktadır.

Literatürde yaygın olarak kullanılan antibiyotiğin bağırsak florası üzerine etkisi çalışmaları yapılmıştır. Farklı antibiyotik gruplarıyla yapılan çalışmalarda amoksisilin ve klindamisin *fusabakteria* grubuna Kinolonlar *Firmicutes* ve *Proteobakteria* grubuna, Sefalosporin ve seftriakson *Verrucomicrobia* grubuna etki ettiği gösterilmiştir (Panda vd., 2014).

Bir başka antibiyotik grubu ile yapılan çalışmada Polimiksin ve sulfonamideler *Firmicutes* ve *bakteroidetes* grubuna etkili olduğu gösterilmiştir (Iapichino vd., 2008)

Antibiyotik kullanımı sonrası disbiyosizin hastalık patojenitesine neden olduğu bir başka çalışmada gösterilmiştir. Bağırsak florasında az sayıda bulunan *Clostridium difficile* geniş spektrumlu antibiyotik kullanım sonrası florada baskın hale geldiği ve pseudomembranöz kolite neden olduğu gözlenmiştir (Bartlett, 2002).

Sağlıklı ve diyabetik gruplara farklı iki doz reboksetin uygulamasında da *Bacteroidetes* arttığı gözlenmiştir. Deney sonuçlarında sağlıklı kontrol grubunda %11,6 oranında bulunan *Bacteroidetes*, sağlıklı 16 mg/kg reboksetin grubunda %46,2'ye çıkmıştır. Reboksetinin 8 mg/kg dozu ile Reboksetinin 16 mg/kg dozu hem diyabetik hem sağlıklı da karşılaştırıldığında 16 mg/kg Reboksetinin grubunda *Bacteroidetes* oranı daha fazladır. Reboksetin etkisinin daha net ortaya konulması için karşılaştırılan sağlıklı kontrol ve sağlıklı gruba farklı iki doz uygulanan reboksetin sonuçları anlamlı farklılık ortaya koymaktadır. *Firmicutes* %80,9 oranında sağlıklı kontrolde bulunurken, %47,9 oranında sağlıklı 8mg/kg reboksetin grubunda, %40,2 oranında ise sağlıklı 16mg/kg reboksetin grubunda bulunmaktadır. Diyabetiklere uygulanan dozlarda da paralel sonuçlar elde edilmiştir. *Proteobacteria* en az %2,1 ile sağlıklı kontrolde ve %2,2 diyabetik kontrolde, en fazla oranda ise *Proteobacteria* %9,5'le diyabetik 8mg/kg reboksetin grubunda bulunmaktadır. *Spirochaetes* en az %3,5'le sağlıklı 8mg/kg reboksetin grubunda en fazla ise %14,4'le diyabetik 8mg/kg reboksetin grubunda yer aldığı gözlenmiştir. *Cyanobacteria*, *Fibrobacteres*, *Actinobacteria* toplam florada az oranda bulunsa da yüzdesel olarak gruplar arasında az farklılıklar içermektedir. Reboksetin uygulanan gruplarda %0,1 *Planctomycetes* bulunduğu gösterilmiştir.



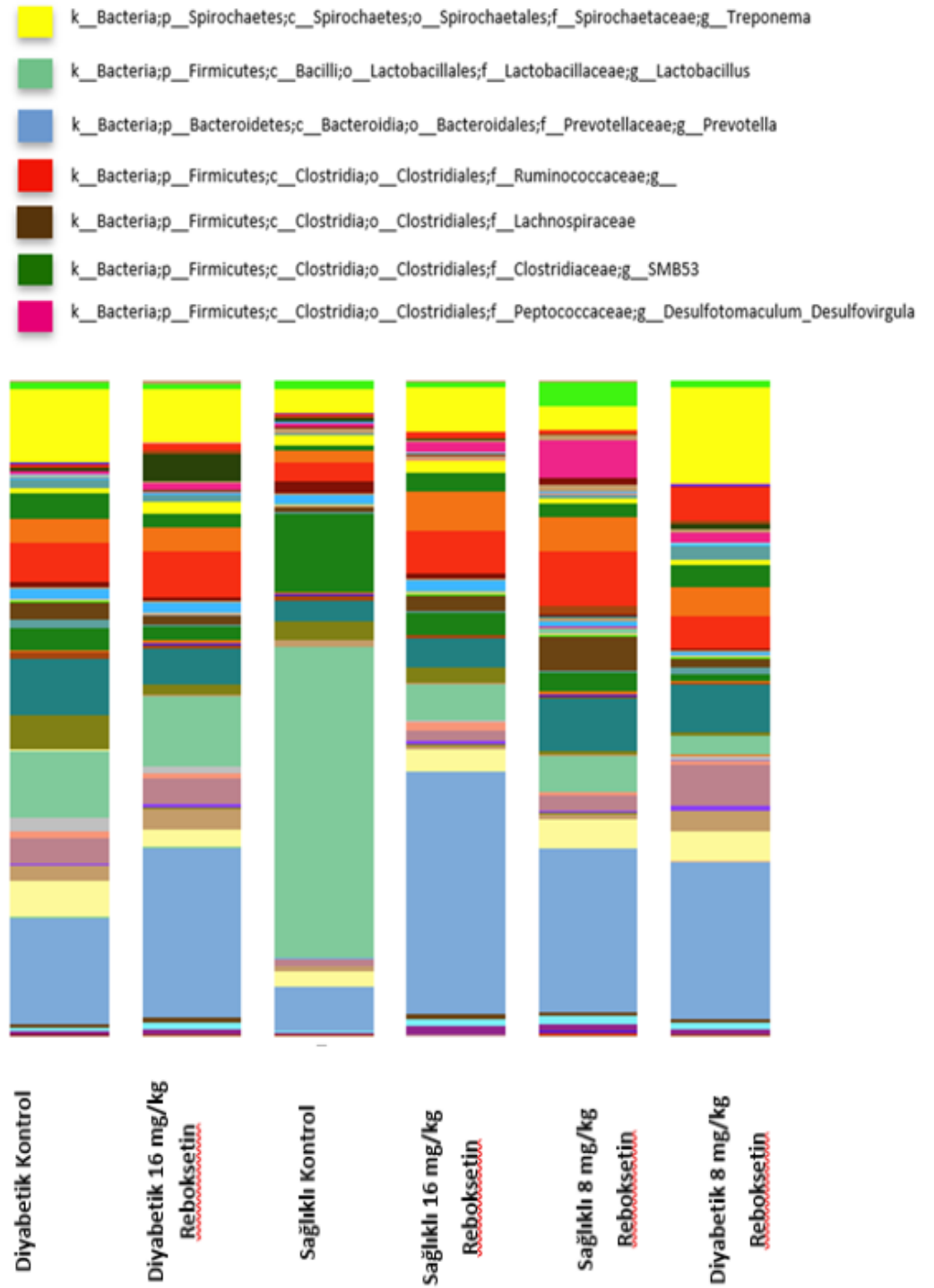
Şekil 4.5. Tüm deney gruplarına ait relatif taks dağılımları

