

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNE AİT BAZI SUŞLARIN OBEZİTEYE KARŞI  
ETKİLERİ**

**Gamze Eda YILDIRIM**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**ANKARA  
2019**

**Her hakkı saklıdır**

## TEZ ONAYI

Gamze Eda YILDIRIM tarafından hazırlanan “**Laktik Asit Bakterilerine Ait Bazı Suşların Obeziteye Karşı Etkileri**” adlı tez çalışması 08/01/2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

**Danışman:** Prof. Dr. Özlem OSMANAĞAOĞLU  
Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı

### Jüri Üyeleri :

**Başkan :** Prof. Dr. Haluk HAMAMCI  
ODTÜ Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

**Üye :** Doç. Dr. Erkan YILMAZ  
Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

**Üye :** Prof. Dr. Özlem OSMANAĞAOĞLU  
Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı

**Yukarıdaki sonucu onaylarım.**

**Prof. Dr. Atila YETİŞEMİYEN**  
Enstitü Müdürü

## ETİK

Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez içindeki bütün bilgilerin doğru ve tam olduğunu, bilgilerin üretilmesi aşamasında bilimsel etiğe uygun davrandığımı, yararlandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi beyan ederim.

08.01.2019



Gamze Eda YILDIRIM

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

### LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNE AİT BAZI SUŞLARIN OBEZİTEYE KARŞI ETKİLERİ

Gamze Eda YILDIRIM

Ankara Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Özlem OSMANAĞAOĞLU

Çalışmanın amacı, 3 farklı kaynaktan (anne sütü, yeni doğan bebek feçesi, turşu suyu) izole edilen laktik asit bakterilerinin (LAB) adiposit farklılaşması için karakterize edilen öncül adiposit 3T3-L1 (ATCC CL-173) hücre hattı üzerindeki adipogenez düzenleyici etkisinin belirlenmesidir. Çalışmada kullanılan suşların öncül adipositlerde adipogenez düzenleyici etkisi; adiposit hücre farklılaşması boyunca, lipid depolanması ve bu yolda önemli bazı genlerin ifade seviyelerinin araştırılması neticesinde değerlendirilmiştir. Hücre canlılık sonuçları olgun adipositlerde; kontrol ile *P. pentosaceus* OZF, *L. plantarum* OZF, *L. plantarum* OZT uygulanan hücreler arasında önemli bir fark olmadığını göstermiştir. Adiposit farklılaşması boyunca, 13 gün içinde *P. pentosaceus* OZF, *L. plantarum* OZF, *L. plantarum* OZT varlığında hücre canlılık oranları sırasıyla % 91.15, % 88.30 ve % 85.05'in üzerinde olduğu belirlenmiştir. LAB'nin lipid akümülyasyon üzerine inhibitör etkisi Oil Red O boyama ile ölçülmüştür. Sitoplazmik yağ damlacıkları üzerinde inhibitör etki *P. pentosaceus* OZF'de, *L. plantarum* OZF ve *L. plantarum* OZT suşlarından daha etkili olduğu belirlenmiştir. Adiposit farklılaşmasının, hücre içi doza bağlı inhibisyonu moleküler seviyede rt-PCR ile değerlendirilmiştir. Adipogenezde önemli rol oynayan bazı genlerin (transkripsiyon faktörleri PPAR $\gamma$ , C/EBP- $\alpha$  genleri, terminal adipojenik işaretleyici GPDH ve sitokin TNF- $\alpha$  geni) mRNA ekspresyon seviyeleri kontrolle karşılaştırıldığında, *P. pentosaceus* OZF uygulanan hücrelerde, *L. plantarum* OZF ve *L. plantarum* OZT'ye kıyasla anlamlı derecede azalma göstermiştir ( $p < 0.05$ ). Sitokin geni adiponektinin, *P. Pentosaceus* OZF ile muamele edilen hücrelerde diğer suşlara oranla daha fazla eksprese edildiği gözlenmiştir ( $p < 0.05$ ). Tüm sonuçlar birlikte ele alındığında, verilerimiz toksik olmayan konsantrasyonlarda *P. pentosaceus* OZF'nin öncül adipositlerin farklılaşmasını diğer suşlara oranla daha fazla inhibe ederek potansiyel anti-obezite etkileri sergileyebileceğini göstermektedir.

**Ocak 2019, 48 sayfa**

**Anahtar Kelimeler:** Adipogenez, probiyotik, obezite, 3T3-L1

## ABSTRACT

Master Thesis

ANTI-OBESITY EFFECTS of CERTAIN STRAINS of LACTIC ACID BACTERIA  
Gamze Eda YILDIRIM

Ankara University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Ozlem OSMANAGAOGLU

The aim of this study was to determine the adipogenesis regulating effect of lactic acid bacteria (LAB) isolated from three different sources (breast milk, newborn baby feces, pickle juice) on the preadipocyte 3T3-L1 (ATCC CL-173) cell line specifically characterized for adipocyte differentiation. The adipogenesis regulating effect of the strains in the preadipocytes was evaluated as a result of the lipid storage during adipocyte cell differentiation and the investigation of the expression levels of some important genes in this pathway. Results of cell viability have shown that there is no significant difference in mature adipocytes between control and the cells treated with *P. pentosaceus* OZF, *L. plantarum* OZF, *L. plantarum* OZT. During adipocyte differentiation, cell viability in the presence of *P. pentosaceus* OZF, *L. plantarum* OZF and *L. plantarum* OZT was found to be above 91.15%, 88.30% and 85.05% respectively in 13 days. The inhibitory effect of LAB on lipid accumulation was measured by Oil Red O staining. The inhibitory effect of *P. pentosaceus* OZF on cytoplasmic oil droplets was found to be more effective as compared to *L. plantarum* OZF and *L. plantarum* OZT strains. Intracellular dose-dependent inhibition of adipocyte differentiation was assessed at the molecular level by rt-PCR. When the mRNA expression levels of some genes that play an important role in adipogenesis (transcription factors PPAR $\gamma$  and C/EBP- $\alpha$  genes, terminal adipogenic marker GPDH gene and cytokine TNF- $\alpha$  gene) were compared with control, cells treated with *P. pentosaceus* OZF showed a significant decrease as compared to *L. plantarum* OZF and *L. plantarum* OZT treated cells ( $p < 0.05$ ). Adiponectin, a cytokine gene, was shown to be more expressed in *P. Pentosaceus* OZF treated cells than the other strains ( $p < 0.05$ ). Taken together, our results suggest that, at non-toxic concentrations, *P. pentosaceus* OZF may exhibit potential anti-obesity effects more than other strains by inhibiting the differentiation of preadipocytes.

**January 2019, 48 pages**

**Key Words:** Adipogenesis, probiotic, obesity, 3T3-L1

## TEŞEKKÜR

Bu çalışma “*Pediococcus pentosaceus* OZF suşunun obeziteye karşı potansiyel etkisinin *in vitro* koşullarda belirlenmesi” adlı hızlı destek projesi ile Ankara Üniversitesi-BAP (Bilimsel Araştırma Projeleri) tarafından desteklenmiştir. Tezimin başarılı bir şekilde sonuçlanabilmesi için gerekli desteği sağlayan BAP’a teşekkür ederiz.

Yüksek lisans tezim boyunca bilimsel ve sosyal yönüyle bana ışık tutan, her zaman daha doğru düşünmeye ve daha sağlam adımlarla ilerlememe yardımcı olan, çalışmam boyunca karşılaştığım her problemde beni sabırla dinleyip desteğini esirgemeyen, sosyokültürel yönüyle de çok kez bana yol gösteren değerli hocam Prof. Dr. Özlem OSMANAĞAOĞLU’na,

Tezimin araştırma kısmında analizleri değerlendirmemde büyük destek olan değerli hocam Prof. Dr. İrfan KANDEMİR’e, çalışmamın başından sonuna kadar desteğini esirgemeyen, her açıdan olumlu ve yapıcı yönüyle beni yönlendiren değerli hocam Arş. Gör. Dr. Harun ÖNLÜ’ye, deneylerim süresince bana her türlü imkanlarını ve yardımlarını sunan saygıdeğer hocam Doç. Dr. Erkan YILMAZ’a ve bilimsel tecrübelerini benimle paylaşan değerli hocalarım Doç. Dr. İlker BÜYÜK ve Arş. Gör. Gülizar AYDOĞDU’ya, tezimin deney aşamalarında bana göstermiş oldukları yakın ilgi ve anlayış için Atlas Biyoteknoloji Laboratuvarı ve çalışanlarına,

Çalışmam boyunca bana her daim yol arkadaşlığı yapan, desteğini bir an için bile esirgemeyen değerli arkadaşım Kemal KAYAŞLI’ya, varlığı ve desteğiyle tezim boyunca beni yalnız bırakmayan sevgili adaşım Eda AKDAĞ’a,

Hayattaki her zorluğu sevgileriyle aştığım, her zaman en büyük destekçim, en büyük şansım olan canım annem, canım babam ve en kıymetlim ablama..

TEŞEKKÜRLER..

Gamze Eda YILDIRIM  
Ankara, Ocak 2019

## İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	
ETİK .....	i
ÖZET .....	ii
ABSTRACT .....	iii
TEŞEKKÜR .....	iv
SİMGELER DİZİNİ .....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	ix
1. GİRİŞ .....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ .....	3
2.1 Probiyotiklerin Tanımı .....	3
2.1.1 Probiyotiklerin sahip olması gereken kriterler .....	3
2.1.2 Probiyotiklerin sağlık üzerine etkileri.....	3
2.2 Obezite ve Risk Faktörleri.....	4
2.2.1 Obezite ve adipogenez.....	5
2.2.2 Obezite ve inflamasyon .....	7
2.2.3 Adipokinler .....	8
2.2.4 Probiyotiklerin obezite üzerine etkileri.....	8
2.3 3T3-L1 Hücre Hattı.....	12
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	13
3.1 MATERYAL .....	13
3.1.1 Bakteri kültürleri ve hücre hattı.....	13
3.1.2 Hücre kültürü ve bakteri kültür ortamı .....	13
3.1.3 Kimyasallar.....	13
3.1.4 Çözelti ve malzemelerin sterilizasyonu .....	13
3.2 Yöntem .....	14
3.2.1 Bakteriyel hücre ekstraktlarının hazırlanması .....	14
3.2.2 Hücre kültürü .....	15
3.2.3 Adipogenez aktivitenin düzenlenmesi .....	16
3.2.3.1 Hücre canlılık testi .....	17
3.2.3.2 Oil Red O boyama ile lipid depolanmasının belirlenmesi .....	18
3.2.3.3 Ters transkripsiyon ve eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (rt- PCR) ile bazı gen ifadeleri seviyelerinin belirlenmesi.....	19
3.2.4 Sonuçların istatistiksel analizi.....	21
4. BULGULAR .....	22
4.1 Hücre Canlılığı .....	22
4.1.1 <i>Pediococcus pentosaceus</i> OZF suşunun hücre canlılığına etkisi .....	23
4.1.2 <i>Lactobacillus plantarum</i> OZF suşunun hücre canlılığına etkisi .....	24
4.1.2 <i>Lactobacillus plantarum</i> OZT suşunun hücre canlılığına etkisi.....	24
4.2 Oil Red O Boyama .....	25
4.2.1 <i>Pediococcus pentosaceus</i> OZF'nin lipid akümüasyonu üzerine etkisi .....	26
4.2.2 <i>L. plantarum</i> OZF'nin lipid akümüasyonu üzerine etkisi .....	28
4.2.3 <i>Lactobacillus plantarum</i> OZT'nin lipid akümüasyonu üzerine etkisi .....	30

<b>4.3 Ters Transkripsiyon ve Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (rt- PCR) .....</b>	<b>32</b>
<b>4.3.1 <i>Pediococcus pentosaceus</i> OZF'nin mRNA ekspresyon seviyeleri .....</b>	<b>32</b>
<b>4.3.2 <i>Lactobacillus plantarum</i> OZF'nin mRNA ekspresyon seviyeleri.....</b>	<b>33</b>
<b>4.3.2 <i>Lactobacillus plantarum</i> OZT'nin mRNA ekspresyon seviyeleri.....</b>	<b>33</b>
<b>5. TARTIŞMA VE SONUÇ .....</b>	<b>35</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>38</b>
<b>EKLER .....</b>	<b>44</b>
<b>EK 1 Lab ve Hücre Kültürü Gelişimi için Kullanılan Kültür Ortamları .....</b>	<b>45</b>
<b>EK 2 Kimyasallar .....</b>	<b>47</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>48</b>



## SİMGELER DİZİNİ

Amp	Genlik (Amplitude)
CO <sub>2</sub>	Karbondioksit
dk	Dakika
kg	Kilogram
m <sup>2</sup>	Metrekare
ml	Mililitre
mg	miligram
nm	Nanometre
Rcf (g)	Bağıl merkezkaç kuvveti (Relative Centrifugal Force)
Rpm	Dakikada Devir (Rotations Per Minute)
sn	Saniye
µl	Mikrolitre
µm	Mikrometre

### Kısaltmalar

AMM	Adipositlerin Gelişimini Devam Ettiren Besiyeri (Adipocyte Maintenance Medium)
ATCC	Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu (American Type Culture Collection)
BMI	Vücut Kitle İndeksi (Body Mass Index)
DEX	Deksametazon (Dexamethasone)
DM	Farklılaşma Besiyeri (Differentiation Medium)
DMEM	Dulbeccos modified Eagle Medium
DMSO	Dimetil Sülfoksit (Dimethyl Sulfoxide)
FBS	Fetal Sığır Serumu (Fetal Bovine Serum)
IBMX	İzobutil metilksantin (Methylisobutylxanthine)
MRS	De Man, Rogosa and Sharpe Broth
MTT	3-[4,5-dimetiltiazol-2-yl]-2,5 difeniltetrazolyum bromür
PBS	Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi (Phosphate Buffer Saline)
PEM	Öncül adipositlerin Büyüme Besiyeri (Preadipocyte Expansion Medium)
Rt	Oda Sıcaklığı (Room Temperature)
rt-PCR	Eş Zamanlı- Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Real time- Polymerase Chain Reaction)
SCFA	Kısa Zincirli Yağ Asiti (Short Chain Fatty Acid)

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Vücut Kitle İndeksi Sınıflandırılması .....	5
Şekil 2.2 Adipogenezde Aşamalar .....	7
Şekil 4.1 Mtt Analizi Sonucu <i>P. pentosaceus</i> OZF Suşuna Ait Hücre Canlılık Sonuçları .....	23
Şekil 4.2 Mtt Analizi Sonucu <i>L. plantarum</i> OZF Suşuna Ait Hücre Canlılık Sonuçları .....	24
Şekil 4.3 Mtt Analizi Sonucu <i>L. plantarum</i> OZT Suşuna Ait Hücre Canlılık Sonuçları .....	25
Şekil 4.4 (A) Oil Red O Boyama Sonucu Mikroskop Görüntüleri (B) Oil Red O Boyama Sonucu Lipid Akümülyasyon Ölçümü .....	27
Şekil 4.5 (A) Oil Red O Boyama Sonucu Mikroskop Görüntüleri (B) Oil Red O Boyama Sonucu Lipid Akümülyasyon Ölçümü .....	30
Şekil 4.6 (A) Oil Red O Boyama Sonucu Mikroskop Görüntüleri (B) Oil Red O Boyama Sonucu Lipid Akümülyasyon Ölçümü .....	31
Şekil 4.7 <i>P. Pentosaceus</i> Ozf Suşunun, 3T3-L1 Hücreleri Üzerindeki Adiponektin, Ppar $\gamma$ , C/Ebp- $\alpha$ , Tnf- $\alpha$ , GPDH Gen Ekspresyon Seviyelerine Etkisi.....	32
Şekil 4.8 <i>L. Plantarum</i> Ozf Suşunun, 3T3-L1 Hücreleri Üzerindeki Adiponektin, Ppar $\gamma$ , C/Ebp- $\alpha$ , Tnf- $\alpha$ , GPDH Gen Ekspresyon Seviyelerine Etkisi.....	33
Şekil 4.9 <i>L. Plantarum</i> Ozt Suşunun, 3T3-L1 Hücreleri Üzerindeki Adiponektin, Ppar $\gamma$ , C/Ebp- $\alpha$ , Tnf- $\alpha$ , GPDH Gen Ekspresyon Seviyelerine Etkisi.....	34

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1 Çalışmada Kullanılan Laktik Asit Bakterileri, Gelişim Koşulları ve İzole Kaynak.....	14
Çizelge 3.2 Hücre Kültür Çalışmasında Kullanılan Besiyeri Formülasyonları .....	16
Çizelge 3.3 Çalışmada Kullanılan Bakteri Konsantrasyonları.....	17
Çizelge 3.4 Rt-Pcr Çalışmalarında Kullanılan Primer Sekansları .....	21



## 1. GİRİŞ

Laktik asit bakterileri insan vücudunda vajina, ağız, mide ve gastrointestinal sistemde yer alan, patojen olmayan güvenilir bakterilerdir. Özellikle fermente gıdaların tüketimi neticesinde yüzyıllardır insana yararlı etkilerinin olduğuna inanılan bu bakteriler, son yıllarda hastalıklardan korunma ve tedavi edici özellikleriyle probiyotik olarak tercih edilmektedirler. Doğal beslenmeden uzak, yüksek yağ ve şeker oranına sahip sağlıklı beslenmenin neticesinde, mikrofloranın bozulması ve adipositlerin aşırı artışı ile sonuçlanan obezite ve diğer metabolik hastalıklar (Tip 2 diyabet, kardiyovasküler hastalıklar vb. gibi) tüm dünyada hızlı bir artış sergilemektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalar ise özellikle probiyotiklerin önemini vurgulamakta olup, konu üzerinde yapılan çalışmalar önem kazanmaktadır. Aşırı lipid artışı ile karakterize edilen obeziteyi önlemeye etken temel yaklaşımlardan biri, laktik asit bakterilerinin hücre farklılaşma basamaklarında lipid depolanmasını düzenleyici etkisinden faydalanılmasıdır.

