









Tip 1 Diyabet Hastalarının Bağırsak Mikrobiyotasında *Lactobacillus Casei* ve *Lactobacillus Acidophilus* Miktarının Araştırılması

Investigation of *Lactobacillus Casei* and *Lactobacillus Acidophilus* Amount at Gut Microbiota from Adult Type 1 Diabetes Mellitus Patients

Mehmet Demirci¹ , Fatma Ela Temeloğlu Keskin² , Zeynep Taner³ , Mücahit Özyazar⁴ , Bekir S. Kocazeybek³ , Hrisi Bahar Tokman³ 

¹Beykent Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

²Gaziosmanpaşa Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Endokrinoloji ve Metabolizma Kliniği, İstanbul, Türkiye

³İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

⁴Yeni Yüzyıl Üniversitesi, Gaziosmanpaşa Hastanesi Endokrinoloji ve Metabolizma Kliniği, İstanbul, Türkiye

Cite this article as: Demirci M, Temeloğlu Keskin FE, Taner Z, Özyazar M, Kocazeybek BS, Tokman HB Investigation of *Lactobacillus Casei* and *Lactobacillus Acidophilus* Amount at Gut Microbiota from Adult Type 1 Diabetes Mellitus Patients. DOI: 10.5152/jarem.2018.2122

ÖZ

Amaç: Probiyotik özellikleri ile konakta koruyucu rolleri olduğu düşünülen *Lactobacillus acidophilus* ve *Lactobacillus casei*'nin erişkin tip 1 diyabet (T1DM) hastaları ve sağlıklı kontrol gruplarındaki bireylerin bağırsak mikrobiyotasındaki miktarlarının real-time PCR yöntemi kullanarak saptanması ve erişkin T1DM hastaları ve sağlıklı kontrol grupları arasında miktarlar açısından bir fark bulunup bulunmadığının belirlenerek, Tip 1 diyabet hastalarında bu probiyotik bakterilerin önemi hakkında bazı verilerin belirlenmesidir.

Yöntemler: Çalışma, Ocak 2014-Ekim 2014 tarihleri arasında, T1DM tanısı almış olan 53 erişkin hastadan ve sağlıklı kontrol grubunu oluşturan 53 sağlıklı bireyden alınan 106 dışkı örneği ile gerçekleştirildi. Dışkı örneklerinden DNA izolasyonları gerçekleştirildi. Elde edilen DNA'lar *L. acidophilus* ve *L. casei*'ye spesifik primerler yardımıyla real-time PCR sisteminde çalışıldı. Sonuçların istatistiksel analizi Mann-Whitney U testi ile yapıldı.

Bulgular: Çalışmamıza katılan tip 1 diyabet tanılı hastaların ve sağlıklı bireylerin ortalama yaşları $32,87 \pm 12,68$ 'dir. T1DM hastalarında saptanan vücut kitle indeksi (VKI), HbA1c ve açlık kan şekeri düzeylerinin, sağlıklı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı fark gösterdiği belirlenmiştir ($p < 0,001$). Buna karşın, bağırsak mikrobiyotasında saptanan *L. acidophilus* ve *L. casei* miktarı sağlıklı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede fark göstermemiştir ($p > 0,05$).

Sonuç: Bu çalışma ülkemizde, T1DM tanılı hastalar ve sağlıklı bireylerin bağırsak mikrobiyotasında *L. acidophilus* ve *L. casei* miktarlarının incelendiği ilk çalışmadır. Probiyotik etkinlikleri bilinen bu iki bakterinin ülkemiz erişkin T1DM'lu hastalarının bağırsak mikrobiyotasındaki miktarlarında, sağlıklı kontrollerine göre fark bulunmamıştır. Görüşümüz, T1DM ile bağırsak mikrobiyotasının birbirini karşılıklı tetikleyen döngüsü içinde, bu bakterilerin eksikliği ya da fazlalığının büyük önem taşıyabileceği yönünde olmuştur. Bu durumun, daha kapsamlı çalışmalarla aydınlatılmasında yarar olduğu kanaatindeyiz.

Anahtar kelimeler: *L. casei*, *L. acidophilus*, bağırsak mikrobiyotası, real-time PCR, tip 1 diyabet

ABSTRACT

Objective: The aim of this study were to determine the amount of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*, which are considered to have protective roles among the host-gut microbiota due to their probiotic properties, by using real-time polymerase chain reaction (PCR) and to compare between adult patients with type 1 diabetes mellitus (T1DM) and healthy individuals.

