



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DENEYSEL MEME KANSERİ MODELİNDE SÜT
PROTEİNLERİNİN KORUYUCU ETKİSİ**

AYŞE MİNE YILMAZ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. A. Süha YALÇIN

İSTANBUL-2010

TEZ ONAYI

Kurum: Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Programın seviyesi: Yüksek Lisans (X) Doktora ()
Anabilim Dalı : Biyokimya Anabilim Dalı
Tez Sahibi: Ayşe Mine YILMAZ
Tez Başlığı: DENEYSEL MEME KANSERİ MODELİNDE SÜT
PROTEİNLERİNİN KORUYUCU ETKİSİ
Sınav Yeri: Biyokimya Anabilim Dalı
Sınav Tarihi : 21.06.2010

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

Danışman

Prof. Dr. A. Süha YALÇIN

Kurumu

Biyokimya

İmza



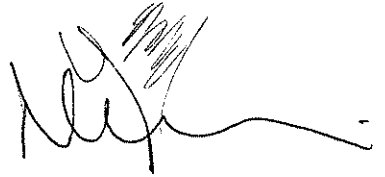
Sınav Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Yavuz TAGA

Biyokimya

Prof. Dr. Nesrin KARTAL ÖZER

Biyokimya



Yukarıdaki jüri kararı Enstitü yönetim Kurulu'nun 16./08./2010. tarih ve 48. sayılı kararı ile onaylanmıştır.



Prof. Dr. Nimet GENÇOĞLU

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü 7,

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda 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 çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Tarih

"Ad Soyadı" (İmza)

Tüm yüksek lisans eğitimim boyunca, bu tezin hazırlanmasında ve tamamlanmasında destek olan başta tez danışmanım *Prof. Dr. A. Süha YALÇIN* olmak üzere değerli hocalarım *Prof. Dr. Yavuz TAGA'ya, Prof. Dr. Kaya EMERK'e, Prof. Dr. Nesrin KARTAL ÖZER'e, Prof. Dr. Serpil BİLSEL'e, Prof. Dr. Goncagül HAKLAR'a, Prof. Dr. Önder ŞİRİKÇİ'ye*, bu tezin hazırlanmasında eşsiz katkılarından dolayı *Prof. Dr. A. Nazlı ARDA'ya, Dr. Evren UÇAR'a, Dr. Wafi ATALLAH'a, Dr. Ahmet KILINÇ'a*, çalışma arkadaşım *Gökhan BİÇİM'e*, Marmara Üniversitesi Biyokimya Anabilim Dalında yüksek lisans ve doktora yapan tüm arkadaşlarıma ve hayatım boyunca bana büyük destek olup her zaman yanımda olan aileme...

Teşekkür Ederim.

İÇİNDEKİLER

KISALTMALAR	VI
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	VII
TABLoların LİSTESİ	IX
1. ÖZET	1
2. SUMMARY	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER	5
4.1.Oksidatif Stres	5
4.1.1.Serbest radikaller	5
4.1.2.Glutatyon konjugasyonu	7
4.1.3.Lipit peroksidasyonu	8
4.1.4.Protein oksidasyonu	8
4.1.5.Isı şok proteinleri	9
4.2.Süt Proteinleri	11
4.2.1.Peynir altı suyu ve süt proteinleri	11
4.2.2.Süt serumu proteinlerinin ticari ve klinik kullanım alanları	12
4.2.3.Süt serumu proteinlerinin immün sistem üzerine etkileri	14
4.2.4.Süt serumu proteinlerinin antikanser aktivitesi	15
4.3.Sıçanlarda Meme Anatomisi ve Meme Gelişimi	16
4.3.1.Makroskobik anatomi	16
4.3.2.Mikroskopik anatomi	17
4.3.3.Sıçanlarda deneysel meme kanseri modeli	17
4.3.4. Genotoksik kimyasallarla oluşturulan meme kanser modelleri	18
4.3.5.N-Metil N-Nitrozüre ve tümör indüksiyonu	20
4.3.6.Karsinogen ile oluşturulan meme tümörlerinin sınıflandırılması	22

5. GEREÇ VE YÖNTEM	24
5.1.Deney Modeli Oluşturulması	24
5.1.1.Deney hayvanları ve deney ortamı	24
5.1.2.Hayvanların beslenmesi	24
5.1.3.Karsinojen madde hazırlanması ve uygulanması	24
5.1.4. Süt serumu proteinlerinin hazırlanması ve uygulanması	25
5.2.Deney Yöntemi	25
5.2.1. Deney grupları	25
5.2.2. Deney gruplarının akış şeması	27
5.2.3.Hayvanların takibi	28
5.2.4.Hayvanların sakrifikasyonu, kan ve doku örneklerinin incelenmesi	28
5.3.Biyokimyasal Analizler	28
5.3.1.Doku homojenatlarının hazırlanması	28
5.3.2.Dokuda lipit peroksidasyonu	28
5.3.3.Dokuda protein oksidasyonu	29
5.3.4.Dokuda glutatyon tayini	29
5.3.5.Glutatyon standartlarının hazırlanması	30
5.4. Elektroforetik Analizler	30
5.4.1.Meme dokusundan ısı şok proteini ekstreaksiyonu	30
5.4.2.Protein konsantrasyonlarının belirlenmesi	31
5.4.3.Sodyum dodesilsülfat poliakrilamid jel elektroforezi	31
5.4.4.İmmünolojik analizler	33
5.4.5.Densitometrik analizler	34
5.5. İstatistiksel Analizler	34
6. BULGULAR	35
6.1. Dokuda Glutatyon Ölçümleri	35
6.2 Dokuda Malondialdehit Ölçümleri	38

6.3 Dokuda Protein Karbonilleri Ölçümleri	43
6.4 Meme Dokusu Isı Şok Proteini Ölçümü	47
7. TARTIŞMA ve SONUÇ	52
8. KAYNAKLAR	55
9. EKLER	68
10. ÖZGEÇMİŞ	70

KISALTMALAR

HSP 27: Heat shock protein 27 (Isı şok proteini 27).

MNU: N-methyl-N-nitrosourea (N-metil-N-nitrozüre)

GSH: Glutasyon

MDA: Malondialdehit

PCO: Okside protein karbonilleri

SSP: Süt serumu proteinleri

DMBA: 7,12-Dimetilbenz[a]antrasen

MPO: Miyeloperoksidaz

γ -GCS: Gama-glutamil sistein sentetaz

GSH-Px: GSH peroksidaz

GSSG: Okside (yükseltgenmiş) glutasyon

NADPH: Nikotinamid adenin dinukleotid fosfat

PUFA: Çok doymamış yağ asitleri

LOO- : Lipit peroksit

LOOH: Lipit hidroperoksit

LF: Laktoferrin

ACE: Anjiotensin dönüştürücü enzim

IgG: İmmünglobülin G

HAMLET: Human alpha-lactalbumin made lethal to tumor cells

TNF- α : Tümör nekroz faktörü

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil 4.1. Glutasyon oksidasyon, redüksiyon döngüsü.

Şekil.4.2. Sıçanlarda meme anatomisi.

Şekil.4.3. 55 Günlük dişi sıçan meme dokusu.

Şekil.5.1. MNU+SSP grubu deney akış şeması.

Şekil.5.2. MNU grubu deney akış şeması.

Şekil.5.3. SSP grubu deney akış şeması.

Şekil.5.4. Kontrol grubu deney akış şeması.

Şekil 6.1. Karaciğer dokusu GSH değerleri.

Şekil 6.2. Böbrek dokusu GSH değerleri.

Şekil 6.3. Meme dokusu GSH değerleri.

Şekil 6.4. Karaciğer dokusu MDA değerleri.

Şekil 6.5. Böbrek dokusu MDA değerleri.

Şekil 6.6. Meme dokusu MDA değerleri.

Şekil 6.7. Karaciğer dokusu PCO değerleri.

Şekil 6.8. Böbrek dokusu PCO değerleri.

Şekil 6.9. Meme dokusu PCO değerleri.

Şekil 6.10 Kontrol grubuna ait membran görüntüsü

Şekil 6.11. Kontrol grubu HSP 27 miktarları

Şekil 6.12 SSP grubuna ait membran görüntüsü

Şekil 6.13 SSP grubu HSP 27 miktarları

Şekil 6.14. MNU grubu membran görüntüsü

Şekil 6.15. MNU alan gruptaki HSP 27 miktarları.

Şekil 6.16. MNU+SSP grubuna ait membran görüntüsü

Şekil 6.17. MNU+SSP alan gruptaki HSP 27 miktarları

TABLoların LİSTESİ

Tablo 4.1. Reaktif oksijen türleri ve reaktif nitrojen türleri.

Tablo 4.2 Isı şok proteinleri sınıflandırılması.

Tablo 5.1. SDS-PAGE için hazırlanan çözeltiler.

Tablo 5.2. SDS-PAGE'de kullanılan jelin hazırlanması.

Tablo 6.1. Karaciğer dokusu GSH değerleri.

Tablo 6.2. Böbrek dokusu GSH değerleri.

Tablo 6.3. Meme dokusu GSH değerleri.

Tablo 6.4. Karaciğer dokusu MDA değerleri.

Tablo 6.5. Böbrek dokusu MDA değerleri.

Tablo 6.6. Meme dokusu MDA değerleri.

Tablo 6.7. Karaciğer dokusu PCO değerleri.

Tablo 6.9. Böbrek dokusu PCO değerleri.

Tablo 6.10. Meme dokusu PCO değerleri.

Tablo 6.11. Meme dokusu HSP27 miktarları.

1.ÖZET

Meme kanseri, gelişmekte olan ülkelerdeki kadınlarda, en sık rastlanan ve en çok korkulan malignansilerden biridir. Meme kanserine sebep olan etiyoloji bu konuda kapsamlı araştırmalara rağmen büyük ölçüde belirsizdir. Bu malignitenin saptandığı kadınların yaklaşık % 75'inde risk faktörleri dışında, yaş ve batı tarzı yaşam belirtilmiştir. Öte yandan, hücrede serbest radikal birikimi, hücre DNA'sının hasarına, nükleotid yapılı koenzimlerin yıkılmasına, hücre tiyol/sülfat oranının değişimine, tiyollere bağlı enzimlerin yapı ve fonksiyonlarının bozulmasına, protein ve lipidlerin kovalent bağlarında anormalliklerin oluşmasına, enzim aktivitelerinde, lipid metabolizmasında değişikliklere, mukopolisakkaritlerin bozulmasına, protein hasarına, lipid peroksidasyonuna sebep olur. Ayrıca, ısı şok proteini HSP 27'nin çeşitli kanser türlerinde farklı seviyeleri tespit edilmiştir. *In vitro* ve *in vivo* çalışmalarla HSP 27'nin yüksek ekspresyonu ile invaziv meme kanseri arasında sıkı korelasyon kanıtlanmıştır ve bu proteinin tümör hücrelerinin invaziv ve metastatik potansiyelinden etkilendiği düşünülmektedir. N-metil-N-nitrozüre, deneysel meme kanseri modelinde sıklıkla kullanılan ve direkt olarak meme hücre DNA'sına etki eden bir kimyasal karsinojendir. Uygulanan doza, sıçan türüne ve sıçanın yaşına bağlı olarak farklı tümör çeşitlerinin modellenmesinde kullanılır. Çalışmamızda deneysel meme kanseri modeli oluşturmak üzere 130 günlük Sprague-Dawley türü, dişi, virjin sıçanlara 100 gün ara ile iki kez N-metil-N-nitrozüre enjekte edildi. Çalışma boyunca sıçanlara haftada iki kez orogastrik gavajla süt serumu proteinleri verildi. Sıçanlar 180 gün sonunda kurban edildi ve örnekler toplandı. Karaciğer, böbrek ve meme dokularında glutatyon, malondialdehit ve protein karbonilleri değerleri karşılaştırıldı. Tüm dokularda en yüksek malondialdehit ve protein karbonil değerleri N-metil-N-nitrozüre grubunda sıçanlarda tespit edildi. En düşük malondialdehit ve protein karbonil değerleri de kontrol grubunda gözlendi. Tüm dokulardaki en yüksek glutatyon değerleri kontrol grubunda en düşük değerler ise N-metil-N-nitrozüre grubunda bulundu. Sonuç olarak, çalışmamızda N-metil-N-nitrozüre ile oluşturulan meme kanseri modelinde N-metil-N-nitrozüre etkisiyle oluşan biyokimyasal değişikliklere süt serumu proteinlerinin koruyucu etkisi gösterilmiştir.

ANAHTAR SÖZCÜKLER: Süt serumu proteinleri, Deneysel meme kanseri, N-metil-N-nitrozüre.

1.SUMMARY

Protective Effect of Whey Proteins in Experimental Breast Cancer Model

Breast cancer is one of the most widespread and frightening malignancies for women in developing countries. Despite numerous studies on the subject, the etiology of breast cancer remains unclarified. In approximately 75% of the women, age and western life-style are responsible besides other risk factors. On the other hand, free radical accumulation in the cell causes many changes including damage to DNA, destruction of nucleotide coenzymes, change of cellular thiol/disulfide ratio, structural and functional changes of enzymes dependent on thiols, abnormalities in covalent bonds of protein and lipids, changes in enzyme activities and lipid metabolism, destruction of mucopolysaccharides, protein damage and lipid peroxidation. In addition, different levels of heat shock protein 27 have been detected in several cancer types. In normal breast tissue, the expression of heat shock protein 27 is very low or absent. Although there is a strong correlation between the higher expression of heat shock protein 27 and invasive breast cancers proved by in vivo and in vitro studies, it is not thought that the protein is affected by the invasive and metastatic potential of tumor cells. N-methyl-N-nitrosourea, which is used widely in developing experimental breast cancer model, is a chemical carcinogen that affects breast cell DNA directly. It is used for modelling various tumor types depending on given dose, rat species and ages. In our study, female, virgin, 130 days old, Sprague-Dawley rats were used to form a cancer model. N-methyl-N-nitrosourea (50 mg/kg) was injected two times by a 100 days break. During the study, whey proteins were given to the rats by orogastric gavage 2 times a week. At the end of 180 days, rats were sacrificed and samples were obtained. Glutathione, malondialdehyde and protein carbonyls levels were determined in liver, kidney and breast tissues. Among all groups, the highest malondialdehyde and protein carbonyl levels were detected in the N-methyl-N-nitrosourea group. The lowest values were observed in the control group. The highest glutathione values were detected in control group and the lowest ones were detected in N-methyl-N-nitrosourea group. In conclusion, the protective role of whey proteins against biochemical changes were evident in N-methyl-N-nitrosourea induced breast cancer model.

