

ÖZET

PREVOTELLA'DAN EN AZ BİR BAKTERİ SUŞU KULLANARAK OBEZİTE,
METABOLİK SENDROM, TİP 2 DİYABET, KARDİYOVASKÜLER
5 HASTALIKLAR, DEMANS, ALZHEİMER HASTALIĞI VE ENFLAMATUVAR
BAĞIRSAK HASTALIĞININ TEDAVİSİ

Prevotellaceae türlerinden en az bir izole edilmiş bakteri
suşunu içeren obezite, metabolik sendrom, tip 2 diyabet,
10 kardiyovasküler hastalıklar, demans, alzheimer hastalığı ve
enflamatuvar bağırsak hastalığının tedavisinde kullanılan bir
ürün olup, burada suş, *Prevotella copri*, *Prevotella stercorea*,
Prevotella histicola, *Prevotella ruminicola*, *Prevotella*
Bryantii 25A ve *Prevotella distasonis*'ten oluşan gruptan
15 seçilir.Ürün bir gıda ürünü olabilir.

İSTEMLER

1. Obezite, metabolik sendrom, tip 2 diyabet, kardiyovasküler hastalıklar, demans, alzheimer hastalığı ve enflamatuvar bağırsak hastalığının tedavisinde kullanıma yönelik bir ürün olup, özelliği; ürünün *Prevotellaseae* türlerinden en az bir izole edilmiş bakteri suşunu içermesi, burada suşun, *Prevotella copri* ve *Prevotella ruminicola*'dan oluşan gruptan seçilmesidir.
2. İstem 1'e göre obezite, metabolik sendrom, tip 2 diyabet, kardiyovasküler hastalıklar, demans, alzheimer hastalığı ve enflamatuvar bağırsak hastalığının tedavisinde kullanıma yönelik ürün olup, özelliği; burada ürünün *Prevotella copri* içermesidir.
3. İstemler 1-2'nin herhangi birine göre obezite, metabolik sendrom, tip 2 diyabet, kardiyovasküler hastalıklar, demans, alzheimer hastalığı ve enflamatuvar bağırsak hastalığının tedavisinde kullanıma yönelik ürün olup, özelliği; burada ürünün en az bir tür diyet lifi içermesidir.
4. İstem 3'e göre obezite, metabolik sendrom, tip 2 diyabet, kardiyovasküler hastalıklar, demans, alzheimer hastalığı ve enflamatuvar bağırsak hastalığının tedavisinde kullanıma yönelik ürün olup, özelliği; burada ürünün en az bir dirençli nişasta içermesidir.
5. Önceki istemlerin herhangi birine göre obezite, metabolik sendrom, tip 2 diyabet, kardiyovasküler hastalıklar, demans, alzheimer hastalığı ve enflamatuvar bağırsak hastalığının tedavisinde kullanıma yönelik ürün olup, özelliği; burada bahsedilen ürünün genetik olarak modifiye edilmiş olmasıdır.
6. İstemler 1-5'in herhangi birine göre obezite, metabolik

- sendrom, tip 2 diyabet, kardiyovasküler hastalıklar, demans, alzheimer hastalığı ve enflamatuvar bağırsak hastalığının tedavisinde kullanıma yönelik ürün olup, özelliği; burada adı geçen diyet lifleri ve dirençli nişastanın, arpa, buğday, çavdar, yulaf lifi, beta-glukan gibi herhangi bir biçimde tahıllar ile ilgili olmasıdır.
- 5
7. İstem 6'ya göre obezite, metabolik sendrom, tip 2 diyabet, kardiyovasküler hastalıklar, demans, alzheimer hastalığı ve enflamatuvar bağırsak hastalığının tedavisinde kullanıma yönelik ürün olup, özelliği; burada bahsedilen diyet lifinin arpadan olmasıdır.
- 10
8. İstemler 1-7'in herhangi birine göre obezite, metabolik sendrom, tip 2 diyabet, kardiyovasküler hastalıklar, demans, alzheimer hastalığı ve enflamatuvar bağırsak hastalığının tedavisinde kullanıma yönelik ürün olup, özelliği; burada adı geçen dirençli nişastanın, arpa çekirdekleri, geriletilmiş nişasta, botanik olarak kapsüllenmiş nişasta, doğal jelatinleştirilmemiş nişasta, siklo-dekstrinler veya kimyasal olarak modifiye edilmiş nişasta esnasındaki gibi herhangi bir formda olmasıdır.
- 15
9. İstemler 1-8'in herhangi birine göre obezite, metabolik sendrom, tip 2 diyabet, kardiyovasküler hastalıklar, demans, alzheimer hastalığı ve enflamatuvar bağırsak hastalığının tedavisinde kullanıma yönelik ilave bir bakteriyel suş içeren ürün olup, özelliği; burada bahsedilen suşun süksinat üreten bir suş olmasıdır.
- 20
10. İstemler 1-9'un herhangi birine göre obezite, metabolik sendrom, tip 2 diyabet, kardiyovasküler hastalıklar, demans, alzheimer hastalığı ve enflamatuvar bağırsak hastalığının tedavisinde kullanıma yönelik ürün olup, özelliği; burada ürünün süksinat içermesidir.
- 25
11. İstemler 1-10'un herhangi birine göre obezite, metabolik
- 30

sendrom, tip 2 diyabet, kardiyovasküler hastalıklar, demans, alzheimer hastalığı ve enflamatuvar bağırsak hastalığının tedavisinde kullanıma yönelik ürün olup, özelliği; burada *Prevotellaceae* türünden bakteri suşunun kapsüllenmiş veya

5 liyofilize edilmesidir.

12. *Prevotellaseae* türlerinden en az bir izole edilmiş bakteriyel suş içeren bir ürün olup, özelliği; burada suşun *Prevotella copri* ve *Prevotella ruminicola*'dan oluşan gruptan seçilmesi ve burada ürünün ayrıca en az bir tür diyet lifi

10 içermesidir.

13. İstem 12'ye göre ürün olup, özelliği; burada ürünün tek bakteri suşu olarak, *Prevotellaseae* türünden bir bakteri suşu içermesi, burada suşun, *Prevotella copri* olmasıdır.

14. İstem 12'ye göre ürün olup, özelliği; burada ürünün ayrıca

15 ilave bir bakteriyel suş içermesi, burada bahsedilen suşun, bir süksinat üreten suş olmasıdır.

15. İstemler 12-14'ten herhangi birine göre ürün olup, özelliği; burada ürünün ayrıca süksinat içermesidir.

TARİFNAME

PREVOTELLA'DAN EN AZ BİR BAKTERİ SUŞU KULLANARAK OBEZİTE,
METABOLİK SENDROM, TİP 2 DİYABET, KARDİYOVASKÜLER HASTALIKLAR,
5 DEMANS, ALZHEİMER HASTALIĞI VE ENFLAMATUVAR BAĞIRSAK
HASTALIĞININ TEDAVİSİ

BULUŞUN ALANI

10 *Prevotellaceae* türlerinden en az bir izole edilmiş bakteri
suşunu içeren obezite, metabolik sendrom, tip 2 diyabet,
kardiyovasküler hastalıklar, demans, alzheimer hastalığı ve
enflamatuvar bağırsak hastalığının tedavisinde kullanılan bir
ürün olup, burada suş, *Prevotella copri* ve *Prevotella*
ruminicola'dan oluşan gruptan seçilir.

15 Ürün bir gıda ürünü olabilir.

BULUŞUN GEÇMİŞİ

20 Alandaki pek çok gıda ve içerik şirketi, gıda maddelerinin
yanında, kullanımı üzerine, temel besinleri sağlamanın yanı sıra
tüketiciye faydalı sağlık etkisi de sağlayan, fonksiyonel
gıdalar denilen içerik ve bunların yanında gıda ürünlerini
tanımlamak için çabalarını arttırmışlardır. Örnekler arasında,
bağırsak sağlığına özel sağlık yararları gösteren ve gıda
ürününe dahil edilen probiyotikler olarak adlandırılan, örneğin
25 fermente edilmiş süt, yoğurt gibi farklı süt ürünlerini ve farklı
içecekleri içeren canlı mikroorganizmalar bulunur. Sağlık
yararlarına sahip gıda ürünlerinin diğer örnekleri, diyet lifi
(DF), prebiyotik karbonhidratlar, stannol, omega-3 yağ asitleri,
vitaminler, polifenoller, düşük glisemik etkili gıdalar, ve
30 benzerlerini içeren besinlerdir.

Halk sağlığı açısından bakıldığında, glikoz metabolizmasını

iyileştirmek ve obeziteyi ve ilgili bozuklukları azaltmak için hareket edebilecek yeni gıda ürünlerinin geliştirilmesi için özel bir ihtiyaç bulunmaktadır. Glukoz metabolizmasında bozulma da bozulmuş bilişsel işlevsellik ile ilişkilidir. Obezite ve tip 2 diyabet (T2D) gibi yaşam tarzıyla ilişkili bozuklukların yaygınlığı dünya çapında artmaktadır ve dünya çapında T2D'den halihazırdaki muzdarip insan sayısının 366 milyondan 2030 yılına kadar 552 milyona ulaşacağı ileri sürülmüştür. Önleyici stratejilere duyulan ihtiyaç bu nedenle acildir. Diyet temelli önleme, yaşam tarzıyla ilgili hastalıkların mücadelesinde etkili strateji olarak kabul edilmektedir ve epidemiyolojik çalışmalar, örneğin tam tahıl gıdalarının ve baklagillerin yüksek alımının diyabetin önlenmesi ve yönetiminde ve kilo kontrolü için faydalı olduğunu desteklemektedir.

Obezite, kardiyovasküler hastalıklara katkıda bulunan önemli bir faktördür, ancak altta yatan mekanizmalar tam olarak bilinmemektedir. Bununla birlikte, önemli bir özellik "metabolik enflamasyon" ve doğuştan gelen sistemin aktivasyonu gibi görünmektedir. Örneğin, yüksek GI'li gıda ve enerji yoğun gıda gibi diyet kalıpları, gelecekte kardiyovasküler hastalıkların gelecekteki riskini öngörebilen bir faktör olarak kabul edilmektedir. Günümüzde, kardiyometabolik bozukluklarla mücadelede sağlıklı bir bağırsak mikrobiyotasının önemini destekleyecek büyüyen bir bilgi sistemi vardır ve bağırsak ekosistemi, konakçı metabolizması, iştah ve kilo regülasyonunun modülatörü olarak kabul edilmektedir. Bağırsak mikrobiyotası ve periferik dokular arasındaki metabolik "çapraz-konuşma"nın, sindirilemeyen karbonhidratlar gibi sindirilmeyen diyet bileşenlerinin bağırsak fermentasyonu yoluyla düzenlediği ileri sürülmüştür.

Fermente edilebilen bağırsak substratlarının konakçı metabolizması üzerindeki rolüne ilişkin kanıtların çoğu, inulin ile yapılan çalışmalardan, hayvan deney modellerinde glukoz

metabolizması ve kilo regülasyonu üzerindeki faydaları göstermektedir.

5 Son zamanlarda, bağırsak mikrobiyotalarının önemi, yalın insan donörlerden metabolik sendrom (MetS) hastalarına yapılan fekal transplantasyona dayalı çalışmalarda belgelenmiştir; MetS, T2D ve kardiyovasküler hastalık geliştirme riski yüksek olan kişileri belirleyen bir dizi risk faktörünü temsil eder. Fekal transplantasyon, fekal infüzyondan 6 hafta sonra T2D deneklerinde insülin duyarlılığının artmasına neden olmuştur. Bu yeni bulgular heyecan vericidir ve sağlıklı bir mikrobiyotanın önemi ile ilgili bilgilere katkıda bulunmaktadır. Bununla birlikte, fekal transplantasyonlar hem karmaşık hem de riskli olabilir.

15 Dolayısıyla, yararlı bakterilerin sayısını arttırmak ve bağırsak mikrobiyal bileşiminin sağlıklı bir dengesini başka yollardan teşvik etmek için stratejilere ihtiyaç duyulmaktadır. Bugüne kadar diyet manipülasyonunu takiben yararlı bakterilerin artışını gösteren çalışmaların çoğu kesitseldir ve dolayısıyla nedensellik göstermemektedir. Bu, lavman yoluyla veya probiyotikler de dahil olmak üzere gıda ürünleri aracılığıyla ya da yeterli miktardaki kolonik substrat diyeti sağlanmasıyla, örneğin normal diyetle spesifik prebiyotik substratlar veya pro- ve prebiyotiklerin kombine edilmesi yoluyla canlı bakteriler sağlanmasıyla gerçekleştirilebilir.

25 Gıda endüstrisindeki iyileştirilmiş sağlık özellikleri veya fonksiyonel gıda ürünlerine sahip yeni gıda ürünleri geliştirme çabalarına rağmen, obezite ve MetS veya T2D'li bireylerin artan sayısı hala büyük bir problem oluşturmaktadır. Bu koşullar tipik olarak ilaçlarla tedavi edilir. Bununla birlikte, sağlıklı bireyler veya hastalık riski altında olan kişilere, erken hastalık süreçlerine karşı koymak için özel olarak tasarlanmış gıda ürünleri sunulabilirse, bu, bilişsel işlevsellikte bozulma da dahil olmak üzere obezite ve MetS'nin gelişmesini

engelleyecektir. Ayrıca, bu tür gıda ürünleri, MetS'e bağlı ortaya çıkan hastalığı olan hastalarda hastalık yönetimini de kolaylaştırabilir.

5 HAYASHI H. VE DİĞERLERİ: "PREVOTELLA COPRI SP AND PREVOTELLA STERCOREA SP NOV. ISOLATED FROM HUMAN FAECES", INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY, cilt 57, no. 5, 2007, sf. 941-946, bir P. copri suşunun insan dışkılarından izolasyonunu açıklamaktadır.

10 WO 2011/053653, öncelikle artrit ve multipl skleroz gibi otoimmün durumları tedavi etmek için oral ilaç veya diyet takviyesi olarak kullanım için Prevotella histicola preparatlarını açıklamaktadır.