Obezitenin temel etmeni olarak dikkat çeken adipositlerin hacim ve sayı olarak artışı; adiposit farklılaşması olarak tanımlanmaktadır. Adipogenez ise öncül adipositlerin olgun adipositlere dönüşümünü içeren çok yönlü bir süreçtir ve öncül adipositlerin çoğalması, farklılaşması, hücre içi lipid depolanması ve ilgili genlerin ifadesindeki değişim sürecini oluşturmaktadır. Çalışmamızda adiposit farklılaşmasını karakterize etmek için en sık kullanılan, fareden izole, embriyonik fibroblast hücre hattı olan 3T3-L1 öncül adipositler kullanılmıştır. Öncül adipositlerden (3T3-L1) olgun adipositlere farklılaşma basamaklarının belirlenmesi ve laktik asit bakterileri ile bu aşamanın kontrolü çalışmamız için kilit rol oynamaktadır. Gastrointestinal bölgede mikrobiyotanın dengede tutulmasına yardımcı etkileri bulunan probiyotikler, obezite için ilaç kullanımının yerini alabilecek doğal ve alternatif bir yaklaşım olarak değerlendirilmektedir. Probiyotiklerin dahil olduğu son çalışmalarda laktik asit bakterilerinin obeziteyi önleyici etkisi çok kez belirlenmiştir.

Bu çalışmanın amacı; insan ve gıda kaynaklı üç farklı laktik asit bakterisinin 3T3-L1 hücre hattında adipogenez üzerine etkisinin belirlenmesidir. Bu yaklaşımda belirlenen

laktik asit bakterilerinin etkili sonuç verebilmeleri için **lipid depolanmasında düzenleyici etki** oluřturabilmeleri beklenmektedir.

Çalışma kapsamındaki temel hedeflerimiz: Kullanacağımız suşların;

- Adiposit farklılaşması boyunca 3T3-L1 hücreleri üzerinde toksik etki göstermeyen konsantrasyonlarının belirlenmesi,
- 3T3-L1 hücrelerinin farklılaşmasını düzenlemesi,
- lipid depolanmasını düzenlemesi ve
- adipositlerin farklılaşma yolağında etkili bazı gen ifade seviyelerini düzenlemesidir.

Sonuç olarak *in vitro* hücre hattı kullanılarak hem moleküler seviyede hem de genetik yaklaşımlar dahilinde amaca yönelik sonuçların elde edilmesi hedeflenmektedir.

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

### 2.1 Probiyotiklerin Tanımı

Probiyotikler ‘yaşam için’ anlamına gelen, uygun miktarda tüketildiklerinde insan sağlığına yararlı etkileri olan mikroorganizmalar olarak tanımlanmaktadır. FAO (Food and Agriculture Organization; BM Gıda ve Tarım Teşkilatı) ve WHO (World Health Organization; Dünya Sağlık Örgütü) ise probiyotikleri "yeterli miktarda alındığında, konağa yararlı etkileri olan yaşayan mikroorganizmalar” olarak tanımlamaktadır (FAO/WHO 2002).

#### 2.1.1 Probiyotiklerin sahip olması gereken kriterler

Geniş incelemeler sonrasında, özellikle laktik asit bakterileri gibi uzun yıllar fermente gıda ürünleri yapımında kullanılan probiyotiklerin, intestinal floraya düzenleyici etkide bulunduğu, konağa ve çevreye faydalı olduğu belirlenmiştir. Tüm probiyotik bakteri türlerinin ve suşlarının farklı özellik ve etkilere sahip olduklarının belirtilmesi gerekmektedir. Ancak her birinin iyi bir probiyotik olarak kabul edilebilmeleri için taşımaları gereken bazı kriterler vardır. Bunlar; (i) patojen gelişimini engelleyebilecek bakteriyosin, hidrojen peroksit ya da asit üretme, (ii) hücrelere (özellikle bağırsak epitel hücrelerine) tutunabilme ve kolonize olabilme, (iii) patojenik tutunmayı engelleme ya da azaltma, (iv) patojen, kanserojen veya invazif olmama, (v) normal doğal flora üyeleri ile koagre olabilme, (vi) güvenli olma gibi temel özelliklerdir (Indu vd. 2002).

#### 2.1.2 Probiyotiklerin sağlık üzerine etkileri

Fermente gıdaların sağlığa yararları yüzyıllardır biliniyor olmasına rağmen, mikroorganizmaların ve sağlığa yararlı uygulamalarının etkileri, bir yüzyıldan fazla süre önce bilimsel popülasyonla ilgili probiyotik kavramını ilk kez Nobel laureate Elie Metchnikoff tanıttı (Metchnikoff, 1908). Bu temel gözlemlerden beri, probiyotikler daha geniş bir alanda keşfedildi, araştırıldı, onaylandı ve dünya çapında tüketilmeye

başlandı. Probiyotiklerin aktiviteleri; mikrofloranın olumlu yönde düzenlenmesinin sürdürülmesi, fırsatçı patojenlerin kontrolü, bağışıklık sisteminin düzenlenmesi, epitel hücre çoğalmasının teşvik edilmesi ve farklılaşma, intestinal bariyer bütünlüğünün güçlendirilmesi şeklinde özetlenebilmektedir. *Lactobacilli* ve *Bifidobacteria* probiyotik olarak en yaygın çalışılan ve tüketilen cins olmuş olmasına rağmen, diğer bakteriyel cinslerin bazı tür/suşları da çeşitli raporlarda probiyotik olarak etiketlenmiştir (Fijan, 2014). Bununla beraber, probiyotiklerin ve suşlarının sağlığa yararları etkilerinin spesifik özellikleri daima vurgulanmaktadır (Azais-Braesco vd. 2010). Sayısız hayvan ve insan deneyleri, risk önleme, çeşitli hastalıkların azaltılması ve yönetimi konusunda belirli probiyotik suşların sağlığa faydalarını ortaya koymaktadır.

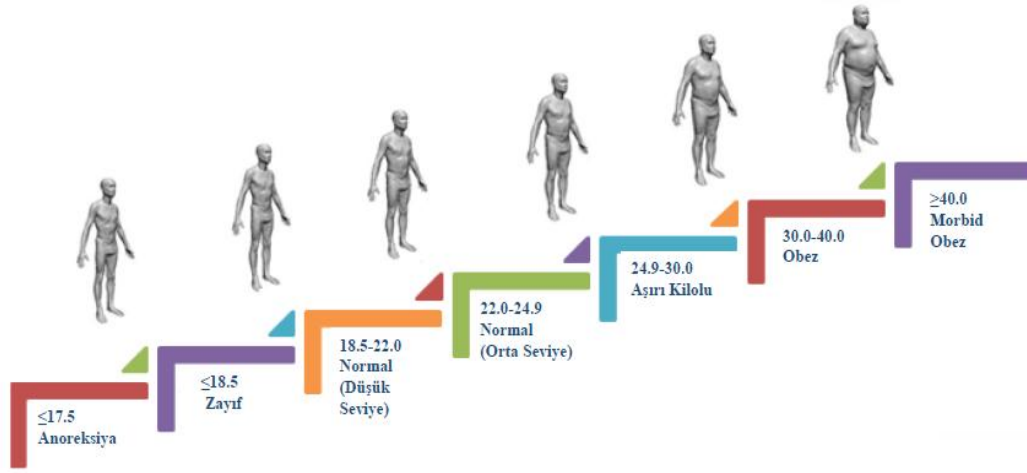
Probiyotiklerin yararlı olduklarına dair belirlenen teröpatik hedeflerden bazıları; bağırsak homeostasisi, ishal, bağırsak, hassas bağırsak hastalığı (Inflammatory bowel disease, (IBD)), kabızlık, laktoz intoleransı (laktoz intole nekrotizan enterokolit), hiperkolesterolemi, hipertansiyon, alkole bağlı olmayan karaciğer yağlanması (NAYKH), tip 2 diyabet ve viral ilişkili akciğer hasarı şeklinde özetlenmektedir. (Yadav vd. 2007, McFarland 2007, Doron vd. 2008, Chmielewska ve Szajewska 2010, Choi vd. 2011, Johnston vd. 2011, Kumar vd. 2011, Wilhelm vd. 2011, Yadav Kumar vd. 2012, Hemsworth vd. 2012 Kumar vd. 2013, Lee vd. 2013, Mohania vd. 2013, Serban, 2013, Orlando ve Russo 2013, vd. 2013, Bernardo vd. 2013, Fitzpatrick 2013, Hemalatha vd. 2014, Zelaya vd. 2014).

## **2.2 Obezite ve Risk Faktörleri**

Günümüzde gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerin en önemli sağlık sorunlarından biri haline gelen obezite, genetik ve çevresel faktörlerin sebep olduğu çok kaynaklı kronik bir hastalıktır. Dünya Sağlık Örgütüne göre obezite ve aşırı kilo, yağ depolanmasının aşırı artışıyla tanımlanmaktadır. 2014 yılında, dünya genç popülasyonunun yaklaşık % 13'nün obez, % 39'nun ise aşırı kilolu birey olduğu tespit edilmiştir (WHO, 2015). Doğal beslenmeden uzak, yüksek oranda şeker ve yağ içeren besin tüketimiyle aşırı kalori alımı gerçekleşmekte ve günlük alınan enerji ile harcanan enerji arasındaki bu fark yağ hücrelerinde lipid depolanmasıyla sonuçlanmaktadır. Obezite sonucu meydana

gelen aşırı lipid depolama; kardiyovasküler hastalıklar, Tip 2 diyabet, kanser gibi metabolik hastalıkları da beraberinde getirmektedir.

Obeziteyi ölçmeye yönelik farklı methodlar bulunmakta, Vücut kitle endeksi (Body Mass Index, BMI) ise en fazla tercih edilen method olarak tanımlanmaktadır. BMI; ağırlığın, metre kare cinsinden uzunluğa ( $\text{kg/m}^2$ ) bölünmesiyle elde edilmekte ve sonuç olarak indeks düşük kilolu, aşırı kilolu, obez veya aşırı obez olarak sınıflandırılabilir (Şekil 2.1).



Şekil 2.1 Vücut Kitle İndeksi Sınıflandırılması  
(<http://www.scientificpsychic.com/fitness/diet.html>.)

### 2.2.1 Obezite ve adipogenez

Obezitenin temel etmeni olarak dikkat çeken adipositlerin hacim ve sayı olarak artışı; adiposit farklılaşması olarak tanımlanmaktadır. Adipogenez ise öncül adipositlerin olgun adipositlere dönüşümünü içeren çok yönlü bir süreçtir ve öncül adipositlerin çoğalması, farklılaşması, hücre içi lipid depolaması ve ilgili genlerin ifadesindeki değişim sürecini oluşturmaktadır.

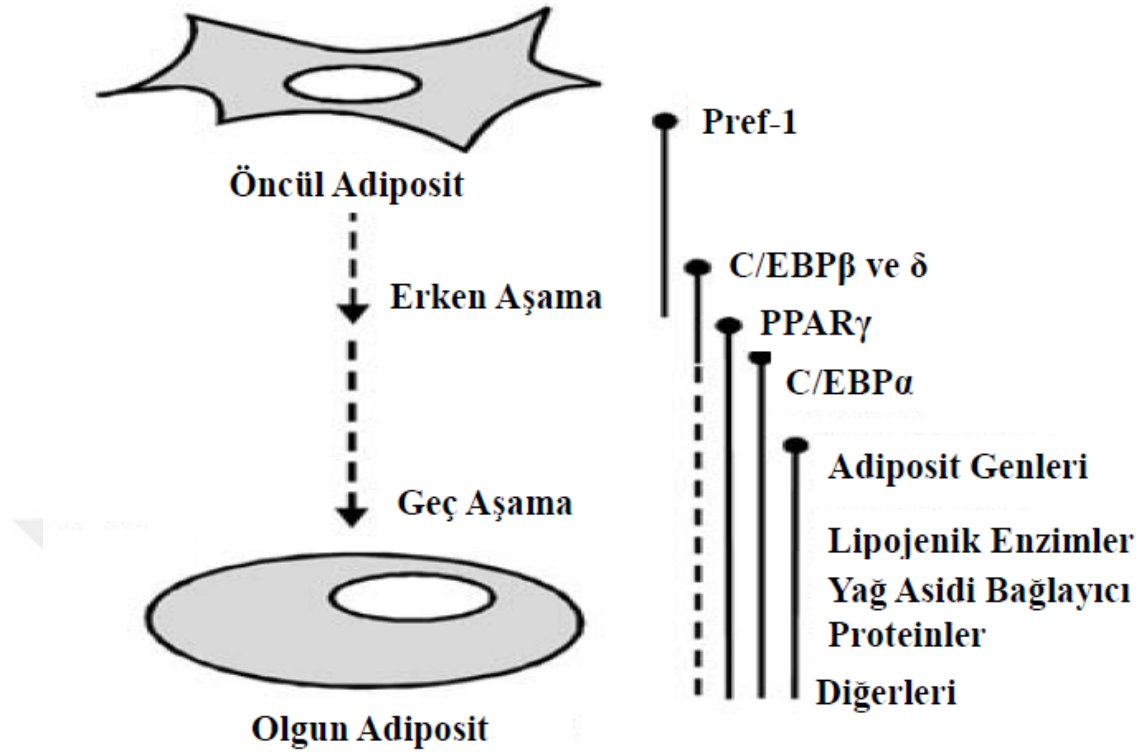
Adipogenez oldukça karmaşık ve koordineli gen ifade programına sahiptir. Bu süreçte Peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) ve CCAAT/enhancer binding

proteins- $\alpha$  (C/EBP- $\alpha$ ) genleri erken düzenleyici olarak kilit rol oynamaktadır (Moseti vd. 2016).

C/EBP ailesi, adiposit farklılaşmasında önemli bir rol oynadığı doğrulanan ilk transkripsiyon faktörleri arasındadır. C/EBP'nin izoformları, lipid ve kolesterol ile ilişkili bileşikleri metabolize etmekte ve karaciğer gibi dokularda eksprese edilmektedir (Christy vd. 1989). C/EBP- $\alpha$ , adiposit spesifik olmamasına rağmen, çoğu adiposit spesifik genlerin transkripsiyonunun başlamasından önce ifade edilmekte ve bazı durumlarda farklılaşmayı indükleyebilmektedir. C/EBP- $\alpha$ , C / EBP- $\beta$  ve C/EBP- $\delta$  izoformlardır; Her birinin adiposit farklılaşması sırasında, belirgin sıralı ve birbirleriyle koordineli ifadesi vardır. C/EBP- $\alpha$ , farklılaşmada öncül adipositlerde  $\beta$  ve  $\delta$ 'ya nispeten daha geç eksprese edilmekte ve farklılaşma boyunca seviyesi artmaktadır (Cao vd. 1991).

PPAR'lar, retinoid X reseptörü (RXR) ile heterodimerleri oluşturur ve bu bağlanma yoluyla transkripsiyonu düzenlemektedir. PPAR $\gamma$ , büyümeyi teşvik etmek ve adipogenez başlatılabilmenin yanı sıra adiposit farklılaşmasını regüle edebilecek kritik bir role sahip en önemli adiposit spesifik genlerdendir. PPAR $\gamma$ , öncül adipositlerden olgun adipositlere farklılaşma süresince adipositleri indükleyip bu sürecin temelini oluşturmaktadır. Etkinliği olmaması halinde farklılaşma gerçekleştirilemez (Gregoire vd. 1998).

