



KUZEY KIBRIS TÜRK CUMHURİYETİ

YAKIN DOĞU ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**3T3-L1 HÜCRELERİNİN ADİPOJENİK FARKLILAŞMA SÜRECİNDE
KEFİRİN PROBİYOTİK İÇERİĞİNİN ROLÜ**

SABIHA GÖKÇEN ZEYBEK

DOKTORA TEZİ

BESLENME VE DİYETETİK DOKTORA PROGRAMI

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. SEVİNÇ YÜCECAN

EŞ DANIŞMAN

Prof. Dr. SEDA VATANSEVER

2019 – LEFKOŞA

TEZ ONAYI (SAVUNMADAN SONRA EKLENECEK)

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Sabiha Gökçen ZEYBEK

TEŞEKKÜR

Bu tez, Yakın Doğu Üniversitesi bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından BAP;SAG- 2017-1-038 numaralı proje ile desteklenmiştir.

Meslek yaşantımın ilk gününden itibaren ve tez çalışması süresi boyunca tecrübesini, ilgisini, bilgisini, yardımlarını ve önerilerini hiçbir zaman esirgemeyerek yanımda olan tez danışmanım sayın Prof. Dr. Sevinç Yücecan'a,

Akademik gelişimimde kattığı tüm farklı bakış açıları ile ulaşılmayı bekleyen farklı ufukların öncüsü olan aynı zamanda tez çalışmasının planlanmasında ve yürütülmesinde tüm destek ve yardımları için eş danışmanım sayın Prof. Dr. Seda Vatansever'e,

Çalışmanın tüm aşamalarında yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen sabır ve anlayış ile destek veren sayın Doç. Dr. Eda Becer'e,

Tez çalışmasının değerlendirilmesine ve geliştirilmesinde değerli katkılarından dolayı jüri üyeleri sayın Prof. Dr. Tamer Şanlıdağ ve Prof. Dr. Murat Sayan'a

Çalışmanın laboratuvar aşamalarının yürütülmesinde destek veren DESAM Hücre Kültürü ve Tıp Fakültesi Klinik Biyokimya Laboratuvar sorumluları ve çalışanlarına,

Tez çalışması süresi boyunca her zaman yanımda olarak bana gösterdikleri anlayış ve manevi destekleri için çalışma arkadaşlarıma, hocalarıma, aileme ve dostlarıma,

Hayatımın her döneminde olduğu gibi bu zorlu sürecin her aşamasında bana olan sevgilerini her daim hissettirerek motivasyon kaynağım olarak verdikleri tüm maddi ve manevi destek, anlayış ve sabır için canımdan çok sevdiğim ailem annem, babam, ve kardeşime,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Sabiha Gökçen Zeybek

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
TABLolar DİZİNİ.....	x
ÖZET.....	1
ABSTRACT.....	2
1. GİRİŞ.....	3
1.1. Kuramsal Yaklaşımlar ve Kapsam.....	3
1.2. Amaç.....	4
1.3. Hipotez.....	5
2. GENEL BİLGİLER.....	6
2.1. Obezitenin Tanımı.....	6
2.2. Obezitenin Görülme Sıklığı.....	8
2.3. Obezite Gelişim Nedenleri.....	11
2.4. Obezitenin Tedavisi.....	13
2.5. Kefirin Tanımı ve Hazırlanışı.....	16
2.6. Kefirin Besin Ögesi Kompozisyonu.....	17
2.7. Kefirin Sağlık Üzerine Etkileri.....	21
2.8. Kefirin Obezite Yönetimindeki Olası Etki Mekanizmaları.....	23
2.9. Kefirin İnflamatuar Sürecin Yönetimindeki Olası Etki Mekanizmaları.....	27
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	30
3.1. Kefirin Hazırlanışı.....	30
3.2. Hücre Hattı ve Hücre Kültürü.....	31
3.2.1. Hücre açma protokolü.....	31
3.2.2. Hücreler ve vasat hazırlığı.....	31
3.2.3. Hücre pasajlama protokolü.....	32
3.2.4. Hücre dondurma protokolü.....	32
3.2.5. Hücre farklılaştırma protokolü.....	33

3.3. Hücre Fiksasyon Protokolü.....	33
3.4. Oil Red-O Protokolü.....	34
3.5. Hücre Canlılığı ve Büyüme Analizi.....	35
3.6. Hücre Canlılığı Testi ve MTT Analizi.....	35
3.7. İmmunohistokimya Protokolü.....	36
3.8. ELISA Protokolü.....	38
3.9. Verilerin İstatistiksel Değerlendirmesi ve Yazılım Programları.....	40
4. BULGULAR.....	41
4.1. Hücre Canlılığı ve Sitotoksosite.....	41
4.2. Oil Red-O Boyama Sonuçları.....	45
4.3. İmmuohistokimyasal Değerlendirme.....	47
4.4. ELISA Değerlendirmeleri.....	51
5. TARTIŞMA.....	57
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	64
KAYNAKÇA.....	67
EKLER.....	79
TEZDEN YAPILAN YAYINLAR, POSTERLER VE SÖZEL SUNUMLAR.....	79
ÖZGEÇMİŞ.....	101

SİMGELER VE KISALTMALAR

%	Yüzde
±	Standart Hata
µL	Mikrolitre
µm	Mikrometre
ACE	Anjiotensin Dönüştürücü Enzim
AGRP	Agouti İlişkili Protein Öncüsü
AM-1-L1	Adipojenik Medium
AMPK	Aktive Olan Protein Kinaz
ANGPTL-4	Angiopoetin Benzeri Protein-4
AP-1	Aktivatör Protein-1
BKI	Beden Kütle İndeksi
CDC	Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi
CFU/mL	Mililitre Başına Koloni Oluşturan Birim
DAB	3,3'diaminobenzidin
dH ₂ O	Distile Su
DM-2-L1	Farklılaştırma Medium
DMSO	Dimetil Sülfoksit
ELISA	Enzim Bağlantılı İmmunoassay
FBS	Fetal Bovin Serum
FIAF	Açlıkla İndüklenen Adipoz Faktör
FXR	Farnesoid X Reseptörü
GI	Gastrointestinal Sistem
GIT	Gastrointestinal sistem
GLP-1	Glukagon Benzeri Peptit-1
GPCRs	G Proteine Bağlı Reseptörler

GPR43/41/109A	G Proteine Bağlı Reseptörler 43/41/109A
H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit
HSKOR	Histolojik Skorelama Yöntemi
IL-1 β	İnterlökin 1 beta
IL-6	İnterlökin-6
IOTF	Uluslararası Obezite Çalışma Grubu
kg	Kilogram
KKTC	Kuzey Kıbrıs Türk Cumhuriyeti
KVH	Kardiyovasküler Hastalıklar
KZYA	Kısa Zincirli Yağ Asitleri
LAB	Laktik Asit Bakterileri
LBP	LPS Bağlayıcı Protein
LPL	Lipoprotein Lipaz
LPS	Lipopolisakkarit
Mg	Miligram
mL	Mililitre
MÖ	Milattan Önce
MTT	3- (4,5- dimethylthiazol-2ly)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NCHS	Ulusal Sağlık ve Beslenme İnceleme Anketi
NF- κ B	Nükleer Faktör Kappa Beta
NOD	Nükleotid Bağlayıcı Oligomerizasyon
NPY	Nöropeptit Y
PBS	Phosphate Buffered Saline
PM-1-L1	Preadiposit Medium
POMC	Proiomelanokortin
PPAR γ	Peroksizom Proliferatörle Aktive Edilmiş Reseptör Protein- gamma

PPARs	Peroksizom Proliferatör Aktive Reseptörler
PPAR α	Peroksizom Proliferatörle Aktive Edilmiş Reseptör Protein- alfa
PPAR β	Peroksizom Proliferatörle Aktive Edilmiş Reseptör Protein-beta
PYY	Peptit YY
SD	Standart Sapma
SPSS-21	SPSS paket Program-21
TBSA	Türkiye Beslenme ve Sağlık Araştırması
Tip 2 DM	Tip 2 Diyabet
TLR-4	Toll Benzeri Protein-4
TMB	Tetramethyl- Benzidine
TNF- α	Tümör Nekrozis Faktör- alfa
TÜİK	Türkiye Sağlık Araştırması
TURDEP-1	Türkiye Diyabet Çalışması - 1
TURDEP-2	Türkiye Diyabet Çalışması – 2
VLDL	Çok Düşük Dansiteli Lipoprotein
WHO/DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.2.1. Ulusal Sağlık ve Beslenme İnceleme Anketi (NCHS) verilerine göre yetişkin ve gençlerde obezite görülme sıklığının yıllara göre değişimi.	10
Şekil 2.3.1. Obezitenin en temel nedenleri artan enerji alımı, düşük fiziksel aktivite ve düşük enerji harcamasının birlikteliğidir. Şekil, kronik pozitif enerji dengesini etkileyebilecek faktörler ve obezite gelişim nedenlerini açıklamaktadır.	12
Şekil 2.4.1. Obezitenin yönetimine ve tedavisine yönelik algoritma.	14
Şekil 2.6.1. Kefiran'ın yapısı.	19
Şekil 2.7.1. Kefir ve kefirin içerisindeki bileşenlerin sağlık üzerindeki olumlu potansiyel etkileri.	21
Şekil 2.7.2. Kefirin insan sağlığı üzerine potansiyel etki mekanizmalarının sistemik diagramı.	22
Şekil 2.8.1. Bağırsak mikrobiyotasındaki değişiklikler sonucu oluşan bağırsak hormonal eksenindeki değişiklikler ve etki mekanizmaları.	24
Şekil 2.8.2. Bağırsak mikrobiyotasının, adenosin monofosfat ile aktive olan protein kinaz (AMPK) ve adiposite üzerine etkisi.	25
Şekil 2.8.3. Değişmiş bağırsak mikrobiyotasının obezite ve metabolik hastalıkların gelişimi üzerindeki potansiyel etki mekanizmaları.	26
Şekil 2.9.1. İnflamasyonun oluşumunda LPS'in rolü ve obezite ile olan ilişkisi.	28
Şekil 2.9.2. Beslenmenin bağırsak mikrobiyotası üzerindeki etkisi.	29
Şekil 4.1.1. Kefir süpernatantın 3T3L1 adipositlerinin hücre canlılığı üzerindeki etkisi.	42

Şekil 4.1.2. Kefir pelletin 3T3L1 adipositlerinin hücre canlılığı üzerindeki etkisi.	43
Şekil 4.2.1. Kefir uygulaması yapılmadan önce kültür ortamında 3T3L1 adipositlerindeki lipid birikimi (A-D) ve oil red-o ile boyaması (E-H). 3 gün (A,E), 7 gün (B, F), 14 gün (C, G), 21 gün (D, H) Scala bar= 50µm	46
Şekil 4.2.2. Kefir süpernatant ve kefir pellet inkübasyonu yapıldıktan sonra 3T3-L1 adipositlerinin oil red-o ile boyaması. Kefir süpernatant (A), Kefir pellet (B) ve Kontrol grubu (C). Scala bar= 50µm	47
Şekil 4.3.1.. 3T3-L1 adiposit hücrelerinde ANGPTL-4'ün immünoaktivitesi. Kontrol grubu (A), Kefir süpernatant grubu (B), Kefir pellet grubu (C).	48
Şekil 4.3.2. Kefir süpernatant ve kefir pellet ile 24 saat boyunca inkübe edilen 3T3-L1 adipositlerindeki leptin ekspresyonu. Kontrol (A), kefir supernatant (B) and kefir pellet (C), Skala Bar = 50 µm	49
Şekil 4.3.3. Kefir süpernatant ve kefir pellet ile 24 saat boyunca inkübe edilen 3T3-L1 adipositlerindeki PPAR-γ ekspresyonu. Kontrol (A), kefir supernatant (B) and kefir pellet (C), Skala Bar = 50 µm	50
Şekil 4.4.1. IL-6'nın Microsoft Excel programında çizilmiş standart eğrisi, x-ekseni: konsantrasyon (pg/mL); y eksen: absorbans (A450)	52
Şekil 4.4.2. IL-6'nın GraphPad programında çizilmiş standart eğrisi, x-ekseni: konsantrasyon (pg/mL); y eksen: absorbans (A450)	52
Şekil 4.4.3. IL-1 beta'nın Microsoft Excel programında çizilmiş standart eğrisi, x-ekseni: konsantrasyon (pg/mL); y eksen: absorbans (A450)	53
Şekil 4.4.4. IL-1 beta'nın GraphPad programında çizilmiş standart eğrisi, x-ekseni: konsantrasyon (pg/mL); y eksen: absorbans (A450)	54
Şekil 4.4.5. TNF-alfa'nın Microsoft Excel programında çizilmiş standart eğrisi, x-ekseni: konsantrasyon (pg/mL); y eksen: absorbans (A450)	55

Şekil 4.4.6. TNF-alfa'nın GraphPad programında çizilmiş standart eğrisi, x-ekseni: 55
konsantrasyon (pg/mL); y eksen: absorbens (A450)

Şekil 4.4.7. LPL'nin Microsoft Excel programında çizilmiş standart eğrisi, x-ekseni: 56
konsantrasyon (pg/mL); y eksen: absorbens (A450)

Şekil 4.4.8. LPL'nin GraphPad programında çizilmiş standart eğrisi, x-ekseni: 56
konsantrasyon (pg/mL); y eksen: absorbens (A450)

TABLolar DİZİNİ

Tablo 2.1.1. Yetişkinler için beden kütle indeksi (kg/m^2) sınıflaması	6
Tablo 2.1.2. Çocuk ve adölesanlar için beden kütle indeksi persentil değerlerine göre hafif şişman ve obezite referans sınıflandırılması	7
Tablo 2.3.1. Obezite gelişimine katkı sağlayan diğer faktörler.	13
Tablo 2.4.1. BKİ ve bel çevresi ölçümlerine göre değişen tedavi protokolleri	15
Tablo 2.6.1. 100 gram kefirin besin ögesi içeriği (TURKOMP, 2019)	18
Tablo 4.1.1. 3T3L1 adiposit hücrelerinin farklı dozlarda kefir süpernatant uygulaması sonucunda adiposit profilerasyonu ve hücre canlılık yüzdesi üzerine etkisi	43
Tablo 4.1.2. 3T3L1 adiposit hücrelerinin farklı dozlarda kefir pellet uygulaması sonucunda adiposit profilerasyonu ve hücre canlılık yüzdesi üzerine etkisi	44
Table 4.3.1. Kontrol grubu ile hem kefir supernatant hemde kefir pellet ile inkübe edilen 3T3-L1 adipositlerindeki ANGPTL-4, leptin ve PPAR- γ için HSKOR değerleri	50
Tablo 4.4.1. Kefir süpernatant ve kefir pellet ile inkübe edilen 3T3L1 adipositlerindeki IL-6, IL-1 beta, TNF-alfa ve LPL ortalama absorbance değerleri	51

3T3-L1 hücrelerinin adipojenik farklılaşma sürecinde kefirin probiyotik içeriğinin rolü

Öğrencinin Adı: Sabiha Gökçen Zeybek

Danışman: Prof. Dr. Sevinç Yücecan

Anabilim Dalı: Beslenme ve Diyetetik

ÖZET

Amaç: Kefir obeziteyi önleme gibi sağlık üzerine olumlu etkileri olan geleneksel fermente süt ürünüdür. Bu çalışmanın amacı, kefirin adiposit hücrelerindeki farklılaşma süreci ve adipositlerdeki lipid birikimi üzerindeki etkisini araştırmaktır.

Gereç ve Yöntem: Kefir süt ile kefir tozunun karıştırılarak fermentasyon işleminin sağlanması ile hazırlandı. Kefirin hücreler üzerindeki sitotoksik etkisi, MTT analizi ile ölçüldü. Oil Red-o boyama yöntemi ile lipid birikimi saptandı. Anti-adipojenik etkinin belirlenmesi amacı ile indirekt immüno-peroksidaz tekniği kullanılarak ANGPTL-4, leptin ve PPAR- γ 'nın dağılımı araştırıldı. Buna ek olarak, TNF- α , IL-1 β , IL-6 ve LPL ekspresyonları ELISA tekniği kullanılarak incelendi.

Bulgular: MTT analizi sonucunda 0.1 mg/dl her iki kefir fraksiyonu içinde etkili bulundu. 3T3-L1 adipositlerinde kefir fraksiyonlarının inkübasyonu ile lipid birikimi azaldı. İmmunohistokimyasal boyama sonuçlarına göre, ANGPTL-4 immunoreaktivitesi her iki kefir fraksiyonunun inkübasyonunda da anlamlı derecede artış gösterdi. Buna ek olarak, leptin immunoreaktivitesi kefir pellet ile müdahale edilen olgun adiposit hücrelerinde anlamlı derecede azaldı. Tüm gruplarda PPAR- γ , LPL, IL-6, TNF- α ve IL-1 β ekspresyonunda herhangi bir fark saptandı.

Sonuç: Kefir hücre yapısını koruyarak lipid birikimini önlemiştir. Ayrıca ANGPTL-4 seviyelerini artırması nedeni ile kilo alımının önlenmesinde önemli bir rol oynayabilir.

Anahtar kelimeler: Kefir, Obezite, Leptin, ANGPTL-4, LPL

The role of probiotic content of kefir in the adipogenic differentiation process of 3T3-L1 cells

Name of Student: Sabiha Gökçen Zeybek

Advisor: Prof. Dr. Sevinç Yücecan

Department: Beslenme ve Diyetetik

ABSTRACT

Objective: Kefir is traditional fermented milk that is reported to have various health benefits such as preventing obesity. The aim of this study was to investigate the effect of kefir on lipid accumulation and cell differentiation in adipocytes.

Materials and Methods: Kefir was prepared from milk and kefir powder fermentation. Cytotoxic effect of kefir on the cells was measured by MTT assay. Lipid accumulation was detected by Oil-red O staining. Anti-adipogenic activities were investigated distribution of ANGPTL-4, leptin and PPAR- γ in mature 3T3-L1 adipocytes using indirect immunoperoxidase technique. In addition, TNF- α , IL-1 β , IL-6 and LPL expression were investigated by using ELISA technique.

Results: In the MTT assay, 0.1 mg/dl dilutions of kefir fractions were found to be effective. Lipid accumulation was reduced by both kefir fractions. As a result of immunohistochemical staining, ANGPTL-4 immunoreactivity was significantly increased in 3T3-L1 cells. Additionally, leptin immunoreactivity was also decreased significantly in the mature adipocytes after treated with kefir pellet. There were no differences in expression of PPAR- γ , LPL, IL6, IL1 β and TNF- α in all groups.

Conclusion: Kefir fractions have prevented lipid accumulation by preserving the cell structure. Moreover, kefir may play important role in preventing weight gain due to increased ANGPTL-4 level.

Keywords: Kefir, Obesity, Leptin, ANGPTL-4, PPAR- γ

1. GİRİŞ

1.1. Kuramsal Yaklaşımlar ve Kapsam

Obezite, kompleks, multifaktoriyel ve geniş çapta önlenabilir bir hastalıktır. Günümüzde hafif şişman sınıflamasına giren bireyler dünya popülasyonunun üçte birini oluşturmaktadır. Obezite prevalansındaki artışın bu şekilde devam etmesi durumunda, 2030 yılına kadar dünyadaki yetişkin nüfusun tahmini %38'i hafif şişman, %20'sinin ise obez olacağı ön görülmektedir (Hruby ve Frank, 2015). Beden kütle indeksi, hafif şişmanlığın ve obezitenin tanımlanmasında en sık kullanılan ölçüttür. Ancak beden kütle indeksi direkt olarak vücut yağ yüzdesini ölçmemekte ve yağ ile kas kütlesi ayırımını yapamamaktadır. Bu nedenle vücut yağını direkt tanımlayacak ölçütler kullanılmalıdır (Schienkiewitz ve ark, 2017).

Yapılan bilimsel çalışmalar hafif şişman ve obezite gelişimine bir çok faktörün katkı koyduğunu tanımlamıştır. Bu faktörler, beslenme, fiziksel aktivite, mental sağlık ve duygu durum, uyku, hijyen ve medya kullanımıdır (Williams ve Greene, 2018). Bunlara ek olarak, bağırsak mikrobiyomu son 10 yılda obezitenin gelişiminde etkili önemli faktör olarak tanımlanmıştır. Obez ve zayıf kişilerde bağırsak mikrobiyomundaki bakteriyel çeşitliliğin değiştiği ve bu değişimin obezite, tip 2 diyabet gibi bir çok hastalığın patogenezi ile yakından ilişki içerisinde olduğu savunulmuştur (Castaner ve ark 2018).

Fermente süt ürünleri, metabolik bozukluklar, kardiyovasküler hastalıklar, bağışıklık sistemi ile ilgili hastalıklar veya bilişsel gerileme gibi farklı hastalık risklerinin azaltması aynı zamanda epidemiyolojik çalışmalarda obeziteyi önleme ile olan ilişkisinden dolayı özel ilgi görmektedir (Gonzalez ve ark, 2019). Kefir, probiyotik içeriği zengin fermente bir besin olarak bilinmektedir (Macori ve Cotter, 2018). Kefir, mikrobiyota üzerindeki module edici etkisi ve obeziteden koruyucu potansiyel etkilerini fermentasyon sürecinde oluşan ve bağırsak mikrobiyotasındaki mikrobiyal çeşitliliğe destek veren bir çok biyoaktif bileşik sayesinde veya bu bileşiklerden bağımsız olarak göstermektedir (Leite ve ark, 2013; Bourrie ve ark 2016).

Sonuç olarak, bağırsak mikrobiyotası ekosistemindeki değişiklikler sonucunda bir çok fizyolojik değişim gerçekleşmekte ve bunun sonucunda obezite ve diğer metabolik hastalıkların gelişimine zemin hazırlanmaktadır. Değişmiş bağırsak mikrobiyotası, kısa zincirli yağ asitleri üretim aracılığı ile enerji eldesinin artırılması, AMPK regülasyonu ile lipogenezin artırılması ve yağ asit oksidasyonunu azaltması, FİAF/ANGPTL-4 regülasyonu ile adipositlerde lipid birikimini regüle etmesi vb etki mekanizmaları ile obezitenin gelişiminde rol oynamaktadır (Boulangé ve ark, 2016).

Kefir ise mikrobiyota üzerindeki bu değişiklikleri olumlu yönde modüle etmekte ve obeziteden koruyucu potansiyel etki göstermektedir. Kefirin literatürde ANGPTL-4/FİAF ekspresyonunun regülasyonu üzerine yapılan herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır aynı zamanda inflamatuvar belirteçler üzerindeki etkisini açıklayan çalışmalar ise sınırlı sayıdadır. Yapılan bu çalışma ile kefirin bu yollar üzerinden obezite üzerindeki etki mekanizmalarının anlaşılması için yol gösterici olacaktır.

1.2. Amaç

Bu çalışma ile probiyotiklerin adipositlerin farklılaşması ve lipid birikimi üzerine etkisinin belirlenmesi amaçlanmaktadır. Bu amaç doğrultusunda obezite ve ilişkili hastalıklara ilişkin etki mekanizmalarının anlaşılmasında in vitro ortamda kullanılan 3T3-L1 hücreleri kullanılmıştır. Probiyotiklerin bu etkilerini gözlemlemek amacıyla probiyotik içeriği zengin olan kefirin kullanılması planlanmıştır.

Bu çalışma ile;

1. 3T3-L1 preadipositlerinin adiposit hücrelerine dönüşümünün gözlemlenmesi
2. 3T3-L1 hücrelerinde PPAR gama, ANGPTL-4/ FİAF, leptin transkripsiyon faktörlerine bakılarak yağ birikiminin oluşum zamanına ve miktarına bakılması
3. TNF alfa, IL-6, IL-1beta ve LPL'nin ELİSA yöntemi ile düzeylerinin belirlenmesi hedeflenmiştir.

1.3. Hipotez

Kefir zengin probiyotik içeriği ile 3T3-L1 preadiposit hücrelerinin farklılaşmasını etkileyebileceği ve adipositlerin içerisindeki lipid birikimini azaltacağı öngörülmektedir. Lipoprotein lipaz inhibitörü olan ANGPTL4'dün transkripsiyonunu artırarak yağ hücrelerinin birikimini azaltacağı ve buna bağlı olarak ANGPTL-4 transkripsiyonunun artması ile lipoprotein lipaz ekspresyonunun baskılanacağı düşünölmektedir.

Bunlara ek olarak, TNF alfa, IL-6, IL-1 beta gibi belirteçlerin miktarını azaltarak inflamatuvar süreci azaltacağı hipotezi ile proje planlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Obezitenin Tanımı

Dünya Sağlık Örgütü (WHO/DSÖ), morbidite ve mortalite riskini artıracak, fiziksel, psikolojik veya sosyal refahı değiştirecek düzeydeki yağ kütlesi artışını obezite olarak tanımlamaktadır (WHO, 2000). Dünya Obezite Federasyonu ise günümüzde obezitenin kronik tekrarlayıcı ve dirençli bir hastalık olduğunu tartışmaktadır (Bray, Kim, Wilding & World Obesity Federation 2017).

Klinik değerlendirilmesinde ayrıntılı öykü/anamnez, fiziksel muayene, yaşam tarzının ve alışkanlıkların sorgulanması, fizyolojik durum ve laboratuvar değerlendirmeleri bulunmaktadır. Anamnez bireydeki pre-obezitenin obeziteye geçiş sürecini anlamaya yardımcı olmaktadır ve obezitenin tedavisinde ilk basamağı oluşturmaktadır. Fiziksel muayene ile çeşitli ölçümler alınmakta ve obezitenin değerlendirilmesi yapılmaktadır. Vücut ağırlığı, beden kütle indeksi (BKI), bel çevresi, vb. ölçümler bu değerlendirmenin içinde bulunmaktadır (Schutz ve ark, 2019).

Beden kütle indeksi, boya göre olması gereken ağırlığın belirlendiği basit bir formüldür. Bu formül, yetişkinlerde obezite ve hafif şişmanlığın tanımlanması için kullanılmaktadır (WHO, 2018). Beden kütle indeksi, vücut ağırlığının, boy uzunluğunun karesine bölünmesi ile hesaplanmaktadır. Tablo 2.1.1’de beden kütle indeksine göre kişinin kilo durumunu sınıflandırması sunulmaktadır (Weir ve Jan, 2019).

Tablo 2.1.1. Yetişkinler için beden kütle indeksi (kg/m²) sınıflaması

BKI	Sınıflama
<16,5 kg/m ²	Çok Zayıf
<18,5 kg/m ²	Zayıf
18,5 – 24., kg/m ²	Normal
25,0 – 29,9 kg/m ²	Hafif Şişman
30,0 kg/m ²	Obezite
30,0 – 34,9 kg/m ²	Obezite- 1 derece
35,0 – 39,9 kg/m ²	Obezite- 2 derece
40,0 kg/m ²	Obezite- 3 derece (Aşırı derecede obezite)

Çocuk veya adölesanlarda obezitenin tanımlanması için ise BKİ persentil değerlerinin kullanılması önerilmektedir (Nehus ve Mitsnefes, 2019). Çocukluk çağı obezitesinin tanımlanmasında, DSÖ'nün, Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi'nin (CDC) ve Uluslararası Obezite Çalışma Grubu'nun (IOTF) geliştirmiş olduğu büyüme değerlendirme araçları kullanılmaktadır (Butte ve ark., 2007). Bu kuruluşların hafif şişman ve obeziteye yönelik sınıflandırmaları Tablo 2.1.2.'de verilmiştir (CDC, 2002); Barlow ve Expert Committee, 2007; Aggrawal ve Jain, 2018; Kuczmarski ve ark., 2000; Cole ve ark., 2000; WHO, 2007; Wang ve Wang, 2002). Dünya Sağlık Örgütü'nün yayınlamış olduğu çocuk büyüme standartları optimum çevresel koşullarda normal büyümeyi tanımlamaktadır ve etnik köken, sosyoekonomik durum ve beslenme şekli ne olursa olsun her yerde çocukları değerlendirmek için kullanılabilir (WHO, 2007).

Tablo 2.1.2. Çocuk ve adölesanlar için beden kütle indeksi persentil değerlerine göre hafif şişman ve obezite referans sınıflandırılması

Referans	Metodoloji ve kesişim noktaları
CDC*	• Örneklemin temelini yaşları 2 – 20 arasında değişen Amerikalı çocuklar oluşturmaktadır. • Hafif şişman tanımlaması için kesişim noktası 85. persentil kullanılmaktadır. • Obezite tanımlaması için kesişim noktası 95. persentil kullanılmaktadır.
IOTF**	• 6 farklı ülkeden (Brezilya, Amerika, Singapur, İngiltere, Hong Kong, Hollanda) yaşları 2 ile 18 yaş arasında değişen yaklaşık 200.000 çocuk çalışmaya dahil edilmiştir. • Çalışmada 18 yaşına kadar olan çocuklarda obezite kesişim noktası beden kütle indeksinin 95. yüzdesi olarak kabul edilmiştir. • 18 yaşından büyükler için ise hafif şişman ve obezite sınıflandırmasına yönelik BKİ kesişim noktaları sırası ile 25 kg/m² ve 30 kg/m²'dir. Bu kesişim noktalarının çocuklar içinde kullanılabileceği ön görülmüştür.

Tablo 2.1.2. Çocuk ve adölesanlar için beden kütle indeksi persentil değerlerine göre hafif şişman ve obezite referans sınıflandırılmasının devamı

WHO***	• Çalışmanın örneklemini, büyümesi kısıtlanmamış, belirtilen kriterlerde emzirilme süresi ve tamamlayıcı beslenmeye başlamış çocuklardan oluşmaktadır. • Büyüme referanslarına göre, BKİ yaklaşık 25 kg/m² karşılık olarak >+1SD'ise hafif şişman; yaklaşık 30 kg/m² karşılık olarak >+2 SD ise obez tanımlaması yapılmaktadır. • Beden kütle indeksi persentil değerlerine göre 85 – 95 persentil aralığı hafif şişmanlığı, 95. Persentil üzeri ise obeziteyi tanımlamaktadır.
--------	---

*CDC: Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi

**IOTF: Uluslararası Obezite Çalışma Grubu

***WHO: Dünya Sağlık Örgütü

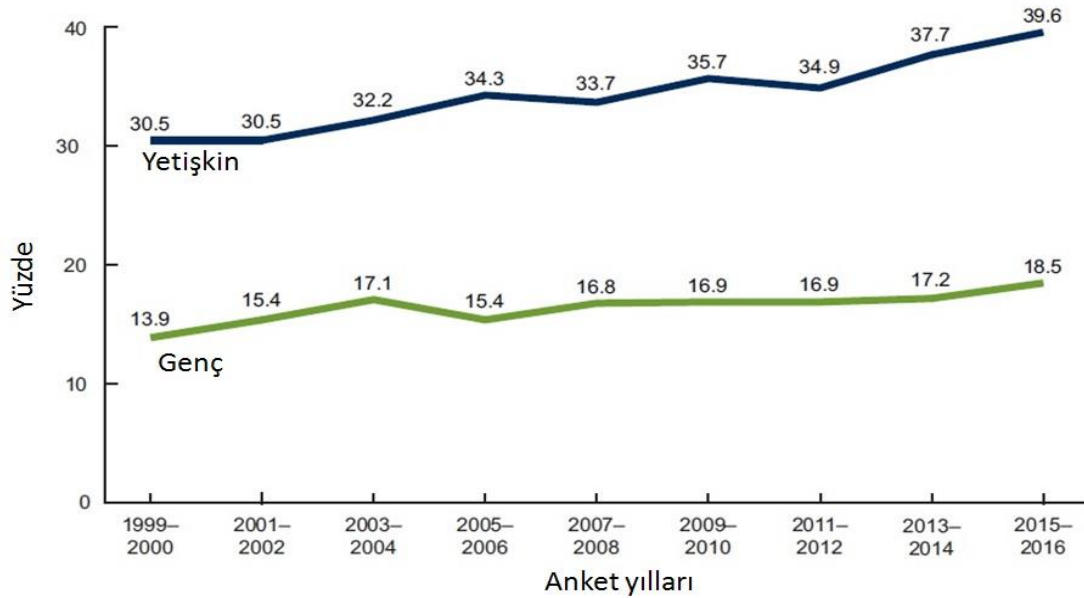
Bununla birlikte, vücut yağ kütlelerinin değerlendirilmesinde hafif şişman ve obezitenin tanısının konulmasında BKİ kullanımının belirli kısıtlamaları bulunmaktadır (Müller ve Geisler, 2017). Bu hesaplama ile yağ kütlesi ile kas kütlesi birbirinden ayıramamakta ve vücut yağ yüzdesi tam olarak ön görülememektedir. Bu nedenle, vücut yağ yüzdesi ve bel çevresi ölçümü obezitenin tanımlanmasında kullanılan diğer pratik araçlardır. Yetişkin kadınlarda vücut yağ yüzdesinin %35'in, erkeklerde ise %25'in üzerinde olması obezite olarak tanımlanmaktadır. Bel çevresi ölçümü ise abdominal obezitenin varlığını belirlemektedir. Bu ölçüm BKİ'ne göre insulin direnci, dislipidemi ve non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı ile daha güçlü bir ilişkiye sahiptir (Aggarwal ve Jain, 2018). Normal bel çevresi referansı kadınlarda <80 cm, erkeklerde ise <94 cm'dir. Kardiyometabolik risk için kesim noktaları ise kadınlarda >88 cm, erkeklerde ise >102 cm olarak gösterilmiştir (Schutz ve ark, 2019).

2.2. Obezitenin Görülme Sıklığı

Dünya genelinde obezite prevalansı 1975 yılından 2016 yılına kadar neredeyse 3 katına çıkmıştır. Daha önceki yıllarda yüksek gelirli, sosyo ekonomik düzeyi yüksek olan ülkelerin sağlık problemi olarak tanımlanan obezitenin görülme sıklığı günümüzde düşük ve orta gelirli ülkelerde artış göstermektedir (Greydanus ve ark., 2018).

DSÖ'nün 2016 verileri incelendiği zaman 41 milyon beş yaş altı çocuğun hafif şişman veya obez olduğu görülmektedir. Çocuk ve adölesanlarda (5 – 19 yaş) ise bu oran 340 milyon olarak belirlenmiştir. Bu yaş grubunda hafif şişman ve obezite görülme sıklığı dramatik bir şekilde artış göstermiştir. 1975 yılında %4 olarak belirlenen hafif şişman ve obezite oranı 2016 yılında %18 olarak saptanmıştır. Bu artış her iki cinsiyette de benzer şekillerde gerçekleşmiştir. 2016 yılındaki, hafif şişmanlık oranı kızlarda %18, erkeklerde ise %19'dur. Obezite görülme sıklığı ise 1975 yılında %1'den azken, 2016 yılında bu oran kızlarda %6, erkeklerde ise %8 olarak saptanmıştır. Yetişkin popülasyonunda hafif şişmanlığın görülme oranı %39, obezitenin ise %13'tür (WHO, 2018).

Amerika'da gerçekleştirilen Ulusal Sağlık ve Beslenme İnceleme Anketi (NCHS) sonuçlarına göre 2015 – 2016 yıllarında yetişkinlerdeki obezite prevalansı %39,8, çocuk ve adölesanlarda ise %18,5 olarak belirlenmiştir. Yaş grupları arasındaki farklılıklar incelendiği zaman yetişkinlerde obezite en sık orta yaş grubunda (40 – 59 yaş) (%42,8) ve bunu takiben genç yetişkin grubunda (20 – 39) (%35,7) görülmektedir. Çocuk ve adölesanlarda obezite görülme sıklığının yaşlara göre dağılımı ise 2 – 5 yaş (%13,9), 6 -11 yaş (%18,4) ve 12 – 19 yaş (%20,8)'dir. Tüm yaş gruplarında obezitenin anlamlı derecede arttığı yapılan bu çalışma ile gösterilmiştir (Şekil 2.2.1) (Hales ve ark, 2017).



Şekil 2.2.1. Ulusal Sağlık ve Beslenme İnceleme Anketi (NCHS) verilerine göre yetişkin ve gençlerde obezite görülme sıklığının yıllara göre değişimi.

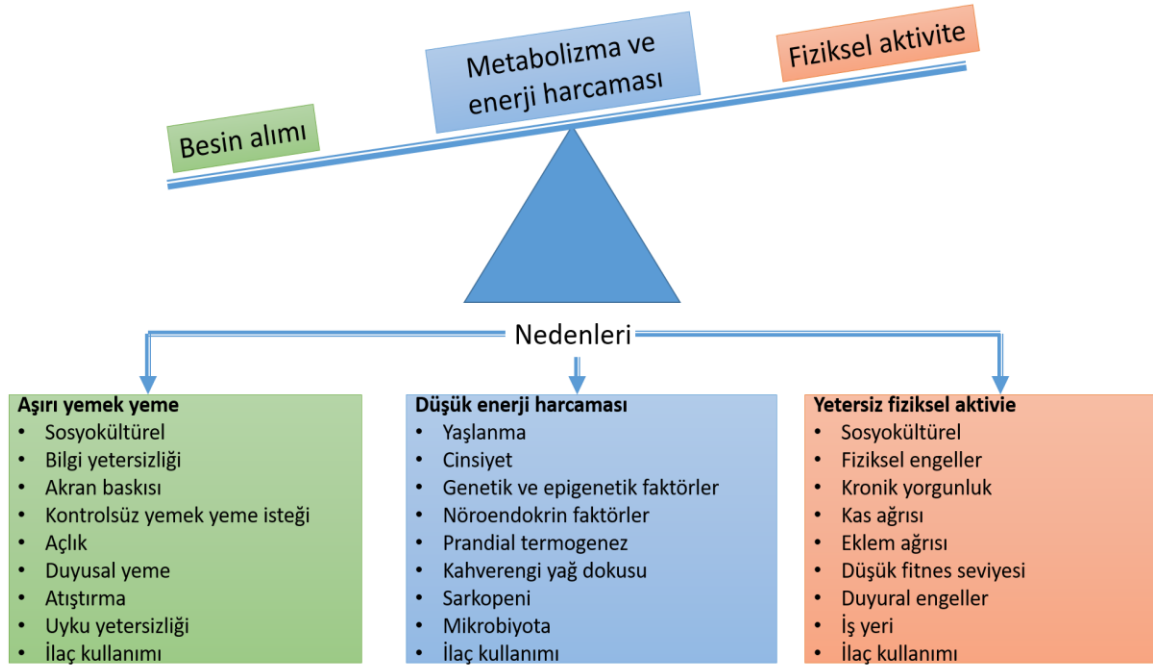
Türkiye Diyabet Epidemiyolojisi Çalışması -1 (TURDEP-1)'e göre 20 yaş üzeri yetişkinlerde obezite prevalansı %22,3 (erkek: %12,9; kadın: %29,9) olarak belirlenmiştir. Bölgesel analizler incelendiği zaman kentsel bölgede (%23,8) kırsal kesimlere göre (%19,6) daha yüksek obezite prevalansı olduğu saptanmıştır (Satman ve ark, 2002). TURDEP-2 çalışmasında ise her iki cinsiyet grubunda da obezite prevalansının artış gösterdiği belirlenmiştir. Erkeklerde obezite prevalansı %27,3, kadınlarda %44,2, toplamda ise %35,9 olarak bulunmuştur (Satman ve ark, 2011). Türkiye Beslenme ve Sağlık Araştırması (TBSA) 2010 yılı raporuna göre yetişkinlerde obezite görülme sıklığı %30,3'tür. Bu oranın cinsiyete göre dağılımına bakıldığında zaman erkeklerde %20,5, kadınlarda ise %41,0 olduğu görülmektedir. Çocuk ve adolesan grubunda obezite görülme sıklığı 0 – 5 yaş ve 6 – 18 yaş grubunda sırası ile %8,5 ve %8,2'dir. Sıfır – 5 yaş grubu kız çocuklarında obezite görülme oranı %6,8, erkeklerde ise %10,1'dir. Altı – 18 yaş grubu kız çocuklarında ise bu oran %7,3, erkeklerde ise %9,1 olarak saptanmıştır (TBSA, 2010). Türkiye Sağlık Araştırması (TÜİK)-2016

verilerine göre 15 yaş üzeri bireylerde obezite oranı %19,6 olarak saptanmıştır. Cinsiyet farklılığına bakıldığında zaman kadınlardaki obezite görülme oranı %23,9, hafif şişmanlık görülme oranı %30,1'dir. Erkeklerde ise bu oranlar sırası ile %15,2 ve %38,6'dır (TÜİK, 2016).

