



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KEÇİ SÜTÜNDEN ELDE EDİLEN
PROTEİN HİDROLİZATLARININ
MCF-7 MEME KANSERİ HÜCRELERİ
ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

KIYMET ÖZLEM ŞAHNA
YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. Tuğba TUNALI AKBAY

İSTANBUL - 2019

TEZ ONAYI

Kurum : Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Programın seviyesi : Yüksek Lisans
Anabilim Dalı : Biyokimya (Eczacılık)
Tez Sahibi : Kıymet Özlem Şahna
Tez Başlığı : Keçi sütünden elde edilen protein hidrolizatlarının MCF-7 meme kanseri hücreleri üzerine etkilerinin incelenmesi
Sınav Yeri : Marmara Üniversitesi Dış Hekimliği Fakültesi
Sınav Tarihi : 25.06.2019

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman (Unvan, Adı, Soyadı)

Prof. Dr. Tuğba Akbay (Danışman)

Kurumu

Marmara Üniversitesi

İmza

Sınav Jüri Üyeleri (Unvan, Adı, Soyadı)

Prof.Dr. Refiye Yanardağ

İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa

Prof.Dr. Ebru Işık Alturfan

Marmara Üniversitesi

Yukarıdaki jüri kararı Enstitü Yönetim Kurulu'nun 03.10.2019... tarih ve 50 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

F. Arıcıoğlu.

Prof. Dr. Feyza ARICIOĞLU
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

-Sınav evrakları 3 iş günü içinde ıslak imzalı tek kopya halinde Enstitüye teslim edilmelidir.

-Bu form bilgisayar ortamında doldurulacaktır.

I. BEYAN

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

Kimyager Kıymet Özlem ŞAHNA

Haziran, 2019

II. TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitim hayatımda değerli mesleki bilgileri ve tecrübeleri ile yoluma daima ışık tutmalarının yanında, bu süreçte yine çok değerli manevi katkılarıyla yanımda olan, desteklerini esirgemeyen ve birlikte çalışma fırsatı yakaladığım için kendimi şanslı saydığım çok kıymetli ve saygı değer tez danışman hocam Sayın **Prof. Dr. Tuğba Tunalı AKBAY'a** teşekkürlerimi bir borç bilirim. Ayrıca yüksek lisans eğitim sürecime çok değerli tecrübeleri ve bilgi birikimleriyle katkıda bulunan M.Ü. Dışhekimliği Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyelerinden başta sayın **Prof.Dr. Ayşen YARAT** ve **Prof. Dr. Ebru Emekli ALTURFAN'a** teşekkürlerimi sunarım. Biyokimya bilimine dair merakımı ve tutkumu aşıl原因 ve bu dersi kendilerinden alma şansı yakaladığım ve dolayısı ile bu başarıma büyük katkısı olan Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya bölümü Biyokimya Anabilim dalı öğretim üyesi Sayın **Prof. Dr. Ömer İrfan KÜFREVİOĞLU'na** teşekkürlerimi sunarım. Bu çalışmada aynı süreçleri paylaştığım, yardımlaşarak ve destekleriyle katkı sağlayan ve birçok sorumu bıkmadan sabırla yanıtlayan değerli ve saygıdeğer yüksek lisans arkadaşım **Kimyager Bilal ÇAKIR'a** teşekkürlerimi bir borç bilirim. Hem yüksek lisans hemde çalışma hayatımı ve anneliğimi birlikte yürütmeme çok büyük katkısı, emeği, özverisi olan manevi desteklerini, dualarını esirgemeyen ve herdaim yanımda bulunan ve yine yanımda olmalarını dilediğim başta kıymetli annem ve kıymetli babam **Firdevs KALKAN** ve **Mehmet KALKAN** a kardeşim **Seher Elif KALKAN'a** minnet ve teşekkürlerimi sunarım. Yüksek Lisans eğitim hayatımda ve özel hayatımda dostluğuyla desteğiyle manevi katkısıyla herdaim yanımda olan değerli arkadaşım **Yüksek Kimyager Gülşah ÇELİKDAĞ'a** minnet ve teşekkürlerimi sunarım. Bu zorlu maratonda birlikte mücadele ettiğim, anlayışı ve fedakarcılıklarıyla yaşamımı kolaylaştıran ve eğitim hayatımda beni herdaim yüreklendiren desteklerini esirgemeyen kıymetli ve saygı değer hayat arkadaşım **Abubekir Emrah ŞAHNA'ya**; ve yine bu süreçte ilk kalp atışından bu yana benimle olan ve hep olmasını dilediğim en büyük şansım, mutluluğum ve gücüm canım oğlum **Sarp Eren ŞAHNA'ya** büyük bir sevgiyle teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez, Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından SAG-C-YLP-150218-0037 numaralı proje ile desteklenmiştir.

Kıymet Özlem ŞAHNA



III. İÇİNDEKİLER

I. BEYAN	i
II. TEŞEKKÜR	ii
III. İÇİNDEKİLER.....	iv
IV. KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ	vii
V. ŞEKİLLER LİSTESİ.....	ix
VI. TABLO LİSTESİ.....	x
1. ÖZET.....	1
2. SUMMARY	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ.....	3
4. GENEL BİLGİLER	6
4.1. Kanser.....	6
4.2. Meme Kanseri	7
4.2.1. Normal Hücre Siklusu	7
4.2.2. Proto-onkogenler ve Onkogenler	8
4.2.3. Apoptoz	10
4.2.4. TP53 Geni (p53 Proteini)	11
4.3. Meme Yapısı	12
4.4. MCF-7 Meme Kanseri Hücre Hattı.....	13
4.5. Meme Kanseri Risk Faktörleri	15
4.6. Meme Kanseri Etiyopatogenezi	16
4.7. Meme Kanseri Östrojenin Etkisi	16
4.8. Meme Kanseri Sınıflandırılması	18
4.9. Süt.....	18
4.9.1. Süt Biyokimyasal Yapısı	20
4.10. Keçi Sütü	20
4.10.1. Keçi Sütü Protein İçeriği	21
4.11. Süt Proteinlerinin Biyokimyasal Özellikleri	22

4.12. Biyoaktif Peptidler	24
4.12.1. Sütte Bulunan Biyoaktif Peptidler ve İnsan Sağlığına Etkileri	26
4.12.2. Sütteki Biyoaktif Peptitlerin Fonksiyonel Özellikleri	27
4.12.3. Süt Proteinlerinin ve Peptitlerin Kansere Önleyici Rolü	28
5. GEREÇ ve YÖNTEM	31
5.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	31
5.2. Kullanılan Cihazlar.....	32
5.3. Keçi Sütü Örnekleri.....	33
5.4. Keçi Sütü Örneklerinde Nem ve Kuru Madde Tayini.....	33
5.5. Keçi Sütü Örneklerinde Kül Tayini.....	34
5.6. Keçi Sütü Örneklerinde Kjeldahl Yöntemi ile Toplam Azot ve Protein Tayini.....	35
5.7. Keçi Sütü Örneklerinde Yağ Tayini	36
5.8. Keçi Sütü Örneklerinde pH Tayini.....	37
5.9. Keçi Sütü Örneklerinin Enerji Değerinin Hesaplanması	38
5.10. Keçi Sütündeki Protein Fraksiyonunun Ayrılması.....	39
5.11. Süt Proteinlerinin Enzimatik Hidrolizi.....	39
5.12. Meme Kanseri MCF-7 Hücrelerinde Canlılık Tayini	41
5.13. Meme Kanseri MCF-7 Hücrelerinde Akış Sitometresiyle Apoptoz Tayini.....	42
5.14. Keçi Sütü Proteinlerinde Protein ve Peptid Tayini	45
5.15. Meme Kanseri MCF-7 Hücrelerinde Protein ve Peptid Tayini.....	46
5.16. İstatistiksel Analiz	47
6. BULGULAR	48
6.1. Keçi Sütü Nem, Kül, Kuru Madde, Protein, Yağ ve Enerji Analizi	48
6.2. Süt Protein Fraksiyonlarının Protein Miktar Tayini.....	48
6.3. Serum Protein Fraksiyonlarının Pepsin ile Enzimatik Muamelesi Sonrası Peptit Dizileri	49
6.4. Serum Protein Fraksiyonlarının Papain ile Enzimatik Muamelesi Sonrası Peptit Dizileri.....	49
6.5. Serum Protein Fraksiyonlarının Tripsin ile Enzimatik Muamelesi Sonrası Peptit Dizileri.....	50

6.6. Kazein Proteinini Fraksiyonlarının Pepsin ile Enzimatik Muamelesi Sonrası Peptit Dizileri	51
6.7. Kazein Proteinini Fraksiyonlarının Papain ile Enzimatik Muamelesi Sonrası Peptit Dizileri	51
6.8. Kazein Proteinini Fraksiyonlarının Tripsin ile Enzimatik Muamelesi Sonrası Peptit Dizileri	52
6.9. Kazein Proteinini ve Kazein Proteinini Peptid Fraksiyonlarının MCF-7 Meme Kanseri Hücrelerinin Canlılığı Üzerine Etkisi	53
6.10. Serum Proteinini ve Serum Proteinini Peptid Fraksiyonlarının MCF-7 Meme Kanseri Hücrelerinin Canlılığı Üzerine Etkisi	55
6.11. Keçi Sütünde Serum ve Kazein Proteinleri Peptit Fraksiyonları ile Tedavi Edilen MCF-7 Meme Kanseri Hücrelerinde Hücre Ölüm Modu Tayini	58
6.12. Keçi Sütü Serum Proteinleri ve Peptid Fraksiyonlarının MCF-7 Meme Kanseri Hücrelerine Etkisi Sonucunda Apoptotik ve Nekrotik Ölüm Sonuçlarının Çift Parametre Akış Dağılım Diyagramı	59
6.13. Keçi Sütü Kazein Proteinleri ve Peptid Fraksiyonlarının MCF-7 Meme Kanseri Hücrelerine Etkisi Sonucunda Apoptotik ve Nekrotik Ölüm Sonuçlarının Çift-Parametre Akış Dağılım Diyagramı	60
6.14. Ölü MCF-7 Meme Kanseri Hücrelerinde Protein Karakterizasyonu	61
7. TARTIŞMA VE SONUÇ	65
8. KAYNAKLAR	71
9. EKLER	84
9.1. Kongre Katılım Belgesi	84
9.2. Kongre Kitapçığı	85
9.3. Kongre Kitapçığında Yer Alan Teze Ait Poster Özeti	86
10. ÖZGEÇMİŞ	87

IV. KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

- ACE:** Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim
AIF: Apoptoz İndükleyici Faktör
Apaf-1: Apoptotik Proteaz Aktve Eden Faktör -1
APC: Adenomatosis Poliposis Koli
Bad: Bcl-2 ile İlişkili Ölüm Promotörü
Bak: Bcl-2 Homolog Antagonisti/Katili
Bax: Bcl-2 İlişkili X Proteini
Bcl-2: B Hücreli CLL / Lenfoma-2
Bid: BH3 Etkileşimli Bölge Ölüm Agonisti
Bim: Bcl-2-Benzeri Protein 11
bp: Baz Çifti
BRCA-1: Meme Kanseri-1
BRCA-2: Meme Kanseri-2
dATP: Deoksiadenozin Tri Fosfat
CDI: Siklin-Bağımlı Kinaz İnhibitörleri
CDK: Siklin-Bağımlı Serin/Treonin Protein Kinaz
CD 95: Ölüm Reseptör Proteini
HER2/neu: Reseptör Tirozin Protein Kinaz erbB-2
Cyto-c: Sitokrom C
E1: Estron
E2: 17-β-Estron
E3: Estrol
EGF: Epidermal Büyüme Faktörü
ER (+): Östrojen Reseptörü
FADD: Fas İlişkili Ölüm Domain
FAS: FS7 ile İlişkili Hücre Yüzeyi Antijeni
FGF: Fibroblast Büyüme Faktörü
G1: Hücre Bölünmesinde Hazırlık Fazı

Hep G2: Karaciğer Hepatoselüler Karsinomu
IgA: İmmünoglobulin A
IgG: İmmünoglobulin G
IgM: İmmünoglobulin M
Kbp: Kilo Baz Çifti
kDa: Kilo Dalton
MCF-7: Meme Kanseri Hücre Kültürü
MDA-MB-435: MD Anderson-Metastatik Meme-435
miRNA: Mitokondrial RNA
T-47D : Meme Kanseri Hücre Hattı
TNF- α : Tümör Nekrozis Faktör- α
TRAIL: TNF İlişkili Apoptoz İndükleyen Ligand
p21: Protein 21
p27: Protein 27
p53: Protein 53
PARP: Poli (ADP-riboz) Polimeraz
PDGF: Platelet Kaynaklı Büyüme Faktörü
PR (+): Progesteron Pozitif
PRAD-1: Paratiroid Neoplazisi Geni
Puma: p53 Yukarı Regüle Edilmiş Apoptoz
WNT7B: Wnt Ailesi Üyesi 7B
VHL: Van Hippel Lindav

V. ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Hücre siklusu	8
Şekil 2. Apoptotik yollar	10
Şekil 3. Apoptotik sinyal-cevap şeması	11
Şekil 4. Meme kesiti	12
Şekil 5. İnsan meme adeno karsinom hücre hattı (MCF-7)	14
Şekil 6. DCIS ve duktal karsinom ile ilişkili tipik yapı	18
Şekil 7. Alt misellerden oluşmuş kazein ve kazein alt/sub miseli	23
Şekil 8. MTT-formazan dönüşümü.....	41
Şekil 9. Annexin-V apoptoz analizi için akış sitometri diyagramı	45
Şekil 10. Kazein proteinleri ve kazein proteinleri peptit fraksiyonları ile tedavi edilen MCF-7 meme kanseri hücreleri 24 saatlik % canlılık değerleri	54
Şekil 11. Kazein proteinleri ve kazein proteinleri peptit fraksiyonları ile tedavi edilen MCF-7 meme kanseri hücreleri 48 saatlik % canlılık değerleri.	55
Şekil 12. Serum proteinleri ve serum proteinleri peptit fraksiyonları ile tedavi edilen MCF-7 meme kanseri hücreleri 24 saatlik % canlılık değerleri	56
Şekil 13. Serum proteinleri ve serum proteinleri peptit fraksiyonları ile tedavi edilen MCF-7 meme kanseri hücreleri 48 saatlik % canlılık değerleri.	57
Şekil 14. Serum ve kazein proteinleri ve bu proteinlerin peptit fraksiyonları ile tedavi edilen MCF-7 meme kanseri hücrelerinin apoptotik ve nekrotik ölüm sonuçları.....	58
Şekil 15. MCF-7 hücrelerinin serum proteinleri ve serum proteinlerinin peptit fraksiyonları ile muamelesi sonucu apoptotik ve nekrotik ölüm akış diyagramları	59
Şekil 16. MCF-7 hücrelerinin kazein proteinleri ve kazein proteinlerinin peptit fraksiyonları ile muamelesi sonucu apoptotik ve nekrotik ölüm akış diyagramları	60

VI. TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Kanıtlanmış antihipertansif aktiviteye sahip peptidler içeren ticari süt ürünleri	19
Tablo 2. Keçi, inek ve anne sütündeki bazı minör protein içerikleri	21
Tablo 3. Süt proteinlerinin biyolojik fonksiyonları	24
Tablo 4. Süt proteini kaynaklı biyoaktif peptitler	28
Tablo 5. Laktoferrinin ve bunun türetilmiş peptidi laktoferrisinin meme kanserine karşı hücre kültürü deneyleri ve hayvan modelleri ile gösterdiği koruyucu özellikler	29
Tablo 6. Enzim çözeltilerinin hazırlanışı	40
Tablo 7. Keçi sütünün nem, kül, kuru madde, protein, yağ ve enerji değerleri	48
Tablo 8. Kazein ve serum protein oranları	48
Tablo 9. Serum proteinlerinin pepsinle elde edilmiş peptit dizileri	49
Tablo 10. Serum proteinlerinin papainle elde edilmiş peptit dizileri	50
Tablo 11. Serum proteinlerinin tripsinle elde edilmiş peptit dizileri	50
Tablo 12. Kazein proteinlerinin pepsinle elde edilmiş peptit dizileri	51
Tablo 13. Kazein proteinlerinin papainle elde edilmiş peptit dizileri	52
Tablo 14. Kazein proteinlerinin tripsinle elde edilmiş peptit dizileri.....	53
Tablo 15. Kazein proteinleri ve kazein proteinleri peptit fraksiyonlarının MCF-7 meme kanseri hücreleri ile 24 saatlik inkübasyon sonunda canlılık Testi (MTT)	54
Tablo 16. Kazein proteinleri ve kazein proteinleri peptit fraksiyonlarının MCF-7 meme kanseri hücreleri ile 48 saatlik inkübasyon sonunda canlılık Testi (MTT)	55
Tablo 17. Serum proteinleri ve serum proteinleri peptit fraksiyonlarının MCF-7 meme kanseri hücreleri ile 24 saatlik inkübasyon sonunda canlılık Testi (MTT)	56
Tablo 18. Serum proteinleri ve serum proteinleri peptit fraksiyonlarının MCF-7 meme kanseri hücreleri ile 48 saatlik inkübasyon sonunda canlılık Testi (MTT)	57

Tablo 19. Hücre enerji metabolizmasında görevli aktivitesi artan (up-regüle olan) proteinler.....	62
Tablo 20. Hücre enerji metabolizmasında görevli aktivitesi azalan (down-regüle olan) proteinler.....	63
Tablo 21. Hücre elektron transportu ve ksenobiyotik metabolizmasında görevli olan aktivitesi artan (up-regüle olan) proteinler.....	64
Tablo 22. Hücre ksenobiyotik metabolizması ile ilişkili olan ve aktivitesi azalan (down-regüle olan) proteinler.....	64
Tablo 23. Hücre ölümünde görevli aktivitesi artan (up-regüle olan proteinler).....	64
Tablo 24. Hücre ölümünde görevli aktivitesi azalan (down-regüle olan) proteinler.....	64

1.ÖZET

Keçi Sütünden Elde Edilen Protein Hidrolizatlarının MCF-7 Meme Kanseri Hücreleri Üzerine Etkilerinin İncelenmesi

Öğrencinin adı Soyadı: Kıymet Özlem ŞAHNA

Anabilim Dalı: Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Tuğba TUNALI AKBAY

Amaç: Bu çalışmanın amacı; protein parçalandığında aktif hale geçen ve insan sağlığı üzerinde birçok yararlı etkileri olduğu bilinen biyoaktif peptitlerin MCF-7 meme kanseri hücre dizileri üzerine olan etkilerini incelemektir.

Gereç ve Yöntem: Bu çalışmada keçi sütünün yapısal özellikleri pH, karbohidrat, yağ, protein, nem, kuru madde ve kül açısından incelenmiştir. Keçi sütü kazein ve serum fraksiyonlarına ayrıldıktan sonra pepsin, papain ve tripsin enzimleri ile ayrı ayrı muamele ederek enzimatik olarak parçalanarak süt peptitleri elde edildi. Bu peptit molekülleri MCF-7 hücre dizileri ile 24 saat ve 48 saat farklı konsantrasyonlarda inkübe edildi. İnkübasyon sonrası MCF-7 hücrelerinin canlılık oranları 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazolium bromür canlılık testi yapılarak tayin edildi. Ölen MCF-7 hücrelerinden proteinler izole edildikten sonra kütle spektroskopisi sisteminde kütlelerine göre ayrılan proteinler ve peptitler tek tek karakterize edildi.

Bulgular: Keçi sütü serum protein fraksiyonunun pepsin ile muamelesinden sonra 13 adet peptit, papain ile muamelesinden sonra 5 adet peptit ve tripsin ile muamelesinden sonra 7-23 amino asit içeren, 39 adet peptit tespit edilmiştir. Kazein fraksiyonunun pepsin ile muamelesinden sonra ise 10 adet peptit; papain ile muamelesinden sonra 23 adet peptit ve tripsin ile muamelesinden sonra 21 adet peptit tespit edilmiştir. MCF-7 hücrelerinin en yüksek apoptotik ölüm oranı kazein fraksiyonunun pepsin ile muamelesinden sonra elde edilen peptidler ile olmuştur. Ölen hücrelerdeki proteinler karakterize edildiğinde hücre enerjisinin sağlanmasında yer alan proteinler ile ilişkili olan peptid dizileri tespit edilmiştir.

Sonuç: Keçi sütü proteinlerinden elde edilen peptitlerin, yeni meme kanseri önleyici ilaç gelişimi için umut verici moleküller olduğu göz önünde bulundurulmalıdır.

Anahtar Kelimeler: Meme kanseri; MCF-7; keçi sütü; biyoaktif peptit

2. SUMMARY

Investigation of the Effects of Protein Hydrolysates Obtained from Goat Milk on MCF-7 Breast Cancer Cells

Name of students: Kıymet Özlem ŞAHNA

Department: Department of Biochemistry, Faculty of Pharmacy

Supervisor: Prof. Dr. Tuğba Tunalı AKBAY

Objective: The aim of this study was to investigate the effects of bioactive peptides on MCF-7 breast cancer cell lines, which are known to have many beneficial effects on human health when the protein breaks down.

Materials and Methods: In the present study, the structural properties of goat milk were examined in terms of pH, carbohydrate, fat, protein, moisture, dry matter and ash. Goat milk was separated into casein and serum fractions and treated with pepsin, papain and trypsin enzymes. These peptide molecules were incubated with MCF-7 cell lines at different concentrations for 24 hours and 48 hours. The viability rates of MCF-7 cells after incubation were determined with 3- [4,5-dimethylthiazol-2-yl] - 2,5-diphenyl tetrazolium bromide viability assay. After isolating proteins from MCF-7 cells, proteins and peptides separated by mass in the mass spectroscopy system were individually characterized.

Results: After treatment of goat milk serum protein fraction with pepsin, 13 peptide; after papain treatment 5 peptides and after treatment with trypsin 39 peptides were detected. After treatment of the casein fraction with pepsin, 10 peptides; after treatment with papain, 23 peptides; after treatment with tripsin 23 peptides were detected. The highest apoptotic mortality of MCF-7 cells was determined with peptides which were obtained after the treatment of casein fraction with pepsin. When the proteins in the dead cells are characterized, the peptide sequences associated with the proteins involved in the delivery of the cell energy have been identified.

Conclusion: It should be noted that peptides derived from goat milk proteins are promising molecules for the development of new breast cancer-inhibiting drugs.

Keywords: Breast cancer; MCF-7; goat milk; bioactive peptide

3. GİRİŞ VE AMAÇ

Kanser, vücudumuzdaki bazı hücrelerin düzensiz olarak bölünüp kontrolsüz olarak çoğalması ile oluşan bir hastalıktır. Yüksek morbidite ve mortalite riski nedeniyle hastaların yaşamsal fonksiyonlarının yanı sıra, ruhsal fonksiyonlarını da etkileyerek yaşam kalitesini bozmaktadır (Gedikli, 2013).

İlk olarak Hipokrat tarafından (M.Ö. 460-377) ortaya atılan kanser teriminin organizmada şifa bulmayan yeni yapılanmaları anlatmak için kullanıldığı bildirilmektedir. Diğerlerinden farklı karakterde olan ve vücut yüzeyinde gelişen kırmızı renkli ve daha yavaş büyüyen şişliklere Hipokrat “Carcinos” ya da “Carcinoma” demiş, Galen (M.S. 2. yüzyıl) ise bu tip oluşumlara yengece benzeyen görünüşleri dolayısıyla “kanser” adını vermiştir. Kanser, hem dünyada hem de ülkemizde kardiyovasküler hastalıklardan sonra ikinci ölüm nedenidir. Dünya üzerinde 2000'li yılların başlarında bir yılda 6 milyon insan kansere yakalanırken bu sayının önümüzdeki yirmi yıl içerisinde 12 milyona ulaşacağı tahmin edilmektedir (Gedikli, 2013).

Hücreler canlıların en temel yapı birimidir ve enzimler, hormonlar ve diğer uyarılar altında, ihtiyaca göre düzenli bir şekilde büyür, bölünür, yaşlanır ve ölürlür. Kanserde ise çeşitli etkenlerle değişime uğramış hücrelerin düzensiz ve kontrolsüz bir şekilde sürekli olarak büyümeleri, bölünmeleri söz konusudur. Hücreler bu şekilde kontrolsüz ve değişmiş bir şekilde çoğaldıkça kan, lenf ya da vücut boşlukları yoluyla primer lokalizasyonları dışındaki yerlere sıçrayarak (metastaz) oralarda da büyümeye devam eder ve yaşamı tehdit etmeye başlarlar. Bu hastalıklı hücrelerde yapısal farklılıkların yanı sıra işlevsel farklılıklar da ortaya çıkmaktadır. Dolayısı ile bu hücreler ya normal süreçte yaptıkları fonksiyonları yapamaz duruma gelir ya da bazı yeni fonksiyonlar üstlenmektedirler. Metastaz yaparak diğer organlara kan ve lenf yoluyla taşınan bu hücreler, birbirlerine yapışmamakta, hücrelerden gelen sinyallere yanıt vermemekte ve apoptoza uğramamaktadırlar (Gedikli, 2013). Günümüzde kanser nedeni ölümlerin başında yer alan meme kanseri, kadınlar arasında

yaygın görülmekte ve akciğer kanserinden sonra kansere bağlı ölümlerde ikinci sırada yer almaktadır (Boyle ve Levin, 2008; Somunoğlu, 2009; Saip ve ark., 2011). Meme kanserleri farklı alt tiplerde ortaya çıkmaktadır, bunlar lümen veya bazal progenitör hücre popülasyonunda meydana gelen gen mutasyonlarından kaynaklandığından meme kanseri tanı ve tedavisinde zorluğa neden olmaktadır (Sims ve ark., 2007).

Hem genetik hem de histopatolojik olarak heterojen olan meme kanseri gelişiminin altında yatan mekanizmalar belirsizliğini korumakta (Hedenfalk ve ark., 2002) ve dolayısıyla tedavi amaçlı konvansiyonel kemoterapi, cerrahi veya radyasyon sınırlı etki göstermektedir. Öte yandan, kanserin oluşum nedenini inhibe etmek veya kanserin malignitesini baskılamak için korunma amaçlı spesifik doğal veya sentetik kimyasal bileşikler yaygın olarak uygulanmaya devam etmektedir (Sarkar ve Li, 2007). Kanser gelişiminin inhibisyonu için proapoptotik ve antiapoptotik genlerin zayıflatılması yöntemi ile kanser proliferasyonunu inhibe edebilen ve kanser hücrelerinde apoptozu indükleyebilen, ancak hiç yan etkisi olmayan yeni kemopreventif ajanların geliştirilmesinin önemli olduğu öngörülmektedir (Korashy ve ark., 2012). Her ne kadar cerrahi, endokrin terapötikler ve radyasyon tedavisi gibi meme kanseri için mevcut tedaviler kullanılsa da, metastaz ve edinilmiş içsel endokrin direnci, meme kanseri tedavisinde klinik zorluklar oluşturmaya devam etmektedir. Bu nedenle, meme kanserinde hücre ölümünü indükleyen yeni mekanizmalara sahip kemoterapötik ajanlara ihtiyaç vardır (Deng ve ark., 2018). Biyoaktif peptidler de son yıllarda bu açıdan önem kazanmaktadır. Proteinlerin gıda ürünlerindeki fonksiyonel özellikleri ve insan beslenmesindeki önemi bilinmektedir. Proteinlerin hidrolizi sonrasında elde edilen biyoaktif peptidlerin etkileri sahip oldukları amino asit dizinine göre değişmektedir. Proteinlerin bir veya daha fazla biyoaktif peptid içerebiliyor olması proteinlerin önemini daha da artırmaktadır. Proteinlerin besin değeri bilinmektedir, fakat bu tür biyoaktif özellikleri ilk olarak 1980'lerin başlarında Japon Bilimsel Akademisi tarafından fonksiyonel gıdalar üzerine başlatılan ulusal bir proje ile incelenmeye başlanmıştır (Dziuba ve ark., 2009; Shimizu, 2012).

Süt biyoaktif peptid bakımından zengin bir kaynaktır. Sütün biyoaktif peptidleri, sindirim sırasında gastrointestinal sistemdeki enzimler tarafından veya mikrobiyal

fermentasyon sırasında serbest hale geçmektedirler (Dziuba ve ark., 2009). Bu biyoaktif peptitlerin çeşitli hastalıkları önleyici etkisi, sağlıklı yaşam politikalarının geliştirilmesinde önemli bir role sahiptir ve ayrıca çeşitli kanser türlerini kontrol altına almak için de yeni bir yaklaşım olarak ortaya çıkarmıştır (Kontou ve ark., 2011).