PPAR $\gamma$  ekspresyon ifadesi doğrudan C/EBP- $\beta$  ve  $\delta$ 'nin birlikte eksprese edilmesiyle indüklenir. Adiposit farklılaşması boyunca C/EBP- $\alpha$  ve PPAR $\gamma$  seviyeleri yoğun olarak artmaktadır. Bu, belirli bir seviyenin üzerindeki C/EBP- $\beta$  artışının PPAR $\gamma$  ekspresyonunu indüklediğini düşündürmektedir. PPAR $\gamma$ 'nın C/EBP- $\alpha$  ile ligand aktivasyonu tam olarak adiposit farklılaşmasına yol açmaktadır (Cao vd. 1991). Adipogenez aşamalarına genel bakış şekil 2.2'de gösterilmektedir.



Şekil 2.2 Adipogenezde aşamalar (Gregoire vd. 1998)

### 2.2.2 Obezite ve inflamasyon

Adiposit hücreleri, besin alımını, insülin duyarlılığını ve enerji metabolizmasını doğrudan düzenleyen “adipositokinler” veya “adipokinler” olarak adlandırılan çeşitli biyoaktif maddeleri salan, endokrin hücreler olarak aktif bir role sahiptir (Kuroyanagi vd. 2008). Son zamanlarda araştırmalar, kronik düşük dereceli sistemik inflamasyon olarak obezitenin insülin direncini ve inflamatuvar biyobelirteçlerin üretimini teşvik ettiği kavramına odaklanmıştır (Kim vd. 2012).

Adipositler, leptin, adiponektin, tümör nekroz faktörü-alfa (TNF-α), resistin, interlökin-6 (IL-6), plazminojen aktivatör inhibitörü-1 (PAI-1), makrofaj kemoatraktan protein-1 (MCP-1) dahil olmak üzere adipokin ve biyoaktif peptidler salgılamaktadır (Kim vd. 2012).

### **2.2.3 Adipokinler**

Adiponektin; sadece adipositlerden salınmakta (Rocha vd. 2011), yağ asidi oksidasyonunu arttırırken glikoz üretimini azaltmaktadır. Aynı zamanda anti-inflamatuar rol oynamaktadır (Shah vd. 2008).

Birçok çalışma, obez olmayan kişilerde obez bireylere göre daha yüksek adiponektin konsantrasyonunu gösteren plazma adiponektin seviyesini belirlemekte ve bu konsantrasyonla obez bireylerin negatif korelasyonunu ortaya koymaktadır (Arita vd. 1999). Arita ve diğ. erkek ve kadınlarda adiponektin ve BMI'nın plazma konsantrasyonu arasında negatif bir korelasyon buldular. Plazma adiponektini düşük konsantrasyonlarda olan bireylerde insülin duyarlılığı azalmış ve Tip II diyabet gelişmiştir (Lindsay vd. 2002). Düşük BMI sahip; diyabetik ve diyabetik olmayan deneklerde plazma adiponektin seviyesinin artmış olduğu gözlemlenmiştir (Hotta vd. 2000).

TNF- $\alpha$ , adipoz dokuda ekspresyonu artış gösteren, obez ve insülin dirençli bireylerin dolaşımında yüksek oranda bulunan bir sitokindir (Hotamisligil vd. 1995). TNF- $\alpha$ 'nın tüm vücut lipit ve glikoz metabolizması üzerinde önemli bir etkisi vardır (Hotamisligil vd. 1996). TNF- $\alpha$  doğrudan proinflamatuar hücre-altı yolların aktivasyonunda rol oynamakta ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimini indüklemektedir (Schenk vd. 2008).

### **2.2.4 Probiyotiklerin obezite üzerine etkileri**

Dünya sağlık örgütüne göre obezite her yıl 2,8 milyon insanın ölümüne yol açmaktadır. 2014 yılında, 1,9 milyardan fazla yetişkinin aşırı kilolu, 600 milyon bireyin ise obez olduğu bildirilmiştir. Dünya popülasyonunun çoğu ülkelerinde aşırı kiloluların ölüm oranları, zayıflara oranla daha fazladır. 1980 yılından itibaren katlanarak artan obeziteden daha önceki yıllarda yüksek gelirli ülkelerin daha fazla etkilendiği düşünülse de yakın zamanda düşük ve orta düzeyli ülkelere de sıçramıştır (WHO 2015).

Probiyotiklerin fonksiyonel etkilerinin, obezite ve bağırsak mikrobiyotası üzerindeki değişimlerin değerlendirilmesi kritik bir konu haline gelmiştir. Farklı LAB suşlarının işlevsel etkileri farklılık gösterip, doz ve hastalık durumları da buna ek olarak bağırsak mikrobiyotası ve obezite üzerine etkisini değiştirmektedir. Çevresel faktörler, diyet ve yaş; bağırsak mikrobiyotasında önemli bir etkiye sahiptir. ‘‘Obez bağırsak mikrobiyotası’’ profilinde obez insanlara uygulanan laktik asit bakterilerinin etki mekanizması aşağıdaki gibi özetlenebilmektedir:

- ✓ Mikrobiyota içeriğini değiştirmekte; *Bifidobacteria*, *Lactobacillus*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Peptococcaceae* miktarını artırırken *Firmucutes*, *Clostridium*, *Actinobacteria*, *Rikenellaceae* miktarını azaltmaktadır.
- ✓ Monosakkaritlerin emilimini teşvik etmekte ve enerji emilimini artırmaktadır.
- ✓ Olgun adipositlerde kısa zincirli yağ asidi (Short Chain Fatty Acid; SCFA) miktarındaki artış, mikrobiyotadaki enerji dengesini sağlamakta yağ asitleri oksidasyonu ile lipid depolanmış farklılaşmış yağ hücresinde obeziteyi engelleyici etki göstermektedir.
- ✓ Bağırsak geçirgenliğini düzenlemektedir.
- ✓ Lipopolisakkarit salınımı azaltmakta, inflamatuvar sitokinleri ( TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  ve MCP-1) baskılamakta, bu sayede düşük dereceli inflamasyonu azalmakta ve obeziteye karşı önleyici etki göstermektedir.

Adipositlerde aşırı yağ artışı ile karakterize edilen obezite için lipid mekanizması oldukça kritik bir aşamadır. LAB'nin ürettiği antimikrobiyal bileşenlerden biri olarak tanımlanan SCFA, bu mekanizmada önemli aktivitelere sahiptir. Çoğunlukla karbonhidratları kaynak olarak kullanan laktik asit bakterileri, hidrolitik enzim aktivitesi sayesinde büyük molekülleri parçalayarak SCFA açığa çıkarmaktadırlar. Bundan dolayı SCFA, GI bölgede lipid metabolizması için büyük rol oynamaktadır. Bakterinin fermentasyon sonucu oluşturduğu SCFA asetat, propiyonat ve bütirat olmak üzere üç sınıfa ayrılmaktadır. Bütirik asit epitel hücrelerde enerji kaynağı için son derece idealdir ve bu yöndeki aktivitesi kolon kanseri riskini azaltmaktadır. Kolonik lümende artan SCFA bu bölgede uygun pH'ı korumaya yardımcıdır. Engelleyici mekanizmalarıyla da çeşitli zararlı ajanların metabolizmalarını önleyici aktiviteye sahiptirler (Candela vd.

2008). Ayrıca fazla artış gösteren kolesterolün sentezini düzenlemekte ya da plazmadaki yönünü karaciğere yönlendirerek kandaki lipid seviyesini düşürmeye yardımcı olmaktadır (De preter vd. 2006). İlave çalışmalar mikrobiyotada artan SCFA nin konağın enerji dengesini olumlu yönde etkilediğini rapor etmektedir (Samuel vd. 2008).

Son yıllarda katlanarak artan obeziteye karşı gerçekleştirilen çalışmalar hız ve önem kazanmaktadır. Potansiyel probiyotik suşların obezite üzerindeki çalışmaları suşların lipid depolanması üzerindeki düzenleyici etkisi üzerine yoğunlaşmaktadır. Bu amaca yönelik gerçekleştirilen benzer literatür çalışmaları aşağıda özetlenmiştir:

- Tsai vd. (2008, 2010), Lee vd. (2013), *L. paracasei* subsp. *paracasei* NTU 101 suşunun obez fareler üzerinde mikrobiyotadaki değişimleri, metabolizmaya etkileri ve obeziteyi düzenleyici etkisini araştırmışlar, konağın mikrobiyotasında *Bifidobacteria* ve *Lactobacilli* oranı artarken, *C. perfringens* oranında azalma tespit etmişler. Suşun adiposit farklılaşmasını engellediği, lipoliz aktivitesini artırdığı ve serbest asit depolanmasını azalttığı, TNF- $\alpha$  ve trigliserit miktarını düşürdüğünü belirtmişler. Obeziteye olan iyileştirici etkisini ise adipositlerin azaldığı, küçük adipositlerin arttığı, vücut ağırlığı ve vücut yağ ağırlığının azaldığı şeklinde rapor etmişlerdir.
- Esposito vd. (2009), *L. gasseri* BNR17 suşunun fareler üzerinde metabolik aktivitesini araştırmışlar ve bağırsak mikrobiyotasını SCFA ile hormon basamağında GLP-1 (Glukagon benzeri peptit-1)'in salınımını gerçekleştirerek düzenlediğini, oksidasyonu ve inflamasyonu önleyici aktivite gösterdiğini ve gen ifadelerini azalttığını belirlemişler. Bu yolakla suşun konak üzerinde besin alınımını azalttığını ve glukoz toleransını düzenlediğini rapor etmişlerdir.
- Omar vd. (2012), *L. amylovorus* ve *L. fermentum* suşlarının bağırsak mikrobiyotasını düzenleyerek vücut ağırlığına etkisini araştırmışlar ve aşırı kilolu bireyler üzerinde denenen bu suşların mikrobiyota ve enerji dengesini düzenleyerek vücut ağırlığı üzerinde azaltıcı etkide bulunduğunu rapor etmişlerdir.

- Park vd. (2012), 3T3-L1 hücreleri üzerinde *L.plantarum* LG42 suşunun hücre içi lipid depolarını önemli miktarda azalttığı ve adipogenez ile ilgili genlerin (PPAR $\gamma$ , C/EBP- $\alpha$ , GPDH, aP2) ifadelerinin düzenlendiğini rapor etmişlerdir.
- Park vd. (2013), *L. curvatus* HY7601 ve *L. plantarum* KY1032 suşlarının obez fare üzerinde bağırsaktaki mikrobiyal değişimleri ve metabolizmaya olan etkisini araştırmışlar, vücut ağırlığı ve yağ depolamada azalma ile insulin, leptin ve toplam kolesterol miktarında ise azalma rapor etmişlerdir, ayrıca mikrobiyotanın olumlu yönde değiştiği vurgulanmıştır.
- Park vd. (2014), *L. brevis* OPK-3 suşunun 3T3-L1 hücre hattı ile adipogenez üzerine etkisini araştırmışlardır. *L. brevis* OPK-3 adiposit farklılaşmasını engellediği, hücre içi trigliserit depolarının azaldığı, ilgili transkripsiyon faktörlerinin (PPAR $\gamma$ , C/EBP- $\alpha$ ) ve sitokin geni olan TNF- $\alpha$  ifadelerinde önemli derecede azalma belirlemişlerdir. Adiponektinin Mrna eksoresyon seviyesinde artış gözlemlemişlerdir.
- Qiao vd. (2015), *L. reuteri* L3 ve *L. reuteri* L10 iki farklı şusun obez fareler üzerinde yağ depolarındaki etkisi araştırılmış ve *L. reuteri* L3 suşunun (*L. reuteri* L10 dahil değil), obez fareler üzerinde önemli miktarda vücut ağırlığını ve lipopolisakkaritleri azalttığını, enerji harcanımını ise artırdığını gözlemlemişlerdir. Aynı zamanda adipositlerde mRNA basamaklarının (PPAR $\gamma$ , FAS, Acc1) önemli derecede baskılandığını ve aynı probiyotik bakteri türünün farklı suşlarının obezite üzerinde farklı etkilere sahip olduğunu vurgulamışlardır.
- Wu vd. (2015), *L. plantarum* K21 suşunun önceki çalışmalarda 3T3-L1 hücre hattı üzerinde adipogenezini engellediğini belirlemişler, aynı suşun *in vivo* çalışma koşullarında obez fare üzerindeki obeziteyi önleyici etkisini araştırmışlar, vücut ağırlığındaki artışı ve yağ depolanmasını önlediğini, PPAR $\gamma$  gen ifadesini engellediğini ayrıca bağırsak mikrobiyotasını düzenlediğini rapor etmişlerdir.
- Chen vd. (2015), *L. reuteri* GMNL-263 suşunun *in vitro* koşullarda 3T3-L1 öncül adipositlerinde farklılaşmaya etkisini araştırmışlar ve adiposit farklılaşması boyunca yağ damlacıklarının oluşmasını önlediğini rapor etmişlerdir. Aynı suşun *in vivo* koşullarda obeziteyi engelleyici etkisini araştırmışlar, kontrol grubuyla karşılaştırdığı obez fare grubunda vücut

aralığında ve toplam kolesterol, trigliserit basamaklarında önemli miktarda azalma rapor etmişlerdir.

- Park vd. (2015), *L. plantarum* FH185 suşunun *in vitro* çalışma koşullarında adiposit farklılaşmasını engelleyici etkisini araştırmışlar ve lipid depolanmasını önlediğini belirlemişlerdir. *In vivo* gözlemlerde ise kontrol grubuyla karşılaştırılan yüksek diyet uygulanmış farelerde adipositlerin boyutu ve bağırsaktaki mikrobiyal değişimleri araştırmışlar, sakrifiye farelerin adipositlerinin boyutlarında azalma, mikrobiyotanın düzenlenmesine katkı sağladığını rapor etmişlerdir.

### 2.3 3T3-L1 Hücre Hattı

Adiposit biyolojisini değerlendirmek ve anlamak için birçok model beraberinde teknik kullanılmaktadır (Poulos vd. 2010). 3T3-L1, murin swiss 3T3 hücrelerinin klonal genişlemesinden köken alan ve sadece tek bir hücre tipi içeren bir adipoz hücre dizisi olarak tanımlanmaktadır (Green ve Kehinde 1974). Bu hücre dizisi, fibroblasttan (embriyo) olgun adipositlere farklılaşma potansiyeli sayesinde, son 30 yıldır adipogenez ve adipositlerin biyokimyası üzerine 5000'den fazla yayınlanan makalede yaygın olarak kullanılmaktadır (Zebisch vd. 2012). 3T3-L1 hücre hattı adiposit farklılaşması sırasında transkripsiyon faktörleri ve çeşitli yollar dahil olmak üzere önemli moleküler belirteçlerin belirlenmesine imkan sağladığı için araştırmalarda tercih edilmektedir (Poulos vd. 2010).

### **3. MATERYAL ve YÖNTEM**

#### **3.1 Materyal**

##### **3.1.1 Bakteri kültürleri ve hücre hattı**

Çalışmamızda 3 farklı kaynaktan izole edilen laktik asit bakteri kültürü kullanılmış olup kullanılan kültürler A.Ü.F.F. Biyoloji Böl. Mikrobiyal Genetik Lab. Kültür Koleksiyonundan temin edilmiştir. Kültürlerin gelişme koşulları ve suşların kaynakları Çizelge 3.1’de gösterilmiştir.

Hücre kültür çalışmamızda kullanılan 3T3-L1 hücre hattı Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu’ndan (American Type Culture Collection (ATCC) (Rockville, MD)) tedarik edilmiştir.

##### **3.1.2 Hücre kültürü ve bakteri kültür ortamı**

Laktik asit bakterilerinin gelişimi için kullanılan MRS besiyeri ile hücre kültüründe kullanılan besiyerlerinin bileşenleri ve hazırlanışları **EK 1**’de belirtilmiştir.

##### **3.1.3 Kimyasallar**

Çalışmada kullanılan kimyasallar ve üretici firmaları **EK 2**’de verilmiştir.

##### **3.1.4 Çözelti ve malzemelerin sterilizasyonu**

Çalışma süresince kullanılan tüm cam malzemelerin sterilizasyonu için pastör fırını (Nüve, Türkiye; (185 °C, 3 saat)), solüsyon ve besi ortamlarının sterilizasyonu için ise otoklav (Nüve, Türkiye) kullanılmıştır (121 °C, 15 dk).

Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan Laktik Asit Bakterileri, Gelişim Koşulları ve İzole Kaynak

Mikroorganizma kültürleri	Gelişim Koşulları	İzole Kaynak
<i>Pediococcus pentosaceus</i> OZF	MRS 37 <sup>0</sup> C 18 saat	Anne sütü
<i>Lactobacillus plantarum</i> OZF	MRS 37 <sup>0</sup> C 18 saat	Bebek feçesi
<i>Lactobacillus plantarum</i> OZT	MRS 37 <sup>0</sup> C 18 saat	Turşu suyu

## 3.2 Yöntem

### 3.2.1 Bakteriye hücre ekstraktlarının hazırlanması

Laktik asit bakterileri, MRS (de Man, Rogosa and Sharpe; Merck, Darmstadt, Germany) besiyerinde 37 °C’de 18 saat geliştirilmiştir.