Methods: Between January 2014 and October 2014, a total of 106 stool samples comprising those of 53 adult patients who were diagnosed with T1DM and those of 53 healthy individuals who presented to an endocrinology clinic were included in the study. DNA was isolated from the stool samples and analyzed with specific primers for *L. acidophilus* and *L. casei* by real-time PCR. Statistical analyses, such as Mann-Whitney U test, were used to determine the difference among patients with T1DM and healthy individuals.

Results: The mean age of patients with T1DM and healthy individuals participating in the study was 32.87 ± 12.68 . A statistically significant difference was observed in the body mass index (BMI) and levels of HbA1c and fasting blood sugar of patients with T1DM when compared to those of the healthy individuals ($p < 0.001$). Conversely, no statistically significant difference was observed in the amount of *L. acidophilus* and *L. casei* detected in the gut of patients with T1DM when compared to that detected in the gut of healthy individuals ($p > 0.05$).

Conclusion: This study was the first to determine and compare the amounts of *L. acidophilus* and *L. casei* in the gut of patients with T1DM and healthy individuals. The amount of these bacteria with known probiotic activities is not different among patients with T1DM and healthy individuals, and there is no change in the amount of these bacteria in both the reciprocal triggering cycle of T1DM and gut microbiota. This situation needs to be clarified with comprehensive studies.

Keywords: *L. acidophilus*, *L. casei*, gut microbiota, real-time PCR, type 1 diabetes

ORCID IDs of the authors: M.D. 0000-0001-9670-2426; F.E.T.K 0000-0001-6101-800X; Z.T. 0000-0003-0336-1832; M.Ö. 0000-0001-5730-2948; B.S.K. 0000-0003-1072-3846; H.B.T 0000-0002-2205-5120.



Sorumlu Yazar / Corresponding Author: Mehmet Demirci,
E-posta: demircimehmet@hotmail.com, mehmetdemirci@beykent.edu.tr

Geleş Tarihi / Received Date: 20.04.2018 Kabul Tarihi / Accepted Date: 13.08.2018
© Telif Hakkı 2018 Sağlık Bilimleri Üniversitesi Gaziosmanpaşa Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi.
Makale metnine www.jarem.org web sayfasından ulaşılabilir.
© Copyright 2018 by University of Health Sciences Gaziosmanpaşa Taksim Training and Research Hospital. Available on-line at www.jarem.org
DOI: 10.5152/jarem.2018.2122

GİRİŞ

Tip 1 diabetes mellitus (T1DM), dünya çapında önemli bir sorun olan ve multifaktöryal karakterli bir otoimmün hastalıktır (1). Genetik ve çevresel faktörlerin kompleks interaksiyonu sonucu oluşur (2). İnsan bağırsağı lümeninde, 10^{14} mikroorganizma/mL içeren bir mikrobiyota içermekte ve bu mikrobiyotanın çevresel faktör olarak diyabet gelişimine, intestinal immün aktivasyon yoluyla katkı sağladığı belirtilmektedir (3, 4). Bağırsak mikrobiyotasının, hem doğal, hem de kazanılmış immün sistemin normal gelişiminde ana rol oynaması (5, 6), birey için gerekli çeşitli metabolik fonksiyonlara etki etmesi (7), insan ve hayvan modellerinde metabolik hastalıkların gelişiminde önemli rol oynadığının gittikçe fazla oranda gösteren veri alınması nedeniyle dikkatler son yıllarda bağırsak mikrobiyotasına yoğunlaşmıştır (5). Probiyotikler, konak sağlığını artırıcı etkileri olan, yaşayan canlı organizmalar olarak tanımlanırlar. Probiyotiklerin, in vitro olarak dentritik hücreleri, makrofajları, monositleri aktive ettiği ve böylece immün sistemi etkilediği gösterilmiştir (8). *Lactobacillus* spp. üyeleri arasından birçok tür, ticari probiyotik olarak kullanılmaktadır. Bu türler arasında *Lactobacillus acidophilus* ve *Lactobacillus casei* probiyotik potansiyelleri kanıtlanmış olan türlerdir (9). Bu bilgiler ışığında, biz de çalışmamızda, probiyotik özellikleri ile konakta koruyucu rolleri olduğu düşünülen *Lactobacillus acidophilus* ve *Lactobacillus casei*'nin real-time PCR yöntemi kullanarak erişkin T1DM hastaları ve sağlıklı kontrol gruplarında miktarlarının saptanmasını ve erişkin T1DM hastaları ve sağlıklı kontrol grupları arasında miktarlar açısından bir fark bulunup bulunmadığının ortaya konulmasını amaçladık.