		Total	DiyabetikKontrol	Diyabetik16mg/kg_Reboksetin	SaglikliKontrol	Saglikli16mg/kg_Reboksetin	Saglikli8mg/kg_Reboksetin	Diyabetik8mg/kg_Reboksetin
Legend	Taxonomy	%	%	%	%	%	%	%
	k_Archaea:p_Euryarchaeota	0.0%	0.1%	0.0%	0.0%	0.1%	0.0%	0.0%
	k_Bacteria:p_Acidobacteria	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	k_Bacteria:p_Actinobacteria	0.3%	0.2%	0.1%	0.2%	0.3%	0.9%	0.1%
	k_Bacteria:p_Bacteroidetes	34.0%	29.9%	39.1%	11.6%	46.2%	35.8%	41.3%
	k_Bacteria:p_Chlamydiae	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	k_Bacteria:p_Chlorobi	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	k_Bacteria:p_Chloroflexi	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	k_Bacteria:p_Cyanobacteria	0.7%	1.0%	0.8%	0.1%	1.3%	0.5%	0.5%
	k_Bacteria:p_Deferribacteres	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	k_Bacteria:p_Elusimicrobia	0.0%	0.1%	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.1%
	k_Bacteria:p_FCPU426	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	k_Bacteria:p_Fibrobacteres	0.6%	2.1%	0.9%	0.0%	0.2%	0.0%	0.7%
	k_Bacteria:p_Firmicutes	49.3%	52.0%	42.0%	80.9%	40.6%	47.9%	32.1%
	k_Bacteria:p_Fusobacteria	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	k_Bacteria:p_Lentisphaerae	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	k_Bacteria:p_Nitrospirae	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	k_Bacteria:p_Planctomycetes	0.1%	0.0%	0.1%	0.0%	0.1%	0.0%	0.1%
	k_Bacteria:p_Proteobacteria	5.3%	2.2%	7.4%	2.1%	3.3%	7.3%	9.5%
	k_Bacteria:p_Spirochaetes	8.0%	11.2%	8.3%	3.8%	7.0%	3.5%	14.4%
	k_Bacteria:p_TM7	1.4%	0.9%	0.7%	1.2%	0.5%	3.7%	1.1%
	k_Bacteria:p_Tenericutes	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	k_Bacteria:p_Verrucomicrobia	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	k_Bacteria:p_WPS-2	0.2%	0.3%	0.5%	0.0%	0.4%	0.2%	0.0%
	k_Bacteria:p_(Thermi)	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%

Şekil 4.6. Tüm deney gruplarına ait relatif taksa dağılımlarına ait gösterge

Tüm deney gruplarının cins düzeyinde karşılaştırması Şekil 4.7’de verilmiştir. Sağlıklı kontrolde *Lactobacillus*, *Clostridiaceae* fazla oranda, *Treponema*, *Desulfovibrio*, *Ruminococcaceae*, *Lachnospiraceae*, *Prevotella* cinsleri ise diğer gruplara nazaran az oranda bulunduğu gösterilmiştir.

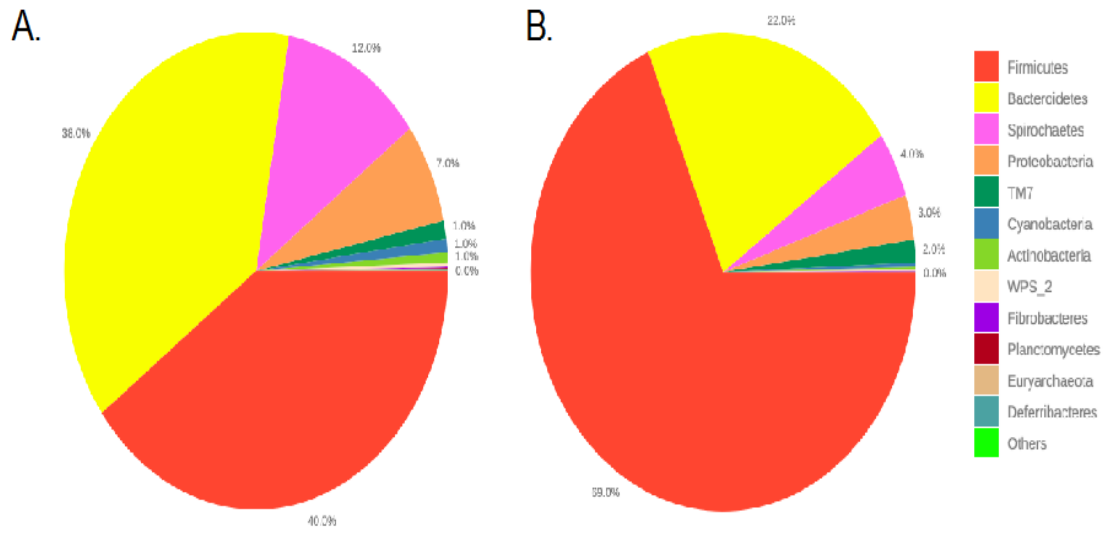
Diyabetik kontrolle sağlıklı kontrol karşılaştırıldığında *Lactobacillus* ve *Clostridiaceae* diyabetik gruplarda azalmıştır. Yapılan benzer çalışmalarda da *Lactobacillus*’un diyabetik kontrolde azaldığı gösterilmiştir (Cani vd., 2008).



Şekil 4.7. Tüm deney gruplarında cins düzeyinde relatif taksa dağılımları

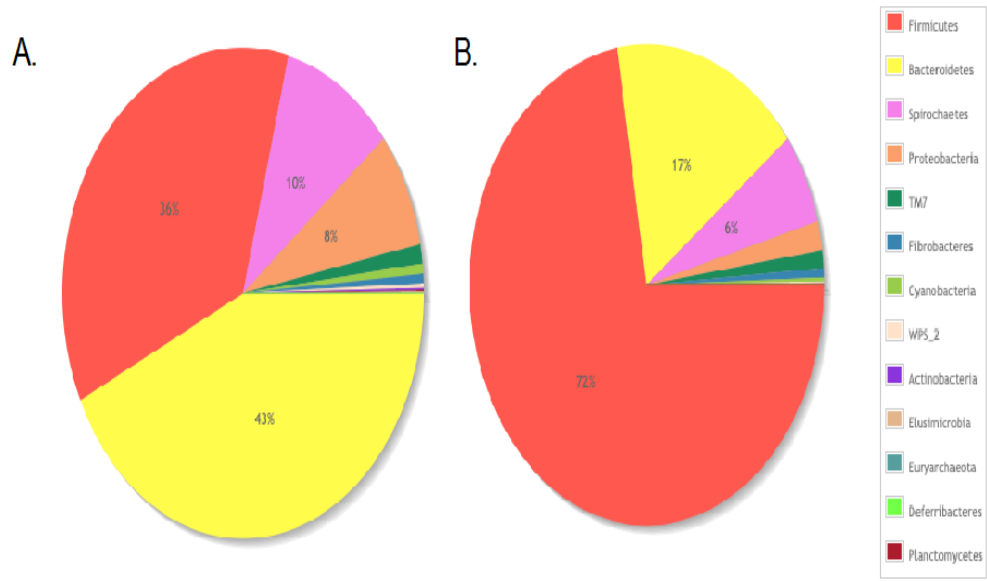
Diyabet ve sağlıklı kontrol grupları karşılaştırıldığında diyabetik bağırsak florasında *Firmicutes* azalırken, *Bacteroidetes*, *Spirochaetes*, *Proteobacteria* baskınlığı artarak değişiklik göstermiştir (Şekil 4.8). Sonuçlar yapılan diğer çalışmalarla da

desteklenmiştir. Sağlıklı kontroller ve tip 2 diyabet hastaları arasında bağırsak mikrobiyotası farklılıkları üzerinde durulan çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalarda da *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Prevotella*, *Clostridia* and *C. coccoides-E. rectale* grubu artarken *Firmicutes* azaldığı gösterilmiştir (Larsen vd., 2010).



