

**LAKTİK ASİT BAKTERİ
FİLTRATLARININ OBEZİTE VE
KOLESTEROL ÜZERİNE ETKİLERİNİN *İN*
VİTRO YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI**

Yüksek Lisans Tezi

Burçin GÜLER

Eskişehir 2019

**LAKTİK ASİT BAKTERİ FİLTRATLARININ OBEZİTE VE KOLESTEROL
ÜZERİNE ETKİLERİNİN *İN VİTRO* YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI**

Burçin GÜLER

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ayşe Tansu KOPARAL

(İkinci Danışman: Prof. Dr. Merih KIVANÇ)

Eskişehir

Anadolu Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Ağustos 2019

Bu tez çalışması BAP Komisyonu tarafından kabul edilen 1704F106 No'lu proje ve TÜBİTAK 2210-C Yüksek Lisans Öncelikli Alanlar Bursu kapsamında desteklenmiştir.

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Burçin GÜLER'in "Laktik Asit Bakteri Filtratlarının Obezite ve Kolesterol Üzerine Etkilerinin *in vitro* Yöntemlerle Araştırılması" başlıklı tezi 26/08/2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek "Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca, Biyoloji Anabilim dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

Unvanı Adı Soyadı

İmza

Üye (Tez Danışmanı)

: Prof. Dr. Ayşe Tansu KOPARAL

Üye

: Doç. Dr. Mustafa UYANOĞLU

Üye

: Doç. Dr. Emel ERGENE

Prof. Dr. Murat TANIŞLI

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ÖZET

LAKTİK ASİT BAKTERİ FİLTRATLARININ OBEZİTE VE KOLESTEROL ÜZERİNE ETKİLERİNİN *İN VİTRO* YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI

Burçin GÜLER

Biyoloji Anabilim Dalı

Genel Biyoloji Bilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ağustos 2019

Danışman: Prof. Dr. Ayşe Tansu KOPARAL

(İkinci Danışman: Prof. Dr. Merih KIVANÇ)

Obezite, aşırı miktarda yağ kitlesine neden olan enerji alımıyla enerji harcamaları arasındaki dengesizlikten kaynaklanan bir hastalık olup, yüksek kolesterol, koroner kalp hastalığı, hipertansiyon, tip 2 diyabet, kanser, solunum komplikasyonları ve osteoartrit gibi çeşitli hastalıklarla ilişkili bir risk faktörüdür. Kolesterol ise, hayvansal kaynaklı besinlerle alınan, kanda ve safra kesesinde bulunan sterol bir bileşiktir. Vücut dokuları için önemli bir yapı taşı olsa da kanda kolesterol miktarının yükselmesi, koroner kalp hastalıkları için önemli bir risk faktörüdür. Son zamanlarda antidiyabetik, antipatojenik, antikanser, serumdaki kolesterol düzeylerinin düşürülmesi ve bağışıklık sisteminin uyarımını içeren sağlığa yararlı etkileri nedeniyle laktik asit bakterilerine (LAB), özellikle laktobasillere ilgi artmıştır. Bu bilgiler ışığında, seçilen laktik asit bakterilerinin adipojenez ve obezite ile üzerine etkilerini araştırmak için 3T3-L1 (preadiposit) hücreleri kullanılmıştır. Bu amaçla bakterilerin canlandırılması, saflıklarının kontrol edilmesi ve stoklanması, bakterilerin kolesterol gideriminin test edilmesi ve filtratların elde edilmesi, bakterilerin Gamma Aminobütirik Asit üretiminin belirlenmesi, 3T3-L1 hücrelerinin yetiştirilmesi ve farklılaştırılması, hücre kültürü yöntemi ile *in vitro* sitotoksik etki belirlenmesi, Oil-Red-O boyamayı içeren deneysel aşamalar takip edilmiştir. Sonuç olarak, seçilen bakterilerin kolesterol giderici ve 3T3-L1 hücre hattında adipojenez baskılayıcı etkileri belirlenmiştir.

Anahtar Sözcükler: 3T3-L1, Laktik Asit Bakterileri, Anti-Obezite, Anti-Kolesterol, GABA

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF LACTIC ACID BACTERIAL FILTRATES ON OBESITY AND CHOLESTEROL BY *IN VITRO* METHODS

Burçin GÜLER

Department of Biology

Programme in General Biology

Anadolu University, Graduate School of Sciences, August 2019

Supervisor: Prof. Dr. Ayşe Tansu KOPARAL

(Co-Supervisor: Prof. Dr. Merih KIVANÇ)

Obesity is a disease caused by an imbalance between energy intake and energy expenditure, which leads to excessive amounts of fat and it is also a risk factor associated with the emergence of various diseases such as coronary heart disease, hypertension, type 2 diabetes, cancer, respiratory complications, and osteoarthritis. Cholesterol is a sterol compound that is taken with animal-derived nutrients and is found in the stomach and bile ducts. Although it is an essential element for body tissues, elevated cholesterol levels are an important risk factor for coronary heart disease. Recently there has been increased interest in LAB's, especially for lactobacilli, due to antidiabetic, anti-pathogenic, anti-cancer effects, as well as lowering of serum cholesterol levels and stimulation of the immune system. Based on the information, 3T3-L1 (preadipocyte) cells used for investigating the effects of selected lactic acid bacteria to adipogenesis and obesity. For this purpose, experimental steps followed are bacterial population growth, control of purity and storage, testing of cholesterol removal of bacteria and filtrates, determination of Gamma-Aminobutyric Acid production of bacteria, cultivation and differentiation of 3T3-L1 cells, in vitro cytotoxic action determination studies (MTT Measurement), Oil-Red-O dyeing (Microscopic Detection by Oil Cells staining). As a result, cholesterol-lowering and adipogenesis repressing effects of selected bacteria on 3T3-L1 cell line were determined.

Keywords: 3T3-L1, Lactic Acid Bacteria, Anti-Obesity, Anti-Cholesterol, GABA

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, her türlü imkânı sunan danışman hocam Prof. Dr. A. Tansu KOPARAL'a,

Yüksek Lisans eğitimime başladığım günden itibaren, her türlü bilgi birikimini benimle paylaşan, motivasyonumu her zaman yüksek tutmamı sağlayan, bana mikrobiyolojiyi çok sevdiren danışman hocam Prof. Dr. Merih KIVANÇ'a,

Tezim süresince 2210-C Öncelikli Alanlar Yurt İçi Yüksek Lisans Burs programı kapsamında destek sağlayan TÜBİTAK Eğitim Bursları Müdürlüğü'ne,

Laboratuvar çalışmalarında bilgi ve tecrübeleriyle desteklerini esirgemeyen sevgili arkadaşlarım Serkan DERELİ, Reyhan VAROL, Gizem ARIK, Burcugül ALTUĞ TASA, Banu BARUTÇA ve Sinem DABAĞOĞLU'na,

İdeallerimi gerçekleştirmem için maddi manevi hep yanımda olan Şenay YALÇINBAYIR, Alper YALÇINBAYIR ve Murat DİKİNCİ'ye,

Her zaman arkamda duran, desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen canım annem, babam ve kardeşime sonsuz teşekkür ediyorum. Tezimi hayattaki en büyük destekçim olan annem Figen GÜLER'e armağan ediyorum.

Burçin GÜLER

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

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

Burçin GÜLER

İÇİNDEKİLER

Sayfa

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI.....	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR	vi
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ.....	vii
İÇİNDEKİLER.....	viii
TABLolar/ÇİZELGELER DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Obezite	3
1.2. Obezite Prevalansı	4
1.3. Obeziteye Sebep Olan Etmenler.....	5
1.4. Laktik Asit Bakterilerinin Özellikleri.....	6
1.5. Laktik Asit Bakterilerinin Etkileri	9
1.6. Probiyotik Mikroorganizmaların Özellikleri.....	10
1.7. Gama-Aminobütirik Asit (GABA).....	11
1.8. GABA'nın Obezite ile İlişkisi	12
1.9. Kolesterol.....	13
1.10. Laktik Asit Bakterilerinin Kolesterol Üzerine Etkileri.....	14
1.11. 3T3-L1 Hücre Hattı	15
1.12. Adiposit.....	15
1.13. Adipojenez ve 3T3-L1 Hücre Hattı	16
2. MATERYAL-YÖNTEM.....	17
2.1. Bakteri Kültürleri.....	17
2.2. Hücre Hattı.....	17
2.3. Besi Ortamları ve Kimyasallar.....	17
2.4. Mikrobiyoloji Deneylerinde Kullanılan Kimyasallar	19
2.5. Hücre Kültürü Çalışmalarında Kullanılan Kimyasallar ve Besiyerleri.....	19

2.6. Bakterilerin Canlandırılması.....	20
2.7. Gram Boyama	21
2.8. Bakterilerin Moleküler Tanılanması	21
2.9. Bakterilerin GABA Üretim Kapasitelerinin İnce Tabaka Kromatografisi Yöntemi Kullanılarak Belirlenmesi.....	22
2.10. Kolesterol Giderimi Testi.....	22
2.11. Bakteri Filtratlarının Liyofilize Edilmesi.....	23
2.12. Bakteri Filtratları İçerisindeki GABA Varlığının LC-MS/MS Yöntemiyle Belirlenmesi	24
2.13. Hücrelerin Pasajlanması.....	25
2.14. Hücrelerin Stoklanması	25
2.15. Hücrelerin Stoktan Çıkarılması	26
2.16. 3T3-L1 Hücrelerinin MTT Testi için Hazırlanması.....	26
2.17. Hücre Kültürü Yöntemi ile <i>İn-Vitro</i> Sitotoksik Etki Belirlenmesi (MTT Ölçümü).....	26
2.18. Oil-Red-O Boyama (Yağ Hücrelerinin Boyanması ile Mikroskopik Olarak Saptanması).....	27
3. BULGULAR.....	28
3.1. Anne Sütünden Elde Edilen Bakteri İzolatlarının Analizleri.....	28
3.2. Kefirden Elde Edilen Bakteri İzolatların Analizleri	28
3.3. Bakterilerin Moleküler Tanılama Bulguları.....	29
3.4. Bakteri Filtratlarının GABA Üretim Kapasitelerinin İnce Tabaka Kromatografisiyle Analizi Bulguları	30
3.5. LC-MS/MS Yöntemiyle GABA Miktarının Belirlenmesi.....	31
3.6. MTT Sitotoksikite Testi Bulguları.....	34
3.7. İzolatların Kolesterol Giderim Testi Bulguları.....	38
3.8. Oil Red O Boyama Bulguları.....	38
4. TARTIŞMA.....	43
5. SONUÇ	48
KAYNAKÇA.....	49
EKLER	
ÖZGEÇMİŞ	

TABLolar/ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Tablo 1.1. Vücut Kitle İndeksi (BMI) sınıflandırma tablosu	4
Tablo 2.1. MRS Agar (Merck) besiyeri içeriği	17
Tablo 2.2. MRS Broth (Merck) besiyeri içeriği	18
Tablo 2.3. M17 Agar (Merck) besiyeri içeriği	18
Tablo 2.4. M17 Broth besiyeri içeriği	19
Tablo 2.5. Fosfat Buffer Saline (PBS) içeriği	20
Tablo 2.6. Fosfat Buffer Saline-EDTA (PBS-EDTA) içeriği	20
Tablo 2.7. GABA için MRM koşulları	25
Tablo 3.1. Anne sütünden elde edilen izolatların gram boyanma ve morfolojik özellikleri	28
Tablo 3.2. Kefirden elde edilen izolatların gram boyanma ve morfolojik özellikleri..	28
Tablo 3.3. Süpernatant (hücre dışı) örneklerde en fazla GABA içeren filtratlar ve GABA derişim miktarları	33
Tablo 3.4. KM2-7 Filtratının 3T3-L1 hücrelerinde konsantrasyona bağlı yüzde canlılık değişim etkisi	36
Tablo 3.5. KM3-14 filtratının 3T3-L1 hücrelerinde konsantrasyona bağlı yüzde canlılık değişim etkisi	37

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 1.1. Bazı laktik asit bakteri üyeleri ve morfolojileri.....	6
Şekil 1.2. Laktik asit bakterilerinin biyoteknolojik kullanım alanları.....	8
Şekil 1.3. GABA sentez reaksiyonu	11
Şekil 3.1. KM3-14 (A) KM2-7 (B) izolatlarının ışık mikroskobu görüntüsü	29
Şekil 3.2. TLC Analiz Görüntüsü	31
Şekil 3.3. GABA standart çözeltisinin MRM + Mod için kütle spektrumu	31
Şekil 3.4. GABA derişim kalibrasyon grafiğı	32
Şekil 3.5. KM2-7 ve KM3-14 filtratlarındaki GABA'ya ait MS spektrum pikleri	34
Şekil 3.6. KM2-7 filtratının 3T3-L1 hücre hattı üzerine MTT sitotoksisite testi.	35
Şekil 3.7. KM3-14 filtratının 3T3-L1 hücre hattı üzerine MTT sitotoksisite testi.	37
Şekil 3.8. İzolatların yüzde kolesterol giderim ölçümü.....	38
Şekil 3.9. KM2-7 6.gün Oil Red O boyama inverted mikroskop görüntüleri	40
Şekil 3.10. KM2-7 8.gün Oil Red O boyama inverted mikroskop görüntüleri	41
Şekil 3.11. KM3-14 6. ve 8.gün Oil Red O boyama inverted mikroskop görüntüleri ...	42

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

LAB	:Laktik Asit Bakterileri
TLC	:İnce Tabaka Kromatografisi (Thin Layer Chromatography)
MS	:Kütle Spektroskopisi (Mass Spectrophotometry)
DMEM	:Dulbecco's modified Eagle's Medium
DMSO	:Dimetil Sülfoksit
FBS	:Fetal Sığır Serum
GABA	:Gama Aminobutirik asit
IBMX	:3-isobutil-1-Metil-ksantin
K ₂ HPO ₄	:Potasyum Fosfat Dibazik
KH ₂ PO ₄	:Potasyum Fosfat Monobazik
MTT	:3-(4,-dimetil-thiazol-2-il)-2,-dipfenil-tetrazoliumbromid
PBS	:Fosfat Buffer Saline
PBS EDTA	:Fosfat Buffer Saline EDTA
BMI	:Vücut Kitle İndeksi (Body Mass Index)

1. GİRİŞ

İnsan vücudu ve bakteriler arasındaki ilişki, patojeniteden simbiyotik alışverişe uzanan uzun bir geçmişe sahiptir. Bu süreçte, fırsatçı patojen türler insan vücudunda kolonize olmaya çalışarak hastalık etmeni haline gelmişlerdir ve halen günümüzde çoğu hastalığın oluşmasında etkilidirler. Öte yandan, bu tek taraflı ve faydacı ilişkiye karşılık zaman içerisinde alternatif olarak bazı bakteri türleriyle insan vücudunun simbiyotik bir ilişki sağladıkları anlaşılmıştır (Eloe-Fadrosch ve Rasko, 2013). İnsan mikrobiyom çalışmalarına göre insan vücudu içerisinde yaklaşık 10-100 trilyon kadar simbiyotik mikrobiyal türlerin bulunduğu ve türlerin çoğunluğunun gastro-intestinal sistem içerisinde oldukları bilinmektedir (Ursell vd., 2012). Mikrobiyolojik tiplendirme çalışmalarından elde edilen verilere göre bu organizmaların büyük bir kısmının *Lactobacillus* genusuna ait oldukları (özellikle *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus* üyeleri) literatürde bildirilmiş olup aynı zamanda bu türlere “probiyotik” tanımı getirilmiştir (Fijan, 2014).

İnsan vücudunda habitant ve çoğu *Lactobacillus* genusuna üye probiyotik türlerin vücuttaki normal biyolojik aktiviteleri sırasında, diğer bakterilerin oluşturduğu enfeksiyonları baskılama, bazı nadir vitaminlerin (K ve B12) üretiminde rol alma (Gu ve Li, 2016), laktoz intoleransını azaltma, immün sistemi destekleme, antifungal etki ve kolon kanserini önleme gibi insan biyolojisine yararlı etkilerinin olduğu ortaya çıkarılmıştır (Patel ve Goyal, 2012). Çoğunlukla gastro-intestinal sistemde yer aldıkları için besin emilimi ve beslenme üzerine de etkileri bilinmekte olup bu sebeple günümüzde obezite ve insan sağlığına yönelik etkileri sıklıkla araştırılmaktadır.

Obezite günümüzde insan popülasyonunun büyük bir kısmını etkileyen ve kalori fazlalığına bağlı olarak insan vücudundaki yağ birikimi şeklinde ortaya çıkan kronik bir sendrom olarak ifade edilmektedir (Hruby ve Hu, 2015). Obezitenin oluşum nedenlerini açıklayabilmek için öne sürülen mekanizmalardan biri adipoz dokuda yağ hücrelerinin (adipositler) adipojenez yolu ile birikmesinden dolayı dokuda lipid birikiminin artış göstermesi olarak ifade edilmiştir (Ghaben ve Scherer, 2019). Adipojeniz yoluyla adiposit oluşumunun ve bu mekanizmanın laktik asit bakterileriyle olan ilişkisini anlayabilmek için embriyonik hücre hattı olan 3T3-L1 konuyla ilgili çalışmalarda sıklıkla kullanılmakta olup bu tez çalışmasında da bu hücre hattı temel olarak tercih edilmiştir.

Literatürde yapılan çalışmalara göre, bağırsak florasının bireyler arasında farklılık gösterdiği görülmüş, obezite hastası bireylerde bağırsak florasındaki mikrobiyom

yoğunluğunun daha az olduğu, bu durumun sindirim ve besin parçalanması yoluyla kalori alınımında bireyler arası fark meydana getirdiği bildirilmiştir (Gao vd., 2018). Ayrıca, bu türlerin metabolik aktivitesi sırasında besin maddelerinin fermentasyonu sağlanarak kısa-zincirli yağ asitlerinin meydana getirildiği bilinmektedir (Hove, Nordgaard-Andersen, ve Mortensen, 1994). Diğer yandan, laktik asit bakterilerinin temel besin maddelerinden biri olan şekeri intestinal sistemde modifiye ederek GABA (Gamma Aminobutirik asit) üretimi gerçekleştirdiği ve bu molekölü intestinal sisteme salgıladığı belirlenmiş ve bu sayede bu bakterilerin ürettiği metabolitlerin vücuda direkt metabolik etkilerinin olduğu anlaşılmıştır (Dhakal, Bajpai ve Baek, 2012).

Literatürdeki GABA üreten laktik asit bakterileri üzerinde yapılan diğer çalışmalarda, bu bakterilerin kolesterol azaltıcı etkilerinin olduğu görülmüştür (Albano vd., 2018; Lim, Kim, ve Lee, 2004; Ma vd., 2019; Shinobu, Takuya, ve Kenji, 2012). Özellikle sindirim sistemindeki laktik asit bakterilerinin metabolizmada kolesterol düzenleyici mekanizmalara katıldığı bilinmektedir. Laktik asit bakterileri ve diğer probiyotik bakterilerin *in vitro* ve *in vivo* ortamlarda kolesterol giderici etkisi üzerine yapılan çalışmalar, bu etkinin üç farklı mekanizma üzerinden gerçekleştiğini işaret etmektedir. Bu mekanizmalardan ilki, sindirim sistemindeki kolesterolün probiyotik bakteriler tarafından doğrudan parçalanmasıdır. Diğer bir mekanizma ise, sindirim sistemiyle ilişkili NPC1L1 protein düzeylerinin baskılanması yoluyla ince bağırsak kolesterol emiliminin azaltılmasıdır. Öne sürülen üçüncü mekanizma ise probiyotik hücrelerinin safra tuzu hidrolaz enzimleri (BSH) üzerinden katalizlenen safra tuzu dekonjugasyonu sonucu fekal safra asitleri salgılanma seviyelerinin arttırılmasıdır (Ma vd., 2019). Belirtilen her üç mekanizma için etki düzeyi, probiyotik bakterilerin türlerine ve ortam şartlarına göre farklılık göstermektedir.

Tüm bu mevcut çalışmalar ve literatür bilgisi göz önüne alındığında, GABA üreten laktik asit bakterilerinin obezite ve kolesterol seviyeleri üzerine etkilerinin detaylı olarak araştırılması biyoteknoloji ve sağlık açısından günümüzde önem kazanmaktadır. Bu noktada, bu çalışmanın amacı, seçilen laktik asit bakteri filtratlarının olası anti-kolesterol ve anti-obezite etkilerinin ortaya konulması olarak belirlenmiştir. Bu amaç kapsamında, embriyonik hücre olan 3T3-L1 hücreleri ile hücre kültürü çalışmaları gerçekleştirilerek seçilen bakteri filtratlarının adipojeniz üzerine olan etkisi ve bunların kolesterol giderimi üzerine etkileri incelenerek obezite ve kolesterol düzenleyici etkiler açısından anlamlı aktivite ve suş/suşların elde edilmesi hedeflenmiştir.

1.1. Obezite

Obezite, aşırı miktarda yağ kitlesine neden olan enerji alımıyla enerji harcamaları arasında enerji alımı lehine meydana gelen dengesizlikten kaynaklanır. Bu dengesizlik sonucu oluşan enerji fazlalığı yoluyla vücutta beyaz yağ dokusunda aşırı yağ birikimi ile karakterizedir (Ng vd., 2014). Obezite, tip 2 diyabet, kolesterol, hipertansiyon, kardiyovasküler hastalıklar, karaciğer hastalığı, kronik böbrek hastalığı, uyku apnesi ve hipoventilasyon sendromu, duygu durum bozuklukları ve fiziksel sakatlıklar gibi kronik hastalıkların ortaya çıkması veya gelişimi ile ilişkili bir risk faktörü olduğu düşünülürse, tıpta önemli bir konudur (Schetz vd., 2019). Dünya Sağlık Örgütü (WHO)'nın 2000 yılında yayımladığı “Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation” adlı bildiri ile obezite dünya genelinde resmi ve salgın bir sağlık problemi olarak kabul edilmiştir.