YÖNTEMLER

Çalışma gruplarının oluşturulması

Bu çalışma, Ocak 2014-Ekim 2014 tarihleri arasında, Endokrinoloji Anabilim dalı polikliniğine başvuran ve tip 1 diyabet tanısı almış olan 53 erişkin hastadan ve sağlıklı kontrol grubunu oluşturan 53 sağlıklı bireyden alınan dışkı örnekleri ile İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Klinik araştırmalar etik kurulundan onay alınarak (Tarih: 31.10.2013, Karar No: 83045809/30339) Tıbbi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı laboratuvarlarında gerçekleştirildi. Çalışmaya dahil edilen her hasta ve her sağlıklı kontrolden yazılı onamları alındı.

Veriler analiz edilirken, istatistiksel açıdan yanılğı (bias) oluşmasını önlemek amacıyla, örneklem seçiminde eşleştirme metodu kullanılmıştır, bu amaçla sağlıklı kontrol grubu örnekleri, hasta grubu vakaları toplandıktan sonra, bu grup vakalarına yaş ve cinsiyet açısından bire bir eşleştirilen bireylerden alındı. Hasta ve kontrol grubunda yer alan bireylerin yaş aralıklarına göre gruplandırılmasında, hastalık kontrol merkezi (CDC)'nin diyabet tanısı alma oranına göre belirlediği yaş aralıkları dikkate alındı (10).

Tip 1 diyabet dışında bir hastalığı olmayan, obez olmayan, son iki hafta içinde antibiyotik kullanmamış olan, son bir ay içinde probiyotik kullanmamış olan, ergen olan (>18 yaş) ve anne ile babasından tip 1 diyabet tanısı olmayan bireyler çalışmamıza dahil edildi.

Numunelerin Toplanması ve Saklanması

Alınan dışkı örnekleri, plastik dışkı toplama kaplarına alınarak derhal laboratuvara getirilmiş ve bakterilere ait DNA izolasyon işlemleri yapılmaya kadar -20°C 'de saklandı.

Dışkı Örneklerinden DNA İzolasyonlarının Yapılması

Dışkı örneklerinden bakteriyel DNA izolasyonu, Magna Pure 96 DNA and Viral NA Small Volume kiti (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim Almanya) ve Dışkı numuneleri transport ve geri kazanım solüsyonu (S.T.A.R.buffer) (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim Almanya) kullanılarak Magna Pure 96 (Roche Diagnostics, Mannheim, Almanya) sisteminde üretici protokolleri takip edilerek yapıldı. Elde edilen DNA'lar nanodrop spektrofotometre (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE, USA) aracılığıyla kontrol edilerek, 260 nm 'de konsantrasyonlarının ve $260/280\text{ nm}$ 'de saflıklarının ölçümü yapıldı.

Bakteriyel Kontrol Kökenlerinin Üretimi ve Plazmid Standartlarının Oluşturulması

Real-time PCR çalışmalarında *L. acidophilus* ve *L. casei* sonuçlarının kontrolü için pozitif kontrol olarak ve ayrıca plazmid standartlarının oluşturularak real-time PCR standart eğrilerinin oluşturulması amacıyla, *L. acidophilus* için ATCC 4356 ve *L. casei* için ATCC 393 standart kökenleri kullanıldı. *L. acidophilus* ATCC 4356 ve *L. casei* ATCC 393 kontrol kökenlerinin üretimi için laboratuvarında, zenginleştirilmiş Schaedler agar besiyeri ve Rogosa agar (RogA) (Fluka, Sigma İsviçre) besiyerlerine ekimler yapıldı. Bu besiyerleri anaerop jarlarda anaerop ortam sağlayıcılar (Oxoid Anaerogen, BD GasPak EZ Anaerobe Container System) ile 37°C 'de 72 saat inkübe edildi. Plazmid standartların oluşturulması için 48 saatlik saf koloniler steril bir öze ile alınıp, ayrı ayrı ependorf tüplerindeki 1 ml 'lik sodyum fosfat tamponu (PBS) içine inoküle edildi. Yoğunlukları 1 McFarland'a göre ayarlandı. Üretilen bu kökenlerden Bioeksen Ltd (İstanbul, Turkey) tarafından hazırlanan plazmid standartları real-time PCR'da standart eğri oluşturulması amacıyla kullanıldı.