Hücre içi ekstrakt: 10000 g, 10 dk, 4 °C’de santrifüj (Sigma, Germany) ile kültür üst sıvısı uzaklaştırılan hücreler steril distile su ile 3 kez yıkanmıştır (5000g, 8dk, 4 °C). Yıkama sonrasında elde edilen hücreler, %100 amp, 59 sn, 1 dk arayla 5 kez sonike edilmiş (Sonics, A.B.D) ardından 5000 g, 8 dk, 4 °C’de santrifüj edilerek elde edilen üst faz filtreden (0.45µm) geçirilmiştir. 1 gece -80 °C’de (Thermo, Revco, A.B.D) dondurulan hücreler liyofilize edilmiş (Thermo, Heto Power Dry LL3000, Çek Cumhuriyeti) ve elde edilen lizatlar kullanılabildiği kadar -20 °C’de muhafaza edilmiştir.

Hücre kültür uygulamasında, hücre içi ekstrakt uygulamasının paralelinde hücre dışı ekstrakt eldesi de çalışmaya dahil edilmiştir. Hücre dışı ekstrakt: MRS besiyerinde 37 °C’de 18 saat geliştirilen hücrelerden elde edilen üst faz pH 7’ye ayarlanmış, 1 gece -80°C’de dondurularak liyofilize edilmiş ve kullanılabildiği kadar -20 °C’de muhafaza edilmiştir.

### 3.2.2 Hücre kültürü

Çalışmamızda kullanılan fare embriyonik fibroblast klon hücre tipi (beyaz yağ öncülü) olan 3T3-L1 hücre hattı çizelge 3.2’de gösterilen öncü adipositlerin gelişme besiyerinde (Preadipocyte expansion medium; PEM) % 70-80 doygunluk seviyesine ulaşana kadar T75 flask (Sunub, Çin) içerisinde kültüre edilmiş, 37 °C % 5 CO<sub>2</sub> atmosfer basıncında CO<sub>2</sub> alan inkübatörde (Nüve, Türkiye) geliştirilmiştir. İstenilen doygunluk seviyesine gelen hücreler PBS ile yıkanmış, 600 µl tripsin eklenerek 4 dakika etüve kaldırılmıştır. Tripsinize edilen hücreler artık flask yüzeyinden kaldırılmış olup üzerine tripsinin 3 katı kadar besiyeri eklenmiştir. Flasktan toplanan hücreler 1500 rpm, 4dk, rt’da (room temprature; oda sıcaklığı) santrifüj (QLS, Iso-Fuge 1416R, İngiltere) edilmiş, üst faz atılarak elde edilen pellet 1 ml besiyerinde çözülmüştür. Hücreler thoma lamında sayılmak üzere; 20 µl tripan blue ile 20 µl hücrelerden alınarak, ependorf içerisinde hücre boya karışımı hazırlanmıştır. Hazırlanan hücre+boya karışımından 20 µl alınarak Thoma lamı ile mikroskop altında sayım gerçekleştirilmiştir. 1 ml’de  $1.54 \times 10^5$  sayılan hücreler, kuyu başına  $5 \times 10^4$  hücre olacak şekilde 24 kuyucuklu hücre kültür plakalarına (Sunub, Çin) ekilmiş ve PEM besiyerinde geliştirilmiştir. 2 gün sonra % 100 doygunluk seviyesine gelen hücreler çizelge 3.2’de gösterilen farklılaştırma besiyerinde ((Differentiation Medium; DM) 37°C, % 5 CO<sub>2</sub> atm’de her iki günde bir değiştirilmek üzere 4 gün geliştirilmiştir. 4. günün sonunda farklılaştırma besiyeri tamamen çekilerek, farklılaşmanın devam edebilmesi ve tamamlanabilmesi için hücreler her iki günde bir değiştirilmek üzere adiposit gelişiminin devamını sağlayan besiyeri (Adipocyte Maintenance Medium; AMM) ile 37 °C’de % 5 CO<sub>2</sub> atm’de inkübe edilmiş, öncül adipositlerin olgun adipositlere farklılaşması sağlanmıştır (Çalışma boyunca Nuair (NU-425-400E, A.B.D) hücre kültür kabini kullanılmıştır).

Çizelge 3.2 Hücre Kültür Çalışmasında Kullanılan Besiyeri Formülasyonları

Besiyeri	Formülasyon
PEM	% 90 Dubelcco's Modified Eagle's Medium (DMEM (Yüksek Glukoz)), % 10 Fetal Bovine Serum, Sığır Serumu (FBS)
DM	% 90 DMEM, % 10 FBS, 1.0 µM Deksametazon (DEX), 0.5 mM İzobutilmetilksantin (IBMX), 5.0 µg/ml İnsulin (Yüksek İnsulin)
AMM	% 90 DMEM, % 10 FBS, 0.5 µg/ml İnsulin (Düşük İnsulin)

### 3.2.3 Adipogenez aktivitenin düzenlenmesi

Çalışmada kullanılan lizatların miktarları öncül adipositler üzerinde yapılan canlılık testi sonucu belirlenmiştir. *Pediococcus pentosaceus* OZF 2.8 mg/ml, *Lactobacillus plantarum* OZF 4.2 mg/ml, *Lactobacillus plantarum* OZT 4.0 mg/ml konsantrasyonları hücreler üzerinde toksik etki göstermiş olup çizelge 3.3'de verilen konsantrasyonlar çalışmaya dahil edilmiştir. Belirlenen konsantrasyonlardaki lizatlar 24 kuyulu plakalara (Sunub, Çin) farklılaşma besiyeriyle uygulanmış, bakterilerin farklılaşma üzerine etkileri aşağıda belirtilen çalışmalarla gözlemlenmiştir. İnokülasyonun gerçekleşmediği kontrol olarak baz alınmıştır.

Çizelge 3.3 Çalışmada Kullanılan Bakteri Konsantrasyonları

Mikroorganizma	Konsantrasyon 1	Konsantrasyon 2
<i>Pediococcus pentosaceus</i> OZF	1.0 mg/ml	2.0 mg/ml
<i>Lactobacillus plantarum</i> OZF	1.8 mg/ml	3.6 mg/ml
<i>Lactobacillus plantarum</i> OZT	1.5 mg/ml	3.0 mg/ml

### 3.2.3.1 Hücre canlılık testi

24 kuyulu plakalarda kültüre edilen hücrelerin üzerinden 100 µl çekilerek 96 kuyucuklu plakalara aktarılmış, kuyu başına 10 µl MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-yl]-2,5 difeniltetrazolyum bromür) solüsyonu (Biotium, A.B.D) eklenerek 4 saat 37 °C, % 5 CO<sub>2</sub> atm'de inkübe edilmiştir. Ardından kuyu başına 200 µl DMSO eklenerek ELISA plaka okuyucusu (Heales, MB-530, Çin) ile 570 nm dalga boyunda ölçüm yapılmıştır. Elde edilen absorbans değeri kullanılarak uygulanan bakterilerin farklılaşma boyunca hücre canlılığına olan etkisi;

(Blank: Besiyeri, Kontrol: Farklılaştırılmış Hücre, Örnek: Farklılaştırılmış hücre+bakteri)

$$\text{Hücre canlılığı} = \frac{\text{Örnek} - \text{Blank}}{\text{Kontrol} - \text{Blank}} \times 100$$

denklemini ile hesaplanmıştır.

### 3.2.3.2 Oil Red O boyama ile lipid depolanmasının belirlenmesi

Boyama işlemi uygulanırken üretici firmanın protokolü takip edilmiştir (Biovision, A.B.D).

60 mg Oil Red O boya, 20 ml % 100 izopropanol içerisinde çözülerek, stok solüsyon hazırlanmıştır. Hazırlanan stoktan 18 ml boya 12 ml distile su ile (3'e 2 oranı uyarlanarak) homojen karışımı sağlanmıştır. Ardından karışım 0.45µm filtreden geçirilerek çalışma solüsyonu elde edilmiştir.

24 kuyulu plakalarda bulunan hücrelerden besiyeri çekilmiş, plakada bulunan hücreler PBS ile 2 kez yıkanmıştır. Ardından hücrelere % 10 formalin eklenerek 55 dk. inkübe edilmiştir. Ardından 2 kez distile su ile yıkanan hücreler, her kuyuya 2 ml olacak şekilde % 60 izopropanol ile muamele edilmiş, 5 dk. 37 °C, % 5 CO<sub>2</sub> atm'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında alkol uzaklaştırılarak, hücrelerin açık bir şekilde havada kurutulması sağlanmıştır. Tamamen kuruyan hücrelerin üzerine kuyu başına 1 ml oil red o boya eklenip, inkübatörde 20 dk. inkübe edilmiştir. Ardından boya çekilmiş ve 4 kez distile su ile yıkanan hücreler boyadan arındırılmış ve inverted mikroskop (Euromex, Hollanda) altında görüntüleri alınmıştır.

Görüntüsü alınan hücreler; ilk olarak 3 kez % 60'lık izopropanol ile ardından % 100'lük izopropanol ile yıkanmış, 492 nm dalga boyunda hücrelerin absorbans değerleri ölçülmüştür. % 100 izopropanol blank olarak kullanılmıştır.

Kontrol ile karşılaştırılan örneklerin hücre içi lipid depolama yüzdesi, elde edilen absorbans değerleri kullanılarak;

$$\text{Lipid Depolama} = \frac{(\text{Örnek})_{492 \text{ nm}}}{(\text{Kontrol})_{492 \text{ nm}}} \times 100$$

denklemleri ile hesaplanmıştır.

### 3.2.3.3 Ters transkripsiyon ve eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (rt- PCR) ile bazı gen ifadeleri seviyelerinin belirlenmesi

RNA İzolasyonu: Farklılaşma sonrası elde edilen 3T3-L1 hücrelerinden RNA izolasyonu, kit (Geneall, Hybrid R, Cat no: 106-101, Almanya) kullanımı ile üretici firmanın ön gördüğü basamaklar takip edilerek gerçekleştirilmiştir.

13. gün sonunda besiyerinden arındırılan hücreler, PBS ile yıkanmış ve tripsinize edilmiştir. 1500 rpm, 4 dk, rt'de santrifüj edilmiş ve üst faz uzaklaştırılmıştır. Elde edilen pellet üzerine 1 ml Ribo-ex uygulanmış 5 dk. oda sıcaklığında bekletilmiştir. Üzerine 200 µl kloroform eklenerek 12000g, 15 dk, 4 °C santrifüj edilmiştir. Üst fazda şeffaf olarak görünen RNA; DNA, protein ve membran artıklarından ayrılmış ve üzerine 600 µl RB1 buffer eklenmiştir. Ardından 10000 g, 1dk, rt'de santrifüj yapılmış, kolon dökülerek 500 µl SW1 buffer eklenerek, 10000 g, 1 dk, rt'de santrifüj edilmiştir. Kolon dökülerek RNW buffer'dan 500 µl tüplere konularak aynı derecede santrifüj edilmiştir. Kolon dökülerek tekrar aynı derecede santrifüj edilmiştir. Kolon atılarak yeni ependorfa tüpler konulmuş üzerine 50 µl nuclease free water ekleyenerek aynı derecede santrifüj edilmiştir. İzole edilen RNA -80 °C'de muhafaza edilmiştir

cDNA İzolasyonu: İzole edilen RNA üretici firmanın (Geneall, Hyper Script, Cat no: 601-005, Almanya) protokolü takip edilerek aşağıda belirtilen basamaklar izlenerek cDNA'ya çevrilmiştir.

3 µg RNA, 50 µM Oligo dT primer, 1 mM dNTP, 9 µl su eklenerek; 65 °C de 5 dk inkübe edilmiş, ardından buz üzerine alınmıştır. 10x RTase reaction buffer, 0.1 M DTT, 200 U/µL HyperScript™ Reverse Transcriptase, 1µL ZymoAll™ RNase Inhibitor eklenerek ilk olarak 55 °C'de 60 dk ardından, 85 °C'de 5 dk inkübe edilmiştir. cDNA sı elde edilen örneklerin miktarları kit kullanımı ile (Molecular probes,qubit ssDNA Assay Kit, Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, A.B.D) ölçülmüştür. cDNA miktarları ölçülen örneklerin rt-PCR ile ekspresyonlarına bakılmıştır (Thermo Fisher, Applied Biosystems, StepOnePlus, A.B.D).

SYBR Green temelli rt-PCR ile çalışma yapılmıştır. RealAmp SYBR Green Master mix (High ROX Dye, Cat no:801-051, A.B.D) kullanılmıştır. Verilerinin normalizasyonu  $2^{-\Delta\Delta CT}$  yöntemine göre yapılmıştır. Aşağıda belirtilen PCR bileşenleri ve koşulları (40 döngü) sağlanarak rt-PCR gerçekleştirilmiştir.

PCR BİLEŞENLERİ	Miktar
2X SYBER MASTER MIX	10 µl
F primer (10pm)	1 µl
R primer (10pm)	1 µl
ROX	1 µl
Cdna	2 µl
Su	5 µl
Toplam	20 µl

PCR KOŞULLARI	
95°C	10 dakika
95°C	15 saniye
60°C	40 saniye

rt-PCR: Bu aşamada kullanılacak hedef ve housekeeping gen bölgeleri için tasarlanan primerler (Sentegen Biyoteknoloji, Ankara) çizelge 3.4'de verilmiştir.

Çizelge 3.4 rt-PCR çalışmalarında kullanılan primer sekansları

Gene	İLERİ	GERİ
$\beta$ -actin	5'- TGTTACCAACTGGGACGACA -3'	5'-CTCTCAGCTGTGGTGGTGAA- 3'
PPAR $\gamma$	5'- CAAGAATACCAAAGTGCGA TCAA-3'	5'- GAGCTGGGTCTTTTCAGAATAA TAAG-3'
C/EBP- $\alpha$	5'- AGCAACGAGTACCGGGTAC G-3'	5'-TGTTTGGCTTTATCTCGGCTC- 3'
GPDH	5'- CTCTTCTTGCCGCTTCAGTTT -3'	5'- CATGTAGGCCATGAGGTCCACC AC-3'
TNF- $\alpha$	5'- AGGCCTTGTGTTGTGTTTCC A-3'	5'- ATGGGGGACAGCTTCCTTCTT-3'
Adiponektin	5'- TGTACCCATTCGCTTTACT-3'	5'-TTTCACTTTGTGCTGCTT-3'

### 3.2.4 Sonuçların istatistiksel analizi

Elde edilen tüm veriler PAST (PAleontological STatistics) istatistik programı kullanılarak analiz edilmiştir. Hata payı  $\alpha=0.05$  olarak kabul edilmiştir.

## 4. BULGULAR

### 4.1 Hücre Canlılığı

Çalışmamızda kullanılan laktik asit bakterilerinin, adiposit farklılaşması boyunca, hücre canlılığı üzerindeki etkisi 13. günde MTT testi ile analiz edilmiştir. Uygulanan bakterilerin 3T3-L1 hücreleri üzerindeki canlılık oranlarını belirlemek için her bakteriden 0 ve farklı 2 konsantrasyon, hücre içermeyen boş besiyeri (blank) kullanılmış deney sonunda hücrelere MTT testi uygulanmıştır. Hücre canlılık sonuçları, kontrol ile karşılaştırılan hücrelerin canlılık oranlarının yüzdesi olarak ifade edilmiştir.

Gruplar arası farklılık aşağıda belirtilen ANOVA tablosu ile belirlenmiştir.