WHO'ya göre bireylerin aşırı kilolu veya obez olarak tanımlanabilmesi için sayısal bir tanımlama sistemi kullanılmaktadır. Vücut Kitle indeksi (BMI) olarak adlandırılan bu sistemde kişilerin ağırlık (kg) ve boyunun metre cinsinden karesi (m^2) birbirlerine oranlanarak sayısal değer elde edilmektedir. Buna göre, BMI değeri 25'ten büyük veya eşit bireyler aşırı kilolu, 30 veya daha büyük olan bireyler ise obez olarak tanımlanmaktadır. Bu tanımlamaların ve risk gruplarının bireyler arasında daha tutarlı sınıflandırmaya imkan verebilmesi için BMI sınıflandırma tablosu da tanımlanmıştır (Tablo 1.1) (James, 2004).

Vücut kitle indeksi değerleri ve risk düzeyi tablosu yetişkin bireyler için kabul edilmekte olup çocuklarda bu değerler değişkenlik göstermektedir. Buna göre, 5 yaş altı için Dünya Sağlık Örgütü çocuk gelişim standartları ortalamasından 2 standart sapma gösteren çocuklar aşırı kilolu, 3 standart sapma gösterenler obez olarak ifade edilmektedir. 5-19 yaşlar içinse bu sapma değerleri 1 ve 2 olarak kabul edilmektedir (WHO Multicentre Growth Reference Study Group, 2006).

Obezite düzeyinin belirlenmesi için klinik olarak hesaplanan BMI değerleri değerlendirilirken, BMI değerleri sabit kalmakla birlikte yetişkin bireylerinin boy uzunluğu ve cinsiyeti göz önüne alınarak risk düzeyleri tanımlaması yapılmaktadır. Ayrıca, farklı insan topluluklarında popülasyon yapısı, ırk ve yaş gibi faktörlerin BMI'nin değerlendirilmesinde göz önüne alınmalıdır. Yapılan değerlendirmeler, yüksek BMI'nin varlığında yaygın görülen koroner kalp hastalıkları, diyabet, yüksek tansiyon gibi

rahatsızlıkların bireylerin ölüm riskini arttırdığını da göstermektedir (Haslam ve James, 2005).

Tablo 1.1. *Vücut Kitle İndeksi (BMI) sınıflandırma tablosu (Haslam ve James, 2005)*

Sınıflandırma	BMI (kg/m ²)	Obezite Düzeyi	Erkek: 102 cm veya daha kısa Kadın: 88 cm veya daha kısa	Erkek > 102cm Kadın > 88 cm
Düşük Kilolu	< 18.5			
Normal Kilolu	18.5 - 24.9			
Fazla Kilolu	25.0 - 29.9		Artmış	Yüksek
Obez	30.0 - 34.9	I	Yüksek	Çok Yüksek
Obez	35.0 - 39.9	II	Çok Yüksek	Çok Yüksek
Aşırı Obez	40.0 +	III	Aşırı Yüksek	Aşırı Yüksek

1.2. Obezite Prevalansı

Dünya Sağlık Örgütü'ne göre, obezite 1980'den bu yana dünya çapında neredeyse iki katına çıkmıştır. 20 yaş ve üstü 1,4 milyardan fazla yetişkin aşırı kilolu olarak tanımlanmakta bunların arasında 200 milyondan fazla erkek ve yaklaşık 300 milyon kadının obez olduğu bilinmektedir. Çocuklukta obezite ve genel olarak fazla kilolu olma, önceki on yılda %80 oranında artmış ve 5 yaşın altındaki 40 milyondan fazla çocuk 2011'de aşırı kilolu olarak belirlenmiştir (Tsai, Cheng ve Pan, 2014). Aşırı kilolu veya obez olmanın bir sonucu olarak yaklaşık 2,8 milyon ölüm rapor edilmektedir. Obezite bu durumuyla hem gelişmekte olan hem de gelişmiş ülkelerde önemli bir halk sağlığı sorunu haline gelmiştir (Ahirwar ve Mondal, 2019). 1975'ten bu yana şişmanlık prevalansı ise dünya çapında üç katına çıkmıştır ve artmaya devam etmektedir. Halen tüm yaş gruplarını, popülasyonları ve tüm gelir seviyesindeki ülkeleri etkileyen en büyük sağlık sorunlarından biridir (Sakr vd., 2015).

ABD'de 2001-2002'de 6-19 yaşları arasındaki çocuklar ve ergenler arasında yapılan bir araştırma, %31,5'inin aşırı kilolu olma riski olduğunu veya aşırı kilolu olduğunu ve %16,5'inin obez olduğunu göstermiştir (Tsai, Cheng ve Pan, 2014). İngiltere'de yapılan bir başka çalışma, 7-11 yaş arası erkekler arasında aşırı kilo ve obezite

prevalansının %17 olduğunu ve aynı yaş grubundaki kızlarda, prevalansın %23,6 olduğunu göstermiştir (Ahirwar ve Mondal, 2019). Birleşik Arap Emirlikleri'nde 5-17 yaş grubundaki prevalans kilolu tanımlananlar için %21,5 ve obez tanımlılar için %13,7 olarak belirtilmiştir (Sakr vd., 2015). Suudi Arabistan'da 6-18 yaş arasındaki erkek çocuklarda yapılan diğer bir çalışma ise %11.7'sinin aşırı kilolu ve %15.8'inin obez olduğunu göstermiştir (Alasmari vd., 2017). Türkiye'de yapılan çalışmalar, 2010 yılında aşırı kilolu ve obez bireylerin toplumda görülme oranının 1990 yılındaki verilere göre 2 kat artış gösterdiğini işaret etmektedir (Erem, 2015). Bu durum, obezite ve aşırı kilolu bireylerin sayısının artış trendinde olduğunu ve konuyla ilgili yapılacak çalışmaların gerekliliğini göstermektedir.

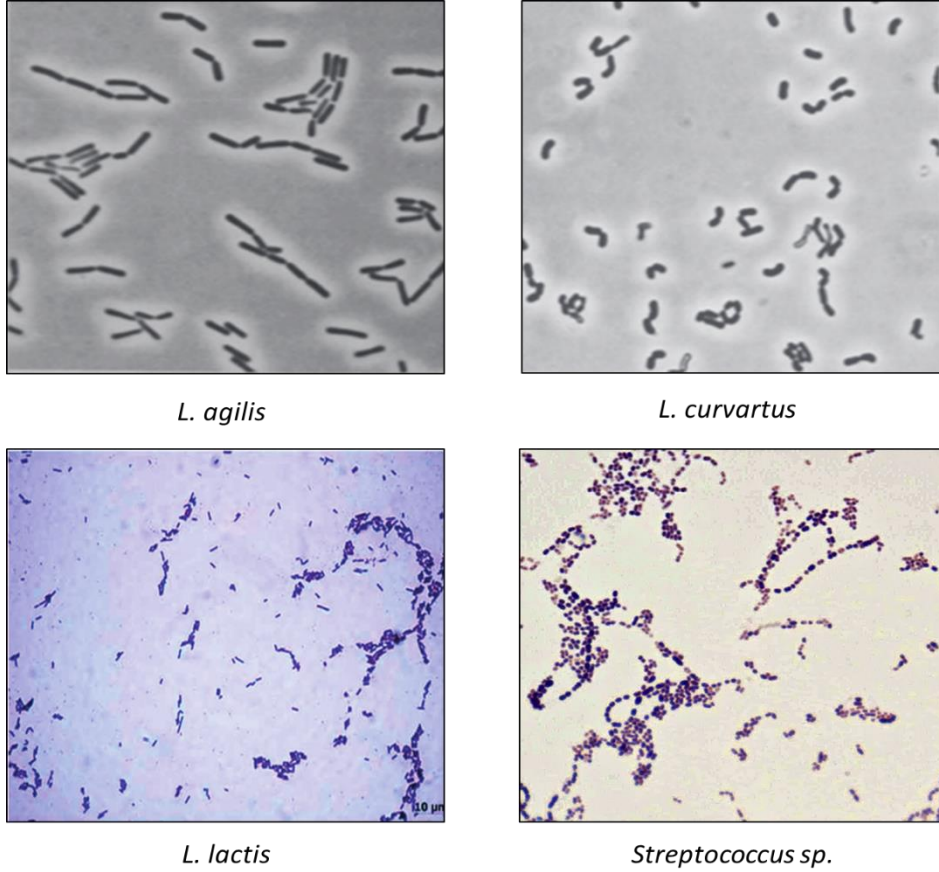
1.3. Obeziteye Sebep Olan Etmenler

Obezite, genetik, metabolik, davranışsal ve kültürel faktörlerden kaynaklanır. Obezite artık tek bir hastalık olarak kabul edilmemektedir, aksine metabolik sendrom da dahil olmak üzere birçok hastalıkla ilişkili bir durumdur. Yapılan çalışmalar şişmanlığın tek başına metabolik hastalık, genetik bozukluk veya mutasyon, yeme alışkanlıklarındaki değişiklikler, egzersiz eksikliği veya diğer faktörlerden kaynaklanmadığını göstermektedir. Buna karşılık, bu faktörlerin yol açtığı çeşitli fizyolojik değişiklikler obezitenin gelişmesine sebep olmaktadır (Kahn, Hull ve Utzschneider, 2006).

WHO'ya göre obeziteye neden olan dokuz ana etmen; fiziksel aktivitesizlik, aşırı beslenme, genetik yatkınlık, basit karbonhidrata dayalı beslenme, yeme sıklığı, ilaç kullanımı, psikolojik durum, diğer hastalıklar ve sosyal etmenler olarak gruplanmıştır. Biyolojik faktörlerin içerisinde metabolizma kaynaklı durumlar, hormon bozuklukları veya eksiklikleri ve genetik yatkınlıklar obezitenin engellenmesi için deneysel araştırma alanlarıdır. Özellikle enerji dengesizliğinin kontrol altına alınması ve yağ birikiminin azaltılması, obezite düzeylerini baskılama açısından oldukça önemlidir. Yapılan çalışmalar, bireylerin vücut metabolizmasındaki anormallikleri yanı sıra, vücut mikrobiyotasındaki bozulma ve tür çeşitliliğindeki azalma durumlarının obezitenin görülmesini ivmelendirdiği anlaşılmıştır. Bu nedenle insan mikrobiyomundaki değişimler de belirtilen metabolizma kaynaklı etmenler içerisinde değerlendirilmektedir. (Pothuraju ve Sharma, 2018).

1.4. Laktik Asit Bakterilerinin Özellikleri

Laktik asit bakterileri (LAB), insanlar tarafından uzun yıllardır gıda üretimi ve korunmasında ve insan sağlığını geliştirmek için probiyotik ajanlar olarak kullanılmaktadır. Yaşama alanları gıdalardan toprağa, bitkilere, su ortamına ve hayvanların bağırsak sistemine kadar çeşitli ekolojik nişlerde dağılım gösterir. Laktik asit bakterileri geniş dağılım gösterdikleri için farklı enerji kaynakları içeren ortamlarda yaşayabilen bakterilerdir. Bu bakteri grubu genus olarak *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus* ve *Streptococcus* gibi farklı cinslerden mikroorganizmaları içermekte olup en çok bilinen ve yaygın üyeleri *Lactobacillus* genusu içerisinde yer almaktadır (Şekil 1.1).



Şekil 1.1. Bazı laktik asit bakteri üyeleri ve morfolojileri (Bakour vd., 2016; Hammes ve Hertel, 2015; Quilodrán-Vega vd., 2016)

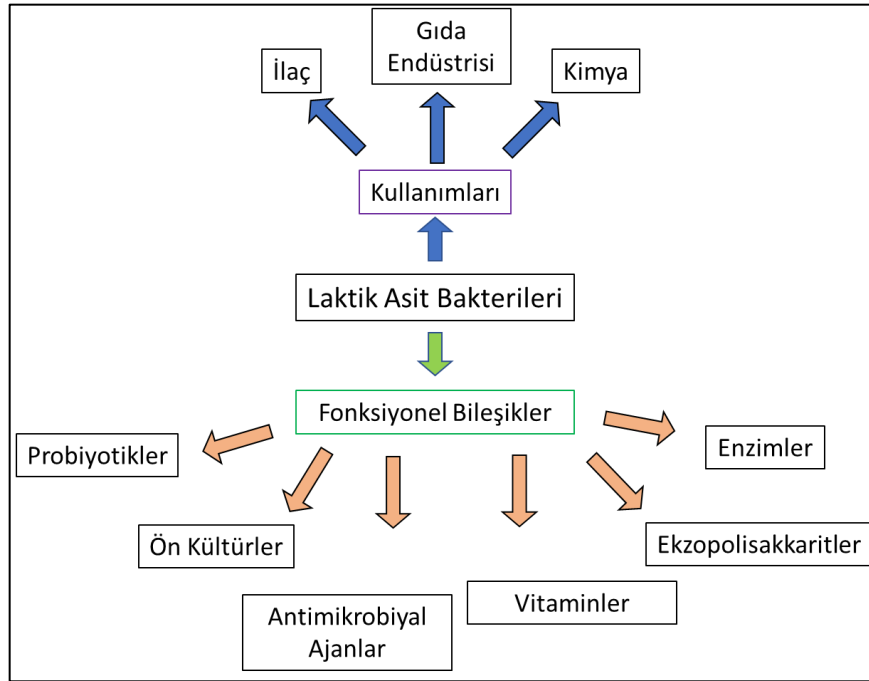
Laktik asit bakterileri insanlarda normal mikrobiyal floranın üyeleri olarak genellikle sindirim ve üreme sistemlerindeki diğer başka mikrobiyal türlerle birlikte habite olurlar. Genellikle gram pozitif özellik gösteren bu türler yaygın olarak spor oluşturmayıp aero tolerant olarak sınıflandırılırlar ve solunum zincirinde katalaz enzimi bulundurmazlar. İki ana gruba ayrılan bu bakterilerin homofermentatif kolu karbonhidratları laktik asite parçalarken, heterofermantatif koldaki üyeler laktik asit yanında etanol ve asetik asit gibi bileşikler meydana getirirler (Florou-Paneri, Christaki ve Bonos, 2013).

Homofermantatif laktik asit bakterilerinin gerçekleştirdiği homolaktik fermentasyonda Glikoliz Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) yolğını takip etmektedir. Böylece bu grup, ana ürün olarak laktik asit molekülünün hem D (-) hem de L (+) formunu meydana getirmektedir. Homofermantatif üyeler yoğurt ve peynir gibi ürünlerin üretiminde kullanılan *Lactobacillus delbruckii* ve *Streptococcus salivarius* gibi üyeler içermektedir. Heterofermantatif üyeler ise, laktik asit molekülünün yanında glikozun fermentasyonu sonucu ikincil bileşikler ve karbondioksit meydana getirirler. Üreme durumlarına bağlı olarak ortamda çok fazla karbondioksit birikmesine neden olabilirler. Bu grupta bilinen bazı üyeler *Lactobacillus brevis*, *L. fermentum* ve *L. reuteri* olarak sıralanabilmektedir. Bu türleri sadece belli şartlarda ve belli maddelerin ortamda bulunmasına bağlı olarak karbondioksit ve diğer ikincil ürünleri meydana getirebildiklerinden dolayı fakültatif heterofermantatif olarak tanımlanmıştır (Gänzle, 2015). ABD Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından genellikle güvenli organizmalar olarak bilinen bu Gram-pozitif bakterilerin bazı türlerinin bağırsaklara ulaşp kolonileşme yetenekleri sayesinde gastrointestinal sistemde hayatta kalabildikleri bilinmektedir (Cano-Garrido, Seras-Franzoso, ve Garcia-Fruitós, 2015).

Laktik asit bakterilerinin normal metabolik aktivitelerinin sağladığı avantajlarından dolayı biyoteknolojik olarak bazı ürünlerin üretilmesi süreçlerinde kullanımları yaygındır. Bu ürünler prebiyotikler, enzimler, vitaminler, antimikrobiyal ajanlar gibi farklı gruplarda sınıflandırılmaktadır (Şekil 1.2) (Florou-Paneri, Christaki ve Bonos, 2013). Günümüzde laktik asit bakteri gıda endüstrisinde fermente ürünlerin üretimi açısından yaygın olarak kullanılmakta olup özellikle yoğurt, kefir, peynir tereyağı gibi ürünlerin üretimine imkân verirler. Bununla birlikte laktik asit bakterilerinin güçlü bakteriyosinler üretme özelliğinden dolayı bu organizmalardan elde edilen

bakteriyosinler gıda endüstrisinde koruyucu olarak kullanılmaktadır (De Vuyst ve Leroy, 2007).

Bununla birlikte, intestinal sistemdeki bazı laktik asit bakterilerinin Folat, B12, K ve Riboflavin gibi insan metabolizması tarafından doğrudan üretilmeyen vitaminleri sentezleyebildikleri görülmüştür. Laktik asit bakterilerinden elde edilen ve uzun zincirli polisakkarit moleküllerce zengin EPS (Ekzopolisakkarit) maddesi de mikrofloradaki diğer organizmalar tarafından kullanılarak kısa zincirli yağ asitlerine dönüştürülür ve böylece yağ asitleri insanda metabolik olarak kullanılmaktadır (Florou-Paneri, Christaki ve Bonos, 2013).



Şekil 1.2. Laktik asit bakterilerinin biyoteknolojik kullanım alanları (Florou-Paneri, Christaki ve Bonos, 2013)

Laktik asit bakterileri yaşam ortamlarındaki çevresel faktörlere oldukça duyarlı organizmalardır. Özellikle asitlik, oksijen ve sıcaklık gibi değişkenlerden oldukça etkilenirler. Bu yüzden laktik asit bakterileri canlı sistemlerde tutunabilmeleri için bazı adaptasyonlar geliştirmişlerdir. Sindirim sistemi epitel dokularına tutunabilme özelliği ile dokuya yerleşen bu bakteriler, kolonizasyon yeteneği ile bu ortamda stabilize olurlar ve

var olan diğ er zararlı bakteriler ile rekabet ederler. Bu sayede canlı sistemlerdeki mikrobiyotanın dengede kalmasını ve kendilerinin de bu ortamda stabilizasyonunu sağlarlar (S  ez-Lara vd., 2016).

1.5. Laktik Asit Bakterilerinin Etkileri

Canlı sistemlerdeki antidiyabetik, antipatojenik, antikojenik, antikanser, gastrointestinal sistemdeki bulaşıcı hastalığ a karşı doğıal direnci arttırma, sindirim düzeyinin geliştirilmesi, serumdaki kolesterol düzeylerinin düşürülmesi ve bağışıklık sisteminin uyarımını içeren sağılğıa yararlı etkileri nedeniyle laktik asit bakterileri ve özellikle laktobasiller popüler araştırm  alanı haline gelmişt r (Lebeer, Vanderleyden ve De Keersmaecker, 2008; Lievin-Le Moal ve Servin, 2014; Wang vd., 2018; Yun, Park, ve Kang, 2009). Laktobasiller canlı sistemlere bilinen faydalı etkilerinden dolayı probiyotik mikroorganizmalar olarak da tanımlanmaktadır. Bu grup bakterilerin bulundukları canlı sistemlerde farklı kategorilerde olumlu etkileri bildirilmişt r.

 nsanda genel olarak habite oldukları gastrointestinal sistemde laktoz intoleransını baskıladıkları, viral ve il   kaynaklı ishali engelledikleri ve kandaki insülin düzeylerinin ayarlanmasını destekledikleri görülmüştür. Yine, insanlarda ülser hastalığının semptomlarının azaltılması ve tedavisinde etkili oldukları bildirilmişt r. Canlı sistemlerde bağışıklık sisteminin desteklenmesini sağıladıkları ve fırsatçı patojen organizmaların gelişimini ve popülasyon büyüklüklerini kontrol altında tuttıkları g sterilmişt r. Son yıllarda, artan antibiyotik direncinden dolayı mikrobiyal kaynaklı hastalıkların kontrol altına alınması için laktik asit bakterilerinin potansiyeli ve kullanımı üzerine çalışmalar bulunmaktadır. Bununla birlikte yapılan araştırmalar sonucunda, güçlü antifungal etkilerinden dolayı *Candida* gibi gruplar üzerinde etkili oldukları anlaşılmıştır.  nsanlarda bazı kanser türlerinin engellenmesi ve özellikle kolon kanserinin oluşmasının önüne geçilmesinde etkili oldukları bildirilmiş ve radyoterapi alan hastalarda iyileşmenin hızlandırılmasını sağıladıkları rapor edilmiştir. Bununla beraber, vücutta meydana gelen alerjik reaksiyonların azaltılması ve kontrol altına alınmalarında olumlu etki yaptıklarına dair bulgular literatürde yer almaktadır (Masood vd., 2011; Vieco-Saiz vd., 2019).

Probiyotik olarak tanımlanan laktik asit bakterilerinin metabolizma açısından iki önemli ve faydalı etkisi ise serumdaki kolesterol düzeylerinin düşürülmesi ve adipoz

dokuda azalma meydana getirmeleridir. Literatürde farklı çalışmalarda gerçekleştirilen hayvan deneyleri bulgularına göre, farklı laktik asit bakteri türleri ile muamele edilen deney gruplarında toplam vücut ağırlığının ve yağ birikiminin azaldığı, adipositlerin sayısı ve büyüklüklerinde azalma meydana geldiği, plazma ve karaciğer dokularında toplam kolesterol miktarının azalma olduğu, yağ asitleri sentez genlerinin ifadelerinde düşüş görüldüğü, adipoz dokuda pro-inflamatuar genler olan TNF α , IL6, IL1 β ve MCP1'in ifadelerinde azalma görüldüğü bildirilmiştir (Kobyliak vd., 2016; Mazloom, Siddiqi ve Covasa, 2019). Tüm bu çalışmalar, laktik asit bakterilerinin potansiyel anti-obezite ve anti-kolesterol etkilerinin olduğunu işaret etmektedir. Laktobasiller belirtilen bu önemli etkileri sebebiyle sıkça insan tüketimi için kullanılmakta olup, bebek mamalarında, kültürlü sütlerde ve çeşitli farmasötik preparatlarda probiyotikler olarak yer almaktadır (Kumar vd., 2012; Tsai, Cheng ve Pan, 2014).