Kanser tedavisi için uygun ilacın ve yöntemin bulunması, günümüzde birçok araştırma laboratuvarının öncelikli hedefleri arasında yer almaktadır. Kesin tedavisi olmayan bu hastalığa çözüm bulmak bir yana, hastalığın seyrini düzeltmek, yaşam süresini uzatmak ve hastanın hayat kalitesini iyileştirmek bile günümüzde kabul gören bir öneme sahiptir. Bu nedenle günümüzde kanser hastalığına umut ışığı olabilecek tedavilere yönelik farklı çalışmalar yapılmakta ve farklı maddelerin bu hastalık üzerindeki etkileri yoğun bir şekilde araştırılmaktadır (Gedikli, 2013).

Bu bilgiler ışığında, çalışmamızın amacı; keçi sütü proteinlerinin enzimatik hidrolizi sonucunda elde edilen biyoaktif peptidlerin, MCF-7 meme kanseri hücre dizileri üzerine olan etkilerini apoptotik ve proteomik yaklaşımlarla incelemektir.

4. GENEL BİLGİLER

4.1 Kanser

Kanser, vücudun bir bölümündeki hücrelerin kontrol dışı büyümesi ve çoğalmasıyla başlayan bir hastalıktır. Birçok farklı kanser türü olmasına rağmen hepsinin ortak noktası, anormal hücrelerin kontrolsüz bir şekilde çoğalmaya başlamasıdır. Sağlıklı hücrelerde DNA hasarı meydana geldiğinde kanser hücresinin oluşumu için zemin hazırlanmış olmaktadır, DNA hasarını onarıldığında ise kanser hücreleri oluşmamaktadır. Kanser hücreleri, anormal şekilde büyüyüp çoğalarak vücudun herhangi bir dokusunda yoğunlaşırlar ve tümör oluştururlar (Gedikli, 2013). Tümörler selim (benign, iyi huylu) veya malign (kötü huylu) olabilirler. Selim tümörler kanser değildir. Memedeki iyi huylu (kanseri olmayan) değişikliklerden biri olan fibrokistik değişim; kist (birikmiş sıvı paketleri) ve fibroz (bağ dokusuna zengin liflerden oluşmuş yara izi dokusu) oluşumu, şişkinlik, kalınlaşma, hassasiyet veya göğüs ağrısının olduğu alanlarda yerlerde kanseri olmayan bir durumdur (Sharma ve ark., 2010).

Malign tümörlerdeki hücreler kontrolsüz ve düzensiz olarak bölünürler. Malign tümörler sağlıklı dokuları sıkıştırabilirler, içine sızabilirler ya da tahrip edebilirler. Kanser hücreleri tümörden ayrılırsa, kan veya lenf dolaşımı aracılığı ile vücudun diğer bölgelerine gidebilirler. Oralarda tümör kolonileri oluşturup, büyümeye devam edebilirler. Birçok kanser türünde vücudun çeşitli yerlerinde tümör formu oluşturmakla birlikte, lösemi gibi kanserler ise tümör oluşumuna nadiren sebep olurlar (Veronesi, 2005).

Kanserin vücudun diğer bölgelerine yayılması olayına metastaz adı verilir (Veronesi, 2005). Metastaz, bütün bir organı kaplayarak onu iş göremez hale getirebilir ve ayrıca çevresindeki organ ve dokulara da zarar verebilir (Gedikli, 2013).

4.2 Meme Kanseri

Meme kanseri, kadınlarda en sık görülen kanser türlerinden biridir. Meme kanallarından kaynaklanan duktal meme kanseri, ve süt bezlerinden kaynaklanan lobüler meme kanseri en çok görülen tipleri arasında yer almaktadır (Saraçlıgil, 2015; Sharma ve ark., 2010).

Her kanser türü birbirinden farklı davranışlar sergileyebilir. Örneğin birbirinden farklı kanser türleri olan meme ve karaciğer kanserleri farklı oranlarda büyür ve farklı tedavilere cevap verirler. Bu nedenle günümüzde tanı konulan kanser türüne göre tedavi yaklaşımları uygulanmaktadır (Saraçlıgil, 2015). Nadiren memenin yağlı ve lifli bağ dokusunu içeren stromal dokudan kaynaklanabilir

(http://www.breastcancer.org/symptoms/understand_bc/what_is_bc.sp, 04.05.2019).

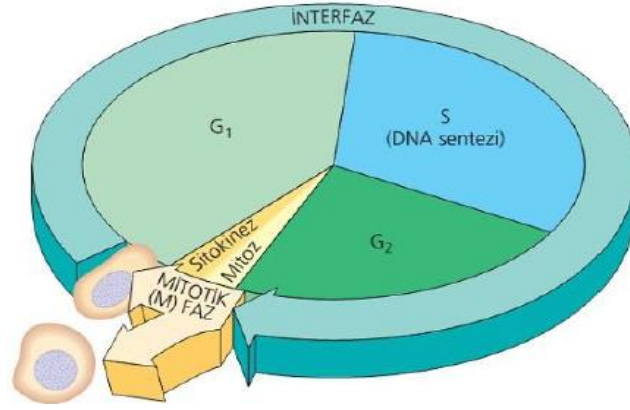
Malign meme hücreleri, kan dolaşımına girmeden önce komşu sağlıklı hücreleri ve yakındaki lenf düğümlerini istila edebilir. Meme kanserinde, akciğer ve kemik dokuları uygun metastatik bölgelerdir (Keen ve Lennan, 2011).

Meme kanseri in situ (non-invaziv) ya da invaziv (meme stromasını istila eden) olmak üzere iki tipte ortaya çıkmaktadır.

Birçok mekanizmanın sağlıklı bir hücrenin kanser hücresine dönüşümü sürecinde rol oynadığı bilinmekle birlikte bu mekanizmaların tümü henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Normal bir hücre siklusu kanser hücrelerinde bozulmaktadır (Gedikli, 2013).

4.2.1 Normal Hücre Siklusu

Hücre siklusu denilen hücrenin yaşam döngüsü genel olarak dinlenme ve bölünme dönemi olarak ikiye ayrılır (Şekil 1). Dinlenme dönemi (G0 fazı), bölünmeye göre daha uzun olan ve yaşamsal faaliyetlerin devam ettiği dönemdir; Mitoz bölünmenin gerçekleştiği M fazı ile mitoz bölünmeye hazırlığın yapıldığı G1, S ve G2 fazlarından oluşan dönem ise bölünme dönemidir (Gedikli, 2013).



Şekil 1: Hücre Siklusu (Arpacı, 2015).

Hücre siklusunun kontrolü; siklinler cyc, siklin-bağımlı serin/treonin protein kinazlar (CDK) ve siklin-bağımlı kinaz inhibitörleri (CDI) tarafından yapılmaktadır. Hücre siklusunun çeşitli aşamalarında siklinler, CDK ve CDI düzeyleri farklılık gösterir ve oldukça komplike bir düzen içinde siklusun ilerlemesini düzenlerler. Hücre siklusunun kontrol bölgelerindeki değişimler veya düzenlenmesi sırasında oluşan hatalar nedeniyle hücre bölünmesinin kontrolü sağlanamazsa bu hatalar kanser gelişimine neden olabilmektedir (Arpacı, 2015).

Siklin-E'nin ve siklin-D1 (PRAD1) 'in üretiminin meme kanserlerinde %30 oranında arttığı ve bu nedenle prognostik faktör olabilecekleri ileri sürülmüştür (Yalçın, 2013).

4.2.2 Proto-onkogenler ve Onkogenler:

Hücre siklusunun hatasız olarak devam etmesi için işlev gören proteinler (büyüme faktörleri, büyüme faktörlerinin reseptörleri, ileti çeviricileri ve transkripsiyon faktörleri), proto-onkogenler ve onkogenler tarafından sentezlenmektedir. Tümör baskılayıcı genler ve proto-onkogenler olan bu iki genel gen kategorisi kanser hücrelerinde mutasyona uğramakta ve yanlış ifadelenmektedir. Proto-onkogenler, artmış gen ekspresyonu veya mutasyonlar nedeniyle onkogene dönüşebilen normal genler olup hücre büyümesini ve bölünmesini ilerletmektedirler. Bu görevlerini, hücre bölünmesini uyaran sinyal iletim moleküllerini ya da hücre siklusu düzenleyicilerini kodlayarak veya diğer genlerin ifadelerini uyaran

transkripsiyon faktörlerini kodlayarak, yaparlar (Arpacı, 2015). Proto-onkogenler büyümenin düzenlenmesini kontrol eden proteinlerdir ve hücrelerin sinyal ileti mekanizmasında görevli birçok proteini de sentezler. Proto-onkogenlerin onkogen haline dönüşümü hücre büyümesinin kontrol mekanizmasını bozmakta, kanser hücrelerinin kontrolsüz çoğalmalarına ve büyümelerine yol açmaktadır (Arpacı, 2015).

Proto-onkogenler ise etkilerini iki farklı şekilde gerçekleştirirler. Birincil etkilerini hücre proliferasyonunu direkt baskılayarak gösterirler, bunlar hücre siklusunu kontrol altında tutan ve kapıcı (gatekeeper) adı verilen APC ve VHL gibi genlerdir. İkinci olarak bekçi (caretaker) olarak adlandırılan BRCA1, BRCA2, gibi genler hücre proliferasyonu üzerine indirekt etki gösteren genlerdir ve DNA tamirinden sorumlu olup mutasyon oluşumuna engel olarak genomun stabil kalmasında etkin rol oynarlar (Arpacı, 2015).

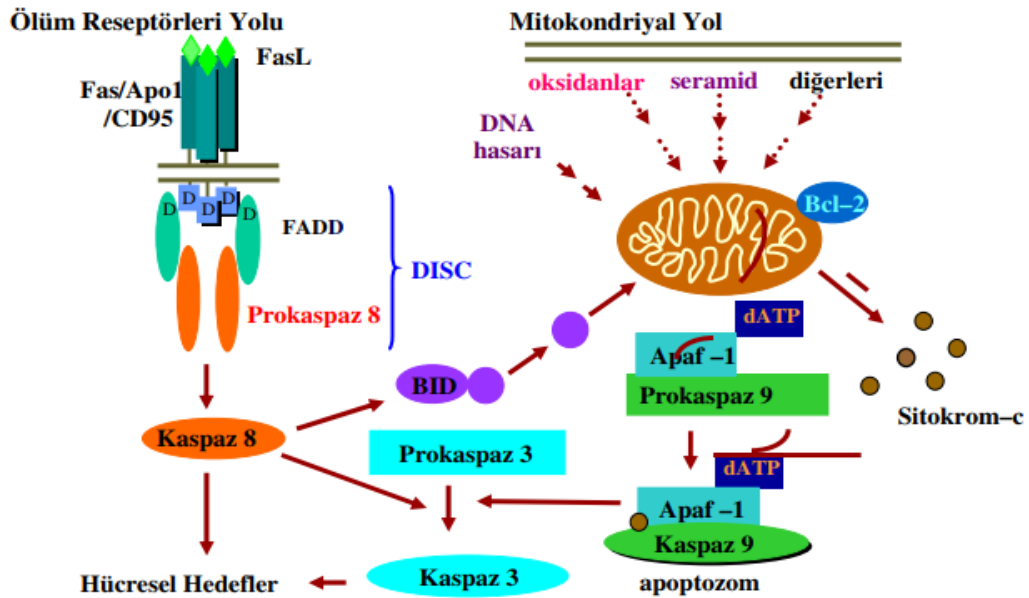
Hücrelerin çoğalması ve farklılaşması üzerinde etkili olan genler ise onkogenlerdir. Proto-onkogenler, mutasyonların işlevsel farklılıklara neden olması durumunda onkogen olarak adlandırılır ve bu durumda aşırı hücre çoğalmasına neden olurlar. Onkogenlerin baskın karakterli olması nedeniyle anne ve babadan gelen allellerden sadece bir tanesinde dahi mutasyon oluşması hücrenin aşırı çoğalmasına ve buna bağlı olarak kanser gelişmesine neden olabilmektedir. Hücrelerin bu dönüşümüne neden olarak bu süreci başlatan ve devam ettiren onkogenler hücre siklusunun normal çalışma düzenini bozarak, yeterli proliferasyon olmayan hücreleri de yok ederek apoptozu tetiklerler. (Arpacı, 2015).

Aslında proto-onkogen dediğimiz bu tümör baskılayıcı genleri onkogenlerden ayıran en önemli özellikleri çekinik karakterli hareket etmeleridir. Tümör oluşumunu engelleyen genlerin inaktif hale gelebilmesi için gerekli olan iki değişiklik yaşam içerisinde arka arkaya kazanabildiği gibi bir tanesi nesiller boyu aktararak bu kişilerde kanser predispozisyonuna ve ailesel kanser sendromlarının gözlenmesine neden olabilirler (Arpacı, 2015).

Meme için ayırıcı özellikler taşıyan ve hem sağlıklı hemde kanserli meme dokularda saptanabilen özel onkogenler; ras, myc ve HER2/neudur (Öztürk, 2006).

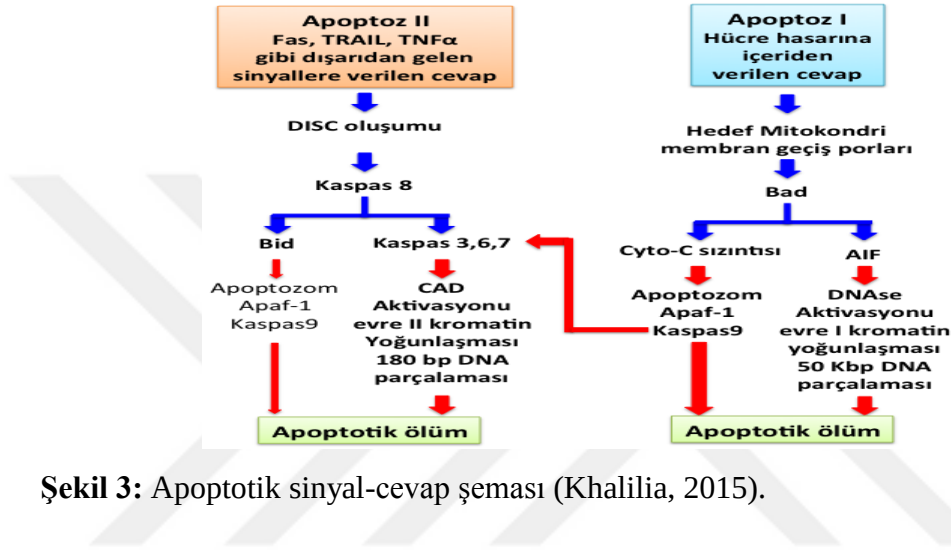
4.2.3 Apoptoz

Apoptoz diğ er bir deyişle programlı hücre ölümü; fonksiyonlarını kaybetmiş, fazla üretilmiş, yaşlanmış, düzensiz gelişmiş veya DNA'sında hasar olan hücrelerin, güvenli bir şekilde yok edilmelerini sağlayan ve genetik olarak kontrol edilen bir hücre ölüm şeklidir (Korkmaz, 2012) ve çeşitli hücre dışı lezyonlar ya da genetik faktörlerce aktive edilebilir (Altunkaynak ve  zbek, 2008). Bu hücre ölüm modu çok sayıda modülatörler tarafından düzenlenmektedir (şekil 2 ve şekil 3). Bazı moleküller (seramid), iyonlar (kalsiyum), genler (c-myc), proteinler (p53) ve organeller (mitokondri) bunlar arasında yer almaktadır. Mitokondriyal yolda programlı hücre ölüm süreci boyunca hücre içine sürekli kalsiyum girişi olur. Doku transglutaminaz aktivasyonunda, endonükleaz aktivasyonunda, gen regülasyonunda, proteazların aktivasyonunda ve hücre iskeleti organizasyonunda kalsiyum iyonları rol alabilirler (Arpacı, 2015). Eğer bir hücrede antiapoptotik proteinler fazla ise apoptoza daha az eğilimli, proapoptotik proteinler fazla ise hücre apoptoza daha fazla eğilimlidir. Proapoptotik proteinler; Bad, Bax, p53, Bid, Bcl-xs, Bak, Bim, Puma ve Noxa, antiapoptotik proteinler ise Bcl-2, Bcl-xL ve Mcl-1' dir. Hücre içi Bcl-2/Bax oranı hücrenin apoptoza gidip gitmeyeceğinin belirlenmesinde önemlidir. Eğer, Bcl-2 fazla ise apoptoz inhibe edilir, Bax fazla ise hücre apoptoza gider (Gedikli, 2013).



şekil 2: Apoptotik yollar (Yaşa, 2011).

Normal meme gelişimi, hücre proliferasyonu ve apoptoz arasındaki denge ile kontrol edilir. Tümör büyümesi; sadece hücrenin kontrolsüz olarak çoğalması değil, aynı zamanda azalmış apoptozun bir sonucudur. Çoğalma ve apoptoz arasındaki denge tümörün çoğalması veya gerilemesinin belirlenmesinde önemlidir (Reed, 1999; Tamm ve ark., 2001). Kemoterapi, radyoterapi veya hormonal tedavi apoptozu kısmi olarak indükleyerek etki gösterir (Hickman, 1992; Ellis ve ark., 1997).



Şekil 3: Apoptotik sinyal-cevap şeması (Khalilia, 2015).

4.2.4. TP53 Geni (p53 Proteini):

p53 (protein 53, TP53) geni, hücre siklusunu düzenleyen bir transkripsiyon faktörüdür. Bu gen, insan kanserleri içinde nokta mutasyonlar ile en sık değişikliğe uğrayan gendir (Arpacı, 2015).

Tüm insan tümörlerinin yarısından çoğunda mutasyona uğratılmış, silinmiş veya yeniden düzenlenmiş olan p53, kanser etiyolojisinde önemlidir. Bu gen DNA da meydana gelen hasara cevap olarak apoptoz veya hücre döngüsünün durmasına aracılık eder, bu nedenle her biri ayrı bir bağlamda çalışan, 19 - 21 genomunun bir molekülü "koruyucu" olarak işlev görür (Choudhuria ve ark., 2002).

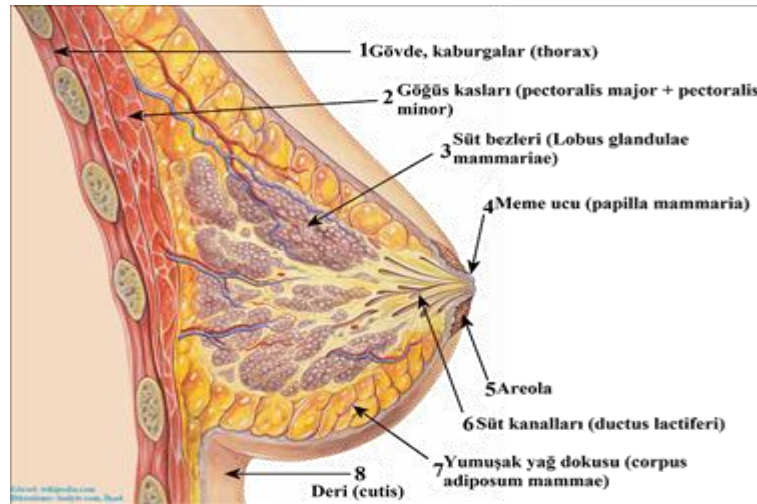
p53 tümör baskılayıcı geni, 17. kromozomun p koluna yerleşmiş (17p13.1), 53 Kd ağırlığında 393 amino asitlik bir nükleer fosfoproteini kodlar ve diğer tüm tümör baskılayıcı genler arasında en çok incelenen gendir (Gedikli, 2013).

İnsanlarda mutasyona uğrayan p53 geni yaklaşık % 50–55 oranında kanser oluşumuna neden olur. Bu gen normalde devamlı olarak sentezlenir fakat hızla parçalanır ve bu yüzden hücrelerde çok düşük bir seviyede bulunur (Arpacı, 2015).

Sağlıklı hücrelerde DNA’da meydana gelen hasar sonucunda, p53 miktarı artarak hücre çoğalmasını, siklusun bölünme kontrol noktalarından G1’de durdurup, DNA onarımı için hücreye zaman kazandırır. DNA onarımını başlatır ve tamamen gerçekleşmesini sağlar. Böylece hücreyi DNA hasarına karşı korumuş olur. DNA da oluşan hasar eğer ortadan kaldırılamıyorsa, p53 geni apoptoz genlerinden olan Bax genini uyararak hücre yine apoptoza gider. Fakat mutant p53 proteinine sahip hasarlı hücreler, G1 fazında durmazlar, onarım için yeterli zaman da olmadığından bir sonraki S fazında hata iki katına çıkar. Böylelikle önlenemez şekilde çoğalan ve hızla büyüyen kanser hücrelerinin oluşumuna neden olur. Aynı zamanda Kaspaz 3, 7, 8 ve 9 enzimlerini aktive ederek apoptozu uyarır ve kötü huylu tümör oluşumunu engeller (Arpacı, 2015).

4.3. Meme Yapısı

Meme; ergenlik, gebelik, emzirme, menopoz sonrası dönemlerde boyut, şekil ve fonksiyonunda büyük değişiklikler meydana gelen bir organdır. Kadınlarda ikinci kaburgadan altıncı kaburgaya kadar uzanır ve ön torasik duvarda bulunur (İşlen, 2017). Meme dokusuna ait kesit Şekil 4’te sunulmuştur.



Şekil 4: Meme kesiti (Küçükkaya, 2014).

Meme dokusu yapı itibari ile tam olarak stromal ve parankimal dokulardan oluşur. Stroma gerçek bir yağ dokusundan oluşur ve dallanma kanallarını oluşturan bu sırada da zamanla salgı kesecikleri oluşumuna yol açan parankim dokusunada bir ortam sağlar. İnsan gelişiminin erken embriyonik safhasında memenin bu temel yapısı oluşur. Dallanma morfogenezi olarak adlandırılan duktal sistemin ve asinusun (kesecik) gelişim süreci fetüste başlar ve erken çocukluk döneminde durur ancak ergenlik çağında hormonal uyarılmanın etkisi ile farklılaşması tetiklenir (İşlen, 2017).

Meme ucu, pigmentli areoladır her memenin ortasında bulunur ve düz kaslar içerir (İşlen, 2017). Meme bezleri süt üretmek üzere özelleşmiş, meme içerisinde bulunan yüzlerce küçük süt üreten lobülde oluşan yapılardır ve her lobülün etrafındaki kontraktıl hücreler sütün serbest bırakılmasını sağlar. Böylece kanallarda sütün memeye iletilmesini sağlar. Meme boyutu süt üretim potansiyelini göstermez çünkü memenin büyük kısmı yağ dokusundan oluşur. Yağ dokusunu ve meme bezlerini fibröz bağ dokusu ağı destekler (İşlen, 2017).

Memelilere özgü özel işlevleri olan meme bezleri; sentezleme, salgılama ve yeni doğana süt üretme gibi fonksiyonları göz önüne alındığında, gebelik ve laktasyon döngüsü sırasında bu bezin mikro ve makro anatomisinde şiddetli değişikliğe neden olan hücresel seviyedeki hormonal etkiler meme dokusunun olgun gelişimsel bir duruma erişmesine neden olur (İşlen, 2017).

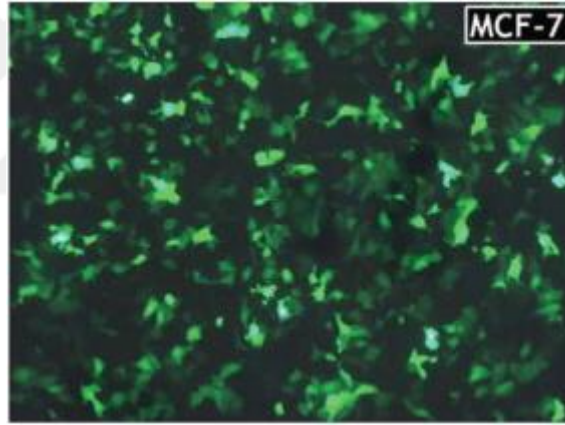
4.4. MCF-7 Meme Kanseri Hücre Hattı

MCF-7; östrojen, progesteron ve glukokortikoid reseptörlerine sahip olan insan meme kanseri hücre hattıdır. MCF-7 hücre hattı ilk olarak, 1970 yılında 69 yaşındaki Kafkas bir kadın hastanın metastatik meme kanseri hücrelerinin plevral efüzyonundan elde edilmiştir. MCF-7; Michigan Kanseri Vakfı – 7' nin kısaltmasıdır (Nieves-Neira ve Pommier, 1999).

MCF- 7 hücre hattı olmadığı zamanlarda, kanser araştırmalarında bir kaç aydan daha uzun yaşayabilen bir meme hücre hattı elde etmek mümkün değildi. Bu hücre hattı epitelyal hücreler olup, insülin benzeri büyüme faktörüne bağlanan proteinler

sentezleyebilmektedirler. WNT7B onkogeninin ekspresyonunu da yapabilmektedirler (Nieves-Neira ve Pommier, 1999).

MCF-7 hücre hattında kaspaz 6, 7 ve 9 ekspresyonunun yanısıra Bcl-2 ekspresyonu da olmaktadır. Diğer yandan p53 ve p21 genlerinin ekspresyonu ve düzenlenmesi normaldir (Nieves-Neira ve Pommier 1999). Hücre siklusunun kontrol noktalarından siklin D1'deki mutasyonlar MCF-7 hücrelerinde de mevcuttur (Nagasawa ve ark 1998). MCF-7 hücreleri, in vitro meme çalışmaları için kullanışlı bir hücre hattıdır, çünkü hücre sitoplazmasındaki östrojen reseptörleri yoluyla bazı ideal özellikleri muhafaza etmektedirler. Eşsiz özellikleri deneysel terapötikler için kullanışlıdır. Ayrıca sitokeratine karşı hassastırlar. İn vitro olarak büyüdüğünde, hücreler kubbeler oluşturabilir ve epitelyal hücreler tek tabakalarda büyür (<https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/mcf-7>, 02.05.2019). Şekil 5'te MCF-7 hücrelerinin görünümünü göstermektedir.



Şekil 5: İnsan meme adeno karsinom hücre hattı (MCF-7) (<https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/mcf-7>, 02.05.2019).

MCF-7, *invitro* meme kanseri araştırmalarında yaygın olarak kullanılan bir hücre hattıdır. Çeşitli antikanser ilaçlar ile ilgili olanlar da dahil olmak üzere, dünya çapında meme kanseri araştırmalarında kullanılmaya devam etmektedir. Çoğunlukla kullanılan MCF 7 hücre hattı; östrojen reseptörü (ER)-pozitif ve progesteron reseptörü (PR)-pozitif olup, lümen A moleküler alt tipinde olan hücre hattıdır. Düşük metastatik potansiyele sahiptir, zayıf agresif ve istilacı olmayan bir hücre hattıdır (Comşa ve Cimpean, 2015).

MCF-7 meme kanseri hücreleri östrojen hormonlarından biri olan 17- β -östrodiol'e (E2) duyarlı hücreleridir ve çoğalması için E2'ye bağlıdır. Yüksek düzeyde ER α (Östrojen Reseptör- α) transkriptleri içerir, ancak ER β (Östrojen Reseptör- β) düşük düzeydedir. MCF-7 hücreleri östrojen yokluğunda ER miktarını arttırır. Kısa süreli östrojen yoksunluğu, MCF-7 hücrelerinin uzun süreli (altı aydan fazla) östrojen yoksunluğuna kıyasla farklı tepkilere neden olur. Düşük proliferasyon oranı östrojen uzaklaştırılmasından yaklaşık bir ay sonra devam eder, bu da o dönemde MCF-7'nin henüz adaptif veya telafi edici büyüme mekanizmaları bulamadığını göstermektedir (Comşa ve Cimpean, 2015).

Meme kanseri hücrelerinin büyümesi sadece ER ve PR ile değil aynı zamanda plazma membranı ile ilişkili büyüme faktörü reseptörleri tarafından da kontrol edilir. Bu büyük ailenin özellikle önemli iki üyesi, her ikisi de MCF-7 hücrelerinde bulunan ve epidermal büyüme faktörü (EGF) tarafından aktive edilen epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) ve insan epidermal büyüme faktörü reseptörü-2 (HER2) 'dir. Bununla birlikte, MCF-7' nin orta derecede EGFR eksprese eden hücre hattı olduğu düşünülmektedir (Comşa ve Cimpean, 2015).