Kuzey Kıbrıs Türk Cumhuriyeti'nde (KKTC) yaşları 9 ile 18 arasında değişen 298 çocuk ve adölesanlarda yapılan çalışma sonucunda hafif şişmanlık oranı %18,6, obezite oranı %16,2 olarak saptanmıştır. Bu çalışmaya göre kız çocuklarda bu oranlar sırası ile %17,2 ve %24,3'tür. Erkek çocukların ise %20,0'si hafif şişman, %8,7'si ise obez sınıflamasına girmektedir (Seray ve ark, 2012). KKTC'de yapılan başka bir çalışmadan yaşları 18 ile 33 arasında değişen 300 kişide hafif şişmanlık oranı %12,7, obezite oranı ise %4,7 olarak saptanmıştır (Özduran, 2017). Kadınlar üzerinde yapılan bir çalışmada ise hafif şişmanlık oranı %20,6 olarak saptanmıştır. Obezite görülme sıklığı detaylandırıldığı zaman %5,3'ü birinci derece obez, %2,4'dü ikinci derece obez sınıflamasında saptanmıştır (Nazif, 2012).

2.3. Obezite Gelişim Nedenleri

Obezitenin gelişim nedenleri halen tartışılmaktadır. Genetik, kültürel yapı ve sosyoekonomik durum gibi faktörleri içeren biyolojik, psikososyal, ve davranışsal faktörler arasındaki karmaşık ilişki obezitenin gelişim nedenlerini açıklamaya çalışmaktadır (Apovian, 2016). Böylelikle obezitenin kişisel seçimlerden veya toplumdan dolayı değil bireyin çevresi ile arasındaki ilişkiden kaynaklandığı söylenebilmektedir. Obezitenin gelişimi, besin alımı, fiziksel aktivite, cinsiyet, mikrobiyota, uyku, ilaç kullanımı vb. daha bir çok faktörden etkilenmektedir. Bu faktörlerin listesi Şekil 2.3.1.'de gösterilmiştir (Blüher, 2019).



Şekil 2.3.1. Obezitenin en temel nedenleri artan enerji alımı, düşük fiziksel aktivite ve düşük enerji harcamasının birlikteliğidir. Şekil, kronik pozitif enerji dengesini etkileyebilecek faktörler ve obezite gelişim nedenlerini açıklamaktadır (Blüher, 2019’dan uyarlanmıştır).

Temel nedenler arasında olan artmış enerji alımı ve azalmış enerji harcamasına ek olarak obezitenin gelişimine neden olan farklı faktörlerde tanımlanmıştır. Bu faktörler Tablo 2.3.1’te listelenmiştir (Wright ve Aronne, 2012; Lu ve ark, 2019; Khan ve ark, 2009; World Obesity Federation Position Statement, 2017).

Tablo 2.3.1. Obezite gelişimine katkı sağlayan diğer faktörler.

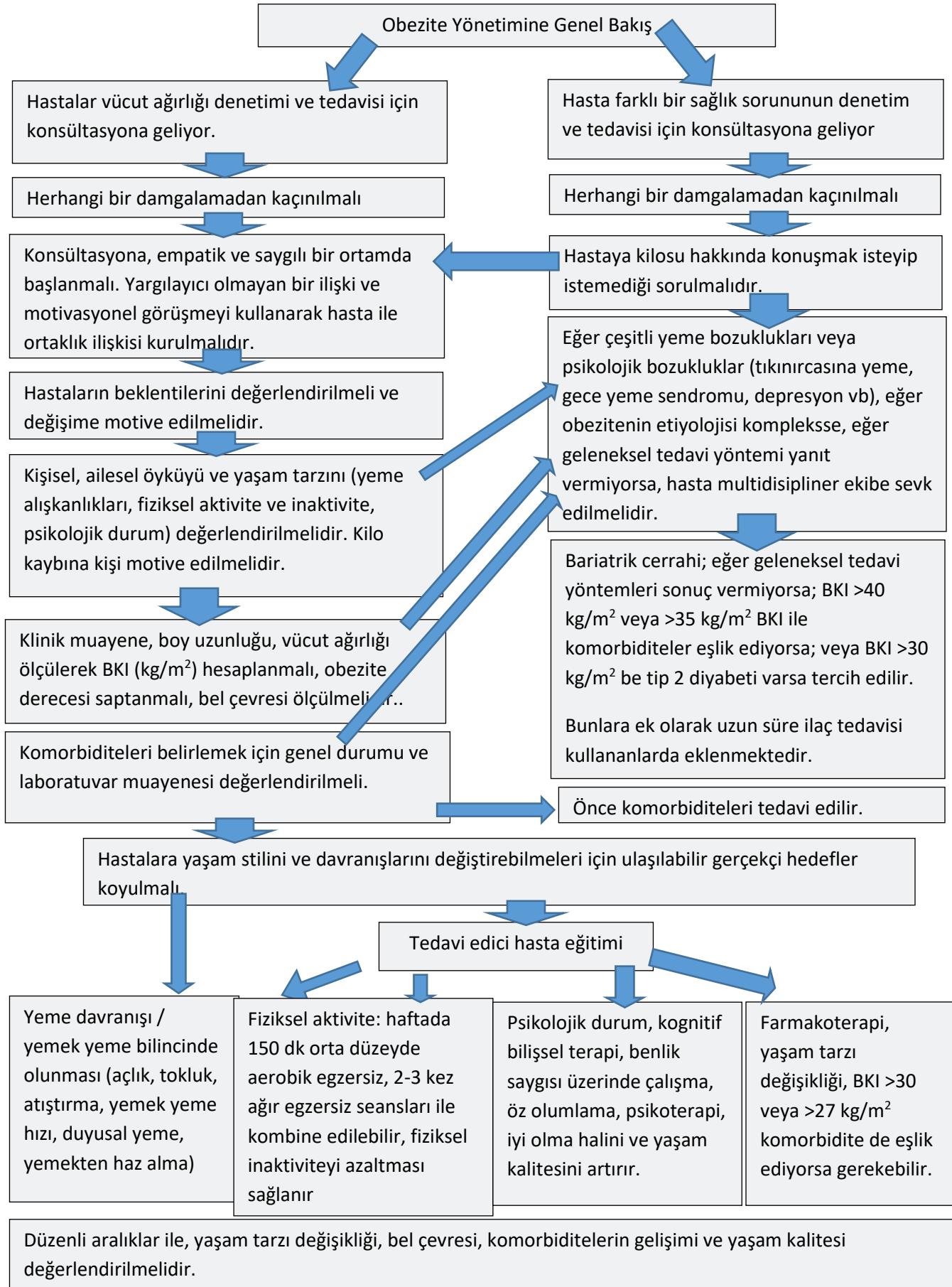
Yemeğin yenildiği ortam
Uyku süresi
İlaç ile indüklenmiş kilo kazanımı
Endokrin bozukluklar (hipertiroidizm, büyüme hormonu eksikliği, dirençli hiperinsülinemi vb)
Etnik köken ve yaş dağılımındaki değişiklikler
Intrauterin yaşam
Yetersiz anne sütü kullanımı
Enfeksiyonlar
Fazla alkol kullanımı

Tablo 2.3.1. Obezite gelişimine katkı sağlayan diğer faktörler devamı.

Gastrointestinal sistem sorunları
Psikiyatrik bozukluklar
Hormonal veya kan şekeri yükselmeleri
Fizyolojik değişiklikler
Besin fiyatlarının pahalı olması
Egzersiz yapmak için güvenli alanların eksikliği
Toksinler ve virüsler

2.4. Obezitenin Tedavisi

Obezitenin yönetiminde ve tedavisinde temel hedefler hastayı metabolik yönden sağlıklı tutmaya çalışarak komplikasyonları önlemektir. Bununla birlikte obeziteye eşlik eden farklı hastalıkların gelişimini önlemek ve herhangi bir hastalığa sahipse tedavi etmektir. Daha sonra beden imajının iyileştirilmesi ve özgüvenin sağlanması hedeflenilmelidir. Obez bir hastanın tedavisinde multidisipliner yaklaşım önemli bir yer tutmaktadır. Tedavisinde etkin disiplinler arası ekipte doktor, hemşire, fiziksel aktivite uzmanı ve psikolog veya psikiyatrist bulunmalıdır. Obezitenin yönetimine ve tedavisine yönelik algoritma ilkeleri Şekil 2.4.1.'te açıklanmıştır (Schutz ve ark, 2019).



Şekil 2.4.1. Obezitenin yönetimine ve tedavisine yönelik algoritma

Klinik muayene sonucu elde edilen BKİ ve bel çevresi sonuçlarına göre hastaya uygulanacak olan tedavi protokolü belirlenmekte ve bunlar yaşam tarzı değişikliği (diyet, fiziksel aktivite), cerrahi (bariatrik cerrahi) ve ilaç kullanımı olarak değişmektedir. Elde edilen ölçüm verilerine göre değişen tedavi protokolleri Tablo 2.4.1’te sunulmaktadır (Yumuk ve ark., 2015).

Tablo 2.4.1. BKİ ve bel çevresi ölçümlerine göre değişen tedavi protokolleri

BKİ (kg/m ²)	Bel Çevresi (cm)		Komorbiditeler
	Erkek: <94 cm Kadın: <80 cm	Erkek: ≥94 cm Kadın: ≥102 cm	
25.0 – 29.9	L	L	L±D
30.0 – 34.9	L	L±D	L±D±S*
35.0 – 39.0	L±D	L±D	L±D±S*
≥40.0	L±D±S*	L±D±S*	L±D±S*

L: Yaşam tarzı değişikliği (diyet, fiziksel aktivite).

D: İlaçlar düşünülebilir.

S: Cerrahi işlem düşünülebilir.

*Hastalar tip 2 diyabetlidir.

Dünya Sağlık Örgütü ise tedavi uygulamalarını üç gruba ayırmaktadır. Bunlar, genel, seçici ve hedef müdahale gruplarıdır. Önleme programları ise davranışlara yönelik (bireysel müdahale) veya topluluk/çevreye yönelik (çevresel müdahale) olmak üzere iki başlık altında incelenmektedir. Genel koruma (primer koruma) müdahale grubunda hedef halktır ve amaç obezite gelişiminin önlenmesidir. Bu amaç doğrultusunda alınan önlemler; bir hastalık olarak obezite bilincini oluşturmak, sağlıklı çevreler oluşturmak, gündüz bakım evleri, okullar, kitle iletişim araçları ile eğitim ve davranış eğitimi vermek, okullarda ve topluluklarda fiziksel aktivite imkanlarını geliştirmek, sağlık politikaları geliştirmek ve ilgili grupların işbirliğini sağlamaktır.

Seçici müdahale (ikincil koruma) grubunda hedef potansiyel risk gruplarıdır ve amaç eşlik eden komorbiditeler ile birlikte obezite gelişiminin önlenmesidir. Bu amaç doğrultusunda alınan önlemler; çocuk doktorları, halk sağlığı merkezleri, aile hekimleri tarafından risk gruplarının belirlenmesi ve tartışılması, aile odaklı eğitimler ve rutin

kontrollerin sağlanmasıdır. Hedef müdahale (üçüncül koruma) grubunda hedef yüksek sağlık riskleri olan veya obez ve hafif şişman çocuk ve adölesanlardır ve amaç vücut ağırlığının olması gereken düzeye getirilmesi ve komorbiditelerin iyileştirilmesidir. Bu amaç doğrultusunda alınması gereken önlemler; disiplinlerarası programlar, önlemler ve ölçümler ve genel sağlık teşvikinin yanı sıra obezitenin önlenmesi için birincil ve ikincil koruma önlemlerinin alınmasıdır.

Davranışlara yönelik önleme programlarında bireysel ölçümler gerçekleştirilir. Bu ölçümler arasında bireysel davranış ve alışkanlıklar bulunmaktadır. Davranışların değiştirilmesine yönelik beslenme eğitimleri ve okul derslerinde hemde eğitimsel programlarda fiziksel aktiviteyi artırıcı girişimlerde bulunulmalıdır. Topluluk ve çevreye yönelik önleme programlarında sağlıkla ilgili karar vermek kolaylaştırılır. Tüm bunların gerçekleştirilebilmesi için okul içi tesisler artırılmalı ve beslenme eğitimleri, eğitsel programların geliştirilmesi, fiziksel aktivitenin artırılmasına yönelik ekipmanların kolaylaştırılmasının gerekliliği vurgulanmalıdır (Blüher ve ark., 2018; Hoelscher ve ark 2013).

2.5. Kefirin Tanımı ve Hazırlanışı

Kefir, Kafkasya, Tibet, Moğolistan kökenli bir içecektir. M.Ö. 2000 yılından itibaren günümüze kuşaktan kuşağa aktarılarak gelmiştir. Kefir, iyi olmak veya iyi yaşamak anlamına gelen ‘keyif’ sözcüğünden türetilmiştir ve tüketen kişilerin genel sağlık ve iyi olma duygularının geliştiğine inanılmaktadır (Farnwoth, 2005). Kefir, probiyotik içeriği zengin fermente bir besin olarak bilinmektedir. Fermente süt ve süt ürünleri, kompleks fermente edici mikrobiyal toplulukların etkileşimi tarafından üretilmektedir. Bu kültürler sıvı veya tane yapıda olabilir ve simbiyotik yaşam süren maya ve bakterilerin kompleks ve spesifik yapısından oluşmuştur (Macori ve Cotter, 2018).

Geleneksel kefir, taze süt ile kefir tanelerinin karıştırılması ve süt ile fermentasyonu aracılığı ile yapılmaktadır. Kefir yapımında genellikle inek sütü kullanılmaktadır ancak keçi veya koyun sütü de kullanılarak üretilebilmektedir. Kefir aynı zamanda süt ve ürünleri haricindeki içeceklerden ceviz sütü, soya sütü, hindistan cevizi sütü, pirinç sütü

veya fıstık sütü gibi içecekler kullanılarakta yapılabilir. Bu ürünlerden yapılacak olan kefirde laktik asit bakterilerinin stimülasyonuna yardımcı olması, mayaların büyümesinin sağlanması ve laktik asit ile etanol üretiminin sağlanması için %1 glukoz, laktoz veya sükroz eklemesi yapılmalıdır (Nielsen ve Gürakan, 2014).

Kefir taneleri ve süt hazırlanır. Kefir yapımında kefir taneleri ile süt arasındaki ideal orantı 1:30 veya 1:50'dir. Belirtilen oranlarda kefir tanesi ve süt karıştırılır ve fermentasyona bırakılır. Fermentasyon işlemi 8 ile 25°C arasında değişen kısmen kapalı bir kapta gerçekleştirilir. Fermentasyon süresi ise 8 – 40 saat arasında değişir, genellikle inkübasyon süresi olarak 24 saat kullanılmaktadır. Daha sonra kefir taneleri hazırlanan içecekten süzgeç aracılığı ile ayrılır. Bu ayrılan kefir taneleri tekrar kefir yapmak için substrat olarak kullanılabilir. Hazırlanan kefir taneleri 4°C'de soğuk ortamda saklanabilir (Rosa ve ark, 2017; Otles ve Cagindi, 2003).

2.6. Kefirin Besin Ögesi Kompozisyonu

Kefirin besin ögesi içeriği geniş ölçüde değişmektedir ve kullanılan sütün kompozisyonu ile kullanılan kefir tanelerinin köken ve kompozisyonundan, fermentasyon süre/sıcaklığından ve saklanma koşullarından etkilenmektedir (Rosa ve ark, 2017).

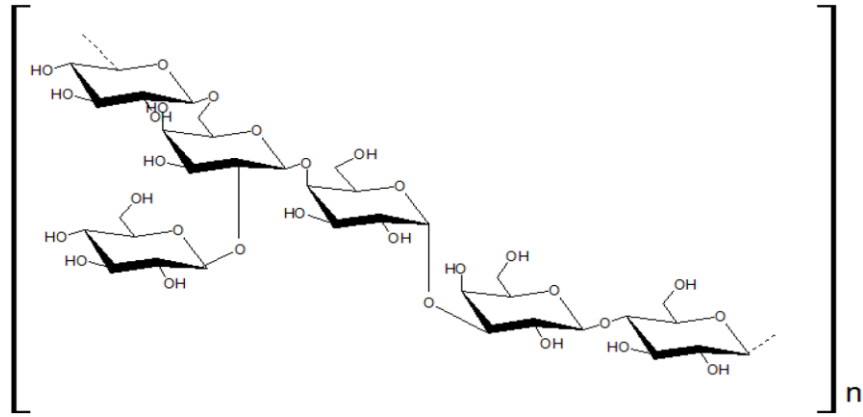
Kodeks alimentarius komisyonunun (Codex Stan 243-2003) raporuna göre, kefir taneleri ile fermente edilerek elde edilmiş kefir en az %2.7 protein, %0,6 laktik asit ve %10'dan az yağ içermelidir. Alkol yüzdesi ile ilgili herhangi bir rakam belirlenmemiştir. Fermentasyon sonucunda toplam mikroorganizma sayısı en az 10^7 CFU/ml ve mayaların miktarı ise 10^4 CFU/ml'den az olmamalıdır.

Ulusal gıda kompozisyon veri tabanına göre kefirin (Ankara kefir) besin ögesi içeriği Tablo 2.6.1'te verilmiştir (TURKOMP, 2019).

Tablo 2.6.1. 100 gram kefirin besin ögesi içeriği (TURKOMP, 2019)

Bileşen	Birim	Ortalama
Enerji	kcal	58
Su	g	89.13
Protein	g	3,29
Yağ (toplam)	g	3,65
Karbonhidrat	g	3,11
Tuz	mg	96
Demir	mg	0,42
Kalsiyum	mg	119
Fosfor	mg	69
Magnezyum	mg	10
Sodium	mg	38
Tiamin	mg	0,06
Riboflavin	mg	0,16
Triptofan	mg	48
Lizin	mg	363
Lösin	mg	278
Izolösin	mg	149

Kefir taneleri, bakteri ve mayaların sinbiyotik ilişkisi tarafından oluşturulan eşsiz bir ekosisteme sahiptir. Bu ekosistem içerisinde 50 çeşitten fazla bakteri ve maya türü bulunmakta ve yapısındaki kompleks mikrobiyal topluluğu oluşturmaktadır (Pogacic ve ark, 2013; Otles ve ark, 20003). Yapı olarak karnabahara benzeyen kefir taneleri, elastik, düzensiz, jelatin yapıda, fildişi veya beyaz renktedir. Tanelerin büyüklükleri 0.3 – 3.5 cm arasında değişkenlik göstermektedir (Leite ve ark 2013). Kefir taneleri genellikle %4.4 yağ, %12.1 kül, %45,7 mukopolisakkarit, %34.3 total protein (%27 çözünmeyen, %1.6 çözünebilir ve %4.6 serbest aminoasit) ile K ve B vitaminleri, triptofan, kalsiyum, fosfor ve magnezyum içermektedir (Rosa ve ark 2017). Kefirin yapısındaki polisakkarite kefiran adı verilmektedir. Kefiran'ın yapısı Şekil 2.6.1'te verilmiştir (Prado ve ark 2015). Kefiran'ın kompleks yapısında d-glukoz ve d-galaktoz oranı 1:1'dir. Bu yapısı sayesinde mikroorganizmalar arasındaki iletişimi sağlamaktadır (Pogacic ve ark, 2013).



Şekil 2.6.1. Kefiran'ın yapısı.

Kefirin mikroflorasında çok fazla çeşitte sinbiyotik ilişki içerisinde bulunan mikroorganizma bulunmaktadır. Bunlar mayalar (*Kluyveromyces*, *Candida*, *Saccharomyces* ve *Pichia*), laktik asit bakterileri (LAB) (*Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*) ve nadiren asetik asit bakterileridir (Plessas ve ark 2017). Kefir tanelerinin bir çok orjini rapor edilmiştir. Bu nedenle tanelerin içerisinde bulunan baskın mikroorganizma türlerinde de değişiklik söz konusudur. Örneğin Türkiye kökenli kefir tanelerinin içerisindeki baskın mikroorganizma türü *Lactobacillus kefiranofaciens* ve *Lactococcus Lactis*'dir (Kesmen ve Kaçmaz, 2011). Kodeks alimentarius komisyonunun (Codex Stan 243-2003) raporuna göre kefir tanelerinin içerisinde *Lactobacillus kefir*, *Leuconostoc* türleri, *Lactococcus* ve *Acetobacter* güçlü bir ilişki içerisinde bulunmaktadır. Aynı zamanda hem laktozu fermente edebilen mayalar (*Kluyveromyces marxianus*) ve laktozu fermente etmeyen mayalar (*Saccharomyces unisporus*, *Saccharomyces cerevisiae* ve *Saccharomyces exiguus*) kefir tanelerinin yapısında yer almaktadır. Kefir probiyotik özelliğini içerisinde bulunan Bifidobakteri türleri (*Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus salivarius* ve *Saccharomyces boulardii*), Bifidobacterium Bifidum, bir çok laktik asit bakterisi ve mayalar sayesinde göstermektedir (Güzel-seydim ve ark 2011).

Kefirin yapılış aşamasındaki soğuma adımı, alkolik fermentasyon CO_2 (%0.08 – 0.2), etanol (%0.5 – 2.0) ve B grubu vitaminlerinin birikimine öncülük eder (Rosa ve ark 2017). Bu olgunlaşma sürecinde, laktoz içeriği azalmaktadır. Bununla birlikte pH düşmekte (4.2 – 4.6) ve kıvam artmaktadır. Süt laktozunun yaklaşık %30'u β -galaktosidaz enzimi tarafından glukoz ve galaktoza hidrolize edilmektedir. Buna ek olarak laktik asit bakterileri laktozu laktik asite çevirerek laktoz içeriğini azaltmaktadır (Hertzler ve Clancy, 2003).

Fermentasyon işlemi sırasında, asit koagülasyonu ve proteoliz nedeniyle proteinler kolay sindirilebilir hale gelmektedir. Fermente olmayan süt ürünleri ile kefir karşılaştırıldığı zaman serin, lizin, alanine, treonin, triptofan, valin, lizin, metionin, fenilalanin ve isolösin miktarlarının kefirde daha fazla olduğu görülmüştür (Arslan, 2015).

Kefirin lipid içeriğini monoasilgliseroller, diaasilgliseroller, triasilgliseroller ve esterleşmemiş serbest yağ asitleri oluşturmaktadır. Ancak yağ içeriği kullanılan sütün içeriğine göre değişkenlik göstermektedir. İçeriğindeki serbest yağ asitleri sindirilebilirliğin kolay olmasına katkı sağlamaktadır (Rosa ve ark 2017).

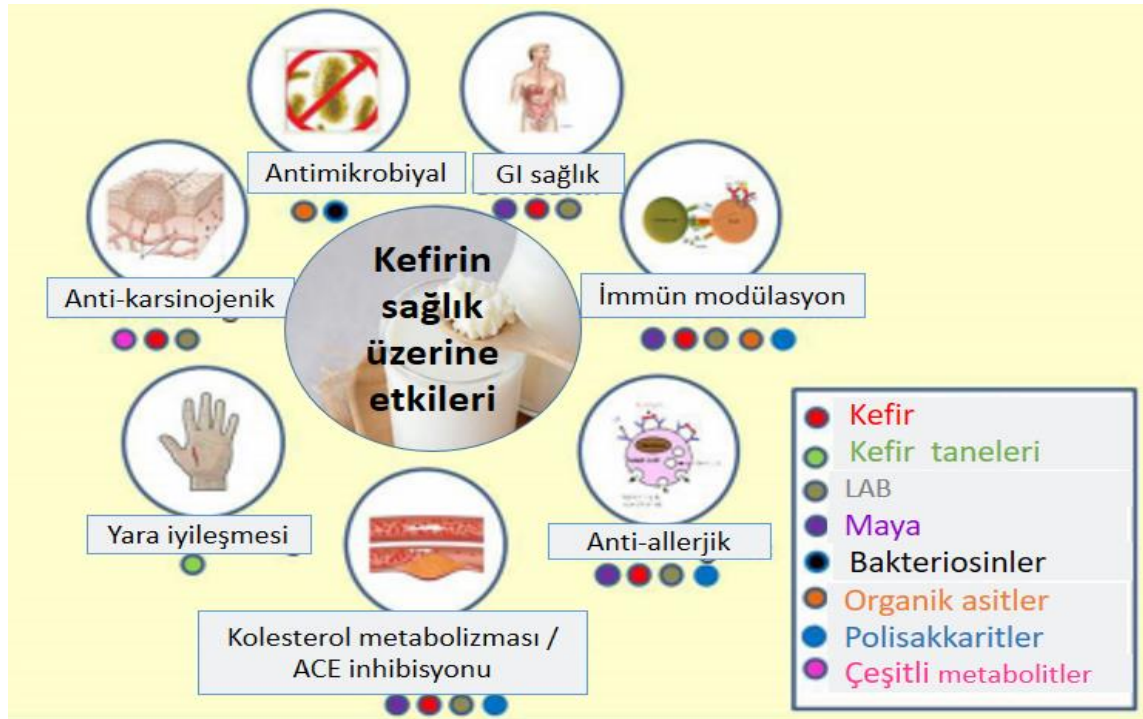
Kefir zengin vitamin bileşimine sahiptir. Kullanılan süt çeşidine göre, kefir tanelerindeki mikroorganizmaların çeşidine ve kefirin hazırlanma şekline göre vitamin içeriği değişkenlik göstermektedir. Kefir yapısında B_1 , B_2 , B_5 , C, A ve K vitaminleri oldukça fazla miktarda bulunmaktadır. Fermentasyon işlemi sonrasında ise pridoksin, B_{12} vitamini, folik asit, biotin, tiamin ve riboflavin konsantrasyonlarının artışı görülmektedir (Otlar ve Cagindi 2003).

Mineral içeriği incelendiği zaman kefirin magnezyum, kalsiyum ve fosfor içeriğinin zengin olduğu görülmüştür. Bu minerallere ek olarak bakır, çinko, manganez, demir, kobalt ve molibden de belirli miktarlarda bulunmaktadır (Ahmed ve ark 2013).

Kefir taneleri 4°C 'de en fazla 8 – 10 gün saklanabilirken, liyofilizasyon işlemi veya kurutma işlemi ile oda sıcaklığında 36 – 48 hafta saklanabilir (Pogacic ve ark, 2013).

2.7. Kefirin Sağlık Üzerine Etkileri

Kefir fizyolojik, hastalıkları önleyici ve tedavi edici özellikleri sayesinde sağlık üzerine olumlu etkilere sahiptir. Bu etkileri fermentasyon sürecinde oluşan ve bağırsak mikrobiyotasındaki mikrobiyal çeşitliliğe destek veren bir çok biyoaktif bileşik sayesinde veya bu bileşiklerden bağımsız olarak göstermektedir (Şekil 2.7.1.) (Leite ve ark, 2013; Bourrie ve ark 2016).



Şekil 2.7.1. Kefir ve kefirin içerisindeki bileşenlerin sağlık üzerindeki olumlu potansiyel etkileri. GI: Gastrointestinal; LAB: Laktik asit bakterileri; ACE: anjiyotensin dönüştürücü enzim.

Kefirin sağlık üzerinde tümör baskılayıcı ve önleyici etki (Gao ve ark 2013; Maalouf, Baydoun ve Rizk, 2011; Melo, Mendonça ve Castro, 2018; Yamane ve ark, 2018; Bennour ve ark, 2018), gastrointestinal bağırsıklığı artırıcı (Davras, Tas ve Guzel-seydim, 2018; Taş ve ark 2019;), anti-allerjenik (Hong ve ark 2011; Lee ve ark 2007; Liu ve ark 2006b), yara iyileşmesini hızlandırıcı (Oryan, Alemzadeh ve Eskandari,

2.8. Kefirin Obezite Yönetimindeki Olası Etki Mekanizmaları

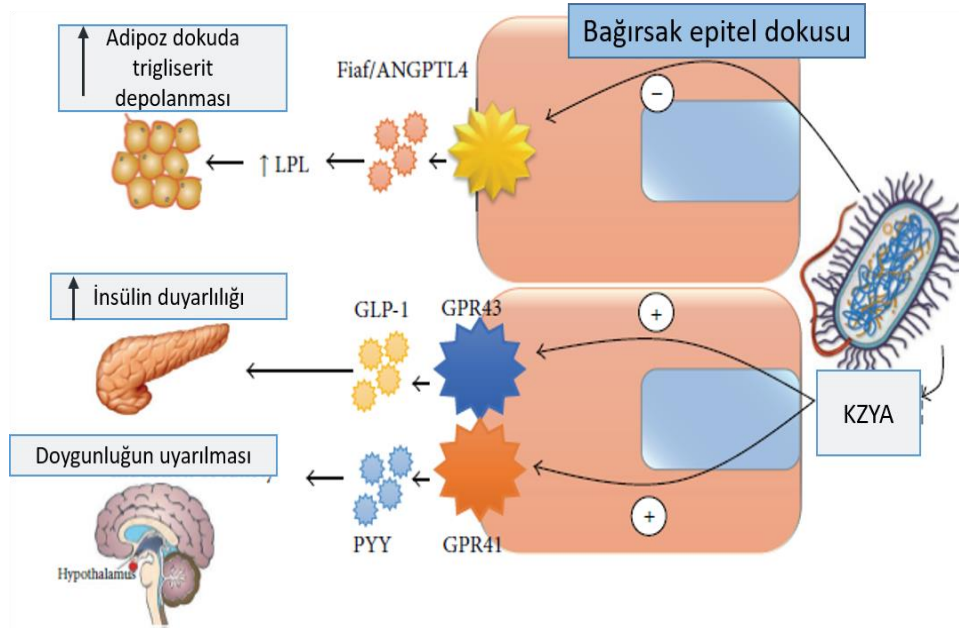
Trilyonlarca mikrop bağırsaklarımızda yaşam sürmektedir. Bu mikropların toplu haline ise bağırsak mikrobiyotası adı verilmektedir. Bağırsak ekosistemimiz konakçı fizyolojisinde esansiyel rol oynamaktadır. Bu ekosistemdeki değişiklikler düşük dereceli inflamasyon, metabolik hastalıklar, artmış lipid birikimi, azalmış insulin duyarlılığı gibi değişen bir çok fizyolojik bozukluğa neden olarak metabolik hastalıkların gelişim riskini artırmaktadır (Boulangue ve ark, 2016).

Bağırsak mikrobiyotası, bağırsaktaki kılcal damarların yoğunluğunu artırması ile ve bağırsak fizyolojisi ile bağırsak motilitesini etkileyerek bağırsak epitelini geliştirir. Böylelikle diyetten kalori ekstraksiyonunu teşvik eder (Boulangue ve ark, 2016).

Polisakkaritler ince bağırsakta sindirilmeden kolona geçerler ve burada bağırsak mikrobiyotası tarafından asetat, propiyonat ve bütirat kısa zincirli yağ asitlerine (KZYA) dönüştürülürler. Bu bileşikler kolonositler tarafından enerji substratı olarak kullanılırlar. Bu durum günlük enerji ihtiyacına %10 katkıda bulunmaktadır. Kronik enerji hasatı ise vücutta artmış yağ birikimine sebep olmaktadır (Boulangue ve ark, 2016; Khan ve ark, 2016; Brusaferrro ve ark 2018; Sahabana, Shahid ve Irfan, 2018).

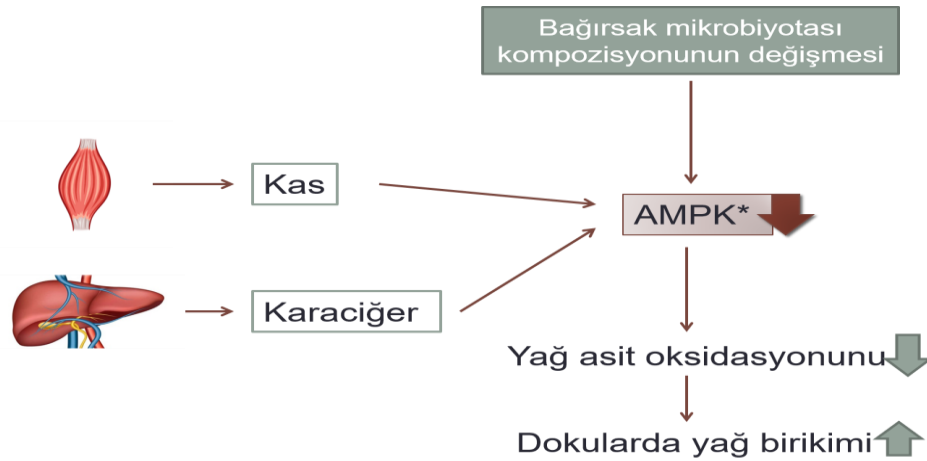
Bağırsak mikrobiyotası, intestinal hücrelerden salgılanan açlıkla indüklenen adipoz faktör (FIAF) regüle eder. FIAF aynı zamanda angiopoetin benzeri protein-4 (ANGPTL-4) olarak bilinmektedir. Bu faktör, adipoz dokulardaki lipoprotein lipaz (LPL) inhibitörüdür. FIAF aktive edilmesi ile birlikte LPL triaçilgliserolü serbest yağ asitlerine dönüştürerek kas ve yağ doku tarafından kullanılmasını sağlar. Bununla birlikte, FIAF inhibe edilmesi trigliseritlerin adipositlerde birikimine öncülük etmektedir. FIAF, peroksizom proliferatör- aktive reseptörler (PPARs) için hedef gendir ve kalın bağırsaklardaki epitelyal hücreler ve karaciğer tarafından üretilmektedir (Şekil 2.8.1) (Boulangue ve ark, 2016; Khan ve ark, 2016; Mazloom, Siddiqi ve Covasa, 2019; Englar, Barlow ve Mathur, 2019).

KZYA, bağırsak ve diğer organlardaki hormonların dengesini değiştirmesi aracılığı ile enerji metabolizmasını etkileyebilmektedir. Obez bireylerde glukagon benzeri peptit-1 (GLP-1) sekresyonu azalmaktadır. Bunun sonucunda insülin direnci ve buna bağlı kilo artışları görülmektedir. Bağırsak mikrobiyotası, GLP-1 öncülerinin ekspresyonunu etkileyerek GLP-1 regülasyonunu sağlamaktadır. KZYA, G proteine bağlı reseptörlerin (GPCRs) (örneğin: bağırsak veya endokrin hücrelerinden eksprese edilen GPR41, GPR43 ve GPR109A) ligandlarıdır. KZYA üretimi ile GPCRs peptit YY (PYY) ve GLP-1 salınımı stimüle etmektedir. GPR43, enerji harcamasını ve vücuttaki artmış enerji homeostasını regüle etmektedir. GPR41 ve 43 insülin duyarlılığını artırarak adipoz dokudaki artmış enerji depolanmasını önler ve karaciğer ile kaslardaki enerji harcamasını artırmaktadır (Şekil 2.8.1.) (Boulangue ve ark, 2016; Khan ve ark, 2016; Brusaferrro ve ark 2018; Mazloom, Siddiqi ve Covasa, 2019; Englar, Barlow ve Mathur, 2019; Ang ve Ding, 2016).



Şekil 2.8.1. Bağırsak mikrobiyotasındaki değişiklikler sonucu oluşan bağırsak hormonal eksenindeki değişiklikler ve etki mekanizmaları. FIAF: açlıkla indüklenen adipoz faktör; ANGPTL-4: angiopoetin benzeri protein-4; LPL: lipoprotein lipaz; GLP-1: glukagon benzeri peptit-1; GPR43/41: G proteine bağımlı protein 43/41; KZYA: kısa zincirli yağ asitleri; PYY: peptit YY; (-): inhibitor etki; (+) stimüle edici etki.

Bağırsak mikrobiyotası, adenozin monofosfat ile aktive olan protein kinazın (AMPK) salınımını baskılar. AMPK temel olarak iskelet kaslarından, beyinden ve karaciğerden metabolik strese (ör: hipoksi, egzersiz) cevap olarak salınmaktadır. Bağırsak bakterileri AMPK inhibisyonuna öncülük etmektedir. Bunun sonucunda, mitokondrial yağ asit oksidasyonu, ketogenezis, glukoz alımı, insulin sekresyonunun regülasyonu azalırken, lipogenez, kolesterol ve trigliserit sentezinin regülasyonu ise artmaktadır (Şekil 2.8.2) (Boulangue ve ark, 2016; Mazloom, Siddiqi ve Covasa, 2019; Pimenta ve ark 2018).