Real-Time PCR Yöntemi ile *L. acidophilus* ve *L. casei* Miktarının Tayini

DNA'lardan *L.acidophilus* ve *L.casei* miktarlarının saptanması için tablo 1'deki Hsp60, groEL bölgesi spesifik primer ve probalar kullanılarak LightCycler 480 II (Roche Diagnostics, Mannheim, Almanya) real-time PCR sisteminde, Fast Start Essential Probe Master Mix kiti (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim Almanya) ile her bir reaksiyona tablo 2'deki reaktif miktarları yüklenerek üretici direktifleri doğrultusunda çalışma yapıldı (11, 12). Her bir reaksiyonda 5 ul bakteriyel DNA kullanıldı. PCR profili başlangıç aktivasyon aşaması olarak; 95°C 'da 10 dakika, takiben 45 siklus, denaturasyon, uzama ve çoğaltma aşaması olarak sırasıyla 95°C 'da 10 sn, 60°C 'da 30 sn ve 72°C 'da 1 sn şeklinde gerçekleştirildi. Her numune için deney 3 kere tekrar edildi. Real-time PCR cihazı her numunenin real-time PCR'da aldığı Cp değerini, plazmid standartlar aracılığıyla elde edilen standart eğriye göre otomatik değerlendirdi ve bakteri miktarları ölçüldü.

İstatistiksel Analiz

Araştırmamızda Tip 1 Diyabet tanısı almış hastalar ve sağlıklı bireylerin dışkı numunelerinden saptanan *L.acidophilus* ve *L. casei* miktarlarının hasta ve kontrol grupları arasında fark gösterip göstermediği Statistical Package for the Social Sciences 20.0 software (IBM SPSS Corp.; Armonk, NY, USA) programında Mann-Whitney U analizi yapılarak belirlendi.

BULGULAR

Tip 1 diyabet tanısı almış 53 hasta ve 53 sağlıklı bireyle gerçekleştirdiğimiz bu çalışmada, hastaların 28'inin erkek, 25'inin ise kadın olduğu belirlenmiştir. Çalışmamıza katılan hastaların ortalama

Tablo 1. *L. acidophilus* ve *L. casei* miktarının real-time PCR ile belirlenmesinde kullanılan primer setleri

Primer adı	Sekans	Referans
<i>L. acidophilus</i> F	5' ATGGAAAAGGTTGGCCA'3	11
<i>L. acidophilus</i> R	5' TCAGTTACCATGTATTGTGACA'3	11
<i>L. acidophilus</i> Prob	FAM'TCGAAGATTACGTTGGTATCAATAC'Tamra	11
<i>L.casei</i> F	5'CTATAAGTAAGCTTTGATCCGGAGATTT'3	12
<i>L.casei</i> R	5'CTTCCTGCGGGTACTGAGATGT'3	12
<i>L.casei</i> Prob	Fam'ACAAGCTATGAATTCACCTTGC'Tamra	12

F: forward (ileri) primer; R: reverse (geri) primer

Tablo 2. *L. acidophilus* ve *L. casei* mastermiks hazırlama protokolü

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

F: forward; R: reverse

Tablo 3. Çalışmamıza dahil edilen hasta ve sağlıklı kontrollerin demografik özelliklerine ait verilerin karşılaştırılması

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

*Yaş ortalaması 19-61 yaş aralığına göre hesaplanmıştır

** Mann whitney U ile hesaplanmıştır.

VKI: vücut kitle indeksi; S: sayı, AKŞ: açlık kan şekeri

yaşları 32,87±12,68, sağlıklı kontrollerde hastalarla eşleştirilmiş 28'inin erkek, 25'inin ise kadın olarak oluşturulmuştur. Ortalama yaşları da, hastalarla benzer ve 32,87±12,68'dir.

Sağlıklı kontrol grubunda ortalama vücut kitle indeksi (VKI) 20,23±1,70 kg/m² iken, T1DM hastalarında 23,25±1,63 kg/m² olarak bulunmuştur. Ortalama HbA1c sağlıklı kontrol grubunda % 4,19±1,11, T1DM hasta grubunda ise %8,69±1,91 olarak saptanmıştır. Diğer önemli bir parametre olan açlık kan şekeri (AKŞ) ortalama düzeyi sağlıklı kontrol grubunda 91,0±5,67 mg/dL iken, T1DM hasta grubunda 133,4±62,44 mg/dL olarak belirlenmiştir.