KEY WORDS: Whey proteins, Experimental breast cancer, N-methyl-N-nitrosourea

3.GİRİŞ VE AMAÇ

Meme kanseri, gelişmekte olan ülkelerdeki kadınlarda en sık rastlanan ve en çok korkulan malignansilerden biridir. Kanserden ölüm nedenleri arasında, meme kanseri kaynaklı ölümler akciğer kanserinden sonra ikinci sırada yer almaktadır (33). Kadınlarda 25 yaşından önce meme kanserine nadiren rastlanmaktadır ve insidansı menopoza yaşı ile artmaktadır (28, 71). Ülkeler arasında meme kanseri görülme oranlarında farklılıklara rastlanmaktadır. Gelişmiş ülkelerde yaşa göre standardize edildiğinde meme kanseri insidansı 80/100, gelişmekte olan ülkelerde 15.9/100, olarak açıklanmıştır. Bu oranın meme kanserinin daha az görüldüğü Asya Bölgesi'nden 5 kat daha yüksek olduğu rapor edilmektedir. (33).

Meme kanserine sebep olan etiyoloji bu konudaki kapsamlı araştırmalara rağmen büyük ölçüde belirsizdir. Bu malignansinin görüldüğü kadınların yaklaşık % 75' inde risk faktörleri dışında, yaş ve batı tarzı yaşamın önemli olduğu belirtilmektedir (28). İnsidansın göreceli düşük olduğu Asya ülkelerinden gelen göçmenlerin ikinci jenerasyonlarında da batı tarzı yaşam ve yeme alışkanlıklarıyla kanser oranının arttığı görülmektedir (58). Bu bilgiler soya proteini izolatları içeren diyetlerin etkisinin araştırıldığı bir çok deneysel çalışmayla desteklenmektedir (5). Ayrıca, hayvansal kaynaklı süt serumu proteinleriyle beslenen sıçanlarda, kimyasallar tarafından indüklenmiş meme tümörlerinde çeşitlilik yönünden azalma gözlenmiştir (35). Bir başka çalışmada da, süt serumu proteinlerinin dimetilbenzaldehit (DMBA) ile indüklenmiş meme tümörü olan sıçanlarda yaşa bağlı tümör gelişimini geciktirdiği belirtilmektedir (10).

Süt serumu proteinlerinin karsinogenezi nasıl değiştirdiği henüz tam olarak açıklanamamıştır. Bu konuda glutatyon (GSH) ve biyoaktif peptidler özellikle ilgi çekmektedir. Süt serumu proteinlerinin tüketimi dokularda GSH miktarını arttırmaktadır (9). Öte yandan, ksenobiyotik detoksifikasyon yolağı GSH ve GSH S-transferaz enzimini içerir. Ayrıca, GSH serbest radikal detoksifikasyon reaksiyonlarında da görevlidir ve immün yanıtı destekler. Bu nedenlerle yüksek GSH konsantrasyonlarının meme kanseri için koruyucu olduğu düşünülmektedir. Diğer olası mekanizma ise biyoaktif peptidleri içerir. Süt serumu ve süt serumu hidrolizatlarının içerdiği biyoaktif peptidlerin birçok hücresel olayda rol alarak, tümör insidansını azalttığı düşünülmektedir (10).

Normal meme dokusunda, ısı şok proteini 27 (HSP 27) ya çok düşük seviyelerde eksprese olur ya da ekspresyonuna hiç rastlanmaz (19, 23). Ancak yüksek ekspresyonu bildirilen insan meme kanseri tümörlerine zıt olarak HSP 27'nin düşük ya da sınırlı eksprese olduğu tümör tiplerinden de bahsedilmiştir (57, 104). Bununla beraber Stage I ve II'ye girmiş neoplastik hücrelerin kısmen periferik olanlarında sıklıkla ısı şok proteinlerine karşı şiddetli immün yanıt görülmektedir. *In vitro* ve *in vivo* çalışmalarla HSP27'nin yüksek ekspresyonu ile invazif meme kanseri arasındaki korelasyon gösterilmiştir (87).

Sıçan meme kanseri modelinde, agresif tümörlerin oluşturulmasında genellikle polisiklik hidrokarbonlar kullanılmaktadır (42). Bu şekilde karsinojen ile indüklenmiş meme kanseri modellerinde genellikle N-metil-N-nitrozüre (MNU) ve dimetil benzantrasen (DMBA) kullanılmaktadır. Bu iki karsinojen maddeyle oluşturulan tümörler histolojik ve biyolojik olarak insandaki lezyonlara benzemektedir (100). Tümör indüksiyonu hedef dokuya özeldir ve bir veya bir kaç dozda kolayca sağlanabilmektedir. Her iki karsinojen de meme adenokarsinomlarının gelişmesini sağlarken, uygulanan hayvanlarda herhangi bir sistemik toksisiteye rastlanmamaktadır. Ayrıca, değişik dozlarla farklı tipte tümörlerin oluşması sağlanabilmektedir.

Bu çalışmada bir kimyasal karsinojen olan N-metil-N-nitrozüre (MNU) ile oluşturulan sıçan meme kanseri modelinde süt serumu proteinlerinin oksidatif stres üzerine etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla dört deney grubu oluşturulmuştur. Bu gruplar kontrol, N-metil-N-nitrozüre (MNU), N-metil-N-nitrozüre ve süt serumu proteinleri(MNU+SSP) , süt serumu proteinleri (SSP) olarak belirlenmiştir Elde edilen dokularda oksidatif stresi gösteren parametreler ölçülerek olası değişiklikler araştırılmıştır. Ayrıca, gruplar arasındaki doku HSP 27 ekspresyonundaki farklar incelenerek süt proteinleri ile meme kanseri arasındaki ilişki aydınlatılmaya çalışılmıştır.

4.GENEL BİLGİLER

4.1.Oksidatif Stres

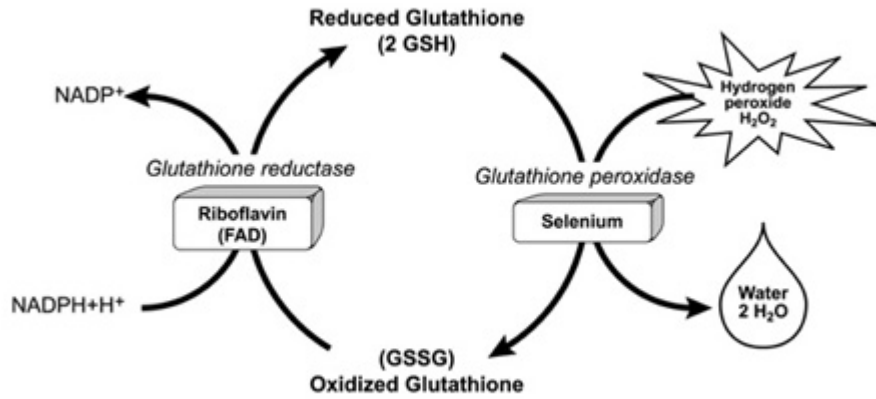
4.1.1.Serbest radikaller

Serbest radikaller en dış orbitalinde tek sayıda paylaşılmamış elektron bulunduran moleküllerdir. Bu moleküller, çevrelerindeki moleküllerden elektron alma veya çevre moleküllere elektron verme eğilimindedirler. Hücre içinde kararsız bileşiklerin oluşumuyla, hücre yapılarında hasara ve değişikliğe sebep olurlar. Kısa yaşam süreleri olmasına rağmen hücrede oksidatif hasara sebep olurlar. Serbest radikaller; bir molekülü oluşturan kovalent bağın homolitik yarılması sonucu, eşlenmiş elektronların her birinin ayrı parçada kalmasıyla, molekülün yapısındaki atomlardan birinin elektron kaybetmesiyle veya yapısına elektron eklenmesiyle oluşabilir. Memeliler aerobik metabolizmayla, başlıca oksijenden serbest radikalleri üretmektedir. Oksijen kaynaklı serbest radikaller hidroksil radikali, hidrojen peroksit, hipokloröz asit, singlet oksijen, peroksinitrit anyonu, peroksinitröz asittir (36). Fakat memeli organizmalarda oksijen türevli serbest radikaller dışında karbon ve kükürt merkezli radikaller de oluşmaktadır. Reaktif oksijen türleri (ROT) ve reaktif azot türleri (RAT) olarak adlandırılan radikal ve non-radikal molekülleri Tablo 4.1’ de verilmiştir.

Tablo 4.1. Reaktif oksijen ve azot türleri

REAKTİF OKSİJEN TÜRLERİ (ROT)		REAKTİF AZOT TÜRLERİ (RAT)	
Radikaller	Non-radikaller	Radikaller	Non-radikaller
Süperoksit	Hidrojen peroksit	Nitrikoksit	Nitröz asit
Hidroksil	Hipoklorik asit	Nitrojen dioksit	Dinitrojen trioksit
Peroksil	Ozon		Dinitrojen tetroksit
Alkoksil	Singlet oksijen		Peroksi nitrit
Hidroperoksil	Lipit peroksit		Alkoksil peroksinitrit

Serbest radikallerin net etkisi oluşumları ile harabiyetleri arasındaki dengeye bağlıdır. Eğer serbest radikal oluşumu antioksidan koruma mekanizmasını atlarsa, denge serbest radikaller lehine bozularak, oksidatif stres ortaya çıkar. Çoğu hücrede bulunan süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz, glutatyon transferaz, katalaz gibi enzimler hücreleri serbest radikallerden korur. Vitamin E, sistein, glutatyon, seruloplazmin gibi ajanlar serbest radikal oluşumunu engelleyerek veya oluşunları inaktive ederek hücre korunmasını destekler. Hücrede serbest radikal birikimi, hücre DNA'sının hasarına, nükleotid yapılı koenzimlerin yıkılmasına, hücre tiyol/sülfat oranının değişimine, tiyollere bağlı enzimlerin yapı ve fonksiyonlarının bozulmasına, protein ve lipidlerin kovalan bağlarında anormalliklerin oluşmasına, enzim aktivitelerinde, lipid metabolizmasında değişikliklere, mukopolisakkaritlerin bozulmasına, protein hasarına, lipid peroksidasyonuna sebep olur. Ayrıca zar yapı ve fonksiyonlarının değişmesine, zar proteinlerinin hasar görmesine, taşıma sistemlerinin bozulmasına, steroid ve yaş pigmenti birikimine, kollajen ve elastin gibi uzun ömürlü proteinlerdeki oksido/redüksiyon olaylarının bozulmasına neden olur. (113). Serbest radikallerin hücrede yol açtığı zararın saptanmasında lipid, protein ve DNA oksidasyonu ürünleri ya da ara ürünleri kullanılır.



Şekil 4.1. Glutatyon oksidasyon, redüksiyon döngüsü

<http://lpi.oregonstate.edu/infocenter/vitamins/riboflavin/ribogsh.jpg&imgrefur>

4.1.2.Glutatyon konjugasyonu

Glutatyon suda çözünen, glutamin, sistein ve glisinden sentezlenen bir tripeptittir. Glutatyon (GSH) organizmanın tiyol içeren en önemli antioksidan molekülüdür. Vücudu tüm elektrofilik ve halojenli yapılara, epoksitlere karşı korur. Karaciğerde milimolar düzeyde, karaciğer dışı dokularda ise nanomolar düzeyde bulunur. Glutatyon havuzu boşaldığında sistein verilmesi halinde glutatyon yeniden oluşur. Hücrenin yükseltgenme indirgenme dengesini koruyan glutatyon, hücreleri endojen ve eksojen kaynaklı oksidanların zararlı etkilerinden korur (78).

GSH antioksidan molekül olarak organizmada çeşitli elektrofilik maddelerin ve peroksitlerin detoksifikasyonunu yapar. Bu görevi glutatyon-S-transferaz ve glutatyon peroksidaz yoluyla gerçekleştirir. Detoksifikasyon görevinin yanında gliksalaz sisteminde ribonükleotitlerin deoksiribonükleotitlere indirgenmesinde tiyol yoluyla çeşitli proteinlerin regülasyonunda ve gen ekspresyonunda da görev alır (2).

De novo GSH sentezi sistin, glutamik asit ve glisin gerektirir. GSH sentezinde γ -glutamilsistein sentetaz (γ -GCS) ve GSH sentetaz enzimleri görev alır. Hücre içinde sentez edilen GSH, selenyum içeren GSH peroksidaz (GSH-Px) ile glutatyon disülfite (okside glutatyon; GSSG) dönüşür (3). Bu enzim hidrojen peroksit ile diğer peroksitlerin indirgenmesini katalizler. GSSG, GSH'ın serbest radikaller ile reaksiyonu sonucu oluşur. GSH'ın GSSG'a dönüşümü transhidrojenasyon yolu ile olur. GSSG'nin tekrar GSH'a indirgenmesi GSSG redüktaz enzimi ile NADPH varlığında katalizlenir. Hücre dışı ortamda GSH, GSSG'a dönüşebilir ancak bu tepkime oksijen gerektirir ve hidrojen peroksit oluşumuna yol açar (63, 65).

Süt serumu proteinleri ile yapılan çalışmalarda, sıçanlarda birkaç dokuda GSH konsantrasyonlarının arttığı görülmüştür, bunun süt serumu proteinlerinde bulunan, glutatyon sentetaz'ın substratı olan γ -glutamilsistein gruplarının yüksek seviyelerine bağlı olduğu düşünülmüştür (11). Artan doku GSH konsantrasyonları GSH'ın antioksidan etkisinden dolayı, mutajeniteyi azaltan, koruyucu etkisi olduğu düşünülmektedir.

4.1.3.Lipit peroksidasyonu

Organizmada oksidatif stresi indirekt olarak gösteren lipit peroksidasyonu doymamış lipitlerin (PUFA) bulunduğu ortamda görülen ve moleküler oksijen ile gerçekleşen, ve lipit hidroperoksitlerin olduğu kompleks bir işlemdir. PUFA'nın metilen bağından moleküler oksijenin bir hidrojen atomu ayrılır ve lipit peroksidasyonu başlar. Oluşan ara ürün olan lipit peroksit radikalli (LOO-) ortamdaki diğer PUFA'lar ile etkileşime girerek bu yağ asitlerinden hidrojen atomu salınımı ve PUFA'ların lipit hidroperoksitlere (LOOH) dönüşümünü indükler. Zincir reaksiyonlar şeklinde ilerleyen bu döngü “propagasyon” olarak adlandırılır. Lipit hidroperoksitleri degradasyona uğrayarak alkan, alken, hidroksialkenal ve keton cisimlerine dönüşür. Organizmada oluşan oksidatif hasarı başlatan hidroksil radikali öncelikli olarak membran fosfolipitlerindeki doymamış yağ asitleri ile etkileşir. Bir karbon atomuna bağlı yan zincirden hidrojen atomunu ayırarak su molekülü oluşturacak biçimde bu atomla birleşir. Bu şekilde bozulan membran yapısına sahip hücreler hızla fonksiyon kaybına uğrarlar (1).