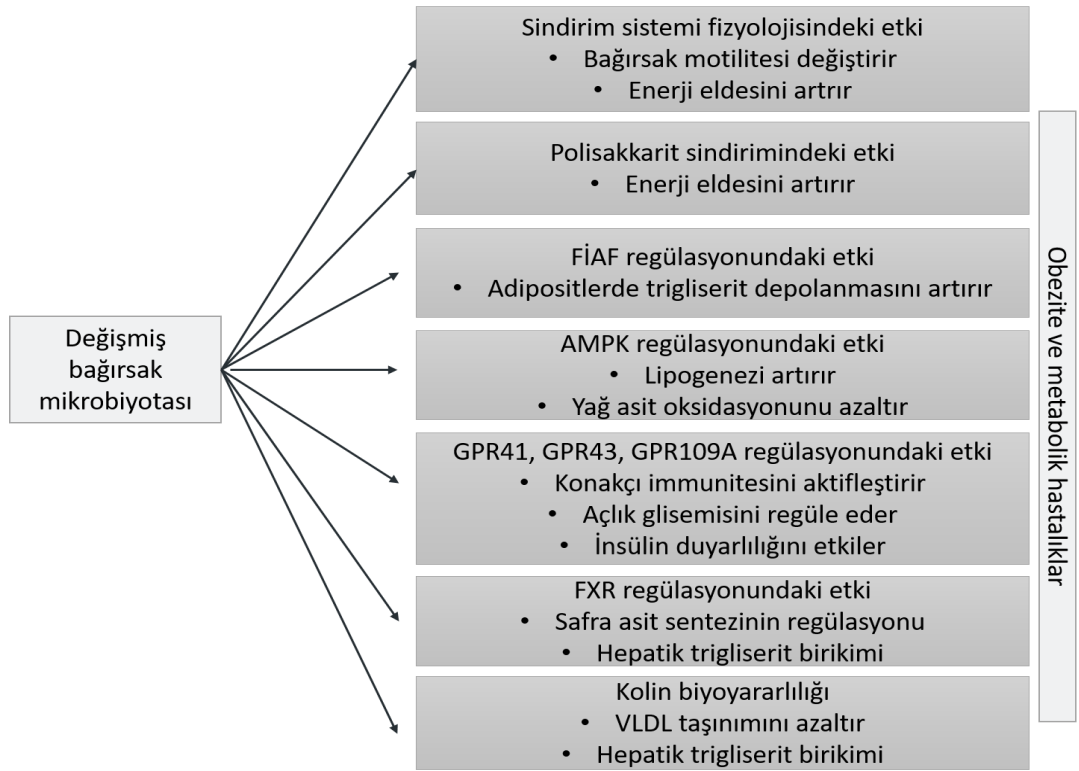


Şekil 2.8.2. Bağırsak mikrobiyotasının, adenozin monofosfat ile aktive olan protein kinaz (AMPK) ve adiposite üzerine etkisi.

Bağırsak mikrobiyotası, yüksek yağlı diyetin indüklediği obezitenin gelişimine katkı koymaktadır. Bunu safra asitlerinin sentezinden ve hepatik trigliserit birikiminin regülasyonundan sorumlu Farnesoid x reseptörü (FXR)'ın regülasyonu aracılığı ile yapmaktadır. FXR, hepatik *de novo* lipogenezis, çok düşük dansiteli lipoprotein transportu ve plazma trigliserit dönüşümünün kontrolünde temel rol oynayarak lipid ve glukoz metabolizmasının iyileştirilmesine öncülük etmektedir (Boulangue ve ark, 2016; Khan ve ark, 2016; Brusaferrro ve ark 2018).

Kolin, mitokondrial membranların ve hücre duvarlarının temel bileşeni olan fosfoditilkolinin sentezi için elzem besin ögesidir. Fosfoditil kolin aynı zamanda çok düşük dansiteli lipoproteininde (VLDL) temel bileşenidir. VLDL, trigliseritlerin organlara transfer edilmesinden sorumludur. Bağırsak mikrobiyotası kolini trimetilamine dönüştürme yeteneğine sahiptir. Böylelikle, karaciğerde trigliseritlerin depolanmasını indirekt olarak etkilemektedir (Boulangé ve ark, 2016).

Sonuç olarak, bağırsak mikrobiyotası ekosistemindeki değişiklikler sonucunda bir çok fizyolojik değişim gerçekleşmekte ve bunun sonucunda obezite ve diğer metabolik hastalıkların gelişimine zemin hazırlanmaktadır. Bu değişiklikler için potansiyel etki mekanizmaları özet olarak Şekil 2.8.3.'da verilmiştir (Boulangé ve ark, 2016).



Şekil 2.8.3. Değişmiş bağırsak mikrobiyotasının obezite ve metabolik hastalıkların gelişimi üzerindeki potansiyel etki mekanizmaları. FİAF: açlıkla indüklenen adipoz faktör; AMPK: adenosin monofosfat ile aktive olan protein kinaz; GPR43/41/109A: G proteine bağımlı protein 43/41/109A; FXR: Farnesoid x reseptörü; VLDL: çok düşük dansiteli lipoprotein.

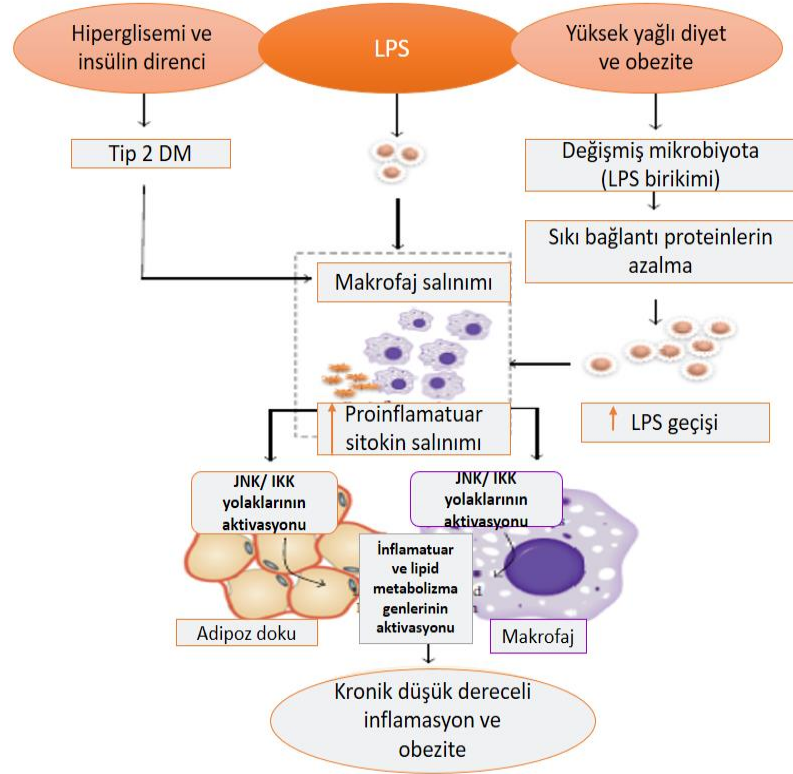
2.9. Kefirin İnflamatuvar Sürecin Yönetimindeki Olası Etki Mekanizmaları

Obezite ve obeziye bağlı komplikasyonların patolojisinin belirleyici özelliklerinden biri de kronik düşük dereceli inflamasyonun ortaya çıkmasıdır (Boulangue ve ark 2016). Leptin, TNF α ve IL-6 gibi adipoz dokudan salgılanan inflamatuvar adipokinlerin sekresyonu aracılığı ile immün disfonksiyona neden olmaktadır (Khan ve ark, 2016).

Endotoksinler olarak da bilinen LPS Gram negatif bakterilerin hücre duvarlarının parçalanması aracılığı ile oluşmaktadır. LPS oluşumunun, obezite ile birlikte görülen düşük dereceli kronik inflamatuvar süreç ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (Brusaferro ve ark., 2018; Clercq ve ark., 2016). LPS yapısında lipid A içermektedir ve sızıntılı intestinal sıkı bağlantılar veya trigliserit ve kolesterolün emiliminden sorumlu şilomikronlar aracılığı ile gastrointestinal mukozayı geçerek plazmaya ulaşır. Sistemik sirkülasyon sonucu LPS karaciğer veya adipoz doku gibi dokulara ulaşır ve bağışıklık sistemi yanıtını başlatır (Ceasar, Fak ve Backhed, 2010). Bir kısım LPS ise plazmadaki LPS- bağlayıcı protein (LBP) bağlanarak makrofajların plazma membranındaki CD14 reseptör proteinini aktive eder. Bu reseptör makrofajların yüzey alanındaki toll benzeri protein-4 (TLR-4) bağlanır ve nukleer faktör $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$) ve aktivatör protein 1 (AP-1) salınımını artırarak inflamatuvar süreci başlatır (Boulangue ve ark 2016; Mazloom, Siddiqi ve Covasa, 2019). LPS aynı zamanda nükleotid bağlayıcı oligomerizasyon (NOD)-benzeri reseptörleri regüle ederek NF- $\kappa\beta$ salınımını indüklemektedir (Boulangue ve ark 2016).

Sağlıklı bireylerde LPS miktarı düşük konsantrasyonlardadır ancak obez kişilerde LPS konsantrasyonları yüksektir ve bu durum endotoksemi olarak adlandırılır (Clercq ve ark 2016). Obez kişilerde metabolik endotokseminin gelişmesi için çeşitli bağlantılar öne sürülmüştür. Bu bağlantılara örnek olarak yüksek yağlı diyet ve bağırsak mikrobiyotasının modifikasyonu sonucu bağırsak geçirgenliğinin artması ile LPS gibi bakteriyel ürünlerin plazma konsantrasyonunda artışı verilebilir. Sirkülasyondaki endotoksin seviyeleri aynı zamanda adipositlerde tumor nekrozis faktör alfa (TNF- α) ve

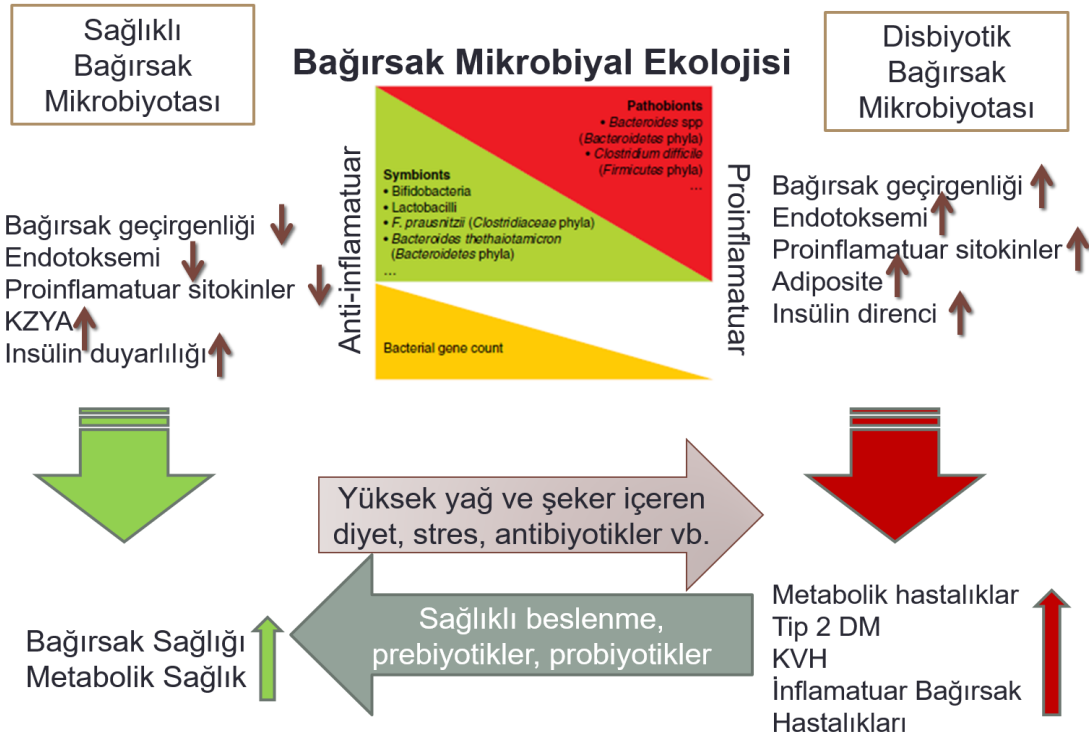
interlökin-6 (IL-6) konsantrasyonlarının yükselmesi ile de ilişkilidir. Bu proinflamatuvar sitokinler, lipogenik ve inflamatuvar genlerin ekspresyonunun başlatılması ile ilişkili olan kinazları aktive ederek inflamasyonun ve adipogenezin artışına neden olmaktadır (Şekil 2.9.1.) (Khan ve ark, 2016).



Şekil 2.9.1. Inflamasyonun oluşumunda LPS'in rolü ve obezite ile olan ilişkisi.

Sonuç olarak, bakteri, virus, mantar ve protozoa gibi trilyonlarca mikroorganizmanın intestinal florada toplanması bağırsak mikrobiyotasını oluşturmaktadır. Mikrobiyota kompozisyonu ise yaşamın ilk anı olan doğumdan itibaren bir çok çevresel faktörden etkilenmektedir. Değiştirilebilir çevresel faktörler arasında bulunan beslenme ise dikkati ve ilgiyi en çok üzerine çeken konu olmuştur. Şekil 2.9.2.'de beslenmenin bağırsak mikrobiyotası üzerindeki etkisi özetlenmiştir. Mikrobiyotanın düzenlenmesine anne sütü, diyetel posa, prebiyotikler vb bir çok

konunun yanısıra diyetle alınan canlı mikroorganizmalar olan probiyotikler dikkat çekmektedir. Probiyotiklerin diyet aracılığı ile en kolay alımı ise fermente besinlerdir. Fermente besinler ile ilgili yapılan çalışmaların başında kefir bulunmakta ve mikrobiyota üzerindeki etkileri anlaşılmaya çalışılmaktadır. Ancak bu olumlu etkilerin sonuçlarını öneriye dökmek için daha fazla çalışmaya ihtiyaç bulunmaktadır (Özdemir ve Demirel, 2017).



Şekil 2.9.2. Beslenmenin bağırsak mikrobiyotası üzerindeki etkisi. KZYA: kısa zincirli yağ asitleri; Tip 2 DM: Tip 2 diyabet; KVH: Kardiyovasküler Hastalıklar (Boulangue ve ark 2016'dan uyarlanmıştır).

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Kefirin Hazırlanışı

Kefir mayası toz şeklinde Danisco (CHOOZ-IT™ Kefir DGLYO 1000 I, 1284649) firmasından temin edilmiştir. Kefir taneleri kullanılmadan önce -18°C’de saklanmıştır. Kullanılan tozun kompozisyonunda *Lactococcus lactis* subsp., *Leuconoctoc* sp, *Lactobacillus* sp., *Streptococcus thermophiles* gibi laktik asit bakterileri, kefir mayaları bulunmakta ve kefir tanesi mikroflorası özelliklerini taşımaktadır.

Kefirin elde edilmesi için steril cam saklama kabı içerisine 500 mL pastörize inek sütü ve 2.5 mg kefir mayası eklenmiştir. Miktarlar hassas tartıda ölçülerek belirlenmiş ve karıştırma işlemleri herhangi bir kontaminasyona neden olmamak için tahta kaşık ile gerçekleştirilmiştir. Süt içerisine kefir tozu eklenip karıştırıldıktan sonra fermentasyon işlemi için 16 saat boyunca, oda sıcaklığında (25°C), kapalı ve serin ortamda inkübasyona bırakılmıştır. Tamamlanan inkübasyon süresi sonunda kefir plastik süzgeçten geçirilerek içerisindeki tortular ortamdan uzaklaştırılmıştır. Hazırlanan kefir 15 mL’lik falkon tüpler içerisine yerleştirilmiştir ve daha sonra 4500 RPM’de 30 dk boyunca oda sıcaklığında santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi sonrasında kefirin katı kısmı (kefir pellet) ile sıvı kısmı (kefir supernatant) birbirinden ayrılmıştır. Kefir pellet için 17 gram, kefir supernatant için 80 gram örnek elde edilmiştir. Çalışma grupları olarak belirlenen kefir pellet ve kefir supernatant farklı falkon tüpler içerisinde yerleştirilerek liyofilizasyon işlemi öncesinde dondurulmuştur. Dondurulan örneklerle 48 saat boyunca liyofilizasyon (Freeze dry) işlemi uygulanmıştır. Bu işlem sonucunda örnekler kurutularak toz haline getirilmiştir. Daha sonra kurutulan örnekler liyofilize makinasından alınmış ve net miktarlar hassas tartıda ölçülmüştür. Liyofilizasyon işlemi sonrasında kefir supernatant ve kefir pellet gruplarından bir miktar örnek daha sonra kullanılmak üzere -80°C’de dondurularak muhafa edilmiştir. Geriye kalan örnekler ise kullanılmak için phosphate-buffered saline (PBS; Frederick, MD217104, USA) ile dilue edilerek 4°C’de saklanmıştır.

3.2. Hücre Hattı ve Hücre Kültürü

3.2.1. Hücre açma protokolü

Açılacak hücreler 2 flaskta çoğaltılacak şekilde ön hazırlıklar yapılmıştır. Hücrelerin ekim yapılacağı flasklar hazırlanarak hücrelerin daha iyi çoğalması ve tutunması için flasklara yuvarlak lamel konulup besiyeri oluşturması için fetal bovin serum (FBS) eklenerek 15 dk bekletilmiştir. - 80°C’de dondurulmuş olarak viyal içerisinde bulunan hücreler önce 37°C’lik su banyosunda çözündürülmüştür. 37°C’ye getirilen hücreler 4 mL’lik vasat içerisine eklendi ve homojen dağılımın sağlanması için alt-üst edilerek karıştırılmıştır. Daha sonra, Dimetil sülfoksit (DMSO) etkisini ortadan kaldırmak için 1000 RPM’de 5 dk boyunca santrifüj edilerek hücreler dibe çöktürülmüştür. Santrifüj sonrasında hücrelerin üzerindeki üst vasat alınıp atılmış ve üzerine 4 mL yeni vasat konulmuştur. Bu süreç içerisinde hücrelerin ekim yapılacağı flasklardan FBS alınıp atılarak yerine 3 mL vasat eklenmiştir. Hücrelerin vasat içerisinde homojen bir dağılım göstermesi için alt – üst yapılarak dağılımı sağlanmış ve her flaskta 2 mL eklenmiştir. Flasklar %5’lik CO₂ ortamında 37°C’de inkübasyona bırakılmıştır.

3.2.2. Hücreler ve vasat hazırlığı

Çalışma kapsamında 3T3-L1 (ATTC: CL-173 Rockville, MD, USA) hücre hattı kullanılmıştır. 3T3-L1 hücreleri fare embriyosundan türetilmiştir. Bu hücreler diyabet, obezite ve bu hastalıklar ile ilişkili bozukluklara ilişkin etki mekanizmalarının anlaşılabilmesi için önemli bir yer tutmaktadır. 3T3-L1 hücreleri fibroblast benzeri bir morfolojiye sahiptir. Ancak uygun koşullar ve ortam sağlandığı zaman adiposit fenotipine farklılaşmaktadır. Adiposit morfolojisinde, trigliseritlerin sentezini ve birikimini artırır ve adipoz hücreler halka görünümünü alır.

3T3-L1 preadiposit hücreleri, preadiposit medium (ZenBio, PM-1-L1) içerisinde kültüre edilmiştir. Hücre hattının vasat hazırlığında, %10 ısı ile inaktive edilmiş FBS (Capricorn Scientific, FBS-11B), %1 penisilin- streptomisin (Biochrom, A2213) ve %1 glutamin (Millipore, K0282) kullanılmıştır. Hazırlanan karışım steril olması için

filtreden geçirilerek 50 mL'lik falkon tüplere yerleştirilmiştir. Hazırlanan karışım vasat değişimlerinde kullanılmak üzere 4°C'de muhafaza edilmiştir ve her 1 haftalık sürede %1'lik glutamin eklemesi yapılmıştır. Hücre hattının vasat değişimi 48 saatte 1 yapılmıştır. Vasat değişiminde, flaskın içerisindeki üst vasat alınıp atılmış ve yerine 5 mL yeni vasat eklenerek hücreler 37°C'de %5 CO₂ ortamda tekrar inkübasyona bırakılmıştır. Hücre sayma işlemi Thoma lamı ile gerçekleştirilmiştir.

3.2.3. Hücre pasajlama protokolü

3T3L1 hücrelerin yoğunluk oranı %90 – 100'a ulaştığı zaman hücre pasajlama işlemi yapılmıştır.

Flaskların içerisindeki hücrelerin üzerinden üst vasat toplanmıştır. Flaskın her gözüne 2.5 mL Tripsin EDTA (Capricorn, Scientific, FRY-1B) eklenerek 37°C'de %5 CO₂ ortamında 10 dk boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübatörden alınan hücrelerin üzerine her 1 mL tripsin için 4 mL vasat ekleyerek tripsinin etkisi ortadan kaldırılmıştır. Hücreler alt üst edilip homojenize edildikten sonra 1000 RPM'de 5 dk boyunca santrifüj edilerek hücreler dibe çöktürülmüştür. Dibe çöktürülen hücrelerin üzerinden üst vasat alınıp atılmıştır ve üzerine 2.5 mL yeni vasat eklenmiştir. Üzerine yeni vasat eklenen hücreler alt üst edilerek hücrelerin vasat içerisinde homojenize olması sağlanmıştır.

3T3L1 preadiposit hücreler ekim yapılmadan önce flaskın her gözüne cam lamel yerleştirilmiş ve her göze FBS eklenerek 15 dk boyunca besiyeri oluşturması için beklenmiştir. Daha sonra her göze hazırlanan vasat – hücre karışımından 100 µL eklenmiş ve üzerine 300 µL vasat eklenerek 37°C'de %5 CO₂ ortamında inkübasyona bırakılmıştır.

3.2.4. Hücre dondurma protokolü

Hücre dondurma protokolünün ilk aşaması hücre pasajlama protokolünün dibe çöktürülen hücrelerin üst vasatlarının alınıp atılmasına kadar aynidir.

Hücre dondurma protokolü ilkelerine göre hücrelerin kristallenmesini engellemek için 1:9 oranında Dimetil sülfoksit (DMSO, Sigma- Aldrich) ve FBS karışımı eklenerek hücreler süspanse edilmesi gerekmektedir. İki viyal hücre dondurulacağı için dondurma solüsyonu için bu oranlar 200 µL DMSO ve 1800 µL FBS olacak şekilde hazırlanmıştır. Her viyal tüpe 1 mL dondurma solüsyonu eklendikten hemen sonra hücreler -80°C’de dondurulmuştur.

3.2.5. Hücre farklılaştırma protokolü

Hücrelere pasajlama protokolü uygulandıktan sonra flaskın içerisine yerleşip çoğalan preadiposit hücreleri için farklılaştırma protokolüne geçilmiştir. Hücrelerin üzerinden PM-1-L1 alınıp atılmıştır. Uygun farklılaşma ortamının sağlanması için hücrelere farklılaşma mediumu (ZenBio, #cat DM2L1) eklenerek kültüre edilmiştir. Hücre hattının farklılaştırma vasatı hazırlığında DM-2-L1 farklılaştırma medium ve %1 penisilin- streptomisin (Biochrom, A2213) kullanılmıştır. Hazırlanan karışım steril olması için filtreden geçirilerek 50 mL’lik falkon tüplere yerleştirilmiştir. Hazırlanan karışım vasat değişimlerinde kullanılmak üzere 4°C’de muhafaza edilmiştir. Hücre hattının vasat değişimi 21 gün boyunca olgun adiposit farklılaşmasını sağlamak için 48 saatte bir yapılmıştır. Vasat değişiminde, flaskın içerisindeki üst vasat alınıp atılmış ve yerine 400 µL yeni vasat eklenerek hücreler 37°C’de %5 CO₂ ortamda tekrar inkübasyona bırakılmıştır.

Hücrelere 3, 7, 14 ve 21 kültür günlerinde fiksasyon protokolü uygulanmıştır. Bu protokol sonrasında hücrelerin adipojenik farklılaşma zamanı belirlenmiştir. Hücreler adipojenik hücrelere farklılaştığı zaman DM-2-L1, 3T3-L1 adipojenik medium (AM-1-L1) ile değiştirilmiştir. Hücreler medium değişikliğinden sonra 37°C’de %5 CO₂ ortamda yeniden inkübasyona bırakılmıştır.

3.3. Hücre Fiksasyon Protokolü

Hücrelerin yapısal durumlarını sabitleştirmek için yapılmıştır. Öncelikle 100 mL su ve bir tablet phosphate- buffered saline (PBS) beher içerisine konularak çözdürülmüştür.

Daha sonra %4'lük paraformaldehid hassas terazide tartılıp PBS içerisine eklenerek orbita shaker makinesinde 45 dk boyunca çözdürülmüştür. Çözdürülme esnasında erime ısı 60°C, pH 7.2 – 7.4 olacak şekilde ayarlanmıştır. Hazırlanan karışım fiksasyon işlemlerinde kullanılmak üzere 4°C'de muhafaza edilmiştir. Bu karışım bir haftanın sonunda tekrar hazırlanmıştır.

Hücreler 3, 7, 14 ve 21 günlerde fikse edilmiştir. Fiksasyon günlerinde 24 gözlü ekim kablari deske çıkartılarak üst vasatları alınıp atılmıştır. Daha sonra her göze 500 µL PBS eklenmiştir. Eklenen PBS toplandıktan sonra 500 µL paraformaldehid (%4) eklenerek, 30 dk boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonrasında üst vasat toplanıp atılmıştır. Fikse edilen hücreler PBS ile tekrar yıkanmıştır. Daha sonra her göze tekrardan 500 µL PBS eklenip, parafilmle 4°C'de muhafaza edilmiştir. Bu işlem, her fiksasyon gününde tekrar edilmiştir.

3.4. Oil Red-O Protokolü

Hücrelere fiksasyon işlemi uygulandıktan sonra 3T3-L1 hücrelerinin içerisindeki lipid dropletlerini boyamak amacı ile yapılmıştır. %0.5 Oil Red-O (Chem-cma SC, 203749A), isopropanol (2-propariol) (Sigma Aldrich, 19516) içerisinde çözdürülmüştür. Hazırlanan karışım içerisinde kalan partiküllerin ortamdan uzaklaştırılması için karışım filtre kağıdından geçirilmiştir. Daha sonra hazırlanan oil red-o karışımı distile su ile 3:2 oranında seyrelerek falkon tüpüne yerleştirilmiştir. Falkon tüpünün etrafı folyo ile sarılarak 24 saat boyunca 4°C'de bekletilmiştir.

Boyama işlemi yapılmadan önce karışım içerisinde oluşabilecek küçük partiküllerin uzaklaştırılması için 0.45µm çapındaki filtreden geçirilerek tekrar süzölmüştür. Süzme işlemi gerçekleştirilen Oil Red-O'dan 1 mL fikse edilmiş hücrelerin üzerine konularak 15 dk boyunca bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda hücreler nazikçe distile su ile yıkanmıştır. Boyanan hücreler mounting medium ile kapatıldıktan sonra ışık mikroskobu (Olympus BX40, Tokyo, Japan) ile görüntülenip fotoğraflanmıştır.

3.5. Hücre Canlılığı ve Büyüme Analizi

Kefir supernatant ve kefir pellet fraksiyonları PBS içerisinde dilüe edilmiştir ve final dilüsyonu 100 mg/mL olarak belirlenmiştir. Daha sonra, hazırlanan çözelti, kültür vasatında 5 farklı konsantrasyona seyreltilmiştir. Bu dozlar, 1 mg/mL, 0.5 mg/mL, 0.2 mg/mL, 0.1 mg/mL, 0.05 mg/mL ve 0.02 mg/mL'dir. Bu dozlar kefir için uygulanabilir optimal dozu bulmak için belirlenmiştir.

3T3-L1 adiposit hücreleri toplanmış ve vasat içerisinde süspanse edilmiştir ve her gözde 100 µL vasat içerisinde 5×10^3 yoğunlukta hücre olacak şekilde 96 gözlü kültür kaplarına ekilmiştir. Hücre hattı, 24 ve 48 saat süre ile 37°C'de %5 CO₂ ortamında inkübasyona bırakılmıştır.

3.6. Hücre Canlılığı Testi ve MTT Analizi

Kefir fraksiyonlarının sitotoksosite etkisinin belirlenmesi için MTT (3- (4,5-dimethylthiazol-2ly)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (Biotium, #30006) analizi yapılmıştır. MTT analizi, 3- (4,5- dimethylthiazol-2ly)-2,5-diphenyltetrazolium bromürün mor formazon ürünlerine indirgenmesiyle yapılan kalorimetrik bir analizdir. MTT analizi için, 96 gözlü ekim kabına bir gün önceden hücre ekimi yapılmıştır. Ekim yapıldıktan sonra ilk gün 48 saat uygulanacak olan kefir pellet ve kefir supernatant fraksiyonlarının, ikinci gün ise 24 saat uygulanacak olan kefir faksiyonlarının inkübasyonu yapılmıştır. Bunun sonucunda 24 ve 48 saatlik ekimler için pozitif ve negatif kontrol değerleri elde edilmiştir. Negatif kontrol sütunu sadece kültür vasatını içermiştir ve bu sütunda hücre veya kefir fraksiyonu bulunmamaktadır. Pozitif kontrol sütunu ise sadece 3T3-L1 hücreleri bulunmaktadır ve yine bu sütunda herhangi bir kefir fraksiyonu bulunmamaktadır.

MTT solüsyonu 1:9 oranında PBS ve thiazolyl blue tetrazolium karıştırılıp homojenizasyonu sağlanarak elde edilmiştir. Hazırlanan solüsyonun içerisinde kalan partiküllerin uzaklaştırılması için solüsyon 0.22 µm çapındaki filter ile süzölmüştür ve ışık görmesi engellenebilmesi için folyo içerisine sarılmıştır. Daha sonra hazırlanacak

olan her 10 mL karışım içi 9 mL MTT solüsyonu ve 1 mL vasat eklenerek MTT uygulama hazırlığı tamamlanmıştır. 24 ve 48 saatlik ekim yapılan hücrelerdeki üst vasat toplanıp atıldıktan sonra her bir göze 10 µL hazırlanan karışımdan eklenerek 4 saat boyunca 37°C’de, %5 CO₂ ortamında inkübasyona bırakılmıştır.

Inkübasyon sonrasında hücrelerin üzerindeki üst vasat alınıp atılmış ve formazon kristallerinin çözünmesi amacı ile 200 µL DMSO eklenerek alt üst edilip karıştırılmıştır. Bunun sonucunda ölçümler absorbans sinyali 570 nm’de alınmıştır (Versa Max, Molecular Device, Sunnyvale, USA). Tüm deneyler her bir fraksiyon için üç kez tekrar edilmiştir.

3.7. Immünositokimya Protokolü

3T3-L1 adipositlerindeki ANGPTL-4, leptin ve PPAR-γ ekspresyonlarının dağılımı indirekt immünperoksidaz tekniği kullanılarak analiz edilmiştir. 3T3-L1 adipositleri 24 saat kefir pellet ve kefir supernatant ile inkübe edildikten sonra paraformaldehid (%4) ile fikse edilmiştir. Daha sonra hücreler PBS ile iki kez yıkanmıştır her bir yıkama için 30 dk süre ayrılmıştır. 3T3-L1 adiposit hücreleri permabilize edilmiştir. Permeabilizasyon işlemi hücre membran geçirgenliğinin sağlanması ve antikorun geçirgenliğinin sağlanması için yapılmıştır. Bunun sağlanması için her göze PBS ile 1:1000 mL oranında seyreltilmiş triton-x 100 (Sigma Aldrich, 9002931) solüsyonundan 10 damla eklenmiştir ve 15 dk boyunca buz üzerinde inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonrasında hücreler üç kez 5 dk boyunca PBS ile iyice yıkanmıştır. Permeabilizasyon işlemi sonrasında endojen peroksidaz enzim aktivitesini inhibe etmek için H₂O₂ (%3) (Sigma Aldrich, D30926) her göze 10 damla eklenerek ve 10 dk boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Bu işlem sonucunda hücreler üç kez 5 dk boyunca PBS ile iyice yıkanmıştır. PBS ile yıkama işleminden sonra ortamdaki diğer proteinlerin bloke edilerek primer antikorun istenilen antijene bağlanmasını sağlamak için bloke edici serum (blocking serum) (Histostain- Plus Kit HRP, 859043, Thermo Fisher) hücrelere eklenmiştir. Bloke edici serum her göze 10 damla eklenerek bir saat boyunca oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. Bu inkübasyon sonrasında PBS ile yıkama işlemi

uygulanmayarak hücrelerin etrafı immunositokimya kalemi ile çizilmiştir. Bir sonraki aşama için uygulanacak olan primer antikorların dilüsyonları belirlenerek hazırlanmıştır. Bloking serum her gözden alındıktan sonra kontrol grubuna sadece PBS diğer gruplara ise primer antikor uygulaması yapılmıştır. Primer antikor uygulamaları her göze 100 µL leptin (1:50) (Prointech, 17436-1-AP), ANGPTL-4 (1:100) (Prointech, 18374-1-AP) ve PPAR-γ (1:50) (Prointech, 15540-1-AP) olacak şekilde eklenmiş ve ekim kapları parafilmlenerek 4°C’de 24 saat nemli ortamda inkübasyona bırakılmıştır.

Primer antikorların inkübasyonu sonrası hücreler 3x5 dk boyunca PBS ile iyice yıkanmıştır ve biyotinlenmiş sekonder antikor (Histostatin-Plus Kit HRP, 859043, Thermo Fischer) 5 damla ilave edilerek 30 dk boyunca inkübasyona bırakılmıştır ve daha sonra 3x3 dk olacak şekilde PBS ile yıkanmıştır. Primer antikorun görünürlüğünün artmasını sağlamak için 5 damla avidin-biotin peroksidaz enzim kompleksi (Histostatin-Plus Kit HRP, 859043, Thermo Fisher) eklenerek 30 dk süreyle inkübasyona bırakılmıştır. PBS ile yıkanan hücrelere 100 µL 3,3’diaminobenzidin (DAB) kromojen (ScyTek Laboratories, ACK125) ilave edilerek 5 dk inkübe edilmiştir ve immünorektivite seviyeleri gözlemlenmiştir. DAB çözeltisi daha sonra distile su (dH₂O) ile iyice yıkandıktan sonra çekirdeği görmek için Mayer’s hematoxylien (Merck Millipore, 109249) ile boyama yapılmıştır. Bir dakikalık inkübasyon sonrasında hücreler dH₂O ile yıkanmıştır. Son olarak ekim kapları içerisinde bulunan yuvarlak lameller mounting medium (Merck Millipore, 107961) ile sabitlenerek lam üzerine ters kapatılmış ve ışık mikroskobu (Olympus BX40, Tokyo, Japan) ile incelenmiştir.

Leptin, ANGPTL-4 ve PPAR- γ antikorlarının immunoreaksiyon yoğunluklarını belirlemek amacı ile histolojik skorlama yöntemi olan HSKOR yöntemi kullanılmıştır. Analizinde $\Sigma P_i (i+1)$ formülü kullanılmaktadır. Formül içerisindeki (i) immunositokimyasal analizler üzerindeki boyamaların yoğunluklarını ifade etmektedir. Boyama yoğunlukları kendi içerisinde 1, 2 veya 3 olmak üzere sınıflandırılmıştır. Bu sınıflandırmalardan 1 hafif, 2 orta ve 3 şiddetli boyamayı ifade etmektedir. Formül içerisindeki (p) ise boyanmış hücrelerin yüzdeliklerini temsil etmektedir. Yüzde değerleri %0- 100 arasında değişmektedir.

3.8. ELISA Protokolü

3T3-L1 adipositlerindeki IL-6, TNF- α , IL-1 β ve lipoprotein lipaz (LPL) aktivitelerinin belirlenmesi amacı ile enzim bağlantılı immunoassay (ELISA) deneyleri yapılmıştır. 3T3-L1 adipositleri 24 saat kefir pellet ve kefir supernatant ile inkübe edildikten sonra üst vasatları toplanarak ELISA deneylerinde kullanılmak üzere muhafaza edilmiştir.

Muhafaza edilen kefir pellet ve kefir supernatant -80°C'den alınarak proteinlerin denature olmasını engellemek amacı ile buz üzerinde çözündürülmüştür. Daha sonra 2000 rpm 5 dk santrifüj edilerek kullanılmak üzere hazırlanmıştır. ELISA deneyleri için Human IL-6 ELISA kit (cat no: BMS213-2 / BMS213-2TEN), Human TNF alpha Platinum ELISA (cat no: BMS223/4 / BMS223/4TEN), Human IL-1 beta Platinum ELISA (BMS224/2 / BMS224/2TEN) ve Human LPL ELISA kit (cat no: E-EL-H2287) kullanılmıştır.

Deneylere başlamadan önce deneyler için gerekli olarak wash buffer, assay buffer solüsyonları hazırlanmıştır. Wash buffer yıkama solüsyonu her kitin içerisinde bulunmaktaydı ve 1000 mL distile su ile dilüe edilerek hazırlanmıştır. Assay buffer solüsyonu da aynı şekilde her kitin içerisinde bulunmaktadır ve son konsantrasyonun elde edilmesi için 100 mL distile su ile dilüe edilerek hazırlanmıştır. Her iki solüsyonun hazırlanması sırasında köpük olmaması için dikkatlice mix edilmiştir. Deney sırasında artan solüsyonlar daha sonra kullanılmak üzere 2 - 8°C'de muhafaza edilmiştir.

İkinci adım olarak standart solüsyonlar hazırlanmıştır. Her ELISA kitinin içerisindeki standart viyaller belirtilen oranlarda distile su ile dilüe edilmiş ve standart konsantrasyonları elde edilmiştir. Standart solüsyon oranları TNF-alfa, IL-1 beta, IL-6 ve LPL solüsyonu için sırası ile 1000 pg/mL, 500 pg/mL, 200 pg/mL ve 2000 pg/mL'dir. Hazırlanan standart homojen olması için 10 – 30 dk arası bekletilmiştir. Daha sonra elde edilen standartlar dilüe edilerek ELISA ekim kabına uygulanarak 7 farklı konsantrasyon elde edilmiştir.