1.6. Probiyotik Mikroorganizmaların Özellikleri

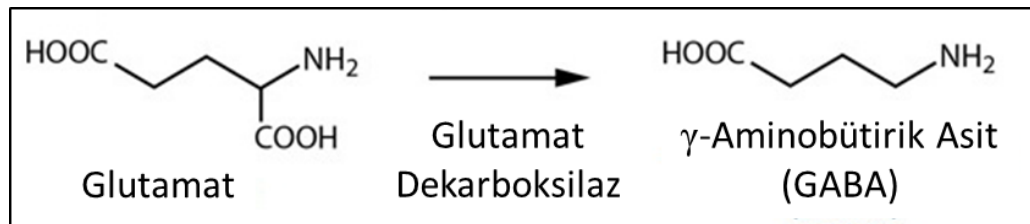
Etiyolojik olarak probiyotik terimi, “yaşam” anlamına gelmektedir, Yunancadan türetilmiştir, ancak probiyotiklerin tanımı zaman içinde, canlı bakteri takviyelerinin kullanımına olan ilginin artması ve etki mekanizmalarının anlaşılmasında kaydedilen ilerlemenin artmasıyla birlikte değişmiştir. Birleşmiş Milletler Dünya Sağlık Örgütü'nün Gıda ve Tarım Örgütü tarafından probiyotikler, yeterli miktarda tüketildiğinde konakçılarına fayda sağlayan patojenik olmayan mikroorganizmalar olarak tanımlanmıştır (Maia vd., 2019).

Probiyotik mikroorganizmalar biyolojileri dolayısıyla genetik olarak stabildirler ve düşük pH, safra ve sindirim enzimlerine direnç gösterme kabiliyetleri nedeniyle gastrointestinal kanaldan geçişte hayatta kalırlar. Gastrointestinal sisteme ulaştıklarında hayatta kalmaları ve intestinal mukozaya yapışmalarıyla bağışıklık sisteminin uyarılması gerçekleşir ve bu durum kolonizasyonlarına temel oluşturur (Roessler vd., 2007). Çeşitli probiyotik türlerin bulundukları dokularda farklı etkileri olabilmekle birlikte genellikle tamamlayıcı veya sinerjistik bir şekilde etki gösterirler. Ek olarak, probiyotiklerin, bulundukları dokudan çok uzaktaki sistemlerde bile anti-inflamatuar etkilere sahip olduğuna dair bulgular bulunmaktadır (Jonkers, vd., 2012).

Mevcut bilgi durumuna göre, insan ve hayvanların gastrointestinal kanalındaki kommensal bakterilerin üyeleri olan *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* gibi bazı laktik asit bakterilerinin yanı sıra probiyotikler hem bakterileri (*Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Propionibacterium*, *Bacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* üyeleri) ve maya gruplarını (*Saccharomyces*) kapsar. Probiyotikler konak sistemlerde *Enterococcus faecalis*, *Salmonella enterica subsp*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* ve *E. coli* gibi patojenleri immün, hormonal ve nöronal etkilerle baskılamaktadır (Kothari, Patel ve Kim, 2019). Ayrıca bu mikroorganizmalar, gastrointestinal sistemdeki bulaşıcı hastalıklara karşı doğal direncin artırılmasını, gastrointestinal mikrofloranın stabilizasyonu, dejeneratif hastalığın önlenmesi, kanserin baskılanmasını, sindirimin artmasını, saprojenik ürünlerin azaltılmasını, obezitede meydana gelen yağ birikiminin azaltılması ve serumdaki kolesterol seviyelerinin düşürülmesini sağlamaktadır (Anandharaj ve Sivasankari, 2014).

1.7. Gama-Aminobütirik Asit (GABA)

Amino asit türevi bir molekül olan Gama Aminobütirik asit (GABA) bakterilerde, hayvanlarda, bitkilerde ve mantarlarda yaygın olarak bulunur. GABA, merkezi sinir sisteminin temel bir nörotransmitter molekülü olarak görev yapar (Zhong vd., 2019). GABA'nın canlılardaki üretimi dekarboksilatlı L-Glutamatın Glutamik asit Dekarboksilaz (GAD) enzimi ile dekarboksilasyonu yoluyla gerçekleştirilir (Şekil 1.3).



Şekil 1.3. GABA sentez reaksiyonu (Dhakal, Bajpai ve Baek, 2012)

Üretilen GABA molekülü, özgül GABA-A ve GABA-B reseptörlerine bağlanarak iyon kanallarının açılmasına, hiperpolarizasyona ve sinirsel iletimin baskılanmasına neden olarak hücrelerde sinirsel uyarılabilirliği kontrol etmektedir. Beyin dokusunda

plazma konsantrasyonunu, büyüme hormonlarını ve protein sentezini destekleyici etki göstermektedir. İnsan ve hayvan çalışmalarında kan basıncını düşürdüğü ve nörolojik bozukluklarda etki sağladığı da bildirilmiştir (Watanabe vd., 2002). Sinir dokularının yanı sıra, pankreasta insülin üreten beta hücrelerinde de üretimi gerçekleştirilen GABA molekülü, insülin üreten beta hücrelerinden salgılandığında komşu alfa hücrelerinin GABA reseptörlerine hareket ederek bu hücrelerden glukagon sentezini baskılar ve böylece insülin metabolizmasında düzenleyici bir etki gösterir (Franklin ve Wollheim, 2004)

Son yıllarda yapılan birçok çalışma, GABA'nın, sinir hücrelerinin yaşlanmasını geciktirmek, kan basıncını düşürmek, cildi onarmak, akıl hastalıklarını tedavi etmek ve kardiyak aritmi ve hormon salgılanmasını düzenlemek gibi fizyolojik işlevlerini bildirmiştir (Chen, 2019). Laktik asit bakterilerinin ise GABA molekülünün potansiyel üreticisi olduğunu gösteren araştırmalar son yıllarda artmıştır (Anggraini vd., 2018). Özellikle *Lactobacillus* gruplarında GABA'nın yüksek miktarda üretilbildiğini gösteren biyoteknolojik üretim denemeleri gerçekleştirilmiştir. Bu üretimin gerçekleştiği besin ortamları ise süt, kefir, yoğurt gibi çeşitli gıda ürünleri olarak bildirilmiştir (Dhakal, Bajpai ve Baek, 2012).

1.8. GABA'nın Obezite ile İlişkisi

GABA'nın (Gamma Aminobutirik asit) beyinde nöronlar arasındaki sinyallerin iletimini düzenleyerek, yiyecek türünü, miktarını ve kalitesini seçmede anahtar rol oynadığı öne sürülmüştür. Ek olarak, GABA'nın yeme davranışına katılımı, kemirgen modelleri ve GABA reseptörü agonistleri ve antagonistleri kullanılarak yapılan deneylerle desteklenmiştir. Beyin glikoz konsantrasyonundaki değişiklikler, GABA gibi nörotransmitterlerin salınımını değiştirmektedir (Sandoval-Salazar vd., 2016).

İnsanlarda prefrontal korteks (PFC), yemek seçimi gibi bilişsel işlevlerde rol alan bir bölgedir ve bireyler iştah açıcı olmayan besinler yerine iştah açıcı bir besin tercih ettiğinde PFC nöronları aktive olur. Bu nedenle insanlarda, PFC'nin disinhibisyonu ve asimetrisinin obezitenin gelişmesine rol oynayan yeme bozukluklarına neden olabileceği düşünülmektedir. Prefrontal korteks davranışın bütün olarak kontrolünde, özellikle uygun

olmayan cevapların inhibisyonunun gerekli olduğu çelişkili durumlarda, GABA seviyesini modüle ederek önemli bir etki göstermektedir (Cohen vd., 2011).

GABA ile obezitenin moleküler biyolojik ilişkisine yönelik araştırmalar obez hayvan modellerinde GABA ve GABA-BR1 (GABA tip B reseptör altünite-1) moleküllerinin kahverengi adipoz dokuda miktarının arttığını göstermiştir. Belirtilen GABA sinyalinin obez hayvanlarda kahverengi adipoz dokuda ve mitokondrilerde fonksiyon bozukluklarından sorumlu olduğuna dair veriler, GABA'nın obezitede metabolik sinyal ve fonksiyon değişikliğinde anlamlı bir etkisinin olduğunu göstermektedir (Ikegami vd., 2018).

1.9. Kolesterol

Kolesterol, hayvansal kaynaklı besinlerle alınan, kanda ve safra kesesinde bulunan sterol bir bileşiktir. Canlı sistemlerde hücre zarının yapısına katılan bu molekül çoğu zaman vücudun farklı dokularından sentezlenen temel bir moleküldür. Vücut dokuları için önemli bir yapı taşı olsa da, kanda kolesterol miktarının yükselmesi, koroner kalp hastalıkları, ateroskleroz, felç gibi hastalıklar için önemli bir risk faktörü olmaktadır (Epstein vd., 1989). Özellikle biriken kolesterolün damar yollarında birikim göstermesi ile dolaşım sisteminde bozulmalar görülmekte, ayrıca safra kesesinde var olan bazı moleküller ile etkileşerek taş oluşumuna neden olduğu görülmektedir. Dünya Sağlık Örgütü, 2030 yılına kadar kardiyovasküler hastalıkların dünyanın önde gelen ölüm nedenleri olarak kalacağını ve dünya çapında yaklaşık 23,6 milyon insanı etkileyeceğini öngörmüştür (Dehkohne, Jafari, ve Fahimi, 2019). Bu kardiyovasküler rahatsızlıkların büyük kısmı dolaşım bozuklukları, damar sertliği, yüksek kolesterol gibi etmenlerin etkisiyle ortaya çıkmakta ve tedavisi süreç almaktadır.

Obezite ile kandaki kolesterol seviyesinin birbiri ile korelasyon gösterdiği, genellikle obezite tanısı koyulmuş kişilerin kan kolesterol miktarlarında artışlar olduğu bildirilmiştir (Mokdad vd., 2003). Bu durum, farklı sebeplerden dolayı obezite tanısı koyulan kişilerde beslenmenin dengesizliği ve yüksek hayvansal yağ içeren besinlerin tercih edilmesinden dolayı ortaya çıkmaktadır. Vücuttaki kolesterol sentezine ek olarak dışarıdan yoğun olarak alınan kolesterol kaynağı besinler ile vücutta kolesterol fazlalığı meydana getirerek kandaki kolesterol seviyesinde artışa neden olmaktadır.

Kan kolesterol düzeylerini düşürmek için yapılan son yöntemler diyet, davranış modifikasyonu, düzenli egzersiz ve ilaç tedavisini içerir. Yüksek kolesterolün tedavisinde etkili bir şekilde kolesterol düzeylerini düşüren farmakolojik ajanlar mevcuttur, fakat bu farmakolojik ajanlar pahalıdır ve ciddi yan etkilerinin olduğu bilinmektedir.

Yüksek kolesterolün gideriminde aktif safra tuzu hidrolazı (BSH) veya bunları içeren ortamlardaki laktik asit bakterilerinin (LAB), safra tuzu metabolizması ile etkileşim göstererek kolesterolü düşürücü aktivite gösterdiklerine dair literatürde bilgiler mevcuttur (Kumar vd., 2012). Ayrıca, laktik asit bakterilerinin veya metabolik ürünlerinin ortamda bulunan kolesterol moleküllerine direkt bağlanarak kolesterolü işleme ve parçalamaya yönelik etki göstererek kolesterol düzeylerini düşürdüğü bildirilmiştir (Ma vd., 2019).

1.10. Laktik Asit Bakterilerinin Kolesterol Üzerine Etkileri

Laktik asit bakterilerinin kolesterol giderimi için önerilen beş mekanizma şu şekildedir:

- Fermantasyon ürünleri kolesterol sentezleyen enzimleri inhibe etmektedir.
- Boşaltımda kolesterolün uzaklaştırılmasını sağlarlar.
- Kolesterolle bağlanarak, geri kazanımını engellerler.
- Bakteriler, safra tuzunun (kolesterolün metabolik ürünü) geri dönüştürülmesine müdahale eder ve yıkımını kolaylaştırır bu da kolesterolden yapılan safra tuzu ihtiyacını artırır böylece vücudun kolesterol tüketimine neden olurlar.
- Laktik asit yıkımından dolayı kolesterol azalmasına neden olurlar (Lee vd., 2009).

Bu mekanizmalar üzerinden probiyotik bakterilerin anti-kolesterol etkilerinden yararlanılmaktadır. Bu etkilerin *in vitro* yöntemlerle analiz edilebilmesi için insan hücre kültürü sistemleri tercih edilmektedir. Literatürde son beş yılda yayınlanan makalelerin üçte birine yakın kısmı adipojenез ve obezite ile ilgili özellikleri araştırmak için 3T3-L1 hücrelerinin kullanımı tercih edilmiştir.

1.11. 3T3-L1 Hücre Hattı

Adipojenезin transkripsiyonel kontrollerini tanımlayan çalışmaların çoğu *in vitro* olarak yapılmıştır. Bu çalışmalar, öncelikle Harvard Üniversitesi'ndeki Dr. Howard Green'in laboratuvarında üretilen 3T3-L1 veya 3T3-F442A fare preadiposit hücre hatlarında gerçekleştirilmiştir (Green ve Kehinde, 1975). Son 35 yılda, bu hücre hatları dünya çapında binlerce araştırmacı tarafından diyabet, obezite gibi hastalıkların hücresel mekanizmalarının anlaşılması için kullanılmıştır. Kültür hücreleri *in vivo* hücrelerin özelliklerine sahip olmadığından birçok hücre tipi *in vitro* şartlarda yeterli değildir. Bu nedenle literatürde kullanımı sağlanan preadiposit hücre hatları son derece faydalı model sistemler olmuştur. *In-vivo* adipositler lipid depolanması, insülin duyarlılığı ve endokrin özelliklerden oluşan üç temel özelliğe sahiptir. 3T3-L1 hücreleri, yağ hücrelerinin bu dikkate değer özelliklerinin üçüne de sahiptir. Adiposit gelişimini incelemek için yaygın olarak kullanılmaya ek olarak, birçok adiposit spesifik genin kimliği ve / veya karakterizasyonu bu hücre hattı kullanılarak tanımlanmıştır (White ve Stephens, 2010).

3T3-L1 hücrelerinin adiposit hücrelerine farklılaşması için *in vitro* kültür ortamına Dekzametazon, 3-isobutil-1-metilksanthin (IBMX) ve insülinde oluşan farklılaşmayı indükleyici maddeler kullanılmaktadır. Farklılaşma süresi genellikle 6-8 gün arası sürmekte ve adiposite dönüşen hücrelerde lipid akümülayonu görülmektedir (Arsenijevic vd., 2012). Lipid akümüle eden bu hücreler Oil Red O adı verilen boya ile boyanır özellik gösterdiklerinden dolayı morfolojik olarak incelenebilirler.

1.12. Adiposit

Adipositler, beyaz yağ dokusunun (WAT) ana hücresel bileşenleridir. Temel işlevleri, triaçilgliseröl depolayarak enerji dengesini kontrol etmek olup aynı zamanda endokrin ve parakrin organlarda önemli rol oynarlar. Adipoz doku, glikoz metabolizmasını, iştahı, immünolojik tepkileri, inflamatuvar tepkileri, kan basıncının düzenlenmesini ve üreme fonksiyonunu kontrol eden faktörleri kontrol ederek birçok fizyolojik ve patolojik süreçlere aracılık eder (Ali vd., 2013).

Birçok laboratuvarında yapılan çalışma, adipositin normal ve patofizyolojik koşullar altında sistemik etkisinin kapsamlı bir şekilde anlaşılması için adipositin metabolizma, inflamatuvar ve kanser üzerine etkisine odaklanmaktadır. Yakın zamana kadar, yağ

dokusunun trigliseritlerin yalnızca bir saklama alanı olduğu düşünülmüştür. Adipositlerin genel enerji homeostazında merkezi bir rol oynayan ve bağışıklık sisteminin bazı yönlerine önemli katkı sağlayan son derece aktif endokrin hücreleri olduğu görülmüştür. Bunu sadece sistemik lipit homeostazını etkileyerek değil, aynı zamanda bir dizi adiposit spesifik ve zenginleştirilmiş hormonal faktör, sitokin ve hücre dışı matriks bileşenlerinin (genellikle "adipokinler" olarak adlandırılır) üretilmesi ve salınması yoluyla gerçekleştirirler (Desruisseaux vd., 2007).

1.13. Adipojenez ve 3T3-L1 Hücre Hattı

Adipojenez, preadipositler gibi fibroblastların lipit yüklü adipositlere farklılaşmasıdır. Hücrelerin kendileri ile hücreler arasındaki ve çevrelerindeki iletişime dayanır. Bu süreç, kabaca altı aşama içerir; mezenkimal prekürsörler, işlenmiş preadipositler, büyümeyi durduran preadipositler, mitotik klonal genişleme, terminal farklılaşması ve olgun adipositlere dönüşümdür. Olgun adipositlere başarılı bir dönüşüm sağlamak için, preadipositler morfoloji ve gen ekspresyonunda belirgin değişikliklere uğrarlar (Lefterova ve Lazar, 2009).

3T3-L1 preadiposit ve 3T3-F442A hücre hatlarını içeren *in vitro* adipojenez modelleri kullanılarak yapılan deneyler, yağ hücresi farklılaşmasını destekleyen transkripsiyonel olayları göstermek için kullanılmıştır. Preadiposit farklılaşmasını incelemek için bu modeli kullanmanın avantaj ve dezavantajları vardır. Klonlamadan türetilen bu hücre hattı, homojen bir hücre popülasyonudur. Bu durum uygulanan tekniklere kesin tepkiler vermesine olanak tanır. Dezavantajı ise; bir preadiposit hücre hattının farklılaşma kabiliyeti çoğu zaman artan pasaj sayısı ile azalmaktadır (Ntambi ve Young-Cheul, 2000). Sahip olduğu avantajlar bu hücre grubunu *in vitro* çalışmalara uygun hale getirmiştir ve bu çalışmada da 3T3-L1 hücre hattı deneysel aşamalarda kullanılmıştır.

2. MATERYAL-YÖNTEM

2.1. Bakteri Kùltürleri

Bu alışmada, Eskişehir Teknik Üniversitesi, Fen Fakùltesi, Biyoloji Bölümü, Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na ait kefir den ve anne sütünden izole edilmiş laktik asit bakterileri kullanılmıştır.

2.2. Hücre Hattı

İn-vitro hücre kùltürü deneylerinde 3T3-L1 preadiposit hücre hattı kullanılmış olup, bu hücreler Amerika Tip Kùltür Koleksiyonu'ndan (ATCC) tedarik edilmiştir.

2.3. Besi Ortamları ve Kimyasallar

Çalışmada gerekli olan bakteriyel kùltürizasyon işlemleri için MRS Agar besiyeri (Tablo 2.1), MRS Broth (Tablo 2.2), M17 Agar (Tablo 2.3) ve M17 Broth (Tablo 2.4) besiyerleri hazırlanarak deneylerde kullanılmıştır.

Tablo 2.1. MRS Agar (Merck) besiyeri içeriği

Kimyasal	Miktar
Diamonyum Hidrojen Sitrat	2 g
Dipotasyum Hidrojen Fosfat	2 g
Glukoz	20 g
Magnezyum Sülfat	0,2 g
Mangan Sülfat	0,04 g
Et Ekstraktı	8 g
Pepton	10 g
Sodyum Asetat	5 g
Maya Ekstraktı	4 g
Tween 80	1 ml
Agar	14 g
Distile Su	1000 ml

Tablo 2.2. *MRS Broth (Merck) besiyeri içeriği*

Kimyasal	Miktar
Pepton	10 g
Et Ekstraktı	8 g
Maya Ekstraktı	4 g
Glukoz	20 g
Tween 80	1 g
Sodyum Asetat	5 g
Magnezyum Sülfat	0,2 g
Mangan Sülfat	0,04 g
Diamonyum Hidrojen Sitrat	2 g
Dipotasyum Hidrojen Fosfat	2 g

Tablo 2.3. *M17 Agar (Merck) besiyeri içeriği*

Kimyasal	Miktar
Soya Peptonu	5g
Et Peptonu	2,5 g
Kazein	2,5 g
Maya Ekstraktı	2,5 g
Et Ekstraktı	5 g
Laktoz Monohidrat	5 g
Askorbik Asit	0,5 g
Disodyum-B-Gliserofosfat	19 g
Magnezyum Sülfat	0,25 g
Agar	12,75 g
Distile Su	1000 ml

MRS Agar Besiyeri 68.2 g/L olacak şekilde distile su ile çözüldükten sonra, erlene aktarılarak 121°C’ de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir. M17 Agar 55 g/L olacak şekilde distile su ile çözüldükten sonra, erlene aktarılarak 121°C’ de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir. M17 Broth besiyeri ise 42,5 g/L olacak şekilde distile su ile çözüldükten sonra, erlene aktarılarak 121°C’ de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

Tablo 2.4. *M17 Broth besiyeri içeriği*

Kimyasal	Miktar
Soya Peptonu	5 g
Et Peptonu	2,5 g
Kazein Peptonu	2,5 g
Maya Ekstraktı	2,5 g
Et Ekstraktı	5 g
Laktoz Monohidrat	5 g
Askorbik Asit	0,5 g
Disodyum-B-Gliserofosfat	19 g
Magnezyum Sülfat	0,25 g
Distile Su	1000 ml
Soya Peptonu	5 g
Et Peptonu	2,5 g
Kazein Peptonu	2,5 g
Maya Ekstraktı	2,5 g

2.4. Mikrobiyoloji Deneylerinde Kullanılan Kimyasallar

Kristal viyole (Merck), Lugol (Merck), Safranin (Merck), Etil Alkol (Sigma), Gliserol (%20), Glaciel Asetik Asit (Merck), Ninhidrin Çözeltisi, Bütanol (Sigma), Oxgall (Sigma), KOH (Sigma), Hekzan (Merck), O-Fitalaldehit (Sigma), GABA (Acros).