	Sum of sqrs	df	Mean square	F	p (same)
Between groups	0,213412	6	0,0355686	465,1	3,311E-21
Within groups	0,001606	21	7,64762E-05		
Total	0,215018	27			

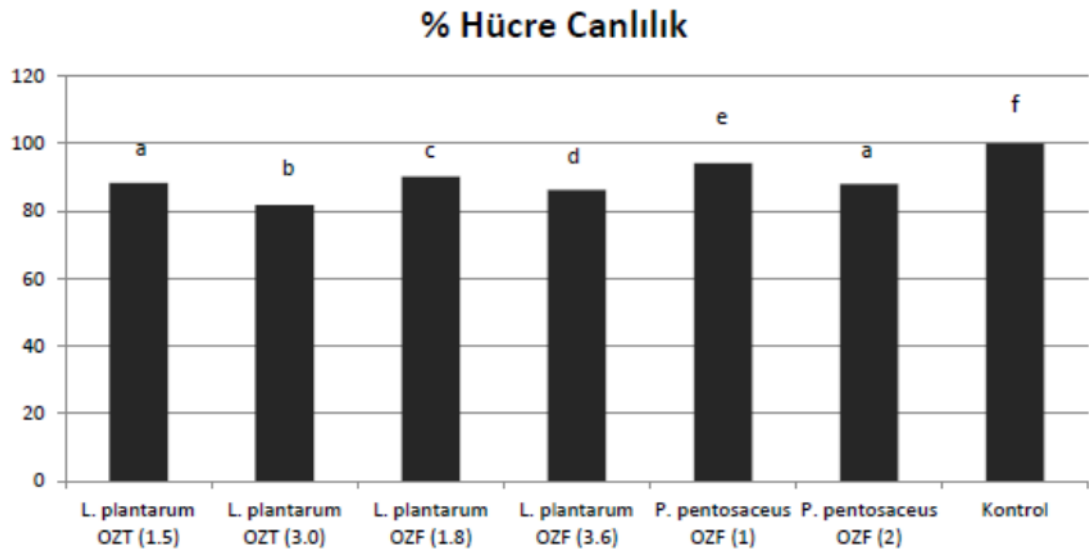
Hangi gruplar arasında farklılık olduğunu gösteren Levene's testi (  $p < 0.05$  )

Levene's test	p(same)	0,004052					
Levene's test	p(same)	0,01081					
Welch F test							
Tukey pairwise							
	L. plantarum OZT (1.5 mg/ml)	L. plantarum OZT (3.0 mg/ml)	L. plantarum OZF (1.8 mg/ml)	L. plantarum OZF (3.6 mg/ml)	P. pentosaceus OZF (1 mg/ml)	P. pentosaceus OZF (2 mg/ml)	Kontrol
L. plantarum OZT (1.5 mg/ml)		0,0001547	0,000688	0,0009311	0,0001547	0,9988	0,0001547
L. plantarum OZT (3.0 mg/ml)	24,01		0,0001547	0,0001547	0,0001547	0,0001547	0,0001547
L. plantarum	7,433	31,45		0,0001547	0,0001547	0,0003148	0,0001547

m OZF (1.8 mg/ml)							
L. plantarum OZF (3.6 mg/ml)	7,204	16,81	14,64		0,0001547	0,002573	0,0001547
P. pentosaceus OZF (1 mg/ml)	21,73	45,74	14,29	28,93		0,0001547	0,0001547
P. pentosaceus OZF (2 mg/ml)	0,6861	23,33	8,119	6,518	22,41		0,0001547
Kontrol	43,22	67,24	35,79	50,43	21,5	43,91	

#### 4.1.1 *Pediococcus pentosaceus* OZF suşunun hücre canlılığına etkisi

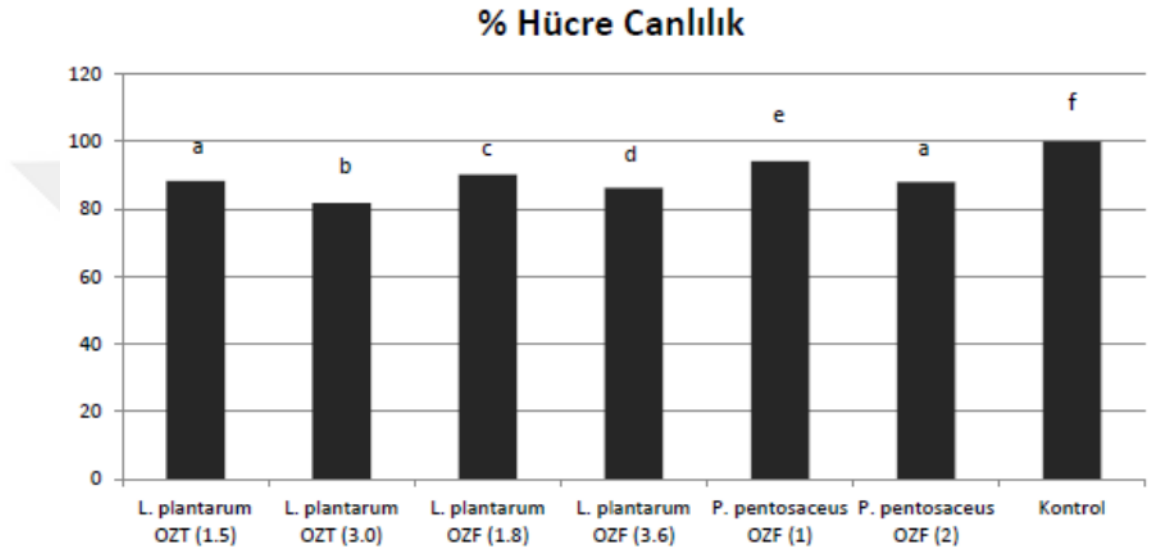
*P. pentosaceus* OZF suşuna ait hücre canlılık oranları Şekil 4.1’de gösterilmiştir. Adiposit farklılaşması boyunca suşun doza bağlı uygulamalarında hücre canlılık oranları 1 mg/ml ve 2 mg/ml konsantrasyonlarında sırayla % 94.2, % 88.1 olarak hesaplanmış ve bu konsantrasyonların hücreler üzerinde toksik etki göstermediği belirlenmiştir.



Şekil 4.1 MTT analizi *P. pentosaceus* OZF suşuna ait hücre canlılık sonuçları

#### 4.1.2 *Lactobacillus plantarum* OZF suşunun hücre canlılığına etkisi

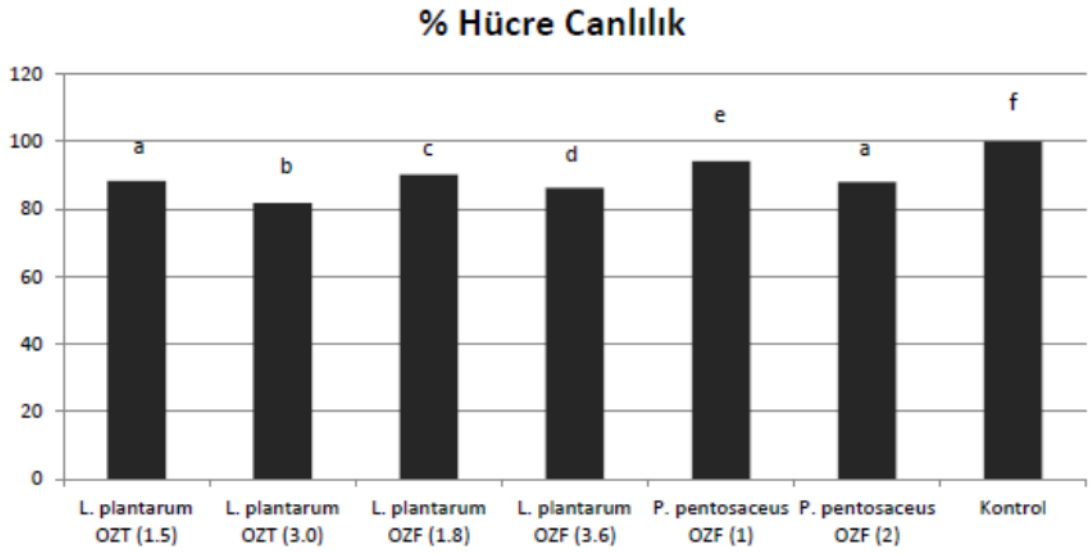
*L. plantarum* OZF suşuna ait hücre canlılık oranları Şekil 4.2’de gösterilmiştir. Adiposit farklılaşması boyunca suşun doza bağlı uygulamalarında hücre canlılık oranları; 1.8 mg/ml, 3.6 mg/ml konsantrasyonlarında sırayla % 90.3, % 86.3 olarak hesaplanmış ve bu konsantrasyonların hücreler üzerinde toksik etki göstermediği belirlenmiştir.



Şekil 4.2 MTT analizi sonucu *L. plantarum* OZF suşuna ait hücre canlılık sonuçları

#### 4.1.2 *Lactobacillus plantarum* OZT suşunun hücre canlılığına etkisi

*L. plantarum* OZT suşuna ait hücre canlılık oranları Şekil 4.3’de gösterilmiştir. Adiposit farklılaşması boyunca suşun doza bağlı uygulamalarında hücre canlılık oranları; 1.5 mg/ml, 3.0 mg/ml konsantrasyonlarında sırasıyla % 88.3, % 81.8 olarak hesaplanmış ve bu konsantrasyonların hücreler üzerinde toksik etki göstermediği belirlenmiştir.



Şekil 4.3 MTT analizi sonucu *L. plantarum* OZT suşuna ait hücre canlılık sonuçları

#### 4.2 Oil Red O Boyama

Laktik asit bakterilerinin lipid birikimi üzerindeki inhibitör etkisi 13. günde değerlendirilmiştir. Hücre içi lipidler tarafından tutulan boya, izopropanol içerisinde 420 nm dalga boyunda ölçülmüştür. İnokülasyon uygulanan hücreler kontrol ile karşılaştırılmıştır. Sonuçlar kontrolün yüzdesi olarak ifade edilmiştir.

Gruplar arası farklılık aşağıda belirtilen ANOVA tablosu ile belirlenmiştir.

	Sum of sqrs	df	Mean square	F	p (same)
Between groups	0,0504812	6	0,00841354	4207	5,786E-22
Within groups	2,8E-05	14	2E-06		
Total	0,0505092	20			

Hangi fruplar arasında farklılık olduğunu gösteren Levene's testi (  $p < 0.05$  )

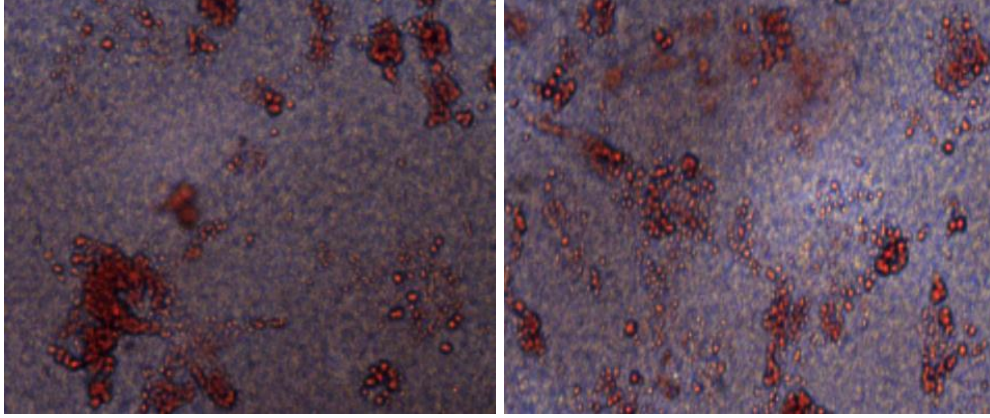
Levene's test	p(same)	0,6637					
Levene's test	p(same)	0,9817					
Welch F test							
Tukey pairwise							
	L.	L.	L.	L.	P.	P.	Kontrol

	plantarum OZT (1.5 mg/ml)	plantarum OZT (3.0 mg/ml)	plantarum OZF (1.8 mg/ml)	plantarum OZF (3.6 mg/ml)	pentosaceus OZF (1 mg/ml)	pentosaceus OZF (2 mg/ml)	
L. plantarum OZT (1.5 mg/ml)		0,1246	0,0001742	0,0001742	0,0001742	0,0001742	0,0001742
L. plantarum OZT (3.0 mg/ml)	4,082		0,0001742	0,0001742	0,0001742	0,0001742	0,0001742
L. plantarum OZF (1.8 mg/ml)	46,13	42,05		0,0001742	0,0001742	0,0001742	0,0001742
L. plantarum OZF (3.6 mg/ml)	88,18	84,1	42,05		0,0001547	0,0001742	0,0001742
P. pentosaceus OZF (1 mg/ml)	80,83	76,75	34,7	7,348		0,0001742	0,0001742
P. pentosaceus OZF (2 mg/ml)	153,5	149,4	107,4	65,32	72,67		0,0001742
Kontrol	36,74	40,82	82,87	124,9	117,6	190,2	

#### 4.2.1 *Pediococcus pentosaceus* OZF'nin lipid akümülayonu üzerine etkisi

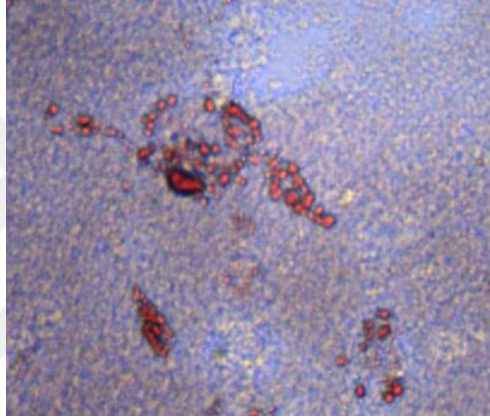
Suşa ait Oil red o boyama sonucunda inverted mikroskop altında alınan fotoğraf görüntüleri ve absorbans değerleri sonucu hesaplanan lipid depolama yüzdeleri Şekil 4.4'te gösterilmiştir. Doza bağlı lipid akümülayon etkisi kontrol ile karşılaştırıldığında; mikroskop altında yağ damlacıklarında azalma gözlenmiştir. Absorbans değerleri sonucunda ise 1.0 mg/ml ekstrakt uygulanan hücreler kontrol ile karşılaştırıldığında lipid akümülayonunununda % 14 oranında, 2.0 mg/ml uygulanan hücrelerde ise % 22 oranında azalma belirlenmiştir.

(a)



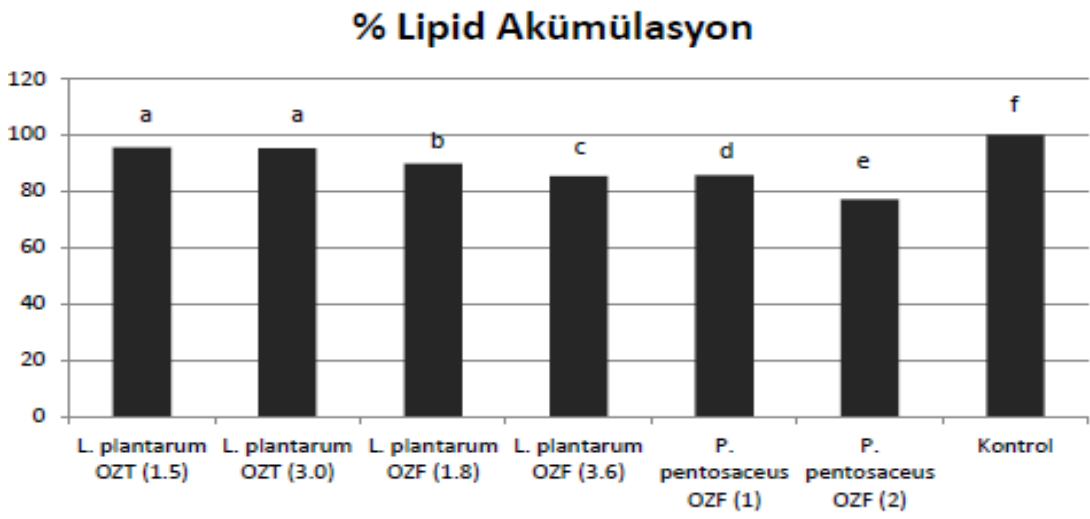
0 (Kontrol) (40X)

1 mg/ml (40X)



2 mg/ml (40X)

(b)



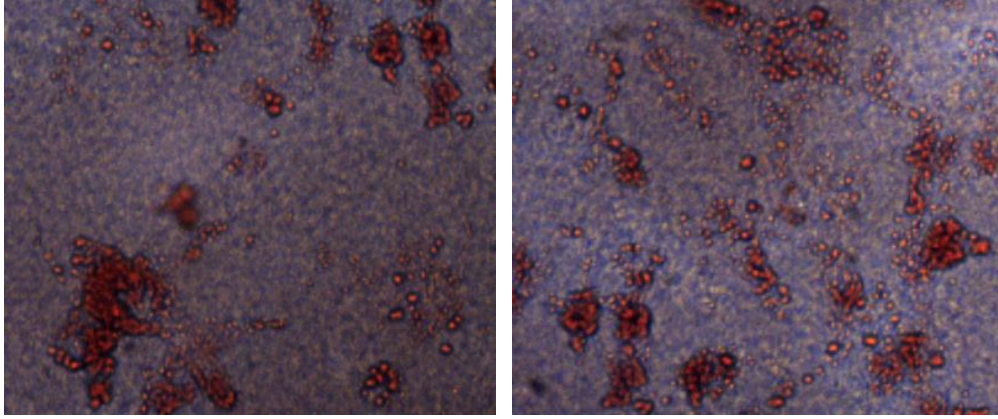
Şekil 4.4.a. Oil Red O boyama sonucu mikroskop görüntüleri, b. Oil Red O boyama sonucu lipid akümülayson ölçümü

#### 4.2.2 *L. plantarum* OZF'nin lipid akümülayonu üzerine etkisi

Suşa ait Oil red o boyamam sonucu şekil 4.5'te gösterilmiştir. Doza bağlı lipid akümülayon etkisi kontrol ile karşılaştırıldığında önemli farklılıklar gözlemlenmiştir. 1.8 mg/ml ekstrakt uygulanan hücreler kontrol ile karşılaştırıldığında lipid akümülayonunu % 10.1 oranında, 3.6 mg/ml uygulanan hücrelerde ise % 14.7 oranında azalttığı gözlemlenmiştir.