ELISA ekim kabına ekim yapılmadan önce ekim yapılacak kuyucuk sayısı belirlenmiş ve fazla kuyucuklar daha sonra kullanılmak üzere 2 – 8 °C’de folyo içerisinde tekrar muhafaza edilmiştir. Daha sonra ekim yapılacak kuyucuklar 400 µL wash buffer ile 2 x 15 sn olacak şekilde automated washer ile yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. TNF- alfa, IL-6 ve IL-1 beta antikorları için belirlenmiş olan standart kuyucuklara 100 µL standart solüsyonlar, blank well olarak belirlenmiş kuyucuklara 100 µL sadece assay buffer veya sample diluent, örnek kuyucuklara ise 50 µL kefir pellet, kefir supernatant ve kontrol grubu solüsyonları ile 50 µL assay buffer veya sample diluent eklenmiştir. Kuyucuklara örnekler yerleştirildikten sonra biotin ile konjuge edilmiş solüsyon hazırlanmıştır ve her kuyucuğua 50 µL eklenmiştir. Biotin ile konjuge edilmiş solüsyon 1:1000 oranında assay buffer ile dilüe edilerek elde edilmiş ve 30 dk içerisinde hazırlanan solüsyon kullanılmıştır. Bu işlemin sonunda antikorlar 2 saat süre boyunca oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. Buharlaşmayı önlemek amacı ile ekim kapları paraflim/plate sealer ile kaplanmıştır. LPL antikoru için daha farklı bir protokol uygulanmıştır. LPL için protokol 100 µL standart, örnek ve blank well solüsyonlarının eklenmesi sonrasında 90 dk boyunca 37°C inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra üst vasatlar alınıp atılmıştır ancak yıkama işlemi uygulanmamıştır ve 100 µL olacak şekilde biotin ile konjuge edilmiş solüsyon eklenerek 37°C’de 1 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır.

Inkübasyon sonrasında tüm antikorların protokolünde serbest kalan antikor- antijen kompleksinin ortamdaki uzaklaştırılması için 3 kez 400 µL wash buffer ile yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Primer antikoru görünürlüğü artmasını sağlamak için 100 µL avidin-biotin peroksidaz enzim kompleksi eklenerek 30 dk süreyle LPL, 37°C’de, diğer antikorlar ise oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonrasında 5 kez 400 µL ile yıkama işlemi yapıldı ve 100 µL tetramethyl- benzidine (TMB) eklenerek karanlık ortamda 15 dk boyunca inkübasyona bırakılmıştır. TMB inkübasyonunun amacı substratı çözümlü hale getirip ve açık mavi renge boyanmasını sağlayarak spectrophotometrically’de okunur hale getirmektir. Son olarak üst solüsyon alınımıp atılmadan ve yıkama işlemi uygulanmadan durdurma solüsyonu yani fosforikasit

eklenerek antikor stabil hale getirilmiştir. Uygulama sonrasında renk değişikliği olmaz mikro plate 450 nm ile ölçüm yapılmıştır.

Elde edilen ELISA sonuçlarının değerlendirilmesinde her antikorun standart solüsyonu için ortalama absorbans değerleri ve standart hata değeri hesaplandı. Hesaplanan bu değerler aracılığı ile standart eğriler oluşturuldu. Bu standart eğrilerin üzerine grafik denklemleri ve r^2 değerleri eklenmiştir. Grafik denklemindeki 'y' değeri absorbans değerini 'x' ise standart konsantrasyonu ifade etmektedir.

3.9. Verilerin İstatistiksel Değerlendirilmesi ve Yazılım Programları

Tüm verilerin ortalama ve standart sapma (SD) değerleri belirlenmiştir. İstatistiksel analiz ve gruplar arası farklılıklar SPSS paket program-21 (SPSS-21) ile değerlendirilmiştir. Gruplar arası farklılık değerlendirmeleri Kruskal wallis ve Mann Whitney U testi yapılarak saptanmıştır. Elde edilen sonuçların istatistiksel anlamlılık derecesi $p < 0.05$ olarak kabul edilmiştir.

Şekil ve tabloların çizimlerinde Microsoft Office programlarından Excel, Powerpoint ve Word programlarının 2016 sürümü ve GraphPad Prism 8 programı kullanılmıştır.

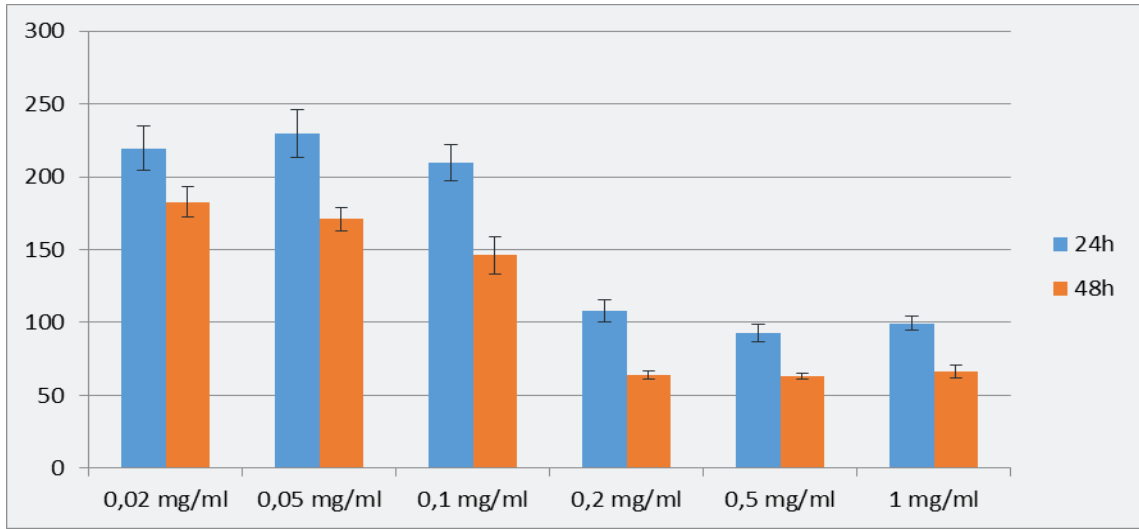
4. BULGULAR

4.1. Hücre Canlılığı ve Sitotoksisite

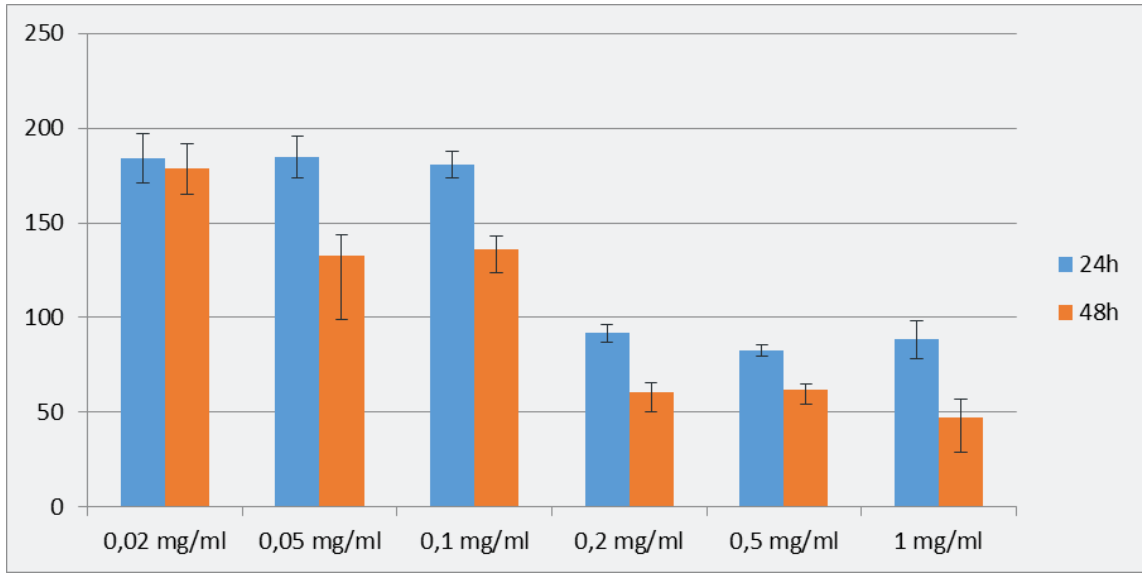
3T3-L1 adiposit hücreleri 24 ve 48 saat boyunca farklı fraksiyonlarda (0.02, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5 and 1 mg/mL) kefir supernatant ve kefir pellet ile inkübasyona bırakılmıştır. Hücre canlılığı yukarıda belirtildiği yöntem doğrultusunda MTT analiz yöntemi ile saptanmıştır. 0.2, 0.5 ve 1 mg/mL kefir pellet ve kefir supernatant konsantrasyonlarının, 3T3-L1 adiposit proliferasyonunu dramatik bir şekilde düşmesine neden olduğu görülmüştür (Şekil 4.1.1. ve Şekil 4.1.2.). Elde edilen bu sonuçlar doğrultusunda, 24 saat boyunca kefir pellet ve kefir supernatant inkübasyonu yapılan tüm deneylerde 0.1 mg/mL dozu kullanılmıştır.

Kefir supernatant ile 24 saat boyunca inkübe edilen 3T3L1 adipsitlerinde adiposit proliferasyonun en düşük olduğu doz 0.5 mg/mL olarak belirlenmiştir (%92). 48 saatlik inkübasyon süresinde ise en düşük proliferasyon yüzdesi (%63) 0.2 ve 0.5 mg/mL ile muamele edilen dozlarda görülmüştür. Farklı fraksiyonlarda yapılan kefir supernatant inkübasyonunda en ideal hücre canlılık yüzdesi ise hem 24 hemde 48 saatlik inkübasyon sürelerin 0.1 mg/mL dozda belirlenmiştir. (Tablo 4.1.1.).

3T3L1 adiposit hücrelerine kefir pellet ile yapılan inkübasyonda doz arttıkça adiposit proliferasyonunun ve canlılığının azaldığı görülmüştür. En düşük adiposit proliferasyonu 24 saatlik inkübasyon sonucunda %82 ile 0.5 mg/mL inkübasyon dozunda saptanmıştır. 48 saatlik uygulama sonucunda ise benzer sonuç 1 mg/mL inkübasyon dozunda belirlenmiştir. Farklı fraksiyonlarda yapılan kefir pellet uygulamasında ise en ideal hücre canlılık yüzdesi her iki inkübasyon süresinde de 0.1 mg/mL dozda belirlenmiştir (Tablo 4.1.2.).



Şekil 4.1.1. Kefir süpernatantın 3T3L1 adipositlerinin hücre canlılığı üzerindeki etkisi. 3T3-L1 adipositleri 24 veya 48 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda kefir süpernatant ile inkübe edilmiştir ve MTT analiz yönetimi ile canlılık dereceleri ölçülmüştür.



Şekil 4.1.2. Kefir pelletin 3T3L1 adipositlerinin hücre canlılığı üzerindeki etkisi. 3T3-L1 adipositleri 24 veya 48 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda kefir pellet ile inkübe edilmiştir ve MTT analiz yönetimi ile canlılık dereceleri ölçülmüştür.

Tablo 4.1.1. 3T3L1 adiposit hücrelerinin farklı dozlarda kefir süpernatant uygulaması sonucunda adiposit profilerasyonu ve hücre canlılık yüzdesi üzerine etkisi						
	0.02 mg/mL (%)	0.05 mg/mL (%)	0.1 mg/mL (%)	0.2 mg/mL (%)	0.5 mg/mL (%)	1 mg/mL (%)
24 saat	217,8	227,6	208,6	111,5	92,1	98,7
48 saat	181,7	170,1	144,6	63,8	64,4	66,1

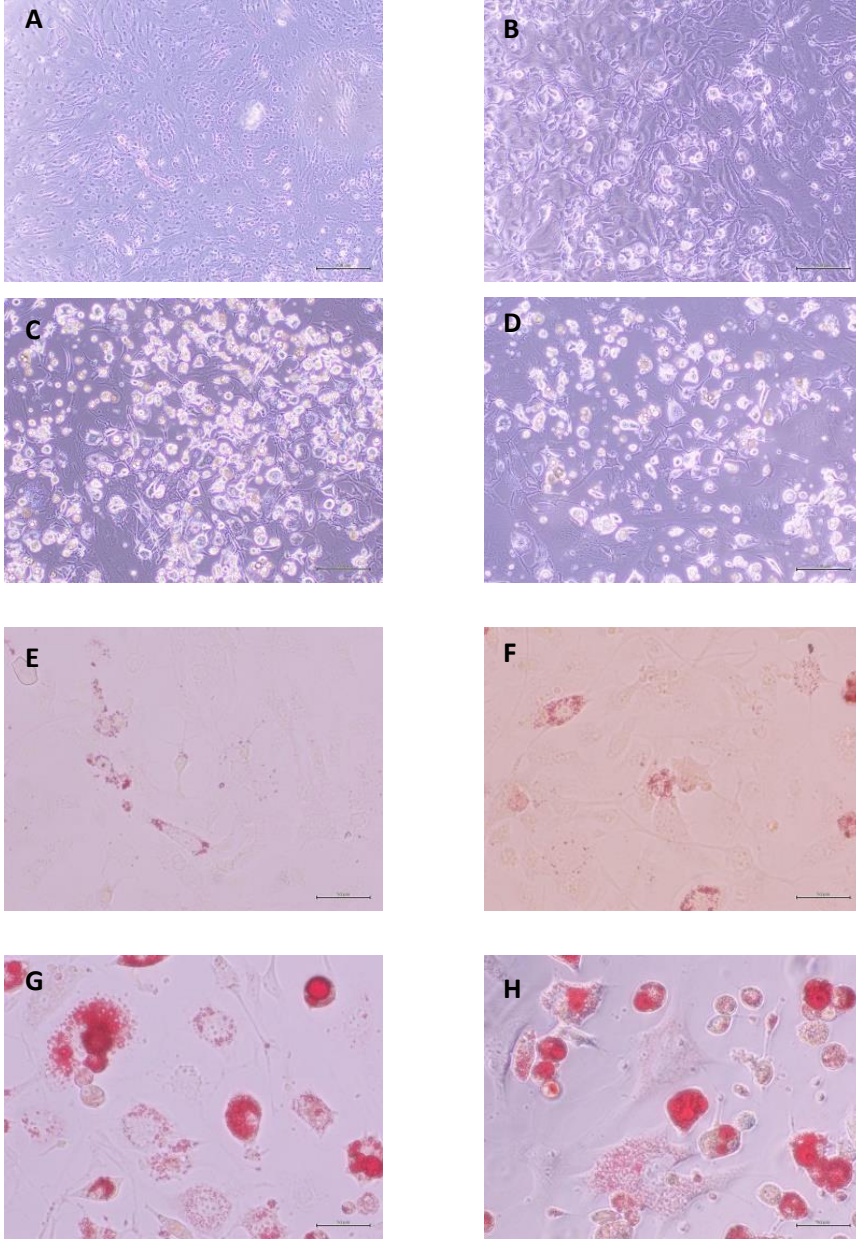
Tablo 4.1.2. 3T3L1 adiposit hücrelerinin farklı dozlarda kefir pellet uygulaması sonucunda adiposit profilerasyonu ve hücre canlılık yüzdesi üzerine etkisi

	0.02 mg/mL (%)	0.05 mg/mL (%)	0.1 mg/mL (%)	0.2 mg/mL (%)	0.5 mg/mL (%)	1 mg/mL (%)
24 saat	182,9	183.4	180	91,4	82.3	87.4
48 saat	173,7	177,4	149,3	70,0	70,0	66,8

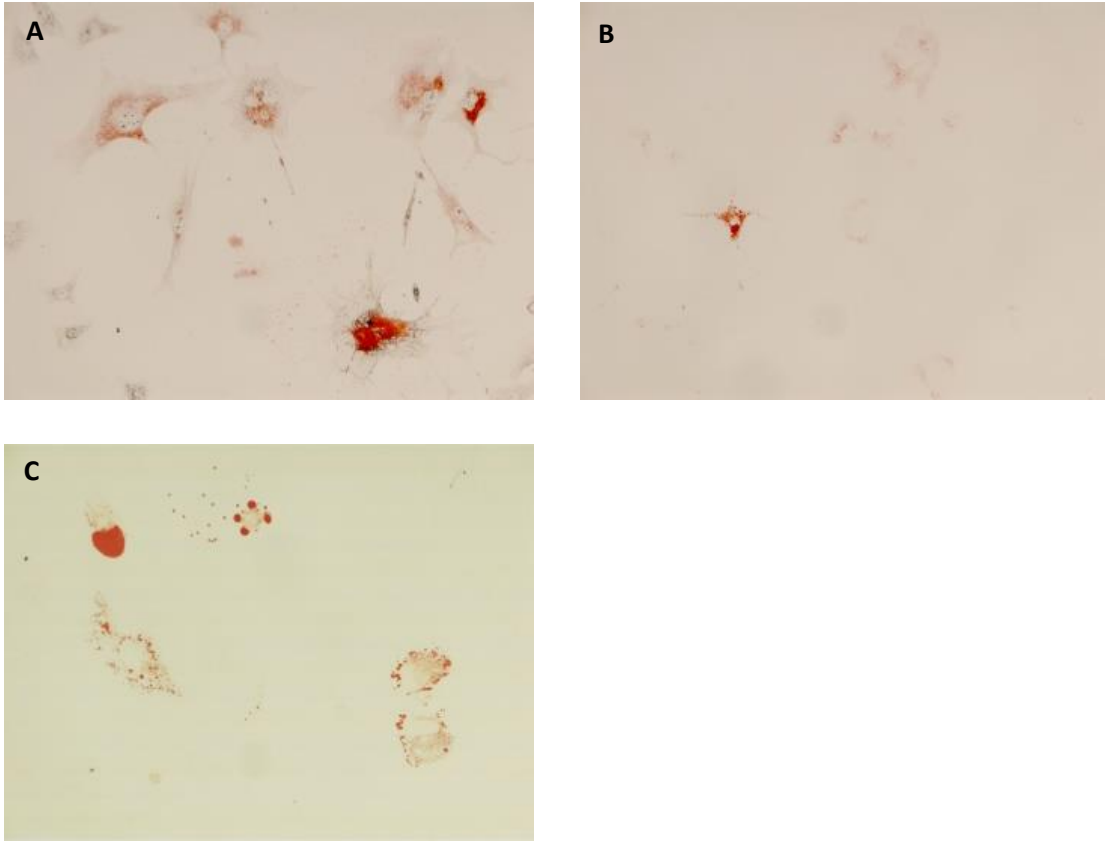
4.2. Oil Red-O Boyama Sonuçları

3T3-L1 preadiposit hücrelerine farklılaşma protokolü uygulanarak hangi gün adipositlere farklılaştığı belirlenmiştir. Bu amaç doğrultusunda 3, 7, 14 ve 21 günlerde fiksasyon işlemi uygulanarak hücreler oil red-o ile boyanmıştır. Farklılaşma protokolü uygulanan 3T3-L1 preadiposit hücrelerinde 3. gün lipid damlacıklarının olduğu gözlemlenmiştir. Buna ek olarak lipid birikiminin arttığı saptanmıştır (Şekil 4.2.1). Inkübasyonun 14. gününde (Şekil 4.2.1, G) ve 21. gününde (Şekil 4.2.1, H) hücrelerin >%95'inde lipid damlacıklarının varlığı görülmektedir. Buna ek olarak benzer şekillerde oil red-o ile boyanmış lipid damlacıkları gözlemlenmiştir.

3T3-L1 adiposit hücreleri 24 saat boyunca kefir supernatant ve kefir pellet (0.1 mg/mL) ile inkübe edilmiştir. Inkübasyon sonrası lipid birikimi incelendiği zaman, kefir supernatant ve kefir pellet ile inkübe edilmiş 3T3-L1 adipositlerinde, kontrol hücrelerine kıyasla daha az hücre içi lipid birikimi görülmüştür. Özellikle lipid damlacıklarının kontrol grubu ile kıyaslandığı zaman daha küçük olduğu fark edilmiştir (Şekil 4.2.2.).



Şekil 4.2.1. Kefir uygulaması yapılmadan önce kültür ortamında 3T3L1 adipositlerindeki lipid birikimi (A-D) ve oil red-o ile boyaması (E-H). 3 gün (A,E), 7 gün (B, F), 14 gün (C, G), 21 gün (D, H) Scala bar= 50µm



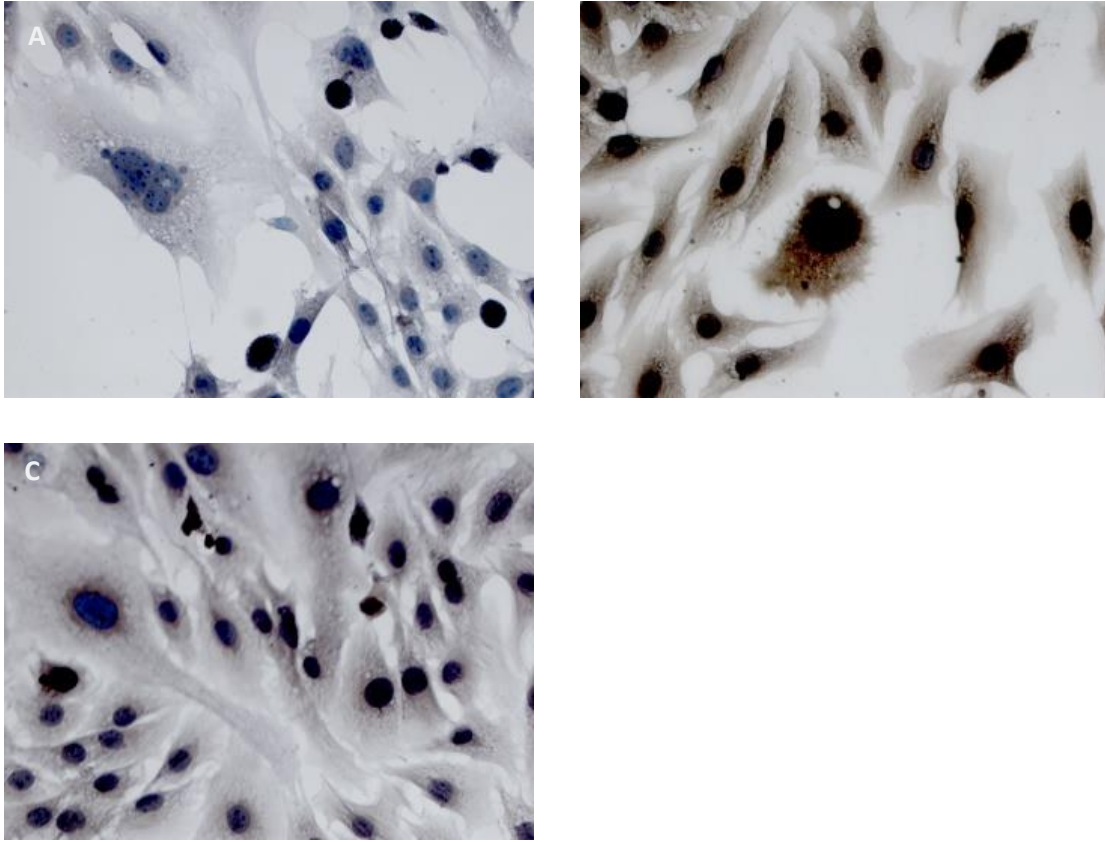
Şekil 4.2.2. Kefir süpernatant ve kefir pellet inkübasyonu yapıldıktan sonra 3T3-L1 adipositlerinin oil red-o ile boyaması. Kefir süpernatant (A), Kefir pellet (B) ve Kontrol grubu (C). Scala bar= 50µm

4.3. İmmünohistokimyasal Değerlendirme

Kefir süpernatant ve kefir pellet ile 24 saat boyunca inkübe edilen 3T3-L1 adipositlerindeki ANGPTL-4, leptin ve PPAR-γ yoğunluklarının H-SKOR değerleri tablo 4.3.1.'de verilmiştir. 3T3-L1 adipositlerinde kontrol grubu, kefir pellet ve kefir süpernatant grubuna ait immunboyama sonuçları ise Şekil 4.3.1. – Şekil 4.3.2. verilmiştir.

ANGPTL-4 immunoreaktivitesi, kefir süpernatant ile 24 saat boyunca inkübe edilen 3T3-L1 adipositlerinde kuvvetli ve kefir pellet grubunda ise orta derecede immunoreaktivite görülmüştür. Kefir süpernatant ve kefir pellet ile inkübe edilen 3T3-

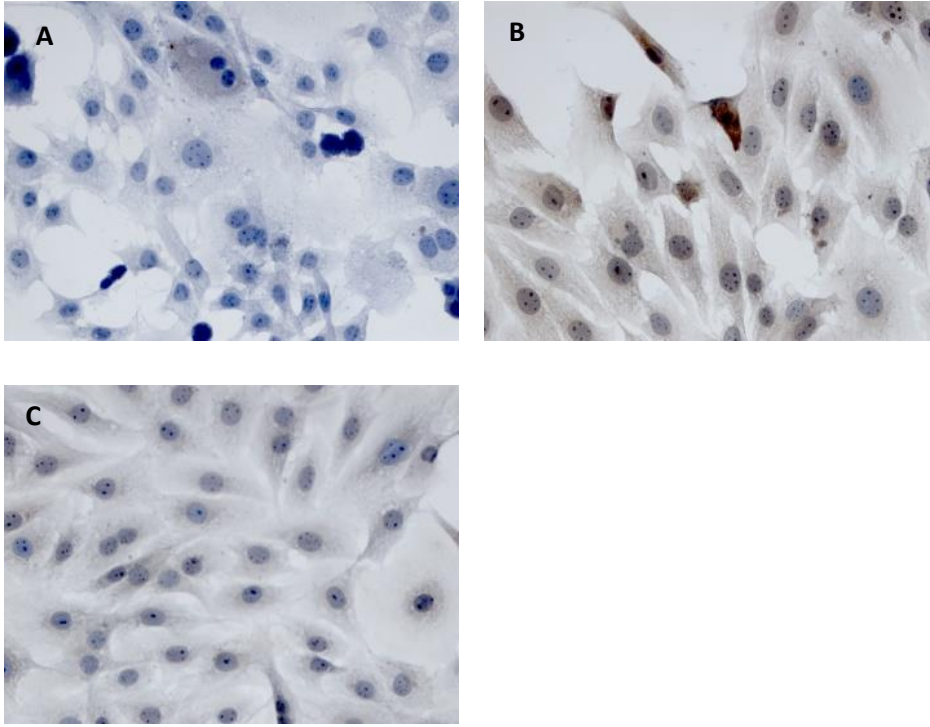
L1 adiposit hücreleri kontrol grubundaki adiposit hücreleri ile karşılaştırıldığı zaman her iki müdahale grubunda da ANGPTL-4 immünoreaktivitesinin anlamlı derecede yüksek olduğu görülmüştür (Şekil 4.3.1. A-C, Tablo 4.3.1.). Kefir süpernatant ile inkübe edilen 3T3-L1 adiposit hücrelerindeki ANGPTL-4 immünoreaktivitesi kefir pellet grubuna göre daha yüksek olmasına rağmen bu iki değer arasındaki fark istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır ($p>0.005$) (Şekil 4.3.1. A-C, Tablo 4.3.1.).



Şekil 4.3.1. 3T3-L1 adiposit hücrelerinde ANGPTL-4'ün immünoreaktivitesi. Kontrol grubu (A), Kefir süpernatant grubu (B), Kefir pellet grubu (C).

Kefir süpernatant (Şekil 4.3.2., B) ve kefir pellet (Şekil 4.3.2., C) ile müdahale edilen 3T3-L1 adiposit hücrelerinde leptinin immun boyama yoğunluğu orta derece bulunmuştur. Bu sonuçların yanı sıra leptin ekspresyonunun kefir pellet grubunda dramatik şekilde azaldığı görülmüştür ve kefir süpernatant grubu ile karşılaştırıldığı

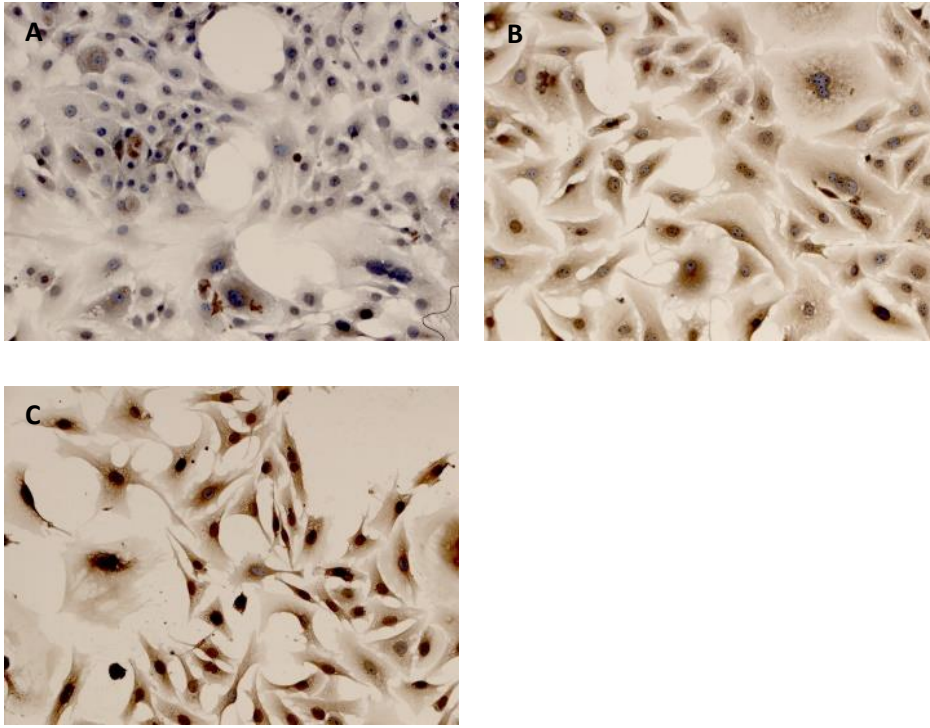
zaman bu immunoreaktivitenin istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanmıştır. Kefir süpernatant grubunun leptin immunoreaktivitesini az da olsa azalttığı belirlenmiştir. Ancak bu azalış istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır ($p > 0.005$) (Tablo 4.3.1.).



Şekil 4.3.2. Kefir süpernatant ve kefir pellet ile 24 saat boyunca inkübe edilen 3T3-L1 adipositlerindeki leptin ekspresyonu. Kontrol (A), kefir supernatant (B) and kefir pellet (C), Skala Bar = 50 μ m

A

Kefir süpernatant (Şekil 4.3.3. B) ve kefir pellet (Şekil 4.3.3. C) ile 24 saat boyunca inkübe edilen 3T3-L1 adipositlerindeki PPAR- γ ekspresyonu sırası ile hafif ve orta derecede olduğu belirlenmiştir. PPAR- γ 'nın 3T3-L1 adipositlerindeki immünoreaktivitesinin kontrol grubunda (Şekil 4.3.3. A) da benzer şekilde orta düzeyde olduğu saptanmıştır. İnkübasyon grupları kontrol grubu ile karşılaştırıldığı zaman PPAR- γ HSKOR'unun istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür ($p > 0.005$) (Tablo 4.3.1.).



Şekil 4.3.3. Kefir süpernatant ve kefir pellet ile 24 saat boyunca inkübe edilen 3T3-L1 adipositlerindeki PPAR-γ ekspresyonu. Kontrol (A), kefir supernatant (B) and kefir pellet (C), Skala Bar = 50 μ m

Table 4.3.1. Kontrol grubu ile hem kefir supernatant hemde kefir pellet ile inkübe edilen 3T3-L1 adipositlerindeki ANGPTL-4, leptin ve PPAR-γ için HSKOR değerleri

	ANGPTL-4	LEPTIN	PPAR- γ
Kontrol grubu	265,46 $\pm$ 25,54	211,37 $\pm$ 11,39	239,06 $\pm$ 22,68
Kefir supernatant	374,42 $\pm$ 27,47 ^a	210,63 $\pm$ 6,15	229,90 $\pm$ 16,13
Kefir pellet	317,06 $\pm$ 45,05 ^b	203,73 $\pm$ 3,83 ^c	243,13 $\pm$ 22,98

Veriler ortalama $\pm$ SD olarak belirtilmiştir. İstatistiksel açıdan değerlendirmeler Mann-Whitney U testi ile değerlendirilmiştir.

^a Veri kontrol grubu ile karşılaştırıldığı zaman istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur ($p = 0.009$).

^b Veri kontrol grubu ile karşılaştırıldığı zaman istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur ($p = 0.047$).

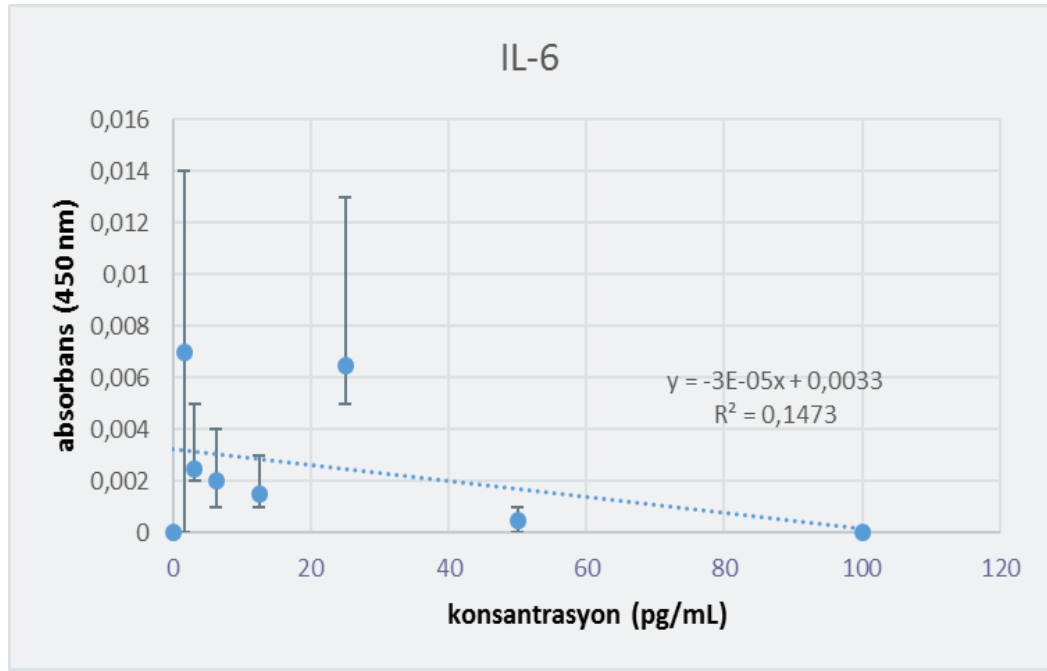
^c Veri kefir supernatant ile inkübe edilen grup ile karşılaştırıldığı zaman istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur ($p = 0.014$).

4.4. ELISA Değerlendirmeleri

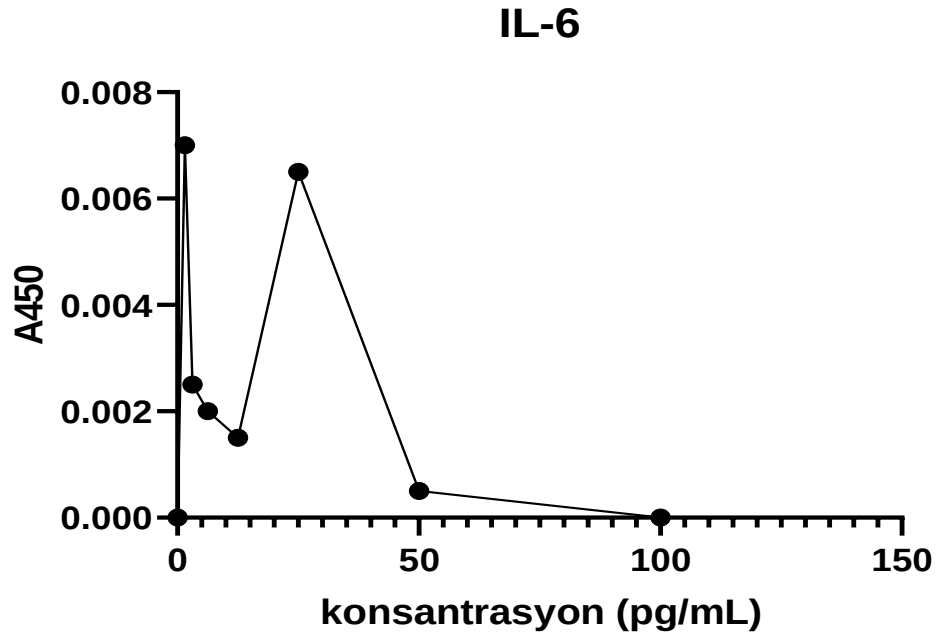
Kefir süpernatant ve kefir pellet ile 24 saat boyunca inkübe edilen 3T3-L1 adipositlerinden alınan üst vasatlara ait IL-6, IL-1 beta, TNF-alfa ve LPL antikorlarına ait ortalama absorbans değerleri Tablo 4.4.1.'de verilmiştir. Kefir pellet, kefir süpernatant grupları kontrol grubu ile karşılaştırıldığı zaman değerler arasında istatistiksel açıdan herhangi bir farklılık bulunamamıştır ($p>0,05$).

Tablo 4.4.1. Kefir süpernatant ve kefir pellet ile inkübe edilen 3T3L1 adipositlerindeki IL-6, IL-1 beta, TNF-alfa ve LPL ortalama absorbance değerleri			
	Ortalama absorbans (450 nm)		
	Kefir Pellet	Kefir Süpernatant	Kontrol
IL-6	0,001	0,001	0
IL-1 beta	0,039	0,005	0
TNF- alfa	0	0	0
LPL	0	0	0

Elde edilen IL-6 ortalama absorbans değerleri 100, 50, 25, 12,5 6,25, 3,13 ve 1,56 pg/mL standartlar ile hazırlanan eğrilere yerleştirilerek değerlendirilmiştir (Şekil 4.4.1. ve Şekil 4.4.2.). Kefir fraksiyonlarının ortalama absorbans değerleri karşılaştırıldığı zaman değerler benzer bulunmuştur.