Lipid peroksidasyonunun sitotoksik olan son ürünlerinden en çok bilineni malondialdehittir (MDA). Antioksidanların başlıca etkileri lipidleri peroksidasyonuna karşı hücreyi korumasıdır. Lipid peroksidasyonu engellenmediği takdirde, membran geçirgenliğinin artması, hücre zarında hasar, akışkanlık azalması, transmembran iyon dengesizliği, salgılama fonksiyonlarının bozulması gibi etkiler ortaya çıkmaktadır. Bu da hücrede ödeme ve ölüme yol açmaktadır (122).

Lipid peroksidasyonunun *in vitro* ölçümü dokularda ki oksidatif hasarın büyüklüğü hakkında bilgi vermektedir. Dokularda miyeloperoksidaz aktivitesi ve malondialdehit (MDA) seviyesi ile lipit peroksidasyonu hakkında kantitatif veri elde edilebilir (48).

4.1.4.Protein oksidasyonu

Protein oksidasyonu, proteinlerin reaktif oksijen türleri veya oksidatif stres ürünleri ile kovalent modifikasyonları sonucu meydana gelir. Protein oksidasyonu aromatik amino asit bakiyelerinin nitratlaşmasına, tiyol gruplarının oksidasyonuna, ileri oksidasyon protein ürünlerinin oluşmasına ve bazı amino asit bakiyelerinin karbonil türevlerine dönüşümlerine yol açar. Proteinlerdeki fonksiyonel gruplar

poliansatüre yağ asitlerinin oksidasyon ürünleri ve glikasyon/glikooksidasyon reaksiyonları sonucu oluşan karbonhidrat türevleri ile reaksiyona girerek inaktif türevleri oluştururlar. Proteinlerin konformasyonel değişimleri; agregasyon ve parçalanmasını artırır. Sekonder ve tersiyer yapının bozulmasına da sebep olur. Proteinlerin normal fonksiyonlarında azalmaya ve proteolize yatkınlığına yol açar. Protein oksidasyonunun kimyasal sonuçları enzim aktivitesindeki azalma, protein fonksiyonlarının kaybı, proteaz inhibitör aktivitenin kaybı, protein agregasyonu, proteolize artmış veya azalmış yatkınlık, reseptör aracılı endositozun bozulması, gen transkripsiyonlarındaki değişimler, immünojen aktivitedeki artış olarak sıralanabilir. (98). Reaktif türevler tarafından gerçekleştirilen proteinlerin oksidatif modifikasyonları, bir dizi bozukluk ve hastalığın etiyolojisi ile ilerlemesinde rol oynar (22). Protein oksidasyonuna yol açan temel mekanizma polipeptid omurgasındaki, çeşitli aminoasitlerin α -karbon atomlarından hidrojen atomunun çıkarılması sonucu oksidasyon ürünlerinin oluşmasıdır (97). Protein oksidasyonun protein karbonil (PCO) gibi marker'larının *in vivo* protein oksidasyonun derecesini gösterecek bir araç olarak kullanılması nispeten uzun bir geçmişe dayanmaktadır (103).

4.1.5. Isı şok proteinleri

Isı şok yanıtı ilk kez 1962 yılında Ritossa tarafından meyve sineklerinin tükürük bezlerinde, ısı yükselmesi, sodyum salisilat ve dinitrofenol etkisiyle kromozom şişkinlikleri olarak tanımlanmıştır (85). Daha sonra 1973 yılında bu modele uygun bir grup protein sentezi Tiessière tarafından gösterilmiş ve ısı şok proteinleri olarak isimlendirilmiştir (108). Bu proteinlerin birçok değişik stres faktörü ile sentezlerinin artması stres proteinleri olarak anılmalarına sebep olmuştur (55).

Isı şok proteinleri ya da stres proteinleri evrim sırasında iyi korunmuş moleküller sınıfında olup, hücre homeostazisinin korunmasında temel rol oynarlar. Fizyolojik koşullar altında moleküler şaperonlar olarak protein katlanması, taşınması ve yıkımına yardımcı olurken, stres koşullarında zarar görmüş proteinlerin agregasyondan korunmasını ve bu proteinlerin yeniden katlanmasını sağlarlar. Isı şok proteinleri birçok gruba ayrılırlar ve moleküler ağırlıklarına göre adlandırılırlar (118).

Tablo 4.2 Isı şok proteinleri sınıflandırılması.

Aile	Üye	Ağırlık (kDa)	Fonksiyon
HSP 110	HSP 110 HSP 104	80-110	Yüksek sıcaklığa tolerans ATP az aktivitesi
HSP 90	HSP 100 HSP 90 α HSP 90 β	82-110	Sitoplazmik protein Zayıf şaperon aktivitesi
HSP 70	HSP 72 HSP 73 GRP 78 GRP 75	67-76	Hücre döngüsü düzenlenmesindeki proteinlerin katlanması, thermotolerans Zayıf ATPaz aktivitesi
HSP 60	HSP 60 HSP 58	58-65	Mitokondride bulunur Moleküler şaperon ATPaz aktivitesinin düzenlenmesi
Küçük HSP'ler	HSP 27 HSP 23 HSP 29 HSP 18	18-27	HSP 27 memelilerde thermotolerans
HSP 10	HSP 10	9-12	Hsp 60 fonksiyonlarının uyarılması
Ubikitin	Ubikitin	8	Abnormal proteinlerin degradasyonu
Diğer HSP'ler	FK BP 59 HSP 47 HSP 32		Stres fonksiyonu bilinmiyor

HSP 27 farklı laboratuvarlar tarafından izole edilmiştir. 25kDa'luk protein aktin polimerizasyonu ile ilişkilidir. HSP 27 insan meme kanseri hücre hattında östrojen bağlayan protein olarak tanımlanmıştır (Edward et al.1981).

27 kDa ağırlığındaki ısı şok proteini HSP 27 aktin ilişkilidir, başlıca deri ve östrojenin hedef dokusunda eksprese edilir (19). HSP 70 ailesini oluşturan

indüklenebilir üyeler, tüm doku hücrelerinde sitoplazma ve nükleusta lokalize olmuşlardır. Memeli hücrelerinde sık rastlanan bir protein olan HSP 90'nın bu hücrelerde iki izoformu tespit edilmiştir (57).

HSP 27, HSP 70 ve HSP 90 ailesinin üyelerinin anormal ekspresyonları ile meme kanseri prognozu arasında pozitif kolerasyon vardır. Romanucci ve ark.'nın 2006 yılında yaptığı bir hayvan çalışması sonuçlarına göre normal meme dokusunda alveoller hücrelerin sitoplazmasında, intralobular ve ekstralobular duktuslarda az miktarda HSP 27 ekspresyonuna rastlanırken, invaziv aşamalarındaki marjinal bölgelerde, yüksek miktarlarına rastlanmıştır (87).

4.2.Süt Proteinleri

Süt, içeriği sayesinde bilinen en iyi besin kaynaklarından biridir, bileşenleri su, yağ, protein (kazein miselleri ve süt serumu proteinleri), karbonhidrat (laktoz), mineral, vitamin ve enzimlerdir (44). Sütteki proteinlerin bir çoğunun kimyasal ve fiziksel yapısı bilinmektedir. Doğal inek sütünün yaklaşık %35'i proteinden oluşur (68). Süt, %80' i kazein, %20' si süt serumu proteinlerinden oluşan başlıca iki ana fraksiyona ayrılır (100).

Kazeinin α -1, α -2, β , κ olmak üzere dört farklı ana formu bulunurken, süt serumunda bulunan major proteinler β -laktoglobülin, α -laktalbumin, immünoglobülinler, serum albumin, laktoferrindir ve tümü biyolojik aktiviteye sahiptir (37).

Kazein prolin, lösin, glutamik asit, serin, lizin amino asitlerinden zengindir, sistein ve karbonhidratların varlığı, bazı amino asitlerin içerikleri, fosfoseril gruplarının sayısındaki farklılık ile birbirlerinden ayrılırlar. Süt serumu proteinleri yüksek lizin, triptofan ve sisteğin içeriği ile çok yüksek bir besin değeri sağlayan globuler proteinlerdir, kuaterner yapı sekonder α -heliks ve β -kıvrımlı tabaka ile sağlanır. Kazeinlerden daha az prolin içerirler ve kompakt molekülerdir (73).

4.2.1.Peynir altı suyu ve süt proteinleri

Süt serumu, peynir yapımı sırasında sütteki kazein çöktürüldükten sonra kalan sulu fazı tanımlayan bir terimdir. Birçok fabrika ürünü içerisinde toz hali kullanılır. Süt serumu proteinleri tozu yenildiğinde kana çok hızlı karışır, bu yüzden sporcular tarafından tercih edilmektedir. Yüksek miktarlardaki protein içeriği sayesinde,

spordan sonra kaslar için gerekli olan zincirli amino asitlerin temini için kullanılır (6, 25).

Sütteki kazein çöktürülmesi ile süpernatantta kalan proteinler, süt serumu proteinleri olarak adlandırılır. Bu proteinler kazeinden daha fazla suda çözünebilme özelliğine sahiptir ve sıcaklıkla denaturasyona maruz bırakılmışlardır (44).

Süt serumu proteinleri, her biri farklı moleküler ağırlıkta ve sağlık için önemli majör ve minör protein fraksiyonları olarak gruplandırılır (29, 52, 79, 82).

4.2.2.Süt serumu proteinlerinin ticari ve klinik kullanım alanları

Ticari ve klinik açıdan önemi olan süt serumu proteinleri α -laktalbumin, β -laktoglobulin, bovine serum albumin, immunoglobulinler, laktoferrin, laktoperoksidazdır. Bu proteinler değişik biyolojik aktivite gösterirler ve farklı farmasitik, nütrisyonel ve kozmetik ürünlerin yapısına katılırlar (25, 38, 82, 101).

Süt tozu ve süt serumunda ki major proteinlerden biri olan laktoferrinin geniş bir kullanım alanı vardır. Mikroorganizmalar ve bitkilerce rekombinant olarak üretilen insan laktoferrin proteini, insan ve hayvan sağlığı için kullanılabilecek, ticari bir üründür.

Membran filtrasyonu ve iyon değişim kromatografisi teknikleri kullanıma girdikten sonra süt serumu proteinlerinin özellikle α -laktalbuminin bebek mamalarını zenginleştirmek için kullanımı artmıştır (47). Bebek mamaları geliştirilirken anne sütüne benzemesi için uzun süren uğraşlar verilmiştir, inek sütü kullanılarak insan sütünün nütrisyon komponentleri karşılaştırılması amaçlanmıştır. İnsan sütünün protein içeriği kalite ve miktar olarak inek sütünden farklıdır (43). Bebek mamaları inek laktoferrin molekülünün (bLF) ilk büyük kullanım alanıdır, günümüzde ise kozmetik ürünler, evcil hayvan besinleri, immün sistemi destekleyen doğal ürünler, içecekler, fermente süt ürünleri ve sakız üretiminde kullanılmaktadır. Tüm bu kullanım alanlarında laktoferrinin (LF) doğal antimikrobiyal, antioksidatif, antiinflamatuvar, antikanser ve immunomodulator özelliklerinden yararlanmak amaçlanmaktadır (20, 51, 68).

Son zamanlardaki klinik çalışmalar; LF'in enfeksiyonlarda ve enflamatuvar hastalıklarda da etkili olduğunu göstermektedir. Yapılan son klinik çalışmalardan biri

olan floconazolun aşamalı minimal inhibisyon konsantrasyonlarıyla birlikte kullanılan LF'nin vaginal patojenler olan *C. Albina* ve *C.Glabrata* enfeksiyonlarında sinerjik etkisi açıklanmıştır (76). LF'in basit inflamatuvar hastalıkların tedavisinde güçlü bir molekül olduğu rapor edilmiştir (59). Japonya'da devam eden kapsamlı bir çalışmaya göre kolon kanserine karşı potansiyel bir koruyucu olduğu açıklanmıştır (109). LF genellikle lipit oksidasyonunun geciktirilmesi veya mikrobiyal üremenin sınırlandırılması amacıyla yiyeceklerde koruyucu olarak kullanılmaktadır (67). Septisemi ve birçok akut solunum sistemi sendromu hastalığında kan ve biyolojik sıvılarda yükselen LF değerlerinin marker olarak kullanılabileceği bildirilmiştir (84). Aynı şekilde inflamasyon sırasında lökositlerin intestinal lümene akın etmeleri ile dışkıda artan LF seviyesi de, intestinal inflamasyon hastaları için biyolojik marker olarak kullanılabilir (32). Bu biyolojik marker kronik inflamatuvar bağırsak hastalığı ve Crohn's hastalığı için spesifite ve sensivite göstermektedir (16). Sığır α -laktalbümin ve β -laktoglobülinin, tripsin ve kemotripsin ile parçalanmasından elde edilen, birçok farklı peptitte gram-pozitif bakterilere karşı anti bakterial aktivite gösterir (80, 81).

Koyun süt serumu proteinlerinin hidrolizinden elde edilen peptidlerin ise *Escherichia Coli* HB101, *E.coli* Cip812, *Bacillus subtilis* Cip5265 ve *Staphylococcus Aureus* suşlarının gelişimini inhibe ettiği gösterilmiştir, ancak bu peptitler henüz tanımlanamamıştır (24).

Biyoaktif peptidler intakt süt serumu proteinlerinin polipeptid zincirinde inaktif formda bulunur. Süt serumu proteinlerinin intestinal kanalda sindirilmesiyle ortaya çıkan peptidler besin maddelerinin girişini ve hormon sekresyonunu stimüle ederek postparandiyal metabolizmayı düzenler. Bununla birlikte süt serumu proteinlerinin terapötik yararları biyoaktif peptid fermentasyonundan çıkan ürünlere bağlıdır (51). Son yıllarda diyetle alınan proteinlerin fizyolojik aktif unsurlar içerdiği daha sık vurgulanır hale gelmiştir (54, 82). Biyoaktif peptidler 3-20 amino asit içerir ve doğal proteinlerin aktif peptit fraksiyonları sindirim sonunda ortaya çıkar. Bu peptidler serbestleştğinde hormon gibi davranarak regulasyona katılırlar. Pankreatik, bakteriyel ve fungal enzimler biyoaktif peptit yapımında kullanılır (81).

Süt serumu proteinlerinin hipertansif etkisi de son 20 yıldır araştırılan konulardan biridir. Mukarami ve ark., 2004 yılında, Japonya’da ticari olarak satılan süt serumu proteinleri ile yaptıkları çalışmada piyasada bulunan 12 çeşit süt serumu örneğinin antihipertansif ve ACE inhibitör etkisi olduğunu, bunlardan dört tanesinin de güçlü hipertansif etki gösterirken aynı zamanda orta derecede ACE inhibitör etkisi olduğunu açıklamıştır (75).

4.2.3.Süt serumu proteinlerinin immün sistem üzerine etkileri

İnsan bağışıklık sistemi bakteriyal, viral, fungal ve parazitik etkenlere ve kansere karşı önemli koruyucu etkiye sahiptir (86).