Tablo 4. Hasta ve kontrol grubundaki erkeklerde *L.acidophilus*, *L.casei* miktarlarının yaş gruplarına göre karşılaştırılması

	Yaş Grupları	Tip 1 Diyabet Hastaları	Sağlıklı Kontrol grubu	p*
<i>L. acidophilus</i>	19-29 Yaş	4,86±0,22	4,85±0,21	0,852
	31-44 Yaş	4,93±0,08	4,93±0,12	0,833
	49-61 yaş	4,96±0,15	4,97±0,14	0,834
	Tüm yaşlar	4,90±0,18	4,89±0,18	0,854
<i>L. casei</i>	19-29 Yaş	4,19±0,19	4,23±0,17	0,361
	31-44 Yaş	4,18±0,22	4,37±0,24	0,156
	49-61 yaş	4,35±0,19	4,33±0,16	0,917
	Tüm yaşlar	4,22±0,20	4,29±0,20	0,125

*Mann-Whitney U testi ile hesaplanmıştır

Tablo 5: Hasta ve kontrol grubundaki kadınlarda *L.acidophilus*, ve *L.casei* miktarlarının yaş gruplarına göre karşılaştırılması

	Yaş Grupları	Tip 1 Diyabet Hastaları	Sağlıklı Kontrol grubu	p*
<i>L.acidophilus</i>	19-28 Yaş	4,95±0,14	4,98±0,11	0,664
	31-41 Yaş	4,89±0,11	4,90±0,09	0,798
	43-56 yaş	5,01±0,10	5,06±0,14	0,196
	Tüm yaşlar	4,94±0,13	4,98±0,12	0,454
<i>L.casei</i>	19-28 Yaş	4,20±0,21	4,31±0,28	0,340
	31-41 Yaş	4,23±0,28	4,34±0,27	0,306
	43-56 yaş	4,26±0,19	4,31±0,16	0,749
	Tüm yaşlar	4,22±0,22	4,32±0,24	0,143

*Mann-Whitney U testi ile hesaplanmıştır

Hastalarda saptanan VKI, HbA1c ve AKŞ düzeylerinin, sağlıklı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı fark gösterdiği belirlenmiştir (p<0.001) (Tablo 3).

Tip 1 diabetes mellitus'lu hasta erkeklerin ve kadınların 1 gram dışkıında bulunan *L.acidophilus* ve *L.casei* miktarları bakımından T1DM'lu hastalar ve sağlıklı kontroller arasında tüm yaş gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadığı belirlenmiştir ($p>0,05$). Şekil 1 ve Şekil 2'de *L. casei* ve *L. acidophilus* için yapılan real-time PCR çalışması sonucu alınan çoğalma eğrileri görülmektedir.

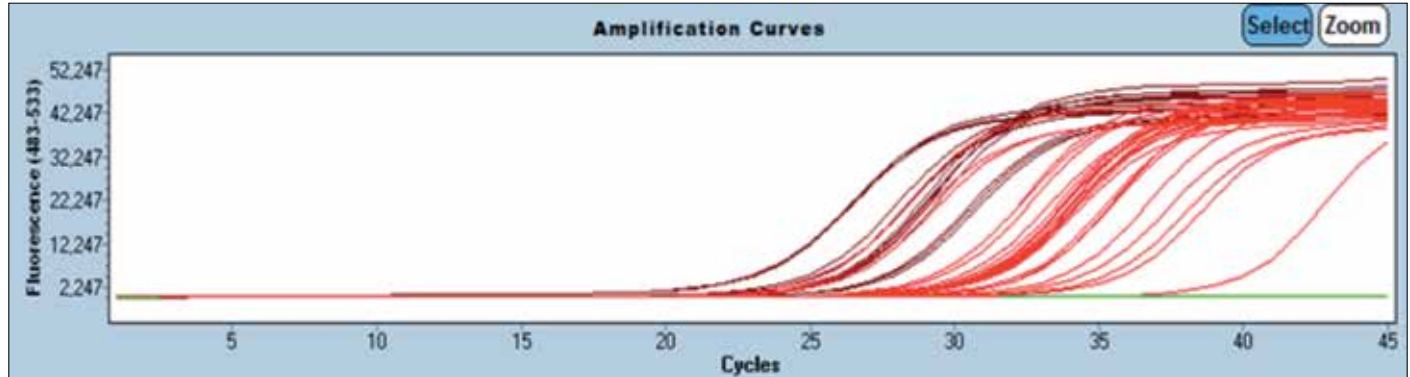
Çalışmamızda T1DM'lu hasta ve sağlıklı kontrol grubundaki erkeklerin dışkılarından izole edilen DNA'larından yapılan real-time PCR çalışması sonucunda 1 gram dışkıda elde edilen \log_{10} *L.acidophilus* ve *L.casei* miktarlarının ortalama değerleri yaş gruplarına göre incelendiğinde, hasta erkeklerde saptanan *L.acidophilus* ve *L.casei* miktarı tüm yaş gruplarında sağlıklı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde fark göstermemiştir ($p>0,05$). Yaş gruplarına bakılmaksızın çalışmamıza katılan tüm T1DM'lu erkek hastalarda saptanan *L.acidophilus* ve *L.casei* miktarlarında, sağlıklı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0,05$) (Tablo 4).