Şekil 4.8. Diyabet grubu (A) ve sağlıklı kontrol grubunda (B) baskın taksaların dağılımı

Reboksetin 8 mg/kg ve 16 mg/kg uygulanan grupla hiç reboksetin uygulanmayan grubun baskın taksa dağılımları karşılaştırıldığında reboksetin uygulanan grupta *Bacteroidetes*, *Spirochaetes*, *Proteobacteria* artarken, *Firmicutes* baskınlığı azalmıştır (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. Reboksetin uygulanan diyabetik grup (A) ve diyabetik kontrol grubunda (B) taksa dağılımları.

4.5. LefSe Analizleri Değerlendirilmesi

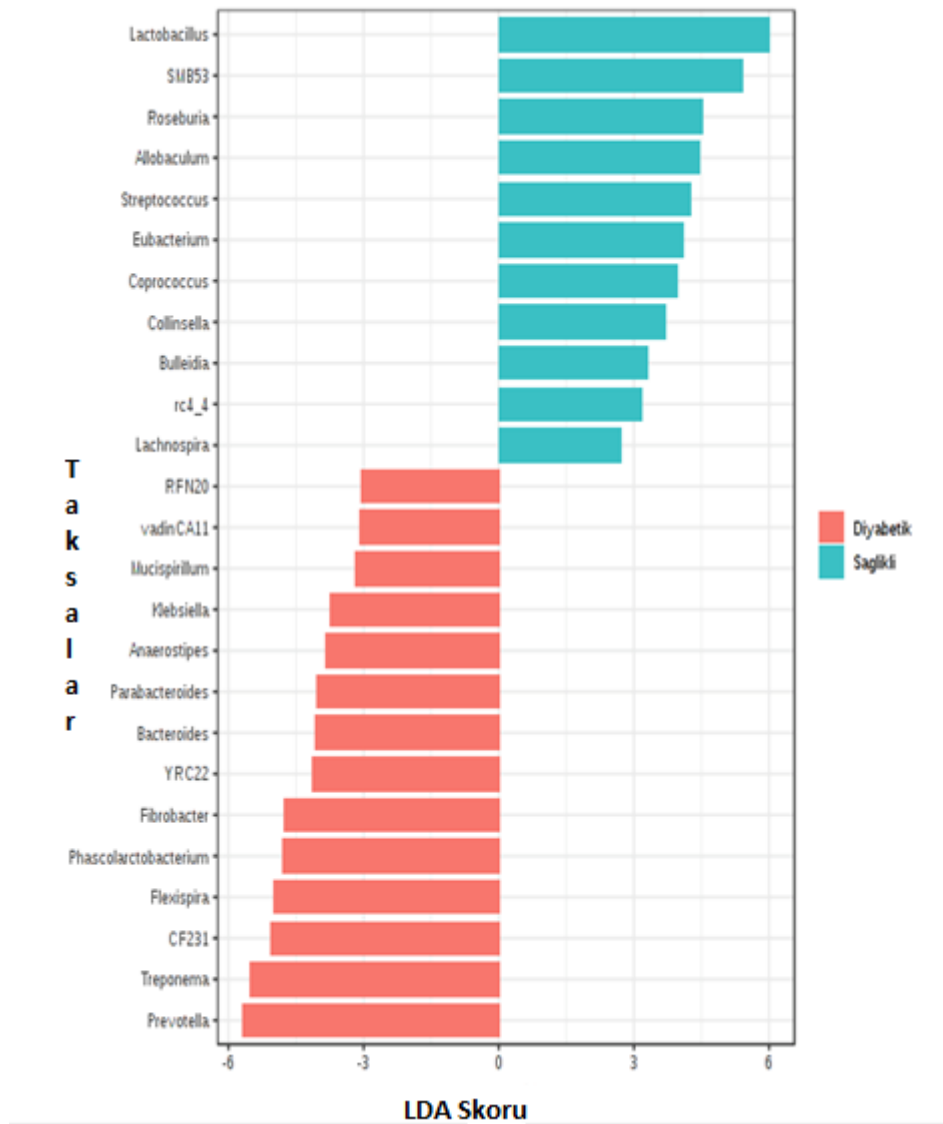
Gruplara anlamlı olarak etki eden taksaları belirleyerek, istenilen gruba özgül potansiyel biyobelirteçleri tespit edebilmek amacıyla LEfSe (*Linear discriminant analysis Effect Size*) analizleri yapılmıştır. LEfSe temel olarak Kruskal-Wallis ve Wilcoxon rank-sum testi birleştirilerek gruplar arasında anlamlı bulunan fonksiyonların etki derecesini belirler (Segata vd., 2011).

Bizim çalışmamızda hem diyabetik ve kontrol gruplarında hem de reboksetin alan ve reboksetin almayan gruplarda LEfSe analizleri yapılarak bu gruplara anlamlı etki eden taksalar belirlenmiştir.

Daha önce yapılan sınırlı sayıda çalışmada sağlıklı kontroller ve tip 2 diyabet hastaları arasında bağırsak mikrobiyotası farklılıkları üzerinde durulmuştur (Yassour vd., 2016). Hastalık patojenitesi ile mikrobiyota ilişkisi için yapılan çalışmalar daha çok obezite ve mikrobiyota ilişkisi üzerinde durulmuş, çalışmaların sonuçlarına göre obez hastalarda sağlıklı kontrollere göre *Bacteroides/Firmicutes* azaldığını ve musin degrade eden bir bakteri olan *Akkermansia muciniphila* azalma olduğu gösterilmiştir (Everard vd., 2013).

Literatürde diğer bir çalışmada obezite, tip 2 diyabetli, tip 1 diyabetli hastaların bağırsak florasında *Firmicutes* ve *Bifidobacterium*'lar azalırken *Bacteroidetes* filumlarında artış gösterilmiştir (Zhang vd., 2015).

Fibrobacter, *Klebsiella*, *Anaerostipes*, *Phascolarctobacterium* anlamlı olarak ($p<0,05$) diyabetik grubuna etki ettiği belirlenmiştir. *Lactobacillus*, *Allobaculum*, *Eubacterium*, *Collinsella* anlamlı olarak ($p<0,05$) sağlıklı gruba etki ettiği gösterilmiştir (Şekil 4.10), (Tablo 4.4).