15 WO 2013/182038, kısa zincirli yağlı asit üreten bakteriler dahil olmak üzere bağırsak mikrobiyota popülasyonlarının geliştirilmesi için bileşim ve yöntemlerle ilgilidir.

WO 2012/142605, bağırsak bozukluğu, durumu veya enflamatuvar bağırsak hastalığı gibi hastalıkların tedavisinde yararlı olan önceden seçilmiş bir mikroorganizma kombinasyonunu içeren bileşimleri açıklar.

20 WO 2013/053836, enflamatuvar bağırsak hastalığı, Alzheimer, obezite ve diyabet Tip II dahil olmak üzere hastalıkların tedavisinde kullanılmak üzere Prevotella'dan bakteriler dahil olmak üzere anaerobik olarak kültürlenmiş insan bağırsak mikrobiyotasını içeren bir bileşimi açıklar.

25

BULUŞUN ÖZETİ

30 Buluş, Prevotellaceae'ye ait türlerin konakçı sağlığı üzerinde yararlı etkilere sahip olduğu ile ilgili benzersiz bulguya ilişkindir. Prevotellaceae'ye ait türler, tüketicinin sağlığını geliştirmek üzere, bir kapsül içine eklenmiş, bir lavman veya bir süpozituar olarak herhangi bir gıda ürünüde veya bir gıda ürünüde bir bileşen olarak, ilave bir

sindirilemeyen karbonhidrat içeren veya içermeyen bir probiyotik olarak kullanılabilir.

Mevcut buluşun bir birinci görünümü, *Prevotellaceae* türlerinden en az bir izole edilmiş bakteri suşunu içeren obezite, metabolik sendrom, tip 2 diyabet, kardiyovasküler hastalıklar, demans, alzheimer hastalığı ve enflamatuvar bağırsak hastalığının tedavisinde kullanılan bir ürün ile ilgili olup, suş, *Prevotella copri* ve *Prevotella ruminicola*'dan oluşan gruptan seçilir.

10 Bu tür bir ürün ile, glikoz metabolizmasını iyileştirmek ve metabolik sendromda risk faktörlerini azaltmak için yukarıda belirtilen bir dizi hastalığın tedavisinde faydalı olabilecek yeni sağlıklı gıda bileşenlerinin yanı sıra gıda ürünleri, kapsüller, lavmanlar veya süpozituarlar sağlamak ilk kez 15 mümkündür.Ürün, bir veya daha fazla diyet lifi ve/veya dirençli nişasta ile birlikte sağlanabilir.

Mevcut buluş ile diğer avantajlar ve amaçlar, ekli çizimlere referansla, daha detaylı olarak açıklanacaktır.

ŞEKİLLERİN KISA AÇIKLAMASI

20 **Şekil 1.** Sırasıyla arpa özü esaslı ekmek (BB) ve beyaz buğday ekmeği (WB) tüketiminden 3 gün sonra standartlaştırılmış kahvaltıya yönelik kan glukozu- ve serum insülin yanıtları (arttırımlı değişimler (Δ)). BB tüketimi, referans WB'e kıyasla (n=39), daha düşük postprandial glukoz- ve insülin pik 25 konsantrasyonlarına ($P<0,01$, ve $P<0,001$, sırasıyla) ve eğrilerin altında daha düşük glukoz- ve insülin alanlarına (0-150 dk $P<0,01$ ve $P<0,001$, sırasıyla) neden olmuştur.

Şekil 2. Sırasıyla arpa özü esaslı ekmek (BB) ve beyaz buğday ekmeği (WB) tüketiminden 3 gün sonra standartlaştırılmış 30 kahvaltıya yönelik kan glukozu- ve serum insülin yanıtları (arttırımlı değişimler (Δ)). BB tüketimi, referans WB'e kıyasla (n=20), daha düşük postprandial glukoz- ve insülin pik

konsantrasyonlarına (her ikisi için de $P<0,05$) ve eğrilerin altında daha düşük glukoz- ve insülin alanlarına (0-150 dk $P<0,05$ ve $P<0,01$, sırasıyla) neden olmuştur.

Şekil 3. Standart hale getirilmiş kahvaltıda, sırasıyla 3 günlük arpa özü esaslı ekmek (BB) ve beyaz buğday ekmeği (WB) tüketiminden sonra nefes H_2 'si atılımı. BB tüketimi, referans öğünü WB'e kıyasla (deney günü esnasında ortalama konsantrasyon, $P<0,01$ ($n=20$) anlamlı ölçüde artmış nefes H_2 'sine neden olmuştur.

Şekil 4. Standartlaştırılmış kahvaltıda, sırasıyla 3 günlük arpa özü esaslı ekmek (BB) ve beyaz buğday ekmeği (WB) tüketiminden sonra plazma PYY konsantrasyonları. BB tüketimi, üç günlük WB alımına kıyasla (deney günü esnasındaki ana etki, $P<0,05$ ($n=20$) anlamlı ölçüde artmış PYY plazma konsantrasyonlarına (0-120 dakika) sebep olur.

Şekil 5. Standartlaştırılmış kahvaltıdan sonra, arpa özü esaslı ekmek (BB) veya beyaz buğday ekmeği (WB) tüketiminden 3 gün sonra yanıt verenlerde ($n=10$) ve yanıt vermeyenlerde ($n=10$) kan glukozu yanıtları. Yanıt verenler grubunda, üç gün BB tüketimi, üç günlük WB alımına kıyasla (alan altında eğri 0-150 dk $P<0,0001$) anlamlı ölçüde daha düşük glukoz yanıtlarına neden olur. Yanıt vermeyenler grubunda BB'nin glukoz toleransında (eğri altında kalan alan) hiçbir gelişme görülmemiştir.

Şekil 6. Standartlaştırılmış kahvaltıdan sonra, arpa özü esaslı ekmek (BB) veya beyaz buğday ekmeği (WB) tüketiminden 3 gün sonra yanıt verenlerde ($n=10$) veya yanıt vermeyenlerde ($n=10$) serum insülin yanıtları. Yanıt verenler grubunda, üç gün BB tüketimi, üç günlük WB alımına kıyasla (alan altında eğri 0-120 dk $P<0,01$) anlamlı ölçüde daha düşük insülin yanıtlarına neden olur. Yanıtlayıcı olmayan grupta BB ile ilgili bir gelişme görülmemiştir.

Şekil 7. Standartlaştırılmış kahvaltıdan sonra, arpa özü

esaslı ekmek (BB) ve beyaz buğday ekmeği (WB) tüketiminden 3 gün sonra yanıt verenlerde (n=7) ve yanıt vermeyenlerde (n=7) kan glukozu yanıtları. Yanıt verenler grubunda, üç gün BB tüketimi, üç günlük WB alımına kıyasla (alan altında eğri 0-150 dk $P<0,0001$) anlamlı ölçüde daha düşük glukoz yanıtlarına neden olur. Yanıt vermeyenler grubunda BB'nin glukoz toleransında (eğri altında kalan alan) hiçbir gelişme görülmemiştir.

Şekil 8, ana bağırsak mikrobiyal türlerinin, araştırmaya katılan farklı gruplar arasında taksonomik çeşitliliğini göstermektedir, veriler, 454 pirosekanslama analizinden sonra üretilmiştir. Altı çubuk, çalışmada yer alan grupları temsil eder: R- kontrol (yanıt veren kontrol), R-WB (yanıt verenler beyaz buğday ekmeği), R-BB (yanıt verenler arpa özü esaslı ekmek). NR=yanıt vermeyenler. Kontrol, numunelerin test ekmekleri (BB veya WB) tüketmeden toplandığı anlamına gelir.

Şekil 9, tetaiotaomikron (n=6) ($P=0,0076$) Bakteroitleri ile mono-kolonize fareler ile karşılaştırıldığında, Prevotella copri (n = 6) ile iki hafta boyunca mono-kolonize olan fareler gelişmiş oral glukoz toleransı ve daha düşük serum insülin seviyeleri sergilemektedir. P. copri ve B. tetaiotaomikron (n=7) ile bi-kolonize edilen fareler ayrıca mono B. tetaiotaomikron kolonize farelere ($P=0,0426$) kıyasla daha iyi oral glikoz toleransı gösterirler.

BULUŞUN AYRINTILI AÇIKLAMASI

TANIMLAR

Mevcut uygulama ve buluş bağlamında, aşağıdaki tanımlar geçerlidir:

"Metabolik sendrom" veya MetS terimi, obezite, hiperlipidemi, hipertansiyon ve glikoz intoleransı gibi risk faktörleri kümesi anlamına gelirken, tip 2 diyabet (T2D) ve kardiyovasküler hastalık geliştirme riski yüksek olan kişiler

belirlenir. "Probiyotik" terimi, bağırsakta kolonizasyon üzerine konakçıda bir sağlık yararı sağlayan bakteriler gibi canlı bir mikroorganizma anlamına gelir.

5 "Diyet lifi" veya "DF" terimi, ince bağırsakta sindirime ve emilmeye direnç gösteren üç veya daha fazla monomer içeren ve bağırsak bakterileri tarafından kolonda tamamen veya kısmen fermente edilen karbonhidratlar anlamına gelir. Bu başvuruda DF terimi, beta-glukanlar, arabinoksilatlar, selüloz, oligosakkaritler, fruktanlar, pektin, guar zımkı gibi nişastadan 10 türetilmiş hazımsız polisakkaritler ile ilgilidir. Bitkide sindirilemeyen polisakkaritler ile yakından ilişkili olan sindirilmeyen maddeler de DF'nin tanımına dahil edilir (örneğin, sindirilmeyen protein fraksiyonları, fenolik bileşikler, lignin, mumlar, fitatlar, fitosteroller).

15 "Dirençli nişasta" (RS) terimi, sağlıklı bireylerin, yani nişastadan elde edilen DF'nin ince bağırsağında sindirimden kaçan nişasta ve nişasta bozunum ürünlerini ifade eder. RS, çözünmeyen DF'nin bazı faydalarını ve çözünür DF'nin bazı faydalarını sağlayabilir. RS, botanik olarak kapsüllenmiş 20 nişasta, jelatinleştirilmemiş- veya geriletilmiş nişastadan türetilmektedir.

"Geriletilmiş nişasta" terimi, pişirme ve soğutma işleminden sonra nişasta moleküllerinin yeniden kristalleşmesi anlamına gelir ve bu da ince bağırsakta sindirime ve emilmeye dirençli 25 yapılara neden olur.

"Botanik olarak kapsüllenmiş nişasta" terimi, gıda matrisi içinde fiziksel olarak hapsedilen nişastayı veya ince bağırsakta sindirim enzimlerine erişemeyen botanik hücreleri ifade eder.

30 "Jelatinleştirilmemiş nişasta" terimi, pişmemiş patateslerde veya pişmemiş tahıllarda nişasta, veya işlendikten sonra jelatinleşmeye direnç gösteren nişasta granülleri gibi, korunmuş sindirilmeyen bozulmamış kristal yapıya neden olan, doğal

formunda oluşmuş, işlenmemiş nişasta granülleri anlamına gelir.

“Prebiyotik” terimi, sindirim sistemindeki bakterilerin büyümesini ve/veya aktivitesini, sağlık yararlarıyla bağlantılı olarak uyaran, sindirilmeyen gıda bileşenlerini, tercihen DF ve RS gibi sindirilmeyen karbonhidratları ifade eder.

“Sinbiyotikler” terimi, probiyotik ve prebiyotiklerin bir kombinasyonu anlamına gelir.

SCFA terimi, sindirilemeyen karbonhidratların mikrobiyal bağırsak fermentasyonundan üretilen kısa zincirli yağlı asitleri anlamına gelir.

“Kapsüllenmiş” terimi, *Prevotella* türünün çevreden (örneğin oksijen ve asitlik) korunacak şekilde kapsüllenmiş olabileceği ve bu nedenle bozulmayacak ve gıda ürünündeki ve bağırsaktan geçiş sırasında nitelik ve aktivitelerini koruyabileceği anlamına gelir. Kapsülleme için kullanılan teknikler, örneğin alginat-, guar sakızı-, ksantan sakızı-, keçiyoynuzu zamkı-, karragenan sakızı- veya diğer diyet lifi, -kazein, prebiyotikler veya nişasta bazlı yenilebilir filmler, toplayıcı emülsiyonlar ve benzerleri bazlı olabilir. Farklı kapsülleme teknolojileri uygulanabilir, bunların bazıları R Vidhyalakshmi ve diğerleri, 2009 [1]’de tarif edilmiştir.

“Yanıt verenler” terimi, prebiyotik arpa çekirdeği ürününün tüketiminden sonra geliştirilmiş glikoz uygulaması alan insan denekleri anlamına gelir.

“Yanıt vermeyenler” terimi, prebiyotik arpa çekirdek ürününün tüketiminden sonra geliştirilmiş glukoz regülasyonu kanıtı göstermeyen insan denekler anlamına gelir.

“Lavman” terimi, *Prevotella* spp ihtiva eden bir çözeltinin, bağırsak mikrobiyal bileşimini faydalı bir şekilde modüle etmek üzere, rektum boyunca bağırsağa prebiyotik substrat ile veya onsuz ilave edildiği bir prosedürü tarif etmek için kullanılır.

Metabolik enflamasyon terimi, insülin direnci ve metabolik

disfonksiyon ile ilişkili aşırı besin ve enerjiye yanıt olarak metabolik hücreler tarafından düzenlenen düşük dereceli, kronik enflamasyonu tarif etmek için kullanılmaktadır.

BULUŞ

5 Arpa çekirdeği ürünlerindeki içsel DF ve RS'nin, diğer lif grupları için de muhtemelen aynı olan kardiyometabolik risk markörleri ve iştah regülasyonu açısından yararlı etkilere sahip olduğu bulunmuştur. Bu nedenle, sağlıklı bireylerde arpa özü akşam öğününden sonraki standartlaştırılmış bir kahvaltıya kadar
10 bir gecelik zaman zarfında arpa özlü ürünlerin alınmasından 11-14 saat sonra, glikoz toleransı ve insülin ekonomisi gelişmiştir.