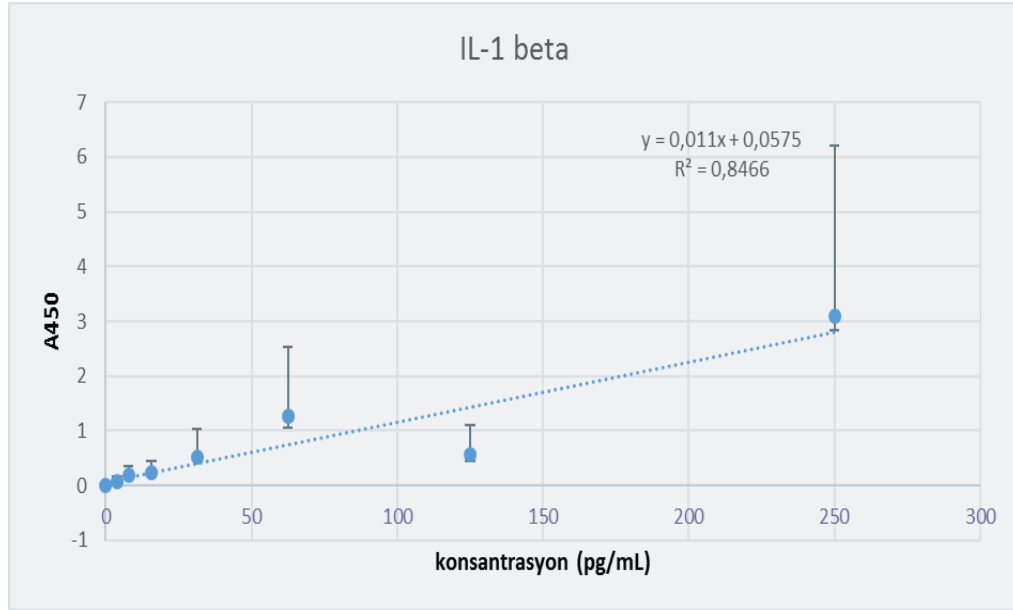


Şekil 4.4.1. IL-6'nın Microsoft Excel programında çizilmiş standart eğrisi, x-ekseni: konsantrasyon (pg/mL); y eksen: absorbans (A450)

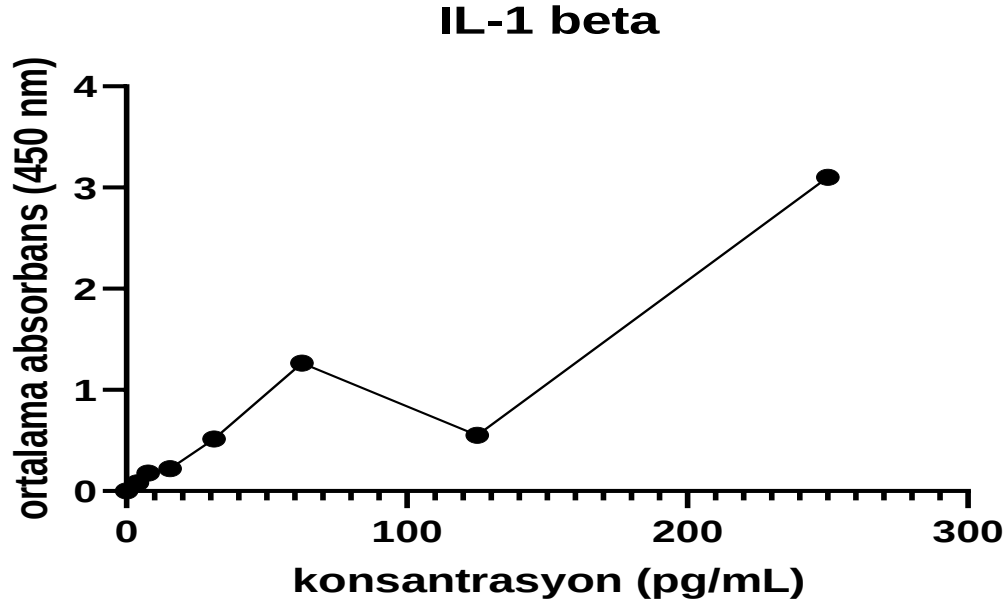


Şekil 4.4.2. IL-6'nın GraphPad programında çizilmiş standart eğrisi, x-ekseni: konsantrasyon (pg/mL); y eksen: absorbans (A450)

IL-1 beta antikoruna ait ortalama absorbans değerleri 250, 125, 62,5, 31,3, 15,6, 7,8 ve 3,9 pg/mL standartlar ile hazırlanan eğrilere yerleştirilerek değerlendirilmiştir (şekil 4.4.3. ve şekil 4.4.4.). Kefir fraksiyonlarının ortalama absorbans değerleri karşılaştırıldığı zaman kefir pellet fraksiyonunun ortalama absorbans değerinin çok az düzeyde kefir süpernatanta göre yüksek olduğu bulunmuştur.

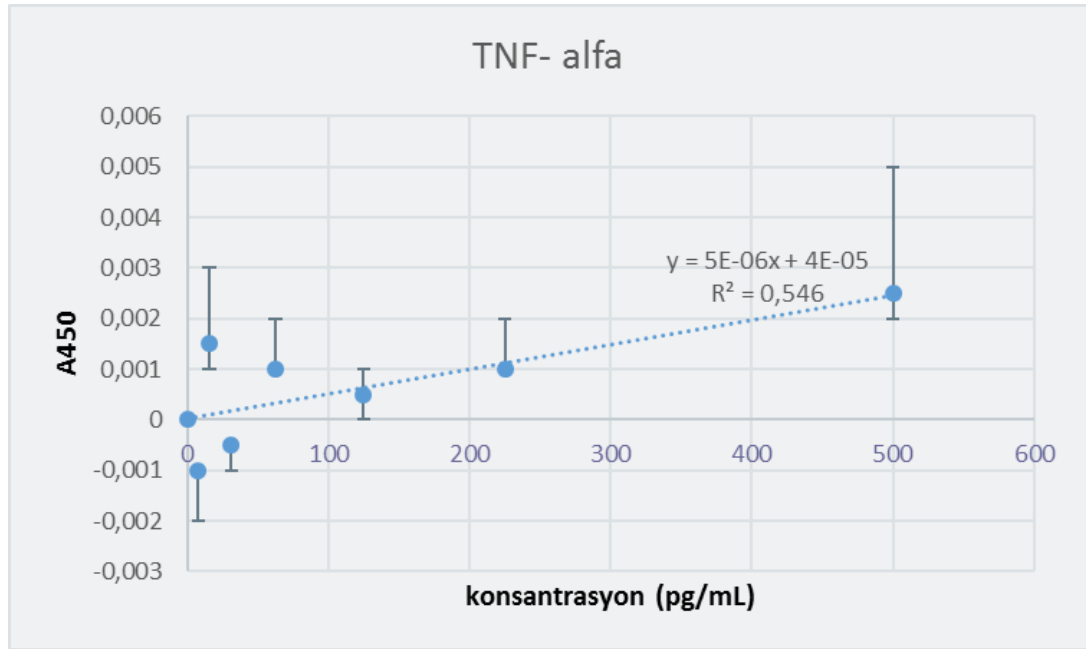


şekil 4.4.3. IL-1 beta'nın Microsoft Excel programında çizilmiş standart eğrisi, x-ekseni: konsantrasyon (pg/mL); y eksenini: absorbans (A450)

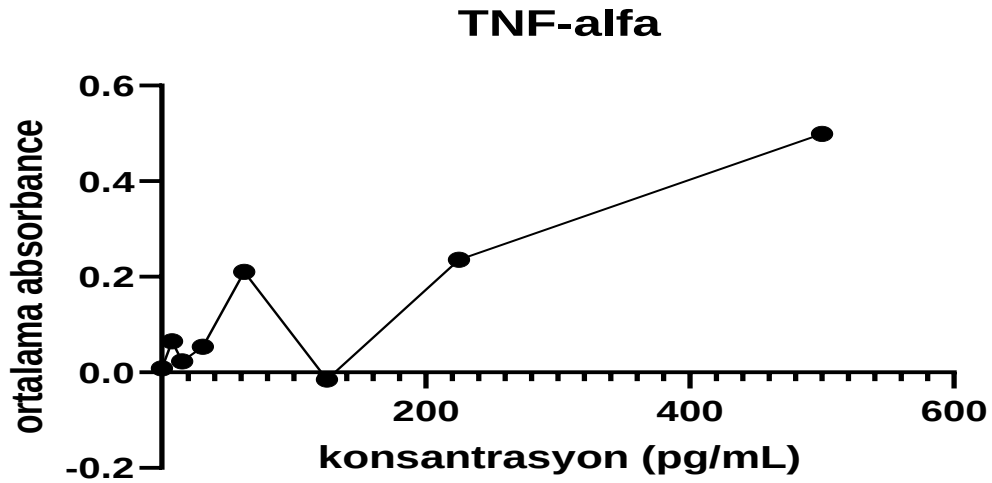


Şekil 4.4.4. IL-1beta'nın GraphPad programında çizilmiş standart eğrisi, x-ekseni: konsantrasyon (pg/mL); y eksenini: absorbans (A450)

TNF- alfa ELISA sonuçlarına göre ortalama absorbans değerleri 500, 225, 125, 62,5, 31,3, 15,6 ve 7,8 pg/mL standartlar ile hazırlanan eğrilere yerleştirilerek değerlendirilmiştir (Şekil 4.4.5 ve Şekil 4.4.6.). Kefir fraksiyonlarının ortalama absorbans değerleri karşılaştırıldığı zaman kefir fraksiyonlarının ortalama absorbans değerleri arasında farklılık bulunmamıştır.

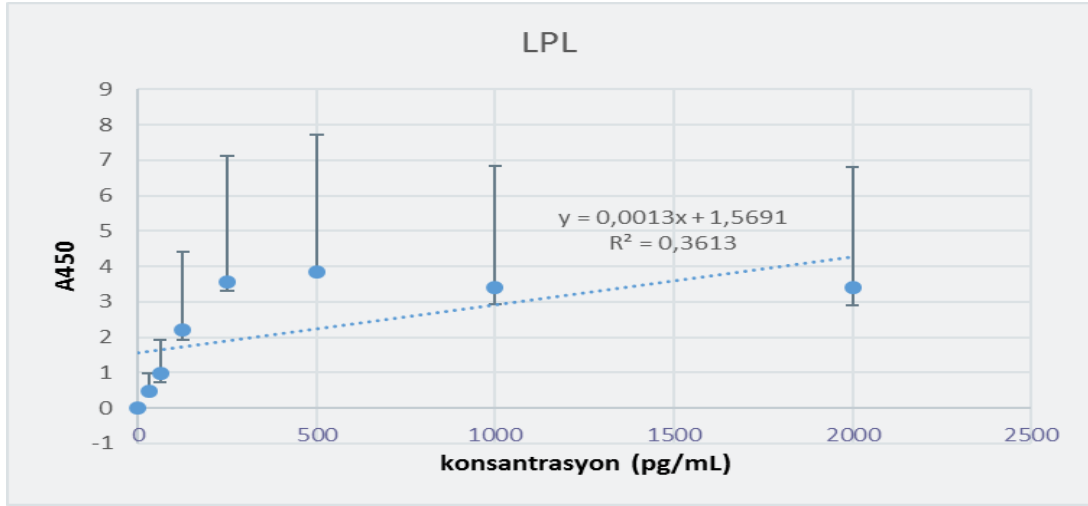


Şekil 4.4.5. TNF-alfa'nın Microsoft Excel programında çizilmiş standart eğrisi, x-ekseni: konsantrasyon (pg/mL); y eksen: absorbans (A450)

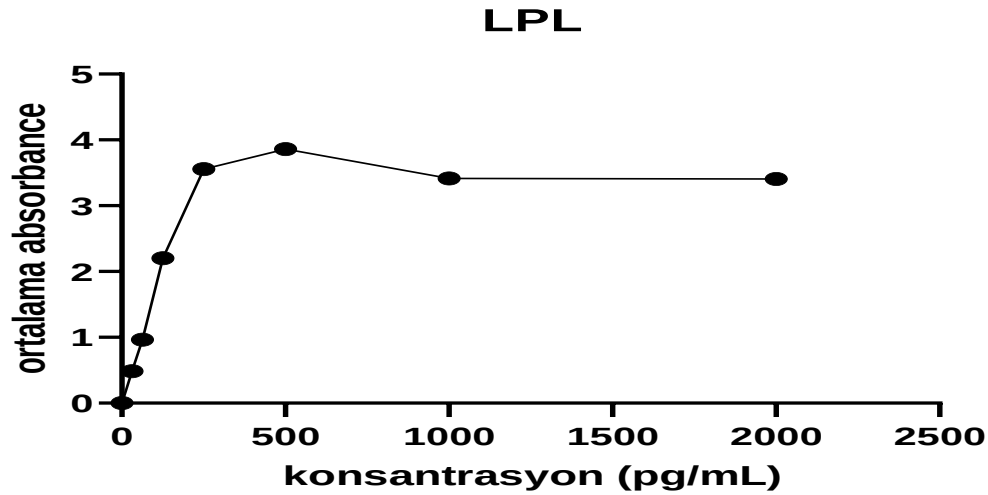


Şekil 4.4.6. TNF-alfa'nın GraphPad programında çizilmiş standart eğrisi, x-ekseni: konsantrasyon (pg/mL); y eksen: absorbans (A450)

Elde edilen LPL ortalama absorbens değerleri 2000, 1000, 500, 250, 125, 62,5 ve 31,3 pg/mL standartlar ile hazırlanan eğrilere yerleştirilerek değerlendirilmiştir (Şekil 4.4.7. ve Şekil 4.4.8.). Kefir fraksiyonlarının ortalama absorbens değerleri karşılaştırıldığı zaman değerler arasında herhangi bir farklılık bulunmamıştır.



Şekil 4.4.7. LPL'nin Microsoft Excel programında çizilmiş standart eğrisi, x-ekseni: konsantrasyon (pg/mL); y eksen: absorbens (A450)



Şekil 4.4.8. LPL'nin GraphPad programında çizilmiş standart eğrisi, x-ekseni: konsantrasyon (pg/mL); y eksen: absorbens (A450)

5. TARTIŞMA

Kefir doğal probiyotik içeriğine sahip geleneksel fermente süt ürünüdür. Hipokolesterolemik, anti-inflamatuar, anti-oksidan etkileri yanı sıra kilo kontrolünü sağlayarak sağlığı olumlu yönde etkilemektedir (Rosa ve ark, 2017; Rosa ve ark, 2016). Bu araştırmanın sonuçları hem kefir supernatant grubunun hem de pellet fraksiyonlarının 3T3-L1 adipositlerinde lipid birikimini önlediğini göstermiştir. Ayrıca, ANGPTL-4 ekspresyonunun, hem kefir supernatant hem de kefir pellet ile inkübe edilen 3T3-L1 adipositlerinde önemli ölçüde arttığı saptanmıştır. Buna ek olarak leptin immünoreaktivitesi, kefir pellet ile inkübe edilen adipositlerde önemli düzeyde azalmıştır. PPAR- γ immune boyamasının ise kefir supernatant ve kefir pellet inkübasyonlarından etkilenmediği belirlenmiştir.

3T3-L1 hücreleri, lipid metabolizmasının ve adipogenezin daha iyi anlaşılması için tercih edilen hücre çeşididir. Bu çalışmada, kefir tanelerinin adipogenez üzerindeki etkisi immünositokimyasal ve histokimyasal deneyler aracılığı ile belirlenmeye çalışılmıştır. 3T3-L1 hücrelerinin farklılaşma zamanı kültür edilme zamanına göre değişkenlik göstermektedir. Bu nedenle, ilk önce olgun adipositlerin elde edilmesi için preadiposit hücrelerinin farklılaşma zamanı belirlenmiştir. Daha sonra olgun adipositlerdeki lipid birikiminin analiz edilmesi için hücreler oil red-o ile boyanmıştır. Adipositlerdeki lipid birikimi incelendiği zaman, 3T3-L1 adipositlerinin 14. ve 21. kültür günlerindeki adiposit birikiminin benzer olduğu görülmüştür. Bu nedenle çalışma süresi boyunca 14 günlük kültür süresi ile elde edilmiş 3T3-L1 olgun adiposit hücreleri kullanılmıştır. İkinci olarak, kefirin moleküler mekanizması araştırılmış ve ANGPTL-4, leptin ve PPAR- γ ekspresyonları araştırılmıştır.

ANGPTL-4, angiopoietin grubuna ait bir proteindir. Temel olarak karaciğer, bağırsak ve adipoz dokudan salgılanmaktadır ve aynı zamanda FIAF olarak bilinmektedir (Paglia ve ark, 2017). Bu protein peroksizom proliferatörle aktive edilmiş reseptör protein- α (PPAR- α) ve PPAR- γ 'nın hedef geni olarak tanımlanmaktadır (Kim ve ark, 2010; Dahiya ve ark, 2017). ANGPTL-4, lipoprotein lipaz aktivitesini düzenler, adipositlerdeki lipolizini stimüle eder ve glikoz ve lipid metabolizmasını module

etmektedir (Paglia ve ark, 2017). Elde ettiğimiz sonuçlar, 24 saat boyunca kefir pellet ve kefir supernatant ile inkübe edilen 3T3-L1 adipositlerinde ANGPTL-4 immünoaktivitelerinin her iki grupta da önemli ölçüde arttığını göstermiştir. Bu verilere göre, kefir LPL inhibe ederek adipositlerdeki yağ birikimini azaltıcı ve ağırlık kontrolünü sağlayıcı potansiyel etkiye sahiptir. Buna ek olarak, kefir supernatant ANGPTL-4 ekspresyonunu laktik asit bakterileri ve mayaların oluşturduğu probiyotik içeriği nedeni ile kefir pellet fraksiyonundan daha fazla artırmıştır. Kefir aracılığı ile alınan probiyotiğin bağırsak mikrobiyotası üzerindeki olumlu etkileri sayesinde de ANGPTL-4 ekspresyonu desteklenmektedir. Sonuç olarak, kilo kontrolü üzerinde kefir supernatant içerisindeki laktik asit bakterileri ve mayalar sayesinde sahip olduğu probiyotik özellik nedeni ile kefir pelletten daha etkili bulunmuştur. Her iki kefir fraksiyonunun ANGPTL-4 üzerindeki etkisi ilk kez yapılan bu çalışma ile ortaya çıkarılmıştır. Gao ve ark (2019), fareler üzerinde yaptıkları çalışmada Tibet Kefir tüketiminin yağ depolanması üzerine olan etkisini araştırmışlardır. Yüksek yağlı diyet uygulayarak yağ depolanmasını ve birikimini sağladıkları fare gruplarına 18 mL/kg Tibet Kefir 8 hafta boyunca vererek yağ depolanmasını analiz etmişlerdir. Yaptıkları bu çalışma sonucunda, yağ dokusundaki ANGPTL-4 ekspresyonunu anlamlı derecede artırdığı ve LPL modülasyonunu sağlayarak indüklenen yağ deposunu önlediğini bulmuşlardır (Gao ve ark, 2019).

Leptin, beyaz yağ dokusundan salgılanmakta (D'souza ve ark, 2017) ve besin alımı ile enerji harcamasını kontrol etmektedir (Stern ve ark, 2016). Lipoliz (Stern ve ark, 2016) ve POMC nöronlarının (Friedman, 2016) aktivasyonunu stimülasyonu ile lipogenez (Mechanick, Zhao ve Garvey, 2018) ve NPY/AGRP nöronlarının (Friedman, 2016) inhibisyonunu sağlayarak kilo kazanımını önlemektedir. Araştırma sonuçları kefir pellet ve kefir supernatant grupları ile kontrol grubundaki leptin ekspresyonu arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark olmadığını göstermektedir ($p>0.005$). Buna ek olarak, kefir supernatant grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığı zaman benzer ekspresyon seviyelerine sahip olduğu görülmüştür. Ancak bu ekspresyon oranı kefir pellet grubuna göre daha fazladır. Kefir supernatant bu etkiyi laktik asit bakterileri ve mayalar sayesinde sahip olduğu probiyotik özellik nedeni ile göstermiştir. Böylelikle

kefirin hücre farklılaşmasını ve adipojenik hücre karakteristiğini koruyarak kilo kontrolünde etkili olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte kefir pellet ile inkübe edilen gruptaki leptin ekspresyonu ile kefir supernatant grubundaki ekspresyona göre anlamlı derecede düşük bulunmuştur ($p= 0.014$). Kefir tüketimi ile azalmış leptin ekspresyonu obez kişilerde leptin direnci üzerinde potansiyel olumlu bir etkiye sahip olacaktır. Rosa ve ark (2016), monosodyum glutamat ile metabolik sendrom geliştirilen fare modellerine günde bir mL kefir supplementasyonu yapmışlar on haftalık uygulama sonrasında kefirin leptin ekspresyonu üzerindeki etkilerini araştırdıklarında kefirin leptin düzeylerinde anlamlı şekilde artış sağladığını bulmuşlardır. Gezginc ve Maranci (2018); 90 gün boyunca haftada 3 kez 200 mL kefir ve her gün 200 mL yoğurt tüketen 23 gönüllü birey ile yürüttükleri çalışmada kefir tüketiminin leptin ekspresyonu üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. Araştırmacılar; çalışma sonunda leptin seviyelerinin anlamlı düzeyde arttığını (uygulama öncesi leptin seviyeleri 3138.19 ± 778.59 pg/mL, uygulama sonrası leptin seviyeleri 4350.10 ± 154.11) saptamışlardır. Zubira ve ark (2017), fruktoz ile zenginleştirilmiş diyet verilen fare modellerinde *Lactobacillus Kefiri* uygulamasının serum leptin seviyeleri, adipoz doku artışı ve kilo kazanımı üzerindeki etkileri araştırmışlar; çalışma sonucunda, *Lactobacillus Kefiri* uygulamasının kilo kazanımı ile adipoz doku artışını önlediğini ve leptin plazma seviyelerinin artışını önlediğini bulmuşlardır.

Ligand aktive edici transkripsiyon faktörleri, nükleer hormon reseptör ailesinin alt sınıflarından bir tanesini oluşturmaktadır. PPAR ise bu grubun alt ailesidir ve 3 farklı formda bulunmaktadır. Bunlar PPAR- α , PPAR- β ve PPAR- γ 'dır (Han ve ark, 2017). Bu üç form farklı dokularda, farklı ligand özgünlüğüne sahiptir ve bunun sonucunda da farklı fizyolojik etkileri vardır (Janani ve Kumari, 2015). PPAR- γ temel olarak adipoz dokuda salgılanmaktadır (Feng, Reuss ve Wang, 2016). Adipoz dokuda, karaciğerde ve kaslardaki lipid regülasyonunu artırması, adipositokin salınımını module etmesi ve insulin direncini iyileştirmesi aracılığı ile adipogenezde önemli bir rol oynamaktadır (Hasan, Rahman ve Kobori, 2019). Aynı zamanda, PPAR- γ adiposit farklılaşmasının düzenlenmesinde ve endojen ve sentetik ligandlar aracılığıyla lipid metabolizmasının düzenlenmesinde anahtar rol oynamaktadır (Sabry ve ark 2019). Son olarak leptin ve

adiponektin seviyelerini düzenleyerek inflamasyonu inhibe etmektedir (Polvani ve ark, 2016). PPAR- γ ; bu etkileri sayesinde obezitenin yönetiminde önemli rol oynamaktadır. Bu çalışmada, kefir pellet ile inkübe edilen 3T3-L1 adiposit hücrelerindeki PPAR- γ immunoreaktivitesinin kontrol grubundaki immunoreaktivite ile benzer olduğu belirlenmiştir. Kefir supernatant grubu ise PPAR- γ ekspresyonunda hafif bir düşüş sağlamıştır. Bu sonuçlara göre, kefir taneleri ile inkübe edilen ve edilmeyen 3T3-L1 adipositlerinde PPAR- γ ekspresyonunun adipogenez süreci boyunca değişmediği görülmektedir. Ho ve arkadaşları (Ho ve ark, 2013), yaptıkları çalışmada kefir uygulaması ile 3T3-L1 adipositlerindeki PPAR- γ ekspresyonunu anlamlı düzeyde düşürdüğünü öne sürmüşlerdir. Choi ve ark (2017), yüksek yağlı diyet ile oluşturdukları obez fare modelleri üzerinde yaptıkları çalışma sonucunda kefir tedavisinin adiposit çaplarının azalmasını sağlayarak vücut ağırlığını düşürdüğünü saptamışlardır. Altta yatan etki mekanizmasının ise adipogenez ile ilişkili genlerin ekspresyonunu azaltması aracılığı ile olduğunu savunmuşlardır. PPAR- γ ekspresyonunun azaldığı tespit edilmiştir. Benzer başka bir çalışmada, 15 gün boyunca fareler 5 gruba ayrılmış ve bu gruplara yoğurt, kousmis, kefir ve ticari probiyotik oral olarak verilmiştir. Çalışma sonucunda kefir, kousmis, yogurt, ticari probiyotik takviyesi verilen gruplarda PPAR- γ ekspresyonunun arttığı saptanmıştır (Sarı ve ark, 2014). PPAR- γ ekspresyonu kefir içeriğine bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. Bu çalışmada diğer çalışmalara göre farklı kefir fraksiyonlar kullanılmıştır. Bu nedenle kefir uygulaması PPAR- γ ekspresyonu üzerinde etkili olmamıştır. Buna ek olarak etkinin daha iyi analiz edilebilmesi için farklı immünohistokimyasal çalışmalar yapıp, mRNA seviyeleri analiz edilerek değerlendirmeler yapılmalıdır. Yapılan başka bir çalışmada kefirden elde edilen laktik asit bakterilerinden *Lactobacillus Kefiri*'nin adipoz dokudaki PPAR- α regülasyonunu artırarak yağ asit oksidasyonunu stimüle ettiği dolayısı ile adipositeyi azalttığı belirlemiş farelerin vücut ağırlığının anlamlı düzeyde azaldığı saptanmıştır (Kim ve ark, 2017).

Yağ dokusu sadece enerji deposu değil aynı zamanda birçok biyoaktif peptin ve protein salgılayan endokrin bir organdır. Bu protein ve peptitlere, sitokinler, hormonlar, büyüme faktörleri, prostaglandinler, akut faz proteinleri örnek verilebilir ve bunlar

karaciğer, pankreas, böbrek, hipotalamus ve immün cevabı etkilemektedir (Frühbeck ve ark 2001; Trayhurn ve Wood, 2004). Yağ dokusu akut enfeksiyon boyunca dramatik olarak leptin seviyelerini yükseltebilir ve IL-6, TNF- α ve IL-1 β seviyelerinin yükselmesine katkı koyabildiği ileri sürülmektedir (Wisse, 2004). Viseral adipoz dokuda gerçekleşen lokal immün yanıt sonucu değişen sitokin regülasyonu obezitedeki kronik sistemik inflamasyonun kaynağıdır (Schmidt ve ark 2014). Oluşan kronik düşük dereceli inflamasyon obez kişilerde immün fonksiyonun etkilenmesine neden olmakta ve metabolik komplikasyonların patogeneğinde yer almaktadır (Pereira ve Leite, 2004; Lumeng ve Saltiel, 2011). Bu çalışmada, ELISA yöntemi ile TNF- α , IL-6 ve IL-1 β seviyeleri hesaplanmıştır. Araştırma sonuçlarına göre IL-6 ve TNF- α değerleri her iki kefir fraksiyonunda da benzer absorbans değerlerine sahiptir. IL-1 β kefir pellet fraksiyonunun ortalama absorbans değerinin çok az düzeyde kefir süpernatanta göre yüksek olduğu bulunmuştur. Seo ve ark. (2018), kefir tanelerinin Caco-2 hücrelerindeki TNF- α ekspresyonu üzerine olan etkisini inceledikleri çalışma sonucunda kefir inkübasyonunun TNF- α mRNA ekspresyonunun inhibe ettiğini saptamışlardır. 3T3-L1 hücreleri üzerinde yapılan bir çalışmada ise kefirin TNF- α ekspresyonunu dramatik olarak azalttığı ancak IL6 seviyelerini etkilemediği gösterilmiştir (Ho ve ark 2013). Fareler üzerinde immün yanıtın değerlendirilmesi amacı ile yapılan başka bir çalışmada; IL-6, IL1 ve TNF α değerleri ELISA yöntemi ile değerlendirilmiştir. Araştırmacılar; günde 3.6 cc kefir süplemantasyonunun proinflamatuvar sitokinlerin (IL1, IL6 ve TNF α) ekspresyonunu azalttığını saptamışlardır. Ayrıca, IL1 seviyelerinin yaklaşık -18.62 $\pm$ 23.59 pg/mL ve IL6 seviyesinin -3.21 $\pm$ 7.57 pg/mL olduğunu ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığı zaman bu değerlerin istatistiksel açıdan anlamlı bir azalış olduğunu saptamışlardır. TNF- α değeri ise 1.65 $\pm$ 4.62 pg/mL azalttığı ancak kontrol grubu ile karşılaştırıldığı zaman azalışın anlamlı olmadığı belirlenmiştir (Hadisaputro ve ark, 2012). Fareler üzerinde yapılan başka bir çalışmada, kolit geliştirilmiş farelerde kefir ile tedavi edilen grupların TNF- α ekspresyonunu istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalttığı gösterilmiştir (Senol ve ark, 2015). Egzersiz ile indüklenen inflamatuvar sitokin salınımı üzerinde kefirin etkilerinin incelendiği çalışmada 18 ile 35 yaş arası 67 yetişkin kişi ile çalışılmış, çalışma sonucunda, tedavi grupları ile kontrol grubu karşılaştırıldığı

zaman TNF- α ekspresyonları arasında bir farklılık saptanmadı ve C reaktif protein değerlerinde önemli bir değişiklik saptamamışlardır. Yapılan bu çalışma sonucunda yoğun egzersiz antrenmanları esnasında kefir tüketiminin inflamasyon ve oksidatif stresin neden olduğu hasarı düzenlemeye yardımcı olabileceğini veya egzersizin olumsuz yan etkilerini azaltabileceğini göstermişlerdir (O'brien, 2015).

Lipoprotein lipaz, lipoproteinlerin serbest yağ asitlerine ve monogliseritlere dönüşümünden sorumlu olan temel enzimdir. Bu durum hidrolize edilen lipoproteinlerin yağ ve kas dokusunun içerisine girişini sağlamaktadır (Goldberg ve Merkel, 2001). LPL, adipöz doku vb bir çok doku tarafından üretilmektedir. ANGPTL-4 ise LPL inhibitörü olarak görev yapmaktadır (Wang ve Eckel, 2009). Bu çalışmada, kefir fraksiyonlarının LPL ekspresyonuna ait ortalama absorbans değerleri karşılaştırıldığı zaman değerler arasında herhangi bir farklılık bulunmamıştır. Fareler üzerinde yapılan bir çalışmada Kefir tüketiminin yağ depolanması üzerine olan etkisi araştırılmıştır. Bu çalışma sonucunda, kefirin yağ dokusundaki ANGPTL-4 ekspresyonunu anlamlı derecede artırdığı ve bu artış aracılığı ile LPL inhibe edilerek yağ deposunun önlediği bulunmuştur (Gao ve ark, 2019).

Tüm bunlara ek olarak, kefir fraksiyonları ile inkübe edilmiş 3T3-L1 adipositlerinde boyanmış lipid sayısının azaldığı tespit edilmiştir. Kefir supernatant ile inkübe edilmiş hücrelerde lipid damlacıklarındaki lipid birikiminin azaldığı görülmüştür. Kefir pellet grubunun ise kefir supernatant grubuna göre lipid birikimi üzerindeki inhibitör etkisinin daha fazla olduğu gözlemlenmiştir. Kefir inkübasyonu sonrasında azalan lipid birikimi, ANGPTL-4 ekspresyonundaki yükselme ile ilişkilendirilebilir. ANGPTL-4 ekspresyonundaki artış ile LPL aktivitesi inhibe edilir ve lipid damlacıkları içerisindeki yağ birikimi önlenmektedir. Buna ek olarak, adipogenez gelişimi boyunca oluşacak diğer mekanizmalar diğer çalışmalar aracılığı ile incelenebilir. Tung ve ark (2018), farelerde yüksek yağlı diyet ile indükleilmiş obezite modeli oluşturulduktan sonra 8 hafta boyunca kefir uygulaması yapılmıştır. Kefir peptitleri distile su ile çözündürüldükten sonra oral olarak 164 mg/kg olacak şekilde farelere verilmiştir. Çalışmanın histokimyasal boyama sonuçlarına göre kefir verilen grupta adiposit dokudaki lipid

birikiminin anlamlı düzeyde azaldığı rapor edilmiştir. Fareler üzerinde yapılan başka bir çalışmada 4 hafta boyunca farelere 140 mg/kg kefir verilmiştir. Uygulama sonrasında hematoksin ve oil red o boyama sonuçlarına göre lipid oksidasyonunun uyarıldığı, lipogenez yolunun ise inhibe edildiği ve yağ birikiminin azaldığını saptamışlardır (Chen ve ark, 2014). Ho ve ark (2013), kefirin 3T3L1 adipositlerinin farklılaşması ve adipositlerdeki lipid birikimi üzerinde bir çalışma gerçekleştirmişlerdir. Bu çalışma sonucunda, adipositlerdeki oil red o ile boyanmış lipid miktarı anlamlı derecede azalmıştır. Buna ek olarak, kefir uygulaması sonrasında olgun 3T3-L1 adipositlerindeki lipid birikiminin azalması sonucu adiposit farklılaşmasını inhibe etmiştir. Kefir tüketiminin anti-obezite etkisinin belirlenmesi amacı ile kefirin içerisindeki laktik asit bakterileri izole edilmiş ve obez farelere verilmiştir. Farelerdeki obezite yüksek yağlı diyet ile indüklenmiştir. Lactobacillus kefiri verilen farelerde adiposity yarı çapının istatistiksel olarak azaldığı (ilk ölçüm 65.1 μ m, son ölçüm 42.2 μ m; $p=0.001$) saptanmıştır (Kim ve ark, 2017). Lim ve ark (2017), kefir tüketiminin kilo kontrolü üzerindeki etkisini araştırmışlardır. Yapılan bu çalışmada kefirin içerisindeki ekzopolisakkaritlerin 3T3L1 hücrelerindeki adipogenezi azalttığı saptanmıştır. Aynı zamanda yüksek yağlı diyetle birlikte kefirde elde edilmiş ekzopolisakkarit beslenen fareler ile kontrol grubu karşılaştırıldığı zaman farelerin vücut ağırlıklarının ve yağ ağırlıklarının istatistiksel olarak azaldığını bulmuştur.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Obezite, vücudun yağsız kütesine karşılık yağ kütesinin aşırı miktarda artması veya boya göre ağırlığın istenilen düzeyin üzerine çıkması olarak tanımlanmaktadır. Obezite çağın en önemli hastalıkları arasında olup hem gelişmiş hem de gelişmekte olan ülkeleri etkileyen sağlık sorunu olmayı sürdürmektedir. Obezitenin tedavisi ise kişinin isteği, kararlığı ve tedaviye etkin olarak katılımı ile gerçekleşmektedir. Tedavinin tıbbi beslenme tedavisi basamağında, temel beslenmenin yanı sıra sağlığı olumlu yönde etkileyen besin veya besin bileşenlerini de tedavinin bir parçası olarak kullanıldığını ve etkisinin araştırıldığını yapılan çalışmalarda görmekteyiz.

Son zamanlarda en çok araştırılan ve çalışılan konu bağırsak mikrobiyotasının obezite gelişimindeki rolüdür. Bu konu ile ilgili yapılan bir çok çalışma ve araştırmada bazı besin veya besin bileşenlerinin mikrobiyota üzerinde olumlu etkilerinin olduğunu ve obezitenin önlenmesinde veya tedavisinde rol oynayabileceği anlaşılmıştır. Bu besin bileşenlerinden ve besinlerden en çok dikkati çeken probiyotik ve probiyotik içeriği zengin besinlerdir. Bu besinler obezite üzerindeki olumlu etkilerini farklı potansiyel etki mekanizmaları ile göstermektedir. Örneğin; kısa zincirli yağ asitlerinin üretiminin artması, ANGPTL-4/FIAF ekspresyonunun artırılması, enerji dengesinin oluşturulması, lipopolisakkarit aracılı inflamasyonun baskılanması, doyumluğu sağlayan hormonların regüle edilmesi vb. etkilerdir. Ancak probiyotik ve probiyotik içeriği zengin besinlerin popülerliğinin fazla olmasına rağmen yapılan çalışmalar henüz bazı etki mekanizmalarını açıklamaya yeterli olmamıştır.

Bu çalışmada ilk kez doğal probiyotik kaynağı olan kefirin hem kefir pellet hemde kefir supernatant fraksiyonlarının ANGPTL-4/FIAF, Leptin ve PPAR- γ ekspresyonları ile LPL, TNF- α , IL-6 ve IL-1 β ekspresyonları üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Bu araştırma ile kefirin obezite üzerindeki potansiyel etki mekanizmaları açıklanmaya çalışılmıştır. Lipid metabolizmasının ve adipogenezin daha iyi anlaşılması için de 3T3-L1 preadiposit hücreleri adipojenije dönüştürülerek çalışma süresince kullanılmıştır.

3T3L1 hücrelerine 0.1 mg/dl kefir supernatant ve kefir pellet inkübasyonu yapıldıktan sonra her iki fraksiyonunda lipid birikimini önlediği belirlenmiştir. Elde

ettiğimiz sonuçlara göre ANGPTL-4 ekspresyonunu hem kefir supernatant hemde kefir pellet inkübasyonunun önemli ölçüde artırdığı, bu artış sayesinde LPL aktivitesinin inhibe olduğu ve adipositlerdeki yağ birikiminin baskılandığı saptanmıştır. Kefir süpermatant grubunun ANGPTL-4 ekspresyonu üzerinde pellet grubuna göre daha çok etkili olduğu saptanmıştır. Bu etkinin ise supernatant grubundaki bakteri ve mayaların oluşturduğu probiyotik etki sayesinde olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Leptin immünoreaktivitesini ise kefir pellet fraksiyonu azaltmıştır. Bu azalış oluşabilecek leptin direnci üzerinde olumlu etkisinin olabileceğini göstermiştir. PPAR- γ ekspresyonunun ise adipogenez süreci boyunca değişmediği görülmüştür.

Yapılan bu çalışma ile kefirin obezite gelişimindeki etki mekanizmaları üzerinde olumlu etkilerinin olduğunu ve tıbbi beslenme tedavisinde günlük tüketilmesi gereken süt ve türevleri porsiyonları çerçevesinde önerilebilecek bir besin olabileceğini göstermektedir. Elde edilen bu sonuçların öncelikle in vivo çalışmalarla daha sonra insanlar üzerinde yapılacak çalışmalar ile desteklenmesi gerekmektedir. Bu çalışma, gelecekte yapılacak diğer çalışmalar için öncü olup rehber niteliği taşımaktadır.