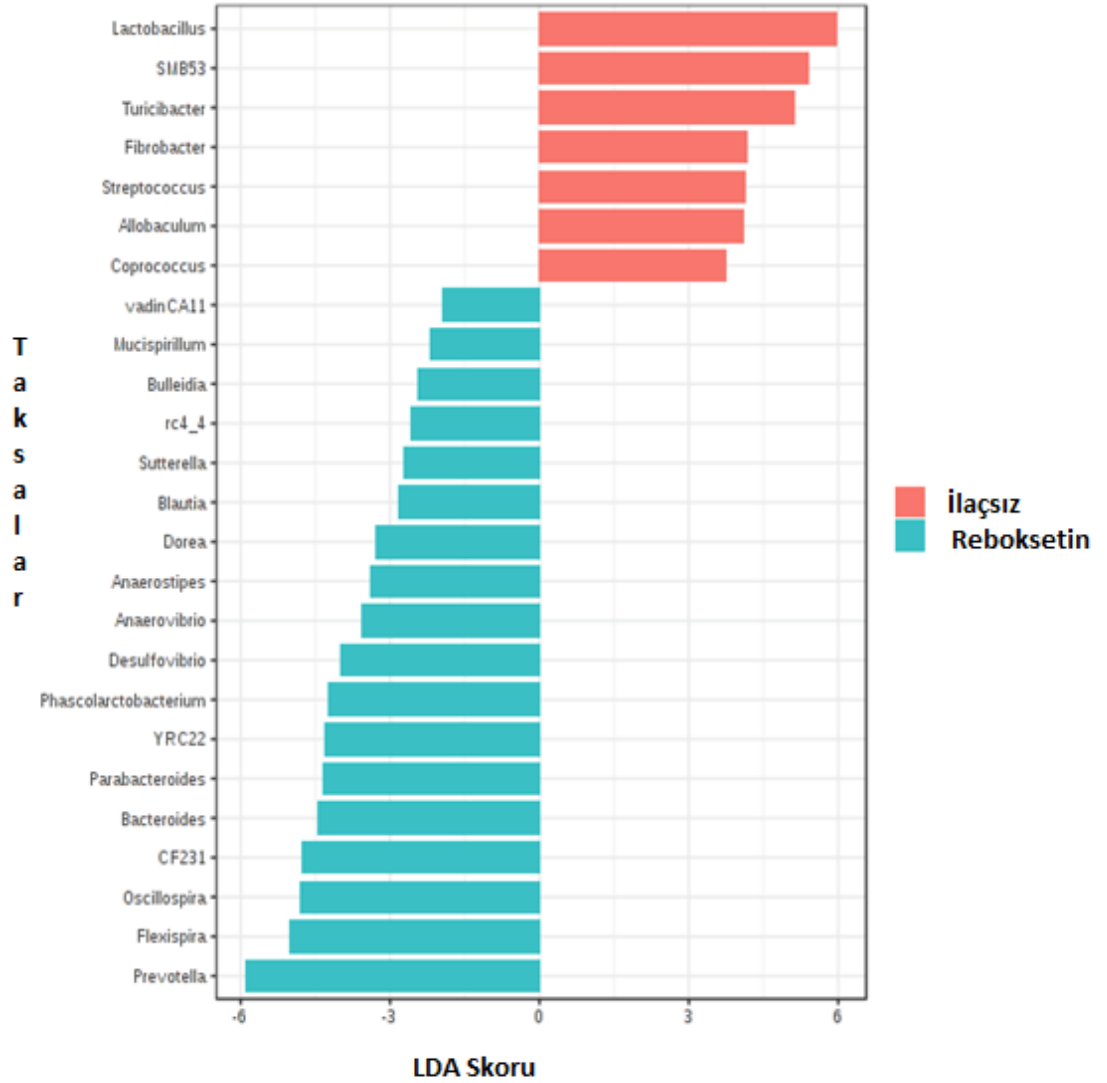
Şekil 4.10. Diyabetik ve sağlıklı gruplara anlamlı olarak etki eden bakteri taksalarının LDA etki dereceleri

Tablo 4.4. Diyabetik ve sağlıklı gruplarda bakteri taksalarının FDR skorları

	P değeri	FDR	Diyabetik	Sağlıklı
<i>Fibrobacter</i>	1.06E-05	0,00031868	1.244.333.984	5.771.779.039
<i>Klebsiella</i>	1.72E-05	0,00031868	1.124.631.759	1.223.475.061
<i>CF231</i>	0,00022814	0,0028137	3.242.312.587	9.519.830.396
<i>Anaerostipes</i>	0,0014091	0,010484	1.553.384.188	2.149.671.679
<i>Allobaculum</i>	0,0014168	0,010484	1.345.374.394	6.837.711.292
<i>Collinsella</i>	0,0021985	0,013557	1.150.887.208	1.139.351.223
<i>Phascolarctobacterium</i>	0,0053249	0,027258	1.673.301.111	4.705.273.521
<i>Eubacterium</i>	0,0058936	0,027258	3.844.932.132	2.805.444.875
<i>Lactobacillus</i>	0,011835	0,048657	8.006.037.905	2.748.376.868
<i>Treponema</i>	0,017211	0,06368	1.182.501.986	5.384.255.538
<i>Mucispirillum</i>	0,029843	0,10038	34.988.388	5.563.614.537
<i>Flexispira</i>	0,038683	0,11863	2.494.982.348	5.900.123.937
<i>Bulleidia</i>	0,041681	0,11863	2.076.892.232	5.989.597.696
<i>YRC22</i>	0,053272	0,14079	5.202.807.651	2.555.167.279
<i>Parabacteroides</i>	0,059058	0,14568	5.955.956.276	3.764.643.224
<i>RFN20</i>	0,064508	0,14918	2.787.168.388	5.992.169.158
<i>Streptococcus</i>	0,087641	0,19075	1.459.142.264	5.001.908.653
<i>Prevotella</i>	0,096307	0,19544	2.864.289.764	1.927.909.467
<i>rc4_4</i>	0,1056	0,19544	2.082.986.535	4.973.278.605
<i>SMB53</i>	0,10565	0,19544	225.377.429	7.454.019.566
<i>Bacteroides</i>	0,15035	0,2649	8.816.791.655	6.467.652.304
<i>vadinCA11</i>	0,17453	0,28559	4.883.363.666	2.410.992.032
<i>Roseburia</i>	0,17753	0,28559	1.020.963.096	1.667.823.642
<i>Lachnospira</i>	0,19565	0,30162	3.136.629.965	4.143.744.594
<i>Coproccoccus</i>	0,22492	0,33288	154.363.625	3.383.019.458
<i>Dorea</i>	0,24256	0,34518	1.373.762.418	2.131.758.116
<i>Ruminococcus</i>	0,26115	0,35788	2.677.323.812	1.859.059.168
<i>Blautia</i>	0,36845	0,48688	3.916.006.727	3.038.114.306
<i>Sutterella</i>	0,39311	0,50156	7.801.207.473	5.362.136.281
<i>Turicibacter</i>	0,58964	0,67855	2.278.232.544	2.330.034.328
<i>Anaerovibrio</i>	0,58964	0,67855	1.230.110.856	1.849.169.312
<i>Candidatus_Arthromitus</i>	0,60519	0,67855	6.639.957.258	3.517.375.276
<i>Paraprevotella</i>	0,76989	0,83783	104.699.354	728.063.794

LEfSe analizleri sonrası reboksetin uygulanmış grupla ilaçsız grup karşılaştırılmasında elde edilen LDA ve FDR skorlarına ilişkin sonuçlar Şekil 4.11’de

ve Tablo 4.5’de gösterilmiştir. *Lactobacillus*, *Turicibacter*, *Streptococcus* anlamlı ($p<0,05$) olarak ilaçsız gruba etki etmektedir. *Prevotella*, *Parabacteroides*, *Bacteroides*, *Flexispira*, *Desulfovibrio* anlamlı olarak ($p<0,05$) reboksetin ilacı uygulanmış gruba etki ettiği gözlenmiştir.