Diğer önemli bir bulgu da, GLP-1 ve diğer iştah düzenleyici hormonların plazma konsantrasyonlarında bir artış ve istemli
15 enerji alımında azalma, aynı zamanda algılanan açlıkta bir azalma olmuştur. Ayrıca, arpa sindirilemeyen karbonhidratları metabolik enflamasyon markörlerini azaltmıştır. Artan bir metabolik enflamasyon durumu, MetS ve T2D'nin önlenmesinde umut verici olmasıyla, metabolik enflamasyonu azaltan gıda
20 konseptlerini oluşturan tanınmış bir kardiyometabolik risk faktörüdür. Arpa hazımsız karbonhidrat alımından sonra artan bağırsak fermantasyon aktivitesinin göstergesi olan nefes hidrojeni (bağırsak fermentasyonu markörü) ve SCFA üretiminin arttığı görülmüştür. Bağırsak fermantasyonunun işaretçileri ile
25 glukoz regülasyonunun iyileştirilmesi arasında önemli ilişkiler bulunmuş olup, bu, arpa çekirdeği bazlı ürünlerin metabolik risk markörleri üzerindeki prebiyotik aracılı etkilerini göstermektedir, yani, görülen faydalı etkiler sindirilemeyen karbonhidratların bağırsak bakterisi fermentasyonundan
30 türetilen mekanizmalarla ilgilidir. Bağırsak mikrobiyota fermentasyonu sırasında üretilen SCFA, kolonik enterositlere enerji sağlar ve ayrıca SCFA'lar da sinyalleme molekülleri olarak işlev görür.

Sonuç olarak, bakteriyel fermentasyon ile üretilen SCFA'nın, L-hücreleri üzerindeki SCFA reseptörleri üzerinde hareket ederek sinyalleme kaskadlarını tetikleyebildiği ve GLP-1 ve PYY (*in vitro* model) gibi bağırsak peptitlerinin daha fazla salınmasına neden olduğu gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlar, arpa çekirdek ürünleri gibi tahıl ürünlerinde DF ve RS'nin prebiyotik potansiyelini açıkça göstermektedir.

Şaşırtıcı bir şekilde, sağlıklı bireylerde, arpa çekirdeği ürünlerinden (ekmek) kardiyo-metabolik risk markörleri ve iştah regülasyonu ile ilgili olarak gözlemlenen faydaların, bağırsak mikrobiyomunun spesifik bir değişimi ile ilişkili olabileceği bulunmuştur ve *Prevotella* türlerinde bir artış tespit etmiş bulunuyoruz. Ayrıca, spesifik *Prevotella* suşunun (*Prevotella copri*) mikropsuz farelere aktarılması hayvanlarda glikoz toleransını geliştirmiştir. Sonuçlar, tanımlanan bakteriyel suşun glukoz metabolizması üzerindeki faydaları ile probiyotik etkisini ortaya koymuştur. *Prevotella* suşlarının seçimi için kriterlerden biri, kompleks şekerlerin parçalanması için gerekli olan glikozit hidrolazların oluşması olmuştur. Seçilen tüm suşlar glikozit hidrolazlarına sahiptir ve çok çeşitli kompleks şekerleri bozundurabilir. İlave bir kriter, kompleks şekerlerdeki bozunmadan ana ürün olarak süksinat üretmek için seçilmiş suşlardır. Suş örnekleri arasında, *Prevotella copri*, *Prevotella sterçekirdek/oza*, *Prevotella histikola*, *Prevotella ruminikola*, *Prevotella Bryantii* 25A ve *Prevotella distasonis* bulunmaktadır. 2, 3, 4, 5 veya 6 farklı suş gibi, farklı suşların bir veya daha fazlasının karışımları da mümkün olabilir. Bu suş, 10^7 veya daha fazla, örneğin 10^7 , 10^8 , 10^9 veya daha yüksek miktarlarda mevcut olabilir.

Ayrıca, ilk kez elde edilen sonuçlar, *Prevotella* spp. suşu ile birlikte, araştırılan prebiyotik substratlarının, diğer bir deyişle, arpa çekirdeği ürünlerindeki DF ve RS'nin, bu bağırsak substratları *Prevotella*'da bir artış sağladığından, sinbiyotik

bir yaklaşımda özellikle değerli olabileceğini ortaya koymaktadır. Sonuçlar, orta yaşlı/yaşlı sağlıklı bireylerde açlık ve 3 gün sonra standart bir kahvaltıdan sonra arpa çekirdeği bazlı ürün (100 gr mevcut karbonhidrat/gün) ile elde edilmiştir. Arpa çekirdek ürünü, bir çapraz-kaplamalı tasarım kullanılarak beyaz buğday ekmeği referans ürünü ile karşılaştırılmıştır. Bağırsak mikro-biyota bileşimini etkileyerek ve *Prevotella* spp oranını artırarak, arpa çekirdeği bazlı ürün, artan bağırsak fermentasyon aktivitesi (bir test markörü olarak nefes hidrojeni (H_2)) ($P<0,001$), artan SCFA konsantrasyonları ($P<0,05$), gelişmiş glikoz regülasyonu (azaltılmış glukoz ve insülin konsantrasyonları ($P<0,05$), artan PYY konsantrasyonları (bağırsakta salınan doygunluk hormonu) ($P<0,05$), artan lipid konsantrasyonları GLP-1 (anti-obezite ve anti-diyabetik bağırsak hormonu), artan algılanan açlık tokluğu ve azalmış açlık hissi ile sonuçlanmıştır. Gut-mikrobiyota bileşimini değiştirerek ve *Prevotella* spp değerini arttırarak, arpa DF ve RS bakımından zengin arpa özü bazlı gıdaların alımı, hem insanlarda hem de farelerde bağırsak fermentasyonu metaboliti süksinatı arttırmıştır.

Sonuçlar ayrıca, test denekleri arasında bazı kişilerin (yaklaşık %15) arpa özü bazlı test ürününün alımını takiben gelişmiş glikoz regülasyonuna ulaşmadıklarını ortaya koymuştur (arpa ile 3 günlük müdahale sonrasında standart bir öğüne glikoz ve/veya insülin yanıtı ile belirlenir). İlginç bir şekilde, bu "yanıtsızlar" arpa çekirdeği ürününün yutulmasından sonra artan bağırsak *Prevotella* konsantrasyonları elde etmemiştir. Bu, gelişmiş glisemik regülasyon ve artan *Prevotella* spp bolluğu arasındaki nedensel ilişkiyi vurgulamakta olup, kamusal alanda tamamen yeni bilgidir. Ayrıca, bu sonuçlar, bazı kişilerin bağırsak mikrobiyota bileşimlerini kolaylıkla değiştirmediklerini ve özellikle önerilen arpa prebiyotikleri (DF + RS) ve *Prevotella* spp'nin ağızdan alımı; ya da sadece *Prevotella* spp sindiriminden fayda görmüş olabileceklerini ilk

kez olarak göstermektedir.

Örneğin, DF ve RS veya DF veya RS açısından zengin bir arpa çekirdeği gıda ürünü kullanılarak, kan glukoz kontrolü, metabolik enflamasyon markörleri ve iştah regülasyonu yararları sağlanmıştır. Metabolik faydalar, bağırsak fermentasyonu, yani bir prebiyotik mekanizmasını belirten nefes hidrojeni, plazma SCFA markörleri ile ilişkili olmuştur.

Yukarıda belirtilen arpa çekirdeği ürününü sindiren sağlıklı insanlardan alınan dışkı örneklerinin bağırsak mikrobiyal haritalaması, metabolik risk belirleyicileri ve iştah uygulaması üzerindeki yararların, bağırsakta bulunan mikroorganizmaların bileşiminin spesifik bir değişikliğine bağlı olduğunu ortaya çıkarmıştır. Yukarıda belirtilen arpa çekirdeği gıda ürünü sindiren denekler, bağırsak mikrobiyotasında *Prevotella* türlerinde bir artış ve arpa çekirdek gıda ürünü almayan kişilere kıyasla gelişmiş kardiyometabolik risk markörleri göstermiştir (aşağıdaki Örneklerle bakınız).

Ayrıca, bir *Prevotella* spp. suşu ile mikrop içermeyen farelerin mono kolonizasyonunun, hayvanlarda glikoz metabolizmasını iyileştirdiği gösterilmiştir. Dolayısıyla, yukarıdaki sonuçlardan elde edilen sonuç, *Prevotella* ile ilgili türlerin, örneğin antidiyabetik özellikler ve ağırlık uygulama potansiyeli ile bir probiyotik olarak kullanılmaya uygundur. Glukoz metabolizmasının bozulması ve bozulmuş bilişsel işlev arasındaki sıkı ilişki, MetS ile ilişkili bilişsel gerilemenin önlenmesi için *Prevotella* türlerinin de kullanımını artırmaktadır. Diğer hastalıklar veya bozukluklar yukarıda belirtilmiştir.

Yukarıdaki deneylerden ve sonuçtan, buluşun, *Prevotellaceae*'den en az bir insan izole edilmiş bakteriyel suşu içeren bir gıda ürünü veya gıda muhteviyatı veya bir lavman olarak kullanılacak formülasyon gibi bir ürünle ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Bakteriyel, süksinat üretmek için modifiye

edilmiş gibi genetik olarak modifiye edilebilir. Örnekler arasında, *Prevotella copri*, *Prevotella stercorea*, *Prevotella histicola*, *Prevotella ruminicola*, *Prevotella Bryantii* 25A ve *Prevotella distasonis* bulunur.

- 5 Probiyotik gıda ürünü, tek başına veya DF ve RS veya DF veya RS gibi en az bir diyet lifleri türü gibi diğer bileşenler ile kombinasyon halinde kullanılabilir ve bazı örneklerde de glukoz metabolizmasını regüle etmek ve insanlarda olduğu gibi bir memelideki metabolik sendromdaki faktör riskini azaltmak için
- 10 süksinik asit kullanılabilir. Tedavi edilecek hastalıklar veya bozukluk örnekleri arasında obezite, metabolik sendrom, tip 2 diyabet, kardiyovasküler hastalıklar, demans, alzheimer hastalığı ve obezite, metabolik sendrom ve tip 2 diyabet gibi enflamatuvar bağırsak hastalığının tedavisi yer alır.
- 15 Probiyotik gıda ürünü ayrıca en az bir DF ve/veya bir RS, doğal veya sentetik, saflaştırılmış, karışımları veya bunların varyantlarını içerebilir. DF ve RS örnekleri arasında, arpa, çavdar, buğday, yulaf, baklagil tohumları, beta-glukanlar, guar sakızı, lignin, lignanlar gibi viskoz ve viskoz olmayan DF gibi
- 20 tahıllar veya baklagillerden elde edilen DF ve RS ve galakto-oligosakkaritler ve frukto-oligosakkaritler gibi oligosakkaritler, botanik olarak kapsüllenmiş RS, geriletilmiş RS, kimyasal olarak modifiye edilmiş nişasta veya jelatinleştirilmemiş RS bulunur. Ürün, en az bir tür dirençli
- 25 nişasta (RS), bunların doğal, sentetik, saflaştırılmış bir karışım veya varyantlarını içerebilir. RS örnekleri arasında,örneğin geriletilmiş nişasta, botanik olarak kapsüllenmiş nişasta, jelatinleştirilmemiş nişasta ve siklodekstrinler veya kimyasal olarak modifiye edilmiş nişasta gibi sebze nişastası
- 30 bulunur. Lifler,örneğin arpa çekirdekleri olabilir. RS/DF oranıörneğin, 10,8 (RS)/13,04 (DF) olabilir. DF; arpa, buğday, çavdar, yulaf veya özütlenmiş beta-glukanlar, guar zamkı, lignin, lignanlar ve galakto-oligosakkaritler ve frukto-

oligosakkaritler gibi oligosakkaritlerden diyet lifi, botanik olarak kapsüllenmiş RS, geriletilmiş RS, kimyasal olarak modifiye edilmiş nişasta veya jelatinleştirilmemiş RS olabilir.Ürün, en az bir tür dirençli nişasta (RS), bunların 5 doğal, sentetik, saflaştırılmış bir karışım veya varyantlarını içerebilir. RS örnekleri arasında, örneğin geriletilmiş nişasta, botanik olarak kapsüllenmiş nişasta, jelatinleştirilmemiş nişasta ve siklodekstrinler veya kimyasal olarak modifiye edilmiş nişasta gibi sebze nişastası bulunur. Lifler, örneğin 10 arpa çekirdekleri olabilir.

Ürün, beklenen sonuçları elde etmek için örneğin RS ve/veya DS ile birlikte bir veya daha fazla bakteri suşu içerebilir.

Başka bir uygulamada, buluş konusu ürün ilave bir bakteri suşunu içerir, burada söz konusu suş, süksinat üretebilir. 15 Yararlı olan bu tür suşların örnekleri arasında, örneğin Lactobacillus, örneğin Lactobacillus reuteri, Lactobacillus rhamnosus, Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus plantarum, Roseburia ve Bifidobacteria, örneğin Bifidobacterium longum, Bifidobacterium lactis, Bifidobacterium animalis ve 20 Bifidobacterium bifidum bulunur. İlave bakteri suşu da süksinat üretmek için genetik olarak modifiye edilebilir.

Ürün ayrıca serbest formda süksinat içerebilir veya bir süksinat üreten bakteri suşu ilave edilebilir. Süksinatı doğal olarak üreten bir suş veya süksinat üretmek için genetik olarak 25 modifiye edilmiş bir suş.

Buna göre, ürün teknikte uzman bir kişi tarafından iyi bilinen kapsüllenebilir veya liyofilize edilebilir.

Bir başka uygulamada bakteriyel suş *Prevotellaseae*, suşu oksijenden korumak için herhangi bir formda kapsüllenebilir. 30 Kapsülleme teknikleri örnekleri arasında, yenilebilir filmler, stabil bariyer malzemesi olarak nişasta granüllerini kullanan sabit Pickering emülsiyonları, polisakkaritlere dayanan

kapsülleme, örneğin beta-glukanlar, guar sakızı, ksantan sakızı, keçiyoynuzu zamkı, karrageenan sakızı, prebiyotikler, aljinat, süt proteini ve benzerleri bulunur. Diğer teknikler süper kritik karbon dioksit içinde polimer arası kompleks oluşumunu içerir.