Aynı şekilde T1DM'lu hasta ve sağlıklı kontrol grubundaki kadınların dışkılarından izole edilen DNA'larından yapılan real-time PCR çalışması sonucunda 1 gram dışkıda elde edilen \log_{10} *L.acidophilus* ve *L.casei* miktarlarının ortalama değerleri yaş gruplarına göre incelendiğinde, gerek 19-28, gerekse 31-41 ve 43-56 yaş aralıklarındaki kadınlarda saptanan *L.acidophilus* ve *L.casei* miktarı sağlıklı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde fark göstermemiştir ($p>0,05$). Yaş gruplarına bakılmaksızın çalışmamıza katılan tüm T1DM'lu kadın hastalarda saptanan *L.acidophilus* ve *L.casei* miktarlarında, sağlıklı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0,05$, $p>0,05$) (Tablo 5).

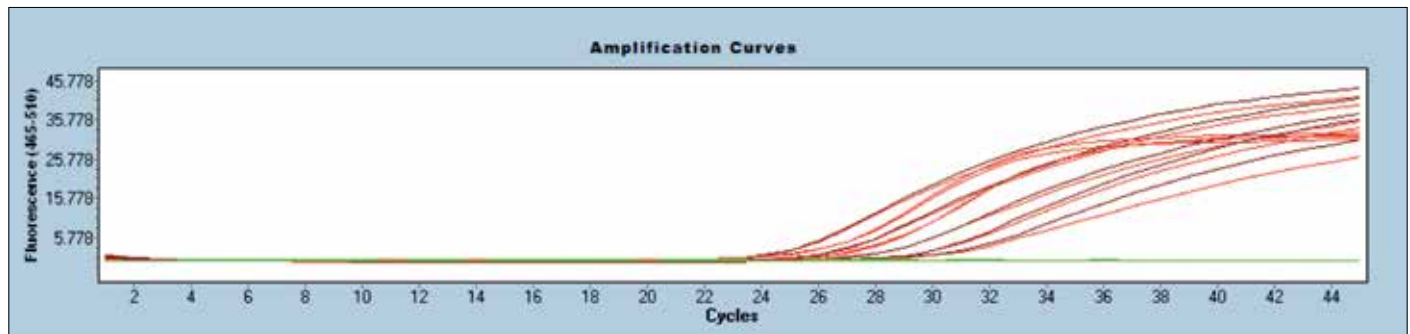
TARTIŞMA

Dünyada en sık görülen endokrin hastalık olarak tanımlanan T1DM, genetik ve çevresel faktörlerin etkisi ile oluşan, multifaktöryel, otoimmün bir hastalık olarak bilinmektedir (1, 2). Son yıllarda biyoinformatik gelişmeler ve ilerleyen moleküler teknikler toplu yaşayan mikroorganizmalar hakkında kapsamlı araştırmaların başlatılabilmesine imkan tanımıştır (13).

