

T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BESLENME VE DİYETETİK ANABİLİM DALI

**HİPERKOLESTEROLEMİK FARELERE PROBİYOTİK VE
D-TAGATOZUN SİNBIYOTİK OLARAK VERİLMESİNİN
METABOLİK PARAMETRELER VE BAĞIRSAK
MİKROBİYOTASI ÜZERİNE ETKİSİ**

Hazırlayan
Mehmet ÇAVDAR

Danışman
Prof. Dr. Nalan Hakime NOĞAY

İkinci Danışman
Dr. Öğr. Üyesi Emine DİNÇER

Doktora Tezi

Mayıs 2023
KAYSERİ

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BESLENME VE DİYETETİK ANABİLİM DALI

**HİPERKOLESTEROLEMİK FARELERE PROBİYOTİK VE
D-TAGATOZUN SİNİYOTİK OLARAK VERİLMESİNİN
METABOLİK PARAMETRELER VE BAĞIRSAK
MİKROBİYOTASI ÜZERİNE ETKİSİ**

Doktora Tezi

Hazırlayan
Mehmet ÇAVDAR

Danışman
Prof. Dr. Nalan Hakime NOĞAY

İkinci Danışman
Dr. Öğr. Üyesi Emine DİNÇER

**Bu Tez Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Proje Birimi
tarafından TDK-2021-10984 kodlu proje ile desteklenmiştir.**

Mayıs 2023
KAYSERİ

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu tezin kendi çalışmam olduğunu, tüm bilgilerin akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda akademik ve etik kuralların gerektirdiği gibi tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel kurallara uygun olarak atıfta bulunulduğunu ve kaynaklar listesinde gösterdiğimi belirtirim.

Adı-Soyadı: Mehmet ÇAVDAR

İmza:

YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI

“Hiperkolesterolemik Farelere Probiyotik ve D-Tagatozun Sinbiyotik Olarak Verilmesinin Metabolik Parametreler ve Bağırsak Mikrobiyotası Üzerine Etkisi” adlı **Doktora Tezi** Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan

Mehmet ÇAVDAR

Danışman

Prof. Dr. Nalan Hakime NOĞAY

Beslenme ve Diyetetik Anabilim Dalı Başkanı

Prof. Dr. Betül ÇİÇEK

KABUL ve ONAY SAYFASI

Prof. Dr. Nalan Hakime NOĞAY danışmanlığında **Mehmet ÇAVDAR** tarafından hazırlanan “**Hiperkolesterolemik Farelere Probiyotik ve D-Tagatozun Sinbiyotik Olarak Verilmesinin Metabolik Parametreler ve Bağırsak Mikrobiyotası Üzerine Etkisi**” adlı bu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Beslenme ve Diyetetik Anabilim Dalında **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

.../.../2023

İmza

JÜRİ

Danışman: **Prof. Dr. Nalan Hakime NOĞAY**

Üye: **Prof. Dr. Habibe ŞAHİN**

Üye: **Prof. Dr. Zafer GÖNÜLALAN**

Üye: **Doç. Dr. Meltem SOYLU**

Üye: **Dr. Öğr. Üyesi Gülin ÖZTÜRK ÖZKAN**

ONAY

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun..... Tarih vesayılı kararı ile onaylanmıştır.

.../.../2023

Prof. Dr. Bilal AKYÜZ

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Doktora tezimin yürütülmesi konusunda tecrübelerini benimle paylaşan, fikir ve önerileriyle bana yol gösteren, manevi desteğini de her zaman yanımda hissettiğim çok kıymetli birinci danışmanım Prof. Dr. Nalan Hakime NOĞAY' a en kalbi duygularımla teşekkür ederim.

Çalışmanın deneysel aşamasına sunduğu katkılardan ötürü ikinci danışmanım sayın Dr. Öğr. Üyesi Emine DİNÇER' e,

Tez izleme süreci boyunca kıymetli görüş ve önerileriyle bana yol gösteren, bilimsel deneyimlerinden yararlandığım değerli hocalarım Prof. Dr. Habibe ŞAHİN ve Prof. Dr. Zafer GÖNÜLALAN' a,

Histolojik analizler ve deneysel aşamalar konusundaki katkılarıyla ve tez sürecim boyunca yanımda hissettiğim manevi desteğinden ötürü Doç. Dr. Derya KARABULUT hocama,

Bağırsak mikrobiyota analizinde kıymetli desteklerinden ötürü Dr. Öğr. Üyesi Müge GÜLCİHAN ÖNAL hocama,

Doktora eğitim sürecim boyunca benden bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen sevgili hocam Prof. Dr. Betül ÇİÇEK' e,

Tez sürecim boyunca kıymetli görüş ve katkılarını sunan Dr. Öğr. Üyesi Neslihan ÖNER hocama,

TDK-2021-10984 proje kodu ile tez projemi destekleyen ve tüm hususlarda bana yardımcı olan Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi kıymetli hocaları ve değerli personellerine,

Manevi desteklerini her daim yanımda hissettiğim ve bu günleri görmemde en büyük pay sahibi olan sevgili eşim Meliha ÇAVDAR' a ve biricik kızım Elif Kübra ÇAVDAR ile aileme en içten duygularımla teşekkür ederim.

Mehmet ÇAVDAR

Kayseri, Mayıs 2023

**HİPERKOLESTEROLEMİK FARELERE PROBİYOTİK VE
D-TAGATOZUN SİNBİYOTİK OLARAK VERİLMESİNİN METABOLİK
PARAMETRELER VE BAĞIRSAK MİKROBİYOTASI ÜZERİNE ETKİSİ**

Mehmet ÇAVDAR

Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Beslenme ve Diyetetik Anabilim Dalı Doktora Tezi, Mayıs 2023

Birinci Danışman: Prof. Dr. Nalan Hakime NOĞAY

İkinci Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Emine DİNÇER

ÖZET

Hiperkolesterolemi tedavisinde farmakolojik ajanlara kıyasla yan etki içermeyen ve daha düşük maliyetli alternatif terapötik ajan arayışları yoğun bir şekilde devam etmektedir. Son yıllarda probiyotik bakterilerin ve prebiyotiklerin birlikte kullanıldığı sinbiyotik uygulamalar ise kolesterol düşürücü etkiye sahip potansiyel biyoterapötikler olarak ön plana çıkmıştır. Mevcut çalışmanın amacı hiperkolesterolemi tablosu oluşturulmuş farelerde ilk defa sinbiyotik olarak kullanılan *Lactocaseibacillus casei* ATCC 393 suşu ile d-tagatozun serum lipit ve kolesterol parametreleri ile bağırsak mikrobiyota örüntüsü üzerine etkilerini araştırmaktır. Farelerde hiperkolesterolemi tablosu yüksek yağlı ve yüksek kolesterolü (YYYK) yemle beslenme sonucu indüklenmiştir. Fareler herhangi bir uygulamanın bulunmadığı negatif ve pozitif kontrol (hiperkolesterolemik kontrol) grupları ile probiyotik, prebiyotik ve sinbiyotik uygulamalarının olduğu toplamda beş gruba ayrılmıştır. Toplamda on iki hafta süren çalışma periyodunun son dört haftasında; probiyotik, prebiyotik ve sinbiyotik uygulamaları gerçekleştirilmiştir. Karaciğer doku kesitlerinin histolojik analizi sonucu mikroveziküler steatozis skorunun ve IL-6 immünoreaktif sonucunun yalnızca sinbiyotik grubunda anlamlı düşüş sergilediği görülmüştür ($p<0.05$). Serum ALB, ALT, AST ve VLDL-K düzeylerinin probiyotik, prebiyotik ve sinbiyotik uygulamalarında değişmediği ($p>0.05$); serum TK düzeyinin ise yalnızca sinbiyotik grubunda önemli miktarda azaldığı saptanmıştır ($p<0.05$). Ayrıca serum HDL-K düzeyinin prebiyotik ve sinbiyotik gruplarında, serum TG düzeyinin ise yalnızca prebiyotik grubunda anlamlı şekilde azaldığı belirlenmiştir ($p<0.05$). Feçes örneklerinin analizi sonucu; uygulamaların bakteriyel türlerin toplam çeşitlilik ve zenginliğinde anlamlı bir artışa yol açmadığı ($p>0.05$) fakat bazı taksonomik öğelerin düzeylerini değiştirerek bağırsak mikrobiyota örüntüsünü düzenlediği bulunmuştur. Sinbiyotik grubunda endotoksin salgılayan bakterileri içeren *Pseudomonadota* filumu ve *Desulfovibrionaceae* ailesi miktarının önemli oranda düştüğü gösterilmiştir ($p<0.05$). Bununla birlikte sinbiyotik grubunda hiperkolesterolemi tablosunda bağırsak mikrobiyotasında artış gösterdiği bilinen *Oscillospira* ile patojenik karakterdeki *Clostridium* cinsinin azaldığı da belirlenmiştir ($p<0.05$). Öte yandan kısa zincirli yağ asitleri (KZYA) fermantasyonunda önemli rol oynayan *Coprococcus* cinsi miktarının ise sinbiyotik tüketimi sonucu önemli düzeyde yükseldiği bulunmuştur ($p<0.05$).

Serum TK düzeyleriyle *Streptococcus* cinsi bakteriler arasında orta düzeyde ve pozitif yönde korelasyon; *Lactobacillus* cinsi arasında ise orta düzeyde ve negatif yönlü korelasyon olduğu belirlenmiştir ($p<0.05$). Bu çalışmayla ilk defa birlikte kullanılan *Lacticaseibacillus casei* ATCC 393 suşu ve d-tagatozun kolesterol düşürücü etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Sinbiyotik uygulamasının hepatositlerde lipit birikimiyle inflamasyonu azalttığı ve buna ek olarak bağırsak mikrobiyota örüntüsündeki disbiyozis tablosunu düzelttiği görülmüştür. Tüm bu sonuçlar hiperkolesterolemi tedavisinde değerlendirildiğinde; *Lacticaseibacillus casei* ATCC 393 suşu ile d-tagatozun sinbiyotik olarak kullanımının alternatif terapötik ajan potansiyeli taşıdığı ortaya çıkmıştır.

Anahtar Kelimeler: Bağırsak Mikrobiyotası; D-tagatoz; Hiperkolesterolemi; Probiyotik; Sinbiyotik.



**EFFECT OF SYNBIOTIC ADMINISTRATION OF PROBIOTIC AND
D-TAGATOSE IN HYPERCHOLESTEROLEMIC MICE ON
METABOLIC PARAMETERS AND GUT MICROBIOTA**

Mehmet CAVDAR

Erciyes University Institute of Health Sciences

Department of Nutrition and Dietetics Ph.D. Thesis, May 2023

First Supervisor: Prof. Dr. Nalan Hakime NOGAY

Second Supervisor: Asst. Prof. Emine DİNÇER

ABSTRACT

In the treatment of hypercholesterolemia, the search for alternative therapeutic agents that do not have side effects and cost less compared to pharmacological agents continues intensively. In recent years, synbiotic administrations, in which probiotic bacteria and prebiotics are used together, have come to the fore as potential biotherapeutics with cholesterol-lowering effects. The current study aims to investigate the effects of *Lacticaseibacillus casei* ATCC 393 and d-tagatose on serum lipid and cholesterol parameters and gut microbiota pattern, which was used as a synbiotic for the first time in mice with hypercholesterolemia. Hypercholesterolemia in mice was induced by feeding a high-fat and high-cholesterol (HFHC) diet. Mice were divided into negative and positive control (hypercholesterolemic control) groups without any administration, and five groups in total with probiotic, prebiotic, and synbiotic administrations. In the last four weeks of the twelve-week working period; probiotic, prebiotic, and synbiotic administrations were carried out. As a result of histological analysis of liver tissue sections, it was observed that microvesicular steatosis and IL-6 immunoreactivation scores showed a significant decrease only in the synbiotic group ($p<0.05$). Serum ALB, ALT, AST, and VLDL-C levels did not change in probiotic, prebiotic, and synbiotic administrations ($p>0.05$); it was determined that serum TC level decreased significantly only in the synbiotic administration group ($p<0.05$). In addition, it was determined that serum HDL-C levels decreased significantly in prebiotic and synbiotic-administered groups, and serum TG levels decreased significantly in only the prebiotic-administered group ($p<0.05$). As a result of the analysis of feces samples, it was found that the administration did not cause a significant increase in the total diversity and richness of bacterial species ($p>0.05$), but it regulated the gut microbiota pattern by changing the levels of some taxonomic components. It was shown that the amount of Pseudomonadota phylum and Desulfovibrionaceae family containing endotoxin-secreting bacteria in the synbiotic group decreased significantly ($p<0.05$). In addition to this, it was determined that *Oscillospira*, which is known to increase in the gut microbiota in the hypercholesterolemia table in the synbiotic group, and the pathogenic *Clostridium* genus decreased ($p<0.05$). On the other hand, it was found that the amount of *Coprococcus* genus, which plays an important role in the fermentation

of short chain fatty acids (SCFA), increased significantly as a result of synbiotic consumption ($p<0.05$). It was determined that there was a moderate and positive correlation between serum TC levels and the *Streptococcus* genus and a moderate and negative correlation between the *Lactobacillus* genus ($p<0.05$). In this study, *Lacticaseibacillus casei* ATCC 393 strain and d-tagatose, which were used together for the first time, were shown to have cholesterol-lowering effects. It has been observed that the administration of synbiotics reduces lipid accumulation and inflammation in hepatocytes and improves the dysbiosis in the gut microbiota pattern. When all these results were evaluated, it was revealed that the use of *Lacticaseibacillus casei* ATCC 393 strain and d-tagatose as a synbiotic in the treatment of hypercholesterolemia has the potential to be an alternative therapeutic agent.

Keywords: Gut Microbiota; D-tagatose; Hypercholesterolemia; Probiotic; Synbiotic.



İÇİNDEKİLER

İÇ KAPAK.....	
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK.....	i
YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI.....	ii
KABUL ve ONAY SAYFASI.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
ÖZET.....	v
ABSTRACT.....	vii
İÇİNDEKİLER	ix
KISALTMALAR ve SİMGELER	xiii
TABLolar LİSTESİ.....	xix
ŞEKİLLER LİSTESİ	xx
1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Kardiyovasküler Hastalıklar Tanımı	4
2.2. Kardiyovasküler Hastalıklar Epidemiyolojisi	4
2.3. Kardiyovasküler Hastalıklar Etiyolojisi	5
2.4. Kolesterol Tanımı.....	6
2.5. Kolesterol Metabolizmasına Ait Metabolik Parametreler.....	6
2.5.1. Şilomikronlar	6
2.5.2. Çok Düşük Dansiteli Lipoprotein Kolesterol	7
2.5.3. Düşük Dansiteli Lipoprotein Kolesterol.....	7
2.5.4. Yüksek Dansiteli Lipoprotein Kolesterol.....	8
2.5.5. Trigliserit (TG)	9
2.6. Hiperkolesterolemi Tanımı	9
2.6.1. Hiperkolesterolemi Tablosunda Metabolik Parametrelere Ait Eşik Değerler	10
2.7. Ateroskleroz Tanımı.....	13
2.7.1. Ateroskleroz Fizyopatolojisi	13
2.7.1.1. Endotel disfonksiyonu	14
2.7.1.2. LDL oksidasyonu ve immün hücre birikimi.....	15

2.7.1.3. Lökosit akümülayonu.....	16
2.7.1.4. İntraselüler lipit birikimi ve köpük hücresi oluşumu.....	16
2.7.1.5. Aterosklerotik lezyon oluşumu.....	16
2.8. Probiyotiklerin Tanımı ve Uygulamasının Metabolizma Üzerine Etkileri.....	19
2.8.1. Probiyotik Uygulamasının Kolesterol Metabolizması Üzerine Etkileri	21
2.8.2. Probiyotiklerin Hipokolesterolemik Etkilerinin Mekanizması	23
2.8.2.1. BSH Enzim Aktivitesi	23
2.8.2.2. Sekonder Safra Asitleri Aracılığıyla Kolesterolün Çökeltilmesi.....	25
2.8.2.3. Kolesterolün Hücre Duvarına Bağlanması	27
2.8.2.4. Kolesterolün Hücre Membranının Yapısına Dahil Edilmesi	27
2.8.2.5. Kolesterolün Asimilasyonu	28
2.8.2.6. Kolesterolün Katabolizasyonu.....	29
2.8.2.7. Prebiyotiklerin Fermantasyonu Sonucu Oluşan Kısa Zincirli Yağ Asitleri.....	29
2.9. Prebiyotik Tanımı.....	30
2.9.1. Prebiyotik Uygulamasının Kolesterol Metabolizması Üzerine Etkileri	30
2.9.2. Prebiyotiklerin Hipokolesterolemik Etkilerinin Mekanizması.....	31
2.10. Sinbiyotik Tanımı.....	33
2.10.1. Sinbiyotik Uygulamasının Kolesterol Metabolizması Üzerine Etkileri	34
2.10.2. Sinbiyotiklerin Hipokolesterolemik Etkilerinin Mekanizması.....	34
2.11. 1. D-tagatozun Tarihçesi	35
2.11.2. D-tagatozun Tanımı, Özellikleri, Metabolizması ve Kullanım Güvenilirliği	38
2.11.3. Yeni Nesil Bir Tatlandırıcı Olarak D-tagatoz	43
2.11.4. D-tagatoz ve Kolesterol Metabolizması İlişkisi	45

2.11.5. Prebiyotik kaynağı olarak D-tagatoz	46
2.12. Bağırsak Mikrobiyotası Tanımı	47
2.12.1. Bağırsak Mikrobiyota Örüntüsü ile Kolesterol Metabolizması Arasındaki İlişki.....	48
3. GEREÇ VE YÖNTEM	50
3.1 Deney Hayvanları.....	50
3.1.1 Deney Hayvanlarının Bakımı	50
3.1.2. Deney Hayvanlarının Gruplandırılması, Uygulama Süreci ve Beslenmesi.....	51
3.1.2.1 Probiyotik Bakteri, Besiyerleri ve Liyofilizasyon İşlemi.....	57
3.1.3. Yem Tüketimi, Vücut Ağırlıkları ve Yem Etkinlik Oranının Saptanması.....	60
3.1.4. Feçes Örneklerinin Toplanması ve Muhafazası	63
3.1.5. Sakrifikasyon İşlemi ve Doku Örneklerinin Alınması	66
3.1.6. Kan Alma İşlemi.....	67
3.1.7. Biyokimyasal Analizler	68
3.1.8. Histolojik Prosedürler.....	70
3.1.8.1. HE Boyama Prosedürü	71
3.1.8.2. PAS Boyama Prosedürü	72
3.1.8.3. İmmünohistokimya Prosedürü.....	72
3.1.9. Bakteriyel DNA İzolasyon İşlemi	73
3.1.10. Feçes Örneklerinin NGS ile Gerçekleştirilen Bağırsak Mikrobiyota Analizi	75
3.1.10.1. DNA Konsantrasyonunun Ölçümü.....	76
3.1.10.2. PCR ve Sekanslama İşlemine Hazırlık.....	77
3.1.10.3. 16S Amplikon Sekanslaması, Kütüphane Miktar Tayini, Normalizasyonu ve Birleştirilmesi.....	79
3.1.10.4. Örneklerin Yeni Nesil Dizileme Yöntemiyle Okunması.....	79
3.1.10.5. Yeni Nesil Dizileme İşleminde Kullanılan Biyoinformatik Analizler.....	80
3.2. İstatistiksel Değerlendirme.....	81

3.3. Araştırmanın Sınırlılıkları	81
4. BULGULAR	83
4.1. Vücut Ağırlığı, Yem Tüketimi ve Yem Etkinlik Oranına Ait Bulgular.....	83
4.2. Biyokimyasal Bulgular.....	90
4.3. Histolojik Analiz Bulguları	95
4.3.1. Hepatosit Dejenerasyonu, Mikroveziküler Steatozis ve İnflamatuvar Hücre İnfiltrasyonuna Ait Histolojik Analiz Bulguları	95
4.3.2. Karaciğer Dokusuna Ait IL-6 İmmünoreaktivitesi Bulguları	97
4.4. Bağırsak Mikrobiyotasına İlişkin Bulgular	99
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	119
5.1. Vücut ağırlığı, yem tüketimi, yem etkinlik oranı ve karaciğer ağırlığına ilişkin bulguların değerlendirilmesi	121
5.2. Biyokimyasal bulgulara ilişkin analizlerin değerlendirilmesi.....	122
5.3. Histolojik analizlere ilişkin bulguların değerlendirilmesi	141
5.4. Bağırsak mikrobiyotasına ilişkin bulguların değerlendirilmesi	143
6. KAYNAKLAR	155
EKLER	
ÖZGEÇMİŞ	

KISALTMALAR ve SİMGELER

ACE	: Anjiyotensin dönüştürücü enzim
ALB	: Albümin
ALP	: Alkalen fosfataz
ALT	: Alanin aminotransferaz
Apo	: Apolipoprotein
Apo-AI	: Apolipoprotein – AI
Apo-AII	: Apolipoprotein – AII
Apo-AIV	: Apolipoprotein – AIV
Apo-B100	: Apolipoprotein – B100
Apo-B48	: Apolipoprotein – B48
Apo-C	: Apolipoprotein – C
Apo-E	: Apolipoprotein – E
AST	: Aspartat aminotransferaz
ASV	: Amplikon sekans varyant
ATCC	: Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu
BOH	: Bulaşıcı olmayan hastalık
bp	: Baz çifti
BSH	: Safra tuzu hidrolaz
CE	: Kolesterol ester
DAB	: Diaminbenzidin
DHAP	: Dihidroksiaseton fosfat

dk	: Dakika
DI	: Desilitre
DVT	: Derin ven trombozu
EAS	: Avrupa Ateroskleroz Derneği
EFSA	: Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi
ELISA	: Enzim bağlı immünosorbent testi
EPS	: Ekzopolisakkarit
ESC	: Avrupa Kardiyoloji Cemiyeti
ET	: Endotelin
FAO	: Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü
FDA	: Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi
FGF	: Fibroblast büyüme faktörü
FOS	: Fruktooligosakkarit
g	: Gram
GA	: Gliseraldehit
GGT	: Gama glutamil transferaz
GİS	: Gastrointestinal sistem
GOS	: Galaktooligosakkarit
GRAS	: Genel olarak tüketimi güvenli kabul edilen
HDL	: Yüksek dansiteli lipoprotein
HDL-K	: Yüksek dansiteli lipoprotein kolesterol
HE	: Hematoksilen eozin

HOMA-IR	: İnsülin reseptörünün homeostatik model değerlendirmesi
HRP	: Horseradish peroksidaz
HT	: Hipertansiyon
IFN- γ	: İnterferon gama
IL-1 β	: İnterlökin-1 beta
IL-6	: İnterlökin-6
ICSP	: Uluslararası Prokaryotlar Sistematigi Komitesi
ISAPP	: Uluslararası Probiyotikler ve Prebiyotikler Derneği
i.p.	: İntraperitoneal
İBH	: İnflamatuvar bağırsak hastalıkları
kg:	Kilogram
kcal	: Kilokalori
KKH	: Koroner kalp hastalıkları
kob	: Koloni oluşturan bakteri
KVH	: Kardiyovasküler hastalıklar
KY	: Kalp yetmezliği
KZYA	: Kısa zincirli yağ asitleri
LAB	: Laktik asit bakterileri
LCAT	: Lesitin kolesterol açıl transferaz
LDL	: Düşük dansiteli lipoprotein
LDL-K	: Düşük dansiteli lipoprotein kolesterol
LDLR	: Düşük dansiteli lipoprotein reseptörü

LPL	: Lipoprotein lipaz
LPS	: Lipopolisakkarit
MCP-1	: Monosit kemotaktik protein-1
MetS	: Metabolik sendrom
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
MMP	: Matriks metalloproteinaz
MRS	: de Man, Rogosa, Sharp
MSS	: Merkezi sinir sistemi
NAFLD	: Alkolik olmayan yağlı karaciğer hastalığı
NASA	: Ulusal Havacılık ve Uzay Dairesi
NCEP – ATP	: Ulusal Kolesterol Eğitim Programı – Erişkin Tedavi Paneli
NGS	: Yeni nesil sekanslama
NHLBI	: Amerikan Ulusal Kalp Akciğer ve Kan Enstitüsü
NHS	: Birleşik Krallık Ulusal Sağlık Sistemi
nm	: Nanometre
NO	: Nitrik oksit
NRC	: Amerikan Ulusal Araştırma Konseyi
OTU	: Operasyonel taksonomik birim
PAS	: Periyodik asit schiff
PBS	: Fosfat tampon çözeltisi
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu

PDGF	: Platelet kaynaklı büyüme faktörü
PGI2	: Prostatiklin
PKOS	: Polikistik over sendromu
RKÇ	: Randomize kontrollü çalışma
ROS	: Reaktif oksijen türleri
rpm	: Dakikadaki devir sayısı
SCORE	: Sistematik Koroner Risk Tahmini
sn	: Saniye
SVH	: Serbrovasküler hastalıklar
SYA	: Serbest yağ asitleri
T2DM	: Tip 2 diyabet
TCSB	: Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı
TEKHARF	: Türk Erişkinlerinde Kalp Hastalığı ve Risk Faktörleri
TEMĐ	: Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Derneği
TG	: Trigiserit
THSA	: Türkiye Hanehalkı Sağlık Araştırması
THSK	: Türkiye Halk Sağlığı Kurumu
TİKA	: Transintestinal kolesterol atımı
TK	: Total kolesterol
TNF- α	: Tümör nekrozis faktör - alfa
TÜİK	: Türkiye İstatistik Kurumu
v.a.	: Vücut ağırlığı

VCAM-1	: Vasküler hücre adezyon molekülü-1
VCAM-2	: Vasküler hücre adezyon molekülü-2
VLDL	: Çok düşük dansiteli lipoprotein
VLDL-K	: Çok düşük dansiteli lipoprotein kolesterol
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
XOS	: Ksilooligosakkarit
YFMS	: Yüksek fruktozlu mısır şurubu



TABLÖLER LİSTESİ

Tablo 2.1.	NCEP – ATP III kılavuzuna göre lipit ve kolesterol metabolizmasına ait bazı değerlerin eşik değerleri.....	11
Tablo 2.2.	ESC/EAS Dislipidemi Tedavisi ve Yönetimi Kılavuzu: LDL-K Eşik Değerleri (2019).....	12
Tablo 2.3.	TEMD Dislipidemi Tanı ve Tedavi Kılavuzu: Lipit ve Kolesterol Parametrelerine Ait Eşik Değerler (2021)	13
Tablo 2.4.	D-tagatozun bir tatlandırıcı olarak sahip olduğu bazı fiziksel, kimyasal ve biyolojik özellikleri.....	39
Tablo 2.5.	Doğal besinlerin D-tagatoz içerikleri.....	39
Tablo 3.1.	D-tagatoza adaptasyon sürecinin günlere göre dozlama şekli	57
Tablo 4.1	Çalışma periyodu boyunca deney hayvanlarına ait ortalama vücut ağırlığı değerlerinin grup içi ve gruplar arası karşılaştırılması.....	85
Tablo 4.2.	Çalışma periyodu haftalarındaki günlük ortalama yem tüketimi değerlerinin grup içi ve gruplar arası karşılaştırılması	88
Tablo 4.3	Gruplara ait farelerin karaciğer ağırlığı, vücut ağırlık artışı, toplam tüketilen yem miktarı ve yem etkinlik oranlarının karşılaştırılması	91
Tablo 4.4	Deney hayvanlarına ait biyokimyasal parametre değerlerinin gruplar arası karşılaştırılması	92
Tablo 4.5.	Karaciğer doku kesitlerine ait skorelama sonuçları.....	96
Tablo 4.6.	Grupların karaciğer dokusu kesitlerine ait IL-6 immunoreaktivitesi sonuçları.....	99
Tablo 4.7.	Permütasyonel çok değişkenli varyans analizi (ADONIS) sonuçları	106
Tablo 4.8.	Grupların çoklu permütasyon testi (MRPP) karşılaştırma sonuçları	106
Tablo 4.9.	Farelerin bağırsak mikrobiyotalarındaki baskın taksonomik ünitelere ait bolluk yüzdelerinin* Kruskal-Wallis testiyle hesaplanması	112
Tablo 4.10.	Farelerin bağırsak mikrobiyotalarındaki baskın taksonomik ünitelere ait bolluk yüzdelerinin* One Way Anova testi ile hesaplanması.....	114
Tablo 4.11.	Serum kolesterol ve lipit parametreleriyle bakteri cinsleri arasındaki ilişkinin Spearman korelasyon testiyle incelendiği ısı haritası	118

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 3.1.	Gruplara ayrıldıktan sonra tekli kafeslerde kalan deney hayvanları.....	52
Şekil 3.2.	Yem çeşitlerinde bulunan makro ve mikro besin ögesi içerikleri ile yüzdeleri.....	55
Şekil 3.3.	Çalışma şeması.....	56
Şekil 3.4.	Probiyotik suşun farelere orogastrik olarak uygulanması.....	58
Şekil 3.5.	Probiyotik suşun sıvı besiyerinde çoğaltılması işlemi hazırlık aşamaları.....	60
Şekil 3.6.	Liyofilize kültürle uygulanan canlı hücre sayımı.....	61
Şekil 3.7.	Probiyotik suşun sıvı besiyerinde çoğaltılması (a) ve liyofilizasyon (b) işlemi	62
Şekil 3.8.	YYYK yemlerin tüketime hazırlanması (a) ve farelerin tartımı (b) işlemleri.....	63
Şekil 3.9.	Feçes örneği alma işleminden önceki genel hazırlık durumu	65
Şekil 3.10.	Feçes örneklerinin alındığı steril gaita kapları (a) ve steril eppendorf tüpleri (b).....	66
Şekil 3.11.	Kardiyak kan alma işlemi.....	68
Şekil 3.12.	Biyokimyasal analizlerin gerçekleştirildiği Cobas C-702 cihazı	70
Şekil 3.13.	Karaciğer dokusu çıkarılması işleminin öncesi (a) ve sonrası (b)	70
Şekil 3.14.	Lizat hazırlık işlemindeki bead tüplerin yatay vorteksleme işlemi	74
Şekil 4.1	Chao1 indeks kutu grafiği.....	100
Şekil 4.2.	Shannon Diversity indeks kutu grafiği.	101
Şekil 4.3.	Inverse-Simpson Diversity indeks kutu grafiği.	102
Şekil 4.4.	Bray-Curtis benzeşmezlik indeksine ait Stress Plot (a) ve NMDS (b) grafikleri.....	104
Şekil 4.5	Ağırlıklı Unifrac mesafesine ait Stress Plot (a) ve NMDS (b) grafikleri.....	105

Şekil 4.6.	Grupların filum düzeyinde bolluk derecelerini gösteren Taksonomik Sütun Grafiği (Taxa Bar Plot).....	108
Şekil 4.7.	Grupların cins düzeyinde bolluk derecelerini gösteren Taksonomik Sütun Grafiği (Taxa Bar Plot).....	109
Resim 4.1	Tüm gruplara ait karaciğer dokularının HE ile boyama işlemi.....	98
Resim 4.2	Tüm gruplara ait karaciğer dokularının PAS ile boyama işlemi.....	98
Resim 4.3	Grupların karaciğer doku kesitleri IL-6 immunoreaktivitesi sonuçları.....	99



1. GİRİŞ VE AMAÇ

Günümüzde mortalite ile morbiditeye yol açıp aynı zamanda yaşam kalitesini olumsuz etkileyen ve sağlık sistemi üzerinde ciddi bir ekonomik yük oluşturan halk sağlığı sorunlarının başında bulaşıcı olmayan hastalıklar (BOH) gelmektedir. Kardiyovasküler hastalıklar (KVH) ise hem küresel ölçekte hem de Türkiye’de prevalansı en yüksek olan BOH alt türüdür. Türkiye Bulaşıcı Olmayan Hastalıklar ve Risk Faktörleri Kohort Çalışması’nda 2012 – 2017 yılları arasında kümülatif koroner kalp hastalığı (KKH) insidansının yüzbinde 5547 olduğu belirtilmiştir (TCSB, 2021). KVH’ın oluşumunda ise damar lümenlerinin daralmasıyla karakterize aterosklerozun etkin rol oynadığı bilinmektedir. Ateroskleroz oluşumundaki en önemli etiyolojik faktör, lipit ve kolesterol parametrelerinin fizyolojik aralık düzeylerini olumsuz yönde değiştiren hiperkolesterolemi tablosudur (THSK, 2015). Türkiye Hanehalkı Sağlık Araştırması “Bulaşıcı Olmayan Hastalıkların Risk Faktörleri Prevalansı, 2017 (STEPS)” çalışmasında ise serum total kolesterol (TK) düzeyi yüksek olan hiperkolesterolemik bireylerin (≥ 190 mg/dl) her iki cinsiyetteki toplam birey sayısının %24.7’ sine denk geldiği belirlenmiştir (THSA, 2017).

Hiperkolesterolemi tablosuna obezite, tip 2 diyabet (T2DM), dislipidemi, metabolik sendrom (MetS) ve alkolik olmayan yağlı karaciğer hastalığı (NAFLD) gibi rahatsızlıklarda da rastlanmaktadır. Vücutta görülen birçok hastalığın ortaya çıkmasında kritik rol oynayan hiperkolesteroleminin etkin ve güvenilir bir şekilde tedavisi gerekmektedir. Klinikte hiperkolesterolemi tedavisinde rutin olarak statin grubu adı verilen farmakolojik ajanlar kullanılmaktadır. Ancak KVH tedavisindeki bu ilaçların kronik kullanımlarına bağlı olarak ciddi yan etkilerle ve

önemli tedavi maliyetleriyle karşılaşmaktadır. Bu yüzden hiperkolesterolemi tedavisinde ilaç tedavisi yerine kullanılacak alternatif terapötik ajanlar yoğun bir şekilde araştırılmaktadır. Son yıllarda konu hakkında gerçekleştirilen araştırmalarda ise organizmaya belirli bir miktarda alındığında metabolizmayı olumlu yönde etkileyen probiyotikler, probiyotikler tarafından fermentasyona uğratılan prebiyotikler ve ikisinin bir arada kullanıldığı sinbiyotikler potansiyel terapötik ajanlar olarak ön plana çıkmıştır (Anandharaj ve ark., 2020).

Probiyotik bakteriler, safra tuzu hidrolaz (BSH) aktivitesi sayesinde sekonder safra asitlerini oluşturması, kolesterolü hücre membran yapısına dahil edebilmesi ve ortamda bulunan kolesterolü asimile edebilmesi gibi metabolik faaliyetler aracılığıyla kolesterol düşürücü etki gösterebilmektedir (Kumar ve ark., 2022). Prebiyotikler ise genellikle probiyotikler tarafından fermentasyona uğratılmaları sonucu açığa çıkan asetat, bütirat ve propiyonat gibi KZYA bileşenleri aracılığıyla probiyotiklerin gelişimine katkı sunarak hipokolesterolemik etki oluşturabilmektedir (Ooi ve Liong, 2010). Sinbiyotik konseptiyle ise probiyotik ve prebiyotiklerin sahip oldukları hipokolesterolemik etkilerin sinerjistik olarak güçlendirilmesi hedeflenmektedir (Olas, 2020).

Literatürdeki çeşitli çalışmalarda hiperkolesterolemi tablosunda sinbiyotik uygulaması sonucu serum lipit ve kolesterol parametrelerinin düzeldiği, karaciğerdeki lipit birikiminin azaldığı ve bağırsak mikrobiyotasında görülen disbiyozis tablosunun iyileştiği görülmüştür. Ancak hiperkolesterolemi tedavisinde alternatif tedavi metodu olarak araştırılan sinbiyotik ürünler; içerdiği probiyotik suş ve prebiyotik kaynağının miktarına, uygulama dozuna ve uygulama süresine bağlı olarak farklı düzeylerde etkinlik gösterebilmektedir (Pandey ve ark., 2015). Bu çalışmada kullanılan sinbiyotik formun hipokolesterolemik etkisinin daha önce araştırılmadığı tespit edilmiş ve bu etkinin belirlenmesinin hiperkolesterolemi tedavisinde alternatif biyoterapötikler arayışında önemli bir boşluğu dolduracağı düşünülmüştür.

Mevcut çalışmanın amacı hiperkolesterolemi tablosunda; ilk defa sinbiyotik olarak bir arada kullanılan *Lactocaseibacillus casei* ATCC 393 suşu ile d-tagatozun sinbiyotik olarak kullanılması sonucu oluşan metabolik etkileri ve

bağırsak mikrobiyota örüntüsü üzerinde görülen değişiklikleri ayrıntılı olarak araştırmaktır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kardiyovasküler Hastalıklar Tanımı

Kalpte veya periferde bulunan damarlarda meydana gelen hasarlanmalar ya da fonksiyonel işlev bozuklukları, KVH olarak adlandırılmaktadır. Klinikte KKH, romatizmal kalp hastalıkları, serebrovasküler hastalıklar (SVH), hipertansiyon (HT), konjenital kalp rahatsızlıkları, kalp yetmezlikleri (KY), pulmoner emboli ve derin ven trombozu (DVT) gibi vasküler kökenli hastalıklar, KVH tablosu altında sınıflandırılmaktadır (Özkan ve ark., 2019).

2.2. Kardiyovasküler Hastalıklar Epidemiyolojisi

Dünya Sağlık Örgütü (WHO), 2000-2019 yılları arasını kapsayan süreci özetleyen “Küresel Sağlık Beklentileri” adlı raporunda tüm dünyada mortalitenin birincil sebebinin KVH olduğunu belirtmiştir (WHO, 2020). Global verilere paralel biçimde ülkemizde de ölüm nedenleri arasında KVH ilk sırada yer almaktadır. Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK), 2018 ve 2019 yıllarında açıkladığı raporlarda KVH kaynaklı ölümlerin tüm ölüm vakaları içindeki oranını sırasıyla %37.8 ve %36.8 olarak açıklamıştır (TÜİK, 2020). Ülkemizde KVH sıklığını belirlemek için yapılan en önemli ve güncel bilimsel çalışma ise “Türk Erişkinlerinde Kalp Hastalığı ve Risk Faktörleri (TEKHARF)” adı ile 2017 yılında yayınlanmıştır. Bu çalışmada, 45-74 yaş arası koroner mortalite oranının erkeklerde binde 7.3, kadınlarda ise 3.8 olduğu saptanmıştır. Bu araştırmanın en dikkat çekici ulgularından birisi de söz konusu yaş grubu içinde tüm Avrupa ülkeleri arasında en yüksek koroner mortalite oranına ülkemizin sahip olduğunun belirtilmesidir. Her ne kadar ülkemizin giderek yaşlanan bir nüfusa sahip olduğu bilinse de Avrupa ülkeleri gibi yaşlı nüfus oranının yüksek olduğu toplumlara kıyasla

ülkemiz nüfusunun henüz nispeten genç olduğu kabul edilmektedir. Nüfus yaş ortalamasındaki bu anlamlı farklılığa rağmen koroner mortalite oranlarımızın şimdiden Avrupa ülkelerini geçmiş olması, toplum sağlığımız açısından gelecek için oldukça endişe verici bir unsur olarak görülmektedir (Onat ve Can, 2017).

2.3. Kardiyovasküler Hastalıklar Etiyolojisi

Kardiyovasküler hastalıkların etiyolojik faktörleri nitelikleri bakımından “değiştirilebilir” ve “değiştirilebilir olmayan” şeklinde iki farklı kategoriye ayrılmaktadır. Genellikle yaş, cinsiyet ve aile bireylerinde görülen KVH öyküsü gibi değiştirilebilir olmayan risk faktörlerine tıbbi müdahale imkanı bulunmamaktadır. Ancak yaşam tarzında oluşturulan bazı değişikliklerle kontrol altına alınabilen obezite gibi durumlarla yaşam tarzı değişikliklerine ilaveten farmakolojik ajan kullanmayı da gerektirebilen hiperlipidemi, HT, T2DM, insülin direnci ve hiperkolesterolemi gibi değiştirilebilir risk faktörlerine medikal olarak müdahale etme şansı bulunmaktadır. Özellikle de KVH oluşumunda temel rol oynayan “ateroskleroz” tablosu ile değiştirilebilir risk faktörlerinden olan “hiperkolesterolemi” yakından ilişkilidir (NHS, 2022). Son yüzyıl içinde beslenme alışkanlıkları tüm dünyada hızlı bir dönüşüm geçirmiş ve insanlar yüksek doymuş yağ, yüksek enerji, yüksek kolesterol, yüksek protein ve düşük posa içeren batı tarzı diyetlerle daha yaygın bir şekilde beslenmeye başlamışlardır. Ayrıca hızla gelişen teknolojiye bağlı olarak insan hayatında fiziksel güç kullanımı azalmış ve insan hayatındaki fiziksel aktivite düzeyleri düşmeye başlamıştır. Beslenme alışkanlıkları ve fiziksel aktivite düzeyindeki değişiklikler, toplumda hiperkolesterolemi görülme sıklığını artırmıştır. Literatürde yapılan çalışmalarda ise hiperkolesterolemi ile KVH görülme sıklığı arasındaki ilişki çeşitli kolesterol parametreleri açısından ispatlanmış durumdadır. Bu sebeple tüm KVH izlem ve tedavi rehberlerinde hiperkolesterolemi temel bir risk faktörü olarak kabul edilmektedir (THSK, 2015).

2.4. Kolesterol Tanımı

Kolesterol, hayvan hücrelerinde bulunan ve hücre içi homeostazın sağlanmasında temel bileşen olan hücre zarının yapısına katılan hidrofobik bir lipit molekülüdür. Vücutta çeşitli metabolik fonksiyonların sürdürülmesinde görevli östrojen ile

androjen gibi steroid hormonlar ve safra asitlerinin sentezinde prekürsör olarak yer almaktadır. Hidrofobik bir yapıya sahip olan kolesterol molekülünün taşınabilmesi için çeşitli lipoproteinlerin aracılık ettiği paketleme işlemine ihtiyaç duyulmaktadır. Lipoproteinler, yapısal olarak merkezde bulunan bir çekirdek ve bu çekirdeği çevreleyen dış katmandan oluşmaktadır. Çekirdekte kolesteril ester (CE) ve trigliseritler (TG) gibi oldukça hidrofobik yapılar yer almakta; dış katmanda ise lipoprotein türüne göre farklılık gösterecek şekilde spesifik apolipoproteinler (Apo), fosfolipitler ve serbest kolesteroller gibi daha polar yapıdaki lipit molekülleri bulunmaktadır. Apolipoproteinler, lipoprotein kompleksinin hangi reseptör ya da enzimle etkileşime gireceğini belirleyen anahtar bileşenlerdir. Lipoproteinler sahip oldukları moleküler yoğunluklarına göre şilomikronlar, çok düşük dansiteli lipoproteinler (VLDL), düşük dansiteli lipoproteinler (LDL) ve yüksek dansiteli lipoproteinler (HDL) gibi alt birimlere ayrılmaktadır. Söz konusu lipoprotein tipleriyle taşınan kolesterol molekülleri ise sırasıyla çok düşük dansiteli lipoprotein kolesterol (VLDL-K), düşük dansiteli lipoprotein kolesterol (LDL-K), yüksek dansiteli lipoprotein kolesterol (HDL-K) olarak adlandırılmaktadır (Visseren ve ark., 2021).

2.5. Kolesterol Metabolizmasına Ait Metabolik Parametreler

2.5.1. Şilomikronlar

Postprandiyal dönemde ince bağırsaklarda oluşan en büyük hacimli plazma lipoprotein türü şilomikronlardır. Bu lipoprotein türünün temel görevi ekzojen yapıdaki lipitlerin ince bağırsaklardan hücrelere transferidir. Şilomikronlar yapılarında apolipoprotein-B48 (Apo-B48), apolipoprotein-AI (Apo-AI) ve apolipoprotein-AII (Apo-AII) gibi spesifik lipoproteinleri bulundurmakta olup aynı zamanda %85-90 oranlarında TG içeriğine sahiptir. Diyetle alınan trigliseritler, şilomikronlar aracılığıyla adipoz ve kas dokularına taşınmaktadır. Söz konusu dokularda bulunan lipoprotein lipaz (LPL) enzimi ise buraya taşınan TG moleküllerini parçalamakta ve bu sayede serbest yağ asitleri (SYA) ortaya çıkmaktadır. Ortaya çıkan SYA molekülleri, enerji eldesinde substrat olarak kullanılmaktadır. Lipoprotein lipaz enziminin söz konusu bu aktivitesinden sonra şilomikronlar; TG açısından fakir ancak kolesterol açısından zengin moleküler

kalıntılar haline gelmektedir. Boyutsal olarak oldukça küçülen bu şilomikron kalıntıları karaciğer tarafından kan dolaşımından uzaklaştırılmaktadır (Bayly, 2014).

2.5.2. Çok Düşük Dansiteli Lipoprotein Kolesterol

Çok düşük dansiteli lipoprotein kolesteroller, yapısında apolipoprotein-B100 (Apo-B100) spesifik apolipoproteinini barındıran ve içeriğinde yaklaşık %55 oranında TG molekülü bulunduran lipoprotein türüdür. Söz konusu lipoprotein birincil görevi, vücutta sentezlenen trigliseritin periferdeki dokulara taşınmasıdır. Şilomikronlara benzer şekilde LPL enzimi VLDL molekülüne de etki etmekte ve bu sayede TG molekülleri VLDL yapısından uzaklaştırılmaktadır. Ardından söz konusu bu TG molekülleri, HDL molekülüne aktarılmakta ve bu sırada HDL molekülündeki kolesterol de VLDL yapısına transfer olmaktadır. Bu sayede VLDL molekülünün içerdiği TG miktarı azalmakta ancak kolesterol yoğunluğu ise artmaktadır. Kolesterol yönünden zengin hale gelen VLDL molekülleri, dolaşımdaki LDL molekülünün prekürsörü olarak kabul edilmektedir (Freeman ve Walford, 2016).

2.5.3. Düşük Dansiteli Lipoprotein Kolesterol

İnsanlarda dolaşımda bulunan plazma kolesterollerinin çok önemli bir kısmı (%70), LDL-K tarafından taşınmaktadır. Bu molekülün yapısının neredeyse yarısını kolesterol oluşturmakta ve yüzeyinde protein yapıdaki apo-B100 bileşeni bulunmaktadır. Düşük dansiteli lipoproteinler, büyük oranda hepatik kökenli olan LDL reseptörleri (LDLR) tarafından plazmadan uzaklaştırılmaktadır. Dolaşımda bulunan plazma LDL-K miktarı LDLR sayısını ve dolayısıyla kolesterol homostazını belirleyen önemli faktörlerin başında gelmektedir. Ayrıca LDL partiküllerinin diğer bir görevi de kolesterolü adrenal bezler ve gonadlar gibi ekstrahepatik dokulara taşımaktır. Kolesterolü büyük oranda taşıyan LDL partiküllerinin yarılanma ömürleri, 2-3 gün arasında değişmektedir. Plazmadaki LDL miktarı normal sınırların üzerine çıktığında arter duvarlarındaki endotelial bariyer bu bileşenler tarafından kolaylıkla aşılabilmekte ve bu sayede oksidasyon/agregasyon gibi olumsuz metabolik tablolara duyarlı LDL bileşeni sayısında artış görülmektedir. Ortaya çıkan bu durum, damarın yapısal

bütünlüğünün bozulmasında belirleyici rollerden birisini oynamaktadır. Okside olmuş LDL molekülleri, makrofajlar tarafından tanınmakta ve bu bölgede yüksek miktarda kolesterol birikimi ortaya çıkmaktadır. Kolesterol düzeyinin damar lümeninde artış göstermesi sonucu köpük hücreleri adı verilen damar içi biyolojik tıkaçın öncü formu meydana gelmekte ve bu süreç inflamasyon ve aterosklerozun ilk adımını oluşturmaktadır. Bu yüzden dolaşımdaki LDL-K seviyesi ile KVVH tablosunun en önemli etiyolojik faktörlerinden biri olan ateroskleroz tablosu arasında pozitif yönde bir korelasyon bulunmaktadır. Dolaşımdaki LDL-K düzeylerinin hesaplanmasında ise genellikle serum TG, TK ve HDL-K düzeylerinin yer aldığı bir eşitliği içeren Friedwald formülünden yararlanılmaktadır (Zamora ve Hidalgo, 2016).

2.5.4. Yüksek Dansiteli Lipoprotein Kolesterol

Küçük boyutlu ve yoğun bir içeriğe sahip olan HDL-K partiküllerin yapısında %55 oranında Apo, %25-30 arasında fosfolipit ve %15-20 aralığında kolesterol bulunmaktadır. Dolaşımda bulunan HDL-K moleküllerinin büyük bir çoğunluğu karaciğerde, daha küçük bir kısmı ise ince bağırsaklarda sentezlenmektedir. Periferik dokularda bulunan kolesterolün tekrar karaciğere taşındığı ve “**tersine kolesterol taşınımı**” olarak adlandırılan anti-aterosklerotik yolağın temel unsuru HDL-K adlı bu partiküllerdir. Yapısında apo-AII, apolipoprotein-AIV (apo-AIV), apolipoprotein-C (Apo-C) ve apolipoprotein-E (Apo-E) gibi biyolojik unsurları barındıran HDL-K molekülünde genellikle temel apolipoprotein çeşidi olarak apo-AI yer almakta olup bu moleküllere yakın düzeyde de “lesitin kolesterol açıl transferaz (LCAT)” adlı enzim bulunmaktadır. Kolesterolün dolaşımda taşınabilmesi için genellikle esterleşmiş yapıda olması gerekmektedir. İşte bu noktada LCAT enzimi devreye girmekte ve lesitin (fosfatidil kolin) ile kolesterolden CE moleküllerinin oluşumunu katalizlemektedir. Yüksek dansiteli lipoprotein molekülü sentezlendikten hemen sonra disk şeklinde bir görünüme sahiptir ve yüzeyinde LCAT enzimi bulunmaktadır. Bu enzim sayesinde şilomikron ile VLDL kalıntılarındaki kolesterol ve fosfatidil kolin bileşenleri CE moleküllerine dönüştürülmektedir. Tüm bu işlemlerin ardından HDL-K partikülünün çekirdeği oluşmakta ve başlangıçta disk şeklinde bulunan yapısal form küresel hale dönüşmektedir. Kolesterol açısından zengin olan bu küresel

form daha sonra karaciğere taşınmakta ve HDL-K partiküllerindeki kolesterol burada yapıdan ayrılmakta ve bir kısmı da safra tuzlarına dönüştürülmektedir (Ouimet ve ark., 2019; Rohatgi, 2018).

2.5.5. Trigliserit

Üç adet SYA ile bir gliserol molekülünün esterleşmesi sonucu oluşan lipit bileşenine TG adı verilmektedir. Suda çözünmeyen bir yapıya sahip olmasından ötürü TG molekülünün; kan dolaşımı aracılığıyla dokulara taşınabilmesi için lipoproteinler gibi taşıyıcı proteinlere ihtiyacı bulunmaktadır. Lipoproteinlerin yüzeyinde genellikle serbest kolesterol, proteinler ve fosfolipitler gibi hidrofilik moleküller yer almakta iken çekirdeğinde ise CE ve TG gibi hidrofobik moleküllere rastlanmaktadır. Vücuttaki temel TG taşıyıcıları şilomikronlar ve VLDL molekülüdür. Diyetle alınan TG molekülüleri ince bağırsaklardan kaslar ve adipoz dokular gibi ekstrahepatik dokulara şilomikronlar aracılığıyla taşınmaktadır. Endojen olarak karaciğerde sentezlenen TG ise ekstrahepatik dokulara VLDL partikülleri vasıtasıyla iletilmektedir (Borén ve Taskinen, 2021).

2.6. Hiperkolesterolemi Tanımı

Dolaşımda bulunan TK miktarı temelde iki kaynaktan sağlanmaktadır. Bunlardan birincisi besinlerin içeriğinde bulunan kolesterol iken ikincisi ise vücutta karaciğerde öncü bileşenlerden üretilen kolesterol sentezidir. Genellikle diyet aracılığıyla vücuda alınan kolesterol miktarı, endojen olarak sentezlenen kolesterolün yaklaşık %20 gibi bir oranına karşılık gelmektedir. Vücutta sentezlenen kolesterol ile besinlerin tüketimi yoluyla alınan kolesterol miktarları arasında dinamik bir etkileşim bulunmaktadır. Şayet diyet yoluyla dışarıdan alınan kolesterol miktarında bir düşüş gözlemlenirse; vücutta sentezlenen kolesterol miktarında artış görülmekte ya da diyetle alınan kolesterol miktarı artış gösterdiğinde endojen kolesterol sentezinde düşüş yaşanmaktadır (Kelly, 2010).

Endojen kolesterol, ekzojen kolesterol ve safra ile atılan kolesterol miktarları arasında hassas bir metabolik denge (homeostaz) bulunmaktadır. Söz konusu bu homeostaz durumu, beslenme alışkanlıkları ya da görülen bazı klinik tablolara bağlı olarak (obezite, HT vb.) bozulmakta ve kolesterol parametrelerinde birtakım değişiklikler görülmektedir. Bu değişimler arasında en önemlisi ise vasküler

sağlığı olumsuz yönde etkileme potansiyeli oldukça yüksek olan hiperkolesterolemi tablosudur. Hiperkolesterolemi, serum TK, VLDL-K ve LDL-K gibi metabolik parametrelerde artışın öte yandan HDL-K değerlerinde ise düşüşün görüldüğü tabloya verilen isimdir. Bununla birlikte hiperkolesterolemi tablosu varlığında; dolaşımda bulunan esterleşmemiş yapıdaki kolesterol miktarı (serbest kolesterol) artış göstermektedir. Dolaşımda artan serbest kolesterol miktarları ise mortalitenin başlıca sebepleri arasında yer alan ve KVH oluşumunda temel rol oynayan “ateroskleroz” tablosunun ortaya çıkmasındaki başlıca faktörlerdendir (Bhatnagar ve ark., 2008).

2.6.1. Hiperkolesterolemi Tablosunda Metabolik Parametrelere Ait Eşik Değerler

Hiperkolesteroleminin KVH oluşumunda en önemli etiyolojik faktörlerden birisi olduğu çeşitli çalışmalarla ispatlanan ve bilim insanları tarafından konsensüs halinde kabul edilen medikal bir olgudur. Bu yüzden global ölçekte KVH yönetiminde otorite olarak görülen bazı kurum ve kuruluşların yayınladıkları tanı ve tedavi rehberlerinde hiperkolesterolemi tablosunu yansıtan kolesterol metabolizması parametrelerine ait eşik değerler belirlenmiştir (Bhatnagar ve ark., 2008). Bu eşik değerler arasında en önemlisi ve küresel çapta en çok bilineni ise Amerikan Ulusal Kalp Akciğer ve Kan Enstitüsü (NHLBI)’ ne bağlı bir uzman paneli tarafından oluşturulan Ulusal Kolesterol Eğitim Programı – Erişkin Tedavi Paneli III (NCEP - ATP III) kılavuzu içeriğinde yer almaktadır. Söz konusu NCEP – ATP III kılavuzuna ait eşik değerler Tablo 2.1’ de özetlenmiştir (NCEP, 2002). KVH yönetimi ve tedavisinde kolesterol parametrelerinin eşik değerlerini belirleyen diğer önemli kuruluşlar arasında ise Avrupa Kardiyoloji Cemiyeti (ESC) ve Avrupa Ateroskleroz Derneği (EAS) bulunmaktadır. Bu iki önemli otorite kuruluş, kardiyoloji alanında uzman bilim insanlarından oluşan “Dislipidemilerin Tedavisi Görev Grubu” adlı bir ekip oluşturmuş ve dislipidemilerin tedavisine ilişkin güncel bir kılavuz yayınlamışlardır. Bu kılavuzda bireylerin KVH riski açısından değerlendirilmesinde başlıca iki faktör; “Sistematik Koroner Risk Tahmini (SCORE)” adı verilen tablo ve serum LDL-K düzeyleri olarak görülmektedir. Bireyler medikal durumlarını yansıtan özellikler bakımından SCORE adlı tabloda düşük riskli, orta riskli, yüksek riskli ve çok

yüksek riskli olarak kategorize edilmişlerdir. Yakın geçmişte ESC/EAS tarafından yayınlanan dislipidemi tedavisi ve yönetimi kılavuzunda kolesterol parametrelerine ait eşik değerler Tablo 2.2’ de belirtilmiştir (Mach ve ark., 2020).

Tablo 2.1. NCEP – ATP III kılavuzuna göre lipit ve kolesterol metabolizmasına ait bazı değerlerin eşik değerleri

	Serum Konsantrasyon Değerleri	Sınıflandırma
LDL-K	<100 mg/dl	Normal
	100 – 129 mg/dl	Normale yakın/hafif yüksek
	130 – 159 mg/dl	Sınırdan yüksek
	160 – 189 mg/dl	Yüksek
	≥190 mg/dl	Çok yüksek
TK	<200 mg/dl	Normal
	200 – 239 mg/dl	Sınırdan yüksek
	≥240 mg/dl	Yüksek
HDL-K	<40 mg/dl	Düşük
	≥60 mg/dl	Yüksek
TG	<150 mg/dl	Normal
	150 – 199 mg/dl	Sınırdan yüksek
	200 – 499 mg/dl	Yüksek
	≥500 mg/dl	Çok yüksek

Kolesterol parametrelerine ait eşik değerlerin ülkemizde belirlendiği en güncel bilimsel kılavuz ise Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Derneği (TEMĐ) tarafından hazırlanmıştır. “Dislipidemi Tanı ve Tedavi Kılavuzu” ismiyle yayınlanan bu kılavuzun içeriğinde serum lipit ve kolesterol parametrelerine ait eşik değerler belirlenmiştir. Söz konusu parametrelere ait eşik değerler ise Tablo 2.3’ te verilmiştir (TEMĐ, 2021).

Tablo 2.2. ESC/EAS Dislipidemi Tedavisi ve Yönetimi Kılavuzu: LDL-K Eşik Değerleri (2019)

Toplam KVH Riski	LDL-K Seviyesi					
	<55 mg/dl	55 mg/dl - <70 mg/dl	70 mg/dl - <100 mg/dl	100 mg/dl - <116 mg/dl	116 mg/dl - <190 mg/dl	≥190 mg/dl
Düşük risk (<1)	Yaşam Tarzı Önerileri	Yaşam Tarzı Önerileri	Yaşam Tarzı Önerileri	Yaşam Tarzı Önerileri	Öncelikle yaşam tarzı müdahalesi ancak metabolik kontrol sağlanamazsa ilaç tedavisi	Yaşam tarzı müdahalesi ile birlikte eş zamanlı ilaç tedavisi
Tavsiye Sınıfı/Kanıt Düzeyi	I/C	I/C	I/C	I/C	IIa/A	IIa/A
Orta düzey risk (≥1 - <5)	Yaşam Tarzı Önerileri	Yaşam Tarzı Önerileri	Yaşam Tarzı Önerileri	Öncelikle yaşam tarzı müdahalesi ancak metabolik kontrol sağlanamazsa ilaç tedavisi	Öncelikle yaşam tarzı müdahalesi ancak metabolik kontrol sağlanamazsa ilaç tedavisi	Yaşam tarzı müdahalesi ile birlikte eş zamanlı ilaç tedavisi
Tavsiye Sınıfı/Kanıt Düzeyi	I/C	I/C	IIa/A	IIa/A	IIa/A	IIa/A
Yüksek risk (≥5 - <10)	Yaşam Tarzı Önerileri	Yaşam Tarzı Önerileri	Öncelikle yaşam tarzı müdahalesi ancak metabolik kontrol sağlanamazsa ilaç tedavisi	Yaşam tarzı müdahalesi ile birlikte eş zamanlı ilaç tedavisi	Yaşam tarzı müdahalesi ile birlikte eş zamanlı ilaç tedavisi	Yaşam tarzı müdahalesi ile birlikte eş zamanlı ilaç tedavisi
Tavsiye Sınıfı/Kanıt Düzeyi	IIa/A	IIa/A	IIa/A	I/A	I/A	I/A
Çok yüksek risk (≥10)	Yaşam Tarzı Önerileri	Öncelikle yaşam tarzı müdahalesi ancak metabolik kontrol sağlanamazsa ilaç tedavisi	Yaşam tarzı müdahalesi ile birlikte eş zamanlı ilaç tedavisi	Yaşam tarzı müdahalesi ile birlikte eş zamanlı ilaç tedavisi	Yaşam tarzı müdahalesi ile birlikte eş zamanlı ilaç tedavisi	Yaşam tarzı müdahalesi ile birlikte eş zamanlı ilaç tedavisi
Tavsiye Sınıfı/Kanıt Düzeyi	IIa/B	IIa/A	I/A	I/A	I/A	I/A

Tablo 2.3. TEMD Dislipidemi Tanı ve Tedavi Kılavuzu: Lipit ve Kolesterol Parametrelerine Ait Eşik Değerler (2021)

Lipit ve Kolesterol Parametreleri	Optimal	Sınırdan Yüksek	Yüksek
TK	<200 mg/dl	200 – 239 mg/dl	>240 mg/dl
LDL-K	<100 mg/dl <70 mg/dl*	130 – 159 mg/dl	>160 mg/dl ≥190 mg/dl**
HDL-K	≥60 mg/dl	Erkek 40 – 59 mg/dl Kadın 50 – 59 mg/dl	Erkek <40 mg/dl Kadın <50 mg/dl
TG	<150 mg/dl	150 – 499 mg/dl (Hafif HTG)	500 – 1000 mg/dl (Orta HTG) ≥1000 mg/dl (Şiddetli HTG)
Apo-B	<90 mg/dl <80 mg/dl*		

*ASKVH veya risk eşdeğeri durumlar için, **Çok yüksek, HTG =Hipertrigliseridemi

2.7. Ateroskleroz Tanımı

Ateroskleroz, genellikle orta ve büyük çaplı damarların lümeninde oluşan daralmayla karakterize klinik bir tablodur. Söz konusu daralmaya bağlı olarak kan akış hızı yavaşlamakta ve bölgedeki dokuların kanlanması ve dolayısıyla beslenmesi yeterli düzeyde gerçekleşmemektedir. Damar lümeninde oluşan hipoksik ortam, dokularda oksidatif hasar meydana getirmektedir. Ayrıca yavaşlayan kan akımına bağlı olarak kanın pıhtılaşma düzeyi artmakta ve emboli adı verilen bu durum arterlerin tıkanması gibi bazı vital problemlere yol açabilmektedir (Zengin, 2012).

2.7.1. Ateroskleroz Fizyopatolojisi

İnsan vücudunda bulunan vasküler yapılar, yalnızca kan dolaşımına aracılık eden basit bir transfer kanalı değildir. Çünkü bu yapılar, çeşitli uyaranlara karşı aktif yanıt oluşturabilmektedir. farklı özelliklere sahip fonksiyonel özelliklere sahiptir. Ateroskleroz, tek başına damar çapının daraldığı ve buna bağlı olarak kanın damar içindeki transferinin olumsuz etkilendiği bir durum olmanın ötesinde metabolik bir süreçtir. Ateroskleroz tablosu proinflatuar sitokinler, bazı immün sistem hücreleri ve çeşitli biyoaktif moleküllerin rol aldığı kompleks

bir klinik tablodur. Ateroskleroz fizyopatolojisinde rol oynadığı düşünülen etkenler beş alt başlık altında toplanabilmektedir (Tanrıverdi ve Savaş Tetik, 2017).

2.7.1.1. Endotel disfonksiyonu

Kan dolaşımında önemli bir yere sahip olan arterleri yapısal olarak üç farklı katman oluşturmaktadır. Bu katmanlar en dıştan en içe doğru sırasıyla tunika adventisya, tunika medya ve tunika intima olarak adlandırılmaktadır. Tunika adventisyada mast hücreleriyle sinir uçları, tunika medyada da hareketsiz düz kas hücreleriyle birlikte elastin ve kollajen gibi yapısal bileşenler bulunmaktadır. Son olarak tunika intimada ise endotel ile subendotel tabakalar yer almaktadır. Ateroskleroz etiolojisindeki en kritik faktör, damar yüzeyinde bulunan endotel tabakası fonksiyonlarının bozulmasıdır. Endotel tabakası, fizyolojik koşullar altında damarın kasılma düzeyini ifade eden tonusun ayarlanması, hemostatik faktörlerin düzenlenmesi ve damarın yapısal bütünlüğünün korunmasında başrole sahip olan bağ doku yapımında önemli görevler üstlenmektedir. Ancak sigara içilmesi, hipertansiyona bağlı olarak damar çeperlerinde oluşan sürekli yüksek basınç, T2DM, obezite, düşük düzeyli kronik inflamasyon tablosu ve hiperkolesterolemi gibi uyaranlar endotel tabakanın yapısal bütünlüğünü zedelemektedir (Milutinović ve ark., 2020).

Ross tarafından ortaya atılan **“hasara tepki hipotezine”** göre ateroskleroz oluşumundaki ilk faktör endotel tabakasında meydana gelen hasarlanmadır. Bu hipoteze göre damar yüzeyinde bulunan endotel tabakasında mekanik, metabolik, immünolojik ya da toksik bazı uyaranlar sonucu harabiyet meydana gelmekte ve fonksiyonel kapasitede düşüş görülmektedir. Fizyolojik koşullar altında endotel yüzeyi, selektif geçirgenlik özelliğine sahiptir ve pıhtı oluşumunu engelleyici (antitrombotik) bir yapıdadır. Ancak endotel disfonksiyonu ile birlikte metabolik faaliyetler açısından olumlu olan söz konusu bu özellikler yitilmektedir. Bununla birlikte endotel disfonksiyonu sonucu, damar yüzeylerinin gerilim hali vazodilatasyon durumundan vazokonstriksiyona geçmekte ve böylece damar çeperlerine yapılan basınç artmaktadır. Ayrıca endotel tabakasında görülen fonksiyon bozukluğu sonucu damar yüzeyinin antiproliferatif özelliği

kaybolmakta ve bu özellik yerini homeostazın korunmasını daha da zorlaştıran proliferatif bir tabloya bırakmaktadır (Ross, 1993).