- 5 Bazıları R Vidhyalakshmi ve diğerleri, 2009 tarafından açıklanan farklı kapsülleme teknolojileri uygulanabilir.

Başka bir uygulamada, *Prevotellaceae*'den elde edilen bakteriyel suş/suşlar, tek başına lavman yoluyla veya DF ve/veya RS gibi prebiyotik substratlarla birlikte bir bileşimde
10 sağlanabilir.

Ürün örneğin uygun herhangi bir gıda ürünü olabilir ve ısıt işlem görmemiş veya hafif ısıt işlem görmüş herhangi bir gıda ürünü içerebilir veya burada *Prevotella* ısıt işleminden sonra, *Prevotella* veya *Prevotella* ve prebiyotik kombine içeren veya
15 bunlarla takviye edilmiş içecekleri içeren, shotlar (örneğin meyve veya süt bazlı), smoothie'ler, içecekler, meyve suları, sofraya suyu, soğuk çorbalar/çorba karışımları, yağ ürünleri, serpmeler, soslar, sos/sos karışımları, salsa, süt ürünleri, dondurma ve tahıl bazlı içecekler ile alınabilir. *Prevotella*
20 ayrıca kapsüllenebilir ve yukarıda tarif edilen gıdalara dahil edilebilir, böylece çevre ve işleme koşullarına karşı direnci artar.

Gıda ürünü aynı zamanda yumuşak ekmek, gevrek ekmek, yassı ekmek, tortilla, yulaf lapası, kahvaltılık gevrekler, tahıl
25 barları veya diğer atıştırmalıklar, patates tozu veya *Prevotella* ile birlikte veya onsuz tüketilmek üzere örneğin arpadan prebiyotiği içeren diğer hızlı gıda ürünleri, hazır gıda ürünleri olabilir. Yukarıda listelenen ürünlerle tüketilmek veya *Prevotella*'nın sağlanması için tüketilmek üzere *Prevotella* spp.
30 içeren kapsüller. Kapsüller ayrıca prebiyotik karbonhidratlardan, örneğin arpadan da yapılabilir. *Prevotella* ayrıca, örneğin, kararlı emülsiyon teknikleriyle kapsüllenebilir ve gıdalara dahil edilebilir.

Prevotella spp. ayrıca, kuru toz olarak sunulabilir ve gıdalara, örneğin kahvaltılık tahıllara eklenebilecek atılabilir kaplar halinde paketlenabilir. Gıda ürünü, örneğin, odalardan birinde prebiyotik veya prebiyotik olmadan *Prevotella* ile, 5 diğeri yukarıda olduğu gibi gıda ürünü olmak üzere, tüketim üzerine karışacak olan iki odalı pakette sağlanan bir içecek, bir çorba, yoğurt, soğuk tahıl pudingi veya shot olabilir. *Prevotella*'lı hazne, pakete dahil olan veya ayrı olarak dağıtılan bir pipeti de içerebilir. *Prevotella* ardından, pipet 10 içerisinden içilerek tüketilecektir.

Ürün, prebiyotikli veya prebiyotik olmayan *Prevotella*'nın emülsiyon damlacıkları halinde kapsüllenmiş olduğu stabil bir emülsiyon olabilir. Bu ürünler örneğin bir shot halinde verilebilir.

15 *Prevotella*'nın kapsüllere dahil edilmesi durumunda, kapsüller tercihen bir entero kapsül şeklinde olmalıdır. *Prevotella* ayrıca entero tabletler, depo tabletleri, depo (uzun süreli salım) kapsülleri veya uzatılmış salımlı granüller içine dahil edilebilir.

20 Ürün ayrıca bir gıda ürününe eklenecek bir gıda bileşeni de olabilir.

Buluş ayrıca aşağıda belirtilenler de dahil olmak üzere bir dizi hastalık veya bozukluğun tedavisinde kullanılabilecek bir ürün tanımlar. Obezitenin tedavisi ve tip 2 diyabet gibi bozuk 25 kan şekeri regülasyonu ile ilişkili bozuklukların yanı sıra, subklinik enflamasyon ve kardiyovasküler hastalık gibi ilişkili hastalığa karşı koruma için kullanılabilir. Ayrıca korunan kavramlar demans patogenezinin özelliklerini de ortadan kaldırır. Ayrıca, kan glikozunun düzensizliği, enflamasyon ve 30 endotelial hasar ile ilişkilidir, dolayısıyla halen korunan konsept ile kardiyovasküler hastalıkların önlenmesi arasında bir bağlantı sağlar.

Sonuç olarak, normal aralıktaki glikoz regülasyonunun hafif düzeyde bozulması bile, bilişsel testlerde önemli ölçüde daha düşük performans ile ilişkilidir ve halihazırda tarif edilen konsept, demansa yardımcı olan glukoz regülasyonunu geliştirmektedir. Ayrıca, halihazırda açıklanan korunmuş konsept, GLP-1 gibi inkretin hormonlarını uyarır. GLP-1 nöroprotektif ve anti-apoptotik etkiler gösterir, beta-amiloid (A β) plak birikimini azaltır, uzun süreli potansiasyonu ve sinaptik plastisiteyi modüle eder ve nöronal progenitör hücrelerin farklılaşmasını teşvik eder, dolayısıyla bunama ve Alzheimer hastalığına karşı önlem alır. GLP-1'in nöroprotektif etkileri: duygudurum bozuklukları olan bireylerde bilişsel eksiklikler için olası tedaviler. Ayrıca, korunan konsept ile gözlenen GLP-2'nin uyarılması, enflamatuvar bağırsak hastalıklarına karşı korur ve eksojen GLP-2'nin, sıçanlarda kemoterapiyle indüklenen mukozitlerden mukozayı koruyabileceği bilinmektedir.

Mevcut buluş, aynı zamanda, bir gıda ürünü veya gıda muhteviyatı gibi tanımlanmış ürün ve bu ürünün, glukoz metabolizmasını iyileştirmek, daha düşük metabolik enflamasyonu sağlamak ve iştah regülasyonunu kolaylaştırmak ve aynı zamanda metabolik sendromdaki risk faktörlerini azaltmak için kullanılması ile de ilgilidir. Bu, MetS ile ilgili bozukluğun önlenmesi ve düzenlenmesinde, obezite, glukoz intoleransı, diyabet veya kardiyovasküler hastalıkların yanı sıra MetS ile ilgili bilişsel işlev bozukluğundan muzdarip kişilerde de yararlı olabilir. Buluşa ait probiyotik, aynı zamanda, prebiyotik substratlar içeren veya içermeyen lavman formülasyonları veya süpozituarlarında da kullanılabilir.

Mevcut buluş ayrıca, metabolik sendromdaki risk faktörlerini azaltmak, glukoz metabolizmasını geliştirmek, kilo regülasyonunu kolaylaştırmak ve MetS ile ilgili bilişsel gerileme riskini azaltmak için yukarıda tanımlanan ürün kullanımına ilişkindir.

Son olarak, buluş, glukoz metabolizmasını geliştirmek, kilo regülasyonunu kolaylaştırmak ve metabolik sendromdaki risk faktörlerini azaltmak için süksinat veya süksinat üreten bir bakteri suşu kullanımı ile ilgilidir.

5 Ürün insanlar, atlar, köpekler ve kediler için kullanılabilir.

Aşağıdaki örneklerin, açık ya da dolaylı olarak herhangi bir tarzda, şekilde ya da herhangi bir biçimde mevcut buluşu sınırlandırmaması amaçlanmıştır.

10 ÖRNEKLER

Örnek 1

ARPA ÖZÜ ESASLI ÜRÜNLERDE PREBİYOTİK KARBOHİDRATLARIN, METABOLİK RİSK MARKÖRLERİNİ, İŞTAH DÜZENLEYİCİ HORMANLARI, VE SAĞLIKLI BİREYLERDE ALGILANAN DOYGUNLUĞU YARARLI ŞEKİLDE ETKİLER

15 ÇALIŞMA YOĞUNLUĞU VE ÇALIŞMA TASARIMININ ÖZETİ

Çalışmanın amacı, arpa çekirdeği bazlı ürünlerde bulunan içilebilir sindirilemeyen karbonhidratlar, DF ve RS'nin MetS ile ilgili risk markörleri üzerindeki etkilerini değerlendirmek olmuştur. Normal vücut kütle endeksine sahip (ortalama $\pm$ SS = 23,6 $\pm$ 2,3 kg/m²) otuz dokuz sağlıklı 64,5 $\pm$ 5,6 yaşındaki orta yaşlı bireye, sunulan bir arpa özü esaslı ekmeke veya bir beyaz buğday ekmeği (WB, referans ürün) bir çapraz tasarımda art arda üç gün boyunca verilmiştir. Ertesi gün (dördüncü gün) standart bir kahvaltı sunulmuş ve postprandiyal dönemde (0-180 dakika) 25 açlık ve tekrar tekrar fizyolojik test markörleri belirlenmiştir. Çalışma, üç alt çalışmaya bölünmüştür (**ÇALIŞMALAR A-C**). ÇALIŞMA A'daki fizyolojik test markörleri arasında, kan glukozu, serum insülini, nefes hidrojeni (H₂) atılımının belirlenmesi (kolonik fermentasyon markörü), ve bir 30 kişinin iştah hislerinin kaydedilmesi bulunur. Kohortun bir alt grubunda daha ileri değerlendirmeler için ven kanı tekrar tekrar toplanmıştır (aşağıya bakınız). Ayrıca, fekal örnekler çalışma

başlangıcından önce ve bağırsak mikrobiyotalarının karakterizasyonu için her bir müdahale periyodundan sonra toplanmıştır (**ÇALIŞMA A**).

5 Yukarıda açıklanan kohorttan ilave fizyolojik test markörleri, rastgele seçilen 20 denekten belirlenmiştir ($64,1 \pm 5,9$ yaş, $23,5 \pm 2,2$ kg/m²) (**ÇALIŞMA B**). Kan glukozu, serum insülini ve nefes H₂'sinin yanında, ayrıca iştah düzenleyici hormonlar (PYY, GLP-1), ve plazma kısa zincirli yağ asitleri (SCFA) ölçülmüştür.

10 **C ÇALIŞMASI**'nda, ÇALIŞMA A'daki kohorttan 20 kişi önceki akşam arpa özü bazlı ürün (BB) yenmesinden sonra bir gecelik zaman zarfında standart bir kahvaltıda glukoz regülasyonundaki gelişmelerin derecesine göre seçilmiştir. En belirgin etkilere sahip 10 kişi ve BB'nin glukoz regülasyonu üzerine en az belirgin etkileri olan 10 birey dahil edilmiştir. C ÇALIŞMASI, aşağıda ayrı şekilde bildirilmiştir.

MALZEMELER VE YÖNTEMLER

TEST DENEKLERİ

20 Çalışmaya alınma kriterleri, 50-70 yaş arası, BKİ normalden biraz fazla kilolu (BKİ 18-28 kg/m²), açlık plazma glukoz değeri $\leq 6,1$ mmol/L, sigara içmeyen, genel sağlıklı ve bilinen herhangi bir metabolik bozukluk veya yiyeceğe alerjisi olmayanlar olmuştur. Anti-hipertansif ilaçlar ve antienflamatuvar etkiye sahip olmayan reçetesiz ağrı kesiciler kabul edilmiştir.

25 Çalışmalar Lund, İsveç Bölgesel Etik İnceleme Kurulu tarafından onaylanmıştır (Referans 2010/457).

A ÇALIŞMASI: 6 erkek ve 33 kadın, $64,5 \pm 5,6$ yaş ve normal beden kitle endekslerine sahip (ortalama $\pm$ SS = $23,6 \pm 2,3$ kg/m²) sağlıklı gönüllüler çalışmaya katılmıştır.

30 B ÇALIŞMASI: Normal beden kitle endekslerine sahip, 3 erkek ve 17 kadın, $64,1 \pm 5,9$ yaş (ortalama $\pm$ SS $23,5 \pm 2,2$ kg/m²) yirmi sağlıklı gönüllü, A ÇALIŞMASI'sındaki kohorttan rastgele

seçilmiştir.

TEST YEMEKLERİ

Test öğünleri arpa çekirdeği esaslı ekmek (BB) ve beyaz buğday ekmeği (WB; referans yemek) olmuştur. Her test ürünü iki hafta boyunca birbirini izleyen üç gün boyunca tüketilmiştir. Sırasıyla, test ve referans ürün miktarı, günde 100 g potansiyel olarak temin edilebilir nişasta verecek şekilde hesaplanmış, Holm ve diğerlerine göre analiz edilmiştir [2] (Tablo 1). İlk iki gün için günlük alım yaklaşık 0800, 1400 ve 2100'de tüketilecek üç eşit parça boyutuna bölünmüştür. Üçüncü günde, günlük alımın yarısı (50 gr mevcut nişasta) eşit olarak 0800 ve 1400 öğünü arasında, diğer yarısı 2100'de tüketilmiştir.

Tablo 1. A-C ÇALIŞMALARI'nda, arpa özü ekmeği (BB) ve beyaz buğday ekmeği referansının (WB) terkibi.

Ürünler	Toplam nişasta ^a	RS	Mevcut nişasta ¹	Çözünmez DF	Çözünebili r DF	Toplam DF ²	RS+DF
WB	77,4	1,92	75,5	% kuru madde 3,55	1,38	4,93	6,85
BB	74,3	10,8	63,5	8,83	4,21	13,04	23,84
WB	103	2,54	100	g/gün 4,71	1,83	6,54	9,08
BB	117	17,0	100	13,97	6,64	20,61	37,61

¹ Fark ile hesaplanmıştır; Toplam nişasta daha az RS (3-5).

² Bu başvuruda adı geçen DF, fiziksel olarak erişilemeyen veya sindirilmeyen nişastayı, yani RS'yi içermez.