Çalışma sonuçlarının desteklenmesi ve beslenmeye yönelik daha somut önerilerde bulunulması için konu ile ilgili araştırılacak adımlar aşağıdaki gibidir;

In vitro çalışmalarda;

- Kefirin diğer transkripsiyon faktörleri ve sitokin salınımları üzerindeki etkilerinin araştırılması.
- Kullanılan kefirin bileşiminin tam olarak belirlenmesi ve hangi içeriğinin bu etki mekanizmaları üzerinde etkin rol oynadığı daha net açıklanmalı.
- Kefirin farklı dozlarda ve farklı sürelerde 3T3L1 hücrelerindeki lipid metabolizması ve adipogenez üzerindeki etkisi araştırılmalı.

In vivo çalışmalarda;

- Kefirin farklı fraksiyonlarda ve farklı dozlarda adipogenez ve bu süreçteki metabolik değişiklikler üzerindeki etkisi araştırılmalı.

- Obezite üzerindeki olası etki mekanizmalarını bağırsak mikrobiyotası aracılığı ile gösterdiği için mikrobiyotadaki flora değişiklikleri üzerindeki etkisinin belirlenmesine yönelik sekans çalışmaları yapılmalı.
- Farklı diyet modelleri ile indüklenen obezite sürecinde kefirin adipositlerin farklılaşma süreci üzerindeki etkisi belirlenmeli.
- Farklı diyet modelleri ile indüklenen obezite sürecinde metabolik ve fizyolojik değişiklikler üzerindeki etkisi belirlenmeli.

Epidemiyolojik çalışmalarda;

- Kefirin tüketim sıklığı ve miktarının değişikliğine göre vücut ağırlığı denetimindeki rolünün araştırılması.
- Obez kişilerde kefir tüketimi ile bağırsak mikrobiyotasındaki değişikliklerin belirlenmesine yönelik sekans çalışmalarının yapılması.
- Kefir üretimi sırasında kullanılan süte bağıntılı olarak değişen besin ögesi içeriğinin belirlenmesi ve bu etkilerin vücut ağırlığı, bağırsak mikrobiyotası üzerindeki etkilerinin belirlenmesi.

KAYNAKÇA

Aggarwal B, Jain V. Obesity in Children: Definition, Etiology and Approach. *Indian J Pediatr.* 2018; 85 (6): 463 – 471.

Ahmed Z, Wang Y, Ahmad A, Khan S, Nisa M, Ahmad H, ve arkadaşları. Kefir and Health: A Contemporary Perspective. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2013; 53 (5): 422 – 434.

Amorim F, Coitinho L, Dias A, Friques A, Monteiro B, Rezende L, ve arkadaşları. Identification of new bioactive peptides from kefir milk through proteopeptidomics: Bioprospection of antihypertensive molecules. *Food Chem.* 2019; 282: 109 – 119.

Ang Z, Ding J. GPR41 and GPR43 in Obesity and Inflammation – Protective or causative. *Front. Immunol.* 2016; 7 (28): 1 – 5.

Apovian C. Obesity: Definition, Comorbidities, Causes, and Burden. *Am J Manag Care.* 2016; 22: 176 – 185.

Arslan S. A review: chemical, microbiological and nutritional characteristics of kefir. *J. Food. Sci.* 2015; 13 (3): 340 – 345.

Barboza K, Coco L, Alves G, Peters B, Vasquez E, Pereira T, ve arkadaşları. Gastroprotective effect of oral kefir on indomethacin- induced acute gastric lesions in mice: impact on oxidative stress. *Life Sci.* 2018; 209: 370 – 376.

Barlow SE, The Expert Committee. Expert committee recommendations regarding the prevention, assessment, and treatment of child and adolescent overweight and obesity: summary report. *Pediatrics.* 2007; 120 (4): 164—192.

Bennour E, Timoumi R, Koroit M, Bacha H, Essefi S. Protective effects of kefir against zearalenone toxicity mediated by oxidative stress in cultured HCT-116 cells. *Toxicon.* 2019; 157: 25 – 34.

Blüher M. Obesity: global epidemiology and pathogenesis. *Nat. Rev. Endocrinol.* 2019; 15 (5): 288-298.

Blüher S, Hauschild K, Graf C, Wildhalm K, Reck U, Jodicke B, ve arkadaşları. Current Guidelines for Obesity Prevention in childhood and Adolescence. *Obes. Facts.* 2018; 11 (3): 263 – 276.

Boulange C, Neves A, Chilloux J, Nicholson J, Dumas M. Impact of the gut microbiota on inflammation, obesity, and metabolic disease. *Genome Med.* 2016; 8 (1): 42-54.

Bourrie B, Cotter B, Willing B. Traditional kefir reduces weight gain and improves plasma and liver lipid profiles more successfully than a commercial equivalent in a mouse model of obesity. *J. Funct. Foods.* 2018; 7 (647): 29 – 37.

Bourrie B, Willing B, Cotter P. The Microbiota and Health Promoting Characteristics of the Fermented Beverage Kefir. *Front. Microbiol.* 2016; 7 (647): 1 – 17.

Brasil G, Cutini M, Moraes F, Pereira T, Vasquez E, Lenz D, Bissoli N, ve arkadaşları. The benefits of soluble non-bacterial fraction of kefir on blood pressure and cardiac hypertrophy in hypertensive rats are mediated by an increase in baroreflex sensitivity and decrease in angiotensin- converting enzyme activity. *Nutrition.* 2018; 51-52: 66 – 72.

Bray GA, Kim KK, Wilding JPH. Obesity: a chronic relapsing progressive disease process. A position statement of the World Obesity Federation. *Obes Rev.* 2017; 18 (7): 715- 723.

Brusaferro A, Cozzali R, Orabona C, Biscarini A, Farinelli E, Cavalli E, ve arkadaşları. Is it time to use probiotics to prevent or treat obesity?. *Nutrients.* 2018; 10 (1613): 1 – 14.

Butte N, Garza C, Onis M. Evaluation of the Feasibility of International Growth Standarts for School- Aged Children and Adolescents. *J. Nuytr.* 2007; 137 (1): 153- 157.

Caesar R, Fak F, Backhed F. Effects of the microbiota on obesity and atherosclerosis via modulation of inflammation and lipid metabolism. *J. Intern. Med.* 2010; 268 (4): 320 – 328.

Castaner O, Goday A, Park Y, Lee S, Magkos F, Shiow S ve ark. The Gut Microbiome in Obesity: A Systematic Review. *Int J Endocrinol.* 2018; 4095789: 1 – 9.

Chen H, Tung Y, Tsai C, Lai C, Lai Z, Lin Y, ve arkadaşları. Kefir improves fatty liver syndrome by inhibiting the lipogenesis pathway in leptin-deficient ob/ob knockout mice. *Int J Obes*. 2014;38 (9): 1172 – 1179.

Choi J, Kang H, Lim W, Kim M, Lee I, Cho H. Kefir prevented excess fat accumulation in diet induced obese mice. *Biosci Biotech Bioch*. 2017; 81 (5): 958 – 965.

Clercq N, Groen A, Romijn J, Nieuwdorp M. Gut microbiota in obesity and undernutrition. *Adv Nutr*. 2016; 7 (6): 1080 – 1089.

Coi J, Kang H, Lim W, Kim M, Lee Y, Cho H. Kefir prevented excess fat accumulation in diet- induced obese mice. *Biosci Biotech. Bioch*. 2017; 81 (5): 958 – 965.

Cole T, Bellizzi MG, Flegal KM, Dietz W. Establishing a standard definition for child overweight and obesity worldwide: international survey. *BMJ*. 2000; 320 (7244): 1240 – 1243.

Cutini M, Almeida S, Nascimento A, Abreu G, Bissoli N, Lenz D, ve arkadaşları. Long term treatment with kefir probiotics ameliorates cardiac function in spontaneously hypertensive rats. *J. Nutr. Biochem*. 2018; 66: 79-85.

D'souza A, Neumann U, Glavas M, Kleffer T. The glucoregulatory actions of leptin. *Mol Metab*. 2017; 6 (9) 1052-1065.

Dahiya DK, Renuka M, Puniya UK, Shandilya T, Dhewa N, Kumar S, Kumar AK, Puniya P. Gut Microbiota Modulation its relationship fibers and probiotics: A review. *Front Microbiol*. 2017; 8 (563): 1 – 17.

Davras F, Tas T, Seydim Z. Immunological effects of kefir produced from kefir grains versus starter cultures when fed to mice. *Funct. Food Health Dis*. 2018; 8 (8): 412 – 423.

Englar T, Barlow G, Mathur R. Obesity, diabetes and the gut microbiome: an updated review. *Expert Rev. Gastroent*. 2019; 13 (1): 3 – 15.

Farnworth E. Kefir- a complex probiotic. *Food Science and Technology Bulletin: J. Funct. Foods*. 2005; 2 (1) 1 – 17.

Feng S, Reuss L, Wang Y. Potential of Natural Products in the Inhibition of adipogenesis through Regulation of PPAR- γ Expression and/or Its Transcriptional Activity. *Molecules*. 2016; 21 (10): 1278- 1297.

Friedman J. The long road to leptin. *J Clin Invest*. 2016; 126 (12): 4727-4734.

Frühbeck G, Ambrosi J, Muruzabal F, Burrell M. Adipocyte: a model for investigation of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2001; 280 (6): 827 – 847.

Gao J, Ding G, Li Q, Gong L, Huang J, Sang Y. Tibet kefir milk decreases fat deposition by regulating the gut microbiota and gene expression of LPL and ANGPTL-4 in high fat diet-fed rats. *Food Res. Int*. 2019; 121: 278 – 287.

Gao J, Gu F, Ruan H, Chen Q, He J, He G. Induction of apoptosis of gastric cancer cells SGC7901 in vitro by a cell- free fraction of Tibetan kefir. *Int Dairy. J*. 2013; 30 (1): 14 – 18.

Gezginc Y, Maranci C. Effect of fermented food consumption on biochemical parameters and adipokines levels. *Prog Nutr*. 2018; 20 (4): 642- 647.

Goldberg IJ, Merkel M. Lipoprotein lipase: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology. *Front Biosci*. 2001; 1 (6): 388 – 405.

Gomes A, Escobar A, Soares J, Silva A, Pinto N, Riul T. Chemical composition and hypocholesterolemic effect of milk kefir and water kefir in Wistar rats. *Rev Nutr*. 2018; 31 (2): 137 – 145.

Gonzalez S, Navarro F, Arboleya A, Gavilan R, Salazar N, Gueimonde M. Fermented Dairy Foods: Impact on Intestinal Microbiota and Health- Linked Biomarkers. *Front. Microbiol*. 2019; 10 (1046): 1 – 10.

Greydanus D, Agana M, Kamboj M, Shebrain S, Soares N, Eke R, Patel D. Pediatric Obesity: Current Concepts. *Dis. Mon*. 2018; 64 (4): 98 – 156.

Hadisaputro S, Djokomoeljanto RRJ, Judiono, Soesatyo M. The Effects of Oral Plain Kefir Supplementation on Proinflammatory Cytokine Properties of the Hyperglycemia Wistar Rats Induced by Streptozotocin. *Acta Med Indones*. 2012; 44(2): 100 – 104.

Hales C, Margaret C, Fryar C, Ogden C. Prevalence of Obesity Among Adults and Youth United States, 2015 – 2016. NCHS Data Brief. 2017. Report no: 288.

Han L, Shen W, Bittner S, Kraemer F, Azhar S. PPARs: regulators of metabolism and as therapeutic targets in cardiovascular disease. Part II: PPAR- β/δ and PPAR- γ . *Future Cardiol.* 2017;13 (3): 279 – 296.

Hasan A, Rahman A, Kobori H. Interactions between Host PPARs and Gut Microbiota in Health and Disease. *Int J Mol Sci.* 2019; 20 (2): 387- 406.

Hertzler S, Clancy S. Kefir improves lactose digestion and tolerance in adults with lactose maldigestion. *J Am Diet Assoc.* 2003; 103 (5): 582 – 587.

Ho J, Choi J, Lim W, Kim M, Lee I, Cho H. Kefir inhibits 3T3-L1 adipocyte differentiation through down-regulation of adipogenic transcription factor expression. *J Sci Food Agric.* 2013; 93 (3): 485 – 90.

Hoelscher D, Kirk S, Ritchie L, Sabo L. Position of the Academy of Nutrition and Dietetics: Interventions for the Prevention and Treatment of Pediatric Overweight and Obesity. *J. Acad. Nutr. Diet.* 2013; 113 (10): 1375 – 1394.

Hong W, Chen Y, Dai T, Huang N, Chen M. Effect of Heat-Inactivated kefir- isolated *Lactobacillus kefirianofaciens* M1 on preventing an Allergic pathway response in Mice. *J. Agric. Food Chem.* 2011; 59 (16): 9022 – 9031.

Hruby A, Frank B. The Epidemiology of Obesity: A Big Picture. *Pharmacoeconomics.* 2015; 33 (7): 673 – 689.

Iraporda C, Junior M, Neumann E, Nunes A, Nicoli J, Abraham A, ve arkadaşları. Biological activity of the non-microbial fraction of kefir: antagonism against intestinal pathogens. *J Dairy Res.* 2017; 84 (3): 339 – 345.

Janani C, Kumari BD. PPAR gamma gene – A review. *Diabetes Metab Syndr.* 2015; 9 (2015): 46 – 50.

Kabaran S, Gezer C. Kuzey Kıbrıs Türk Cumhuriyeti’ndeki Çocuk ve Adölesanlarda Akdeniz Diyetine Uyum ile Obezitenin Belirlenmesi. *Türk. J. Pediatr. Dis.* 2012; 7 (1): 11 – 20.

Kesmen Z, Kacmaz N. Determination of Lactic Microflora of Kefir Grains and Kefir Beverage by Using Culture- Dependent and Culture- Independent Methods. *J. Food. Sci.* 2011; 76 (5): 276 – 283.

Khan L, Sobush K, Keener D, Goodman K, Lowry A, Kakietek J. Recommended Community Strategies and Measurements to Prevent Obesity in the United States. *MMWR Recommendations and Reports.* 2009; 58 (RR-7): 1 – 26.

Khan M, Gerasimidis K, Edwards C, Shaikh G. Role of gut microbiota in the aetiology of obesity: proposed mechanisms and review of the literature. *Int J Obes.* 2016; 8: 1 – 27.

Kim DH, Jeong D, Kang IB, Kim H, Song KY, Seo KH. Dual function of *Lactobacillus Kefiri* DH5 in preventing high-fat-diet-induced obesity: direct reduction of cholesterol and upregulation on PPAR- α in adipose tissue. *Mol Nutr Food Res.* 2017; 6 (11): 1-35.

Kim H, Youn B, Shin M, Namkoong C, Park K, Baik J. Hypothalamic ANGPTL4/FIAF is a novel regulator of food intake and body weight. *Diabetes.* 2010; 59 (11): 2772-2780.

Kuczmariski RJ, Ogden CL, Grummer- Strawn LM, Flegal KM, Guo S, Wei R, ve arkadaşları. CDC growth charts: United States. *Adv Data.* 2000; 8 (314):1 – 27.

Lee M, Ahn K, Kwon O, Kim M, Kim M, Lee I, arkadaşları. Anti-inflammatory and anti-allergic effects of kefir in a mouse asthma model. *Immunology.* 2007; 212 (8): 647 – 654.

Leite O, Miguel M, Peixoto R, Rosado A, Silva J, Paschoalin V. Microbiological, technological, and therapeutic properties of kefir: a natural probiotic beverage. *Braz. J. Microbiol.* 2013; 44 (2): 341 – 349.

Lim J, Kale M, Kim D, Kim H, Chon J, Seo K, ve arkadaşları. Anti-obesity effect of exopolysaccharides isolated from kefir grains. *J. Agric. Food Chem.* 2017; 65 (45): 10011 – 10019.

Lin Y, Chen Y, Hsieh H, Chen M. Effect of *Lactobacillus mali* APS1 and *L. Kefiranofaciens* M1 on obesity and glucose homeostasis in diet- induced obese mice. *J Funct. Foods.* 2016; 23: 580 – 589.

Liu J, Wang S, Chen M, Chen H, Yueh P, Lin C. Hypocholesterolaemic effects of milk-kefir and soyamilk- kefir in cholesterol- fed hamsters. *Brit. J. Nutrition.* 2006; 95 (5): 939 – 946.

Liu J, Wang S, Chen M, Yueh P, Lin C. The anti- allergenic properties of milk kefir and soymilk kefir and their beneficial effects on the intestinal microflora. *J. Sci. Food. Agric.* 2006; 86 (15): 2527 – 2533.

Lu D, Che J, Lu Y, Huang Y, Lu T, Chen Y, ve arkadaşları. Mini review of obesity, etiology progresses and different therapeutics. *ECDMR.* 2019; 3(3): 98 – 102.

Lumeng C, Saltiel A. Inflammatory Links Between Obesity and Metabolic Disease. *J Clin Invest.* 2011; 121 (6): 2111 – 2117.

Maalouf K, Baydoun E, Rizk S. Kefir induces cell-cycle arrest and apoptosis in HTLV-I-negative malignant T-lymphocytes. *Cancer Manag Res.* 2011; 3: 39 – 47.

Macori G, Cotter P. Novel insights into the microbiology of fermented dairy foods. *Curr. Opin. Biotech.* 2018; 49: 172-178.

Mazloom K, Siddi1i I, Covasa M. Probiotics: How effective are they in the fight against obesity. *Nutrients.* 2019; 11 (258) 1 – 24.

Mechanick J, Zhao S, Garvey T. Leptin, An Adipokine with Central Importance in the global obesity problem. *Global Heart.* 2018; 13 (2): 113-127.

Miao J, Guo H, Chen F, Zhao L, He L, Ou Y, ve arkadaşları. Antibacterial effects of a cell-penetrating peptide isolated from kefir. *J. Agric. Food Chem..* 2016; 64 (16): 3234 – 3242.

Müller MJ, Geisler C. Defining obesity as a disease. *Eur. J. Clin. Nutr.* 2017; 71 (11): 1256-1258.

Nazif S, Kuzey Kıbrıs Türk Cumhuriyet’inde yaşayan 19 – 40 Yaş Arası Kadınların Beslenme Durumunun Saptanması ve Kalsiyum Tüketim Durumunun Değerlendirilmesi. Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2012, Ankara (Prof. Dr. Tanju Besler).

Nehus E, Mitsnefes M. Childhood Obesity and the Metabolic Syndrome. *Pediatr Clin N Am*. 2019; 66 (1): 31-43.

Nielsen B, Gürakan C. Kefir: A Multifaceted Fermented Dairy Product. *Probiotics Antimicro*. 2014; 6 (3-4): 123 – 135.

Nikbakht E, Khalesi S, Singh I, Williams L, West N, Colson N. Effect of probiotics and synbiotics on blood glucose: systematic review and metaanalysis of controlled trials. *Eur J Nutr*. 2018; 57 (1): 95 – 106.

O'Brien KV, The Effects of Post Exercise Consumption of a Kefir Beverage on Performance and Recovery During Intensive Endurance Training. Louisiana State University, The Interdepartmental Program in The School of Animal Sciences, Doktora Tezi, 2015, USA, (Dr. Charles Boeneke).

Oryan A, Alemzadeh E, Eskandari M. Kefir accelerates burn wound healing through inducing fibroblast cell migration in vitro and modulating the expression of IL- β , TGF- β 1 and bFGF genes in vivo. *Probiotics Antimicro*. 2018; 1- 13.

Ostadrahmi A, Taghizadeh A, Mobasser M, Farrin N, Payahoo L, Gheshlaghi Z, ve arkadaşları. Effect of Probiotic fermented milk (kefir) on glycemic control and lipid profile in type 2 diabetic patients: a randomized double- blind placebo-controlled clinical trial. *Iran J Public Health*. 2015; 44 (2): 228 – 237.

Otles S, Cagindi O. Kefir: a probiotic dairy- composition, nutritional and therapeutic aspects. *Pak. J. Nutr*. 2003; 2 (2): 54 – 55.

Özduran G. Yakın Doğu Üniversitesi Beslenme ve Diyetetik Bölümü Öğrencilerinin Besin Örüntüsü ile Diyet Kalite İndeksi ve uyku Kaliteleri Arasındaki İlişki. Yakın Doğu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2017, Lefkoşa (Prof. Dr. Sevinç Yücecan).

Paglia L, Listi A, Caruso S, Amodeo V, Passiglia F, Bazan V. Potential Role of ANGPTL4 in the cross talk between metabolism and cancer through PPAR signaling pathway. *PPAR Res*. 2017; 2017 (8187235): 1- 15.

Pereira S, Leite J. Low- Grade Inflammation, Obesity, and Diabetes. *Curr Obes Rep*. 2014; 3 (4): 422 – 431.

Pimenta F, Regueira M, Ton A, Campagnaro B, Toimil M, Pereira, ve arkadaşları. Mechanisms of Action of Kefir in Chronic Cardiovascular and Metabolic Diseases. *Cell Physiol and Biochem*. 2018; 48 (5): 1901 – 1914.

Plessas S, Nouska C, Mantzourani I, Kourkoustas Y, Alexopoulos A, Bezirtzoglou E. Microbiological Exploration of Different Grains. *Fermentation*. 2017; 3 (1): 1 – 10.

Pogacic T, Sinko S, Zamberlin S, Samarzija D. Microbiota of kefir grains. *Mljekarstvo*. 2013; 63 (1) 3 – 14.

Polvani S, Tarocchi M, Tempesti S, Bencini L, Galli A. Peroxisome proliferator activated receptors at the crossroad of obesity, diabetes, and pancreatic cancer. *World J Gastroenterol*. 2016; 22 (8): 2441 – 2459.

Prado M, Bandon L, Vandenberghe L, Rodrigues C, Castro G, Soccol V, Soccol C. Milk Kefir: composition, microbial cultures, biological activities, and related products. *Front. Microbiol*. 2015; 6 (1177): 1 – 10.

Rodrigues K, Caputo L, Carvalho J, Evangelista J, Schneedorf J. Antimicrobial and healing activity of kefir and kefir extract. *Int. J. Antimicrob Agents*. 2005; 25 (5): 404 – 408.

Rosa D, Dias M, Grzeskowiak L, Reis S, Conceicao L, Peluzio M. Milk Kefir: nutritional, microbiological and health benefits. *Nutr. Res. Rev*. 2017; 30 (1): 82 – 96.

Rosa D, Grzeskowiak L, Ferreira C, Fonseca A, Reis SA, Dias MM, ve arkadaşları. Kefir reduces insulin resistance and inflammatory cytokine expression in animal model of the metabolic syndrome. *Food Funct*. 2016; 7 (8): 3390-3401.

Sabry M, Dawood A, Rashed L, Sayed S, Hassan S, Yaunes S. Relation between resistin, PPAR- γ , obesity and atherosclerosis in male albino rats. *Arch Physiol Biochem*. 2019; 7:1 – 10.

Sarı EK, Bakır B, Aydın BD, Sozmen M. The effects of kefir, kousmiss, yogurt and commercial probiotic formulations on PPAR- α and PPAR- β/δ expressions in mouse kidney. *Biotech Histochem*. 2014; 89 (4): 287-295.

Satman I, Tutuncu Y, Gedik S, Dinccag N, Karsidag K, Yilmaz T, ve arkadaşları. Diabetes epidemic in Turkey: results of the second population based survey of diabetes and risk characteristics in Turkey (TURDEP-II). *Diabetologia*. 2011; 54 (1): 2498.

Satman I, Yılmaz T, Sengül A, Salman S, Salman F, Uygur S ve arkadaşları. Population-Based Study of Diabetes and Risk Characteristics in Turkey: Results of the Turkish Diabetes Epidemiology Study (TURDEP). *Diabetes Care*. 2002; 25 (9): 1551 – 1556.

Schienkiewitz A, Mensink G, Kuhnert R, Lange C. Overweight and Obesity among adults in Germany. *Journal of Health Monitoring*. 2017; 2 (2): 20 – 17.

Schmidt F, Weschenfelder J, Sander C, Minkwitz J, Thormann J, Chittka T, ve arkadaşları. Inflammatory Cytokines in General and Central Obesity and Modulating Effects of Physical Activity. *Plos One*. 2015; 10 (3): 1 – 17

Schutz D, Busetto L, Dicker D, Lambert N, Pryke R, Toplak H, ve arkadaşları. European Practical and Patient- Centred Guidelines for Adult Obesity Management in Primary Care. *Obes. Facts*. 2019; 12(1): 40- 66.

Senol A, Isler M, Sutcu R, Akin M, Cakir E, Ceyhan B, ve ark. Kefir Treatment Ameliorates Dextran Sulfate Sodium- Induced Colitis in Rats. *World J Gastroenterol*. 2015; 21 (46): 13020- 13029.

Seo MK, Park EJ, Ko SY, Choi EW, Kim S. Therapeutic effects of kefir grain Lactobacillus-derived extracellular vesicles in mice with 2,4,6- trinitrobenzene sulfonic acid induced inflammatory bowel disease. *J. Dairy Sci*. 2018; 101 (10): 8662 – 8671.

Seydim Z, Tas T, Greene A, Seydim A. Review: Functional Properties of Kefir. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr*. 2013; 51 (3): 261 – 268.

Shabana, Shahid S, Irfan U. The gut microbiota and its potential role in obesity. *Future Microbiol*. 2018; 13 (5): 589 – 603.

Stern J, Rutkowski J, Scherer P. Adiponectin, Leptin and Fatty Acids in the Maintenance of metabolic homeostasis through adipose tissue crosstalk. *Cell Metab*. 2016; 23 (5): 770- 784.

TC Sağlık Bakanlığı. Türkiye Beslenme ve Sağlık Araştırması (TBSA) 2010. Beslenme Durumu ve Alışkanlıklarının Değerlendirilmesi Sonuç Raporu. Yayın no: SB-SAG-2014/02. 2014; 931: 1-636.

Trayhurn P, Wood S. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *Br J Nutr.* 2004; 92 (3): 347 – 355.

Tung Y, Chen H, Wu H, Ho M, Chong K, Chen C. Kefir peptides prevent hyperlipidemia and obesity in high-fat-diet-induced obese rats via lipid metabolism modulation. *Mol. Nutr. Food Res.* 2018; 62 (3): 2-9.

Wang H, Eckel R. Lipoprotein lipase: from gene to obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2009; 297: 271 – 288.

Wang Y, Wang JQ. A comparison of international references for the assessment of child and adolescent overweight and obesity in different populations. *Eur J Clin Nutr.* 2002; 56 (10): 973- 982.

Wang Y, Xu N, Xi A, Ahmed Z. Effects of *Lactobacillus plantarum* MA2 isolated from Tibet kefir on lipid metabolism and intestinal microflora of rats fed on high-cholesterol diet. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2009; 84 (2): 341 – 347.

Williams SE, Greene JL. Childhood Overweight and Obesity: Affecting Factors, Education and Intervention. *J. Child. Obes.* 2018; 3 (2): 1 – 7.

WHO Multicentre Growth Reference Study Group. WHO Child Growth Standards based on length/height, weight and age. *Acta Paediatrica.* 2006; 450: 76-85.

WHO Technical Consultation. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation 2000. Report No.: 0512-3054 (Print) 0512-3054, 2000. Geneva: WHO; 2000.

Wisse B. Inflammatory Syndrome: The Role of Adipose Tissue Cytokines in Metabolic Disorders Linked to Obesity. *J Am Soc Nephrol.* 2004; 15 (11): 21792- 2800.

World Health Organization (WHO) and Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Codex Alimentarius Commission. Milk and milk products (CODEX STAN 243- 2003). 2011; vol 2 edition pp. 6 -16. Rome Italy.

World Obesity Federation Position Statement. Obesity: a chronic relapsing progressive disease process. A position statement of the World Obesity Federation. *Obes. Rev.* 2017; 18 (7): 715-723.

Wright S, Aronne L. Causes of Obesity. *Abdom Imaging*. 2012; 37: 730 – 732.

Yamane T, Sakamoto T, Nakagaki T, Nakano Y. Lactic Acid Bacteria from kefir increase cytotoxicity of natural killer cells to tumor cells. *Foods*. 2018; 7 (4): 1 – 9.

Yumuk V, Tsigos C, Fried M, Schindler K, Busettp L, Micic D, ve arkadaşları. European Guidelines for Obesity Management in Adults. *Obes. Facts*. 2015; 8 (6): 402-24.

Zubiria M, Gambaro S, Rey M, Carasi P, Serradell M, Giovambattista A. Deleterious Metabolic Effects of High Fructose Intake: The Preventive Effect of *Lactobacillus kefir* Administration. *Nutrients*. 2017; 9 (5): 470 – 487.

EKLER

TEZDEN YAPILAN YAYINLAR, POSTERLER VE SÖZEL SUNUMLAR

The role of probiotic content of kefir in the adipogenic differentiation process of 3T3-L1 cells

Sabiha Gökçen Zeybek¹, Eda Becer^{2,3}, Tamer Şanlıdağ^{3,4}, Sevinç Yücecan¹, Seda Vatansever^{3,5}

¹Department of Nutrition and Dietetics, Faculty of Health Sciences, Near East University, Nicosia, Cyprus

²Department of Biochemistry, Faculty of Pharmacy, Near East University, Nicosia, Cyprus

³Research Center of Experimental Health Sciences (DESAM), Near East University, Nicosia, Cyprus

⁴Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Near East University, Nicosia, Cyprus

⁵Department of Histology and Embryology, Faculty of Medicine, Manisa Celal Bayar University, Manisa, Turkey

Corresponding Author: Sabiha Gokcen Zeybek¹

Email Address: gokcen_zeybek@hotmail.com

Phone:+90 392 2236464 **Ext:** 3434

The role of probiotic content of kefir in the adipogenic differentiation process of 3T3-L1 cells

ABSTRACT

Objective: Kefir is traditional fermented milk that is reported to have various health benefits such as preventing obesity. The aim of this study was to investigate the effect of kefir on lipid accumulation and cell differentiation in adipocytes.

Materials and Methods: Kefir was prepared from milk and kefir powder fermentation. Then, kefir supernatant and pellet fractions were incubated for 24 h and 48 h with mature 3T3-L1 adipocytes. Cytotoxic effect of kefir on the cells was measured by MTT assay. Lipid accumulation was detected by Oil-red O staining. Anti-adipogenic activities of kefir fractions were investigated distribution of ANGPTL-4, leptin and PPAR- γ in mature 3T3-L1 adipocytes using indirect immunoperoxidase technique.

Results: In the MTT assay, 0.1 mg/dl dilutions of kefir supernatant and pellet were found to be effective on adipocytes growth and differentiation after both 24 h and 48 h incubations. Lipid accumulation was reduced by both kefir supernatant and pellet in 3T3-L1 adipocytes for 24 h. As a result of immunohistochemical staining, ANGPTL-4 immunoreactivity was significantly increased in 3T3-L1 cells after treated with kefir fractions. Additionally, leptin immunoreactivity was also decreased significantly in the mature adipocytes after treated with kefir pellet. There were no differences in expression of PPAR- γ in all groups.

Conclusion: Kefir fractions have prevented lipid accumulation by preserving the cell structure on 3T3-L1 adipocytes. The increased level of ANGPTL4 expression may be mediated inhibition of lipid accumulation. Moreover, kefir supernatant may play important role in preventing weight gain due to reduced leptin level.

Keywords: Kefir, Obesity, Leptin, ANGPTL-4, PPAR- γ

INTRODUCTION

Obesity is a chronic disease and defined as the accumulation of fat in the human body beyond the amount [1]. It is known to increase the risk factor of chronic and serious diseases, such as cardiovascular disease, diabetes mellitus type 2, hypertension, dyslipidemia and cancer [2]. Obesity is resulted from factors, including genetics and environmental factors such as gut microbiota.

The gut microbiota plays a strong role in the control of obesity through a more efficient way for better energy yield from consumed foods and by modulating dietary or the host-derived compounds [3]. Gut microbiota affects immune cells via microbial products including metabolites such as short-chain fatty acids (SCFAs) which can affect adipogenesis. Gut microbiota and obesity contributing mechanism is still unclear. However, it has been suggested that extra calories, increased lipoprotein lipase (LPL) activity, lipogenesis, increased intestinal permeability could contribute to gut microbiota related obesity [1, 4-7]. Probiotics affect these mechanisms by increasing the short fatty acids [8]. SCFAs induce satiety, decrease liver lipogenesis, increase levels of PYY, GLP-1, leptin and reduce lipid accumulation in adipose tissue. Thus, the increase in the amount of short-chain fatty acids makes a strong contribution to weight control [9].

Diet and food components are important factors in regulating the composition and the function of gut microbiota. Kefir is one of the factors that have regulatory effect on gut microbiota [10]. It is obtained from kefir grains which are rich in probiotic content. At the end of the fermentation of kefir grains, lactic acid, bioactive peptides, exopolysaccharides, antibiotic, small amounts of alcohol and various bacteriocins are produced. According to Codex Alimentarius, kefir contains 2.7% protein, 0.6% lactic acid and less than 10% fat. The total number of microorganisms is at least 10^7 CFU/mL and the number of yeasts is minimum 10^4 CFU/mL. It also has beneficial effects on lactose digestion, blood pressure, antioxidant activity, cancer prevention, cholesterol and glucose metabolism [11]. In addition of these effects, kefir is one of the potential dietary solutions to body weight control due to its probiotic properties [12].

Fasting induced adipose factor (FIAF) is known as ANGPTL-4 and it has got a protective mechanism against diet-induced obesity. ANGPTL-4 shows this protective effect of obesity by inhibiting lipoprotein lipase (LPL) [1, 7, 13]. It is secreted by liver, intestine and adipose tissue and main regulator of adipocyte. As a result of increased activity of LPL, the amount of fatty acids and fat storage increases, thus increasing the risk of developing obesity [14,15]. The probiotics increase the amount of ANGPTL-4 with positive effects on microbiota and inhibit the LPL activity and show a protective effect against obesity [13,16].

Differentiated 3T3-L1 adipocytes are widely used *in vitro* model in the study of adipogenesis. Differentiation of the cells is dependent on culture conditions including supplements, induction time and number of passage. Treatment of 3T3-L1 preadipocyte cell line with pro-differentiation agents convert cells into mature adipocytes [17]. In many *in vitro* studies related with adipogenic cells are preferred 3T3-L1 cells [18-20].

The role of probiotics in obesity and related diseases has been explained by reducing fat storage and reduces the inflammatory cytokines. However, the cellular mechanisms of kefir on adipocyte differentiation and lipid accumulation have remained unclear. The present study is to determine the effect of kefir on fat accumulation and ANGPTL4, leptin and PPAR γ expression in 3T3-L1 adipocytes.

MATERIALS AND METHODS

Sample preparation and reagents

Kefir powder was supplied by Danisco (CHOOZIT™ Kefir DGLYO 1000 I, 1284649). Kefir composition consists of lactic acid bacteria such as *Lactococcus lactis* subsp., *Leuconoctoc* sp., *Lactobacillus* sp., *Streptococcus thermophilus*, kefir grains microflora and kefir grains. Kefir powder was added into pasteurized milk (500 mL pasteurized milk, 2.5 mg kefir powder). The fermentation was performed for 16 hours at room temperature. Grains were filtered out from the fermented medium. Then kefir was centrifuged at 4500 rpm for 30 minutes at room temperature. After centrifugation, kefir supernatant and pellet fractions were separated from each other. Fractions were then freeze dried and powdered. Dried kefir fractions were diluted in phosphate-buffered saline (PBS, Frederick, MD217104, USA) and stored at 4°C until used.

Cell culture and adipocyte differentiation

3T3-L1 cells were supplied from ATCC (CL-173 Rockville, MD, USA) and cultured in preadipocyte medium (ZenBio, PM-1-L1). Culture medium was changed every two days. After the cells reached to 90-100 % confluency, they were subcultured using 0.25% trypsin-EDTA solution (Biochrom, L2143). 3T3-L1 preadipocytes were cultured with differentiation medium (ZenBio, #cat DM-2-L1) to stimulate mature adipocyte differentiation for 21 days and medium was changed every two days. The cells were fixed on culture days of 3, 7, 14 and 21. After 21 days, the 3T3-L1 differentiation medium was replaced with 3T3-L1 adipocyte maintenance medium (ZenBio, #cat AM-1-L1).

Oil Red O staining

Oil Red O staining method was used to stain lipid droplets in the 3T3-L1 cells. Stok 0.5% Oil red O (Chem-cma SC, 203749A) solution was dissolved in isopropanol (2-propariol) (Sigma Aldrich, 19516). The mixture was filtered through filter paper,

diluted with distilled water in a 3:2 dilution and stored at 4°C for 24 h. Fixed cells were incubated with Oil red O solution for 15 min at room temperature and then, they were washed with distilled water. Cells were visualized by a light microscope and photographed (Olympus BX40, Tokyo, Japan).

Cell viability

The cytotoxicity effect of kefir fractions were measured using a MTT assay (3 - (4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (Biotium, #30006). MTT is based on colorimetric measurement of reduction of 3 - (4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide which is reduced by living cells to yield purple formazan product. Stock kefir supernatant and pellet fractions were prepared in PBS and final dilution was 100 mg/ml. After then, and the solution was diluted in culture medium with five different concentrations (0.02, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5 and 1 mg/mL). 3T3-L1 adipocytes were collected, suspended in medium and seeded in 96-well culture dishes at a density of 5×10^4 cells in each well with 100 μ l medium. Negative control wells had culture medium neither contained any cells nor kefir grains, and positive control wells had only cells with culture medium without kefir grains and incubations were performed for 24 and 48 h. After incubation time, 10 μ l MTT solution was added into each well and incubated for 4 h at 37 °C in 5% CO₂, after that, 200 μ l DMSO was added into each well to dissolve the formazan salts. The absorbance was measured at 540 nm with spectrophotometer (Versa Max, Molecular Device, Sunnyvale, USA). All experiments were performed in triplicate for each extract.