2.5. Hücre Kültürü Çalışmalarında Kullanılan Kimyasallar ve Besiyerleri

DMEM High Glucose (Sigma), EDTA (Merck), Penisilin-Streptomisin (Gibco), Amfoterisin-B (Sigma), Sodyum bikarbonat (Sigma), Dimetil sülfoksit (Sigma), NaCl (Merck), KH_2PO_4 (Merck), Na_2HPO_4 (Merck), EDTA (Merck), MTT (Sigma), KCl (Sigma), Formaldehit (Merck), 2-Propanol (Merck), DMSO (Merck), Dekzametazon (Sigma), IBMX (Sigma), Oil-Red (Sigma) Fosfat Buffer Saline (Tablo 2.5), Fosfat Buffer Saline-EDTA (Tablo 2.6), Tripsin-EDTA.

PBS tamponu için, Tablo 2.5'teki kimyasallar belirtilen miktarlarda 30 dakika boyunca manyetik karıştırıcıda homojen hale getirildikten sonra steril edilmiştir.

Tablo 2.5. Fosfat Buffer Saline (PBS) içeriği

Kimyasal	Miktar
NaCl	8 g
KCl	0,2 g
Na ₂ HPO ₄	1,44 g
KH ₂ PO ₄	0,24 g
Distile Su	1000 ml

PBS-EDTA tamponu için Tablo 2.6'daki kimyasallar belirtilen miktarlarda 40 santigrat derecede 30 dakika boyunca manyetik karıştırıcıda homojen hale getirildikten sonra steril edilmiştir.

Tablo 2.6. Fosfat Buffer Saline-EDTA (PBS-EDTA) içeriği

Kimyasal	Miktar
NaCl	8 g
KCl	0,2 g
Na ₂ HPO ₄	1,44 g
KH ₂ PO ₄	0,24 g
Distile Su	1000 ml
EDTA	0,372 g

2.6. Bakterilerin Canlandırılması

Bakterilerin canlandırılması için MRS Broth ve M17 Broth kullanılmıştır. Besiyerleri 121°C'de 1,5 atmosfer basınç altında 20 dakika süreyle otoklavlanmıştır. Besiyerleri 45°C'ye soğutulduktan sonra 5'er ml deney tüplerine aktarılmış üzerine 100 µl bakteri ekimi yapılmıştır. Kültürler anaerobik ortamda 37 °C'de, 2 gün süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından gram boyama yapılarak saf olarak belirlenen kültürler %20 Gliserol içerisinde- 86°C'de stoklanmıştır.

2.7. Gram Boyama

Bakterilerin hücre duvarlarının, fiziksel ve kimyasal yapısına göre gram pozitif ve gram negatif özelliklerinin belirlenmesini sağlayan bir boyama şeklidir.

İzolatlar, M17 veya MRS Broth kullanılarak 48 saat inkübe edildikten sonra M17 ve MRS Agar bulunan petri kaplarına ekimi yapılarak çoğaltılmıştır. Temiz bir lam yüzeyine bir damla su konulduktan sonra bakteri kültürü öze yardımıyla ilave edilip kurumaya bırakılmıştır. Ardından lam 3 kez ateşten geçirilerek fiks edilmiştir. Hazırlanan preparatlar ilk olarak kristal viyole ile boyanarak 1 dakika bekletilmiştir. Fazla boyadan arındırılması için lam yüzeyi su ile yıkanarak üzerine lugol ilave edilerek 1 dakika bekletilmiştir. Yine su ile yıkandıktan sonra alkol konularak 30 saniye bekletildikten sonra son aşama olarak safranin ilave edilerek 45 saniye bekletilmiştir. Bekleme süresinin sonunda yıkandıktan sonra kurutulan örnekler ışık mikroskopunda 100'lük objektifte immersiyon yağı kullanılarak incelenmiştir. Mor renkte görülen bakteriler gram (+), pembe-kırmızı renkte görülenler ise gram (-) olarak değerlendirilmiştir. Gram pozitif ve basil formu bakteriler belirlenerek deneysel aşamalar için seçilmiştir.

2.8. Bakterilerin Moleküler Tanınması

Çalışmada kullanılan KM2-7, KM3-14 ve KM4 kodlu bakterilerin moleküler tanınması, 16s rRNA bölgelerinin dizi analizi yoluyla gerçekleştirilmiştir. Belirtilen izolatların 16s rRNA dizi analizleri, BM Yaz. Dan. Lab. San. Tic. Şti 'den hizmet alımı yoluyla sağlanmıştır. Elde edilen 16s rRNA dizi analizi verileri Bioedit programı ile düzenlenmiş ve 27F 1492R evrensel primerleri ile elde edilen okumalar birleştirilmiştir. Oluşturulan diziler, National Center of Biotechnology (NCBI) portalında yer alan Genbank veritabanındaki diğer 16s RNA dizileriyle BLAST programı kullanılarak karşılaştırılmıştır. Belirtilen bakterilerin tür düzeyinde tanınması yüzde benzerlik oranıyla gerçekleştirilmiştir.

2.9. Bakterilerin GABA Üretim Kapasitelerinin İnce Tabaka Kromatografisi Yöntemi Kullanılarak Belirlenmesi

İzolatlar MRS Broth içerisinde 48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından 4° C 1100g 5 dakika süreyle santrifüj edilmiştir. İşlem sonunda üstte oluşan süpernatant kısımları alınarak TLC’de kullanılmak üzere +4°C’de saklanmıştır. Santrifüj sonrasında elde edilen pelet kısmı, 3 kez distile su ile 1100 g 4°C 3 dakika süreyle santrifüj edilerek yıkanmış ardından -86°C’de dondurulmuştur. Peletler çözündürüldükten sonra darası alınan ependorf tüplere konulmuş içerisindeki pelet miktarı hesaplanmış 10 mg/ml olacak şekilde distile su ilave edilmiştir. Uygun konsantrasyona getirilen peletlere 50 saniye boyunca 3 kez sonikasyon işlemi uygulanmıştır. Sonikasyon sonrası 1100 g 4°C 15 dakika santrifüj edilmiş süpernatant kısmı temiz bir ependorfa alınarak TLC’de kullanılmak üzere +4°C’de saklanmıştır.

Hazırlanan ilk süpernatant 20 µl son süpernatant 20 µl ve standart GABA 20 µl ve 10 µl olacak şekilde plaka üzerine spotlanmıştır. Plakanın yürütüleceği tankın içerisine çözücü (Bütanol: Asetik Asit: Su 5:3:3) konulmuş, örneklerin spotlandığı plaka tanka yerleştirilerek örneklerin yürümesi sağlanmıştır. Yürütme işleminin tamamlanmasının ardından plaka tanktan çıkarılarak kurumaya bırakılmıştır. Kuruma sonrası %0,2 Ninhidrin içeren etanol plaka üzerine püskürtülmüş ve 100°C etüvde 10 dakika süreyle reaksiyon oluşumu sağlanmıştır. Reaksiyon sonucunda oluşan bantlara bakılarak GABA standardının hizasında bant oluşumu gösteren örnekler seçilmiştir.

2.10. Kolesterol Giderimi Testi

Bakterilerin canlandırılması için 100 ml MRS Broth kullanılmıştır. Besiyeri 121°C’de 1,5 atmosfer basınç altında 20 dakika süreyle otoklavlanmıştır. Besiyeri 45°C’ye soğutulduktan sonra 5’er ml deney tüplerine aktarılmış üzerine 100 µl bakteri ekimi yapılmıştır. Kültürler anaerobik ortamda 37 °C’de 2 gün süreyle inkübe edilmiştir. Bu işlemi takiben bakteriler MRS Agar üzerine ekim yapılarak aynı şartlar altında inkübasyona bırakılmıştır.

100 ml hazırlanan taze MRS Broth içerisine %0,3 Ovgall ve 100 µg/ml final konsantrasyonda olacak şekilde kolesterol filtreden geçirilerek ilave edilmiştir. Hazırlanan karışım kolesterol deneyi için hazırlanan özel tüplere 5er ml olacak şekilde

dağıtılmıştır. Agar plakları üzerinde geliştirilen bakterilerden kontrollü şekilde tüplerin içerisine aktarımı yapılarak, spektrofotometrik olarak değerleri ölçülerek OD değeri 1 olacak şekilde bakteri ekimi yapılmıştır. Kültürler aynı şartlar altında 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından kültürler 9000 g 4°C 15 dakika santrifüj edildikten sonra oluşan süpernatant kısmından 1 ml alınarak başka tüpe aktarılmıştır. Süpernatantın üzerine %33 oranında KOH ve %95 oranında etanol ilave edilerek 1 dakika süreyle vorteks cihazında homojen hale gelmesi sağlanmıştır. Bu işlemin ardından 37°C su banyosunda bekletildikten sonra soğutulup, 2 ml steril distile su ve 3 ml Hekzan ilave edilip 1 dakika süreyle vortekslenmiştir. Karıştırma işlemi ardından üst tabakada oluşan fazın 1 mililitresi yeni tüplere aktarılmıştır. Tüpler 65°C su banyosunda Hekzan buharlaşana kadar bekletilmiştir. Hekzanın buharlaşması sağlandıktan sonra tüplerin üzerine 2 ml o-fitalaldehit ilave edilerek 10 dakika süreyle oda sıcaklığından bekletilmiştir. Bu işlemin ardından 0.5 ml konsantre sülfirik asit ilave edilerek spektrofotometrede 550 nm dalga boyunda absorbansı ölçülmüştür (Gilliland, Nelson ve Maxwell, 1985).

Elde edilen absorbans değerleri, daha önce oluşturulmuş olan standart kolesterol grafiği baz alınarak oluşturulan denklemde kullanılarak örneklerdeki son kolesterol değerleri hesaplanmıştır. Elde edilen değerler kontrol grubuna göre değerlendirilerek aşağıdaki formül üzerinden yüzde giderim hesaplanmıştır (Pereira ve Gibson, 2013).

Yüzde Giderim (%) = $\frac{[(\text{Kontrol Kolesterol Miktarı } (\mu\text{g}) - \text{Kültür Kolesterol Miktarı } (\mu\text{g}))]}{(\text{Kontrol Kolesterol Miktarı } (\mu\text{g}))} \times 100$

2.11. Bakteri Filtratlarının Liyofilize Edilmesi

MRS Broth ve M17 Broth kullanılarak inkübasyona bırakılan deney tüplerinden %1 oranında kültür alınarak 100 ml MRS Broth bulunan erlenlere aktarılıp 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bu işlem sonunda örnekler santrifüj tüplerine alınarak 1100 g 4°C 5 dakika süreyle santrifüj edilmiş ve bu işlem her bir bakteri kültürü için 2 defa tekrarlanmıştır. Santrifüj sonucunda oluşan süpernatant kısmı Durhan şişelere alınarak -86 °C'de 24 saat dondurulmuştur. Örneklerin donması sağlandıktan sonra liyofilizatör cihazına konularak 7 gün süreyle konsantre hale getirilmesi sağlanmıştır.

2.12. Bakteri Filtratları İçerisindeki GABA Varlığının LC-MS/MS Yöntemiyle Belirlenmesi

GABA'nın stok çözeltisi 1,69 mg saf maddenin 1 ml %0,1 formik asit içeren su ile çözülmesiyle hazırlanmıştır. Metot geliştirme çalışmaları bu çözelti derişimine gerekli seyreltmeler yapılarak gerçekleştirilmiş ve analizi yapılacak numuneler de aynı şekilde standardın hazırlandığı çözücü içerisinde hazırlanmıştır.

GABA bileşğinin sıvı kromatografisi ile çeşitli analitik uygulamalarını yapabilmek için LC-MS/MS ile analitik metot geliştirilmesine ihtiyaç duyulmuştur. Bu amaçla kullanılan etken madde GABA, HPLC dereceli Asetonitril (ACN), formik asit (FA) ve su Sigma-Aldrich GmbH'den (Almanya) satın alınmıştır. Tüm çözeltiler, steril olmayan selüloz asetat (CA) şırınga filtrelerinden (25 mm id, 0.2 µm por çapında, GS Tek, ABD) enjeksiyondan önce süzölmüştür.

LC-MS/MS çalışmaları için LCMS-8040 serisi (Shimadzu, Nexera XR serisi) sıvı kromatografi kütle spektrometresi kullanılmıştır. Cihazın LC kısmı, üç yollu gaz giderici (DGU-20A3R), bir SIL-20AC otomatik numune alıcısı, bir CTO-10ASVP kolonlu fırına sahip iki LC-20AD ikili pompa ve CBM-20A haberleşme veri yolu modölünden oluşmaktadır. Çalışma için sabit faz olarak Fused-Core tanecikleri ile üretilmiş kolon (Supelco Ascentis Express HILIC, 2.7 µm x 10 cm 4.6 mm) seçilmiştir. Mobil faz, su içinde %0,2 (h/h) Formik asit ve Asetonitril 'de %0,1 (h/h) formik asit karışımıdır (65:35 (h/h), pH = 2,0). Kolon fırını ve otomatik enjeksiyonlayıcı termostatu sırasıyla 30.0 ± 0,1 °C ve 15 ± 0,1 °C olarak ayarlanmıştır. Enjekte edilen numune hacmi 1 µl ve akış hızı 0,10 ml/dk. şeklindedir. Bu koşullar altında maddenin alıkonma zamanı 13.0±0,1 dakika olarak belirlenmiştir.

Kütle spektrometresi, pozitif modda (ESI +) bir elektrosprey iyonizasyonu kullanarak m/z 100 ila m/z 800 kütle aralığında çalıştırılmıştır. MS koşulları; kurutma gazı (azot) akışı 15 l/dk., nebulize edici gaz (azot) akışı 3 l/dk., çarpışma gazı (Argon), CDL sıcaklığı 250°C ve ısı bloğu sıcaklığı 450°C olacak şekilde optimize edilmiştir. Tüm analizler boyunca Çoklu Reaksiyon İzleme (MRM) modu kullanılmıştır (Tablo 2.7).

Tablo 2.7. GABA için MRM koşulları

Precursor Ion	Product Ion	Q1 Pre-Bias (V)	CE (V)	Q3 Pre-Bias (V)
	87.05	-11.0	-15.0	-16.0
103.85	45.05	-17.0	-24.0	-15.0
	69.05	-11.0	-19.0	-27.0

2.13. Hücrelerin Pasajlanması

Satın alınan 3T3-L1 hücre hattı, DMEM High Glucose içerisine %10 Fetal Sığır serumu (FBS) ilave edilerek hazırlanan mediumda 37°C de, %5 CO₂ içeren CO₂ inkübatöründe kültüre edilmiştir. Besiyeri miktarları 25 cm²'lik flask için 7 ml, 75 cm²'lik flask için 15 ml ve 175 cm²'lik flask için 50 ml olarak kullanılmıştır. Hücre kültür yoğunluğu flask tabanının %70'ini kapladığı zaman pasaj işlemi yapılmıştır. İlk olarak flask içerisindeki medium pasteur pipeti ile aspire edilerek PBS ile yıkanmış, kalan hücre besiyeri bu sayede uzaklaştırılmıştır. Ardından PBS-EDTA ile muamele edilen hücrelerin flask tabanından ayrılma işlemi kolaylaştırılmıştır. Kullanılan flask yüzeyine bağlı olarak, 25 cm²'lik hücre kültür kabı için 250 µl, 75 cm²'lik hücre kültür kabı için 750 µl 175 cm²'lik hücre kültür kabı için 1200 µl 1x Trypsin PBS-EDTA konmuş, bir dakika inkübatörde bekletilerek hücrelerin yapıştıkları flasktan kalkmaları sağlanmıştır. İnverted mikroskop altında hücrelerin kalktıkları gözlemlendikten sonra, Trypsin PBS-EDTA'nın etkisini inhibe edebilmek için eklenen miktarın 10 katı kadar medium, hücrelerin üzerine ilave edilmiştir. Santrifüj tüpünde pipetlenerek homojen hale getirilen hücreler, flasklara bölünerek üzerlerine gerekli miktarlarda medium ilave edilmiştir.

2.14. Hücrelerin Stoklanması

Hücre kültür yoğunluğu %70'e ulaştığında, PBS ve ardından PBS-EDTA ile yıkanan hücreler 1X Trypsin PBS-EDTA kullanılarak flask yüzeyinden kaldırılmıştır. Hücreler santrifüj tüpü içerisine alınarak 1200 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında oluşan pelet üzerine her bir stok için, 850 µl hücre besiyeri, 100 µl Fetal Bovine serum ve 50 µl Dimetilsülfoksit (DMSO) konulmuştur. Pipetlenerek homojen hale getirilen karışım, her bir stok için vial içerisine 1'er ml olacak şekilde paylaştırılarak Mr. Frosty (kademeli soğutucu) içerisine konulmuş -86°C'ye

koyulmuştur. Bir gün sonrasında -86°C'den alınan vialler sıvı azot tankına (-196°C) yerleştirilerek, hücrelerin stoklanması sağlanmıştır.

2.15. Hücrelerin Stoktan Çıkarılması

Santrifüj tüpü içerisine, 7 ml DMEM yüksek glikoz besiyeri ve %10 FBS ilave edilmiştir. Ardından azot tankından hücre çıkarılarak, hızlı bir şekilde hazırlanan karışımla pipetlenerek çözünmesi sağlanmıştır. Santrifüj tüpleri, 1200 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda oluşan süpernatant kısmı, pasteur pipeti ile aspire edilerek pelet kısmının kalması sağlanmıştır. Hücre peleti üzerine 7 ml medium ve %10 FBS ilave edilerek homojen hale getirildikten sonra 25cm²'lik flask içerisine alınmıştır. Hücreler 37°C'de, %5 CO₂ içeren inkübatörde, inkübasyona bırakılmıştır.

2.16. 3T3-L1 Hücrelerinin MTT Testi için Hazırlanması

Uygun koşullarda çoğalmaya bırakılan hücreler flask yüzeyini %70 oranında kapladıkları zaman Tripsin-EDTA ile muamele edilerek flask tabanından kaldırılmıştır. Hücreler Corning tüp içerisine alınarak, pipetleme yardımıyla homojen hale getirilmiştir. Thoma lamına lamel kapatarak, her iki yüzeye 10'ar µl hücreli medium konulmuş, hücreler 3 kez sayılmıştır. Hücreler, %10 FBS içeren besiyerinde süspansiyon haline getirildikten sonra 96 kuyucuklu hücre kültürü plakalarına her bir kuyucuk 5x10³ hücre olacak şekilde 0,1 ml hücre süspansiyonu aktarılmıştır.

Hücrelerin yapışması ve test maddesinin uygulanabilmesi için 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Inkübasyon sonrasında plaka ters çevrilmek suretiyle besiyeri uzaklaştırılmıştır. Test maddesi, belirlenen konsantrasyon değerlerinde taze besiyeri ile karıştırılarak 24, 48 ve 72 saat 37°C'de CO₂ inkübatöründe inkübe edilmiştir.

2.17. Hücre Kültürü Yöntemi ile *İn-Vitro* Sitotoksik Etki Belirlenmesi (MTT Ölçümü)

Test maddeleri ile 24, 48 ve 72 saat muamele edilen hücrelerden inkübasyon süresi sonunda besiyerleri uzaklaştırılmıştır. Hücreler 5 mg/ml MTT solüsyonu ile her bir kuyucuğa 0.1 ml olacak şekilde konulmuştur. Canlı hücrelerin mitokondriyal metabolik aktiviteleri sonucu MTT boyasının suda çözünmeyen formazan tuzuna dönüşebilmesi

için 2 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre sonunda hücrelerden MTT boyası uzaklaştırılmıştır. Canlı hücreler tarafından oluşturulan formazan tuzlarının çözünmesi için her bir kuyucuğa 0,1 ml DMSO ilave edilmiştir. Plakalardaki hücrelerin optik yoğunlukları ELISA cihazında 570 nm dalga boyunda okutulmuştur. Test maddesi ile muamele edilmeyen kontrol hücre canlılık oranı %100 olarak kabul edilerek, deney hücrelerinin canlılık oranları yüzde olarak ifade edilmiştir (Mosmann, 1983). Hücrelerin deney setlerinde her test maddesi konsantrasyonu için 8 paralel halinde ekildiği deneyler, birbirinden bağımsız olarak 3 kez tekrarlanmıştır. MTT deneylerinin sonuçlarının istatistiksel değerlendirmesinde SPSS programı kullanılmış ve elde edilen verilerin tek yönlü ANOVA ile Post-Hoc olarak Tukey testi uygulanarak anlamlılıkları belirlenmiştir. Anlamlılık değeri olarak $p < 0.05$ kabul edilmiştir.