Şekil 4.11. Reboksetin uygulanmış diyabetik grup ve diyabetik kontrol gruplarına anlamlı olarak etki eden bakteri taksalarının LDA etki dereceleri

Tablo 4.5. Reboksetin uygulanmış diyabetik grup ve diyabetik kontrol gruplarına anlamlı olarak etki eden bakteri taksalarının LDA etki dereceleri

	p değeri	FDR	İlaçsız	Reboksetin
<i>Parabacteroides</i>	0,0004511	0,0077083	2706522144,00	7089593785,00
<i>Lactobacillus</i>	0,0004511	0,0077083	2602360.53	6757704303,00
<i>Prevotella</i>	0,000625	0,0077083	1618418738,00	3232798518,00
<i>Bacteroides</i>	0,0024794	0,022934	4873653074,00	1040555845,00
<i>Flexispira</i>	0,005007	0,037052	60460193,00	2721249594,00
<i>YRC22</i>	0,0074723	0,046079	1982589394,00	5998982229,00
<i>Desulfovibrio</i>	0,010976	0,050763	1664648319,00	3573252544,00
<i>SMB53</i>	0,010976	0,050763	7000919716,00	1971887258,00
<i>Turicibacter</i>	0,022587	0,092857	3796316194,00	1080403305,00
<i>Streptococcus</i>	0,031651	0,11711	4297668139,00	1588491883,00
<i>Blautia</i>	0,072042	0,24232	2855410887,00	4174189807,00
<i>Oscillospira</i>	0,079411	0,24485	2861548563,00	4152658896,00
<i>vadinCA11</i>	0,1119	0,30235	385278525,00	4020953131,00
<i>Allobaculum</i>	0,1144	0,30235	4858744317,00	2266742948,00
<i>CF231</i>	0,14786	0,36471	170911025,00	2913437922,00
<i>Bulleidia</i>	0,18525	0,4284	3264710689,00	3801774742,00
<i>Anaerovibrio</i>	0,2364	0,50389	1425533267,00	1496932836,00
<i>Fibrobacter</i>	0,24514	0,50389	9599806083,00	6595724688,00
<i>Anaerostipes</i>	0,2727	0,50493	7701113418,00	1269631674,00
<i>Phascolarctobacterium</i>	0,27294	0,50493	1028029276,00	1370677518,00
<i>rc4_4</i>	0,3131	0,52668	2746165458,00	3531229458,00
<i>Sutterella</i>	0,31316	0,52668	6285594087,00	7355781905,00
<i>Mucispirillum</i>	0,34368	0,55052	221645845,00	2517819659,00
<i>Coprococcus</i>	0,3571	0,55052	2867535324,00	1732544208,00
<i>Dorea</i>	0,42991	0,62485	1446620722,00	1835687088,00
<i>Paraprevotella</i>	0,45541	0,62485	7826456659,00	1042511987,00
<i>Ruminococcus</i>	0,45597	0,62485	2196161899,00	2505710924,00
<i>Treponema</i>	0,51067	0,67482	8165740479,00	1037015889,00
<i>Candidatus_Arthromitus</i>	0,5392	0,68795	3085979447,00	6578323928,00
<i>Lachnospira</i>	0,61989	0,76453	3509207043,00	3526302397,00
<i>RFN20</i>	0,7183	0,85085	2254506853,00	1715739249,00
<i>Collinsella</i>	0,74766	0,85085	2949778224,00	6731092962,00
<i>Clostridium</i>	0,75887	0,85085	210293064,00	2835972867,00
<i>Eubacterium</i>	0,86016	0,90994	8391905021,00	1679455933,00
<i>Klebsiella</i>	0,89239	0,91718	7284320838,00	6742008001,00
<i>Roseburia</i>	0,93011	0,93011	1544419938,00	1040371038,00

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sinaptik aralıkta noradrenalin geri alımını selektif olarak inhibe eden bir ilaç olan reboksetin antidepresanının sağlıklı ve diyabetik gruplarda kullanımının bağırsak florası üzerindeki etkinliğinin araştırılması açısından özgün bir değer taşımaktadır.

Bu çalışmayla elde edilen verilerle reboksetinden yola çıkarak antidepresan grubu ilaçların biyoinformatik analizlerden faydalanarak bağırsak florasında yarattığı değişiklikleri ve floradaki varyasyonların, baskın grupların ortaya konmasını sağlamıştır.

Çalışmamızdan elde ettiğimiz tüm sonuçlar doğrultusunda reboksetin kullanımının disbiyozise neden olabileceği ortaya konmuştur. İki farklı doz reboksetinde diyabetik florada değişiklik oluşturmaktadır. Aynı zamanda diyabetin de bağırsak florasında anlamlı değişiklik yaptığı gösterilerek bu anlamda yapılan literatür çalışmalarına katkı sağlanmıştır. Lefse Analizleriyle diyabetik grupta ve sağlıklı grupta bulunan baskın taksalar diyabet tanısında biyobelirteç olarak kullanılması konusunda yapılacak çalışmalara katkı sağlayacaktır. Reboksetin kullanımı ile oluşan disbiyozis hastalık gelişimine neden olabilir bu nedenle reboksetin kullanımı durumunda sağlıklı floraya dönüşümü sağlayacak beslenme destekleri (probiyotik kullanımı vb.) sağlanabilmesi için yeni bir bakış açısı getirmiştir. Antidepresan grupların da sıkça karşılaşılan yan etki sorunsalına bağırsak florası açısından da değerlendirilmesine olanak sağlayacaktır. Sağlıklı bağırsak florası baz alınarak antidepresan ilaçların yan etkileri azaltmak ve etkinliğini artırmak için antidepresan tedavisine ek olarak bağırsak florasını destekleyecek beslenme veya kombine ilaçlar geliştirilmesine olanak sağlayacaktır.

KAYNAKÇA

- Ackermann, R.T., Rosenman, M.B., Downs, S.M., Holmes, A.M., Katz, B.P, Li, J., Zillich A.J., Carney, C.P. ve Inui, T.S. (2005). Telephonic case-finding of major depression in a Medicaid chronic disease management program for diabetes and heart failure. *GenHosp Psychiatry*, 27(5), 338-343.
- Bağcı, H. (2002). İnsan Genom Projesi. Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Özel Sayı, 11-19.
- Bailey, M.T. ve Coe, C.L. (1999). Maternal separation disrupts the integrity of the intestinal microflora in infant rhesus monkeys. *Inc. Dev Psychobiol*, 35, 146-155.
- Baker, G. C., Smith, J. J. ve Cowan, D. A. (2003). Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *J Microbiol Met*, 55(3), 541-555.
- Barrett, E., Ross, R.P., O'Toole, P.W., Fitzgerald, G.F ve Stanton, C. (2012). γ -Aminobutyricacid production by culturable bacteria from the human intestine. *J Appl Microbiol*, 113(2), 407-411.
- Bartlett, J.G. (2002). Clinical practice. Antibiotic-associated diarrhea. *N Engl J Med*, 346(5), 334-339.
- Botero, L.E, Delgado-Serrano, L., Cepeda-Hernandez, M.L., Del Portillo Obando, P. ve Zambrano-Eder, M.M. (2016). The human microbiota: the role of microbial communities in health and disease. *Acta biol. Colomb*, 21(1), 5-15.
- Bozok, T., Şimsek, T., Kömür, S. ve Ulu, A. (2014). Normal Mikrobiyal Floranın İnsan Sağlığı Üzerine Etkisi ve İnsan Mikrobiyom Projesi. Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Arşiv Kaynak Tarama Dergisi, 23(3), 420-426.
- Britton, R.A. ve Young, V.B. (2014). Role of the intestinal microbiota in resistance to colonization by *Clostridium difficile*. *Elsevier Inc.* 146(6), 1547-1553.
- Cani, P.D., Rottier, O., Goiot, Y., Neyrinck, A.M., Geurts, L. ve Delzenne N.M. (2008). Changes in gut microbiota control inflammation in obese and diabetic mice through unexpected dependent mechanisms. *Diabetologia: clinical and experimental diabetes and metabolism*, 34-35.
- Caporaso, J. G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F. D., Costello, E. K., Fierer, N., Peña, A.G., Goodrich, J.K., Gordon, J.I., Huttley, G. A., Kelley, S.T., Knights, D., Koenig, J.E., Ley, R.E., Lozupone, C. A., McDonald, D., Muegge, B. D., Pirrung, M., Reeder, J., Sevinsky, J.R., Turnbaugh, P. J., Walters,