MCF-7 suşlarının E2 tedavisine bir cevap olarak, büyümedeki farklılıklar, ER ekspresyon seviyesindeki veya işlevselliğindeki farklılıklardan kaynaklanmamaktadır. MCF-7 hücrelerinin E2 duyarlılığı, insülin benzeri büyüme faktörü tip I reseptörünü (IGF-IR) aktive eden bir otokrin faktörünün salgılanmasına bağlı gibi görünmektedir. MCF-7 hücre hattında miRNA'ların düzenlenmesinde IGF-1 sinyalleşmesinin rolüne ilişkin kanıtlar da vardır (Comşa ve Cimpean, 2015).

4.5. Meme Kanseri Risk Faktörleri

Meme kanseri, yaş, kilo (aşırı kilolu veya obez olmak), sigara içmek, alkol kullanımı, uzun menstruasyon öyküsü, oral kontraseptif kullanımı, menapoz sonrası hormon kullanımı ve yaşlılıkta doğum gibi birçok faktör nedeniyle gelişebilir (Tyczynski ve ark, 2002). Meme kanseri vakalarının % 95'i kendiliğinden ortaya çıksa da, aile öyküsü ve genetik eğilim meme kanseri oluşum oranını da etkileyebilir. Yapılan çalışmalar, kalıtsal BRCA1 ve BRCA2 mutasyonları olan kadınlarda meme kanseri riskinin yaklaşık % 80 civarında

olduğunu ortaya koymuştur (King ve ark. 2003; Foulkes ve ark. 2003; Serova ve ark., 1997).

4.6. Meme Kanseri Etiyopatogenezi

Meme kanserin gelişmesinde yer alan etiyolojik faktörler; genetik faktörler, hormonal etkiler ve çevresel faktörler olmak üzere 3 grupta incelenmektedir. BRCA-1, BRCA-2, TP53 (Li-Fraumeni sendromu), PTEN (Cowden sendromu), AR ve AT riskini arttırmakla birlikte otozomal geçişli ailesel vakalarının birçoğundan sorumludur. Aileden gelen bu kanser vakalarında tümör baskılayıcı genler ve DNA tamir genlerinin ekspresyonunda azalma gözlenirken HER-2/neu onkogeninin ekspresyonunda artış tanımlanmıştır. Diğer bir yandan meme kanseri oluşumu östrojene uzun süre maruz kalınması ile açıklanmaktadır. Meme kanseri hücreleri tarafından salgılanan ve tümör oluşumunun otokrin metabolizmasında önemli olan büyüme faktörlerinin (EGF, FGF, PDGF) oluşumu östrojene bağlıdır (Yırtıcı, 2012).

HER-2/neu antijeni gibi büyüme faktörü proteinleri, meme, yumurtalık, akciğer, mide ve oral kanserler dahil olmak üzere farklı insan kanser türlerinde aşırı miktarda eksprese edilmektedir (Gancberg ve ark., 2000). 1987'de, HER-2/neu proto-onkogeninin, invaziv meme kanserlerinin % 20-30'unda çoğaldığı ve aşırı eksprese edildiği ve ayrıca hayatta kalma süresinin kısalması ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Hung ve Lau, 1999).

4.7. Meme Kanseri Östrojenin Etkisi:

Meme kanserlerinin ortaya çıkması ve gelişmesinde başta östrojen (E2) olmak üzere bazı hormonların rol oynadığı ve hormonların etkisi olmadan, meme kanseri olmayacağı bildirilmektedir (Meites, 1972; Cuzick ve ark., 1986). Bundan dolayı kadınlarda meme kanseri erkeklere oranla 100 kat daha sık görülmektedir. 17- β -östradiolün (E2) östrojen reseptör pozitif meme tümör hücrelerinde çoğalmayı uyardığı ve apoptozu engellediği bilinmektedir (Santen ve ark., 2007; Yaşarturk ve Altıntaş, 2010).

Östrojenlerin etkilerine hücre içi ER aracılık eder. Östrojen için iki reseptör (ER α ve ER β) tanımlanmıştır. ER α çoğunlukla rahim ve meme bezlerinde bulunur, ER β ise merkezi sinir, kardiyovasküler, bağışıklık sistemleri, kemik, böbrek ve akciğerlerde çalışır (Gustafsson, 2000). ER bir transkripsiyon aktivatörüdür ve gen transkripsiyonunu aktive eden hedef genin östrojen tepki elementine bağlanır. Östrojen yoksa, ER, çekirdekteki bir ısı şoku proteininin bağlanmasıyla inaktive edilir. Hormonun östrojen reseptörüne bağlanması, reseptörü inhibe edici kompleksten ayırır ve östrojen reseptörünün hedef gendeki tepki elemanlarını bağlamasına izin veren konformasyonel değişiklikleri tetikler (Moggs ve Orphanides, 2001).

Meme kanseri vakalarının % 40-80'ninde ER'nin pozitif olduğu tespit edilmiştir. Östrojen, ER pozitif meme kanseri hücrelerinde kendi reseptörünü aktive ederek hücre siklusunun G1 fazını kısaltmakta ve hücrenin daha sık bir şekilde bölünmesine neden olmaktadır. ER miktarı meme kanseri hücrelerinde, normal hücrelerde bulunan ER miktarından belirgin derecede fazladır (Gedikli, 2013).

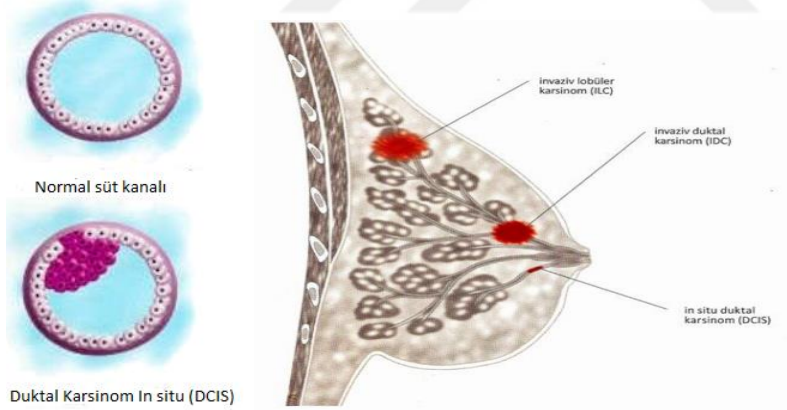
Çalışmalar meme kanserinin hormona bağlı malignitenin klasik bir modeli olduğunu göstermektedir. Östrojen normal meme bezinin büyümesinde ve farklılaşmasında önemli rol oynar. Vücuttaki yüksek östrojen seviyelerinin meme kanserinde risk faktörü olduğunu gösteren artan kanıtlar mevcuttur. Klinik ve deneysel çalışmalar östrojenlerin aynı zamanda meme için kanserojen olduğu fikrini desteklemekte ve östrojen uygulaması tümör büyümesini arttırırken östrojen yoksunluğu tümörleri azaltmaktadır (Cos ve ark., 2006).

50 yaşın üzerindeki insanlar meme kanseri vakalarının % 76'sını oluşturmakta ve aynı zamanda ömür boyu östrojene maruz kalmanın meme kanserine neden olmada önemli bir rolü olduğunu göstermektedir. Ayrıca, menopoz dönemindeki kadınlarda meme kanserinin en çok görülmesinin diğer bir nedeni de menopozdaki kadınlarda yer alan biyosentez nedeniyle meme bezindeki östrojen konsantrasyonunun yüksek olması, menopozdan sonra periferik dokularda neredeyse % 100 oranında östrojen sentezlenmesidir (Yager ve Davidson, 2006).

4.8. Meme Kanserinin Sınıflandırılması

Meme kanserinin sınıflandırılması klinik veya histopatolojik olarak invaziv ve invazif olmayan meme kanseri olarak iki şekilde yapılmaktadır. İnvaziv olmayan meme kanserinde hücreler, kanallarla sınırlıdır ve memenin etrafındaki yağ ve bağ dokularını istila etmez. Yerinde duktal karsinom (DCIS), invaziv olmayan meme kanserinin en sık görülen şeklidir (% 90). Lobüler karsinoma in situ (LCIS) daha az yaygındır ve artan meme kanseri riski için bir belirteç olarak kabul edilir (Sharma, ve ark., 2010).

İnvaziv meme kanseri hücreleri, kanal ve lobüler duvardan geçerek, memenin çevresindeki yağ ve bağ dokularını istila eder. Lenf düğümleri veya diğer organlarda metastatik (yayılma) olmadan invaziv olabilir İnvaziv lobüler kansinom 10 meme kanserinin yaklaşık 1'inde görülür. Bu, kanserin meme lobları zarındaki hücrelerde başladığı anlamına gelmektedir. İnvazif lobüler kanser en çok 45-55 yaşları arasındaki kadınlarda yaygındır. Erkeklerinde invazif lobüler meme kanserine yakalanmaları mümkündür ancak bu çok nadirdir (Sharma ve ark., 2010). En fazla görülen meme kanseri tipi invaziv duktal karsinomdur (Şekil 6)(Yırtıcı, 2012).



Şekil 6: DCIS ve Duktal karsinom ile ilişkili tipik yapı (www.istanbulsaglik.gov.tr/w/anasayfalinkler/belge/meme_ca_2014.pdf, 12.06.2019)

4.9. Süt

Memelilerin ilk besini olan süt, yenidoğanın uygun bir şekilde büyümesi ve gelişmesi için gereken tüm enerjiyi ve besinleri sağlamaktadır. Süt bebek beslenmesinde önemli olan yüksek kaliteli proteinler, lipitler, karbohidratlar, laktoz,

vitaminler, mineraller, enzimler, hormonlar, immünoglobulinler ve büyüme faktörleri gibi birçok biyoaktif bileşenin kaynağıdır. Bu bileşenler sadece insani beslenme gereksinimlerinin karşılanmasına yardımcı olmakla kalmaz, aynı zamanda hipertansiyon ve kardiyovasküler hastalıklar, obezite, osteoporoz, diş çürüğü, zayıf gastrointestinal sağlık, kolorektal kanser, yaşlanma ve diğerleri gibi çeşitli rahatsızlıkların önlenmesinde de önemli bir rol oynamaktadır (Tablo 1). Süt proteinleri genç memelilere azot ve amino asit kaynağı sağlar ve bozulmamış formda çoklu fizyolojik özellikler içerir. Dahası, son yıllarda yapılan çalışmalarda, bu proteinler biyolojik olarak aktif peptidlerin kaynağı rolünü üstlendiği görülmüştür. Biyoaktif peptitler, ana proteinin dizini içinde inaktiftir, ancak bir kez in vitro işlem koşulları veya in vivo gastrointestinal sindirim yoluyla salgılandığında, vücut fonksiyonları üzerinde pozitif bir etkiye neden olan ve sonuçta tüketiciye sağlık yararlarını teşvik eden düzenleyici bileşikler olarak işlev kazanırlar (Hsieh ve ark., 2014).

Tablo 1: Kanıtlanmış antihipertansif aktiviteye sahip peptidler içeren ticari süt ürünleri (Hsieh ve ark., 2014).

<i>Ticari ad</i>	<i>Elde Ediliş Prosesi</i>	<i>Protein Kaynakları</i>	<i>Aktif Diziler</i>	<i>Yayın Numarası (Referans)</i>
Peptit C12	Tripsin ile Hidroliz	α_{s1} - Kazein	FFVAPFPEVFGK	JP62270533 [31]
Biozate	Tripsin ile Hidroliz	Peynir altı suyu proteinleri	Peynir altı suyu proteinleri	US6998259 [157]
Lowpept	Pepsin ile Hidroliz	α_{s1} - Kazein	RYLGY, AYFYPEL	WO2005012355 [158]
Calpis	Fermantasyon	β -Kazein	VPP, IPP	US5449661A [37,38]
Evolus	Fermantasyon	β -Kazein	VPP, IPP	US6972282 [159]

A: Alanin R : Arjinin N: Asparajin D:Aspartat C: Sistein Q:Glutamin E:Glutamat G:Glisin H:Histidin I:İzölösin K: Lizin L:Lösin M:Metiyonin F:Fenilalanin P:Prolin S:Serin T:Treonin W:Triptofan Y:Tirozin V:Valin

Sütte östrojen metabolitleri ile ilgili endişeler ve tüketimin üreme sistemi kanserleri ile ilişkilendirilmesi nedeniyle Farlow ve ark. (2012) ticari keçi ve inek sütünde estron (E1) ve 17- β -estradiol (E2) düzeylerini karşılaştırmışlardır. Keçi sütünün E1 ve E2 konsantrasyonu inek sütünden daha düşük olarak tespit edilmiştir (Clark ve Garcia, 2017).

4.9.1. Sütün Biyokimyasal Yapısı

Süt, fosfolipitler ve yağ küresinin yüzeyindeki proteinler ile stabilize edilmiş, su içinde yağ tipi bir emülsiyondan oluşan kompleks bir karışımdır. Ek olarak, kolloidal dispersiyonlarda proteinler, laktoz, sayısız mineral, özellikle kalsiyum ve fosfor, yağda çözünür ve suda çözünür vitaminler, enzimler ve çeşitli organik bileşikler içerir (Louis ve Rusoff, 1970).

Süt santrifüj edildiğinde serum ve kazein fraksiyonları elde edilmektedir. Suda çözünen serum proteinleri sürekli fazı temsil ederken, kazein miseller dağınık fazı temsil etmektedir. Bu emülsiyonda, membranları esas olarak bir fosfolipit-protein kompleksi ile oluşturulmuş küçük kürecikler halinde olan yağ bileşenleri bulunur (Greppi, ve ark., 2008).

Sütün biyokimyasal bileşimi ve özellikleri türlerden türe, yenidoğanın beslenme gereksinimlerine göre değişkenlik göstermektedir. Sütün uzun süre, yetişkinlerin beslenmesinde ve özellikle bebeklerin beslenmesinde kullanımı hakkında yapılan araştırmada, keçi sütünün diğer türlerin sütlerine kıyasla iyi bir protein ve amino asit kaynağı olduğu tespit edilmiştir (Greppi, ve ark., 2008).

4.10. Keçi Sütü

Farklı hayvan türlerine ait süt örneklerinin biyokimyasal içeriği geniş çapta çalışılmıştır ve özellikle insanlar tarafından tüketilen sütle ilgili çok sayıda referans mevcuttur. Araştırmalarda keçi ve koyun sütünden daha çok inek ve manda sütü üzerinde durulmuştur. Keçi sütü, düşük yağ oranı, düşük laktoz, kalsiyum zenginliği, antioksidan ve antimikrobiyal özellikleri nedeniyle çok çeşitli yararları mevcuttur. Keçi sütü, inek sütüne alerjisi olanlara sağlıklı ve dengeli bir diyet sağlar (Prajapati ve ark., 2017).

Kısa zincirli yağ asitlerinin serbest kalması nedeniyle keçi sütünün kendine has bir kokusu ve tadı vardır. Keçi sütü yapısındaki yağ küreciklerinin küçük olması ve protein ve yağ dağılımının dengeli olması nedeniyle daha çabuk sindirilebilir özelliğe sahiptir. Sütün besin değeri, cins, yem, laktasyon aşaması ve mevsim gibi faktörlerden etkilenmesine rağmen keçi sütü genel olarak iyi bir kalsiyum, fosfor,

potasyum, magnezyum, sodyum ve demir kaynağıdır. Modifiye keçi sütü bebek beslenmesinde de kullanılabilir (Prajapati ve ark., 2017).

Keçi sütünün yumuşak yağı, gastrointestinal rahatsızlıkları ve ülseri olan yetişkinlerde sindirimi kolaylaştırmaktadır. Keçi sütü; bağışıklık sisteminin uyarılmasını da sağlar. Keçi sütünün halk arasında birçok yararlı etkisi nedeniyle kullanılmasına rağmen, bu sütle ilgili yeterli araştırma mevcut değildir (Zenebe ve ark., 2014).

4.10.1. Keçi Sütü Protein İçeriği

Beslenmenin önemli bileşenlerinden biri olan süt proteinleri önemli besinsel, biyolojik ve işlevsel özelliklere sahiptir. Anne sütünün protein içeriği yaklaşık % 1.6 iken, inek sütünün % 3,3 ve keçi sütünün % 4,6'dır . Tablo 2'de keçi, inek ve anne sütündeki bazı minör protein içerikleri görülmektedir (Remeuf and Lenoir, 1986).

Tablo 2: Keçi, inek ve anne sütündeki bazı minör protein içerikleri (Remeuf and Lenoir, 1986).

	Keçi sütü	İnek Sütü	Anne Sütü
PROTEİNLER			
Laktoferrin (µg/mL)	20-200	20-200	<2000
Transferrin (µg/mL)	20-200	20-200	<50
Prolaktin (µg/mL)	44	50	40-160
Folat bağlayan protein	12	8	-
İMMÜNOGLOBÜLİNLER			
IgA (süt: µg/mL)	30-80	140	1000
IgA (kolostrum: mg/mL)	0,9-2,4	3,9	17,35
IgM (süt: µg/mL)	10-40	50	100
IgM (kolostrum: mg/mL)	1,6-5,2	4,2	1,59
IgG (süt: µg/mL)	100-400	590	40
IgG (kolostrum: mg/mL)	50-60	47,6	0,43
Protein-olmayan azot (%)	0,4	0,2	0,5

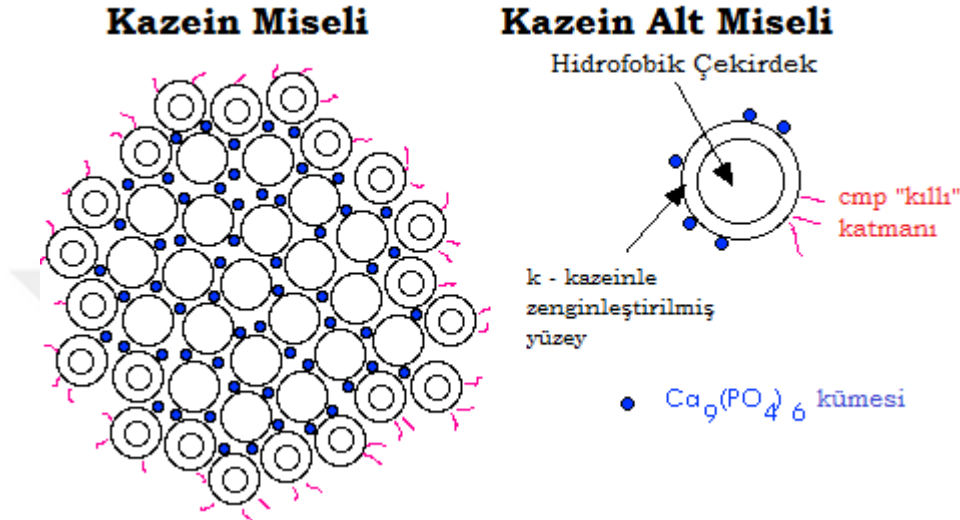
Sığır ve keçi sütünün protein fraksiyonları nitel olarak çok benzerdir ve bu sütler arasındaki en büyük fark, kazeinlerin oranları ve sınıflarıyla ilgilidir. Sığır sütüne kıyasla keçi sütünün hipoalerjenitesi, keçi sütündeki düşük seviyelerde α s1-kazeinin (α s1-cn) bulunması ile ilgilidir ve bu fraksiyonun, spesifik haplotipler tarafından belirlenen alerjenik potansiyele sahip olduğu kabul edilmiştir. Moleküler tekniklere dayanan çalışmalar, farklı cinslerde bulunan keçi alellerinin süt kazein fraksiyonunda önemli farklılıklara yol açtığını ve bu alellerin bu özellikler için bölgesel eğilimler gösterebileceğini belirtmiştir (Karoline ve ark., 2014).

Keçi sütünün proteinleri sığır sütü proteinleri ile karşılaştırıldığında, sığır sütünde mevcut on temel amino asit miktarı keçi sütünde altı kat daha yüksek oranda bulunmaktadır. Ayrıca, keçi sütünün sindirimi veya teknolojik işlenmesi sırasında biyoaktif peptidlerinin oluşması da keçi sütüne değer katmaktadır. Keçiler de dahil olmak üzere çeşitli hayvan türlerinden sağılmış sütlerini içeren çalışmalar, süt ve süt serumu proteinlerinin ve bu proteinlerden üretilen peptitlerin antimikrobiyal, immünomodülatör, antioksidan, antitrombotik, hipokolesterolemik aktiviteler gibi önemli biyolojik aktivitelere sahip olduğunu göstermektedir (Karoline ve ark., 2014).

4.11. Süt Proteinlerinin Biyokimyasal Özellikleri

Süt proteinleri, temel olarak kazein, süt serumu proteinleri, enzimler ve az miktarda protein içermeyen azot içeren bileşiklerden oluşan heterojen karışımlardır. Proteinlerin % 73'ü kazein ve % 8'lik kısmı süt serumu proteindir (Fox ve McWeeney, 2003). Keçi sütü kazein fraksiyonunda α S1, α S2, β ve κ ve süt serum proteini fraksiyonunda ise α -laktoalbumin ve β -laktoglobulin ana alt protein fraksiyonlarıdır. Keçinin sütünün protein fraksiyonu, diğer hayvanlarda olduğu gibi, temel olarak toplam proteinlerin % 80'ini oluşturan kazeinlerden oluşur. Kazein kolloidal form (misel) özelliğine sahip, kolloidal bir süspansiyon halinde sütte bulunan küresel proteindir. Hidrofobik bir çekirdek ve yüklü bir kutupsal hidrofilik kısım ile karakterize edilir. Polar kısmın anyonik bölgeleri Ca^{2+} 'a duyarlılıktan ve bu proteinin bazı fizikokimyasal özelliklerinden sorumludur. Ayrıca, kazeinler nispeten hidrofobiktir ve sütte bulunanlar gibi iyonik koşullar altında, tipik kolloidal formlarına (misel) sıkıca bağlanma eğilimindedirler. Miseller, bir protein fraksiyonu

ve kalsiyum ve fosfat iyonları tarafından oluşturulur (Şekil 7). Her bir protein fraksiyonunun kalitatif ve kantitatif içeriği; fizyolojik (laktasyon aşaması, laktasyon sırası), çevresel (iklim, hijyen), genetik ve beslenme gibi birçok faktöre bağlıdır (Greppi, ve ark., 2008).



Şekil 7: Alt misellerden oluşmuş kazein ve kazein alt/sub miseli (Medved, 2010).

Kazein fraksiyonu 20 °C' de pH 4.6 - 4.7'de asitleştirildiğinde; enzimatik işlemlerle (kimozin) veya ultrasantrifüj yoluyla çöktürülebilen spesifik bir fosfoprotein grubudur. Bu fraksiyon prolin, glutamat ve glutamin bakımından zengin, glisin ve aspartat bakımından fakirdir. Kazeinin sütün içinde stabil bir şekilde çözünmesini sağlamak için yüksek miktarda Ca ve fosfat gereklidir, böylece besinsel bir amino asit kaynağı haline gelir. Keçi sütünde oligosakaritlere bağli olarak bulunan kazein fraksiyonu, özellikle iltihaplı bağırsak hastalıkları üzerinde yararlı anti-inflamatuar etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (Greppi, ve ark., 2008).

Süt serum proteinlerinin toplumlarda ve çeşitli kültürlerde hastalıkların önlenmesinde ve tedavisinde yüzyıllardır kullanıldığına dair bilgiler bulunmaktadır. Özellikle akut septik ve gastrointestinal enfeksiyonlarına karşı 17. yüzyılda İtalya'da kullanıldığına dair belgeler mevcuttur. Yapılan çalışmalarda birçok biyolojik aktiviteye sahip, serum proteinlerinden beta-laktoglobulin, alfa laktalbümin, serum albümini, immunoglobulinler, proteoz-pepton, laktoferrin ve laktoperoksidaz ile diğer süt proteinleri belirlenmiştir (Tablo 3). Serum proteinleri ve bunlardan

kaynaklanan peptidler biyolojik ve fizyolojik özelliklerinden dolayı, fonksiyonel gıdaların üretiminde önemli bir yer tutmaktadırlar. Birçok değişik besinsel ve fizyolojik etkiye sahip olmalarına, serum proteinlerinin biyolojik olarak aktif proteinler ve peptidler içermesi temel neden olarak belirlenmiştir. Yapılan çalışmalarda süt serum proteinlerinin kilo kontrolünde, egzersiz sonrası fiziksel performansın geri kazanılmasında, kalp sağlığının korunmasında, kanseri önlemede, yara iyileşmesinde, enfeksiyonun önlenmesi veya azalmasında, bebek beslenmesinde, sağlıklı yaşlanmanın gerçekleşmesini sağladığı gösterilmiştir. Süt serum proteinlerinin kolon, meme, deri ve prostat kanserlerinin oluşumu ve gelişimine karşı in vivo ve in vitro koşullarda yapılan birçok araştırma, koruyucu etki gösterdiğini ortaya koymuştur. Ayrıca kan basıncını düşürücü, hipertansiyonu önleyici fonksiyona sahip olduğu da belirlenmiştir (Gür ve ark., 2010).

Tablo 3: Süt proteinlerinin biyolojik fonksiyonları (Gür ve ark., 2010).

Protein	Konsantrasyon (g/L)		Fonksiyon
	İnek	İnsan	
Toplam kazeinler	26.0	2.7	İyon taşıyıcı (Ca, PO ₄ , Fe, Zn, Cu), biyoaktif peptidler için ön madde
α-kazein	13.0	-	
β-kazein	9.3	-	
κ-kazein	3.3	-	
Toplam serum proteini	6.3	7.3	- Retinol taşıyıcı, yağ asitlerini bağlar, antioksidan - Laktoz sentezinde rol oynar, Ca taşıyıcı, immunomodülatör, antikanserojen - İmmun koruyucu
β-laktoglobulin	3.2	-	
α-laktalbumin	1.2	1.9	
İmmunoglobulinler	0.7	1.3	
Serum albumini	0.4	0.4	- Yağ asitleri taşıyıcısı, antioksidan - Antibakteriyal, antifungal, antiviral, antioksidan, immunomodülatör, demir bağlayıcı, antikanserojen, anti-inflamatuar, yararlı bakterilerin gelişimini teşvik edici - Antimikrobiyal
Laktoferrin	0.1	0.2	
Laktoperoksidaz	0.03	-	
Proteoz-pepton	0.8	-	
Lizozim	0.0004	0.1	- Antimikrobiyal - Antiviral, enterotoksin bağlayıcı, bifidojenik
Glikomakropeptit	1.2	-	
Diğerleri	0.8	1.1	

4.12. Biyoaktif Peptidler

Biyoaktif peptitler, enzimatik aktivite sonucu açığa çıktığında spesifik özellikleriyle önemli fizyolojik rollere sahip ancak yapısal protein içinde inaktif olan aminoasit zincirleri “fonksiyonel peptitler” olarak tanımlanmaktadır. İlk olarak belirlenişi Mellander tarafından olan biyoaktif bileşikler, günümüzde süt proteinlerinden opioid, antitrombotik, antihipertansif, antimikrobiyal, antikanserojen, mineral taşıyıcı veya immunomodülatör aktiviteye sahip birçok biyoaktif peptid ortaya konulmuştur. Bu peptitlerin, aminoasit kompozisyonları, dizileri biyolojik

aktivitesini belirler ve 3-20 aminoasit içermektedirler. Biyoaktif peptidler biyolojik aktivitelerini; antimikrobiyal etki, kan basıncını düşürücü etki (Angiotensin-I Converting Enzyme (ACE) inhibitörü), kolesterol düşürme, antitrombotik ve antioksidan etki, mineral absorpsiyonu/ biyoyararlılığını artırma, immunomodülatör ve opioid etkiler gibi geniş bir yelpazede göstermektedir (Ortağ ve Hayta, 2013).

Süt proteinleri biyoaktif peptidler açısından başlıca kaynak olarak değerlendirilmektedir. Hayvansal kaynaklı proteinler de bitkisel kaynaklı proteinler gibi potansiyel biyoaktif aminoasit zincirleri içermektedir ve bu açıdan süt proteinleri ve özellikle de kazeinler biyolojik aktif peptitlerin önemli bir kaynağıdır. Peyniraltı suyu temel proteinlerinden α -laktalbumin ve β -laktoglobulinin de biyoaktif aminoasit zincirler içerdiği gösterilmiştir (Kınık ve Gürsoy, 2002).