İmmün sistemde yetmezlik kişinin enfeksiyon riskini ve hastalık şiddetini arttırmaktadır. İmmün sistem hastalığa karşı spesifik ve nonspesifik yanıtlar göstermektedir. Spesifik immün yanıt T lenfosit ve B lenfositten üretilen antikorlar aracılığıyla olur. Nonspesifik immün yanıt ise cilt, mukoza, lizozim, kompleman ve interferon gibi fizikokimyasal bariyerler ayrıca doğal öldürücü (NK) ve fagositik hücreleri içerir. Süt ise immün sistemi düzenleyen immünoglobulinler, laktoferrin, büyüme faktörleri ve glutasyon üretimi için gerekli amino asitlerden oluşur. Bunların yanı sıra otokrin ve/veya parakrin etkisi olan sitokin olarak adlandırılan pluripotent polipeptidler de süt yapısında bulunur (21, 31).

İntestinal lümende enfeksiyona karşı pasif immünite lizozim, laktoperoksidaz, laktoferrin ve kazein makropeptidler ile sağlanır (7). İmmünoglobulinler pasif savunmada yer alır ve intestinal lümende parçalanmaya karşı dirençlidir (88).

Kolostrum olarak bilinen doğum sonrası ilk süt immünoglobulinler, antimikrobiyal peptidler, büyüme faktörleri ve başka biyoaktif peptidlerden zengindir (110). Kolostrumdan üretilen süt serumunda immünglobulin konsantrasyonları yüksektir ancak laktasyon sonrası konsantrasyon azalır.

Süt serumu proteinlerinin ürünleri aktif laktoferrin/metal bağlayıcı aktivitelerden zengindir. Laktoferrin hem stabil demir iyonlarının salınmasına hem de oksidatif reaksiyonları katalizleyebilen serbest demir iyonlarının temizlenmesine aracılık eder (37). Laktoferrinin antimikrobiyal ve bakterisidal aktivitesine benzer çok sayıda ürün içeren süt serumu proteinleri intestinal kanal için en iyi antimikrobiyal maddelerden biridir.

İmmünglobulinler süt türevlerinde ağırlıklı olarak bulunur ve süt serumu proteinlerinin %1 kadarını oluştururlar. IgG *Clostridium difficile*'nin toksinini bağlayarak bu enfeksiyonun kötü etkilerini engellediği bildirilmiştir. (116). Antimikrobiyal peptidler doğal bağışıklık için önemli unsurlardır ve süt proteinlerinin proteolitik olarak sindirilmesinden elde edilebilirler.

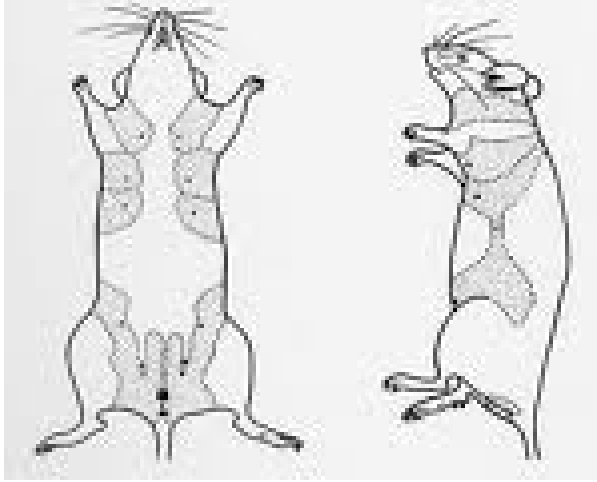
4.2.4.Süt serumu proteinlerinin antikanser aktivitesi

Nutrisyonel çalışmalarda gıdaların antikanser etkileri geniş bir şekilde araştırılmıştır (17). Genel olarak hububat, yeşil sebzeler, taze meyveler ve liflerden zengin, düşük doymuş yağlardan oluşan diyetin sağlık açısından faydalı olduğu kabul edilmektedir. Bu çalışmalarda göreceli olarak inek sütüne daha az vurgu yapılmıştır

Oleik asit ve α -laktalbümin birleşiminden oluşan human alpha-lactalbumin made lethal to tumor cells (HAMLET) molekülü birçok modelde denenerek terapotik etkisi bildirilmiştir. Bu modellerdenbiri olan sıçan glioblastoma ksenograf modelinde, insan glioblastoma doku kültürlerinde gelişen sferoidler ve hücre süspansiyonları farelere enjekte edilerek gerçekleştirilmiştir. Bu metodun uygulandığı hayvanlarda HAMLET molekülü verilmeyen farelerde tümör belirtileri 7 haftada çıkarken HAMLET verilenlerde daha geç ortaya çıkmıştır ve tümör boyutları daha küçüktür. Sağlıklı hayvanlara HAMLET moleküllü verildikten sonra herhangi bir zehirlenme belirtisi görülmemiştir (26).

Deri papilloma hastalarında yapılan başka bir araştırmaya göre de placebo ile karşılaştırmalı olarak topikal uygulanmasıyla HAMLET molekülünün %100 oranında başarılı olduğu görülmüştür (34). HAMLET molekülünün daha çok apoptoza karşı etkisi çalışılmıştır. Svensson ve arkadaşları tarafından 2003 yılında keşfedilen bu protein hakkında daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir (103).

4.3.Sıçanlarda Meme Anatomisi ve Meme Gelişimi

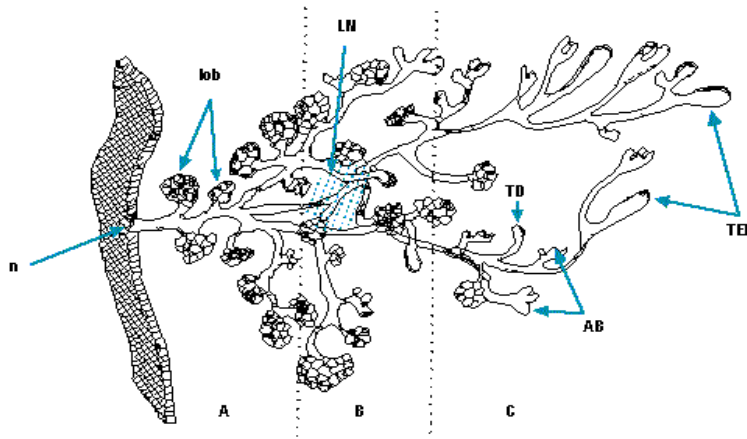


Şekil.4.2. Sıçanlarda meme anatomisi

(http://Necropsy_of_the_Mouse/imagesbig/Image7.jpg&imgrefurl=http,
Erişim:07.05.2010)

4.3.1. Makroskobik anatomi

Meme bezleri sıçanlarda servikal alandan inguinal alana doğru ventro leateral olarak yerleşim göstermektedir. Dorsale doğru sübkütan yassı fibroadipoz dokuyu barındırır. Dişi sıçanlarda ikisi servikal alanda, ikisi torosik alanda, son iki bezde abdomino-inguidal alanda olmak üzere altı çift meme bezi bulunur. Erkek sıçanlarda meme dokusu atrofiktir ve çok nadir spontan meme tümörlerine rastlanır. Bu yüzden karsinogenez çalışmalarında kullanılmamaktadırlar (91).



Şekil.4.3. 55 Günlük dişi sıçan meme dokusu

(<http://ehp.niehs.nih.gov/realfiles/members/1996/104-9/russofig2big.GIF>
Erişim17.05.2010)

4.3.2. Mikroskopik anatomi

Sıçanlarda meme üç bölgeden oluşmaktadır. Birinci bölge *Zon A* olarak adlandırılır ve meme ucundan arkaya doğru fibroadipoz dokuya kadar uzanır, bir veya iki major süt kanalından oluşur. Progresif olarak daha küçük duktusların ve lateral tomurcukların bulunduğu bölge ise bezin *Zon B* kısmındadır. Ayrıca bu bölge intramamaryan lenf nodlarını içerir. Bezin son kısmı terminal duktal yapıları ve terminal tomurcukları içeren *Zon C* olarak adlandırılan bölgedir bezin en aktif kısmıdır.

Meme duktusları tübüller yapıda olup iç yüzeyleri epitel hücrelerinden, dış yüzeyleri ise bazal membran üzerine yerleşmiş miyoepitel hücrelerinden oluşur. Epitel hücrelerinin kalınlığı ve yapılarındaki farklılaşma hücrelerin yerleşim yerine göre değişiklik gösterir (90).

Sıçan meme dolusunda major duktuslar tek tabaka ya da psödostratifiye tabaka kloumnar veya küboidal hücrelerden oluşur. Lümene doğru uçları künt yapıdaki mikrovilli yapısı uzanır. Hücreler insandaki gibi gelişmiş bağ kompleksleri ile birbirlerine tutunur. Terminal tomurcuklar ise büyük küp şeklinde hücrelerden oluşup çok katlı epitelyum hücreler içerirler, hücre proliferasyonunun en yoğun olduğu yerlerdir (92).

‘*Cap*’ hücreleri terminal tomurcuklarda bazal membranın hemen altına yerleşmişlerdir. Duktus ve miyoepitel hücreleri *cap* hücrelerinden oluşur (90, 92). Miyoepitel hücreleri epitel tabakası ile bazal membran arasına yerleşmiştir, insan miyofibriline benzeyen aktin ve miyozin liflerinden oluşur.

4.3.3.Sıçanlarda deneysel meme kanseri modeli

Sıçanlarda meme kanseri araştırmalarına bazı türlerde spontan meme tümörlerinin oluştuğunun farkına varılmasıyla başlanmıştır. Çeşitli suşlardaki dişi sıçanlarda yaşla beraber hormon-bağımlı meme kanseri oluşabilmektedir. Erken yaşta yapılan ooferektomi sonrasında sıçanlarda meme kanseri oluşumu tamamen engellenmekte ya da geciktirilmektedir (117).

Yaşlanma ile beraber reproduktif siklusun sona ermediği ve hormonal dengesizliklerin eşlik ettiği durumlarda meme tümörlerinin oluştuğu görülmüştür (2).

Deneyisel hayvan modelleri kanser inisiyasyonu, progresyonu ve çok basamaklı karsinogenez hakkında birçok bilgi sunmaktadır. Sıçanlarda meme tümörleri virüs enfeksiyonları, genotoksik kimyasallar ve radyasyonla indüklenebilmektedir (18). Meme kanseri araştırmaları için ideal hayvan modeli insanda görülen hastalığı taklit etmelidir. Meme kanserinin insanlarda kimyasallarla ya da genotoksik ajanlarla oluştuğuna dair net bir kanıt olamasa da yaşam boyunca bireylerin çeşitli çevresel karsinojenlere maruz kaldığı bilinmektedir. Polisiklik hidrokarbonlar, nitrozürelere ve aromatik aminler gibi çevrede yaygın olarak bulunan toksik kimyasalların *in vitro* deneylerde insan meme hücresi kültürlerinde epitelde mutasyon ve neoplastik transformasyonu indüklediği gösterilmiştir (94).

Oluşturulan neoplastik değişiklikler karsinogenezin başlamasına sebep olan konak faktörleri hakkında bilgi vermekte, yaş ve reproduktif duruma bağlı oluşan değişiklikler, ovaryan plasental ve pitüiter hormonların etkilerini gösterebilmektedir. Meme dokusu iyonize radyasyonun yarattığı karsinojenik etkiye en yatkın dokulardan biridir.

İyonize radyasyonun etkilerinin incelendiği hayvan modellerinin ilki 1950 yılında dişi Holzman sıçanlarına, 6 ay boyunca supraletal dozda X ışını uygulanmasıyla, benign ve malign meme tümörleri oluşturulan çalışmadır (27). Radyasyonun genç virjin sıçanlarda daha çok karsinojenik etki yarattığı bilinmektedir. X ışınları, nötronlar, fraksiyone γ -radyasyonun, doza bağlı olarak, lineer etki yaratarak, bir yıllık süreçte sıçanlarda değişik tipte meme tümörleri oluşturulduğu gösterilmiştir (14).

Hücre kültürleri meme kanseri patofizyolojisinin araştırılmasında diğer bir yöntemdir. Sıçanlarda oluşturulan meme tümörleri ya da insan meme tümörleri iki boyutlu hücre kültürlerinde çoğaltılarak hücre-hücre, hücre-ekstraselüler matriks etkileşimleri araştırılabilmektedir (49).

Yeni geliştirilen üç boyutlu hücre kültürlerinde E-kadherin gibi çeşitli adezyon moleküllerinin invazyon ve metastazda ki rolü ve angiogenez araştırılmaktadır (45).

4.3.4.Genotoksik kimyasallarla oluşturulan meme kanser modelleri

Kimyasallarla oluşturulan meme tümörleri çeşitli basamaklardan geçerek oluşmaktadır. Kimyasal uygulamasından sonra ilk basamakta hücresel DNA ile

karsinojen karşı karşıya gelerek DNA' da biyokimyasal bir tahribat oluşturur. Bu etkileşimden oluşan DNA hasarı onarılmazsa sonuç mutasyon, kromozomal translokasyon, regülatör genlerin inaktivasyonu olabilir. Neoplazi; oluşan hasarın geri dönüşümsüz olup otonom hücre proliferasyonunun oluşması ile başlar, invazyon ve metastaz basamakları ile devam eder (119).

Sıçan suşları arasında değişik karsinojenlere karşı genetik olarak hassasiyette farklılıklar mevcuttur. Genetik yatkınlığı da nesilden nesile aktarıldığı savunulmaktadır (41).

Sıçanlarda polisiklik hidrokarbonlar, nitrozürelere, aromatik aminler meme kanserini tetikleyebilmektedir. Bu kimyasallar arasında 7,12-Dimetilbez(a) andresen (DMBA), N-metil N-nitrozüre (MNU), monokloroasetik asit (MCA), 2-asetiaminofloren, 3,4-benzopiren, etilnitrozüre ve bütülnitrozüre meme kanserini tetikleyici ajanlar olarak kullanılmaktadır.

Sıçan suşları arasında Buffalo, Sprague-Dawley, Lewis, Wistar/Furth suşları kimyasallara karşı en hassas gruplardır. Fisher, August, ACI ve Copenhagen suşları genelde kimyasallara karşı dirençlidir. Makroskobik olarak hassas suşlarda %70 oranında meme tümörü oluşturulabilirken bu oran dirençli suşlarda %10'dan azdır.

Meme karsinogenez çalışmalarında en fazla Sprague-Dawley daha sonra Wistar suşları kullanılmaktadır. MNU direkt olarak meme hücresi DNA'sına etki eden bir ajan olarak görev almakta ve doza bağlı olarak değişen sıklıklarda meme tümörleri oluşturmaktadır. Uygulama sonrasında aktif kimyasala parçalanır. MNU ise direkt etkili karsinojenler sınıfındandır (107).

Meme kanserinin patogeneğinde üç ayrı mekanizmanın etkin olduğu öne sürülmektedir. Meme hücrelerinde proliferasyon ile apoptoz arasındaki hassas dengenin bozulmasıyla, oksidatif stresin yarattığı serbest radikal hasarı ve endokrin değişikliklerin oluşması kanser oluşumunu indüklemektedir (39,40).