Sağlıklı bir endotel tabakasında; vazodilatör etkileriyle ön plana çıkan nitrik oksit (NO) ve prostasiklin (PGI₂) gibi bileşenler vazokonstriktör etki gösteren endotelin (ET) ve anjiyotensin dönüştürücü enzim (ACE) gibi bileşenlerden daha fazla salgılanmaktadır. Ancak endotel disfonksiyonu sonucu NO düzeyleri düşmekte ve damar çeperlerinde vazokonstriktör etki hakim olmaya başlamaktadır. Bu aşamada endotel tabakası seçici geçirgen özelliğini yitirmeye başlamakta ve çeşitli lipoproteinlerin damar tabakalarına doğru infiltrasyonu gerçekleşmektedir (Zengin, 2012).

2.7.1.2. LDL oksidasyonu ve immün hücre birikimi

Endotel disfonksiyonu sonucu damar tabakalarının içine infiltre olan LDL partikülleri, intima tabakasına kadar ulaşmakta ve bu bölgede bir LDL sekestrasyonuna yol açmaktadır. İntimaya giren LDL partikülleri proteoglikanlara bağlanarak bu tabakadaki kalış süresini artırmakta ve bu sayede reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşturduğu oksidasyona daha duyarlı hale gelmektedir. Okside olmuş LDL partikülleri proinflamatuvar bir kimlik kazanmakta ve çeşitli enzimatik değişiklikler sayesinde yapısal olarak minimal bir modifikasyon geçirmektedir. Modifiye LDL partiküllerinde; başlangıçta karakteristik apolipoprotein türü olan apo-B100 bileşeni değişmemekte ve bu partiküller genellikle az sayıda LDLR içeren makrofaj hücreleri tarafından tespit edilememektedir. Ancak modifiye LDL partikülleri, monosit kemotaktik protein-1 (MCP-1) gibi metabolik öğelerin salınımını uyarmakta ve bu sayede ortama monosit göçü tetiklenmektedir. Tamamen okside olmuş LDL partiküllerinin yapısındaki apo-B100 bileşenleri ise değişime uğramakta ve makrofajlar tarafından bütünüyle fagosite edilebilecek pozisyona gelmektedir. Oksidasyonu tamamlanmış LDL partikülü; çeşitli kemokinler, sitokinler, adhezyon molekülleri ve büyüme faktörlerinin salınımını uyarmakta ve ateroskleroz tablosunun oluşumunda önemli rol oynayan monosit ve lökosit göçünü hızlandırmaktadır (Shimokawa, 1999; Sitia ve ark., 2010).

2.7.1.3. Lökosit akümülayonu

Sağlıklı bir endotel tabakasında lökositlerin adezyonuna karşı bir direnç bulunmaktadır. Endotel disfonksiyonu sonucu, vasküler hücre adezyon molekülü-1 (VCAM-1), vasküler hücre adezyon molekülü-2 (VCAM-2) ve selektin gibi adezyon moleküllerinin ekspresyon düzeyi artmakta ve bunun sonucunda monositlerle T lenfositlerin endotel yüzeyine tutunma kabiliyeti artmaktadır. Adezyonu kolaylaştıran tüm bu süreçlerin ardından ise lökositler intima tabakasına rahatlıkla infiltre olabilmektedir (Gimbrone ve García-Cardena, 2016).

2.7.1.4. İntraselüler lipit birikimi ve köpük hücresi oluşumu

Normal şartlarda makrofaj hücrelerinin yapısında az miktarda LDLR bileşeni bulunduğu için bu hücrelerin oksidasyona uğramamış ya da oksidasyon sonucu minimal düzeyde modifikasyon geçirmiş LDL moleküllerini fagosite etme hızı oldukça düşüktür. Öte yandan oksidasyon sonucu tümüyle modifiye olmuş LDL partikülleri ise dolaşımdaki makrofajları kendisine doğru çekerek bir makrofaj birikimine sebep olmaktadır. Makrofajlar tamamen okside olmuş LDL partiküllerini çöpçü reseptörler aracılığıyla tanımakta akabinde ise fagositozla parçalamakta ve bu partiküllerin yapısında bulunan kolesterolü kendi içerisinde CE olarak depolamaktadır. Yoğun miktarda kolesterol içeren bu makrofaj hücreleri bir araya gelerek lipit damlacıkları oluşturmakta ve oluşturduğu bu yapılara “köpük hücreleri” denilmektedir. Köpük hücreleri, ateroskleroz oluşumunun ilk ögesi olarak kabul edilmektedir. Kolesterol esterlerinin makrofajlar tarafından depolanma işlemi makrofajların apoptozisine kadar devam etmektedir. Çünkü makrofajlarda bu işlemi gerçekleştiren çöpçü reseptörlerin aşağı yönlü regülasyonu bulunmamaktadır (Davignon ve Ganz, 2004).

2.7.1.5. Aterosklerotik lezyon oluşumu

Aterosklerozun öncü bileşeni olan köpük hücrelerinin intima tabakasında birikmeye başlamasıyla birlikte “yağlı çizgilenmeler” oluşmaya başlamaktadır. Söz konusu bu yağlı çizgilenmeler çocukluk ve adölesan çağlarında bile başlayabilmekte ve genellikle asemptomatik olduğundan dolayı klinik uygulamalarla tespit edilememektedir. Yağlı çizgilenmeler genellikle damar çeperlerinde sarı çizgiler şeklinde ve kanın akış yönüne doğru görülmektedir. Bu

izgilenmelerin oluşumu ve ilerlemesi dolaşımda bulunan kolesterol parametrelerinin düzeyi ile yakından ilişkilidir. Özellikle de köpük hücrelerinin oluşumunda aktif görev alan LDL partiküllerinin diyetle alınan ya da endojen olarak üretilen miktarı azalırsa dolaşımdaki LDL-K düzeyi gerilemektedir. Böyle bir durumda yağlı çizgilenmeleri oluşturan ve lezyona göç eden lipit miktarı azalmakta öte yandan bu bölgeden göç eden lipit miktarı ise artmaktadır. Bunun sonucunda da lezyon oluşumu gerilemekte ve geriye yalnızca skar doku kalmaktadır. Hiperkolesterolemik tablonun görüldüğü ve LDL partiküllerinin dolaşımda artış gösterdiği aksi bir durumda ise yağlı izgilenmelerden daha ileri ve farklı lezyonlar oluşmakta ve aterosklerotik tablo farklı bir evreye geçmektedir. Bahsi geçen bu daha ileri lezyonların oluşumuna en büyük katkıyı ise hücre dışı lipit birikimi vermektedir. Köpük hücrelerinin apoptozu sonucu bu hücrelerin yapısında bulunan çok miktardaki CE molekülü, hücre dışı lipit havuzunun büyük bir kısmını oluşturacak şekilde açığa çıkmaktadır. Lipit havuzunun geriye kalan kısmını ise dolaşımdaki lipoproteinler oluşurmaktadır (Insull Jr, 2009).

Yağlı izgilenmelerin ardından artan hücre dışı lipit havuzuna bağlı olarak beyaz renkli yeni bir plak oluşumu gözlemlenmektedir. Söz konusu bu yeni yapı fibröz plak olarak adlandırılmakta ve damar lümenine doğru genişleme göstermektedir. Fibröz plak, çekirdeğinde lipitlerin çekirdeğin etrafında ise çok miktarda düz kas hücreleri, T lenfositler, makrofajlar, köpük hücreleri ve ekstrasellüler matriksin bulunduğu kompleks bir yapıdır. Fibröz plak çekirdeğinin etrafında yer alan makrofajlardan matriks metalloproteinazlar (MMP) salgılanmaktadır. Bu enzimler endojen dokulardan salgılanan çeşitli metabolik inhibitörlerle birlikte homeostazı sağlayacak şekilde vasküler dokularda meydana gelen g, aktivasyon, çoğalma ve yeni damar oluşumu gibi metabolik faaliyetleri modüle etmektedir. Fibröz plağın lipitten oluşan çekirdeğinin üzeri fibröz bir başlıkla kaplanmaktadır. Fibröz başlık, medya tabakasından intima tabakasına göç eden düz kas hücreleri ve bu hücrelerden salgılanan kollajen ve elastin gibi liflerle proteoglikan ile glikozaminoglikanlar gibi moleküler bileşenlerden oluşmaktadır. Düz kas hücrelerinin tabakalar arası g ve bölünmesi, platelet kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) ile fibroblast büyüme faktörü (FGF) gibi moleküllerin tetiklemesi sonucu gerçekleşmektedir. Fibröz başlıkta bir yandan düz kas hücreleri tarafından

ekstrasellüler matriks yapımı görülmekte öte yandan ise makrofajlardan salınan MMP enzimleri tarafından da bağ dokuları yıkılmaktadır. Bu anabolik ve katabolik işlemler birçok sitokinin rol aldığı karmaşık bir metabolik süreçle yönetilmektedir (Bentzon ve ark., 2014; Jebari-Benslaiman ve ark., 2022).

Fibröz plakların oluşum süreci tamamlandığında ise damar lümeni anlamlı ölçüde daralmaktadır. Ancak KHV tablosundaki en tehlikeli durum bu fibröz ya da aterom plak oluşumlarının kararsız yapısıdır. Arter lümeninde oluşan fibröz plaklar ne kadar kalın bir yapıya sahipse o kadar stabildir. Bu yapılar her ne kadar kan akımını yavaşlatarak hücrelerin beslenmesini yavaşlatsa da stent gibi bazı cerrahi uygulamalar sonucu söz konusu olumsuzluk ortadan kaldırılabilmektedir. Ancak özellikle de çeşitli inflamatuvar hücreler ve lipidler açısından zengin olan ve daha ince yapıdaki hassas fibröz plaklar, yüksek yırtılma ve hasarlanma riskini içermektedir. Bu yapıdaki plaklar istenmeyen bazı hemorajik durumlara yol açabilmekte ve trombüs oluşumuna yatkın bir ortam oluşturmaktadır. Stabil olmayan, ince kalınlıktaki hassas plakların oluşturduğu lezyonlar ise “komplike” olarak isimlendirilmektedir. Komplike lezyonlar, merkezde bulunan lipid kökenli büyük bir çekirdeğe sahiptir. Ayrıca lezyon çekirdeğinin etrafında çok sayıda inflamatuvar ve düz kas hücreleri bulunmaktadır. Lezyonun en dışını ise kollajen içeriği azalmış ince fibröz bir kapsül kaplamıştır. Zamanla komplike lezyonların yüzeyindeki makrofajlardan kollajenaz ile elastaz gibi çeşitli MMP enzimleri salgılanmakta ve bu enzimler fibröz kapsülün kollajen içeren matriksini hidrolize uğratmaktadır. Ayrıca aktif makrofajlardan tümör nekrozis faktör alfa (TNF- α) ve interlekin-1 beta (IL-1 β), T lenfositlerden ise interferon gama (IFN- γ) gibi proinflamatuvar sitokinler salınarak sinerjistik bir etki oluşturmakta; bunun sonucunda ise düz kas hücrelerinin ölümü artmakta ve ekstrasellüler matriks daha da azalmaktadır. Katabolik faaliyetlerin artması ve anabolik faaliyetlerin de azalması sonucu fibröz kapsül zayıflamakta ve en sonunda ise çatlamaktadır. Fibröz başlığı zedelenmiş plaktaki pıhtılaşma öncüsü moleküller, kanda bulunan bileşenler ve pıhtılaşma faktörleriyle karşılaşmakta ve pıhtı (trombüs) oluşumu tetiklenmektedir. Plâğın yırtılması (rûptür) ve pıhtı oluşumu ile birlikteyse akut koroner sendromlar denilen klinik tablolar görülmeye başlamaktadır. Bir aterom plâğın rûptüre olması için damar lümenini önemli oranda daraltması şartı

bulunmamaktadır. Damar lümenini ciddi anlamda daraltmayan bu şekildeki stabil olmayan bir plağın yırtılarak pıhtı oluşturması gibi sendromlara sebep olması ise daha ciddi ve tehlikeli klinik tablolara yol açabilmektedir (Badimon ve Vilahur, 2014; Sary ve ark., 1994; van der Wal ve Becker, 1999) .

2.8. Probiyotiklerin Tanımı ve Uygulamasının Metabolizma Üzerine Etkileri

Probiyotiklere ait en kapsayıcı tanımlama ilk olarak 2001 yılında WHO ve Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) tarafından yapılmıştır. Ardından 2014 yılında Uluslararası Probiyotikler ve Prebiyotikler Derneği (ISAPP)' nin sunduğu katkılarla son şeklini alan ifade *“yeterli miktarda tüketildiği zaman konak canlının sağlığı üzerine olumlu etkiler yapan canlı mikroorganizmalar”* olarak açıklanmıştır (WHO/FAO, 2006; Hill ve ark., 2014). Probiyotik bakteriler genellikle sağlıklı bireylerin bağırsak mikrobiyota örüntüsünde en yüksek oranda bulunan mikrobiyal bileşenlerden olan “Laktik asit bakterileri (LAB)” arasında yer almaktadır. Taksonomik sınıflandırma bakımından çoğunlukla “Bacillota” filumuna ait olan probiyotik bakteriler *“Lactobacillus”*, *“Bifidobacterium”*, *“Lactococcus”*, *“Leuconostoc”*, *“Pediococcus”* ve *“Streptococcus”* gibi cinslere ait mikroorganizmalardan oluşmaktadır. Ancak bu cinslerin içinde yer alan her mikroorganizma probiyotik bir bakteri olarak kabul edilmemektedir. Çünkü mikrobiyal bir bileşenin probiyotik olarak kabul edilebilmesi için fonksiyonel özellikler bakımından bazı ön koşulları sağlaması gerekmektedir. Bu ön koşullar arasında; patojenik bakterilerin gelişimini engelleme, yararlı bakterilerin sayısını artırma, safra tuzuna ve mide asidine karşı dirençli olma, epitel yüzeylere tutunabilme ve gastrointestinal sistemden (GIS) geçiş boyunca canlı birim sayısının belirli bir seviyenin altına düşmemesi gibi şartlar bulunmaktadır (Beasley 2004; Madigan ve Martinko, 2006). Ayrıca ISAPP yakın bir geçmişte probiyotiklerin sahip olması gereken minimum kriterleri güncellemiştir. Bu kriterler arasında; probiyotiğin cins, tür ve suş düzeyinin ayrıntılı olarak tanımlanması ve bu tanımlamanın güncel bilimsel terminolojiyle uyumlu biçimde gerçekleştirilmesi, probiyotiğin kullanım amaçları doğrultusunda tüketimlerinin güvenli olduğunun çeşitli testlerle doğrulanması, probiyotik suşun uluslararası bir kültür koleksiyonunda muhafaza edilmesi, probiyotiğin sahip olduğu belirtilen sağlığa faydalı etkilerinin en az bir klinik çalışmayla doğrulanması ve probiyotik

ürünün raf ömrünün sonuna kadar belirtilen minimum miktarının korunması bulunmaktadır (ISAPP, 2018).

Probiyotik bakteriler, bağırsak mikrobiyota örüntüsünün en önemli mikrobiyal bileşenlerinden birisi olup çeşitli hastalık ve rahatsızlıkların tedavisinde birtakım olumlu metabolik etkiler yaratabilmektedir. Literatürde bazı metabolik hastalıklarda uygulanan geleneksel tedavi metotlarına alternatif olabilecek çeşitli terapötik ajan araştırmalarının sayısı her geçen gün artış göstermektedir. Probiyotikler ise alternatif terapötik ajan olarak kullanılabilme potansiyeli bakımından nütrosötikler arasında ilk sıralarda yer almaktadır. Probiyotik bakteri uygulamasının etkinliği çok çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir ve hakkında en fazla çalışma yapılan alan, inflamatuvar bağırsak hastalıkları (İBH)'dır. Çeşitli in vivo çalışmalarda probiyotik takviyesinin intestinal bariyer mekanizması elemanlarını güçlendirdiği, bağırsak mikrobiyota örüntüsünü düzenlediği ve proinflamatuvar sitokinlerin salgılanmasını inhibe ederek bağırsak sağlığını olumlu yönde etkilediği gösterilmiştir. Bununla birlikte probiyotik bakteri takviyesinin antihipertansif, antikanserojen, antioksidan ve antiinflamatuvar etki yarattığı, dermatit, artrit ve alerji semptomlarını azalttığı, mineral emilimine katkı sağladığı ve kolesterol metabolizmasına ait parametreleri düzenleyerek hipokolesterolemik etki oluşturduğunu belirten çalışmalara da rastlanmaktadır (Ishimwe ve ark., 2015). ISAPP, probiyotiklerin sahip olduğu metabolik etkileri; suşa bağımlı olarak ortaya çıkan ve daha seyrek görülen etkiler, tür düzeyinde ortaya çıkan ve görece daha sık görülen etkiler ile cins düzeyinde daha yaygın bir biçimde oluşan etkiler olarak üç gruba ayırmıştır. Probiyotik kullanımı sonucu suşa bağımlı olarak nörolojik, immünolojik ve endokrinolojik birtakım etkiler görülmekte ve bu etkiler sonucu bazı spesifik biyoaktif moleküller üretilmektedir. Probiyotiklerin tür düzeyinde ortaya çıkardığı etkiler ise bazı vitaminlerin sentezini, çeşitli enzimatik aktivitelerin yönetilmesini, intestinal bariyer mekanizmasının güçlendirilmesini ve karsinojenlerin nötralize edilmesini sağlamaktadır. Probiyotiklerin cins düzeyinde gösterdiği etkiler arasında ise bağırsaklardaki transit geçişin düzenlenmesi, KZYA üretiminin ve enterositlerdeki hücre döngüsünün artması ve patojenlerin kolonizasyonuna direncin oluşması bulunmaktadır (Hill ve ark., 2014; Salminen ve ark., 2021).

2.8.1. Probiyotik Uygulamasının Kolesterol Metabolizması Üzerine Etkileri

Literatürde probiyotik bakterilere ait kolesterol giderim yeteneklerini araştıran çeşitli araştırmalar mevcuttur. Ancak probiyotik bakterilerin ortamda bulunan kolesterolü düşürebilme yeteneklerinin altında yatan metabolik mekanizmaların genellikle in vitro çalışmalarla ortaya konulduğu gösterilmiştir. Bu mekanizmalar arasında en önemlileri aşağıda belirtilen şekildedir:

- Safra tuzu hidrolaz aktivitesi sonucu safra tuzlarının dekonjugasyonu,
- Ortamda bulunan kolesterolün probiyotik bakteriler tarafından asimilasyona uğratılması,
- Dekonjugasyon sonucu oluşan sekonder safra asitlerinin ortamdaki kolesterolü çökeltmesi,
- Bazı probiyotik bakterilerin yapısında bulunan enzimler aracılığıyla kolesterolün katabolize edilmesi,
- Ortamda bulunan kolesterolün probiyotik suşların hücre duvarına bağlanması,
- Probiyotik bakterilerin substrat olarak prebiyotikleri fermente etmesi sonucu açığa çıkan KZYA bileşenleri,
- Ortamda bulunan kolesterolün probiyotik bakteriler tarafından alınarak hücre zarının yapısına dahil edilmesi gibi mekanizmalar sonucu probiyotik mikroorganizmalar kolesterol düşürücü etki gösterebilmektedir (Ooi ve Liong, 2010).

Wang ve ark. (2018), randomize kontrollü çalışmaları (RKÇ) inceledikleri meta-analiz çalışmalarında; tek başına spesifik bir probiyotik suş ya da çeşitli probiyotik suşları içeren karışım halindeki ürünlerin uygulaması sonucu kolesterol parametrelerinde meydana gelen farklılığı araştırmışlardır. Uygulanan probiyotiğin formundan bağımsız olarak probiyotik takviyesi alan gruba ait serum TK düzeylerinin kontrol grubuna kıyasla anlamlı ölçüde düşüş gösterdiği bulunmuştur. Verilerin alt grup analizleri sonucu ise “*Lactiplantibacillus plantarum*”, “*Bifidobacterium lactis*” ve “*Lactobacillus acidophilus*” gibi tek bir türün uygulandığı probiyotik uygulamalarının VSL#3 gibi ticari olarak satılan probiyotik suş karışımlarına göre serum TK düzeylerini daha etkili bir biçimde

azalttığı saptanmıştır (Wang ve ark., 2018). Sharma ve ark. (2016) ise probiyotik uygulamasının gerçekleştirildiği RKÇ verilerini meta-analizlerinde incelemişlerdir. Probiyotik uygulamasının gerçekleştirildiği grubun kontrol grubuna kıyasla sırasıyla serum TK düzeylerinin ortalama 8.40 mg/dl düştüğü ($p = 0.002$), LDL-K düzeylerinin ortalama 6.63 mg/dl azaldığı ($p = 0.001$), ancak HDL-K ile TG düzeylerinin anlamlı düzeyde değişiklik göstermediği ($p > 0.05$) saptanmıştır (Sharma ve ark., 2016).

Günümüzde ticari olarak satılan probiyotik karışımlarının ya da çeşitli besinlerden ve insan vücudunun farklı bölgelerinden izole edilen probiyotik suşların çoğunluğu “*Lactobacillus*” ile “*Bifidobacterium*” cinsi bakterilerden oluşmaktadır. İzole edilen söz konusu bu laktobasiller arasında “*Lactobacillus johnsonii*”, “*Lactobacillus acidophilus*”, “*Lacticaseibacillus rhamnosus*”, “*Lactobacillus gasseri*”, “*Limosilactobacillus reuteri*” ve “*Lacticaseibacillus casei*” gibi türler bulunmaktadır (Heller, 2001). Uluslararası Prokaryotlar Sistematiği Komitesi (ICSP) adlı otorite kuruluş, birçok probiyotik bakterinin bilimsel terminolojiye uygun olarak yeniden isimlendirildiği “Uluslararası Bakteri Adlandırma Kodu” adlı raporun revize edilmiş halini 2022 yılında yayınlamıştır. Söz konusu revizyon raporunda *Lactobacillus casei* olarak isimlendirilen probiyotik suşların isminin *Lacticaseibacillus casei* olarak değiştirilmesi uygun bulunmuştur (Oren ve ark., 2023). Probiyotik olmanın ön koşullarını sağlayan ve çeşitli kaynaklardan izole edilen suşların gen haritası da dahil olmak üzere farklı özellikleri bazı otorite kabul edilen kurumlar tarafından koruma altına alınmakta ve standart tip kültürler olarak saklanmaktadır. Kâr amacı gütmeyen bu otorite kuruluşların başında ise Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu (ATCC) adlı kurum gelmektedir. Söz konusu kurumun veri bankasında pek çok probiyotik LAB kültürü bulunmaktadır. Bu probiyotik kültürlerden birisi de “*Lacticaseibacillus casei* ATCC 393” adlı suştur. *L.casei* ATCC 393 kodlu probiyotik kültürün biyogüvenlik testleri ve genetik haritalama işlemleri tamamlanmış ve tüketimi sonucu sağlık üzerine herhangi bir olumsuz oluşturmadığının ispatı olan “*Genel olarak tüketimi güvenli kabul edilen*” (GRAS) ve “*Nitelikli Güvenilirlik Varsayımı*” (QPS) gibi statüler verilmiştir (ATCC, 2022; Hill ve ark., 2018). Literatürdeki çeşitli in vitro çalışmalarda *L. casei* ATCC 393 suşunun probiyotik

olmanın ön koşullarını sağladığı gösterilmiştir (Lye ve ark., 2010a; Sidira ve ark., 2010). Lye ve ark., (2010b) yürüttükleri in vitro bir çalışmada *L. casei* ATCC 393 suşunun ortamda bulunan kolesterolü katabolize ederek koprostanole dönüştürdüğünü göstermiştir (Lye ve ark., 2010b). Söz konusu suşun kolesterol giderim yeteneği hakkında gerçekleştirilen diğer bir in vitro çalışmada ise *L. casei* ATCC 393 probiyotik kültürünün BSH aktivitesine sahip olduğu gözlemlenmiştir (Majeed ve ark., 2019). El Helim ve ark. (2016) ise YYYYK diyetle beslenerek hiperkolesterolemik hale gelen farelere probiyotik *L. casei* ATCC 393 kültürünü intragastrik olarak uygulamış ve ortalama serum TK düzeylerinin anlamlı olarak azaldığını saptamışlardır (El Helim ve ark., 2016).

2.8.2. Probiyotiklerin Hipokolesterolemik Etkilerinin Mekanizması

2.8.2.1. Safra Tuzu Hidrolaz Enzim Aktivitesi

Literatürde yapılan farklı çalışmalarda probiyotiklerin çeşitli mekanizmalar aracılığıyla hipokolesterolemik etki gösterdiği tespit edilmiştir. Söz konusu mekanizmalar arasında en dikkat çekici olanlarından birisi de bazı probiyotik suşların yapısında bulunan BSH enzim aktivitesidir (Ooi ve Liong, 2010). Safra sıvısı, emülsifiye edici özelliğinden dolayı yağların ince bağırsaklardaki sindirim ve emiliminde önemli rol oynamaktadır. Suda çözünabilen bir yapıya sahip olan safra sıvısı, karaciğerde sentezlenmekte ancak konsantre edilerek safra kesesinde depolanmaktadır. Besinlerin ince bağırsaklarda sindirimi esnasında oluşan hormonal uyarılar sonucu safra kesesinden safra sıvısı salgılanmakta ve bu sıvı çeşitli metabolik kanallar aracılığıyla ince bağırsağa dökülmektedir. Safra sıvısının içerisinde kolesterol, fosfolipitler, konjuge safra asitleri, safra pigmentleri ve çeşitli elektrolitler bulunmaktadır (Begley ve ark., 2006).

Kolik asit ve kenodeoksikolik asit gibi primer safra asitlerinin kan dolaşımındaki çözünürlükleri oldukça düşüktür. Primer safra asitlerinin safra kesesinde depolanması ve ardından ince bağırsaklara taşınması için suda çözünürlüğünün yükselmesi gerekmektedir. Bu yüzden kolik asit ve kenodeoksikolik asit gibi primer safra asitleri, karaciğerden ayrılmadan önce glisin ya da taurin ile konjuge edilerek yüksek çözünürlüğe sahip safra tuzlarına dönüştürülmektedir. Fizyolojik koşullar altında safra tuzları, safra sıvısında yer alan organik maddelerin yaklaşık

%80 gibi oldukça yüksek bir oranını oluşturmaktadır. Çeşitli enzimatik tepkimeler sonucu safra tuzları dekonjugasyon geçirmekte ve glikolik asit, taurokolik asit, glikokenodeoksikolik asit ve taurokenodeoksikolik asit gibi sekonder safra asitlerini oluşturmaktadır (Önür ve Beyler, 2001).

Bazı probiyotik suşların sahip olduğu BSH enzim aktivitesi sonucu safra tuzları dekonjugasyona uğramakta ve böylece sekonder safra asitleri ortaya çıkmaktadır. Sekonder safra asitleri düşük çözünürlüğe sahip bileşenlerdir ve ince bağırsaklar tarafından emilimi oldukça düşüktür. Bu yüzden sekonder safra asitlerinin büyük bir kısmı feçesle atılmaktadır. Vücudun safra tuzlarının bu şekilde bir dekonjugasyona uğramasına ve dolayısıyla safra sıvısının azalmasına verdiği tepki ise yeniden safra sıvısı sentezlenmesidir. Tekrardan safra üretim işleminde prekürsör olarak vücudun kolesterol havuzunda bulunan kolesterol molekülleri kullanılmaktadır. Sonuç olarak BSH aktivitesine sahip bazı probiyotik suşları yukarıda anlatılan mekanizmalar aracılığıyla hipokolesterolemik etki göstermektedir (Pereira ve Gibson, 2002).

In vitro bir çalışmada Jones ve ark. (2004), probiyotik bir suş olan “*Lactiplantibacillus plantarum* 80 (pCBH1)” bakterisinin BSH aktivitesine sahip olduğunu göstermiş ve ardından bu bakterinin dış ortamdaki çeşitli stres koşullarına olan dayanıklılığını artırmak için mikroenkapsülasyon işlemi uygulamıştır. Mikroenkapsülasyon uygulaması sonucu, söz konusu suşun safra tuzlarını dekonjugasyona uğratma kapasitesinin canlı hücrelere göre anlamlı düzeyde arttığı ve ortaya çıkan hipokolesterolemik etki boyutunun da yükseldiği saptanmıştır (Jones ve ark., 2004).

Hernández-Gómez ve ark. (2021), çeşitli yöresel peynirler, süt ürünleri ve ticari ürünlerden izole ettikleri probiyotik özellikteki bakterileri, BSH aktivitesi açısından taramışlardır. Özellikle “*Lactobacillus*” cinsi beş farklı bakteri (*Lactocaseibacillus casei* Shirota, *Lactiplantibacillus plantarum* 299v, *Lactocaseibacillus rhamnosus* ATCC 53103 (LGG), *Lactiplantibacillus plantarum* DGIA1 ve *Limosilactobacillus fermentum* K73) suşunun pozitif BSH aktivitesine sahip olduğu saptanmış ve in vitro ortamda safra tuzlarını dekonjuge etme oranları ölçülmüştür. *Lactiplantibacillus plantarum* DGIA1 adlı probiyotik suşun sodyum

glikokolat, sodyum glikodeoksikolat, sodyum taurokolat ve sodyum taurodeoksikolat gibi safra tuzlarını sırasıyla %69, %100, %81 ve %92 oranlarında dekonjuge ettiği ve bu sayede in vivo koşullarda hipokolesterolemik etki oluşturma potansiyelinin olduğu belirtilmiştir (Hernández-Gómez ve ark., 2021).

Tsai ve ark. (2014), çeşitli hayvanlardan ve bitkilerden izole ettikleri yaklaşık 800 bakteriyi, BSH aktiviteleri bakımından in vitro ortamda test etmiş ve bu bakteriler arasından en yüksek BSH aktivitesine sahip “*Pediococcus acidilactici* NBHK002”, “*Bifidobacterium adolescentis* NBHK006” ve “*Lactacaseibacillus rhamnosus* NBHK007” isimli üç farklı probiyotik suşu seçmiştir. Bu üç suşun karışımından oluşan “PROBIO-S23” adlı ürünün kolesterol düşürücü etkilerini in vivo ortamda araştırmışlardır. Çalışmada deney hayvanı olarak kullanılan hamsterlar 6 hafta boyunca YYYYK yem örüntüsüyle beslenmiş ve bu süreç içerisinde hayvanlara “PROBIO-S23” ürünü düşük (78 mg/kg; v.a./gün), orta (390 mg/kg; v.a./gün) ve yüksek dozda (1950 mg/kg; v.a./gün) oral gavaj aracılığıyla her gün uygulanmıştır. Altı haftalık deneysel periyodun sonunda 3 farklı dozda probiyotik suş karışımı uygulanan gruplarının tümünün yüksek yağlı yüksek kolesterollü yemle beslenen gruba kıyasla serum TK, TG ve LDL-K düzeylerinin anlamlı ölçüde düştüğü ancak serum HDL-K düzeylerinin ise değişmediği gösterilmiştir (Tsai ve ark., 2014).

2.8.2.2. Sekonder Safra Asitleri Aracılığıyla Kolesterolün Çökeltilmesi

Probiyotiklerin hipokolesterolemik etki göstermesinde etkili diğer bir mekanizma ise ortamda bulunan ve dekonjugasyon sonucu oluşan sekonder safra asitleriyle birlikte kolesterolün çökmesidir. Bazı probiyotik suşlar sahip oldukları BSH aktivitesi sayesinde hem yeniden safra sentezi için kolesterol havuzundan kolesterol çekmekte hem de bu enzim aktivitesi sonucu oluşan sekonder safra asitleri intestinal sistemdeki kolesterolü çökelterek emilimini azaltmaktadır. Probiyotik bazı suşların sahip olduğu bu hipokolesterolemik etkiyi ilk olarak Klaver ve Meer, in vitro bir çalışmalarında göstermişlerdir (Klaver ve Meer, 1993).

Shobrahani ve Halami (2016) ise in vitro bir çalışmada, çiğ süttten izole ettikleri üç farklı probiyotik suşu, kolesterol düşürücü etkiye sahip olma bakımından test etmişlerdir. Bu çalışmada kullanılan “*Priestia flexa* MCC 2458”, “*Priestia flexa* MCC 2427” ve “*Bacillus licheniformis* MCC 2514” adlı suşların BSH aktivitesine sahip olmadığı görülmüştür. Araştırmacılar söz konusu üç probiyotik suşun bulunduğu iki ayrı asidik ortam (pH: 5.0) hazırlamıştır. İlk ortama sadece safra sıvısı eklenmiş ve kolesterol miktarının %18,48 - %19,68 aralığında düştüğü gözlemlenmiştir. İkinci ortama ise safra sıvısı ile birlikte konjuge safra asitleri eklendiğinde; asidik ortamın da etkisiyle sekonder safra asitlerinin oluştuğu ve bu kez ortamdaki kolesterol miktarının %27,57 - %31,22 aralığında düştüğü ve hipokolesterolemik etkinin anlamlı ölçüde arttığı saptanmıştır ($p<0.05$). Sonuç olarak sekonder safra asitlerinin ortamda bulunan kolesterolü çöktttiği ve bu sayede intestinal sistemden kolesterol emiliminin azaldığı sonuç olarak ise hipokolesterolemik etkinin oluştuğu belirtilmiştir (Shobharani ve Halami, 2016).

Probiyotik özellikteki laktik asit bakteri suşlarının kolesterol düşürücü etkilerinin araştırıldığı diğer bir in vitro çalışmada ise “*Lacticaseibacillus paracasei* M3”, “*Lacticaseibacillus casei* M5” ve “*Lacticaseibacillus paracasei* M7” gibi suşların kolesterol düşürücü etkileri araştırılmıştır. Bu çalışmada ortamda bulunan kolesterolü çökttme kapasitesinin en fazla *L. casei* M5 adlı suшта olduğu (50.16 µg/mL) görülmüş; diğer suşların kolesterol çökttme kapasitelerinin ise (33–44 µg/mL) daha kısıtlı kaldığı belirlenmiştir. İncelenen suşların BSH aktiviteleri karşılaştırıldığında ise en yüksek aktiviteye yine *L. casei* M5 suşunun sahip olduğu görülmüş ve BSH aktivitesi sonucu açığa çıkan sekonder safra asitlerinin ortamdaki kolesterolün çökelmesine aracılık ettiği gösterilmiştir (Bhat ve Bajaj, 2020).

Her ne kadar bazı probiyotik suşların sahip olduğu bu kolesterolü çökttme etkisi in vitro çalışmalarla kanıtlanmış olsa da bilim insanları bu mekanizmanın in vivo koşullardaki etkisine şüpheyle yaklaşmaktadır. Kolesterolün sekonder safra asitleri tarafından çökttildiği bu işlem için genellikle pH değerinin <6.0 olduğu hafif asidik bir ortam gerekmektedir. Çünkü BSH enziminin optimum çalışması için gereken asitlik derecesi pH 5.0 – pH 6.0 aralığındadır. Ancak fizyolojik koşullarda intestinal lümenin pH değeri genellikle nötr ya da hafif alkali bir

aralıkta bulunmaktadır. Ayrıca kolesterol moleküllerinin genellikle nötre yakın asitlik derecesine (pH: 7.0) sahip ortamlarda çözünürlüğünün arttığı ve böylece fizyolojik koşullardaki intestinal lümende sekonder safra asitleriyle birlikte çökmesinin azalacağı öngörülmektedir. Tüm bu sebepler göz önüne alındığında; probiyotiklerin hipokolesterolemik etki göstermesinde rol oynayan mekanizmalardan birisi olarak kabul edilen kolesterolün çökertilmesi işleminin in vivo ortamda da etkinliğinin kanıtlanabilmesi için daha fazla sayıda ve ayrıntılı bilimsel çalışmaya ihtiyaç duyulduğu görülmektedir (Reis ve ark., 2017).

2.8.2.3. Kolesterolün Hücre Duvarına Bağlanması

Probiyotik suşların kolesterol düşürücü etki göstermesinde rol alan mekanizmalardan birisi de hücre duvarına kolesterolün bağlanmasıdır. Kimoto ve ark. (2002), “*Lactococcus*” cinsine ait yedi ayrı probiyotik suş ile yaptığı in vitro çalışmada, canlı ve gelişme aşamasında olan bakteri hücreleri ile canlı ancak metabolik faaliyetleri fosfat tampon çözeltisi (PBS) aracılığıyla durdurulmuş olan ve ısı şoku ile tamamen öldürülmüş olan bakterileri hipokolesterolemik etkileri açısından kıyaslamıştır. Söz konusu bakteriler ortamdan kolesterol giderme kapasitesi bakımından karşılaştırıldığında; en fazla etkiye canlı ve gelişimine devam eden probiyotik suşların sahip olduğu görülmüştür. Bu çalışma sonundaki en ilgi çekici bulgu ise bazı probiyotik suşların ısı şoku ile metabolik faaliyetleri tamamen sona erdirilmiş olsa bile ortamdaki kolesterolü hücre duvarlarına bağlayarak kolesterol düşürücü etki oluşturmaya devam etmesidir (Kimoto ve ark., 2002).

2.8.2.4. Kolesterolün Hücre Membranının Yapısına Dahil Edilmesi

Bazı probiyotik bakterilerin sahip olduğu hipokolesterolemik etkinin ortaya çıkmasında rol alan mekanizmalardan bir diğeri ise ortamda bulunan kolesterolün hücre içine alınıp hücre membranının yapısına dahil edilmesidir (Ooi ve Liong, 2010). Lye ve ark. (2010a), in vitro bir çalışmalarında 15 farklı probiyotik suşu ortamdaki kolesterolü hücre zarının yapısına katabilme fonksiyonları açısından değerlendirmişlerdir. Kolesterol düşürücü etkinin test edilebilmesi için bu suşlar arasından en yüksek hidrofobisite kapasitesine sahip “*Lactobacillus acidophilus* ATCC 314”, “*Lactobacillus acidophilus* FTCC 0291”, “*Lactobacillus delbrueckii*

subsp. bulgaricus FTCC 0411”, “*Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* FTDC 1311” ve “*Lactocaseibacillus casei* ATCC 393” adlı beş probiyotik suş seçilmiştir. Söz konusu suşlar kolesterol içeren ve içermeyen iki farklı besiyerinde inkübe edilmiş ve daha sonra hücrenin toplam yağ asit örüntüsü ve içeriği ölçülmüştür. Ayrıca floresans anizotropi metodu ile hücre içeriğine dahil edilen moleküllerin hangi organelin yapısına katıldığı belirlenmiştir. Çalışma sonucu besiyerine kolesterol eklenen probiyotik suşların kolesterol içermeyen besiyerinde gelişen suşlara kıyasla toplam yağ asit örüntülerinin (doymuş ve doymamış yağ asitleri bakımından) anlamlı ölçüde farklı olduğu bulunmuştur. Bununla birlikte floresans anizotropi yöntemi ile yapılan ölçümlerde kolesterolün probiyotik suşların hücre zarında bulunan fosfolipit yapıdaki kuyruğun, zarın üst yüzeyinde yer alan fosfolipitlerin ve yine burada bulunan fosfolipit çift tabakanın yapısına girdiği ispatlanmıştır. Araştırmacılar, bazı probiyotik bakterilerin suşa bağımlı olarak değişebilecek nitelikte olsa da probiyotiklerin ortamda bulunan kolesterolü hücre zarının yapısına katarak kolesterol düşürücü etki gösterdiğini ispatlamışlardır (Lye ve ark., 2010a).

2.8.2.5. Kolesterolün Asimilasyonu

Kolesterol düşürücü etki oluşturan ve probiyotik bakterilere has olan başka bir özellik ise kolesterol asimilasyonudur. Kolesterol asimilasyon yeteneği suşlara bağımlı olarak değişiklik göstermekle birlikte bu işlem için safra tuzlarının varlığına ihtiyaç duyulmaktadır. Bazı probiyotik bakterilerin peptidoglikan yapıdaki hücre duvarları kolesterolü asimile edebilmektedir. Ayrıca bu bakterilerden salgılanan ekzopolisakkarit (EPS) düzeyleriyle kolesterol asimilasyon yeteneği arasında pozitif yönlü bir korelasyon olduğu da bilinmektedir. Söz konusu suşlar, kolesterolü asimilasyona uğratarak safra tuzlarını da kullanmaktadır. Safra tuzlarının yeniden sentezlenmesinde ise kolesterol havuzundan faydalanılmakta ve böylece hipokolesterolemik bir etki meydana gelmektedir (Reis ve ark., 2017). “*Lactobacillus acidophilus*” cinsi çeşitli probiyotik suşlar ile gerçekleştirilen in vitro bir çalışmada; farklı safra tuzları varlığında kolesterol asimilasyon oranının suşlara bağlı olarak %11 ile %71 arasında değiştiği ve ortamdaki kolesterolü asimile etme yeteneğine en fazla

sahip olan suşun “*Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356” olduğu saptanmıştır (Lin ve Chen, 2000).

2.8.2.6. Kolesterolün Katabolizasyonu

Probiyotik suşların bir kısmında bulunan ve ortamdaki kolesterolün düşürülmesini sağlayan mekanizmalardan bir diğeri ise kolesterolün katabolizasyonudur. Bu katabolizasyon işlemi sonucu kolesterolün büyük çoğunluğu koprostanole ve çok az bir miktarı da koprostanona dönüşmektedir. Diyetle alınan ve ince bağırsaklara gelen kolesterol ile endojen olarak sentezlenen ancak transintestinal kolesterol atımı (TİKA) yoluyla (dolaşımdaki kolesterolün doğrudan ince bağırsak lümenine doğru geçişi) bağırsaklara taşınan bir miktar kolesterol, bağırsak mikrobiyota örüntüsünde bulunan bazı probiyotik suşlar tarafından katabolize edilmektedir. Bahsi geçen katabolizasyon işlemini ise bu suşların yapısında bulunan kolesterol redüktaz enzimi gerçekleştirmektedir (Reis ve ark., 2017). Laktik asit bakterileri ile gerçekleştirilen in vitro bir çalışmada hidrofobisite özelliği en fazla olan beş ayrı probiyotik suşun kolesterol düşürücü etkiye sahip olup olmadığı araştırılmıştır. Bu beş suşun tamamının intraselüler ve ekstraselüler kolesterol redüktaz enzim aktivitesine sahip olduğu saptanmış ve ortamdaki kolesterolün koprostanole dönüşümünü en fazla “*Lactobacillus acidophilus* FTCC 0291”, “*Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* FTCC 0411” ve “*Lactocaseibacillus casei* ATCC 393” adlı suşların gerçekleştirdiği görülmüştür (Lye ve ark., 2010b).

2.8.2.7. Prebiyotiklerin Fermantasyonu Sonucu Oluşan Kısa Zincirli Yağ Asitleri

Son olarak bazı probiyotik suşların ortamda bulunan kolesterolün düşürülmesinde etkin olmasının sebebi ise bağırsak mikrobiyota örüntüsünde yer alan probiyotik bakterilerin substrat olarak prebiyotikleri fermente etmesi sonucu açığa çıkan KZYA bileşenleri olarak görülmektedir. Özellikle de propiyonatın karaciğerdeki kolesterol sentezini inhibe ettiği ve serum kolesterol parametrelerinin düzenlenmesine yardım ettiği bilinmektedir (Markowiak-Kopeć ve Ślizewska 2020). Hara ve ark. (1999) yürüttükleri in vivo bir çalışmada, ratları üç ayrı gruba bölmüş ve birinci grubun yemini posasız, ikinci grubun yemini şeker kamışından elde edilen posayla ve üçüncü grubun yemini ise KZYA karışımı ve safra tuzu

ilavesiyle hazırlamışlardır. Çalışma sonunda ratların karaciğerleri ve ince bağırsaklarından alınan kesitler incelenmiş ve en düşük kolesterol sentez hızının KZYA karışımı tüketen grupta olduğu ($p<0.05$) görülmüştür (Hara ve ark., 1999).

2.9. Prebiyotik Tanımı

Prebiyotikler, ‘‘kolondaki bir veya sınırlı sayıdaki mikroorganizmanın büyümesini ve/veya aktivitesini seçici bir şekilde uyararak, konakçıyı faydalı şekilde etkileyen, sindirilemeyen besin bileşenleri’’ olarak tanımlanmaktadır. Bir besin ögesi ya da bileşeninin prebiyotik olarak adlandırılabilmesi için bağırsak mikrobiyota örüntüsünde bulunan ‘‘*Lactobacillus*’’ ve ‘‘*Bifidobacterium*’’ cinsleri gibi faydalı bakterilerin sayısını artırması ya da gelişimini desteklemesi gerekmektedir. Bununla birlikte prebiyotiklerin diğer bir özelliği de patojen bakteriler tarafından fermente edilmemesi ve bu bakterilerin metabolik aktivitelerine katkı sunmamasıdır. Ayrıca prebiyotikler, GİS kanalından geçerken herhangi bir şekilde fermantasyona uğramamalı ve yapısal bütünlüğünü koruyarak bakterilerin en yoğun bulunduğu bölge olan kolona kadar ulaşabilmelidir. Prebiyotiklerin probiyotik bakteriler tarafından fermente edilmesi sonucu asetat, bütirat ve propiyonat gibi KZYA bileşenleri oluşmaktadır. Söz konusu KZYA bileşenlerinden olan bütirat, kolonositlerin temel enerji kaynağı olarak kullanılmakta ve intestinal bariyer mekanizması için çok önemli olan mukozanın temel salgısı konumundaki müsin miktarını artırmaktadır. Ayrıca bütirat, İBH semptomlarının azaltılmasında da rol oynamaktadır. Diğer bileşenlerden olan asetat ve propiyonat ise sırasıyla patojen mikroorganizmaların çoğalmasını engellemekte ve antiproliferatif etki göstererek kanseri önleyici rol oynamaktadır (Markowiak-Kopeć ve Śliżewska 2020).

2.9.1. Prebiyotik Uygulamasının Kolesterol Metabolizması Üzerine Etkileri

Prebiyotikler, probiyotik bakterilerin aktivitelerini ve intestinal kanaldaki gelişimlerini artırarak çeşitli rahatsızlıklara ait olumsuz tablonun düzeltilmesinde görev almaktadır. Bu düzeltme işlemi probiyotiklerin sahip oldukları enzimler veya salgıladıkları metabolitler aracılığıyla gerçekleşmektedir. Literatürde prebiyotiklerin obezite karşıtı fonksiyon gösterdiği, konstipasyonu önlediği, antikanserojen kapasiteye sahip olduğu, hipolipidemik etki oluşturduğu ve

kolesterol metabolizması parametrelerini olumlu yönde değiştirdiğini belirten çalışmalara rastlanmaktadır (Anandharaj ve ark., 2020; Ooi ve Liong, 2010). Prebiyotikler hakkında yapılan çalışmalar incelendiğinde büyük çoğunluğunun bağırsak sağlığını ilgilendiren rahatsızlıklarla ilgili olduğu görülmektedir. Ancak son yıllarda lipit ve kolesterol metabolizması parametreleri ile prebiyotik kullanımı arasındaki ilişkinin incelendiği çalışma sayılarında artış görülmekte ve prebiyotik takviyesinin dozu, şekli ve kaynağının söz konusu parametreler üzerindeki etkileri netleştirilmeye çalışılmaktadır (PubMed, 2022).

Fazla kilolu ve obez bireylerle gerçekleştirilen RKÇ'lere ait verilerin kullanıldığı bir meta-analizde bazı prebiyotik türlerinin çeşitli lipit ve kolesterol parametreler üzerindeki etkisi ölçülmüştür. Prebiyotik uygulamasının serum TK ve LDL-K düzeylerini önemli ölçüde azalttığı ancak serum TG ve HDL-K düzeylerini ise önemli ölçüde değiştirmediği saptanmıştır (Beserra ve ark., 2015). Mahboobi ve ark. (2018) ise T2DM'li bireylere prebiyotik takviyesi olarak inülin, fruktooligosakkarit (FOS), galaktooligosakkarit (GOS) ve laktülozun uygulandığı RKÇ verilerini meta-analizlerinde incelemişlerdir. Prebiyotik takviyesinin ortalama serum TK ve TG düzeylerini anlamlı düzeyde düşürdüğü, serum HDL-K düzeylerini ise önemli oranda yükselttiği gözlemlenmiştir. Öte yandan prebiyotik uygulamasının ortalama serum LDL-K düzeylerini de düşürdüğü ancak bu düşüşün istatistiksel olarak anlamlılığa ulaşmadığı görülmüştür (Mahboobi ve ark., 2018).

2.9.2. Prebiyotiklerin Hipokolesterolemik Etkilerinin Mekanizması

Prebiyotiklerin hipokolesterolemik etki oluşturmalarının altında yatan temel mekanizma kolesterol düşürücü kapasiteye sahip probiyotik mikroorganizmaların miktarını artırması ve gelişimini desteklemesidir. Probiyotikler kolonda bulunan prebiyotikleri substrat olarak kullanmakta ve bu sayede bağırsak mikrobiyota örüntüsünde dominant hale gelmektedir. Bu sayede bazı probiyotik bakteri türlerinde bulunan; BSH aktivitesi, kolesterol asimilasyonu, kolesterol katabolizasyonu ve sekonder safra asitleriyle birlikte kolesterolün çöktürülmesi gibi kolesterol düşürücü fonksiyonel özelliklerin aktivitesinde artış görülmektedir. Ayrıca prebiyotiklerin probiyotik bakteriler tarafından fermente edilmesi sonucu

açığa çıkan KZYA bileşenlerinin de kolesterol metabolizması üzerine etkileri bulunmaktadır. Asetat karaciğerlerde de novo kolesterol sentezi ve trigliserit sentezinde substrat olarak kullanılmakta iken propiyonat ise karaciğerde kolesterol sentezinde yer alan lipojenik enzimlerin ekspresyonunu ve LDL-K yapımını inhibe etmektedir. Bu yüzden prebiyotiklerin fermentasyonu sonucu bağırsaklarda açığa çıkan “propiyonat/asetat” oranı hipokolesterolemik kapasitenin belirlenmesi için önem arz etmektedir. Sonuç olarak probiyotiklere benzer biçimde prebiyotik türlerin hepsinin de hipokolesterolemik etkiye sahip olduğunu söylemek mümkün değildir. Prebiyotiklerin çeşidine ve dolayısıyla fermente edilmesi sonucu açığa çıkan KZYA bileşen oranına göre kolesterol düşürücü etkileri farklılık göstermektedir (Yalınay, 2020).

Yakın zamana kadar yapılan çalışmalarda; prebiyotik uygulamasının metabolizma üzerinde oluşturduğu olumlu etkilerin yalnızca probiyotiklerin gelişimine sağladığı katkılardan kaynaklandığı düşünülmekteydi. Son zamanlarda ortaya çıkan birtakım deneysel veriler, prebiyotiklerle ilgili bu hipotezin yanlış olmadığını ancak eksik olabileceğini düşündürmüştür. Çeşitli güncel çalışmalar, prebiyotiklerin metabolik etkilerinin yalnızca probiyotiklerin gelişimi üzerinden dolaylı yoldan değil de bazı metabolik reaksiyonlara dahil olarak direkt bir biçimde metabolizmaya direkt etki ettiğini de belirtmektedir. Ortamdaki prebiyotik varlığının dolaylı ya da direkt olarak etkisinin olduğunun düşünüldüğü metabolik reaksiyonlardan birisi de hiperkolesterolemi tablosudur (Korcz ve ark., 2018).

Adebola ve ark. (2020), BSH aktivitesine sahip probiyotik bir suş olan “*Lactobacillus acidophilus* NCTC 1723” ile in vitro bir çalışma gerçekleştirmişlerdir. Bu çalışmada bakterinin gelişme ortamına %1 oranında eklenen inülinin kolik asit salınımını artırdığı ancak yine aynı miktarda ilave edilen laktüloz ve laktobiyonik asidin ise kolik asit salınımını azalttığı gösterilmiştir (Adebola ve ark., 2020). Diğer bir in vitro çalışmada ise farklı kaynaklardan izole edilen probiyotik suş karışımının gelişme ortamına %1 oranında GOS, laktüloz, inülin ve staçiyoz gibi prebiyotikler eklenmiştir. Söz konusu çalışmada prebiyotik kaynaklarının probiyotik suşların kolesterolü asimile etme yeteneklerini kontrol grubuna göre ne ölçüde değiştirdiği araştırılmıştır.

Ortamdaki kolesterol miktarında en fazla düşüşe neden olan prebiyotik kaynağı GOS (%50) olarak saptanmıştır. Staçiyoz ve laktülozun da ortama ilave edilmesiyle kolesterol asimilasyonunun sırasıyla %47.19 ve %44.60 oranında arttığı ancak benzer bir kolesterol düşürücü etkinin inülin ilavesi sonucu görülmediği belirtilmiştir (Kuerman ve ark., 2020).

Yukarıda bahsi geçen bu iki güncel çalışma sonucu prebiyotik kaynağının çeşidine bakılmaksızın probiyotik suşların aktivitesini artıracak ve bu sayede kolesterol düşürücü etki oluşturacak fikri tekrar gözden geçirilmeye başlanmıştır. Bu çalışmalardan elde edilen bilimsel çıktılar; prebiyotiklerin kolesterol düşürücü etkilerini, probiyotik suşların sahip olduğu hipokolesterolemik mekanizmalara direkt olarak etki ederek gösterebileceğine de dikkat çekmektedir. Ayrıca prebiyotiklerin sahip olduğu hipokolesterolemik etkinin probiyotik suş türüne spesifik olarak değişebileceği ise ilgi çekici diğer bir noktadır. Literatürdeki çalışmalara bakıldığında klinik ve deneysel çalışmalarda hipokolesterolemik etkileri açısından en çok araştırılan prebiyotik türlerinin inülin, FOS ve GOS olduğu görülmüştür (Mohanty ve ark., 2018). Ancak çeşitli besinler ve besin öğelerinin prebiyotik kapasitesinin araştırıldığı çalışmaların sayısı her geçen gün artmakta ve bu çalışmalar sonucu bazı yeni nesil prebiyotikler keşfedilmektedir. Son zamanlarda doğadaki besinlerin içeriğinde çok az miktarda bulunmasından ötürü “nadir şekerler” olarak adlandırılan ve çeşitli metabolik fonksiyonlara etki etme potansiyeline sahip monosakkarit yapıdaki bazı yeni nesil prebiyotikler ilgi çekmektedir. Söz konusu bu nadir şekerler arasında D-allüloz, D-sorboz ve D-tagatoz gibi monosakkaritler bulunmaktadır. Bu nadir şekerlerin başında ise ilk etapta glisemik kontrol üzerindeki olumlu etkileriyle ön plana çıkmış ardından yapılan çeşitli çalışmalarda prebiyotik fonksiyon sergileme yeteneğinin de var olduğu görülen yeni nesil bir nütrasötik olan D-tagatoz gelmektedir (Roy ve ark., 2018).

2.10. Sinbiyotik Tanımı

Sinbiyotik ifadesi, probiyotik suşlar ve prebiyotiklerin birlikte uygulanmasıyla konakçının metabolik parametrelerinde olumlu değişiklikler yaratan kombinasyona verilen isimdir. Probiyotik bir bakteri ile prebiyotik bir besin

bileşeninin sinbiyotik olarak kabul edilebilmesi için temel şart, bu bileşenler arasında sinerjistik bir etkinin var olmasıdır. Literatürdeki çalışmalarda, sinbiyotiklerin gastrointestinal hastalıklar, alt ve üst solunum yolları enfeksiyonları, T2DM, NAFLD, kanser ve hiperkolesterolemi gibi çeşitli rahatsızlıklar üzerinde terapötik etkilerinin olduğu bildirilmektedir (Mohanty ve ark., 2018).

2.10.1. Sinbiyotik Uygulamasının Kolesterol Metabolizması Üzerine Etkileri

İn vivo bir çalışmada probiyotik bir suş olan *L. casei* ASCC 292 ile birlikte prebiyotik kaynaklarının bir formda maltodekstrin, diğer formda ise FOS olduğu iki ayrı sinbiyotik form oluşturulmuştur. Bu sinbiyotik formlar ratlara uygulanmış ve bazı kolesterol ve lipid parametrelerindeki değişimler incelenmiştir. İki ayrı sinbiyotik formunda serum LDL-K düzeylerini önemli düzeyde düşürdüğü ancak serum HDL-K düzeylerini anlamlı ölçüde değiştirmediği saptanmıştır. Serum TK ve TG düzeylerini ise sadece prebiyotik kaynağı olarak FOS içeren sinbiyotik formun istatistiksel olarak anlamlı biçimde düşürdüğü gözlemlenmiştir (Liong ve Shah, 2006). Hadi ve ark. (2020), 23 RKÇ verilerini inceledikleri meta-analiz çalışmalarında, sinbiyotik uygulamasının kolesterol parametreleri üzerine etkisini araştırmış ve sinbiyotik kullanımının; plazma TK, TG ve LDL-K düzeylerini sırasıyla ortalama 10.17 mg/dl, 14.30 mg/dl ve 8.32 mg/dl azalttığını saptamışlardır. Ayrıca plazma HDL-K düzeyi ortalamalarının ise 1.3 mg/dl arttığı da belirtilmiştir (Hadi ve ark., 2020). Öte yandan Karimi ve ark. (2020) ise polikistik over sendromuna (PKOS) sahip kadınlarla gerçekleştirdikleri RKÇ tipi araştırmada; müdahale grubuna yedi ayrı suşu içeren bir probiyotik karışımıyla birlikte prebiyotik kaynağı olarak inülinin kullanıldığı sinbiyotik verilmiş ve serum TK ile TG düzeylerinin anlamlı şekilde değişmediği gözlemlenmiştir (Karimi ve ark., 2020).

2.10.2. Sinbiyotiklerin Hipokolesterolemik Etkilerinin Mekanizması

Probiyotiklerin ve prebiyotiklerin sahip olduğu hipokolesterolemik etkiler ve bu etkilerin altında yatan mekanizmalar çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir. Teorik olarak probiyotik ve prebiyotiklerin birlikte sinbiyotik olarak uygulamasının tek başına probiyotik ya da prebiyotik uygulamalarına kıyasla daha güçlü kolesterol

düşürücü etki yaratması beklenmektedir. Çünkü probiyotik ya da prebiyotiklerin tek başlarına sahip olduğu metabolik etkilerin sinbiyotik formda sinerjistik bir şekilde güçleneceği öngörülmektedir. Sinbiyotik formun içinde serum kolesterol seviyelerinin azaltılmasında başrolü çoğunlukla probiyotikler oynamaktadır. Probiyotik bakteriler ortamda bulunan kolesterolü hücre duvarlarına bağlayarak ve hücre zarının yapısına dahil ederek düşürebilmektedir. Bununla birlikte probiyotikler sahip oldukları BSH aktivitesi sayesinde safra tuzlarını dekonjuge edebilmekte ve safra tuzlarını içeren yeni safra sıvısı sentezinde de kolesterol havuzundaki kolesterol molekülleri substrat olarak kullanılmaktadır. Bu sayede probiyotik kaynaklı hipokolesterolemik bir etki ortaya çıkmaktadır. Ayrıca safra tuzlarının dekonjugasyonu sonucu açığa çıkan sekonder safra asitleri ortamdaki kolesterolü çöktürmekte ve çökelen kolesterolün feçesle atımı ise artmaktadır. Son olarak probiyotikler tarafından kolesterolün asimilasyonu ve katabolizasyonu gerçekleştirilebilmekte ve böylece ortamdaki kolesterol varlığı azaltılmaktadır. Prebiyotikler ise kolesterol düşürücü etki bakımından sinbiyotik form içinde genellikle yan rolü oynamaktadır. Prebiyotikler, probiyotikler tarafından fermentasyona uğratarak hem probiyotiklerin gelişimini desteklemekte hem de fermentasyon sonucu açığa çıkan propiyonat gibi bazı KZYA bileşenleri üzerinden kolesterol sentezini inhibe etmektedir. Probiyotik ve prebiyotiklerin sahip olduğu bu etkiler sinbiyotik form içinde ortak olarak yer almaktadır. Sonuç olarak ise sinbiyotiklerin ortamdaki kolesterol miktarını probiyotik ya da prebiyotiklere göre daha etkili ve anlamlı düzeyde düşürmesi beklenmektedir (Anandharaj ve ark., 2014; Shehata ve ark., 2019).

2.11.1. D-tagatozun Tarihçesi

Ünlü Fransız kimyager Théophile-Jules Pelouze, 1852 yılında kuş üvezi (*Sorbus Aucuparia L.*) bitkisinin bakterilerle fermente edilmesi sonucu üretilen bir içecekten tatlı tada sahip ve kristal yapıda bir organik bileşik izole etmiştir. Pelouze, bu bileşiğe “sorbine” (sorbin) adını vermiş ve kimyasal/fiziksel özelliklerinden ötürü bileşiğin basit bir tür karbonhidrat olduğunu belirtmiştir. Daha sonra Alman kimyager Hermann Emil Fischer ise “sorbine” (sorbin) adı verilen bu bileşiğin fenilhidrazin ile tepkimeye girdiğini göstermiştir. Bunun üzerine bir başka Alman kimyager olan Carl Wilhelm Bernhard Scheibler,

fenilhidrazin ile tepkimeye girebilen bu bileşiğin adının sonuna diğer basit karbonhidratlar gibi -oz ekinin getirilmesini ve adının “sorbinose” (sorbinoz) olarak değiştirilmesini teklif etmiştir. Söz konusu öneri bilim dünyasında kabul görmüş ve zaman geçtikçe de “sorbinose” (sorbinoz) ifadesi yerine sıklıkla kullanılan “sorbose” (sorboz) kelimesi literatürde kendine yer bulmuştur. Pelouze tarafından yapılan keşiften yaklaşık yarım yüzyıl sonra ise Lobry de Bruyn ve Van Ekenstein aldaz yapısındaki bileşiklerle zayıf bazların tepkimeye girmesi sonucu ketoz yapıda iki kimyasal bileşenin oluştuğunu saptamıştır. Bu iki bilim adamı yaptıkları bir deneyde ise kimyasal yapısı bilinen D-galaktozun zayıf bir baz ile tepkimesi sonucu D-sorboz ve henüz keşfedilmemiş bir bileşiğin oluştuğunu fark etmişlerdir. Bu yeni bileşiğe ise D-galaktozun alfabetik harflerinden esinlenerek D-tagatoz adını vermişlerdir (Karabinos, 1952; Kim, 2004).

D-tagatoz, kimyasal yapısının tayin edildiği 19. yüzyılın ortasından 20. yüzyılın sonuna kadar yalnızca bir karbonhidrat türevi olarak görülmüştür. D-tagatozun besin değeri ya da bir diyet bileşeni olarak kullanımı hakkında herhangi bir bilimsel girişimde bulunulmamıştır (Vastenavond ve ark., 2012). D-tagatozu bilim dünyasına düşük enerjili tatlandırıcı veya yeni nesil bir fonksiyonel besin olarak ilk defa, Amerikalı bir mühendis Dr. Gilbert Levin tanıtmıştır. Dr. Levin, Ulusal Havacılık ve Uzay Dairesi (NASA) kurumunda görev almış ve 1960-1980 yılları arasında diğer gezegenlerde hayatın olup olmadığının araştırıldığı büyük çaplı projelerde bulunmuş bir bilim insanıdır. Bu projelerden birisi olan ve Mars gezegeninde canlılık ya da yaşam kalıntılarının araştırıldığı bir çalışmada Levin, Viking-1 ve Viking-2 adlı uzay araçlarını geliştirmiştir. Bu araçlarla Mars yüzeyinden toprak numuneleri alınmış ve canlılık/yaşam belirtileri olarak kabul edilebilecek mikroorganizma varlığı araştırılmıştır. Levin ve ekibinin buradaki temel hipotezi şu şekilde oluşturulmuştur. Canlılık ve yaşama dair metabolik faaliyetlerin tümü bir substrata diğer bir ifadeyle bir besin maddesine ihtiyaç duymaktadır. Viking-1 ve Viking-2 uzay araçları ile Mars yüzeyinden alınan toprak örneğinin içine tüm metabolik faaliyetlerdeki temel substrat olan glikoz eklenmiştir. Ardından gaz çıkışının olup olmadığı kontrol edilerek canlı mikroorganizma varlığı ispatlanmaya çalışılmıştır. Başlangıçta bu deneyde glikoz

türü olarak D-glikozun kullanılmasına karar verilmiştir. Çünkü glikozun diğer bir enantiyomeri (aynı kimyasal formüle sahip ancak ışığı zıt yönlerde kıran özdeş bileşenler) olan L-glikoz, yeryüzündeki canlı organizmalar tarafından metabolize edilememektedir. Ekip, çeşitli monosakkaritlerin kimyasal yapılarının aynı olmasına rağmen enantiyomer formları farklı olduğundan dolayı biyolojik reaksiyonlarda farklı tepkiler oluşturduğu bilimsel gerçeğinden yola çıkarak bir fikir geliştirmiştir. Canlılığın arandığı gezegen olan Mars, dünyadan tamamen farklı bir gezegen olduğu için burada muhtemelen var olabilecek canlıların metabolizmalarının da yeryüzündeki organizmalardan tamamen farklı olabilme ihtimali bulunmaktadır. Yani dünyada tüm canlılık faaliyetleri için gerekli ve metabolize edilebilir formdaki temel substrat D-glikoz iken Mars' ta bu substratın L-glikoz olarak karşımıza çıkabilme ihtimali de bulunmaktadır. Bu yüzden en yeni ve pahalı teknolojilerin kullanıldığı bu projede hiçbir ihtimalin gözden kaçırılmaması gerektiği düşünülmüş ve Mars yüzeyinden alınan toprakta araştırılacak olan canlılıkta substrat olarak hem D-glikoz hem de L-glikozun kullanılmasına karar verilmiştir. Tüm bu uzay araştırmaları Dr. Levin için bir dönüm noktası olmuş ve L-glikoz gibi monosakkaritlerin L-izomer formlarının (L-fruktoz, L-glikoz vb.) insanlar tarafından sindirilemediğini öğrenmiştir. Buradan yola çıkan Dr. Levin, insan sindirim sisteminde sindirilemeyen monosakkarit kaynaklarının diyetle yer alan sükroza alternatif olabileceği fikrini geliştirmiştir (NASA, 2004).