- W.A., Widmann, J., Yatsunenko, T., Zaneveld, J. ve Knight, R. (2010). QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods*, 7(5), 335-336.
- Cegielski-Perun, K., Bujalska-Zadrozny, M., Gasińska, E. ve Makulska-Nowak, H. E. (2014). Enhancement of antinociceptive effect of morphine by antidepressants in diabetic neuropathic pain model. *Pharmacol. Rep*, 66(2), 228-234.
- Çetinkalp, Ş. (2010). Tip 1 Diyabet ve Otoimmunité. *Türkiye Klinikleri Endokrinoloji-Özel konular*, 3(2), 51-8.
- Davies, J. (2001). In a map for human life, count the microbes, too. *Science*, 291(5512)
- Eckburg, P.B., Bik, E.M., Bernstein, C.N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., Gill S.R., Nelson K.E. ve Relman, D.A. (2005). Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*, 308(5728), 1635-1638.
- 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. *Proc Natl Acad Sci USA*, 110(22),9066-9071.
- Evrensel, A. ve Ceylan, M. E. (2015). Bağırsak Beyin Ekseni: Psikiyatrik Bozukluklarda Bağırsak Mikrobiyotasının Rolü. *Psikiyatride Güncel Yaklaşımlar*, 7(4), 461-472.
- Faveri, M., Mayer, M.P., Feres, M., de Figueiredo, L.C., Dewhirst, F.E. ve Paster, B.J. (2008). Microbiological diversity of generalized aggressive periodontitis by 16S rRNA clonal analysis. *Oral Microbiol Immunol*, 23(2), 112-118.
- Ferrand, J., Patron, K., Legrand-Frossi, C., Fripiat, J.P, Merlin, C., Alauzet, C. ve Lozniewski, A. (2014). Comparison of seven methods for extraction of bacterial DNA from fecal and cecal samples of mice. *J Microbiol Met*, 105, 180-185.
- Fishbain, D. (2000). Evidence-based data on pain relief with antidepressants. *Ann Med*, 32(5), 305-316.
- Friedricks, D. (2013). *The Human Microbiota: How Microbial Communities Affect Health and Disease*. New Jersey: John Wiley & Sons.
- Gao, Z., Tseng, C.H., Pei, Z. ve Blaser, M.J. (2007). Molecular analysis of human forearm superficial skin bacterial biota. *Proc Natl Acad Sci*,104(8), 2927-2932.
- Gerritsen, J., Smidt, H., Rijkers, G.T. ve de Vos, W.M. (2011). Intestinal microbiota in

- human health and disease: The impact of probiotics. *Genes & Nutrition*, 6(3), 209-240.
- Gevers, D., Cohan, F., Lawrence, J., Spratt, B., Coenye, T. ve Feil, E. (2005). Opinion: Re-evaluating prokaryotic species. *Nat Rev Microbiol*, 373, 3733-3739.
- Goodacre, R. (2007). Metabolomics of a superorganism. *J Nutr*, 137, 259-266.
- Gosalbes, M.J., Vazquez-Castellanos, J.F., Angebault, C., Woerther L., Ruppe E., Ferrus M.L., Latorre A., Andremont A ve Moya A. (2016). Carriage of Enterobacteria Producing Extended-Spectrum β -Lactamases and Composition of the Gut Microbiota in an Amerindian Community. *Antimicrob Agents and Chemother*, 60(1), 507-514.
- Guarner, F. ve Malagelada, J.R. (2003). Gut flora in health and disease. *Lancet*, 361(9356), 512-519.
- Gündoğdu, A. (2016). Bir “Süper Organizma” Olarak İnsan; Mikrobiyomun. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*, 46(4), 147-151.
- Hajos, M., Fleishaker, J.C., Filipiak-Resiner, J.K., Brown, M.T. ve Wong, E.H. (2004). Theselective norepinephrine reuptake inhibitor antidepressant reboxetine: pharmacological and clinical profile. *CNS Drug Rev*, 10(1), 23-44.
- Halmos, E.P., Christophersen, C.T., Bird, A.R., Shepherd S.J., Gibson P.R. ve Muir JG (2014). Diets that differ in their FODMAP content alter the colonic luminal microenvironment. *Gut*, 64(1), 93-100.
- Helvacı, F. ve Hocaoglu, Ç. (2016). Major Depresif Bozukluk’ Tanımı, Etiyolojisi ve Epidemiyolojisi: Bir Gözden Geçirme. *J Contemporary Med*, 6(1),51-66.
- Hur, K. ve Lee, M. (2015). Gut Microbiota and Metabolic Disorders. *Diabetes Metab J*, 39(3), 198-203.
- Hyman, R.W., Fukushima, M., Diamond, L., Kumm, J., Giudice, L.C. ve Davis, R.W. (2005). Microbes on the human vaginal epithelium. *Proc Natl Acad Sci*, 102(22), 7952-7957.
- Iapichino, G., Callegari, M.L., Marzorati, S., Cigada, M., Corbella, D., Ferrari S ve Morelli, L. (2008). Impact of antibiotics on the gut microbiota of critically ill patients. *J Med Microbiol*, 57(8), 1007-1014.
- Işık, E., Işık, U. ve Taner, Y. (2013). Çocuk, Ergen, Erişkin ve Yaşlılarda Depresif ve Bipolar Bozukluklar. Ankara: Ziraat Gurup Matbaacılık.