Ulusal ve uluslararası kaynaklarda, erişkin T1DM tanısı almış bireylerin bağırsak mikrobiyotasındaki probiyotik etkinlikleri ile tanınan *L.casei* ve *L.acidophilus* türleri hakkında yayınlanmış bir veriye rastlayamadık. Özellikle, erişkinlere ait verileri içeren makaleler henüz bulunmadığından, çalışmamızdaki bulguları çocuklar üzerine yapılmış çalışmalara ait verilerle kısmen kıyaslayabildik. Murri ve ark. (2) 2013 yılında T1DM'lu çocukların bağırsak mikrobiyotasında *Lactobacillus* spp. miktarının kontrol grubuna göre düşük olduğunu, Brown ve ark. (14), ise T1DM'lu 8 çocuğun dışkı örneklerinde yaptıkları 16S rRNA analizi sonucunda, *Lactobacillus* spp. miktarlarının, kontrol gruplarına göre yüksek olduğunu belirtmişlerdir. Bu araştırmacıların çalıştıkları olgu sayısı bizim araştırmamızdaki olgu sayısına göre çok düşük ve kullandıkları test yöntemi, bizimkinden farklı olduğu için ayrıca tür düzeyinde değil de yalnızca *Lactobacillus* cinsi düzeyinde bir bilgi sundukları için, T1DM'lu hastaların bağırsak mikrobiyotasındaki probiyotik etkinlikleri ile tanınan *L. casei* ve *L. acidophilus* türleri hakkında kesin kabul görmüş bir sonuca henüz varılmadığı kanaatindeyiz. Bununla beraber, her ne kadar araştırmamız insanlar üzerine veriler içerse de benzer konuda yayınların bulunmamasına bağlı olarak bulgularımızı yapılmış olan hayvan deneyleri ile karşılaştırdık. Valladares ve ark. (15) diyabet dirençli BB-DR sıçanlardan izole ettikleri *Lactobacillus johnsonii* ile besledikleri diyabet eğilimli



Şekil 1. *L. casei* çoğalma eğrileri



Şekil 2. *L. acidophilus* çoğalma eğrileri

BB-DP sıçanlarda normalde 69. günde saptadıkları T1DM'un 141. güne kadar gelişmediğini ve bu sıçanların ileal mukozalarından aldıkları örneklerde *Lactobacillus* türlerini incelediklerinde bu bakteri oranlarını yüksek saptadıklarını bildirmişlerdir. Araştırmacıların bu verilerine göre bağırsak mikrobiyotasında bazı *Lactobacillus* türlerindeki artışa bağlı olarak T1DM'un etkilendiği düşünülebilir. Bizim araştırmamızda incelediğimiz *Lactobacillus* türleri farklı olmakla beraber, T1DM'lu hastalarda saptadığımız ortalama *L. acidophilus* ve *L. casei* miktarlarında kontrol gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadığını belirledik. Ancak *L. acidophilus* ve *L. casei* türlerinin uzun süre BB-DP (diyabet eğilimli sıçan) sıçanlara verilmesi sonucunda ne gibi değişimler görülebileceğini belirlemek için kapsamlı hayvan deneyleri içeren araştırmalar gerekmektedir.

SONUÇ

Probiyotik özellikleri ile tanınan *L.acidophilus* ve *L.casei*'nin T1DM'lu kadın ve erkek hastalarda, sağlıklı kişilere göre miktar bakımından fark göstermemesi, T1DM ile bağırsak mikrobiyotasının birbirini karşılıklı tetikleyen döngüsü içinde, bu bakterilerin yerini belirlemeye yönelik daha kapsamlı araştırmalara gerek olduğunu göstermektedir. Elde ettiğimiz bulgularla kısıtlı verilerin bulunduğu bu noktaya dikkat çekilmek istenmiştir.

Etik Komite Onayı: İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Klinik araştırmalar etik kurulundan onay alınmıştır (Karar No: 83045809/30339; Tarih: 31.10.2013).

Hasta Onamı: Çalışmaya katılan hastalardan yazılı onam alınmıştır.

Yazar Katkıları: Fikir - H.B.T., M.D.; Tasarım - H.B.T., M.D., M.Ö., F.E.T.K.; Denetleme - H.B.T., M.D., M.Ö.; Kaynaklar - H.B.T., M.D., F.E.T.K., M.Ö., Z.T.; Malzemeler - H.B.T., M.D., Z.T.; Veri Toplanması ve/veya İşlemesi - M.D., Z.T., F.E.T.K.; Analiz ve/veya Yorum - H.B.T., M.D., B.S.K.; Literatür Taraması - H.B.T., M.D., B.S.K.; Yazıyı Yazan - H.B.T., M.D., B.S.K.; Eleştirel İnceleme - M.D., F.E.T.K., Z.T., M.Ö., B.S.K., H.B.T.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

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

Ethics Committee Approval: Ethics committee approval was received for this study from the Ethics Committee of Istanbul University-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Medical Faculty. (Decision No: 83045809/30339; Date: 31.10.2013)

Informed Consent: Written informed consent was obtained from patients who participated in this study.