Sütteki biyoaktif peptidler, kazeinde ve bazı süt serum proteinlerinde etkisiz halde bulunurlar. Bu peptitler bulunduğu protein dizisinde inaktif haldedir ve üç yolla aktif hale geçebilir. Sindirim sırasında gastrointestinal sistemdeki sindirim enzimleri tarafından, bitkiler ve mikroorganizmaların salgıladığı proteolitik enzimler tarafından (sütte plazmin enzimi tarafından) veya mikrobiyal fermentasyon sırasında proteolitik mikroorganizmalar tarafından hidroliz yoluyla serbest hale geçmektedir (Dziuba ve ark., 2009). Biyoaktif peptidler hormon benzeri aktiviteleri ve düzenleyici bileşik olarak rollerini ancak protein yapısından serbest hale geçtiklerinde göstermektedirler. Barsak sisteminde üretildikten sonra veya gıdalarla alındıklarında bu biyoaktif peptitler barsakta hedef bölgeleriyle etkileşime girerler. Hemen sonra bu bölgeler tarafından absorbe edilerek, periferik organlara ulaşırlar (Gür ve ark., 2010).

Bitki kaynaklı veya hayvan kaynaklı pek çok sayıda biyoaktif peptit en çok süt kaynaklı ürünlerden izole edilmiştir. Birden fazla biyolojik aktivite gösteren spesifik peptit zincirleri ve bu biyolojik aktivite aminoasit kompozisyonu ve dizilişine bağlı olmasıyla beraber, peptitlerin C-terminal veya N-terminal pozisyonundaki aminoasit son derece önem taşımaktadır. Örneğin, C-terminal pozisyonunda prolin aminoasidinin bulunması Angiotensin I dönüştürücü enzim

inhibitörü aktivitesi için, gerekmektedir. Diğer bir örnek, antihipertansiyon etkisine sahip β -kazein'nin mikrobiyal bir enzimle parçalanmasıyla elde edilen biyoaktif peptid zinciri 7 aminoasitten oluşmaktadır (Lizin-Valin-Lösin-Prolin-Valin-Prolin-Glisin). Bu yapıdaki peptit zinciri kuvvetli bir ACE inhibitörü aktivitesi göstermezken glisin aminoasidi bu peptit zincirinden uzaklaştırıldığında 6 aminoasit içeren peptidin antihipertansiyon etkisi yanında kuvvetli ACE inhibitörü olarak aktivite gösterdiği bildirilmektedir. C-terminal ucundaki prolin aminoasidinin bulunduğu 6 aminoasitten oluşan peptit zincirinin yapılan çalışmalarda ACE inhibisyonu için önemli olabileceğini göstermiştir (Kınık ve Gürsoy, 2002).

Biyoaktif peptitler, küçük boyutlarından ve özgüllüklerinden dolayı protein-protein etkileşimlerini önleme yetenekleri ile bilinmektedirler. Bitkiler, hayvanlar, mantarlar, mikroplar ve bunların ürünleri içinde çeşitli proteinler bulunduğundan doğa, en büyük biyoaktif peptid kaynağı olmaya devam etmektedir. Yıllar boyunca, gıdalardaki biyoaktif peptitler klasik veya biyoinformatik yaklaşımlarla keşfedilmiştir. Klasik yaklaşım, hidrolizattaki sayısız peptit parçasını serbest bırakmak için gıda sınıfı proteolitik enzimlerle proteinlerin hidrolize edilmesini içerir. Alternatif olarak, proteinler bakteriler tarafından fermente edilebilir. Bakteriler proteolitik enzimler, peptidleri hidrolizat içine salmak için proteinleri hidrolize eder. Hidrolizatlar daha sonra biyolojik bir aktivite için in vitro olarak test edilir. Hidrolizatlar iyi biyoaktivite gösterirlerse, in vivo testlerle onaylanırlar. Biyolojik olarak aktif hidrolizat daha sonra fonksiyonel bir gıdada geliştirilebilir. Hidrolizatlardaki biyoaktif peptitler ayrıca, farmakolojik olmayan terapi için ayrıştırılabilir ve gıda takviyesi olacak şekilde saflaştırılabilirler (Banon ve ark., 2017).

4.12.1. Sütte Bulunan Biyoaktif Peptidler ve İnsan Sağlığına Etkileri

Bir peptidin fonksiyonu o peptidin amino asit bileşimi ile belirlenir. (Haque ve ark., 2009). Sütten elde edilen biyoaktif peptidlerin fonksiyonları da yapısında bulunan doğal kaynaklı proteinlerde yer alan aminoasitler belirlemektedir (Beermann ve Hartung, 2013). Mikrobiyal veya enzimatik olarak parçalanan kazeinlerden ve serum proteinlerinden açığa çıkan ve aktif hale gelen peptitler, yaşamsal sistemlerin

düzenlenmesinde potansiyel ayarlayıcı veya düzenleyici görevler üstlenirler (Meisel, 1998). Birçok araştırmada, süt ve süt ürünlerinde fizyolojik ve biyolojik fonksiyona sahip biyoaktif peptitlerin varlığını ortaya konulmuştur (Haque ve ark., 2009; Korhonen, 2009; Gonzalez-Gonzalez ve ark., 2011; Hafeez ve ark., 2014). Bu biyoaktif peptidler antimikrobiyal, opioid, antihipertansif, antioksidatif kanser önleyici ve bağışıklık düzenleyici gibi vücutta birçok biyolojik aktiviteye sahip biyoaktif peptitler için zengin bir kaynaktır (Korhonen, 2009).

4.12.2. Sütteki Biyoaktif Peptitlerin Fonksiyonel Özellikleri

Süt kaynaklı biyoaktif peptitlerin, insanlarda hastalıkların tedavisi ve kronik hastalıklara yakalanma riskini önemli ölçüde azalttığı birçok bilimsel araştırmada gösterilmiştir (Meisel, 1998). Süt biyoaktif peptitlerinin insan sağlığı üzerine olan etkileri özellikle kardiyovasküler sistem (antihipertansif, antitrombotik ve antioksidatif etki), gastrointestinal sistem (mineral bağlayıcı ve antimikrobiyal etki) sinir sistemi (opioid etki) ve bağışıklık sistemi (immünomodülatör etki) açısından incelenmektedir (Korhonen ve ark., 2006).

Sütten türetilen biyoaktif peptitler, sağlığı artırıcı fonksiyonel gıdaların potansiyel bileşenleri olarak tanımlanmıştır. Bu biyoaktif peptitler, diyetle ilişkili kronik hastalıklara, özellikle bulaşıcı olmayan hastalıklara, obeziteye, kardiyovasküler hastalıklara ve diyabete yöneliktir. İnek, keçi, koyun, manda ve deve sütünden elde edilen peptitler, anti mikrobiyal, immün modülatör, antioksidan, anti-trombotik ve çeşitli toksik maddelere karşı antagonistik aktiviteler dahil olmak üzere çok fonksiyonlu özellikler sergilemektedirler. Bu tür yeni biyoaktif peptitlerin ticari üretimi için, membran ayırma ve iyon değiştirme kromatografi yöntemlerine dayanan büyük ölçekli teknolojiler geliştirilmiştir. Bu peptitlerin ve bunların farmakodinamik parametrelerinin tanımlanması, güçlü fonksiyonel özelliklerini gıda uygulamalarına aktarmak açısından önem taşımaktadır (Mohanty ve ark., 2016). Süt kaynaklı biyoaktif peptitler Tablo 4’ de verilmiştir.

Tablo 4: Süt proteini kaynaklı biyoaktif peptitler (Ay ve Şanlı, 2018).

Biyoaktif Peptit	Öncü Protein	Biyoaktivite
Kasomorfinler	α -, β -Kazein	Opioid Etki
α-Laktorfin	α -Laktoalbümin	Opioid Etki
β-Laktorfin	β -Laktoglobulin	Opioid Etki
Laktoferoksinler	Laktoferrin	Opioid Etki
Kasokinler	κ -Kazein	Opioid Etki
Kasokininler	α -, β -kazein	ACE-inhibitörü
Immunopeptitler	α -, β -kazein	İmmunomodulator
Laktoferrisinler	Laktoferrin	Antimikrobiyal
Kasoplatelinler	κ -Kazein, transferin	Antitrombotik
Fosfopeptitler	α -, β -Kazein	Mineral bağlayıcı

4.12.3. Süt Proteinlerinin ve Peptitlerin Kansere Önleyici Rolü

Kanser kaynaklı ölümlerinin % 35'inin diyet ve besin bileşenlerine bağlı olduğu bilinmektedir. Bununla birlikte, hücre kültürü ve hayvan ve insan deneyi sonuçları, önemli sayıda gıda bileşeninin kanser riskini azaltabileceğini ve hatta tümör hücrelerini antikanser tedavilerine karşı hassaslaştırabileceğini göstermiştir. Son birkaç yılda, gıda proteinleri ve türetilmiş peptitler, kanserin başlatılması, ilerletilmesi ve ilerlemesi aşamalarına karşı en umut verici önleyici özelliklere sahip gıda bileşenlerinden biri haline gelmiştir (Hsieh ve ark., 2014).

Süt proteinleri arasında laktoferrin ve bunun türetilmiş peptidi laktoferrisin en çok çalışılanıdır. Her iki bileşik için de antioksidan, immünomodulator ve antiinflamatuvar aktiviteler kansere karşı koruyucu etkileriyle yakından ilişkilidir. Laktoferrin, antioksidan ve immünomodulator özelliklerinin yanında, apoptozu indükleyerek, anjiyogenezi inhibe ederek ve kanserojen metabolize edici enzimleri modüle ederek etki eder. Ayrıca laktoferrisin, normal lenfositlere, fibroblastlara veya endotelial hücrelere zarar vermeden meme, kolon, fibrosarkom, lösemi ve oral ve yumurtalık kanseri hücreleri dahil olmak üzere farklı hücre hatlarında güçlü antikanserojen özellikler gösterdiği belirtilmektedir. Ayrıca, hayvan modelleri bu süt türevi peptidin faydalı özelliklerini doğrulamıştır. Anti-

karsinogenezdeki olası sığır laktoferrisinin mekanizmasının apoptozu indüklemeye kabiliyeti ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Sığır laktoferrisinin anjiyogenezindeki baskılanma kabiliyeti *in vitro* ve *in vivo* olarak koruyucu özelliklere katkıda bulunduğu gösterilmiştir (Tablo 5). Hem spontan hem de deneysel metastaz faresi modellerinde cilt altı sığır laktoferrisinin uygulanmasından sonra, tümör büyümesinin ve karaciğer ve akciğer metastazının önemli bir inhibisyonu bildirilmiştir (Hsieh ve ark., 2014).

Tablo 5: Laktoferrinin ve bunun türetilmiş peptidi laktoferrisinin meme kanserine karşı hücre kültürü deneyleri ve hayvan modelleri ile gösterdiği koruyucu özellikler (Hsieh ve ark., 2014).

Kanser türü	Hayvan türleri/ protein-peptid	Hücre çizgisi / hayvan modeli	Etkiler / etki mekanizmaları
Meme kanseri	İnsan laktoferrin	MDA-MB-231 hücreleri	Hücre büyümesinin engellenmesi Hücre siklusu durması
	Sığır laktoferrin	4T1 ksenograft Balb/c fareleri	Tamoksifenin kemopreventif etkilerinin iyileştirilmesi Proinflamatuvar sitokinlerin down regülasyonu
	Sığır laktoferrin-oleik asit kompleksi	MCF-7 hücreleri	Proliferasyonun inhibisyonu Apoptoz indüksiyonu
	Sığır laktoferrisin	MCF-7,T-47D ve MDA-MB-435 hücreleri	Sitotoksik aktivite Apoptoz indüksiyonu

Sentetik antikanser ajanların çoğu nefrotoksik, nörotoksik, kardiyotoksik ve gonadotoksik yan etkilerle ilişkilidir. Bu nedenle, gıda kaynaklı antikanser biyoaktif peptit arayışı günümüz şartlarında artmıştır. Platensis hidrolizatlarından izole edilen bir peptid Histidin-Valin-Lösin-Serin-Arjinin-Alanin-Prolin-Arjinin, HT-29 kanser hücresi çoğalmasına karşı güçlü inhibe edici aktivite göstermiş, ancak normal karaciğer hücrelerine karşı çok az inhibisyon göstermiştir. Ton balığı pişirme suyundan iki peptidin meme kanseri hücre dizisi MCF-7'de güçlü antiproliferatif

aktivite sergilediği gösterilmiştir. Peptitler, S fazında p21 ve p27 ekspresyonunu artırarak, siklin A ekspresyonunu azaltırken hücre döngüsünün durmasını indüklemiştir. Ek olarak, peptidler bölünmüş kaspaz 3'ü, Bcl-2, PARP ve kaspaz 9 ekspresyonunu azaltmış, p53 ve Bax ekspresyonunu arttırmıştır. Kolza tohumu protein fermentatlarından gelen peptitlerin, insan HepG2 karaciğer kanseri, insan MCF-7 meme kanseri hücre hatlarının çoğalmasını engellediği de gösterilmiştir. Yıllar boyunca, sadece birkaç çalışma antikanser peptidlerin normal hücelere karşı potansiyel sitotoksitesini test etmiştir. Bununla birlikte, gıda kaynaklı antikanser peptidlerin güvenliğini doğrulamak için bu tür çalışmaların çoğuna ihtiyaç vardır. Bugüne kadar, biyoaktif peptidlerin antikanser yeteneğinin çoğu, sadece in vitro olarak değerlendirilirken, bu tür peptitlerin in vivo aktiviteleri hakkındaki araştırmalar sınırlı sayıdadır (Banon ve ark., 2017).

5. GEREÇ VE YÖNTEM

5.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Tüm tez çalışmamız süresince kullandığımız kimyasal maddeler analitik saflıkta olup, aşağıda listelenmektedir.

Metil kırmızısı ($C_{15}H_{15}N_3O_2$) [Sigma 250198]

Bromkresol yeşili ($C_{21}H_{14}Br_4O_5S$) [Sigma 114359]

Sodyum hidroksit (NaOH) [Sigma S8045]

Borik Asit (H_3BO_3) [Sigma B6768]

Sodyum hidroksit (NaOH) [Sigma S8045]

Hidroklorik asit (HCl) [Sigma 320331]

Sülfürik asit (H_2SO_4) [Supelco 84727]

Potasyum sülfat (K_2SO_4) [Sigma P0772]

Bakır sülfat penta hidrat ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) [Sigma 209198]

Amil alkol ($CH_3(CH_2)_4OH$) [Sigma W205605]

Amonyum hidroksit (NH_4OH) [Sigma 221228]

Tris ($NH_2C(CH_2OH)_3$) [Roche TRIS-RO]

Sodyum dihidrojen fosfat dihidrat ($NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$) [Sigma 71500]

Disodyum hidrojen fofat dodekahidrat ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$) [Sigma 71650]

Pepsin [Sigma P0525000]

Tripsin [Merck 1.08444]

Papain [USP 1495005]

MTT, 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazolium tuzu ($C_{18}H_{16}BrN_5S$) [Sigma M5655]

SDS, Sodyum dodesil sülfat ($CH_3(CH_2)_{11}OSO_3Na$) [Supelco 74255]

EDTA, Etilen diamin tetra asetik asit ($(HO_2CCH_2)_2NCH_2CH_2N(CH_2CO_2H)_2$) [Sigma E6758]

FITC ile konjüge Annexin-V [Sigma A9210]

Propidyum iyodür ($C_{27}H_{34}I_2N_4$) [Sigma P4170]

Sodyum Klorür (NaCl) [Sigma 746398]

Potasyum Klorür (KCl) [Sigma P9333]

Kalsiyum Klorür (CaCl_2) [Sigma C1016]
HEPES ($\text{C}_8\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$) [Sigma H4034]
Disodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4) [Sigma 795410]
Potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4) [Sigma 795488]
Formik asit (HCOOH) [Sigma 33015]
Asetik asit (CH_3COOH) [Sigma 695092]

5.2. Kullanılan Cihazlar

Liyofilizatör– Taknosem, Toros 2/2
Etüv – Memmert, UN750
Kül fırını – Protherm, PAF 120/10
Azot-Protein yakma ünitesi - BEHR LABORTECHNIK, 625M
Azot-Protein distilasyon ünitesi - BEHR LABORTECHNIK, S2
Gerber santrifüjü – BIOBASE, BK-D5A
pH metre – Hanna, HI 2211
Santrifüj – HITACHI, CR22N
Manyetik karıştırıcı - ISOLAB
UV Spektrofotometre – Shimadzu, BioSpec Nano
Akış sitometre – BD Biosciences, FACSCalibur
Ultrasonik karıştırıcı – Bandelin, Sonoplus HD2070
Mikrosantrifüj - Beckman Coulter, Microfuge 20R
LC-Q-ToF-MS Sistemi – Waters, Xevo G2 XS

5.3. Keçi Sütü Örnekleri

Keçi sütü örnekleri, Trakya bölgesindeki veteriner kontrollü bir çiftlikte yetiştirilen Saanen-Maltız kırmısı türündeki keçilerden temin edilmiştir. Keçi sütleri sabah sağımından sonra +4 °C’de muhafaza edilerek, soğuk zincir bozulmadan 1-1,5 saat içerisinde teslim alınmıştır. Alındıktan sonra 6 parçaya ayrılmış ve analizler yapılmıştır.

Keçi sütü örnekleri, analizleri yapılmak üzere İstanbul Sabahattin Zaim Üniversitesi, Helal Gıda Ar-Ge Mükemmelliyet Merkezi Laboratuvarlarına getirildi. Alınan keçi sütü örneklerinde; Nem ve kuru madde tayini, kül tayini, toplam azot ve protein tayini, yağ tayini, pH tayini ve enerji değerinin hesaplanması yapılmıştır.

5.4. Keçi Sütü Örneklerinde Nem ve Kuru Madde Tayini (Güzeler ve ark., 2010)

Deneyin Prensibi

Süt örneklerinde nem ve kuru madde etüvde kurutma yöntemi kullanılarak yapılmaktadır. Belli bir sıcaklıkta süt örneklerindeki suyun uçurulması ve bunun sonucunda oluşan ağırlık kaybından nem miktarının bulunması ilkesine dayanır. Sütteki nem uçurulduktan sonra geriye kalan madde kuru maddedir.

Hesaplama

Nem ile kuru madde arasında

% Nem= 100 - % kuru madde bağıntısı vardır.

Deneyin Yapılışı

Sabit tartıma getirilen petri kutusuna 4-5 mL homojen hale getirilmiş örnekten tartılarak alınır (M_1). Petri kutusu 100 ±1 °C sıcaklıkta ve 3 saat süreyle etüvde tutulur. Süre sonunda kurutma işlemi bittiğinde tartım kabı, etüvden çıkarılır ve

desikatöre alınır. Tartım kabı, desikatör içerisinde oda sıcaklığına geldiğinde tartım yapılır (M_2).

Hesaplama

Nem ve Kuru Madde miktarları aşağıdaki formüllerden hesaplanır.

$$K : (M_2 - M_0) / (M_1 - M_0) \times 100$$

$$\% \text{ Nem} : 100 - K$$

K : Kuru madde miktarı, %

M_0 : Numune kabının darası, g

M_1 : Kurutmadan önce numune ve kabın ağırlığı, g

M_2 : Kurutmadan sonra numune ve kabın ağırlığı, g

5.5. Keçi Sütü Örneklerinde Kül Tayini (Ismail, 2017)

Deneyin Prensibi

Süt örneklerinde tuz ve mineral içeriğinin göstergesi kül miktarıdır. Belirli hacimdeki süt örneklerinin yüksek sıcaklıkta (525°C) yakılıp küllendirilerek kül miktarının saptanması ilkesine dayanır.

Deneyin Yapılışı

Süt numunesi 20°C 'de karıştırılarak homojenize edilir. Yağ parçaları tespit edilirse 38°C 'ye ısıtılır ve karıştırılır. Porselen krezeler temizlenip sabit tartıma getirildikten sonra tartılır (M_1). Keçi sütünden 3-5 mL alınıp kroze aktarılır, kroze tekrar tartılır (M_2). Krezeler bir gece 110°C 'de etüvde bekletilir. Daha sonra $525 \pm 25^\circ\text{C}$ 'deki kül fırınında 5-6 saat bekletilir. Fırından alınan krezeler desikatöre alınarak oda sıcaklığına gelene kadar bekletilir ve tartılır (M_3).

Hesaplama

Kül miktarı aşağıdaki formülden hesaplanır.

$$\text{g Kül}/100 \text{ g} = (M_2 - M_1) / (M_3 - M_1) \times 100$$

M₁: Kroze ağırlığı, g

M₂: Fırın öncesi kroze ve numunenin ağırlığı, g

M₃: Fırın sonrası kroze ağırlığı, g

5.6. Keçi Sütü Örneklerinde Kjeldahl Yöntemi ile Toplam Azot ve Protein Tayini (Kjeldahl, 1883)

Deneyin Prensibi

Bu metodun prensibi; yakma, destilasyon ve titrasyon işlemlerine dayanır. Örnek numunesi konsantre sülfürik asit, potasyum sülfat ve bakır II sülfat yardımı ile yakılarak homojenize edilir. Ortaya çıkan amonyak, sodyum hidroksit çözeltisi eşliğinde distile edilerek borik asit çözeltisi içerisine toplanır. Örnek içerisindeki azot miktarı hidroklorik asit ile titre edilerek tayin edilir.

Gerekli Çözeltiler

- **Metil kırmızısı indikatörü (2000 mg/L):** 100 mg metil kırmızısı bir miktar % 96'lık etanolde çözülerek hacmi 50 mL'ye tamamlanır.
- **Bromkresol yeşili indikatörü (2000 mg/L):** 500 mg bromokresol yeşili bir miktar % 96'lık etanolde çözülerek hacim 250 mL'ye tamamlanır.
- **Sodyum hidroksit çözeltisi, 1 M:** 20 gram NaOH bir miktar suda çözülür ve daha sonra hacmi 500 mL'ye tamamlanır.
- **Borik Asit (H₃BO₃) çözeltisi, % 4 (m/v):** 4 g Borik asit bir miktar suda çözülür ve üzerine 0,5 mL metil kırmızısı, 0,25 mL bromokresol yeşili ve 0,5 mL 1 M sodyum hidroksit çözeltiye eklenir ve hacim 100 mL'ye tamamlanır..
- **Sodyum hidroksit çözeltisi, % 40 (w/w):** 40 g sodyum hidroksit bir miktar suda çözüldükten sonra hacim 100 mL'ye tamamlanır.
- **Hidroklorik Asit Çözeltisi, 0.1 N:** Bir miktar distile su 1000 mL 'lik balon jojeye ilave edilip üzerine 8,28 mL derişik (% 37'lik, d=1,19 g/mL) HCl çözeltisinden eklenir. Biraz karıştırdıktan sonra yavaş yavaş 1000 mL ye distile su ile seyreltilir.

Deneyin Yapılışı

1 mL keçi sütü Kjeldahl tüpüne alınır. Üzerine 15 g potasyum sülfat ve 0,5 g bakır sülfat penta hidrat ve 15 mL sülfürik asit ilave edilir ve karıştırılır. Protein yakma fırını 420 °C 'ye çıkartılarak Kjeldahl tüpleri ısıtmaya başlanır. Sıvı kısım açık yeşil renk alana kadar kaynatmaya devam edilir. 2 saat süre ile yakma işlemine devam edilir. Yakma işlemi sonrasında Kjeldahl tüpü 15-25 dakika süre ile soğumaya bırakılır. Soğuyan tüp içerisine 75 mL su ilave edilerek karıştırılır. Tüp içerisine kaynama taşları ve çözeltiyi bazik hale getirecek miktarda (yaklaşık 70 mL) % 40'lık NaOH çözeltisi ilave edilir. Tüp, diğer ucunda 50 mL borik asit çözeltisi içeren erlen bağlı distilasyon ünitesine bağlanır. Distilasyon işlemine toplama kabında yaklaşık 150 mL distilat toplanana kadar devam edilir. Distilat 0,1 M HCl çözeltisi ile Bromkresol yeşili indikatörlüğünde renk maviden açık pembeye dönene kadar titre edilir ve sarfiyat kaydedilir.

Hesaplama

Protein miktarı aşağıdaki formüllerden hesaplanır.

$$\%, N = \frac{1,401 \times (V_a - V_b) \times M_{HCl}}{w}$$

% Protein= % N x F

N : Toplam azot miktarı, % (w/w)

V_a: Numune için harcanan asit miktarı, mL

V_b: Şahit deneme için harcanan asit miktarı, mL

M_{HCl}: HCl çözeltisinin molaritesi

w: Numune ağırlığı, g

F: Protein faktörü, 6,38

5.7. Keçi Sütü Örneklerinde Yağ Tayini (Moore ve Morse, 1926)

Deneyin Prensibi

Süt örneklerindeki yağ içeriği hariç diğer bileşenlerinin sülfürik asit yardımıyla parçalanıp açığa çıkan yağın amil alkol ile berrak hale getirilmesi prensibine dayanır.

Gerekli Çözeltiler

- **Derişik Sülfürik asit (H₂SO₄):** d:1,820 ±0,005 g/mL
- **Amil Alkol:** d: 0,815 ± 0,005 g/mL, ≥ % 98
- **Amonyum Hidroksit Çözeltisi, NH₄OH:** % 28 - 30 (w/w), d: 0,9 g/mL

Deneyin Yapılışı

10 mL sülfürik asit bütirometreye konulur. Süt 40 °C'ye ısıtılır, dikkatlice çalkalanarak 20 ±2 °C'ye soğutulur ve 10,75 mL arasında bütirometreye konulur. Son olarak 1 mL amil alkol bütirometreye transfer edilir. Bütirometrenin ağzı kısmı tıpa ile kapatılır. Tıpa üste gelecek şekilde 30 saniye hızlı bir şekilde çalkalanır. Bu ön çalkalamadan sonra homojen bir karışım olması için bütirometre 10 defa ters düz edilerek karıştırılır. Tıpa, yağ yüzdesi bütirometrenin okuma bölgesinde olacak şekilde sıkıştırılır. Bütirometre santrifüje konulur ve 4 dakika 400 x g 'de santrifüj edilir. Santrifüjleme işleminden sonra bütirometre 67 ±2 °C'deki su banyosunda 5 dakika bekletilir. Süre sonunda yağ kolonundaki yağ yüzdesi bütirometreden okunur.

Hesaplama

Bütirometreden okunan değerler ile numunedeki % yağ miktarı aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanır.

$$Y = B - A$$

Burada;

Y= Yağ miktarı, %

A= Sütunun alt ucunda okunan değer,

B= Sütunun üst ucunda okunan değer

5.8. Keçi Sütü Örneklerinde pH Tayini (Bates ve Ashok, 1973)

Deneyin Prensibi

Bu metodun prensibi, deney çözeltisine daldırılmış veya numuneye doğrudan yerleştirilmiş iki elektrot arasındaki potansiyel farkının ölçülmesi esasına dayanır.

Gerekli Çözeltiler

- Kalibrasyon Çözeltileri (pH : 4 – 7 – 10)

Deneyin Yapılışı

pH metre, pH'sı tam olarak bilinen ve ölçme sıcaklığında denenecek numunenin pH'sına mümkün olduğu kadar yakın olan kalibrasyon çözeltileri kullanılarak kalibre edilir. Numune, homojen hale gelinceye kadar dikkatli bir şekilde karıştırılır. Elektrot numuneye daldırılır ve ölçüm yapılır.

5.9. Keçi Sütü Örneklerinin Enerji Değerinin Hesaplanması (Tontisirin, 2003)

Deneyin Prensibi

Sütün sindirimi sırasında, içeriğinde bulunan proteinlerin, yağların ve karbohidratların yakılmasıyla ortaya çıkan enerjinin hesaplanması prensibine dayanır.

Enerji Değerinin Hesaplanması

Yukarıda belirtilen analitik metotlar ile süte enerji sağlayan bileşenlerin (protein, yağ, karbohidrat) miktarları sütün enerji değerini hesaplamak için uygun bir faktörle (Spesifik Atwater Faktörü) çarpılmıştır. Bileşenlerden herbirinin enerji değerleri toplanarak insanlar için beslenme enerji değerleri bulunur.

Spesifik Atwater Faktör Sistemi: Spesifik Atwater Sistemine göre her gıdaya ait protein, yağ ve karbonhidratın faktörleri farklıdır.

Hesaplama

Enerji ve karbohidrat değerinin hesaplanması için Spesifik Atwater Faktör Sistemi kullanılarak aşağıdaki şekilde hesaplanmıştır.