Bahsedilen endokrin değişiklikler prolaktin ve östrojen seviyelerinde artış, progesteron seviyesinde düşüş ile apoptoz-supresör gen indüksiyonundan oluşmaktadır. Meme dokusunda östrojenler metabolik etkileri ile serbest radikal miktarını artırmaktadırlar. Meme bezi epitelinde östrojenin oluşturduğu oksidatif DNA hasarının 8-oxo-2-deoksiguanozinin indüksiyonuyla gerçekleştiği gösterilmiştir (74).

Meme karsinogenezinde apoptoz TNF- α ve kaspazlar tarafından oluşturulmaktadır. TNF- α bir enflamatuvar sitokin olup makrofajlar ve lenfositler tarafından salgılanmaktadır. Tümör hücrelerine karşı sitolitik ya da sitostatik etkilerinin yanında karmaşık bir etki sistemine sahip olup hücrelerde nekroz ve apoptozu hızlandırmaktadır. Kaspaz-3 (sistenil aspartat proteinaz) molekülü oksidatif stres durumunda apoptozun oluşumunu sağlamaktadır (54).

Oksidatif stres ve oluşan serbest radikal hasarı tek başına karsinogenezin başlamasında ve progresyonunda önemli bir basamaktadır (64).

Meme bezini oluşturan hücreler üç farklı evrede denge halinde bulunmaktadır. Bu evreler siklus evresi, dinlenme evresi (G_0) ve ölüm evresidir. Meme bezinde bu üç evrede bulunan hücre popülasyonları hücre siklusu çalışmaları, büyüme fraksiyonu ve hücre kaybı ölçüm yöntemleriyle tanımlanabilmektedirler. Büyüme fraksiyonundan kasıt siklus içinde gelişimlerine devam eden hücrelerin tanımlanmasıdır. Hücre siklus zamanı ve büyüme fraksiyonu belirlenerek ünite/zaman'da çoğalan hücre sayısı gösterilmiş olur. Meme dokusu değişimini tamamlamaya yakın ya da erişkin meme dokusuna dönüşürken çoğalan hücre sayısı ölen hücre sayısına eşitlenmeye başlamaktadır (93). Genç virjin sıçanların meme dokusunda mevcut olan terminal tomurcuklarının karsinojenlere daha fazla hassas olmaları bu bölgedeki hücrelerin aktif olarak proliferasyon gösteren epitele sahip olmalarına bağlanmıştır. Terminal tomurcuklardaki aktif proliferasyon varlığı mitotik ve DNA indeksi hesaplamalarıyla gösterilmiştir. Terminal tomurcuklarda ve terminal duktuslarda mitotik indeksler yüksektir, bu oran proksimale doğru gidildikçe azalmaktadır (95)

4.3.5.N-Metil N-Nitrozüre ve tümör indüksiyonu

MNU, $C_2H_5N_3O_2$ kapalı formülüne sahip su içinde ve polar organik çözücülerde çözünebilen, yüksek oranda karsinojenite, teratojenite ve toksisiteye sahip bir kimyasaldır. İnstabil bir madde olan MNU ısı, ışık ve havayla temasında diazometana dönüşür. MNU direk etkili bir ajan olup, DNA'ya geri dönüşümsüz bağlanarak, mutasyonlara sebep olur ve karsinogenezi indükler. MNU doza bağlı olarak tümör indüksiyonu sağlayabilmektedir. İntravenöz ya da intraperitoneal MNU uygulamasından sonra hassas sıçan suşlarında 8-21 arasında tümör oluşumu

görülebilmektedir. MNU ile tümör indüksiyonunda dişi virjin sıçanlar kullanılmaktadır (83, 91, 92).

Virjin sıçanlarda endokrin modifikasyonlar gerçekleşmediği için karsinojene karşı daha hassastırlar. Wistar ve Sprague Dawley sıçanlarda karsinojene en hassas olunan dönem, 40-60 günlük oldukları dönemdir. Oluşan malign tümör sayısı MNU dozuyla (20-50 mg/kg) orantılı olarak artarken, yaş arttıkça oluşturulabilecek tümör sayısı azalmaktadır. Sıçanlarda MNU ile meme kanseri oluşturulmasında tümör oluşumunun meme dokusundaki terminal tomurcuklardan başladığı düşünülmektedir. Terminal tomurcukların en fazla olduğu dönem 40-60 günlük oldukları dönemdir (90, 92). Gebelikle birlikte terminal tomurcuklar alveolar tomurcuklara gelişmekte yanı sıra karsinojene hassasiyet azalmaktadır (72).

MNU uygulamasından sonra DNA hasarı, terminal tomurcuklarda intraduktal proliferasyona sebep olur. İntraduktal proliferasyonla oluşan hücreler morfolojik olarak terminal tomurcuklardan büyüklükleri ve homojen olmayan hücre kompozisyonları ile ayrılırlar. Hücreler yaklaşık iki katına ulaşırken, periduktal stromada dezmozplastik reaksiyon, başlar bu bölgeye enflamatuvar hücre göçü gerçekleşir. MNU uygulamasından üç hafta sonra 10-20 arası alanda intraduktal proliferasyon başlamakta, 10 hafta sonrada bu oran % 30'a yükselmektedir (74). İntraduktal proliferatif değişiklik prekanseröz lezyon olarak kabul edilmektedir. Sıçanın MNU'ya maruz kalması sonrasında yüksek oranda intraduktal proliferasyon gerçekleşmesine rağmen bu etkiye maruz kalan tüm sıçanlarda meme karsinomu görülmemesinin sebebi bilinmemektedir (90, 91).

Fakat intraduktal proliferasyonla birlikte oluşan stromal reaksiyon ve enflamatuvar yanıt ne kadar fazla ise karsinom sıklığı o kadar artmaktadır. Malign transformasyona ilerleyen intraduktal proliferatif değişikliklerde stromal alanda heparan sülfat gibi proteoglikanların miktarının arttığı, proteoglikanların otokrin yanıtı uyardığı, ortamdaki büyüme faktörleri için reseptör görevi üstlendikleri ve sonuçta bu faktörlerin neoplaziyi hızlandırdıkları öne sürülen teoriler ararsındadır. MNU ile oluşturulan sıçan meme kanseri modeli, bizlere çeşitli şekillerde meme karsinogenezinin aydınlatılmasında bilgiler sunmaktadır. Bunlar şu şekilde tanımlanabilir.

1. MNU ile oluşturulan meme kanseri modellerindeki tümörler insan meme kanserinde olduğu gibi sıklıkla duktal epitelden kaynaklanmaktadır.
2. Tümörler terminal tomurcuklarda oluşan premaling lezyonlardan sonra gelişmektedir.
3. MNU ile oluşturulan tümör modeli, terminal tomurcuklardaki proliferatif değişim ve apoptotik hücre ölümü hakkında bilgiler sunmaktadır.
4. MNU ile oluşturulan hiperplastik, premalign ve malign lezyonlar insandaki lezyonlarla bezerlik taşıdığı için çeşitli kimyasal ajanların hayvan modellerinde denenip karsinogenez üzerine etkileri araştırılabilmektedir.

4.3.6.Karsinojen ile oluşturulan meme tümörlerinin sınıflandırılması

Karsinojen maruziyeti iki temel sınıftaki tümörlerin oluşumuna neden olur.

- Stromal/epitelyum orjinli tümörler
- Being/maling tümörler

Bu tümörler histolojik özelliklerine göre alt sınıflarına ayrılarak incelenmektedir. (83, 89).

Sıçanlarda oluşturulan meme tümörleri arasında en sık invaziv papiller karsinomlar görülmektedir. Papiller karsinomlar yoğun fibrovasküler çekirdeğe sahip olup, lenfosit ve mast hücreleri barındırırlar. Sıklıkla ülserasyona ve bölgesel nekroza yol açarlar. Fibrovasküler alanda gelişen epitelyum, kalınlığı ve sitolojik özelliklerine göre Grade I ve Grade II şeklinde sınıflandırılırlar. Grade I tümörler birkaç kat epitel hücrelerinin yanında kısa papiller görünüme sahiptir. Grade II tümörler daha seyrek bağ dokusu üzerinde sekonder (papilla) olan epitel hücreleri vardır (71,72). Sıçan meme kanseri modellerinde oluşan palpabl kitlelerin neoplastik değişikliklere bağlı oldukları ancak histopatolojik olarak doğrulanabilmektedir.

Karsinojen indüksiyonu esnasında reaktif olarak meme dokusuna uyan bölgelerde lenfoid hiperplaziler, cilt ve cilt adneksiyal yapı tümörleri, hibernomlar, tükrük bezi hiperplazileri (servikal meme bezleri komşuluğunda), apseler oluşabilmektedir. Bu kitlelerin tümü ayırıcı tanıları arasında yer almaktadır. Sıçanlarda oluşturulan meme tümörlerinde malignite kriterleri şu şekilde belirlenmiştir.

I-Makroskopik Kriterler

- Kısa sürede hızlı büyüme göstermesi, cilt ülserasyonu varlığı
- Nekroz ve hemoraji içeren yumuşak karakterlerde doku oluşumu.

II-Histopatolojik Kriterler

- Normal yapının kaybı, pleomorfizm varlığı, papilla formasyonu
- Miyoepitel üzerinde tek tip hücre varlığı, değişik oranlarda fibrozis ve enflamatuvar yanıt oluşması
- Nükleositoplazmik oranda artış, oval nükleus yapısı, leptokromatik görünüm, bir veya iki belirgin nükleus, yaygın mitoz varlığı.
- Kas, dermis, yağ dokusu invazyonu

III-Biyolojik Kriterler

- Lenf nodu ve akciğer metastazı (yaşlı sıçanlarda)
- Gözün ön kamerasında anjiojenik cevap oluşumu.

5.GEREÇ VE YÖNTEM

Bu tez çalışması Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiş (Proje no: SAG-C-YLP-270109-0011) ve Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (Onay tarihi ve sayısı: 20.11.2008-63.2008.mar).

Çalışmamız Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Araştırma ve Hayvan Laboratuvarı, Patoloji Anabilim Dalı ve Biyokimya Anabilim Dalı Laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

5.1.Deney Modeli Oluşturulması

5.1.1.Deney hayvanları ve deney ortamı

Çalışmalarda ortalama ağırlıkları 180-300 g olan 130 günlük Wistar Albino virjin dişi sıçanlar kullanıldı. Hayvanlar beşerli kafeslerde 12 saat gece, 12 saat gündüz olmak üzere % 40 nem ve 20 °C sıcaklığa sahip ortamda tutuldu.

5.1.2.Hayvanların beslenmesi

Tüm gruptaki sıçanlar pellet formundaki standart ticari yem ile 6 g/10 g vücut ağırlığı/gün olacak şekilde beslendi. MNU grubu, MNU+SSP grubu, SSP grubu ve kontrol grubunda hayvanların içme suları çeşme suyu olarak verildi.

5.1.3.Karsinojen madde hazırlanması ve uygulanması

Yüksek derecede karsinojenik bir madde olan MNU ile çalışılırken, çalışma alanında olası kirlenmeleri engellemek amacıyla filtre kağıdı ile kaplandıktan sonra çeker ocak altında tartım yapıldı. Madde ışığa duyarlı olduğu için çözücünün bulunduğu tüpler alüminyum folyo ile sarıldı. Çözücü olarak 6 ml % 0.9' luk fizyolojik tuzlu su çözeltisinin pH değeri <5 olacak şekilde asetik asit çözeltisi ile

ayarlandı. Ardından 300 mg MNU çözücü içine konuldu ve vortex karıştırıcı (Yellow line TTS2) ile karıştırıldı. Son konsantrasyonu 50 mg/ml olacak şekilde hazırlanan MNU çözeltisi buz üzerinde hayvan laboratuvarına götürüldü ve sıçanlar tartılarak 50 mg/kg olacak şekilde 26 gauge 3/8'lik iğnelerle intraperitoneal enjeksiyonlar yarım saat içinde yapıldı. Enjeksiyon 100 gün ara ile 2 kez yapıldı ve ikinci uygulamada da tüm işlemler tekrarlandı.

Karsinogen çözeltinin hazırlanmasında kullanılan tüm malzemeler çift kat hastane atık poşetlerine doldurulup uygun şekilde imhası sağlandı.

5.1.4. Süt serumu proteinleri çözeltisinin hazırlanması ve uygulanması

Çalışmamızda Kavi Gıda'dan temin edilen süt serumu proteinleri konsantresi (Ek I: Kavi Gıda) kullanıldı. Gavaj sırasında verilen süt serumu proteinleri çözeltisi şu şekilde hazırlandı: 5 g süt serumu proteinleri tartıldıktan sonra 50 ml' lik falkon tüplerine aktarıldı ve hacim ultra saf su ile 50 ml'ye tamamlandı. Karıştırıcı (Mixer 820 Swelab Instrument) ile tüm katı madde su içinde homojen olarak dağılına kadar karıştırıldı, Sigma 2-16K santrifüj aleti ile 2500 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek süpernatantlar ayrıldı. Süpernatantlar 2 ml/sıçan olacak şekilde haftada 2 kez hafif, eter anestezisi altında, feeding tüple ve orogastrik gavajla verildi.

5.2. Deney Yöntemi

5.2.1. Deney grupları

Bu çalışmada 130 günlük 40 adet dişi, virjin, Wistar Albino türü sıçan kullanıldı. Sıçanlara 50 mg/ml n-metil n- nitrozüre (MNU), intraperitoneal enjeksiyonla, 100 gün ara ile iki kez verilerek deneysel meme kanseri oluşturulması amaçlandı (107).

Diğer gruplara ise MNU enjeksiyonu ile aynı anda, haftada iki kez 2 ml orogastrik gavajla süt serumu proteinleri çözeltisi, veya fizyolojik tuzlu su verildi. Sıçanlar 180 gün sonunda sakrifiye edildi ve örnekler toplandı.

Çalışmanın Grupları:

Kontrol grubu (n=10): 130 günlükten itibaren çalışma boyunca haftada iki kez olmak üzere feeding tüp ile 2 ml steril fizyolojik su (FTS) orogastrik gavajla verildi. İlk MNU uygulamasından 180 gün sonra hayvanlar sakrifiye edildi, örnekleme yapıldı.