2.18. Oil-Red-O Boyama (Yağ Hücrelerinin Boyanması ile Mikroskopik Olarak Saptanması)

Uygun koşullarda çoğalmaya bırakılan 3T3-L1 hücreleri, pasajlandıktan sonra Thoma lamında hücre sayımı yapılmıştır. Bu deney için 24 kuyucuklu plaka kullanılmış ve her bir kuyucuk için 4×10^4 olacak şekilde FBS ve DMEM yüksek glukoz besiyeri kullanılarak hücre ekimi yapılmıştır. Hücre yoğunluğuna bağlı olarak 48 veya 72 saat inkübasyona bırakılan hücrelerin konfluent hale gelmesi sağlanmıştır. İnkübasyon süresinin ardından hücrelerin üzerindeki medium pasteur pipeti ile uzaklaştırılmıştır. Belirlenen konsantrasyonlarda hazırlanan test maddeleri, indüksiyon mediumu (0,5 M 3-izobutil-1-metilsantin (IBMX), 50 μ M deksametazon ve 10mg/ml insülin içeren DMEM besiyeri) içerisinde çözdürüldükten sonra her bir konsantrasyon değerinden 3'er tekrar olacak şekilde hücrelere verilmiştir (Park vd., 2013). Maddenin uygulandığı gün 0. Gün olarak kabul edilmiş, 0-6 ve 0-8 günlerdeki, maddenin hücreler üzerinde farklılaşmaya olan etkisi Oil Red O metodu kullanılarak literatürde belirtildiği gibi boyanmıştır (Kasturi & Joshi, 1982). Hücreler önce PBS ile yıkanarak ve %3,7'lik formaldehit ile 10 dakika fiske edilmiştir. Fiksasyonun ardından hücreler 3 kez su ile yıkanmış ve izopropanolde çözülmüş (5 mg Oil Red O/ml) 1 ml Oil Red O her kuyucuğa eklenerek 2 saat oda sıcaklığında bekletilmiştir. Plakalar 2 saat sonra 4 kez distile su ile yıkanmış ve mikroskop analizi yapılarak görüntülenmiştir.

3. BULGULAR

3.1. Anne Sütünden Elde Edilen Bakteri İzolatlarının Analizleri

Çalışmada kullanılan, anne sütünden izole edilen izolatların mikroskopik ve hücresel analizlerinden elde edilen sonuçlar Tablo 3.1’de gösterilmiştir. Buna göre 43 izolat Gram (+) boyanma göstermiş olup Kok hücre morfolojisine sahiptir. 4 izolat grubunun ise Gram (+) olup Basil morfolojide olduğu görülmüştür.

Tablo 3.1. Anne sütünden elde edilen izolatların gram boyanma ve morfolojik özellikleri

İzolat numarası	Gram özelliği	Hücre şekli
KM5, TM17, TM8, TM14, K6, TN4, TM3, K17, K16, TM2, TM6, TM5, TM9, TM16, K14, K2, TN3, TM13, K21, TM11, TM7, TM15, TM4, K19, K18, K9, K3, KM6, K13, TM1, K7, K15, TM18, K20, K4, K5, TM12, TM3, K17, TM8, TM9, TM11, TM10	(+)	Kok
KM1-2, KM1-3, KM1-9, KM2-7	(+)	Basil

3.2. Kefirden Elde Edilen Bakteri İzolatların Analizleri

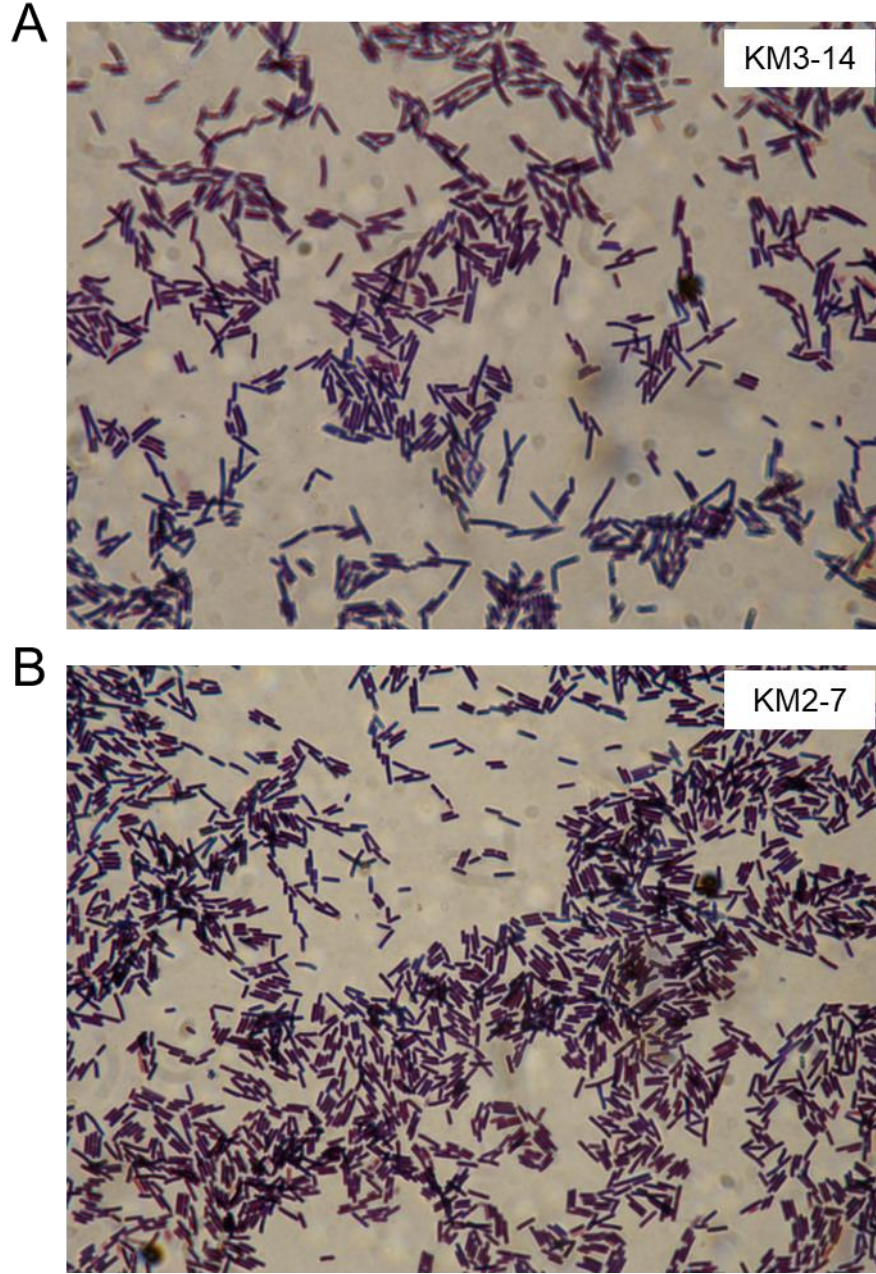
Çalışmada kullanılan, kefirde izole edilmiş izolatların mikroskopik ve hücresel analizlerinden elde edilen sonuçlar Tablo 3.2’de gösterilmiştir. Buna göre, 34 izolatın tamamının Gram (+) özellikte olduğu ve Basil morfoloji gösterdiği görülmüştür.

Tablo 3.2. Kefirden elde edilen izolatların gram boyanma ve morfolojik özellikleri

İzolat numarası	Gram özelliği	Hücre şekli
K2-21, KM4-1, KM1-2, K2-10, K2-4, K2-11, KM2-7, K2-14, K2-19, K2-2, K2-20, KM1-3, KM3-14, K2-15, KM1-1, K2-19, K2-7, K2-20, K2-21, KM4-1, K2-10, KM5, K2-7, K2-13, K2-3, K2-22, K2-1, K2-23, K2-6, K2-16, K2-17, K2-8, K2-2, KM4-3, KM1-17, KM1-1, KM3-13	(+)	Basil

Sonuç olarak; Kefir ve Anne sütünden izole edilmiş toplamda 81 izolata gram boyama ve mikroskopik inceleme yapılmış olup, bu doğrultuda, toplam 47 izolat gr (+) Kok, 34 izolat gr (+) Basil özelliği göstermiştir.

İn-vitro hücre kültürü deneylerinde kullanılan KM3-14 ve KM2-7 Gram boyama yapıldıktan sonra ışık mikroskopunda 100x büyütme ile görüntülenerek koloni morfolojilerinin basil formda oldukları görülmüştür (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. KM3-14 (A) KM2-7 (B) izolatlarının ışık mikroskobu görüntüsü (100x)

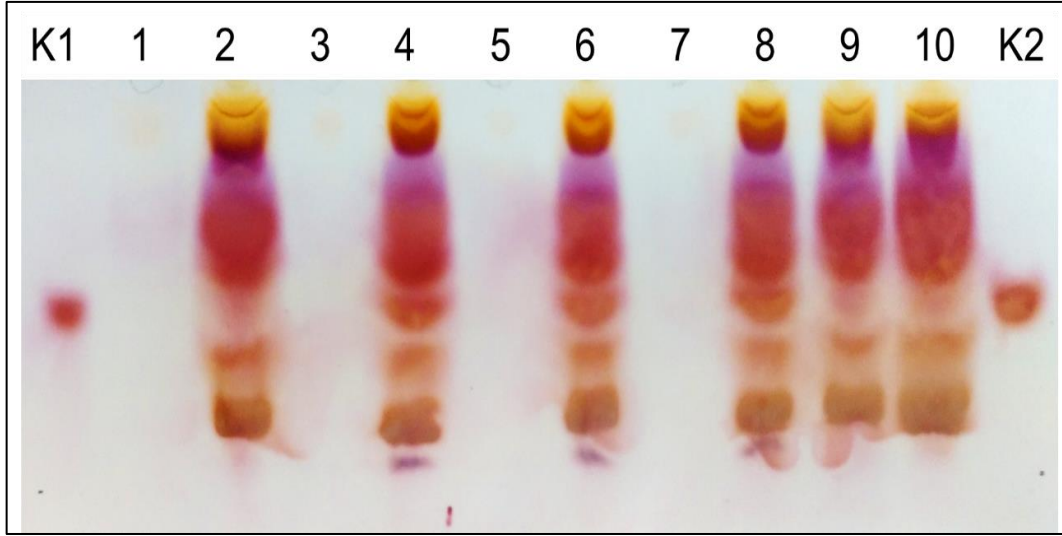
3.3. Bakterilerin Moleküler Tanılama Bulguları

Çalışmada kullanılan bakteri izolatlarından 3'ü olan KM2-7, Km3-14 ve KM4'ün 16s rRNA dizi analizi tamamlanmış ve elde edilen sekans bilgileri Genbank

veritabanında diğ er 16s rRNA sekans verileri ile karşılaştırılmıştır. Buna göre, hücre kültürü deneylerinde kullanılan KM2-7 izolatu *L. brevis* (Acs: MN400226.1, benzerlik %99,72) ve aynı şekilde KM3-14 izolatu da *L. brevis* (Acs: JQ741972.1, benzerlik %99,58) olarak tanılanmıştır. KM4 izolatu ise *L. plantarum* (Acs. MG739434.1 benzerlik %99,71) olarak belirlenmiştir. Hücre kültürü deneylerinde kullanılan her iki KM2-7 ve KM3-14 izolatının da *L. brevis* türleri olduğu görülmüş ve laktik asit bakterileri  yeleri oldukları teyit edilmiştir.

3.4. Bakteri Filtratlarının GABA  retim Kapasitelerinin  nce Tabaka Kromotografisiyle Analizi Bulguları

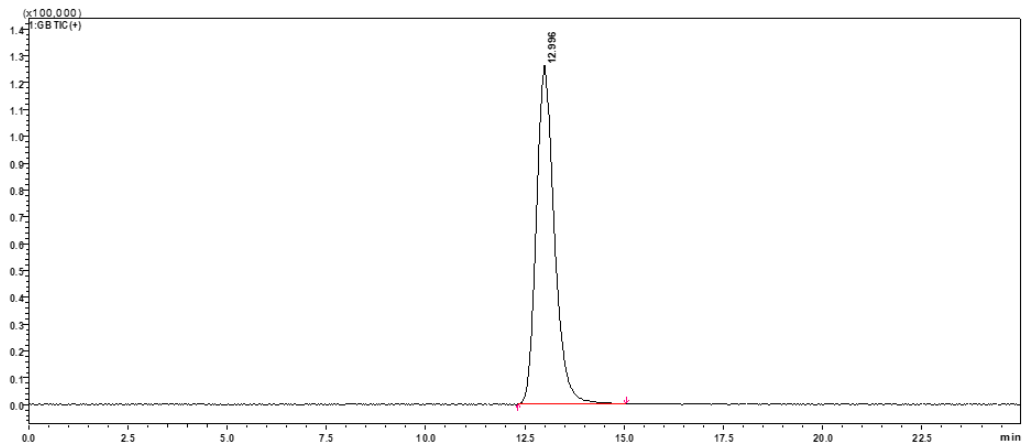
Elde edilen bakteri filtratları içinde GABA'nın nitel olarak analiz edilebilmesi için önce Tabaka Kromotografisi yöntemi kullanılmıştır. Silika membran üzerine 20'şer  l olmak koşuluyla eşit miktarda yüklenen örneklerin GABA  retim kapasiteleri kıyaslanmıştır. Reaksiyon sonucunda oluşan bantlara bakılarak GABA standardının hizasında bant oluşumu gösteren örnekler belirlenmiştir. şekil 3.2'deki Silika membran sonucuna göre, kefire ait izolatlardan K2-19, KM3-14, KM2-7 numaralı bakteri filtratlarına ait süpernatant örnekleri (hücre dışı) pozitif kontrolle karşılaştırıldığında, GABA'ya ait güçlü bantlara sahip oldukları g r lm ştir. KM1-1 KM1-17, KM3-13 örneklerinde ise zayıf bantlar gözlenmiştir. Pelet (Hücre içi)  rneklerinde ise GABA'ya ait olabilecek bantlar görülmemiştir.



Şekil 3.2. TLC Analiz Görüntüsü. **K1:** GABA Pozitif Kontrol 1 μ l, **1:** Km1-1 Hücre İçi Ekstrakt 20 μ l, **2:** Km1-1 Hücre Dışı Ekstrakt 20 μ l, **3:** K2-19 Hücre İçi Ekstrakt 20 μ l, **4:** K2-19 Hücre Dışı Ekstrakt 20 μ l, **5:** Km3-14 Hücre İçi Ekstrakt 20 μ l, **6:** Km3-14 Hücre Dışı Ekstrakt 20 μ l, **7:** Km2-7 Hücre İçi Ekstrakt 20 μ l, **8:** Km2-7 Hücre Dışı Ekstrakt 20 μ l, **9:** Km3-13 Hücre Dışı Ekstrakt 20 μ l, **10:** Km1-17 Hücre Dışı Ekstrakt 20 μ l, **K2:** GABA Pozitif Kontrol 20 μ l

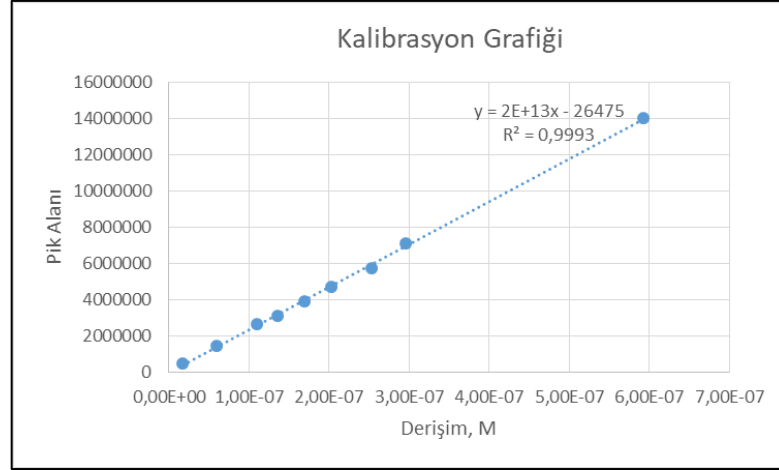
3.5. LC-MS/MS Yöntemiyle GABA Miktarının Belirlenmesi

İnce tabaka kromatografisi bulgularına ek olarak, seçilen izolatlarda GABA varlığının Kütle Spektroskopisi (MS) yöntemiyle analiz edilebilmesi için, ticari GABA standardından kalibrasyon okutması yapılmış olup elde edilen bu standarda ait MS spektrumu Şekil 3.3'te yer almaktadır.



Şekil 3.3. GABA standart çözeltisinin MRM + Mod için kütle spektrumu

Örneklerdeki GABA'nın Molar derişim yönünden miktarını elde edebilmek için belirlenen konsantrasyonlardaki GABA örneklerinin karşılık geldiği MS spektrumdaki pik alanları kullanılarak Şekil 3.3'teki kalibrasyon grafiği oluşturulmuş olup, analiz edilen seçilmiş izolatlardaki MS kütle spektrumundan elde edilen pik alanları kullanılarak örneklerdeki GABA'nın molar derişimi hesaplanmıştır (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. GABA derişim kalibrasyon grafiği

Buna göre, mikroskobik analizleri gerçekleştirilmiş izolatlardan seçilen örneklerin GABA varlığının ve bu varlığın molar derişim hesabı, MS spektrumu üzerinden gerçekleştirilmiş olup, elde edilen bulgulara göre, süpernatant gruplarında $\mu\text{g GABA/mg}$ çözelti düzeyinde en fazla GABA içeren 5 filtrat KM3-14, K2-20 ve KM2-7, K2-19 ve KM1-3 olmuştur (Tablo 3.3).

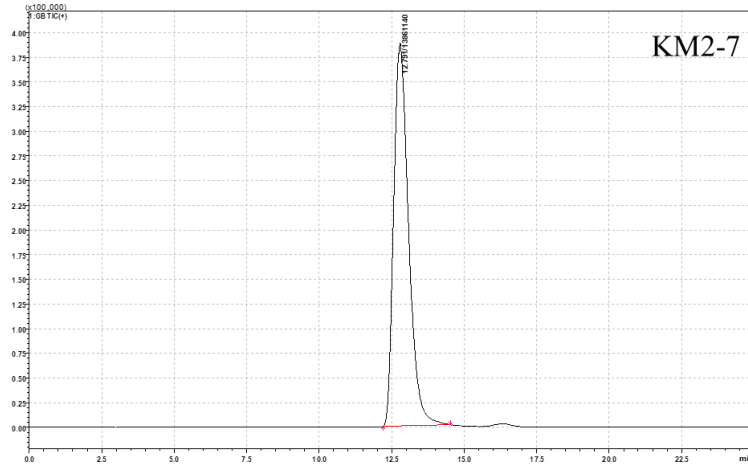
Tablo 3.3. Süpernatant (hücre dışı) örneklerde en fazla GABA içeren filtratlar ve GABA derişim miktarları

Numune	Pik Alanı	Derişim	Ortalama Derişim, M	µg GABA/mg çözelti
KM2-7	13861140	5,88316E-07		
KM2-7	13381031	5,67977E-07	5,76417E-07	0,050803501
KM2-7	13498604	5,72958E-07	1,06014E-08	0,000934372
K2-19	14238679	6,04309E-07		
K2-19	14490667	6,14984E-07	6,02923E-07	0,050547483
K2-19	13888515	5,89475E-07	1,28107E-08	0,00107402
KM3-14	12674116	5,3803E-07		
KM3-14	12748759	5,41192E-07	5,36881E-07	0,053233824
KM3-14	12518095	5,31421E-07	4,98609E-09	0,00049439
KM1-3	11724899	4,97819E-07		
KM1-3	11586850	4,91971E-07	4,89713E-07	0,046543044
KM1-3	11288910	4,79349E-07	9,43955E-09	0,000897149
K2-20	12755861	5,41493E-07		
K2-20	12506460	5,30928E-07	5,32095E-07	0,053168267
K2-20	12339723	5,23864E-07	8,87213E-09	0,000886525

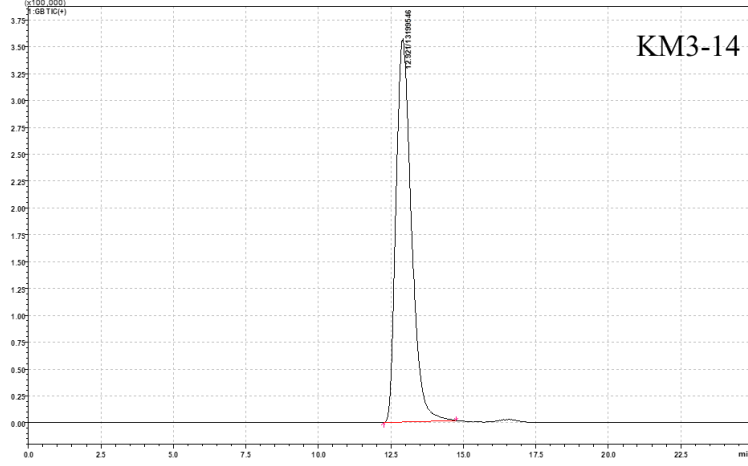
Seçilen KM2-7 ve KM3-14 filtratlarındaki GABA'ya ait MS Spektrum pikleri ise Şekil 3.5'te gösterilmiş olup bu örneklerin GABA içerdikleri MS pikleri üzerinden teyit edilmiştir.

KM3-14, K2-19, KM1-3 ve KM2-7 pelet örneklerinde (Hücre dışı) MS spektrofotometrik analiz sonucunda GABA'ya ait pik elde edilmemiştir. Aynı şekilde, bakterilerin inkübasyonunda kullanılan MRS besiyerinde, 3T3-L1 hücre hattının besiyeri olan DMEM High Glucose besiyerinde de beklendiği üzere pik elde edilmemiştir. LC MS/MS analizinde elde edilen tüm bu verilerin ile TLC analizi bulgularıyla uyumlu olduğu görülmüştür.