STANDARDLAŞTIRILMIŞ KAHVALTI

Standartlaştırılmış bir kahvaltı, sırasıyla BB veya WB ile 3 günlük bir müdahalenin ardından tüketilmiş ve 50 g mevcut

karbonhidratlara ve 2,5 dl musluk suyuna karşılık gelen 122,9 g WB'den oluşmuştur.

TEST ÜRÜNLERİNİN TARİFİ VE HAZIRLANMASI.

- 5 Beyaz Buğday ekmeği (WB, referans yemek ve standartlaştırılmış kahvaltı); Bir ev pişirme makinesinde standart bir prosedür uyarınca bir WB pişirilmiştir (Tefal ev ekmeği model no. 573102; Menü seçimi, program 2 [beyaz ekme, 1000 g, hızlı (süre 2:32)]). Ekmek 540 g beyaz buğday unu (Kungsörnen Ab, Jarna, İsveç), 360g su, 4,8 g kuru maya, 4,8g NaCl (İyotsuz) yapılmıştır.
- 10 Soğutulduktan sonra ekme dilimlenmiş ve porsiyon boyutlarında alüminyum folyoya sarılmıştır, plastik torbalara koyulmuş ve bir dondurucuda (-20 °C) saklanmıştır. Tüketmeden önceki gün, test kişilerine, alüminyum folyoya ve plastik torbaya sarılı olan ekmeği çevre sıcaklığında çözmeleri talimatı verilmiştir.
- 15 Arpa özü esaslı ekme (BB); Toplam 595 g arpa özü, 12 dakika boyunca 520 g su içinde kaynatılmış ve daha sonra oda sıcaklığında 30 dakika soğutulmuştur. Pişirildiğinde bütün su taneler tarafından emilmiştir. Tanelere 105 gr buğday unu, 6 gr kuru maya, 5 gr tuz ve 300 gr su eklenmiştir. Hamur, 4 dakika
- 20 (Electrolux AKM 3000, N23 N25) süreyle yoğrulmuş ve bir kapta 30 dakika süreyle ilave mayalanmış, ardından bir fırın teknesinde bir başka mayalanmaya (35 dakika) tabi tutulmuştur. Pişirme tepsisi alüminyum folyo ile kaplanmış ve 225 °C'de bir ev fırında pişirilerek, mevcut sıcaklığın 96 °C'ye ulaşması sağlanana kadar
- 25 buharın varlığını en üst seviyeye çıkarmak için bir su kabı bırakılmıştır. Pişirdikten sonra ekme, fırın tepsisi olmaksızın çevre oda sıcaklığında ıslak havlu içerisinde soğutulmuştur. Soğuduktan sonra ekme plastik bir torbaya konulmuş ve gece boyunca oda sıcaklığında bırakılmıştır. Ekmekler kesildikten
- 30 sonraki gün porsiyon boyutlarında alüminyum folyoya sarılarak plastik poşetlere konulmuş ve bir dondurucuda (-20 °C) saklanmıştır.

TEST ÜRÜNLERİNDEKİ TOPLAM NİŞASTA, RS VE DF'NİN ANALİZİ

Test ürünleri toplam nişasta [3], RS [4] ve DF [5]'ye göre analiz edilmiştir. Toplam nişasta ve DF analizinden önce, ekmekler hava ile kurutulmuş ve öğütülmüştür. Test ürünlerindeki RS, yenen ürünlerde analiz edilmiştir. Mevcut nişasta, RS'nin toplam nişastadan çıkarılmasıyla hesaplanmıştır (Tablo 1).

DENEY PROSEDÜRÜ.

Çalışma, randomize (test ürünlerinin sırası) çaprazlama çalışması olmuştur, yani her bir konu yaklaşık 2 hafta arayla ayrılmış olan BB veya WB tüketen iki üç günlük müdahaleye katılmıştır. Denekler, alışıldık beslenmelerini ve yemek modellerini standartlaştırmaya ve test veya referans ürünlerin tüketim günlerinde alkol, aşırı fiziksel egzersiz veya DF bakımından zengin gıdalardan kaçınmaları konularında teşvik edilmiştir. Ayrıca, önceki 2 hafta boyunca ve çalışma boyunca antibiyotik veya probiyotik tüketmemiş olmaları gerekir. Ardından sırasıyla, arpa çekirdeği ekmeği veya WB içeren son test akşam yemeğinden sonra, sabahları standart bir kahvaltı servis edilene kadar denekler yemek yememiştir. Denekler, 0730'da deney bölümüne ulaşmışlar ve kan örnekleme için kullanılacak bir antekübital damar içine intravenöz kanül (BD Venflon, Becton Dickinson) yerleştirilmiştir. Açlık kan testleri toplanmış, kahvaltıdan önce doygunluk ve nefes H_2 'si kaydedilmiştir. Kahvaltı, ~0800'de ve 13 dakika içerisinde tüketilmiştir. Ayrıca, kahvaltı öncesi ve sonrası iştahın ölçümleri 100 mm Görsel Analog Skalası (VAS) kullanılarak elde edilmiştir. 2,5 saat tekrarlanan kan örneği sırasında, deneklere, sabit ve düşük derecede fiziksel aktivite sürdürmeleri söylenmiştir.

SONRAKİ HAVA FİZYOLOJİK DEĞİŞKENLERİ VE SOLUNUM HİDROJENLERİNİN ÖRNEKLENMESİ VE ANALİZİ.

Kan glukozunun belirlenmesi için parmak kılcal kan örnekleri alınmıştır (HemoCue®B-glukoz, HemoCue AB, Änjelholm, İsveç). Serum(lar) (s-insülin) ve plazmada (p) fizyolojik test

markörlerini belirlemek için venöz kan örnekleri alınmıştır (p-SCFA, p-GLP-1 ve p-PYY). Serum ve plazma santrifüjleme ile ayrılmış ve analiz edilene kadar hemen bir dondurucuda (-40 °C) saklanmıştır. Plazma GLP-1 ve PYY'nin analizine yönelik kan toplama tüpleri, kan örneklemesinden önce DPPIV (10µl/ml kan) (Millipore, St Charles, USA) ve Trasylol® 10 000 KIE/ml Aprotinin'den (50 µl/ml kan) (Bayer Healthcare AG, Leverkusen, Germany) oluşan bir inhibisyon kokteyli ile hazırlanmıştır. İnhibisyon kokteyli içeren tüpler, kullanıma kadar, ancak en fazla 6 gün boyunca buz üzerinde tutulmuştur. Enzim bağlantılı immünosorban testlerine dayanan Ticari Kitler, S-insülin (Mercodia, Uppsala, İsveç), PYY (3-36 ve 1-36), ve GLP-1'in (aktif 7-36) (Alpco Diagnostics, Salem USA) belirlenmesi için kullanılmıştır. SCFA (asetat, propiyonat, butirat) bir GC-yöntemi [6] kullanılarak belirlenmiştir. Verilen nefes havasındaki nefes hidrojeni (H₂), bir Gastro+ (Bedfont EC60 Gastrolyzer, Rochester, İngiltere) kullanılarak kolonik fermantasyon aktivitesinin bir göstergesi olarak ölçülmüştür. Fekal örnekler diyet müdahalesinden önce toplanmış ve dördüncü günde, sırasıyla üç günlük test ve referans ürün tüketimi yapılmıştır. Deneklere dördüncü günde meydana gelen ilk defekasyondan feçes toplanması talimatı verilmiş ve numune derhal dondurulmuş ve analize kadar - 80 °C'de sürekli depolama için 24 saat içinde deney birimine teslim edilmiştir. Fizyolojik parametrelerin belirlenmesi için bir zaman çizelgesi **Tablo 2**'de sunulmuştur.

Tablo 2. Test markörlerinin belirlenmesi için zaman çizelgesi.

Süre (kahvaltı başladıktan sonra dakika)	0	15	30	45	60	90	120	150
P-PYY	X				X		X	
SCFA	X				X		X	

P-GLP2	X		X		X	X		X
H ₂	X	X	X	X	X	X	X	X
Glikoz	X	X	X	X	X	X	X	X
P-GLP1	X		X	X	X	X		X
S-insülin	X		X	X	X	X	X	X
İştah hisleri	X	X	X	X	X	X	X	X

HESAPLAMALAR VE İSTATİSTİKSEL YÖNTEMLER.

Grafik çizimleri için GraphPad Prism (sürüm 5, GraphPad Yazılımı, San Diego, CA, USA) kullanılmıştır. Eğriler altındaki artmış kan şekeri ve serum insülin alanları (iAUC, (zamanın bir fonksiyonu olarak konsantrasyonlar), trapezoid modeli kullanılarak her bir denek ve test unu için hesaplanmıştır. Artan pik (iPeak) konsantrasyonları glukoz ve insülin için referans hattından bireysel maksimum postprandiyal artış olarak belirlenmiştir. Farklı test öğelerinden sonra test değişkenlerinde önemli farklılıklar, ANOVA (general lineer modeli) ile, MINITAB İstatistiksel Yazılımında (sürüm 16; Minitab, Minitab Inc, State College, PA) değerlendirilmiştir. Düzensiz dağılmış artıklarda (Anderson-Darling ile test edilmiş ve $P < 0,05$ olduğunda eşit dağılmadığı kabul edilmiş), ANOVA'dan önceki verilere Box Cox dönüşümü yapılmıştır. Parametreler arasındaki korelasyonlar MINITAB İstatistiksel Yazılımında Pearson korelasyonu kullanılarak yapılmıştır (sürüm 14; Minitab, Minitab Inc, State College, PA). $P < 0,05$ değerleri anlamlı kabul edilmiştir. Veriler ortalama $\pm$ SEM olarak ifade edilmiştir, değerler $P < 0,05$ 'te anlamlı kabul edilmiştir. Örnek 1: ÇALIŞMA A: $n = 39$, ÇALIŞMA B: $n = 20$, ÇALIŞMA C: $n = 20$.

SONUÇLAR

ÇALIŞMA A (n=39)

KAN GLUKOZU VE SERUM İNSÜLİNİ

BB'nin üç günlük tüketimi, referans WB'ye kıyasla postprandiyal pik konsantrasyonları (iPeak, $P<0,01$) ve iAUC 0-150 dk ($P<0,01$) cinsinden standartlaştırılmış kahvaltıya kan glikoz yanıtını önemli ölçüde artırmıştır (**Tablo 3**). Ayrıca, BB, anlamlı ölçüde indirgenmiş insülin iAUC (0-150 dk $P<0,001$) ve insülin iPeak ($P<0,001$, **Şekil 1**, Tablo 3) sonucunu vermiştir.

Tablo 3. Sırasıyla arpa özü esaslı ekmek (BB) veya beyaz buğday ekmeği (WB) tüketiminden 3 gün sonra standartlaştırılmış kahvaltıya yönelik kan glukozu- ve serum insülin yanıtları.

	Glukoz (n=39)		İnsülin (n=39)	
	iPeak	iAUC 0-150 dakika	iPeak	iAUC 0-150 dakika
	mmol/L	mmol·dk/L	nmol/L	nmol·dk/L
WB	3,45±0,14	215± 13,6	0,266±0,019	16,2±1,28
BB	2,99±0,14* *	181 ± 11,7**	0,230±0,020 ***	13,7±1,13***
% değişim	-13,4	-15,8	-13,6	-15,5

*, $P<0,05$, **, $P<0,01$, ***, $P<0,001$ (WB ve BB arasındaki farklar).

NEFES H₂ ATILIMI

BB tüketimi, BB sonrası artmış bağırsak fermantasyon aktivitesinin göstergesi olan referans WB'ye kıyasla nefes H₂'sini belirgin şekilde arttırmıştır ($P<0,001$, **Tablo 4**).

Tablo 4. Standartlaştırılmış kahvaltıdan sonra, sırasıyla 3 günlük arpa özü esaslı ekmek (BB) veya beyaz buğday ekmeği (WB) tüketiminden sonra nefes H₂'si atılımı ve açlık iştah hisleri.

		H ₂	Tokluk	Açlık
	Açlık Değeri	Ortalama0-150 dk	Açlık Değeri	Açlık Değeri
	N=38	N=39	N=39	N=39
		<i>Ppm</i>		<i>mm</i>
WB	11,39±2,23	7,54±1,04	31,44±4,33	53,77±3,51
BB	26,32±3,42 ***	33,17±4,26 ***	39,74±4,26 *	43,67±4,52 *
%değişim	131	339,92	26,4	-18,78
*; P<0,05, ***; P<0,001 (WB ve BB arasındaki farklar)				

İŞTAH HİSLERİ

5 BB'nin üç günlük tüketimi, üç günlük WB tüketimi ile karşılaştırıldığında, ertesi gün doygunluk ve azalan açlık ile sonuçlanmıştır (P<0,05, Tablo 4).

10 A ÇALIŞMASI: ÖZET VE SONUÇLAR: Bir arpa çekirdeği esaslı ürün alımı, son kısmın yutulmasından 11-14 saat sonra iyileştirilmiş tokluk glukoz regülasyonu ile sonuçlanmıştır. Ayrıca arpa çekirdeği esaslı ürün, aynı zaman perspektifinde artan tokluk ve azalan açlık hissini arttırmıştır. Paralel olarak, artmış kolonik fermentasyon aktivitesinin bir göstergesi olan nefes hidrojen atılımı artmıştır. Sonuçlar, arpa çekirdeği bazlı ürünlerden sonra elde edilen faydalı etkilerin, arpa çekirdeği

15 bazlı ürünler içinde bulunan, içsel DF ve RS'nin spesifik bağırsak fermentasyonu ve spesifik mikrobiyota aktivasyonunun aracılık ettiğini göstermektedir.

ÇALIŞMA B (ÇALIŞMA A'daki kohorttan rastgele seçilen n = 20'deki ilave test markörleri)

20 KAN GLUKOZ VE SERUM İNSÜLİN YANITI

BB'nin üç günlük tüketimi, daha düşük iPeak ($P<0,05$) ve iAUC 0-150 dk ($P<0,05$) açısından standartlaştırılmış kahvaltıdan sonra WB'nin üç günlük tüketimi ile karşılaştırıldığında, kandaki glukoz yanıtını olumlu etkilemiştir. Ayrıca, s-insülin iAUC (0-150 dk) ve insülin iPeak, anlamlı ölçüde daha düşük ($P<0,01$ ve $P<0,05$, sırasıyla) (**Şekil 2**) olmuştur.