- Jandhyala, S. M., Talukdar, R., Subramanyam, C., Vuyyuru, H., Sasikala, M. ve Nageshwar-Reddy D. (2015). Role of the normal gut microbiota. *World J Gastroenterol*, 21(29), 8787-8803.
- Kessler, R.C. ve Bromet, E.J. (2013). The epidemiology of depression across cultures. *Annu Rev Public Health*, 34, 119-138.
- Koeth, R.A., Wang, Z., Levison, B. S., Buffa, J.A., Org E., Sheehy B.T., Britt, E.B., X., Wu, Y., Lin, L., Smith J.D., DiDonato, J.A., Chen, J., Li H., Wu, G.D., Lewis, J.D., Warrier M., Brown, J.M., Krauss, R.M., Wilson-Tang, W.H., Bushman, F.D. Lusi, A.J. ve Hazen, S.L. (2013). Intestinal microbiota metabolism of L-carnitine, a nutrient in red meat, promotes atherosclerosis. *Nat Med*, 19(5), 576-585.
- Lagier, J.C., Hugon, P., Khelaifia, S., Fournier, P.E., La Scola, B. ve Raoult, D. (2015). The rebirth of culture in microbiology through the example of culturomics to study human gut microbiota. *Clin Microbiol Revs*, 28(1), 237-264.
- Larsen, N., Vogensen, F.K., van den Berg, F., Nielsen, D. S., Andreasen, A. S., Pedersen, B.K. ve Abu Al-Soud, W., Sørensen S.J., Hansen L.H., Jakobsen M. (2010). Gut Microbiota in Human Adults with Type 2 Diabetes Differs from Non-Diabetic Adults. *PlosOne*, 5(2).
- Lederberg, J. ve McCray, A. (2001). Ome Sweet 'Omics—a genealogical treasury of words. *Scientist*, 15(8).
- Levkovich, T., Poutahidis, T., Smillie, C., Varian, B.J., İbrahim, Y.M., Lakritz, J.R., Alm E.J. ve Erdman S.E. (2013). Probiotic bacteria induce a glow of health, *PLoS One*, 8(1).
- Ley, R.E., Turnbaugh, P.J., Klein, S. ve Gordon, J.I. (2006). Microbial ecology: Human gut microbes associated with obesity. *Nature*, 444(7122), 1022-1023.
- Lyte, M. (2011). Probiotics function mechanistically as delivery vehicles for neuroactive compounds. Microbial endocrinology in the design and use of probiotics. *Bioassays*, 33(8), 574-581.
- Maes, M., Kenis, G., Kubera, M., Debaets, M., Steinbusch, H. ve Bosmans, E. (2005). The negative immunoregulatory effects of fluoxetine in relation to the cAMP-dependent PKA pathway. *Int Immunopharmacol*, 5(3), 609-618.
- Mete, H.E. (2008). Kronik Hastalık ve Depresyon. *Klinik Psikiyatri*, 11, 3-18.

- Neish, A. (2009). Microbes in gastrointestinal health and disease. *Gastroenterology* 136(1), 65-80.
- Olchanski, N., McInnis Myers, M., Halselth, M., Cyr, P.L., Bockstedt, L., Goss, T.F. ve Howland, R.H. (2013). The economic burden of treatment-resistant depression. *Clinical therapeutics*, 35(4), 512-522.
- O'Malley, P.G., Balden, E., Tomkins, G., Santora, J., Kroenka, K. ve Jackson, J.L. (2000). Treatment of fibromyalgia with antidepressants: a meta-analysis. *J Gen Intern Med*, 15(9), 659-666.
- Örsel, S. (2004). Depresyonda Tedavi: Genel İlkeler ve Kullanılan Antidepresan İlaçlar. *Klinik Psikiyatri*, 17-24.
- Palmer, C., Bik, E.M., Digiulio, D.B., Relman, D.A. ve Brown, P.O. (2007). Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS Biol*, 5(7).
- Panda, S., El Kahader, I., Casalles, F., Lopes Vivancos, J., Garcia Cors, M., Santiago, A., Cuenca, S., Guarner F. ve Manichanh, C. (2014). Short Term of Antibiotics on Human Gut Microbiota. *Plos One*, 9(4).
- Pastors, J.G., Warshaw, H., Daly, A., Franz M. ve Kulkarni K. (2002). The evidence for the effectiveness of medical nutrition therapy in diabetes management. *Diab Care*, 25(3), 608-613.
- Peterson, J., Garges, S., Giovanni, M., McInnes, P., Wang, L., Schloss, J.A., Bonazzi, V., McEwen, J.E., Wetterstrand, K.A., Deal, C., Baker, C.C., Di Francesco, V., Howcroft, T.K., Karp, R.W., Lunsford, R.D., Wellington, C.R., Belachew, T., Wright, M., Giblin, C., David, H., Mills, M., Salomon, R., Mullins, C., Akolkar, B., Begg, L., Davis, C., Grandison, L., Humble, M., Khalsa, J., Little, A.R., Peavy, H., Pontzer, C., Portnoy, M., Sayre, M.H., Starke-Reed, P., Zakhari, S., Read, J., Watson, B. ve Guyer, M. (2009). The NIH Human Microbiome Project. *Genome Research*, 19(12), 2317-2323.
- Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K.S, Manichanh, C., Nielsen, T, Pons, N., Levenez, F., Yamada, T., Mende, D.R., Li, J., Xu, J., Li, S., Li, D., Cao, J., Wang, B., Liang, H., Zheng, H., Xie, Y., Tap, J., Lepage, P., Bertalan, M., Batto, J.M., Hansen, T., Le Paslier, D., Linneberg, A., Nielsen, H.B., Pelletier, E., Renault, P, Sicheritz-Ponten, T., Turner, K, Zhu, H., Yu, C., Li, S., Jian, M., Zhou, Y., Li, Y., Zhang, X., Li, S., Qin, N., Yang, H., Wang, J., Brunak, S., Doré, J., Guarner, F., Kristiansen, K., Pedersen, O., Parkhill, J., Weissenbach,

- J., MetaHIT Consortium, Bork, P., Ehrlich, S.D. ve Wang, J. (2010). A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*, 464(7285), 59-65.
- Relman, D.A. ve Falkow, S. (2001). The meaning and impact of the human genome sequence for microbiology. *Trends Microbiol*, 9(5), 206-208.
- Satman, I., Yilmaz, T., Sengül, A., Salman, S., Salman, F., Uygur, S., Bastar, I., Tütüncü, Y., Sargin, M., Dinççag, N., Karsidag, K., Kalaça, S., Ozcan, C., King, H. (2002). Population-based study of diabetes and risk characteristics in Turkey: results of the turkish diabetes epidemiology study (TURDEP). *Diabetes Care*, 25(9), 1551-1556.
- Scates, A.C. ve Doraiswamy, P.M. (2000). Reboxetine: A selective norepinephrine reuptake inhibitor for the treatment of depression. *Ann Pharmacother*, 34(11), 1302-1312.
- Segata, N., Izard, J., Waldron, L., Gevers, D., Miropolsky, L., Garrett, W.S. ve Huttenhower, C. (2011). Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biol*, 12(6).
- Sekirov, I., Russell, S.L., Antunes, L.C. ve Finlay, B.B. (2010). Gut microbiota in health and disease. *Physiol Rev*, 90(3), 859-904.
- Shendure, J., ve Ji, H. (2008). Next-generation DNA sequencing. *Nat Biotechnol*, 26(10), 1135–1145.
- Shreiner, A.B., Kao, J.Y. ve Young, V.B. (2015). The gut microbiome in health and in disease. *Curr Opin Gastroenterol*, 31(1), 69-75.
- Simrén M., Barbara G., Flint H.J., Spiegel B.M., Spiller R.C., Vanner S., Verdu E.F., Whorwell P.J. ve Zoetendal E.G. (2013). Intestinal microbiota in functional bowel disorders: a Rome foundation report. *Gut*, 62(1), 159-176.
- Stahl, M. (2000). Classical Antidepressants, Serotonin Selective Reuptake Inhibitors, and Noradrenergic Reuptake Inhibitors (2 b.). Cambridge: Cambridge University Press.
- Süzük, S. (2015). *Helicobacter pylori* Tedavisinin Mikrobiyata Üzerine Etkisi. Doktora Tezi. Ankara: Gazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- Tillisch, K., Labus, J., Kilpatrick, L., Jiang, Z., Stains, J., Ebrat, B., Guyonnet, D., Legrain-Raspaud, S., Trotin, B., Naliboff, B., Mayer, E.A. (2013). Consumption of fermented milk product with probiotic modulates brain activity. *Gastroenterol*, 144(7), 1319-1401.