Ardından yapılan çalışmalarda L-glikozunda organoleptik özellik bakımından sükroz gibi tatlı olduğu saptanmıştır. Sonuç olarak sükroz gibi tatlı olan ancak sindirimi oldukça düşük bir besin bileşeninin yeni nesil bir tatlandırıcı olarak kullanılabilme potansiyeli olduğu görülmüştür. Fakat sükroza alternatif olabilecek bir tatlandırıcının sahip olması gereken özelliklerin yalnızca metabolik ve organoleptik uygunluk olmadığı aynı zamanda besin endüstrisinde kullanımının sükroza kıyasla daha maliyetli olmaması gerektiği de belirlenmiştir. Yapılan araştırmalar sonucu L-glikoz üretiminin oldukça pahalı bir teknik gerektirdiği ve üretilen L-glikozun gıda sanayisinde kullanılmak için ekonomik olmadığı sonucuna varılmıştır (Levin, 2002).

2.11.2. D-tagatozun Tanımı, Özellikleri, Metabolizması ve Kullanım Güvenilirliği

Nadir şekerlerden birisi olan ve düşük enerjili tatlandırıcılar kategorisine giren D-tagatoz monosakkarit yapısındaki bir bileşendir. D-tagatoz ya da literatürde daha bilinen ismiyle tagatoz, tatlılık derecesi bakımından günümüzde en sık kullanılan karbonhidrat kaynağı olan sükroza %92 oranında benzemektedir. Enerji değeri gram başına yaklaşık 1.5 kilokalori (kkal) olarak hesaplanmıştır (Guerrero-Wyss ve ark., 2018). Ancak tagatozun sahip olduğu bu enerji değerinin gerçek değerinden daha yüksek hesaplandığı düşünülmektedir. Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi adlı kuruluşa tagatozun enerji değerinin tescil edilmesi için yapılan başvurunun temelini oluşturan in vivo çalışmada; tagatozun sindirime uğradıktan sonra ince bağırsaklardan %100 oranında geri emildiği kabul edilerek enerji hesabı yapılmıştır. Yapılan hesaplama sonucu; tagatozun enerji değeri 1.5 kkal olarak bulunmuş ve FDA enerji değerini bu şekilde tescillemiştir. Ancak daha sonra domuzlarla ve ratlarla yapılan çalışmalarda ince bağırsaklardan emilen tagatoz miktarının maksimum %20 - %25 aralığında olduğu belirtilmiş; geriye kalan %75 gibi yüksek miktardaki oranının kolona ulaşarak burada fermente edildiği gösterilmiştir (Laerke ve Jensen, 1999; Saunders ve ark., 1999). Sonuç olarak tagatozun gram başına sahip olduğu enerji miktarının görece yüksek hesaplandığı görülmektedir. Nitekim Livesey ve Brown (1996), ratlarla yaptıkları bir çalışmada tagatozun enerji alımına katkısının dikkate alınmayacak ölçüde küçük değerler olduğunu ve önemsenmemesi gerektiğini belirtmişlerdir (Livesey ve Brown, 1996).

Tagatozun halihazırda gıda sanayisinde kullanılan tatlandırıcılardan en önemli farkı; özellikle de unlu mamulleri ve pastacılık ürünlerinde hacim artırıcı etkiye sahip olmasıdır. Steviosit, neotam, sükraloz, sakarin, aspartam ve asesülfam potasyum gibi tatlandırıcılar, sükrozun 200 -400 katına kadar tatlılığa sahip olsa da hacim artırıcı fonksiyon göstermemektedir. Genellikle içeceklere eklenen bu tatlandırıcı çeşitlerinin çok az miktarı ile istenilen tatlılık oranındaki ürünler elde edilebilmektedir. İçecekler için tercih edilen bir duyu kalite kriteri olmayan hacim artırıcı kapasite, söz konusu unlu mamuller ve pastacılık ürünleri olduğunda ise tüketim açısından vazgeçilmez bir unsur olarak görülmektedir.

Ayrıca tagatoz dilde herhangi bir soğutma etkisine yol açmamakta ve neredeyse tüm yapısal özellikler açısından sükroz ile mükemmel bir uyum sergilemektedir. Tagatozun bazı fiziksel ve kimyasal özellikleri Tablo 2.4’te özetlenmiştir (Levin, 2002).

Tablo 2.4. D-tagatozun bir tatlandırıcı olarak sahip olduğu bazı fiziksel, kimyasal ve biyolojik özellikleri

Özellikler	Değer
Kimyasal tür	Monosakkarit (keto)
Kimyasal formül	$C_6H_{12}O_6$
Molekül ağırlığı	180
Fiziksel form	Beyaz kristal (katı)
Koku	Hayır
Erime Noktası	134 °C
Görece tatlılık oranı (Sükroz ile kıyaslandığında)	%92 (Ağırlıkça %10’ luk sulu çözeltide)
Tatlılık düzeyi	Neredeyse sükroz ile eş düzeyde
Stabil olduğu pH aralığı	2-7
Çözünürlük	Ağırlıkça %58 (21 °C)
Soğutma etkisi	Hayır
Kalori değeri	1.5 kkal/g
Maillard reaksiyonu ve karamelizasyon	Evet
Potansiyel medikal etkileri	Antidiyabetik, Obezite karşıtı, Prebiyotik

Bir nadir şeker türü olan tagatoz; sterilize inek sütü, süt tozu, elma, ananas, portakal, çikolata, çeşitli peynirler ve yoğurt gibi besinlerde oldukça düşük miktarlarda bulunmaktadır. Bazı besinlerin tagatoz içeriği Tablo 2.5’te verildiği gibidir (Skytte, 2006).

Tablo 2.5. Doğal besinlerin D-tagatoz içerikleri

Besinler	Miktar (mg/kg)
Elma	3500
Ananas	1800
Portakal	1500
Kuru Üzüm	800
Yaban Mersini Konsantresi	700
Tam Buğday	100
Kuru Fasulye	100
Sterilize Süt	2000-3000
Süt Tozu	800
Sütlü Sıcak Çikolata	140-1000
Süt (UHT)	5
Rokfor Peyniri	20
Parmesan Peyniri	10
Yoğurt	29

Doğal besinlerde bulunan tagatoz miktarları incelendiğinde; tagatozun metabolik etkilerinin ortaya çıkabilmesi için gereken miktarlara diyetle alım vasıtasıyla ulaşılamayacağı göze çarpmaktadır. Bu yüzden tagatozun bir tatlandırıcı olarak glisemik kontrol üzerindeki olumlu metabolik etkilerinin gözlemlenebilmesi için diyetle dışarıdan ilave edilmesi gerekmektedir. Günümüzde gıda sanayisinde tagatoz içeren besinler; dondurmalar, unlu mamüllere, kahvaltılık gevreklerden glutensiz ürünlere, diyabetik ürünlerden çikolata çeşitlerine varana kadar geniş ürün yelpazesine sahiptir. Modern gıda sanayisinde tagatozun üretimi iki farklı şekilde gerçekleştirilmektedir. Bu üretim şekillerinden birincisi kimyasal metot olup son zamanlarda üretimde bu yol artık tercih edilmemektedir. Çünkü bu metotla tagatozun üretimi, birtakım kompleks reaksiyonlara ve yüksek maliyete sahiptir. Tagatozun üretiminde kullanılan ve günümüzde daha popüler olan ikinci üretim şekli ise biyolojik metottur. Bu üretim şeklinde ise daha çok probiyotik özellikleriyle ön plana çıkan LAB bakterileri kullanılmakta ve tagatozun üretimi bu bakterilerin sahip olduğu “L-arabinoz izomeraz” enzim aktivitesi aracılığıyla gerçekleştirilmektedir. Gıda sanayisinde en çok kullanılan ham maddelerden birisi olan peynir altı suyu içeriğindeki D-tagatoz, bu enzim sayesinde çeşitli metabolik basamaklar sonucu D-tagatoz ya da diğer bir ifadeyle tagatoza dönüştürülmektedir. Biyolojik metodun en önemli avantajları arasında saflaştırma işleminin kolaylığı ve düşük maliyeti bulunmaktadır (Kim, 2004; Oh, 2007).

D-fruktoz ile d-tagatozun moleküler konfigürasyonu arasında C-4 atomik pozisyonu yerleşiminden kaynaklanan yapısal bir farklılık bulunmaktadır. Bu durum, D-tagatozu D-fruktozun bir epimerine dönüştürmekte ve diğer monosakkaritlere kıyasla daha az miktarda emilmesine yol açmaktadır. Atomik yerleşimdeki söz konusu bu ufak farklılık ince bağırsaklardan emilen fruktoz ve tagatoz miktarlarının önemli düzeyde değişmesini sağlamıştır. Çünkü her iki monosakkaritin de emilimine aracılık eden “fruktoz aktaran taşıma sistemi” D-fruktoza karşı yüksek bir afiniteye sahip iken D-tagatoza karşı ise oldukça düşük afinite sergilemektedir. Bu yüzden D-tagatozun yalnızca %20-25 arasındaki miktarı ince bağırsaklardan emilmektedir (Lu ve ark., 2008).

Fruktoz ve tagatozun ince bağırsaklardan emilen miktarları farklı olmasına rağmen metabolize edilmelerinde rol alan yollar birebir aynıdır. Fakat tagatozun

metabolize olma hızı fruktoza kıyasla %50 oranında daha yavaş gerçekleşmektedir. Çünkü hem tagatozu hem de fruktozu fosforile edip metabolize olmalarını başlatan fruktokinaz enziminin fruktoza karşı olan afinitesi, tagatoza karşı olandan daha yüksektir. Tagatoz ve fruktozun diyetle birlikte alımı sonucu her ikisi de fruktokinaz enzimi tarafından fosforilasyona uğratılmakta ve sırasıyla tagatoz-1-fosfat ve fruktoz-1-fosfat molekülleri oluşmaktadır. Ancak yukarıda da bahsi geçen afinite farkından dolayı, bu monosakkaritler enzim açısından bir rekabete girmektedir. Bu rekabeti fruktokinaz enzimini bağlama kapasitesi daha yüksek olan fruktoz kazanmakta ve daha fazla miktarda fruktoz-1-fosfat molekülü oluşmaktadır. Söz konusu fruktoz-1-fosfat molekülü ise hem glikozdan glikojen sentezlenmesinde rol alan glikokinaz enzimi aktivitesini artırarak hem de glikojenin hidrolizinde görev alan glikojen fosforilaz enzimini inhibe ederek karaciğerde bulunan glikojen düzeyini yükseltmektedir. Sonuç olarak ise kan dolaşımında bulunan glikoz moleküllerinin sayısı glikojen deposuna dönüştürülerek düşürülmektedir (Williams, 2017).

Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi, 2001 yılında tagatozu tüketim açısından GRAS ürünler sınıfına almıştır. Ardından Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA)' de tagatozu kullanımında herhangi bir kısıtlama olmayan bir besin bileşeni olarak kategorize etmiştir (Lu ve ark., 2008). Tagatozun kullanım güvenilirliği, GRAS etiketini aldığı 2001 yılına kadar olan süreçte çeşitli çalışmalarla test edilmiştir. Bu çalışmalardan birisi, D-tagatozun olası toksik etkilerini araştırmak için Kruger ve meslektaşları tarafından yürütülmüştür. Söz konusu çalışmada ratlara gestasyonun 6. – 15. günleri arasını kapsayan sürede gastrik gavaj yoluyla sırasıyla düşük (4.000 mg/kg), orta (12.000 mg/kg) ve yüksek (20.000 mg/kg) doz olacak şekilde üç farklı d-tagatoz uygulaması gerçekleştirilmiştir. Farklı doz gruplarına ait ratların tümünün karaciğerleri histopatolojik muayeneden geçirilmiş ve d-tagatoz kaynaklı olabileceği düşünülecek hiçbir toksikolojik bulguya rastlanmamıştır. Bununla birlikte d-tagatoz uygulamasının üreme fonksiyonları ve kapasitesi üzerinde de herhangi bir olumsuz etkiye sahip olmadığı saptanmıştır. Ayrıca d-tagatozun üç farklı doz uygulama gruplarının hiçbirinde fetal vücut ağırlığı, cinsiyet dağılım oranı, karaciğer ağırlığı, vücudun dış görünüşünü

etkilemediği ve iskelet ya da viseral bölgede bulunan malformasyonlar gibi fetusa ait herhangi bir yan etkiye yol açmadığı bildirilmiştir (Kruger ve ark., 1999a).

D-tagatozun uzun süre boyunca oral olarak tüketimi sonucu ortaya çıkabilecek potansiyel toksik etkilerini araştırmak için yukarıda da bahsi geçen Kruger ve meslektaşları (1999) aynı ekip ile bir başka çalışma daha gerçekleştirmişlerdir. Bu araştırmada d-tagatoz yem miktarının kütlece sırasıyla %5, %10, %15 ve %20' sini oluşturacak şekilde diyetle eklenmiş ve 90 gün boyunca ratların bu yemleri tüketmesi sağlanmıştır. Çalışma sonucu sadece yem miktarının kütlece %15 ve %20' sini d-tagatozun oluşturduğu gruplarda geçici süreli dışkı kıvamında yumuşama görülmüş ancak zaman geçtikçe ratların gastrointestinal sisteminin bu duruma adaptasyon gösterdiği ve söz konusu semptomların ortadan kalktığı bildirilmiştir. Yem tüketimi ile birlikte yüksek doz d-tagatoz alan bazı ratlarda minimal düzeyde karaciğer hipertrofisi görülmüş ancak bu durumun histopatolojik herhangi bir değişime yol açmadığı yapılan analizlerle saptanmıştır. Sonuç olarak d-tagatozun; 90 gün gibi uzun bir süre boyunca diyetle yüksek miktarlarda tüketildiğinde bile (günlük tüketilen yem miktarının %15 ve %20' si kadar) istenmeyen herhangi bir toksik ya da metabolik yan etkiye sahip olmadığı tespit edilmiştir (Kruger ve ark., 1999b).

D-tagatoz kullanımı hakkında elde edilen bu olumlu verilerden sonra genotoksik özellikleri de ortaya çıkarılmak istenmiş ve bir başka çalışma daha gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma in vitro koşullarda 5 ayrı standart test ile yürütülmüş ve d-tagatozun herhangi bir genotoksik yan etkiye sahip olmadığı bildirilmiştir (Kruger ve ark., 1999c). Bär ve arkadaşları (1999), çeşitli düzeylerde d-tagatoz alımı ile karaciğer ağırlığında görülen artış arasındaki ilişkiyi araştırmak istemiş ve ratlarla bir çalışma gerçekleştirmişlerdir. Bu çalışma sonucunda da daha önceki çalışmalarla uyumlu biçimde elektron mikroskobu ile gerçekleştirilen karaciğere ait histopatolojik analizlerde olumsuz bir duruma rastlanmamış ancak d-tagatozun yemin ağırlıkça %15 ve %20'sini oluşturduğu durumlarda karaciğer ağırlıklarının minimal düzeyde de olsa artış gösterdiği saptanmıştır. Söz konusu çalışmada klinikte karaciğer paneli olarak adlandırılan ve karaciğerde oluşan hasarlanmaya dair veriler sunan testler gerçekleştirilmiştir. Bu panelin önemli bileşenlerinden olan plazma alanin aminotransferaz (ALT), aspartat

aminotransferaz (AST), gama glutamil transferaz (GGT) ve alkalen fosfataz (ALP) gibi enzim düzeyleri incelenmiş ve bu enzim düzeylerinin fizyolojik aralıklar içerisinde olduğu saptanmıştır. Karaciğerin minimal düzeyde de olsa hipertrofik hale gelmesindeki temel sebebin artan glikojen depoları olduğu saptanmıştır. Karaciğerlerde görülen bu ağırlık artışının sebebinin d-tagatozun fosforilasyonu olduğu belirtilmiştir. D-tagatozun karaciğerde fruktokinaz enzimi tarafından fosforile edilmesi sonucu d-tagatoz-1-fosfat oluşmakta ve söz konusu bu molekül glikokinaz enzim aktivitesini artırmaktadır. Aktivitesi artan glikokinaz enzimi, glikozun glikoz-6-fosfata dönüşümünü hızlandırmakta ve glikoz-6-fosfat düzeylerindeki artış ise glikojen sentaz enzimini aktive etmektedir. Tüm bu süreçlerin sonucunda karaciğerde sentezlenen glikojen miktarı artmakta ve hipertrofinin altında yatan mekanizmanın bu olduğu düşünülmektedir. Özetle in vivo ortamda doğrulanan deneylerle d-tagatoz tüketiminin metabolizma üzerinde herhangi bir toksik yan etkiye yol açmadığı bulunmuştur (Bär, 1999; Bär ve ark., 1999).

2.11.3. Yeni Nesil Bir Tatlandırıcı Olarak D-tagatoz

Diyetle alınan en önemli karbonhidrat kaynaklarından birisi de sükrozdur. Sükroz, hem beslenmemizde çeşitli yiyecek ve içeceklerin içinde hem de gıda sanayisinde unlu mamuller, içecekler, dondurma, şekerleme, çikolata, tatlı, reçel, pastacılık ürünleri ve çeşitli hazır gıdalar gibi oldukça geniş skaladaki ürünlerin içeriğinde bulunmaktadır. Sükroz temelde sahip olduğu tatlılık özelliğinden ötürü çeşitli yiyecek ve içeceklere eklenmektedir. Sükroz, gram başına 4 kkal enerji içermektedir. Sükrozun diyetle sürekli tüketimi sonucu ise zamanla önemli düzeyde enerji fazlası oluşmakta ve bu enerji fazlalığı kronik olarak devam ettiğinde ise başta obezite olmak üzere insülin direnci, kardiyovasküler hastalıklar, karaciğer rahatsızlıkları ve bazı kanser türlerine yol açabilmektedir. Ayrıca sükroz yapısında bulunan glikozdan dolayı insülin salınımını etkileyen en temel besin bileşenlerinden birisi olarak görülmektedir. Tüm bu sebeplerden dolayı sükroza alternatif olabilecek besin bileşenleri ya da gıda katkı maddeleri arayışı sonucu tatlandırıcılar ortaya çıkmıştır. Tatlandırıcılar sahip oldukları organoleptik özellikler sebebiyle sükroza benzeyen gıda katkı maddeleridir. Tatlandırıcılar; doğal tatlandırıcılar, yapay tatlandırıcılar ve polyoller (şeker

alkolleri) olmak üzere 3 temel kategori altında sınıflandırılmakta ve eklendileri besinlerin içine tatlı bir tat vererek tüketimini kolaylaştırmaktadır. Ayrıca tatlandırıcılar, insülin salınımını genellikle çok az düzeyde uyararak glisemik kontrolün sağlanmasında etkin rol oynamaktadır. Bununla birlikte sükröz ile kıyaslandığında çok düşük miktarlarda enerji içeriğine sahip olmasından ötürü günlük alınan enerji miktarının kısıtlanmasında da kullanılmaktadır. Son yıllarda ise doğal tatlandırıcılar arasında nadir şekerler olarak adlandırılan grubun bir üyesi olan d-tagatoz adlı monosakkarit ön plana çıkmıştır (İşgören ve Sungur, 2018).

D-tagatoz, yeni nesil bir tatlandırıcı olarak ortaya çıktığı zamandan itibaren glisemik ve insülinemik kontrolü sağlamanın yanı sıra sahip olduğu düşük enerji miktarı sayesinde vücut ağırlığı üzerinde olumlu etkilerinin bulunması, antioksidan kapasiteye sahip olması ve tüketiminin sağlık açısından herhangi bir sorun teşkil etmemesi gibi (GRAS statüsüne sahip olması) avantajlara sahip olduğu görülmüştür (Espinosa ve Fogelfeld, 2010). İn vivo çalışmalar sonucu; bir tatlandırıcı olarak d-tagatozun glisemik kontrolü nasıl etkilediğini gösteren iki önemli mekanizma ortaya koyulmuştur. Bunlardan birincisi, d-tagatozun karaciğerde metabolize olma süreciyle ilişkilidir. D-tagatoz ve fruktozun hepatik metabolizasyon basamakları birbirleriyle aynıdır. Karaciğerde fosforile olan d-tagatoz, d-tagatoz-1-fosfata dönüşmekte ve ardından da dihidroksiaseton fosfat (DHAP) ve gliseraldehit (GA) moleküllerini oluşturacak şekilde metabolize olmaktadır. Bu süreçte hepatik dokulardaki düzeyi geçici olarak artan d-tagatoz-1-fosfat, glikokinaz enziminin translokasyonunu indüklemekte ve böylece glikozun glikoz-6-fosfata dönüşümü sağlanarak glikozdan glikojen oluşum süreci stimüle edilmektedir. Ayrıca d-tagatoz-1-fosfat molekülünün glikojenin hidrolize edilerek glikoz moleküllerinin açığa çıkmasını sağlayan glikojen fosforilaz enzimini de inhibe ettiği gösterilmiştir. Yukarıda belirtilen her iki durumda da d-tagatoz, dolaşımda bulunan glikoz miktarını azaltmakta ve glikojen depolarının artırılmasına katkıda bulunarak glisemik kontrolün sağlanmasında etkin rol oynamaktadır. Son olarak ise ince bağırsaklarda karbonhidratların sindiriminde rol alan sükröz ve maltaz gibi enzimleri inhibe ederek glisemik kontrolün sağlanmasına katkı sağladığı belirtilmiştir. İnce bağırsaklarda disakkaritlerin

sindiriminde görevli sükras ve maltaz enziminin aktivasyonu sonucu glikoz moleküllerinin sayısı artmakta ve dolaşıma katılması sonucu ise kan glikoz düzeyi yükselmektedir (Roy ve ark., 2018).

2.11.4. D-tagatoz ve Kolesterol Metabolizması İlişkisi

Fazla miktarda enerji alımına sebep olan faktörlerin başında rafine şekerler olarak adlandırılan sükras gibi basit karbonhidratlar ve yüksek fruktozlu mısır şurubu (YFMS) gibi besin bileşenleri gelmektedir. Bahsi geçen bileşenler genellikle işlenmiş/hazır gıdalar, ayak üstü beslenme ve gazlı içecekler aracılığıyla vücuda alınmakta ve yiyecek ya da içecekleri tatlandırmak amacıyla kullanılmaktadır. Bununla birlikte söz konusu karbonhidrat türevleri sahip oldukları yüksek kalori içeriklerinden dolayı vücuda alınan enerji miktarını da önemli ölçüde artırmaktadır. Literatürde bulunan çeşitli çalışmalarda fruktoz ve sükras açısından zengin ve yüksek miktarda enerji içeren diyetle beslenmenin yalnızca obeziteye sebep olmadığı aynı zamanda KVH tablosunun ortaya çıkmasında anahtar metabolik faktörlerden olan hiperkolesterolemi oluşumuna da zemin hazırladığı gösterilmiştir (Kelly, 2010; Kong ve ark., 2019). İn vivo çalışmalarda; fruktoz ve sükras gibi basit karbonhidrat kaynakları açısından zengin olan diyet tüketimi sonucu serum TK, VLDL-K, LDL-K ve TG düzeylerinde artış olduğu saptanmış öte yandan ateroskleroz oluşumunun engellenmesinde görevli serum HDL-K düzeylerinin ise düşüş gösterdiği belirlenmiştir (Police ve ark., 2009).

İlk olarak tatlılık derecesi sükrasa oldukça yakın olduğu için dikkatleri üzerine çeken ve yeni nesil tatlandırıcı olarak kullanılma potansiyeli olduğu görülen d-tagatozun metabolize olması sonucu ortaya çıkan enerji miktarının da oldukça düşük olduğu saptanmıştır. D-tagatozun diyetle tüketimi sonucu enerji alımına katkısı çeşitli in vivo çalışmalarda araştırılmıştır. Yapılan çalışmalarda d-tagatozun sahip olduğu kalori değerinin sıfıra yakın olduğunu belirtilmiştir (Livesey ve Brown, 1996). Sonuç olarak d-tagatoz; sükras, fruktoz ya da YFMS gibi besin bileşenlerinin yerine gıdalara tatlandırıcı olarak uygulanınca hem yiyecek ya da içeceklerin sahip olduğu kalori değerlerini düşürmüş hem de sükras ve fruktozun kolesterol parametreleri üzerindeki olumsuz etkilerini ortadan kaldırmıştır (Police ve ark., 2009). Ayrıca daha sonra yapılan çalışmalarla d-

tagatozun prebiyotik kapasiteye de sahip olduğu yapılan çeşitli çalışmalarla ispatlanmış ve bu sayede dolaylı olarak hipokolesterolemik etkilere sahip olduğu belirtilmiştir. Çünkü bağırsak mikrobiyotasında bulunan bazı probiyotik bakteri türleri yapılarında bulunan, BSH gibi enzimatik aktiviteler aracılığıyla safra asitlerinin feçesle atımını artırmakta ve bunun sonucu olarak vücudun kolesterol havuzundan yeni safra üretimi gerçekleştirilmektedir. Bu sayede konakçının serum kolesterol düzeyi, düşüş gösterebilmektedir. D-tagatoz ise kolonda söz konusu bu probiyotik bakterilerin gelişimini arttıran prebiyotik fonksiyon sergileyerek kolesterol düşürücü bir etki sergilemektedir (Ooi ve Liong, 2010).

2.11.5. Prebiyotik kaynağı olarak D-tagatoz

Prebiyotikler, kolonda bulunan ve konakçı sağlığı üzerine olumlu metabolik katkılar sunduğu bilinen faydalı bakteriler (probiyotikler) tarafından fermente edilmektedir. Söz konusu bu probiyotik ögeler, başlıca “*Lactobacillus*” ve “*Bifidobacterium*” gibi bakteri cinslerinden oluşmakta ve genellikle bağırsak mikrobiyota örüntüsünde hastalık yapıcı özellikleriyle bilinen patojen bakterilerle besin ögelerine ulaşım açısından rekabet halinde bulunmaktadır. Prebiyotikler, yalnızca probiyotik bakteriler tarafından fermente edilmekte ve bu işlem sonucu KZYA bileşenleri ortaya çıkmaktadır. Asetat, bütirat ve propiyonat gibi KZYA türleri kolon pH değerini düşürerek probiyotiklerin metabolik faaliyetleri için elverişli bir ortam sağlarken patojenlerin gelişimini de inhibe etmektedir. Kolonda prebiyotik fermentasyonu sonucu artan KZYA düzeyi aracılığıyla patojenlerin bağırsak mikrobiyota örüntüsü içinde dominant hale gelmesi olarak nitelendirilen ve birçok hastalığın patogeneğinde rol oynadığı düşünülen “disbiyozis” tablosunun oluşumu engellenmektedir. Ayrıca prebiyotikler kolonositler tarafından substrat olarak kullanılmakta ve bu sayede GİS sağlığının korunmasında önemli görev almaktadır (Mohanty ve ark., 2018). Başlangıçta d-tagatoz, sahip olduğu düşük kalori değeri ve bazı organoleptik özellikleri bakımından şükroza yakınlığıyla dikkatleri üzerine çekmiş ve tatlandırıcı olarak kullanılma kapasitesi araştırılmaya başlanmıştır. Ardından yapılan çeşitli in vitro ve in vivo çalışmalar sonucu d-tagatozun prebiyotik kapasiteye sahip bir nütrasötik olarak kullanılabilme potansiyeline sahip olduğu da gösterilmiştir (Roy ve ark., 2018). Bertelsen ve ark. (2001) in vitro bir çalışmalarında, d-tagatozun

insan GIS kanalında bulunan en karakteristik 12 farklı patojen bakteri türünün hiçbirisi tarafından fermente edilmediğini buna karşın “*Lactocaseibacillus casei*”, “*Lactocaseibacillus rhamnosus*” ve “*Lactocaseibacillus paracasei*” gibi probiyotik özellikleriyle ön plana çıkan bakteri türleri tarafından fermentasyona uğradığını göstermiştir (Bertelsen ve ark., 2001). Laerke ve ark. (2000) ise domuzlarla yürüttükleri bir çalışmalarında kontrol grubuna 150 g/kg sükroz içeren bir yemi ve müdahale grubuna ise 50 g/kg sükroz + 100 g/kg d-tagatoz içeren başka bir yemi 18 gün boyunca uygulamış ve ardından hayvanlardan elde edilen feçes örneklerini in vitro ortamda KZYA üretimi açısından incelemiştir. Bu çalışma sonucu kolondaki asetat, bütirat ve propiyonat gibi tüm KZYA üretiminin; d-tagatoz içeren yem tüketen grupta kontrol grubuna kıyasla anlamlı düzeyde artış gösterdiği ($p<0.05$) saptanmıştır. Araştırmacılar kolona sindirilmeden ulaşan d-tagatozun bağırsak mikrobiyota bileşenleri tarafından fermente edildiğini ve bunun sonucunda da KZYA üretiminin arttığını göstermiş ve d-tagatozun prebiyotik kapasitesine dikkat çekmiştir (Laerke ve ark., 2000).

2.12. Bağırsak Mikrobiyotası Tanımı

Bağırsak mikrobiyotası virüsler, mantarlar, mayalar ve bakterilere ev sahipliği yapan kompleks ve dinamik bir ekosistemdir. İnsan bağırsak mikrobiyotası örüntüsünde yaklaşık 1000 farklı bakteri türü bulunmakta ve bu bakterilerin sayısının toplam 100 trilyon civarında olduğu düşünülmektedir. Son zamanlarda gerçekleştirilen bilimsel çalışmalarda insan vücudunda bulunan her bir somatik hücreye karşılık 10 bakteri hücresinin bulunduğu görülmüş ve bağırsak mikrobiyotası ayrı bir organ olarak kabul edilmeye başlanmıştır (Allayee ve Hazen, 2015). Merkezi sinir sistemi (MSS) ile bağırsak mikrobiyotası arasında çift yönlü ve dinamik bir etkileşimin olduğu düşünülmekte ve bu metabolik fenomen “bağırsak – beyin aksı” olarak isimlendirilmektedir. Bu aksın MSS homeostazı ve inflamasyonda rol oynadığı öngörülmektedir (Rutsch ve ark., 2020). Bağırsak mikrobiyotasının büyük çoğunluğunu “Bacillota”, “Bacteroidetes”, “Actinomyetota”, “Proteobacteria” ve “Verrucomicrobiota” olmak üzere 5 ana filuma ait bakteriler oluşturmaktadır. “Bacillota” filumu “*Lactobacillus*”, “*Bacillus*”, “*Clostridium*” ve “*Enterococcus*” gibi önemli bakteri cinslerini kapsamakta iken “Bacteroidota” filumunun ise büyük çoğunluğunu

“*Bacteroides*” ve “*Prevotella*” cinsi bakteriler oluşturmaktadır. “*Actinomycetota*” filumu ise daha çok “*Bifidobacterium*” cinsine ait bakterilerin metabolik etkileriyle ön plana çıkmaktadır (Lagier ve ark., 2015; Rinninella ve ark., 2019).

2.12.1. Bağırsak Mikrobiyota Örüntüsü ile Kolesterol Metabolizması Arasındaki İlişki

Son yıllarda bağırsak mikrobiyota örüntüsüyle lipit ve kolesterol metabolizmasına ait bozukluklar arasındaki ilişkilerin araştırıldığı çalışmaların sayısında kayda değer bir artış görülmektedir. Bağırsak mikrobiyotasındaki değişimlerin ayrıntılı olarak incelenemediği yeni teknolojik yöntemlere paralel olarak kolesterol metabolizmasıyla ilgili bazı mekanistik ilişkiler ayrıntılı olarak açığa çıkarılmaya çalışılmaktadır. Hiperkolesterolemi ile bağırsak mikrobiyota kompozisyonu arasındaki bu ilişkilerinden birisi, bağırsak mikrobiyota örüntüsünde bulunan bazı probiyotik bakterilerin sahip olduğu enzimatik aktivitelerdir. Bu mikroorganizmaların yapısında BSH ve 7-alfa-dehidroksilaz adlı enzimler bulunmaktadır. Bu enzimlerden BSH, safra tuzlarını dekonjuge ederek sekonder safra asitleri oluşumunu sağlamakta; 7-alfa-dehidroksilaz ise primer safra asitlerini sekonder safra asitlerine dönüştürmektedir. Her iki enzim aktivitesi sonucu oluşan bu sekonder safra asitlerinin ince bağırsaklardan emilimi oldukça düşüktür ve büyük bir kısmı feçesle atılmaktadır. Primer safra asitleri karaciğerde kolesterolde sentezlenmektedir. Dekonjuge olan safra tuzlarının yer aldığı safra sıvısı ise kolesterol havuzundaki kolesterol molekülleri kullanılarak yeniden sentezlenmektedir. Primer safra asitlerinin karaciğerde tekrardan üretiminde de kolesterol kullanıldığı için serum kolesterol miktarlarında düşüş gerçekleşmektedir. Yukarıda bahsedilen enzimlere sahip olan bakterilerin bağırsak mikrobiyota örüntüsü içindeki çeşitliliğinin ve miktarının artması sonucu ise hipokolesterolemik etkilerde artış görülmektedir (Fukuda ve Ohno, 2014; Jia ve ark., 2021).

Kolesterol metabolizması bozuklukları ile bağırsak mikrobiyotası arasındaki başka bir mekanistik ilişki de patojen bakteriler tarafından salgılanan ve endotoksin özelliğine sahip lipopolisakkaritlerit (LPS) üretimidir. Yüksek yağlı yüksek kolesterolü beslenmenin bağırsak mikrobiyota örüntüsünde bulunan

patojenik karakterdeki gram-negatif bakterilerin sayısını artırdığı gösterilmiştir. Bu bakterilerin en önemli özelliklerinden birisi de LPS adlı metaboliti salgılamalarıdır. Disbiyotik karakterdeki bağırsak mikrobiyota örüntüsü, “geçirgen bağırsak sendromu” adlı metabolik tabloya sebep olmaktadır. Patojenlerden salgılanan LPS metabolitleri ise geçirgen bağırsaktan kan dolaşımına sızarak; başta kronik inflamasyon olmak üzere insülin direnci ve hiperkolesterolemi gibi lipid metabolizması bozukluklarına yol açmaktadır (Kim ve ark., 2014). Bağırsak mikrobiyota örüntüsü ile kolesterol metabolizması arasındaki diğer bir ilişki ise KZYA adlı bileşenlerdir. Asetat, propiyonat ve bütirat gibi KZYA bileşenleri; “*Lactobacillus*” ve “*Bifidobacterium*” cinslerine ait bazı probiyotik bakteriler tarafından prebiyotiklerin fermantasyona uğratılması sonucu üretilmektedir. Bu KZYA çeşitlerinden olan propiyonat enterohepatik dolaşıma katılmakta ve portal ven aracılığıyla karaciğere taşınmaktadır. Karaciğere taşınan propiyonat ise kolesterol sentezinin inhibisyonunda rol oynamaktadır (Xiong ve ark., 2022).

Gargari ve ark. (2018) bir çalışmalarında hiperlipidemi tablosuna sahip adölesanların sağlıklı adolesanlara kıyasla fekal asetat, bütirat ve propiyonat düzeylerinin anlamlı düzeyde daha düşük olduğunu göstermiştir. Ayrıca KZYA seviyelerindeki bu azalma ile “*Lachnospiraceae*” ve “*Oscillospiraceae*” ailelerine ya da “*Akkermansia*”, “*Bacteroides*”, “*Roseburia*” ve “*Faecalibacterium*” cinsine ait KZYA üreten bakteriler arasında ilişki olduğu saptanmıştır (Gargari ve ark., 2018).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Deney Hayvanları

Deney hayvanları ile bilimsel amaçlı çalışma yapabilmek için gerekli izin, Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (EÜHADYEK)’ndan 06.01.2021 tarih ve 21/13 karar nolu etik uygunluk onayı ile alınmıştır. Çalışma kapsamında kullanılan BALB/C türü fareler Erciyes Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi (DEKAM)’nden 8 haftalık ve erkek cinsiyetinde temin edilmiştir. Çalışmada toplam 40 adet fare kullanılmış olup tüm deneysel aşamalar DEKAM bünyesinde gerçekleştirilmiştir.

3.1.1 Deney Hayvanlarının Bakımı

Deney hayvanlarının beslenme ve rutin bakımları 13.01.2011 tarih ve 28141 sayılı Resmi Gazetede yayımlanarak yürürlüğe giren “Deneysel ve Diğer Bilimsel Amaçlar İçin Kullanılan Hayvanların Refah ve Korunmasına Dair Yönetmelik” kapsamında yapılmıştır. Literatürdeki in vivo çalışmalarda da standart olarak uygulandığı gibi farelerin barındığı ortamın sıcaklığı $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, nispi nem oranı ise $\%50 \pm 10$ olduğu koşullara sabitlenmiş ve 12 saat aydınlık/12 saat karanlık bir ışık döngüsü sağlanmıştır. Tüm gruptaki fareler çalışma süreci boyunca tekli kafeslerde tutulmuştur. Bu işlemin uygulanmasındaki amaç, çalışma sonunda gerçekleştirilen bağırsak mikrobiyota analizi ölçüm sonuçlarında çapraz kontaminasyon kaynaklı değişimlerin önüne geçmektir. Şekil 3.1’ de ise gruplara ayrıldıktan sonra tekli kafeslerde kalan ve bakımları DEKAM bünyesindeki “Fare Çalışma Odası” nda yürütülen deney hayvanları gösterilmiştir.

3.1.2. Deney Hayvanlarının Gruplandırılması, Uygulama Süreci ve Beslenmesi

Çalışmada kullanılan fare sayısının belirlenmesi işlemi için Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Biyoistatistik Anabilim Dalı'ndaki bir biyoistatistik uzmanından destek alınmış ve gerekli hayvan sayısı için istatistiksel hesaplama yapılmıştır. Örneklem sayısının hesaplanmasında Lye ve ark. (2017) tarafından yürütülen çalışmadan yararlanılmış ve GPower 3.1 (Universität Dusseldorf, Almanya) istatistiksel analiz programı kullanılmıştır. Söz konusu hesaplamaların ardından çalışmada kullanılması gereken toplam fare sayısının 40 olduğu belirlenmiştir.

Çalışmadaki fareler 5 ayrı gruba eşit bir şekilde bölünmüş ve her bir grupta 8 adet fare ile uygulamalar gerçekleştirilmiştir. Deney hayvanlarının beslenmesinde kullanılan üç farklı çeşit yem, ticari bir firmadan (ARDEN ARAŞTIRMA & DENEY, Türkiye) temin edilmiştir. Temin edilen bu yem çeşitlerinin hazırlanmasında Amerikan Ulusal Araştırma Konseyi (NRC)'nin belirlediği standartlar referans olarak kabul edilmiştir. Bu standartlar, deney hayvanlarının yeterli ve dengeli beslenmesinin sağlanması amacıyla gerekli makro ve mikro besin öğelerini eksiksiz düzeyde içermektedir. Ayrıca deney hayvanlarının yemlerinin üretiminde 40 yılı aşkın tecrübesiyle bilinen ve literatürde yayınlanan binlerce in vivo çalışmada deney hayvanlarının diyetlerinin hazırlanması konusunda referans kabul edilen "Research Diet" adlı kuruluşun yem formülasyonlarından yararlanılmıştır. Söz konusu firma, özellikle de obezite, T2DM ve hiperkolesterolemi gibi spesifik metabolik bozukluklara özgü yemlerin bazı formülasyonlarını "Open Source Diets" ismiyle bilim dünyasına ücretsiz olarak açmış ve buradaki verilerden yararlanılmasına da müsaade etmiştir. Yemlerin temin edildiği ticari firma özellikle de YYYYK yem ve d-tagatoz ilaveli YYYYK yem hazırlığında; "Research Diet" firmasının yayınladığı ve "Open Source Diets" kategorisi altında bulunan D12451 kodlu yem formülasyonundan yararlanarak ARD-45 HFD kodlu bir yem üretmiştir. Söz konusu bu yemin içerdiği enerjinin %45 gibi yüksek bir miktarı yağlardan sağlanmış ve bu yemin hazırlığında halihazırdaki formülasyona ek olarak kilogram başına %1.25 oranında kolesterol ve %0.25 oranında da kolik asit eklenerek hiperkolesterolemi

oluşturmayı amaçlayan YYYYK yem eldesi gerçekleştirilmiştir. D-tagatoz ilaveli YYYYK yem eldesi için ise modifiye edilen ARD-45 HFD kodlu yem içeriğindeki basit karbonhidrat kaynağı olan sükroz çıkarılmış ve yerine eşit miktarda d-tagatoz ilave edilmiştir.



Şekil 3.1. Gruplara ayrıldıktan sonra tekli kafeslerde kalan deney hayvanları

Ayrıca d-tagatoz ilaveli YYYYK yemine de kilogram başına düşen toplam ağırlık miktarının %1.25 oranında kolesterol ve %0.25 oranında da kolik asit eklenmiş ve yine bu sayede YYYYK içeriğine sahip bir yem eldesi gerçekleştirilmiştir. Hem YYYYK hem de d-tagatoz ilaveli YYYYK yemleri, yukarıda bahsi geçen aynı ticari firmadan aynı formda temin edilmiş ve bu sayede d-tagatoz dışındaki yem içeriğinde yer alan maddeler standart hale getirilmiştir. Yemlerin hazırlığında kullanılan formülasyon Şekil 3.2’ de verilmiştir. Çalışmadaki gruplar ise şu şekilde oluşturulmuştur:

Grup-1: Negatif Kontrol (NK) Grubu (n = 8): Bu grupta bulunan fareler, 13 hafta boyunca yalnızca standart yem örüntüsüne sahip yemlerle beslenmiştir.

Grup-2: Pozitif Kontrol (PK) Grubu (n = 8): Bu grupta bulunan fareler, adaptasyonun sağlanmaya çalışıldığı ilk hafta standart yem örüntüsüne sahip yemlerle ardından 12 hafta boyunca ise yalnızca YYYYK yemlerle beslenmiştir.

Grup-3: Probiyotik Grubu (PRO) (n = 8): Bu grupta bulunan fareler, adaptasyonun sağlanmaya çalışıldığı ilk hafta standart yem örüntüsüne sahip yemlerle ardından ise 12 hafta boyunca yalnızca YYYYK yemlerle beslenmiştir. Ayrıca bu gruptaki farelere son 4 haftalık “deneysel periyot” boyunca her gün bir defa liyofilize haldeki probiyotik kültür uygulanmıştır. Liyofilazyon sonucu toz haline getirilmiş probiyotik kültür, 100 µl steril distile su içerisinde 10^9 koloni oluşturan birim (kob) konsantrasyonunda süspanse edilmiş ve farelere orogastrik olarak uygulanmıştır.

Grup-4: Prebiyotik Grubu (PRE) (n = 8): Bu grupta bulunan fareler, ilk bir haftalık adaptasyon sürecinde standart yem örüntüsüne sahip yemlerle ardından ise 8 hafta boyunca YYYYK yemlerle beslenmiştir. Son 4 hafta “deneysel periyot” süresi boyunca d-tagatoz ilaveli YYYYK yemler verilmiştir.

Grup-5: Sinbiyotik Grubu (SİN) (n = 8): Bu grupta bulunan fareler, ilk bir haftalık adaptasyon sürecinde standart yem örüntüsüne sahip yemlerle ardından ise 8 hafta boyunca YYYYK yemlerle beslenmiştir. Son olarak ise bu gruba; 4 haftalık “deneysel periyot” süresi boyunca d-tagatoz ilaveli YYYYK yemler verilmiştir. Ayrıca bu gruptaki farelere de son 4 haftalık “deneysel periyot” boyunca her gün bir defa liyofilize haldeki probiyotik kültür uygulanmıştır. Liyofilazyon sonucu toz haline getirilmiş probiyotik kültür, 100 µl steril distile su içerisinde 10^9 kob konsantrasyonunda süspanse edilmiş ve farelere orogastrik olarak uygulanmıştır. Bütün araştırma periyodunu ayrıntılı olarak gösteren çalışma şeması Şekil 3.3’te verilmiştir.

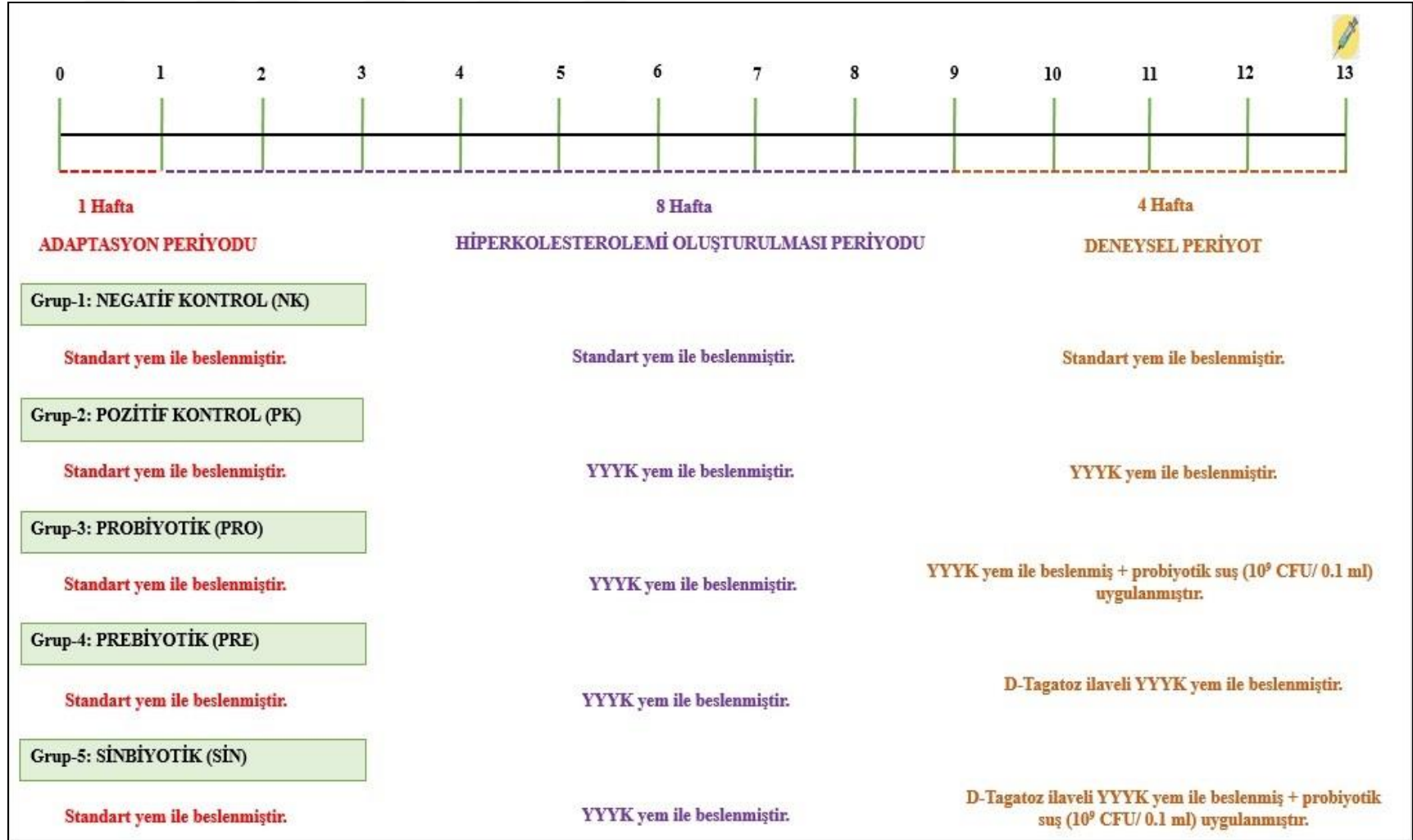
Prebiyotik ve sinbiyotik uygulamasının gerçekleştirildiği gruplarda hiperkolesterolemi tablosu oluşturabilmek için 8 hafta boyunca YYYYK yem tükettirilmiştir. Son 4 haftalık süreçte ise bu grupların d-tagatoz ilaveli YYYYK yem tüketmeleri sağlanarak hiperkolesterolemi tablosu üzerine d-tagatozun bir prebiyotik kaynağı olarak nasıl etki ettiği araştırılmıştır. Bu iki gruptaki hayvanların d-tagatoz ilaveli YYYYK yem tüketmeye başlamadan önce GİS’ in d-

tagatoza olan adaptasyonunu sağlayabilmek adına “d-tagatoza adaptasyon evresi” uygulanmıştır.

Söz konusu adaptasyon evresinin uygulanmasının amacı, d-tagatozun diyetle basit karbonhidrat kaynağı olarak yüksek oranlarda kullanılması sonucu ortaya çıkabilecek GİS semptomlarını minimize etmektir. Literatürdeki çalışmalar incelendiğinde; d-tagatoz gibi bazı nadir şekerlerin (d-allüloz, d-sorboz vb.) yeme ilave olarak daha düşük oranlarda (%3-5) uygulandığında serum glikoz ve insülin değerleri gibi glisemik kontrole ait parametreler ile kolesterol metabolizmasına ait parametreler üzerinde etki göstermediği saptanmıştır (Kanasaki ve ark., 2019; Nagata ve ark., 2018). Ancak bu nadir şekerlerin diyetle sükröz yerine birincil karbonhidrat kaynağı olarak daha yüksek oranlarda kullanıldığında ise kolesterol ve glisemik kontrol parametrelerinde olumlu metabolik değişimler görülmüştür (Police ve ark., 2009). Fakat diyetle birincil basit karbonhidrat kaynağı olarak yüksek miktarda (diyetin ağırlıkça yaklaşık %20’si kadar) nadir şeker tüketiminin ise GİS üzerinde ozmotik yük oluşturabildiği ve bazı istenmeyen yan etkilere yol açtığı belirlenmiştir. Bu yan etkilerin genellikle geçici özellikte olduğu ve dışkılama sıklığında artış ile dışkı kıvamında bozulmalar gibi ciddi olmayan yan etkileri kapsadığı gözlemlenmiştir (Kruger ve ark., 1999b). Ayrıca nadir şeker kullanımı sonucu GİS üzerinde görülen bu yan etkilerin genellikle 3 – 15 gün arasında uygulanan adaptasyon evresi sonucu ortadan kalktığı da yapılan çalışmalarda belirtilen diğer bir husustur (Lodder ve ark., 2016; Williams ve ark., 2015).

Yem Türü	Standart Yem		YYK Yem		D-Tagatoz İlaveli YYK Yem	
%	g	kcal	g	kcal	g	kcal
Protein	20	20.3	24	20	24	23.4
Karbonhidrat	64	63.9	41	35	41	26.3
Yağ	7	15.8	24	45	24	50.3
Toplam		100		100		100
kcal/g	4		4.66		4.16	
İçindekiler						
Kazein, 30 Mesh	200	800	200	800	200	800
L-sistin	3	12	3	12	3	12
Mısır Nişastası	397	1590	72.8	291	72.8	291
Maltodekstrin 10	132	528	100	400	100	400
Sükroz	100	400	172.8	691	-	-
D-Tagatoz	-	-	-	-	172.8	259.2
Selüloz, BW 200	50	0	50	0	50	0
Soya fasülyesi yağı	70	630	25	225	25	225
t-bütıl hidrokinon	0.014	0	-	-	-	-
Susuz süt yağı	-	-	177.5	1598	177.5	1598
Mineral karışımı	35	0	10	0	10	0
Dikalsiyum fosfat	-	-	13	0	13	0
Kalsiyum karbonat	-	-	5.5	0	5.5	0
Potasyum sitrat	-	-	16.5	0	16.5	0
Vitamin karışımı	10	40	10	40	10	40
Kolin bitartrat	2.5	0	2	0	2	0
Kolesterol	-	-	10	0	10	0
Sodyum kolat	-	-	2.5	0	2.5	0
FD&C Red Dye	-	-	0.05	0	0.05	0
Toplam	1000	4000	870.65	4057	870.65	3625.2

Şekil 3.2. Yem çeşitlerinde bulunan makro ve mikro besin ögesi içerikleri ile yüzdeleri



Şekil 3.3. Çalışma şeması

Tüm bu sebeplerden ötürü bu çalışmada da PRE ve SİN gruplarında bulunan farelerin d-tagatoz ilaveli YYYYK yem tüketmeye başlamasının ardından görülebileceği ihtimali olan GİS yan etkilerinin eliminasyonu için “d-tagatoza adaptasyon evresi” uygulanmıştır. Bir haftalık bu adaptasyon sürecinde YYYYK içeriğinde basit karbonhidrat kaynağı olarak bulunan ve sükrözün yerine ilave edilen d-tagatozun, 1000 gram (g) yem içindeki miktarının bulunma yüzdesi kıstas olarak alınmıştır. Toplam 7 günlük bir sürede 10 mililitre (ml) su içinde hedef d-tagatoz dozuna tedricen artırma yoluyla ulaşılmış ve böylece PRE ve SİN grubundaki farelerin d-tagatoza olan uyumları sağlanmıştır. Söz konusu adaptasyon süreci boyunca günlere göre dozlaşmanın nasıl yapıldığı ise Tablo 3.1’de verilmiştir.

Tablo 3.1. D-tagatoza adaptasyon sürecinin günlere göre dozlaşma şekli

UYGULANAN GÜN	D-tagatoz (g) / 10 ml su
1.Gün	0.25
2.Gün	0.50
3.Gün	0.75
4.Gün	1.00
5.Gün	1.25
6.Gün	1.50
7.Gün	1.75

Prebiyotik ve sinbiyotik gruplarındaki farelerin bir haftalık “D-tagatoza adaptasyon evresi” periyodundaki su tüketimleri hariç tüm gruplar çalışma boyunca su ve yem tüketimleri bakımından *Ad Libitum* olarak beslenmiştir.

Probiyotik suşun orogastrik olarak uygulandığı PRO ve SİN gruplarında uygulamanın nasıl gerçekleştirildiği ise Şekil 3.4’te gösterilmiştir.

3.1.2.1 Probiyotik Bakteri, Besiyerleri ve Liyofilizasyon İşlemi

Çalışmada probiyotik kaynağı olarak tek bir probiyotik suş kullanılmıştır. Bu suş ya da diğer bir ifadeyle tip kültür, “*L. casei* ATCC 393” isimli probiyotik bakteridir. Söz konusu probiyotik suş, ticari olarak liyofilize formda; ATCC adlı kâr amacı gütmeyen ve standart tip kültürler oluşturulmasında etkin rol oynayan otorite niteliğindeki kuruluştan temin edilmiştir. Liyofilize haldeki probiyotik suşun çoğaltılmasında de Man, Rogosa, Sharp (MRS) broth sıvı besiyeri kullanılmıştır. Kullanılan besiyerinin içeriğinde: kazein pepton 10.0 g/L, et özütü

10.0 g/L, maya özütü 4.0 g/L, D (+) glikoz 20.0 g/L, dipotasyum hidrojen fosfat 2.0 g/L, Tween 80 1.0 g/L, diamonyum hidrojen sitrat 2.0 g/L, sodyum asetat 5.0 g/L, magnezyum sülfat 0.2 g/L, manganaz sülfat 0.4 g/L kullanılmıştır. Ardından 52.2 g besiyeri içeriği distile su cihazından (MES MP Minipure) elde edilen 1000 ml distile suda çözülmüştür. Son olarak çözelti 121 °C’de 15 dakika (dk) otoklavlanmak suretiyle steril edilmiş ve probiyotik kültürün çoğaltılmasında kullanılmıştır.



Şekil 3.4. Probiyotik suşun farelere orogastrik olarak uygulanması

Probiyotik kültürlerin çoğaltılmasının ardından işlemin gerçekleştirildiği brotha %20 oranında steril gliserol ilave edilmiş ve ardından çözelti uzun süreli muhafaza edilmek üzere -80 °C’deki donduruculara kaldırılmıştır. Şekil 3.5’ te hem liyofilize halde temin edilen “*L. casei* ATCC 393” probiyotik suşu hem de bu suşun çoğaltılmasında kullanılan sıvı besiyeri gösterilmiştir.

İnokulum hazırlığı amacıyla 0.1 µl dondurulmuş *L. casei* kültürü, 10 ml MRS sıvı besiyerine ilave edilmiş ve 37°C’de 24 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır.

Daha sonra kültür, 1000 ml sıvı besiyerine alt kültürlenerek 37°C’de 24 saat boyunca tekrar inkübe edilmiştir. Akabinde hücreler, 3000 x g’ de 15 dk süreyle 4°C’de santrifüjlenmiş ve süpernatant kısmı uzaklaştırılıp pelet toplanmıştır. Elde edilen pelet %5 yarım yağlı süttozu ve %5 maltoz içeren 500 ml’lik steril solüsyon içerisinde yaklaşık olarak 10^9 - 10^{10} kob/ml yoğunluğunda re-süspanse edilmiştir. Tüm bu işlemlerin ardından dört hafta boyunca 16 hayvanda gerçekleştirilecek probiyotik uygulamasının standardizasyonu için 450 adet 2 ml’lik cryo tüplere hücreleri içeren çözeltiden 1 ml dağıtılmış ve -80 °C’de bir gece bekletilerek liyofilizatöre hazır hale getirilmiştir. Daha sonra dondurarak kurutma yönteminin kullanıldığı liyofilizatörde (Labconco Free Zone) liyofilizasyon gerçekleştirilmiştir. Her bir cryo tüpte yaklaşık 10^9 - 10^{10} bakteri hücresi olduğu hesaplanmıştır. Hazırlanan liyofilize kültürler ise uygulamanın gerçekleştirildiği zamana kadar 4 °C’ deki bir buzdolabında muhafaza edilmiştir.

Liyofilizasyonun ardından canlı hücre sayısı, rastgele alınan 3 cryo tüpten çift paralel sayım yapılarak saptanmıştır. Ekimler için MRS agar, dilüsyon sıvısı olarak serum fizyolojik (%0.85 NaCl) kullanılmıştır. Hazırlanan kültürler ekim işleminden önce oda sıcaklığında 30 dk bekletilmiş ardından dilüsyon sıvısı içerisine alınarak seyreltme işlemi gerçekleştirilmiştir. Akabinde, her bir dilüsyondan 100 µl örnek alınarak MRS agar besiyerine yayma plaka yöntemiyle ekilmiş ardından petriler 24 saat süreyle 37°C’de inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından oluşan 30 – 300 arasındaki koloniler sayılmış ve sonuç 1.28×10^8 kob/ml olarak bulunmuştur. Probiyotik uygulamasının gerçekleştirildiği her bir deney hayvanı için bir adet cryo tüpe 100 µl distile su eklenmiş ve böylece her gün 1.28×10^9 *L. casei* ATCC 393 suşunun hayvanlar tarafından alındığına emin olunmuştur. Liyofilize kültürlere uygulanan canlı hücre sayımı Şekil 3.6 ile gösterilmiştir. Şekil 3.7’de ise probiyotik suşun sıvı besiyerinde çoğaltılması ve liyofilazyon işlemine ait bazı aşamalar gösterilmiştir.



Şekil 3.5. Probiyotik suşun sıvı besiyerinde çoğaltılması işlemi hazırlık aşamaları

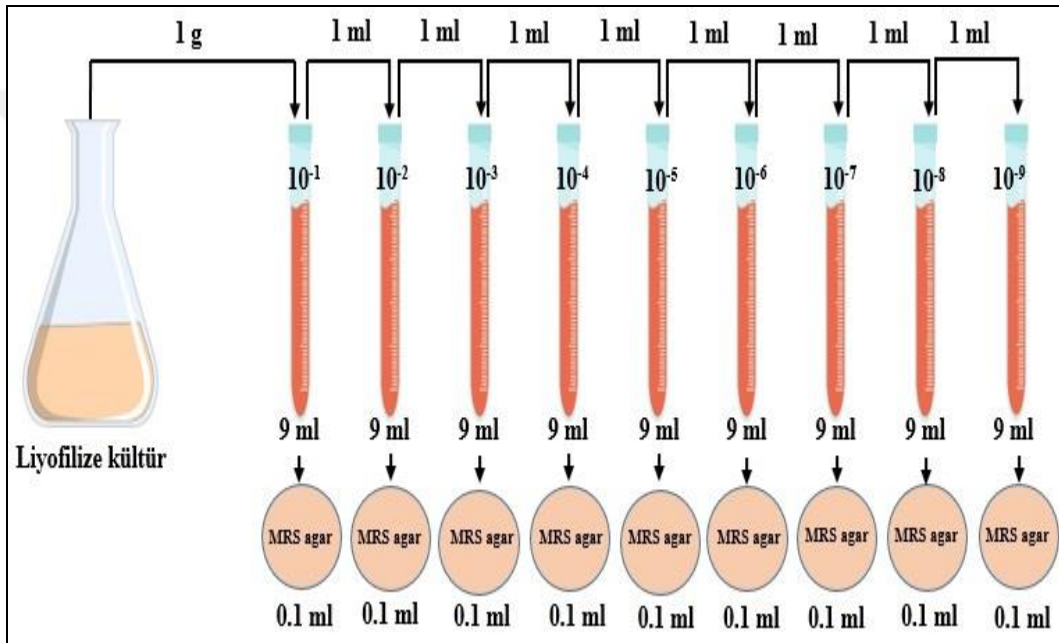
3.1.3. Yem Tüketimi, Vücut Ağırlıkları ve Yem Etkinlik Oranının Saptanması

Ticari firmadan temin edilen yemlerin üretiminin ardından uygulamanın gerçekleştirildiği merkeze transferi, buz aküleriyle dolu büyük bir strafor köpük içerisinde yapılmıştır. Yaklaşık 500 – 600 g paketler halinde ayrı ayrı üretilen yemler -20 °C’ deki soğutuculara hızlı bir şekilde aktarılmış ve uygulamaların gerçekleştirildiği zamana kadar ise burada muhafaza edilmiştir. Deney hayvanlarının günlük beslenmesinde kullanılacak yem paketleri, bir gece öncesinden -20 °C sıcaklığından +4 °C bölmesine alınmıştır. Ertesi sabaha kadar bu sıcaklıkta bekleyen yemler, DEKAM bünyesinde bulunan laboratuvarlarda sabah beslenme için kafeslere koyulmadan hemen önce steril koşullar altında dilimlenmiş ve böylece hayvanların rahatlıkla tüketebileceği sıcaklık ve forma getirilmiştir. Ardından deney hayvanlarının bulunduğu uygulama odasında her hayvana verilen yem miktarının doğru saptanması amacıyla hassas bir şekilde yem tartımı gerçekleştirilmiş ve kaydedilmiştir.

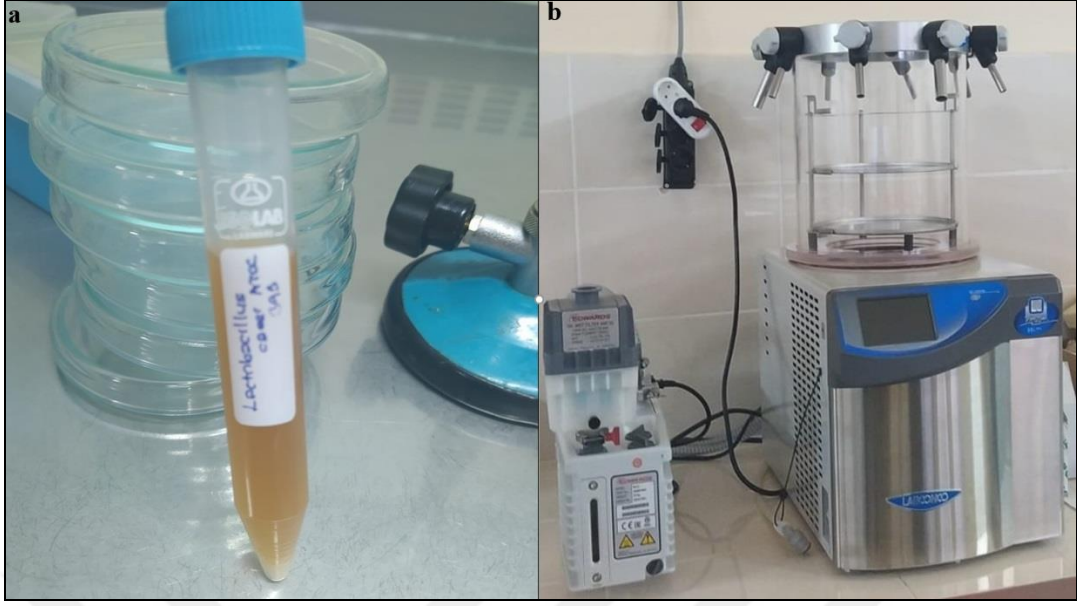
Ertesi gün aynı işleme başlamadan önce ise kafeste kalan yem miktarı tartılmış ve böylece farelerin 24 saat içinde tükettikleri yem miktarları saptanmıştır. Yukarıda

bahsedilen işlemler; tüm gruplardaki hayvanlar için her gün aynı saatte ve aynı düzende olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Yemlerin -20 °C sıcaklığında muhafaza edilen ve kafeslere koyulmadan önceki dilimlenmiş halleri ile farelerin tartım işlemi Şekil 3.8’de gösterilmiştir.

Deney hayvanlarının vücut ağırlıklarının ölçümü ise her haftanın ilk uygulama gününde sabah saatlerinde gerçekleştirilmiş ve gruplara göre ayrılmış şekilde bir çizelgeye kaydedilmiştir.



Şekil 3.6. Liyofilize kültürlerle uygulanan canlı hücre sayımı



Şekil 3.7. Probiyotik suşun sıvı besiyerinde çoğaltılması (a) ve liyofilizasyon (b) işlemi

Söz konusu periyotların başında ve sonunda ölçülen vücut ağırlıklarına bağlı olarak “vücut ağırlık artışı” bulunmuş ve bu periyotlar boyunca toplam tüketilen yem miktarlarına bölünmüştür. Akabinde ise çıkan sonuç 100 ile çarpılmış ve bu sayede yem etkinlik oranı yüzde (%) hesaplanmıştır (Guo ve ark., 2019).