A



B

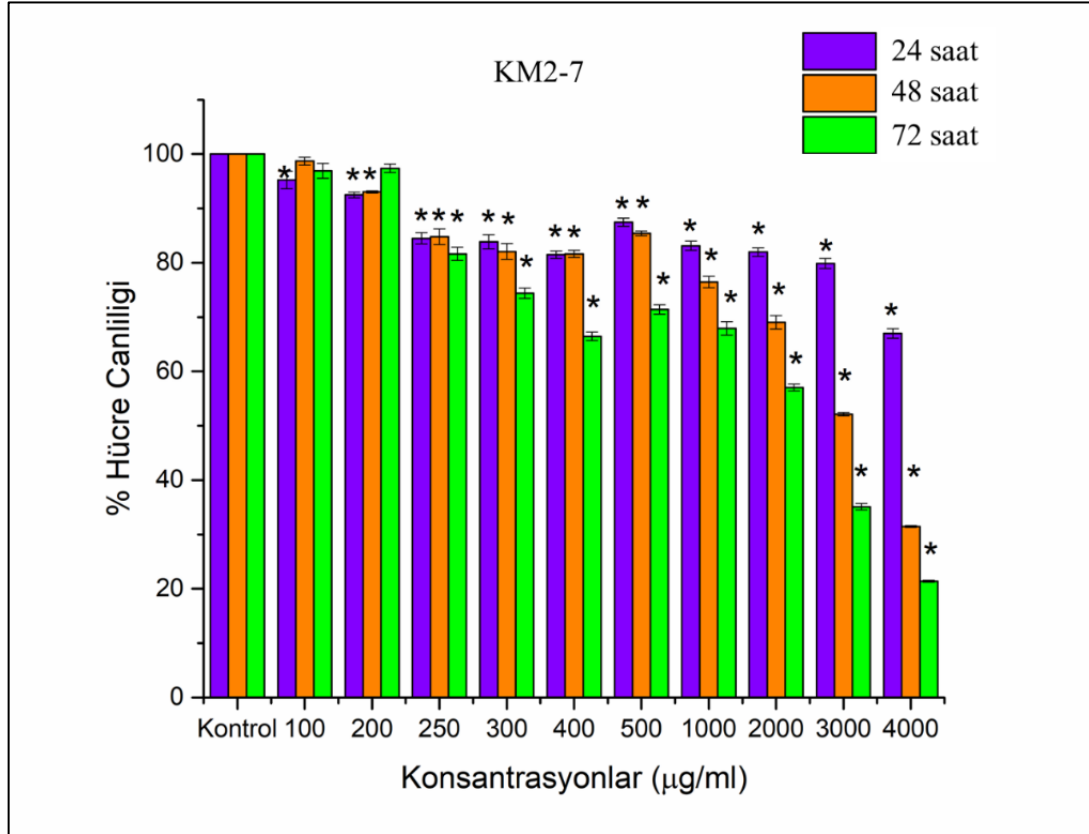


Şekil 3.5. KM2-7 (A) ve KM3-14 (B) filtratlarındaki GABA'ya ait MS spektrum pikleri

3.6. MTT Sitotoksosite Testi Bulguları

Test maddelerinin konsantrasyonlara bağlı olarak hücre canlılığına olan etkisi MTT testi ile analiz edilmiştir. Buna göre, KM2-7 filtratının 3T3-L1 hücre hattı üzerine MTT sitotoksosite testi SPSS analizi değerlendirildiğinde, 24 saatlik deney sonunda 100, 200, 250, 300, 400, 500, 1000, 2000, 3000, 4000 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonlarının tamamında % hücre canlılığı açısından sırasıyla -4,7*, -7,5*, -15,5*, -16,1*, -18,5*, -12,5*, -16,8*, -18,0*, -20,1*, 33,0* yüzde değişim değerleri elde edildiği görülmüş olup tüm değişimler istatistiksel olarak anlamlıdır. 48 saatlik deney bulgularında ise aynı konsantrasyonlarda sırasıyla -1,28, -6,9*, -15,2*, -17,9*, -18,3*, -14,5*, -23,5*, -30,9*, -47,8*, -68,5* % canlılık değişimleri görülmüş olup sadece 100 $\mu\text{g/ml}$ 'deki değişim istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. 72 saatlik son grupta ise, istatistiksel olarak konsantrasyonlarda sırasıyla -3,0, -2,6, -18,3*, -25,6*, -33,5*, -28,6*, -32,0*, -42,9*, -64,9*, -78,6* yüzde

canlılık değişimleri elde edilmiş ve 100 ile 200 µg/ml'deki değişimler anlamlı bulunmamıştır. Buna göre en fazla sitotoksik etki gösteren konsantrasyonlar 3000 ve 4000 µg/ml olduğu görülmüştür (Tablo 3.4) (Şekil 3.6).

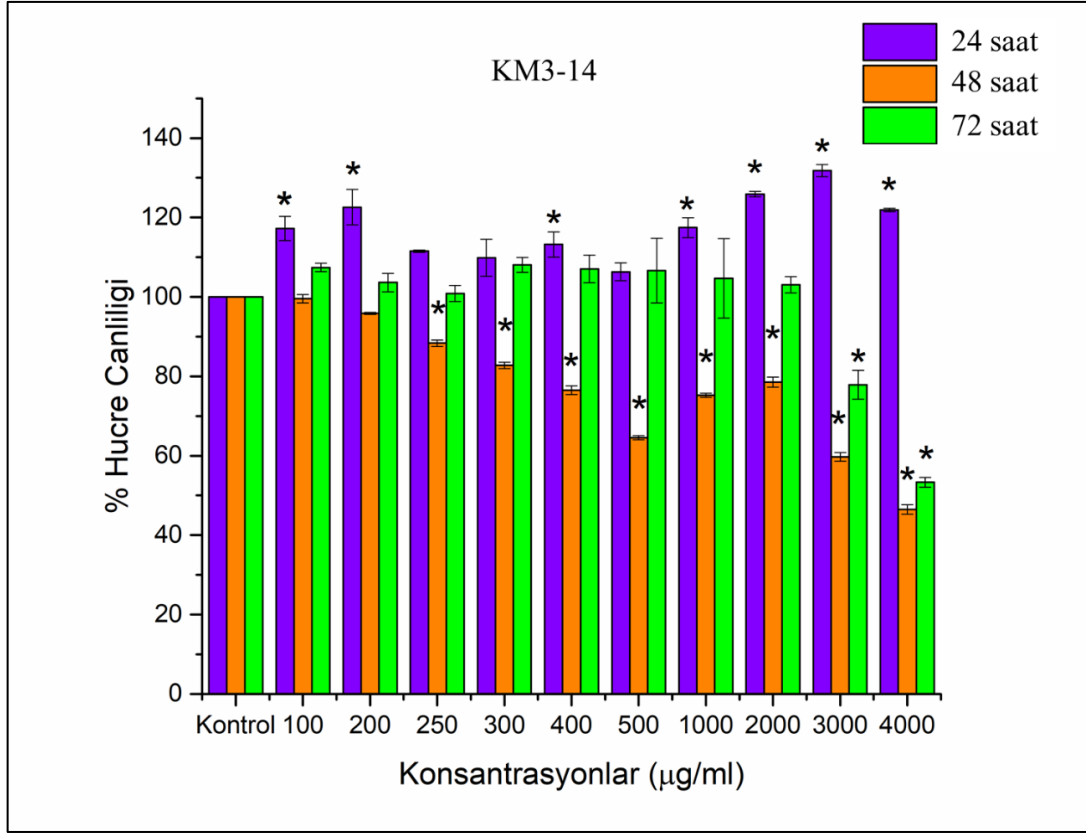


Şekil 3.6. KM2-7 filtratının 3T3-L1 hücre hattı üzerine MTT sitotoksikite testi. Kontrol grubuna göre anlamlı olan farklılıklar (*) ile gösterilmiştir. Veriler ortalama $\pm$ SE şeklinde gösterilmiştir. Anlamlılık değeri $p < 0.05$ 'tir.

Tablo 3.4. KM2-7 Filtratının 3T3-L1 hücrelerinde konsantrasyona bağlı yüzde canlılık değişim etkisi (Yüzde değişimler kontrol grubuna göre karşılaştırılmış olup kontrol grubuna göre anlamlı olan farklılıklar (*) ile gösterilmiştir).

KM 2-7 Konsantrasyonlara Bağlı 3T3-L1 % Canlılık Değişimi			
Kons. (µg/ml)	24 saat	48 saat	72 saat
100	-4,7*	-1,28	-3,0
200	-7,5*	-6,9*	-2,6
250	-15,5*	-15,2*	-18,3*
300	-16,1*	-17,9*	-25,6*
400	-18,5*	-18,3*	-33,5*
500	-12,5*	-14,5*	-28,6*
1000	-16,8*	-23,5*	-32,0*
2000	-18,0*	-30,9*	-42,9*
3000	-20,1*	-47,8*	-64,9*
4000	33,0*	-68,5*	-78,6*

KM3-14 filtratının 3T3-L1 hücre hattı üzerine MTT sitotoksikite testi SPSS analizi incelendiğinde ise, 24 saatlik deney sonunda 100, 200, 250, 300, 400, 500, 1000, 2000, 3000, 4000 µg/ml konsantrasyonlarının tamamında yüzde hücre canlılığı açısından sırasıyla 17,2*, 22,6*, 11,5, 9,8, 13,2*, 6,3, 17,4*, 25,9*, 31,8*, 21,8* yüzde değişim değerleri elde edildiği görülmüş olup 250, 300 ve 500 µg/ml konsantrasyonlarındaki canlılık değişimleri anlamlı olmamıştır. 48 saatlik deney bulgularında ise aynı konsantrasyonlarda sırasıyla -0,4, -4,1, -11,6*, -17,2*, -23,5*, -35,4*, -24,7*, -21,4*, -40,3*, -53,5* yüzde canlılık değişimleri görülmüş ve 100 ve 200 µg/ml'deki değişim istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. 72 saatlik son grupta ise, konsantrasyona bağlı sırasıyla 7,4, 3,6, 0,8, 8,0, 7,0, 6,6, 4,6, 3,0, -22,1*, -46,6* yüzde canlılık değişimleri elde edilmiş, fakat sadece 1000 ile 2000 µg/ml'deki değişimler anlamlı olmuştur. Buna göre hücre canlılığına KM3-14 filtratı, KM2-7 filtratının aksine, 24 ve 48 saatte genel olarak hücre sayısında artış meydana getirdiği görülmektedir (Tablo 3.5) (Şekil 3.7). Uygulanan madde konsantrasyonları içerisinde hücre canlılığına yüksek sitotoksik etkisi olanlar 3000 ve 4000 µg/ml olarak belirlenmiştir.



Şekil 3.7. KM3-14 filtratının 3T3-L1 hücre hattı üzerine MTT sitotoksosite testi. Kontrol grubuna göre anlamlı olan farklılıklar (*) ile gösterilmiştir. Veriler ortalama $\pm$ SE şeklinde gösterilmiştir. Anlamlılık değeri $p < 0.05$ 'tir.

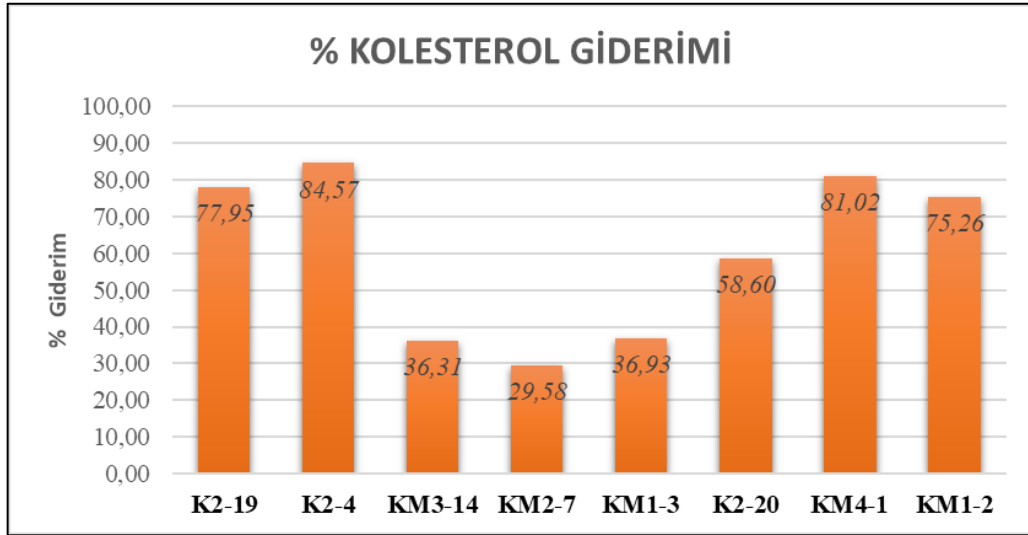
Tablo 3.5. KM3-14 filtratının 3T3-L1 hücrelerinde konsantrasyona bağlı yüzde canlılık değişim etkisi. (Yüzde değişimler kontrol grubuna göre karşılaştırılmış olup kontrol grubuna göre anlamlı olan farklılıklar (*) ile gösterilmiştir.)

KM 3-14			
Konsantrasyona Bağlı 3T3-L1 % Canlılık Değişimi			
Kons. (µg/ml)	24 saat	48 saat	72 saat
100	17,2*	-0,4	7,4
200	22,6*	-4,1	3,6
250	11,5	-11,6*	0,8
300	9,8	-17,2*	8,0
400	13,2*	-23,5*	7,0
500	6,3	-35,4*	6,6
1000	17,4*	-24,7*	4,6
2000	25,9*	-21,4*	3,0
3000	31,8*	-40,3*	-22,1*
4000	21,8*	-53,5*	-46,6*

3.7. İzolatların Kolesterol Giderim Testi Bulguları

Bakteri izolatlarının kolesterol giderim aktivitesini belirleyebilmek için kontrol grubu ile karşılaştırmalı yüzde giderim değerleri spektrofotometrik değerler baz alınarak standart kolesterol formülü üzerinden hesaplanmıştır.

Buna göre, elde edilen yüzde kolesterol giderim sonuçları Tablo 3.3'te özetlenmiştir. Elde edilen bulgulara göre izolatlar, kolesterol giderim kapasitelerine göre büyükten küçüğe olarak K2-4, KM4-1, K2-19, KM1-2, K2-20, KM1-3 KM3-14 ve KM2-7 şeklinde sıralanmıştır. İlk 4 grup %84,57, %81,02, %77,95 ve %75,26 giderim yüzdelerine sahipken, en yüksek giderim kapasitesi %84 ile K2-4'te, en düşük giderim kapasitesi %29,58 olarak KM2-7 izolatında gerçekleşmiştir (Şekil 3.8).



Şekil 3.8. İzolatların yüzde kolesterol giderim ölçümü. Örnekler MRS Broth içerisinde %0,3 Ovgall ve 100µg/ml final konsantrasyonda kolesterol varlığında inkübe edilmiştir. (Değerler, kontrol grubuna göre kolesterol miktarındaki azalmanın yüzde olarak karşılığını göstermektedir.)

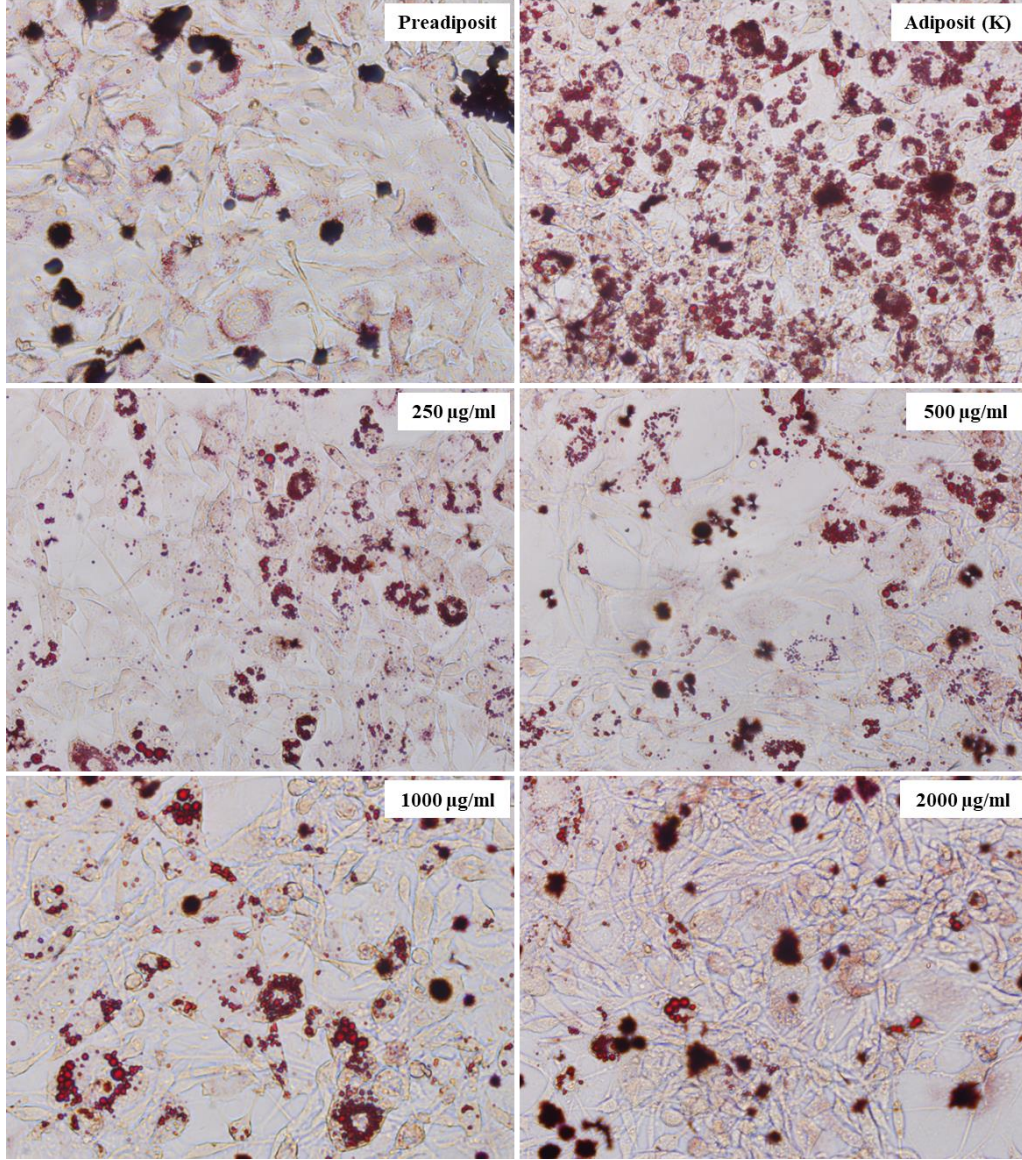
3.8. Oil Red O Boyama Bulguları

KM2-7 ve KM3-14 filtratlarının 3T3-L1 adipositlerinde adipojeniz ve yağ birikimi üzerine etkisinin farklı konsantrasyonlardaki analizi için Oil-Red O boyama gerçekleştirilmiştir. Buna göre, KM2-7 filtratının 6.gündeki yağ birikimi üzerine etkisi incelendiğinde, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, konsantrasyon artışına bağlı olarak hücrelerde adipojeniz baskılanmasına bağlı olarak yağ birikiminin azaldığı gözlemlenmiştir (Şekil 3.9). KM2-7 filtratının 8.gündeki yağ birikimi etkisi

incelendiğinde ise, kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında, konsantrasyon artışına bağlı olarak hücrelerde adipojeniz baskılanması ile yağ birikiminin azaldığı inverted mikroskop görüntülerinde tespit edilmiştir (Şekil 3.10). Yağ birikimini baskılama açısından en etkili konsantrasyonlar 1000 ve 2000 $\mu\text{g/ml}$ olarak belirlenmiştir.