- Turnbaugh, P.J., Ley, R.E., Hamody, M. Fraser-Liggett, C., Knight, R. ve Gordon, J.I. (2007). The human microbiome project. *Nature*, 449(7164), 804- 810.
- Udina, M., Castellví, P., Moreno-España, J., Navinés, R., Valdés, M., Forns, X., Langohr, K., Solà R., Vieta E., Martín-Santos, R. (2012). Interferon-induced depression in chronic hepatitis C: asystematic review and meta-analysis. *J Clin Psychiatry*, 73(8), 1128-1138.
- Üçel, U. İ., Can, Ö. D., Demir Özkay, Ü. ve Öztürk, Y. (2015). Antihyperalgesic and antiallodynic effects of mianserin on diabetic neuropathic pain: a study on mechanism of action. *Eur J. Pharmacol*, 756, 92-106.
- Van Nood, E., Vrieze, A., Nieuwdorp, M., Fuentes, S., Zoetendal, E.G., de Vos W.M., Visser, C.E., Kuijper, E.J., Bartelsman, J.F., Tijssen, J.G., Speelman, P., Dijkgraaf, M.G., Keller, J.J. (2013). Duodenal infusion of donor feces for recurrent *Clostridium difficile*. *N Engl J Med*, 368(5), 407-415.
- Westernberg, H.G. (1999). Pharmacology of antidepressants: Selectivity or multiplicity. *J Clin Psychiatry*, 60, 8-46.
- Willis, T. (1971). Diabetes: A Medical Odyssey. Tuckahoe. USV Pharmaceutical Corp.
- Wong, E.H., Sonders, M.S., Amara, S.G., Tinholt, P.M., Piercey, M.F. Hoffmann, W.P., Hyslop, D.K., Franklin, S., Porsolt, R.D., Bonsignori, A., Carfagna, N., & McArthur, R.A. (2000). Reboxetine: A pharmacologically potent, selective, and specific norepinephrine reuptake inhibitor. *Biol Psychiatry*, 47(9), 818-829.
- Yan, J. E., Yuan, W., Lou, X. ve Zhu, T. (2012). Streptozotocin-induced diabetic hyperalgesia in rats is associated with upregulation of toll-like receptor 4 expression. *Neurosci Lett*, 526(1), 54-58.
- Yassour, M. Vatanen, T., Siljander, H., Hämäläinen, A.M., Härkönen, T., Ryhänen, S.J., Franzosa, E.A., Vlamakis, H., Huttenhower, C., Gevers, D., Lander, E.S., Knip, M., DIABIMMUNE Study Group, Xavier, R.J. (2016). Natural history of the infant gut microbiome and Natural history of the infant gut microbiome and impact of antibiotic treatment on bacterial strain diversity and stability. *Sci Transl Med*, 8(343).
- Zhang, Y. J., Li, S., Gan, R.Y., Zhou, T., Xu, D. P. ve Li, H. B. Impacts of gut bacteria on human health and diseases. (2015). *Int J of Mol Sci*, 16(4), 7493-7519.
- http-1:
https://web.ornl.gov/sci/techresources/Human_Genome/index.shtml (Erişim tarihi:

30.12.2018)

http-2:

<https://www.genome.gov/12011238/an-overview-of-the-human-genome-project/>

(Erişim tarihi:10.09.2018)

http-3:

<https://www.beslenmerehberim.net/mikrobiyota/> (Erişim tarihi:01.08.2018)

http-4:

<https://www.idf.org/e-library/epidemiology-research/diabetes-atlas.html> (Erişim tarihi: 12.11.2018)

http-5:

<http://www.idf.org/sites/default/files/UN%20Resolution%20on%20World%20Diabetes%20Day%20of%20Dec%202006.pdf> (Erişim tarihi:28.08.2018)

http-6:

http://www.turkendokrin.org/files/file/DIYABET_TTK_web.pdf

(Erişim tarihi:28.06.2018)

http-7:

http://www.tdhd.org/dhd_kitap/02blm.pdf (Erişim tarihi:01.05.2018)

http-8:

<http://web.hitit.edu.tr/dosyalar/materyaller/mkursatderici@hititedutr211220155G2S4B5E.pdf> (Erişim tarihi:15.09.2018)

http-9:

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Reboxetine#section=Top> (Erişim tarihi: 20.08.2018)

http-10:

<https://eu.mpbio.com/116560000-fastdna-spin-kit-for-soil-samp-cf> (Erişim tarihi: 04.12.2018)



T.C.
ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARAR FORMU

Toplantı No: 8 Dosya Kayıt No: 18-61 BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN ADI	Reboksetin kullanımının bağırsak florası üzerine etkisinin biyoinformatik analizi.
	SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI / ADI KURUMU	Dr. Öğr. Üy. Hülya KARACA GENÇER Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
	YARDIMCI ARAŞTIRMACILAR	Dr. Öğretim Üyesi Ceren ÖZKUL KOÇAK, Araş. Gör. Nazlı TURAN YÜCEL, Yüksek Lisans Öğr. Sinem TEKİNKOCA
	Hayvan Türü ve Sayısı	Sprague- Dawley/Erkek 24

DEĞERLENDİRİLEN BELGE	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ ve EKLERİ	Var
------------------------------	--------------------------------------	-----

KARAR BİLGİLERİ	Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Öğ. Üyesi Dr. Öğr. Üy. Hülya KARACA GENÇER'in araştırma yürütücüsü olduğu 18-61 dosya kayıt numaralı ve "Reboksetin kullanımının bağırsak florası üzerine etkisinin biyoinformatik analizi" başlıklı başvuru, Deney Hayvanları Etik Kurulu Yönergesine uygun bulunarak onaylanmasına karar verilmiştir.	
	KARAR NO: 2018-57	KARAR TARİHİ: 04.12.2018

ETİK KURUL ÜYELERİ			
ÜNVANI / ADI SOYADI ETİK KURUL GÖREVİ	BİRİMİ	TOPLANTIYA KATILMA	KARARA KATILMA İMZA
Doç. Dr. Bülent ERĞÜN BAŞKAN	Eczacılık Fakültesi Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı	☒ Katıldı ☐ Katılmadı	
Doç. Dr. Özgür Devrim CAN ÜYE	Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı	☒ Katıldı ☐ Katılmadı	
Doç. Dr. Sinem ILGIN ÜYE	Eczacılık Fakültesi Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı	☒ Katıldı ☐ Katılmadı	
Doç. Dr. Harun BÖCÜK ÜYE	Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü	☐ Katıldı ☒ Katılmadı	
Doç. Dr. Gökhan KUŞ ÜYE	Açıköğretim Fakültesi Sağlık Programları Bölümü	☒ Katıldı ☐ Katılmadı	
Doç. Dr. Gülşen AKALIN ÇİFTÇİ ÜYE	Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı	☒ Katıldı ☒ Katılmadı	
Yrd. Doç. Dr. Vet. Hek. Mustafa ESER ÜYE	Deney Hayvanları Arş. Ve Uyg. Birimi	☒ Katıldı ☐ Katılmadı	
Dr. Kürşat KARTAL ÜYE	Laboratuvar Hayvanları Bilimi Derneği Üyesi	☒ Katıldı ☐ Katılmadı	
Vet. Hek. Mustafa SAYIN ÜYE	Serbest	☐ Katıldı ☒ Katılmadı	