Şekil 3.8. YYYYK yemlerin tüketime hazırlanması (a) ve farelerin tartımı (b) işlemleri

3.1.4. Feçes Örneklerinin Toplanması ve Muhafazası

Tüm farelerden feçes örnekleri çalışmanın son üç gününde ve saat 08:00 -10:00 saatleri arasında toplanmıştır. Bu işlem, DEKAM bünyesinde deney hayvanları uygulama laboratuvarlarında gerçekleştirilmiş ve numunelerin toplanmasında iki araştırmacı görev almıştır. Feçes örnekleri alım işlemine başlamadan önce araştırmacılar steril eldivenler giymiş ve tüm hayvanlara ait örneklerin ayrı ayrı saklanacağı 1.5 ml hacmine sahip steril eppendorf tüplerini (ISOLAB Laborgeräte GmbH, Germany) asetatlı kalemler aracılığıyla kapaklarını açmadan kodlamışlardır. Feçes örneklerinin alınmasından önce bir adet konvansiyonel (polikarbonat yapıdaki) deney hayvanı kafesi otoklavlanmış ve tamamen steril hale getirilmiştir. Feçes örneklerinin toplanmasında polipropilen gövdeli, çevir-aç sızdırmayan özel kapaklı ve 50 g hacme sahip steril gaita numune kapları (FıratMed, Türkiye) kullanılmıştır. Feçes örneklerinin analizinde herhangi karışıklık yaşanmaması için

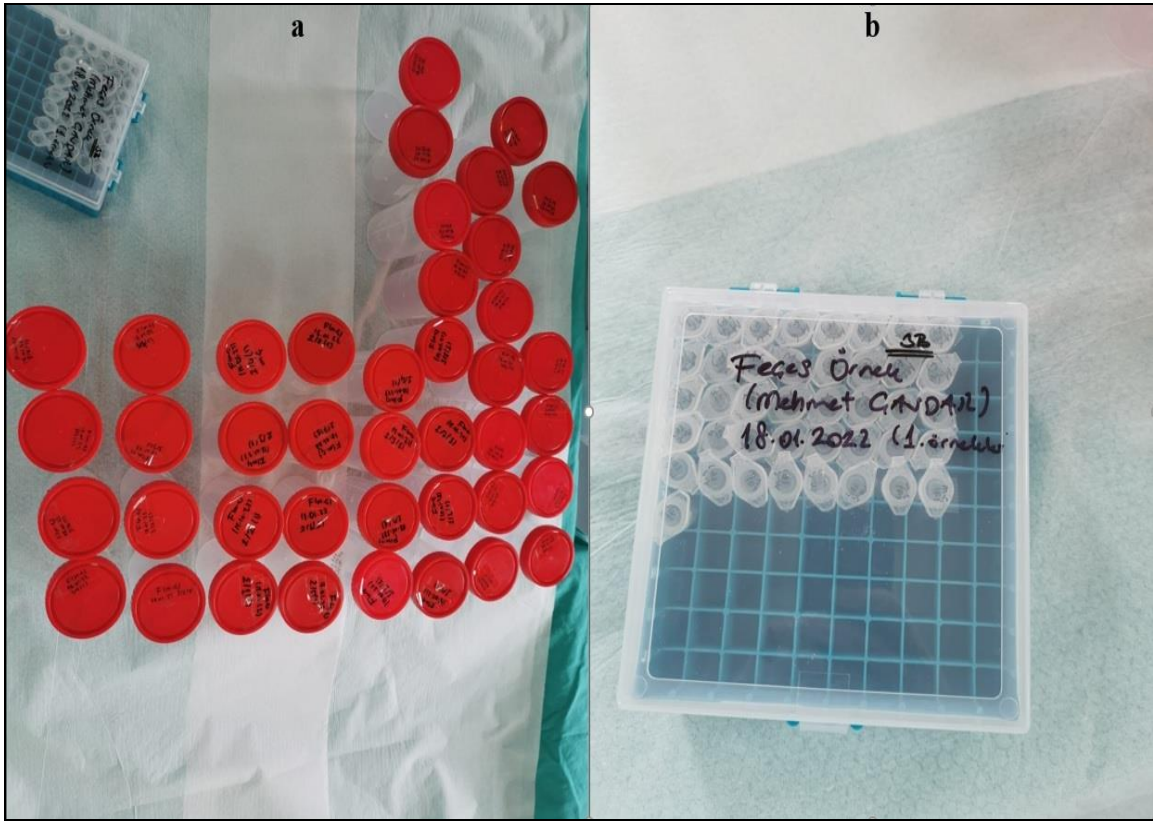
steril eppendorf tüplerde olduğu gibi steril gaita numune kapları da aynı şekilde kodlanmıştır. Feçes örneği alınacak deney hayvanının kafesi ile otoklavlanarak steril hale getirilmiş kafes birbirine temas etmeyecek şekilde yan yana getirilmiştir. Araştırmacılardan birisi deney hayvanının bulunduğu kafesi açmış ve kafes telinin üzerinde tekniğine uygun biçimde fareyi tuttuktan hemen sonra yan tarafta bulunan steril kafesin üzerine getirmiştir. Bu arada elinde steril gaita numune kabı ile bekleyen diğer araştırmacı kabı fareye temas etmeyecek şekilde anüs bölgesine doğru hızlıca yaklaştırmıştır. Farelerin tutmaya karşı refleks olarak kısa süre içinde defekasyon gerçekleştirdiği gözlemlenmiş ve feçes örnekleri direkt olarak steril gaita kabının içine alınmış ve hemen ağzı kapatılmıştır. Bu süreç esnasında farelerde tutuşun stresine bağlı olarak görülen idrarın gaita kabının içine girmemesine özen gösterilmiştir. İdrar ile kontaminasyona uğrayan feçes örnekleri ise alınmamıştır. Ardından diğer numune alma işlemine geçmeden önce gaita numune kabında bulunan feçes örneği tek kullanımlık steril plastik öze uçları ile alınarak aynı kodlu steril eppendorf tüpe aktarılmış ve ağzı hızlıca kapatılmış akabinde tüm numune alma işleminin tamamlanmasına kadar saklanacağı -20°C’ deki soğutucuya aktarılmıştır. Tüm feçes örneği alma işleminden önceki genel hazırlık durumu Şekil 3.9’da gösterilmiştir.



Şekil 3.9. Feçes örneği alma işleminden önceki genel hazırlık durumu

Feçes örneği alım sürecinde sık görülmemekle birlikte gaita çeşitli sebeplere bağlı olarak numune kabına (araştırmacılar arasındaki zamanlama hataları gibi durumlara bağlı olarak) alınamamıştır. Bu durumda gaita kontamine olacağı dış bir ortama değil de genellikle numune kabının hemen altında bekleyen ve steril edilmiş kafesin içine düşmüştür. Böyle bir durum varlığında araştırmacılardan birisi hemen steril plastik tek kullanımlık öze uçları ile feçes örneğini steril kafesten alarak daha önceden kodlanmış steril eppendorf tüpe aktarmış ve ağzını hızlı bir biçimde kapatmıştır. Ardından başka bir feçes örneğinin de gaita numune kabı yerine altta duran kafesin içine düşme ihtimaline karşılık her defasında altta bekleyen steril kafes %70' lik etanol solüsyonu ile detaylı bir biçimde temizlenmiş ve hemen sonrasında ise kafesin içi kurulanmıştır. Steril kafesin içine düşmeyen feçes örnekleri ise alınmamıştır. Feçes örneği alım sürecinde kullanılan steril gaita kapları (a) ve feçes örneklerinin aktarıldığı steril eppendorf tüpler (b) Şekil 3.10'da gösterilmiştir.

Tüm hayvanlardan feçes örnekleri alım işlemi bittiğinde -20°C ' deki soğutucuda steril eppendorf tüplerde ayrı ayrı kodlanmış biçimde duran feçes örnekleri, bakteriyel DNA izolasyonunun gerçekleştirileceği zamana kadar muhafaza edilmek üzere DEKAM bünyesinde yer alan -80°C sıcaklığındaki başka bir soğutucuya nakledilmiştir. Feçes örneklerinden DNA izolasyonu, Erciyes Üniversitesi Gevher Nesibe Genom ve Kök Hücre Enstitüsü (GENKÖK) bünyesinde bulunan steril kabinler içinde gerçekleştirilmiştir. İzolasyonun gerçekleştirileceği gün, DEKAM içerisindeki -80°C ' lik soğutucudan alınan feçes örnekleri, işlemin uygulanacağı GENKÖK merkezine buz aküleri ile dolu strafor köpükle taşınmıştır.



Şekil 3.10. Feçes örneklerinin alındığı steril gaita kapları (a) ve steril eppendorf tüpleri (b)

3.1.5. Sakrifikasyon İşlemi ve Doku Örneklerinin Alınması

Sakrifikasyon işleminden 16 saat önce farelerin kafeslerinden yemler toplanmış ve bu sayede kan alma işleminin gerçekleştirildiği saatte aç halde olmaları sağlanmıştır. Sakrifikasyon işlemleri için intraperitoneal (i.p.) yoldan uygulanan enjektabl anesteziik maddeler kullanılmıştır. Anesteziik ajan olarak dissosiyatif grubundan ketamin (Ketasol,

Richter Pharma AG, Avusturya), premedikan olarak ise ksilazin (Rompun, Bayer, Almanya) tercih edilmiştir. Ksilazin ve ketamin dozları ise sırasıyla 60 mg/kg ve 10 mg/kg olarak uygulanmıştır. Anestezi derinliğinin kontrolü için palpebral (göz kapağı) ve bacak refleksleri kontrol edilmiş ve söz konusu reflekslerin kaybolduğu anestezik derinlik safhasında maksimum kardiyak kan alma işlemi gerçekleştirilmiştir.

3.1.6. Kan Alma İşlemi

Uygun anestezik derinlik altındaki farelerden 1 ml' lik insülin enjektörleri vasıtasıyla maksimum kardiyak kan alma işlemi gerçekleştirilmiştir. Kan alma işleminin ardından örnekler, daha önceden uygun biçimde kodlanan sarı kapaklı jelli tüplere aktarılmış ve hemoliz ve pıhtı oluşumunun önüne geçebilmek için tüpler nazikçe alt üst edilerek çevrilmiştir. Ardından sakrifikasyon işlemi tamamlanana kadar kalacak şekilde +4°C' deki soğutuculara kaldırılmıştır. Tüm sakrifikasyon işleminin bitişiyle birlikte örnekler dakikadaki devir sayısı (rpm) 3000 olacak şekilde 15 dk boyunca santrifüj edilmiştir. Tüplerdeki jel ayraç (separatör) bölümünün üzerinde kalan serum kısmı ise otomatik pipet aracılığıyla kan alınan tüplerle aynı kodu içeren 1.5 ml' lik steril eppendorf tüplere aktarılmıştır. Daha sonra tüm farelere ait serum örnekleri hızlıca buz aküleriyle dolu strafor bir köpüğe konulmuş ve 2 saat içerisinde biyokimyasal analizlerin gerçekleştirileceği Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Laboratuvarına getirilmiştir. Kan alma işlemi Şekil 3.11' de gösterilmiştir.



Şekil 3.11. Kardiyak kan alma işlemi

3.1.7. Biyokimyasal Analizler

Serum elde etme işleminin ardından hızlı bir şekilde Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Laboratuvarına getirilen serum örnekleri burada mevcut olan biyokimya otoanalizörüne (Cobas C-702, Roche, Almanya) yüklenmiştir. Çalışmada insülin dışında yer alan tüm biyokimyasal parametreler cihazda yer alan hassas ticari kolorimetrik kitler aracılığıyla ölçülmüştür. Her ölçüm öncesi en az iki seviye kontrol materyali kullanılarak metodun doğruluğu test edilmiş ve kontrol sonuçlarının ± 2 standart sapma aralığında olduğu teyit edildikten sonra analizler gerçekleştirilmiştir. Otoanalizörde analizi gerçekleştirilen metabolik bileşenler arasında; serum TK, HDL-K, LDL-K, TG, albümin (ALB), ALT, AST ve glikoz parametreleri bulunmaktadır. Serum VLDL-K seviyeleri ise literatürde de kabul görmüş bir hesaplama yöntemi olan “Friedewald Formülü” aracılığıyla hesaplanmıştır (Friedewald ve ark., 1972). Bu formülle yapılan

serum VLDL-K hesabı ise şu şekildedir: Serum VLDL-K = Serum TG/5. Biyokimyasal analizlerin gerçekleştirildiği cihaz, Şekil 3.12’de gösterilmiştir.

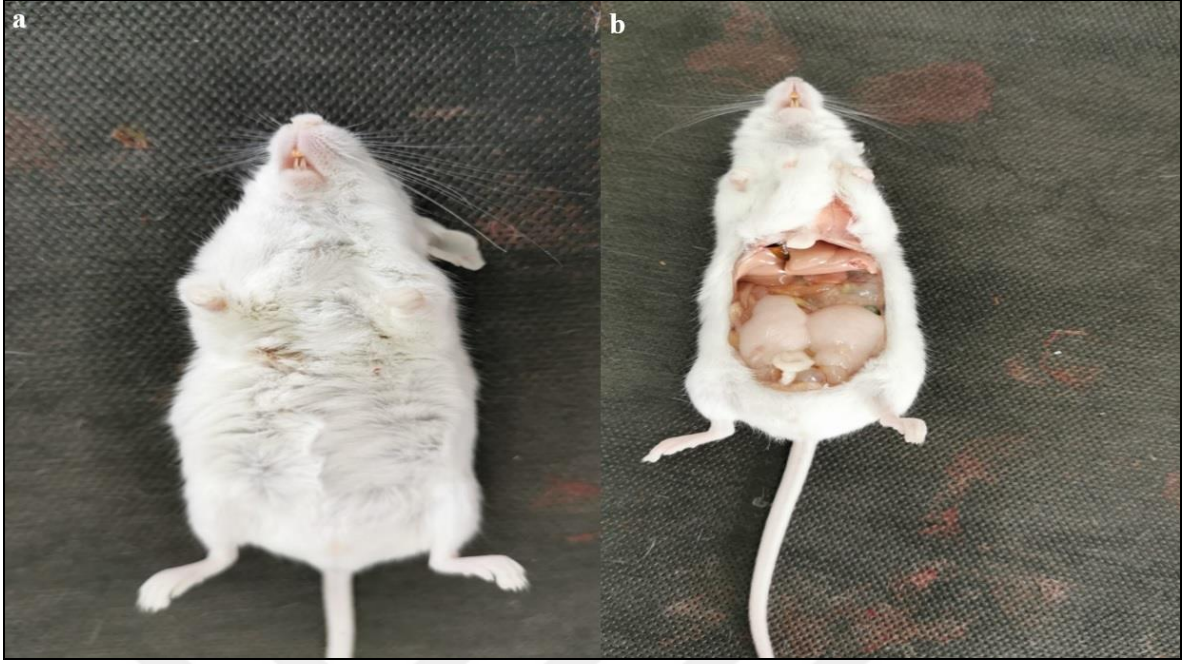
Serum insülin parametresi ise ticari enzim bağlı immünosorbent testi (ELISA) kiti (BT LAB, Çin) aracılığıyla analiz edilmiştir. Bu analiz, sandviç ELISA yöntemi kullanılarak Erciyes Üniversitesi Ziya Eren İlaç Uygulama ve Araştırma Merkezi’nde gerçekleştirilmiştir. Yönetici talimatları doğrultusunda ticari ELISA kitleri aracılığıyla gerçekleştirilen yöntemde, ölçülmek istenen maddeye özgü antikorlarla kaplanmış 96 adet kuyucuktan meydana gelen mikrolakanın ilk 10 kuyucuğu farklı konsantrasyonlarda standart solüsyon ve dilüsyon tamponu içeren standartlara ayrılmıştır. Ardından 1 kuyucuk boş bırakılmış ve sonraki 40 kuyucuğa ise standart solüsyon ile numuneler (serum örnekleri) eklenmiştir. Bu işlemlerin akabinde mikrolaka, 37°C sıcaklıkta 60 dk inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyonun ardından mikrolaka, yıkama cihazında (Biotek ELx50, Biotek Instruments, ABD) seyreltilmiş haldeki yıkama solüsyonuyla 5 kez yıkanmıştır. Söz konusu yıkama işleminden sonra boş kuyucuk dışındaki tüm kuyucuklara; kullanım talimatlarında da belirtildiği gibi Horseradish Peroksidaz (HRP) konjugatına özgü antikor eklenmiş ve mikrolaka 37°C sıcaklıkta 30 dk boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra mikrolakayı yıkama işlemi bir kez daha tekrarlanmıştır. Bu işlemten sonra loş bir ortamda tüm kuyucuklara kromojen substrat solüsyonları eklenmiş ve bir müddet sonra örneklerin bulunduğu kuyucuklarda mavi rengin oluştuğu gözlemlenmiştir. Ardından mikrolaka mikserle 5 dk boyunca karıştırılmış ve son defa 37°C sıcaklıkta 30 dk boyunca inkübe edilmiştir. Daha sonra ise tüm kuyucuklara durdurma (stop) solüsyonları ilave edilmiş ve rengin maviden sarıya döndüğü saptanmıştır. Mikrolakalarda yer alan kuyucuklar, spektrofotometrenin optik değeri 450 nanometre (nm)’ye ayarlanıp kolorimetrik olarak okunmuştur. Serum örneklerinin optik dansite değerleri standart eğrilerle kıyaslanmış ve bu sayede konsantrasyon değerlerine ulaşılmıştır.



Şekil 3.12. Biyokimyasal analizlerin gerçekleştirildiği Cobas C-702 cihazı

3.1.8. Histolojik Prosedürler

Kan alım işleminin hemen ardından farelerin karaciğer dokuları hızlı bir şekilde çıkarılarak %10' luk formaldehit solüsyonuna konulmuştur. Bu dokuların histolojik analizlerde stabil bir biçimde tespit edilebilmesi için formaldehit solüsyonunda bir süre bekletilmesi gerekmiştir. Ardından dokular, içeriğindeki alkol oranları gittikçe artan serilere tâbi tutulmuş (%50, %70, %96, absolut alkol x 3) ve bu sayede yapılarında bulunan su uzaklaştırılmıştır. Daha sonra dokular ksilen solüsyonlarında bekletilmiş ve akabinde 65 °C' lik etüvde bulunan eriyik haldeki parafine alınmıştır. Bu işlemlerin akabinde ise parafinlenmiş dokular bloklanarak kesit almaya hazır hale getirilmiştir. Hazırlanan parafin bloklardan 5 µm' lik kesitler alınmış ve lamlara yayılmıştır. Bu kesitler kullanılarak karaciğer dokusu için Hematoksilen Eozin (HE) boyaması, Periyodik Asit Schiff (PAS) boyaması ve interlökin-6 (IL-6) immunoreaktivitesinin gösterilmesi için immunohistokimya uygulaması gerçekleştirilmiştir. Karaciğer dokusunun çıkarılması işleminin öncesi (a) ve sonrası (b) ise Şekil 3.13'te gösterilmiştir.



Şekil 3.13.Karaciğer dokusu çıkarılması işleminin öncesi (a) ve sonrası (b)

3.1.8.1. HE Boyama Prosedürü

Parafinlenmiş karaciğer kesitleri ilk olarak etüvde bekletilmiş daha sonra ise ksilen solüsyonuna alınmıştır. Bu işlemler sonucu kesitlerin içeriğindeki parafin uzaklaştırılmıştır. Parafini uzaklaştırılmış kesitler, alkol solüsyonlarından geçirilerek suyla yıkanmıştır. Daha sonra bu kesitler 8 dk boyunca hematoksilen boya solüsyonunda tutulmuş ve ardından akan musluk suyu altında yıkanmıştır. Daha sonra Eozin solüsyonuna alınan bu kesitler, 5 dk burada bekletilmiştir. Akabinde ise tekrar suyla yıkanan kesitler alkol serilerine tâbi tutularak bir kez daha ksilen solüsyonunda bekletilmiştir. Her iki solüsyonla gerçekleştirilen boyama sonrası kesitler kapatılmış ve incelemeye alınmıştır. Karaciğer kesitlerinde gözlemlenen hepatosit dejenerasyonu, mikroveziküler steatozis, lobüler ve portal alanlarda görülen inflamatuvar hücre infiltrasyonları gibi histolojik değişiklikler ise uzman bir histolog tarafından skorlanmıştır. Histolojik değişimlerin skorlaması; 0 (yok), 1 (hafif), 2 (orta) ve 3 (şiddetli) olarak gerçekleştirilmiştir. Tüm işlemler sonucu elde edilen veriler ise istatistiksel analiz metotları aracılığıyla incelenmiştir.

3.1.8.2. PAS Boyama Prosedürü

Histolojik boyama için alınmış olan kesitler ilk olarak etüvde bekletilmiş ve böylece yapısındaki parafin uzaklaştırılmıştır. Daha sonra bu kesitler, ksilen ve alkol solüsyonlarından geçirilerek musluk suyu altında yıkanmıştır. Akabinde aynı kesitler periyodik asit solüsyonunda bekletilmiş ve musluk suyu ile bir kez daha yıkanmıştır. Ardından bu kesitler oda sıcaklığında tutulan karanlık bir ortamda Schiff solüsyonunda bekletilmiş ve musluk suyu altında tekrar yıkanmıştır. Tüm bu işlemlerden sonra ise kesitlere hematoksilin boyası uygulanmış ve bir müddet bekletildikten sonra kesitler tekrar yıkanmıştır. Sonrasında ise yıkanmış kesitlere hızlı bir şekilde asit-alkol uygulaması gerçekleştirilmiştir. Son defa suyla yıkanan kesitler, alkol ve ksilende bekletildikten sonra kapatılarak histolojik incelemeye alınmıştır.

3.1.8.3. İmmünohistokimya Prosedürü

Farklı gruptaki farelere ait IL-6 immunoreaktivitesinin gösterilmesi amacıyla immunohistokimya prosedürü uygulanmıştır. Parafinlenmiş kesitler, 65°C'lik etüvde bir gece bekletilmiş ve ardından ksilen solüsyonuna alınarak deparafinizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Daha sonra kesitler, dereceli alkol serilerinden geçirilmiş ve PBS ile yıkanmıştır. Akabinde PBS ile yıkanan kesitler, antijen geri kazanımı için %5' lik sitrat tamponuyla mikrodalga fırında muameleye tâbi tutulmuştur. Mikrodalga fırınından alınan kesitler, hidrojen peroksit (H_2O_2) çözeltisinde bekletilmiş ve kesitler tekrar PBS çözeltisiyle yıkanmıştır. Bu basamaktan sonraki işlemler ise yönetici talimatları doğrultusunda immunohistokimya boyama kiti (LabVision, Ultra Vision Detection System Large Volume Anti-Polyvalent, Thermo Fisher Scientific, ABD) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kesitlerdeki IL-6 immunoreaktivitelerini görünür hale getirmek için diamin benzidin (DAB) (DAB Plus Substrate System, Thermo Fisher Scientific, ABD) uygulanmış ve sonrasında ise kesitler suyla yıkanmıştır. Yıkamanın ardından kesitler, Gill hematoksilin solüsyonu ile karşıt biçimde boyanmış ve arkasından tekrar suyla yıkanmıştır. Tekrar yıkanan kesitler bu kez önce alkol sonra ise ksilen solüsyonlarından geçirilerek kapatılmıştır. Nihayetinde her bir deney grubunun içindeki her bir kesitten toplam 10 adet resim alınmış ve alınan resimlerden farklı iki alan ölçümü gerçekleştirilmiştir. Böylece IL-6 immunoreaktivitesi için her gruptan toplam 160 alan

ölçümü Image J programı aracılığıyla gerçekleştirilmiştir. Gruplar arasında meydana gelen farklılıklar ise istatistiksel analizler yapılarak belirlenmiştir.

3.1.9. Bakteriyel DNA İzolasyon İşlemi

Feçes örneklerinden DNA izolasyonu ticari kit (Thermo Fisher Scientific, ABD) aracılığıyla gerçekleştirilmiştir. Bu işlemin uygulanmasında yönetici talimatları doğrultusunda takip edilen protokoller kısaca şu şekilde özetlenmiştir: İlk olarak 0.1 g ağırlığındaki feçes örnekleri alınarak bead tüplere konulmuştur. Akabinde bead tüplere 700 µl lizis tamponu (lysis buffer) eklenmiş ve tüplerin ağzı sıkıca kapatılarak feçes örnekleri tüpün içinde homojen bir biçimde dağılına kadar vortekslenmiştir. Ardından tüplere 100 µl lizis artırıcı solüsyon eklenmiş ve kısa bir süre daha vortekslenmiştir. Daha sonra feçes örneklerinin bulunduğu tüpler, 65 °C sıcaklıkta 10 dk süreyle inkübatöre koyulmuştur. İnkübatörden alınan örnekler bu kez 10 dk süren yatay vorteksleme işlemine tâbi tutulmuştur. Yatay vortekslemeden sonra tüpler, 14000 x g' de 5 dk daha santrifüjlenmiştir. Bütün bu işlemlerin ardından tüplerin üst bölgesinde bulunan süpernatant kısmı, altta bulunan çöküntüyle temas ettirilmeden mikropipet aracılığıyla başka bir steril tüpe (1.5 ml' lik eppendorf mikrosantrifüj tüpü) 400 µl hacimde olacak şekilde aktarılmıştır. Aktarılan süpernatantın üzerine 250 µl hacminde Cleanup Buffer solüsyonu eklenmiş ve tekrar vortekslenmiştir. Vorteks işleminin ardından mikrosantrifüj tüpü, 14000 x g' de 2 dk santrifüjlenmiştir. Santrifüjün ardından ise tüpün yüzeyinde kalan süpernatant kısmı dipte bulunan pelete değmeyecek şekilde mikropipet aracılığıyla 500 µl hacminde çekilerek yine steril nitelikteki başka bir mikrosantrifüj tüpüne (1.5 ml' lik eppendorf mikrosantrifüj tüpü) aktarılmıştır. Yukarıda bahsi geçen tüm bu işlemlerin ardından lizat hazırlığı tamamlanmış ve DNA moleküllerinin bağlanması aşamasına geçilmiştir. Şekil 3.14'te ise lizat hazırlığı işleminin bir aşaması olan bead tüplerin yatay vorteksleme işlemi gösterilmiştir.



Şekil 3.14. Lizat hazırlık işlemindeki bead tüplerin yatay vorteksleme işlemi

Lizat hazırlığının son kısmında steril bir mikrosantrifüj tüpüne alınan 500 μ l hacmindeki süpernatantın üzerine bu kez 900 μ l hacminde Binding Buffer solüsyonu eklenmiş ve kısa bir süre vortekslenmiştir. Akabinde süpernatant ve solüsyon içeren toplam 1400 μ l karışımın 700 μ l hacmindeki miktarı mikropipetle alınarak filtreli bir tüpe (spin column tube) aktarılmıştır. Kapağı sıkıca kapatılan filtreli tüp, 14000 x g' de 1 dk santrifüjlenmiş ve filtreli tüpün alt kısmında kalan sıvı uzaklaştırılmıştır. Az önceki işlemde artakalan süpernatant ve solüsyonun 700 μ l hacmindeki kısmı, filtreli tüpe tekrar eklenmiş ve santrifüj aşaması aynı şekilde bir kez daha gerçekleştirilmiştir. Böylece DNA izolasyon işleminin ikinci aşaması olan DNA' nın bağlanması aşaması da tamamlanmıştır.

Son olarak ise DNA' nın yıkandığı ve ayrıştırıldığı aşamaya geçilmiştir. Bu aşamada ise şu sırasıyla şu işlemler uygulanmıştır: Başlangıçta DNA moleküllerinin bağlandığı aşamanın sonundaki işlemde yer alan filtreli tüpün üst kısmı, toplama tüplerine (collection tube) yerleştirilmiş ve iç içe geçmiş ikili bir tüp yapısının oluşması sağlanmıştır. Ardından bu ikili yapıya 500 µl yıkama tamponu (wash buffer) eklenmiş ve 14000 x g' de 1 dk santrifüj edilmiştir. Söz konusu santrifüjden sonra alta geçen süzöntü atılmış ve ikili tüp yapısı 14000 x g' de 30 saniye (sn) daha santrifüjlenmiştir. Santrifüjlemenin ardından ikili tüp yapısının üst kısmında bulunan filtreli tüp çıkarılmış ve başka bir steril mikrosantrifüj tüpüne (1.5 ml' lik eppendorf mikrosantrifüj tüpü) yerleştirilmiştir. Akabinde ise yeniden oluşturulan bu ikili tüp yapısının üzerine 100 µl elüsyon tamponu (elution buffer) eklenmiş ve 1 dk boyunca oda sıcaklığında bekletilmiştir. Bekleme işleminden sonra ikili tüp yapısının 14000 x g' de 1 dk süreyle santrifüj işlemi gerçekleştirilmiştir. Tüm bu işlemlerin ardından ikili tüp yapısının üstünde kalan filtreli tüp kısmı atılmış ve böylece alttaki mikrosantrifüj tüpünde saf DNA örnekleri elde edilmiştir. Son olarak numune örnekleri NGS işleminin gerçekleştirileceği güne kadar GENKÖK' de bulunan -20 °C' deki soğutuculara kaldırılmıştır.

3.1.10. Feçes Örneklerinin NGS ile Gerçekleştirilen Bağırsak Mikrobiyota Analizi

Genomik çalışmaların merkezinde bulunan 16S rRNA dizisi, bakteri genomuna dağılmış halde bulunan 9 adet korunmuş (C1-C9), 9 adet de çok değişken bölge (V1-V9) içermektedir (Petrosino ve ark., 2009). Bu çok değişken bölgeler yüksek oranda farklılık gösterdiği için taksonomik sınıflandırmada ciddi bir öneme sahiptir. Bakteri filogenetik analizinde en sağlıklı sonucu veren V4-V6 bölgeleri ise tüm 16S rRNA dizisini temsil ettiği için, çalışmalarda en çok tercih edilen bölgedir. Daha az değişken bölgelerin başında ise V2-V8 bölgeleri gelmektedir. Söz konusu 16S rRNA geninin yapısında bulunan çok değişken bölgeler, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) tekniğinde de bu bölgelere bağlanabilen primerlerin tasarlanması için uygun koşullara sahiptir (Neelakanta ve Sultana, 2013; Turan ve ark., 2018).

Bu çalışmada fekal mikrobiyota analizi, Illumina MiSeq cihazı aracılığıyla NGS teknolojisi kullanılarak gerçekleştirilmiş ve bu sayede mikrobiyal çeşitlilik değerlendirilmiştir. Yeni nesil dizileme teknolojileri ile daha düşük maliyetle, daha kısa

sürede, daha büyük dizileme verileri elde edilebilmektedir. Illumina MiSeq sistemi kullanılarak yapılan dizilemede 25 milyon okuma sayısına erişilebilmektedir. Illumina tabanlı mikrobiyota analiz işlemleri; geniş kapsamlı, yüksek verimli, sistematik hataların önemli ölçüde az olduğu veriler sunması sebebiyle, metagenomik araştırmalarda sıklıkla tercih edilmektedir (Oulas ve ark., 2015).

Çalışmada ilk olarak DNA izolasyonu yapılan gaita örneklerinin 16S rRNA genine ait V3-V4 bölgeleri PCR yöntemiyle çoğaltıldıktan sonra örneklerin çalışıp çalışmadığının jel elektroforezinde kontrolleri yapılmıştır. Daha sonra ise ortamda çoğalmayan artefaktları temizlemek için saflaştırma işlemi gerçekleştirilmiştir. Akabinde ise her bir örneğin havuzlandığında tek hale gelebilmesi için Index PCR işlemi uygulanmıştır. Bu işlemde ise Illumina index primerleri kullanılarak gen çoğaltma işlemi gerçekleştirilmiştir. Gen çoğaltma işleminin ardından ortamdaki artefaktların tekrardan temizlenmesi amacıyla son saflaştırma işlemi yapılmış ve tüm örnekler bir tüp içine toplanmıştır. Daha sonra Illumina MiSeq yükleme protokolüne göre florometrik olarak ölçüm yapılan havuzdan 4 nm olacak şekilde seyreltme işlemi gerçekleştirilmiştir. Son olarak ise denatürasyon işlemleri yapılmış ve ardından örnekler 10 pM olarak Illumina MiSeq cihazına yüklenmiştir.

3.1.10.1. DNA Konsantrasyonunun Ölçümü

Bakteriyel DNA izolasyonunun son aşamasında elüsyon tamponu kullanılarak elde edilen ve PCR işlemi için gerekli olan DNA konsantrasyonu, AccuGreen High Sensitivity dsDNA Quantitation Kit (Biotium, ABD) aracılığıyla ölçülmüştür. Söz konusu kit, Qubit Fluorometer (Thermo fisher Scientific, ABD) cihazıyla uyumlu biçimde; 5 pg/µl ile 100 ng/µl arasındaki örnek miktarlarının RNA üzerindeki çift sarmallı DNA (dsDNA) konsantrasyonlarını doğrulamak için tasarlanmıştır. Bu kit sayesinde örnekte bulunan bazı solvent, protein ve serbest nükleotitler gibi çeşitli kontaminantların sonuçlar üzerine etkisi minimize edilmiştir. Başlangıçta AccuGreen High Sensitivity Quantitation Kit reaktanı, kit içeriğinde bulunan DNA Quantitation tamponu kullanılarak 1:200 oranında dilüe edilip AccuGreen çalışma solüsyonu hazırlanmıştır. Örnekleri ve standartları yerleştirmek için 1.5 ml'lik Eppendorf DNA LoBind (Eppendorf, Almanya) tüpleri kullanılmıştır. Standartların oluşturulduğu tüplere 190 µl AccuGreen çalışma solüsyonu ve kit içeriğinde bulunan standart solüsyondan ise 10 µl eklenmiş ve ardından tüp, kabarcık oluşturmayacak

şekilde çok kısa bir süre vortekslenmiştir. Örneklerin oluşturulduğu tüplere ise 10 µl örnek ve 190 µl AccuGreen çalışma solüsyonu eklenmiş ve standart oluşumuna benzer biçimde tüpler kabarcık oluşturmayacak şekilde çok kısa süreliğine tekrar vortekslenmiştir. Akabinde hem standartların hem de örneklerin hazırlandığı tüpler oda sıcaklığında 2 dk süreyle inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon işleminin ardından DNA konsantrasyonu (ng/µl) Qubit Fluorometer vasıtasıyla ölçülmüştür.

3.1.10.2. PCR ve Sekanslama İşlemine Hazırlık

Elde edilen DNA' nın konsantrasyonu ve saflığı, %1'lik agaroz jel varlığında izlenmiştir. Agaroz jel izleminin ardından DNA konsantrasyonu, EASY Dilution (Takara, Japonya) adlı solüsyon kullanılarak 1 ng/µL düzeyine kadar dilüe edilmiştir. Yeni nesil dizileme uygulamasından önce ampikon kütüphanesinin hazırlanması gerekmektedir. Bu amaçla ise PCR yöntemi aracılığıyla örneklerdeki V3 ve V4 bölgeleri çoğaltılmaktadır (Edgar, 2010). Çalışmanın bu aşamasında PCR metodu kullanılarak gen çoğaltma işlemine geçilmiştir. Bakteriyel türlerin tespitinde ise moleküler anlamda en sık kullanılan değişken kısım olan V3 ve V4 bölgelerinden yararlanılmıştır. Bu bölgelerin çoğaltılması sırasında ileri ve geri yönlü primerler kullanılmıştır. Söz konusu primer çifti, yaklaşık 2x250 baz çifti (bp) uzunluğundaki bir bölgenin çoğaltılmasını sağlamaktadır. Çoğaltmada kullanılan ileri ve geri yönlü primerler ise aşağıdaki gibidir:

16S Ampikon PCR İleri Yönlü Gen Dizisi = 5'

TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG

16S Ampikon PCR Geri Yönlü Gen Dizisi = 5'

GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAAT
CC

Polimeraz zincir reaksiyon tekniğiyle gen çoğaltma sırasında 2.5 µl mikrobiyal DNA (5 ng/µl), 5 µL ileri yönlü primer, 5 µL geri yönlü primer ve 12.5 µL PrimeSTAR GXL Premix (Takara, Japonya) kullanılmıştır. Ardından elde edilen örnekler 95°C' de 3 dk, devamındaki toplam 25 döngü için ise -95°C' de 30 sn, -55°C' de 30 sn, -72°C' de 30 sn, 72°C' de 5 dk işleme tâbi tutulmuş ve +4°C' de muhafaza edilmek üzere saklanmıştır (Illumina, 2013).

Gen çoğaltma işleminin yapıldığı örneklerde ortamda çoğalmayan moleküler kalıntıları temizlemek için PCR ürün temizliği gerçekleştirilmiştir. Kapa Pure Beads (Roche, Almanya) manyetik özellikli boncukların kullanıldığı bu aşamada; primer dimerler ve serbest primerler ortamdan uzaklaştırılmıştır. Bu uzaklaştırma işlemi iki basamaktan oluşmuştur. İlk basamakta her bir örneğe 20 µl Kapa Pure Beads manyetik boncuklar eklenmiş ve pipetleme yapılmıştır. Manyetik stand kullanılarak istenilen PCR ürünlerinin manyetik özelliğe sahip boncuklara tutunması sağlanmıştır. İkinci basamakta ise kontaminasyonun önüne geçmek için manyetik boncuk eklenmiş örnekler, 200 µl hacmindeki %80' lik etanol çözeltisiyle yıkanmıştır. Yıkamanın ardından ise saf PCR ürünü, 50 µl 10 Mm pH 8.5 Tris solüsyonunda saklanmıştır (Illumina, 2013).

Yeni nesil sekanslama işlemi sırasında çeşitli örneklerin ayırt edilebilmesi ve sayıca birden çok örneğin tek okumada sonuç verebilmesi için elde edilen PCR ürünlerine “indeks barkod” görevi gören özel baz dizileri ile PCR ürünlerinin yeni nesil sekanslama cihazındaki özel oligo bağlanma bölgelerine tutunmasını sağlayan “adaptör” dizileri eklenmiştir. Bu işlem için Nextera XT (Illumina, ABD) indeks kiti kullanılmış ve her bir örneğe 2 adet barkod bölgesi, prosedüre uygun bir biçimde PCR koşullarında bağlanmıştır. Bu prosedüre göre; 5 µl DNA, 5 µl Nextera XT Index Primer 1 (N7xx), 5 µl Nextera XT Index Primer 2 (S5xx), 25 µl PrimeSTAR GXL Premix ve 10 µl distile su kullanılmıştır. Elde edilen PCR ürünü 95°C’ de 3 dk, devamındaki toplam 8 döngü için ise -95°C’ de 30 sn, -55°C’ de 30 sn, -72°C’ de 30 sn, 72°C’ de 5 dk işleme tâbi tutulmuş ve +4°C’ de muhafaza edilmek üzere saklanmıştır (Illumina, 2013).

Analiz aşamasına geçilmeden önce minimal düzeyde de olsa örneklerde bulunabilen moleküler kalıntıları tamamen ortadan kaldıracak için ikinci kez PCR ürün temizliği yapılmıştır. Daha önceki PCR ürün temizliğine benzer şekilde burada da manyetik özellikli Kapa Pure Beads boncukları kullanılarak ortamdan primer dimer ve serbest primerler uzaklaştırılmıştır. Bu uzaklaştırma işlemi de iki basamaktan oluşmuştur. Ancak bu kez ilk temizlik işleminden farklı olarak her bir örneğe 56 µl Kapa Pure Beads manyetik boncuk eklenmiş ve pipetlenmiştir. Daha sonra manyetik stand kullanılarak istenilen PCR ürünlerinin manyetik boncuklara tutunması sağlanmıştır. İkinci basamakta ise kontaminasyonun önüne geçmek için ilk basamakta olduğu gibi manyetik boncuk eklenmiş

örnekler, 200 µl hacmindeki %80' lik etanol çözeltisiyle iki defa yıkanmıştır. Yıkamanın ardından elde edilen saf PCR ürünü ise 25 µl 10 Mm pH 8.5 Tris solüsyonunda muhafaza edilmek üzere kaldırılmıştır (Illumina, 2013).

3.1.10.3. 16S Amplikon Sekanslaması, Kütüphane Miktar Tayini, Normalizasyonu ve Birleştirilmesi

DNA izolasyonunun ardından bakteri DNA' larında yer alan 16S rDNA V3-V4 bölgeleri, bu bölgeye spesifik 314F-860R primer setleri kullanılarak amplifiye edilmiştir. Ardından örnekler ait kütüphanelerin hazırlanmasında Nextera XT DNA (Illumina, ABD) kütüphane hazırlama kit ve indeksleri kullanılmıştır. Yeni nesil dizileme işlemi yürüten Illumina MiSeq cihazlarından elde edilen biyoinformatik verilerin kalite düzeylerini yükseltmek için her bir akış hücresi üzerinde oluşan kümelenmenin optimum seviyede olması gerekmektedir. Akış hücreleri, dizilemenin gerçekleşmesi için elzem olan kimyasal reaksiyonların olduğu ve yapısal olarak küçük kanallardan meydana gelen ince camdan tabakalar olarak tanımlanmaktadır. Bahsi geçen kümelenmenin sağlıklı bir biçimde oluşturulması ve kütüphane miktar tayininin hassas bir biçimde tespiti için ise kantifikasyon işlemi uygulanmıştır. Örnekler ait kütüphaneler birleştirilmeden önce normalizasyon aşamasından geçirilmiştir. Normalizasyon aşamasındaki amaç, tüm örneklerin tek bir kütüphane özelinde temsil edilmesini sağlamaktır. Söz konusu aşamada manyetik özelliğe sahip boncukları içeren AMPure XP (Beckman Coulter, ABD) bead tüpler kullanılmıştır. Bu tüplerin içindeki manyetik boncukların örnekler ait kütüphanelere tutunma kapasitesi eşittir. Bu yüzden de örnekler has kütüphanelerin birleştirilmesi sonucu oluşturulan tek kütüphane içerisinde her bir örneğin eşit oranda temsil edilmesi sağlanmıştır (Illumina, 2013).

3.1.10.4. Örneklerin Yeni Nesil Dizileme Yöntemiyle Okunması

Kütüphane hazırlık işlemlerinin ardından tek bir formda birleştirilmiş kütüphane, Illumina MiSeq cihazında okumanın gerçekleştirilmesi için akış hücresine eklenmiştir. Akış hücresinin yüzeyine yapışık biçimde bulunan oligolar ise kütüphanede bulunan adaptör dizilerinin tamamlayıcı bileşenlerini oluşturmaktadır. Köprü amplifikasyonu aracılığıyla her bir fragmentin ayrı ve kopyalanmış kümeler şeklinde çoğaltılması (clustering) sağlanmıştır. Illumina MiSeq cihazıyla gerçekleştirilen NGS işleminde, "Sequencing by

Synthesis” teknolojisi kullanılmıştır. Bu teknoloji sayesinde her bir bazın tespiti, dizileme sırasında DNA kalıbının üzerine eklenirken gerçekleştirilmiştir. Söz konusu dizilemede kullanılan ve DNA nükleotid dizileri anlamına gelen dNTP’ ler ise işleme özgü tersinir yapıda ve sonlandırma dizisine (terminatör) bağlanabilir özelliktedir. Bu dNTP’ ler sahip oldukları kimyasal yapıları kaynaklı; her bir dizileme döngüsündeki hata payını ve yanlış baz eklenmesi olasılığını minimize etmektedir. Tüm bu etmenler sonucu, dizilemenin her bir baz açısından yüksek doğruluğa sahip olması sağlanmaktadır (Illumina, 2013).

Kalıp DNA üzerinde bulunan tekrar eden bölge ya da homopolimer DNA dizileri, farklı dizileme tekniklerinde birtakım yanlış okumalara ya da okumaların söz konusu bölge ve dizilerde sonlanmasına yol açmaktadır. Ancak Illumina MiSeq cihazının sahip olduğu bu özel “Sequencing by Synthesis” teknolojisi ve spesifik dNTP’ ler sayesinde tekrar eden bölgeler ve homopolimer DNA dizilerinde yukarıda bahsi geçen sıkıntılara rastlanmadan okuma gerçekleştirilmiştir (Illumina, 2013).

3.1.10.5. Yeni Nesil Dizileme İşleminde Kullanılan Biyoinformatik Analizler

İlk olarak Illumina MiSeq platformunda 2x250 bp uzunluğundaki çift yönlü (pair-end) okumalar QIIME2 sistemine yüklenmiştir (Bolyen ve ark., 2019). Ardından bütün örneklerin birbirine yakın (100X) okuma derinliği üzerinde olduğu tespit edilmiş ve bu aşamada hiçbir örnek çalışma dışı bırakılmamıştır. Kalite temizlemesi ve kimera deteksiyonu ise QIIME2 programı üzerinde DADA2 algoritması kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Callahan ve ark., 2016). Kalite skoru (phred score), 30 değerinin altında olan kısımlar devre dışı bırakılmış ve akabinde Amplikon Sekans Varyantları (ASV) oluşturulmuştur. Elde edilen ASV’ ler ise SILVA 138 (<https://www.arb-silva.de/documentation/release-138/>) veritabanı aracılığıyla haritalanarak taksonomik tablolar meydana getirilmiştir (Schloss 2021; Werner ve ark., 2012). Veri görselleştirme ve biyoistatistiksel analizler için QIIME2 aracılığıyla oluşturulan dosyalar, R 4.1 programlama dili ve R studio kullanılarak işleme alınmıştır (McMurdie ve Holmes, 2013; R Project, 2022). Bir örneğe ait taksonomik birimlerin düzeylerini yorumlamak için Chao1, Shannon ve Simpson gibi alfa çeşitliliğe (α -diversity) ait indeksler kullanılmıştır. Gruplar arasındaki istatistiksel anlamlılığı yorumlamak için ise Kruskal-Wallis testi kullanılmıştır (Kruskal ve Wallis, 1952). Örnekler arasındaki taksonomik farklılıkları yorumlamak için ise Jaccard,

Bray-Curtis, ağırlıklı ve ağırlıksız Unifrac mesafesi gibi beta çeşitliliğe (β -diversity) ait analiz metotlarından yararlanılmıştır. Taksonomik açıdan gruplar arasındaki yoğunluk farklılıkları ise DeSeq2 paketi kullanılarak tespit edilmiştir (Love ve ark., 2014). Gruplar arasında taksonomik üniteler düzeyinde istatistiksel açıdan anlamlı farklılık olup olmadığı ise doğrusal diskriminant analizi etki büyüklüğü (LEfSe) aracılığıyla belirlenmiştir (Segata ve ark., 2011).

3.2. İstatistiksel Değerlendirme

Araştırmada elde edilen veriler SPSS (Statistical Package for Social Sciences) for Windows 25.0 programı deneme sürümü kullanılarak analiz edilmiştir. Verileri değerlendirilirken tanımlayıcı istatistiksel metotlar (sayı, medyan, minimum ve maksimum değerleri, ortalama ve standart sapma vb.) kullanılmıştır.

Kullanılan verilerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro-Wilk testi ile test edilmiştir. Normal dağılım gösteren değişkenlerde niceliksel verilerin karşılaştırılmasında; ikiden fazla bağımsız grubun kıyaslandığı durumlarda tek yönlü varyans analizi kullanılmıştır. Söz konusu analizde fark yaratan grup ya da grupları tespit etmek için varyans homojenliği varsayımı sağlandığında Tukey testi, varyans homojenliği varsayımı sağlanmadığında ise Tamhane's testi uygulanmıştır. Normal dağılım göstermeyen değişkenlerde ise niceliksel verilerin kıyaslanmasında; ikiden fazla bağımsız grubun karşılaştırıldığı durumlarda Kruskal-Wallis H testi, ikiden fazla bağımlı grup karşılaştırmalarında da Friedman testi uygulanmıştır. Bu analizlerde fark yaratan grup ya da grupları tespit etmek için ise düzeltilmiş Bonferroni testi kullanılmıştır. Ayrıca tabloların sütunlarında yer alan bulgular hem “ortalama $\pm$ standart sapma” hem de “medyan (çeyreklik açıklığı)” ve “minimum-maksimum değerler” şeklinde belirtilmiştir. Sayısal değişkenler arası ilişkilerin belirlenmesi amacıyla Spearman rank korelasyon katsayısı kullanılmıştır. İstatistiksel anlamlılık düzeyi ise “ $p < 0.05$ ” olarak kabul edilmiştir.

3.3. Araştırmanın Sınırlılıkları

Çalışmada deney hayvanı olarak vahşi tip (WT) olarak adlandırılan türlerden birisi olan BALB/C tipi fareler kullanılmıştır. Söz konusu fare türü yem tüketimleri aracılığıyla “hiperkolesterolemik” hale getirilmeye çalışılmıştır. Bu amaçla yağ ve kolesterol içeriği

yüksek bir diyet tipi model olarak alınmış ve bununla birlikte yeme ekstra kolesterol ve kolik asit gibi bileşenler eklenerek hiperkolesterolemik tablonun oluşumu güçlendirilmeye çalışılmıştır. Bu araştırmadaki uygulamalara benzer şekilde yem ile WT farelerde hiperkolesterolemi tablosunun oluşturulduğu çalışmalar literatürde bulunmaktadır. Güncel çalışmalar incelendiğinde ise hiperkolesterolemi tablosunun oluşturulmasında kullanılan hayvan türü açısından çeşitli alternatifler bulunduğu da saptanmıştır. Bu alternatifler arasında ise farklı metabolik bileşenlere özgü olarak çeşitli gen bölgeleri silinmiş ya da kesilmiş fare türleri (knockout fareler), ön plana çıkmıştır. Hiperkolesterolemi tablosu oluşturmaya yatkın deney hayvanları arasında LDLr^{-/-} ve ApoE^{-/-} gibi çeşitli knockout fare türleri bulunmaktadır. Bahsi geçen knockout fare türlerinde hiperkolesterolemi tablosu, WT türü farelerde olduğu gibi diyet ya da yem tüketimi aracılığıyla belirli bir sürecin ardından değil de yapılan genetik müdahale sonucu doğuştan oluşmaktadır. Vahşi tip farelerde ise metabolizma farklılıklarına ve hastalıklara karşı bireysel direnç farklılıklarına bağlı olarak beslenme ile çeşitli hastalık modeli oluşturma sürecinde bazı sıkıntılarla karşılaşılabilir. Bu çalışmada ise deney hayvanı olarak knockout fare türleri çalışmaya getirdiği çok yüksek maliyetleri açısından kullanılamamış ve bu ise araştırmanın bir sınırlılığı olarak görülmüştür.

4. BULGULAR

4.1. Vücut Ağırlığı, Yem Tüketimi ve Yem Etkinlik Oranına Ait Bulgular

Mevcut çalışmanın başlangıcında farelerin 5 ayrı gruba randomize bir şekilde dağıtımı gerçekleştirilmiştir. Söz konusu dağıtım işlemi sonucu gruplar arasındaki ortalama vücut ağırlığı farkının literatüre uygun olarak ± 2 g düzeyinde olduğu saptanmıştır. Bu işlemlerin ardından tüm gruplara ait fareler, bir haftalık adaptasyon periyodu sürecine tâbi tutulmuştur. Bu süreçte tüm gruplar standart örüntüye sahip yemlerle beslenmiş ve bu bir haftanın ardından da gruplar arasında vücut ağırlığı bakımından anlamlı bir farklılık olmadığı görülmüştür ($p>0.05$). Böylece YYYY yemlerle beslenmeyi ve probiyotik/prebiyotik uygulamalarını içeren 12 haftalık deneysel uygulama aşamasına geçilmeden önce ortalama vücut ağırlıklarının gruplar arasında dengeli bir biçimde dağıldığı gözlemlenmiştir. Adaptasyon periyodunun ardından 8 hafta boyunca uygulanan hiperkolesterolemi oluşturulma periyodu ve 4 hafta boyunca uygulanan deneysel periyot sürecinin her bir haftasındaki ortalama vücut ağırlıkları ise grup içi ve gruplar arasında ayrı ayrı karşılaştırılmış ve sonuçlar Tablo 4.1’de verilmiştir.

Gruplar arasında ortalama vücut ağırlıkları açısından ilk 7 haftada önemli bir fark bulunmadığı saptanmıştır ($p>0.05$). Ancak 8. haftadaki ortalama vücut ağırlığı değerleri, gruplar arasında kıyaslandığında ise istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık olduğu tespit edilmiştir ($p<0.05$). Söz konusu bu farkın hangi grup ya da gruplardan kaynaklandığını anlamak için yapılan ikili karşılaştırma testi sonuçlarına göre; PK grubu değerlerinin NK ve SİN grubu değerlerine göre daha yüksek olduğu görülmüştür ($p = 0.016$). Buna paralel olarak PK grubuna ait farelerin 10. ($p = 0.002$), 11. ($p = 0.002$) ve 12. ($p = 0.002$) haftalarda da PRE ile SİN gruplarından daha fazla ortalama vücut ağırlığına sahip olduğu

belirlenmiştir. On üçüncü hafta PK grubu ortalama vücut ağırlığı değerinin ise sadece PRE ve SİN gruplarından değil aynı zamanda PRO grubundan da anlamlı ölçüde daha yüksek olduğu görülmüştür ($p = 0.000$).

Negatif kontrol grubundaki farelerin ortalama vücut ağırlığı değerleri grup içerisinde haftalara göre kıyaslandığında; bazı gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunduğu belirlenmiştir ($p = 0.028$). İkinci, 3., 4., 9., 10., 11. ve 12. hafta değerlerinin 6. hafta değerine göre daha yüksek olduğu görülmüştür. Ayrıca 4., 10. ve 12. hafta değerlerinin 1. hafta değerinden; tek başına 4. hafta değerinin de 7. ve 8. hafta değerlerinden daha fazla olduğu da gösterilmiştir.

Benzer şekilde PK grubundaki farelerin ortalama vücut ağırlığı değerleri kendi içinde haftalara göre karşılaştırıldığında; bazı haftalar arasında önemli bir farklılığın bulunduğu tespit edilmiştir ($p=0.000$). Sekizinci., 9., 10., ve 13. hafta değerlerinin 1., 2., ve 3. hafta değerlerine göre daha fazla olduğu saptanmıştır. Bununla birlikte 8., 9., ve 10. hafta değerlerinin 4. ve 5. hafta değerlerinden; tek başına 9. hafta değerinin ise 6. hafta değerinden daha yüksek olduğu görülmüştür.

Probiyotik uygulamasının gerçekleştirildiği gruba ait farelerin ortalama vücut ağırlığı değerlerinin haftalara göre grup içi kıyaslamasında ise bazı haftalar arasında anlamlı bir değişimin olduğu saptanmıştır ($p=0.033$). On üçüncü hafta ortalama vücut ağırlığı değerinin 9. hafta değerine göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

Prebiyotik uygulamasının gerçekleştirildiği gruptaki farelerin ortalama vücut ağırlığı değerleri kendi içinde karşılaştırıldığında; çeşitli grupların arasında anlamlı bir fark olduğu bulunmuştur ($p=0.000$).

Tablo 4.1 Çalışma periyodu boyunca deney hayvanlarına ait ortalama vücut ağırlığı değerlerinin grup içi ve gruplar arası karşılaştırılması

VA	¹ NK (n = 8)		² PK (n = 8)		³ PRO (n = 8)		⁴ PRE (n = 8)		⁵ SİN (n = 8)		TD	p	PH
	Ort ± ss	M Mn – Mks	Ort ± ss	M Mn – Mks	Ort ± ss	M Mn – Mks	Ort ± ss	M Mn – Mks	Ort ± ss	M Mn – Mks			
H1	32,87 ± 1,29	33,28 30,97 - 34,31	33,94 ± 2,05	34,01 30,93 - 36,93	33,14 ± 1,23	32,53 31,84 - 35,03	34,69 ± 2,03	34,70 30,98 - 37,49	33,39 ± 1,78	32,71 31,04 - 35,83	1,412 ^F	0,250	-
H2	33,24 ± 1,54	33,12 31,09 - 35,81	34,99 ± 2,25	34,98 32,28 - 38,05	33,28 ± 2,06	32,85 30,68 - 37,08	34,71 ± 2,37	35,47 29,89 - 37,07	34,14 ± 1,94	34,47 31,68 - 37,73	1,226 ^F	0,317	-
H3	33,45 ± 1,21	33,02 32,09 - 35,12	35,68 ± 2,91	35,12 32,53 - 40,09	33,28 ± 1,97	32,92 30,74 - 37,19	34,70 ± 2,52	35,49 29,44 - 37,09	34,50 ± 2,61	34,63 31,42 - 39,69	1,439 ^F	0,242	-
H4	33,7 ± 1,58	33,17 32,01 - 35,93	36,09 ± 3,08	36,05 32,86 - 40,38	33,61 ± 1,99	33,18 31,44 - 37,58	34,39 ± 2,63	35,30 29,18 - 37,28	34,46 ± 2,57	33,98 31,76 - 39,86	1,345 ^F	0,273	-
H5	33,14 ± 1,86	33,36 30,71 - 35,61	36,40 ± 3,43	36,04 32,48 - 41,26	33,44 ± 2,47	32,40 31,28 - 38,93	34,25 ± 2,41	35,01 29,68 - 36,53	34,39 ± 2,79	33,78 31,79 - 40,52	5,897 ^H	0,207	-
H6	32,37 ± 1,39	32,43 30,03 - 33,91	36,81 ± 3,67	36,80 32,29 - 41,82	34,06 ± 2,91	33,31 30,68 - 40,41	34,04 ± 2,45	34,77 29,79 - 36,38	33,84 ± 2,90	33,17 30,47 - 39,57	7,583 ^H	0,108	-
H7	32,95 ± 1,90	32,30 31,17 - 35,92	36,93 ± 3,81	36,71 32,64 - 42,21	34,13 ± 2,70	33,77 30,85 - 39,68	33,30 ± 2,47	33,63 28,92 - 36,13	33,25 ± 3,04	32,84 29,12 - 38,46	2,627 ^F	0,510	-
H8	32,99 ± 1,24	33,43 31,54 - 34,90	37,38 ± 3,63	36,67 33,18 - 42,53	33,97 ± 2,80	33,69 30,69 - 39,56	33,50 ± 2,65	34,39 28,87 - 36,28	33,23 ± 2,75	32,95 29,57 - 38,06	3,520 ^F	0,016*	2>1,5
H9	33,64 ± 2,16	33,44 30,81 - 37,02	37,58 ± 3,70	36,83 33,45 - 42,94	34,57 ± 3,03	34,46 30,47 - 40,02	33,39 ± 2,19	33,73 29,58 - 36,47	33,25 ± 3,14	32,50 30,49 - 39,74	8,363 ^H	0,079	-
H10	33,57 ± 1,46	33,80 31,28 - 35,52	37,66 ± 4,28	36,98 32,81 - 43,81	33,90 ± 3,16	33,92 29,81 - 39,91	31,29 ± 2,74	31,48 27,12 - 34,21	31,66 ± 3,27	30,50 28,52 - 38,30	5,276 ^F	0,002*	2>4,5
H11	33,26 ± 2,15	33,62 30,17 - 36,14	37,21 ± 4,07	36,91 32,37 - 43,27	33,44 ± 3,49	32,96 28,41 - 40,15	30,79 ± 2,56	31,22 26,91 - 33,68	31,15 ± 3,18	30,14 28,34 - 37,56	5,230 ^F	0,002*	2>4,5
H12	33,46 ± 1,76	33,83 31,28 - 36,13	36,99 ± 4,28	36,23 31,84 - 43,86	33,29 ± 3,67	32,70 29,13 - 40,71	31,04 ± 2,16	31,00 26,67 - 33,80	30,00 ± 3,91	29,46 24,68 - 37,45	5,302 ^F	0,002*	2>4,5
H13	33,03 ± 1,66	33,49 30,02 - 35,42	37,09 ± 3,72	36,55 32,93 - 42,89	32,58 ± 3,23	31,91 28,63 - 38,61	31,30 ± 2,17	31,84 27,04 - 33,78	29,34 ± 3,88	29,08 24,42 - 35,78	6,989 ^F	0,000*	2>3,4,5
TD	22,944 ^X		35,307 ^X		22,408 ^X		72,268 ^X		52,434 ^X				
p	0,028*		0,000*		0,033*		0,000*		0,000*				
PH	2,3,4,9,10,11,12>6 4,10,12>1 4>7,8		8,9,10,11,13>1,2,3 8,9,10>5,4 9>6		13>9		1,2,3,4,5,6>11,13 1,2,3>10		2,3,4,5,6>13 3,4,5>12 4>11				

Açıklamalar: Veriler ortalama ± standart sapma olarak gösterilmiştir. $p < 0.05$ anlamlı olarak kabul edilmiştir. **Kısaltmalar:** H: Hafta, M: Medyan, Mn: Minimum Değer, Mks: Maksimum Değer, PH: Post-Hoc Analizler, TD: Test Değeri, VA: Vücut Ağırlığı; ¹NK: Negatif Kontrol, ²PK: Pozitif Kontrol Grubu; ³PRO: Probiyotik Grubu; ⁴PRE: Prebiyotik Grubu; ⁵SİN: Sinbiyotik Grubu. ^F: Tek yönlü varyans analizi, ^H: Kruskal-Wallis testi, ^X: Friedman testi, * $p < 0.05$

Prebiyotik grubunda 1., 2., 3., 4., 5., ve 6. hafta değerlerinin hem 11. hem de 13. hafta değerlerinden daha yüksek olduğu bulunmuştur. Ayrıca 1., 2., ve 3. hafta değerlerinin tümünün de 10. hafta değerine göre daha fazla olduğu görülmüştür.

Son olarak SİN grubuna ait farelerin ortalama vücut ağırlığı değerleri kendi arasında kıyaslandığında ise bazı gruplar arasında anlamlı farklılıkların olduğu belirlenmiştir ($p=0.000$). İkinci., 3., 4., 5., ve 6. hafta değerlerinin 13. hafta değerine göre daha yüksek olduğu bulunmuştur. Bununla birlikte 3., 4. ve 5. hafta değerlerinin 12. hafta değerinden; tek başına 4. hafta değerinin ise 12. hafta değerinden daha fazla olduğu saptanmıştır.

Gruplardaki farelerin çalışma periyodunu oluşturan haftalar boyunca günlük ortalama ne kadar yem tükettikleri ise grup içi ve gruplar arası şeklinde kıyaslanmış ve sonuçlar Tablo 4.2' de gösterilmiştir. Günlük ortalama yem tüketim miktarları gruplar arasında incelendiğinde; 2., 3., 4., 5. ve 13. haftalardaki değerlerin birbirinden anlamlı derecede farklı olduğu saptanmıştır ($p<0.05$). İkinci haftadaki SİN grubu yem tüketim miktarının PRO grubu miktarından anlamlı şekilde daha yüksek olduğu görülmüştür ($p=0.036$). Üçüncü haftadaki SİN grubu miktarının ise NK, PK ve PRO grubu miktarlarından önemli oranda daha fazla olduğu bulunmuştur ($p = 0.000$). Dördüncü haftadaki SİN grubu miktarının da diğer tüm grupların miktarlarından daha yüksek olduğu saptanmıştır ($p = 0.003$). Bununla birlikte 5. haftadaki SİN grubu miktarının ise tek başına PRO grubu miktarından anlamlı bir biçimde daha fazla olduğu da belirlenmiştir ($p = 0.027$). Son olarak ise 13. haftadaki PRO grubu miktarının; hem SİN hem de PRE grubu değerlerinden önemli düzeyde daha düşük olduğu belirlenmiştir ($p = 0.007$).

Negatif kontrol grubuna ait farelerin günlük ortalama yem tüketim miktarları haftalara göre grup içinde kıyaslandığında; bazı gruplar arasında önemli bir farklılık olduğu görülmüştür ($p = 0.000$). Birinci, 2., 4. ve 5. hafta miktarlarının 11., 12. ve 13. hafta değerlerinden daha yüksek olduğu görülmüştür.

Pozitif kontrol grubundaki farelerin günlük ortalama yem tüketim miktarları haftalara göre kendi içinde karşılaştırıldığında ise çeşitli gruplar arasında anlamlı bir farkın olduğu saptanmıştır ($p = 0.000$). Birinci, 2., 3., 4., 5., 6., 7. ve 8. hafta miktarlarının 12. ve 13. hafta miktarlarından daha fazla olduğu belirlenmiştir.

Probiyotik uygulamasının gerçekleştirildiği gruba ait farelerin günlük ortalama yem tüketim miktarları haftalara göre grup içinde kıyaslandığında; bazı grup miktarları arasında önemli bir değişimin olduğu görülmüştür ($p=0.000$). Birinci, 2., 3., 4., 7. ve 8. hafta miktarlarının 12. hafta miktarına göre daha yüksek olduğu görülmüştür. Ayrıca 1., 2., ve 4. hafta yem miktarlarının da 10. ve 13. hafta miktarlarından daha fazla olduğu gözlemlenmiştir.

Prebiyotik uygulamasının olduğu grubun günlük ortalama yem tüketim miktarları kendi içinde karşılaştırıldığında ise çeşitli gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir farkın olduğu gözlemlenmiştir ($p=0.000$). Birinci, 2., 3. ve 4. hafta miktarlarının 10. hafta miktarına göre daha fazla olduğu görülmüştür. Bununla birlikte 1., 2. ve 3. hafta miktarlarının 9. hafta miktarından; 1. ve 2. hafta miktarlarının da 8. hafta miktarından daha yüksek olduğu bulunmuştur. Sinbiyotik uygulamasının gerçekleştirildiği gruba ait farelerin günlük ortalama yem tüketim miktarları haftalara göre grup içinde kıyaslandığında ise bazı grup miktarları arasında önemli bir farklılık olduğu görülmüştür ($p=0.000$). Birinci, 2., 3., 4., 5. ve 7. hafta miktarlarının 10. hafta miktarına göre daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir.