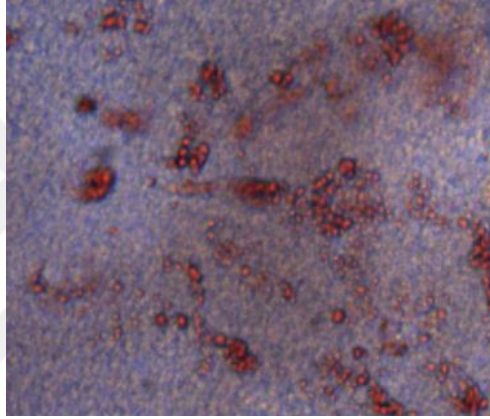


(a)



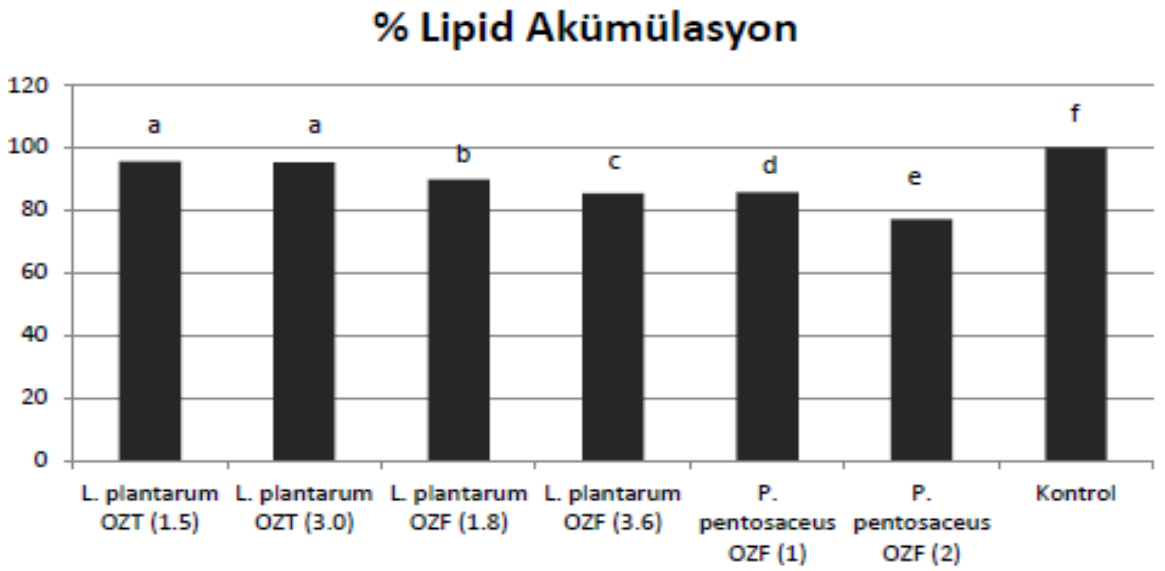
0(Kontrol) (40X)

1.8 mg/ml (40X)



3.6 mg/ml (40X)

(b)



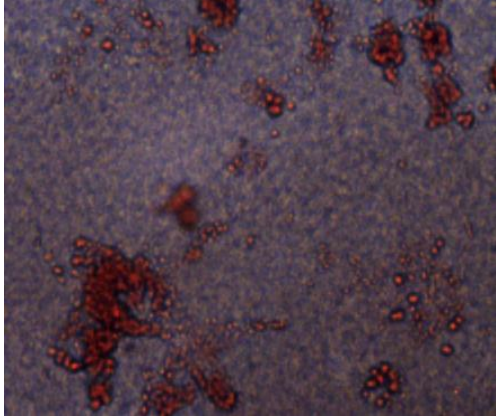
Şekil 4.5.a.Oil Red O boyama sonucu mikroskop görüntüleri, b. Oil Red O boyama sonucu lipid akümülayson ölçümü

#### 4.2.3 *Lactobacillus plantarum* OZT'nin lipid akümülayonu üzerine etkisi

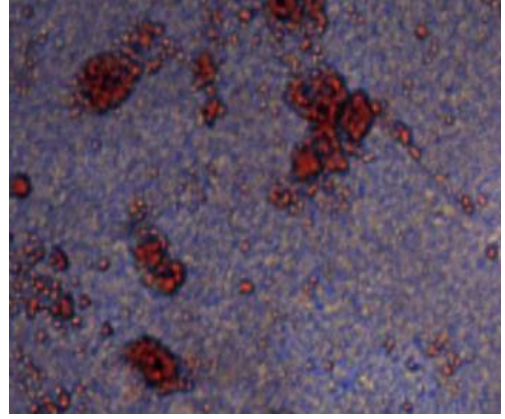
SuŒa ait Oil red o boyamam sonucu Œekil 4.6'da gösterilmiŒtir. Doza baēlı lipid akümülayon etkisi kontrol ile karŒılaŒtırıldıēında anlamlı sonuē gözlemlenememiŒtir. 1.5 mg/ml ekstakt uygulanan hücreler kontrol ile karŒılaŒtırıldıēında lipid akümülayonununda % 4.4 oranında, 3.0 mg/ml uygulanan hücrelerde ise % 4.8 oranında azalma gözlemlenmiŒtir.



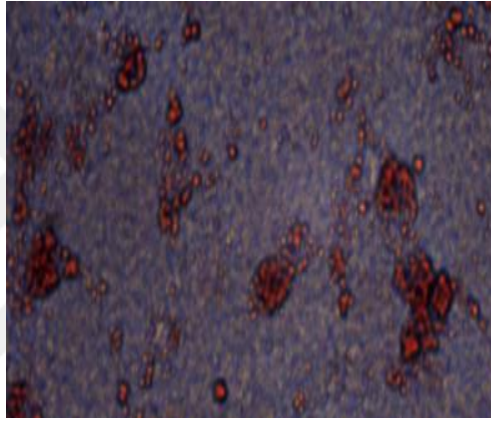
(a)



0(Kontrol)(40X)



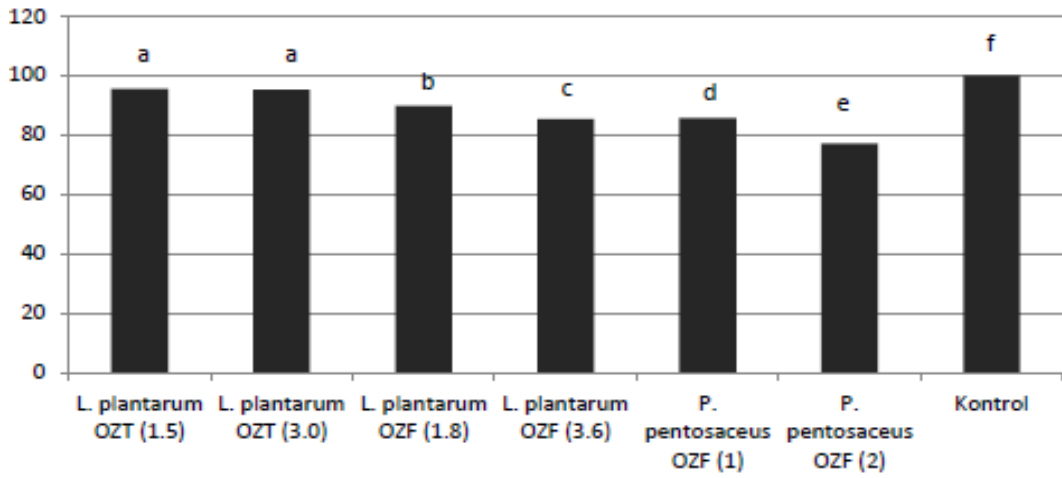
1.5 mg/ml (40X)



3.0 mg/ml(40X)

(b)

### % Lipid Akümülayson



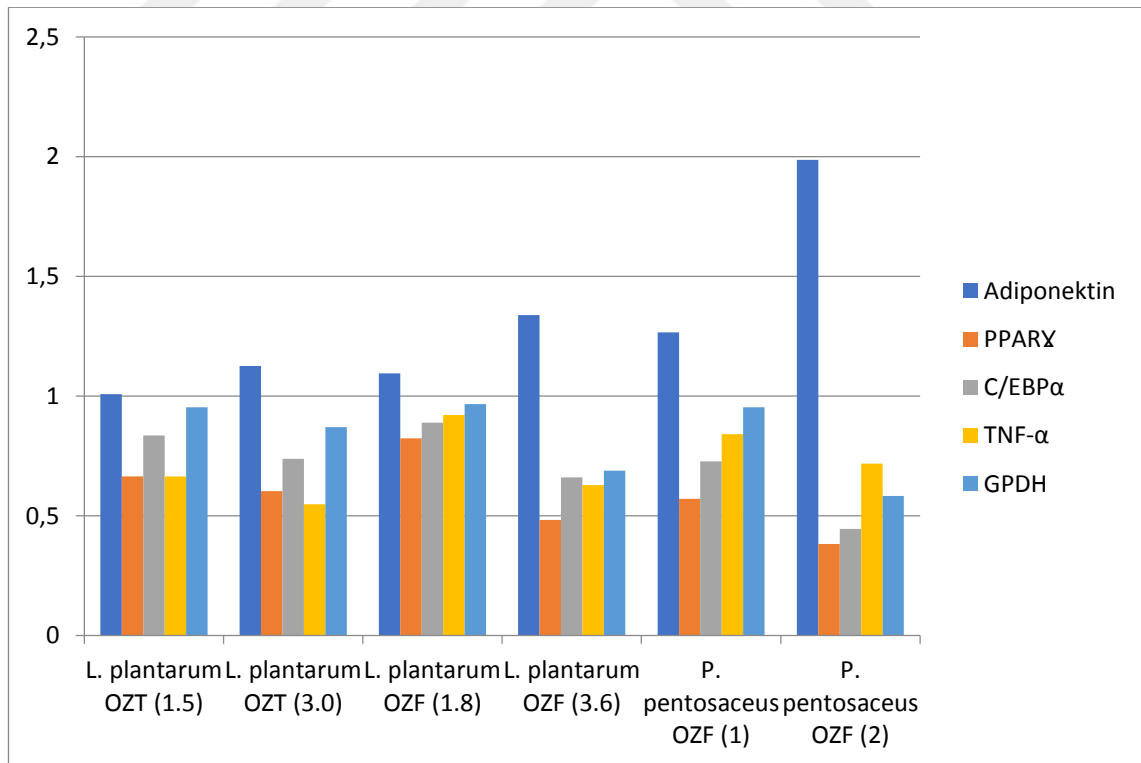
Şekil 4.6 a. Oil Red O boyama sonucu mikroskop görüntüleri, b. Oil Red O boyama sonucu lipid akümülayson ölçümü

### 4.3 Ters Transkripsiyon ve Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (rt- PCR)

Uygulanan lizatların lipid metabolizması ile ilgili genlerin mRNA ekspresyon seviyelerine olan etkisi 13. gün toplanan örneklerden elde edilmiştir. Doza bağlı olarak gerçekleştirilen analizde beta-actin housekeeping gen olarak alınmıştır.

#### 4.3.1 *Pediococcus pentosaceus* OZF'nin mRNA ekspresyon seviyeleri

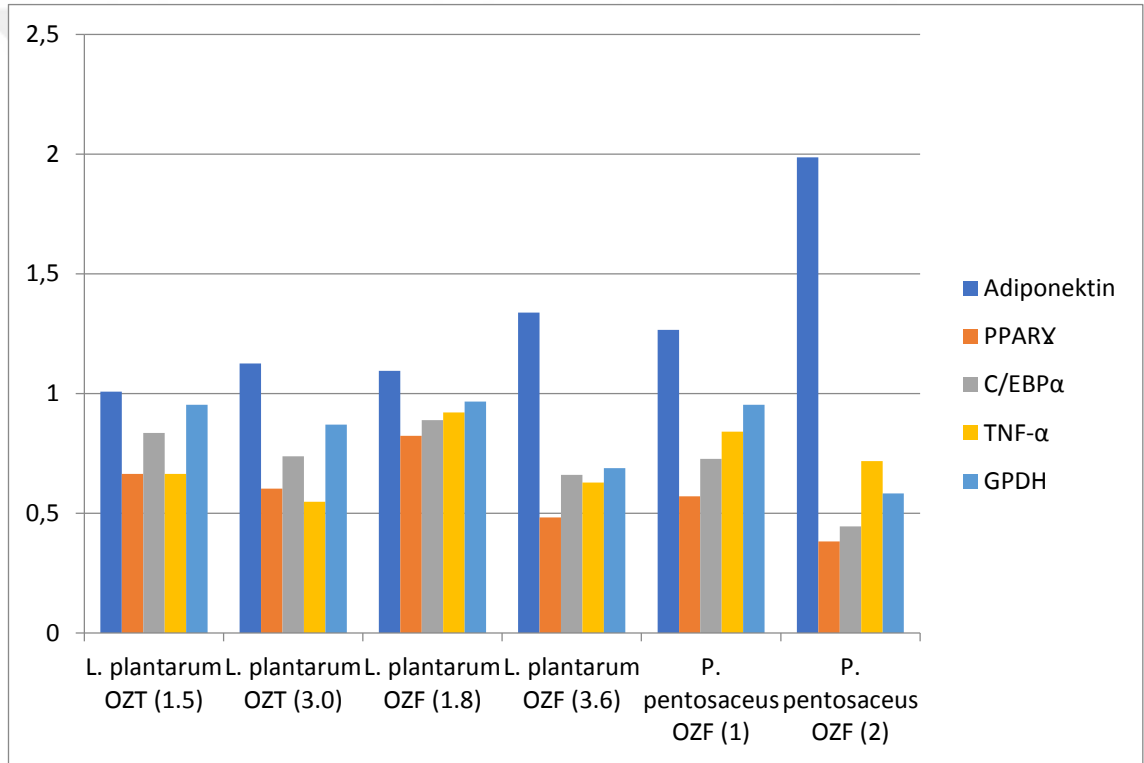
Suşa ait rt-PCR analizi ile elde edilen gen ekspresyon seviyeleri şekil 4.7'de gösterilmiştir. Farklılaşmış 3T3-L1 adiposit üzerinde suşun doza bağlı uygulamaları; PPAR $\gamma$  ve cebp genlerinin mRNA ekspresyon seviyelerini önemli miktarda azalttığı gözlenmiştir. Bu ifadelerin ardından suşun toksik olmayan konsantrasyonları adipojenik gen GPDH ve sitokin geni olan TNF- $\alpha$  nın mRNA ekspresyon seviyesini önemli miktarda azalttığı gözlemlenirken, Adiponektin seviyesini artırdığı gözlenmiştir.



Şekil 4.7 *P. pentosaceus* OZF suşunun, 3T3-L1 hücreleri üzerindeki Adiponektin, PPAR $\gamma$ , C/EBP- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , GPDH gen ekspresyon seviyelerine etkisi

#### 4.3.2 *Lactobacillus plantarum* OZF'nin mRNA ekspresyon seviyeleri

Suşa ait rt-PCR analizi ile elde edilen gen ekspresyon seviyeleri şekil 4.8'de gösterilmiştir. Farklılaşmış 3T3-L1 adipositleri üzerinde suşun doza bağlı uygulamaları; PPAR $\gamma$  ve cebp genlerinin mRNA ekspresyon seviyelerini azalttığı gözlenmiştir. Suşun toksik olmayan konsantrasyonları, adipojenik gen GPDH ve sitokin geni olan TNF- $\alpha$  nın mRNA ekspresyon seviyelerini azalttığı gözlemlenirken, Adiponektin seviyesini artırdığı gözlenmiştir.