BAĞIRSAK FERMENTASYON MARKÖRLERİ: NEFES H_2 VE SCFA'SI

Üç gün BB tüketimi, referans öğünü WB'e kıyasla ($P<0,01$, **Şekil 3, Tablo 5**) anlamlı ölçüde artmış nefes H_2 'sine neden olmuştur. Ayrıca, BB alımı, s-asetat konsantrasyonlarını ve toplam SCFA konsantrasyonunu önemli ölçüde artırmıştır ($P < 0,05$, Tablo 5). BB sonrası WB'ye göre (BB $16,1 \pm 0,7$; WB $14,2 \pm 0,9$; $P=0,11$) dolaşımdaki s-bütiratın anlamlı olmayan bir artışı gözlenmiştir. Sonuçlar, BB'den sonra artan bağırsak fermantasyon aktivitesini göstermektedir.

Tablo 5. 3 gün sırasıyla, arpa çekirdeği esaslı ekmek (BB) veya beyaz buğday ekmeği (WB) tüketimini takiben, açlıkta plazmadaki SCFA konsantrasyonları.

	Asetat	Propiyonat	Butirat	Açlık Toplam SCFA
	Açlık değeri	Açlık değeri N=19	değeri N=18	Açlık değeri N = 19
	N = 19			
	$\mu\text{mol/L}$	$\mu\text{mol/L}$	$\mu\text{mol/L}$	$\mu\text{mol/L}$
WB	$145,3 \pm 11,5$	$9,84 \pm 0,902$	$14,23 \pm 0,864$	$170,2 \pm 12,6$
BB	$171,5 \pm 10,2^*$	$10,45 \pm 0,793$	$16,01 \pm 0,706^1$	$197,8 \pm 10,3^*$
%değişim	18	6	13	16

*; $P<0,05$, ¹ $P=0,11$

BAĞIRSAK İLE İLİŞKİLİ HORMONLAR

GLP-1

GLP-1: bağırsaktaki L hücreleri tarafından üretilen ve insülin salgısını pankreastan arttıran ve hem alfa hücrelerinde hem de beta hücrelerinde insülin duyarlılığını glikoz bağımlı bir şekilde arttıran bir hormondur. GLP-1 ayrıca beta hücresi kütlesini arttırır, asit sekresyonunu ve midede gastrik boşalmayı engeller ve beyindeki tokluğu arttırarak besin alımını azaltır.

BB testi öğün tüketimi, BB ($1,6 \pm 0,5$ pmol/L) tüketiminden sonra WB'den ($1,0 \pm 0,4$ pmol/L) ($P < 0,01$) sonrası ile karşılaştırıldığında, p-GLP-1 konsantrasyonlarının önemli ölçüde artmasına neden olmuştur.

GLP-2

p-GLP-2 konsantrasyonları, BB tüketiminden (ortalama 0-150 dk: $3,5 \pm 0,5$ ng/ml) üç gün sonra, WB'den (ortalama 0-150 dk $3,1 \pm 0,4$ ng/ml, $P < 0,05$) sonrası ile karşılaştırıldığında deney günü esnasında anlamlı ölçüde artmıştır.

PYY

PYY: Ayrıca L hücreleri tarafından üretilir ve mide motilitesini inhibe eder ve iştahı azalttığı gösterilmiştir.

Üç gün BB tüketiminden sonra, üç günlük WB alımına kıyasla ($P < 0,05$, **Şekil 4**), PYY plazma konsantrasyonlarının artışı (0-120 dk) ortaya çıkaran test yemeklerinin önemli bir ana etkisi gözlenmiştir.

25 BAĞIRSAĞA BAĞIMLI HORMONLAR VE SCFA ARASINDAKİ İLİŞKİLER

Üç günlük WB veya BB tüketiminden sonra, PYY'nin plazma konsantrasyonları, sırasıyla toplam SCFA'nın plazma konsantrasyonları ile korelasyon göstermiştir ($r = 0,51$, $P < 0,05$ ve $r = 0,57$, $P = 0,01$).

30 B ÇALIŞMASI: ÖZET VE SONUÇLAR: Geniş araştırmalar, ÇALIŞMA A'da sunulan sonuçlara ek olarak, arpa özü bazlı ürünün iştah ve

glukoz regülasyonunu tüketimden sonra 11-14 saatlik bir zaman zarfındaki iştah ve glukoz regülasyonu için önemli olan bağırsak hormonlarının plazma konsantrasyonlarını artırdığını göstermektedir. Artmış bağırsak fermentasyon aktivitesi, artan nefes hidrojen atılımı ve artmış plazma SCFA konsantrasyonları ile belirlenmiştir. Buna ek olarak, arpa çekirdeği ürünü, bağırsak duvarı geçirgenliğini örneğin endotoksinlere indirgeyerek bağırsak bariyeri işlevlerinde önemli olan bir bağırsak hormonu olan GLP-2'nin plazma konsantrasyonlarını arttırmıştır.

Çalışma, arpa özü bazlı ürünlerde bulunan içsel sindirilemeyen karbonhidratların bağırsak fermentasyonunun, obezitenin ve ilişkili metabolik bozuklukların önlenmesi ve/veya tedavisini amaçlayan umut veren bir yaklaşım için bir mekanizma oluşturabileceğini göstermektedir.

C ÇALIŞMASI (n=20, standartlaştırılmış kahvaltıda münferit glukoz regülasyonunda düzelme derecesine dayalı bir çalışmada kohorttan seçilmiştir.

ÇALIŞMA A'daki (n = 39, Örnek 1) kohorttan, yaş (ortalama $\pm$ SS) $64,9 \pm 5,1$ yaş ve beden kitle indeksleri (ortalama $\pm$ SS) $23,2 \pm 2,4$ kg/m² olan 20 denek (18 kadın ve 2 erkek), daha ileri araştırma için dahil edilmiştir. Denekler, WB'ye kıyasla, bireysel glukoz regülasyonunu geliştirmek için arpa çekirdeği ürününün verimliliğine göre seçilmiştir. BB'nin glukoz regülasyonu üzerindeki faydaları ile ilgili en belirgin etkileriyle ÇALIŞMA A'daki 10 kişi (8 kadın ve 2 erkek, $64,0 \pm 4,6$ yaş, BKİ $23,9 \pm 2,7$ kg/m²) dahil edilmiş ve "yanıt verenler" olarak kaydedilmiş, ve BB'nin glikoz regülasyonunda en az iyileşme içeren 10 kişi (10 kadın $65,7 \pm 5,3$ yaş, BKİ $22,5 \pm 1,7$ kg/m²) dahil edilmiş ve "yanıt vermeyenler" olarak kaydedilmiştir. Yanıt veren ve yanıt vermeyenleri tanımlamak için kullanılan kriterler aşağıda açıklanmıştır. Yanıt verenler grubunda, üç gün BB tüketimi, anlamlı ölçüde gelişmiş glukoz

toleransı (iAUC 0-150 dk: 156±20 ve 251±26 mmol*dk/L, sırasıyla BB ve WB'den sonra, $P<0,0001$, **Şekil 5**) ve standartlaştırılmış kahvaltıdan sonra azalmış insülin yanıtına (iAUC 0-120 dk: 10,3±1,5 ve 15,3±2,1 nmol*dk/L, sırasıyla BB ve WB'den sonra, $P<0,01$, **Şekil 6**) neden olmuştur. Tersine yanıt vermeyenler grubunda, glukoz toleransı üstünde (iAUC 0-150 dk 173±23 ve 191±24 mmol*dk/L, sırasıyla BB ve WB'den sonra, $P=0,11$) veya insülin yanıtları (iAUC 0-120 dk 15,8±1,8 ve 16,3±1,5 nmol*dk/L, sırasıyla BB ve WB'den sonra, $P=0,51$) herhangi anlamlı gelişme görülmemiştir.

Çalışmadan önce ve sırasıyla BB ve WB tüketiminden sonra toplanan fekal örnekler, bağırsak mikrobiyotalarına göre karakterize edilmiştir (Örnek 2'ye bakınız).

"YANIT VERENLER" VE "YANIT VERMEYENLERİN" TANIMI

Yanıt verenler, arpa çekirdek ürününün en belirgin yararlı etkisini glikoz regülasyonu üzerine elde eden ÇALIŞMA A (n = 39)'daki kohortun 10 deneği olarak tanımlanmıştır. Yanıt verenlerde arpa özü ürünü, aralıklı kan glukozunda alanında (iAUC, standartlaştırılmış kahvaltıdan 0-90 dk sonra) minimum %25 oranında (arasında -25-(-67)%, ortalama=-%39) bir düşüşe, aynı zaman zarfında, daha düşük toplam AUC'ye ve standartlaştırılmış kahvaltıdan sonra en az %15 (-15-(-69)%, ortalama=-%33) oranında azalan insülin iAUC'ye neden olmuştur. Geriye kalan 29 denekte, ya indirilmiş bir glukoz yanıtı ya da indirilmiş bir insülin yanıtı bulunmuştur. Bununla birlikte, glukoz ve/veya insülin yanıtlarında en az iyileşme gösteren 10 denek "yanıt vermeyen" olarak belirtilmiştir. Yanıt vermeyenler grubunda (n=10), dört kişi herhangi bir glukoz- düşmesi elde edememiş ve arpadan sonra insülin yanıtları alamamış, üç kişi az daha düşük glukoz yanıtları elde etmiş, ama herhangi bir insülin yanıtı alamamış ve üç kişiler BB'den sonra az daha düşük insülin yanıtı elde etmiş, ama glukoz yanıtlarında herhangi bir gelişme elde edememiştir.

C ÇALIŞMASI: ÖZET VE SONUÇLAR: Sonuçlar, 11-14 saatlik bir perspektifte, glukoz regülasyonu üzerindeki arpa çekirdeklerinin yararlı etkinliği ile ilgili münferit farklılıkları göstermektedir. Münferit uyuşmazlıkların sebebinin, bağırsak mikroflorasının bileşimindeki farklılıklar ile ilişkili olduğu ileri sürülmektedir.

C ÇALIŞMASINA YÖNELİK BİR İZLEME ÇALIŞMASI gerçekleştirilmiştir. Amaç, daha önce BB'nin WB'ye karşı tüketimini takiben glukoz regülasyonu ve bağırsak mikroflorası üzerinde elde edilen sonuçları doğrulamak olmuştur. Çalışma tasarımı daha önce tarif edilen tasarıma benzer olmuştur. C Çalışmasındaki tüm bireylere (10 yanıt verenler ve 10 yanıt vermeyenler) çalışmanın tekrar ettirilmesine istekli olup olmadıkları sorulmuştur. Yedi yanıtlayıcı (6 kadın ve 1 erkek, 65,6 ± 4,3 yaş, bmi 23,5 ± 3,2 kg/m²) ve yedi yanıt vermeyen (7 kadın, 64,7 ± 6,1 yaş, bmi 21,7 ± 1,2 kg/m²) sonuçları kabul etmiştir.

İzleme çalışmasında elde edilen sonuçlar daha önce elde edilen sonuçlarla tutarlı olmuştur. Sonuç olarak, yanıt verenler grubunda (n=7), BB, standartlaştırılmış kahvaltıya (iAUC 0-150 dk 239±32 ve 295±28 mmol*dakika/L, sırasıyla, BB ve WB'den sonra, P<0,0001, **Şekil 7**) glukoz toleransını anlamlı ölçüde geliştirirken, BB'nin yanıt vermeyenler grubundaki (sırasıyla BB ve WB'den sonra iAUC 0-150 dk 277±20 ve 287±36 mmol*dakika/L, P=0,81) glukoz toleransı üzerinde herhangi bir gelişmesi görülmemiştir.

İZLEME ÇALIŞMASINA YÖNELİK ÖZET VE SONUÇLAR: İzleme çalışmasında elde edilen sonuçlar böylece, DF ve RS'nin BB'deki glukoz regülasyonu üzerine faydalı etkileri ile ilgili olarak yukarıda açıklanan önceki çalışmalarda (A-C çalışmaları) elde edilen sonuçları doğrular ve metabolik yanıtın münferit bir bileşenini gösterir.

Örnek 2

İNSANLARDA WB VEYA BB ÜRÜNLERİNİN İZLENMESİ İLE İNSAN BAĞIRSAGI MİKROBİYOTA KARAKTERİZASYONU;

NEDENSEL İLİŞKİLERİN DOĞRULUĞU İÇİN FARE VE İNOKÜLASYON DENEYLERİ

- 5 FEKAL DNA EKSTRAKSİYONU, AMPLİFİKASYONU, PİROSEKANSLAMA VE VERİ ANALİZİ.

Genomik DNA, daha önce Salonen ve diğerleri [7] tarafından daha önce tarif edilen tekrarlı tane dövmesi (RBB) yöntemi kullanılarak, birey başına 100-150 mg dışkıdan izole edilmiştir, 10 Fekal DNA, bir NanoDrop ND-1000 spektrofotometresi (Nano-Drop Technologies) kullanılarak ölçülmüş ve genomik DNA kalitesi, %1 Agaroz-GelRed jeli kullanılarak jel elektroforezi ile değerlendirilmiştir. Genomik DNA'nın bir bölüntüsü, PCR için kullanılmadan önce 1 ul içinde 10 ng'ye seyreltilmiştir.