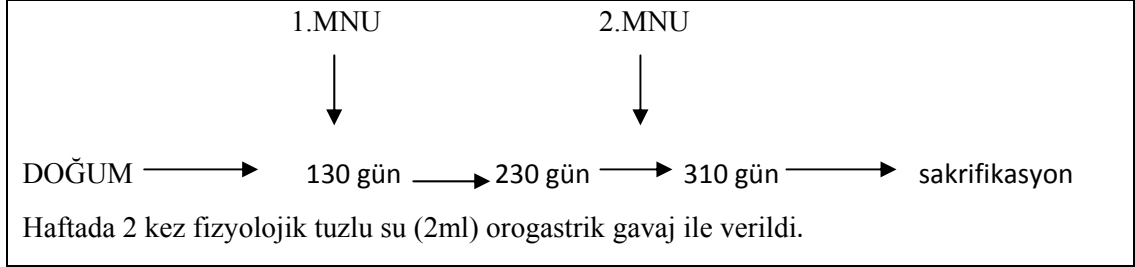
MNU grubu (n=10): 130 günlükten itibaren çalışma boyunca n-metil n-nitrozüre (MNU) 50 mg/kg, intraperitoneal ve 100 gün ara ile iki kez verildi. İlk MNU uygulamasından 180 gün sonra sıçanlar sakrifiye edildi, örnekleme yapıldı.

MNU+SSP grubu (n=10): 130 günlükten itibaren çalışma boyunca n-metil n-nitrozüre (MNU) 50 mg/kg, intraperitoneal ve 100 gün ara ile iki kez verildi. MNU uygulaması ile birlikte haftada iki kez orogastrik gavajla 2 ml süt serumu proteinleri verildi. İlk MNU uygulamasından 180 gün sonra sıçanlar sakrifiye edildi, örnekleme yapıldı.

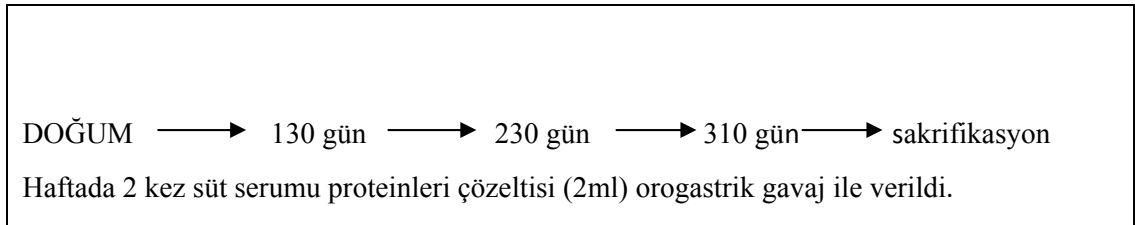
SSP grubu (n=10): 130 günlükten itibaren çalışma boyunca haftada iki kez olmak üzere feeding tüp ile orogastrik gavajla 2 ml süt serumu proteinleri çözeltisi verildi. 180 gün sonra hayvanlar sakrifiye edildi, örnekleme yapıldı.

Sıçanların anestezisi intraperitoneal olarak verilen ketamin 100 mg/kg; Ketalar® (Eczacıbaşı Warner Lambert, İstanbul) ile sağlandı. Ardından hafif eter inhalasyon anestezisi altında intrakardiyak kan alınarak ötenazi gerçekleştirildi. Tüm gruplarda sıçanlar ilk tümör indüksiyonundan 180 gün sonra sakrifiye edildi, bir kısım meme dokusu formaldehid içine yerleştirilerek patolojik incelemeye götürüldü, kalan meme dokusu ile karaciğer ve böbrekler çıkarıldı alüminyum folyo ile sarılıp sıvı azot içerisinde dondurularak -20 °C’ de saklandı. Ötenazi sırasında alınan kan örnekleri santrifüj edilerek serum kısmı ayrıldı, serum örnekleri ependorf tüpler içinde -20 °C’ de saklandı.

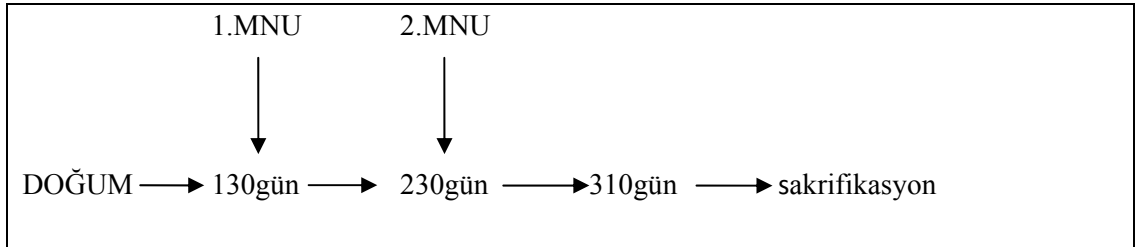
5.2.2. Deney gruplarının akış şeması



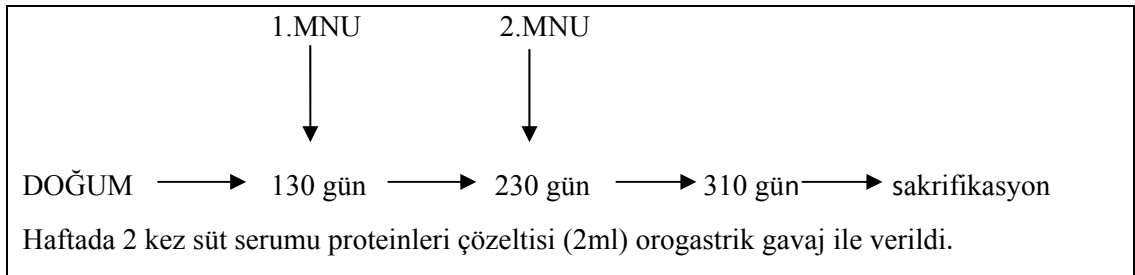
Şekil.5.4. Kontrol grubu deney akış şeması.



Şekil.5.3. SSP grubu deney akış şeması.



Şekil.5.2. MNU grubu deney akış şeması.



Şekil.5.1. MNU+SSP grubu deney akış şeması.

5.2.3.Hayvanların Takibi

Çalışma boyunca sıçanlar, ağırlık, hastalık, tümör gelişimi ve sağ kalım açısından takip edildi. Haftalık olarak kilo ölçümleri yapılarak kayıt edildi. Gruplar içindeki hayvanların yeme alışkanlıkları ve su tüketimleri izlenip farklılıklar kayıt altına alındı.

5.2.4.Hayvanların sakrifikasyonu, kan ve doku örneklerinin incelenmesi

Örneklerin alınmasından önce hayvanlara hafif eter inhalasyon anestezisi yapıldı, daha sonra intrakardiyak kan alınarak ötenazi gerçekleştirildi. Ötenazi sırasında alınan kan örnekleri santrifüj edilerek serum kısmı ayrıldı. Serum örnekleri ependorf tüpler içinde biyokimyasal analizler yapılmak üzere -20 °C’de saklandı. Böbrek, karaciğer ve meme dokularının üçer tanesi her biri için ayrı ayrı olmak üzere alüminyum folyoya sarılıp, etiketlendi ve sıvı azot içerisinde dondurularak saklandı.

Geri kalan 3 meme dokusu tamponize edilmiş %10’ luk formalin solüsyonunda saklandı.

5.3.Biyokimyasal Analizler

5.3.1.Doku homojenatlarının hazırlanması

- 1) 200-300 mg doku alındı, kan pıhtısı ve eritrositlerden arındırmak için 50 mM fosfat tamponu (1 mM EDTA içeren, pH=6.7) ile durulandı.
- 2) Daha sonra doku 1.2 ml fosfat tamponu ile homojenize edildi.
- 3) Homojenat 15 dakika süreyle 10,000 x g, 4 °C’ de santrifüj edildi.
- 4) Süpernatant ayrıldı. Kullanılana kadar -80 °C’de muhafaza edildi.

5.3.2.Dokuda lipit peroksidasyonu

Prensip: Tiyobarbitürik asidin okside lipitlerle reaksiyonu sonrası oluşan renkli ürün spektrofotometrik olarak saptanır.

Ayıraçlar: Tiyobarbitürik asit (TBA) çözeltisi: 0.5 g TBA 20 ml ultra-saf suda ısıtılarak çözülür, üzerine 2.5 ml 1N NaOH eklenir ve ultra-saf su ile 50 ml’ye tamamlanır.

Deneyin Yapılışı: 250 µl homojenat, eşit hacim 250 µl TBA ayıracıyla karıştırılır. Kaynar su banyosunda 1 saat tutulur. Soğuduktan sonra 1.5ml metanol konulur. 532 nm’de absorpsanlar okunur.

Hesap: Sonuçlar, malondialdehit (MDA) için saptanmış olan ekstinksiyon katsayısı ($1.56 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) kullanılarak n mol/g doku cinsinden hesaplandı (8).

5.3.3.Dokuda protein oksidasyonu

Prensip: Oksidan etki sonucu protein yapılarında oluşan karbonil grupları 2,4-dinitrofenilhidrazin ile reaksiyona sokulup oluşan ürünün verdiği absorpsan spektrofotometrik olarak hesaplanır.

Ayırıcılar:

- 1) % 20 ve % 10 Trikloroasetik asit (TCA)
- 2) 2,4-DNPH (19.8 mg/ 10 ml 2 N HCl içinde)
- 3) 1N NaOH çözeltisi

Deneyin Yapılışı: Homojenatın protein içeriği 0.5-1 mg olacak şekilde ayarlanır. Daha sonra 250 µl örnek alınır ve 500 µl %20 TCA ile karıştırılır. 11,000 x g ‘de santrifüj edildikten sonra süpernatant atıldı. Çökelti üzerine 500 µl DNPH ilave edildi. Oda sıcaklığında ara sıra karıştırılarak 1 saat inkübe edildi. Üzerine 500 µl %20 TCA eklendi, 2-3 dakika bekletildikten sonra, 11,000 x g’ de 3 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldı, çökelti % 10 TCA ile yıkandı. Tekrar santrifüj edilerek, bu işlem iki kez tekrarlandı. Pellete 1 ml 1N NaOH eklendi ve 37 °C’ de tutularak çözülmesi sağlandı. Oluşan rengin absorpsansı 360 nm’de okundu. Blank olarak DNPH yerine 2 N HCl kullanıldı.

Hesap: Sonuçlar protein karbonilleri için ekstinksiyon kat sayısı olan $22,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ kullanılarak µmol/mg protein olarak ifade edildi (62)

5.3.4.Dokuda glutatyon tayini

Prensip: Glutatyon ile o-phthalaldialdehit (OPT) kompleksi tarafından oluşturulan ürünün yaydığı floresans yoğunluğu, zamanın bir fonksiyonu olarak ölçülür.

Ayırıcılar:

- 1) Meta-Fosforik Asit Çöktürücü Reaktifi: 1.67 g glasiyel metafosforik asit, 0.2 g disodyum EDTA ve 30 g NaCl saf su ile çözülür ve 100 ml’ye tamamlanır.

- 2) OPT Reaktifi: 25 mg OPT, 25 ml metanolde çözülür.
- 3) Fosfat Tamponu (0.1 M): 13.8 g NaH_2PO_4 (monobazik), 1.46 g (0.005 M) EDTA 1 lt ultra-saf suda çözülür. pH, 1 N NaOH ile 8'e ayarlanır.
- 4) Meta-Fosforik Asit Ekstraksiyon Solüsyonu: 1 ml Meta-Fosforik Asit Çöktürücü Reaktifi(No:1) ile 0.9 ml ultra-saf su ile karıştırılır.
- 5) N-Etilmaleimid (NEM): 125 mg NEM, 25 ml ultra-saf suda çözülür.
- 6) 1 N NaOH : 6 g NaOH, 150 ml ultra-saf suda çözülür.

5.3.5.Glutatyon Standartlarının Hazırlanması

- 1) Stok GSH Standardı: 100 mg GSH, 100 ml ultra-saf suda çözülür. Seri dilüsyon ile 0, 10, 20, 30, 40 ve 50 mg/dl olacak şekilde standart serisi hazırlanır.
- 2) Numune Hazırlanması: 100 μl EDTA'lı kan, Meta-Fosforik Asit Ekstraksiyon Solüsyonu eklenir. 1000 x g'de 10 dak. sentrifüjden sonra supernatant kısmı ayrılır.

Yöntem:

- 1) Hem standart hem numune için, 200 μl fosfat Tamponu floresans plağına pipetlenir.
- 2) 10 μl standart, numune, kontrol, eklenir.
- 3) 10 μl OPT, her kuyuya ilave edilir.
- 4) Oda ısısında 15 dak. İnkube edilir.
- 5) Bu süre sonunda 420 nm'de emisyon ve 350 nm'de eksitasyon olacak şekilde floresans okunur.
- 6) Sonuçlar $\mu\text{mol GSH} / \text{g Hb}$ olarak ifade edilir.

Hesap: Standart grafik çizilir ve sonuçlar grafikten okunur.

Normal Değerler: $9.6 \pm 3 \text{ mg/L}$ (15).

5.4. Elektroforetik Analizler

5.4.1.Meme dokusundan ısı şok proteini ekstraksiyonu

Elde edilen meme dokuları (100 mg), 2 ml soğuk parçalama tamponu (% 0.04 EDTA), % 1 Triton X-100, 1 mM PMSF ve % 0.02 Tris-HCl (pH 6.8) ile parçalandı. Homojenat $+4^\circ\text{C}$ ' de 15000 x g'de (Eppendorf Centifuge 5810 R), 20 dakika

santrifüj edildi. Üst sıvıda bulunan suda çözünebilen proteinler, SDS-PAGE ve Western Blot analizinde kullanılmak üzere -70 °C’ de saklandı (120).

5.4.2. Protein konsantrasyonlarının belirlenmesi

Prensip: Protein ekstratlarının konsantrasyonlarının belirlenmesinde Lowry yöntemi kullanıldı. Proteinler alkali çözeltide bakır ile reaksiyona sokulup bakır-peptid bağı-protein kompleksi oluşturulur. Folin-Ciocalteu reaktifi eklenmesiyle indirgenen tirozin ve triptofan kalıntıları bu komplekslerle birleşirler. Oluşan mavi renk spektrofotometrik olarak ölçülür.

Ayırıcılar:

- 1) % 2 Na₂CO₃, 0.1 M NaOH çözeltisi içinde hazırlanır.
- 2) % 0.5 CuSO₄, %1’ lik NaK tartarat içinde hazırlanır.
- 3) 50 birim 1 no.lu çözelti, 1 birim 2 no.lu çözelti ile karıştırılır.
- 4) Folin-Ciocalteu ayırıcı (kullanılacağı zaman 1:1 sulandırıldı)
- 5) Standart: % 0.2’ lik bovine serum albumin çözeltisi

Uygulama: Bir deney tüpüne 50 µl örnek konulup üzerine 3 no.lu karışım eklendi, 15 dakika süre ile oda sıcaklığında bekletildi. Daha sonra 0.1 ml sulandırılmış Folin-Ciocalteu çözeltisi eklenip 1 saat süre ile bekletildikten sonra 750 nm’de absorbanslar okundu. Bovine serum albumin çözeltisi kullanılarak standart grafiği oluşturuldu. Hesaplar grafik kullanılarak yapıldı.