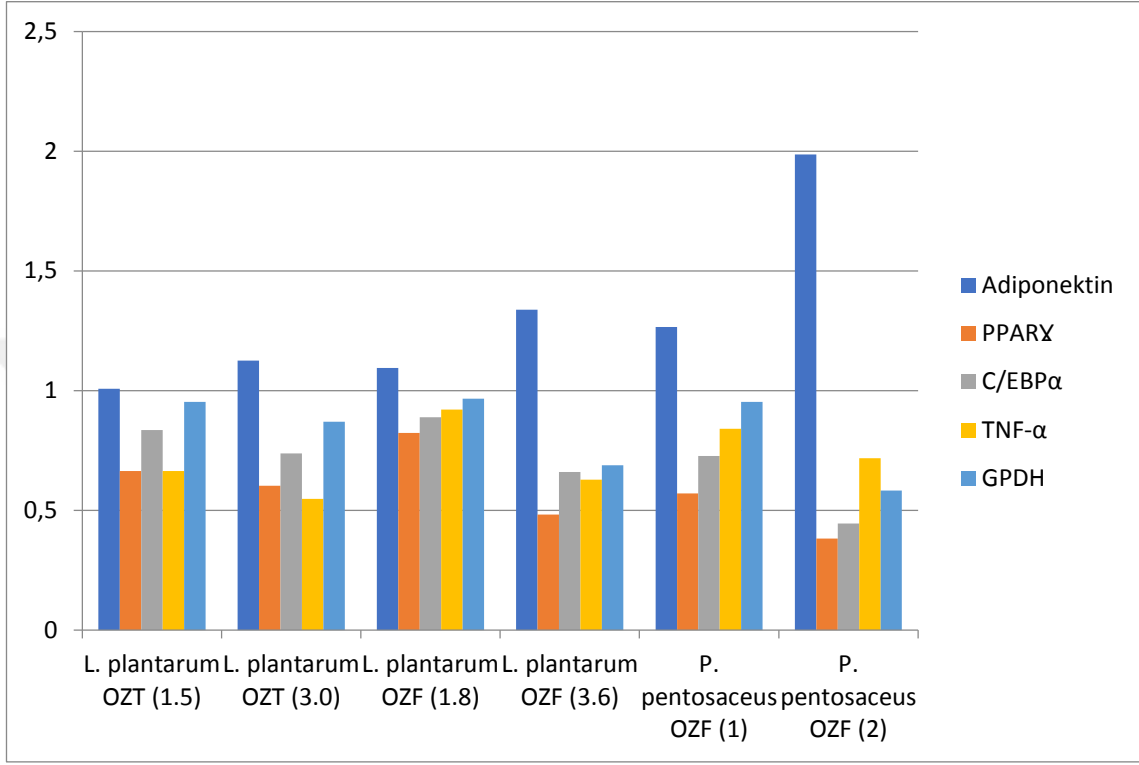


Şekil 4.8 *L. plantarum* OZF suşunun, 3T3-L1 hücreleri üzerindeki Adiponektin, PPAR $\gamma$ , C/EBP- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , GPDH gen ekspresyon seviyelerine etkisi

#### 4.3.2 *Lactobacillus plantarum* OZT'nin mRNA ekspresyon seviyeleri

Suşa ait rt-PCR analizi ile elde edilen gen ekspresyon seviyeleri şekil 4.9'da gösterilmiştir. Farklılaşmış 3T3-L1 adipositlerinde suşun doza bağlı uygulamaları; PPAR $\gamma$  ve cebp genlerinin mRNA ekspresyon seviyelerini azalttığı gözlenmiştir. Suşun

toksik olmayan konsantrasyonları; adipojenik gen GPDH ve sitokin geni olan TNF- $\alpha$ 'nın mRNA ekspresyon seviyelerini azalttığı gözlemlenmiştir. Adiponektin ekspresyon seviyesinde ise düşük doz etki göstermezken, yüksek dozda artış gözlenmiştir.



Şekil 4.9 *L. plantarum* OZT suşunun, 3T3-L1 hücreleri üzerindeki Adiponektin, PPAR $\gamma$ , C/EBP- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , GPDH gen ekspresyon seviyelerine etkisi

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Obezitenin şiddeti, öncül adipositlerin olgun adipositlere farklılaşma derecesi ve adipoz dokuda adipositlerin genişlemesi ile korelasyon göstermektedir. Çalışmamız kapsamında laktik asit bakterilerinin, temel yolak olarak tercih edilen *in vitro* koşullarda obeziteyi baskılamaya yönelik etkilerini belirlemeye çalıştık ve 3 farklı suşun bu mekanizmaya etkisini araştırdık. Kültür koleksiyonumuzda yer alan tüm probiyotik kriterleri tanımlanmış olan *P. pentosaceus* OZF suşu buna ek olarak, tüm laktik asit bakteri türlerinin ve suşlarının farklı özellik ve etkilere sahip olduklarını belirlemek adına iki farklı kaynaktan izole edilen *L. plantarum* türüne ait farklı iki suş çalışmamıza dahil edilmiştir.

Hücre canlılık testi 3 farklı suş ve her birinden 2 farklı konsantrasyon şeklinde kontrol grubuna karşı test edilmiştir. 4 denemenin test grupları arasındaki fark istatistiksel olarak farklı bulunmuştur (ANOVA  $p < 0.001$ ). Levene's testi ile her bir grup tekrar incelenmiş, suş ve farklı konsantrasyonları arasında kontrole göre istatistiksel farklılık tespit edilmiştir ( $p < 0.05$ ). İstatistiksel olarak suşların her 2 konsantrasyonda da farklılaşma boyunca toksik etki göstermediği belirlenmiştir.

Lipid akümüasyonu 3 farklı suşun herbirinden 2 farklı konsantrasyon şeklinde kontrol grubuna karşı test edilmiştir. 3 denemenin test grupları arasındaki fark istatistiksel olarak farklı bulunmuştur. ( $p < 0.001$ ). Levene's testi ile her bir grup tekrar incelenmiş *L. plantarum* OZT suşunun kullanılan iki konsantrasyon arasında fark olmamasına rağmen ( $p > 0.05$ ) kontrol grubunda farklılık göstermiş ve lipid akümüasyonunda azalma gözlenmiştir. Aynı test sonuçlarına göre diğer bakteri ve farklı konsantrasyonları arasında kontrole göre istatistiksel farklılık tespit edilmiş ( $p < 0.05$ ) ve lipid akümüasyonunda kontrol dışında tüm gruplarda azalma gözlenmiştir ( $p < 0.05$ ).

Adiposit özgü PPAR $\gamma$  ve C/EBP- $\alpha$ , adiposit farklılaşmasının erken aşamasında yer almaktadır (Rosen vd. 2000). PPAR $\gamma$  ve C/EBP- $\alpha$  hücrelerde yağ birikimini tetikleyen LPL, leptin, GPDH ve aP2 gibi adipojenik genlerin ekspresyonunu düzenlemektedir (Berger ve Moller, 2002; Kawada vd. 2001). Elde ettiğimiz sonuçlar, uygulanan

LAB'de özellikle *P. pentosaceus* OZF'nin 3T3-L1 adipositlerinin farklılaşması sonucunda C/EBP- $\alpha$  ve PPAR $\gamma$ 'nin mRNA ekspresyonunu önemli ölçüde düşürdüğünü göstermektedir (Şekil 4.7). Yapılan birkaç çalışma, C/EBP- $\alpha$  gen ekspresyonu ile lipid birikimi oranı arasında pozitif korelasyon olduğunu göstermiştir (Hu vd. 1995; Jiang vd. 2006; Park vd. 2009). Bu sonuçlar *P. pentosaceus* OZF'nin adipojenik transkripsiyon faktörlerini, nihayetinde GPDH ekspresyon seviyesini azalttığını göstermektedir. Sitolitik enzim GPDH, gliserolün triaçilgliserole dönüştürülmesinde önemli bir rol oynamaktadır (Wise ve Green, 1979). GPDH aktivitesinin azaltılması, yağ asitleri ve trigliseritlerin de novo sentezini yavaşlatmakta ve aynı zamanda olgun adipositlerde öncül adipositlerin ve lipogenezin erken farklılaşma aşamasında farklılaşmayı inhibe edebilmektedir. Verilerimiz, gajami sik-hae'den izole edilen *L. plantarum* LG42 suşu ile muamele edilen 3T3-L1 hücrelerinde C/EBP- $\alpha$ , PPAR $\gamma$  ve GPDH mRNA ekspresyon seviyesini azalttığı sonucuyla uyumludur (Park vd. 2013).

Böylelikle *P. pentosaceus* OZF'nin adiposit farklılaşma programında yer alan önemli adipojenik transkripsiyon faktörlerinin ekspresyon seviyelerini düzenleyerek adipogenez sürecinde baskılayıcı etki gösterdiği sonucuna varılmıştır.

Yağ dokusu sadece yağ formunda fazla enerji için birincil depolama alanı değil, aynı zamanda lipid homeostazının kontrolüne katılan bir endokrin organ olarak da görev yapmaktadır. Adipoz dokudan salınan adipositokinlerin düzensizleştirilmesi, inflamatuvar bir durumun meydana gelmesine bu da insülin sinyal iletimi ve lipid metabolizmasında düzensizliğe yol açmaktadır. Kronik inflamasyon, mRNA ekspresyon seviyesinde TNF- $\alpha$  gibi proinflamatuvar adipokinlerin artışı, ardından adiponektin gibi antiinflamatuvar adipokinlerin azalışı ile karakterize edilmektedir (Hotamisligil vd. 1993; Wise ve Green, 1979). Serumda yüksek düzeyde bulunan TNF- $\alpha$ 'nın insülin sinyal iletiminde tahribata, sonucunda ise insülin direncine yol açtığı gösterilmiştir (Kershaw ve Flier, 2004; Ruan vd. 2003). Yapılan çalışmalarda obez birey ve rodent yağ dokusunda TNF- $\alpha$  seviyelerinin artış gösterdiği belirtilmiştir (Cowherd vd. 1999; Gregoire vd. 1998). Araştırmamız, 3T3-L1 hücreleri üzerinde özellikle *P. pentosaceus* OZF'nin TNF- $\alpha$  mRNA ekspresyonunu önemli ölçüde azalttığını ve adiponektin ekspresyonunu arttırdığını göstermiştir (Şekil 4.7). Elde ettiğimiz sonuçlar

doğrultusunda *P. pentosaceus* OZF'nin antiinflamatuvar özelliklere sahip olduğu ve insülin duyarlılığını arttırdığı belirlenmiştir. Araştırmamız sonucu, Kimchi'den izole edilen *Lactobacillus brevis* OPK-3 suşunun 3T3-L1 adipositlerine uygulanması sonucu Adiponektin ekspresyon seviyesinde gözlemlenen artış ve TNF- $\alpha$ 'da ki azalışla uyumlu sonuçlar göstermiştir (Park vd. 2013).

*P. pentosaceus* OZF, hücre içi trigliserit birikiminde azalma ile birlikte adiposit farklılaşmasının önlenmesi yoluyla anti-adipojenik etkiler sergilemiştir. Ayrıca 3T3-L1 adipositlerinde adipojenik transkripsiyon faktörlerinde önemli seviyede baskılanma yolağı ile adipojenik özgü GPDH mRNA moleküllerinin baskılanmasını sağlamıştır. Dahası, *P. pentosaceus* OZF'nin, TNF- $\alpha$  ekspresyonunun azaltılması yoluyla inflamatuvar yanıtı da düşürdüğü gözlenmiştir. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda, anti-obezite ve anti-inflamatuvar özellik gösteren *P. pentosaceus* OZF'nin obeziteye alternatif yaklaşım olarak *in vivo* koşullarda da değerlendirilebileceği öngörülmüştür.

Sonuçlar birlikte ele alındığında, *P. pentosaceus* OZF 'nin adipogenezin inhibisyonunda önemli bir rol oynayabileceğini belirlenmiştir. *L. plantarum* türüne ait bebek feçesinden izole edilen *L. plantarum* OZF suşunun adiposit farklılaşması boyunca baskılayıcı etkisini gözlemlerken, turşu suyundan izole edilen *L. plantarum* OZF suşunun toksik olmayan konsantrasyonlarda farklılaşmaya baskılayıcı etkide bulunmadığını gözlemlenmiştir (Şekil 4.8 - Şekil 4.9).

Hücre dışı ekstrakt, üst fazdan elde edilerek liyofilize edilen örnekler, çalışmamız boyunca kontaminasyon gösterdiği için adipogenez aktivitesinin düzenlenmesinde deneylere dahil edilmemiştir.

## KAYNAKLAR

- Arita, Y., Kihara, S., Ouchi N., Takahashi M., Maeda K., Miyagawa J., Shimomura I., Nakamura T., Miyaoka K., Kuriyama H., Nishida M., Yamashita S., Okubo K., Matsubara K., Muraguchi M., Ohmoto Y., Funahashi T. and Matsuzawa Y. 1999. Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 257(1); 79-83.
- Azais-Braesco, V., Bresson, J.L., Guarner, F. and Corthier, G. 2010. Not all lactic acid bacteria are probiotics, but some are. *Br. J. Nutr.*, 103; 1079-1081.
- Berger J and Moller DE. 2002. The mechanisms of action of PPARs. *Annu Rev Med*, 53; 409-435.
- Bernardo, W.M., Aires, F.T., Carneiro, R.M., Sa, F.P., Rullo, V.E. and Burns, D.A. 2013. Effectiveness of probiotics in the prophylaxis of necrotizing enterocolitis in preterm neonates: a systematic review and meta-analysis. *J. Pediatr*, 89; 18-24.
- Candela, M., Perna, F., Carnevali, P., Vitali, B., Ciati, R., Gionchetti, P., Rizzello, F., Campieri, M. and Brigidi, P. 2008. Interaction of probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains with human intestinal epithelial cells: adhesion properties, competition against enteropathogens and modulation of IL-8 production. *Int J Food Microbiol*, 125(3); 286-292.
- Cao, Z., Umek, R.M. and McKnight. S.L. 1991. Regulated expression of three C/EBP isoforms during adipose conversion of 3T3-L1 cells. *Genes & Development*, 5(9); 1538-1552.
- Chen, Y.H., Hsieh, F.C. and Chen, P.Y. 2015. US20150196608 A1
- Chmielewska, A. and Szajewska, H. 2010. Systematic review of randomised controlled trials: probiotics for functional constipation. *World J. Gastroenterol.*, 16; 69-75.
- Choi, C.H., Jo, S.Y., Park, H.J., Chang, S.K., Byeon, J.S. and Myung, S.J. 2011. A randomized, double-blind, placebo-controlled multicenter trial of *Saccharomyces boulardii* in irritable bowel syndrome: effect on quality of life. *J. Clin. Gastroenterol.*, 45; 679-683.
- Christy, R.J., Yang, V.W., Ntambi, J.M., Geiman, D.E., Landschulz, W.H., Friedman, A.D., Nakabeppu, Y., Kelly, T.J. and Lane, M.D. 1989. Differentiation-induced gene expression in 3T3-L1 preadipocytes: CCAAT/enhancer binding protein interacts with and activates the promoters of two adipocyte specific genes. *Genes & Development*, 3(9); 1323-1335.
- Cowherd, R.M., Lyle, R.E. and McGehee, Jr R.E. 1999. Molecular regulation of adipocyte differentiation. *Semin Cell Dev Biol* ., 10; 3-10.
- De Preter, V., Coopmans, T., Rutgeerts, P. and Verbeke, K. 2006. Influence of long-term administration of lactulose and *saccharomyces boulardii* on the colonic

- generation of phenolic compounds in healthy human subjects. *J Amer Coll of Nutr*, 25; 541-549.
- Esposito, E., Iacono, A., Bianco, G., Autore, G., Cuzzocrea, S., Vajro, P., Canani, R.B., Calignano, A., Raso, G.M., Meli, R. 2009. Probiotics reduce the inflammatory response induced by a high-fat diet in the liver of young rats. *J Nutr*, 139; 905-911.
- Fijan, S. 2014. Microorganisms with claimed probiotic properties: an overview of recent literature. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 11; 4745-4767.
- Fitzpatrick, L.R. 2013. Probiotics for the treatment of *Clostridium difficile* associated disease. *World J. Gastroint. Pathophysiol.*, 4; 47-52.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization (FAO/WHO). 2014. Web Sites: <http://ftp.fao.org/es/esn/food/wgreport2.pdf>. Erişim Tarihi: 30.04.2002
- Green, H. and Kehinde, O. 1974. Sublines of mouse 3T3 cells that accumulate lipid. *Cell Cell*, 1(3); 113-116.
- Gregoire, F.M., Smas, C.M. and Sul, H.S. 1998. Understanding Adipocyte Differentiation. *Physiological Reviews*, 78(3); 783-809.
- Grunfeld, C. and K.R. Feingold. 1991. The metabolic effects of tumor necrosis factor and other cytokines. *Biotherapy (Dordrecht, Netherlands)*, 3(2); 143-58.
- Hemalatha, R., Kumar, M., Das, N., Kumar, N.S., Challa, H.R. and Nagpal, R. 2014. Effect of probiotic *Lactobacillus salivarius* UBL522 and prebiotic fructo-oligosaccharide on serum lipids, inflammatory markers, insulin sensitivity and gut bacteria in healthy young volunteers: a randomized controlled single-blind pilot study. *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.*, 20 (3); 289-298.
- Hotamisligil, G.S., Shargill, N.S. and Spiegelman, B.M. 1993. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science*, 259; 87-91.
- Hotamisligil, G.S., Arner, P., Caro, J.F., Atkinson, R.L and Spiegelman, B.M. 1995. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance. *The Journal of Clinical Investigation*. 95(5); 2409-15.
- Hotta, K., Funahashi, T., Arita, Y., Takahashi, M., Matsuda, M., Okamoto, Y., Iwahashi, H., Kuriyama, H., Ouchi, N., Maeda, K., Nishida, M., Kihara, S., Sakai, N., Nakajima, T., Hasegawa, K., Muraguchi, M., Ohmoto, Y., Nakamura, T., Yamashita, S., Hanafusa, T. and Matsuzawa, Y. 2000. Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 20(6); 1595-9.