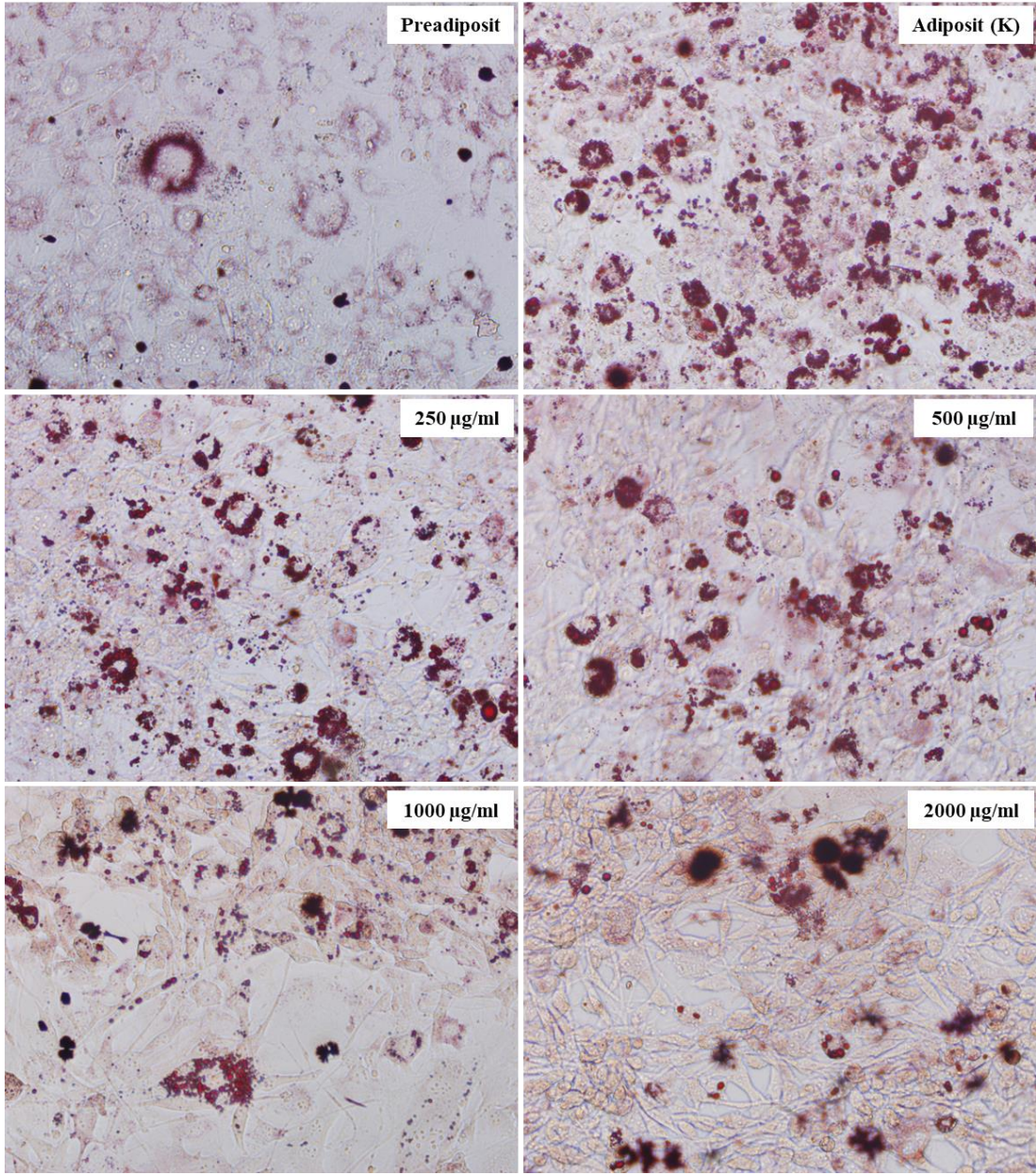
KM3-14 filtratının yağ birikimi üzerine yaptığı etkiye bakıldığında ise, 6. günde 250 ve 500 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonlarda KM2-7 filtratına göre daha az yağ birikimi olduğu gözlenmiştir. 250 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonda 500 μg 'a göre daha az yağ birikimi olduğu sonucuna varılmıştır. 8. günde ise 250 ve 500 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonlarında 6. güne benzer yağ birikimi görülmüştür (Şekil 3.11). Elde edilen sonuçlarda, 6. günde etkili konsantrasyon 250 $\mu\text{g/ml}$ iken 8. günde 500 $\mu\text{g/ml}$ olarak belirlenmiştir

KM2-7 6.Gün Oil Red O Boyama



Şekil 3.9. KM2-7 6.gün Oil Red O boyama inverted mikroskop görüntüleri (40x).

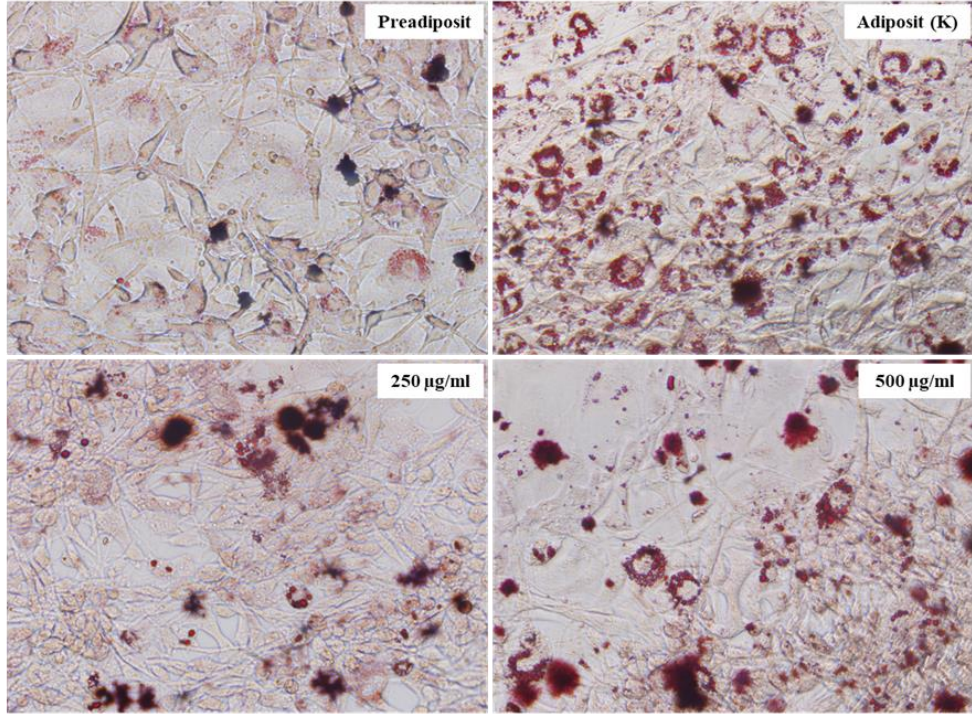
KM2-7 8.Gün Oil Red O Boyama



Şekil 3.10. KM2-7 8.gün Oil Red O boyama inverted mikroskop görüntüleri (40x).

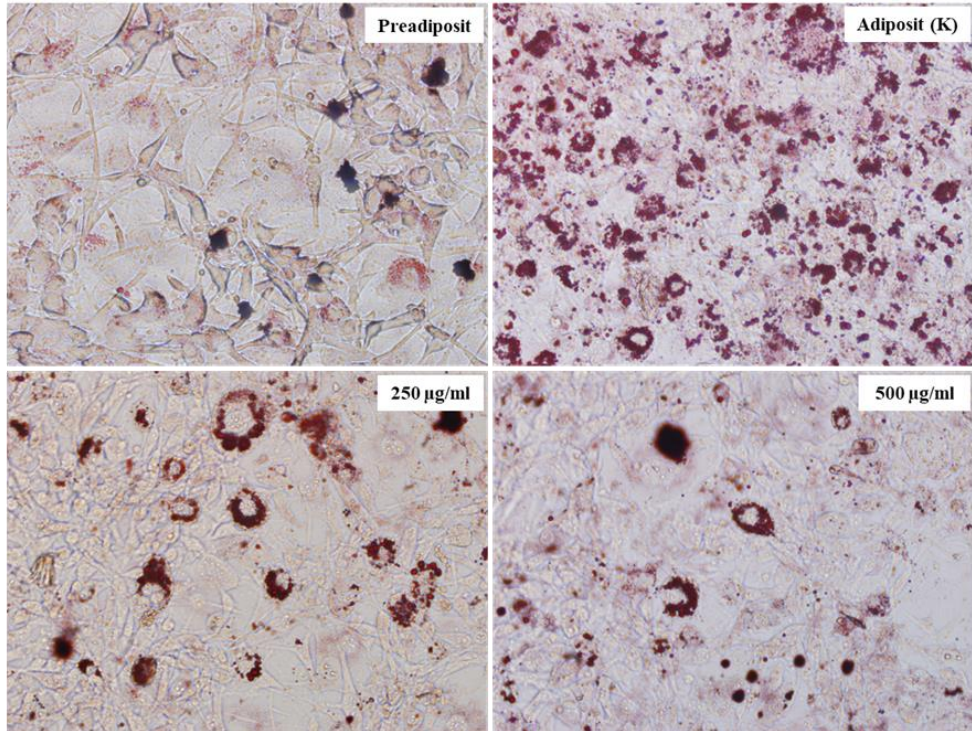
A

KM3-14 6.Gün Oil Red O Boyama



B

KM3-14 8.Gün Oil Red O Boyama



Şekil 3.11. KM3-14 6.gün (A) ve 8.gün (B) Oil Red O boyama inverted mikroskop görüntüleri (40x).

4. TARTIŞMA

Obezite, aşırı miktarda yağ birikimi ile karakterize olan bir durumdur. Özellikle beyaz yağ dokusunda aşırı yağ birikimi ile karakterize edilmektedir (Ng vd., 2014). Obezitenin ortaya çıkış derecesi, hücresel düzeyde preadipositlerin adipositlere olan dönüşümü ve adipoz dokunun hacim kazanması ile belirlenmektedir (Park vd., 2013). Bununla birlikte, obezitenin tip 2 diyabet, kolesterol, hipertansiyon, kardiyovasküler hastalıklar gibi kronik hastalıkların ortaya çıkışı veya gelişimi ile doğrudan veya dolaylı olarak ilişkisi göz önüne alındığında adipojenez ve adipoz dokunun oluşumu ile ilgili yapılan çalışmalar literatürde önem kazanmaktadır.

Kolesterol ise, hayvansal kaynaklı besinlerle alınan, metabolizmada doğal olarak bulunan sterol bir bileşiktir. Metabolizmada doğal olarak bulunsa bile insan kanında kolesterol miktarının yükselmesinin koroner kalp hastalıkları, ateroskleroz, felç gibi hastalıklar için risk faktörü oluşturmaktadır (Blesso ve Fernandez, 2018). İnsanda metabolizmada yer alan kolesterolün dengede tutulması veya fazla kolesterolün vücut içerisinde giderimi insan sağlığı açısından çok önemlidir.

İnsanlarda obezite ve kolesterol yüksekliğinin kontrol altına alınabilmesi için literatürde farklı çalışmalar bulunmaktadır. Obezite için, popüler olan yaklaşım, GABA üreten Laktik asit bakterilerinin insana probiyotik takviyesi olarak verilmesi veya besinlere bu bakterilerden katkı maddesi eklenmesi ve bunun etkilerinin araştırılmasıdır. Özellikle GABA'nın nörotransmitter bir molekül olması sebebiyle enerji metabolizmasına etki ettiği bilinmektedir (Dhakal, Bajpai ve Baek, 2012). GABA üreten laktik asit bakterilerinin (LAB) adipojenez üzerinde etki ederek adiposit oluşumunu ve yağ birikimini düzenleyici etki göstermesi beklenmektedir.

Literatürde yapılan çalışmalara bakıldığında GABA üreten laktik asit bakteri suşlarının adipojenezi baskıladığı ve yağ oluşumunu engellediğine dair farklı çalışmalar vardır (Moon vd., 2012; Park vd., 2013; Park vd., 2014; Park vd., 2014). Bu çalışmalarda elde edilen bulgular, GABA üreten laktik asit bakterilerinin, hücre içindeki lipid birikimini adipojenez bağlantılı genleri baskılayarak azalttığını göstermiştir. Ayrıca, hücre içi trigliserit depolanmasını azalttıkları ve GPDH aktivitesinin baskılayıcı etki gösterdikleri bildirilmiştir. Bu etki, hücre içi yağ birikimini ve obeziteyi baskılama açısından önemli bir mekanizma olarak değerlendirilmektedir.

Çalışmada kullanılan bakteri filtratlarının mikroskopik analizleri değerlendirildiğinde, kok ve basil formdaki örnekler dikkate alınmıştır. Bu örnekler KM5, TM17, TM8, TM14, K6, TN4, TM3, K17, K16, TM2, TM6, TM5, TM9, TM16, K14, K2, TN3, TM13, K21, TM11, TM7, TM15, TM4, K19, K18, K9, K3, KM6, K13, TM1, K7, K15, TM18, K20, K4, K5, TM12, TM3, K17, TM8, TM9, TM11, TM10, KM1-2, KM1-3, KM1-9, KM2-7 (Anne Sütü Suşları) ve K2-21, KM4-1, KM1-2, K2-10, K2-4, K2-11, KM2-7, K2-14, K2-19, K2-2, K2-20, KM1-3, KM3-14, K2-15, KM1-1, K2-19, K2-7, K2-20, K2-21, KM4-1, K2-10, KM5, K2-7, K2-13, K2-3, K2-22, K2-1, K2-23, K2-6, K2-16, K2-17, K2-8, K2-2, KM4-3, KM1-17, KM1-1, KM3-13 (Kefir Kaynaklı) olarak kodlanmış tüm bu suşların bakteri oldukları teyit edilmiş ve bu örneklerle ait filtratlarda GABA TLC analizi tamamlanmıştır. GABA'nın filtratlardaki varlığı ince tabaka kromatografisiyle analiz edildiğinde elde ettiğimiz bant profilleri literatürdeki diğer çalışmalar ile uyumlu olmuş ve özellikle kefir örneklerine ait filtratlardan elde edilen süpernatant örneklerinde GABA varlığı teyit edilmiştir (Moon vd., 2012; Park vd., 2013). Anne sütü kaynaklı örneklerle ait filtratlarda ise Kefir örneklerinde olduğu gibi TLC'de GABA varlığını gösteren kalın bantların elde edilmesi beklenmiş ise de elde edilen bulgular bu suşlardaki GABA üretiminin düşük seviyede olduğunu işaret etmektedir.

Çalışmamızda GABA üretim seviyeleri en yüksek olan 5 filtrat KM2-7 (0,050 µg/mg), K2-19 (0,050 µg/mg), KM3-14 (0,053 µg/mg), KM1-3 (0,046 µg/mg), K2-20 (0,053 µg/mg) olarak belirlenmiş ve belirtilen süpernatant GABA miktarları yapılan diğer çalışmalar ile karşılaştırılmıştır. Buna göre, Dhakal ve arkadaşlarının ortaya koyduğu verilere göre farklı laktik asit suşları ve farklı büyüme ortamları kullanılarak gerçekleştirilen çalışmalarda 0,015 µg/ mg ile 0,258 µg/ mg arasında GABA üretim miktarları bildirilmiştir (Dhakal, Bajpai ve Baek, 2012). Elde ettiğimiz Süpernatant örneklerindeki GABA üretim değerleri bu veriler ile karşılaştırıldığında, filtrat örneklerimizin GABA üretim kapasitelerinin belirtilen değerler ile uyum gösterdiği ve örneklerimizin bazı suşlara göre GABA üretimi açısından yüksek üretim gösterdikleri görülmüştür.

Çalışmada seçilen 8 adet bakteri filtratlarının kolesterol giderim kapasitelerinin belirlenmesi için literatürde önerilen spektrofotometrik yöntem takip edilerek yüzde kolesterol giderim değerlerinin kontrole göre anlamlılığı karşılaştırılmıştır. Buna göre

özellikle Km3-14 (%36), Km2-7 (%29), Km1-3 (%36) ve K2-20 (%28) filtratlarının yüzde kolesterol giderim kapasiteleri %28 ile %58 arasında meydana gelmiştir. Literatürde kolesterol giderimi ile ilgili yapılan benzer çalışmalara bakıldığında ise, Albano ve arkadaşlarının bazı laktik asit suşlarının (*L. casei*) *in vitro* kolesterol giderim kapasitesini belirlemeye yönelik gerçekleştirdikleri çalışmada, spektrofotometrik yöntemle belirlenen suşların kolesterol giderim kapasitelerinin %50 ile %20 giderim yüzdesi arasında dağılım gösterdikleri bildirilmiştir (Albano vd., 2018). Kolesterol giderimi ile ilgili diğer bir çalışmada, Shinobu ve arkadaşları farklı laktik asit suşlarının kolesterol giderim kapasitesini miktar ve yüzde giderim olarak analiz etmiş olup, elde ettikleri sonuçlara göre belirledikleri *Lactobacillus* suşlarında giderim düzeyleri maksimum %64 ve minimum %2 olarak bildirilmiştir (Shinobu, Takuya ve Genji, 2012). Lim ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği diğer bir çalışmada ise, farklı *Streptococcus*, *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* suşlarında *in vitro* yüzde kolesterol giderimi analiz edilmiş ve elde edilen sonuçlara göre özellikle *Lactobacillus* suşlarındaki yüzde kolesterol giderim değerleri %30 ile %50 değerleri arasında yer almıştır (Lim, Kim ve Lee, 2004).

Farklı çalışmalardaki belirtilen kolesterol giderim değerleri bulguları göz önüne alındığında, izolatlarımızın kolesterol giderim seviyeleri için %58 ve altındaki giderim yüzdelерinin literatürdeki çalışmalar ile uyumlu olduğu sonucuna varılmıştır. Tüm bu veriler, özellikle farklı laktik asit bakteri suşlarının kolesterol giderimi açısından değişken yüzde giderim kapasitelerine sahip olduklarını göstermiştir. %58'in üzerinde Kolesterol giderimine sahip filtratlar için literatürde destekleyici veri bulunamamıştır. Bu örneklerdeki yüzde giderimlerin yüksek olmasının anlamlı yüksek aktiviteden veya spektrofotometrik ölçümdeki muhtemel artefaktlardan dolayı olabileceği düşünülmektedir.

Çalışmada kullanılan bakteri filtratlarının 3T3-L1 hücre hattı üzerinde olası sitotoksik etkisini belirleyebilmek için uygulanan MTT sitotoksitesite testinde, preadiposit hücrelerinin bakteri filtratları (KM2-7 ve KM3-14) ile 24-48-72 saat inkübasyonu tamamlanmıştır. Preadipositlere uygulanan MTT testindeki inkübasyon süresi 72 saatle sınırlandırılmış olup bu yöntem literatürdeki bazı çalışmalarla bütünlük göstermektedir (He vd., 2013; Kim vd., 2014). Elde edilen sitotoksitesite verilerine göre, preadiposit hücreleriyle bakteri filtratlarının 72 saatlik inkübasyonunda istatistiksel anlamı olarak

hücre sayısında bir miktar azalma meydana gelmiş olsa da 2000, 3000, 4000 µg/ml filtrat konsantrasyonları hariç diğer konsantrasyonlarda çok dramatik düşüşler gözlenmemiştir. KM3-14 filtratlarına ait MTT sitotoksite bulguları KM2-7'den farklı olarak hücrelerde bir miktar proliferasyon meydana geldiğini göstermektedir. Bu durum kullanılan farklı izolatların farklı aktiviteye sahip olduğunu göstermektedir.

3T3-L1 preadipositleri konfluent hale geldikten sonra farklılaştırma maddeleri ve belirlenen filtratlar ile 2 günde bir muamele edilerek hücrelerin inkübasyon süreleri 6 ve 8 gün olarak ayarlanmıştır. Belirtilen inkübasyon süreleri içerisinde preadipositlerin adiposite dönüşümünün bakteri filtratları tarafından etkilenip etkilenmediği ve adiposit oluşumu Oil Red O boyama ile mikroskopik olarak değerlendirilmiştir. Beklenen etki olarak preadipositlerin adipositlere olan dönüşümünün baskılanması öngörülmüştür. Elde edilen bulgular değerlendirildiğinde, her iki deney grubunda 6. ve 8. günlere ait mikroskop görüntülerinde preadipositlerin adiposite dönüşümünün baskılandığı görülmüş olup elde edilen bulgular öngörümüz ile uyumlu olmuştur.

Bakteri filtrat örneklerimizin Adipojenez üzerine olan bu etkileri, diğer çalışmalarla karşılaştırıldığında; Park ve arkadaşları, *Lactobacillus brevis* ve *Lactobacillus plantarum* suşları kullanarak 3T3-L1 hücrelerinde adipojenezin baskılanma düzeyini Oil-Red-O boyama ile farklı madde konsantrasyonlarında analiz etmiş ve her iki çalışmada elde ettikleri bulgular artan örnek konsantrasyonunun Adipojenez oluşumunu baskıladığını göstermiştir (Park vd., 2013; Park vd., 2014). Elde edilen bu verilere göre, her ne kadar kullandığımız madde konsantrasyonları bu çalışmalara göre yüksek seviyede uygulanmış olsa da çalışmamızda artan konsantrasyona bağlı olarak adiposit oluşumunun baskılanması görülmüş ve 3T3-L1 hücrelerinde adipojenezi baskılayıcı etkisi açıdan belirtilen çalışmalarla uyumluluk elde edilmiştir.

Elde edilen veriler özetlendiğinde, çalışmamızda kullanılan kefir örneklerine ait filtratlardan elde edilen süpernatant örneklerinde GABA varlığı teyit edilmiştir. Bu filtratlar içerisinde GABA üretim seviyeleri en yüksek olan 5 filtrat KM2-7 (0,050 µg/mg), K2-19 (0,050 µg/mg), KM3-14 (0,053 µg/mg), KM1-3 (0,046 µg/mg), K2-20 (0,053 µg/mg) olarak görüşmüş ve bu miktarların diğer çalışmalardaki miktarlar ile uyumlu oldukları sonucuna varılmıştır. Yüzde kolesterol giderimi açısından Km3-14, Km2-7 Km1-3 ve K2-20 filtratlarının yüzde kolesterol giderim kapasitelerinin %20 ile %50 arasında olduğu ve benzer çalışmalarla karşılaştırıldığında bu yüzdelerin optimal

aralıkta yer aldıkları sonucuna varılmıştır. Filtrat örneklerinin adipojenez üzerine etkisi analiz edildiğinde ise artan konsantrasyona bağı olarak adiposit oluşumunun baskılandığı görülmüş ve 3T3-L1 hücrelerinde adipojenezi baskılayıcı etkisi açıdan literatürdeki çalışmalarla paralel sonuçlar elde edilmiştir. Bu sonuçlar, çalışmada kullanılan filtratların, öngörülen etkiler açısından anlamlı aktivitelere sahip olduklarını ortaya koymuştur.

5. SONUÇ

Bu çalışmada, laktik asit bakteri filtratlarının anti-kolesterol ve 3T3-L1 hücre hattı üzerindeki anti-obezite etkileri araştırılmıştır. Elde edilen bulgular, *Lactobacillus brevis* ve *Lactobacillus plantarum* suşlarını da içeren filtratların anlamlı kolesterol giderim aktivitelerinin olduğunu göstermiş ve anti-kolesterol etkileri ortaya çıkarılmıştır. *Lactobacillus brevis* suşları olan KM2-7 ve KM3-14 kodlu izolatların 3T3-L1 hücre hattında adipojenez oluşumunu ve yağ birikimini baskılayıcı aktiviteleri görülmüş ve böylece anti-obezite açısından etkileri belirlenmiştir.