Tablo 4.2. Çalışma periyodu haftalarındaki günlük ortalama yem tüketimi değerlerinin grup içi ve gruplar arası karşılaştırılması

YT	¹ NK (n = 8)		² PK (n = 8)		³ PRO (n = 8)		⁴ PRE (n = 8)		⁵ SİN (n = 8)		TD	p	PH
	Ort ± ss	M Mn – Mks	Ort ± ss	M Mn – Mks	Ort ± ss	M Mn – Mks	Ort ± ss	M Mn – Mks	Ort ± ss	M Mn – Mks			
H1	6,61 ± 0,43	6,61 6,07 - 7,19	6,46 ± 0,56	6,35 5,54 - 7,29	6,65 ± 0,36	6,70 6,11 - 7,19	6,92 ± 0,40	6,91 6,38 - 7,52	6,85 ± 0,43	6,97 6,16 - 7,45	1,428 ^F	0,245	-
H2	6,37 ± 0,27	6,34 6,01 - 6,75	6,34 ± 0,23	6,35 5,96 - 6,75	6,38 ± 0,51	6,24 5,95 - 7,58	6,46 ± 0,27	6,41 6,08 - 6,91	6,69 ± 0,19	6,73 6,38 - 6,97	10,254 ^H	0,036*	5>3
H3	5,82 ± 0,36	5,84 5,37 - 6,31	6,17 ± 0,48	6,20 5,37 - 6,90	5,95 ± 0,49	5,81 5,42 - 7,00	6,30 ± 0,32	6,25 5,78 - 6,83	6,88 ± 0,29	6,93 6,45 - 7,23	8,554 ^F	0,000*	5>1, 2, 3
H4	6,08 ± 0,27	6,04 5,66 - 6,45	6,12 ± 0,55	6,04 5,48 - 6,84	6,14 ± 0,53	5,93 5,68 - 7,29	6,12 ± 0,32	6,00 5,70 - 6,55	6,88 ± 0,47	7,01 6,19 - 7,49	4,835 ^F	0,003*	5>1, 2, 3, 4
H5	6,35 ± 0,34	6,36 5,85 - 6,84	6,00 ± 0,57	5,87 5,46 - 7,07	5,72 ± 0,66	5,51 5,12 - 7,19	5,92 ± 0,38	5,95 5,43 - 6,47	6,49 ± 0,53	6,62 5,68 - 7,29	3,107 ^F	0,027*	5>3
H6	5,66 ± 0,32	5,67 5,26 - 6,08	5,85 ± 0,45	5,63 5,35 - 6,50	5,57 ± 0,58	5,34 5,15 - 6,84	5,67 ± 0,29	5,64 5,20 - 6,23	6,15 ± 0,58	6,14 5,29 - 7,03	7,034 ^H	0,134	-
H7	5,96 ± 0,21	5,94 5,56 - 6,26	6,16 ± 0,42	6,16 5,61 - 6,94	5,91 ± 0,38	5,83 5,56 - 6,70	6,05 ± 0,28	6,08 5,67 - 6,45	6,23 ± 0,55	6,23 5,37 - 7,24	0,984 ^F	0,429	-
H8	5,68 ± 0,18	5,64 5,50 - 5,98	6,08 ± 0,48	5,99 5,40 - 6,79	5,81 ± 0,82	5,48 5,29 - 7,72	5,50 ± 0,66	5,55 4,30 - 6,46	6,01 ± 0,56	5,99 5,20 - 7,07	6,288 ^H	0,179	-
H9	5,78 ± 0,30	5,87 5,12 - 6,03	5,76 ± 0,43	5,79 5,12 - 6,50	5,53 ± 0,71	5,30 4,95 - 7,23	5,47 ± 0,28	5,53 5,03 - 5,77	5,73 ± 0,38	5,75 5,11 - 6,38	7,471 ^H	0,113	-
H10	5,66 ± 0,35	5,70 5,06 - 6,06	5,82 ± 0,54	5,77 5,20 - 6,79	5,25 ± 0,69	5,08 4,64 - 6,85	5,43 ± 0,39	5,31 5,00 - 6,15	5,39 ± 0,37	5,34 4,90 - 5,97	1,741 ^F	0,163	-
H11	5,44 ± 0,25	5,44 4,97 - 5,72	5,82 ± 0,50	5,63 5,35 - 6,68	5,38 ± 0,57	5,19 4,94 - 6,71	5,71 ± 0,34	5,68 5,27 - 6,27	5,52 ± 0,53	5,39 4,70 - 6,19	6,670 ^H	0,154	-
H12	5,43 ± 0,28	5,37 4,94 - 5,84	5,50 ± 0,43	5,32 5,07 - 6,44	5,09 ± 0,68	4,91 4,63 - 6,69	5,71 ± 0,33	5,68 5,29 - 6,22	5,57 ± 0,44	5,69 5,00 - 6,13	2,056 ^F	0,108	-
H13	5,33 ± 0,17	5,29 5,09 - 5,59	5,56 ± 0,41	5,54 4,94 - 6,32	5,19 ± 0,25	5,14 4,88 - 5,67	5,75 ± 0,33	5,78 5,25 - 6,30	5,74 ± 0,46	5,72 5,10 - 6,30	14,168 ^H	0,007*	4, 5>3
TD	70,458 ^X		58,194 ^X		80,010 ^X		65,538 ^X		72,346 ^X				
p	0,000*		0,000*		0,000*		0,000*		0,000*				
PH	1,2,4,5>11,12,13		1,2,3,4,7,8>12,13		1,2,3,4,7,8>12 1,2,4>13,10		1,2,3,4>10 1,2,3>9 1,2>8		1,2,3,4,5,7>10 1,3,4>11,12 3,4>9				

Açıklamalar: Veriler ortalama ± standart sapma olarak gösterilmiştir. $p < 0.05$ anlamlı olarak kabul edilmiştir. **Kısaltmalar:** H: Hafta, M: Medyan, Mn: Minimum Değer, Mks: Maksimum Değer, PH: Post-Hoc Analizler, TD: Test Değeri, YT: Günlük ortalama yem tüketimi; ¹NK: Negatif Kontrol, ²PK: Pozitif Kontrol Grubu; ³PRO: Probiyotik Grubu; ⁴PRE: Prebiyotik Grubu; ⁵SİN: Sinbiyotik Grubu. ^F: Tek yönlü varyans analizi, ^H: Kruskal-Wallis testi, ^X: Friedman testi, * $p < 0.05$

Birinci, 2., ve 3. hafta miktarlarının 11. ve 12. hafta miktarlarından; 3. ve 4. hafta miktarlarının da 9. hafta miktarından daha fazla olduğu saptanmıştır.

Mevcut çalışmada ilk bir haftalık adaptasyon periyodunun ardından gelen 8 haftalık hiperkolesterolemi oluşturulma periyodu ve akabindeki 4 haftalık deneysel periyot boyunca gruptaki farelerin sahip olduğu ortalama vücut ağırlık artışları, tüketilen toplam yem miktarları ve yem etkinlik oranları karşılaştırılması Tablo 4.3' te gösterilmiştir. Ayrıca çalışmanın sonunda sakrifikasyon işleminin ardından çıkarılıp tartılan ortalama karaciğer ağırlıklarının gruplar arası kıyaslaması da aynı tabloda yer almıştır. Tablo 4.3.' te de görüldüğü üzere hiperkolesterolemi oluşturma periyodu boyunca ortalama ağırlık artışının en fazla PK grubunda ($3,64 \pm 3,04$ g) görüldüğü saptanmıştır. Benzer biçimde bu periyotta PRO ($1,42 \pm 2,33$ g) ve NK ($0,77 \pm 1,76$ g) gruplarının da pozitif yönde bir ağırlık artışına sahip olduğu gösterilmiştir. Ancak aynı periyot boyunca SİN ($-0,15 \pm 2,89$ g) ve PRE ($-1,3 \pm 1,14$ g) gruplarının ortalama vücut ağırlığı artışı değerlerinin ise negatif yönde seyrettiği gözlemlenmiştir.

Hiperkolesterolemi oluşturma periyodu boyunca deney gruplarının ortalama vücut ağırlığı kazanımları karşılaştırıldığında, PK grubunun vücut ağırlığı kazanımının PRE grubuna kıyasla önemli düzeyde daha yüksek olduğu ($p=0.010$); diğer tüm gruplar arasında ise anlamlı bir farklılık olmadığı görülmüştür ($p>0.05$). Deneysel periyot boyunca deney gruplarının ortalama vücut ağırlık kazanımları kıyaslandığında ise SİN grubunun vücut ağırlık kazanım miktarının NK grubuna göre önemli oranda daha düşük olduğu ($p=0.000$); ancak diğer gruplar arasında önemli bir farklılığın olmadığı saptanmıştır.

Hiperkolesterolemi oluşturma ve deneysel periyot boyunca tüketilen toplam yem miktarları tüm gruplar arasında karşılaştırıldığında ise istatistiksel açıdan önemli bir farklılığa rastlanmamıştır ($p>0.05$). Ortalama karaciğer ağırlıklarının kıyaslaması sonucunda da hiçbir grup değerinin diğerinden önemli düzeyde farklı olmadığı görülmüştür ($p>0.05$).

Hiperkolesterolemi oluşturma periyodu boyunca saptanan yem etkinlik oranının gruplar arasındaki karşılaştırmasında ise önemli bir fark olduğu saptanmıştır ($p=0.002$). Pozitif kontrol grubu değerinin hem PRE hem de SİN grubu

değerlerinden daha yüksek olduğu görülmüştür. Deneysel periyottaki yem etkinlik oranının gruplar arasındaki kıyaslamasında da istatistiksel açıdan anlamlı bir farka rastlanmıştır ($p=0.001$). Negatif kontrol grubu değerlerinin PRE ve SİN grubu değerlerinden önemli düzeyde daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

4.2. Biyokimyasal Bulgular

Mevcut çalışmadaki gruplarda bulunan farelere ait biyokimyasal parametrelerin analiz sonuçları, Tablo 4.4' te verilmiştir. Söz konusu tabloda; biyokimyasal parametre değerleri, tüm gruplar arasında karşılaştırılmış ve hangi parametrelerde istatistiki açıdan ne gibi farklılıklar olduğu belirtilmiştir.

Ortalama serum ALB düzeyinin gruplar arası karşılaştırılmasında herhangi anlamlı farklılık bulunmamıştır. Tüm grup düzeylerinin birbirine benzer değerlerde olduğu ve aralarında önemli bir farklılığın olmadığı gözlemlenmiştir ($p=0.198$). Ortalama serum ALT ve AST düzeylerinin gruplar arası kıyaslaması da gerçekleştirilmiştir. Pozitif kontrol grubunun diğer gruplara göre daha yüksek AST ve ALT düzeylerine sahip olduğu görülmüştür. Ancak söz konusu bu yüksekliğin ALT ($p=0.230$) ve AST ($p=0.218$) düzeylerinde istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılığa yol açmadığı saptanmıştır.

Tablo 4.3 Gruplara ait farelerin karaciğer ağırlığı, vücut ağırlık artışı, toplam tüketilen yem miktarı ve yem etkinlik oranlarının karşılaştırılması

	¹ NK (n = 8)		² PK (n = 8)		³ PRO (n = 8)		⁴ PRE (n = 8)		⁵ SİN (n = 8)		TD	p	PH
	Ort ± ss	M Mn - Mks	Ort±ss	M Mn - Mks	Ort±ss	M Mn - Mks	Ort±ss	M Mn-Mks	Ort±ss	M Mn - Mks			
KA	1,5±0,19	1,52 1,15-1,82	1,52±0,11	1,54 1,37-1,66	1,38±0,25	1,30 1,08-1,85	1,62±0,14	1,65 1,41-1,77	1,61±0,18	1,64 1,30-1,79	2,309 ^F	0,077	-
HVAA	0,77±1,76	0,96 (-2,25)-2,89	3,64±3,04	3,86 (-0,88)-7,90	1,42±2,33	0,84 (-2,02)-4,99	(-1,3)±1,14	-1,52 (-2,40)-0,54	-0,15±2,89	-0,26 (-4,89)-3,95	13,27 ^H	0,010*	2>4
DVAA	-0,61±1,25	-0,18 (-3,11)-0,84	(-0,49)±0,6	-0,32 (-1,24)-0,46	(-1,99)±0,7	-1,77 (-3,38)-(-1,37)	(-2,09)±1,08	-1,93 (-4,44)-(-1,01)	-3,91±2,65	-3,43 (-8,25)-(-0,67)	21,13 ^H	0,000*	1>5
HTYM	333,9±11	336,81 311-343,5	339,41±23,0	333,72 313,94-376,4	328,94±32	315,78 309,16-402,9	332,42±15,72	329,70 308,32-355,29	357,4±21,5	360,58 326,88-391,51	9,101 ^H	0,059	-
DTYM	153,1±5,2	154,12 143,04-159	158,86±12,4	153,81 146,56-183,6	146,4±15	141,57 133,56-181,5	158,21±7,24	158,38 146,53-170,87	155,46±9,3	157,37 140,49-168,18	1,875 ^F	0,137	-
HYEO	0,22±0,54	0,28 (-0,72)-0,86	1,05±0,84	1,15 (-0,26)-2,10	0,39±0,7	0,27 (-0,65)-1,27	(-0,39)±0,34	-0,46 (-0,73)-(-0,16)	-0,06±0,78	-0,07 (-1,35)-1,06	5,388 ^F	0,002*	2>4,5
DYEO	-0,41±0,83	-0,11 (-2,05)-0,55	(-0,32)±0,39	-0,19 (-0,81)-0,28	(-1,39)±0,6	-1,20 (-2,45)-(-0,78)	(-1,32)±0,67	-1,18 (-2,72)-(-0,66)	-2,53±1,75	-2,25 (-5,60)-(-0,45)	19,77 ^H	0,001*	1,2>5

Açıklamalar: Veriler ortalama ± standart sapma olarak gösterilmiştir. $p < 0.05$ anlamlı olarak kabul edilmiştir. **Kısaltmalar:** DTYM: DeneySEL periyotta toplam tüketilen yem miktarı, DVAA: DeneySEL periyottaki ortalama vücut ağırlık artışı, DYEO: DeneySEL periyottaki yem etkinlik oranı, HTYM: Hiperkolesterolemi oluşturma periyodundaki toplam tüketilen yem miktarı, HVAA: Hiperkolesterolemi oluşturma periyodundaki ortalama vücut ağırlık artışı, HYEO: Hiperkolesterolemi oluşturma periyodundaki yem etkinlik oranı, KA: Karaciğer ağırlıkları ortalaması, M: Medyan, Mn: Minimum Değer, Mks: Maksimum Değer, PH: Post-Hoc Analizler, TD: Test Değeri; ¹NK: Negatif Kontrol, ²PK: Pozitif Kontrol Grubu; ³PRO: Probiyotik Grubu; ⁴PRE: Prebiyotik Grubu; ⁵SİN: Sinbiyotik Grubu. ^F: Tek yönlü varyans analizi, ^H: Kruskal-Wallis testi, * $p < 0.05$.

Tablo 4.4 Deney hayvanlarına ait biyokimyasal parametre değerlerinin gruplar arası karşılaştırılması

BP	¹ NK (n = 8)		² PK (n = 8)		³ PRO (n = 8)		⁴ PRE (n = 8)		⁵ SİN (n = 8)		TD	p	PH
	Ort ± ss	M Mn-Mks	Ort ± ss	M Mn-Mks	Ort ± ss	M Mn-Mks	Ort ± ss	M Mn-Mks	Ort ± ss	M Mn-Mks			
ALB (g/L)	30,6 ± 2,1	30,7 26,5-33,2	30,7 ± 1,0	31,1 29,0-31,6	29,4 ± 2,3	29,7 25,1-32,4	28,9 ± 2,5	29,9 24,3-31,0	29,5 ± 1,5	29,0 27,7-31,4	1,597 ^H	0,198	-
ALT (u/L)	43,5 ± 14,9	37,9 32,0-72,3	58,1 ± 18,1	54,6 36,8-89,0	52,7 ± 12,7	50,0 41,0-76,6	60,9 ± 11,9	56,3 47,9-77,8	55,1 ± 14,6	54,8 30,5-77,4	5,610 ^F	0,230	-
AST (u/L)	63,5 ± 13,1	65,90 46,8-84,1	87,6 ± 22,9	85,0 59,7-126,5	73,2 ± 24,1	62,2 57,5-123,7	74,1 ± 19,4	69,2 56,7-112,8	73,5 ± 26,9	58,2 53,3-126,8	5,755 ^H	0,218	-
TK (mg/dl)	128,9 ± 21,6	122,0 113,0-178,0	237,9 ± 31,2	229,0 203,0-294,0	206,0 ± 32,9	216,5 146,0-237,0	226,3 ± 31,1	222,0 179,0-266,0	189,9 ± 18,1	201,0 162-208	18,67 ^F	0,000*	2,3,4,5>1; 2>5
GLİ (mg/dl)	143,5 ± 31,6	147,3 103,0-191,0	226,4 ± 47,6	228,0 157,0-294,0	187,3 ± 38,3	178,5 138,0-265,0	144,6 ± 27,3	143,0 102,0-193,0	152,3 ± 27,6	144,0 113-192	16,63 ^H	0,002*	2>1,4,5
İNS (U/ml)	189,4 ± 59,6	199,1 73,0-272,2	101,3 ± 18,9	95,8 74,5-131,1	86,1 ± 11,4	83,9 70,8-102,2	67,5 ± 8,7	68,2 53,6-80,9	50,0 ± 15,1	49,1 35,2-79,4	27,53 ^H	0,000*	1,2>5; 1>4
HDL (mg/dl)	101,9 ± 12,9	104,5 75,4-117,1	172,6 ± 15,7	171,9 151,0-197,3	145,1 ± 35,7	148,0 71,9-194,5	132,1 ± 20,3	143,6 100,4-150,4	124,4 ± 14,7	126,4 105,5-142	11,51 ^F	0,000*	2>1,4,5
LDL (mg/dl)	12,8 ± 4,4	11,7 8,5-21,4	78,6 ± 16,8	80,8 53,0-96,1	72,1 ± 13,3	70,40 48,3-90,2	78,4 ± 9,0	81,2 68,2-89,6	72,1 ± 14,5	75,3 54,7-89,5	19,63 ^H	0,001*	2,3,4,5>1
TRG (mg/dl)	24,8 ± 4,0	23,9 21,0-31,0	59,3 ± 14,6	61,0 40,0-80,0	32,9 ± 8,7	32,5 16,0-43,0	31,9 ± 17,4	23,0 15,0-64,0	34,1 ± 13,8	27,0 21-51	16,24 ^H	0,003*	2>1,4
VLDL (mg/dl)	5,7 ± 1,3	5,5 4,2-8,5	9,2 ± 2,5	8,1 6,6-14,0	6,6 ± 1,8	6,5 3,2-8,6	6,4 ± 3,5	4,6 3,0-12,8	6,8 ± 2,8	5,4 4,2-10,2	2,353 ^F	0,074	-

Açıklamalar: Veriler ortalama ± standart sapma olarak gösterilmiştir. $p < 0.05$ anlamlı olarak kabul edilmiştir. **Kısaltmalar:** ALT: Alanin Aminotransferaz, AST: Aspartat Aminotransferaz, BP: Biyokimyasal Parametreler, GLİ: Glikoz, HDL: HDL-Kolesterol, İNS: İnsülin, LDL: LDL-Kolesterol, TK: Total Kolesterol, TRG: Trigliserit, VLDL: VLDL-Kolesterol, M: Medyan, Mn: Minimum Değer, Mks: Maksimum Değer, PH: Post-Hoc Analizler, TD: Test Değeri; ¹NK: Negatif Kontrol, ²PK: Pozitif Kontrol Grubu; ³PRO: Probiyotik Grubu; ⁴PRE: Prebiyotik Grubu; ⁵SİN: Sinbiyotik Grubu. ^F: Tek yönlü varyans analizi, ^H: Kruskal-Wallis testi, * $p < 0.05$.

Bu çalışmada PK, PRO, PRE ve SİN gruplarındaki farelere 12 hafta boyunca YYYYK yem tükettirilerek diyet aracılığıyla hiperkolesterolemi tablosu oluşturulmaya çalışılmıştır. Serum TK düzeyleri incelendiğinde ise bu amaca ulaşıldığı sonucuna varılmıştır. Çünkü YYYYK yemlerle beslenen PK, PRO, PRE ve SİN gruplarının tümünün ortalama serum TK düzeylerinin standart yem örüntüsüne sahip yemle beslenen NK grubuna kıyasla anlamlı olarak daha yüksek olduğu görülmüştür ($p=0.000$). Böylece yem tüketimi aracılığı ile hiperkolesterolemi tablosunun oluşturulduğu saptanmıştır. Sinbiyotik uygulamasının gerçekleştirildiği grubun ortalama serum TK düzeyinin PK grubundan anlamlı ölçüde daha düşük olduğu saptanmıştır ($p=0.000$). Probiyotik ve prebiyotik uygulamalarının gerçekleştirildiği gruplarda ise ortalama serum TK düzeylerinin PK grubunun sahip olduğu düzeyden daha düşük olduğu fakat bu düşüklüğün istatistiksel açıdan anlamlı olmadığı bulunmuştur ($p>0.05$).

Gruplar ortalama serum glikoz düzeyleri açısından kıyaslandığında ise standart yem örüntüsüyle beslenen NK grubunun en düşük değere sahip olduğu görülmüştür. Pozitif kontrol ve PRO grubuna ait fareler, basit karbonhidrat kaynağı sükroz olan YYYYK yemlerle beslenmiş ve bu iki grubun sırasıyla $226,4 \pm 47,6$ mg/dl ve $187,3 \pm 38,3$ mg/dl değerlerinde serum glikoza sahip oldukları belirlenmiştir. Basit karbonhidrat kaynağı olarak d-tagatozun kullanıldığı YYYYK yemlerle beslenen PRE ve SİN gruplarının ortalama serum glikoz düzeylerinin ise sırasıyla $144,6 \pm 27,3$ mg/dl ve $152,3 \pm 27,6$ mg/dl olduğu gösterilmiştir. Negatif kontrol, PRE ve SİN gruplarının ortalama serum glikozlarının da PK grubundan anlamlı şekilde daha düşük olduğu saptanmıştır ($p=0.002$). Probiyotik uygulamasının gerçekleştirildiği grup ile PK grubu arasında söz konusu değer açısından ise önemli bir farklılık bulunmamıştır ($p>0.05$).

Serum ortalama insülini gruplar arasında kıyaslandığında; en yüksek düzeye NK grubunun ($189,4 \pm 59,6$ U/ml) sahip olduğu bulunmuştur. Basit karbonhidrat kaynağı olarak d-tagatozun kullanıldığı YYYYK yemlerle beslenen PRE ve SİN gruplarının ortalama serum insülin düzeylerinin ise sırasıyla $67,5 \pm 8,7$ U/ml ve $50,0 \pm 15,1$ U/ml olduğu gösterilmiştir. Negatif kontrol grubu dışında basit karbonhidrat kaynağı sükroz olan YYYYK yemlerle beslenen PK ve PRO gruplarının serum ortalama insülinleri sırasıyla $101,3 \pm 18,9$ U/ml ve $86,1 \pm 11,4$

U/ml olarak saptanmıştır. Negatif kontrol ve PK gruplarının serum ortalama insülinlerinin SİN grubu insülininden önemli oranda daha yüksek olduğu görülmüştür ($p=0.000$). D-tagatozun basit karbonhidrat kaynağı olarak kullanıldığı PRE grubu serum ortalama insülinin ise NK grubundan daha düşük olduğu saptanmıştır ($p=0.000$).

Gruplar ortalama HDL-K düzeyleri bakımından karşılaştırıldığında ise en düşük değere NK grubunun ($101,9 \pm 12,9$ mg/dl) sahip olduğu görülmüştür. Söz konusu değeri NK grubunun ardından en düşük miktarda içeren diğer grup ise SİN grubu ($124,4 \pm 14,7$ mg/dl) olarak belirlenmiştir. Bu grupların ardından ortalama serum HDL-K düzeylerinin sırasıyla PRE ve PRO gruplarında da $132,1 \pm 20,3$ mg/dl ve $145,1 \pm 35,7$ mg/dl olduğu; tüm gruplar içinde en yüksek değere ise PK grubunun ($172,6 \pm 15,7$ mg/dl) sahip olduğu bulunmuştur. Bununla birlikte NK, PRE ve SİN gruplarının serum ortalama HDL-K düzeylerinin PK grubuna kıyasla anlamlı ölçüde daha düşük olduğu gösterilmiştir ($p=0.000$). Probiyotik uygulamasının gerçekleştirildiği grup ile PK grubu arasında ise HDL-K düzeyleri açısından anlamlı bir farklılık olmadığı saptanmıştır ($p>0.05$).

Serum ortalama LDL-K düzeyleri gruplar arasında kıyaslandığında ise en düşük değerin NK grubunda ($12,8 \pm 4,4$ mg/dl) olduğu görülmüştür. Diğer tüm grupların serum ortalama LDL-K düzeylerinin ise NK grubundan fazla olduğu bulunmuştur ($p=0.001$). Ancak PK, PRO, PRE ve SİN grupları arasında LDL-K açısından önemli bir farklılık olmadığı görülmüştür ($p>0.05$).

Tüm grupların serum ortalama TG düzeylerine bakıldığında; PK grubunun ($59,3 \pm 14,6$ mg/dl) en yüksek TG düzeyine sahip olduğu gözlemlenmiştir. Söz konusu TG düzeyleri gruplar arasında karşılaştırıldığında ise NK ve PRE grubu düzeylerinin PK grubu düzeyinden istatistiksel olarak anlamlı olarak daha düşük olduğu görülmüştür ($p=0.001$). Ancak diğer gruplar olan PRO ve SİN gruplarıyla PK grubu arasında TG açısından önemli bir farklılığa rastlanmamıştır ($p>0.05$). Serum ortalama VLDL-K düzeylerinin gruplar arası karşılaştırılmasında ise herhangi iki grup değeri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığı gözlemlenmiştir ($p=0.074$).

4.3. Histolojik Analiz Bulguları

4.3.1. Hepatosit Dejenerasyonu, Mikroveziküler Steatozis ve İnflamatuvar Hücre İnfiltrasyonuna Ait Histolojik Analiz Bulguları

Negatif kontrol grubuna ait farelerden alınan karaciğer doku kesitlerine HE boyama işlemi uygulanmış ve karaciğerlerin yapısal olarak normal histolojik görünüme sahip olduğu saptanmıştır. Söz konusu bu normal histolojik görünüm; klasik lobül olarak sınıflandırılan, merkezde bir vena centralisin yer aldığı ve buradan periferine doğru uzanan ışınsal hepatosit hücre kordonları ile çevresindeki sinüzoidlerin düzenli olarak uzanması şeklinde gözlemlenmiştir. Bu görünümün içinde hepatositlerin eozinofilik sitoplazmaları ile yuvarlak merkezi çekirdeklerinin kolayca ayırt edildiği görülmüştür. Ayrıca klasik lobül periferinde yer alan portal alanlar içindeki kanal, arter ve ven yapılarının da rahatlıkla tespit edilebildiği belirlenmiştir. Son olarak NK grubuna ait doku kesitlerinde herhangi bir dejenerasyona ve inflamatuvar hücre infiltrasyonuna da rastlanmamıştır.

Yüksek yağlı yüksek kolesterolü yemle beslenen PK grubuna ait karaciğer kesitlerinin bazı alanlarında hepatosit hücre ışınsal diziliminde çeşitli disorganizasyonların olduğu ve hepatositlerin yapısal özelliklerini kaybederek dejenere hâle geldiği gözlemlenmiştir. Ayrıca dejenere hâldeki hepatosit hücre çekirdeklerinde renk değişikliklerinin olduğu ve sitoplazmalarının ise daha eozinofilik boyandığı tespit edilmiştir. Bu gruba ait kesitlerde birçok hepatositin hücre sitoplazmasında mikroveziküler steatozise de rastlanmıştır. Bununla birlikte hepatosit hücre kordon yapısının bozulmasına paralel bir şekilde sinüzoid yapısının da bozulduğu görülmüştür. Son olarak PK grubuna ait karaciğer doku kesitlerinin bazı alanlarında inflamatuvar hücre infiltrasyonlarının olduğu saptanmıştır. Pozitif kontrol grubunda NK grubuna kıyasla hepatosit dejenerasyonu, mikroveziküler steatozis ve inflamatuvar hücre infiltrasyonunda da artış olduğu belirlenmiştir.

Probiyotik uygulamasının gerçekleştirildiği grubun karaciğer doku kesitleri yapısal olarak incelendiğinde; hepatosit hücre kordonlarının PK grubuna kıyasla daha düzenli bir görünüme sahip olduğu görülmüştür. Dahası bu gruptaki hepatosit hücre dejenerasyonun da PK grubuna kıyasla azaldığı fakat bu

azalmanın istatistiksel açıdan anlamlı bir fark oluşturmadığı saptanmıştır. Benzer şekilde PRO grubunda mikroveziküler steatozisin de PK grubuna kıyasla azaldığı tespit edilmiştir. İnflamatuvar hücre infiltrasyonunun ise PRO grubunda oldukça nadir düzeyde olduğu gözlemlenmiştir.

Prebiyotik uygulamasının gerçekleştirildiği grup PK grubuyla kıyaslandığında ise karaciğer doku kesitlerine ait hepatosit hücre kordonlarının genel olarak düzenli olduğu ve dejenerasyonun daha az olduğu belirlenmiştir. Hepatositlerin hücre sitoplazmasında meydana gelen mikroveziküler steatozisin ise PK grubuna kıyasla oldukça azaldığı da saptanan diğer bir bulgudur. Ayrıca PRE grubunun karaciğer kesitlerindeki inflamatuvar hücre infiltrasyonlarının ise PK grubuyla karşılaştırıldığında oldukça nadir düzeyde olduğu bulunmuştur.

Sinbiyotik uygulamasının gerçekleştirildiği grubun karaciğer kesitleri PK grubuyla karşılaştırıldığında ise hepatosit dejenerasyonunun azaldığı görülmüştür. Ayrıca SİN grubundaki mikroveziküler steatozis değerlerinin de PK grubuna kıyasla azaldığı gözlemlenmiştir. Son olarak SİN grubuna ait inflamatuvar hücre infiltrasyonunun da PK grubu ile karşılaştırıldığında daha düşük bir seviyede olduğu gösterilmiştir.

Tüm deney gruplarının karaciğer doku kesitlerine ait hepatosit hücre dejenerasyonu, mikroveziküler steatozis ve inflamatuvar hücre infiltrasyonuna ait skorlamanın istatistiksel analiz sonuçları Tablo 4.5’ te verilmiştir. Karaciğer HE ve PAS boyamasına ait görüntüler ise sırasıyla Resim 4.1 ve Resim 4.2 ile gösterilmiştir.

Tablo 4.5. Karaciğer doku kesitlerine ait skora sonuçları

	¹ NK (n = 8)	² PK (n = 8)	³ PRO (n = 8)	⁴ PRE (n = 8)	⁵ SİN (n = 8)	p
Hepatosit dejenerasyonu	0,12 ± 0,35 ^a	1 ± 0,53 ^b	0,62 ± 0,51 ^{ab}	0,5 ± 0,53 ^{ab}	0,37 ± 0,51 ^{ab}	0,0189
Mikroveziküler steatozis	0 ± 0 ^a	1,87 ± 0,64 ^b	0,87 ± 0,64 ^c	0,62 ± 0,51 ^{ac}	0,37 ± 0,51 ^{ac}	0,0001
İnflamatuvar hücre infiltrasyonu	0 ± 0 ^a	0,75 ± 0,70 ^b	0,5 ± 0,53 ^{ab}	0,37 ± 0,51 ^{ab}	0,25 ± 0,46 ^{ab}	0,0630

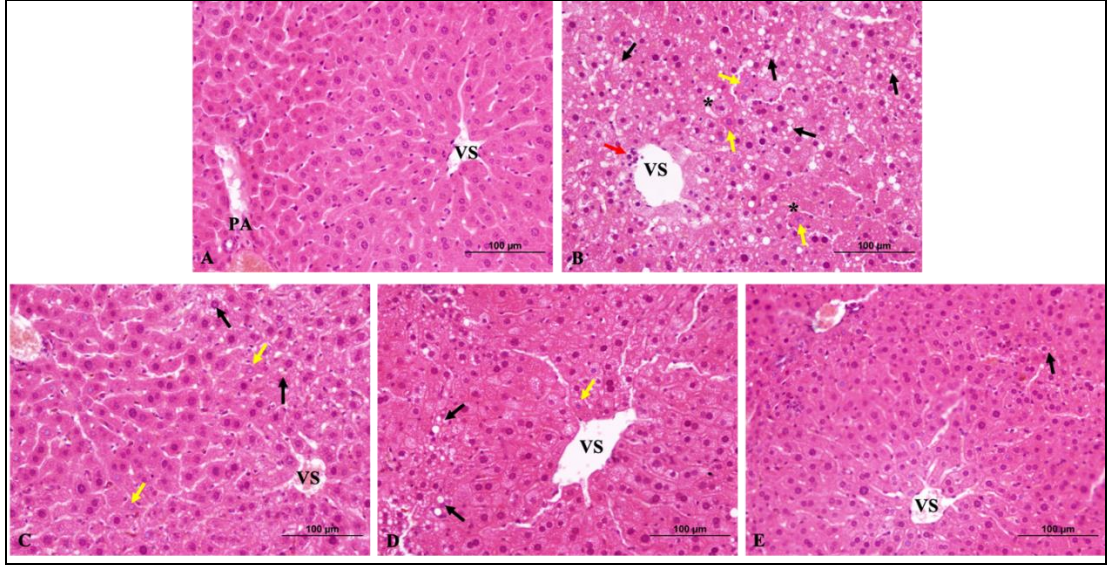
Veriler ortalama ± standart sapma olarak gösterilmiştir. $p < 0.05$ anlamlı kabul edilmiştir. Aynı harfi (a, b ve c) içeren gruplar arasında anlamlı fark bulunmaz. **Kısaltmalar:** ¹NK: Negatif Kontrol, ²PK: Pozitif Kontrol Grubu; ³PRO: Probiyotik Grubu; ⁴PRE: Prebiyotik Grubu; ⁵SİN: Sinbiyotik Grubu.

4.3.2. Karaciğer Dokusuna Ait IL-6 İmmünoaktivitesi Bulguları

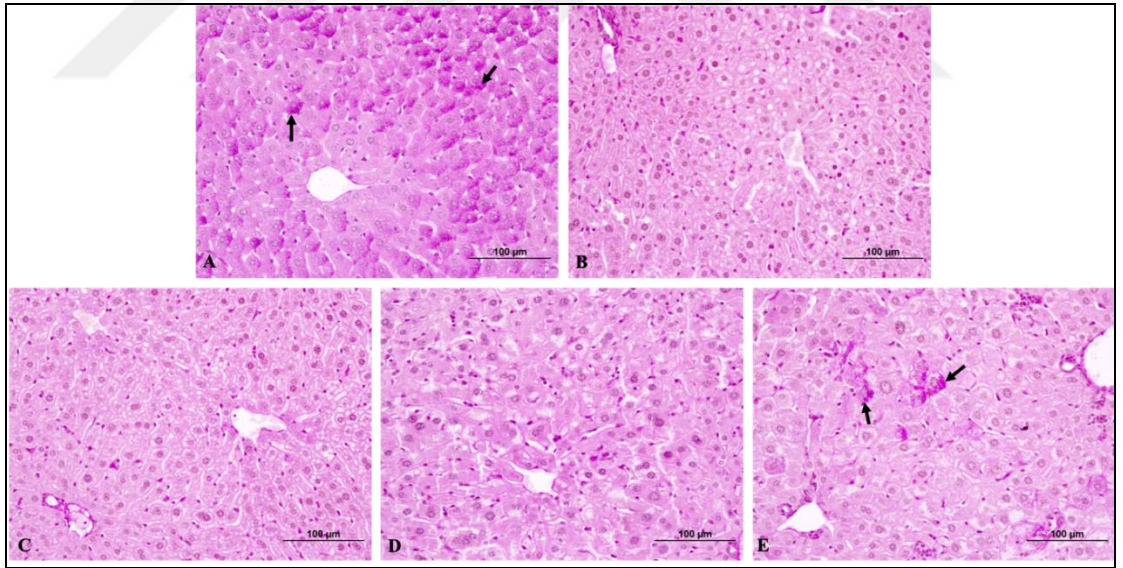
Tüm grupların karaciğer dokularına ait kesitlerde IL-6 immunoreaktivitesi belirlenmiştir. Elde edilen veriler normal dağılım göstermediği için istatistiksel olarak Kruskal-Wallis testi uygulanmıştır. Verilere ait sonuçlar ise median (minimum-maksimum) değerleri olarak Tablo 4.6' da gösterilmiştir. Karaciğer doku kesitlerinin hepatosit hücre sitoplazmasında IL-6 immunoreaktivitesinin pozitif reaksiyonlar gösterdiği belirlenmiştir.

Pozitif kontrol grubunun IL-6 immunoreaktivitesinde NK grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlemlenmiştir. Probiyotik, prebiyotik ve sinbiyotik uygulamasının gerçekleştirildiği gruplar ile NK grubunun IL-6 immunoreaktivitesi arasında ise istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır.

Probiyotik, prebiyotik ve sinbiyotik uygulamasının gerçekleştirildiği grupların IL-6 immunoreaktivitesinin ise PK grubuna göre önemli düzeyde daha düşük olduğu görülmüştür. Ancak PRO, PRE ve SİN grupları kendi arasında değerlendirildiğinde ise bazı sayısal farklılıklar gözlenmiş olmasına rağmen istatistiksel açıdan herhangi bir anlamlı farklılık oluşmadığı saptanmıştır. Grupların karaciğer kesitlerine ait IL-6 immunoreaktivite görüntüleri ise Resim 4.3 ile verilmiştir.



Resim 4.1 Tüm gruplara ait karaciğer dokularının HE ile boyama işlemi. **Açıklamalar:** Hepatosit dejenerasyonu sarı ok, mikroveziküler steatozis siyah ok, hücre infiltrasyonu kırmızı ok ve bozulmuş sinüzoidler ise yıldız işaretiyle gösterilmiştir. **A)** NK grubu, **B)** PK grubu, **C)** PRO grubu, **D)** PRE grubu, **E)** SİN grubu. Skala bar 100 µm. **Kısaltmalar:** **VS:** vena sentralis, **PA:** portal alan, **NK:** Negatif Kontrol, **PK:** Pozitif Kontrol, **PRO:** Probiyotik, **PRE:** Prebiyotik, **SİN:** Sinbiyotik grubu.

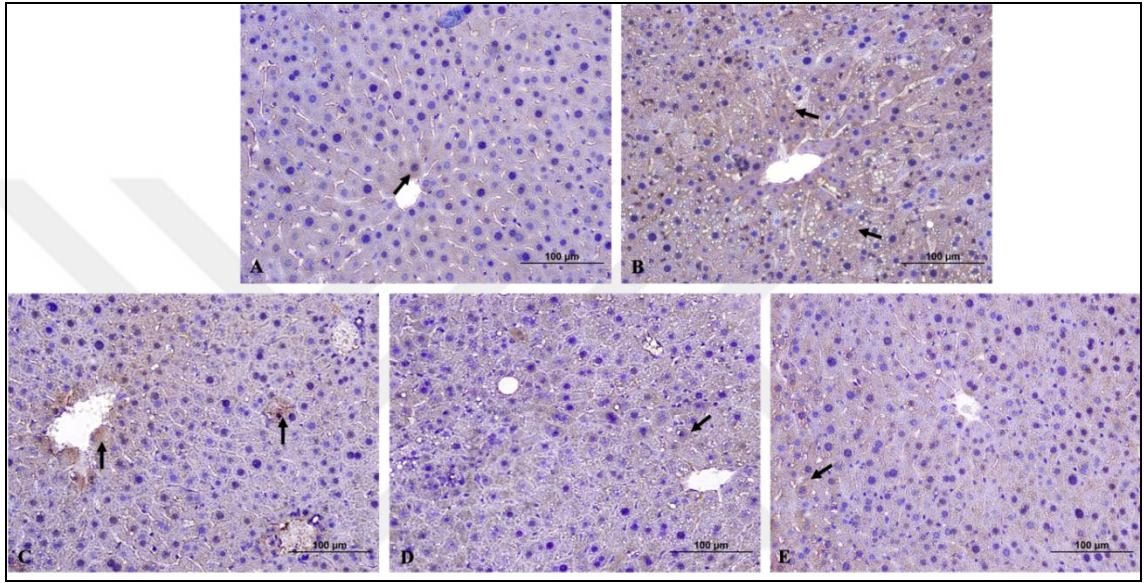


Resim 4.2 Tüm gruplara ait karaciğer dokularının PAS ile boyama işlemi. **Açıklamalar:** PAS (+) alanlar, siyah oklarla gösterilmiştir. **A)** NK grubu, **B)** PK grubu, **C)** PRO grubu, **D)** PRE grubu, **E)** SİN grubu. Skala bar 100 µm. **Kısaltmalar:** **NK:** Negatif Kontrol, **PK:** Pozitif Kontrol, **PRO:** Probiyotik, **PRE:** Prebiyotik, **SİN:** Sinbiyotik grubu.

Tablo 4.6. Grupların karaciğer dokusu kesitlerine ait IL-6 immunoreaktivitesi sonuçları

	¹ NK (n = 8)	² PK (n = 8)	³ PRO (n = 8)	⁴ PRE (n = 8)	⁵ SİN (n = 8)	<i>p</i>
IL-6 immuno reakt.	86,15 (75,87-112,50) ^a	89,70 (76,89-115,52) ^b	87,31 (75,44-106,62) ^a	86,92 (74,01-117,90) ^a	86,98 (75,96-124,44) ^a	0,0001

Veriler $\pm$ median (minimum-maximum) olarak gösterilmiştir. $p < 0.05$ anlamlı kabul edilmiştir. Aynı harfi (a, b ve c) içeren gruplar arasında anlamlı fark bulunmamıştır. **Kısaltmalar:** ¹NK: Negatif Kontrol, ²PK: Pozitif Kontrol Grubu; ³PRO: Probiyotik Grubu; ⁴PRE: Prebiyotik Grubu; ⁵SİN: Sinbiyotik Grubu.



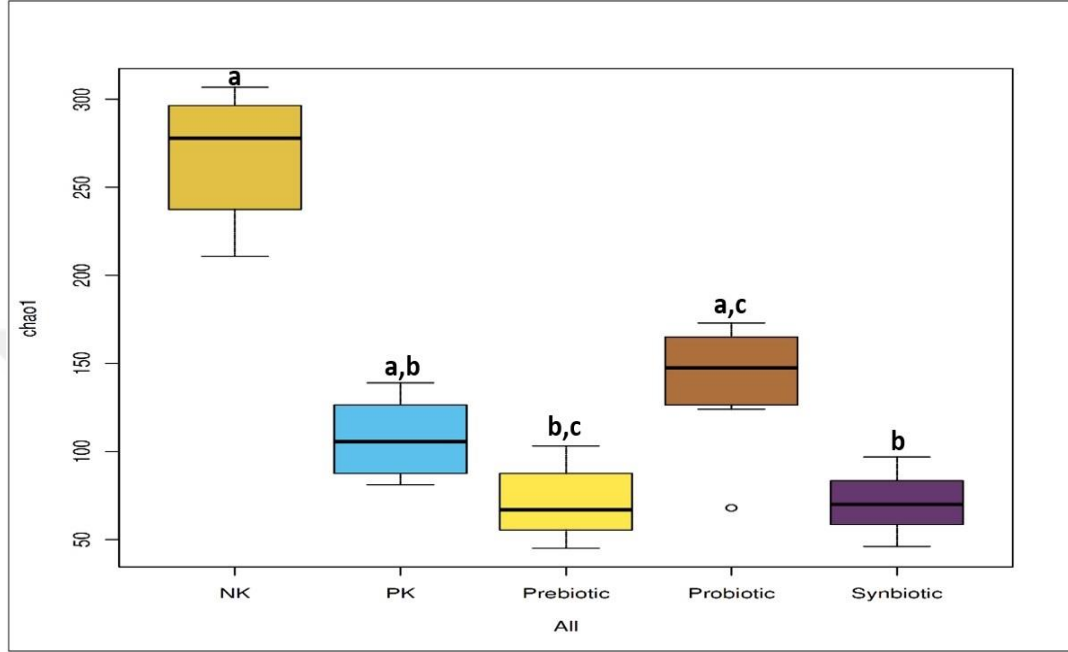
Resim 4.3 Grupların karaciğer doku kesitleri IL-6 immunoreaktivitesi sonuçları. **Açıklamalar:** Siyah oklar IL-6 immunoreaktivitesine ait alanları göstermiştir. A) NK grubu, B) PK grubu, C) PRO grubu, D) PRE grubu, E) SİN grubu. Skala bar 100 µm. **Kısaltmalar:** NK: Negatif Kontrol, PK: Pozitif Kontrol, PRO: Probiyotik, PRE: Prebiyotik, SİN: Sinbiyotik

4.4. Bağırsak Mikrobiyotasına İlişkin Bulgular

Mevcut çalışmada grup içi mikrobiyal tür çeşitlilik ve zenginliğinin değerlendirilmesinde alfa çeşitlilik indekslerinden olan Chao1, Shannon Diversity ve Inverse-Simpson Diversity indeksleri kullanılmıştır. Bu indekslere ait kutu grafikleri ise sırasıyla Şekil 4.1, Şekil 4.2 ve Şekil 4.3 ile gösterilmiştir.

Şekil 4.1’ de NK, PK, PRO, PRE ve SİN gruplarına ait Chao1 kutu grafiği verilmiştir. Negatif kontrol grubunun bakteriyel tür zenginliğinin PRE ($p=0.000$) ve SİN ($p=0.000$) gruplarından anlamlı ölçüde daha yüksek olduğu; ancak PK ($p=0.06$) ve PRO ($p=0.741$) grupları ile NK grubu arasında ise önemli bir farklılık bulunmadığı saptanmıştır.

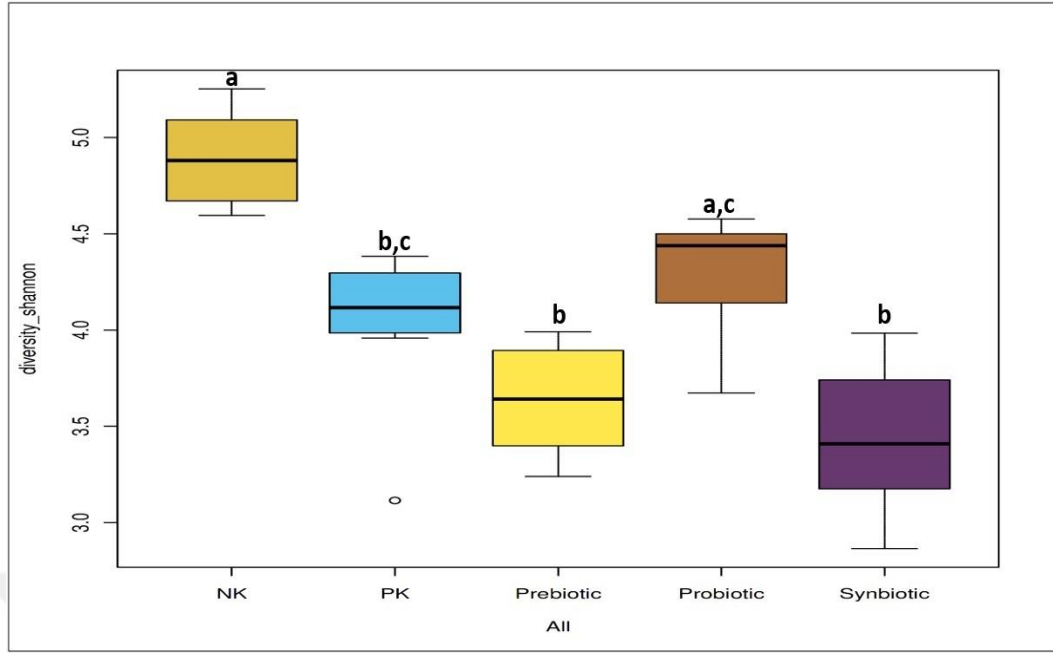
Şekil 4.2’ de NK, PK, PRO, PRE ve SİN gruplarına ait Shannon Diversity indeks kutu grafiği verilmiştir. Bu grafikte NK grubuna ait bakteriyel tür çeşitliliğinin PK ($p=0.000$), PRE ($p=0.000$) ve SİN ($p=0.000$) gruplarından anlamlı derecede daha yüksek olduğu görülmüştür.



Şekil 4.1 Chao1 indeks kutu grafiği.

Açıklamalar: Aynı harfi içeren (a,b ve c) gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. Gruplar arası karşılaştırmalarda Kruskal-Wallis H testi kullanılmış ve istatistiksel anlamlılık değeri $p<0.05$ olarak kabul edilmiştir.

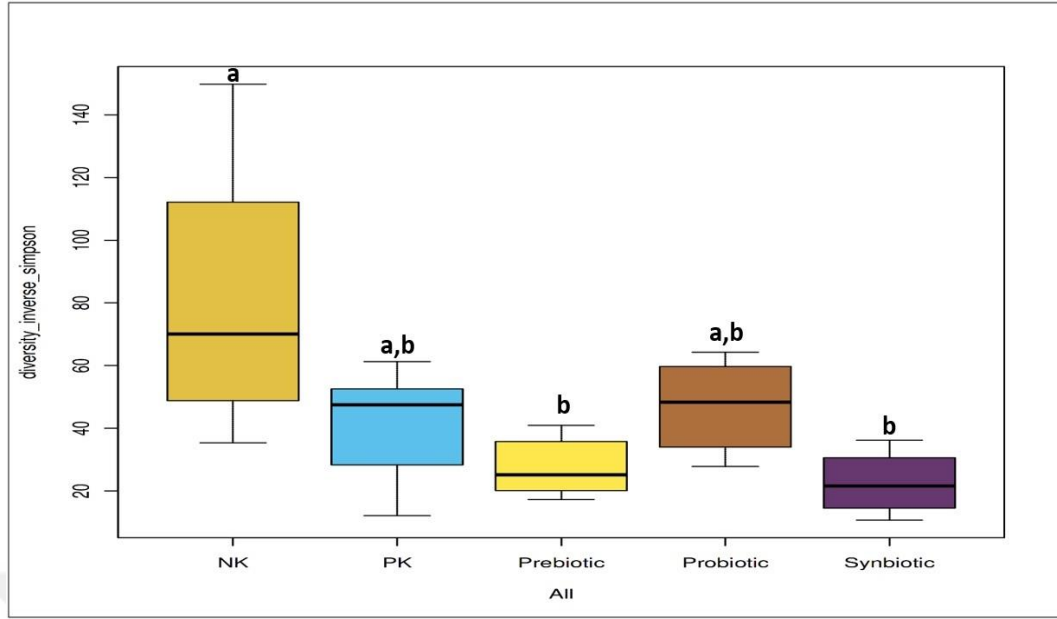
Fakat bakteriyel tür çeşitliliği açısından buna benzer bir ilişkiye NK ile PRO grupları arasında rastlanmamıştır ($p=0.008$).



Şekil 4.2. Shannon Diversity indeks kutu grafiği.

Açıklamalar: Aynı harfi içeren (a,b ve c) içeren gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. Gruplar arası karşılaştırmalarda One-Way Anova (Tek Yönlü Varyans Analizi) testi kullanılmış ve varyansların homojenliğinin sağlandığı durumda Tukey testi; varyansların homojenliğinin sağlanamadığı durumda ise Tamhane's testi kullanılmıştır. İstatistiksel anlamlılık değeri $p < 0.005$ olarak kabul edilmiştir.

Şekil 4.3' te tüm gruplara ait Inverse-Simpson Diversity indeks kutu grafiği verilmiştir. Bu grafikte NK grubuna ait tür çeşitliliğinin, PRE ($p=0.008$) ve SİN ($p=0.001$) gruplarından önemli düzeyde daha fazla olduğu görülmüştür. Ancak bakteriyel tür çeşitliliği açısından bu tipte bir ilişki; NK - PK ($p=0.691$) ve NK - PRO ($p=1.000$) grupları arasında görülmemiştir.



Şekil 4.3 Inverse-Simpson Diversity indeks kutu grafiği.

Açıklamalar: Aynı harfi içeren (a,b ve c) içeren gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. Gruplar arası karşılaştırmalarda Kruskal-Wallis H testi kullanılmış ve istatistiksel anlamlılık değeri $p < 0.05$ olarak kabul edilmiştir.

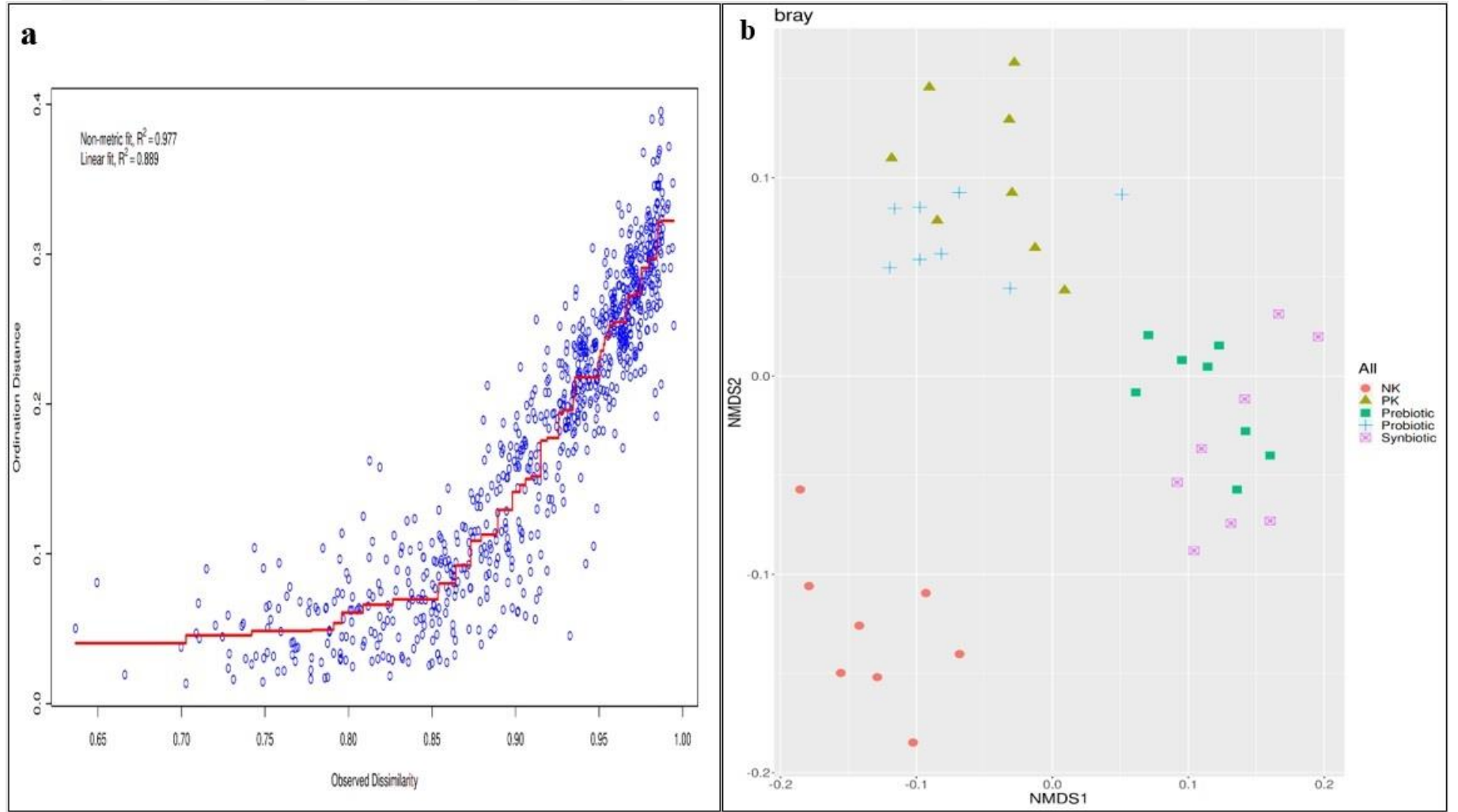
Bray-Curtis benzeşmezlik indeksi ve Ağırlıklı Unifrac mesafelerine ait NMDS ve “Stress Plot” grafikleri sırasıyla Şekil 4.4 ve Şekil 4.5 ile Bray-Curtis indeksi ve Ağırlıklı Unifrac mesafesine ait PCoA grafikleri gösterilmiştir. Şekil 4.4’ te Bray-Curtis benzeşmezlik indeksine ait NMDS ve Stress Plot grafikleri verilmiştir.

Şekil 4.4’ e ait Stress Plot grafiği incelendiğinde; Non-metric fit, $R^2 = 0.977$ değerinin 1 değerine oldukça yakın bir sayı olduğu görülmüştür. Buradan yola çıkılarak çalışmadaki deney gruplarının mikrobiyal farklılıkları ortaya çıkarma açısından doğru kurgulandığı saptanmıştır. Diğer yandan Bray-Curtis indeksini içeren NMDS grafiğine bakıldığında ise PK grubunun NK ($p=0.003$), PRO ($p=0.001$), PRE ($p=0.001$) ve SİN ($p=0.001$) gruplarından bakteriyel tür bakımından hem çeşitlilik hem de bolluk düzeyi olarak net şekilde ayrıştığı görülmüştür. Bray-Curtis indeksi ve Ağırlıklı Unifrac mesafesine ait NMDS grafiklerinin değerlendirilmesi permütasyonel çok değişkenli varyans analizi (ADONIS) aracılığıyla gerçekleştirilmiştir. Söz konusu ADONIS analizinde grupların mikrobiyal farklılıklarını ortaya koyabilmek için NK, PRO, PRE ve SİN grupları; hiperkolesterolemik modelin oluşturulduğu PK grubuyla kıyaslanmıştır.

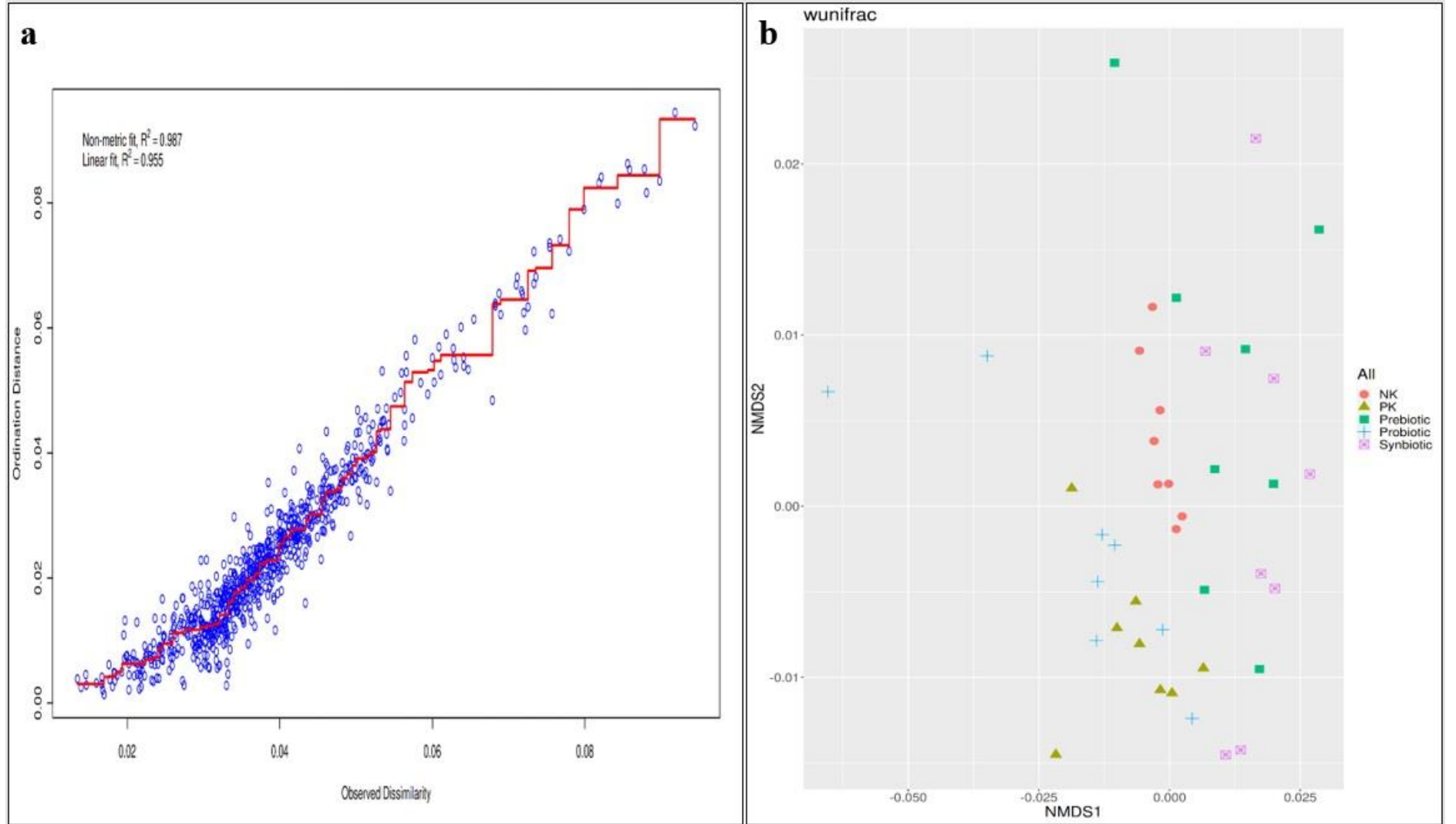
Bu ikili grup karşılaştırmalarının yapıldığı ADONIS analizi Tablo 4.7 ile gösterilmiştir.

Şekil 4.5’ te ise Ağırlıklı Unifrac mesafesine ait Stress Plot ve NMDS grafikleri bulunmaktadır. Stress Plot grafiğine bakıldığında; gruplar arası mikrobiyal değişimlerin sağlıklı bir şekilde yorumlanabilmesine imkan veren grup dizaynlarının doğru biçimde oluşturulduğu belirlenmiştir.





Şekil 4.4 Bray-Curtis benzeşmezlik indeksine ait Stress Plot (a) ve NMDS (b) grafikleri



Şekil 4.5 Ağırlıklı Unifrac mesafesine ait Stress Plot (a) ve NMDS (b) grafikleri

Tablo 4.7. Permütasyonel çok değişkenli varyans analizi (ADONIS) sonuçları

Grup	⁶Df	⁷SumOfSqs	⁸R2	⁹F	¹⁰Pr(>F)
Karşılaştırmaları					
¹ NK – ² PK	1	1.52	0.2771	5.366	0.003**
³ PRO – ² PK	2	2.30	0.29219	4.335	0.001***
⁴ PRE – ² PK	2	2.92	0.3301	5.174	0.001***
⁵ SİN – ² PK	2	3.08	0.33827	5.368	0.001***

Açıklamalar: ¹NK: Negatif Kontrol, ²PK: Pozitif Kontrol Grubu; ³PRO: Probiyotik Grubu; ⁴PRE: Prebiyotik Grubu; ⁵SİN: Sinbiyotik Grubu, ⁶Df: Serbestlik derecesi, ⁷SumOfSqs: Sıralı kareler toplamı, ⁸R2: Etki büyüklüğü, ⁹F: F Testi değeri, ¹⁰Pr(>F): F Testi istatistiksel anlamlılık değeri; *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$; $p < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

Tablo 4.7'deki ADONIS analizi sonuçları incelendiğinde ise PK grubunun NK ($p=0.003$), PRO ($p=0.001$), PRE ($p=0.001$) ve SİN ($p=0.001$) gruplarından net biçimde ayrıştığı yani bazı taksonomik öğeler açısından önemli farklılıklar içerdiği saptanmıştır. Bray-Curtis indeksi ve Ağırlıklı Unifrac mesafesine ait PCoA grafikleri çoklu permütasyon testi (MRPP) aracılığıyla değerlendirilmiştir. Bu MRPP analizinde grupların mikrobiyal farklılıklarını ortaya çıkarmak için NK, PRO, PRE ve SİN grupları; hiperkolesterolemik modelin oluşturulduğu PK grubuyla karşılaştırılmıştır. Bray-Curtis indeksi ve Ağırlıklı Unifrac mesafesine ait PCoA grafiğinde ise PK grubunun NK ($p=0.001$), PRO ($p=0.001$), PRE ($p=0.001$) ve SİN ($p=0.001$) gruplarından tür bakımından hem çeşitlilik hem de bolluk düzeyi olarak ayrıştığı görülmüştür. Bu ikili grup kıyaslamalarının yapıldığı MRPP analizi ise Tablo 4.8 ile verilmiştir.