- **Karbohidrat:**

Karbohidrat, % = 100 - (% protein + % yağ + % nem + % kül)

- **Spesifik Atwater Faktör Sistemine Göre Enerji Hesabı:**

Enerji değeri (kcal/100 g) = [Fp x (% , P)] + [Fy x (% , Y)] + [Fk x (% , K)]

Fp(4,27), Fy(8,79), Fk(3,87) sırasıyla; protein, yağ ve karbohidrat faktörleri %P, %Y, %K ise sırasıyla; % protein, % yağ ve % karbohidrat, g/100 g

5.10. Keçi Sütündeki Protein Fraksiyonunun Ayrılması (Martínez-Maqueda ve ark., 2013)

Bu metodun prensibi, izoelektrik noktada proteinlerin çöktürülmesi işlemine dayanır.

Gerekli Çözeltiler

- **Sodyum Hidroksit Çözeltisi, 1 N:** 20 gram NaOH suda çözülür ve hacim 500 mL'ye tamamlanır.
- **Hidroklorik Asit Çözeltisi, 1 N:** Bir miktar distile su 1000 mL'lik balon jojeye ilave edilip üzerine 82,80 mL derişik (% 37'lik, d=1,19 g/mL) HCl çözeltisinden eklenir. Biraz karıştırdıktan sonra yavaş yavaş 1000 mL ye distile su ile seyreltilir.

Deneyin Yapılışı

Süt örneği distile su ile 1:15 oranında seyreltilir. Proteinlerin çözünmesini sağlamak için pH değeri 1 N NaOH çözeltisi kullanılarak pH 9,5'a getirilir. Daha sonra oda sıcaklığında manyetik karıştırıcı ile 1 saat karıştırılır ve 5000 x g de 30 dakika santrifüj edilir. Süpernatant alınarak 1 N HCl ile pH değeri pH 4,5'e getirilerek çökeltme sağlanır. Çökelek kısmı kazein, supernatant kısmı serum proteinlerini içerir. Kazein ve serum proteinleri daha sonra liyofilize edilerek saklanmıştır.

5.11. Süt Proteinlerinin Enzimatik Hidrolizi (Abubakar ve ark., 1998)

Deneyin Prensibi

Bu metodun prensibi, enzimatik reaksiyonlarla proteinlerin hidrolizini gerçekleştirip, peptitlerin oluşması işlemine dayanır.

Süt örnekleri; 0,2 mg/mL konsantrasyonlarındaki tripsin, pepsin ve papain enzimleri kullanılarak hidroliz edilmiştir. Enzimatik hidroliz deneyinde 3 farklı enzim ile çalışılmıştır. Bunlar; tripsin, pepsin ve papain enzimleridir.

Gerekli Çözeltiler

- **Tris HCl Tampon Çözeltisi, 0,02 M, pH 8,0:** 0,242 g Tris, 80 mL distile suda çözünür. 1 N HCl ile pH 8,0'e ayarlanarak hacim distile suyla 100 mL'ye tamamlanır.
- **Sodyum Fosfat Tampon Çözeltisi, 0,02 M, pH 7,0:** 0,39 g (10 mmol) $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ bir miktar distile suda çözülür, üzerine 0,90 g (10 mmol) $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ eklenip çözülerek, son hacim distile suyla 1000 mL'ye tamamlanır.
- **Hidroklorik Asit Çözeltisi, 0,05 N:** Bir miktar distile su 1000 mL'lik balon jojeye ilave edilip üzerine 4,14 mL derişik (% 37' lik, $d=1,19 \text{ g/mL}$) HCl çözeltisinden eklenir. Biraz karıştırdıktan sonra yavaş yavaş 1000 mL'ye distile su ile seyreltilir.
- **Enzim Çözeltileri, 0,2 mg/mL:** Pepsin, Tripsin ve Papain enzimleri 2 mg alınıp, 10 mL'ye tablo 8'de belirtilen her birine özel hazırlanan tampon çözeltilerle seyreltilerek hazırlanmıştır.

Deneyin Yapılışı

Keçi sütünden elde edilen kazein ve serum proteinleri fraksiyonları ayrıldıktan sonra enzimler ile ayrı ayrı muamele edilmiştir. Enzimatik reaksiyonlarda; protein fraksiyonları ve enzimler 100:5 (Protein : Enzim) oranında karıştırılarak inkübe edilmiştir. 3 farklı enzimin hazırlanışı Tablo 6'da belirtilmiştir

Tablo 6: Enzim çözeltilerinin hazırlanışı

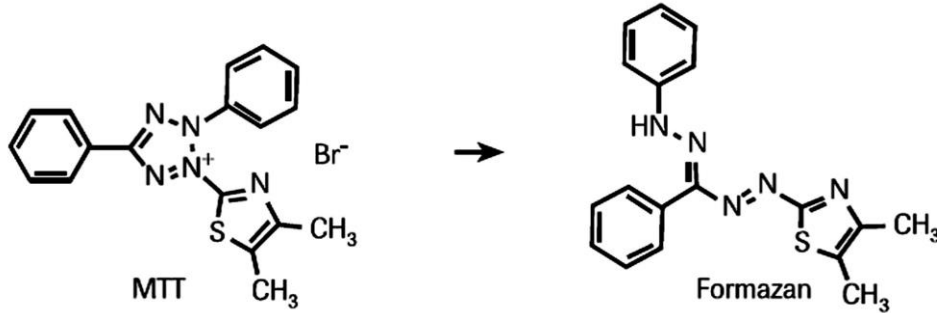
Enzim	Tampon Çözeltisi	pH	Sıcaklık
Pepsin, 0,2 mg/mL	0,05 N HCl	2	25 °C
Tripsin, 0,2 mg/mL	0,02 M Tris.HCl	8	37 °C
Papain, 0,2 mg/mL	0,02 M Sodyum Fosfat	7	37 °C

Sıcaklığı ayarlanabilir bir karıştırıcı kullanılarak protein fraksiyonları ve enzimler 12 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra enzim aktivitesini durdurmak için için tüm çözeltiler, 98 °C sıcaklıkta 10 dk inkübe edilmiştir. Hazırlanan süt hidrolizatları daha sonra MCF-7 meme kanseri hücreleri üzerine olan etkileri denenmek üzere -86 °C'ta saklanmıştır.

5.12. Meme Kanseri MCF-7 Hücrelerinde Canlılık Tayini (Gasparini ve ark., 2017)

Deneyin Prensibi

Bu metod, metabolik olarak aktif olan hücrelerde mitokondriyel süksinat dehidrogenaz aktivitesi sonucunda sarı renkli 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazolium tuzunun (MTT) kolorimetrik olarak tayin edilebilen, mor renkli formazan kristallerine dönüştürülmesi prensibine dayanır (Şekil 8).



Şekil 8: MTT-Formazan dönüşümü (Kuete ve ark., 2017).

Gerekli Çözeltiler

- **MTT İşaretleme Çözeltisi, 0,5 mg/mL:** 5 mg MTT alınır, % 10 'luk SDS çözeltisiyle 10 mL 'ye seyreltilir.
- **% 10 SDS (0,01M HCl içerisinde):** 10 g SDS bir miktar 0,01 M HCl içerisinde çözüldükten sonra hacmi 0,01 M HCl ile 100 mL' ye tamamlanır.
- **EDTA Çözeltisi, 0,53 mM:** 0,099 g EDTA alınır, bir miktar suda çözülerek hacmi 500 mL' ye tamamlanır.

- **Tripsin Çözeltisi, % 0,25 (w/v):** 1,25 g tripsin alınır, bir miktar 0,53 mM EDTA çözeltisinde çözülerek, hacmi 500 mL' ye tamamlanır.

Deneyin Yapılışı

75 cm² 'lik şişelerde çoğaltılan MCF-7 hücreleri tripsinize edilerek Neubauer lamında sayılır. 5x10³ MCF-7 hücresi 100 µL süspansiyon içinde 96 kuyulu plaklara ekilir. Her bir parametre için üç ekim yapılır. Plaklar, MCF-7 hücrelerinin yapışması ve hücre sayısının iki katına çıkarılması için 24 saat inkübatörde bekletilir. Kuyucuklardaki ortamlar atılır ve yerine farklı konsantrasyonlardaki (µg/mL) deney ortamları ilave edilir. Deney ortamları konsantrasyonunu 0 µg/mL içeren kuyucuklar kontrol, hücre içermeyen sadece deney ortamı içeren kuyucuklar kör olarak değerlendirilir. Plaklar 24 ve 48 saat inkübatörde bekletilir. Plak kuyucuklarına 10 µL MTT işaretleme çözeltisi ilave edilir. İnkübatörde 4 saat bekletilir. 100 µL Çözücüd çözeltisinden 100 µL ilave edilir. Gece boyu inkübatörde bekletilir. Absorbans değerleri plak okuyucuda 550 nm dalga boyuna karşı okunur. Hesaplama yapılırken 0 µL konsantrasyon içeren kuyucuklardan (kontrol hücreleri) okunan absorbans değeri % 100 kabul edilir ve diğer örneklerin absorbanslarından rölatif canlılık değerleri hesaplanır.

Hesaplama

$$\text{Yüzde Canlılık} = [\text{Örnek ABS}_{\text{ortalama}} / \text{Kontrol ABS}_{\text{ortalama}}] \times 100$$

ABS: Absorbans

5.13. Meme Kanseri MCF-7 Hücrelerinde Akış Sitometresiyle Apoptoz Tayini (Wlodkowica ve ark., 2009)

Deneyin Prensibi

Bu metodun prensibi, hücrelerin sıvı içerisinde tekli akışının sağlanması ve ardından her bir hücrenin lazer ile uyarılıp eksitasyonun ölçülmesi işlemine dayanır.

Gerekli Çözeltiler

- **FITC ile Konjüge Annexin-V (BD)**
- **50 µg/mL Propidyum Iodür (PI) :** 50 µg PI bir miktar distile suda çözülerek 1 mL'ye tamamlanır.
- **Sodyum Klorür (NaCl) Çözeltisi, 1,5 M:** 87,75 g NaCl alınır, bir miktar distile suda çözülerek 1000 mL'ye tamamlanır.
- **Potasyum Klorür (KCl) Çözeltisi, 50 mM:** 3,73 g KCl alınır, bir miktar distile suda çözülerek 1000 mL'ye tamamlanır.
- **Kalsiyum Klorür (CaCl₂) Çözeltisi, 18 mM:** 2,00 g CaCl₂ alınır, bir miktar distile suda çözülerek 1000 mL'ye tamamlanır.
- **Sodyum Hidroksit (NaOH) Çözeltisi, 1 M:** 20 gram NaOH bir miktar suda çözülür ve daha sonra hacmi 500 mL'ye tamamlanır.
- **HEPES Tampon Çözeltisi, 100 mM, pH 7,4:** 2,38 g HEPES uygun bir behere tartılır. Üzerine 80 mL distile sui lave edilip karıştırılır. pH ölçümü yaparak kontrol edilir. Yaklaşık 5,00 civarında gözlemlenen pH üzerine bir miktar 1 M NaOH çözeltinin içerisine ilave edilir. pH 7,40 olana kadar takip edilir. pH 7,40 olduğunu görünce hacim distile suyla 100 mL 'ye tamamlanır.
- **Bağlama Tamponu:** 100 mM HEPES (pH: 7,4), 1,5 M NaCl, 50 mM KCl, 18 mM CaCl₂
- **Fluoresan Reaktif:** 100 µL bağlama tamponu, 5 µL Annexin-V, 10 µL PI
- **EDTA Çözeltisi, 0,53 mM:** 0,099 g EDTA alınır, bir miktar suda çözülerek hacmi 500 mL 'ye tamamlanır.
- **Tripsin Çözeltisi, % 0,25 (w/v):** 1,25 g tripsin alınır, bir miktar 0,53 mM EDTA çözeltisinde çözülerek, hacmi 500 mL 'ye tamamlanır.
- **Hidroklorik Asit Çözeltisi, 0,1 N:** Bir miktar distile su 1000 mL 'lik balon jojeye ilave edilip üzerine 8,28 mL derişik (%37' lik, d=1,19) HCl çözeltisinden eklenir. Biraz karıştırdıktan sonra yavaş yavaş 1000 mL ye distile su ile seyreltilir.
- **Fosfat Tamponu, pH: 7,40:** 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,44 g Na₂HPO₄ ve 0,24 g KH₂PO₄ tartılarak bir miktar suda çözülerek 800 mL 'ye tamamlanır. 0,1 N HCl çözeltisiyle pH 7,40 ayarlanır ve hacim distile suyla 1000 mL 'ye tamamlanır.

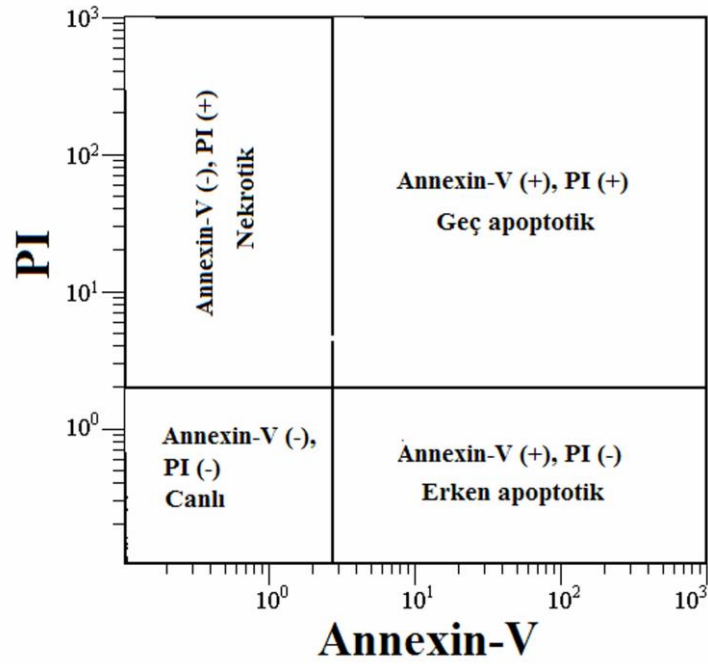
Deneyin Yapılışı

75 cm² şişelerde çoğaltılan MCF-7 hücreleri tripsinize edilir ve hücreler Neubauer lamında sayılır. Hazırlanan 1x10⁵ hücre/mL süspansiyonundan 2 mL 6' lı plak kuyucuklarına ekilir. Böylece her bir kuyucuğa 2x10⁵ hücre ekilmiş olur. Hücrelerin yapışması ve hücre sayısının iki katına çıkması için plaklar 24 saat boyunca 37°C 'ta inkübe edilir. Kuyucuklardaki ortamlar atılır ve yerine farklı konsantrasyonlarda keçi sütü içeren deney ortamları ilave edilir. 24 saat inkübe edilir. Plak kuyucuklarının içerikleri ayrı ayrı tüplere aktarılır. Kuyucukların içerisindeki hücreler 1 mL tripsin ile kaldırılır ve hücreler kendi tüplerine aktarılır. Kuyucuklar 1 mL PBS ile yıkanır ve kendi tüplerine aktarılır. 200 x g de 5 dk santrifüj edilir. Süpernatant atılır ve her bir pellet 115 µL floresan reaktifi ile süspanse edilir. Sonra, tüpler 15 dk karanlıkta inkübe edilir. Her bir tüpe 400 µL PBS ilave edilir ve akış sitometrede FL1(Yeşil-530/30) ve FL2(Sarı-585/42) filtreleri kullanılarak okuma gerçekleştirilir.

Hesaplama

Hücreler, her bir hücrenin Annexin-V ve PI ışıma miktarına göre diyagrama yerleştirilir (Şekil 9). Annexin-V ve PI sinyalinin algılanmadığı hücreler canlı, sadece PI sinyalinin algılandığı hücreler nekrotik, sadece Annexin-V sinyalinin algılandığı hücreler apoptotik ve hem Annexin-V hem de PI sinyalinin algılandığı hücreler geç apoptotik olarak değerlendirilir. Diyagramdaki her bir bölgeye düşen hücre sayısının (Hücre sayısı bölge) sayılan toplam hücre sayısına oranından yüzde değerler hesaplanır.

$$\text{Yüzde Hücre} = (\text{Hücre sayısı bölge} / \text{Toplam Hücre}_{\text{sayısı}}) \times 100$$



Şekil 9: Annexin-V apoptoz analizi için akış sitometri diyagramı (Özkaya, 2009)

5.14. Keçi Sütü Proteinlerinde Protein ve Peptid Tayini (Wisniewski ve ark., 2009)

Deneyin Prensibi

Bu metodun prensibi, protein moleküllerinin ileri düzey kromatografik sistemler ve kütle dedektörü kullanılarak protein/peptid yapılarının kütlelerinin ölçülmesi işlemine dayanır.

Gerekli Çözeltiler

Formik Asit Çözeltisi, % 0,1 (v/v): 0,105 mL formik asit (% 95 saflıkta) alınır, distile suyla 100 mL 'ye seyreltilir.

Deneyin Yapılışı

Protein ekstraksiyonu için hücre pelleti Universal Protein Extraction (UPX) Kit (Expedeon-44101) ve proteaz inhibitör kokteyli (Thermo Sci.-87785) ile karıştırıldı. Örnekler, 5x10 sn döngü ve döngüler arası 30 sn buz üstünde soğutma yapılacak

şekilde sonike edildi. Sonikasyon sonrası örnekler buz üstünde bekletilerek soğutulduktan sonra 200 x g hızda, 95°C’de 10 dk, karıştırılarak, kaynatıldı. 22.000 x g’de 10 dk santrifüj edildi. Süpernatant alınarak, örnekler yeni tüplere alındı. Peptit eldesi ticari kit (FASP Protein Sindirim kiti, Expedeon-44250) ve tripsin enzimi (Pierce-90057) kullanılarak yapıldı. Örneklerin son konsantrasyonu 200 ng/µL olacak şekilde % 0,1 formik asit ile dilue edildi ve cihaza uygun tüplere aktarıldı.

Analizlere başlamadan önce, analizlerin gerçekleştirildiği Xevo G2-XS Q TOF (Waters) cihazına özgü olan MassLynx programı (V4.1-Waters) aracılığı ile dedektör ve kalibrasyon ayarları yapıldı. Metod SONAR ve hassasiyet (sensitivite) moduna getirilerek, oluşturulan triptik peptitler hidrofobikliklerine göre HSS T3 (Waters-186008818) kolonunda asetonitril gradienti ile fraksiyonlanlarına ayrıldı. Asetonitril % 5-50 aralığında arttırılarak peptitlerin kolondan ayrılması sağlandı ve elektrospray iyonlaşması sonucu kütle spektrometresinde analiz edildi. Analiz esnasında, m/z 50-1950 aralığında tanımlanabilecek peptitler için veri toplandı. 0,7 sn kadar kütle spektroskopisi (MS) analizi gerçekleştirildi ve peptidin bütünü hakkında bilgi toplandı. Ardından 0,7 sn kadar MS/MS analizi yapıp peptidin parçalanması ve amino asit dizisi (Dizi) bilgisinin elde edilmesi sağlandı. Protein tanımlamaları yapılırken UniProt protein veri bankasındaki keçi sütüne ait protein Dizi bilgisi kullanıldı. Progenesis QIP yazılımı (Waters-2018) kullanarak protein tanımlaması yapıldı.

5.15. Meme Kanseri MCF-7 Hücrelerinde Protein ve Peptid Tayini (Wisniewski ve ark., 2009)

Deneyin Prensibi

Bu metodun prensibi, hücre bünyesinde bulunan proteinlerin çöktürülerek protein moleküllerinin ileri düzey kromatografik sistemler ve kütle dedektörü kullanılarak protein/peptit yapılarının kütlelerinin ölçülmesi işlemine dayanır.

Gerekli Çözeltiler

Formik asit çözeltisi, % 0,1 (v/v): 0,105 mL formik asit (% 95 saflıkta) alınır, distile suyla 100 mL 'ye seyreltilir.

Deneyin Yapılışı

MCF-7 meme kanseri hücreleri 22.000 x g'de 10 dk santrifüj edildi. Süpernatant alınarak, örnekler yeni tüplere alındı. Peptit eldesi FASP Protein Digestion Kit (Expedeon-44250) ve tripsin enzimi (Pierce-90057) kullanılarak yapıldı. Örneklerin son konsantrasyonu 200 ng/μL olacak şekilde % 0,1 formik asit ile dilue edildi ve cihaza uygun tüplere aktarıldı.

Analizlere başlamadan önce, analizlerin gerçekleştirildiği Xevo G2-XS Q TOF (Waters) cihazına özgü olan MassLynx programı (V4.1-Waters) aracılığı ile dedektör ve kalibrasyon ayarları yapıldı. Metod SONAR ve hassasiyet (sensitivite) moduna getirilerek, oluşturulan triptik peptitler hidrofobikliklerine göre HSS T3 (Waters-186008818) kolonunda asetonitril gradienti ile fraksiyonlanlarına ayrıldı. Asetonitril % 5-50 aralığında arttırılarak peptitlerin kolondan ayrılması sağlandı ve elektrospray iyonlaşması sonucu kütle spektrometresinde analiz edildi. Analiz esnasında, molekül ağırlığı 50-1950 aralığında tanımlanabilecek peptitler için veri toplandı. 0,7 sn kadar MS analizi gerçekleştirildi ve peptidin bütünü hakkında bilgi toplandı. Ardından 0,7 sn kadar MS/MS analizi yapıp peptidin parçalanması ve amino asit dizisi (Dizi) bilgisinin elde edilmesi sağlandı. Protein tanımlamaları yapılırken UniProt protein veri bankasındaki MCF-7 hücrelerine ait protein Dizi bilgisi kullanıldı. Progenesis QIP yazılımı (Waters-2018) kullanarak protein tanımlaması yapıldı.

5.16. İstatiksel Analiz

Çalışmamızda ortalama ve standart sapma değerleri SPSS 20 paket istatistiksel analiz programı kullanılarak belirlenmiştir.

6. BULGULAR

6.1. Keçi Sütü Nem, Kül, Kuru Madde, Protein, Yağ ve Enerji Analizi

Keçi sütünün nem, kül, protein, yağ ve enerji analizi ile tayin edilen sonuçları Tablo 7’de verilmiştir.

Tablo 7: Keçi sütünün nem, kül, kurumadde, protein, yağ ve enerji değerleri

Süt analizleri		
Analizler	Ort	SD
pH	6,70	0,06
Nem, % (m/m)	87,20	0,34
Kuru Madde, % (m/m)	12,80	0,34
Kül, % (m/m)	1,01	0,06
Protein, % (m/m)	3,84	0,06
Yağ, % (m/m)	4,00	0,32
Enerji, kcal/100g	66,84	1,20

Ort: Ortalama SD: Standart Sapma, n=6

6.2. Süt Protein Fraksiyonlarının Protein Miktar Tayini

Keçi sütünden elde edilen protein kazein ve serum fraksiyonlarının protein yüzdeleri (m/m) Tablo 8’de verilmiştir. Buna göre kazein fraksiyonunun protein değerleri, süt serum protein değerlerinden yüksek olan değeri istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.05$).

Tablo 8: Kazein ve serum protein oranları

	KazeinFraksiyonu		Serum Fraksiyonu	
	Ort	SD	Ort	SD
Protein (% m/m)	85,91*	2,55	46,94	3,17

Ort: Ortalama SD: Standart Sapma, * $p<0.05$, n=6

6.3. Serum Proteinini Fraksiyonlarının Pepsin ile Enzimatik Muamelesi Sonrası Peptit Dizileri

Keçi sütü serum proteinlerinin pepsin ile sindirimi sonucunda açığa çıkan peptit fraksiyonlarının LC-Q-TOF-MS ile yapılan peptit dizi analizinde 13 adet molekül ağırlıkları 582,3090 ile 1681,8280 Da arasında değişen peptit saptanmıştır (Tablo 9).

Tablo 9: Serum proteinlerinin pepsinle elde edilmiş peptit dizileri

Pepsin-Serum Proteinleri (PW)		
Sıra	Dizi	Molekül ağırlığı, Da
1	DTDYKKYL	1044,5246
2	DTDYKKYLL	1157,6030
3	VRTPEVDKEAL	1255,6854
4	VRTPEVDKEA	1124,5873
5	KIDALNENKVL	1255,7217
6	VRTPE	582,3090
7	KPTPEGNL	854,4474
8	VLDTDYKKYL	1256,6616
9	VLDTDYKKYL	1256,6649
10	KHLKTGAEMKASEDL	1656,8546
11	SIIRNLNDQVL	1283,7087
12	DTHKSEIAHRFNDL	1681,8280
13	EAQPTDASAQF	1221,5250

A: Alanin R: Arjinin N: Asparajin D: Aspartat C: Sistein Q: Glutamin
E: Glutamat G: Glisin H: Histidin I: İzolösin K: Lizin L: Lösin M: Metiyonin
F: Fenilalanin P: Prolin S: Serin T: Treonin W: Triptofan Y: Tirozin V: Valin

6.4. Serum Proteinini Fraksiyonlarının Papain ile Enzimatik Muamelesi Sonrası Peptit Dizileri

Keçi sütü serum proteinlerinin papain ile sindirimi sonucunda açığa çıkan peptit fraksiyonlarının LC-Q-TOF-MS ile yapılan peptit dizi analizinde 5 adet molekül ağırlıkları 828,3762 ile 3188,5625 Da arasında değişen peptit tespit edilmiştir (Tablo 10).

Tablo 10: Serum proteinlerinin papainle elde edilmiş peptit dizileri

Papain-Serum Proteinleri (PW)		
Sıra	Dizi	Molekül ağırlığı, Da
1	ALPMHIR	836,4693
2	TPEVDKEALEK	1257,6474
3	WENGCAQK	1120,4304
4	IDALNENKVLVLDTDYK	1962,0299
5	NLENTVK	816,4354

A: Alanin R: Arjinin N: Asparajin D: Aspartat C: Sistein Q: Glutamin E: Glutamat G: Glisin H: Histidin I: İzolösin K: Lizin L: Lösin M: Metiyonin
F: Fenilalanin P: Prolin S: Serin T: Treonin W: Triptofan Y: Tirozin V: Valin

6.5. Serum Proteini Fraksiyonlarının Tripsin ile Enzimatik Muamelesi Sonrası Peptit Dizileri

Keçi sütü serum proteinlerinin tripsin ile sindirimi sonucunda açığa çıkan peptit fraksiyonlarının LC-Q-TOF-MS ile yapılan peptit dizi analizinde 39 adet molekül ağırlıkları 687,3549 ile 2332,0772 Da arasında değişen peptit elde edilmiştir (Tablo 11).

Tablo 11: Serum proteinlerinin tripsinle elde edilmiş peptit dizileri

Tripsin-Serum Proteinleri					
Sıra	Peptid dizileri	Molekül ağırlığı, Da	Sıra	Peptid dizileri	Molekül ağırlığı, Da
1	VLVLDTDYK	1064,5905	21	KENINELSK	1073,5788
2	TPEVDKEALEK	1257,6675	22	ENINELSK	945,4805
3	IDALNENK	915,4738	23	EDVPSER	830,3764
4	TKIPAVFK	902,5664	24	YNVPQLEIVPK	1298,7273
5	ALPMHIR	836,4719	25	SAEEQLHSMK	1158,5417
6	VYVEELKPTPEGNLEILLQK	2311,2932	26	ANEGLTWNLSK	1231,6009
7	IDALNENK	916,4607	27	CVPNSKEK	960,4682
8	VLVLDTDYKK	1192,6763	28	LRPVAAEIVGTEK	1445,7816
9	EALEKFDK	978,4966	29	ETTVFENLPEK	1305,6356
10	TPEVDKEALEK	1239,6509	30	SLFPPASEVVVKP	1269,7061
11	VLDTDYKK	980,5229	31	NLENTVK	817,4206
12	LVLDTDYKK	1093,6105	32	NATLGSEETTEHAPSDASTTEGK	2332,0772
13	TPEVDK	687,3549	33	NLENTVK	817,4243
14	VLDTDYK	852,4189	34	VLNTNIDGRR	1156,6288
15	TIDMESTEVFTK	1399,6587	35	QYKIPDWFLNR	1536,7655
16	NAGPFTPTVNR	1172,6009	36	QYKIPDWFLNR	1536,7648
17	QEKMAIHPR	1238,6201	37	LVMFQRR	948,5363
18	ISQYYQK	928,4684	38	LAQFVEHWK	1156,6080
19	ALNEINQFYQK	1366,6830	39	FQSEEQQTDELQDK	1980,8572
20	EQLSTSEENSK	1250,5583			

A: Alanin R: Arjinin N: Asparajin D: Aspartat C: Sistein Q: Glutamin E: Glutamat G: Glisin H: Histidin I: İzolösin K: Lizin L: Lösin M: Metiyonin
F: Fenilalanin P: Prolin S: Serin T: Treonin W: Triptofan Y: Tirozin V: Valin

6.6. Kazein Proteinini Fraksiyonlarının Pepsin ile Enzimatik Muamelesi Sonrası Peptit Dizileri

Keçi sütü kazein fraksiyonunun pepsin ile sindirimi sonucunda açığa çıkan peptit fraksiyonlarının LC-Q-TOF-MS ile yapılan peptit dizi analizinde 10 adet molekül ağırlıkları 935,5074 ile 1897,0388 Da arasında değişen peptit tespit edilmiştir (Tablo 12).