Günümüzde, katkı maddesi olarak piyasada birçok sentetik bileşik mevcuttur. Bu bileşikler adipojenez düzenleyicileri olarak kullanılır, ancak birtakım yan etkileri de bulunmaktadır. Bu nedenle yeni adipojenik düzenleyicilerin doğal kaynaklardan izole edilmesi, yeni terapötik ajanların geliştirilmesinde önem arz etmektedir. Daha önce yapılan çalışmalarda bazı probiyotiklerin obezite ve kolesterol üzerine etkilerinin olduğu bildirilmiştir. Gerçekleştirilen bu çalışma ile, literatüre menşei bakımından özgün yeni suşların verileri sağlanmıştır. Elde edilen suşlar, gıda katkı maddesi olarak değerlendirilme potansiyeline sahip olup biyoteknolojik yönden katkı sağlayacaktır.

KAYNAKÇA

- Ahirwar, R., & Mondal, P. R. (2019). Prevalence of obesity in India: A systematic review. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*, 13(1), 318–321.
- Alasmari, H. D., Al-Shehri, A. D., Aljuaid, T. A., Alzaidi, B. A., & Alswat, K. A. (2017). Relationship Between Body Mass Index and Obesity Awareness in School Students. *Journal of Clinical Medicine Research*, 9(6), 520–524.
- Albano, C., Morandi, S., Silveti, T., Casiraghi, M. C., Manini, F., & Brasca, M. (2018). Lactic acid bacteria with cholesterol-lowering properties for dairy applications: In vitro and in situ activity. *Journal of dairy science*, 101(12), 10807–10818.
- Ali, A. T., Hochfeld, W. E., Myburgh, R., & Pepper, M. S. (2013). Adipocyte and adipogenesis. *European Journal of Cell Biology*, 92(6–7), 229–236.
- Anandharaj, M., & Sivasankari, B. (2014). Isolation of potential probiotic *Lactobacillus* oris HMI68 from mother's milk with cholesterol-reducing property. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 118(2), 153–159.
- Anggraini, L., Marlida, Y., Wizna, W., Jamsari, J., Mirzah, M., Adzitey, F., & Huda, N. (2018). Molecular identification and phylogenetic analysis of GABA-producing lactic acid bacteria isolated from indigenous dadih of West Sumatera, Indonesia. *F1000Research*, 7, 1663.
- Arsenijevic, T., Grégoire, F., Delforge, V., Delporte, C., & Perret, J. (2012). Murine 3T3-L1 Adipocyte Cell Differentiation Model: Validated Reference Genes for qPCR Gene Expression Analysis. *PLoS ONE*, 7(5), e37517.
- Bakour, S., Rathored, J., Lo, C. I., Mediannikov, O., Beye, M., Ehounoud, C. B., Biagini, P., Raoult, D., Fournier, P. E., Fenollar, F. (2016). Non-contiguous finished genome sequence and description of *Streptococcus varani* sp. nov. *New Microbes and New Infections*, 11, 93–102.
- Blesso, C. N., & Fernandez, M. L. (2018). Dietary cholesterol, serum lipids, and heart disease: Are eggs working for or against you? *Nutrients*, 10(4).
- Cano-Garrido, O., Seras-Franzoso, J., & Garcia-Fruitós, E. (2015). Lactic acid bacteria: reviewing the potential of a promising delivery live vector for biomedical purposes.

- Microbial Cell Factories*, 14(1), 137.
- Chen, W. (2019). *Lactic Acid Bacteria*. (1). Singapur: Springer.
- Cohen, J. I., Yates, K. F., Duong, M., & Convit, A. (2011). Obesity, orbitofrontal structure and function are associated with food choice: a cross-sectional study. *BMJ Open*, 1(2), e000175–e000175.
- De Vuyst, L., & Leroy, F. (2007). Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria: Production, Purification, and Food Applications. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 13(4), 194–199.
- Dehkohne, A., Jafari, P., & Fahimi, H. (2019). Effects of probiotic *Lactobacillus paracasei* TD3 on moderation of cholesterol biosynthesis pathway in rats. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 22(9), 1004–1009.
- Desruisseaux, M. S., Nagajyothi, Trujillo, M. E., Tanowitz, H. B., & Scherer, P. E. (2007). Adipocyte, Adipose Tissue, and Infectious Disease. *Infection and Immunity*, 75(3), 1066–1078.
- Dhakal, R., Bajpai, V. K., & Baek, K. H. (2012). Production of GABA (γ -aminobutyric acid) by microorganisms: A review. *Brazilian Journal of Microbiology*, 43(4), 1230–1241.
- Eloe-Fadrosh, E. A., & Rasko, D. A. (2013). The Human Microbiome: From Symbiosis to Pathogenesis. *Annual Review of Medicine*, 64(1), 145–163.
- Epstein, F. H., Steinberg, D., Parthasarathy, S., Carew, T. E., Khoo, J. C., & Witztum, J. L. (1989). Beyond Cholesterol. *New England Journal of Medicine*, 320(14), 915–924.
- Erem, C. (2015). Prevalence of Overweight and Obesity in Turkey. *IJC Metabolic & Endocrine*, 8, 38–41.
- Fijan, S. (2014). Microorganisms with claimed probiotic properties: An overview of recent literature. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 11(5), 4745–4767.
- Florou-Paneri, P., Christaki, E., & Bonos, E. (2013). Lactic Acid Bacteria as Source of Functional Ingredients. *Lactic Acid Bacteria - R & D for Food, Health and Livestock*

Purposes, 70.

- Franklin, I. K., & Wollheim, C. B. (2004). GABA in the endocrine pancreas: its putative role as an islet cell paracrine-signalling molecule. *The Journal of general physiology*, 123(3), 185–190.
- Gänzle, M. G. (2015). Lactic metabolism revisited: metabolism of lactic acid bacteria in food fermentations and food spoilage. *Current Opinion in Food Science*, 2, 106–117.
- Gao, X., Zhang, M., Xue, J., Huang, J., Zhuang, R., Zhou, X., Zhang, H., Fu, Q., Hao, Y. (2018). Body mass index differences in the gut microbiota are gender specific. *Frontiers in Microbiology*, 9(JUN), 1–10.
- Ghaben, A. L., & Scherer, P. E. (2019). Adipogenesis and metabolic health. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 20(4), 242–258.
- Gilliland, S. E., Nelson, C. R., & Maxwell, C. (1985). Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 49(2), 377–381.
- Green, H., & Kehinde, O. (1975). An established preadipose cell line and its differentiation in culture II. Factors affecting the adipose conversion. *Cell*, 5(1), 19–27.
- Gu, Q., & Li, P. (2016). Biosynthesis of vitamins by probiotic bacteria. In V. Rao & L. G. Rao (Eds.), *Probiotics and Prebiotics in Human Nutrition and Health*.
- Hammes, W. P., & Hertel, C. (2015). *Lactobacillus*. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. 1–76.
- Haslam, D. W., & James, W. P. T. (2005). Obesity. *The Lancet*, 366(9492), 1197–1209.
- He, Y., Li, Y., Zhao, T., Wang, Y., & Sun, C. (2013). Ursolic Acid Inhibits Adipogenesis in 3T3-L1 Adipocytes through LKB1/AMPK Pathway. *PLoS ONE*, 8(7).
- Hove, H., Nordgaard-Andersen, I., & Mortensen, P. B. (1994). Effect of lactic acid bacteria on the intestinal production of lactate and short-chain fatty acids, and the absorption of lactose. *The American journal of clinical nutrition*, 59(1), 74–79.

- Hruby, A., & Hu, F. B. (2015). The Epidemiology of Obesity: A Big Picture. *Pharmacoeconomics*, 33(7), 673–689.
- Ikegami, R., Shimizu, I., Sato, T., Yoshida, Y., Hayashi, Y., Suda, M., Katsuumi, G., Li J., Wakasugi, T., Minokoshi, Y., Okamoto, S., Hinoi, E., Nielsen, S., Jespersen, N. Z., Scheele, C, Soga, T., Minamino, T. (2018). Gamma-Aminobutyric Acid Signaling in Brown Adipose Tissue Promotes Systemic Metabolic Derangement in Obesity. *Cell Reports*, 24(11).
- James, P. T. (2004). Obesity: The worldwide epidemic. *Clinics in Dermatology*, 22(4 SPEC. ISS.), 276–280.
- Jonkers, D., Penders, J., Masclee, A., & Pierik, M. (2012). Probiotics in the Management of Inflammatory Bowel Disease. *Drugs*, 72(6), 803–823.
- Kahn, S. E., Hull, R. L., & Utzschneider, K. M. (2006). Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature*, 444(7121), 840–846.
- Kasturi, R., & Joshi, V. C. (1982). Hormonal regulation of stearyl coenzyme A desaturase activity and lipogenesis during adipose conversion of 3T3-L1 cells. *The Journal of biological chemistry*, 257(20), 12224–12230
- Kim, J. E., Park, S. J., Yu, M. H., & Lee, S. P. (2014). Effect of ganoderma applanatum mycelium extract on the inhibition of adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes. *Journal of Medicinal Food*, 17(10), 1086–1094.
- Kobyliak, N., Conte, C., Cammarota, G., Haley, A. P., Styriak, I., Gaspar, L., Fusek, J., Rodrigo L., Kruzliak, P. (2016). Probiotics in prevention and treatment of obesity: A critical view. *Nutrition and Metabolism*, 13(1).
- Kothari, D., Patel, S., & Kim, S.-K. (2019). Probiotic supplements might not be universally-effective and safe: A review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 111, 537–547.
- Kumar, M., Nagpal, R., Kumar, R., Hemalatha, R., Verma, V., Kumar, A., Chakraborty, C., Singh, B., Marotta, F., Jain, S., Yadav, H. (2012). Cholesterol-Lowering Probiotics as Potential Biotherapeutics for Metabolic Diseases. *Experimental Diabetes Research*, 2012, 1–14.

- Lebeer, S., Vanderleyden, J., & De Keersmaecker, S. C. J. (2008). Genes and Molecules of Lactobacilli Supporting Probiotic Action. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 72(4), 728–764.
- Lee, D., Jang, S., Baek, E., Kim, M., Lee, K., Shin, H., Chung, M. J., Kim, J. E., Lee, K. O., Ha, N. (2009). Lactic acid bacteria affect serum cholesterol levels, harmful fecal enzyme activity, and fecal water content. *Lipids in Health and Disease*, 8(1), 21.
- Lefterova, M. I., & Lazar, M. A. (2009). New developments in adipogenesis. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 20(3), 107–114.
- Lievin-Le Moal, V., & Servin, A. L. (2014). Anti-Infective Activities of Lactobacillus Strains in the Human Intestinal Microbiota: from Probiotics to Gastrointestinal Anti-Infectious Biotherapeutic Agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 27(2), 167–199.
- Lim, H. J., Kim, S. Y., & Lee, W. K. (2004). Isolation of cholesterol-lowering lactic acid bacteria from human intestine for probiotic use. *Journal of veterinary science*
- Ma, C., Zhang, S., Lu, J., Zhang, C., Pang, X., & Lv, J. (2019). Screening for cholesterol-lowering probiotics from lactic acid bacteria isolated from corn silage based on three hypothesized pathways. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(9), 1–13.
- Maia, L. P., Levi, Y. L. de A. S., do Prado, R. L., Santinoni, C. dos S., & Marsicano, J. A. (2019). Effects of probiotic therapy on serum inflammatory markers: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Functional Foods*, 54, 466–478.
- Masood, M. I., Qadir, M. I., Shirazi, J. H., & Khan, I. U. (2011). Beneficial effects of lactic acid bacteria on human beings. *Critical Reviews in Microbiology*, 37(1), 91–98.
- Mazloom, K., Siddiqi, I., & Covasa, M. (2019). Probiotics: How effective are they in the fight against obesity? *Nutrients*, 11(2), 1–24.
- Mokdad, A. H., Ford, E. S., Bowman, B. A., Dietz, W. H., Vinicor, F., Bales, V. S., & Marks, J. S. (2003). Prevalence of Obesity, Diabetes, and Obesity-Related Health Risk Factors, 2001. *JAMA*, 289(1), 76.
- Moon, Y. J., Soh, J. R., Yu, J. J., Sohn, H. S., Cha, Y. S., & Oh, S. H. (2012). Intracellular lipid accumulation inhibitory effect of Weissella koreensis OK1-6 isolated from

- Kimchi on differentiating adipocyte. *Journal of Applied Microbiology*, 113(3), 652–658.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1–2), 55–63.
- Ng, M., Fleming, T., Robinson, M., Thomson, B., Graetz, N., Margono, C., ... Gakidou, E. (2014). Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *The Lancet*, 384(9945), 766–781.
- Ntambi, J. M., & Young-Cheul, K. (2000). Adipocyte differentiation and gene expression. *The Journal of nutrition*, 130(12), 3122–3126.
- Park, J.-E., Oh, S.-H., & Cha, Y.-S. (2013). Lactobacillus plantarum LG42 Isolated from Gajami Sik-Hae Inhibits Adipogenesis in 3T3-L1 Adipocyte. *BioMed Research International*, 2013, 1–7.
- Park, J. E., Oh, S. H., & Cha, Y. S. (2014). Lactobacillus plantarum LG42 isolated from gajami sik-hae decreases body and fat pad weights in diet-induced obese mice. *Journal of Applied Microbiology*, 116(1), 145–156.
- Park, Jeong Eun, Oh, S. H., & Cha, Y. S. (2014). Lactobacillus brevis OPK-3 isolated from kimchi inhibits adipogenesis and exerts anti-inflammation in 3T3-L1 adipocyte. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(12), 2514–2520.
- Patel, S., & Goyal, A. (2012). The current trends and future perspectives of prebiotics research: a review. *3 Biotech*, 2(2), 115–125.
- Pereira, D. I. A., & Gibson, G. R. (2002). Cholesterol assimilation by lactic acid bacteria and bifidobacteria isolated from the human gut. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(9), 4689–4693.
- Pothuraju, R., & Sharma, R. K. (2018). Interplay of Gut Microbiota, Probiotics in Obesity: A Review. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets*, 18(3), 212–220.
- Quilodrán-Vega, S. R., Villena, J., Valdebenito, J., Salas, M. J., Parra, C., Ruiz, A.,

- Kitazawa, H., García, A. (2016). Isolation of lactic acid bacteria from swine milk and characterization of potential probiotic strains with antagonistic effects against swine-associated gastrointestinal pathogens. *Canadian Journal of Microbiology*, 62(6), 514–524.
- Roessler, A., Friedrich, U., Vogelsang, H., Bauer, A., Kaatz, M., Hipler, U. C., Schmidt, I., Jahreis, G. (2008). The immune system in healthy adults and patients with atopic dermatitis seems to be affected differently by a probiotic intervention. *Clinical and experimental allergy: journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, 38(1), 93–102.
- Sáez-Lara, M. J., Robles-Sanchez, C., Ruiz-Ojeda, F. J., Plaza-Diaz, J., & Gil, A. (2016). Effects of probiotics and synbiotics on obesity, insulin resistance syndrome, type 2 diabetes and non-alcoholic fatty liver disease: A review of human clinical trials. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(6), 1–15.
- Sakr, Y., Alhussami, I., Nanchal, R., Wunderink, R. G., Pellis, T., Wittebole, X., Martin-Loeches, I., François, B., Leone, M., Vincent, J.-L. (2015). Being Overweight Is Associated With Greater Survival in ICU Patients. *Critical Care Medicine*, 43(12), 2623–2632.
- Sandoval-Salazar, C., Ramírez-Emiliano, J., Trejo-Bahena, A., Oviedo-Solís, C. I., & Solís-Ortiz, M. S. (2016). A high-fat diet decreases GABA concentration in the frontal cortex and hippocampus of rats. *Biological Research*, 49(1), 15.
- Schetz, M., De Jong, A., Deane, A. M., Druml, W., Hemelaar, P., Pelosi, P., Pickkers P., Reintam-Blaser, A., Roberts, J., Sakr, Y., Jaber, S. (2019). Obesity in the critically ill: a narrative review. *Intensive Care Medicine*, 45(6), 757–769.
- Shinobu, W., Takuya, K., & Kenji, S. (2012). *Cholesterol-lowering Effects of Lactobacillus brevis Isolated from Turnip “ Tsuda Kabu ”*. *Food Science and Technology Research*, 18(6), 825–834.
- Tsai, Y.-T., Cheng, P.-C., & Pan, T.-M. (2014). Anti-obesity effects of gut microbiota are associated with lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(1), 1–10.
- Ursell, L. K., Metcalf, J. L., Parfrey, L. W., & Knight, R. (2012). Defining the human

- microbiome. *Nutrition Reviews*, 70(Suppl 1), 38-44.
- Vieco-Saiz, N., Belguesmia, Y., Raspoet, R., Auclair, E., Gancel, F., Kempf, I., & Drider, D. (2019). Benefits and inputs from lactic acid bacteria and their bacteriocins as alternatives to antibiotic growth promoters during food-animal production. *Frontiers in Microbiology*, 10(February), 1–17.
- Wang, L., Guo, M.-J., Gao, Q., Yang, J.-F., Yang, L., Pang, X.-L., & Jiang, X.-J. (2018). The effects of probiotics on total cholesterol. *Medicine*, 97(5), e9679.
- Watanabe, M., Maemura, K., Kanbara, K., Tamayama, T., & Hayasaki, H. (2002). GABA and GABA receptors in the central nervous system and other organs. *International review of cytology*, 213, 1–47.
- White, U. A., & Stephens, J. M. (2010). Transcriptional factors that promote formation of white adipose tissue. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 318(1–2), 10–14.
- WHO Multicentre Growth Reference Study Group. (2006). WHO Child Growth Standards based on length/height, weight and age. *Acta paediatrica (Oslo, Norway : 1992). Supplement*, 450, 76–85.
- Yun, S. I., Park, H. O., & Kang, J. H. (2009). Effect of *Lactobacillus gasseri* BNR17 on blood glucose levels and body weight in a mouse model of type 2 diabetes. *Journal of Applied Microbiology*, 107(5), 1681–1686.
- Zhong, Y., Wu, S., Chen, F., He, M., & Lin, J. (2019). Isolation of high γ -aminobutyric acid-producing lactic acid bacteria and fermentation in mulberry leaf powders. *Experimental and therapeutic medicine*, 18(1), 147–153.

EKLER

EK-1 MS Analizine Göre Filtratlardaki GABA'nın Molar Derişimi ve Pik Alanları Tablosu

Numune	Pik Alanı	Derişim	Ortalama Derişim, M	µg GABA/mg çözelti
KM2-7	13861140	5,88316E-07		
KM2-7	13381031	5,67977E-07	5,76417E-07	0,050803501
KM2-7	13498604	5,72958E-07	1,06014E-08	0,000934372
K2-19	14238679	6,04309E-07		
K2-19	14490667	6,14984E-07	6,02923E-07	0,050547483
K2-19	13888515	5,89475E-07	1,28107E-08	0,00107402
KM3-14	12674116	5,3803E-07		
KM3-14	12748759	5,41192E-07	5,36881E-07	0,053233824
KM3-14	12518095	5,31421E-07	4,98609E-09	0,00049439
KM1-3	11724899	4,97819E-07		
KM1-3	11586850	4,91971E-07	4,89713E-07	0,046543044
KM1-3	11288910	4,79349E-07	9,43955E-09	0,000897149
K2-20	12755861	5,41493E-07		
K2-20	12506460	5,30928E-07	5,32095E-07	0,053168267
K2-20	12339723	5,23864E-07	8,87213E-09	0,000886525
K2-14	1390140	6,00115E-08		
K2-14	1342989	5,80141E-08	5,85328E-08	0,005532454
K2-14	1332575	5,75729E-08	1,29943E-09	0,000122821
K2-21	11212130	4,76097E-07		
K2-21	11340684	4,81543E-07	4,75137E-07	0,048703856
K2-21	11015582	4,6777E-07	6,93611E-09	0,000710985
K2-11	1317915	5,69519E-08		
K2-11	1376787	5,94459E-08	5,82414E-08	0,005560976
K2-11	1350363	5,83265E-08	1,24916E-09	0,000119272
K2-2	502332	2,24017E-08		
K2-2	511227	2,27785E-08	2,26201E-08	0,002122458
K2-2	508904	2,26801E-08	1,95442E-10	1,83384E-05
KM4-1	1307848	5,65254E-08		
KM4-1	1347672	5,82125E-08	5,74733E-08	0,005513157
KM4-1	1335148	5,76819E-08	8,62661E-10	8,27513E-05
K2-9	1066580	4,63047E-08		
K2-9	1083166	4,70073E-08		0,004386751
K2-9	1072616	4,65604E-08		3,34598E-05

K2-10	508079	2,26451E-08		
K2-10	513461	2,28731E-08		0,002326171
K2-10	522080	2,32382E-08		3,03666E-05
K2-4	1297177	5,60734E-08		
K2-4	1351168	5,83606E-08		0,005590279
K2-4	1349350	5,82836E-08		0,000126118
KM1-2	1370329	5,91723E-08		
KM1-2	1379822	5,95744E-08		0,00567507
KM1-2	1379536	5,95623E-08		2,18426E-05
KM3-14(1)	930679	4,05476E-08		
KM3-14	907854	3,95806E-08		0,003851465
KM3-14	930679	4,05476E-08		5,34515E-05
K2-19	652073	2,87451E-08		
K2-19	645666	2,84737E-08		0,002898207
K2-19	645010	2,84459E-08		1,67783E-05
KM1-3	656049	2,89135E-08		
KM1-3	661349	2,9138E-08		0,00281568
KM1-3	668319	2,94333E-08		2,51713E-05