Immunohistochemistry

Distributions of leptin, ANGPTL-4 and PPAR γ in 3T3-L1 adipocytes were analyzed using indirect immunoperoxidase technique. 3T3-L1 adipocytes were fixed with 4% of paraformaldehyde for 30 minutes after 24 h incubation with kefir grains and they were then washed with PBS for 2 times, each for 30 min. Cells were permeabilized with 0.1 % Triton-X-100 (Sigma Aldrich, 9002931) for 15 minutes on ice, they were washed again with PBS. For inhibiting endogenous peroxidase enzyme activity, they

were incubated with 3% of H₂O₂ (Sigma Aldrich, D30926) for 10 min at room temperature. At the end of this procedure, cells were washed again with PBS (3x3 min) and blocking serum (Histostatin- Plus Kit HRP, 859043, Thermo Fischer) was added and allowed to incubate for 1 hour at room temperature. The blocking serum was discarded after incubation time and anti-leptin (1:50) (Prointech, 17436-1-AP), anti-ANGPTL-4 (1:300) (Prointech, 18374-1-AP) and anti PPAR γ (1:50) (Prointech, 15540-1-AP) primary antibodies were added and incubated in a humid environment for overnight at 4°C. The cells were then washed 3x3 min with PBS and biotinylated secondary antibody (Histostatin- Plus Kit HRP, 859043, Thermo Fischer) were added and incubated for 30 min. At the end of this period, cells were washed again with PBS and streptavidin peroxidase complex (Histostatin- Plus Kit HRP, 859043, Thermo Fischer) was added and incubated for 30 min. After washing with PBS, immunoreactivity was observed using 3,3' diaminobenzidine (DAB) chromogen (ScyTek Laboratories, ACK125) for 5 minutes. DAB solution was then washed with distilled water and they were stained with Mayer's hematoxylin (Merck Millipore, 109249) to counterstain. They were covered with mounting medium and examined under light microscope (Olympus BX40, Tokyo, Japan). Immunocytochemical staining was evaluated by H-SCORE analysis method.

Statistical analysis

All data was described as mean $\pm$ standard deviation (SD). Statistical differences were determined using by SPSS packet programmed (SPSS-21). The differences between the groups were analyzed with Kruskal-Wallis and Mann Whitney U test. A p value of <0.05 was considered as statistically significant.

Results

Cell viability and cytotoxicity

3T3-L1 adipocytes were treated with different concentrations of (0.02, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5 and 1 mg/mL) kefir supernatant and pellet for 24 and 48 h. The cell viability was determined as described above by MTT assay. 0.2, 0.5 and 1 mg/mL concentrations of kefir supernatant and pellet resulted in a dramatic decrease of 3T3-L1 adipocytes proliferation (Figure 1 and 2). Based on results, kefir supernatant and pellet at 0.1 mg/ml for 24 h incubation were used in all subsequent experiments.

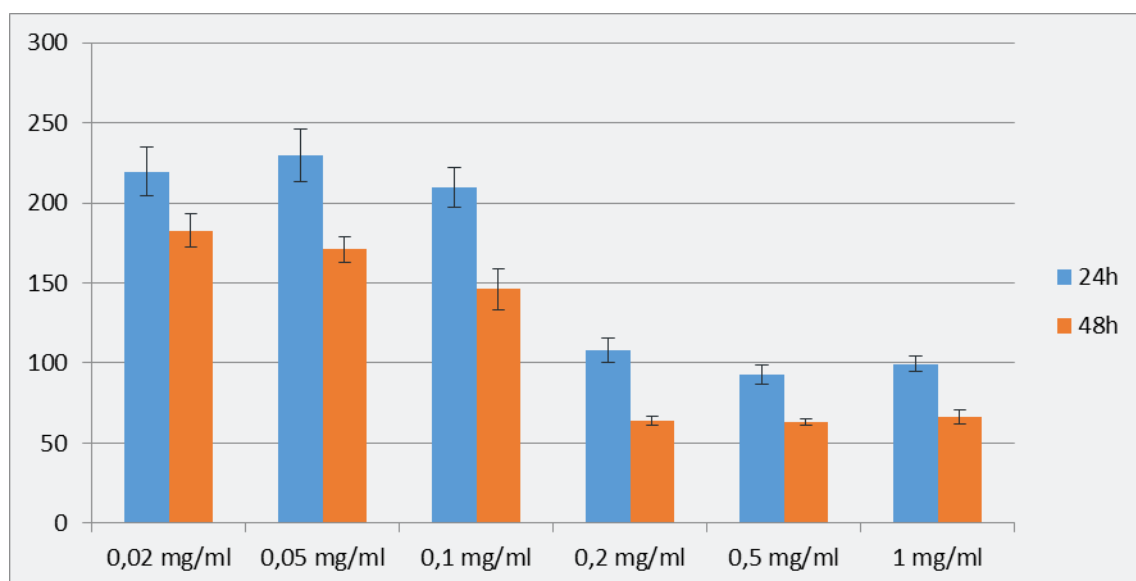


Figure 1. Effect of kefir supernatant on cell viability of 3T3-L1 adipocytes. 3T3-L1 adipocytes were treated with different concentrations of kefir supernatant for 24 or 48 h. Viability was quantitated by the MTT assay.

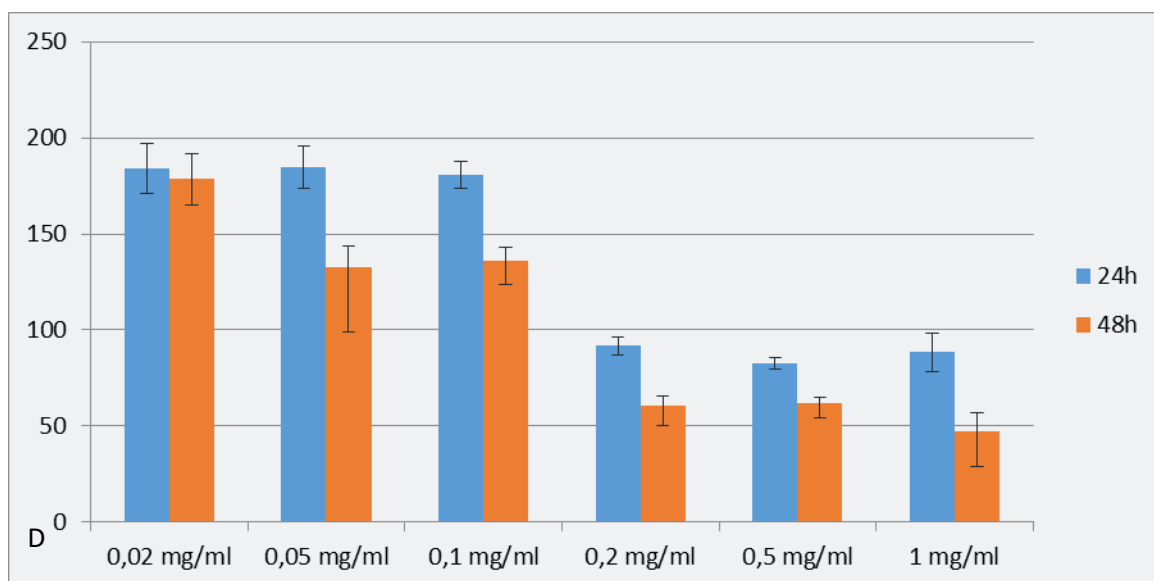
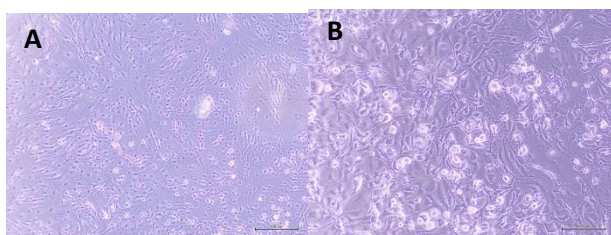


Figure 2. Effect of kefir pellet on cell viability of 3T3-L1 adipocytes. 3T3-L1 adipocytes were treated with different concentrations of kefir pellet for 24 or 48 h. Viability was quantitated by the MTT assay.

Oil red O staining

3T3-L1 preadipocyte cells differentiation protocol was applied and then the cells were fixed on days 3, 7, 14 and 21. Lipid droplets were observed on the 3rd day of 3T3-L1 cells and the accumulation of lipid was increased according to incubation time (Figure 3). On day 14 (Figure 3, G) and 21 (Figure 3, H), >95% of the cells contained lipid droplets and there was similar oil red positive lipid droplets. Therefore, the mature adipocytes evaluation in the study was used only for 14 days during culture time.



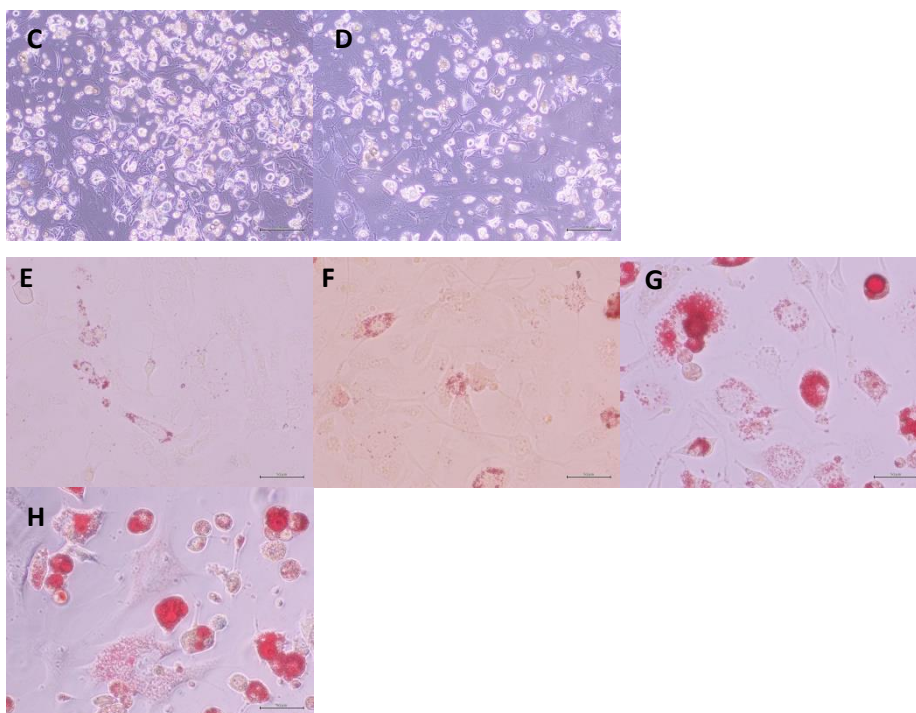


Figure 3. Lipid accumulation in 3T3-L1 adipocytes in culture (A-D) and Oil Red O staining (E-H) without kefir grains treatment. Day 3 (A, E), day 7 (B, F), day 14 (C, G), day 21 (D, H) Scale bars = 50 μ m.

3T3-L1 adipocytes were incubated with kefir supernatant and pellet (0.1 mg/ml) for 24 h. Kefir supernatant and pellet treated 3T3-L1 adipocytes showed less intracellular lipid accumulation decreased versus control cells. Especially, lipid droplets was smaller in the 3T3-L1 cells when compared to control group (Figure 4).

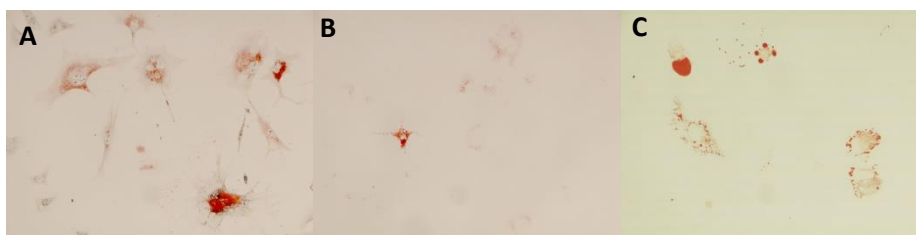


Figure 4. Oil Red O staining of 3T3-L1 adipocytes with kefir supernatant (A), pellet (B) and without kefir grains (control, C). Scale bars = 50 μ m

Immunohistochemical evaluation

The H-SCOREs of ANGPTL-4, leptin, PPAR- γ intensities in 3T3-L1 adipocytes treated with kefir supernatant and pellet for 24 h are given in Table 1. ANGPTL-4 immunoreactivity was strong in 3T3-L1 adipocytes treated with kefir supernatant and moderate in kefir pellet treated 3T3-L1 adipocytes. The immunoreactivity of ANGPTL-4 was significantly higher in 3T3-L1 adipocytes treated with both kefir supernatant and pellet compared to control group (Figure 5 A-C, Table 1). While ANGPTL-4 immunoreactivity was higher in 3T3-L1 cells after incubation with kefir supernatant than kefir pellet group, however, this increased immunoreactivity was not significant (Figure 5 A-C, Table 1).

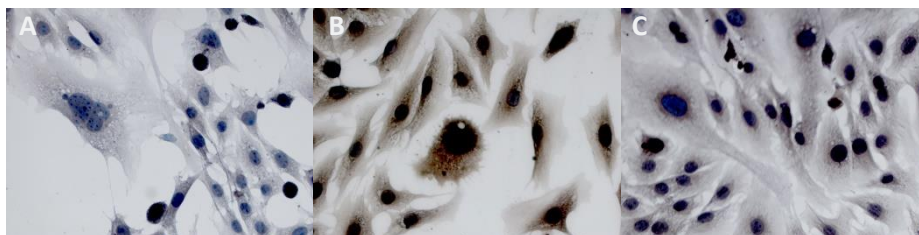


Figure 5. Immunoreactivity of ANGPTL-4 in 3T3-L1 adipocytes from control (A), kefir supernatant (B) and kefir pelet (C) groups. Scala Bars = 50 μ m

Immunolabeling of leptin was mild in both kefir supernatant (Figure 6B) and kefir pellet (Figure 6C) treated 3T3-L1 cells. Leptin expression was dramatically decreased in the kefir pellet group, this immunoreactivity was statistically significant when compared to kefir supernatant group (Table 1).

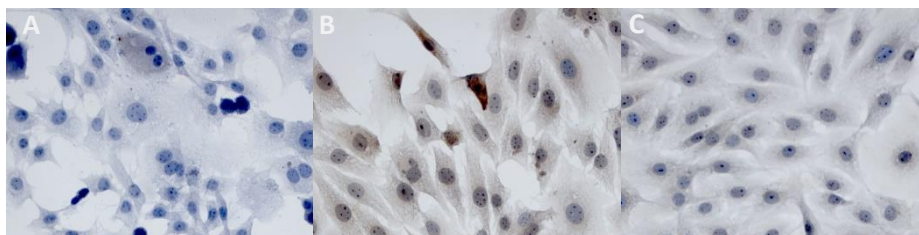


Figure 6. Immunoreactivity of leptin 3T3-L1 adipocytes from control (A), kefir supernatant (B) and kefir pelet (C) groups, Scala Bars = 50 μ m

Intensity for PPAR- γ was mild and moderate in 3T3-L1 adipocytes that treated with kefir supernatant (Figure 7B) and kefir pellet (Figure 7C), respectively. The PPAR- γ immunoreactivity was also moderate in control group (Figure 7A). Statistical analysis showed that PPAR- γ H-SCORE results were not significant when compared with control group (Table 1).

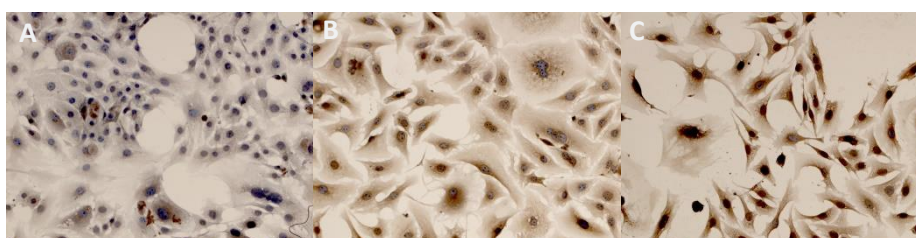


Figure 7. Immunoreactivity of PPAR- γ 3T3-L1 adipocytes from control (A), kefir supernatant (B) and kefir pellet (C) groups Scale Bars = 50 μ m

Table 1. The H-SCORE datas for ANGPTL-4, leptin and PPAR- γ in control and treated with either kefir supernatant or kefir pellet of 3T3-L1 adipocytes

	ANGPTL-4	LEPTIN	PPAR- γ
Control group	265,46 $\pm$ 25,54	211,37 $\pm$ 11,39	239,06 $\pm$ 22,68
Kefir supernatant	374,42 $\pm$ 27,47 ^a	210,63 $\pm$ 6,15	229,90 $\pm$ 16,13
Kefir pellet	317,06 $\pm$ 45,05 ^b	203,73 $\pm$ 3,83 ^c	243,13 $\pm$ 22,98

Data is expressed as means $\pm$ SD and were compared by Mann-Whitney U test.

^a The data was significant when compared with control group ($p = 0.009$).

^b The data was significant when compared with control group ($p = 0.047$).

^c The data was significant when compared with kefir supernatant treated cells group ($p = 0.014$).

Discussion

Kefir is a traditional fermented milk product with natural probiotic content. It has numerous beneficial health effects such as hypocholesterolaemic effect, anti-inflammatory effect, anti-oxidant activity, weight gain control etc. [11, 21]. Our results showed that both kefir supernatant and pellet fractions inhibited lipid accumulation in 3T3-L1 adipocytes. Also, ANGPTL-4 expression is significantly increased in 3T3-L1 mature adipocytes after treatment with both kefir supernatant and pellet fractions. In addition, leptin immunoreactivity was significantly decreased after treated with kefir pellet. PPAR- γ expression was not affected after kefir supernatant and pellet treatment.

3T3-L1 cells are preferred for better understanding of lipid metabolism and adipogenesis [18-20]. In this study, 3T3-L1 cells were used to determine the effect of different grains of kefir on adipogenesis via histochemically and immunohistochemically. Because of the differentiation of 3T3-L1 cells dependent on culture time, to obtain mature adipocyte, the time manner of the preadipocyte differentiation was firstly investigated. The mature adipocytes were analyzed with lipid accumulation after Oil Red O staining. The lipid accumulation was similar in adipocytes on day 14th and 21th day culture period, therefore, throughout the study 14 day culture time was used. Secondly, the molecular mechanism of kefir was investigated expressions of ANGPTL-4, leptin and PPAR- γ in all groups

ANGPTL-4 is a member of angiopoietins that the protein is synthesized mainly from liver, intestine and adipose tissue which is also known as fasting-induced adipose factor (FIAF) [22]. It is defined as the target gene of peroxisome proliferator- activated receptor protein- α (PPAR- α) and PPAR- γ [23,24]. It regulates lipoprotein lipase (LPL) activity [25,26], stimulates intracellular adipocyte lipolysis [27], modulate glucose and lipid metabolism [22]. Our results showed that, ANGPTL-4 immunoreactivities were significantly increased in 3T3-L1 cells after kefir treatment groups for 24 h. According to these results, kefir may provide weight control by inhibiting LPL and reducing fat accumulation in adipocytes. In addition, kefir supernatant increased ANGPTL-4

expression more than kefir pellet through probiotic content. The intestinal microbiota is improved with probiotic uptake and ANGPTL-4 expression is supported. Consequently, kefir supernatant is more effective in weight control than pellet. Both grains of kefir on ANGPTL-4 activity were first revealed by this study.

Leptin is primarily secreted from white fat tissue (WAT) [28] and controls food intake and energy expenditure [29]. It prevents weight gain by increased lipolysis [29], decreased lipogenesis [30], activating POMC neurons and inhibiting NPY/AGRP neurons [31]. In our results, there was no significant difference in kefir pellet and supernatant fractions compared to the control group. In addition, kefir supernatant has similar expression levels compared to the control group but more than the pellet. This effect is demonstrated by its probiotic content. Thus, it has an effective weight gain by maintained adipogenic cell characteristic and preventing cell differentiation after kefir incubation. However, leptin expression was significantly lower in the kefir pellet group than kefir supernatant group. Reduced leptin expression with kefir consumption has a positive effect on leptin resistance in obese individuals. Rosa et al. [12] was investigated the effect of kefir on serum leptin levels and they found that it significantly increased leptin levels. In another study, conducted on 21 volunteer individuals, changes in leptin levels of individuals consuming kefir were examined. Researchers found a significant increase in leptin levels in the group consuming kefir [32].

Ligand activating transcription factors are one of the subclasses of the nuclear hormone receptor superfamily. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) are the subfamily of this group. The PPAR subfamily has got 3 isotopes; PPAR- α , PPAR- β/δ , PPAR- γ [33]. These three forms are found in different tissues, have different ligand specificity and have different physiological roles [34]. PPAR- γ is predominantly secreted in adipose tissue [35]. It plays an important role in adipogenesis by increasing the regulation of lipids into adipose tissue, liver and muscle; modulation of adipocytokine release; improving insulin resistance [36]. Also, it is the key regulator in adipocyte differentiation and effective in lipid metabolism through endogenous and synthetic ligands [37]. Finally, it inhibits inflammation by regulating leptin and

adiponectin levels [38]. PPAR- γ plays a role in the management of obesity through these effects. In our study, PPAR- γ immunoreactivity was similar in kefir pellet treated 3T3-L1 cells when compared control group. The kefir supernatant group showed a slight decrease in PPAR- γ expression through probiotic content. According to these results, PPAR- γ expression did not change during adipogenesis with or without kefir grains. Ho et al. [39] suggested that PPAR- γ expression was significantly reduced after incubation with kefir. In another study on mice, was also PPAR- γ expression decreased with kefir treatment [40]. The PPAR- γ expression may depend on kefir contents, in our study we have used kefir grains which differ from each other therefore, PPAR- γ expression might not be effective in this study, or different expressions were not evaluated with immunohistochemically, the mRNA levels could be analyzed.

As a result, 3T3-L1 cells incubated with kefir fractions and reduction in the amount of stained lipid was detected Kefir supernatant reduced the lipid accumulation in lipid droplets. The lipid accumulation inhibitory effect was more observed in the kefir pellet group than kefir supernatant. Decreased lipid accumulation after kefir grains, may be associated with the effect of enhancing ANGPTL-4 expression. So, this increase inhibits LPL activity and prevents fat accumulation. In addition, other mechanisms during adipogenesis could be also investigated in future studies.

Conclusion

In conclusion, the effects of kefir on lipid accumulation and cell differentiation were investigated. For this purpose, accumulation of lipid was evaluated with Oil red O staining and the expressions of ANGPTL-4, leptin and PPAR- γ were examined immunohistochemically. As a result, kefir has prevented fat accumulation via inhibiting of molecular pathways of lipid accumulation. Therefore, kefir may prevent weight gain and adipogenesis, thus, this study will guide us to explain the role of kefir in obesity.

Acknowledgements

This project was supported by Near East University Research Projects (BAP ; SAG-2017-1-038).

Disclosure statement

The authors declare no conflict of interest.

References

1. Sanchez M, Panahi S, Tremblay A. Childhood Obesity: A Role for Gut Microbiota. *Int J Environ Res Public Health* 2015; 12(1):162 – 175.
2. Campbell AW. The Epidemic of Obesity. *Altern Ther Health Med* 2018; 24 (1): 8-11.
3. Tremaroli V, Bäckhed F. Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. *Nature* 2012; 489 (7415): 242-249.
4. Miele L, Giorgio V, Alberelli M, Candia E, Gasbarrini A, Grieco A. Impact of Gut Microbiota on Obesity, Diabetes and Cardiovascular Disease Risk. *Curr Cardiol Rep* 2015; 17 (12): 120.
5. Cax A, West N, Cripss A. Obesity, inflammation and the gut microbiota. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2015; 3 (3): 207- 215.
6. Marik P. Colonic flora, probiotics, obesity and diabetes. *Front Endocrinol* 2012; 3 (87): 1-6.
7. Molinaro F, Paschetta E, Cassader M, Gambino R, Musso G. Probiotics, prebiotics energy balance and obesity. *Gastroenterol Clin North Am* 2012; 41(4): 843- 854.
8. Sanders M, Benson A, Lebeer S, Merenstein D, Klaenhammer T. Shared mechanisms among probiotic taxa: implications for general probiotic claims. *Curr Opin Biotechnol* 2018; 49: 207-216.
9. Brusaferrero A, Cozzali R, Orabona C, et al. Is it time to use probiotics to prevent or treat obesity?. *Nutrients* 2018;10 (1613): 1-14.
10. Gerard P. Gut Microbiota and Obesity. *Cell Mol Life Sci* 2016; 73 (1): 147-162.
11. Rosa D, Dias M, Grzeskowiak L, Reis S, Conceicao L, Peluzio M. Milk kefir: nutritional, microbiological and health benefits. *Nutr Res Rev* 2017; 30 (1): 82-96.
12. Rosa D, Grzeskowiak L, Ferreira C, Fonseca A, Reis SA, Dias MM, et al. Kefir reduces insulin resistance and inflammatory cytokine expression in animal model of the metabolic syndrome. *Food Funct* 2016; 7 (8): 3390-3401.
13. Khan M, Gerasimidis K, Edwards C, Shaikh G. Role of gut microbiota in the aetiology of obesity proposed mechanisms and review of the literature. *J Obes* 2016; 2016 (7353642): 1-28.
14. Mazloom K, Siddiqi I, Covasa M. Probiotics: How effective are they in the fight against obesity. *Nutrients* 2019;11 (258): 1-24.
15. Boulange C, Neves A, Chiloux J, Nicholson J, Dumas M. Impact of the gut microbiota on inflammation, obesity, and metabolic disease. *Genom Med* 2016; 8 (42): 1-12.
16. Shabana S. Shahid U. The Gut Microbiota and its potential role in obesity. *Future Microbiol* 2018; 13 (5): 589 – 603.

17. Zebisch K, Voigt V, Wabitsch M, Brandsch M. Protocol for effective differentiation of 3T3-L1 cells to adipocytes. *Anal Biochem* 2012; 425 (2012): 88-90.
18. Stoecker K, Sass S, Theis F, Hauner H, Pfaaf M. Inhibition of fat cell differentiation in 3T3-L1 pre-adipocytes by all- trans retinoic acid: Integrative analysis of transcriptomic and phenotypic data. *Biomol Detect Quantif* 2017; 11 (2017): 31 – 44.
19. Paul L, Satheeshkumar N. AMPK activating and Anti adipogenic potential of *Hibiscus rosa sinensis* flower in 3T3-L1 cells. *J Ethnopharmacol* 2018; 26 (233): 123-130.
20. Huang J, Yokoyama W, Kim Y. Soy noodles processed from soy flour or tofu affects antioxidant content, lipid accumulation in 3T3-L1 cells and plasma lipids in hamsters. *J Food Process Preserv* 2019; 0 (0): 1- 8.
21. Erdogan F, Ozarslan S, Seydim Z, Tas T. The effect of kefir produced from natural kefir grains on the intestinal microbial populations and antioxidant capacities of Balb/c mice. *Food Res Int* 2019; 115 (2019): 408 – 413.
22. Paglia L, Listi A, Caruso S, Amodeo V, Passiglia F, Bazan V. Potential Role of ANGPTL4 in the cross talk between metabolism and cancer through PPAR signaling pathway. *PPAR Res* 2017; 2017 (8187235): 1- 15.
23. Kim H, Youn B, Shin M, Namkoong C, Park K, Baik J. Hypothalamic ANGPTL4/FIAF is a novel regulator of food intake and body weight. *Diabetes* 2010; 59 (11): 2772-2780.
24. Dahiya DK, Renuka M, Puniya UK, Shandilya T, Dhewa N, Kumar S, Kumar AK, Puniya P. Gut Microbiota Modulation its relationship fibers and probiotics: A review. *Front Microbiol* 2017; 8 (563): 1 – 17.
25. Morris A. ANGPTL4- the link binding obesity and glucose intolerance. *Nat Rev Endocrinol* 2018; 14 (5): 251.
26. Janssen A, Katiraei S, Bartosinska B, Eberhard D, Dijk K, Kersten S. Loss of angiopoietin-like 4 (ANGPTL4) in mice with diet-induced obesity uncouples visceral obesity from glucose intolerance partly via the gut microbiota. *Diabetologia* 2018; 61 (6): 1447-1458.
27. Koliwad S, Gray N, Wang J. Angiopoietin-like 4 (Angptl4). *Adipocyte* 2012; 1 (3): 182-187.
28. D'souza A, Neumann U, Glavas M, Kleffer T. The glucoregulatory actions of leptin. *Mol Metab* 2017; 6 (9) 1052-1065.
29. Stern J, Rutkowski J, Scherer P. Adiponectin, Leptin and Fatty Acids in the Maintenance of metabolic homeostasis through adipose tissue crosstalk. *Cell Metab* 2016; 23 (5): 770- 784.
30. Mechanick J, Zhao S, Garvey T. Leptin, An Adipokine with Central Importance in the global obesity problem. *Global Heart*. 2018; 13 (2): 113-127.
31. Friedman J. The long road to leptin. *J Clin Invest* 2016; 126 (12): 4727-4734.

32. Gezgin Y, Maranci C. Effect of fermented food consumption on biochemical parameters and adipokines levels. *Prog Nutr* 2018; 20 (4): 642- 647.
33. Han L, Shen W, Bittner S, Kraemer F, Azhar S. PPARs: regulators of metabolism and as therapeutic targets in cardiovascular disease. Part II: PPAR- β/δ and PPAR- γ . *Future Cardiol* 2017;13 (3): 279 – 296.
34. Janani C, Kumari BD. PPAR gamma gene – A review. *Diabetes Metab Syndr* 2015; 9 (2015): 46 – 50.
35. Feng S, Reuss L, Wang Y. Potential of Natural Products in the Inhibition of adipogenesis through Regulation of PPAR- γ Expression and/or Its Transcriptional Activity. *Molecules* 2016; 21 (10): 1278- 1297.
36. Hasan A, Rahman A, Kobori H. Interactions between Host PPARs and Gut Microbiota in Health and Disease. *Int J Mol Sci* 2019; 20 (2): 387- 406.
37. Sabry M, Dawood A, Rashed L, Sayed S, Hassan S, Yaunes S. Relation between resistin, PPAR- γ , obesity and atherosclerosis in male albino rats. *Arch Physiol Biochem* 2019; 7:1 – 10.
38. Polvani S, Tarocchi M, Tempesti S, Bencini L, Galli A. Peroxisome proliferator activated receptors at the crossroad of obesity, diabetes, and pancreatic cancer. *World J Gastroenterol* 2016; 22 (8): 2441 – 2459.
39. Ho J, Choi J, Lim W, Kim M, Lee I, Cho H. Kefir inhibits 3T3-L1 adipocyte differentiation through down-regulation of adipogenic transcription factor expression. *J Sci Food Agric* 2013; 93 (3): 485 – 90.
40. Choi J, Kang H, Lim W, Kim M, Lee I, Cho H. Kefir prevented excess fat accumulation in diet-induced obese mice. *Biosci. Biotechnol Biochem* 2017; 81 (5): 958-965.



13-17 November 2019 - N.Cyprus
WOCMAP VI
 6th World Congress on Medicinal and Aromatic Plants

18.06.2019

Dear Sabiha Gökçen ZEYBEK,

The Organizing Committee of the 6th World Congress on Medicinal and Aromatic Plants for Human and Animal Welfare (WOCMAP VI) congratulates you and confirms that your abstract titled **"The role of probiotic content of kefir in the adipogenic differentiation process of 3T3-L1 cells"** was peer-reviewed by the Scientific Committee and has been accepted as an **ORAL** presentation at the congress to be held in Kaya Artemis Hotel, Famagusta, N.Cyprus from 13 to 17 November 2019.

Please complete your registration and payment until July 29, 2019, otherwise, I regret to inform you that your abstract will not be published in the Book of Abstract and the special abstract issue of the journal Phytomedicine. .

If you would like additional information, please do not hesitate to contact me.

We look forward to seeing you at the congress.

Best Regards,

Prof. Dr. K. Hüsnü Can Başer
 President, WOCMAP VI



Organizing Secretariat

Address: Cinnah Cad. Gelibolu Sok. No: 3 /11
 Kavaklıdere-Ankara
 Tel: 0090 312 466 14 66
 E-mail: kongre@bilkonturizm.com.tr
 Web: www.bilkonturizm.com.tr

Congress Secretariat

Prof. Dr. Fatih Demirci
 Anadolu University,
 Faculty of Pharmacy, 26470
 Eskişehir/Turkey
 E-mail: wocmap2019@gmail.com



The role of probiotic content of kefir in the adipogenic differentiation process of 3T3-L1 cells

Sabiha Gökçen Zeybek¹, Eda Becer^{2,3}, Tamer Şanlıdağ^{3,4}, Sevinç Yücecan¹, Seda Vatansever^{3,5}

¹Department of Nutrition and Dietetics, Faculty of Health Sciences, Near East University, Nicosia, Cyprus

²Department of Biochemistry, Faculty of Pharmacy, Near East University, Nicosia, Cyprus

³Research Center of Experimental Health Sciences (DESAM), Near East University, Nicosia, Cyprus

⁴Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Near East University, Nicosia, Cyprus

⁵Department of Histology and Embryology, Faculty of Medicine, Manisa Celal Bayar University, Manisa, Turkey

Aim: Kefir is a fermented probiotic milk product. It has various health benefits such as preventing obesity. The aim of this study was to investigate the effect of kefir on lipid accumulation and cell differentiation in adipocytes.

Materials and Methods: Kefir was prepared by fermenting kefir grains with milk. Then mature 3T3-L1 cells were incubated for 24 and 48 hours with kefir supernatant and kefir pellet fractions. The MTT assay was used to measure the cytotoxic effect of kefir. Lipid accumulation in adipocytes was determined by oil red-o staining. Anti-adipogenic activities of kefir fractions were investigated by distribution of ANGPTL-4, leptin and PPAR- γ in mature 3T3-L1 adipocytes using indirect immunoperoxidase technique.

Results: The MTT assay showed that 0.1 mg/dl of kefir supernatant and kefir pellet dilutions were effective on the adipocytes growth and differentiation after both 24 h and 48 h incubations. Kefir supernatant and pellet treated 3T3-L1 adipocytes showed less intracellular lipid accumulation decreased versus control cells. The H-SCOREs of ANGPTL-4, leptin, PPAR- γ intensities in 3T3-L1 adipocytes treated with kefir

supernatant and pellet for 24 h are given in Table 1. As a result of immunohistochemical staining, ANGPTL-4 immunoreactivity was significantly increased, and leptin immunoreactivity was significantly decreased in 3T3-L1 cells. There were no differences in expression of PPAR- γ in all groups.

Conclusion: Kefir fractions inhibit lipid accumulation in adipocytes and prevents weight gain by increasing expression of ANGPTL-4 and reducing leptin expression. Therefore, this study will guide us to explain the role of kefir in obesity.

Keywords: Kefir, Obesity, Leptin, ANGPTL-4, PPAR- γ

ÖZGEÇMİŞ

Adı	Sabiha Gökçen	Soyadı	Zeybek
Doğum Yeri	Lefkoşa	Doğum Tarihi	8.11.1990
Uyruğu	KKTC	Tel	05338263682
E-mail	gokcen_zeybek@hotmail.com		

Eğitim Düzeyi	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora	Yakın Doğu Üniversitesi	2019
Yüksek Lisans	Yakın Doğu Üniversitesi	2015
Lisans	Yakın Doğu Üniversitesi	2012
Lise	20 Temmuz Fen Lisesi	2007

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (Yıl- Yıl)
Araştırma Görevlisi	Yakın Doğu Üniversitesi	2012 - ...

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama	Konuşma	Yazma
İngilizce	İyi	Zayıf	Orta

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma Becerisi
Microsoft Office (Word, Excel, Powerpoint)	Çok iyi
SPSS istatistik paket programı	İyi
GraphPad	Zayıf
BEBIS Beslenme Bilgi Sistemi	Çok iyi
WHO Anthro / Anthro Plus	Çok iyi

Yayınları/Tebliğleri/Ödülleri

1. Donduran, S. Zeybek SG. Kevser, A. Saygılı, F. Çetinkalp, Ş. Yılmaz, C. (Nisan 2012). Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Öğrencilerinin Beslenme Alışkanlıklarının Değerlendirilmesi [Poster]. VIII Uluslararası Beslenme ve Diyetetik Kongresi, Antalya.
2. Gezer, C. Zeybek, SG. Dal, S. Köksal E. (Nisan 2014). Türkiye'nin Yedi Farklı Bölgesinde Yaşayan Erkek Futbolcu Çocukların Antropometrik Ölçümlerinin Değerlendirilmesi [Poster]. IX. Uluslararası Beslenme ve Diyetetik Kongresi. Ankara.
3. Gezer, C. Dal, S. Zeybek, SG. Köksal E. (2014). Futbolcu Erkek Çocuklarda Obezite Prevalansı: İki Farklı Ülke Örneği. IX. Uluslararası Beslenme ve Diyetetik Kongresi Kongre Kitapçığı (s.172). Ankara: Bayt Bilimsel Araştırmalar Basın Yayın ve Tanıtım
4. Zeybek, SG. Hacet, F. (Kasım 2014), Kuzey Kıbrıs'taki SOS Çocuk Köyü'nde Yaşayan Çocuklarda Büyümenin ve Obezite Sıklığının Değerlendirilmesi [Poster]. VI. Ulusal Obezite Kongresi, İstanbul
5. Zeybek, SG. Ballar MA., (Kasım 2014). Diyet İzmir Beslenme Koçluğu ve Danışmanlık Merkezi'ne Başvuran Çocuklara Uygulanan Tıbbi Beslenme Tedavisinin Etkinliğinin Değerlendirilmesi ve İzlenmesi [Sözel Bildiri]. VI Ulusal Obezite Kongre Kitapçığı. İstanbul
6. Zeybek SG, Dayı T. (2017) Kuzey Kıbrıs 20 Temmuz Fen Lisesi 12. Sınıf Öğrencilerinin Beslenme Alışkanlıklarının Yeme Tutum Davranışlarının Değerlendirilmesi [Sözel Bildiri]. Uluslararası Sağlıklı Beslenme Kongresi, Gastrointestinal Hastalıklar, 5-7 Ekim 2017, İzmir
7. Zeybek SG, Dayı T, Arslan H, (2017) Kuzey Kıbrıs 23 Nisan İlkokulu Öğrencilerinde Malnurtisyon Durumunun Saptanması [Poster Bildiri]. Uluslararası Sağlıklı Beslenme Kongresi, Gastrointestinal Hastalıklar, 5-7 Ekim 2017, İzmir
8. Shaw V, Clinical Paediatric Dietetics, Chapter: Burns, Çeviren: Zeybek SG. Klinik Pediatrik Beslenme, Bölüm: Yanık. 1. Basım, Nobel Akademik Yayıncılık, İzmir, 2019 (Basımda)
9. Zeybek, SG. Ozsoy S, (2018) Assesment of Dietary Calcium Intakes of Women Living in Nicosia: Contribution of Yoghurt to Calcium Intake [Poster Bildiri]. IV Traditional Symposium on 'Traditional Foods from Adriatic to Caucasus'' 19 - 21 April 2018 Kyrenia/Nothorn Cyprus.