Tablo 12: Kazein proteinlerinin pepsin elde edilmiş peptit dizileri

Pepsin-Kazein		
Sıra	Dizi	Molekül ağırlığı, Da
1	YPWKPTSKSEL	1334,6821
2	CDELGIMIWQDF	1526,6528
3	EKSAKVYFRTVEL	1584,8701
4	DYRWIAL	935,5074
5	TVRVHTWSSL	1184,6021
6	QYPYQGPIVL	1176,5862
7	TEEEKNRLNF	1278,6243
8	KQEKNMAIHPRKEKL	1897,0388
9	SSGLGNVPRPYQL	1445,7206
10	QIMSSPWGEMYNIF	1684,7427

A: Alanin R: Arjinin N: Asparajin D: Aspartat C: Sistein Q: Glutamin E: Glutamat G: Glisin H: Histidin I: İzolösin
K: Lizin L: Lösin M: Metiyonin F: Fenilalanin P: Prolin S: Serin T: Treonin W: Triptofan Y: Tirozin V: Valin

6.7. Kazein Proteinini Fraksiyonlarının Papain ile Enzimatik Muamelesi Sonrası Peptit Dizileri

Keçi sütü kazein fraksiyonunun papain ile sindirimi sonucunda açığa çıkan peptit fraksiyonlarının LC-Q-TOF-MS ile yapılan peptit dizi analizinde 23 adet molekül ağırlıkları 828,3762 ile 3188,5625 Da arasında değişen peptit tespit edilmiştir (Tablo 13).

Tablo 13: Kazein proteinlerinin papainle elde edilmiş peptit dizileri

Papain-Kazein		
Sıra	Dizi	Molekül ağırlığı, Da
1	EENEILPPDHLNGVK	1734,8404
2	LEMDGHLNK	1055,5149
3	EENEILPPDHLNGVKLEMDGHLNK	2741,3056
4	EIIRDLQDGDGK	1415,6741
5	IDDMQKLKVVENFINESMR	2308,1439
6	ALSGPGLVRMVTICADSITK	2088,1095
7	GIIFNNPALWK	1385,7563
8	LKVVENFINESMR	1577,8289
9	HKMEHVSSEEPINIFQEIYK	2560,2362
10	TNAIPYVRYL	1208,6577
11	FAWPQYLK	1051,5461
12	EGNPAHQKQPMIAVNQELAYFYPQLFR	3188,5625
13	FVVAPFPEVFR	1306,7084
14	YLGYLEQLLR	1266,6999
15	HFWGLRVRGQHTK	1620,8585
16	YSQVLANGLDNKLR	1590,8261
17	ARHPHPL	963,5244
18	SRYPSTYK	828,3762
19	QFTPEKFFGIFNK	1617,8089
20	LVANLPKDYMITLK	1649,8932
21	TPSLTPPTR	1065,5802
22	LDLSNVQSKCGSK	1492,7338
23	YPVEPFTESSQLTLTDVEK	2182,0736

A: Alanin R: Arjinin N: Asparajin D:Aspartat C: Sistein Q:Glutamin E:Glutamat G:Glisin H:Histidin I:İzolösin K: Lizin L:Lösin M:Metiyonin F:Fenilalanin P:Prolin S:Serin T:Treonin W:Triptofan Y:Tirozin V:Valin

6.8. Kazein Proteini Fraksiyonlarının Tripsin ile Enzimatik Muamelesi Sonrası Peptit Dizileri

Keçi sütü kazein fraksiyonunun tripsin ile sindirimi sonucunda açığa çıkan peptit fraksiyonlarının LC-Q-TOF-MS ile yapılan peptit dizi analizinde 23 adet molekül ağırlıkları 828,3762 ile 3188,5625 Da arasında değişen peptit tespit edilmiştir (Tablo 14).

Tablo 14: Kazein proteinlerinin tripsin ile elde edilmiş peptit dizileri

Tripsin-Kazein		
Sıra	Dizi	Molekül ağırlığı, Da
1	ALNEINQFYQK	1366,7082
2	EQLSTSEENSK	1250,5694
3	NAGPFTPTVNR	1173,5866
4	NMAIHPR	837,4285
5	NANEEEYSIR	1223,5499
6	ALNEINQFYQK	1367,6799
7	TIDMESTEVFTK	1399,6607
8	ALNEINQFYQK	1367,6801
9	YNVPQLEIVPK	1298,7426
10	ENINELSK	927,4754
11	HPINHRGLSPEVPNENLLR	2191,1673
12	KYNVPQLEIVPK	1426,8243
13	VYVEELKPTPEGNLEILLQK	2311,3044
14	IDALNENK	915,4778
15	VLVLDTDYK	1064,5835
16	YPVEPFTESQSLTLTDVEK	2182,1001
17	VKETMVPK	930,5179
18	FQSEEQQTEDELQDK	1980,8676
19	LMELGHK	826,4382
20	SPRQPQNQNPK	1308,6635
21	YIPIQYVLSR	1250,7048

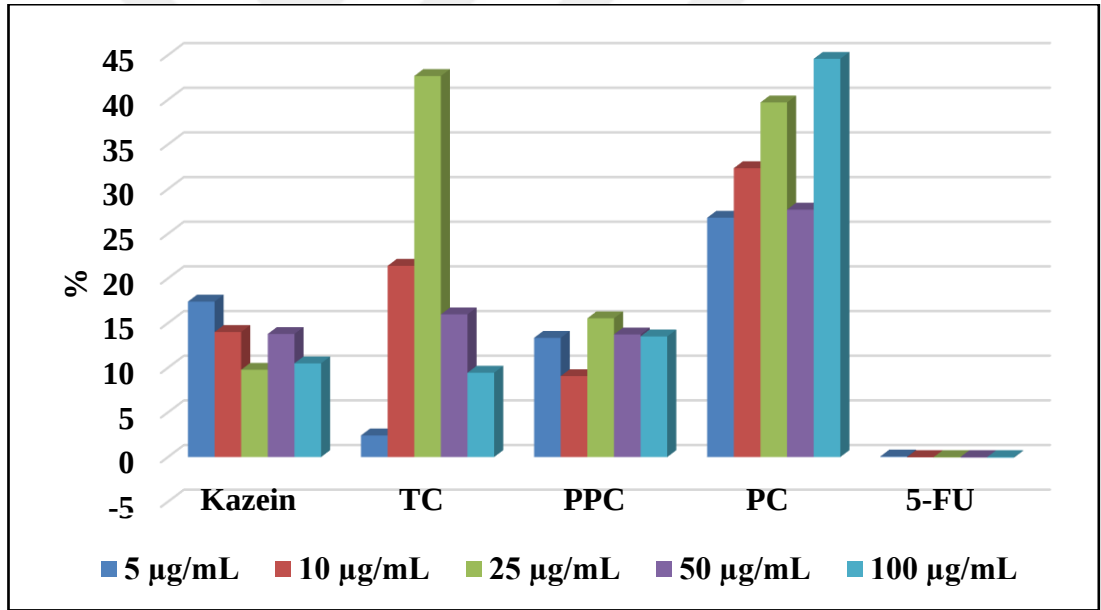
A: Alanin R: Arjinin N: Asparajin D: Aspartat C: Sisrein Q: Glutamin E: Glutamat G: Glisin
H: Histidin I: İzolösin K: Lizin L: Lösin M: Metiyonin F: Fenilalanin P: Prolin S: Serin
T: Treonin W: Triptofan Y: Tirozin V: Valin

6.9. Kazein Proteini ve Kazein Proteini Peptid Fraksiyonlarının MCF-7 Meme Kanseri Hücrelerinin Canlılığı Üzerine Etkisi

MCF-7 hücrelerinin, keçi sütünden elde edilen kazein ve kazeinin peptit fraksiyonları ile 24-48 saat inkübasyonu sonrasında canlılık testi sonuçları incelendiğinde 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda 50 µg/mL kazein ve fraksiyonlarının en yüksek hücre ölümüne (apoptotik+ nekrotik) neden olduğu görülmüştür (Tablo 15, 16).

Tablo 15: Kazein proteinleri ve kazein proteinleri peptit fraksiyonlarının MCF-7 meme kanseri hücreleri ile 24 saatlik inkübasyon sonunda canlılık testi (MTT)

MCF-7 Yüzde Canlılık Oranı (24 saat)					
Konsantrasyon (µg/mL)	Kazein	TC	PPC	PC	5-FU
5	17,40	2,42	13,34	26,79	0,062
10	14,00	21,41	9,06	32,34	-0,034
25	9,77	42,66	15,53	39,70	-0,051
50	13,78	15,98	13,72	27,70	-0,070
100	10,49	9,44	13,51	44,58	-0,074

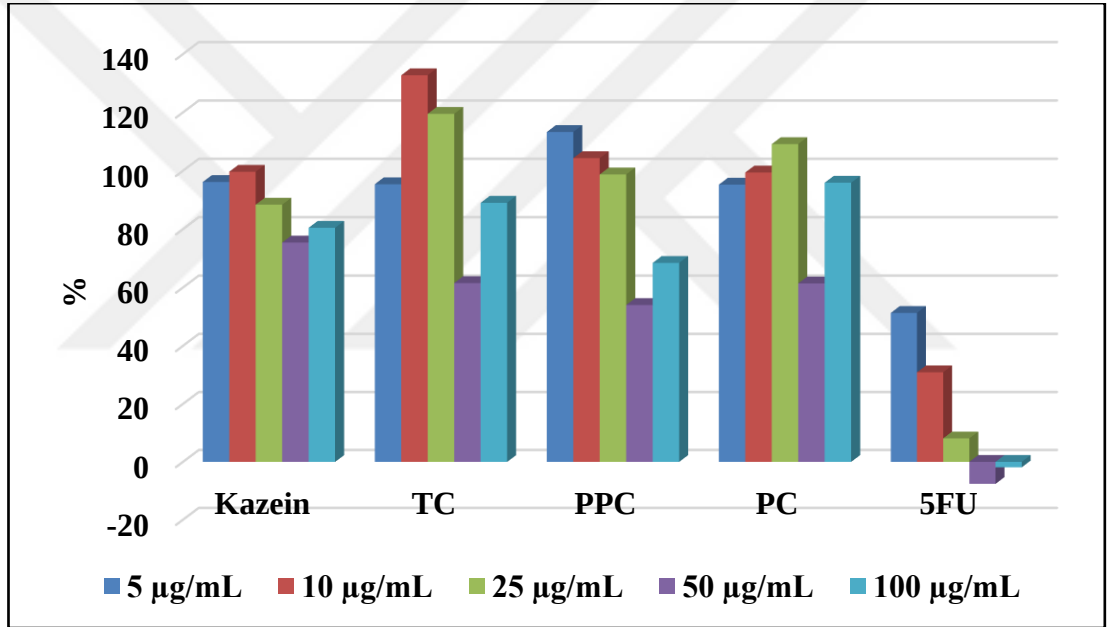


Şekil 10: Kazein proteinleri ve kazein proteinleri peptit fraksiyonları ile tedavi edilen MCF-7 meme kanseri hücreleri 24 saatlik % canlılık değerleri

TC: Tripsinle muamele edilmiş kazein fraksiyonu, PPC: Papainle muamele edilmiş kazein fraksiyonu, PC: Pepsinle muamele edilmiş kazein fraksiyonu, 5-FU: 5-Florourasil (Kontrol)

Tablo 16: Kazein proteinleri ve kazein proteinleri peptit fraksiyonlarının MCF-7 meme kanseri hücreleri ile 48 saatlik inkübasyon sonunda canlılık testi (MTT)

MCF-7 Yüzde Canlılık Oranı (48 saat)					
Konsantrasyon (µg/mL)	Kazein	TC	PPC	PC	5-FU
5	96,17	95,40	113,29	95,27	51,30
10	99,68	132,75	104,35	99,42	30,95
25	88,39	119,52	98,77	109,14	8,11
50	75,42	61,54	54,02	61,41	-7,59
100	80,48	89,04	68,42	95,91	-1,88



Şekil 11: Kazein proteinleri ve kazein proteinleri peptit fraksiyonları ile tedavi edilen

MCF-7 meme kanseri hücreleri 48 saatik % canlılık değerleri

TC: Tripsinle muamele edilmiş kazein fraksiyonu, PPC: Papainle muamele edilmiş kazein fraksiyonu, PC: Pepsinle muamele edilmiş kazein fraksiyonu, 5-FU: 5-Florourasil (Kontrol)

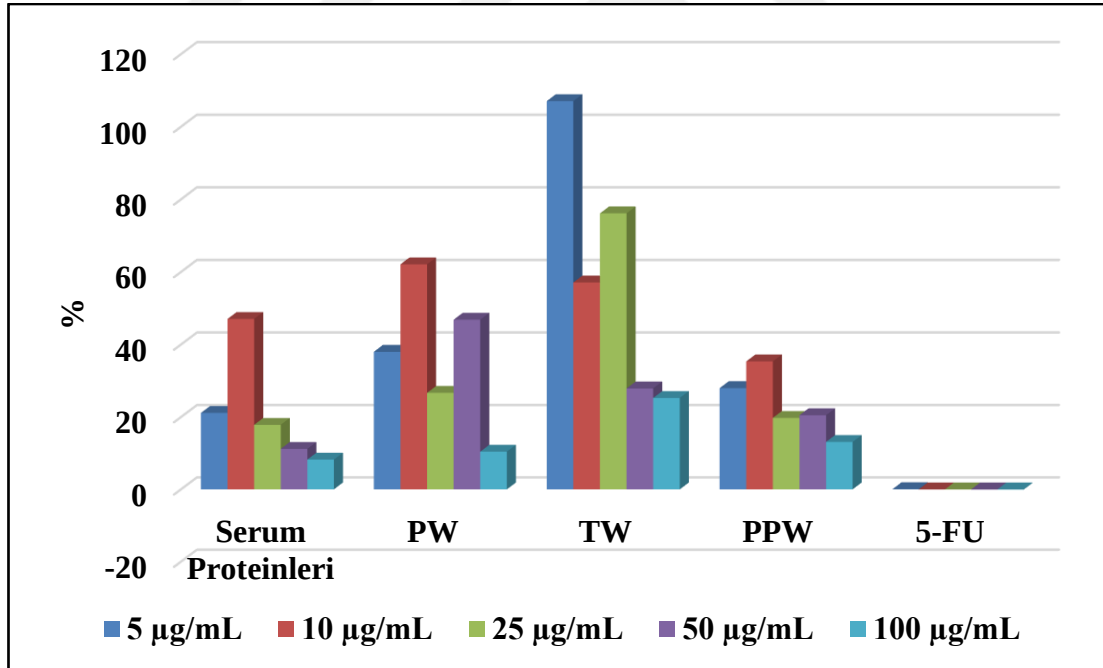
6.10. Serum Proteinini ve Serum Proteinini Peptid Fraksiyonlarının MCF-7 Meme Kanseri Hücrelerinin Canlılığı Üzerine Etkisi

MCF-7 hücrelerinin, keçi sütünden elde edilen serum ve serum proteininin peptit fraksiyonları ile 24-48 saat inkübasyonu sonrasında canlılık testi sonuçları incelendiğinde 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda 50 µg/mL serum proteinini ve

fraksiyonlarının en yüksek hücre ölümüne (apoptotik + nekrotik) neden olduğu görülmüştür (Tablo 17, 18).

Tablo 17: Serum proteinleri ve serum proteinleri peptit fraksiyonlarının MCF-7 meme kanseri hücreleri ile 24 saatlik inkübasyonu sonunda canlılık testi (MTT)

MCF-7 Yüzde Canlılık Oranı (24 saat)					
Konsantrasyon (µg/mL)	Serum	PW	TW	PPW	5-FU
5	21,14	37,99	107,05	28,00	0,062
10	47,05	62,09	57,10	35,36	-0,034
25	17,84	26,68	76,15	19,76	-0,051
50	11,20	46,83	27,90	20,50	-0,070
100	8,23	10,43	25,25	13,12	-0,074

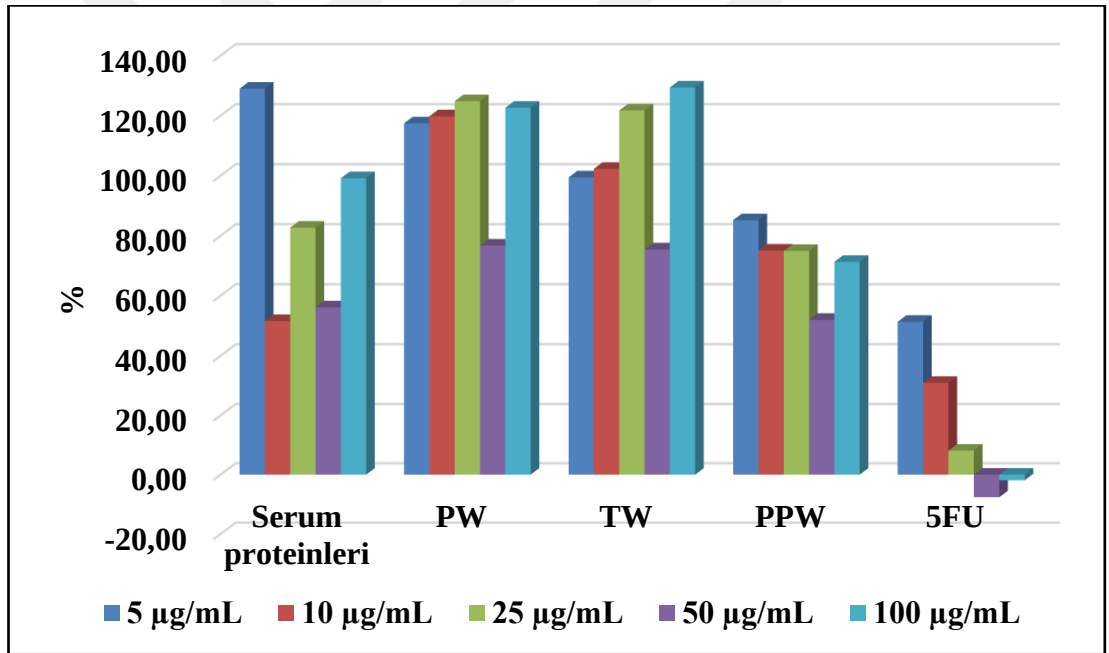


Şekil 12: Serum proteinleri ve serum proteinleri peptit fraksiyonları ile tedavi edilen MCF-7 meme kanseri hücreler 24 saatlik % canlılık değerleri

PW: Pepsinle muamele edilmiş serum proteinleri fraksiyonu, **TW:** Tripsinle muamele edilmiş serum proteinleri fraksiyonu, **PPW:** Papainle muamele edilmiş serum proteinlerinin fraksiyonu, **5-FU:** 5-Flourourasil (Kontrol)

Tablo 18: Serum proteinleri ve serum proteinleri peptit fraksiyonlarının MCF-7 meme kanseri hücreleri ile 48 saatlik inkübasyonu sonunda canlılık testi (MTT)

MCF-7 Yüzde Canlılık Oranı (48 saat)					
Konsantrasyon (µg/mL)	Serum	PW	TW	PPW	5-FU
5	128,99	117,44	99,42	85,15	51,30
10	51,56	119,78	102,27	75,03	30,95
25	82,68	124,84	121,73	74,90	8,11
50	56,10	76,72	75,42	51,95	-7,59
100	99,16	122,63	129,38	71,27	-1,88

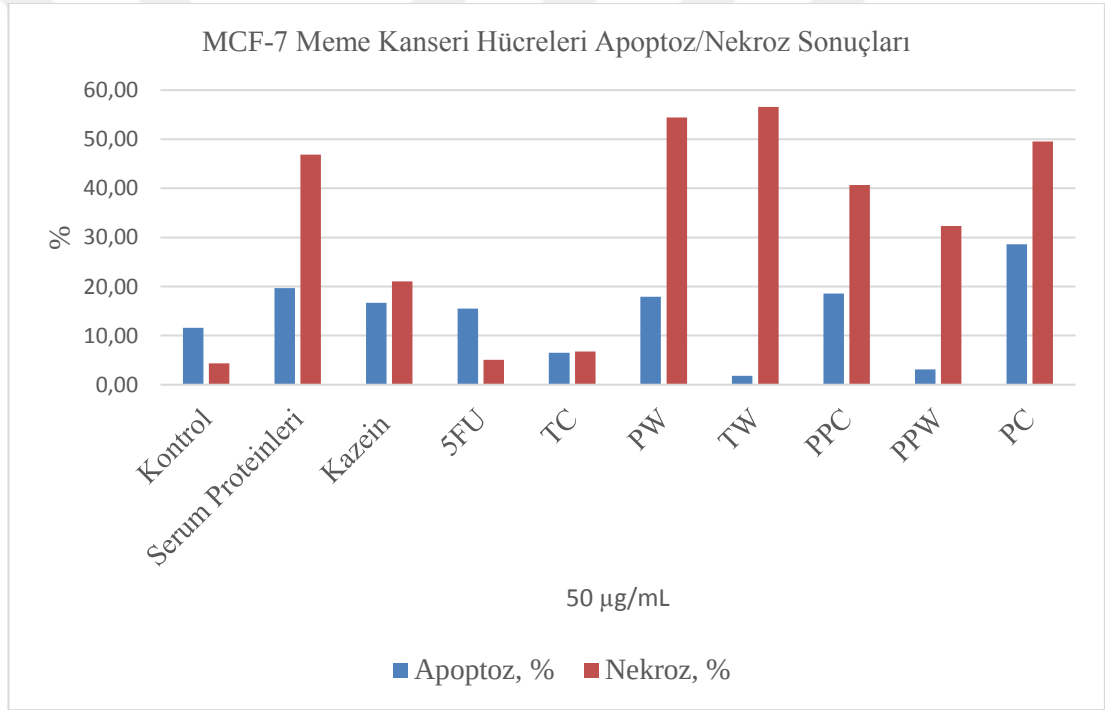


Şekil 13: Serum proteinleri ve serum proteinleri peptit fraksiyonları ile tedavi edilen MCF-7 meme kanseri hücreleri 48 saatlik % canlılık değerleri

PW: Pepsinle muamele edilmiş serum proteinleri fraksiyonu, **TW:** Tripsinle muamele edilmiş serum proteinleri fraksiyonu, **PPW:** Papainle muamele edilmiş serum proteinlerinin fraksiyonu, **5-FU:** 5-Flourourasil (Kontrol)

6.11. Keçi Sütünde Serum ve Kazein Proteinleri Peptit Fraksiyonları ile Tedavi Edilen MCF-7 Meme Kanseri Hücrelerinde Hücre Ölüm Modu Tayini

MCF-7 hücrelerinin keçi sütü serum ve kazein proteinleri ve bu proteinlerin peptit fraksiyonları ile muamelesi sonucu canlılık testi ile hücre ölümleri belirlenmiştir. Fakat canlılık testi sonucunda belirlenen inkübasyon süresi (24 saat) ve konsantrasyondaki (50µg/ml) peptit fraksiyonları ile tedavi edilmesi sonucu ölü MCF-7 hücrelerinin hangi ölüm modunu seçtiğinin tespiti flow sitometri kullanılarak yapıldı. Hücrelerde en yüksek apoptotik ölüm ve yüksek nekrotik ölüm, PC fraksiyonu ile gerçekleşmiştir. Sonuçlar Şekil 12’de verilmiştir.

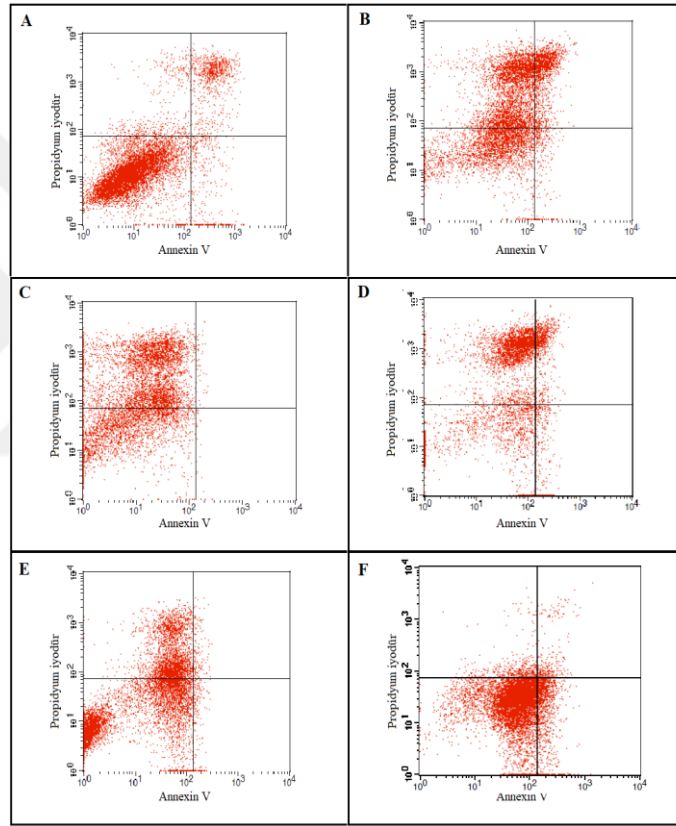


Şekil 14: Serum ve kazein proteinleri ve bu proteinlerin peptit fraksiyonları ile tedavi edilen MCF-7 meme kanseri hücrelerinin apoptotik ve nekrotik ölüm sonuçları.

Kontrol: Fosfat Tamponu, **TC:** Tripsinle muamele edilmiş kazein fraksiyonu, **PPC:** Papainle muamele edilmiş kazein fraksiyonu, **PC:** Pepsinle muamele edilmiş kazein fraksiyonu, **PW:** Pepsinle muamele edilmiş serum proteinleri fraksiyonu, **TW:** Tripsinle muamele edilmiş serum proteinleri fraksiyonu, **PPW:** Papainle muamele edilmiş serum proteinlerinin fraksiyonu, **5-FU:** 5-Flourourasil (Kanser tedavi kontrol)

6.12. Keçi Sütü Serum Proteinleri ve Peptid Fraksiyonlarının MCF-7 Meme Kanser Hücrelerine Etkisi Sonucunda Apoptotik ve Nekrotik Ölüm Sonuçlarının Çift Parametre Akış Dağılım Diyagramı

Serum proteini ve peptit fraksiyonlarının MCF-7 hücreleri ile muamelesinden elde ettiğimiz sonuçlarda 50 µg/ml konsantrasyonundaki TW, PW, serum proteinleri, ve PPW peptit fraksiyonları yüksek düzeyde nekrotik ölümüne neden olurken, apoptotik ölüm daha düşük gözlemlenmiştir.



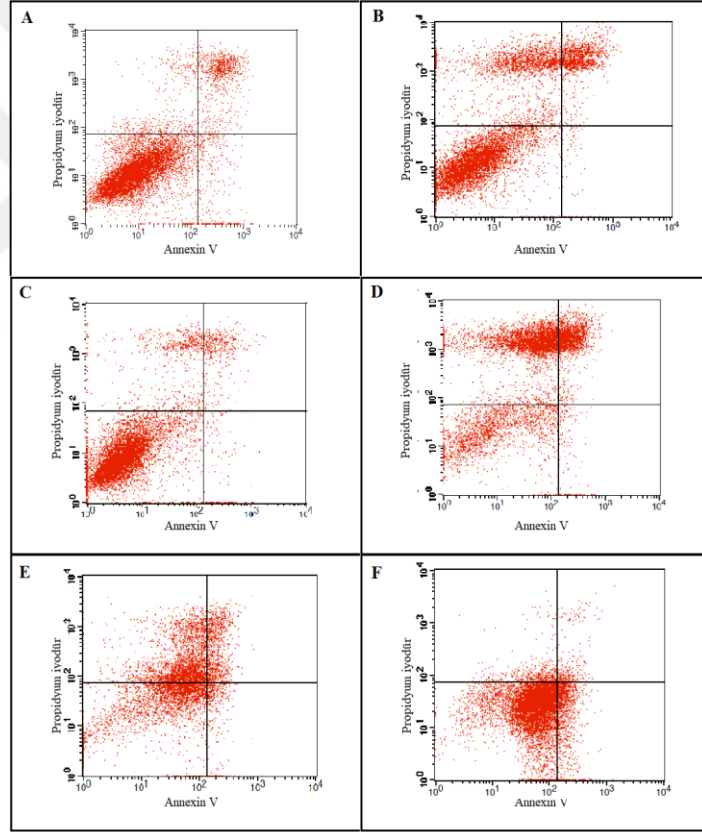
Şekil 15: MCF-7 hücrelerinin serum proteinleri ve serum proteinlerinin peptit fraksiyonları ile muamelesi sonucu apoptotik ve nekrotik ölüm akış diyagramları.