5.4.3. Sodyum dodesilsülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE)

Suda çözünebilen hücresel proteinlerin denatüre jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile ayrıştırılmasında işlem sırasında kullanılan çözeltiler Tablo 3.1’de, jellerin hazırlanması sırasında kullanılan çözelti oranları ve işlem sırası Tablo 3.2’de verildi. Önce jelin 1. kısmı (ayırma jeli) döküldü ve hava ile teması engellemek üzere jel yüzeyi 1 ml ultra saf su ile kapatıldı. Polimerizasyon tamamlandıktan sonra (yaklaşık 1 saat) yüzeydeki su uzaklaştırıldı ve jelin 2. kısmı (yükleme jeli) dökülüp tarak yerleştirildi. Polimerizasyon sonunda (yaklaşık 30 dakika) jel kaseti elektroforez aletine (Mini-PROTEAN 3 Cell, BIO-RAD) yerleştirildi ve örnekler 1:1 oranında örnek yüklem tamponu ile karıştırılıp 5 dakika kaynatıldıktan sonra, her bir cepte 15 µg protein olacak şekilde uygulandı.

Tablo 5.1. SDS-PAGE için hazırlanan çözeltiler

Çözeltiler	Bileşenleri
Stok akrilamid çözeltisi	Akrilamid.....30 g Bis akrilamid.....0.8 g Distile su ile 100 ml'ye tamamlandı
1.875 M Tris-HCl tamponu (pH 8.8)	Trizma-Baz.....45.43 g 3 N HCl ile pH 8.8'e ayarlandı Distile su ile 200 ml'ye tamamlandı
0.6 M Tris-HCl tamponu (pH 6.8)	Trizma-Baz.....14.54 g 3 N HCl ile pH 6.8'e ayarlandı Distile su ile 200 ml'ye tamamlandı
%10 SDS	SDS.....10 g Distile su ile 100 ml'ye tamamlandı
%10 Amonyum persülfat (APS) (polimerizasyon başlatıcı, taze hazırlanır)	APS.....0.1 g Distile su ile 1 ml'ye tamamlandı
1 x Yürütme tamponu (25 mM Tris, 192 mM glisin, %0.1 SDS, pH 8.3)	Tris.....3.03 g Glisin.....14.4 g SDS.....1 g Distile su ile 1 litreye tamamlandı
Örnek yükleme tamponu	0.6 M Tris-HCl (pH 6.8).....5 ml SDS.....0.5 g Sukroz.....5 g β -Merkaptoetanol.....0.25 ml Bromofenol mavisi (% 0.5 stok).5 ml Distile su ile 50 ml'ye tamamlandı

Tablo 5.2. SDS-PAGE'de kullanılan jelin hazırlanması

Solüsyonlar	Ayırma jeli (%10 Akrilamid)	Yükleme Jeli (% 5 Akrilamid)
Stok akrilamid solüsyonu	13.3 ml	1.35 ml
1.875 M Tris-HCl tamponu (pH 8.8)	8.0 ml	-
0.6 M Tris-HCl tamponu (pH 6.8)	-	1.0 ml
%10 SDS	0.4 ml	0.1 ml
Su	18.1 ml	7.5 ml
%10 Amonyum persülfat (APS)	0.2 ml	0.05 ml
Karışımın havası alındı		
TEMED	14 µl	14 µl
Jel kasetine döküldü		

Elektroforez işlemi sabit voltajda (200 V) gerçekleştirildi. Bromfenol mavisine ait bant jelin alt kenarına ulaşana dek (~40 dakika) ayırım sürdürüldü. İşlem sonunda akım kesilerek jel kaset arasından çıkarıldı.

5.4.4.İmmünolojik Analizler

Bu analizlerde, %10 poliakrilamid içeren SDS-PAGE (Walker, 2002) ile ayrılan proteinler, elektroblot yöntemi ile 1 saat boyunca 100 V akım uygulayarak polivinilidin diflorür (PVDF) membrana aktarıldı. Proteinlerin, doğru bir şekilde aktarımının yapıp yapılmadığını göstermek için membran proteinlere geçici olarak bağlanan Ponceau S (%1 asetik asit içinde hazırlandı) ile boyandı. Ponceau S boyası distile su yıkanarak ortamdan tamamen uzaklaştırıldı. Membran % 5 (w/v) süt tozu (% 0.05 Tween-20 içeren PBS içinde hazırlandı) ile bloke edildikten sonra, bloklama solüsyonu içinde 1:1000 oranında hazırlanan primer antikorla (HSP27, Stressgen) oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi.

Membran, yıkama solüsyonu (% 0.05 Tween-20 içeren PBS) 15 dakika aralıklarla değiştirilerek 1 saat yıkandıktan sonra, bloklama solüsyonu içinde hazırlanan sekonder antikor ile [keçi anti-fare IgG (Fab), HRPO (yaban turpu peroksidazı) ile işaretli konjuge antikor (Stressgen), 1:5000] oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. Membran yıkama solüsyonu ile tekrar yıkandıktan sonra, spesifik protein bantları “ECL Plus Western Blotting Detection System (Amersham)” kullanılarak röntgen filmi (Hyperfilm) üzerine yansıtıldı.

5.4.5.Densitometrik Analizler

Western blot ile film üzerine aktarılan görüntüler densitometrede (GS-800 Calibrated Densitometer, BIO-RAD), “Quantity One[®] SW” yazılımı kullanılarak görüntülendi ve karşılaştırıldı. Milimetre kare başına düşen optik densite hesaplandı.

5.5. İstatistiksel Analizler

Analizlere ait tüm sayısal veriler istatistiksel olarak değerlendirildi. Aritmetik ortalamalar (X) ve standart sapmalar (SD) hesaplandı. Gruplar arasındaki farkların anlamlı olup olmadığını belirlemek için ANOVA (tek yönlü varyans analizi; one-way ANOVA) testi yapıldı. Anlamlılık sınırı olarak $P < 0.05$ olarak kabul edildi. Bu istatistiksel işlemler GraphPad Prism 4.0 paket programı ile gerçekleştirildi.

Denatüre Jel Elektroforezi ve Western Blot

Dört farklı hayvan grubundan (NMU uygulananlar, NMU ve SSP uygulananlar, SSP uygulananlar, kontrol) elde edilen suda çözünebilen proteinler, her bir cepte 15 µg protein olacak şekilde jellere yüklendi. Jellerdeki proteinler daha önce anlatılan yöntemle göre PVDF membranlara aktarıldı ve membranlara aktarım Ponceau S boyası ile kontrol edildikten sonra HSP27 antikoruna ile işleme sokuldu. Spesifik protein bantları, “ECL Plus Western Blotting Detection System (Amersham)” kullanılarak röntgen filmi (Hyperfilm) üzerine yansıtıldı.

6.BULGULAR

Hayvanların ön değerlendirmesi hastalık, sağ kalım, toksisite, kilo alımı gibi parametrelerce değerlendirildi. Gruplar arasında kilo artışı, sağ kalım, hastalık açısından herhangi bir farka rastlanmadı. Haftada bir kez MNU enjeksiyonu yapılan gruplarda palpasyonla muayenede tümör dokusuna rastlanmadı.

6.1. Dokuda Glutasyon (GSH) Ölçümleri

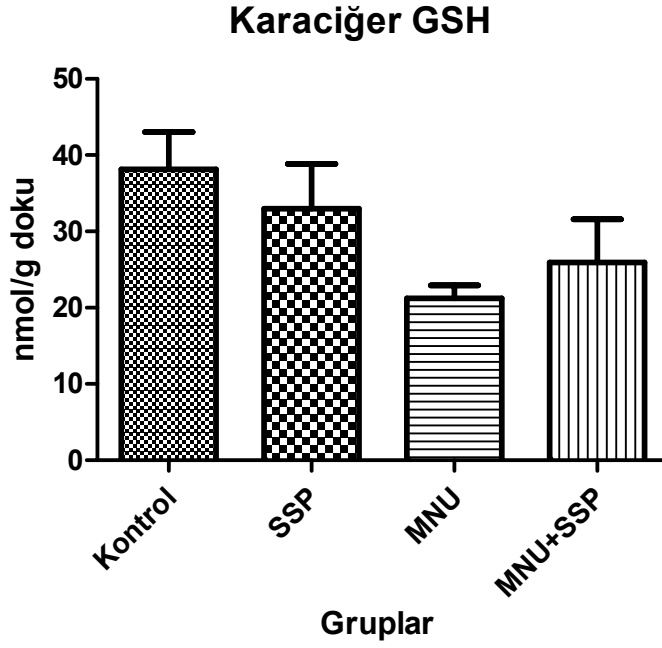
Karaciğer, böbrek ve meme dokusunda glutasyon (GSH) düzeyleri incelendiğinde aşağıdaki sonuçlar elde edildi.

Karaciğer glutasyon (GSH) seviyeleri Tablo.6.1. ve Şekil.6.1. ile gösterilmiştir. Karaciğer dokusunda, sayısal değer olarak, GSH miktarı en fazla olan grup kontrol grubu, en düşük olan grup ise MNU grubudur.

Tablo 6.1. Karaciğer dokusu GSH değerleri

GRUPLAR	n mol/g doku
Kontrol (n=9)	38.15 ± 1.62
SSP (n=10)	32.97 ± 1.86
MNU (n=10)	21.21 ± 0.55
MNU+SSP (n=10)	25.92 ± 1.80

Gruplar karşılaştırıldığında, SSP ve kontrol grubu arasında anlamlı bir fark tespit edilememiştir ($P<0.0529$). MNU grubu GSH seviyeleri MNU+SSP grubuna göre değerlendirildiğinde anlamlı derecede düşük bulunmuştur ($P=0.0016$). MNU ve Kontrol grubu karşılaştırılmasında P değeri 0.0058, anlamlı derecede düşüktür. Yine MNU grubu ile SSP grubu karşılaştırılmasında da benzer bir değer elde edilmiştir ($P=0.0013$). MNU+SSP grubu ile SSP grubu değerlendirildiğinde anlamlı bir fark gözlenememiştir ($P=0.931$).



Şekil 6.1. Karaciğer dokusu GSH değerleri.

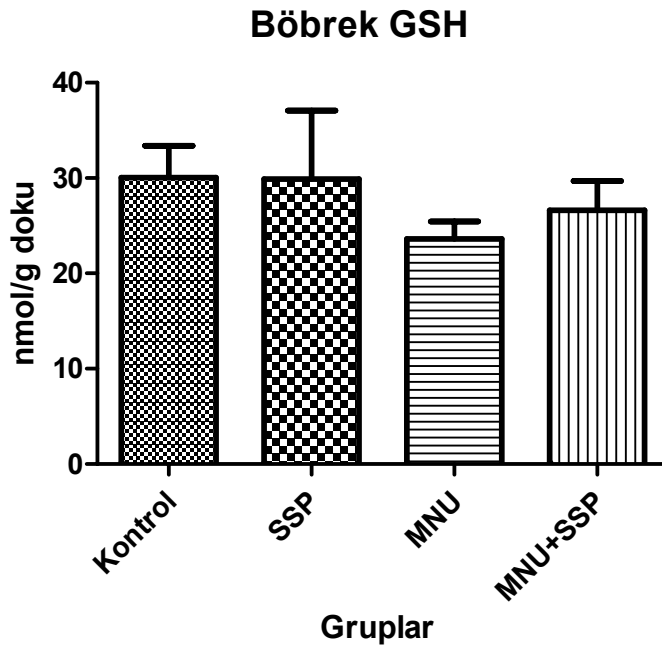
MNU grubu 90 gün ara ile iki kez 50 mg/ kg MNU enjekte edilmiştir. MNU+SSP grubuna 90 gün ara ile iki kez 50 mg/kg MNU enjeksiyonu ve 6 ay boyunca haftada iki kez 2ml SSP orogastrik gavajla verilmiştir. SSP grubuna 6 ay boyunca haftada iki kez 2 ml SSP orogastrik gavajla verilmiştir. Kontrol grubuna 6 ay boyunca haftada iki kez 2 ml fizyolojik su orogastrik gavajla verilmiştir.

Böbrek dokusu glutatyon (GSH) seviyeleri Tablo.6.2. ve Şekil.6.2. ile gösterilmiştir.

Bu bulgulara göre MNU grubu GSH miktarı MNU+SSP grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük ($P=0.016$) bulunmuştur. Aynı grup SSP grubuyla karşılaştırıldığında da anlamlı olarak düşüktür ($P=0.015$). Kontrol grubu GSH miktarı MNU grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($P<0.001$). MNU ve MNU+SSP grubu arasında anlamlı derecede düşük bulunmuştur ($P=0.015$). MNU+SSP grubu, böbrek GSH miktarları, kontrol grubundan anlamlı derecede düşük bulunmuştur ($P=0.031$). SSP ve kontrol grupları arasında böbrek GSH miktarları açısından anlamlı bir fark yoktur ($P=0,947$).

Tablo 6.2. Böbrek dokusu GSH değerleri.

GRUPLAR	n mol/g doku
Kontrol (n=9)	30.07 ± 1.11
SSP (n=10)	29.89 ± 2.28
MNU (n=10)	23.60± 0.58
MNU+SSP (n=10)	26.62 ± 0.97



Şekil 6.2. Böbrek dokusu GSH değerleri

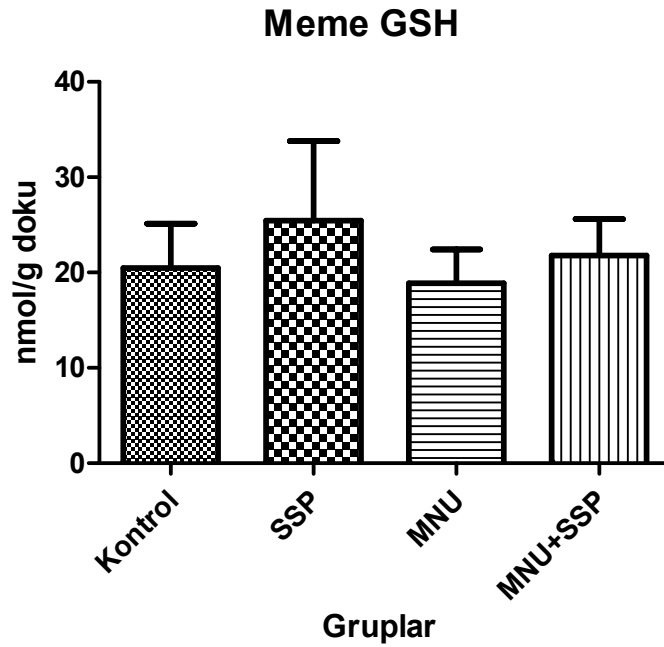
MNU grubu 90 gün ara ile iki kez 50 mg/ kg MNU enjekte edilmiştir. MNU+SSP grubuna 90 gün ara ile iki kez 50 mg/kg MNU enjeksiyonu ve 6 ay boyunca haftada iki kez 2ml SSP orogastrik gavajla verilmiştir. SSP grubuna 6 ay boyunca haftada iki kez 2 ml SSP orogastrik gavajla verilmiştir. Kontrol grubuna 6 ay boyunca haftada iki kez 2 ml fizyolojik su orogastrik gavajla verilmiştir.