- 15 16 rRNA geninin V1-V2 değişken bölgesinin amplifikasyonu, fekal mikrobiyota çeşitliliğini değerlendirmek için 454 Titanyum sıralama adaptörleri ile kaynaşmış 27F ve 338R primerleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. 338R primerleri, tek bir sekanslamada analiz edilmek üzere çoklu numunelerin analiz 20 edilmesine imkan tanıyan benzersiz hata düzeltici 12-tabanlı barkodları içermiştir. Her bir örnek, 1,5 U FastStart Taq DNA Polymerase (Roche), her bir primerden 0,2 µM ve 1 ul (~10 ng) ekstrakte edilmiş genomik DNA içeren 25 µL'lik bir tepkime hacminde üç kopya halinde amplifiye edilmiştir. PCR şu şartlar 25 altında gerçekleştirilmiştir: 3 dakika süreyle 95 °C'de başlangıç denatürasyonu, daha sonra 20 sn süreyle 95 °C'de 25 döngü denatürasyon, 30 sn süreyle 52 °C'de tavlama ve 60 sn süreyle 72 °C'de elongasyon, ve 10 dakika süreyle 72 °C'de bir nihai elongasyon adımı. PCR'den sonra üç kopya birleştirilmiş ve 30 ortaya çıkan ürün, boyut ve saflık açısından %0,8 Agarose-GelRed jeli üzerinde kontrol edilmiştir. Daha sonra örnekler, NucleoSpin Gel ve PCR Clean-up kit (Macherey- Nagel, Almanya) ile saflaştırılmış ve Quant-iT PicoGreen dsDNA kit (Invitrogen,

Carlsbad, CA) kullanılarak kantifiye edilmiştir. Saflaştırılmış PCR ürünleri, 1 µl'de 20 ng'lik bir konsantrasyona seyreltilmiş ve eşit miktarlarda toplanmıştır. Toplanan örnekler daha sonra kısa amplifikasyon parçalarını çıkarmak için Ampure manyetik saflaştırma tanecikleri (Agencourt, Danvers, MA) ile saflaştırılmıştır. Toplanan ürünler, National Genomics Infrastructure'da (Stockholm) 454 GS FLX titanyum kimyası kullanılarak dizilmiştir.

Ham veriler, 200 nükleotidden daha kısa, 1.000 nükleotidden daha uzun olan, primer uyumsuzlukları, belirsiz bazlar, düzeltilemeyen barkodlar içeren veya homopolimer çalışmaları altı bazdan fazla olan sekansların çıkarılması için kalite filtrelenmiştir. Kalite filtrelenmiş okumaların 454 adaptörleri ve barkod sekansları trimlenmiş ve yazılım paketi Quantitative Insights Into Microbial Ecology(QIIME) (sürüm 1.5.0) ile analiz edilmiştir. Kalite filtresini kabul eden okumaların sayısı 755963 (ortalama 12599 sekans/örnek) olmuştur. Sekanslama verilerine, QIIME'den temin edilebilen bir sarıcı olan denoise_wrapper.py ile gürültü giderme uygulanmıştır.

Sekanslar, UCLUST kullanarak, çiftli bir kimlik eşiği %97 olan operasyonel taksonomik birimler (OTU'lar) atanmıştır. En bol sekans, her OTU için temsilci olarak seçilmiş ve Ribozomal Veritabanı Projesi (RDP) Sınıflandırıcı kullanılarak taksonomik olarak atanmıştır. Temsili OTU'lar, Pynast kullanılarak hizalanmış ve örneklerin β -çeşitliliğini (ağırlıklı UniFrac) hesaplamak için kullanılan FastTree ile filogenetik bir ağaç inşa etmek için kullanılmıştır.

KISA ZİNCİRLİ YAĞLI ASİTLERİN EKSTRAKSİYONU VE SAYISALLAŞTIRMASI

120 - 190 mg donmuş feçes, çevirmeli kapaklı bir cam tüpe (16x125 mm) aktarılmış ve 100 µl'lik dahili standart ([1-¹³C]asetat ve [2H₆]propiyonat 1M konsantrasyonda, [1³C₄]butirat 0,5M konsantrasyonda, [1-¹³C₁]izobutirat ve [1-¹³C]izovalerat

0,1M konsantrasyonda, [1,2-¹³C₂]heksanoat, [¹³C]laktat ve [¹³C₄]süksinik asit her biri 40 mM konsantrasyonda) stok çözeltisi ilave edilmiştir. Ekstraksiyondan önce, örnekler 3 saat boyunca -50 °C'de dondurularak kurutulmuştur (verim 28-78 mg/kuru ağırlık). 50 µl %37'lik HCl ile asitleştirildikten sonra organik asitler ekstrakte edilmiştir (2 ml dietil eter/ekstraksiyon; 2 sefer). 500-µl'lik ekstrakte edilmiş örnek bölüntüsü, 50 µl'lik N-tert-butildimetilsilil-N-metiltriflorasetamit (MTBSTFA; Sigma) ile oda sıcaklığında karıştırılmıştır. Elde edilen türetilmiş materyalin bir bölüntüsü (1 µl), bir kütle spektrometresi detektörüne (Agilent Technologies 5975 C) bağlı bir gaz kromatografisine (Agilent Technologies 7890 A) enjekte edilmiştir. Bir doğrusal sıcaklık gradyanı kullanılmıştır. Başlangıç sıcaklığı 65°C 6 dakika süreyle muhafaza edilmiş, 260 °C'ye (15°C/dk) ve ayrıca 280 °C'ye 5 dakika süreyle yükseltilmiştir. Enjektör ve transfer hattı sıcaklıkları 250°C olmuştur. Miktar tayini, etiketli iç standartlara göre seçilmiş iyon izleme kazanım modunda tamamlanmıştır (valerat [1-¹³C]izovalerat ile karşılaştırılmıştır, heptanoat ve oktanoat [1,2-¹³C₂]heksanoat ile karşılaştırılmıştır ve fumarat [¹³C₄]süksinik asit ile karşılaştırılmıştır). İzlenen iyonların m/z oranları aşağıdaki gibi olmuştur: 117 (asetik asit), 131 (propiyonik asit), 145 (butirik asit), 146 (izovalerik asit), 159 (izovalerik asit ve valerik asit), 173 (heksanoik asit), 187 (heptanoik asit), 201 (oktanoik asit), 261 (laktik asit), 287 (fumarik asit), 289 (süksinik asit), 121 ([²H₂]- ve [1-¹³C]asetat), 136 ([²H₅]propiyonat), 146 ([1-¹³C₁]izobutirat), 149 ([¹³C₄]butirat), 160 ([1-¹³C]izovalerat), 175 ([1,2-¹³C₂]heksanoat), 264 ([¹³C]laktat) ve 293 ([¹³C₄]süksinik asit).

İNSANLARDA FEKAL MİKROBİYAL ÖRÜNTÜ İLE İLGİLİ SONUÇLAR

16S rRNA geninin barkodlu ampikonlarının pirosekanslaması, her tedaviden sonra yanıt verenlerde (R) ve yanıt vermeyenlerde

(NR) üretilen benzer miktardaki sekanslarla, örnek başına ortalama 12599 sekans (aralık 7018 - 21116) olan 755 963 yüksek kaliteli sekans ile sonuçlanmıştır. Her bir çalışma grubunda en fazla Firmicutes (~%70) bulunmuş, ardından Bacteroidetes (~%20) gelmiştir. Bununla birlikte, yanıt verenler veya yanıt vermeyenler arasında veya herhangi bir tedavi ile göreceli olarak Firmicutes ve Bacteroidetes bolluğu arasında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. Bacteroidetes bolluğundaki önemli olmayan bir artış; bununla birlikte, arpa özü ekmeği (**Şekil 8A**) ile desteklenmiş diyet üzerinde Yanıt veren grubuna kaydedilmiştir.

Prevotella ve *Bakteroidetes* tarafından Bacteroidetes dalı oluşturulmuş ve ilginç şekilde *Prevotella* yanıt veren gruplarında anlamlı ölçüde daha yüksek göreceli bolluk bulmuş bulunmaktayız (**Şekil 8B**, İki yönlü ANOVA, $P < 0,01$). Ayrıca yanıt vermeyenlerde gözlenmeyen yanıt veren grubunda arpa çekirdeği ekmeği tüketiminden sonra *Prevotella* seviyeleri artmıştır.

Ayrıca arpa çekirdeği ekmeği ile beslenen diyetle cevap veren grupta dışkıda süksinat düzeylerinde anlamlı artış tespit edilmiştir (**Tablo 6**). Süksinatın *Prevotella* türlerinin fermentatif aktivitelerinden başlıca metabolit olduğu bilinmektedir.

Tablo 6. Fekal organik asit konsantrasyonu.

Metabolit umol/g kuru ağırlık	Yanıt veren Kontr ol	Yanıt veren WB	Yanıt veren BB	Yanıt vermeyen Kontrol	Yanıt vermeyen WB	Yanıt vermeyen BB
Asetat	92,82	93,47	77,58	90,95	100,92	79,51
Propiyonat	40,08	36,88	35,12	29,02	37,47	27,57
Butirat	38,02	32,41	30,07	28,27	33,49	23,81

Laktat	3,54	12,86	5,37	4,73	4,89	8,30
Süksinat	4,32	2,86	9,32	1,66	1,33	2,43

FARELERDE İNOKÜLASYON DENEYLERİ

- On-on iki haftalık mikrop içermeyen Swiss Webster erkek fareleri, tekli 10^8 CFU *Bakteroidetes tetaiotaomikron* suşu VPI-5482 (gece boyunca YCFA ortamında kültür) veya *Prevotella copri* suşu DSM18205 (gece boyunca PYG ortamında kültür) gavajı ile ya tek başına veya birlikte aşılanmıştır. Her iki suş, insan feçesinden izole edilmiştir. Her ikisi de 15 ml'lik Hungate tüplerinde fare sistemlerine kültürlenmiş ve nakledilmiştir.
- 10 Mono ve bi- kolonize fareler 14 gün boyunca izo-kafes sisteminde barındırılmıştır. Sakrifiye öncesinde, farelere ağızdan glukoz tolerans testi (OGTT) yapılmıştır. Bütün fareler OGTT'den 4 saat önce aç bırakılmıştır. Kolonizasyon yoğunluğu, türe özgü primerler kullanılan qPCR deneyleri kullanılarak doğrulanmıştır.
- 15 Yaşları eşleşen, gnotobiyotik erkek Swiss Webster farelerinin bir kontrol grubu da aynı otoklavlanmış gıdalarla ad libitum şekilde beslenmiştir.

- Fareler 4 saat aç bırakılmış ve daha sonra oral gavaj %60 D-glukoz (3 g/kg vücut ağırlığı) verilmiştir. Kuyruk damarından 0, 30, 60, 90 ve 120'nci dakikada kan alınmış ve kan şekeri seviyeleri, bir HemoCue® glukometre kullanılarak ölçülmüştür. İnsülin ELISA testi (Crystal Chem, Inc.) kullanılarak serum insülin düzeylerinin analizi için kuyruk damarından 0, 15 ve 30 dakika sonra ekstra kan alınmıştır.

25 SONUÇLAR

- Prevotella*'nın glukoz toleransındaki gelişmelere etkisinin olup olmadığını araştırmak için, insan dışkısı türevli *Prevotella* suşu ile mono kolonize gnotobiyotik fareler - *Prevotella copri* ve bu farelerin glikoz toleransını B. 30 tetaiotaomikron ile kolonize edilmiş ve her iki suş ile bi-

kolonize edilmiş fareler ile karşılaştırmış bulunmaktayız. B. thetaiotaomicron ile kolonizasyon, *P. copri* ile kolonize edilen farelere kıyasla glukoz toleransının bozulmasına neden olmuştur (**Şekil 9A-B**). Ek olarak, *P. copri* ile kolonize edilen farelerde serum insülin seviyeleri, B. thetaiotaomicron ile kolonize edilen farelere kıyasla glikozun oral gavajından sonra 15 ve 30 dakikalarında daha düşük olmuştur (**Şekil 9C**). Önemli olarak, B. thetaiotaomicron ile kolonileştirilmiş fareler, *P. copri* ile birlikte kolonileştirildiklerinde gelişmiş glikoz toleransı sergilemiştir. Bu veriler, B. thetaiotaomicronunun glukoz toleransını bozarken ve *P. copri*'nin bu bozulmayı önleyebileceğini önermektedir.

Örnek 3

ÜRÜN ÖRNEKLERİ

15 A) Bir porsiyon yoğurt içeren bir kapta, hermetik olarak kapağa kapatılmış ve bir membran ile ayrılmış arpa DF'si ve/veya RS'si ve *Prevotella* (10^7 CFU veya daha fazla).

B) Bir porsiyon ayran içeren bir şişede, hermetik olarak bir pipete kapatılmış arpa DF'si, RS'si ve *Prevotella* (10^9 CFU).

20 C) Tek dozluk paketlerde hermetik olarak kapalı bir arpa DF, RS ve *Prevotella* porsiyonu.

D) Bir meyve içeceği porsiyonunu içeren bir şişe ile birlikte, bir içme pipetinde hermetik olarak kapatılmış arpa DF'i ve/veya RS'si ve *Prevotella* (10^9 CFU).

25 E) Bir meyve içeceği porsiyonunu içeren bir şişe ile birlikte, bir kapağa hermetik olarak kapatılmış ve bir zar ile ayrılmış, arpa DF'i ve RS'si ve *Prevotella* (10^9 CFU).

30 F) Prebiyotik karbonhidrat bileşeni olan veya olmayan bir matris içinde kapsüllenmiş *Prevotella* içeren bir emülsiyon haline getirilmiş gıda ürünü.

A-F) Bir porsiyon arpa DF'si ve RS'si ve *Prevotella* (7 g

çözünmez arpa DF'si, 3,3 g çözünür arpa DF'si, 8,5 g RS ve 10⁹ CFU Prevotella).