A: Kontrol Hücreleri, **B:** Serum Proteinleri, **C:** TW, **D:** PW, **E:** PPW, **F:** 5-FU. Diyagramın X eksenı FITC ışımına göre, Y eksenı ise PI ışımına göre dağılımlarını göstermektedir. Her bir kırmızı nokta tek bir hücreyi ifade etmektedir. Yüzde değerler diyagramın ilgili bölgesindeki hücre sayısının sayılan hücrelerin tamamına oranını belirtmektedir. (X eksenı Annexin V, Y eksenı PI sinyalini gösterir, Alt sol panel (Annexin V-/PI-) canlı hücreleri gösterir; sağ alt panel (Annexin V +/PI-) erken apoptotic hücreler; sağ üst panel (Annexin V +/PI +) geç apoptotic hücreler; sol üst panel (Annexin V-/PI +) nekrotik hücreler).

6.13. Keçi Sütü Kazein Proteinleri ve Peptid Fraksiyonlarının MCF-7 Meme Kanseri Hücrelerine Etkisi Sonucunda Apoptotik ve Nekrotik Ölüm Sonuçlarının Çift-Parametre Akış Dağılım Diyagramı

Kazein proteini ve kazein peptit fraksiyonlarının MCF-7 hücreleri ile muamelesinden elde ettiğimiz sonuçlarda 50 µg/ml konsantrasyonundaki PC, PPC peptit fraksiyonlarıyla meydana gelen nekrotik ölüm, tripsinin neden olduğu nekrotik ölüme oranla daha düşüktür.

Ayrıca, PC peptit fraksiyonu MCF-7 hücrelerinde en yüksek apoptotik ölüme neden olurken, TC peptit fraksiyonu ile en düşük apoptotik ve nekrotik ölüm gözlemlenmiştir.



Şekil 16: MCF-7 hücrelerinin kazein proteinleri ve kazein proteinlerinin peptit fraksiyonları ile muamelesi sonucu apoptotik ve nekrotik ölüm akış diyagramları.

A: Kontrol Hücreleri, B: Kazein Proteinleri, C: TC, D: PC, E: PPC, F: 5-FU. Diyagramın X eksenini FITC ışığına göre, Y eksenini ise PI ışığına göre dağılımlarını göstermektedir. Her bir kırmızı nokta tek bir hücreyi ifade etmektedir. Yüzde değerler diyagramın ilgili bölgesindeki hücre sayısının sayılan hücrelerin tamamına oranını belirtmektedir. (X eksenini Annexin V, Y eksenini PI sinyali gösterir, Alt sol panel (Annexin V-/PI-) canlı hücreleri gösterir; sağ alt panel (Annexin V+/PI-) erken apoptotic hücreler; sağ üst panel (Annexin V+/PI+) geç apoptotic hücreler; sol üst panel (Annexin V-/PI+) nekrotik hücreler).

6.14. Ölü MCF-7 Hücrelerinde Protein Karakterizasyonu

Peptitlerle muamele sonucunda ölen MCF-7 hücrelerinden protein ekstraksiyonu yapılarak elde edilen peptitler LC-Q-TOF-MS ile karakterize edildiğinde en az 3 peptit zinciri, protein veri bankasında yer alan proteinlerin peptit zincirleri ile karşılaştırılması sonucunda 1043 tane eşleşme tespit edilmiştir. Tespit edilen proteinlerin konsantrasyonları, protein veri bankasındaki canlı MCF-7 hücre proteinleri referans alındığında hücre içinde konsantrasyonu artmış veya azalmış (aktivitesi artan - aktivitesi azalan) olarak belirlenmiştir. Bu proteinlerin hücrelerde katıldıkları biyokimyasal süreçler göz önünde bulundurularak enerji metabolizması, apoptoz, sinyal iletimi ve antioksidan sistemde yer almalarına göre kategorize edilmiştir (Tablo 19-24).

Tablo 19: Hücre enerji metabolizmasında görevli aktivitesi artan (up-regüle olan) proteinler

Sıra	Proteinler
1	ATP sentaz alt birimi beta_ mitokondrial
2	Dolikil-difosphooligosakarit - protein glikosiltransferaz alt birimi
3	ATP sentaz alt birimi alfa_ mitokondrial
4	ADP / ATP translokazı 2
5	ADP / ATP translokazı 3
6	Malat dehidrojenaz_ mitokondrial
7	Sitrat sentaz_ mitokondrial
8	Sodyum / potasyum taşıyıcı ATPaz alt birimi alfa-1
9	Glukosidaz 2 alt birim beta
10	Sodyum / potasyum taşıyıcı ATPaz alt birimi alfa-2
11	Enoil-CoA hidrataz_ mitokondrial
12	Sitrat sentaz_ mitokondrial
13	Sodyum / potasyum taşıyıcı ATPaz alt birimi alfa-1
14	Glukosidaz 2 alt birim beta
15	Sodyum / potasyum taşıyıcı ATPaz alt birimi alfa-2
16	Enoil-CoA hidratase_ mitokondrial
17	Bifonksiyonel koenzim A sentaz
18	Asetil-CoA karboksilaz 1
19	Hidroksiasil-koenzim A dehidrojenaz_ mitokondri
20	N-asetilglukosamin-6-sülfataz
21	ATP bağımlı 6-fosfofruktokinaz_ karaciğer tipi
22	Glutamat dehidrojenaz 1_ mitokondrial
23	Aldehit dehidrojenaz_ mitokondrial
24	L-laktat dehidrojenaz B zinciri
25	Piruvat dehidrojenaz E1 bileşeni alt birimi beta_ mitokondriyal
26	Dolikil-difosphooligosakarit - protein glikosiltransferaz 48 kDa alt birimi
27	Fosfatidilinositol 4-kinaz alfa Varsayılan heksokinaz HKDC1
28	ATP bağlayıcı kaset alt ailesi F üyesi 3
29	Glikojen fosforilaz beyin formu Glutamat dehidrojenaz 2 mitokondrial
30	Glikojen fosforilaz beyin formu
31	Glutamat dehidrojenaz 2_ mitokondrial
32	ATPaz ailesi AAA alanı içeren protein 2
33	Glutasyon S-transferaz kappa 1 Karboksipeptidaz D
34	Beta-galaktosidaz
35	ATP sentaz alt birimi delta_ mitokondrial
36	Süksinat dehidrojenaz [ubiquinone] flavoprotein subunit mitokondrial
37	Glikojen fosforilaz_ beyin formu
38	Glutamat dehidrojenaz 2_ mitokondrial
39	ATPaz ailesi AAA alanı içeren protein 2
40	Glutasyon S-transferaz kappa 1 Karboksipeptidaz D
41	Beta-galaktosidaz
42	ATP sentaz alt birimi delta_ mitokondrial
43	Süksinat dehidrojenaz [ubiquinone] flavoprotein subunit mitokondrial
44	Aktif olmayan fosfolipaz D5
45	Sitokrom b-c1 kompleks alt birimi 1_ mitokondri
46	Sitokrom b-c1 kompleks alt birimi 1_ mitokondri

Tablo 20: Hücre enerji metabolizmasında görevli aktivitesi azalan (down-regüle olan) proteinler

Sıra	Proteinler
1	Yağ asidi sentaz
2	Piruvat kinaz
3	Fosfoglisarat kinaz 1
4	Gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenaz
5	Fruktoz-bifosfat aldolaz A
6	L-laktat dehidrojenaz A zinciri
7	transketolaz
8	Glutasyon S-transferaz Mu 3
9	Glikoz-6-fosfat 1-dehidrojenaz
10	ATP-sitrat sentaz
11	Glukoz-6-fosfat izomeraz
12	Karnitin O-palmitoiltransferaz 1_ kas izoformu
13	Galektin-1
14	Glukoz-6-fosfat izomeraz
15	Karnitin O-palmitoiltransferaz 1_ kas izoformu
16	Galektin-1
17	Glukozamin-6-fosfat izomeraz 1
18	Sikline bağımlı kinaz 1
19	Piruvat dehidrojenaz E1 bileşeni alt birimi alfa_ somatik form_ mitokondri
20	Triokinaz / FMN siklaz
21	UDP-glukoz: glikoprotein glukosiltransferaz 1
22	İnsülin düşürücü enzim
23	ATP sentaz birleştirme faktörü 6_ mitokondrial
24	İnsülin düşürücü enzim
25	ATP sentaz birleştirme faktörü 6_ mitokondrial
26	ADP-şeker pirofosfatazı
27	Gliserol-3-fosfat fosfataz
28	L-laktat dehidrojenaz C zinciri
29	Piruvat dehidrojenaz E1 bileşeni alt birimi alfa_ testis-spesifik form_ mitokondrial
30	Glutasyon sentetazı
31	ATP bağlayıcı kaset alt aile E üyesi 1
32	İnsülin düşürücü enzim
33	ATP sentaz birleştirme faktörü 6_ mitokondrial
34	ADP-şeker pirofosfataz
35	Gliserol-3-fosfat fosfataz
36	İzositrat dehidrojenaz [NADP] sitoplazmik
37	L-laktat dehidrojenaz C zinciri
38	Piruvat dehidrojenaz E1 bileşeni alt ünite alfa_ testis-spesifik form_ mitokondrial
39	Glutasyon sentetazı
40	ATP bağlayıcı kaset alt aile E üyesi 1

Tablo 21: Hücre elektron transportu ve ksenobiyotik metabolizmasında görevli olan ve aktivitesi artan (up-regüle olan) proteinler

Sıra	Proteinler
1	Elektron transferi flavoprotein alt birimi beta
2	Elektron transferi flavoprotein alt birimi beta
4	Karbonil redüktaz [NADPH] 1
5	NADPH - sitokrom P450 redüktazı
6	NADPH - sitokrom P450 redüktazı
7	NADPH - sitokrom P450 redüktazı

Tablo 22: Hücre ksenobiyotik metabolizması ile ilişkili olan ve aktivitesi azalan (down- regüle olan) proteinler

Sıra	Proteinler
1	Flavin redüktaz (NADPH)
2	NAD (P) transhidrojenaz_ mitokondrial
3	Nikotinamid fosforibosiltransferaz

Tablo 23: Hücre ölümünde görevli aktivitesi artan (up-regüle olan) proteinler

Sıra	Proteinler
1	Programlanmış hücre ölümü proteini 4
2	Programlanmış hücre ölümü proteini 6

Tablo 24: Hücre ölümünde görevli aktivitesi azalan (down-regüle olan) proteinler

Sıra	Proteinler
1	Apoptoz inhibitörü
2	Lizozom ile ilişkili membran glikoprotein 1
3	Apoptoz inhibitörü 5
4	Lizozom ile ilişkili membran glikoprotein 1
5	Lizozom ile ilişkili membran glikoprotein 1

7. TARTIŞMA VE SONUÇ

Besinsel özellikleri ve sağlık üzerine etkileri nedeniyle biyoaktif peptidlere olan ilgi günümüzde giderek artmaktadır. Bu nedenle de çeşitli besin kaynaklarından elde edilen biyoaktif peptit temelli yeni fonksiyonel bileşenlerin eldesi üzerine yapılan çalışmaların sayısı son yıllarda önemli ölçüde artmıştır (Bhat ve ark., 2015; Gu ve ark., 2015; Irshad ve ark., 2015; Karami ve ark., 2015). Biyoaktif peptitler, süt, fermente ürünler, bitki ve deniz proteinleri gibi birçok gıdada mevcuttur. Molekül başına genellikle 2-20 amino asit içeren biyoaktif peptidler, bazı durumlarda 20'den fazla amino asit de içerebilir veya 6000 Da'dan daha düşük molekül ağırlığına da sahip olabilirler (Sarmadi ve İsmail 2010). Doğal olarak oluşan peptitler sindirim süreçlerinden bağımsız olarak üst gastrointestinal kanalda aktiviteler gösterebilirler. İnsan vücudunda sindirim sonrası oluşan biyoaktif peptitler ise bağırsaktan absorbe edilebilir ve doğrudan kan akışına girebilir, bu da *in vivo* biyoyararlanımlarını ve hedef bölgedeki fizyolojik etkilerini göstermelerini sağlar. Sindirim sonrası oluşan biyoaktif peptitler, bulundukları ana protein dizileri içerisinde etkisizdirler, ancak enzimatik, kimyasal ve mikrobiyal hidrolize uğradıklarında serbest hale geçerek etkilerini gösterebilirler (Kim ve Wijesekara 2010; Di Bernardini ve ark., 2011). Kim ve Wijesekara (2010), bugüne kadar istenilen işlevsel özelliklere sahip biyoaktif peptidlerin üretilmesinde en etkili ve güvenilir yöntemin enzimatik sindirim olduğu belirtilmektedir. Bu çalışmamızın ilk aşamasında keçi sütü kazein ve serum fraksiyonları ayrı ayrı pepsin, papain ve tripsin enzimleri ile inkübe ederek çeşitli süt peptid fraksiyonları elde edildi. Biyoaktif peptitlerin, vücudumuzda bazı fizyolojik fonksiyonları değiştirerek kronik hastalıkları önleyebildiği yapılan araştırmalarda gösterilmiştir (Karami ve Akbari-Adergani, 2019). Yapılan çalışmalarda biyoaktif peptidlerin besin olarak kullanımına ek olarak antihipertansif, opioid agonistleri veya antagonistleri, immünomodülatör, antitrombotik, antioksidan, antikanser ve antimikrobiyal aktivitelere sahip olduğu tespit edilmiştir (Elias ve ark. 2008). Sütün içerisinde yapısal olarak bulunan endojen aktif peptidlerin varlığı, sütü besinsel olarak değerli bir biyoaktif peptit kaynağı haline getirmiştir. Bu nedenle çalışmamızda keçi sütü proteinlerinin endojen biyoaktif peptidleri ve pepsin, papain ve tripsin enzimleri ile enzimatik sindiriminden elde edilen biyoaktif peptidlerinin

MCF-7 meme kanseri hücreleri üzerine etkileri incelenerek, hücreler üzerinde antikanserojen etkisi araştırılmıştır.

Son yıllarda yapılan çalışmaların çoğu, insan sütündeki endojen peptitlerin tanımlanması üzerine gerçekleştirilirken (Dinges ve ark., 2017; Su ve ark., 2017; Gan ve ark., 2019), az sayıda çalışma, geniş tüketime yönelik sütün endojen peptidomik profiline odaklanmıştır. Çalışmamızda keçi sütündeki hem endojenik hem de enzimatik sindirim sonrası elde edilen peptidlerin peptidomik profili elde edilmiştir. Baum ve arkadaşları (2013a) ham inek sütündeki süt peptidlerinin ön fraksiyonlanmasından sonra, ham inek sütünde 248 endojen peptit (Baum ve ark., 2013b) ve 18 varsayılan fosfopeptit tanımlamıştır. Dallas ve arkadaşları (2014) da sığır kolostrumunun serum fraksiyonunda 245'ten fazla endojen peptit tanımlamışlardır. Daha sonra yapılan iki çalışma ise eşek sütü örneklerinde endojen peptitlerin araştırılmasına odaklanmıştır (Piovesena ve ark., 2015; Zenezini ve ark., 2016). Her ne kadar bu çalışmalar süt örneklerinde doğal olarak oluşan biyoaktif peptitlerin araştırılması konusunda ümit verici sonuçlar göstermiş olsa da, dört kalıntıdan daha uzun amino asit sekansları bildirmişlerdir (Koskinen ve ark., 2011).

Çalışmamızda kullandığımız keçi sütünün kimyasal ve fiziksel özelliklerinin yaptığımız analizler sonucunda normal aralıkta olduğunu gösterdikten sonra keçi sütünün kazein ve serum fraksiyonlarının liyofilizasyon sonrası protein tayininde keçi sütünü kazein fraksiyonunun protein konsantrasyonunun serum fraksiyonunun protein konsantrasyonundan daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Keçi sütü serum protein fraksiyonunun pepsin ile muamelesinden sonra molekül ağırlıkları 582,3090 ile 1681,8280 Da arasında olan ve 5 -15 amino asit içeren, 13 adet peptit, papain ile muamelesinden sonra molekül ağırlıkları 816,4354 ile 1962,0299 Da olan ve 7-17 amino asit içeren 5 adet peptit ve tripsin ile muamelesinden sonra molekül ağırlıkları 687,3549 ile 2332,0772 Da arasında olan, 7-23 amino asit içeren, 39 adet peptit tespit edilmiştir. Keçi sütü kazein fraksiyonunun pepsin ile muamelesinden sonra molekül ağırlıkları 935,5074 ile 1897,0388 Da arasında olan ve 7-15 amino asit içeren, 10 adet peptit; papain ile muamelesinden sonra molekül ağırlıkları 828,3762 ile 3188,5625 Da olan, 7-27 amino asit içeren 23 adet peptit ve tripsin ile muamelesinden sonra molekül ağırlıkları 826,4382 ile 2311,3044 Da arasında olan, 7-20 amino asit içeren, 21 adet peptit tespit edilmiştir.

Kanser tedavisinde klasik yaklaşım, DNA bağlama veya mikrotübül engelleyici kemoterapiler yoluyla hücre döngüsüne ve kanser hücrelerinin mitozuna müdahale etmektir (Dickens ve Ahmed, 2018). Bu strateji genellikle etkinlikten yoksundur ve normal dokular için de toksisite ile sonuçlanır (Klaeger ve ark., 2017). Bununla birlikte, bu bileşikler genellikle sınırlı sayıda özgüllük ve seçicilik göstermekte, birçok hedef dışı etkiye neden olmaktadır (Scott ve ark., 2016).

Günümüzde kanser tedavisinde kullanımı onaylanmış olan ilaçların, kanserin ilerlemesinde rol aldığı bilinen moleküllerin nispeten küçük bir yüzdesi üzerinde etkili olmaktadır (Santos ve ark., 2016). Bu nedenle, şu anda kullanılmayan ve birçok durumda tümör oluşumunun itici motorları olarak kabul edilen kanser hücrelerinin bileşenlerini spesifik olarak, seçici ve etkili bir şekilde hedefleyebilen yeni bir ilaç nesline ihtiyaç duyulmaktadır.

Antikanser peptidleri, spesifik hedeflere yönelik antikanser ilaçların keşfi ve üretimi için umut verici yeni bir alternatiftir. Bu peptidler küçük moleküller olduklarından, kanserli hücrelere kolayca nüfuz edebilir ve geleneksel ilaçlarla birleştirildiğinde seçici olarak neoplazik hücreleri hedefleyebilir ve sağlıklı dokuda doğru aktiviteleri azaltabilirler (Gaspar ve ark., 2013).

E-Kobon ve arkadaşları (2016), *Achatina fulica* mukusundan HPLC ile ayrılan fraksiyonlarının içindeki küçük peptid içeriğinin antikanser özelliğini MCF-7 meme kanseri hücre dizileride göstermiştir. Kütle spektrometrik ve biyoinformatik analizler sonucunda bu peptitlerin, yeni antikanser ilaç gelişimi için umut verici hedefler olduklarını belirtmişlerdir.

Sirpu Natesh ve arkadaşları (2018), deniz süngerisi ile ilişkili bakterilerin, apoptozu indükleyen ve kanser hücresi ölümüne neden olacak sitotoksik biyopeptid yapılı metabolitleri içerdiğini ve deniz doğal ürünlerinin potansiyel bir ilaç kaynağı olduğunu belirtmişlerdir.

Crusca ve arkadaşları (2018), akrep zehirinden elde ettikleri peptidlerin antikanserojen etkiye sahip olduğunu belirtmişlerdir. Akrep zehirinden elde ettikleri pantinin peptidlerinin, meme ve prostat adenokarsinom hücrelerine karşı antikanser aktivite sergilediğini ve bu yeni küçük katyonik antikanser peptidlerin rasyonel

tasarımı için potansiyel kemoterapötikler oluşturulurken model olarak kullanılabileceğini belirtmişlerdir.

Yuan ve arkadaşları (2018), yeşil ağaç kurbağası konak savunma peptidlerinden olan kaerini radyoaktif iyot ile işaretlediklerinde anti kanser özelliğe sahip olduğunu, meme kanserini tedavi etmek için kullanılabileceğini ve aynı zamanda tedaviye cevabın eşzamanlı görüntüleme ile izlenebileceğini belirtmişlerdir.

Yang ve arkadaşları (2007) mitokondriyal adenin nükleotit translokaz 3 (ANT3) enziminin, MCF-7 hücrelerinde apoptoz sırasında mitokondriyal geçirgenliği düzenleyen bir bileşen olduğunu belirtmişlerdir. ANT3'ün ayrıca, MCF-7 hücrelerinde TNF- α ve oksidatif stres ile indüklenen hücre ölümüne neden olduğu ve apoptozu indüklediğini göstermişlerdir. ANT3 içermeyen mutant hücrelerde gözlenen TNF- α kaynaklı apoptoz direncinin mitokondriyal membran potansiyeli ve sitokrom c salınımının düzenlenmesindeki bir eksiklik ile ilişkili olabileceğini de öne sürmüşlerdir. Yang ve arkadaşlarının bulgularına benzer olarak çalışmamızda keçi sütü kaynaklı biyoaktif peptidler ile muamele edilen ve ölen MCF-7 hücrelerinde ANT3'ün aktive olduğunu tespit ettik. ANT3'ün aktivitesinde tespit ettiğimiz bu artışın, MCF-7 hücrelerinde apoptozun tetiklenmesinden sorumlu olan mekanizmalardan biri olabileceğini düşünmekteyiz.

Imre ve arkadaşları (2017) yaptıkları çalışmada apoptoz inhibitör 5'in (API5) kaspaz-2 'yi inhibe ederek apoptotik hücre ölümünü engellediğini göstermişlerdir. Biz de çalışmamızda keçi sütü kazein fraksiyonunun pepsin ile muamelesinden elde edilen biyoaktif peptidler ile MCF-7 hücrelerinin 48 saat inkübasyonu sonrasında ölen hücrelerde API5'in inhibe olduğunu ve bu sayede inhibe olmayan kaspaz 2'nin MCF-7 hücrelerinde apoptotik ölüme neden olabileceğini ön görmekteyiz.

Wang ve arkadaşları (2010) lipogenez artışının, kanser hücrelerinin önemli bir özelliği olduğunu ve kanserin gelişimine ve ilerlemesine katkıda bulunduğunu ifade ettikleri çalışmalarında, yağ asidi kaynağının sınırlandırılması ile hücre çoğalmasının engellendiği ve apoptozu indüklediğini tespit etmişlerdir. Araştırmacılar ayrıca asetil-CoA karboksilaz (ACCA) enziminin artışının, meme, prostat, yumurtalık, akciğer ve kolon kanseri hücreleri ve dokularında gözlemlendiğini ve bu nedenle kanser müdahalesi için potansiyel bir hedef olduğunu ileri sürmüştür. Bununla birlikte, meme kanseri

dokularında ACCA enziminin mutasyona uğradığını ve ACCA inhibitörlerinin meme kanseri hücrelerine bağlanmasını ve hücreyi öldürme potansiyalini değiştirebileceğini ifade etmişlerdir. Çalışmamızda ölen MCF-7 meme kanseri hücrelerinde ACCA enziminin aktive olduğu tespit edilmiştir. Keçi sütü kazein fraksiyonunun pepsin ile muamelesinden elde edilen biyoaktif peptidlerin, meme kanserinde görülen ACCA mutasyonları üzerine etkilerini anlamak için kapsamlı çalışmaların yapılması gerekmektedir.

Tarrado-Castellarnau ve arkadaşları (2017), Gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenaz (GAPDH)'ın aşırı ekspresyonunun erken evre tümörlerle pozitif olarak ilişkili olduğunu ve yüksek riskli popülasyonlarda GAPDH seviyelerinin izlenmesinin erken tanı için önemli bir bileşen olduğunu belirtmişlerdir. Çalışmamızda ölen MCF-7 meme kanseri hücrelerinde GAPDH enziminin inaktive olduğunu tespit ettik. Biz de GAPDH enziminin keçi sütü kazein fraksiyonunun pepsin ile muamelesinden elde edilen biyoaktif peptidler ile inaktive olarak, MCF-7 hücrelerinin ölümüne neden olduğunu düşünmekteyiz.

Bogdanov ve arkadaşları (2017) meme dokusu örneklerinde, Na^+/K^+ -ATPaz (NAK) enziminin alfa alt gen birimlerinden *ATP1A1* (kodlayan $\alpha 1$ -alt ünite) ve *ATP1A2* (kodlayan $\alpha 2$ -alt ünite)'nin normal meme dokusundaki ekspresyonlarına göre anormallikler tespit etmişlerdir. *ATP1A1* , tüm meme kanseri örnek gruplarında yaklaşık 1.5 kat oranında aşırı eksprese edildiğini ortaya koymuşlardır. Çalışmamızda ölen MCF-7 meme kanseri hücrelerinde NAK enziminin artışı literatüre uyumlu olarak tespit edilmiş ve keçi sütü kazein fraksiyonunun pepsin ile muamelesinden elde edilen biyoaktif peptidlerinin NAK aktivitesi üzerinde etkili olmadığı tespit edilmiştir.

Shackelford ve arkadaşları (2013) NAD sentezinin hız sınırlayıcı aşamasını katalize eden nikotinamid fosforibosiltransferaz (Nampt) enziminin aktivitesinin invaziv tümörlerde ve tümör metastazlarında arttığını göstermişlerdir. Çalışmamızda Nampt aktivitesinin keçi sütü kazein fraksiyonunun pepsin ile muamelesinden elde edilen biyoaktif peptidleri ile muamele sonrası ölen MCF-7 meme kanseri hücrelerinde inhibe olduğu tespit edilmiştir. Bu durumda da Nampt inhibisyonu

aracılığı ile keçi sütü biyoaktif peptidlerin metastaz önleyici etkiye de sahip olabileceğini düşünmekteyiz.

Bu çalışmamızda keçi sütü kazein ve serum fraksiyonlarının enzimatik muamelesinden elde edilen peptidlerin MCF-7 meme kanseri hücrelerini öldürdüğü tespit edildi. En yüksek hücre ölüm oranı keçi sütü kazein fraksiyonunun pepsin ile muamelesinden elde edilen peptidler ile elde edilmiştir. Keçi sütü peptidleri ile muamele edildikten sonra ölen MCF-7 hücrelerinde tespit edilen karbohidrat mekanizması ile ilişkili olan enzimler incelendiğinde aktive olan ve inhibe olan enzimler glukozun hücrede kullanımını ve ATP sentezini inhibe etmekte idi. Bunun yanında apoptoz ile ilgili olan proteinler incelendiğinde apoptotik özellikteki proteinler ile eşleşen peptid dizilimlerinde artış görülürken, antiapoptotik proteinlerle ilişkili olan peptitlerin azaldığı tespit edilmiştir. Ksenobiyotik metabolizması ile ilişkili protein ve enzimlerin aktivitelerinde de artış ve azalma tespit edilmiştir.

Sonuç olarak, çalışmamızda elde ettiğimiz keçi sütü biyoaktif peptidlerinin meme kanserinde kemoterapötik ajan olarak kullanılması için temel oluşturucu niteliktedir. Bundan sonraki çalışmalarımız keçi sütü biyoaktif peptidlerinin farmakolojik özelliklerinin tanımlanması, fonksiyonel özelliklerinin belirlenmesi ile ilgili olarak devam edecek ve böylece yeni biyoaktif peptitlerin tanımlanması yönündeki bilimsel araştırmalara katkı sağlayarak, yeni ilaçların ve sağlığa yararlı fonksiyonel gıdaların üretimi için adım atılmış olacaktır.