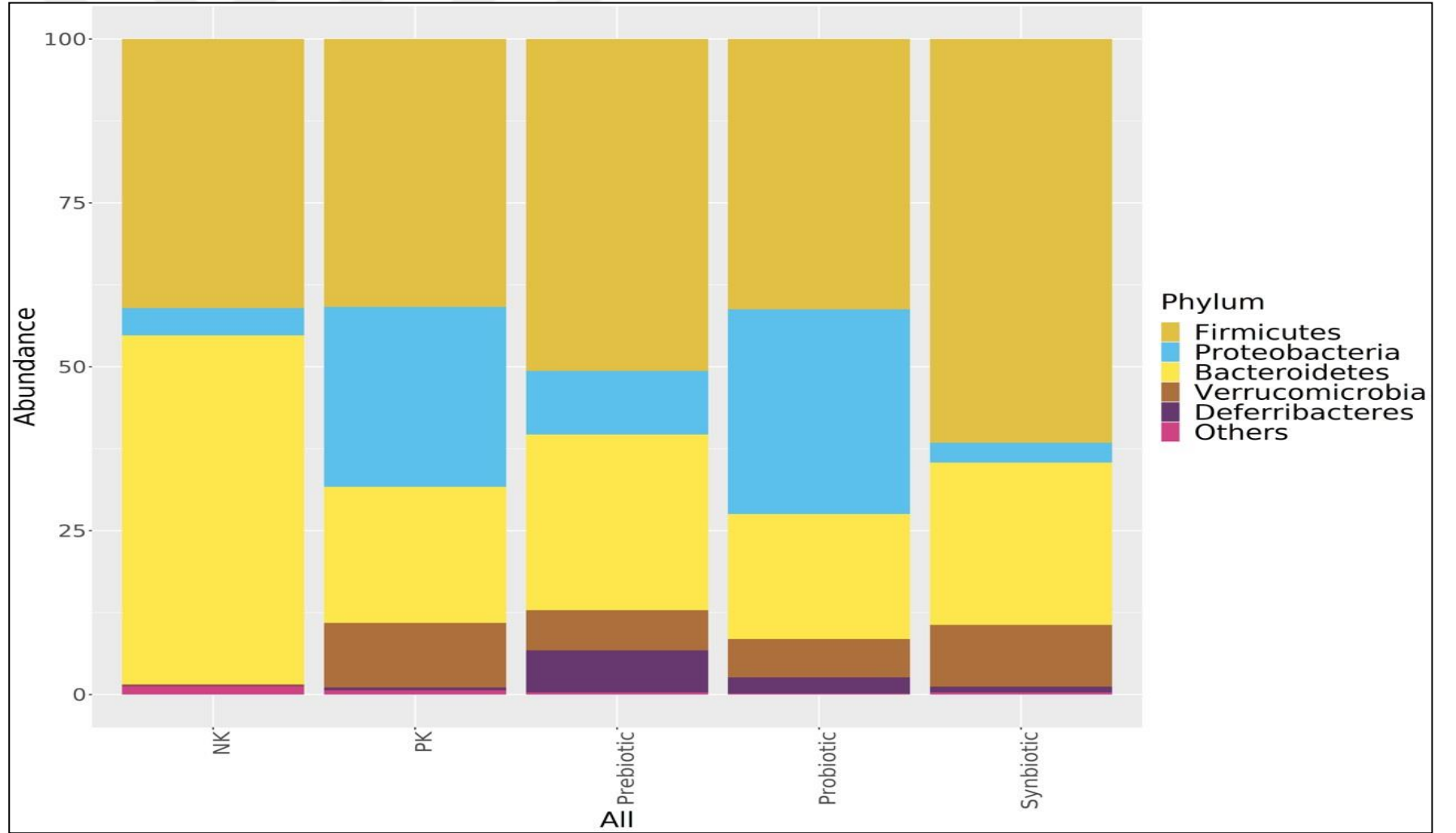
Tablo 4.8. Grupların çoklu permütasyon testi (MRPP) karşılaştırma sonuçları

İkili Grup Karş.	⁶A	⁷Observ. Delta	⁸Expect. Delta	⁹Significance
¹ NK – ² PK	0.1549	2.03E+03	2.40E+03	0.001***
³ PRO – ² PK	0.1541	1.97E+03	2.33E+03	0.001***
⁴ PRE – ² PK	0.1544	2.02E+03	2.39E+03	0.001***
⁵ SİN – ² PK	0.1562	2.23E+03	2.64E+03	0.001***

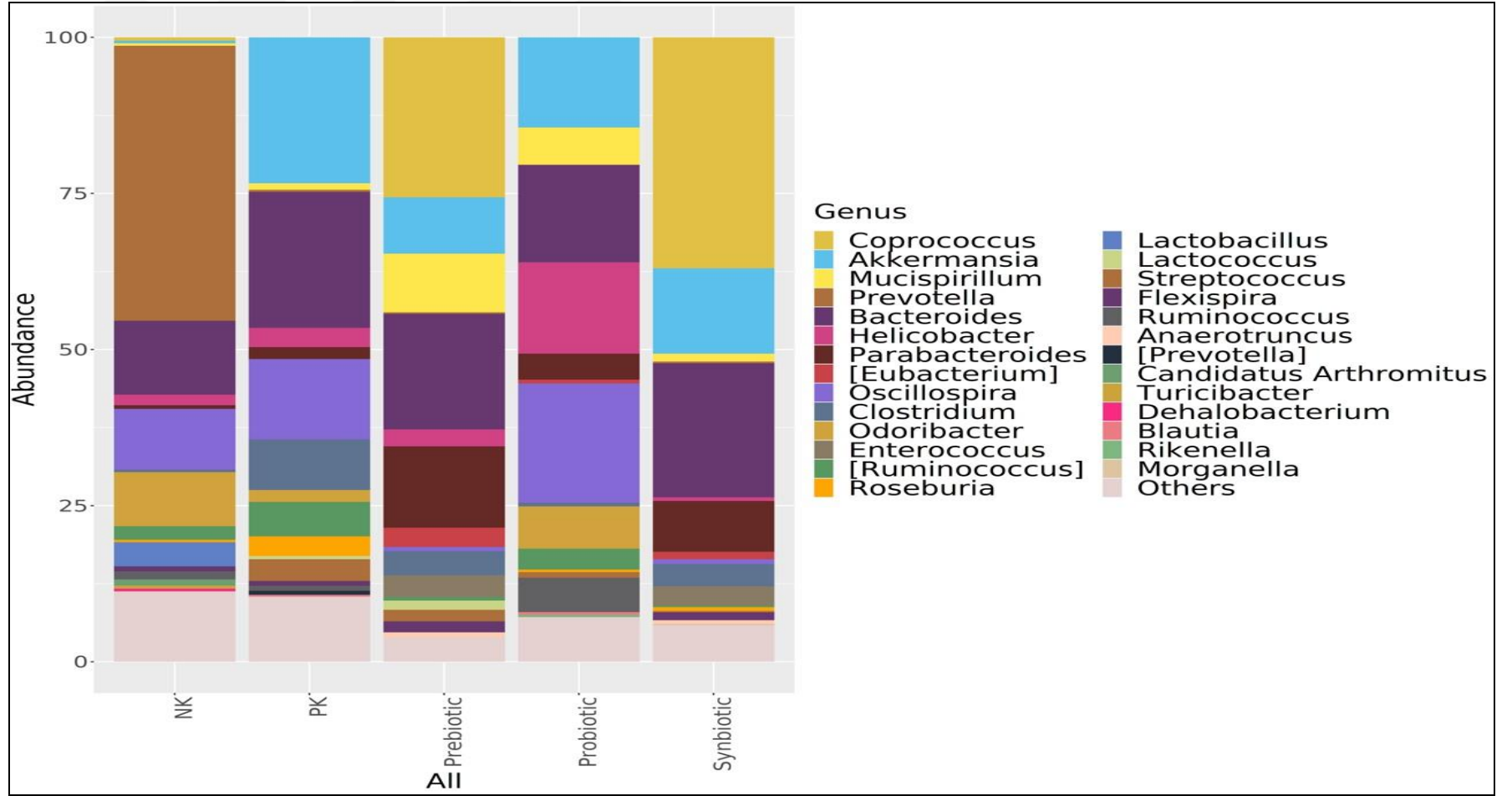
Açıklamalar: ¹NK: Negatif Kontrol, ²PK: Pozitif Kontrol Grubu; ³PRO: Probiyotik Grubu; ⁴PRE: Prebiyotik Grubu; ⁵SİN: Sinbiyotik Grubu, ⁶A: Grup kimliği tarafından belirlenen mesafelere ait oranların tesadüf faktörüne bağlı olarak düzeltilmiş bir tahmini, ⁷Observed Delta: Grup ortalamaları arasındaki mesafelerin genel ağırlıklı ortalaması, ⁸Expected Delta: Grup yapısının olmadığı yokluk hipotezi varsayımında gruplar arasındaki gerçek mesafe farklılıklarının ortalaması, ⁹Significance: İstatistiksel anlamlılık değeri; *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$; $p < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

Mevcut çalışmada bakteriler özelindeki bu inceleme, en tepedeki taksonomik bileşen olan filum ile alttaki taksonomik bileşenlerden olan cinsi içerecek şekilde gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.6 ve Şekil 4.7’de ise beş ayrı grubun bağırsak mikrobiyotasına ait olan filum ve cinslerin bolluk düzeyleri karşılaştırılmıştır. Bu karşılaştırmalar Taksonomik Sütun Grafikleri (Taxa Bar Plots) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Söz konusu grafiklerde, her bir taksonomik öge; bolluk düzeyine göre değişen alanları kapsayan şekilde görselleştirilmiştir. Taksonomik sütun grafiklerinde; her bir taksonomik ögenin en yüksek oranda barındırdığı alt bileşenler verilmiştir. Bununla birlikte aynı alt bileşenlerin aynı renkle gösterimi sağlanarak gruplar arası karşılaştırma yapılmasına imkan sağlanmıştır.

Şekil 4.6. ile NK, PK, PRO, PRE ve SİN gruplarında bulunan farelerin bağırsak mikrobiyota örüntüsündeki filumlar, bolluk düzeylerine göre kıyaslanmıştır. Bu taksonomik sütun grafiğinde tüm gruplar içinde en fazla miktarda yer alan filumların sırasıyla Bacillota, Pseudomonadota, Bacteroidota, Verrucomicrobiota ve Deferribacteres olduğu görülmüştür. Bu filumların dışında yer alan taksonomik ögeler ise diğerleri (others) olarak nitelendirilmiştir.



Şekil 4.6. Grupların filum düzeyinde bolluk derecelerini gösteren Taksonomik Sütun Grafiği (Taxa Bar Plot)



Şekil 4.7. Grupların cins düzeyinde bolluk derecelerini gösteren Taksonomik Sütun Grafiği (Taxa Bar Plot)

Gruplar arasında Bacillota filum düzeyleri açısından anlamlı bir farklılık bulunmadığı saptanmıştır ($p>0.05$). Pseudomonadota filumunun en yüksek oranda görüldüğü iki grup sırasıyla PK (%27.37) ve PRO (%31.23) grupları olarak bulunmuştur. Bu filumu en düşük oranda içeren NK (%4.15) ve SİN (%3.05) grupları ile PK ve PRO grupları arasında önemli fark olduğu belirlenmiştir ($p = 0.000$). Tüm gruplar içinde en bol bulunan üçüncü sıradaki filum olan Bacteroidota' yı en yüksek miktarda içeren grup ise NK (%53.25) olarak saptanmış; en düşük miktarda içeren iki grubun ise sırasıyla PRO (%19.07) ve PK (%20.77) grupları olduğu gözlemlenmiştir. Negatif kontrol grubu ile PRO ve PK grupları arasında Bacteroidota düzeyleri açısından anlamlı farklılığa rastlanmıştır ($p=0.006$). Verrucomicrobiota ve Deferribacteres filumları gruplar arasında karşılaştırıldığında ise istatistiksel açıdan anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0.05$).

Bakteri cinslerinin göreceli bolluk düzeylerinin gruplara göre dağılımlarını gösteren Taksonomik Sütun Grafiği ise Şekil 4.7'de verilmiştir. *Coprococcus* cinsine en düşük yüzdede sahip olan grupların PK ve PRO grupları olduğu görülmüştür. Ancak PRE ve SİN gruplarında bu bakteri cinsinin PK ve PRO gruplarına kıyasla önemli oranda artış gösterdiği gözlemlenmiştir ($p=0.001$). *Prevotella* cinsi bakterilerin ise NK grubunda önemli düzeyde bulunduğu saptanmış ancak PK grubu dışındaki diğer tüm gruplardaki yüzdelерinin NK grubuna göre anlamlı düzeyde daha düşük olduğu tespit edilmiştir ($p=0.000$). *Helicobacter* cinsi bakteriler açısından ise SİN ile PRO grupları arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılığa rastlanmıştır ($p=0.008$).

Parabacteroides' in bulunma yüzdeleri gruplar arasında incelendiğinde ise PRE grubunun PK ve NK grubuna kıyasla anlamlı ölçüde daha yüksek değerlere sahip olduğu gösterilmiştir ($p=0.000$). *Eubacterium* cinsi NK, PK ve PRO gruplarında düşük oranlarda görülmüş ancak özellikle de SİN grubundaki miktarın bu gruplara kıyasla önemli artış gösterdiği saptanmıştır ($p=0.003$). *Oscillospira*' nın ise en yüksek oranda PRO ve PK gruplarında yer aldığı ancak PRE ve SİN gruplarında ise düzeylerinin ciddi anlamda düştüğü belirlenmiştir ($p=0.000$).

Clostridium' un en yüksek oranda PK grubunda görüldüğü ancak PRE ve SİN gruplarında bu cins bakterilerin PK grubuna kıyasla önemli seviyede düştüğü

gözlemlenmiştir ($p=0.032$). *Odoribacter* ise en yüksek oranda NK grubunda bulunmuş; PRE ve SİN gruplarında ise NK grubuna göre anlamlı düzeyde daha düşük olduğu tespit edilmiştir ($p=0.000$). *Enterococcus*' un en düşük oranda PRO grubunda görüldüğü; yalnızca SİN grubunda PRO grubuna kıyasla artış gösterdiği bulunmuştur ($p=0.009$). *Ruminococcus* cinsine ise en yüksek düzeyde PRO grubunda rastlanmış ancak PRE ve SİN gruplarında bu bakteri cinsinin önemli oranda azaldığı görülmüştür ($p=0.000$). *Roseburia*' nın en düşük miktarda bulunduğu grubun PRE olduğu belirlenmiş öte yandan PRO grubunda ise bu bakteri cinsinin PRE grubuna kıyasla önemli miktarda arttığı saptanmıştır ($p=0.026$). *Lactobacillus* cinsine ait bakterilere ise en yüksek oranda NK grubunda rastlanmış; söz konusu bakteri cinsi düzeylerinin PK, PRE ve SİN gruplarında ise NK grubuna göre önemli oranda düştüğü gösterilmiştir ($p=0.001$). *Streptococcus* cinsinin ise en düşük oranda NK en yüksek oranda da PK grubunda olduğu bulunmuştur ($p=0.002$).

Probiyotik, prebiyotik ve sinbiyotik uygulamaları sonucu farelerin bağırsak mikrobiyota örüntülerindeki baskın taksonomik ünitelere ait göreceli bolluk yüzdelerinin nasıl değiştiği ise sırasıyla Tablo 4.9 ve Tablo 4.10'da verilmiştir.

Tablo 4.9. Farelerin bağırsak mikrobiyotalarındaki baskın taksonomik ünitelere ait bolluk yüzdelерinin * Kruskal-Wallis testiyle hesaplanması

Filum	¹ NK (n = 8)	² PK (n = 8)	³ PRO (n = 8)	⁴ PRE (n = 8)	⁵ SİN (n = 8)	SEM	p
	Ort.	Ort.	Ort.	Ort.	Ort.		
Bacteroidota	53,25 ^a	20,77 ^b	19,07 ^b	26,78 ^{a,b}	24,77 ^{a,b}	2,77	0,006*
Pseudomonadota	4,15 ^a	27,37 ^b	31,23 ^b	9,70 ^{a,b}	3,05 ^a	2,57	0,000*
Verrucomicrobiota	0,15 ^a	9,98 ^a	5,81 ^a	6,15 ^a	9,40 ^a	2,02	0,191
Deferribacteres	0,32 ^a	0,67 ^a	2,54 ^a	6,68 ^a	1,02 ^a	1,19	0,087
Sınıf							
Deltaproteobacteria	1,45 ^{a,b}	25,13 ^a	25,09 ^a	2,23 ^b	0,01 ^b	2,42	0,000*
Bacteroidia	53,00 ^a	20,43 ^{b,c}	18,66 ^{b,c}	26,77 ^{a,b}	24,77 ^{a,c}	2,78	0,005*
Verrucomicrobiae	0,15 ^a	10,02 ^a	5,87 ^a	6,15 ^a	9,40 ^a	2,02	0,191
Deferribacteres	0,32 ^a	0,68 ^a	2,55 ^a	6,64 ^a	1,02 ^a	1,18	0,088
Epsilonproteobacteria	2,43 ^a	2,24 ^a	6,26 ^a	3,16 ^a	1,44 ^a	0,60	0,128
Bacilli	2,47 ^{a,c}	2,65 ^{a,c}	0,74 ^{a,b}	5,69 ^{a,c}	4,20 ^c	0,56	0,035*
Erysipelotrichi	0,25 ^a	3,60 ^{b,c}	0,68 ^{b,c}	2,65 ^{a,b}	1,99 ^{b,c}	0,49	0,010*
Gammaproteobacteria	0,23 ^{a,b}	0,17 ^{a,b}	0,04 ^b	4,30 ^a	1,50 ^{a,b}	0,38	0,007*
Takım							
Desulfovibrionales	1,45 ^{a,b}	25,13 ^a	25,07 ^a	2,23 ^b	0,01 ^b	2,42	0,000*
Bacteroidales	53,01 ^a	20,43 ^{b,c}	18,66 ^{b,c}	26,77 ^{a,b}	24,77 ^{a,c}	2,78	0,005*
Verrucomicrobiales	0,15 ^a	10,02 ^a	5,87 ^a	6,15 ^a	9,40 ^a	2,03	0,191
Deferribacterales	0,32 ^a	0,68 ^a	2,55 ^a	6,67 ^a	1,02 ^a	1,19	0,088
Campylobacterales	2,43 ^a	2,24 ^a	6,26 ^a	3,16 ^a	1,44 ^a	0,60	0,128
Lactobacillales	2,27 ^{a,c}	2,60 ^{a,c}	0,74 ^{a,b}	5,64 ^{a,c}	4,20 ^c	0,55	0,034*
Erysipelotrichales	0,25 ^a	3,60 ^{b,c}	0,68 ^{b,c}	2,65 ^{a,b}	1,99 ^{b,c}	0,49	0,010*
Enterobacterales	0,23 ^{a,b}	0,17 ^{a,b}	0,02 ^b	3,23 ^a	1,35 ^{a,b}	0,33	0,030*
Aile							
Lachnospiraceae	28,49 ^a	23,03 ^a	25,44 ^a	29,92 ^a	45,56 ^a	2,71	0,138
Desulfovibrionaceae	1,57 ^{a,b}	26,29 ^a	26,74 ^a	2,57 ^b	0,02 ^b	2,52	0,000*
Verrucomicrobiaceae	0,16 ^a	8,92 ^a	6,13 ^a	4,06 ^a	1,18 ^a	1,60	0,122
Deferribacteraceae	0,34 ^a	0,70 ^a	2,70 ^a	6,78 ^a	1,16 ^a	1,20	0,088
Prevotellaceae	22,68 ^a	0,43 ^{b,c}	0,22 ^b	0,47 ^b	0,58 ^{a,b}	1,69	0,000*
Muribaculaceae	17,36 ^{a,b}	5,56 ^{a,c}	3,72 ^c	3,30 ^c	2,13 ^c	1,15	0,001*
Bacteroidaceae	4,99 ^a	9,90 ^{a,b}	6,75 ^{a,b}	15,27 ^{a,b}	17,31 ^b	1,41	0,015*
Helicobacteraceae	2,64 ^a	2,36 ^a	6,66 ^a	3,54 ^a	1,79 ^a	0,64	0,189

Tablo 4.9 Devamı

Filum	¹ NK (n = 8)	² PK (n = 8)	³ PRO (n = 8)	⁴ PRE (n = 8)	⁵ SİN (n = 8)	SEM	p
	Ort.	Ort.	Ort.	Ort.	Ort.		
Porphyromonadaceae	0,28 ^a	0,98 ^{a,c}	1,93 ^{a,b}	10,50 ^b	6,87 ^{b,c}	0,90	0,000*
Oscillospiraceae	5,82 ^{a,c}	7,67 ^{a,b}	11,88 ^a	1,56 ^c	1,91 ^{b,c}	0,79	0,000*
Erysipelotrichaceae	0,27 ^a	3,94 ^{b,c}	0,71 ^{a,c}	2,90 ^{a,c}	2,29 ^{b,c}	0,53	0,009*
Rikenellaceae	6,11 ^a	2,47 ^{a,b}	2,27 ^{a,b}	0,52 ^b	0,70 ^b	0,40	0,000*
Odoribacteraceae	2,21 ^a	0,10 ^a	0,62 ^a	0,03 ^a	0,01 ^a	0,27	0,111
Enterobacteriaceae	0,25 ^{a,b}	0,18 ^{a,b}	0,03 ^a	5,15 ^b	1,59 ^{a,b}	0,47	0,009*
Enterococcaceae	0,29 ^{a,b}	0,33 ^{a,b}	0,01 ^a	3,63 ^b	3,37 ^b	0,49	0,006*
Clostridiaceae	0,81 ^{a,b}	0,20 ^{a,b}	0,03 ^a	2,65 ^b	1,75 ^{a,b}	0,31	0,016*
Streptococcaceae	0,24 ^a	2,26 ^a	0,65 ^a	2,42 ^a	0,75 ^a	0,31	0,371
Lactobacillaceae	1,92 ^a	0,08 ^b	0,07 ^b	0,05 ^b	0,14 ^b	0,17	0,001*
Cins							
Coprococcus	1,46 ^{a,b}	0,01 ^a	0,05 ^a	22,95 ^b	36,36 ^b	3,36	0,000*
Akkermansia	0,27 ^a	18,52 ^a	9,82 ^a	11,41 ^a	12,86 ^a	2,99	0,160
Mucispirillum	0,92 ^a	2,15 ^a	6,53 ^a	9,24 ^a	1,46 ^a	1,65	0,077
Prevotella	41,32 ^a	1,53 ^{a,b}	0,30 ^b	0,79 ^b	0,77 ^b	2,96	0,000*
Bacteroides	11,35 ^a	19,29 ^a	14,83 ^a	19,88 ^a	21,81 ^a	1,87	0,312
Helicobacter	2,36 ^{a,b}	5,44 ^{a,b}	15,42 ^a	3,02 ^{a,b}	0,88 ^b	1,45	0,008*
Parabacteroides	0,52 ^a	2,00 ^{a,c}	3,67 ^{a,b}	13,32 ^b	9,36 ^{b,c}	1,21	0,000*
Eubacterium	0,01 ^a	0,06 ^{a,b}	0,40 ^a	2,61 ^{a,b}	1,59 ^b	0,36	0,003*
Oscillospira	10,73 ^{a,b}	16,89 ^a	22,97 ^a	1,10 ^b	1,00 ^b	1,93	0,000*
Clostridium	0,81 ^{a,b}	7,83 ^a	0,92 ^a	4,00 ^b	3,85 ^b	0,84	0,032*
Odoribacter	9,48 ^a	2,98 ^{a,b}	6,80 ^{a,c}	0,20 ^{b,c}	0,01 ^b	0,86	0,000*
Enterococcus	0,35 ^{a,b}	0,18 ^{a,b}	0,01 ^a	3,68 ^{a,b}	3,12 ^b	0,48	0,009*
Ruminococcus	2,88 ^{a,b}	2,43 ^{a,b}	7,35 ^a	0,51 ^b	0,35 ^b	0,52	0,000*
Roseburia	0,91 ^{a,b}	3,73 ^{a,b}	1,79 ^a	0,20 ^b	0,80 ^{a,b}	0,39	0,026*
Lactobacillus	4,76 ^a	0,20 ^b	0,18 ^{a,b}	0,09 ^b	0,24 ^b	0,44	0,001*
Lactococcus	0,60 ^a	1,56 ^a	0,40 ^a	1,83 ^a	0,61 ^a	0,24	0,565
Streptococcus	0,01 ^a	3,59 ^b	1,45 ^{a,b}	1,99 ^b	1,10 ^b	0,33	0,002*

Açıklamalar: Veriler ortalama $\pm$ standart sapma olarak gösterilmiştir. $p < 0.05$ anlamlı olarak kabul edilmiştir. Aynı harfi içeren (a,b ve c) içeren gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. * $p < 0.05$. **Kısaltmalar:** ¹NK: Negatif Kontrol, ²PK: Pozitif Kontrol Grubu; ³PRO: Probiyotik Grubu; ⁴PRE: Prebiyotik Grubu; ⁵SİN: Sinbiyotik Grubu

Tablo 4.10. Farelerin bağırsak mikrobiyotalarındaki baskın taksonomik ünitelere ait bolluk yüzdelерinin* One Way Anova testi ile hesaplanması

Filum	¹ NK (n = 8)	² PK (n = 8)	³ PRO (n = 8)	⁴ PRE (n = 8)	⁵ SİN (n = 8)	p
	Ort ± ss	Ort ± ss	Ort ± ss	Ort ± ss	Ort ± ss	
Bacillota	41,05 ± 15,76 ^a	40,90 ± 15,75 ^a	41,23 ± 10,49 ^a	50,66 ± 17,05 ^a	61,59 ± 22,02 ^a	0,068
Sınıf						
Clostridia	38,53 ± 15,72 ^a	34,82 ± 14,04 ^a	40,05 ± 10,88 ^a	42,36 ± 13,30 ^a	55,42 ± 22,33 ^a	0,117
Takım						
Clostridiales	38,53 ± 15,72 ^a	34,83 ± 14,05 ^a	40,06 ± 10,89 ^a	42,33 ± 13,29 ^a	55,42 ± 22,32 ^a	0,117

Açıklamalar: Veriler ortalama ± standart sapma olarak gösterilmiştir. Aynı harfi içeren (a,b ve c) içeren gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. $p < 0.05$ anlamlı olarak kabul edilmiştir. * $p < 0.05$ **Kısaltmalar:** ¹NK: Negatif Kontrol, ²PK: Pozitif Kontrol Grubu; ³PRO: Probiyotik Grubu; ⁴PRE: Prebiyotik Grubu; ⁵SİN: Sinbiyotik Grubu.

Gruplar bakteri sınıfları açısından karşılaştırıldığında; Deltaproteobacteria sınıfına en yüksek oranda sahip olan iki grubun PK ve PRO olduğu görülmüştür. Ancak özellikle de PRE ve SİN gruplarında Deltaproteobacteria' nın NK grubuna yaklaşan seviyede düşüş gösterdiği saptanmıştır ($p=0.000$). Bacteroidia sınıfının en yüksek oranda NK grubunda, en düşük miktarlarda ise PK ve PRO gruplarında olduğu bulunmuştur. Prebiyotik ve SİN gruplarının Bacteroidia yüzdeleriyle NK grubunun yüzdesi arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p=0.005$). Probiyotik grubunun Bacilli sınıfının diğer gruplara göre kısmen düşüş gösterdiği belirlenmiştir. Ancak SİN grubunun yüzdesinin PRO grubuna kıyasla anlamlı olarak arttığı saptanmıştır ($p=0.035$). Erysipelotrichi sınıfı ise en düşük yüzde de NK grubunda görülmüştür. Prebiyotik grubu haricindeki diğer tüm gruplarda Erysipelotrichi sınıfı yüzdesinin NK grubuna kıyasla anlamlı oranda artış gösterdiği belirlenmiştir ($p=0.010$). Gammaproteobacteria sınıfının en düşük yüzdede PRO grubunda, en yüksek yüzdede PRE grubunda bulunduğu gösterilmiş ve iki grup arasında anlamlı farklılık tespit edilmiştir ($p=0.007$).

Gruplar takımlar düzeyinde kıyaslandığında Desulfovibrionales yüzdelерinin en yüksek oranda PK ve PRO gruplarında bulunduğu; PRE ve SİN grubu yüzdelерinin ise PK ve PRO gruplarına kıyasla önemli oranda daha düşük olduğu görülmüştür ($p=0.000$). Bacteroidales takımının en yüksek yüzdeye NK grubunda ulaştığı; diğer tüm grupların ise Bacteroidales düzeylerinin NK' dan daha az

olduğu gözlemlenmiştir ($p=0.005$). Lactobacillales takımına ait bakterilerin en düşük yüzdede PRO grubunda bulunduğu, öte yandan PRE ve SİN gruplarında ise bu takımın artış gösterdiği saptanmıştır. Sinbiyotik uygulamasının gerçekleştirildiği grubun Lactobacillales yüzdesinin PK grubundan anlamlı miktarda daha fazla olduğu bulunmuştur ($p=0.034$).

Erysipelotrichales takımının en düşük yüzdede NK grubunda bulunduğu görülmüştür. Pozitif kontrol, PRO ve SİN gruplarının ise Erysipelotrichales takımını NK grubuna kıyasla daha yüksek oranda içerdiği gösterilmiştir ($p=0.010$). Enterobacteriales takımını en yüksek oranda PRE, en düşük oranda ise PRO grubunun içerdiği ve bu iki grup arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunduğu belirlenmiştir ($p=0.030$).

Gruplar bakteri aileleri açısından karşılaştırıldığında ise PRE ile SİN grubunun sahip olduğu Desulfovibrionaceae aile yüzdesinin PRO ve PK gruplarının ikisinden de önemli düzeyde daha düşük olduğu bulunmuştur ($p=0.000$). Prevotellaceae ailesine en yüksek yüzde oranında sahip olan grubun NK olduğu ancak PRO ve PRE grubunda ise bu oranların NK grubuna kıyasla anlamlı derecede daha düşük olduğu saptanmıştır ($p=0.000$). Muribaculaceae ailesi, en yüksek oranda NK grubunda görülmüş ve probiyotik ve prebiyotik uygulamalarının olduğu tüm gruplarda bulunma yüzdesinin NK grubuna kıyasla önemli oranda daha düşük olduğu belirlenmiştir ($p=0.001$). Bacteroidaceae'nin ise en düşük yüzdede NK grubunda olduğu; diğer gruplarda bu ailenin yüzdelерinin artış gösterdiği ancak bu artışın yalnızca SİN grubunda anlamlı bir seviyeye ulaştığı gözlemlenmiştir ($p=0.015$).

Porphyromonadaceae ailesinin PRE grubunda PK grubuna göre daha fazla oranda bulunduğu belirlenmiştir ($p=0.000$). Oscillospiraceae'nin ise en yüksek düzeye PK grubunda ulaştığı fakat PRE ve SİN gruplarındaki yüzdelерinin PK'ya göre önemli oranda düşüş gösterdiği tespit edilmiştir ($p=0.000$). Erysipelotrichaceae ailesine en düşük yüzdede NK grubunda rastlanmış, PK ve SİN gruplarında ise bu ailenin yüzdelерinde NK grubuna göre anlamlı bir artış olduğu saptanmıştır ($p=0.009$). Rikenellaceae ailesinin en yüksek oranda NK grubunda olduğu görülmüştür. Diğer tüm grupların Rikenellaceae yüzdelерinin ise NK'ya göre

daha düşük olduğu gözlemlenmiştir. Ancak bu düşüklüğün yalnızca PRE ve SİN gruplarında istatistiksel anlamlılığa ulaştığı tespit edilmiştir ($p=0.000$). Enterobacteriaceae ve Clostridiaceae' nin NK, PK ve PRO gruplarında düşük oranlarda bulunduğu belirlenmiştir. Prebiyotik grubunun ise PRO grubuna kıyasla sırasıyla Enterobacteriaceae ($p=0.009$) ve Clostridiaceae ($p=0.016$) ailelerini daha yüksek yüzdede içerdiği gösterilmiştir. Enterococcaceae' nin PRO grubunda çok düşük miktarda bulunduğu saptanmış ancak PRE ve SİN gruplarında bu ailenin yüzdelерinin PRO grubuna kıyasla anlamlı düzeyde arttığı bulunmuştur ($p=0.006$). Lactobacilloceae' yi en yüksek yüzdede NK grubunun içerdiği, buna karşın diğer tüm gruplarda bu aile miktarlarının anlamlı ölçüde düştüğü saptanmıştır ($p=0.001$).

Serum kolesterol ve lipit parametreleriyle bakteri cinsleri arasındaki ilişki, Tablo 4.11' de Spearman korelasyon testi aracılığıyla incelenmiş ve bu ilişkinin görselleştirildiği bir ısı haritası çıkarılmıştır. Isı haritasında serum TK miktarı ile *Akkermansia* ($p<0.001$) ve *Streptococcus* ($p<0.001$) cinsleri arasında orta seviye – pozitif yönlü, *Parabacteroides* ($p<0.05$) ile ise düşük seviye – pozitif yönlü bir korelasyon saptanmıştır. Öte yandan serum TK miktarı ile *Prevotella* ($p<0.01$) arasında düşük seviye – negatif yönlü, *Lactobacillus* ($p<0.01$) ile ise orta seviye – negatif yönlü korelasyon olduğu görülmüştür.

Serum LDL-K ile *Parabacteroides* ($p<0.05$), *Clostridium* ($p<0.05$) ve *Streptococcus* ($p<0.01$) arasında düşük seviye – pozitif yönlü, *Prevotella* ($p<0.01$) ile *Odoribacter* ($p<0.05$) arasında da düşük seviye – negatif yönlü ilişki olduğu bulunmuştur. *Lactobacillus* ($p<0.001$) ile LDL-K arasında ise orta seviye – negatif yönlü bir korelasyon olduğu saptanmıştır. Serum HDL-K ile *Akkermansia* ($p<0.001$) ve *Streptococcus* ($p<0.001$) cinsleri arasında orta seviye – pozitif yönlü; *Coprococcus* ($p<0.01$), *Prevotella* ($p<0.05$) ve *Lactobacillus* ($p<0.05$) ile HDL-K arasında ise düşük seviye – negatif yönlü bir korelasyon olduğu gösterilmiştir.

Serum TG miktarı ile *Roseburia* ($p<0.05$), *Lactococcus* ($p<0.05$) ve *Streptococcus* ($p<0.01$) arasında düşük seviye, *Oscillospira* ($p<0.05$) ile TG arasında ise zayıf seviye – pozitif yönlü bir ilişki olduğu gözlemlenmiştir. Diğer taraftan

Coprococcus ($p<0.05$) ile *Enterococcus* ($p<0.05$) arasında ise düşük seviye – negatif yönlü bir korelasyon olduğu belirlenmiştir.

Serum VLDL-K miktarı ile *Lactococcus* ($p<0.05$) cinsi bakteriler arasında düşük seviye – pozitif yönlü bir korelasyon saptanmıştır. Hehangi bir bakteri cinsi ile serum VLDL-K miktarı arasında negatif yönlü bir ilişkiye rastlanmamıştır ($p>0.05$).



Tablo 4.11. Serum kolesterol ve lipit parametreleriyle bakteri cinsleri arasındaki ilişkinin Spearman korelasyon testiyle incelendiği ısı haritası

	TK	LDL-K	HDL-K	VLDL-K	TG	Coprococcus	Akkermansia	Mucispirillum	Prevotella	Bacteroides	Helicobacter	Parabacteroides	Eubacterium	Oscillospira	Clostridium	Odoribacter	Enterococcus	Ruminococcus	Roseburia	Lactobacillus	Lactococcus	Streptococcus	
		***	***	ns	*	ns	***	ns	**	ns	ns	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	**	ns	***	TK
	***		*	ns	ns	ns	ns	ns	**	ns	ns	*	ns	ns	*	*	ns	ns	ns	***	ns	**	LDL-K
(0.90)	***	*		**	***	**	**	ns	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	*	ns	*	HDL-K
(1.00)	ns	ns	**		***	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	*	ns	VLDL-K
(0.70)	*	ns	***	***		*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	*	ns	ns	*	ns	*	ns	*	**	TG
(0.90)	ns	ns	**	ns	*		ns	ns	ns	ns	***	**	***	***	ns	**	**	***	**	ns	ns	ns	Coprococcus
(0.50)	***	ns	**	ns	ns	ns		*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	Akkermansia
(0.70)	ns	ns	ns	ns	ns	ns	*		*	ns	***	ns	ns	**	ns	ns	*	*	ns	ns	ns	ns	Mucispirillum
(0.30)	**	**	*	ns	ns	ns	ns	*		*	ns	**	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	**	ns	ns	Prevotella
(0.50)	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	*		ns	**	**	**	ns	*	ns	**	ns	**	ns	ns	Bacteroides
(0.16)	ns	ns	ns	ns	ns	***	ns	***	ns	ns		ns	**	***	ns	ns	*	**	*	ns	ns	ns	Helicobacter
(0.00)	*	*	ns	ns	ns	**	ns	ns	**	**	ns		***	***	ns	***	ns	**	*	**	ns	ns	Parabacteroides
(-0.16)	ns	ns	ns	ns	ns	***	ns	ns	ns	**	**	***		***	ns	**	*	***	ns	ns	ns	ns	Eubacterium
(-0.16)	ns	ns	ns	ns	*	***	ns	**	ns	**	***	***	***		ns	**	**	***	***	ns	ns	ns	Oscillospira
(-0.30)	ns	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns		*	ns	ns	ns	**	ns	**	Clostridium
(-0.30)	ns	*	ns	ns	ns	**	ns	ns	ns	*	ns	***	**	**	*		ns	***	ns	**	ns	*	Odoribacter
(-0.50)	ns	ns	ns	ns	*	**	ns	*	ns	ns	*	ns	*	**	ns	ns		***	ns	ns	ns	ns	Enterococcus
(-0.70)	ns	ns	ns	ns	ns	***	ns	*	ns	**	**	**	***	***	ns	***	***		*	ns	ns	ns	Ruminococcus
(-0.90)	ns	ns	ns	ns	*	**	ns	ns	ns	ns	*	*	ns	***	ns	ns	ns	*		ns	ns	*	Roseburia
(-0.90)	**	***	*	ns	ns	ns	ns	ns	**	**	ns	**	ns	ns	**	**	ns	ns	ns		ns	**	Lactobacillus
(-1.00)	ns	ns	ns	*	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns		**	Lactococcus
	***	**	*	ns	**	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	**	*	ns	ns	*	**	**		Streptococcus

Açıklamalar: Spearman korelasyon katsayı değeri pozitif olanlar kırmızı, negatif olanlar ise mavi renk ile gösterilmiştir. Parametreler arasındaki ilişkin gösterildiği kutucukların korelasyon katsayısına göre hangi renk tonunu aldığı ise soldaki sütunda belirtilmiştir. Korelasyon katsayısı: <0.16 ise çok zayıf, 0.16 – 0.30 ise zayıf, 0.30 – 0.49 ise düşük, 0.50 – 0.69 ise orta, 0.70 – 0.89 ise güçlü, 0.90 – 1.00 ise çok güçlü korelasyonu belirtmektedir. *** p <0.001, ** p <0.01, * p <0.05; p <0.05 değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. **Kısaltmalar:** ns: non-significant (istatistiksel açıdan anlamlı değil; p >0.05)

5. TARTIşMA VE SONUÇ

Serum lipit ve kolesterol parametrelerinin normal eřik deęerlerin üzerine çıktıęı hiperkolesterolemi tablosu, ateroskleroza yol açarak vasküler fonksiyonlarda bozulmalara ve karacięerde lipit birikimine yol açmaktadır. Karacięerde, adipoz doku miktarındaki artıř sonucu, insülin direnci ve dūřuk seviyeli kronik inflamasyon gibi metabolik bozukluklar tetiklenmektedir. Sōz konusu metabolik bozukluklar ise obezite, Tip 2 DM, MetS ve NAFLD gibi hastalıkların temel etiyolojik faktōrū konumundadır. Tūm bu sebeplerden ōtūrū, metabolik bozuklukların hem oluřumunda hem de klinik seyrinde rolū olan hiperkolesterolemi tablosunun etkin bir biçimde tedavi edilmesi gerekmektedir (řliř ve ark., 2019).

Klinikte hiperkolesteroleminin primer tedavisinde ilaç tedavisinden faydalanılmaktadır. Vūcut aęırlıęı kaybı ve dūzenli fiziksel aktivite gibi alternatif tedavi yōntemlerinin ise ilaç tedavisiyle birlikte uygulanması tavsiye edilmektedir. Bu alternatif tedavi yōntemlerinden birisi de biyoterapōtik amaçlı kullanılan sinbiyotik uygulamasıdır. Őzellikle de son yıllarda bu uygulamaların lipit ve kolesterol parametrelerinin dūzenlenmesinde rol oynadıęını gōsteren çalıřmaların sayısında artıř yařanmaktadır. Bu çalıřmalarda diyetle ilave edilen sinbiyotiklerin çeřitli metabolik mekanizmalar aracılıęıyla kolesterol dūřūrūcū etki oluřturdukları saptanmıřtır. Fakat probiyotik suřların ve prebiyotik kaynakların sahip olduęu hipokolesterolemik etki; uygulama sūresine, uygulama dozuna ve uygulama řekline baęlı olarak deęiřebilmektedir (Anandharaj ve ark., 2020). Bazı probiyotik bakterilerin ya da prebiyotik kaynaklarının kolesterol dūřūrūcū etkileri in vitro çalıřmalarla ispatlanmıř olsa da organizmada aynı

etkileri açığa çıkarabilmesi her zaman mümkün olmayabilmektedir. Çünkü metabolizmanın sahip olduğu kompleks yollar ve enzimatik tepkimeler in vitro ortamda elde edilen bulguları etkileyebilmektedir. Bu yüzden in vitro ortamda görülen hipokolesterolemik etkilerin in vivo ortamda da test edilmesi gerekmektedir (Thakkar ve ark., 2020).

Mevcut çalışmada probiyotik kaynağı olarak in vitro çalışmalarda hipokolesterolemik etki gösterdiği saptanan ancak bu etkinin in vivo ortamda ayrıntılı biçimde test edilmediği *Lactobacillus casei* ATCC 393 suşu; prebiyotik kaynağı olarak ise glisemik kontrol üzerine etkileri kanıtlanan ancak kolesterol düşürücü etkileri kapsamlı olarak aydınlatılmamış olan yeni nesil tatlandırıcı d-tagatoz, sinbiyotik olarak uygulanmıştır. Güncel literatür taraması sonucu; bu çalışmada kullanılan sinbiyotik formun hiperkolesterolemi üzerine etkilerinin ilk kez araştırıldığı belirlenmiştir. Sinbiyotik formun içindeki prebiyotik kaynağının kullanılan probiyotik suş tarafından fermente edilebildiği farklı bir amaçla gerçekleştirilen bir çalışma aracılığıyla doğrulanmıştır (Buron-Moles ve ark., 2019). Prebiyotik kaynağının probiyotik suş tarafından fermente edilmesi sonucu kullanılan suşun gelişiminin artacağı ve dolayısıyla suşun sahip olduğu hipokolesterolemik etkinin de sinerjistik şekilde güçleneceği düşünülmüştür. Bu amaçla farelerde YYYYK yemler aracılığıyla hiperkolesterolemi tablosu indüklenmiş ardından da sinbiyotik form 4 hafta boyunca uygulanarak kolesterol düşürücü etkinliği incelenmiştir. Ayrıca bu çalışmadaki sinbiyotik uygulamasının hepatositlerdeki lipid birikimini ve bağırsak mikrobiyota örüntüsündeki taksonomik öğeleri ne düzeyde etkilediği de gerçekleştirilen histolojik ve biyoinformatik analizler aracılığıyla değerlendirilmiştir.

Mevcut çalışmanın önemi hiperkolesterolemi tedavisinde ilk defa kullanılan sinbiyotik formun; biyoterapötik kapasitesinin belirlenmesidir. Bu çalışmadaki sinbiyotik formun hiperkolesterolemi tedavisinde alternatif tedavi metodu olarak kullanılmasının diğer önemli boyutu da yan etkiye sahip olmaması ve düşük maliyetidir. Bununla birlikte tüketimi herhangi bir sorun teşkil etmeyen probiyotik suş ile tatlandırıcı özellikteki d-tagatozun bir arada kullanımının kolesterol

düşürücü nitelikteki yeni nesil fonksiyonel besinlerin oluşturulmasına da katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

5.1. Vücut ağırlığı, yem tüketimi, yem etkinlik oranı ve karaciğer ağırlığına ilişkin bulguların değerlendirilmesi

Yüksek yağlı ve yüksek kolesterolü beslenme sonucu organizmaya alınan fazla miktardaki enerjiden dolayı adipoz doku miktarı artmakta ve bunun sonucunda genellikle obezite ve NAFLD gibi hastalıklar oluşmaktadır. Bu hastalıklarda yalnızca vücut ağırlığı ve adipoz doku kütlelerinde artış görülmemekte; insülin direnci ve düşük seviyeli kronik inflamasyon gibi birçok rahatsızlığın metabolik temelini oluşturan faktörler de ortaya çıkmaktadır (Wang ve ark., 2019). Literatürdeki çalışmalarda YYYYK tüketimi sonucu ortaya çıkan obezite, hiperlipidemi ve hiperkolesterolemi gibi tablolara ait metabolik parametrelerin; probiyotik, prebiyotik ya da sinbiyotik uygulamalarıyla tekrardan fizyolojik aralık düzeylerine döndürülebildiği belirtilmektedir (Behrouz ve ark., 2020; Hadi ve ark., 2020).

Çalışmanın yönteminde verilen yem içeriği tablosundan da anlaşılabileceği üzere; YYYYK yemin gram başına sahip olduğu enerji miktarı, d-tagatoz ilaveli YYYYK yeme kıyasla daha yüksektir. Bu yüzden çalışmanın son 4 haftasındaki deneysel periyot sürecinde PK grubu daha fazla enerji içeren yemlerle, PRE ve SİN grupları ise göreceli olarak daha az enerji içeren yemlerle beslenmiştir. Çalışma sonunda gruplar arasında ortaya çıkan ortalama vücut ağırlığı farkının, yemlerin gram başına sahip olduğu enerji miktarı arasındaki bu farklılıktan kaynaklandığı düşünülmüştür. Toplam tüketilen yem miktarı ($p=0.137$) (Tablo 4.3) ve karaciğer ağırlıkları ($p=0.077$) (Tablo 4.3) açısından ise gruplar arasında anlamlı farklılık olmadığı bulunmuştur. Öte yandan yem etkinlik oranının ise SİN grubunda PK ve NK grubundan önemli düzeyde daha fazla olduğu belirlenmiştir. Tüm bu sonuçlar göz önüne alındığında; probiyotik, prebiyotik ve sinbiyotik uygulamalarının karaciğer kütlelerinde ağırlık artışına ve yem tüketimini etkileyecek boyutta majör bir metabolik bozukluğa yol açmadığı saptanmıştır. Sinbiyotik uygulamasının olduğu grupta d-tagatozun kullanımının ise basit karbonhidrat kaynağı olarak sükrozun kullanıldığı NK ve PK gruplarına kıyasla yem etkinlik oranını anlamlı

şekilde düşürdüğü gözlemlenmiştir. Bu düşüşün ise d-tagatoz ve sükroz arasındaki gram başına sahip olduğu kalori farklılığından kaynaklandığı öngörülmüştür.

Choi ve ark. (2018), yüksek yağlı yem tüketen farelere probiyotik kaynağı olarak *Lacticaseibacillus casei* LS03 (LS) ve *Leuconostoc kimchi* GJ2 (GJ) suşlarını, prebiyotik kaynağı olarak ise bir nadir şeker türevi olan d-allülozu (AL) uygulamıştır. Aynı zamanda her bir probiyotik suş ile d-allülozun birlikte kullanıldığı sinbiyotik formları (LS - AL, GJ - AL, LS + GJ - AL) da gruplara ayrı ayrı uygulanmıştır. Çalışma sonucunda probiyotik uygulamalarının vücut ağırlığı, yem etkinlik oranı ve karaciğer ağırlığını çalışmanın başlangıcına kıyasla değiştirmedikleri saptanmıştır. Yüksek yağlı kontrol grubunun yem tüketiminin LS suşu grubuna kıyasla arttığı, GJ suşu grubuyla ise benzer değerlere sahip olduğu görülmüştür. Prebiyotik AL ve diğer sinbiyotik gruplarının tümünün yüksek yağlı kontrol grubuna göre vücut ağırlığı ve yem etkinlik oranlarını düşürdüğü ancak yem tüketimi ve karaciğer ağırlıklarını ise değiştirmedikleri belirlenmiştir (Choi ve ark., 2018). Çalışmamızda da bu çalışmanın sonuçlarıyla uyumlu bir biçimde sinbiyotik uygulamasının vücut ağırlığı ve yem etkinlik oranını düşürdüğü fakat karaciğer ağırlığını değiştirmedikleri bulunmuştur.

5.2. Biyokimyasal bulgulara ilişkin analizlerin değerlendirilmesi

Vücutta kolesterol metabolizmasının merkezinde karaciğer yer almaktadır. Fizyolojik koşullar altında; yüksek yağlı yemlerle uzun süreli beslenme sonucu karaciğerde lipit birikimi artmakta ve karaciğer fonksiyonlarını yansıtan bazı parametrelerde olumsuz değişiklikler ortaya çıkmaktadır (Nemes ve ark., 2016). Klinikte karaciğer rahatsızlıklarının teşhisinde çeşitli metabolik parametreleri içeren testlerden faydalanılmaktadır. Bu testlerden birisi de karaciğer fonksiyon testi (KFT) olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu test, klinisyenlere karaciğerde meydana gelen hasarlanmanın bölgesi ve boyutu hakkında bir ön değerlendirme yapma imkanı sunmaktadır (Lala ve ark., 2022). Mevcut çalışmada karaciğer fonksiyonlarının değerlendirilmesi amacıyla; KFT bileşenlerinden olan serum ALB, AST ve ALT gibi parametreler kullanılmıştır. Karaciğerde sentezlenen ve negatif akut faz reaktanlarından birisi olan serum ALB düzeyinin gruplar arası karşılaştırılmasında anlamlı bir farklılığa rastlanmamıştır ($p=0.198$) (Tablo 4.4).

Buradan yola çıkılarak; YYYYK yemle uzun bir süre (12 hafta boyunca) beslenmenin, karaciğerin protein sentez mekanizmasını etkileyen düzeyde majör bir metabolik bozukluğa yol açmadığı belirlenmiştir.

Al-Muzafar ve Amin (2017), MetS tablosuna sahip ratlara; probiyotik suş karışımı şeklindeki bir ürünü (*Lactobacillus acidophilus* 10×10^8 kob/gün; *Lactiplantibacillus plantarum* 9.8×10^7 kob/gün; *Bifidobacterium bifidum* 2×10^6 kob/gün) 1 g/kg dozunda, 4 hafta boyunca uygulamıştır. Çalışma sonucunda standart kontrol grubu, yüksek yağlı yem tüketen kontrol grubu ve yüksek yağlı yem + probiyotik uygulamasının olduğu müdahale grupları arasında serum ALB düzeyi açısından önemli bir fark bulunamamıştır (Al-Muzafar ve Amin, 2017). Osman ve ark. (2021) tarafından gerçekleştirilen çalışmada ise YYYYK yemlerle beslenen ratlara probiyotik *Lacticaseibacillus paracasei* ssp. *paracasei* DSM 2649 DSM suşundan elde edilen postbiyotik moleküller uygulanmıştır. Bu çalışma sonucunda da bizim çalışmamızla uyumlu şekilde; standart kontrol, YYYYK yem tüketen kontrol ve müdahale grupları arasında serum ALB düzeylerinin benzerlik gösterdiği saptanmıştır (Osman ve ark., 2021).

Yüksek yağlı yüksek kolesterolü yemlerle beslenen farelerle gerçekleştirilen bir çalışmada ise *Lactiplantibacillus plantarum* WCFS1 ve *Lacticaseibacillus rhamnosus* LA68 probiyotik suşları iki gruba ayrı ayrı uygulanmıştır. Çalışma sonunda mevcut çalışma sonuçlarıyla benzer bir şekilde; probiyotik, hiperkolesterolemik kontrol ya da standart kontrol grupları arasında serum ALT ve AST düzeyleri açısından anlamlı bir fark bulunmamıştır (Ivanovic ve ark., 2015). Li ve ark. (2022) ise hiperkolesterolemik farelere *Lactiplantibacillus plantarum* H6 adlı probiyotik suşu uygulamıştır. Bu çalışmada hiperkolesterolemik kontrol grubunun serum ALT ve AST düzeylerinin standart kontrol grubuna kıyasla daha yüksek olduğu ancak bu yüksekliğin istatistiksel anlamlılığa ulaşmadığı görülmüştür. Probiyotik grubunun ALT ve AST düzeylerinin ise hiperkolesterolemik kontrol grubundan önemli ölçüde daha düşük olduğu, hatta neredeyse standart kontrol grubu miktarlarına eşit olduğu belirlenmiştir (Li ve ark., 2022). Mevcut çalışma ile bu çalışma arasında probiyotik uygulamasına bağlı olarak görülen bu farklılığın; farklı probiyotik suşlar arasındaki kolesterol giderim yeteneklerinin değişkenlik göstermesi

nedeniyle ortaya çıktığı düşünülmektedir. Çünkü probiyotiklerin hipokolesterolemik etkileri suşlara bağımlı olarak farklılık sergileyebilmektedir.

Klinikte hiperkolesterolemi tanısının konulmasında kullanılan en önemli parametrelerin başında serum TK düzeyi gelmektedir. Serum TK düzeyi, serum LDL-K ile HDL-K düzeylerinin toplamından oluşmakta ve klinik değerlendirmelerde optimum düzeyinin <200 mg/dl olması gerektiği belirtilmektedir. Serum TK düzeyini büyük oranda belirleyen kolesterol parametresi ise insanlarda serum LDL-K seviyesidir. Çünkü dolaşımdaki kolesterolün büyük çoğunluğu LDL-K tarafından taşınmaktadır (Türkvatan Cansever, 2016). Ancak söz konusu bu durum mevcut çalışmada da kullanılan BALB/C türü farelerde insanlardan daha farklıdır. Çünkü bu farelerde dolaşımdaki kolesterolün ana taşıyıcısı insanlardakinin aksine HDL-K parametresidir. Dolayısıyla bu tür ile yapılan çalışmaların değerlendirilmesinde serum TK dışında dikkat edilmesi gereken ilk metabolik parametre; serum HDL-K düzeyi olmalıdır (Gordon ve ark., 2015).

Mevcut çalışmadaki gruplar serum lipit ve kolesterol parametreleri açısından kıyaslandığında; PK grubuna ait TK, HDL-K, LDL-K ve TG düzeylerinin NK grubuna kıyasla anlamlı ölçüde daha yüksek olduğu görülmüştür. Bu sonucun özellikle de PK grubunun lipit ve kolesterol parametrelerinde ortaya çıkması kritik bir öneme sahiptir. Çünkü mevcut çalışmadaki uygulamaların etkinlik düzeylerinin belirlenmesinde temel belirleyici; diğer bir ifadeyle hiperkolesterolemik kontrol grubu, PK grubudur.

Al-Sheraji ve ark. (2015), hiperkolesterolemik ratlara; yoğurt yapımında kullanılan ve starter kültür özelliğindeki *Streptococcus thermophilus* ve *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* suşlarına ilaveten *Bifidobacterium longum* BB 536 adlı probiyotik bakteriyi uygulamıştır. Probiyotik grubunun serum TK, LDL-K, VLDL-K ve TG düzeylerinin hiperkolesterolemik kontrol grubuna göre önemli oranda daha düşük olduğu saptanmıştır. Serum HDL-K düzeyinin ise probiyotik grubunda hiperkolesterolemik kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (Al-Sheraji ve ark., 2015). Mevcut çalışmada ise serum TK, LDL-K, VLDL-K ve TG düzeylerinin PRO

grubunda düşüş gösterdiği ancak bu düşüşün istatistiksel açıdan anlamlı olmadığı görülmüştür. İki çalışma arasında probiyotik uygulamasına bağlı olarak kolesterol parametreleri üzerindeki farklılığının kullanılan suş sayısından kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir. Çalışmamızda kullanılan suş sayısı (1 adet - *L. casei* ATCC 393), Al- Sheraji'nin çalışmasında kullanılan suş sayısından (3 adet - *Streptococcus thermophilus*; *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*; *Bifidobacterium longum* BB 536) daha azdır. Bu sayede probiyotik suş sayısı daha fazla olan çalışmadaki hipokolesterolemik etkinin sinerjistik bir biçimde artmış olabileceği öngörülmüştür.

Lye ve ark. (2017) hiperkolesterolemik farelere; *Limosilactobacillus fermentum* FTDC 8312 ve *Limosilactobacillus fermentum* JCM 1173 adlı probiyotik suşları farklı gruplara ayrı ayrı olarak uygulamıştır. Çalışmada *Limosilactobacillus fermentum* FTDC 8312 suşunun uygulandığı müdahale grubunun serum TK ve LDL-K düzeylerinin hiperkolesterolemik kontrol grubuna göre önemli oranda daha düşük, HDL-K düzeyinin de anlamlı düzeyde daha yüksek olduğu bulunmuştur. İki grup arasındaki serum TG düzeylerinin ise benzerlik gösterdiği saptanmıştır. Aynı parametrelere ait kıyaslamalar *Limosilactobacillus fermentum* JCM 1173 suşunun uygulandığı müdahale grubu ile hiperkolesterolemik kontrol grubu arasında da yapılmış ve herhangi bir parametre bakımından anlamlı bir farklılığa rastlanmamıştır (Lye ve ark., 2017). Hiperkolesterolemik kontrol grubuyla kıyaslandığında *L. fermentum* FTDC 8312 suşu uygulamasının mevcut çalışmadaki *L. casei* ATCC 393 suşu uygulamasından farklı olarak; serum TK ve LDL-K düzeylerini anlamlı şekilde düşürdüğü, HDL-K düzeyini ise önemli miktarda artırdığı belirlenmiştir. Öte yandan söz konusu bu iki çalışmada da probiyotik suş uygulamalarının hiperkolesterolemik kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında; serum TG düzeylerinde önemli bir farklılık oluşturmadığı ve çalışmaların bu açıdan benzerlik taşıdığı görülmüştür.

Bu çalışmadaki probiyotik suş uygulamasının serum lipit ve kolesterol parametreleri üzerine etkisi ile çalışmamızdaki probiyotik suş uygulamasının etkisinin benzer doğrultuda fakat aynı anlamlılık düzeyinde olmadığı belirlenmiştir. Parametreler üzerindeki etki düzeylerinin iki çalışma arasında farklılık göstermesinin altında yatan sebebin probiyotik bakterilerin kolesterol

düşürücü etkilerinin farklı metabolik mekanizmalar aracılığıyla ortaya çıkması olarak yorumlanmıştır. Lye ve ark. (2017), *L. fermentum* FTDC 8312 suşunun hipokolesterolemik etkilerinin daha çok sahip olduğu BSH enzim aktivitesi ve ortamda serbest halde bulunan kolesterolü hücre membranına bağlama kapasitesi sayesinde ortaya çıktığını belirtmiştir. Oysa çalışmamızda kullanılan *L.casei* ATCC 393 suşunun kolesterol düşürücü etkisinin kaynağının ise ortamda bulunan kolesterolün katabolik faaliyetler sonucu koprostanole dönüştürülmesi ve akabinde bu koprostanol moleküllerinin feçes aracılığıyla atılmasıdır (Lye ve ark., 2010b).

Keleszade ve ark. (2022), bir RKÇ’de hiperkolesterolemik bireylere *Lactiplantibacillus plantarum* ECGC 13110402 adlı probiyotik suşunu 4×10^9 kob/gün dozunda 6 hafta boyunca uygulamıştır. Çalışma sonucunda müdahale grubunun serum TK ve LDL-K düzeylerinin, plasebo grubuna göre hem 3. hem de 6. haftada önemli miktarda daha düşük olduğu bulunmuştur. Altıncı haftadaki müdahale grubu serum HDL-K düzeyinin ise plasebo grubuna göre önemli oranda daha düşük olduğu görülmüştür (Keleszade ve ark, 2022).

Her iki çalışmada da probiyotik uygulaması sonucu serum TK ve LDL-K miktarlarında düşüş görüldüğü ancak bu düşüşün yalnızca *L. plantarum* ECGC 13110402 suşunda istatistiksel anlamlılığa eriştiği saptanmıştır. Keleszade ve ark. (2022), *L. plantarum* ECGC 13110402 suşunun güçlü bir BSH enzim aktivitesine sahip olduğunu ve hipokolesterolemik etkilerini bu sayede ortaya çıkardığını belirtmişlerdir. In vitro bir çalışmada ise *L.casei* ATCC 393 suşunun düşük BSH enzim aktivitesine sahip olduğu gösterilmiştir (Lye ve ark., 2010a). Suşların sahip olduğu BSH enzim aktivitesi düzeyine bağlı olarak kolesterol düşürücü etkilerinin de değiştiği bilinmektedir. Bu iki suş arasındaki hipokolesterolemik etki farklılığının ise BSH enzim aktivitesi düzeylerinin eşit olmamasından kaynaklandığı düşünülmüştür.

Yüksek yağlı diyetle beslenmenin karaciğerin sentez mekanizması ve fonksiyonel kapasitesi üzerinde olumsuz etkileri bulunmaktadır. Karaciğerde ortaya çıkan dejeneratif değişiklikler, glikoz homeostazında görevli serum glikoz ve insülin düzeyi gibi parametrelerin değişiminde de direkt olarak rol oynayabilmektedir.

Bununla birlikte yüksek yağlı diyet, bağırsak mikrobiyotasında disbiyozis tablosu oluşumuna yol açmakta ve bu durumda artış gösteren patojen mikroorganizmalardan endotoksinler ve LPS gibi toksik moleküller salgılanmaktadır. Bu moleküller, intestinal bariyer sisteminin seçici geçirgen özelliğini olumsuz yönde etkilemekte ve bozulan intestinal bariyer sistemi sonucu inflamasyon tablosu tetiklenmektedir. İnflamasyonda düzeyi artan proinflamatuvar sitokinler, insülin direnci oluşumuna zemin hazırlamaktadır. Probiyotik uygulaması ise yüksek yağlı diyetle beslenmenin glisemik kontrol üzerindeki olumsuz etkilerini serum glikoz ve insülin düzeylerini düzenleyerek hafifletebilmekte ya da ortadan kaldırılabilmektedir (Pintaric ve Langerholc, 2022).

Li ve ark. (2019), yüksek yağlı yemle beslenen farelere probiyotik *Limosilactobacillus reuteri* FN041 suşunu uygulamıştır. Çalışma sonucunda, standart kontrol grubu, yüksek yağlı yem tüketen kontrol grubu ve yüksek yağlı yem + probiyotik grubu arasında serum glikoz düzeyleri açısından önemli bir farka rastlanmamıştır (Li ve ark., 2019). Bu araştırma ile çalışma sonuçlarımız arasında, probiyotik uygulaması sonucu serum glikoz düzeylerinde oluşan etki bakımından benzerlik bulunmuştur. İki çalışmada da probiyotik grubunun serum glikoz düzeylerinin yüksek yağlı yem grubu miktarından daha düşük değerlere sahip olduğu ancak bu düşüklüğün istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptanmıştır. Li ve ark. (2019), bu çalışmada 7 haftalık yüksek yağlı diyetle beslenmenin insülin direncinin oluşumu için kısıtlı bir süre olduğunu ve bu sürenin fareleri ancak insülin direncinin erken safhalarına ulaştırabildiğini belirtmişlerdir.

Molina-Tijeras ve ark. (2021), yüksek yağlı yemle besledikleri farelere probiyotik *Limosilactobacillus fermentum* CECT5716 suşunu günlük 5×10^8 kob dozunda uygulamışlardır. Çalışma sonucunda yüksek yağlı yem grubunun serum glikoz düzeyinin standart kontrol grubuna kıyasla önemli oranda daha yüksek olduğu saptanmıştır. Probiyotik grubunun serum glikoz düzeyi ise yüksek yağlı yem grubu miktarına göre anlamlı oranda daha az bulunmuştur (Molina-Tijeras ve ark., 2021). İki çalışma arasında; probiyotik uygulaması sonucu serum glikoz düzeyleri üzerinde oluşan bu farklılığın; probiyotik suşların uygulama süresine bağlı olarak ortaya çıktığı düşünülmektedir. Çünkü bu çalışmadaki *Limosilactobacillus*

fermentum CECT5716 suşu 11; çalışmamızdaki *L.casei* ATCC 393 suşu ise farelere 4 hafta boyunca uygulanmıştır.

İn vivo başka bir çalışmada ise YYYYK yemle beslenen farelere; günde bir kez 1×10^9 kob dozunda probiyotik *Enterococcus faecium* GEFA01 suşu uygulanmıştır. Çalışma sonucunda; standart kontrol grubu ile YYYYK yem grubu arasında serum insülin düzeyleri bakımından önemli bir fark bulunmamıştır. Ancak probiyotik grubunun serum insülin düzeyinin bu iki grup değerinden de önemli miktarda daha düşük olduğu bulunmuştur (Xu ve ark., 2022a). Zhao ve ark. (2022) ise MetS tablosuna sahip ratlara *Lactiplantibacillus plantarum* S9 adlı probiyotik suşu günde bir kez 1×10^9 kob dozunda uygulamıştır. Bu çalışmada yüksek yağlı yem grubunda; homeostatik model değerlendirmesi (HOMA-IR) testine göre insülin direncinin olduğu saptanmış ve bu grubun serum insülin düzeyinin standart yem grubundan anlamlı seviyede daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Probiyotik grubunun serum insülin düzeyinin ise yüksek yağlı yem grubu miktarından daha düşük olduğu gözlemlenmiştir (Zhao ve ark., 2022). Bu iki çalışma ile mevcut çalışma arasında; probiyotik uygulaması sonucu serum insülin düzeylerinde görülen anlamlı düşüşler açısından farklılık bulunmaktadır. Serum insülin düzeylerinde ortaya çıkan bu farklı sonuçların ise probiyotiklerin uygulanma süresiyle ilişkili olduğu düşünülmektedir. Çünkü mevcut çalışmadaki probiyotik suşun uygulama süresinin; Zhao ve meslektaşları (2022) ile Xu ve meslektaşları (2022) tarafından yürütülen çalışmalarda ise bu sürenin sırasıyla 6 ve 8 hafta olduğu görülmüştür.

Probiyotik tüketimi sonucu, metabolik faydaların görüldüğü klinik tabloların başında hiperkolesterolemi gelmektedir. Ancak klinikte probiyotik bakterilerin kolesterol düşürücü amaçla kullanılabilmesi için yalnızca çeşitli lipit ve kolesterol parametrelerini olumlu şekilde değiştirmesi yeterli kabul edilmemektedir. Aynı zamanda bu bakterilerin antimikrobiyal etkiye sahip olması ve tüketimi sonucu konak canlıda antibiyotik direnci oluşturmaması gerekmektedir. Probiyotik bakterilerin taksonomik açıdan çok çeşitli cinslerin yapısında bulunduğu saptanmış; ancak daha çok *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* cinslerine ait türlerde bu özellikteki bakterilerin yer aldığı belirlenmiştir (Abdi ve ark., 2022; Jia ve ark., 2023).