REFERANSLAR

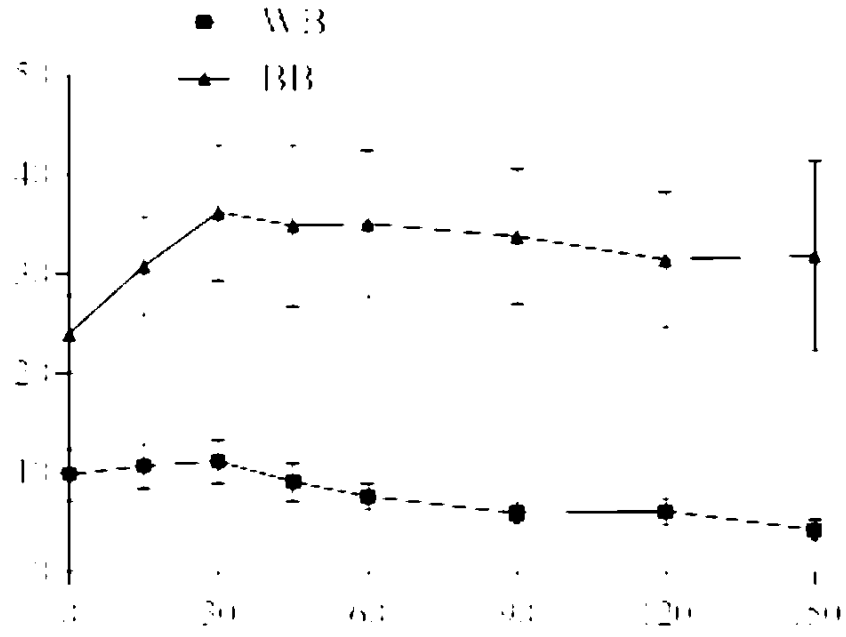
- 5 1. Vidhyalakshmi, R., R. Bhakayaraj, ve R.S. Subhasree, *Encapsulation "The Future of Probiotics"-A Review*. Advances in Biological Research 2009. **3**(3-4): sf. 96-103.
2. Holm, J., ve diğerleri, *A rapid method for the analysis of starch*. Starch/Starke, 1986. **38**: s. 224-226.
- 10 3. Bjorck, I.M.E. ve M.A. Siljestrom, *In-vivo and in-vitro digestability of starch in autoclaved pea and potatoe products*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 1992. **58**: s. 541-553.
- 15 4. Akerberg, A.K., ve diğerleri, *An in vitro method, based on chewing, to predict resistant starch content in foods allows parallel determination of potentially available starch and dietary fiber*. The Journal of Nutrition, 1998. **128**(3): s. 651-60.
- 20 5. Asp, N.-G., ve diğerleri, *Rapid enzymatic assay of insoluble and soluble dietary fiber*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1983. **31**: s. 476-482.
- 25 6. Brighenti, F., *Summary of the conclusion of the working group on Profibre interlaboratory study on determination of short chain fatty acids in blood*, in *Functional properties of non-digestible carbohydrates*, F. Gullion, ve diğerleri, Editörler. 1998, European Comission, DG XII, Science, Research and Development: Brussels, Belgium, sf. 150-153.
- 30 7. Salonen, A., ve diğerleri, *Comparative analysis of fecal DNA extraction methods with phylogenetic microarray: effective recovery of bacterial and archaeal DNA using mechanical cell lysis*. J Microbiol Methods, 2010. **81**(2): s. 127-3



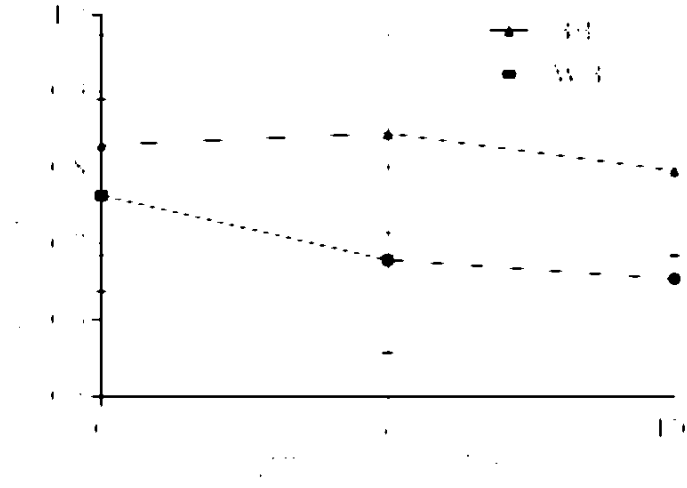
ŞEKİL 1



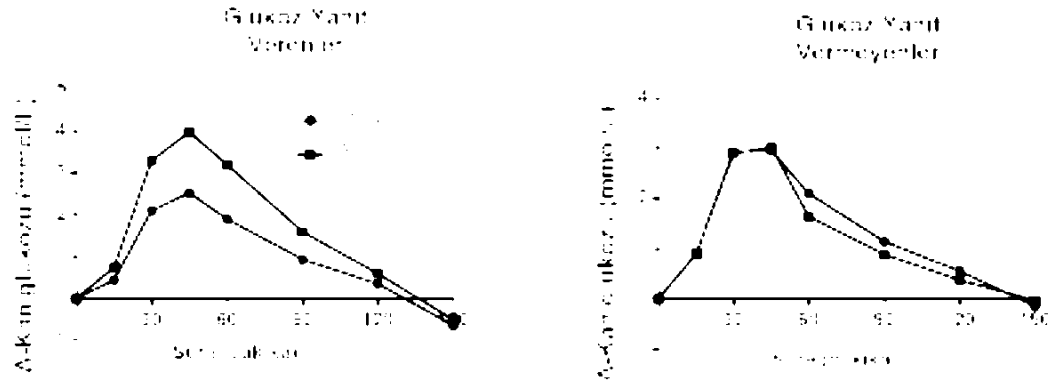
ŞEKİL 2



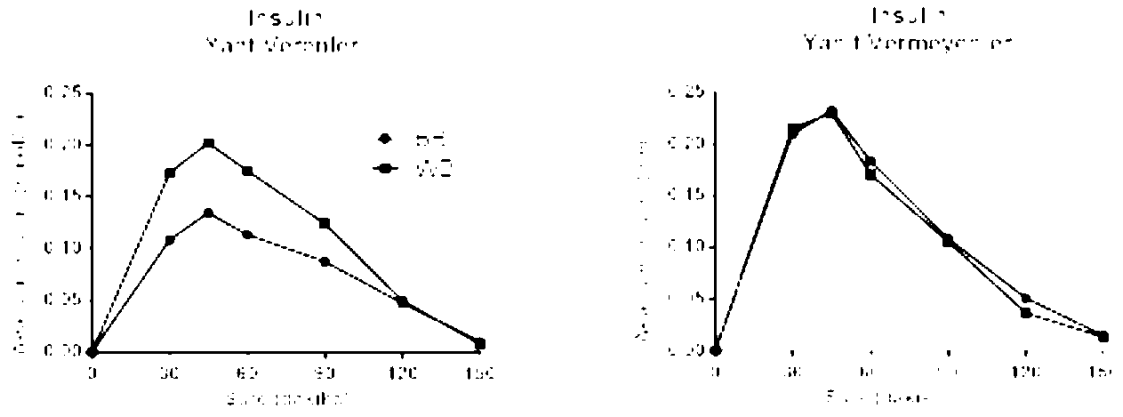
ŞEKİL 3



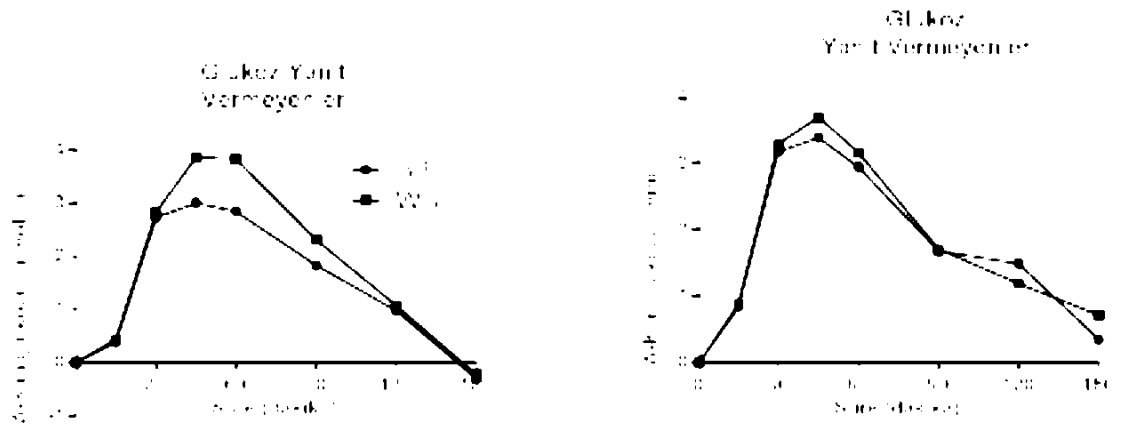
ŞEKİL 4



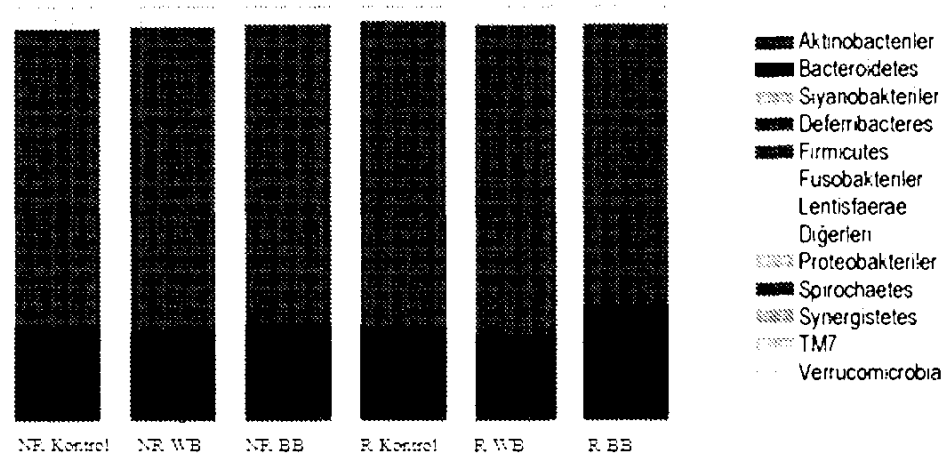
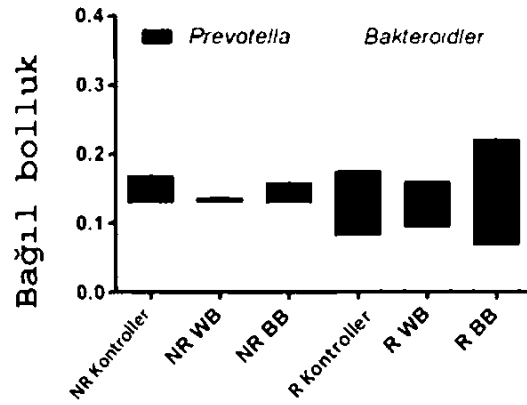
ŞEKİL 5



ŞEKİL 6

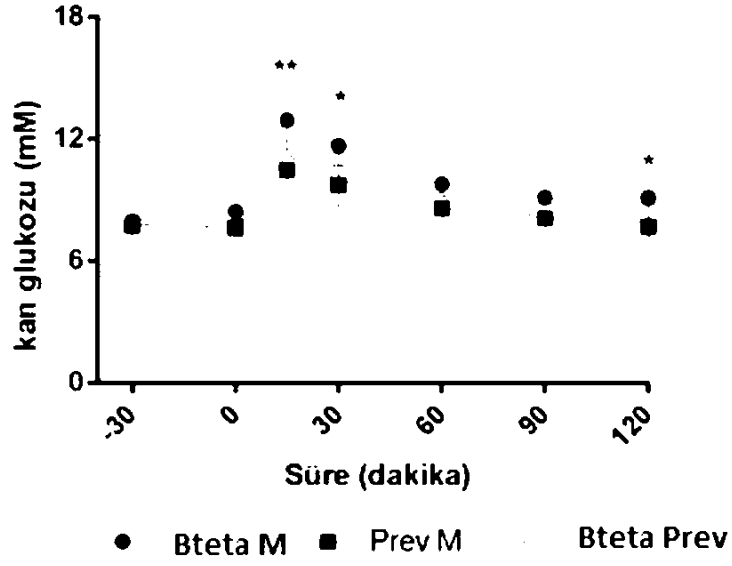


ŞEKİL 7

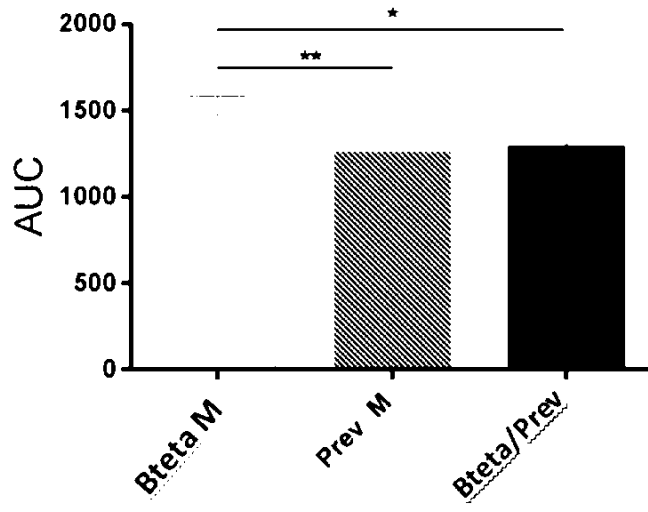
A**B**

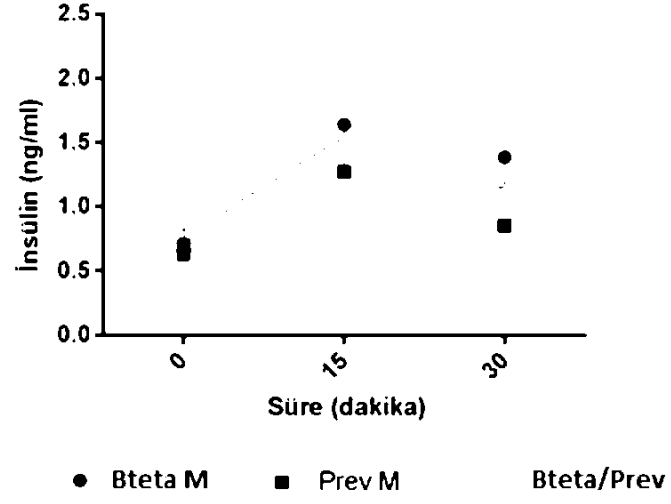
ŞEKİL 8

A.



ŞEKİL 9a

B.**ŞEKİL 9b**



ŞEKİL 9c