8. KAYNAKLAR

Abubakar A, Saito T, Kitazawa H, Kawai Y, and Itoh T. Structural analysis of new antihypertensive peptides derived from cheese whey protein by proteinase K digestion. J Dairy Sci. 1998; 81(12): 3131-8.

Altunkaynak BZ, Özbek E. Programlanmış hücre ölümü apoptoz nedir?. 2008; 6(2): 93-104.

Arpacı N. TGF β ve D Vitamininin MCF-7 Hücresinin Plazminojen Aktivatör Sistemi Üzerine Etkisi. S.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2015, Konya (Danışman: Prof Dr. A Ünlü)

Ay C, Şanlı T. Süt ürünlerinde biyoaktif peptitlerin oluşumu ve fonksiyonel özellikleri. Adü Ziraat Derg. 2018;15(1): 115-120.

Bogdanov A , Moiseenko F, Dubina M. Abnormal expression of *ATP1A1* and *ATP1A2* in breast cancer. F1000Research. 2017; 6(10): 1-5.

Banon E, Daliri M, Oh D, Lee B. Bioactive Peptides. Foods 2017; 6:6050032.

Baraem P, Ismail. Ash content determination. Food Analysis Laboratory Manual. 2017; 117-119.

Bates R. G. Ashok K. Vijh. Determination of pH: theory and practice. J. Electrochem. Soc. 1973; 120: 263.

Baum F, Ebner J, Pischetsrieder M. Identification of multiphosphorylated peptides in milk. J Agric Food Chem. 2013a; 61: 9110–7.

Baum F, Fedorova M, Ebner J, Hoffmann R, Pischetsrieder M. Analysis of the endogenous peptide profile of milk: identification of 248 mainly casein-derived peptides. J Proteome Res. 2013b; 12: 5447–62.

Beermann C, Hartung J. Physiological properties of milk ingredients released by fermentation. *Food and Function*. 2013; 4: 185-199.

Bhat ZF, Kumar S, Bhat HF. Bioactive peptides of animal origin: a review. *J Food Sci Technol*. 2015;52:5377–5392

Boyle P, Levin B eds. *World Cancer Report 2008*. IARC, Lyon: 2008; 1: 510

Choudhuria T, Pala S, Munna L, Aggarwal B, Tonyadosa, Gaurisankarsaa. Curcumin induces apoptosis in human breast cancer cell through p53-dependent Bax induction. *FEBS Lett*. 2002; 521: 334-340.

Clark S, Garcia M. Advances in goat milk research. *J Dairy Sci*. 2017; 100: 10026-10044.

Comşa Ş, Cîmpean A. The story of MCF-7 breast cancer cell line: 40 years of experience in research. *Anticancer Res*. 2015;35:3147-3154.

Cos S, González C, Martínez-Campa MD, Mediavilla C, González A, Sánchez-Barceló EJ. Estrogen-signaling pathway: a link between breast cancer and melatonin oncostatic actions. *Cancer Detect Prev*. 2006; 30: 118- 128.

Crusca E Jr, Basso LGM, Altei WF, Marchetto R. Biophysical characterization and antitumor activity of synthetic pantothenic peptides from scorpion's venom. *Biochim Biophys Acta Biomembr*. 2018;1860(11):2155-2165.

Cuzick J, Wang DY, Bulbrook RD. The prevention of breast cancer. *Lancet* 1986; 1(8472): 83-6.

Dallas DC, Weinborn V, de Moura Bell JMLN, Wang M, Parker EA, Guerrero A. Comprehensive peptidomic and glycomic evaluation reveals that sweet whey permeate from colostrum is a source of milk protein-derived peptides and oligosaccharides. *Food Res Int*. 2014; 63:203–9.

Di Bernardini R, Harnedy P, Bolton D, Kerry J, O'Neill E, Mullen AM, Hayes M. Antioxidant and antimicrobial peptidic hydrolysates from muscle protein sources and by-products. *Food Chem.* 2011;124:1296–1307.

Dickens E, Ahmed S. Principles of cancer treatment by chemotherapy. *Surgery(Oxford)* 2018;36:134-138.

Dingess KA, de Waard M, Boeren S, Vervoort J, Lambers TT, van Goudoever JB, Hettinga K. Human milk peptides differentiate between the preterm and term infant and across varying lactational stages. *Food Funct.* 2017;8:3769–82.

Deng Li, Qi M, Peng QL, Chen MF, Qi Q, Zhang JY, Yao N, Huang MH, Li XB, Peng YH, Liu JS, Fu DR, Chen JX, Ye WC, Zhang DM. Arenobufagin induces MCF-7 cell apoptoz by promoting JNK-mediated multisite phosphorylation of Yes-associated protein. *Cancer Cell Int.* 2018; 10: 12935-018.

Dziuba M, Dziuba B, Iwaniak A. Milkproteins as precursors of bioactive peptides. *Issue.* 2009; 8(1): 71-90.

E-Kobon T, Thongararm P, Roytrakul S, Meesuk L, Chumnannpuen P. Prediction of anticancer peptides against MCF-7 breast cancer cells from the peptidomes of *Achatina fulica* mucus fractions. *Comput Struct Biotechnol J.* 2016; 14: 49–57.

Elias RJ, Kellerby SS, Decker EA. Antioxidant activity of proteins and peptides. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2008; 48: 430-441

Ellis PA, Sacconi-Jotti G, Clarke R, Johnston SR, Anderson E, Howell A. Induction of apoptoz by tamoxifen and ICI 182780 in primary breast cancer. *Int J Cancer.* 1997; 72: 608-613.

Foulkes WD. Germline BRCA1 mutations and a basal epithelial phenotype in breast cancer. *JNCI.* 2003; 95(19): 1482-1485.

Fox PF, McWeeney. Proteins. In: Paul LH, eds. *Advanced Dairy Chemistry* Springer Verlag. 3rd ed. New York; 2003, p:1346

Gan J, Robinson RC, Wang J, Krishnakumar N, Manning CJ, Lor Y, Breck M, Barile D, German JB. Peptidomic profiling of human milk with LC–MS/MS reveals pH-specific proteolysis of milk proteins. *Food Chem.* 2019; 274: 766–74.

Gancberg D, Lespagnard L, Rouas G, Paesmans M, Piccart M , Di Leo A, Nogaret JM, Hertens D, Verhest A, Larsimont D. Sensitivity of Her-2/neu antibodies in archival tissue samples of invasive breast carcinomas: Correlation with oncogene amplification in 160 cases. *J Clin Pathol.* 2000; 113 (5): 675-682.

Gaspar D, Veiga AS, Castanho MA, From antimicrobial to anticancer peptides. A review, *Frontiers in microbiology.* 2013; 4: 294.

Gasparini LS, Macedo ND, Pimentel EF, Fronza M, Junior VL, Borges WS, Cole ER, Andrade TU, Endringer DC, Lenz D. In vitro cell viability by CellProfiler® software as equivalent to MTT assay. *Pharmacogn Mag.* 2017;13(Suppl 2): 365–369.

Gedikli S. Meletoninin MCF-7 Hücre Kültüründeki Apoptoz Aktivasyonunun ve Sitotoksitesinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR), MTT Hücre Canlılık Testi ve İmmünohistokimya Yöntemleriyle Araştırılması. A.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 2013, İstanbul (Danışman: Prof Dr. E Özbek).

Gonzalez-Gonzalez CR, Tuohy KM, Jauregi P. Production of angiotensin-I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity in milk fermented with probiotic strains: Effects of calcium, pH and peptides on the ACE-inhibitory activity. *International Dairy Journal.* 2011; 21: 615-622.

Gu X, Hou Y-K, Li D, Wang J-Z, Wang F-J. Separation, purification, and identification of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from walnut (*Juglans regia* L.) hydrolyzate. *Int J Food Prop.* 2015;18:266–276.

Greppi G, Roncada P, Fortin R. Protein components of goat's milk. *Istituto Sperimentale Italiano.* 2010;(1):71-94.

Gustafsson JA. Novel aspects of estrogen action. *J Soc Gyn Invest,* 2000; 60: 8-9.

Gür F, Güzel M, Öncül N, Yıldırım Z, Yıldırım M. Süt serum proteinleri ve türevlerinin biyolojik ve fizyolojik aktiviteleri. Akademik Gıda. 2010; 8(1): 23-31.

Güzeler N, Say D, Kaçar A. Compositional changes of saanen x kilis goats. Milk During Lactation. Gıda. 2010; 35(5): 325-330.

Hafeez Z, Cakir-Kiefer C, Roux E, Perrin C, Miclo L, Dary-Mourot A. Strategies of producing bioactive peptides from milk proteins to functionalize fermented milk products. Food Research International. 2014; 63: 71-80.

Haque E, Chand R, Kapila S. Biofunctional properties of bioactive peptides of milk origin. Food Reviews International. 2009; 25: 28-43.

Hedenfalk IA, Ringner M, Trent JM, Borg A. Gene expression in inherited breast cancer. Adv Cancer Res. 2002; 84: 1-34.

Hickman JA. Apoptoz induced by anticancer drugs. Cancer and Metastasis Rev. 1992;11: 121–139.

Hsieh C, Ledasma B, Tome S, Weinboru V, Borile D, Bell J. Milk proteins peptides and oligosaccharides: Effects against the 21 st century disorders. Biomed Research International. 2015: 16.

Hung MC, Lau YK. Basic science of HER-2/neu:A review. Semin Oncol. 1999; 26 (4): 51-59.

Imre G, Berthelet J, Heering J, Kehrlöesser S, Melzer MI, Lee BI, Thiede B, Dötsch V, Rajalingam K. Apoptosis inhibitor 5 is an endogenous inhibitor of caspase-2. EMBO Rep. 2017 May; 18(5): 733–744.

Irshad I, Kanekanian A, Peters A, Masud T. Antioxidant activity of bioactive peptides derived from bovine casein hydrolysate fractions. J Food Sci Technol. 2015;52:231–239.

İşlen N. EGFR İnhibitörünün (AG 1478) Triple Negatif ve Luminal A Meme Kanseri Hücreleri Üzerine Antiproliferatif ve Antimetastatik Etkileri. İ.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2017, İstanbul (Danışman: Yrd. Doç. Dr. T Mehmet).

Karoline W, Costa A, Souza E, Mesquita E, Vasconcelas G, Gadelha T, Gadelha C, Franco O, Queiroga R, Magnani M. Comparative protein composition analysis of goat milk produced by the alpine and saanen breeds in northeastern brazil and related antibacterial activities. PLoS One. 2014; 9: 93361.

Karami Z, Akbari-Adergani, B. Bioactive food derived peptides: a review on correlation between structure of bioactive peptides and their functional properties. Journal of Food Science and Technology. 2019; 56 (2): 535-547.

Karami Z, Emam-Djomeh Z, Mirzaee HA, Khomeiri M, Sadeghi Mahoonak A, Aydani E. Optimization of microwave assisted extraction (MAE) and soxhlet extraction of phenolic compound from licorice root. J Food Sci Technol.2015;52:3242–3253.

Keen, A, Lennan, E. Women's cancers. 1st Ed. West Sussex ; John Wiley & Sons, Inc. 2011, p: 110

Khalilia W. Hücre Kültüründe Apoptozun Moleküler Mekanizmaları Üzerine Gama Radyasyonunun Etkileri. İ.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 2016, İstanbul (Danışman Doç. Dr. Ö Gül).

Kınık Ö, Gürsoy O. Süt proteinleri kaynaklı biyoaktif peptitler. Mühendislik Bilimleri Dergisi. 2002; 8(2): 195-200.

Kim SK, Wijesekara I. Development and biological activities of marine-derived bioactive peptides: a review. J Funct Foods.2010;2:1–9

King MC, Marks JH, Mandell JB; The New York Breast Cancer Study Group. Breast and ovarian cancer risks due to inherited mutations of BRCA1 and BRCA2. Science, 2003;302(5645): 643-646.

Kjeldahl, J. Neue methode zur bestimmung des stickstoffs in organischen körpern. Z. Anal. Chem. 1883; 22; 366–382.

Klaeger S, Heinzlmeir S, Wilhelm M, Polzer H, Vick B, Koenig P-A Reinecke M, Ruprecht B, Petzoldt S, Meng C, Zecha J, Reiter K, Qiao H, Miğfer D, Koch H, Schoof M, Canevari G, Casale E, Depaolini SR, Kanatçı A, Wu Z, Schmidt T, Rueckert L, Becker W, Huenges J, Garz AK, Gohlke BO, Zol DP, Kayser G, Vooder T, Preissner R, Hahne, H, Tõnisson K, Kramer K, Götze K, Bassermann F, Schlegl J, Ehrlich HC, Aiche S, Walch A, Greif PA, Schneider S, Felder ER, Ruland J, Médard G, Jeremias I, Spiekermann K, Kuster B. The target landscape of clinical kinase drugs. Science 2017; 358: 1148-1164

Kontou N, Psaltopoulou T, Panagiotakos D, Dimopoulos MA, Linos A. The mediterranean diet in cancer. Tıbbi Gıda Dergisi. 2011;14(10):1065-1078.

Korashy H, Maayah Z, Allah A, Kadi A, Alhaider A. Camel milk triggers apoptotic signaling pathways in human hepatoma HepG2 and breast cancer MCF-7 cell lines through transcriptional mechanism. J. Biomed Biotechnology. 2012;10: 593195-593204.

Korhonen H, Pihlanto A. Bioactive Peptides: Production and functionality. International Dairy Journal. 2006; 16: 945-960.

Korhonen H. Milk-derived Bioactive peptides: From science to applications. Journal of Functional Foods. 2009: 177-187.

Korkmaz Ş. MDA-MB-231 ve MCF-7 İnsan Meme Kanseri Hücre Soylarında Zeytin Yaprığı Ekstresinin Anti-Kanser İlaçlarla Kombinasyonunun Araştırılması. U.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Uzmanlık Tezi, 2012, Bursa (Danışmanı: Prof. Dr. E ULUKAYA).

Koskinen VR, Emery PA, Creasy DM, Cottrell JS. Hierarchical clustering of shotgun proteomics data. Mol Cell Proteomics. 2011;10:M110.003822.

Küçükkaya F. Meme Parankiminde Kontrastlı Manyetik Rezonans İnceleme İle Tespit Edilen Kitlelerin Yeni Bir Metod Olan Volume Navigasyon Tekniğiyle Ultrasonografik Görüntülemeye Yerinin Tespit Edilmesi ve Bu Teknikle Lezyonların Yerinin Doğru Bir Şekilde Tespit Edilebilirliğinin ve Yeterliliğinin Araştırılması. M.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Uzmanlık Tezi, 2014, İstanbul (Danışmanı: Prof. Dr. E ARIBAL)

Louis L, Rusoff H. Milk: Its nutritional value at a low cost for people of all ages. *Journal of Dairy Science*. 1970; 53: 1296-1302.

Martínez-Maqueda D, Hernández-Ledesma B, Lourdes Amigo, Beatriz Miralles, and José Ángel Gómez-Ruiz. Extraction/fractionation techniques for proteins and peptides and protein digestion. 1 st ed. Springer US. *Proteomics in Foods: Principles and Applications*. 2013; 2; 21-50.

Meisel H. Overview on milk protein-derived peptides. *International Dairy Journal*. 1998; 8: 363-373.

Medved M. Bielikoviny mlieka ich technologiky a nutricny vyznam. Slovenska technicka univerzita V bratislave. Fakulta chemickej a potravinarskej a nutricny vyznam, Bakalarska prace ,2010, Bratislava, Vedúci záverečnej práce/školiteľ (Doc Ing G Maria).

Meites J. Relation of prolactin and estrogen to mammary tumorigenesis in the rat. *J Natl Cancer Inst* 1972; 48(4): 1217-24.

Moggs J, Orphanides G. Estrogen receptors: orchestrators of pleiotropic cellular responses. *EMBO Reports*. 2001; 2(9):775-781.

Mohanty DP, Mohaptra S, Misra S, Sahu P.S. Milk derived bioactive peptides and their impact on human health. *Saudi J Biol Sci*. 2016; 23(5): 577-583.

Nagasawa H, Keng P, Maki C, Yu Y, Little JB. Absence of a radiation induced first-cycle G1-S arrest in P53+ human tumor cells synchronized by mitotic selection. *Cancer Res*. 1998; 58: 2036-2041.

Nieves-Neira W, Pommier Y. Apoptotic response to comptothecin and 7-hydroxystaurosporine (UCN-01) in the 8 human breast cancer cell lines of the NCI anticancer drug screen: Multifactorial relationships with topoisomerase I protein kinase C, Bcl-2, p53, MDM-2 and caspase pathways. *Int J Cancer*. 1999;30;82(3): 396-404.

Otağ F, Hayta M. Gıdalarda biyoaktif peptit oluşumu ve aktivitesi üzerine ısı işlem ve fermentasyonun etkileri. *Gıda*. 2013; 38(5): 307-314.

Öztürk M. Meme kanserinin genetiği ve risk faktörleri. İÜ. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri. 2006; 15-16.

Piovesana S, Capriotti AL, Cavaliere C, La Barbera G, Samperi R, Zenezini Chiozzi R. Peptidome characterization and bioactivity analysis of donkey milk. *J Proteomics*. 2015; 119: 21–9

Prajapati B, Kapadiya B, Jain A, Mehta M, Darji B, Aparnathi, D. Comparison of surti goat milk with cow and buffalo milk for physicochemical characteristics selected processing-related parameters and activity of selected enzymes. *Vet World*. 2017; 10: 477-484.

Reed JC. Dysregulation of apoptosis in cancer. *J Clin Oncol*. 1999; 17: 2941-2953.

Remeuf F, Lenoir J. Relationship between the physico-chemical characteristics of goat's milk and its rennetability. *Int Dairy Bull*. 1986; 202: 68.

Saip P, Keskin S, Özkan M, Kaplan MA, Aydoğan F, Demirağ GG, Uzunoğlu S, Engin H, Başaran G, Güler N, Uygun K, Demirkan B, Özdemir F, Çubukçu E, Salepçi T, Çiçin İ. Türkiye’de meme kanserli hastaların tanı ve tedavi yöntemlerine ulaşım hızı; çok merkezli gözlemsel çalışma. *J Breast Health*. 2011; 7: 109-117.

Santen RJ, Boyd NF, Chlebowski RT, Cummings S, Cuzick J, Dowsett M, Easton D, Forbes JF, Key T, Hankinson SE, Howell A, Ingle J. Critical assessment of new risk factors for breast cancer: considerations for development of an improved risk prediction model. *Endocr Relat Cancer* 2007; 14(2): 169-87.

Santos R, Ursu O, Gaulton A, Bento AP, Donadi RS, Bologa CG, Al-Lazikani B, Hersey A, Oprea TI, Overington JP. A comprehensive map of molecular drug targets. *Nat Rev Drug Discov* 2016; 16:19..

Saraçlıgil B. D Vitaminin MCF 7 Meme Kanseri Hücresi Metabolizması Üzerine Etkisi. S.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıpta Uzmanlık Tezi, 2015, Konya (Danışman Yrd.Doç. Dr. Ö Bahadır).

Sarkar FH, Li YW. Targeting multiple signal pathways by chemopreventiv eagents for cancer prevention and therapy. *Acta Pharmacol Sin.*2007; 28: 1305-1315.

Sarmadi BH, Ismail A. Antioxidative peptides from food proteins: A review. *Peptides*. 2010 ;31: 1949–1956

Scott DE, Bayly AR, Abell C, Skidmore J: Small molecules, big targets: drug discovery faces the protein–protein interaction challenge. *Nat Rev Drug Discov* 2016, 15:533.

Serova OM, Mazoyer S, Puget N, Dubois V, Tonin P, Shugart Y, Goldgar D. Mutations in BRCA1 and BRCA2 in breast cancer families: are there more breast cancer-susceptibility genes?. *Am J Human Gen.* 1997; 60(3): 486-95.

Shackelford RE, Mayhall K, Maxwell NM, Kandil E and Coppola D. Nicotinamide phosphoribosyltransferase in malignancy: A Review. *Genes & Cancer.* 2013; 4(11-12): 447–456

Sharma G, Dave R, Sanadya J, Sharma P, Sharma K. Various type sand management of breast cancer: An Overwiev. *J Adv Pharm Technol Ars.* 2010; 2: 109-126.

Shimizu T. Food derived bioactive peptides in the market. In: *Food Proteins and Peptides: Chemistry, Functionality, Interactions, and Commercialization.* Hettiarachchy NS, Sato K, Marshall MR, Kannan A, editors, CRC Press, Boca Raton, p. 2012; 375-394.

Sims AH, Howell A, Howell SJ, Clarke RB. Origins of breast cancer sub type sand therapeutic implications. *Nat Clin Practices Oncol.* 2007; 4:516-525.

Sirpu Natesh N, Arumugam M, Karanam G. Apoptotic role of marine sponge symbiont *Bacillus subtilis* NMK17 through the activation of caspase-3 in human breast cancer cell line. *Mol Biol Rep.* 2018;45(6):2641-2651

Somunoğlu S. Meme kanseri: Belirtileri ve erken tanıda kullanılan tarama yöntemleri. *Fırat Sağlık Hiz Derg* 2009; 4: 103-22.

Su MY, Broadhurst M, Liu C-P, Gathercole J, Cheng W-L, Qi X-Y, Clerens S, Dyer JM, Day L, Haigh B. Comparative analysis of human milk and infant formula derived peptides following in vitro digestion. *Food Chem.* 2017;221: 1895–903.

Tamm I, Schriever F, Dorken B. Apoptoz: Implications of basic research for clinical oncology. *Lancet Oncol.* 2001; 2: 33–42.

Tarrado-Castellarnau M, Diaz-Moralli M, Polat IH, Sanz-Pamplona R, Alenda C, MorenoV, Castells A and Cascante M. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is overexpressed in colorectal cancer onset. *Transl Med Communications.* 2017; 2:6

Tyczynski JE, Bray F, Parkin D. M. Breast cancer in europe. *ENCR Cancer Fact Sheets.* 2002; 2: 8.

Veronesi, Boyle, Goldhirsch, Orecchia, Viale. Steering committee on clinical practice guidelines for the careand treatment of breast cancer. *NCI.* 2009; 1727-1741.

Wang C, Rajput S, Watabe K, Liao DF, Cao D. Acetyl-CoA carboxylase- α as a novel target for cancer therapy. *Frontiers in Bioscience.* 2010; 2 : 515-526.

Wisniewski JR, Zougman A, Nagaraj N Mann M. Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nat Methods.* 2009; 6; 5: 359-363.

Włodkowica D, Skommer J, Faley S, Darzynkiewicz Z . Cooper J.M. Dynamic analysis of apoptoz using cyanine SYTO probes: From classical to microfluidic cytometry. *Exp Celi Res.* 2009; 315: 1706-1714.

Yager J.D, Davidson N. Estrogen Carcinogenesis in breast cancer. The New England J Med. 2006; 3: 354.

Yalçın G. Flavonoidlerin Kansere Hücrelerine Etkisi. S.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2013, Konya (Danışman Yrd.Doç.Dr. Ö Bahadır).

Yang Z , Cheng W, Hong L, Chen W, Wang Y, Lin S, Han J, Zhou H and Gu J. Adenine nucleotide (ADP/ATP) translocase 3 participates in the tumor necrosis factor-induced apoptosis of MCF-7 cells. Mol Biol Cell. 2017; 18: 4681–4689

Yaşa İ. Resveratrol ve Epigallocateşin Kombinasyonunun Sıçan C6 Glioma Hücrelerinde Apoptotik Etkileri. İ.B.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2011, Bursa (Danışman: Prof Dr. T. Altuğ).

Yaşarturk U, Altıntaş A. Meme tümörlü köpeklerde serum 17 β -estradiol kolesterol ve trigliserid düzeylerinin klinik önemi. F U Sağ Bil Vet Derg 2010; 24(3): 157-161.

Yılmaz E. MCF7 Meme Kanseri ve MCF10A Normal Epitel Hücre Soyunda Propolisin Etkin Maddelerinin Sitotoksik ve Apoptotik Etkilerinin Değerlendirilmesi. İ.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2015, İstanbul (Danışman Prof Dr. Ö Oğuz).

Yırtıcı Ü. Endemik Centaurea Fenzlı Reichardt Bitkisinin MCF-7 Meme Kanseri Hücre Dizileri Üzerine Sitotoksik, Apoptotik, Nekrotik Etkisi. K.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 2012, Kırıkkale (Danışman: Prof. Dr. A. Ergene).

Yuan J, You X, Ni G, Wang T, Cavezza S, Pan X, Liu X. Iodine-125 labeled Australian frog tree host-defense peptides caerin 1.1 and 1.9 better inhibit human breast cancer cells growth than the unlabeled peptides. ¹²⁵I-caerin 1.9 may better be used for the treatment of breast cancer. Hell J Nucl Med. 2018;21(2):115-120.

Zenebe T, Ahmed N, Kabeta T, Kebede G. Review on medicinal and nutritional values of goat milk. Academic J Nutrition. 2014; 3: 30-38.

Zenezini CR, Capriotti AL, Cavaliere C, La Barbera G, Piovesana S, Samperi R. Purification and identification of endogenous antioxidant and ACE-inhibitory peptides from donkey milk by multidimensional liquid chromatography and nanoHPLC- high resolution mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem.* 2016;408: 5657–66.



9. EKLER

9.1. Kongre Katılım Belgesi



9.2. Kongre Kitapçığı



www.ivekbio.com



9. 3. Kongre Kitapçığında Yer Alan Teze Ait Poster Özeti



26-28 Kasım
26-28 November **2018**
Osmanlı Arşivi Kongre Merkezi, İstanbul - Ottoman Archives Congress Center, İstanbul

POSTERLER / POSTERS

P-099

In Silico Analysis of Goat Milk Derived Bioactive Peptides

Kıymet Özlem Şahna, Bilal Çakır, Tuğba Tunalı Akbay

Marmara University, Faculty of Dentistry, Department of Basic Medical Sciences, Başibüyük, Maltepe, İstanbul

Absract

Goat milk is an ideal food for children and adults, and is traditionally used as a supplement for the treatment of asthma, eczema, migraine, frequent vomiting and weight loss. These beneficial effects of goat milk are thought to be due to its bioactive peptides. Some bioactive peptides have already been approved by the FDA for commercialization as therapeutic peptides. Therefore, the specific objectives of this study were to isolate the proteins from goat milk by extraction and precipitation techniques, to digest the goat milk with pepsin, to identify the bioactive goat milk peptides with proteomic techniques and to use an in silico analysis for the prediction of the potential role of goat milk based bioactive peptides. Goat milk samples were collected from the goats on the same farm being managed and fed in the same way. Goat milk casein was precipitated in pH 4.6 and whey protein fraction was separated. Both casein and whey fractions were hydrolyzed with pepsin enzyme under specified conditions. Peptides of goat milk were identified by mass-chromatography systems. The bioactive role of these peptides were evaluated with in silico analysis in BIOPEP database system. The BIOPEP application contains a database of biologically active peptide sequences and a program enabling construction of profiles of the potential biological activity of peptides. According to the results of BIOPEP database, goat milk bioactive peptides were found to have variety of beneficial functions in the body. In conclusion, bioactive peptides of goat milk can be used as functional ingredients in the formulation of health-enhancing nutraceuticals, and as potent drugs with positive impact on body functions.

Keywords

Bioactive Peptide, Goat Milk, In silico analysis , Casein, Whey proteins

10. ÖZGEÇMİŞ

Adı	Kıymet Özlem	Soyadı	ŞAHNA
Doğum Yeri	İstanbul	Doğum Tarihi	30.06.1987
Uyruğu	T.C	Tel	05432392622
E-mail	k.ozlem_kalkan@hotmail.com		

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora/Uzmanlık	-	-
Yüksek Lisans	-	-
Lisans	Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya bölümü	2013
Lise	Kadıköy Erenköy Kız Lisesi	2004

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
Kalite Kontrol Analisti	Biofarma İlaç San. Tic. A.Ş	2015-2019
Kalite Kontrol Analisti	Avis İlaç San. Tic. A.Ş	2015-6ay
Kalite Kontrol Uzmanı	Özmer Pastacılık ve İçecek Ürünleri Tic. A.Ş	2008-2010

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*
İngilizce	İyi	Orta	Orta

Yabancı Dil Sınav Notu #								
YDS	ÜDS	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE
-	-	-	-	-	-	-	-	-

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	-	-	-
(Diğer) Puanı	-	-	-

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
MPower (Waters)	Çok İyi
Lab Solitions (Shimadzu)	Çok İyi
Qmex	İyi
Agilent Chemstation	Çok İyi
SAP	Çok İyi

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendiriniz.