Peer-review: Externally peer-reviewed.

Author Contributions: Concept - H.B.T., M.D.; Design - H.B.T., M.D., M.Ö., F.E.T.K.; Supervision - H.B.T., M.D., M.Ö.; Resources - H.B.T., M.D., F.E.T.K., M.Ö., Z.T.; Materials - H.B.T., M.D., Z.T.; Data Collection and/or

Processing - M.D., Z.T., F.E.T.K.; Analysis and/or Interpretation - H.B.T., M.D., B.S.K.; Literature Search - H.B.T., M.D., B.S.K.; Writing Manuscript - H.B.T., M.D., B.S.K.; Critical Review - M.D., F.E.T.K., Z.T., M.Ö., B.S.K., H.B.T.

Conflict of Interest: The authors have no conflict of interest to declare.

Financial Disclosure: The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. (Project No. 37749)

KAYNAKLAR

1. Saleh NM, Raj SM, Smyth DJ, Wallace C, Howson JMM, Bell L, et al. Genetic association analyses of atopic illness and proinflammatory cytokine genes with type 1 diabetes. *Diabetes Metab res rev* 2011; 27: 838-43.
2. Murri M, Leiva I, Gomez JM, Cardona F, Soriguer F, Tinahones FJ, et al. Gut microbiota in children with type 1 diabetes differs from that in healthy children: a case control study. *BMC Medicine* 2013; 11: 46.
3. Gomes AC, Bueno AA, de Souza RGM, Mota JF. Gut microbiota, probiotics and diabetes. *Nutrition Journal*. 2014; 13: 60.
4. Westerholm-Ormio M, Vaarala O, Pihkala P, Ilonen J, Savilahti E. Immunologic activity in the small intestinal mucosa of pediatric patients with type 1 diabetes. *Diabetes* 2003; 52: 2287-95.
5. Karlsson F, Tremaroli V, Nielsen J, Bäckhed F. Assessing the human gut microbiota in metabolic diseases. *Diabetes* 2013; 62: 3341-9.
6. Macpherson AJ, Uhr T. Induction of protective IgA by intestinal dendritic cells carrying commensal bacteria. *Science* 2004; 303: 1662-5.
7. Sommer F, Bäckhed F. The gut microbiota--masters of host development and physiology. *Nat Rev Microbiol* 2013; 11: 227-38.
8. Ljungberg M, Korpela R, Ilonen J, Ludvigsson J, Vaarala O. Probiotics for the prevention of beta cell autoimmunity in children at genetic risk of type 1 diabetes--the PRODIA study. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1079: 360-4.
9. Parra K, Ferrer M, Pi-ero M, Barboza Y, Medina LM. Use of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* for a potential probiotic legume-based fermented product using pigeon pea (*Cajanus cajan*). *J Food Prot* 2013; 76: 265-71.
10. CDC. Distribution of Age at Diagnosis of Diabetes Among Adult Incident Cases Aged 18-79 Years. 2011. Available from: URL: <http://www.cdc.gov/diabetes/statistics/age/fig1.htm>.
11. Herbel SR, Von Nickisch-Roseneck M, Kuhn M, Murugaiyan J, Wiler LH, Guenther S. Specific TaqMan Probes for the Identification and Quantification of *Lactobacilli* in Pharmaceuticals. *J Prob Health* 2014; 2: 1.
12. Monique H, Knol J. Quantitative Real-Time PCR Analysis of Fecal *Lactobacillus* Species in Infants Receiving a Prebiotic Infant Formula. *App. Env. Mic* 2006; 4: 2359-65.
13. NIH HMP Working Group, Peterson J, Garges S, Giovanni M, McInnes P, Wang L, et al. The NIH Human Microbiome Project. *Genome Res* 2009; 19: 2317-23.
14. Brown CT, Davis-Richardson AG, Giongo A, Gano KA, Crabb DB, Mukherjee N, et al. Gut microbiome metagenomics analysis suggests a functional model for the development of autoimmunity for type 1 diabetes. *PLoS One* 2011; 6: e25792.
15. Valladares R, Sankar D, Li N, Williams E, Mahmoud ASA, Lai K-K, et al. *Lactobacillus johnsonii* N6.2 mitigates the development of type 1 diabetes in BB-DP rats. *PLoS One* 2010; 5: e10507.