10. Dayı T, Zeybek SG, Hulusiğa Ö, (2018) Evaluation of Birikim Kindergarden Students Adherence to Mediterranean Diet [Poster Bildiri]. IV Traditional Symposium on ‘Traditional Foods from Adriatic to Caucasus’ 19 -21 April 2018 Kyrenia/Nothern Cyprus.
11. Ozsoy S, Zeybek SG, (2018) Determination of Healthy Eating Index and Body Mass Index for Women Aged 19 – 65 Living in TRNC. [Poster Bildiri]. IV Traditional Symposium on ‘Traditional Foods from Adriatic to Caucasus’ 19 - 21 April 2018 Kyrenia/Nothern Cyprus.

ORIGINAL ARTICLE

The role of probiotic content of kefir in the adipogenic differentiation process of 3T3-L1 cells

Sabiha Gökçen Zeybek¹, Eda Becer^{2,3}, Tamer Şanlıdağ^{3,4}, Sevinç Yücecan¹, Seda Vatansever^{3,5}

¹Department of Nutrition and Dietetics, Faculty of Health Sciences, Near East University, Nicosia, Cyprus - E-mail: gokcen_zeybek@hotmail.com; ²Department of Biochemistry, Faculty of Pharmacy, Near East University, Nicosia, Cyprus; ³Research Center of Experimental Health Sciences (DESAM), Near East University, Nicosia, Cyprus; ⁴Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Near East University, Nicosia, Cyprus; ⁵Department of Histology and Embryology, Faculty of Medicine, Manisa Celal Bayar University, Manisa, Turkey

Summary. *Objective:* Kefir is traditional fermented milk that is reported to have various health benefits such as preventing obesity. The aim of this study was to investigate the effect of kefir on lipid accumulation and cell differentiation in adipocytes. *Materials and Methods:* Kefir was prepared from milk and kefir powder fermentation. Then, kefir supernatant and pellet fractions were incubated for 24 h and 48 h with mature 3T3-L1 adipocytes. Cytotoxic effect of kefir on the cells was measured by MTT assay. Lipid accumulation was detected by Oil-red O staining. Anti-adipogenic activities of kefir fractions were investigated distribution of ANGPTL-4, leptin and PPAR- γ in mature 3T3-L1 adipocytes using indirect immunoperoxidase technique. *Results:* In the MTT assay, 0.1 mg/dl dilutions of kefir supernatant and pellet were found to be effective on adipocytes growth and differentiation after both 24 h and 48 h incubations. Lipid accumulation was reduced by both kefir supernatant and pellet in 3T3-L1 adipocytes for 24 h. As a result of immunohistochemical staining, ANGPTL-4 immunoreactivity was significantly increased in 3T3-L1 cells after treated with kefir fractions. Additionally, leptin immunoreactivity was also decreased significantly in the mature adipocytes after treated with kefir pellet. There were no differences in expression of PPAR- γ in all groups. *Conclusion:* Kefir fractions have prevented lipid accumulation by preserving the cell structure on 3T3-L1 adipocytes. The increased level of ANGPTL4 expression may be mediated inhibition of lipid accumulation. Moreover, kefir supernatant may play important role in preventing weight gain due to reduced leptin level.

Keywords: Kefir, Obesity, Leptin, ANGPTL-4, PPAR- γ

Introduction

Obesity is a chronic disease and defined as the accumulation of fat in the human body beyond the amount (1). It is known to increase the risk factor of chronic and serious diseases, such as cardiovascular disease, diabetes mellitus type 2, hypertension, dyslipidemia and cancer (2). Obesity is resulted from factors, including genetics and environmental factors such as gut microbiota.

The gut microbiota plays a strong role in the control of obesity through a more efficient way for better

energy yield from consumed foods and by modulating dietary or the host-derived compounds (3). Gut microbiota affects immune cells via microbial products including metabolites such as short-chain fatty acids (SCFAs) which can affect adipogenesis. Gut microbiota and obesity contributing mechanism is still unclear. However, it has been suggested that extra calories, increased lipoprotein lipase (LPL) activity, lipogenesis, increased intestinal permeability could contribute to gut microbiota related obesity (1, 4-7). Probiotics affect these mechanisms by increasing the short fatty acids (8). SCFAs induce satiety, decrease

liver lipogenesis, increase levels of PYY, GLP-1, leptin and reduce lipid accumulation in adipose tissue. Thus, the increase in the amount of short-chain fatty acids makes a strong contribution to weight control (9).

Diet and food components are important factors in regulating the composition and the function of gut microbiota. Kefir is one of the factors that have regulatory effect on gut microbiota (10). It is obtained from kefir grains which are rich in probiotic content. At the end of the fermentation of kefir grains, lactic acid, bioactive peptides, exopolysaccharides, antibiotic, small amounts of alcohol and various bacteriocins are produced. According to Codex Alimentarius, kefir contains 2.7% protein, 0.6% lactic acid and less than 10% fat. The total number of microorganisms is at least 10^7 CFU/mL and the number of yeasts is minimum 10^4 CFU/mL. It also has beneficial effects on lactose digestion, blood pressure, antioxidant activity, cancer prevention, cholesterol and glucose metabolism (11). In addition of these effects, kefir is one of the potential dietary solutions to body weight control due to its probiotic properties (12).

Fasting induced adipose factor (FIAF) is known as ANGPTL-4 and it has got a protective mechanism against diet-induced obesity. ANGPTL-4 shows this protective effect of obesity by inhibiting lipoprotein lipase (LPL) (1, 7, 13). It is secreted by liver, intestine and adipose tissue and main regulator of adipocyte. As a result of increased activity of LPL, the amount of fatty acids and fat storage increases, thus increasing the risk of developing obesity (14,15). The probiotics increase the amount of ANGPTL-4 with positive effects on microbiota and inhibit the LPL activity and show a protective effect against obesity (13,16).

Differentiated 3T3-L1 adipocytes are widely used *in vitro* model in the study of adipogenesis. Differentiation of the cells is dependent on culture conditions including supplements, induction time and number of passage. Treatment of 3T3-L1 preadipocyte cell line with pro-differentiation agents convert cells into mature adipocytes (17). In many *in vitro* studies related with adipogenic cells are preferred 3T3-L1 cells (18-20).

The role of probiotics in obesity and related diseases has been explained by reducing fat storage and reduces the inflammatory cytokines. However, the cellular mechanisms of kefir on adipocyte differentiation and lipid accumulation have remained unclear. The

present study is to determine the effect of kefir on fat accumulation and ANGPTL4, leptin and PPAR- γ expression in 3T3-L1 adipocytes.

Materials and Methods

Sample preparation and reagents

Kefir powder was supplied by Danisco (CHOOZ-IT™ Kefir DGLYO 1000 I, 1284649). Kefir composition consists of lactic acid bacteria such as *Lactococcus lactis* subsp., *Leuconoctoc* sp., *Lactobacillus* sp., *Streptococcus thermophilus*, kefir grains microflora and kefir grains. Kefir powder was added into pasteurized milk (500 mL pasteurized milk, 2.5 mg kefir powder). The fermentation was performed for 16 hours at room temperature. Grains were filtered out from the fermented medium. Then kefir was centrifuged at 4500 rpm for 30 minutes at room temperature. After centrifugation, kefir supernatant and pellet fractions were separated from each other. Fractions were then freeze dried and powered. Dried kefir fractions were diluted in phosphate-buffered saline (PBS, Frederick, MD217104, USA) and stored at 4°C until used.

Cell culture and adipocyte differentiation

3T3-L1 cells were supplied from ATCC (CL-173 Rockville, MD, USA) and cultured in preadipocyte medium (ZenBio, PM-1-L1). Culture medium was changed every two days. After the cells reached to 90-100 % confluency, they were subcultured using 0.25% trypsin-EDTA solution (Biochrom, L2143). 3T3-L1 preadipocytes were cultured with differentiation medium (ZenBio, #cat DM-2-L1) to stimulate mature adipocyte differentiation for 21 days and medium was changed every two days. The cells were fixed on culture days of 3, 7, 14 and 21. After 21 days, the 3T3-L1 differentiation medium was replaced with 3T3-L1 adipocyte maintenance medium (ZenBio, #cat AM-1-L1).

Oil Red O staining

Oil Red O staining method was used to stain lipid droplets in the 3T3-L1 cells. Stok 0.5% Oil red O (Chem-cma SC, 203749A) solution was dissolved in isopropanol (2-propariol) (Sigma Aldrich, 19516). The mixture was filtered through filter paper, diluted with

distilled water in a 3:2 dilution and stored at 4°C for 24 h. Fixed cells were incubated with Oil red O solution for 15 min at room temperature and then, they were washed with distilled water. Cells were visualized by a light microscope and photographed (Olympus BX40, Tokyo, Japan).

Cell viability

The cytotoxicity effect of kefir fractions were measured using a MTT assay (3 - (4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (Biotium, #30006). MTT is based on colorimetric measurement of reduction of 3 - (4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide which is reduced by living cells to yield purple formazan product. Stock kefir supernatant and pellet fractions were prepared in PBS and final dilution was 100 mg/ml. After then, the solution was diluted in culture medium with five different concentrations (0.02, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5 and 1 mg/mL). 3T3-L1 adipocytes were collected, suspended in medium and seeded in 96-well culture dishes at a density of 5×10^4 cells in each well with 100 μ l medium. Negative control wells had culture medium neither contained any cells nor kefir grains, and positive control wells had only cells with culture medium without kefir grains and incubations were performed for 24 and 48 h. After incubation time, 10 μ l MTT solution was added into each well and incubated for 4 h at 37 °C in 5% CO₂, after that, 200 μ l DMSO was added into each well to dissolve the formazan salts. The absorbance was measured at 540 nm with spectrophotometer (Versa Max, Molecular Device, Sunnyvale, USA). All experiments were performed in triplicate for each extract.

Immunohistochemistry

Distributions of leptin, ANGPTL-4 and PPAR γ in 3T3-L1 adipocytes were analyzed using indirect immunoperoxidase technique. 3T3-L1 adipocytes were fixed with 4% of paraformaldehyde for 30 minutes after 24 h incubation with kefir grains and they were then washed with PBS for 2 times, each for 30 min. Cells were permeabilized with 0.1 % Triton-X-100 (Sigma Aldrich, 9002931) for 15 minutes on ice, they were washed again with PBS. For inhibiting endogenous peroxidase enzyme activity, they were incubated with 3% of H₂O₂ (Sigma Aldrich, D30926) for 10 min at room

temperature. At the end of this procedure, cells were washed again with PBS (3x3 min) and blocking serum (Histostatin- Plus Kit HRP, 859043, Thermo Fischer) was added and allowed to incubate for 1 hour at room temperature. The blocking serum was discarded after incubation time and anti-leptin (1:50) (Prointech, 17436-1-AP), anti-ANGPTL-4 (1:300) (Prointech, 18374-1-AP) and anti PPAR γ (1:50) (Prointech, 15540-1-AP) primary antibodies were added and incubated in a humid environment for overnight at 4°C. The cells were then washed 3x3 min with PBS and biotinylated secondary antibody (Histostatin- Plus Kit HRP, 859043, Thermo Fischer) were added and incubated for 30 min. At the end of this period, cells were washed again with PBS and streptavidin peroxidase complex (Histostatin- Plus Kit HRP, 859043, Thermo Fischer) was added and incubated for 30 min. After washing with PBS, immunoreactivity was observed using 3,3' diaminobenzidine (DAB) chromogen (ScyTek Laboratories, ACK125) for 5 minutes. DAB solution was then washed with distilled water and they were stained with Mayer's hematoxylin (Merck Millipore, 109249) to counterstain. They were covered with mounting medium and examined under light microscope (Olympus BX40, Tokyo, Japan). Immunocytochemical staining was evaluated by H-SCORE analysis method.

Statistical analysis

All data was described as mean $\pm$ standard deviation (SD). Statistical differences were determined using by SPSS packet programmed (SPSS-21). The differences between the groups were analyzed with Kruskal-Wallis and Mann Whitney U test. A p value of <0.05 was considered as statistically significant.

Results

Cell viability and cytotoxicity

3T3-L1 adipocytes were treated with different concentrations of (0.02, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5 and 1 mg/mL) kefir supernatant and pellet for 24 and 48 h. The cell viability was determined as described above by MTT assay. 0.2, 0.5 and 1 mg/mL concentrations of kefir supernatant and pellet resulted in a dramatic decrease of 3T3-L1 adipocytes proliferation (Figure 1

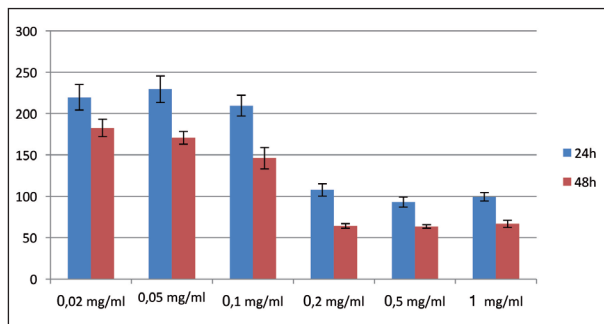


Figure 1. Effect of kefir supernatant on cell viability of 3T3-L1 adipocytes. 3T3-L1 adipocytes were treated with different concentrations of kefir supernatant for 24 or 48 h. Viability was quantitated by the MTT assay.

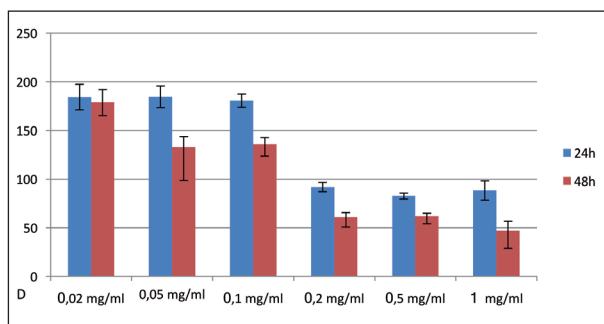


Figure 2. Effect of kefir pellet on cell viability of 3T3-L1 adipocytes. 3T3-L1 adipocytes were treated with different concentrations of kefir pellet for 24 or 48 h. Viability was quantitated by the MTT assay.

and 2). Based on results, kefir supernatant and pellet at 0.1 mg/ml for 24 h incubation were used in all subsequent experiments.

Oil red O staining

3T3-L1 preadipocyte cells differentiation protocol was applied and then the cells were fixed on days 3, 7, 14 and 21. Lipid droplets were observed on the 3rd day of 3T3-L1 cells and the accumulation of lipid was increased according to incubation time (Figure 3). On day 14 (Figure 3, G) and 21 (Figure 3, H), >95% of the cells contained lipid droplets and there was similar oil red positive lipid droplets. Therefore, the mature adipocytes evaluation in the study was used only for 14 days during culture time.

3T3-L1 adipocytes were incubated with kefir supernatant and pellet (0.1 mg/ml) for 24 h. Kefir supernatant and pellet treated 3T3-L1 adipocytes showed less intracellular lipid accumulation decreased versus control cells. Especially, lipid droplets was smaller in the 3T3-L1 cells when compared to control group (Figure 4).

Immunohistochemical evaluation

The H-SCOREs of ANGPTL-4, leptin, PPAR- γ intensities in 3T3-L1 adipocytes treated with kefir supernatant and pellet for 24 h are given in Table 1. ANGPTL-4 immunoreactivity was strong in 3T3-L1 adi-

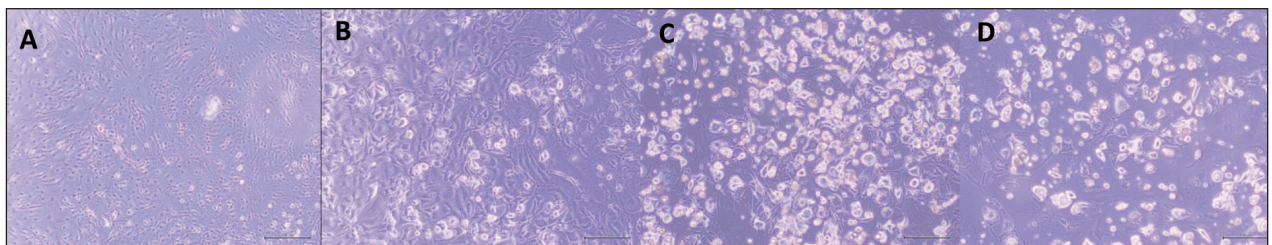


Figure 3. Lipid accumulation in 3T3-L1 adipocytes in culture (A-D) and Oil Red O staining (E-H) without kefir grains treatment. Day 3 (A, E), day 7 (B, F), day 14 (C, G), day 21 (D, H) Scale bars = 50 μ m.

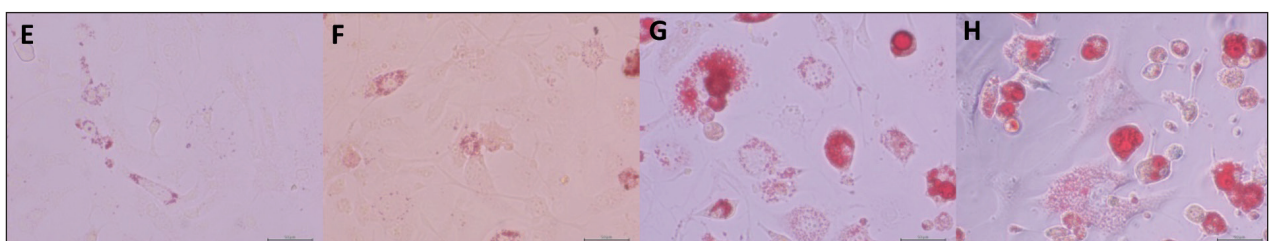


Figure 4. Oil Red O staining of 3T3-L1 adipocytes with kefir supernatant (A), pellet (B) and without kefir grains (control, C). Scale bars = 50 μ m

pocytes treated with kefir supernatant and moderate in kefir pellet treated 3T3-L1 adipocytes. The immunoreactivity of ANGPTL-4 was significantly higher in 3T3-L1 adipocytes treated with both kefir supernatant and pellet compared to control group (Figure 5 A-C, Table 1). While ANGPTL-4 immunoreactivity was higher in 3T3-L1 cells after incubation with kefir supernatant than kefir pellet group, however, this increased immunoreactivity was not significant (Figure 5 A-C, Table 1). Immunolabeling of leptin was mild in both kefir supernatant (Figure 6B) and kefir pellet (Figure 6C)

treated 3T3-L1 cells. Leptin expression was dramatically decreased in the kefir pellet group, this immunoreactivity was statistically significant when compared to kefir supernatant group (Table 1).

Intensity for PPAR- γ was mild and moderate in 3T3-L1 adipocytes that treated with kefir supernatant (Figure 7B) and kefir pellet (Figure 7C), respectively. The PPAR- γ immunoreactivity was also moderate in control group (Figure 7A). Statistical analysis showed that PPAR- γ H-SCORE results were not significant when compared with control group (Table 1).

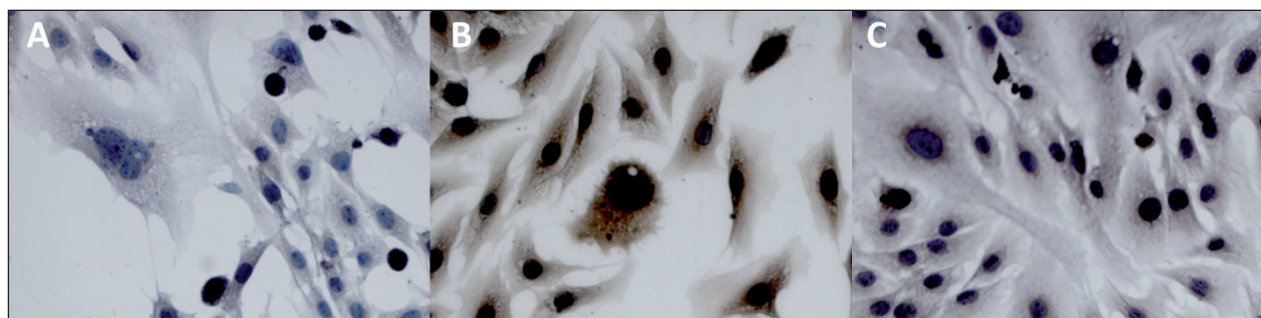


Figure 5. Immunoreactivity of ANGPTL-4 in 3T3-L1 adipocytes from control (A), kefir supernatant (B) and kefir pelet (C) groups. Scale Bars = 50 μ m

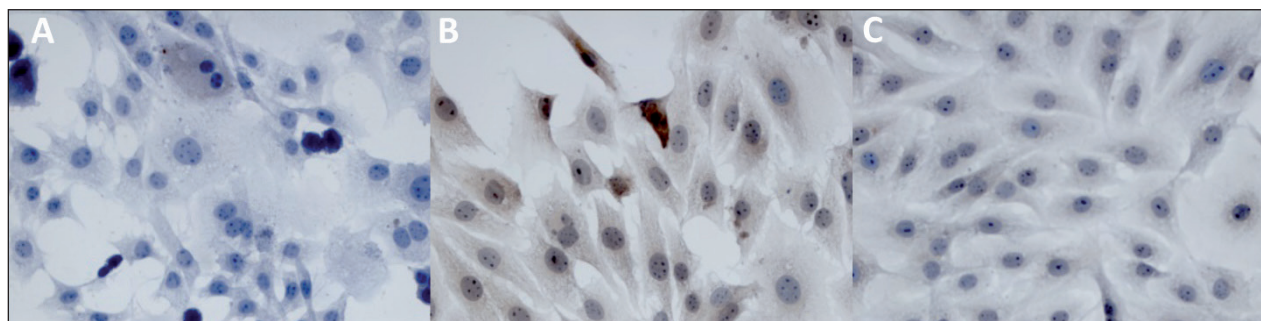


Figure 6. Immunoreactivity of leptin 3T3-L1 adipocytes from control (A), kefir supernatant (B) and kefir pelet (C) groups, Scale Bars = 50 μ m

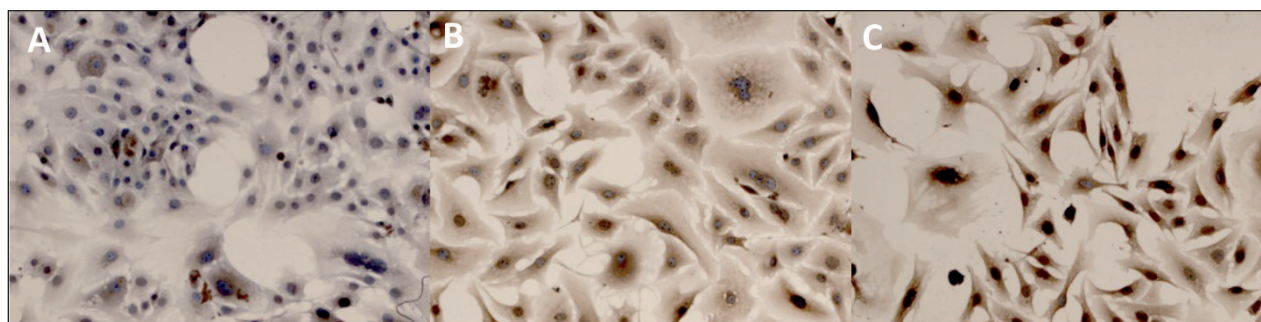


Figure 7. Immunoreactivity of PPAR- γ 3T3-L1 adipocytes from control (A), kefir supernatant (B) and kefir pelet (C) groups Scale Bars = 50 μ m

Table 1. The H-SCORE datas for ANGPTL-4, leptin and PPAR- γ in control and treated with either kefir supernatant or kefir pellet of 3T3-L1 adipocytes

	ANGPTL-4	LEPTIN	PPAR- γ
Control group	265,46 $\pm$ 25,54	211,37 $\pm$ 11,39	239,06 $\pm$ 22,68
Kefir supernatant	374,42 $\pm$ 27,47 ^a	210,63 $\pm$ 6,15	229,90 $\pm$ 16,13
Kefir pellet	317,06 $\pm$ 45,05 ^b	203,73 $\pm$ 3,83 ^c	243,13 $\pm$ 22,98

Data is expressed as means $\pm$ SD and were compared by Mann-Whitney U test.

^a The data was significant when compared with control group ($p = 0.009$).

^b The data was significant when compared with control group ($p = 0.047$).

^c The data was significant when compared with kefir supernatant treated cells group ($p = 0.014$).

Discussion

Kefir is a traditional fermented milk product with natural probiotic content. It has numerous beneficial health effects such as hypocholesterolaemic effect, anti-inflammatory effect, anti-oxidant activity, weight gain control etc. (11, 21). Our results showed that both kefir supernatant and pellet fractions inhibited lipid accumulation in 3T3-L1 adipocytes. Also, ANGPTL-4 expression is significantly increased in 3T3-L1 mature adipocytes after treatment with both kefir supernatant and pellet fractions. In addition, leptin immunoreactivity was significantly decreased after treated with kefir pellet. PPAR- γ expression was not affected after kefir supernatant and pellet treatment.

3T3-L1 cells are preferred for better understanding of lipid metabolism and adipogenesis (18-20). In this study, 3T3-L1 cells were used to determine the effect of different grains of kefir on adipogenesis via histochemically and immunohistochemically. Because of the differentiation of 3T3-L1 cells dependent on culture time, to obtain mature adipocyte, the time manner of the preadipocyte differentiation was firstly investigated. The mature adipocytes were analyzed with lipid accumulation after Oil Red O staining. The lipid accumulation was similar in adipocytes on day 14th and 21th day culture period, therefore, throughout the study 14 day culture time was used. Secondly, the molecular mechanism of kefir was investigated expressions of ANGPTL-4, leptin and PPAR- γ in all groups

ANGPTL-4 is a member of angiopoietins that the protein is synthesized mainly from liver, intestine and adipose tissue which is also known as fasting-induced adipose factor (FIAF) (22). It is defined as the target gene of peroxisome proliferator- activated receptor protein- α (PPAR- α) and PPAR- γ (23,24). It regulates lipoprotein

lipase (LPL) activity (25,26), stimulates intracellular adipocyte lipolysis (27), modulate glucose and lipid metabolism (22). Our results showed that, ANGPTL-4 immunoreactivities were significantly increased in 3T3-L1 cells after kefir treatment groups for 24 h. According to these results, kefir may provide weight control by inhibiting LPL and reducing fat accumulation in adipocytes. In addition, kefir supernatant increased ANGPTL-4 expression more than kefir pellet through probiotic content. The intestinal microbiota is improved with probiotic uptake and ANGPTL-4 expression is supported. Consequently, kefir supernatant is more effective in weight control than pellet. Both grains of kefir on ANGPTL-4 activity were first revealed by this study.

Leptin is primarily secreted from white fat tissue (WAT) (28) and controls food intake and energy expenditure (29). It prevents weight gain by increased lipolysis (29), decreased lipogenesis (30), activating POMC neurons and inhibiting NPY/AGRP neurons (31). In our results, there was no significant difference in kefir pellet and supernatant fractions compared to the control group. In addition, kefir supernatant has similar expression levels compared to the control group but more than the pellet. This effect is demonstrated by its probiotic content. Thus, it has an effective weight gain by maintained adipogenic cell characteristic and preventing cell differentiation after kefir incubation. However, leptin expression was significantly lower in the kefir pellet group than kefir supernatant group. Reduced leptin expression with kefir consumption has a positive effect on leptin resistance in obese individuals. Rosa et al. (12) was investigated the effect of kefir on serum leptin levels and they found that it significantly increased leptin levels. In another study, conducted on 21 volunteer individuals, changes in leptin levels of individuals consuming kefir were examined. Researchers

found a significant increase in leptin levels in the group consuming kefir (32).

Ligand activating transcription factors are one of the subclasses of the nuclear hormone receptor superfamily. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) are the subfamily of this group. The PPAR subfamily has got 3 isotopes; PPAR- α , PPAR- β/δ , PPAR- γ (33). These three forms are found in different tissues, have different ligand specificity and have different physiological roles (34). PPAR- γ is predominantly secreted in adipose tissue (35). It plays an important role in adipogenesis by increasing the regulation of lipids into adipose tissue, liver and muscle; modulation of adipocytokine release; improving insulin resistance (36). Also, it is the key regulator in adipocyte differentiation and effective in lipid metabolism through endogenous and synthetic ligands (37). Finally, it inhibits inflammation by regulating leptin and adiponectin levels (38). PPAR- γ plays a role in the management of obesity through these effects. In our study, PPAR- γ immunoreactivity was similar in kefir pellet treated 3T3-L1 cells when compared control group. The kefir supernatant group showed a slight decrease in PPAR- γ expression through probiotic content. According to these results, PPAR- γ expression did not change during adipogenesis with or without kefir grains. Ho et al. (39) suggested that PPAR- γ expression was significantly reduced after incubation with kefir. In another study on mice, was also PPAR- γ expression decreased with kefir treatment (40). The PPAR- γ expression may depend on kefir contents, in our study we have used kefir grains which differ from each other therefore, PPAR- γ expression might not be effective in this study, or different expressions were not evaluated with immunohistochemically, the mRNA levels could be analyzed.

As a result, 3T3-L1 cells incubated with kefir fractions and reduction in the amount of stained lipid was detected. Kefir supernatant reduced the lipid accumulation in lipid droplets. The lipid accumulation inhibitory effect was more observed in the kefir pellet group than kefir supernatant. Decreased lipid accumulation after kefir grains, may be associated with the effect of enhancing ANGPTL-4 expression. So, this increase inhibits LPL activity and prevents fat accumulation. In addition, other mechanisms during adipogenesis could be also investigated in future studies.

Conclusion

In conclusion, the effects of kefir on lipid accumulation and cell differentiation were investigated. For this purpose, accumulation of lipid was evaluated with Oil red O staining and the expressions of ANGPTL-4, leptin and PPAR- γ were examined immunohistochemically. As a result, kefir has prevented fat accumulation via inhibiting of molecular pathways of lipid accumulation. Therefore, kefir may prevent weight gain and adipogenesis, thus, this study will guide us to explain the role of kefir in obesity.

Acknowledgements

This project was supported by Near East University Research Projects (BAP; SAG- 2017-1-038).

Disclosure statement

The authors declare no conflict of interest.

References

1. Sanchez M, Panahi S, Tremblay A. Childhood Obesity: A Role for Gut Microbiota. *Int J Environ Res Public Health* 2015; 12(1):162 – 175.
2. Campbell AW. The Epidemic of Obesity. *Altern Ther Health Med* 2018; 24 (1): 8-11.
3. Tremaroli V, Bäckhed F. Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. *Nature* 2012; 489 (7415): 242-249.
4. Miele L, Giorgio V, Alberelli M, Candia E, Gasbarrini A, Grieco A. Impact of Gut Microbiota on Obesity. *Diabetes and Cardiovascular Disease Risk. Curr Cardiol Rep* 2015; 17 (12): 120.
5. Cax A, West N, Cripss A. Obesity, inflammation and the gut microbiota. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2015; 3 (3): 207- 215.
6. Marik P. Colonic flora, probiotics, obesity and diabetes. *Front Endocrinol* 2012; 3 (87): 1-6.
7. Molinaro F, Paschetta E, Cassader M, Gambino R, Musso G. Probiotics, prebiotics energy balance and obesity. *Gastroenterol Clin North Am* 2012; 41(4): 843- 854.
8. Sanders M, Benson A, Lebeer S, Merenstein D, Klaenhammer T. Shared mechanisms among probiotic taxa: implications for general probiotic claims. *Curr Opin Biotechnol* 2018; 49: 207-216.
9. Brusaferrero A, Cozzali R, Orabona C, et al. Is it time to use probiotics to prevent or treat obesity?. *Nutrients* 2018;10 (1613): 1-14.

10. Gerard P. Gut Microbiota and Obesity. *Cell Mol Life Sci* 2016; 73 (1): 147-162.
11. Rosa D, Dias M, Grzeskowiak L, Reis S, Conceicao L, Peluzio M. Milk kefir: nutritional, microbiological and health benefits. *Nutr Res Rev* 2017; 30 (1): 82-96.
12. Rosa D, Grzeskowiak L, Ferreira C, Fonseca A, Reis SA, Dias MM, et al. Kefir reduces insulin resistance and inflammatory cytokine expression in animal model of the metabolic syndrome. *Food Funct* 2016; 7 (8): 3390-3401.
13. Khan M, Gerasimidis K, Edwards C, Shaikh G. Role of gut microbiota in the aetiology of obesity proposed mechanisms and review of the literature. *J Obes* 2016; 2016 (7353642): 1-28.
14. Mazloom K, Siddiqi I, Covasa M. Probiotics: How effective are they in the fight against obesity. *Nutrients* 2019; 11 (258): 1-24.
15. Boulange C, Neves A, Chiloux J, Nicholson J, Dumas M. Impact of the gut microbiota on inflammation, obesity, and metabolic disease. *Genom Med* 2016; 8 (42): 1-12.
16. Shabana S, Shahid U. The Gut Microbiota and its potential role in obesity. *Future Microbiol* 2018; 13 (5): 589 – 603.
17. Zebisch K, Voigt V, Wabitsch M, Brandsch M. Protocol for effective differentiation of 3T3-L1 cells to adipocytes. *Anal Biochem* 2012; 425 (2012): 88-90.
18. Stoecker K, Sass S, Theis F, Hauner H, Pfaaf M. Inhibition of fat cell differentiation in 3T3-L1 pre-adipocytes by all- trans retinoic acid: Integrative analysis of transcriptomic and phenotypic data. *Biomol Detect Quantif* 2017; 11 (2017): 31 – 44.
19. Paul L, Satheeshkumar N. AMPK activating and Anti adipogenic potential of *Hisbiscus rosa sinensis* flower in 3T3-L1 cells. *J Ethnopharmacol* 2018; 26 (233): 123-130.
20. Huang J, Yokoyama W, Kim Y. Soy noodles processed from soy flour or tofu affects antioxidant content, lipid accumulation in 3T3-L1 cells and plasma lipids in hamsters. *J Food Process Preserv* 2019; 0 (0): 1- 8.
21. Erdogan F, Ozarslan S, Seydim Z, Tas T. The effect of kefir produced from natural kefir grains on the intestinal microbial populations and antioxidant capacities of Balb/c mice. *Food Res Int* 2019; 115 (2019): 408 – 413.
22. Paglia L, Listi A, Caruso S, Amodeo V, Passiglia F, Bazan V. Potential Role of ANGPTL4 in the cross talk between metabolism and cancer through PPAR signaling pathway. *PPAR Res* 2017; 2017 (8187235): 1- 15.
23. Kim H, Youn B, Shin M, Namkoong C, Park K, Baik J. Hypothalamic ANGPTL4/FIAF is a novel regulator of food intake and body weight. *Diabetes* 2010; 59 (11): 2772-2780.
24. Dahiya DK, Renuka M, Puniya UK, Shandilya T, Dhewa N, Kumar, S, Kumar AK, Puniya P. Gut Microbiota Modulation its relationship fibers and probiotics: A review. *Front Microbiol* 2017; 8 (563): 1 – 17.
25. Morris A. ANGPTL4- the link binding obesity and glucose intolerance. *Nat Rev Endocrinol* 2018; 14 (5): 251.
26. Janssen A, Katiraei S, Bartosinska B, Eberhard D, Dijk K, Kersten S. Loss of angiopoietin-like 4 (ANGPTL4) in mice with diet-induced obesity uncouples visceral obesity from glucose intolerance partly via the gut microbiota. *Diabetologia* 2018; 61 (6): 1447-1458.
27. Koliwad S, Gray N, Wang J. Angiopoietin-like 4 (Angptl4). *Adipocyte* 2012; 1 (3): 182-187.
28. D'souza A, Neumann U, Glavas M, Kleffer T. The glucoregulatory actions of leptin. *Mol Metab* 2017; 6 (9) 1052-1065.
29. Stern J, Rutkowski J, Scherer P. Adiponectin, Leptin and Fatty Acids in the Maintenance of metabolic homeostasis through adipose tissue crosstalk. *Cell Metab* 2016; 23 (5): 770- 784.
30. Mechanick J, Zhao S, Garvey T. Leptin, An Adipokine with Central Importance in the global obesity problem. *Global Heart*. 2018; 13 (2): 113-127.
31. Friedman J. The long road to leptin. *J Clin Invest* 2016; 126 (12): 4727-4734.
32. Gezginc Y, Maranci C. Effect of fermented food consumption on biochemical parameters and adipokines levels. *Prog Nutr* 2018; 20 (4): 642- 647.
33. Han L, Shen W, Bittner S, Kraemer F, Azhar S. PPARs: regulators of metabolism and as therapeutic targets in cardiovascular disease. Part II: PPAR- β/δ and PPAR- γ . *Future Cardiol* 2017; 13 (3): 279 – 296.
34. Janani C, Kumari BD. PPAR gamma gene – A review. *Diabetes Metab Syndr* 2015; 9 (2015): 46 – 50.
35. Feng S, Reuss L, Wang Y. Potential of Natural Products in the Inhibition of adipogenesis through Regulation of PPAR- γ Expression and/or Its Transcriptional Activity. *Molecules* 2016; 21 (10): 1278- 1297.
36. Hasan A, Rahman A, Kobori H. Interactions between Host PPARs and Gut Microbiota in Health and Disease. *Int J Mol Sci* 2019; 20 (2): 387- 406.
37. Sabry M, Dawood A, Rashed L, Sayed S, Hassan S, Yaunes S. Relation between resistin, PPAR- γ , obesity and atherosclerosis in male albino rats. *Arch Physiol Biochem* 2019; 7:1 – 10.
38. Polvani S, Tarocchi M, Tempesti S, Bencini L, Galli A. Peroxisome proliferator activated receptors at the crossroad of obesity, diabetes, and pancreatic cancer. *World J Gastroenterol* 2016; 22 (8): 2441 – 2459.
39. Ho J, Choi J, Lim W, Kim M, Lee I, Cho H. Kefir inhibits 3T3-L1 adipocyte differentiation through down-regulation of adipogenic transcription factor expression. *J Sci Food Agric* 2013; 93 (3): 485 – 90.
40. Choi J, Kang H, Lim W, Kim M, Lee I, Cho H. Kefir prevented excess fat accumulation in diet-induced obese mice. *Biosci. Biotechnol Biochem* 2017; 81 (5): 958-965.

Correspondence:

Sabiha Gokcen Zeybek

Department of Nutrition and Dietetics, Faculty of Health Sciences, Near East University, Nicosia, Cyprus

Phone:+90 392 2236464 Ext: 3434

E-mail: gokcen_zeybek@hotmail.com