İnsanlarda bulunan GİS sistemine ait fizyolojik koşulların in vitro olarak oluşturulduğu bir çalışmada *Lactobacillus acidophilus* ATCC 314, *Lactobacillus acidophilus* FTCC 0291, *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* FTCC 0411, *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* FTDC 1311 ve *Lacticaseibacillus casei* ATCC 393 suşlarının kolesterol giderim yetenekleri incelenmiştir. Söz konusu *Lacticaseibacillus casei* ATCC 393 suşunun kolesterolü asimile etme, ortamdaki kolesterolü bakterinin hücre yüzeyine bağlama ve BSH enzim aktivitesi gibi özellikler aracılığıyla hipokolesterolemik etki gösterdiği bulunmuştur (Lye ve ark., 2010a). Başka bir in vitro çalışmada ise *Lacticaseibacillus casei* ATCC 393 suşunun ortamda bulunan kolesterolü; yapısında bulunan kolesterol redüktaz enzimi vasıtasıyla katabolize ederek intestinal sistemde daha az çözünürlüğe ve emilime sahip olan koprostanole dönüştürdüğü saptanmıştır. İntestinal lümende emilimi düşük olan bu koprostanol moleküllerinin feçes aracılığıyla atıldığı ve bu sayede *L.casei* ATCC 393 suşunun kolesterol düşürücü etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (Lye ve ark., 2010b).

Sidira ve ark. (2010) tarafından yürütülen ve in vitro ile in vivo deney aşamalarına sahip iki aşamalı bir çalışmanın in vitro kısmında; *L. casei* ATCC 393 suşunun gastrik ve pankreatik sıvılar gibi GİS stres faktörlerine olan dayanıklılığı ölçülmüştür. Çalışmanın in vivo kısmında ise dokuz gün boyunca ratlara günde bir kez 1×10^9 kob dozunda *L. casei* ATCC 393 suşu uygulanmıştır. İn vitro testler sonucu; insan gastrik ve pankreatik sıvılarının pH seviyesi bakımından simüle edildiği ortamlara ilave edilen suşun 0., 180. ve 240. dakikalarda gerçekleştirilen canlılık düzeylerine ait ölçüm sonuçlarının birbirine yakın düzeylerde olduğu bulunmuştur. Özetle *L. casei* ATCC 393 suşunun gastrik ve pankreatik sıvılara karşı dayanıklı olduğu gösterilmiştir. İn vivo aşamasında ise ratlardan probiyotik suş uygulamasının son gününde feçes örnekleri alınmış ve bu örneklerin 12 saat sonra gerçekleştirilen analizinde *L. casei* ATCC 393 suşunun 10^6 kob/g düzeyinde bulunduğu saptanmıştır. Feçes örneklerinde görülen karakteristik patojenik mikroorganizmalardan olan *Staphylococcus*, *Enterobacter*, *Coliform* ve *Streptococcus* cinsi bakterilerin sayısında ise *L. casei* ATCC 393 suşu kullanımına bağlı olarak önemli düşüşler olduğu saptanmıştır (Sidira ve ark., 2010).

Majeed ve ark. (2019) tarafından yürütülen diğer bir in vitro çalışmada probiyotik özellikteki iki suş olan *Bacillus coagulans* MTCC 5856 ile *Lactocaseibacillus casei* ATCC 393 suşu kolesterol düşürücü etkileri bakımından kıyaslanmıştır. Çalışmada *Lactocaseibacillus casei* ATCC 393 suşunun BSH enzim aktivisine sahip olduğu gösterilmiştir. Ayrıca söz konusu bakterinin gelişimi esnasında ortamda bulunan kolesterolü hücre membranına alarak hipokolesterolemik etki oluşturduğu da belirlenmiştir (Majeed ve ark., 2019).

El Helim ve ark. (2016) hiperkolesterolemik farelerle gerçekleştirdikleri bir çalışmada ise *L. casei* ATCC 393 suş uygulamasının hiperkolesterolemik kontrol grubuna göre ortalama serum TK düzeyini anlamlı şekilde düşürdüğünü tespit etmiştir (El Helim ve ark., 2016).

Prebiyotiklerin kolesterol metabolizmasına ait parametreleri çeşitli mekanizmalar aracılığıyla olumlu yönde etkilediği ve in vivo çalışmalarda hipokolesterolemik etki oluşturduğu bilinmektedir. Prebiyotiklerin tüketimi sonucu üst GİS organlarında viskozite artışı görülmekte ve bu sayede lipitlerin, kolesterolün ve safra asitlerinin emilimi azalmaktadır. Emilimi azalan bu bileşenlerin feçesle atımında ise artış görülmektedir. Tüm bu metabolik süreçler sonucu ise serum TK, LDL-K ve TG gibi lipit ve kolesterol parametrelerinde düşüş gözlemlenmektedir (Mohanty ve ark., 2018).

İn vivo bir çalışmada ratların beslenmesinde kullanılan ve standart yem örüntüsündeki lif kaynağı olan selülozu çıkarılıp yerine soya sütünün fermente edilmesiyle elde edilen ve oligosakkarit içeriği yüksek prebiyotik bir ticari ürün eklenmiştir. Ardından elde edilen bu yeme, yüksek miktarda kolesterol de ilave ederek ratları standart ve modifiye yemlerle ayrı ayrı gruplarda beslenmiştir. Bu çalışma ile mevcut çalışma deney hayvanlarına prebiyotik kaynağının uygulanma şekli ve süresi (4 hafta) açısından benzerlik göstermektedir. Her iki çalışmada da hayvanlara prebiyotik ürün orogastrik olarak değil de yeme ilave edilerek verilmiş bu sayede prebiyotiğin daha yüksek miktarda uygulanması amaçlanmıştır. Ayrıca prebiyotik tüketiminden kaynaklı metabolik etkilerin güçlendirilmesi de hedeflenmiştir. Çalışma sonundaki analizlerde mevcut çalışma sonuçlarıyla

uyumlu bir biçimde; serum ALB düzeyinin gruplar arasında benzerlik gösterdiği bulunmuştur (Villanueva-Suárez ve ark., 2016).

Miralles-Pérez ve ark. (2022) ratları standart yem, yüksek yağlı yem ve yüksek yağ + inülin içeren yemlerle üç ayrı grupta beslemiştir. Yüksek yağlı yem ya da yüksek yağlı yem + inülin içeren yemle beslenen ratların serum TK, TG, HDL-K, LDL-K gibi bazı lipit ve kolesterol metabolizmasına ait parametrelerinin önemli düzeylerde değiştiği ancak serum ALT ve AST düzeylerinin anlamlı düzeyde değişmediği saptanmıştır (Miralles-Pérez ve ark., 2022). Lipit ve kolesterol metabolizmasına ait TK, HDL-K, LDL-K ve TG gibi bazı parametrelerde değişim yaşanması için bu çalışmada olduğu gibi 10 hafta ya da mevcut çalışmada olduğu gibi 12 hafta boyunca yüksek yağlı yemle beslenme yeterli olabilmektedir. Ancak bu çalışmalarda olduğu gibi uzun bir süre boyunca yüksek yağlı beslenmenin bile karaciğerin fonksiyonel kapasitesini yansıtan serum ALT ($p=0.230$) (Tablo 4.4) ve AST ($p=0.218$) (Tablo 4.4) düzeylerini değiştirmedeği saptanmıştır.

Hafif hiperkolesterolemik bireylerle yapılan bir RKÇ’de, plasebo ve müdahale grubundaki bireylere, 80 g şeklindeki test ürünleri 45 gün boyunca tüketirilmiştir. Plasebo grubuna test ürünü olarak pirinç lapası, müdahale grubuna ise prebiyotik yulaf lapası uygulanmıştır. Çalışma sonunda plasebo ve müdahale grubundaki bireylerin serum ALT ve AST düzeyleri karşılaştırılmış ve iki grup arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır (Xu ve ark., 2022b). Bu çalışmadaki prebiyotik uygulama süresi (>6 hafta) mevcut çalışmadan daha fazla olmasına rağmen, serum ALT ve AST düzeylerinin anlamlı düzeyde değişmediği görülmüştür.

Hashmi ve ark. (2016) ratları; standart yem, YYYYK yem (hiperkolesterolemik kontrol), YYYYK yem + GOS (110 mg/250 g v.a.), YYYYK yem + GOS (154 mg/250 g v.a.), YYYYK yem + GOS (198.4 mg/250 g v.a.) ve YYYYK + inülin (154 mg/250 g v.a.) içeren yemlerle altı ayrı grupta beslemiştir. Çalışma sonucunda hem inülin uygulamasının olduğu grupta hem de GOS uygulanan üç grupta; serum TK, LDL-K, VLDL-K ve TG düzeylerinin hiperkolesterolemik kontrol grubuna göre anlamlı ölçüde daha düşük olduğu bulunmuştur. İnülin uygulanan grubun lipit ve kolesterol parametrelerine ait istatistiksel anlamlılık düzeyinin GOS uygulanan gruplardan daha fazla olduğu görülmüştür. Galaktooligosakkarit

gruplarında, prebiyotik miktarındaki artış ile parametrelerde görülen düşüş arasında pozitif bir korelasyon olduğu saptanmıştır. Serum HDL-K düzeylerinin ise inülin ve GOS uygulanan gruplarının tümünde hiperkolesterolemik kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Prebiyotik kaynağı olarak GOS kullanılan grupların serum HDL-K düzeylerinde gözlemlenen artış ile GOS dozları arasında doğru orantı olduğu bulunmuştur (Hashmi ve ark., 2016).

Hafif şişman ve hiperkolesterolemik bireylerle gerçekleştirilen bir RKÇ’de, katılımcılar iki ayrı gruba bölünmüş ve 2 ay boyunca rutin beslenme alışkanlıkları değiştirilmeden diyet örüntüsü olarak NCEP – ATPIII kılavuzu doğrultusunda (%50-60 karbonhidrat, %15 protein, %25-35 yağ, <%7 doymuş yağ, ≤200 mg kolesterol, 20-35 g diyet posası, 2000 mg/gün sodyum) hazırlanan beslenme programını uygulamışlardır. Aynı zamanda müdahale ve plasebo grubundaki katılımcılara 2 ay süren bu diyet uygulamasına ek olarak günde iki kez prebiyotik bir karışım ya da plasebo bir ürün verilmiştir. Çalışma sonunda müdahale grubunun serum TK ve LDL-K düzeylerinin plasebo grubuna kıyasla önemli oranda azaldığı; serum HDL-K, VLDL-K ve TG düzeylerinin ise anlamlı değişim göstermediği bulunmuştur (Vázquez-Manjarrez ve ark., 2021).

Xie ve ark. (2022), YYYYK yem tüketen farelere prebiyotik kaynağı olarak sırasıyla 1.25 mg/kg/v.a. (düşük doz), 2.50 mg/kg/v.a. (orta doz) ve 5.00 mg/kg/v.a. (yüksek doz) miktarındaki sarımsak polisakkaritini 6 hafta boyunca uygulamıştır. Çalışma sonucunda yalnızca yüksek doz prebiyotik uygulamasının olduğu grubun serum lipit ve kolesterol parametreleri üzerinde etkili olduğu anlaşılmıştır. Yüksek doz prebiyotik uygulanan gruba ait serum parametreleri ile hiperkolesterolemik kontrol grubu parametreleri karşılaştırıldığında; TK ve TG düzeylerinin birbirine yakın değerlere sahip olduğu, LDL-K ve HDL-K düzeylerinin ise istatistiksel anlamda hiperkolesterolemik kontrol grubundan daha düşük olduğu görülmüştür (Xie ve ark., 2022).

Yukarıda bahsi geçen çalışmalar ile mevcut çalışmanın serum lipit ve kolesterol parametreleri kıyaslandığında farklı sonuçlar elde edildiği görülmüştür. Bu durumun sebebi ise prebiyotiklerin hipokolesterolemik etki göstermesinde etkili olan KZYA bileşenleri miktarının kullanılan prebiyotiğin türüne, uygulama

sıklığına, uygulama süresine ve uygulama dozuna bağlı olarak farklılık göstermesidir. Prebiyotiklerin yemin içine modifiye edilmesi ya da orogastrik olarak uygulanması bile uygulanan prebiyotik miktarını etkileyebilmektedir. Deney hayvanlarının mide hacimleri göz önüne alındığında; orogastrik olarak verilen prebiyotik miktarı, yemin içine ilave edilen prebiyotik miktarına göre oldukça düşük kalmaktadır. Tüm bu etkenler bir arada değerlendirildiğinde, prebiyotiklerin hipokolesterolemik etkilerinin çalışmalar arasında gösterdiği değişimler daha net anlaşılmaktadır.

Ghosh ve ark. (2020) bir çalışmalarında, YYYYK yemlerle besleyerek hiperkolesterolemi ve glikoz intolerans tablosu oluşturdıkları fareleri üç ayrı gruba ayırmıştır. Bu farelere sırasıyla standart yem, YYYYK yem (hiperkolesterolemik kontrol grubu) ve YYYYK + %5 GOS ilave edilmiş (prebiyotik grubu) yemler tüketirilmiş ve gruplar arasındaki serum glikoz düzeyleri karşılaştırılmıştır. Prebiyotik grubunun hiperkolesterolemik kontrol grubuna kıyasla, serum glikoz düzeylerinin önemli oranda daha düşük olduğu saptanmıştır. Bununla birlikte standart kontrol grubuyla prebiyotik grubunun serum glikoz düzeylerinde arasında anlamlı bir fark olmadığı tespit edilmiştir (Ghosh ve ark., 2020). Bu çalışma ile mevcut çalışma arasında, prebiyotik tüketimi sonucu görülen glisemik kontrol tablosu parametrelerinin olumlu değişimi açısından uyumluluk olduğu görülmüştür. Çünkü iki çalışmada da YYYYK yem tüketimi sonucu ortaya çıkan glikoz intoleransı belirtileri, prebiyotik tüketimiyle ortadan kalkmıştır.

Yüksek yağlı yüksek kolesterolü yemlerle 12 hafta boyunca beslenerek MetS tablosu oluşturulan fareler; standart kontrol grubu, MetS kontrol grubu ve YYYYK + %5 inülin ilave edilmiş yemle beslenen prebiyotik grubu şeklinde farklı gruplara ayrılmıştır. Çalışma sonunda MetS kontrol grubunun plazma insülin düzeyinin standart kontrol grubu düzeyinden daha yüksek olduğu fakat bu yüksekliğin istatistiksel anlamlılığa sahip olmadığı bulunmuştur. Öte yandan prebiyotik grubunun serum insülin düzeyinin ise her iki kontrol grubu miktarından da önemli seviyede daha düşük olduğu tespit edilmiştir (Tan ve ark., 2018). Bu çalışma ile mevcut çalışma arasında, prebiyotik grubundaki serum insülin

düzeyinin standart yem örüntüsüyle beslenen gruptaki düzeyden daha düşük olması açısından benzerlik olduğu görülmüştür.

Literatür taraması sonucu, d-tagatozun metabolizma üzerine etkilerinin detaylı olarak araştırıldığı ilk çalışmaların glisemik kontrol üzerine olduğu görülmektedir. Ardından d-tagatozun sahip olduğu çok düşük miktardaki enerji değerinin obezite karşıtı etkinlik gösterme potansiyelinin olduğu da keşfedilmiştir. Tüm bu sebeplerden dolayı d-tagatoz ile gerçekleştirilen in vivo çalışmalar belirli bir süre antidiyabetik ve obezite karşıtı etkiler üzerine yoğunlaşmıştır (Patra ve ark., 2009). Ancak Police ve ark. (2009) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, d-tagatozun lipit ve kolesterol parametreleri üzerinde de etkili olabileceğine dair ilk kapsamlı veriler elde edilmiştir. Yüksek yağlı diyet tüketmeden hiperkolesterolemi tablosunun oluşturulabildiği LDLr^{-/-} fareleriyle yürütülen bu araştırmada; fareler iki ayrı gruba ayrılmış ve bir grubun yeminde birincil karbonhidrat kaynağı olarak sükroz; diğer grubun yeminde ise aynı miktarda d-tagatoz kullanılmıştır. Bu çalışma sonucunda d-tagatoz grubunun serum TK, LDL-K, TG ve VLDL-K düzeylerinin, sükroz grubuna kıyasla önemli miktarda daha düşük olduğu bulunmuştur. Ancak iki grup arasındaki serum HDL-K düzeylerinin ise benzerlik gösterdiği saptanmıştır (Police ve ark., 2009). Bizim çalışmamızda ise d-tagatoz eklenen yemle beslenen grubun serum TK, VLDL-K ve LDL-K düzeylerinin PK grubuna kıyasla bir miktar daha düşük olduğu ancak bu düşüklüğün istatistiksel bir anlamlılık içermediği tespit edilmiştir. Bu iki çalışmaya ait kolesterol parametrelerinin, prebiyotik uygulamalarından farklı şekilde etkilendiği gözlemlenmiştir. Bu etkinin altında yatan sebebin ise d-tagatoz ilave edilen yemlerin uygulama süresi ve yem örüntüleri arasındaki farklılık olduğu düşünülmektedir. Nitekim Police ve arkadaşlarının çalışmasında, d-tagatoz ilave edilen yemler 16 hafta; mevcut çalışmada ise d-tagatoz ilave edilen yemler 4 hafta boyunca tüketilmiştir. Ayrıca bu çalışmada d-tagatoz ilave edilen yemdeki d-tagatoz oranı yemin kütleye %29' u iken; bizim çalışmamızda d-tagatoz %17 oranında eklenmiştir.

Donner ve ark. (2010), toplam 12 ay boyunca rutin beslenme alışkanlıklarını ve fiziksel aktivite düzeylerini değiştirmeyen T2DM hastalarıyla gerçekleştirdikleri pilot bir çalışmada, bireylerin günde 3 defa 15 g d-tagatoz tüketmesini sağlamıştır.

Bu çalışmanın sonunda bireylerin vücut ağırlığının başlangıca göre önemli oranda azaldığı (109 ± 14.7 kg- 105.3 ± 14.4 kg; $p=0.01$) görülmüştür. Öte yandan bireylerin serum lipit ve kolesterol parametrelerinden olan TK, LDL-K ve TG düzeylerinde ise önemli bir farklılığa rastlanmamıştır. Ancak serum HDL-K düzeylerinin çalışma sonunda başlangıca kıyasla anlamlı seviyede yükseldiği belirlenmiştir (41.7 ± 12.1 mg/dl vs 30.5 ± 15.8 mg/dl; $p<0.001$). Ancak araştırmacılar d-tagatoz kullanımı sonucu HDL-K düzeyleri üzerinde ortaya çıkan bu etkinin; ortalama vücut ağırlık kaybı ile ilişkili olabileceğini belirtmiştir (Donner ve ark., 2010).

ApoE^{-/-} tipi farelerle gerçekleştirilen bir çalışmada müdahale grubu birincil karbonhidrat kaynağı olarak %34 oranında d-tagatoz içeren YYYYK yemle, kontrol grubu ise birincil karbonhidrat kaynağı olarak %34 oranında sükroz içeren YYYYK yemle 8 hafta boyunca beslenmiştir. Çalışma sonunda müdahale grubunun serum TK ve VLDL-K düzeylerinin kontrol grubundan önemli düzeyde daha düşük olduğu bulunmuştur. Öte yandan serum HDL-K düzeyinin ise müdahale grubunda kontrol grubuna kıyasla daha fazla olduğu belirlenmiştir. Müdahale grubundaki serum LDL-K ve TG düzeylerinin ise kontrol grubuna göre daha düşük olduğu ancak bu düşüklüğün istatistiksel anlamlılık taşımadığı görülmüştür (Metts ve ark., 2013). Bu çalışmada d-tagatoz içeren yemle beslenen gruba ait serum TK ve VLDL-K düzeylerinin; mevcut çalışmada yer alan benzer özellikteki gruba ait düzeylerden önemli ölçüde daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Bu parametreler açısından ortaya çıkan farklılığın altında yatan muhtemel sebep ise yemlerde kullanılan d-tagatoz içeriğinin ve farelerin bu yemlerle olan beslenme süresinin aynı olmamasıdır. Nitekim bu çalışmadaki yemlerin d-tagatoz içeriğinin ve bu yemlerle olan beslenme süresinin; mevcut çalışmadaki aynı değerlerin tam iki katı olduğu saptanmıştır.

Williams ve ark. (2015), ApoE^{-/-} tipi farelerle gerçekleştirdikleri bir çalışmada, tıpkı Metts ve meslektaşlarının (2013) çalışmasında olduğu gibi yüksek kolesterollü yem örüntüsünde %34 oranında bulunan ve birincil karbonhidrat kaynağı görevi üstlenen sükrozu çıkararak yerine aynı miktarda d-tagatoz eklemiştir. Ardından bu yem, farelerin beslenmesinde 8 hafta boyunca kullanılmıştır. Çalışma sonunda d-tagatoz ilaveli yemle beslenen grubun

(prebiyotik grubu) serum TK ve TG düzeylerinin, hiperkolesterolemik kontrol grubu düzeylerinden anlamlı ölçüde daha düşük olduğu görülmüştür (Williams ve ark., 2015). Bu çalışmada da d-tagatoz ilaveli yemin farelere uygulanma süresi ve yeme eklenen d-tagatoz miktarının mevcut çalışmadaki değerlerden iki kat fazla olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak yemle birlikte bir prebiyotik kaynağı olarak daha fazla oranda ve sürede d-tagatoz tüketiminin serum kolesterol parametreleri üzerinde daha etkili ve anlamlı sonuçlar ortaya çıkardığı görülmüştür.

Yadav ve ark. (2018), hiperkolesterolemik zebra balıklarıyla yürüttükleri in vivo bir çalışmalarında, d-tagatoz ve fruktoz gibi farklı ketoheksozların serum lipit ve kolesterol parametreleri üzerindeki etkilerini belirlemeyi amaçlamışlardır. Bu kapsamda zebra balıkları; standart kontrol grubu (SK), birincil karbonhidrat kaynağı olarak sükroz ve yüksek miktarda kolesterol içeren kontrol grubu (YK), birincil karbonhidrat kaynağı olarak %50 sükroz + %50 fruktoz içeren yüksek kolesterol-yüksek fruktoz (YKYF) grubu ve birincil karbonhidrat kaynağı olarak %50 sükroz + %50 d-tagatoz içeren yüksek kolesterol-yüksek d-tagatoz (YKYT) grubu şeklinde 4 farklı gruba ayrılmış ve zebra balıklarının bu diyet örüntülerine sahip yemlerle 3 hafta boyunca beslenmeleri sağlanmıştır. Çalışma sonunda ilginç bir şekilde, YKYF grubunun serum TK düzeyinin YK grubu düzeyinden %15 daha düşük bulunmuştur. Serum TK düzeyi açısından YKYT grubu ile YK grubu arasında ise anlamlı bir farklılık olmadığı görülmüştür. Araştırmacılar, YKYF grubu ile YK grubu arasında serum TK düzeyi açısından görülen bu ilginç farklılığın sebebinin hepatik dokularda görülen şiddetli inflamasyon tablosu ve vücut ağırlıklarında görülen önemli boyuttaki düşüşlerden kaynaklandığını ileri sürmüştür.

Yüksek kolesterol içeren yeme %50 gibi yüksek oranda eklenen fruktozun YKYF grubunda ciddi hepatosteatoza sebep olduğu karaciğerlerde yapılan histolojik analiz sonucu ispatlanmıştır. Söz konusu ciddi hepatosteatoz tablosu, YKYF grubunun vücut ağırlıklarında dramatik boyutlarda düşüşlere yol açmıştır. Öyle ki YKYF grubunun diyet örüntüsü daha fazla miktarda enerji içermesine rağmen; ortalama vücut ağırlığı SK grubundan bile daha düşük bulunmuştur. Serum TK düzeylerindeki bu ilginç düşüşün ise YKYF grubunda görülen önemli boyuttaki vücut ağırlığı kayıplarından kaynaklandığı öngörülmüştür. Aynı çalışmada

grupların serum TG düzeyleri karşılaştırıldığında; YK grubu düzeyinin, YKYF grubundan %14 oranında daha düşük, YKYT grubundan ise %30 oranında daha yüksek olduğu saptanmıştır. Böylece bu çalışma ile mevcut çalışma arasında d-tagatoz ilave edilen yemlerle beslenen grubun serum TG düzeylerinin yüksek kolesterolü yemle beslenen kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede düşüklük göstermesi açısından benzerlik saptanmıştır (Yadav ve ark., 2018).

D-tagatoz ile birlikte D-allüloz ve D-sorboz adlı iki nadir şekerin daha lipit ve kolesterol metabolizması üzerine etkilerinin araştırıldığı in vivo bir çalışmada, ratlar 4 hafta boyunca çeşitli yemlerle beslenmiştir. Bu çalışmada ratlar 5 ayrı gruba ayrılmış ve tüm gruplara standart diyet örüntüsüne sahip yemler verilmiştir. Ancak kontrol grubu dışındaki diğer dört grubun yemlerine standart diyet örüntüsüne ek olarak yemin kütlece ağırlığının %3' ü oranında d-fruktoz, d-allüloz, d-tagatoz ve d-sorboz eklenmiş ve böylece farklı ketoheksozları içeren dört ayrı grup elde edilmiştir. Çalışma sonucunda yem içeriğinde d-tagatoz, d-allüloz ve d-sorboz gibi nadir şekerleri içeren grupların serum TK ve TG düzeylerinin d-fruktoz grubu düzeyleriyle benzer olduğu bulunmuştur (Nagata ve ark., 2018). Bu çalışmada d-tagatozun yeme eklendiği diğer çalışmalardan farklı olarak birincil karbonhidrat kaynağı olarak kullanılan sükrozun çıkarılıp yerine aynı miktarda d-tagatoz eklenmemiştir. Aksine d-tagatoz, diyetle kütlece %3 oranında yeme ekstradan ilave edilmiştir. Ayrıca mevcut çalışmanın da aralarında bulunduğu diğer çalışmalarda bu çalışmadan farklı olarak d-tagatoz, genellikle yüksek yağlı ve yüksek kolesterolü diyetlere ilave edilmiş ve kolesterol metabolizması üzerine etkinliği bu şekilde test edilmiştir. Özetle bu çalışmada kullanılan d-tagatoz dozunun mevcut çalışmaya kıyasla oldukça düşük olduğu ve serum lipit ve kolesterol parametreleri üzerine etkilerinin ise düşük dozlama yüzünden saptanamadığı düşünülmektedir.

Hiperkolesteroleminin görüldüğü karaciğer rahatsızlıklarına ait RKÇ verilerinin incelendiği bir meta-analiz çalışmasında, sinbiyotik kullanımının serum ALB düzeyini anlamlı ölçüde değiştirmedeği gösterilmiştir (Khalesi ve ark., 2018). Mevcut çalışmada da bu çalışmanın sonuçlarına benzer şekilde sinbiyotik kullanımının serum ALB düzeyini etkilemediği bulunmuştur.

Alkole bağılı olmayan yağlı karaciğer hastalarıyla gerçekleştirilen bir RKÇ ile müdahale grubuna 24 hafta boyunca 300 g sinbiyotik yoğurt (*Bifidobacterium animalis* 1 x 10⁸ kob ve 1.5 g inülin içeren şekilde) uygulanmış; kontrol grubuna ise sadece sağlıklı beslenme tavsiyeleri verilmiştir. Çalışma sonunda müdahale grubunun serum ALT ve AST düzeylerinin kontrol grubuna göre önemli miktarda düştüğü tespit edilmiştir (Bakhshimoghaddam ve ark., 2018). Bu çalışmada sinbiyotik uygulamasının serum ALT ve AST düzeylerini düşürmede etkili olduğu gözlemlenirken, mevcut çalışmada sinbiyotik uygulamasının söz konusu düzeyler üzerinde anlamlı bir etki oluşturmadığı saptanmıştır. İki çalışma arasında ortaya çıkan bu etki farkının, sinbiyotik formülün içeriği ve uygulama süresine bağlı olarak görüldüğü varsayılmıştır. Çünkü bu çalışmadaki sinbiyotik ürünün içeriği tamamen farklı olup; uygulanma süresi ise mevcut çalışmaya kıyasla 6 kat daha fazladır.

Lee ve ark. (2022), diyet aracılığıyla hiperkolesterolemi oluşturulmuş ratlarla gerçekleştirdikleri in vivo bir çalışmada müdahale grubuna, tofu peynirinden elde edilmiş bir prebiyotik ürün ile *Bacillus coagulans* lilac-01 adlı probiyotik suşu sinbiyotik olarak 2 hafta süreyle uygulamıştır. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında müdahale grubunun plazma aortik ALT ve AST düzeylerinin benzer olduğu görülmüştür (Lee ve ark., 2022). Bu çalışmada sinbiyotik uygulaması sonucu ALT ve AST düzeylerinde kayda değer bir değişime rastlanmamış; mevcut çalışmada da söz konusu düzeylerin bu çalışmayla uyumlu biçimde anlamlı şekilde değişmediği saptanmıştır. Söz konusu iki çalışmanın da sinbiyotik uygulama sürelerinin ≤4 hafta olduğu görülmüş ve bu süre zarfının sinbiyotiklerin ALT ve AST düzeyleri üzerinde etki oluşturabilmesi için yetersiz kaldığı tespit edilmiştir.

Mevcut çalışmada probiyotik, prebiyotik ve sinbiyotik uygulamalarının gerçekleştirildiği gruplar içinde yalnızca SİN grubunun serum TK düzeyinin PK grubundan önemli miktarda daha düşük olduğu görülmüştür. Probiyotik ve PRE gruplarında serum TK düzeylerinde bir miktar düşüş görülse de, bu düşüklüğün istatistiksel anlamlılığa ulaşmadığı saptanmıştır. Ayrıca SİN grubunun serum HDL-K düzeyinin PK grubundan önemli oranda daha düşük olduğu görülmüştür.

Hiperkolesteroleminin diyetle indüklenerek oluşturulduğu bir çalışmada ratlara ayrı ayrı; prebiyotik kaynağı olarak yulaf (yemin kütlege ağırlığının %15' i), probiyotik kaynağı olarak *Lacticaseibacillus rhamnosus* ATCC 53103 (LGG) suşu (1×10^8 kob/ml) ve sinbiyotik formda ikisi birden 60 gün boyunca uygulanmıştır. Çalışma sonucunda sinbiyotik grubunun hiperkolesterolemik kontrol grubuna kıyasla serum TK, TG, LDL-K ve VLDL-K düzeylerinin sırasıyla %24, %32, %38 ve %33 gibi önemli oranlarda daha düşük olduğu saptanmıştır. Öte yandan sinbiyotik grubunun serum HDL-K düzeyi ise hiperkolesterolemik kontrol grubu değerinden anlamlı oranda daha yüksek bulunmuştur (Sangwan ve Singh, 2018). Bu çalışma ile mevcut çalışma arasında sinbiyotik uygulaması sonucu serum TK, TG, LDL-K ve VLDL-K düzeylerinin hiperkolesterolemik kontrol grubuna göre düşüş göstermesi açısından uyumluluk olduğu gözlemlenmiştir. Ancak mevcut çalışmada söz konusu düşüklüğün yalnızca serum TK düzeyinde istatistiksel anlamlılığa sahip olduğu gösterilmiştir. İki çalışma arasındaki serum kolesterol parametrelerinde ortaya çıkan bu farklılığın, sinbiyotik formülasyonunda yer alan probiyotik suş ve prebiyotik kaynaklarının farklı hipokolesterolemik kapasiteye sahip olmasına bağlı olarak gerçekleştiği düşünülmüştür. Ayrıca bu çalışmada mevcut çalışmadan farklı olarak sinbiyotik uygulamasının ≥ 4 hafta daha sürdürüldüğü belirlenmiştir. Artan sinbiyotik uygulama süresinin daha güçlü bir hipokolesterolemik etki oluşturduğu öngörülmüştür.

Mahmoud ve ark. (2022) hiperkolesterolemik ratlara; probiyotik suşların karışımından oluşan bir ürün (*Bifidobacterium longum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium lactis*, *Lacticaseibacillus rhamnosus*, *Bifidobacterium breve*, *Lacticaseibacillus casei*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactiplantibacillus plantarum*; her bir suş 30×10^9 kob/gün dozunda) ile prebiyotik kaynağı olarak inülinin (FOS) kullanıldığı bir ticari ürünü sinbiyotik olarak uygulamıştır. Çalışma sonucunda sinbiyotik uygulamasının gerçekleştiği grubun serum LDL-K ve TG düzeylerinin hiperkolesterolemik kontrol grubuna kıyasla anlamlı düzeyde düştüğü; serum HDL-K düzeyinin ise önemli oranda arttığı gösterilmiştir. Bununla birlikte sinbiyotik uygulaması sonucu hiperkolesterolemik kontrol grubuna kıyasla serum TK düzeylerinin de düştüğü ancak bu düşüşün anlamlılık

içermediği saptanmıştır (Mahmoud ve ark., 2022). Mevcut çalışmadaki bazı serum kolesterol parametrelerinin bu çalışmada olduğu gibi düşüş göstermesine rağmen istatistiksel anlamlılık düzeyine ulaşamadığı görülmüştür. Söz konusu etki büyüklüğündeki değişimin ise sinbiyotiklerin uygulama süresi ve içeriği arasında görülen farklılıklar ile probiyotik ürünlerin içeriği ve uygulanma dozlarına bağlı olarak ortaya çıktığı düşünülmüştür. Çünkü bu çalışmadaki sinbiyotik ürünün uygulama süresinin mevcut çalışmadan 4 hafta daha fazla olduğu görülmüştür. Ayrıca bu çalışmada probiyotik ürün 8 ayrı suş içerir iken; mevcut çalışmada probiyotik ürün olarak tek bir suş kullanılmıştır. Bununla birlikte bu çalışmadaki probiyotik ürünün uygulama dozunun mevcut çalışmadan 10 kat daha fazla olduğu da belirlenmiştir.

Rani ve meslektaşları (2022), yüksek yağlı diyet tüketen farelere ayrı gruplarda, günde bir defa 3.4×10^9 kob dozunda *Limosilactobacillus fermentum* NCDC 400 adlı suşu, %4 oranında FOS içeren bir süt ürününü ve *Limosilactobacillus fermentum* NCDC 400 suşu + %4 oranında FOS içeren fermente bir süt ürününü 24 hafta boyunca uygulamıştır. Çalışma sonucunda sinbiyotik uygulanan gruba ait serum TG, TK, LDL-K ve VLDL-K düzeylerinin hiperkolesterolemik kontrol grubuna göre düşüş gösterdiği ancak serum HDL-K düzeyinin ise arttığı bulunmuştur (Rani ve ark., 2022). Mevcut çalışma ile bu çalışma arasında sinbiyotik uygulaması sonucu hiperkolesterolemik kontrol grubuna göre serum TK düzeyinde gözlemlenen düşüş açısından uyumluluk görülmüştür. Her ne kadar mevcut çalışmada da diğer serum kolesterol parametrelerinde azalmalar saptanmış olsa da, bu düşüşlerin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür. İki çalışma arasında gözlenen bu farkın temelde sinbiyotiklerin uygulama süresi arasındaki büyük farktan kaynaklandığı düşünülmektedir. Çünkü bu çalışmada sinbiyotiklerin mevcut çalışmaya kıyasla 6 kat daha fazla süreyle uygulandığı gözlemlenmiştir.

Ke ve ark. (2019) in vivo bir çalışmada yüksek yağlı diyetle beslenen farelere farklı gruplarda, *Bifidobacterium animalis* subsp. lactis ve *Lactocaseibacillus paracasei* subsp. paracasei DSM 46331 suşlarının karışımını (1×10^8 kob), yulaftan elde edilen β -glukanı (1 g/kg v.a.) ve ikisini bir arada günde 1 kez 12 hafta boyunca uygulamıştır. Çalışma sonucunda sinbiyotik uygulamasının

gerçekleştirildiği gruba ait serum glikoz ve insülin düzeylerinin hiperkolesterolemik kontrol grubuna kıyasla önemli oranda daha düşük olduğu saptanmıştır. Bu çalışmada, sinbiyotik grubuna ait serum glikoz ve insülin düzeylerinin neredeyse herhangi bir uygulamanın gerçekleştirilmediği standart kontrol grubuna yaklaştığı görülmüştür (Ke ve ark., 2019). Bu çalışma ile mevcut çalışma arasında sinbiyotik uygulamasının serum glikoz ve insülin düzeyleri üzerinde oluşturduğu etkiler bakımından benzerlikler olduğu gözlemlenmiştir. Her iki çalışmada da bahsi geçen parametreler üzerinde en etkin sonuçların, sinbiyotik uygulamaları sonucu ortaya çıktığı belirlenmiştir.

Hiperkolesterolemi bulgusunun eşlik ettiği MetS tanısı almış hastalarla yürütülen çalışmaların yer aldığı güncel bir meta-analizde, sinbiyotik takviyesinin çeşitli kardiyometabolik parametreler üzerindeki etkisi incelenmiştir. Bu çalışmada sinbiyotik uygulamasının serum insülin düzeyini anlamlı şekilde düşürdüğü (WMD, -6.39 μ U/mL; 95%CI, (-7.2) – (-5.4)); $p = 0.001$, $I^2 = 88.2\%$, $N = 2$) ancak aynı etkiyi serum glikoz düzeyi üzerinde gösteremediği (WMD, -11.5 mg/dl; 95%CI, ((-25.2) – (2.1)); $p = 0.09$, $I^2 = 99.1\%$, $N = 5$) saptanmıştır (Arabi ve ark., 2022). Mevcut çalışma ile bu meta-analiz arasında sinbiyotik uygulamasının serum glikoz düzeylerini anlamlı biçimde düşürmesi açısından fark olduğu görülmüştür. Meta-analizde sinbiyotik uygulamasının etkinliğinin araştırıldığı 5 ayrı çalışmada da prebiyotik kaynağı olarak FOS kullanıldığı görülmüştür. Oysa mevcut çalışmada prebiyotik kaynağı olarak kullanılan ve yeni nesil bir tatlandırıcı olan d-tagatoz kullanılmıştır. Sinbiyotik uygulaması sonucu serum glikoz düzeyleri üzerinde ortaya çıkan bu etki farkının büyük ölçüde sinbiyotik formülasyonu içindeki prebiyotik türü farklılığından ortaya çıktığı düşünülmüştür.

5.3. Histolojik analizlere ilişkin bulguların değerlendirilmesi

Karaciğer, karbonhidrat metabolizmasında hayati öneme sahip olup hayvansal dokularda glikojenin depolandığı temel organdır. Literatürde in vivo ortamda genellikle 8-12 hafta aralığında YYYYK yem örüntüsüyle beslenmenin, hepatositlerde lipit birikimine ve karaciğer fonksiyonlarında bazı olumsuz değişikliklere yol açtığı belirtilmektedir (Cao ve ark., 2019; Teng ve ark., 2020).

Yüksek yağlı ve yüksek kolesterolü beslenmeye bağlı olarak hepatositlerin sahip olduğu normal histolojik görünüm yapısında birtakım dejeneratif değişiklikler meydana gelmekte ve hücrelerin yapısal bütünlüğü bozulmaktadır. Karaciğerde görülen lipid birikimine bağlı olarak hepatositlerde mikroveziküler steatozis ve inflamatuvar hücre infiltrasyonlarına da rastlanmaktadır. Ayrıca YYYY beslenme, karaciğerin fonksiyonel kapasitesine zarar verebilmekte ve bunun sonucunda da glikojen depolama kapasitesinde düşüş görülebilmektedir (Liang ve ark., 2021).

Vu ve ark. (2022), YYYY yemlerle beslenen farelere 12 hafta boyunca VSL#3 adlı probiyotik bir ticari ürünü, prebiyotik β -glukanı ve ikisinin bir arada olduğu sinbiyotik formu uygulamıştır. Çalışma sonunda gerçekleştirilen histolojik analizlerde; sinbiyotik uygulaması gerçekleştirilen grubun YYYY yemle beslenen kontrol grubuna kıyasla hepatosit dejenerasyonu, mikroveziküler steatozis ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu değerlerinin anlamlı düzeyde azaldığı gösterilmiştir (Vu ve ark., 2022). Mevcut çalışmada SİN grubunun PK grubuna kıyasla hepatosit dejenerasyonu, inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve mikroveziküler steatozis değerlerinin düşüş gösterdiği ancak bu düşüşlerden yalnızca mikroveziküler steatozis değerinin istatistiksel anlamlılığa ulaştığı görülmüştür. Bu çalışmada kullanılan probiyotik suş karışımının toplam 8 adet suştan oluştuğu ve mevcut çalışmadan farklı olarak yeme ilave edildiği saptanmıştır. Bu sayede de mevcut çalışmaya kıyasla daha fazla miktarda probiyotik uygulamasının gerçekleştirildiği tespit edilmiştir. Ayrıca bu çalışmanın sinbiyotik uygulama süresinin de mevcut çalışma süresinin 3 katı olduğu belirlenmiştir. Tüm bu faktörlerin çalışmaların histolojik analiz sonuçları arasındaki söz konusu anlamlılık farkına yol açtığı düşünülmektedir.

Yüksek yağlı ve yüksek kolesterolü bir diyet örüntüsüyle beslenme; obezite, dislipidemi ve hiperkolesterolemi gibi metabolik rahatsızlıklara yol açmaktadır. Bu rahatsızlıklar sonucu organizmadaki adipoz doku miktarı artış göstermekte ve bu dokulardan salgılanan çeşitli bileşenler aracılığıyla inflamasyon tablosu tetiklenmektedir. Karaciğerde ortaya çıkan inflamasyon bulgusuna ait en önemli biyobelirteçlerden birisi de proinflamatuvar bileşenlerden olan IL-6 sitokindir (Duan ve ark., 2018). Klinikte karaciğere ait metabolik hasarlanmaların olduğu hiperkolesterolemi tablosunun değerlendirilmesinde, inflamatuvar reaksiyon

yanıtına ait parametreler önemli rol oynamaktadır. İnflamatuvar reaksiyon yanıtının boyutunun belirlenmesinde ise karaciğer dokusundan alınan örneklerle gerçekleştirilen immünohistokimyasal analizler kullanılmaktadır (Maretti-Mira ve ark., 2022).

Kang ve ark. (2023), karaciğer dokusunda ve fonksiyonlarında dejeneratif değişikliklerin görüldüğü otoimmün hepatit tablosuna sahip farelere 6 hafta boyunca *Lactobacillus acidophilus* OL457299 (1.5×10^9 kob/gün) ve *Bifidobacterium infantis* M58738 (1.5×10^9 kob/gün) probiyotik suşlarından oluşan karışımı ve konjac glukomannan bitkisine ait oligosakkaritleri içeren prebiyotik bir ürünü sinbiyotik formda uygulamıştır. Çalışma sonucunda gerçekleştirilen immünohistokimyasal analizde, sinbiyotik uygulanan gruba ait hepatosit hücre sitoplazmasında IL-6 immünoreaktivitesinin hastalık modelinin oluşturulduğu kontrol grubuna kıyasla anlamlı ölçüde düşük olduğu görülmüştür (Kang ve ark., 2023). Mevcut çalışmada da bu çalışma sonuçlarıyla benzer şekilde SİN grubu IL-6 immünoreaktivitesinin PK grubundan daha düşük olduğu bulunmuştur.

5.4. Bağırsak mikrobiyotasına ilişkin bulguların değerlendirilmesi

Bağırsak mikrobiyota örüntüsü incelenmesinde kullanılan biyoinformatik analiz metotlarının başında “Alfa Çeşitlilik (α -diversity)” ve “Beta Çeşitlilik (β -diversity)” indeksleri gelmektedir. Bu yöntemlerden olan alfa çeşitlilik indeksleri, tek bir biyolojik bileşenin (örnek ya da grup) içindeki mikrobiyal türlerin çeşitlilik ve zenginliğinin belirlenmesinde kullanılmaktadır. Diğer bir yöntem olan beta çeşitlilik indekslerinden ise birden fazla biyolojik bileşen (örnekler ya da gruplar) arasındaki mikrobiyal tür çeşitliliğinin belirlenmesinde faydalanılmaktadır (Walters ve Martiny, 2020).

Alfa çeşitlilik indeksleri arasında yer alan Chao1 indeksi, bir mikrobiyal örnek ya da grubun barındırdığı türlerin zenginliğini ölçmek için kullanılmaktadır. Chao1 indeksinde bakteriyel çeşitlilik dikkate alınmamakta yalnızca tür zenginliği kapsamında değerlendirme yapılmaktadır. Bu indekste gözlemlenen operasyonel taksonomik birimlerin (OTU) içinde yer alan ve yalnızca bir (singleton) ya da iki (doubleton) defa bulunan nadir türlerden faydalanılmaktadır. Söz konusu nadir

türlerin, sekans verilerinin içindeki kayıp türler hakkında en fazla bilgiyi barındırdığı düşünülmektedir. Bu özellikleriyle Chao1 indeksi, bolluk düzeyi düşük olan mikrobiyal türlerin bulunma ihtimalinin olduğu veri setlerinde kullanışlı bir biyoinformatik metot olarak karşımıza çıkmaktadır (Hughes ve ark., 2001).

Yüksek yağlı diyet örüntüsüyle beslenmenin bağırsak mikrobiyota örüntüsünde disbiyozis tablosu oluşturarak bakteriyel tür zenginliğini azalttığı çeşitli çalışmalarla ispatlanmıştır (He ve ark., 2018; Murphy ve ark., 2015). Mevcut çalışmada da olduğu gibi standart diyet örüntüsüyle beslenip herhangi bir uygulamanın gerçekleştirilmediği ve böylece disbiyozis tablosunun oluşmadığı NK grubuna ait tür zenginliğinin yüksek yağlı diyet örüntüsüyle beslenen diğer gruplardan daha fazla olması beklenen bir sonuçtur. Nitekim bakteriyel tür zenginliğinin PRO, PRE ve SİN gruplarında NK grubuna kıyasla düşüş gösterdiği saptanmıştır. Ancak literatürde bulunan çok sayıda çalışmada, yüksek yağlı diyetle beslenmelerine rağmen probiyotik, prebiyotik ve sinbiyotik uygulamalarının gerçekleştirildiği grupların bakteriyel tür çeşitlilik ve zenginlik değerlerinde, yüksek yağlı diyetle beslenen kontrol gruplarına kıyasla yükseliş görüldüğü belirtilmiştir (Ke ve ark., 2019; Kong ve ark., 2019; Megur ve ark., 2022). Mevcut çalışmada ise her ne kadar istatistiksel anlamlılık değerine ulaşmasa da probiyotik uygulanan grubun bakteriyel tür zenginliğinin arttığı görülmüştür. Öte yandan prebiyotik uygulamalarının olduğu PRE ve SİN gruplarında ise tür zenginliğinin, istatistiksel öneme sahip olmasa da PK grubundan daha düşük olduğu görülmüştür. Görece bu ilginç sonuca PRO grubunda değil de yalnızca PRE ve SİN gruplarında rastlanması prebiyotik kaynağının önemine işaret etmektedir. Bu çalışmada kullanılan ve bir nadir şeker çeşidi olan d-tagatozun diğer çalışmalarda kullanılan FOS ve GOS türleri gibi prebiyotik kaynaklarından farklı olarak bağırsak mikrobiyota örüntüsünde daha kısıtlı bir probiyotik bakteri grubu tarafından fermente edildiği bilinmektedir. Bu sayede mikrobiyota örüntüsü içinde d-tagatozu fermente edebilen küçük bir probiyotik grubun dominasyonunun olduğu ve sonuç olarak da tür zenginliğinin azaldığı düşünülmektedir.

Alfa çeşitlilik analizlerinden Shannon Diversity indeksi türlerin zenginlik ve eşitliğinden faydalanmakta ve Chao1 indeksinden farklı olarak tür çeşitliliği hakkında değerlendirme yapılabilmesine olanak sağlamaktadır. Bağırsak mikrobiyota örüntüsünün incelenmesinde kullanılan diğer bir alfa çeşitlilik analizi ise Inverse-Simpson indeksidir. Bu indekste, Shannon Diversity indeksinde olduğu gibi zenginlik değil türlerin eşitliği ön plana çıkarılarak bakteriyel tür değerlendirilmesi gerçekleştirilmektedir (Roswell ve ark., 2021).

Huang ve ark. (2021) YYYYK yemlerle besleyerek hiperkolesterolemi tablosu oluşturdıkları ratlara *Bacillus* sp. DU-106 adlı probiyotik suşu düşük doz (7.5×10^9 kob/kg/gün) ve yüksek doz (15×10^9 kob/kg/gün) şeklinde 7 hafta boyunca uygulamıştır. Çalışma sonucunda düşük ve yüksek doz olarak probiyotik uygulamasının gerçekleştirildiği her iki grubunda Chao1 ve Shannon Diversity indeks değerlerinin mevcut çalışmanın sonuçlarıyla benzer şekilde negatif kontrol grubunda daha yüksek olduğu görülmüştür. Ancak çalışmada iki indeks değerinin hem düşük hem de yüksek doz probiyotik uygulanan gruplarda pozitif kontrol grubuna kıyasla anlamlı biçimde daha yüksek olduğu bulunmuştur (Huang ve ark., 2021). Mevcut çalışmada probiyotik uygulaması sonucu anlamlı artış göstermeyen bakteriyel tür zenginlik ve çeşitlilik değerlerinin bu çalışmada önemli miktarda artış gösterdiği saptanmıştır. Bu çalışmada uygulanan düşük dozlu probiyotik suş mevcut çalışmada kullanılan dozun 7.5 katıdır. Bununla birlikte bu çalışmanın probiyotik suş uygulama süresinin de mevcut çalışmaya kıyasla 3 hafta daha fazla olduğu belirlenmiştir. İki çalışma arasında probiyotik uygulaması sonucu bakteriyel tür zenginlik ve çeşitliliğinde görülen bu durumun uygulama dozu ve süresindeki farklılığa bağlı olarak ortaya çıktığı düşünülmektedir.

Abdo ve ark. (2021) hiperkolesterolemik hamsterlar ile gerçekleştirdikleri bir çalışmada, YYYYK diyet örüntüsüne prebiyotik kaynağı olarak %5 oranında ksiloogisakkarit (XOS) ilave etmiş ve hayvanları 6 hafta boyunca beslemiştir. Çalışma sonucunda prebiyotik grubunun bakteriyel tür zenginlik ve çeşitliliğinde hiperkolesterolemik kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir değişim olmadığı gözlemlenmiştir (Abdo ve ark., 2021). Kolonda probiyotikler tarafından fermente edilen prebiyotiklerin; kaynağına, uygulama süresine, uygulama tipine ve

uygulanma miktarına bağı olarak bağırsak mikrobiyota örüntüsünün değışiminde rol aldığı bilinmektedir. Bu çalışma ile mevcut çalışma arasında hem prebiyotik kaynağı hem de prebiyotiğın uygulanma süresi bakımından farklılıklar bulunmaktadır. Ancak tüm bu farklılıklara rağmen her iki çalışmada da prebiyotik uygulamasının gerçekleştirildiğı grup ile hiperkolesterolemik kontrol grubu arasında bakteriyel tür çeşitlilik ve zenginlik değerlerinin birbirine benzer olduğı bulunmuştur.

Ke ve ark. (2019) yüksek yağı diyetle besledikleri farelere probiyotik suş karışımı bir ürün (*Lactocaseibacillus paracasei* subsp. paracasei DSM 46331 (1×10^8 kob/kg/gün); *Bifidobacterium animalis* subsp. lactis DSM 10140 (1×10^8 kob/kg/gün)), prebiyotik kaynağı olarak yulaf β -glukanı (1 g/kg v.a.) ve sinbiyotik olarak ikisini birlikte 12 hafta boyunca uygulamıştır. Çalışma sonucunda yüksek yağı yemle beslenen kontrol grubuna kıyasla bakteriyel türlerin zenginlik ve çeşitliliğinde en fazla artış görülen grubun sinbiyotik uygulaması gerçekleştirilen grup olduğı görülmüştür (Ke ve ark., 2019). Bu çalışma ile mevcut çalışma arasında sinbiyotik uygulamalarının bağırsak mikrobiyota örüntüsü üzerine etkileri bakımından önemli farklar bulunduğu gözlemlenmiştir. Mevcut çalışmada sinbiyotik uygulamasının yüksek yağı yemle beslenen kontrol grubuna kıyasla bakteriyel tür zenginlik ve çeşitliliğinde bir artışa yol açmadığı bulunmuştur. İki çalışma arasında probiyotik suşların tipi, sayısı, uygulama dozu ve süresi bakımından ciddi farklılıklar bulunmaktadır. Sinbiyotik uygulaması sonucu iki çalışma arasında ortaya çıkan bu durumunun kaynağının ise yukarıda bahsi geçen sebeplere bağı olarak ortaya çıktığı düşünülmektedir.

Bağırsak mikrobiyota örüntüsünün incelendiğı diğer biyoinformatik analizler ise beta çeşitlilik indekslerinden olan Bray-Curtis benzeşmezlik indeksi ve Ağırlıklı Unifrac mesafesidir. Beta çeşitliliğe ait bu yöntemler, boyut indirgeme analizleri olarak isimlendirilen Temel Koordinat Analizi (PCoA) ve Metrik Olmayan Çok Boyutlu Ölçeklendirme (NMDS) gibi biyoinformatik analiz metotları aracılığıyla iki boyuta indirgenip görselleştirilmektedir. Bray-Curtis indeksi, örnek ya da gruplar arasındaki mikrobiyota örüntüsü farklılıklarını nicel olarak gösteren bir istatistiksel analiz metodudur. Bu metotta filogenetik düzeydeki topluluk farklılıklarını belirleyebilmek için bakteri türlerinin çeşitliliğı ve bolluğı dikkate

alınmaktadır. Ağırlıklı Unifrac mesafesi ise örnek ya da gruplar arasındaki türlerin yalnızca mikrobiyota kompozisyonunu içindeki varlık/yokluk durumlarını değil aynı zamanda bolluklarını da göz önüne alarak nicel bir ölçüm gerçekleştirmektedir. Bununla birlikte Ağırlıklı Unifrac mesafesi yönteminde genellikle gruplar arasındaki baskın türlerin değişimi üzerinde durulmaktadır (Walters ve Martiny, 2020).

Lye ve ark. (2017), *Limosilactobacillus fermentum* FTDC 8312 ve *Limosilactobacillus fermentum* JCM 1173 adlı probiyotik suşları ayrı gruplarda hiperkolesterolemik farelere uygulamıştır. Bu çalışmada bağırsak mikrobiyota örüntüsündeki değişim, Bray-Curtis indeksi ve Ağırlıklı Unifrac mesafesi gibi yöntemlerle incelenmiş ve PCoA ile görselleştirilmiştir. Her iki yöntemde de hiperkolesterolemik kontrol grubu, FTDC8312 ve JCM1173 gruplarının bakteriyel tür çeşitlilik ve bolluklarının birbirlerinden net bir biçimde farklı olduğu gözlemlenmiştir (Lye ve ark., 2017). Mevcut çalışmada Bray-Curtis indeksi ve Ağırlıklı Unifrac mesafesine ait NMDS ve PCoA grafiklerinde ise NK, PK ve PRO gruplarının bu çalışmanın sonuçlarıyla uyumlu bir şekilde bakteriyel tür çeşitlilik ve bolluklarının birbirinden anlamlı şekilde farklılık gösterdiği bulunmuştur.

Aoki ve ark. (2021), farelerle gerçekleştirdikleri bir çalışmada iki ayrı grubu YYYYK yem ve YYYYK + %10 inülin içeren yemlerle beslemiştir. Bu çalışmada YYYYK (hiperkolesterolemik model) + inülin içeren yemlerle beslenen farelerin yalnızca YYYYK yemlerle beslenen farelere kıyasla bakteriyel tür çeşitlilik ve bolluğunun önemli ölçüde farklılık gösterdiği bulunmuştur. Ağırlıklı Unifrac mesafesine ait PCoA grafiğinde ise bu iki grubun birbirinden net bir biçimde ayrıldığı gözlemlenmiştir (Aoki ve ark., 2021). Mevcut çalışmada da prebiyotik kaynağı olarak d-tagatoz ilave edilen yemle beslenen farelerin bakteriyel tür çeşitlilik ve bolluğunun hiperkolesterolemik modelin oluşturulduğu kontrol grubundaki farelere kıyasla önemli miktarda daha fazla olduğu görülmüştür. Bu iki çalışmada da probiyotik tarafından fermentasyonu sonucu KZYA bileşenlerini ortaya çıkaran prebiyotiklerin, bağırsak mikrobiyotasında bulunan bakteriyel tür ve çeşitliği artırdığı gösterilmiştir.

Sinbiyotik bir ürünün (10^9 kob/gün; *Lactobacillus acidophilus* SD 5221, *Lactocaseibacillus rhamnosus* SD 5675, *Lactocaseibacillus paracasei* SD 5275 ve *Bifidobacterium lactis* SD 5674 + 5.5 g FOS) obez farelere uygulandığı bir çalışmada, Bray-Curtis ve Ağırlıklı Unifrac mesafesine ait PCoA grafiklerinde bakteriyel tür çeşitlilik ve bolluğunun obez kontrol grubuna kıyasla değişmediği saptanmıştır (Duarte ve ark., 2022). Bu çalışmadaki sinbiyotik ürünün mevcut çalışmadaki sinbiyotik ürüne kıyasla 4 hafta daha fazla uygulandığı ve sinbiyotik uygulama şeklinin farklı olduğu gözlemlenmiştir. Bu çalışmada sinbiyotik ürün içme suyuna karıştırılmış biçimde uygulanmış ancak mevcut çalışmada sinbiyotik ürünün prebiyotik bileşeni yem içeriğinde %17 gibi yüksek bir oranda bulunmuştur. İki çalışma arasında sinbiyotik uygulamasına bağlı olarak bakteriyel tür ve çeşitliliğinde ortaya çıkan farklılığın sinbiyotik uygulama şekli ve içeriğindeki bu değişimlerden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Yüksek yağlı diyet örüntüsü ile beslenen farelerin bağırsak mikrobiyota örüntüsünde Bacillota filumunun arttığı, Bacteroidota filumunun ise azaldığı bilinmektedir. Literatürdeki çeşitli çalışmalarda; Bacillota/Bacteroidota (B/B) oranının artışı ile obezite, hiperlipidemi ve hiperkolesterolemi tabloları arasında pozitif yönlü korelasyon olduğu belirtilmiştir (Jiang ve ark., 2019). Disbiyozisin önemli bir bileşeni olarak kabul edilen B/B oranlarının bu çalışmanın PK ve PRO gruplarında artış gösterdiği; ancak PRE ve SİN gruplarında ise değişmediği saptanmıştır. Bağırsak mikrobiyota örüntüsü homeostazının sağlanmasında tek başına probiyotik uygulamasının yeterli olmadığı; prebiyotik ya da sinbiyotik uygulamasının daha etkin olduğu görülmüştür.

Disbiyozis tablosunun oluşmasında salgıladıkları endotoksin özellikteki LPS molekülleriyle önemli etkiye sahip bağırsak mikrobiyotası bileşenlerinden diğeri de Pseudomonadota filumudur (Shin ve ark., 2015). Hong ve ark. (2021), *Lactiplantibacillus plantarum* suşu ve pullulan adlı prebiyotik kaynağının bir arada kullanıldığı sinbiyotik formun, Pseudomonadota filumunu azalttığını ve bu sayede disbiyozis tablosunun düzeltilmesine katkı sağladığını göstermişlerdir (Hong ve ark., 2021). Mevcut çalışmada da sinbiyotik uygulamasının disbiyozis tablosunun görüldüğü PK grubuna kıyasla Pseudomonadota filum düzeyini anlamlı şekilde düşürdüğü gözlemlenmiştir.

Yüksek yağlı diyet tüketimi sonucu miktarı artan ve salgıladıkları LPS molekülleri ile obezite, insülin direnci ve hiperkolesterolemi gibi inflamasyon tablosuyla ilişkili hastalıklara zemin hazırlayan taksonomik bileşenlerden birisi de Desulfovibrionaceae bakteri ailesidir (Zheng ve ark., 2021). Randomize kontrollü bir çalışmada *Lactobacillus acidophilus* NCFM adlı probiyotik suş ile prebiyotik sellobiyozun kullanıldığı sinbiyotik formun Desulfovibrionaceae bakteri ailesini tek başına probiyotik ya da prebiyotik uygulanan gruba kıyasla önemli oranda azalttığı bulunmuştur (van Zanten ve ark., 2014). Çalışmamızda da Desulfovibrionaceae miktarının SİN grubunda PK grubuna göre anlamlı şekilde düştüğü görülmüştür.

Tap ve ark. (2015) klinik bir çalışmada günde 40 g diyet posası tüketiminin *Coprococcus* cinsi bakteriler ile asetat ve bütirat gibi KZYA bileşenlerini önemli oranda artırdığını; bu sayede bağırsak mikrobiyota örüntüsünün homeostazında olumlu rol oynadığını göstermiştir (Tap ve ark., 2015). Mevcut çalışmada da bu çalışmanın sonuçlarıyla uyumlu şekilde prebiyotik kaynağı olarak D-tagatoz kullanımının da *Coprococcus* sayısını anlamlı olarak yükselttiği bulunmuştur.

Oscillospira cinsi bakterilerin bağırsak mikrobiyota örüntüsündeki zenginlik düzeyi ile obezite, NAFLD ve hiperkolesterolemi gibi metabolik rahatsızlıklar arasında negatif yönlü korelasyon olduğu belirtilmiştir (Yang ve ark., 2021). Lye ve ark. (2017) hiperkolesterolemik farelerle yaptıkları bir çalışmada, *Oscillospira* cinsinin bağırsak mikrobiyotasında bulunma düzeyi ile fekal kolesterol düzeyi arasında ters orantılı bir ilişki olduğunu belirtmiştir (Lye ve ark., 2017). Mevcut çalışmada PK grubuna kıyasla serum TK miktarının anlamlı olarak düştüğü tek grup SİN grubudur. Mevcut çalışmada kullanılan *Lactocaseibacillus casei* ATCC 393 suşunun kolesterol düşürücü etki oluşturmalarının altında yatan temel mekanizma, kolesterolü katabolize edip feçesle atımını sağlamasıdır (Lye ve ark., 2010b). Probiyotik uygulamasının olduğu grup ile PK grubunun serum TK düzeyleri arasında anlamlı bir değişim saptanmamıştır. Bu iki gruba ait *Oscillospira* cinsi bakteri bolluğunun da benzer olduğu görülmüştür. Öte yandan SİN grubu serum TK düzeyinin PK grubuna göre önemli şekilde düştüğü ve *Oscillospira* cinsinin de PK ve PRO gruplarına kıyasla anlamlı biçimde azaldığı gösterilmiştir. Her ne kadar mevcut çalışmada fekal kolesterol düzeyleri

ölçülmemiş olsa da SİN grubunun serum TK düzeyindeki düşüşte; feçesle atılan kolesterol miktarındaki artışın etkili olduğu düşünülmektedir. Sinbiyotik uygulamasının olduğu grupta görülen feçesteki kolesterol miktarındaki artışın ise Lye ve ark. (2017) tarafından belirtildiği gibi bağırsak mikrobiyotasındaki *Oscillospira* cinsini azalttığı düşünülmektedir.

Yüksek yağlı diyetle beslenmenin bağırsak mikrobiyota örüntüsünde disbiyozis tablosu oluşturduğu ve özellikle de *Clostridium* cinsi fırsatçı patojenlerin bağırsak mikrobiyotasındaki bolluk düzeylerinin disbiyozis tablosunda artış gösterdiği bilinmektedir. Disbiyozis tablosunun düzeltilmesinde etkili olan etmenlerden birisi de patojenik karakteristiğiyle ön plana çıkan *Clostridium* cinsi bakterilerin seviyesinde düşüş gerçekleşmesidir (Jia ve ark., 2021). Mevcut çalışmada PRE ve SİN gruplarındaki *Clostridium* cinsinde PK grubuna kıyasla önemli düşüş olduğu görülmüştür. Bu düşüşün ise yüksek yağlı diyet tüketimi sonucu oluşan disbiyozis tablosunun düzeltilmesinde rol oynadığı düşünülmektedir.

Literatürde LPS moleküllerini salgılayan patojenik yapıdaki bazı *Streptococcus* cinsi bakterilerin hiperlipidemi ve hiperkolesterolemi gibi metabolik rahatsızlıkları tetiklediği ve disbiyozis tablosu oluşumuna yol açtığı belirtilmiştir (He ve ark., 2018). Hong ve ark. (2021), in vivo bir çalışmada sinbiyotik uygulamasının *Streptococcus* cinsini ve LPS moleküllerini anlamlı şekilde düşürdüğünü göstermiştir (Hong ve ark., 2021). Mevcut çalışmada da PK grubunda miktarı artan *Streptococcus* cinsi bakterilerin sinbiyotik uygulamasının olduğu grupta önemli düzeyde düştüğü belirlenmiştir.

Lactobacillus cinsi bakteri suşlarının sahip oldukları BSH aktivitesi, kolesterolü katabolize edip feçesle atma yeteneği ve kolesterolü hücre membranının yapısına dahil edebilme gibi özellikler aracılığıyla kolesterol düşürücü etki gösterdiği belirtilmiştir. Bu bakteri cinsinin bağırsak mikrobiyota örüntüsü homeostazına olumlu etkilerinin olduğu ve patojen bakterilerin bağırsak lümenindeki dominasyonunu engelleyerek endotoksin düzeylerini düşürdüğü gösterilmiştir (Kumar ve ark., 2012; Sivamaruthi ve ark., 2021).