- Indu, P.K., Chopra, K. and Saini, A. 2002. Probiotics: potential pharmaceutical applications. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 15; 1-9.
- Johnston, B.C., Goldenberg, J.Z., Vandvik, P.O., Sun, X. and Guyatt, G.H. 2011. Probiotics for the prevention of pediatric antibiotic-associated diarrhea. *Cochrane Database Syst. Rev.*, 9(11); CD004827.
- Kawada, T., Takahashi, N. and Fushiki, T. 2001. Biochemical and physiological characteristics of fat cell. *J Nutr Sci Vitaminol*, 47; 1–12.
- Kershaw, E.E. and Flier, J.S. 2004. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab.*, 89; 2548–2556.
- Kim, O.Y., Lee, S.M., Do, H., Moon, J., Lee, K.H., Cha, Y.J. and Shin, M.J. 2012. Influence of Quercetin-rich Onion Peel Extracts on Adipokine Expression in the Visceral Adipose Tissue of Rats. *Phytotherapy Research*, 26(3); 432-437.
- Kumar, M., Verma, V., Nagpal, R., Kumar, A., Gautam, S.K., Behare, P.V., Grover, C.R. and Aggarwal, P.K. 2011. Effect of probiotic fermented milk and chlorophyllin on gene expressions and genotoxicity during AFB<sub>1</sub>-induced hepatocellular carcinoma. *Gene*, 490; 54-59.
- Kumar, M., Verma, V., Nagpal, R., Kumar, A., Behare, P.V., Singh, B. and Aggarwal, P.K. 2012. Anticarcinogenic effect of probiotic fermented milk and chlorophyllin on aflatoxin-B<sub>1</sub> induced liver carcinogenesis in rats. *Br. J. Nutr.*, 107; 1006-1016.
- Kumar, M., Rakesh, S., Nagpal, R., Kumar, R., Hemalatha, R., Ramakrishna, A., Sudarshan, V., Ramagoni, R., Shujauddin, M., Verma, V., Kumar, A., Tiwari, A. and Singh, B. 2013. Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG and Aloe vera gel improves lipid profiles in hypercholesterolemic rats. *Nutrition*, 29; 574-579.
- Kuroyanagi, K., Kang, M.S., Goto, T., Hirai, S., Ohyama, K., Kusudo, T., Yu, R., Yano, M., Sasaki, T., Takahashi, N. and Kawada, T. 2008. Citrus auraptene acts as an agonist for PPARs and enhances adiponectin production and MCP-1 reduction in 3T3-L1 adipocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 366(1); 219-225.
- Lee, B.H., Lo, Y.H. and Pan, T.M. 2013. Anti-obesity activity of *Lactobacillus* fermented soy milk products. *J Funct Foods*, 5; 905-913.
- Lee, S.J., Bose, S., Seo, J.G., Chung, W.S., Lim, C.Y. and Kim, H., 2013. The effects of co-administration of probiotics with herbal medicine on obesity, metabolic endotoxemia and dysbiosis: a randomized double-blind controlled clinical trial. *Clin. Nutr.*, 33 (6); 973-981.
- Lindsay, R.S., Funahashi, T., Hanson, R.L., Matsuzawa, Y., Tanaka, S., Tataranni, P.A., Knowler, W.C. and Krakoff, J. 2002. Adiponectin and development of type 2 diabetes in the Pima Indian population. *Lancet*, 360(9326); 57-8.

- McFarland, L.V. 2007. Meta-analysis of probiotics for the prevention of traveler's diarrhea. *Travel Med. Infect. Dis.*, 5; 97-105.
- Metchnikoff, E. 1908. *The Prolongation of Life.* (first ed.) G.P. Putnam's Sons, New York.
- Mohania, D., Kansal, V.K., Shah, D., Kumar, M., Gautam, S.K., Singh, B., Behare, P.V. and Nagpal, R. 2013. Therapeutic effect of probiotic *Dahi* (yogurt) on plasma, aortic and hepatic lipid profile of hypercholesterolemic rats. *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.*, 18; 490-497.
- Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods.* 65; 55-63.
- Moseti, D., Regassa, A. and Kim, W.K. 2016. Molecular Regulation of Adipogenesis and Potential Anti-Adipogenic Bioactive Molecules. *Int. J. Mol. Sci.*, 17(1); Makale 124.
- Murphy, E.F., Cotter, P.D., Hogan, A., O'Sullivan, O., Joyce A., Fouhy, F., Clarke, S.F., Marques, T.M., O'Toole, P.W., Stanton, C., Quigley, E.M., Daly, C., Ross, P.R., O'Doherty, R.M. and Shanahan, F. 2013. Divergent metabolic outcomes arising from targeted manipulation of the gut microbiota in diet-induced obesity. *Gut*, 62; 220-226.
- Nagpal, R., Kumar, A., Kumar, M., Behare, P.V., Jain, S. and Yadav, H. 2012. Probiotics, their health benefits and applications for developing healthier foods: a review. *FEMS Microbiol. Lett.*, 334; 1-15.
- Orlando, A. and Russo, F. 2013. Intestinal microbiota, probiotics and human gastrointestinal cancers. *J. Gastrointest. Cancer*, 44; 121-131.
- Omar, J.M., Chan, Y.M., Jones, M.L., Prakash, S. and Jones, P.J.H. 2012. *Lactobacillus fermentum* and *Lactobacillus amylovorus* as probiotics alter body adiposity and gut microflora in healthy persons. *Elsevier*, 5(1); 116-123.
- Park, J.E., Oh, S.H. and Cha, Y.S. 2012. *Lactobacillus plantarum* LG42 Isolated from Gajami Sik-Hae Inhibits Adipogenesis in 3T3-L1 Adipocyte. *BioMed Research International*, Article ID 460927; 7.
- Park, D.Y., Ahn, Y.T., Park, S.H., Huh C.S., Yoo, S.R., Yu, R., Sung, M.K., McGregor, R.A. and Choi, M.S. 2013. "Supplementation of *Lactobacillus curvatus* HY7601 and *Lactobacillus plantarum* KY1032 in diet-induced obese mice is associated with gut microbial changes and reduction in obesity. *PLoS One*, 8(3); e59470.
- Park, J. E., Oh, S.H. and Cha, Y. S. 2014. *Lactobacillus brevis* OPK-3 isolated from kimchi inhibits adipogenesis and exerts anti-inflammation in 3T3-L1 adipocyte. *J Sci Food Agric.*

- Poulos, S.P., M.V. Dodson, and G.J. Hausman. 2010. Cell line models for differentiation: Preadipocytes and adipocytes. *Exp. Biol. Med. Experimental Biology and Medicine*, 235(10); 1185-1193.
- Rocha, V.Z. and E.J. Folco. 2011. Inflammatory Concepts of Obesity. *International Journal of Inflammation*, Article ID 529061; 14 pages.
- Rosen, E.D., Walkey, C.J., Puigserver, P. and Spiegelman, B.M. 2000. Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes Dev*, 14; 1293–1307.
- Ruan, H., Zarnowski, M.J., Cushman, S.W. and Lodish, H.F. 2003. Standard isolation of primary adipose cells from mouse epididymal fat pads induces inflammatory mediators and down-regulates adipocyte genes. *J Biol Chem.*, 278; 47585–47593.
- Qiao, Y., Sun, J., Xia, S., Li, L., Li, Y., Wang, P., Shi, Y. and Le, G. 2015. Effects of different *Lactobacillus reuteri* on inflammatory and fat storage in high-fat diet-induced obesity mice model. *Journal of Functional Foods*, 14; 424-434.
- Salminen, S., Ouwehand, A., Benno, Y. and Lee, Y.K. 1999. Probiotics: how should they be defined?. *Food Sci. Technol.*, 10; 107-110.
- Samuel, B.S., Shaito, A., Motoike, T., Rey, F.E., Backhed, F., Manchester, J.K., Hammer, R.E., Williams, S.C., Crowley, J., Yanagisawa, M. and Gordon, J.I. 2008. Effects of the gut microbiota on host adiposity are modulated by the short-chain fatty-acid binding G protein-coupled receptor, Gpr41. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 105; 16767-16772.
- Schenk, S., Saberi, M. and Olefsky, J.M. 2008. Insulin sensitivity: Modulation by nutrients and inflammation. *J. Clin. Invest. Journal of Clinical Investigation*, 118(9); 2992-3002.
- Scientific Psychic. Web Sites: <http://www.scientificpsychic.com/fitness/diet.html>.
- Serban, D.E. 2013. Gastrointestinal cancers: influence of gut microbiota, probiotics and prebiotics. *Cancer Lett.*, 345; 258-270.
- Shah, A., Mehta, N. and Reilly, M.P. 2008. Adipose inflammation, insulin resistance, and cardiovascular disease. *J. Parenter. Enter. Nutr. Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 32(6); 638-644.
- Sung, J.H., Chon, J.W., Lee, M.A., Park, J.K. and Woo Park, J.T. 2011. The anti-obesity effect of *Lethariella cladonioides* in 3T3-L1 cells and obese mice. *Nutr Res Pract.*, 5(6); 503-510.
- Tsai, Y.T., Cheng, P.C., Fan, C.K. and Pan, T.M. 2008. Time-dependent persistence of enhanced immune response by a potential probiotic strain *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* NTU 101. *Int J Food Microbiol*, 128; 219-225.

- Tsai, Y.T., Cheng, P.C. and Pan, T.M., 2010. Immunomodulating activity of *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* NTU 101 in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7-infected mice. *J Agric Food Chem*, 58; 11265-11272.
- Wallace, T.C., Guarner, F., Madsen, K., Cabana, M.D., Gibson, G., Hentges, E. and Sanders, M.E. 2011. Human gut microbiota and its relationship to health and disease. *Nutr. Rev.*, 69; 392-403.
- Walter, J., Britton, R.A. and Roos, S. 2011. Host-microbial symbiosis in the vertebrate gastrointestinal tract and the *Lactobacillus reuteri* paradigm. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 108; 4645-4652.
- Wise, L.S. and Green, H. 1979. Participation of one isozyme of cytosolic glycerophosphate dehydrogenase in the adipose conversion of 3T3 cells. *J Biol Chem*, 254; 273–275.
- World Health Organization (WHO) 2015. Web Sites: from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>.
- Wilhelm, S.M., Johnson, J.L. and Kale-Pradhan, P.B. 2011. Treating bugs with bugs: the role of probiotics as adjunctive therapy for *Helicobacter pylori*. *Ann. Pharmacother.*, 45; 960-966.
- Wise LS and Green H. 1979. Participation of one isozyme of cytosolic glycerophosphate dehydrogenase in the adipose conversion of 3T3 cells. *J Biol Chem*. 254; 273–275.
- Wu, C.C., Weng, W. L., Lai, W. L., Tsai, H. P., Liu, W.H. and Lee, M.H. 2015. Effect of *Lactobacillus plantarum* Strain K21 on High-Fat Diet-Fed Obese Mice. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, Article ID 391767, s.9.
- Yadav, H., Jain, S. and Sinha, P.R. 2007. Antidiabetic effect of probiotic dahi containing *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* in high fructose fed rats. *Nutrition*, 23; 62-68.
- Yu, JJ and Oh, SH. 2010. Isolation and characterization of lactic acid bacteria strains with ornithine producing capacity from natural sea salt. *J Microbiol.*, 48; 467–472.
- Zebisch, K., Voigt, V., Wabitsch, M. and Brandsch, M. 2012. Protocol for effective differentiation of 3T3-L1 cells to adipocytes. *Analytical Biochemistry*, 425(1); 88-90.
- Zelaya, H., Tsukida, K., Chiba, E., Marranzino, G., Alvarez, S., Kitazawa, H., Agüero, G. and Villena, J. 2014. Immunobiotic Lactobacilli reduce viral-associated pulmonary damage through the modulation of inflammation-coagulation interactions. *Int. Immunopharmacol.*, 19; 161-173.

## **EKLER**

EK 1 Lab ve Hücre Kültürü Gelişimi için Kullanılan Kültür Ortamları  
EK 2 Kimyasallar

## EK 1 Lab ve Hücre Kültürü Gelişimi için Kullanılan Kültür Ortamları

### MRS Besiyeri

Bileşen	Miktar (g/L)
Kazein pepton	10
Et Ekstraktı	8
Maya ekstraktı	4
Glukoz	20
Dipotasyum hidrojenfosfat	2
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.5
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	0.2
Tween 80	1
Triamonyum sitrat	2
Sodyum asetat	5
Ph: 6.8± 0.2	

100 ml’de 5,2 gr hazır besiyeri içeriği çözülerek hazırlanmıştır. Sterilizasyon 121°C’de 15 dk yapılmıştır.

### DMEM High Glucose (4.5 g/l), with L-Glutamine

Bileşen	Miktar (mg/l)
<b>Amino Asitler</b>	
L-Arjinin HCl	84.00
L-Sistein 2HCl	48.00
L-Glutamin	584.00
Glisin	30.00
L-Histidin HCl H <sub>2</sub> O	42.00
L-Izolösin	105.00
L-Lösin	105.00
L-Lizin HCl	146.00
L-Metiyonin	30.00
L-Fenilalanin	66.00
L-Serin	42.00
L-Threonin	95.00
L-Triptopfan	16.00
L-Tirozin 2 Na	89.47
L-Valin	94.00
<b>Vitaminler</b>	
Kolin klorür	4.00
D-Kalsiyum Pantotenat	4.00

Folik Asit	4.00
myo-Inositol	7.20
Nikotinamid	4.00
Piridoksal HCl	4.00
Riboflavin	0.40
Tiyamin HCl	4.00
<b>İnorganik Tuzlar</b>	
Kalsiyum Klorür 2 H <sub>2</sub> O	265.00
Demir(III) Nitrat 9 H <sub>2</sub> O	0.10
Magnezyum Sülfat	97.67
Potasyum Klorür	400.00
Sodyum Bikarbonat	3700.00
Sodyum Klorür	6400.00
Sodyum Fosfat Monobazik Anhidrit	109.00
<b>Diğer Bileşenler</b>	
D-Glukoz	4500.00
Fenol Kırmızı Sodyum Tuzu	15.90

Hücre kültür ortamında kullanılan tüm besiyeri ve besiyeri içeriğine dahil edilen gereçler kullanımdan önce 37°C su banyosunda (Memmert, WNB 7, Almanya) ısıtılmıştır. %90 DMEM + %10 FBS içeriği çalışma boyunca temel besiyeri olarak kullanılmıştır. Farklılaştırma ve adiposit gelişimi için kullanılan kimyasallar temel besiyerine eklenerek toplam karışım 0.45 µm filtreden geçirilmiş kullanıma hazır hale getirilmiştir.

## EK 2 Kimyasallar

### Kimyasal Adı

### Marka

0.22 ve 0.45 -mikron por çaplı membran filtre  
MRS  
DMEM, FBS, Tripsin, PBS  
Serolojik pipet  
DMSO (Dimethyl Sulfoxide)  
DEX (Dexamethasone)  
IBMX (Methylisobutylxanthine)  
Insulin (Bovine)

**Sartorius**  
**Merck, Germany**  
**Capricorn, Germany**  
**Sarstedt, Germany**  
**Sigma, Germany**  
**GBiosciences, U.S.A**  
**Sigma**  
**Sigma**



## ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Gamze Eda YILDIRIM

Doğum Yeri : ARDAHAN

Doğum Tarihi : 06.11.1989

Yabancı Dili : İngilizce

### **Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)**

Lise : Niksar Danişmend Gazi Lisesi 2003-2007

Lisans : Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji 2009-2013

Yüksek Lisans: Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı, 2016/2018

### **Uluslararası Kongre Sunum**

Anti-obesity Effects of Potential Probiotic Strains on 3T3-L1 Adipocytes. **II. International Summit on Probiotics Health and Nutraceuticals (IPN-2016)** September 07-09, 2016 II. Inter (IPN-2016) • Baltimore, MD, USA

### **Ulusal Kongre Sunum**

Yeni doğan bebek feçesinden izole edilen laktik asit bakterisinin obeziteye karşı potansiyel etkisinin *in vitro* koşullarda belirlenmesi. **5. Ulusal Bağırsak Mikrobiyotası ve Probiyotik Kongresi**, Antalya, Türkiye, 11-14 Ekim 2018

Gıda kaynaklı laktik asit bakterisinin obeziteye karşı potansiyel etkisinin *in vitro* koşullarda belirlenmesi. **5. Ulusal Bağırsak Mikrobiyotası ve Probiyotik Kongresi**, Antalya, Türkiye, 11-14 Ekim 2018