Mevcut çalışmada serum lipit ve kolesterol parametreleriyle bakteri cinsleri arasındaki ilişkinin incelendiğinde ısı haritasında, *Lactobacillus* cinsi bakteriler ile

serum TK ve LDL-K düzeyleri arasında negatif yönlü ve orta düzeyde bir korelasyon olduğu görülmüştür. Öte yandan *Streptococcus* cinsi bakterilerle serum TK ve HDL-K düzeyleri arasında da pozitif yönlü ve orta düzeyde bir korelasyon saptanmıştır. Özellikle de PK grubu ile karşılaştırıldığında SİN grubunun yaklaşık 4 kat daha fazla *Lactobacillus* cinsini ve yaklaşık 3 kat daha az *Streptococcus* cinsi bakteriyi bağırsak mikrobiyota örüntüsünde barındırdığı gözlemlenmiştir. Pozitif kontrol grubuna kıyasla serum TK düzeyinde anlamlı düşüşe sahip olan tek grubun SİN grubu olduğu görülmüştür. Aynı zamanda en yüksek *Lactobacillus* ve en düşük *Streptococcus* oranına da SİN grubunun sahip olduğu görülmüştür. Bu yüzden SİN grubunun serum TK düzeyi ile aynı grubun *Lactobacillus* ve *Streptococcus* düzeyleri arasında ilişki olduğu düşünülmektedir.

Mevcut çalışmada *Lactocaseibacillus casei* ATCC 393 suşu ve d-tagatozun sinbiyotik olarak uygulanmasının hiperkolesterolemi tablosu ve bağırsak mikrobiyota örüntüsü üzerine etkileri araştırılmış ve aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir:

1. Probiyotik, prebiyotik ve sinbiyotik uygulamalarının tümünün vücut ağırlığını önemli oranda azalttığı ancak yem tüketimi ve karaciğer ağırlıklarını anlamlı biçimde değiştirmedığı bulunmuştur.
2. Biyokimyasal parametrelerin analizi sonucu; uygulamaların hiçbirinin serum ALB, ALT ve AST düzeylerini önemli oranda değiştirmedığı bulunmuştur. Buradan yola çıkılarak PRO, PRE ve SİN gruplarının karaciğer fonksiyonel kapasitesini koruduğu görülmüştür.
3. Hiperkolesterolemi tanısında en önemli parametre olan serum TK düzeyi PRO, PRE ve SİN gruplarında PK grubuna kıyasla daha düşük bulunmuş ancak bu düşüşün yalnızca SİN grubunda istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanmıştır. Bu çalışmada kullanılan fare türlerindeki temel kolesterol taşıyıcısı olan serum HDL-K düzeyinin ise yalnızca PRE ve SİN gruplarında etkin bir biçimde düştüğü belirlenmiştir. Karaciğer yağlanması yansıtan önemli serum parametrelerinden olan TG düzeyi ise PK grubuna kıyasla yalnızca PRE grubunda önemli düzeyde azalmıştır.
4. Histolojik analizler sonucu; PRO, PRE ve SİN grubu karaciğer doku kesitlerine ait hepatosit dejenerasyonu, mikroveziküler steatozis,

inflatuar hücre infiltrasyonu skorları ile IL-6 immunoreaktivite sonuçlarının PK grubuna kıyasla düştüğü görülmüş ancak mikroveziküler steatozis ve IL-6 immunoreaktivitesine ait bu düşüşlerin yalnızca SİN grubunda istatistiksel anlamlılığa sahip olduğu tespit edilmiştir.

5. Bağırsak mikrobiyota analizi sonucunda; probiyotik, prebiyotik ya da sinbiyotik uygulamalarının toplam bakteriyel tür çeşitlilik ve zenginliğinde anlamlı bir artışa yol açmadığı ancak mikrobiyota örüntüsü içerisinde bazı taksonomik öğelerin düzeylerini önemli oranda değiştirerek hipokolesterolemik etki gösterdiği belirlenmiştir. Özellikle de SİN grubunda salgıladıkları LPS adlı endotoksinlerle disbiyozis tablosu oluşumuna yol açan Pseudomonadota filumunun ve Desulfovibrionaceae ailesinin anlamlı şekilde azaldığı bulunmuştur. Bununla birlikte SİN grubunun bağırsak mikrobiyota örüntüsünde; KZYA fermentasyonunda önemli rol oynayan *Coprococcus* cinsinin arttığı gözlemlenmiştir. Hiperkolesterolemi tablosunda bağırsak mikrobiyotasında artış gösteren *Oscillospira* cinsi ile patojenik karakteriyle ön plana çıkan *Clostridium* cinsi bakteri düzeyleri ise SİN grubunda anlamlı olarak daha düşük bulunmuştur.
6. Serum TK düzeyleri ile genellikle patojenik yapıdaki türleri barındıran *Streptococcus* cinsi arasında orta düzeyde ve pozitif yönde bir korelasyon; faydalı bakteri türlerini yüksek oranda içeren *Lactobacillus* cinsi arasında ise orta düzeyde ve negatif yönlü bir korelasyon olduğu belirlenmiştir.
7. Mevcut çalışmada ilk defa birlikte kullanılan *Lactocaseibacillus casei* ATCC 393 suşu ve d-tagatozun kolesterol düşürücü etkiye sahip olduğu in vivo ortamda ispatlanmıştır. Sinbiyotik uygulaması sonucu hepatositlerde lipit birikiminin ve inflamatuvar bulguların azaldığı bulunmuştur. Bununla birlikte sinbiyotik form kullanımının ardından bağırsak mikrobiyota örüntüsündeki bazı taksonomik bileşen miktarlarının olumlu yönde değiştiği ve bu sayede disbiyozis tablosunun düzeldiği görülmüştür.

Mevcut çalışmada uygulanan sinbiyotik formun hipokolesterolemik etkilerinin daha net bir biçimde aydınlatılabilmesi için uygulanabilecek öneriler ise sırasıyla aşağıdaki verilmiştir:

- Çalışmada deney hayvanları olarak vahşi tip fareleri içeren BALB/C türü kullanılmıştır. Vahşi tip farelerin metabolik varyasyonları, bazı genleri susturulmuş (knockout) farelere kıyasla çok daha fazla oranda gösterdikleri bilinmektedir. Hiperkolesterolemi özelinde knockout ApoE^{-/-} ve LDLr^{-/-} fareleriyle çalışmanın; genetik yapı kaynaklı varyasyonları minimuma indirdiği bilinmektedir. Mevcut çalışmadaki sinbiyotik formun hipokolesterolemik kapasitesinin knockout farelerle test edilmesi; çok daha hassas ölçüm sonuçlarının elde edilmesini sağlayacak ve bu anlamda bilimsel literatüre önemli katkılar sağlayacaktır.
- Mevcut çalışmada sinbiyotik formun kolesterol düşürücü etkileri metabolik yolak ve mekanizmalar açısından yalnızca bağırsak mikrobiyota örüntüsü düzeyinde incelenmiştir. Oysa literatürdeki çeşitli çalışmalarda sinbiyotik uygulamalarının kolesterol sentezinde görevli bazı enzim ya da protein düzeylerinin değişiminde de rol oynadığı belirtilmektedir. Daha ileri çalışmalarla sinbiyotik formun kolesterol metabolizmasına ait enzim ve protein düzeylerini hangi boyutta etkilediği araştırılmalıdır. Bu sayede sinbiyotik uygulamasının sahip olduğu hipokolesterolemik etkinin altında yatan mekanizmanın daha net bir biçimde aydınlatılacağı düşünülmektedir.
- Mevcut çalışmada KZYA düzeyleri belirlenmemiştir. Kısa zincirli yağ asitleri, probiyotiklerin gelişimine sundukları katkı aracılığıyla dolaylı yoldan hipokolesterolemik etki gösterebilmektedir. Ancak literatürde asetat, bütirat ve propiyonat gibi KZYA bileşenleri ile kolesterol parametreleri arasında doğrudan ilişki olduğunu belirten çalışmalarda yer almaktadır. Bu sinbiyotik formula gerçekleştirilecek daha ileri çalışmalarda; KZYA bileşenleri ayrıntılı olarak belirlenmeli ve böylece kolesterol parametreleri ile KZYA bileşenleri arasında ilişki açığa çıkarılmalıdır.
- Çalışmadan elde edilen bütün metabolik çıktılar bir arada değerlendirildiğinde ise mevcut sinbiyotik ürünün hiperkolesterolemi

tedavisinde alternatif biyoterapötik ajan olarak kullanılabileceği bulunmuştur.



6. KAYNAKLAR

- Abdi M, Esmaeili Gouvarchin Ghaleh H, Ranjbar R. *Lactobacilli* and *Bifidobacterium* as anti-atherosclerotic agents. Iran J Basic Med Sci, 2022; 25(8): 934-946.
- Abdo AAA, Zhang C, Lin Y, Liang X, Kaddour B, Wu Q, Li X, Fan G, Yang R, Teng C, Xu Y, Li W. Xylo-oligosaccharides ameliorate high cholesterol diet induced hypercholesterolemia and modulate sterol excretion and gut microbiota in hamsters. J Funct Foods, 2021; 77: 104334.
- Adebola OO, Corcoran O, Morgan WA. Prebiotics may alter bile salt hydrolase activity: Possible implications for cholesterol metabolism. Pharma Nutrition, 2020; 12: 100182.
- Allayee H, Hazen SL. Contribution of gut bacteria to lipid levels: another metabolic role for microbes. Circ Res, 2015; 117(9): 750-754.
- Al-Muzafar HM, Amin KA. Probiotic mixture improves fatty liver disease by virtue of its action on lipid profiles, leptin, and inflammatory biomarkers. BMC Complement Altern Med, 2017; 17: 43-49.
- Al-Sheraji SH, Amin I, Azlan A, Manap MY, Hassan FA. Effects of *Bifidobacterium longum* BB536 on lipid profile and histopathological changes in hypercholesterolaemic rats. Benef Microbes, 2015; 6(5): 661-668.
- Anandharaj M, Sivasankari B, Rani RP. Corrigendum to “effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on hypercholesterolemia: a review”. Chi J Biol, 2020; 2020: 8236703.

- Anandharaj M, Sivasankari B, Rani RP. Effects of Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics on Hypercholesterolemia: A Review. *Chin J Biol*, 2014; 2014: 572754.
- Aoki R, Onuki M, Hattori K, Ito M, Yamada T, Kamikado K, Kim YG, Nakamoto N, Kimura I, Clarke JM, Kanai T, Hase K. Commensal microbe-derived acetate suppresses NAFLD/NASH development via hepatic FFAR2 signalling in mice. *Microbiome*, 2021; 9(1): 188-196.
- Arabi SM, Bahrami LS, Rahnama I, Sahebkar A. Impact of synbiotic supplementation on cardiometabolic and anthropometric indices in patients with metabolic syndrome: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Pharmacol Res*, 2022; 176: 106061.
- ATCC, American Type Culture Collection (2022). *Lactocaseibacillus casei* ATCC 393 (Orla-Jensen). Erişim: [<https://www.atcc.org/products/393>], Erişim Tarihi: 07 Haziran 2023.
- Badimon L, Vilahur G. Thrombosis formation on atherosclerotic lesions and plaque rupture. *J Intern Med*, 2014; 276(6): 618-632.
- Bakhshimoghaddam F, Shateri K, Sina M, Hashemian M, Alizadeh M. Daily Consumption of Synbiotic Yogurt Decreases Liver Steatosis in Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Randomized Controlled Clinical Trial. *J Nutr*, 2018; 148(8): 1276-1284.
- Bär A, Lina BA, de Groot DM, de Bie B, Appel MJ. Effect of D-tagatose on liver weight and glycogen content of rats. *Regul Toxicol Pharmacol*, 1999; 29(2): 11-28.
- Bär A. Characteristics and significance of D-tagatose-induced liver enlargement in rats: An interpretative review. *Regul Toxicol Pharmacol*, 1999; 29(2): 83-93.
- Bayly GR. Lipids and disorders of lipoprotein metabolism. In: Marshall WJ, Lapsley M, Day AP, Ayling RM (eds), *Clinical Biochemistry: Metabolic and Clinical Aspects* (3rd ed). Elsevier, New York 2014; p.:702-736.

- Beasley S. Isolation, identification and exploitation of lactic acid bacteria from human and animal microbiota,. Doctoral Thesis, University of Helsinki Faculty of Agriculture and Forestry Sciences, Helsinki 2004; p.: 6-7.
- Begley M, Hill C, Gahan CGM. Bile Salt Hydrolase Activity in Probiotics. *Appl Environ Microbiol*, 2006; 72: 1729-1738.
- Behrouz V, Aryaeian N, Zahedi MJ, Jazayeri S. Effects of probiotic and prebiotic supplementation on metabolic parameters, liver aminotransferases, and systemic inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: A randomized clinical trial. *J Food Sci*, 2020; 85(10): 3611-3617.
- Bentzon JF, Otsuka F, Virmani R, Falk EJ. Mechanisms of plaque formation and rupture. *Circ Res*, 2014; 114(12): 1852-1866.
- Bertelsen H, Andersen H, Tvede M. Fermentation of D-tagatose by human intestinal bacteria and dairy lactic acid bacteria. *Microb Ecol Health Dis*, 2001; 13(2): 87-95.
- Beserra BT, Fernandes R, do Rosario VA, Mocellin MC, Kuntz MG, Trindade EB. A systematic review and meta-analysis of the prebiotics and synbiotics effects on glycaemia, insulin concentrations and lipid parameters in adult patients with overweight or obesity. *Clin Nutr*, 2015; 34(5): 845-858.
- Bhat B, Bajaj BK. Multifarious cholesterol lowering potential of lactic acid bacteria equipped with desired probiotic functional attributes. *3 Biotech*, 2020; 10(5): 1-16.
- Bhatnagar D, Soran H, Durrington PN. Hypercholesterolaemia and its management. *BMJ*, 2008; 337: 503-508.
- Bolyen E, Rideout JR, Dillon MR, Bokulich NA, Abnet CC, Al-Ghalith GA, Alexander H, Alm EJ, Arumugam M, Asnicar F, Bai Y, Bisanz JE, Bittinger K, Brejnrod A, Brislawn CJ, Brown CT, Callahan BJ, Caraballo-Rodriguez AM, Chase J, Cope EK, Da Silva R, Diener C, Dorrestein PC, Douglas GM, Durall DM, Duvallet C, Edwardson CF, Ernst M, Estaki M,

Fouquier J, Gauglitz JM, Gibbons SM, Gibson DL, Gonzalez A, Gorlick K, Guo J, Hillmann B, Holmes S, Holste H, Huttenhower C, Huttley GA, Janssen S, Jarmusch AK, Jiang L, Kaehler BD, Kang KB, Keefe CR, Keim P, Kelley ST, Knights D, Koester I, Kosciulek T, Kreps J, Langille MGI, Lee J, Ley R, Liu YX, Lotfield E, Lozupone C, Maher M, Marotz C, Martin BD, McDonald D, McIver LJ, Melnik AV, Metcalf JL, Morgan SC, Morton JT, Naimey AT, Navas-Molina JA, Nothias LF, Orchanian SB, Pearson T, Peoples SL, Petras D, Preuss ML, Pruesse E, Rasmussen LB, Rivers A, Robeson MS, Rosenthal P, Segata N, Shaffer M, Shiffer A, Sinha K, Song SJ, Spear JR, Swafford AD, Thompson LR, Torres PJ, Trinh P, Tripathi A, Turnbaugh PJ, Ul-Hasan S, van der Hooft JJJ, Vargas F, Vazquez-Baeza Y, Vogtmann E, von Hippel M, Walters W, Wan Y, Wang M, Warren J, Weber KC, Williamson CHD, Willis AD, Xu ZZ, Zaneveld JR, Zhang Y, Zho Q, Knight R, Caporaso JG. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME2. *Nat Biotechnol*, 2019; 37(8): 852-827.

Borén J, Taskinen MR. Metabolism of Triglyceride – Rich Lipoproteins. In: von Eckardstein A, Binder CJ (eds), *Prevention and Treatment of Atherosclerosis: Improving State-of-the-Art Management and Search for Novel Targets*. Springer, Cham 2021; p.: 133-156.

Buron-Moles G, Chailyan A, Dolejs I, Forster J, Mikš MH. Uncovering carbohydrate metabolism through a genotype-phenotype association study of 56 lactic acid bacteria genomes. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2019; 103(7): 3135-3152.

Callahan BJ, McMurdie PJ, Rosen MJ, Han AW, Johnson AJA, Holmes SP. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat Methods*, 2016; 13(7): 581-583.

Cao C, Wu R, Zhu X, Li Y, Li M, An F, Wu J. Ameliorative effect of *Lactiplantibacillus plantarum* WW-fermented soy extract on rat fatty liver via the PPAR signaling pathway. *J Funct Foods*, 2019; 60: 103439.

- Choi BR, Kwon EY, Kim HJ, Choi MS. Role of Synbiotics Containing d-Allulose in the Alteration of Body Fat and Hepatic Lipids in Diet-Induced Obese Mice. *Nutrients*, 2018; 10(11): 1797-1803.
- Davignon J, Ganz P. Role of Endothelial Dysfunction in Atherosclerosis. *Circulation*, 2004; 109(23 Suppl 1): III27-32.
- Donner TW, Magder LS, Zarbalian K. Dietary supplementation with d-tagatose in subjects with type 2 diabetes leads to weight loss and raises high-density lipoprotein cholesterol. *Nutr Res*, 2010; 30(12): 801-806.
- Duan Y, Zeng L, Zheng C, Song B, Li F, Kong X, Xu K. Inflammatory Links Between High Fat Diets and Diseases. *Front Immunol*, 2018; 9: 2649-2659.
- Duarte SMB, Stefano JT, Franco LAM, Martins RC, Moraes BDGC, Barbeiro DF, Oliveira N, Neri JMTR, Cogliati B, Vanni DS, Sabino EC, Carrilho FJ, Oliveira CP. Synbiotic Supplementation Modulates Gut Microbiota, Regulates β -Catenin Expression and Prevents Weight Gain in ob/ob Mice: Preliminary Findings. *Int J Mol Sci*, 2022; 23(18): 10483-10489.
- Edgar RC. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics*, 2010; 26(19): 2460-2461.
- El Helim MA, Hashem S, Essam T, Omar M. Cholesterol lowering capability of some *Lactobacillus* strains and its effect on mice fed a high cholesterol diet. *Clin Microbiol*, 2016; 5(3): 3-6.
- Espinosa I, Fogelfeld L. Tagatose: from a sweetener to a new diabetic medication? *Expert Opin Investig Drugs*, 2010; 19(2): 285-294.
- Freeman MW, Walford GA. Lipoprotein Metabolism and the Treatment of Lipid Disorders. In: Jameson JL, de Groot LJ, de Kretser DM, Giudice LC, Groosman AB, Melmed S, Potts JT, Weir GC (eds), *Endocrinology: Adult and Pediatric-Volume I* (7th ed). WB Saunders, Philadelphia 2016; p.:715-736.

- Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. Clin Chem, 1972; 18(6): 499-502.
- Fukuda S, Ohno H. Gut microbiome and metabolic diseases. Semin Immunopathol, 2014; 36(1): 103-114.
- Gargari G, Deon V, Taverniti V, Gardana C, Denina M, Riso P, Guardamagna O, Guglielmetti S. Evidence of dysbiosis in the intestinal microbial ecosystem of children and adolescents with primary hyperlipidemia and the potential role of regular hazelnut intake. FEMS Microbiol Ecol, 2018; 94: fiy045.
- Ghosh SS, Wang J, Yannie PJ, Sandhu YK, Korzun WJ, Ghosh S. Dietary Supplementation with Galactooligosaccharides Attenuates High-Fat, High-Cholesterol Diet-Induced Glucose Intolerance and Disruption of Colonic Mucin Layer in C57BL/6 Mice and Reduces Atherosclerosis in Ldlr^{-/-} Mice. J Nutr, 2020; 150(2): 285-293.
- Gimbrone MA, García-Cardena G. Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis. Circ Res, 2016; 118(4): 620-636.
- Gordon SM, Li H, Zhu X, Shah AS, Lu LJ, Davidson WS. A comparison of the mouse and human lipoproteome: suitability of the mouse model for studies of human lipoproteins. J Proteome Res, 2015; 14(6): 2686-2695.
- Guerrero-Wyss M, Durán Agüero S, Angarita Dávila L. D-Tagatose Is a Promising Sweetener to Control Glycaemia: A New Functional Food. Biomed Res Int, 2018; 2018: 8718053.
- Guo L, Wang L, Liu F, Li B, Tang Y, Yu S, Zhang D, Huo G. Effect of bile salt-hydrolase active *Lactiplantibacillus plantarum* KLDS 1.0344 on cholesterol metabolism in rats fed a high cholesterol diet. J Funct Foods, 2019; 61: 103497-103507.
- Hadi A, Ghaedi E, Khalesi S, Pourmasoumi M, Arab A. Effects of synbiotic consumption on lipid profile: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled clinical trials. Eur J Nutr, 2020; 59(7): 2857-2874.

- Hara H, Haga S, Aoyama Y, Kiriya S. Short-chain fatty acids suppress cholesterol synthesis in rat liver and intestine. *J Nutr*, 1999; 129(5): 942-948.
- Hashmi A, Naeem N, Farooq Z, Masood S, Iqbal S, Naseer R. Effect of Prebiotic Galacto-Oligosaccharides on Serum Lipid Profile of Hypercholesterolemics. *Probiotics Antimicrob Proteins*, 2016; 8(1): 19-30.
- He C, Cheng D, Peng C, Li Y, Zhu Y, Lu N. High-Fat Diet Induces Dysbiosis of Gastric Microbiota Prior to Gut Microbiota in Association With Metabolic Disorders in Mice. *Front Microbiol*, 2018; 9: 639-650.
- Heller, KJ. Probiotic bacteria in fermented foods: product characteristics and starter organisms. *Am J Clin Nutr*, 2001; 73: 374-379.
- Hernández-Gómez JG, López-Bonilla A, Trejo-Tapia G, Ávila-Reyes SV, Jiménez-Aparicio AR, Hernández-Sánchez H. In Vitro Bile Salt Hydrolase (BSH) Activity Screening of Different Probiotic Microorganisms. *Foods*, 2021; 10(3): 674-682.
- Hill C, Guarner F, Reid G, Gibson GR, Merenstein DJ, Pot B, Morelli L, Canani RB, Flint HJ, Salminen S, Calder PC, Sanders ME. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat Rev Gastroenterol*, 2014; 11(8): 506-514.
- Hill D, Sugrue I, Tobin C, Hill C, Stanton C, Ross RP. *Lactobacillus casei* Group: History and Health Related Applications. *Front Microbiol*, 2018; 9: 2107.
- Hong L, Lee SM, Kim WS, Choi YJ, Oh SH, Li YL, Choi SH, Chung DH, Jung E, Kang SK, Cho CS. Synbiotics Containing Nanoprebiotics: A Novel Therapeutic Strategy to Restore Gut Dysbiosis. *Front Microbiol*, 2021; 12: 715241.

- Huang J, Xiao N, Sun Y, Wu S, Tian W, Lai Y, Li P, Du B. Supplementation of *Bacillus* sp. DU-106 reduces hypercholesterolemia and ameliorates gut dysbiosis in high-fat diet rats. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2021; 105(1): 287-299.
- Hughes JB, Hellmann JJ, Ricketts TH, Bohannon BJ. Counting the uncountable: statistical approaches to estimating microbial diversity. *Appl Environ Microbiol*, 2001; 67(10): 4399-4406.
- Illumina (2013). 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation. Erişim: [https://support.illumina.com/documents/documentation/chemistry_documentation/16s/16s-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b.pdf], Erişim Tarihi: 06 Aralık 2022.
- Insull Jr, W. The pathology of atherosclerosis: plaque development and plaque responses to medical treatment. *Am J Med*, 2009; 122(1): 3-14.
- ISAPP, International Scientific Association of Probiotics and Prebiotics (2018). ISAPP position statement on minimum criteria for harmonizing global regulatory approaches for probiotics in foods and supplements. Erişim: [<https://isappscience.org/wp-content/uploads/2018/10/summary-document-probiotics-criteria-ISAPP.pdf>], Erişim Tarihi: 05 Haziran 2023.
- Ishimwe N, Daliri EB, Lee BH, Fang F, Du G. The perspective on cholesterol-lowering mechanisms of probiotics . *Mol Nutr Food Res*, 2015; 59(1): 94-105.
- Ivanovic N, Minic R, Dimitrijevic L, Radojevic Skodric S, Zivkovic I, Djordjevic B. *Lactobacillus rhamnosus* LA68 and *Lactiplantibacillus plantarum* WCFS1 differently influence metabolic and immunological parameters in high fat diet-induced hypercholesterolemia and hepatic steatosis. *Food Funct*, 2015; 6(2): 558-65.
- İşgören A, Sungur S. Tatlandırıcılar. *Lectio Scientific*, 2019; 3(1): 19-32.

- Jebari-Benslaiman S, Galicia-García U, Larrea-Sebal A, Olaetxea JR, Alloza I, Vandenbroeck K, Benito-Vicente A, Martín C. Pathophysiology of atherosclerosis. *Int J Mol Sci*, 2022; 23(6): 3346-3352.
- Jia B, Zou Y, Han X, Bae JW, Jeon CO. Gut microbiome-mediated mechanisms for reducing cholesterol levels: implications for ameliorating cardiovascular disease. *Trends Microbiol*, 2023; 31(1): 76-91.
- Jia X, Xu W, Zhang L, Li X, Wang R, Wu S. Impact of Gut Microbiota and Microbiota-Related Metabolites on Hyperlipidemia. *Front Cell Infect Microbiol*, 2021; 11: 634780.
- Jiang J, Feng N, Zhang C, Liu F, Zhao J, Zhang H, Zhai Q, Chen W. *Lactobacillus reuteri* A9 and *Lactobacillus mucosae* A13 isolated from Chinese superlongevity people modulate lipid metabolism in a hypercholesterolemia rat model. *FEMS Microbiol Lett*, 2019; 366(24): fnz254.
- Jones ML, Chen H, Ouyang W, Metz T, Prakash S. Microencapsulated genetically engineered *Lactiplantibacillus plantarum* 80 (pCBH1) for bile acid deconjugation and its implication in lowering cholesterol. *J Biomed Biotechnol*, 2004; 2004(1): 61-69.
- Kanasaki A, Jiang Z, Mizokami T, Shirouchi B, Iida T, Nagata Y, Sato M. Dietary d-allulose alters cholesterol metabolism in golden syrian hamsters partly by reducing serum PCSK9 levels. *J Funct Foods*, 2019; 60: 103429.
- Kang Y, Kuang X, Yan H, Ren P, Yang X, Liu H, Liu Q, Yang H, Kang X, Shen X, Tong M, Li L, Wang X, Guo L, Ma J, Zhang F, Fan W. A Novel Synbiotic Alleviates Autoimmune Hepatitis by Modulating the Gut Microbiota-Liver Axis and Inhibiting the Hepatic TLR4/NF- κ B/NLRP3 Signaling Pathway. *mSystems*, 2023: e0112722.
- Karabinos JV. Psicose, sorbose and tagatose. *Adv Carbohydr Chem*, 1952; 7: 99-136.

- Karimi E, Heshmati J, Shirzad N, Vesali S, Hosseinzadeh-Attar MJ, Moini A, Sepidarkish M. The effect of synbiotics supplementation on anthropometric indicators and lipid profiles in women with polycystic ovary syndrome: a randomized controlled trial. *Lipids Health Dis*, 2020; 19(1): 60-69.
- Ke X, Walker A, Haange SB, Lagkouvelas I, Liu Y, Schmitt-Kopplin P, von Bergen M, Jehmlich N, He X, Clavel T, Cheung PCK. Synbiotic-driven improvement of metabolic disturbances is associated with changes in the gut microbiome in diet-induced obese mice. *Mol Metab*, 2019; 22: 96-109.
- Keleszade E, Kolida S, Costabile A. The cholesterol lowering efficacy of *Lactiplantibacillus plantarum* ECGC 13110402 in hypercholesterolemic adults: a double-blind, randomized, placebo controlled, pilot human intervention study. *J Funct Foods*, 2022; 89: 104939.
- Kelly RB. Diet and Exercise in the Management of Hyperlipidemia. *Am Fam Physician*, 2010; 81(9): 1097-1102.
- Khalesi S, Johnson DW, Campbell K, Williams S, Fenning A, Saluja S, Irwin C. Effect of probiotics and synbiotics consumption on serum concentrations of liver function test enzymes: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Nutr*, 2018; 57(6): 2037-2053.
- Kim KA, Lee IA, Gu W, Hyam SR, Kim DH. β -Sitosterol attenuates high-fat diet-induced intestinal inflammation in mice by inhibiting the binding of lipopolysaccharide to toll-like receptor 4 in the NF- κ B pathway. *Mol Nutr Food Res*, 2014; 58(5): 963-972.
- Kim P. Current studies on biological tagatose production using L-arabinose isomerase: a review and future perspective. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2004; 65(3): 243-249.
- Kimoto H, Ohmomo S, Okamoto T. Cholesterol removal from media by lactococci. *J Dairy Sci*, 2002; 85(12): 3182-3188.

- Klaver FAM, Meer RVD. The assumed assimilation of cholesterol by lactobacilli and *Bifidobacterium bifidum* is due to their bile salt-deconjugating activity. *Appl Environ Microbiol*, 1993; 59(4): 1120-1124.
- Kong C, Gao R, Yan X, Huang L, Qin H. Probiotics improve gut microbiota dysbiosis in obese mice fed a high-fat or high-sucrose diet. *Nutrition*, 2019; 60: 175-184.
- Korcz E, Kerényi Z, Varga L. Dietary fibers, prebiotics, and exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria: potential health benefits with special regard to cholesterol-lowering effects. *Food Funct*, 2018; 9(6): 3057-3068.
- Kruger CL, Whittaker MH, Frankos VH, Schroeder RE. Developmental toxicity study of D-tagatose in rats. *Regul Toxicol Pharmacol*, 1999a; 29(2): 29-35.
- Kruger CL, Whittaker MH, Frankos VH, Trimmer GW. 90-Day oral toxicity study of D-tagatose in rats. *Regul Toxicol Pharmacol*, 1999b; 29(2): 1-10.
- Kruger CL, Whittaker MH, Frankos VH. Genotoxicity tests on D-tagatose. *Regul Toxicol Pharmacol*, 1999c; 29(2): 36-42.
- Kruskal WH, Wallis WA. Use of Ranks in One-Criterion Variance Analysis. *J Am Stat Assoc*, 1952; 47(260): 583-621.
- Kuerman M, Bao YH, Guo Y, Guo M. Effects of prebiotic carbohydrates on the growth promotion and cholesterol-lowering abilities of compound probiotics in vitro. *LWT Food Sci Technol*, 2020; 118: 108703.
- Kumar M, Nagpal R, Kumar R, Hemalatha R, Verma V, Kumar A, Chakraborty C, Singh B, Marotta F, Jain S, Yadav H. Cholesterol-lowering probiotics as potential biotherapeutics for metabolic diseases. *Exp Diabetes Res*, 2012; 2012: 902917.
- Kumar M, Nagpal R, Kumar R, Hemalatha R, Verma V, Kumar A, Chakraborty C, Singh B, Marotta F, Jain S, Yadav H. Corrigendum to "Cholesterol-Lowering Probiotics as Potential Biotherapeutics for Metabolic Diseases". *J Diabetes Res*, 2022; 2022: 3952529.

- Laerke HN, Jensen BB, Højsgaard S. In vitro fermentation pattern of D-tagatose is affected by adaptation of the microbiota from the gastrointestinal tract of pigs. *J Nutr*, 2000; 130(7): 1772-1779.
- Laerke HN, Jensen BB. D-tagatose has low small intestinal digestibility but high large intestinal fermentability in pigs. *J Nutr*, 1999; 129(5): 1002-1009.
- Lagier JC, Hugon P, Khelaifia S, Fournier PE, La Scola B, Raoult D. The Rebirth of culture microbiology through the example of culturomics to study human gut microbiota. *Clin Microbiol Rev*, 2015; 28(1) : 237-264.
- Lala V, Zubair M, Minter DA. Liver Function Tests. In: *StatPearls*. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL) 2022; PMID: 29494096.
- Lee Y, Tanaka Y, Iwasaki W, Yokoyama F, Joe GH, Tsuji M, Nose T, Tada K, Hanai T, Hori S, Shimizu H, Minamida K, Ishizuka S. Dietary supplementation with okara and *Bacillus coagulans* lilac-01 improves hepatic lipid accumulation induced by cholic acids in rats. *J Funct Foods*, 2022; 90: 104991.
- Levin GV. Tagatose, the new GRAS sweetener and health product. *J Med Food*, 2002; 5(1): 23-36.
- Li S, Qi C, Zhu H, Yu R, Xie C, Peng Y, Yin SW, Fan J, Zhao S, Sun, J. *Lactobacillus reuteri* improves gut barrier function and affects diurnal variation of the gut microbiota in mice fed a high-fat diet. *Food Funct*, 2019; 10(8): 4705-4715.
- Li Y, Chen M, Ma Y, Yang Y, Cheng Y, Ma H, Ren D, Chen P. Regulation of viable/inactivated/lysed probiotic *Lactiplantibacillus plantarum* H6 on intestinal microbiota and metabolites in hypercholesterolemic mice. *NPJ Sci Food*, 2022; 6(1): 50-59.
- Liang H, Jiang F, Cheng R, Luo Y, Wang J, Luo Z, Li M, Shen X, He F. A high-fat diet and high-fat and high-cholesterol diet may affect glucose and lipid metabolism differentially through gut microbiota in mice. *Exp Anim*, 2021; 70(1): 73-83.

- Lin MY, Chen TW. Reduction of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus* in culture broth. J Food Drug Anal, 2000; 8(2): 97-102.
- Liong MT, Shah NP. Effects of a *Lactobacillus casei* Synbiotic on Serum Lipoprotein, Intestinal Microflora, and Organic Acid in Rats. J Dairy Sci, 2006; 89: 1390-1399.
- Livesey G, Brown JC. D-tagatose is a bulk sweetener with zero energy determined in rats. J Nutr, 1996; 126(6): 1601-1609.
- Lodder R, Ensor M, Williams J, Banfield A, Smith R. Effect of BSN272 on hyperlipidemia and atherosclerosis in LDLr^{-/-} mice. Webmedcentral, 2016; 7(11): WMC005230.
- Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. Genome Biol, 2014; 15(12): 550-559.
- Lu Y, Levin GV, Donner TW. Tagatose, a new antidiabetic and obesity control drug. Diabetes Obes Metab, 2008; 10(2): 109-134.
- Lye HS, Kato T, Low WY, Taylor TD, Prakash T, Lew LC, Ohno H, Liong MT. *Lactobacillus fermentum* FTDC 8312 combats hypercholesterolemia via alteration of gut microbiota. J Biotechnol, 2017; 262: 75-83.
- Lye HS, Rahmat-Ali GR, Liong MT. Mechanisms of cholesterol removal by lactobacilli under conditions that mimic the human gastrointestinal tract. Int Dairy J, 2010a; 20(3): 169-175.
- Lye HS, Rusul G, Liong MT. Removal of cholesterol by lactobacilli via incorporation and conversion to coprostanol. J Dairy Sci, 2010b; 93: 1383-1392.
- Mach F, Baigent C, Catapano AL, Koskinas KC, Casula M, Badimon L, Chapman MJ, De Backer GG, Delgado V, Ference BA, Graham IM, Halliday A, Landmesser U, Mihaylova B, Pedersen TR, Riccardi G, Richter DJ, Sabatine MS, Taskinen MR, Tokgozoglu L, Wiklund O. 2019 ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: lipid modification to

reduce cardiovascular risk: the Task Force for the management of dyslipidaemias of the European Society of Cardiology (ESC) and European Atherosclerosis Society (EAS). *Eur Heart J*, 2020; 41(1): 111-1188.

Madigan MT, Martinko JM. *Brock Biology Of Microorganisms* (11 th ed), Pearson Education Inc, New Jersey 2006; p.: 375-378.

Mahboobi S, Rahimi F, Jafarnejad S. Effects of Prebiotic and Synbiotic Supplementation on Glycaemia and Lipid Profile in Type 2 Diabetes: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Adv Pharm Bull*, 2018; 8(4): 565-574.

Mahmoud HM, Sallam RM, Henin CMA, Moustafa AS, Mohamed RH, Mohamad MI. Synbiotics intake improves disturbed metabolism in a rat model of high fat diet-induced obesity; A potential role of adipose tissue browning. *Obes Med*, 2022; 32: 100414.

Majeed M, Majeed S, Nagabhushanam K, Arumugam S, Beede K, Ali F. Evaluation the in vitro cholesterol-lowering activity of the probiotic strain *Bacillus coagulans* MTCC 5856. *Int J Food Sci Tech*, 2019; 54: 212-220.

Maretti-Mira AC, Salomon MP, Hsu AM, Kanel GC, Golden-Mason L. Hepatic damage caused by long-term high cholesterol intake induces a dysfunctional restorative macrophage population in experimental NASH. *Front Immunol*, 2022; 13: 968366.

Markowiak-Kopeć P, Ślizewska K. The Effect of Probiotics on the Production of Short-Chain Fatty Acids by Human Intestinal Microbiome. *Nutrients*, 2020; 12(4): 1107-1111.

McMurdie PJ, Holmes S. phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLoS One*, 2013; 8(4): e61217.

- Megur A, Daliri EB-M, Baltriukienė D, Burokas A. Prebiotics as a Tool for the Prevention and Treatment of Obesity and Diabetes: Classification and Ability to Modulate the Gut Microbiota. *Int J Mol Sci*, 2022; 23: 6097-6111.
- Metts B, Thatcher S, Lewis E, Karounos M, Cassis L, Smith R, Lodder RA. DDDAS Design of Drug Interventions for the Treatment of Dyslipidemia in ApoE^{-/-} Mice. *J Dev Drugs*, 2013; 2(2): 107.
- Milutinović A, Šuput D, Zorc-Pleskovič R. Pathogenesis of atherosclerosis in the tunica intima, media, and adventitia of coronary arteries: An updated review. *Bosn J Basic Med Sci*, 2020; 20(1): 21-30.
- Miralles-Pérez B, Nogués MR, Sánchez-Martos V, Fortuño-Mar À, Ramos-Romero S, Torres JL, Ponomarenko J, Amézqueta S, Zhang X, Romeu M. Influence of Dietary Inulin on Fecal Microbiota, Cardiometabolic Risk Factors, Eicosanoids, and Oxidative Stress in Rats Fed a High-Fat Diet. *Foods*, 2022; 11(24): 4072-4079.
- Mohanty D, Misra S, Mohapatra S, Sahu PS. Prebiotics and synbiotics: Recent concepts in nutrition. *Food Biosci*, 2018; 26: 152-160.
- Molina-Tijeras JA, Díez-Echave P, Vezza T, Hidalgo-García L, Ruiz-Malagón AJ, Rodríguez-Sojo MJ, Romero M, Robles-Vera I, García F, Plaza-Díaz J, Olivares M, Duarte J, Rodríguez-Cabezas ME, Rodríguez-Nogales A, Gálvez J. *Lactobacillus fermentum* CECT5716 ameliorates high fat diet-induced obesity in mice through modulation of gut microbiota dysbiosis. *Pharmacol Res*, 2021; 167: 105471.
- Murphy EA, Velazquez KT, Herbert KM. Influence of high-fat diet on gut microbiota: a driving force for chronic disease risk. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2015; 18(5): 515-520.
- Nagata Y, Mizuta N, Kanasaki A, Tanaka K. Rare sugars, d-allulose, d-tagatose and d-sorbose, differently modulate lipid metabolism in rats. *J Sci Food Agric*, 2018; 98(5): 2020-2026.

NASA, National Aeronautics and Space Administration (2004). A natural way to stay sweet. Erişim: [https://spinoff.nasa.gov/Spinoff2004/ch_4.html], Erişim Tarihi: 20 Kasım 2022.

National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation*, 2002; 106(25): 3143-3421.

Neelekanta G, Sultana H. The use of metagenomic approaches to analyze changes in microbial communities. *Microbiol Insights*, 2013; 16(6): 37-48.

Nemes K, Åberg F, Gylling H, Isoniemi H. Cholesterol metabolism in cholestatic liver disease and liver transplantation: From molecular mechanisms to clinical implications. *World J Hepatol*, 2016; 8(22): 924-932.

NHS, National Health Service (2022). Cardiovascular disease. Erişim: [<https://www.nhs.uk/conditions/cardiovascular-disease/>], Erişim Tarihi: 08 Kasım 2022.

Oh DK. Tagatose: properties, applications, and biotechnological processes. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007; 76(1): 1-8.

Olas B. Probiotics, Prebiotics and Synbiotics-A Promising Strategy in Prevention and Treatment of Cardiovascular Diseases? *Int J Mol Sci*, 2020; 21(24): 9737.

Onat A, Can G. Erişkinlerimizde kalp hastalıkları prevalansı, yeni koroner olaylar ve kalpten ölüm sıklığı. İçinde: Onat A, editör. TEKHARF 2017: Tıp dünyasının kronik hastalıklara yaklaşımına öncülük. Logos Yayıncılık, İstanbul, 2017; ss 20-25.

Ooi LG, Liong MT. Cholesterol-Lowering Effects of Probiotics and Prebiotics: A Review of in Vivo and in Vitro Findings. *Int J Mol Sci*, 2010; 11(6): 2499-2522.

- Oren A, Arahal DR, Göker M, Moore ERB, Rossello-Mora R, Sutcliffe IC. International Code of Nomenclature of Prokaryotes. Prokaryotic Code (2022 Revision). Int J Syst Evol Microbiol, 2023; 73(5a).
- Osman A, El-Gazzar N, Almanaa TN, El-Hadary A, Sitohy M. Lipolytic Postbiotic from *Lactobacillus paracasei* Manages Metabolic Syndrome in Albino Wistar Rats. Molecules, 2021; 26(2): 472-477.
- Ouimet M, Barrett TJ, Fisher EA. HDL and reverse cholesterol transport: Basic mechanisms and their roles in vascular health and disease. Circ Res, 2019; 124(10): 1505-1518.
- Oulas A, Pauloudi C, Polymenakou P, Pavlopoulos GA, Papanikolau N, Kotoulas G, Arvanitidis C, Iliopoulos I. Metagenomics: tools and insights for analyzing next-generation sequencing data derived from biodiversity studies. Bioinform Biol Insights, 2015; 5(9): 75-88.
- Önür ND, Beyler AR. Safra asitleri metabolizması. J Ankara Univ Fac Med, 2001; 54(1): 65-76.
- Özkan ÖP, Büyükünäl SK, Yiğit Z, İnci Y, Şakar FŞ, Ersü DÖ. Kardiyovasküler hastalık tanısı almış hastaların sağlıklı yaşam biçimi davranışlarının değerlendirilmesi. Mersin Univ Sağlık Bilim Derg, 2019; 12(1): 22-31.
- Pandey KR, Naik SR, Vakil BV. Probiotics, prebiotics and synbiotics-a review. J Food Sci Technol, 2015; 52(12): 7577-7587.
- Patra F, Tomar SK, Arora S. Technological and functional applications of low-calorie sweeteners from lactic acid bacteria. J Food Sci, 2009; 74(1): 16-23.
- Pereira DIA, Gibson GR. Cholesterol Assimilation by Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria Isolated from the Human Gut. Appl Environ Microbiol, 2002; 68: 4689-4693.
- Petrosino JF, Highlander S, Luna RA, Gibbs RA, Versalovic J. Meatgenomic pyrosequencing and microbial identification. Clin Chem, 2009; 55(5): 856-866.

- Pintarič M, Langerholc T. Probiotic Mechanisms Affecting Glucose Homeostasis: A Scoping Review. *Life (Basel)*, 2022; 12(8): 1187-1196.
- Police SB, Harris JC, Lodder RA, Cassis LA. Effect of diets containing sucrose vs. D-tagatose in hypercholesterolemic mice. *Obesity (Silver Spring)*, 2009; 17(2): 269-275.
- PubMed, National Center for Biotechnology Information (2022). Erişim: [https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=hypercholesterolemia+and+prebiotic&filter=datesearch.y_5], Erişim Tarihi: 19 Kasım 2022.
- R Project, R Core Team (2022). R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing. Erişim: [<https://www.r-project.org/>], Erişim Tarihi: 15 Aralık 2022.
- Rani K, Ali SA, Kaul G, Behare PV. Protective effect of probiotic and prebiotic fermented milk containing *Lactobacillus fermentum* against obesity-induced hepatic steatosis and inflammation. *J Food Biochem*, 2022; 46(12): e14509.
- Reis SA, Conceição LL, Rosa DD, Siqueira NP, Peluzio MCG. Mechanisms responsible for the hypocholesterolaemic effect of regular consumption of probiotics. *Nutr Res Rev*, 2017; 30(1): 36-49.
- Rinninella E, Raoul P, Cintoni M, Franceschi F, Migliano GAD, Gasbarrini A, Mele MC. What is the healthy gut microbiota composition? A changing ecosystem across age, environment, diet and diseases. *Microorganisms*, 2019; 7(1): 14-29.
- Rohatgi A. Lipid Measurements. In: de Lemos JA, Omland T (eds), *Chronic Coronary Artery Disease* (1st ed). Elsevier, Philadelphia 2018; p.: 88-97.
- Ross, R. The pathogenesis of atherosclerosis. *Nature*, 1993; 362: 801-809.
- Roswell M, Dushoff J, Winfree R. A conceptual guide to measuring species diversity. *Oikos*, 2021; 130(3): 321-338.

- Roy S, Chikkerur J, Roy SC, Dhali A, Kolte AP, Sridhar M, Samanta AK. Tagatose as a Potential Nutraceutical: Production, Properties, Biological Roles, and Applications. *J Food Sci*, 2018; 83(11): 2699-2709.
- Rutsch A, Kantsjö JB, Ronchi F. The Gut-Brain Axis: How Microbiota and Host Inflammation Influence Brain Physiology and Pathology. *Front Immunol*, 2020; 11: 604179.
- Salminen S, Collado MC, Endo A, Hill C, Lebeer S, Quigley EMM, Sanders ME, Shamir R, Swann JR, Szajewska H, Vinderola G. The International Scientific Association of Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of postbiotics. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2021; 18(9): 649-667.
- Sangwan S, Singh R. Synergistic effect of oats and LGG fermented milk on lowering hypercholesterolemia in rats. *J Cereal Sci*, 2018; 82: 164-69.
- Saunders JP, Zehner LR, Levin GV. Disposition of D-[U-14C]tagatose in the rat. *Regul Toxicol Pharmacol*, 1999; 29(2): 46-56.
- Schloss PD. Amplicon Sequence Variants Artificially Split Bacterial Genomes into Separate Clusters. *mSphere*, 2021; 6(4): e0019121.
- Segata N, Izard J, Waldron L, Gevers D, Miropolsky L, Garnett WS, Huttenhower C. Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biol*, 2011; 12(6): R60.
- Sharma S, Kurpad AV, Puri S. Potential of probiotics in hypercholesterolemia: A meta-analysis. *Indian J Public Health*, 2016; 60(4): 280-286.
- Shehata MG, El-Sahn MA, El Sohaimy SA, Youssef MM. Role and mechanisms lowering cholesterol by dietary of probiotics and prebiotics: A review. *J Appl Sci*, 2019; 19(8): 737-746.
- Shimokawa, H. Primary endothelial dysfunction: atherosclerosis. *J Mol Cell Cardiol*, 1999; 31(1): 23-37.

- Shin NR, Whon TW, Bae JW. Proteobacteria: microbial signature of dysbiosis in gut microbiota. *Trends Biotechnol*, 2015; 33(9): 496-503.
- Shobharani P, Halami PM. In vitro evaluation of the cholesterol-reducing ability of a potential probiotic *Bacillus* spp. *Ann Microbiol*, 2016; 66: 643-651.
- Sidira M, Galanis A, Ypsilantis P, Karapetsas A, Progaki Z, Simopoulos C, Kourkoutas Y. Effect of probiotic-fermented milk administration on gastrointestinal survival of *Lactobacillus casei* ATCC 393 and modulation of intestinal microbial flora. *J Mol Microbiol Biotechnol*, 2010; 19(4): 224-230.
- Sitia S, Tomasoni L, Atzeni F, Ambrosio G, Cordiano C, Catapano A, Tramontana S, Perticone F, Naccarato P, Camici P, Picano E, Cortigiani L, Bevilacqua M, Milazzo L, Cusi D, Barlassina C, Sarzi-Puttini P, Turiel M. From endothelial dysfunction to atherosclerosis. *Autoimmun Rev*, 2010; 9(12): 830-834.
- Sivamaruthi BS, Bharathi M, Kesika P, Suganthi N, Chaiyasut C. The Administration of Probiotics against Hypercholesterolemia: A Systematic Review. *Appl Sci*, 2021; 11(15): 6913-6919.
- Skytte UP. Tagatose. In: Mitchell H (ed), *Sweeteners and Sugar Alternatives in Food Technology*. Blackwell Publishing, Oxford 2006; p.: 262-294.
- Śliż D, Marcinkiewicz A, Olejniczak D, Jankowski P, Staniszevska A, Mamcarz A, Walusiak-Skorupa J. Hypercholesterolemia and prevention of cardiovascular diseases in the light of preventive medical examinations of employees in Poland. *Int J Occup Med Environ Health*, 2019; 32(6): 865-872.

- Stary HC, Chandler AB, Glagov S, Guyton JR, Insull Jr W, Rosenfeld ME, Schaffer SA, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW. A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation*, 1994; 89(5): 2462-2478.
- Tan S, Caparros-Martin JA, Matthews VB, Koch H, O’Gara F, Croft KD, Ward NC. Isoquercetin and inulin synergistically modulate the gut microbiome to prevent development of the metabolic syndrome in mice fed a high fat diet. *Sci Rep*, 2018; 8(1): 10100.
- Tanrıverdi B, Savaş Tetik Ş. Aterosklerozun Patofizyolojisi ve Risk Faktörleri. *Marmara Pharm J*, 2017; 21: 1-9.
- Tap J, Furet JP, Bensaada M, Philippe C, Roth H, Rabot S, Lakhdari O, Lombard V, Henrissat B, Corthier G, Fontaine E, Doré J, Leclerc M. Gut microbiota richness promotes its stability upon increased dietary fibre intake in healthy adults. *Environ Microbiol*, 2015; 17(12): 4954-4964.
- TCSB, Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı (2021). Türkiye Bulaşıcı Olmayan Hastalıklar ve Risk Faktörleri Kohort Çalışması. Erişim: [https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/kronik-hastaliklar-engelli-db/hastaliklar/kalpvedamar/raporlar_ist/v9s_NCD.kohort_27.10.2021.pdf] , Erişim Tarihi: 07 Mayıs 2023.
- TEMED, Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Derneği (2021). Dislipidemi ve Tanı ve Tedavi Kılavuzu. Erişim: [http://www.temd.org.tr/admin/uploads/tbl_gruplar/20180525144116-2018-05-25tbl_gruplar144111.pdf], Erişim Tarihi: 18 Kasım 2022.
- Teng Y, Wang Y, Tian Y, Chen YY, Guan WY, Piao CH, Wang YH. *Lactiplantibacillus plantarum* LP104 ameliorates hyperlipidemia induced by AMPK pathways in C57BL/6N mice fed high-fat diet. *J Funct Foods*, 2020; 64: 103665.

- Thakkar PN, Patel A, Modi HA, Prajapati JB. Hypcholesterolemic Effect of Potential Probiotic *Lactobacillus fermentum* Strains Isolated from Traditional Fermented Foods in Wistar Rats. Probiotics Antimicrob Proteins, 2020; 12(3): 1002-1011.
- THSA (BOH – RFP), Türkiye Hanehalkı Sağlık Araştırması “Bulaşıcı Olmayan Hastalıkların Risk Faktörleri Prevalansı, 2017 (STEPS). Erişim: [https://cdn.who.int/media/docs/default-source/ncds/ncd-surveillance/data-reporting/turkey/factsheet-steps-turkey-tur-08.10.2018.pdf?sfvrsn=6e6c0c0d_1&download=true], Erişim Tarihi: 07 Mayıs 2023.
- THSK, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu. Türkiye Kalp ve Damar Hastalıkları Önleme ve Kontrol Programı 2015-2020. T.C. Sağlık Bakanlığı Yayınları, Ankara, 2015; ss 11-20.
- Tsai CC, Lin PP, Hsieh YM, Zhang ZY, Wu HC, Huang CC. Cholesterol-lowering potentials of lactic acid bacteria based on bile-salt hydrolase activity and effect of potent strains on cholesterol metabolism in vitro and in vivo. Sci World J, 2014; 2014: 690752.
- Turan MK, Günay ÖC, Kayış SA, Çörtük M. Mikrobiyotada 16S rRNA ve basit biyoinformatik analizler. J Biotechnol Strateg Health Res, 2018; 2(1): 23-34.
- TÜİK, Türkiye İstatistik Kurumu (2020). Ölüm ve Ölüm Nedeni İstatistikleri, 2019. Erişim: [<https://data.tuik.gov.tr/Bulten/Index?p=Olum-ve-Olum-Nedeni-Istatistikleri-2019-33710>], Erişim Tarihi: 08 Kasım 2022.
- Türkvatan Cansever A. 104 soruda lipidler ve kardiyovasküler etkileri. Turk Kardiyol Dern Ars, 2016; 44(Suppl 4): 1-141.
- van der Wal AC, Becker AE. Atherosclerotic plaque rupture-pathologic basis of plaque stability and instability. Cardiovasc Res, 1999; 41(2): 334-44.

- van Zanten GC, Krych L, Röytiö H, Forssten S, Lahtinen SJ, Abu Al-Soud W, Sørensen S, Svensson B, Jespersen L, Jakobsen M. Synbiotic *Lactobacillus acidophilus* NCFM and cellobiose does not affect human gut bacterial diversity but increases abundance of lactobacilli, bifidobacteria and branched-chain fatty acids: a randomized, double-blinded cross-over trial. *FEMS Microbiol Ecol*, 2014; 90(1): 225-236.
- Vastenavond CM, Bertelsen H, Hansen SJ, Laursen RS, Saunders J, Eriknauer K. Tagatose (D-tagatose). In: O'Brien-Nabors L (ed), *Alternative Sweeteners* (4th ed). CRC Press, Boca Raton 2012; pp.: 198-222.
- Vázquez-Manjarrez N, Guevara-Cruz M, Flores-López A, Pichardo-Ontiveros E, Tovar AR, Torres N. Effect of a dietary intervention with functional foods on LDL-C concentrations and lipoprotein subclasses in overweight subjects with hypercholesterolemia: Results of a controlled trial. *Clin Nutr*, 2021; 40(5): 2527-2534.
- Villanueva-Suárez MJ, Pérez-Cózar ML, Mateos-Aparicio I, Redondo-Cuenca A. Potential fat-lowering and prebiotic effects of enzymatically treated okara in high-cholesterol-fed Wistar rats. *Int J Food Sci Nutr*, 2016; 67(7): 828-33.
- Visseren FLJ, Mach F, Smulders YM, Carballo D, Koskinas KC, Bäck M, Benetos A, Biffi A, Boavida JS, Capodanno D, Cosyns B, Crawford C, Davos CH, Desormais I, Di Angelantonio E, Franco OH, Halvorgen S, Hobbs FDR, Hollander M, Jankowska EA, Michal M, Sacco S, Sattar N, Tokgozoglu L, Tonstad S, Tsioufis KP, van Dis I, van Gelder IC, Wanner C, Williams B, ESC Scientific Document Group. 2021 ESC Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice. *Eur Heart J*, 2021; 42: 3227-37.
- Vu V, Muthuramalingam K, Singh V, Hyun C, Kim YM, Unno T, Cho M. Effects of β -glucan, probiotics, and synbiotics on obesity-associated colitis and hepatic manifestations in C57BL/6J mice. *Eur J Nutr*, 2022; 61(2): 793-807.

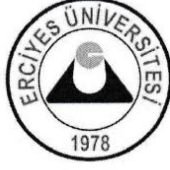
- Walters KE, Martiny JBH. Alpha-, beta-, and gamma-diversity of bacteria varies across habitats. PLoS One, 2020; 15(9): e0233872.
- Wang CS, Li WB, Wang HY, Ma YM, Zhao XH, Yang H, Qian JM, Li JN. VSL#3 can prevent ulcerative colitis-associated carcinogenesis in mice. Worl J Gastroenterol, 2018; 24(37): 4254-4262.
- Wang G , Huang W , Xia Y , Xiong Z , Ai L . Cholesterol-lowering potentials of *Lactobacillus* strain overexpression of bile salt hydrolase on high cholesterol diet-induced hypercholesterolemic mice. Food Funct, 2019; 10(3): 1684-1695.
- Werner JJ, Koren O, Hugenholtz P, DeSantis TZ, Walters WA, Caporaso JG, Angenent LT, Knight R, Ley RE. Impact of training sets on classification of high-throughput bacterial 16s rRNA gene surveys. ISME J, 2012 ;6(1): 94-103.
- WHO, World Health Organization (2020). Leading causes of death and disability 2000-2019: A visual summary. Erişim: [<https://www.who.int/data/stories/leading-causes-of-death-and-disability-2000-2019-a-visual-summary>], Erişim Tarihi: 08 Kasım 2022.
- Williams J, Ensor C, Gardner S, Smith R, Lodder A. BSN723T prevents atherosclerosis and weight gain in ApoE knockout mice fed a western diet. Webmedcentral, 2015; 6(12): WMC005034.
- Williams JB. The development of BSN272 from prevention of diet-induced hyperlipidemia in mice to a potential therapy for prader-willi syndrome in humans,. Doctoral Dissertation, University of Kentucky College of Pharmacy, Lexington 2017; p.: 4-6.
- World Health Organization: Food and Agriculture Organization of the United Nations. Probiotics in food. Health and nutritional properties and guidelines for evaluation. FAO Food Nutr Pap, 2006; 85: 1-50.

- Xie C, Gao W, Li X, Luo S, Chye FY. Study on the hypolipidemic properties of garlic polysaccharide in vitro and in normal mice as well as its dyslipidemia amelioration in type 2 diabetes mice. *Food Biosci*, 2022; 47: 101683.
- Xiong RG, Zhou DD, Wu SX, Huang SY, Saimaiti A, Yang ZJ, Shang A, Zhao CN, Gan RY, Li HB. Health Benefits and Side Effects of Short-Chain Fatty Acids. *Foods*. 2022; 11(18): 2863-2869.
- Xu D, Pan D, Liu H, Yang C, Yang X, Wang X, Liu F, Feng M, Wu Q, Shen Y, Yang L, Wang S, Sun G. Improvement in cardiometabolic risk markers following an oatmeal diet is associated with gut microbiota in mildly hypercholesterolemic individuals. *Food Res Int*, 2022b; 160: 111701.
- Xu W, Zou K, Zhan Y, Cai Y, Zhang Z, Tao X, Qiu L, Wei H. *Enterococcus faecium* GEFA01 alleviates hypercholesterolemia by promoting reverse cholesterol transportation via modulating the gut microbiota-SCFA axis. *Front Nutr*, 2022a; 9: 1020734.
- Yadav D, Kim SJ, Bae MA, Kim JR, Cho KH. The Ability of Different Ketohexoses to Alter Apo-A-I Structure and Function In Vitro and to Induce Hepatosteatosis, Oxidative Stress, and Impaired Plasma Lipid Profile in Hyperlipidemic Zebrafish. *Oxid Med Cell Longev*, 2018; 2018: 3124364.
- Yalınay M. Probiyotikler ve Prebiyotikler. Kitap: Altındış M (yazar), Mikrobiyota, Probiyotikler ve Akılcı Beslenme (1. Baskı). Nobel Akademik Yayıncılık, Ankara 2020; s.:511-13.
- Yang J, Li Y, Wen Z, Liu W, Meng L, Huang H. *Oscillospira* - a candidate for the next-generation probiotics. *Gut Microbes*, 2021; 13(1): 1987783.
- Zamora R, Hidalgo FJ. Lipoproteins. In: Caballero B, Finglas PM, Toldrá F (eds), *Encyclopedia of Food and Health* (1st ed). Academic Press, Oxford 2016; p.:544-49.
- Zengin H. Ateroskleroz patogenezi. *J Exp Clin Med*, 2012; 29: 101-106.

Zhao L, Shen Y, Wang Y, Wang L, Zhang L, Zhao Z, Li S. *Lactiplantibacillus plantarum* S9 alleviates lipid profile, insulin resistance, and inflammation in high-fat diet-induced metabolic syndrome rats. *Sci Rep*, 2022; 12(1): 15490-1599.

Zheng F, Wang Z, Stanton C, Ross RP, Zhao J, Zhang H, Yang B, Chen W. *Lactobacillus rhamnosus* FJSYC4-1 and *Lactobacillus reuteri* FGSZY33L6 alleviate metabolic syndrome via gut microbiota regulation. *Food Funct*, 2021; 12(9): 3919-3930.





Tarih: 06.01.2021

Toplantı Sayısı: 01

Karar No:21/13

Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 06.01.2021 tarihinde Prof. Dr. Gültekin ATALAN 'nın başkanlığında toplanmıştır.

Üye Adı/Soyadı	Ünvanı	Bölümü
Gültekin ATALAN	Prof. Dr.	Veteriner Fakültesi
Coşkun TEZ	Prof. Dr.	Fen Fakültesi
Vehbi GÜNEŞ	Prof. Dr.	Veteriner Fakültesi
Fusun Ferda ERDOĞAN	Prof. Dr.	Tıp Fakültesi
Yusuf KONCA	Prof. Dr.	Ziraat Fakültesi
Ahmet ÖZTÜRK	Prof. Dr.	Tıp Fakültesi
M. Betül AYCAN	Prof. Dr.	Eczacılık Fakültesi
Ayşe EKEN	Prof. Dr.	Eczacılık Fakültesi
Zühal HAMURCU	Doç. Dr.	Tıp Fakültesi
Sezer DEMİRBUĞA	Doç. Dr.	Diş Hekimliği Fakültesi
İbrahim KARAMAN	Doç. Dr.	Tıp Fakültesi
Çağrı Çağlar SİNMEZ	Doç. Dr.	Veteriner Fakültesi
Zeynep CAFEROĞLU	Dr.Öğr.Üyesi	Sağlık Bilimleri Fakültesi
Eray AKTUĞ	Arş. Gör. Dr.	Tarımsal Araştırma ve Uygulama Merkezi ERÜT.
Umut ALPMAN	Arş. Gör.	Genom ve Kök Hücre Merkezi (GENKÖK)
Mustafa ERMIŞ	Veteriner Hekim	DeneySEL Araştırmalar Uygulama ve Arş.Mrkz.
Ali KOÇ	Kurumla İlişkisi Olmayan Üye	Sivil Üye
Mehmet TAV	Dernek Üyesi (Avukat)	Sivil Toplum Kuruluşu Temsilcisi

Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimler Fakültesi Beslenme ve Diyetetik A.B.D. dan Doç.Dr. Hakan HAKİME NOĞAY tarafından sunulan “Hiperkolesterolemik Farelere Probiyotik ve D-tagatozun Sinbiyotik Olarak Verilmesinin Metabolik Parametreler ve Bağırsak Mikrobiyotası Üzerine Etkisi” başlıklı proje incelenerek çalışmanın yapılmasının uygun olacağına ve Rektörlük makamına sunulmasına oybirliğiyle karar verildi.

Tarih : 06.01.2021

Etik Kurul Başkanı : Prof. Dr. Gültekin ATALAN

Doktora TEZ

ORJİNALLIK RAPORU

%**7**

BENZERLİK ENDEKSİ

%**7**

İNTERNET KAYNAKLARI

%**2**

YAYINLAR

%**2**

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1

acikbilim.yok.gov.tr

İnternet Kaynağı

%**1**

2

openaccess.hacettepe.edu.tr:8080

İnternet Kaynağı

%**1**

3

ihslc.mehmetakif.edu.tr

İnternet Kaynağı

<%**1**

4

Submitted to Erciyes Üniversitesi

Öğrenci Ödevi

<%**1**

5

nek.istanbul.edu.tr:4444

İnternet Kaynağı

<%**1**

6

www.researchgate.net

İnternet Kaynağı

<%**1**

7

temd.org.tr

İnternet Kaynağı

<%**1**

8

9lib.net

İnternet Kaynağı

<%**1**

9

halksagligiokulu.org

İnternet Kaynağı

<%**1**

ÖZ GEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı, Soyadı: Mehmet ÇAVDAR

Uyruğu: Türkiye (TC)

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Yüksek Lisans	Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü	2017
Lisans	Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi	2013

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görev
2016 – Hâlen	Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bil. Fak.	Arş. Gör.
2015 – 2016	Erciyes Üniversitesi Sağlık Bil. Fak.	Arş. Gör.
2013 – 2015	Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Kültür ve Spor Daire	Diyetisyen

YABANCI DİL

İngilizce

YAYINLAR

1. Dinçer E, Çavdar M, Tekin T, Çavdar M. Adductor Pollicis Muscle Thickness and Its Relationship with Other Anthropometric Measurements: A Sample of Healthy Turkish Population. Hacettepe University Faculty of Health Sciences Journal, 2023; 10(1): 171-87.
2. Tekin T, Çavdar M, Dinçer E. Determination of Adductor Pollicis Muscle Thickness in Overweight or Obese Young Women. Bilge International Journal of Science and Technology Research, 2022; 6 (2): 106-11.
3. Çavdar M, Şahin H. Effect of nutritional education on serum potassium level in patients receiving haemodialysis Prog Nutr, 2021; 23(3): e2021115.
4. Çavdar M, Çavdar M. Besinler ve bazı besin öğelerinin akciğer kanseriyle ilişkisi. ERÜ Sağlık Bilimleri Fakültesi Dergisi, 2018; 5: 8-16.
5. Çavdar M, Çavdar M. Alternative Therapeutic Applications Used In The Treatment Of Ulcerative Colitis: Probiotics, Prebiotics, Synbiotics And Fecal Microbiota Transplantation. Prog Nutr, 2023; 25(2): e2023029.