Meme dokusu glutatyon (GSH) seviyeleri Tablo.6.3. ve Şekil.6.3. ile gösterilmiştir. Bu bulgulara göre MNU grubu meme dokusunu GSH seviyeleri ile MNU+SSP grubu karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır ($P=0.115$). MNU değerleri SSP grubuna göre anlamlı derecede düşük bulunmuştur ($P=0.043$). MNU grubu ile kontrol grubu GSH değerleri arasında anlamlı bir fark tespit edilememiştir ($P=0.425$). MNU+SSP ve SSP grupları arasında anlamlı bir fark saptanamamıştır ($P=0.245$). MNU+SSP ve kontrol grupları arasında da fark

bulunamamıştır (P=0.543). SSP ve kontrol grubu GSH seviyeleri arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır (P=0.154).

Tablo 6.3. Meme dokusu GSH değerleri

GRUPLAR	n mol/g doku
Kontrol (n=8)	20.50 ± 1.63
SSP (n=10)	25.44 ± 2.64
MNU (n=9)	18.87 ± 1.18
MNU+SSP (n=9)	21.77 ± 1.28



Şekil 6.3. Meme dokusu GSH değerleri.

MNU grubu 90 gün ara ile iki kez 50 mg/ kg MNU enjekte edilmiştir. MNU+SSP grubuna 90 gün ara ile iki kez 50 mg/kg MNU enjeksiyonu ve 6 ay boyunca haftada iki kez 2ml SSP orogastrik gavajla verilmiştir. SSP grubuna 6 ay boyunca haftada iki kez 2 ml SSP orogastrik gavajla verilmiştir. Kontrol grubuna 6 ay boyunca haftada iki kez 2 ml fizyolojik su orogastrik gavajla verilmiştir.

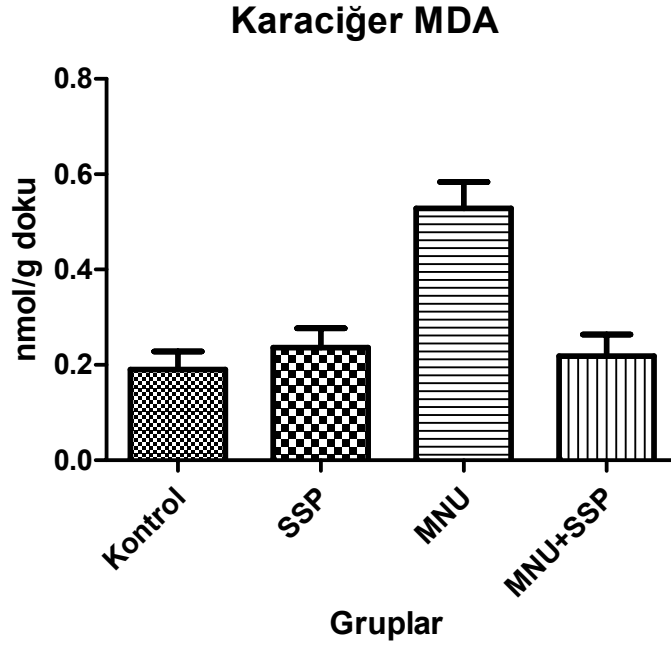
6.2 Dokuda Malondialdehit (MDA) Ölçümleri

Karaciğer malondialdehit (MDA) miktarları Tablo 6.4 ve Şekil 6.4 ile gösterilmiştir.

Karaciğer MDA değerlerine bakıldığında en yüksek MNU grubunda, en düşük değer de kontrol grubunda tespit edilmiştir. Bu bulgulara göre SSP grubu karaciğer MDA seviyeleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek ($P=0.021$) bulunmuştur. MNU ve MNU+SSP grubu MDA seviyeleri karşılaştırılmasında MNU grubu MDA seviyeleri anlamlı derecede yüksektir ($P<0.0001$). MNU grubu ile SSP grubu MDA seviyeleri karşılaştırılmasında; MNU grubu MDA seviyeleri anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($P<0.0001$). MNU ve kontrol grubu MDA seviyeleri karşılaştırılmasında da aynı şekilde, MNU grubu MDA seviyeleri anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($P<0.0001$). MNU+SSP grubu ile SSP grubu arasındaki karşılaştırmada anlamlı bir farka rastlanamamıştır ($P=0.361$). MNU+SSP ile kontrol grubu arasında yapılan karşılaştırmada da anlamlı bir farka rastlanamamıştır ($P=0.169$).

Tablo 6.4. Karaciğer dokusu MDA değerleri.

GRUPLAR	n mol/g doku
Kontrol (n=9)	0.190 ± 0.013
SSP (n=10)	0.236 ± 0.013
MNU (n=10)	0.529 ± 0.018
MNU+SSP (n=10)	0.218 ± 0.014



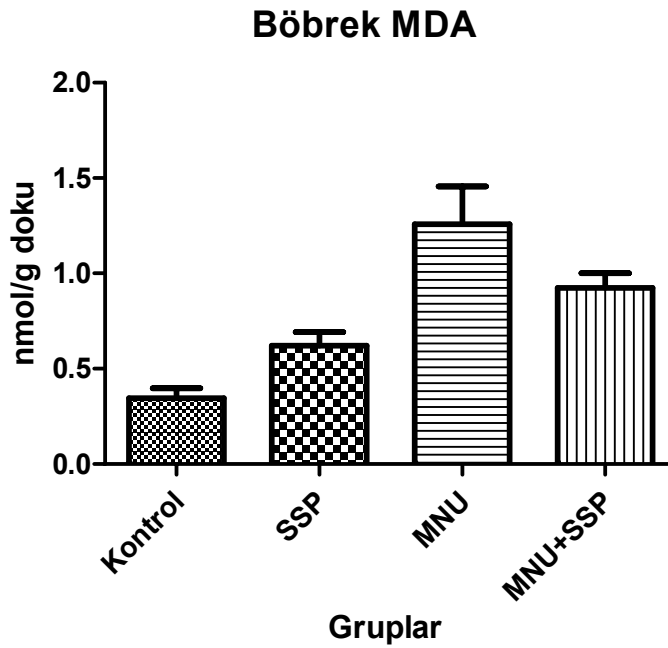
Şekil 6.4. Karaciğer dokusu MDA değerleri

MNU grubu 90 gün ara ile iki kez 50 mg/ kg MNU enjekte edilmiştir. MNU+SSP grubuna 90 gün ara ile iki kez 50 mg/kg MNU enjeksiyonu ve 6 ay boyunca haftada iki kez 2ml SSP orogastrik gavajla verilmiştir. SSP grubuna 6 ay boyunca haftada iki kez 2 ml SSP orogastrik gavajla verilmiştir. Kontrol grubuna 6 ay boyunca haftada iki kez 2 ml fizyolojik su orogastrik gavajla verilmiştir.

Böbrek malondialdehit (MDA) seviyeleri Tablo 6.5 ve Şekil 6.5 .. ile gösterilmiştir. SSP ve Kontrol grupları arasında böbrek MDA seviyeleri karşılaştırıldığında; SSP grubu doku MDA seviyeleri, anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($P<0.0001$). MNU ve MNU+SSP grupları MDA seviyeleri açısından karşılaştırıldığında, MNU+SSP grubu değerleri anlamlı derecede düşük bulunmuştur ($P=0.0002$). MNU grubu MDA değerleri, SSP grubu değerleri ile karşılaştırıldığında anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($P<0.0001$). MNU grubu MDA seviyeleri kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksektir ($P<0.0001$). MNU MDA seviyeleri MNU+SSP grup değerleri ile karşılaştırıldığında MNU değerleri anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($P<0.0001$). MNU+SSP ile kontrol grubu arasında anlamlı bir fark vardır ($P<0.0001$).

Tablo 6.5. Böbrek dokusu MDA değerleri

GRUPLAR	n mol/g doku
Kontrol (n=8)	0.346 ± 0.017
SSP (n=9)	0.621 ± 0.023
MNU (n=9)	1.257 ± 0.063
MNU+SSP (n=9)	0.925 ± 0.025



Şekil 6.5. Böbrek dokusu MDA değerleri

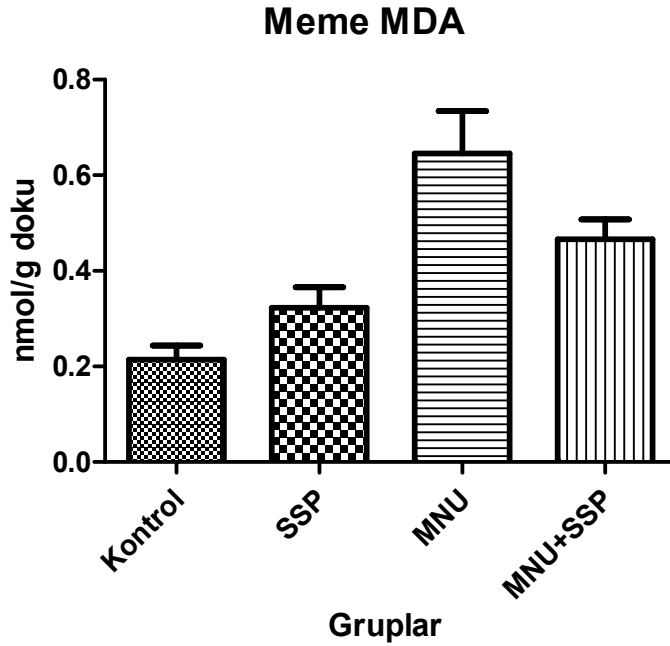
MNU grubu 90 gün ara ile iki kez 50 mg/ kg MNU enjekte edilmiştir. MNU+SSP grubuna 90 gün ara ile iki kez 50 mg/kg MNU enjeksiyonu ve 6 ay boyunca haftada iki kez 2ml SSP orogastrik gavajla verilmiştir. SSP grubuna 6 ay boyunca haftada iki kez 2 ml SSP orogastrik gavajla verilmiştir. Kontrol grubuna 6 ay boyunca haftada iki kez 2 ml fizyolojik su orogastrik gavajla verilmiştir.

Meme malondialdehit (MDA) seviyeleri Tablo 6.6 ve Şekil 6.6. ile gösterilmiştir. SSP ve kontrol grubu MDA seviyeleri karşılaştırıldığında, SSP grubu MDA seviyeleri anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($P<0.0001$). MNU ve MNU+SSP grupları arasında yapılan karşılaştırmada ise MNU grubu meme MDA düzeyleri, anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($P=0.0004$). Meme dokusu MDA seviyelerinin SSP ve MNU grupları arasındaki karşılaştırmasında SSP grubu MDA

değerleri anlamlı derecede düşük bulunmuştur ($P<0.0001$). MNU MDA değerleri, kontrol grubu meme MDA değerlerinden anlamlı derecede yüksektir ($P<0.0001$). MNU+SSP grubu MDA değerleri, SSP grubu MDA değerlerinden anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($P<0.0001$). MNU+SSP grubu ile kontrol grubu karşılaştırıldığında ise anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($P<0.0001$).

Tablo 6.6. Meme dokusu MDA değerleri.

GRUPLAR	nmol/g doku
Kontrol (n=8)	0.215 $\pm$ 0.010
SSP (n=9)	0.323 $\pm$ 0.014
MNU (n=7)	0.645 $\pm$ 0.034
MNU+SSP (n=7)	0.466 $\pm$ 0.015



Şekil 6.6. Meme dokusu MDA değerleri.

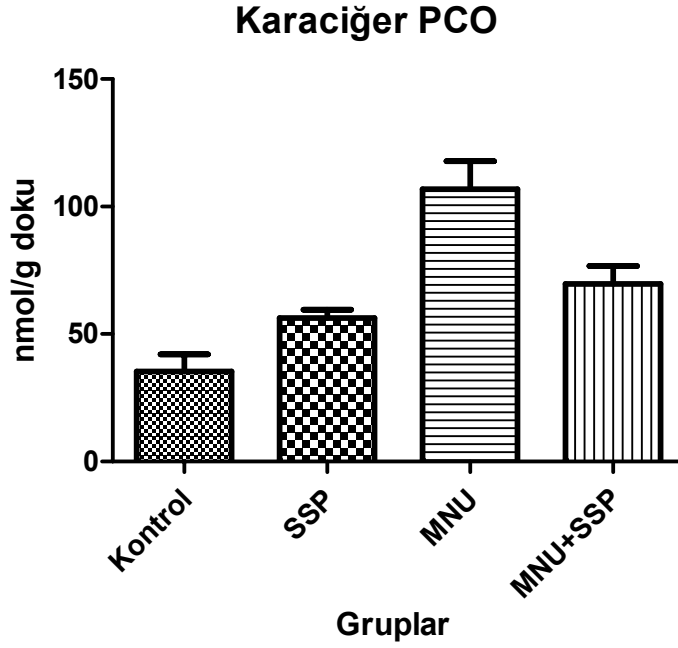
MNU grubu 90 gün ara ile iki kez 50 mg/ kg MNU enjekte edilmiştir. MNU+SSP grubuna 90 gün ara ile iki kez 50 mg/kg MNU enjeksiyonu ve 6 ay boyunca haftada iki kez 2ml SSP orogastrik gavajla verilmiştir. SSP grubuna 6 ay boyunca haftada iki kez 2 ml SSP orogastrik gavajla verilmiştir. Kontrol grubuna 6 ay boyunca haftada iki kez 2 ml fizyolojik su orogastrik gavajla verilmiştir.

6.3 Dokuda Protein Karbonil (PCO) Ölçümleri.

Karaciğer PCO miktarları seviyeleri Tablo 6.7 ve Şekil 6.7 ile gösterilmiştir. Bu bulgulara göre SSP karaciğer PCO seviyeleri ile kontrol grubunun ki ile karşılaştırılınca, SSP grubu karaciğer PCO seviyeleri istatistiksel açıdan anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($P<0.0001$). MNU ve MNU+SSP karaciğer PCO değerleri karşılaştırmasında, MNU grubu değerleri anlamlı derecede yüksektir ($P<0.0001$). MNU ve SSP grupları karşılaştırıldığında ise MNU grubu PCO değerleri anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($P<0.0001$). MNU grubu PCO değerleri kontrol grubuna göre de anlamlı derecede yüksektir ($P<0.0001$). Karaciğer dokusunda ki PCO değerleri karşılaştırmasında SSP ve MNU+SSP gruplarına bakıldığında MNU+SSP grubu anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($P<0.0001$). MNU+SSP grubu karaciğer PCO değerleri, kontrol grubuna göre de anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($P<0.0001$).

Tablo 6.7. Karaciğer dokusu PCO değerleri.

GRUPLAR	n mol/g doku
Kontrol (n=9)	32.31 ± 2.23
SSP (n=10)	56.30 ± 1.04
MNU (n=10)	106.81± 3.48
MNU+SSP (n=10)	69.68 ± 2.22



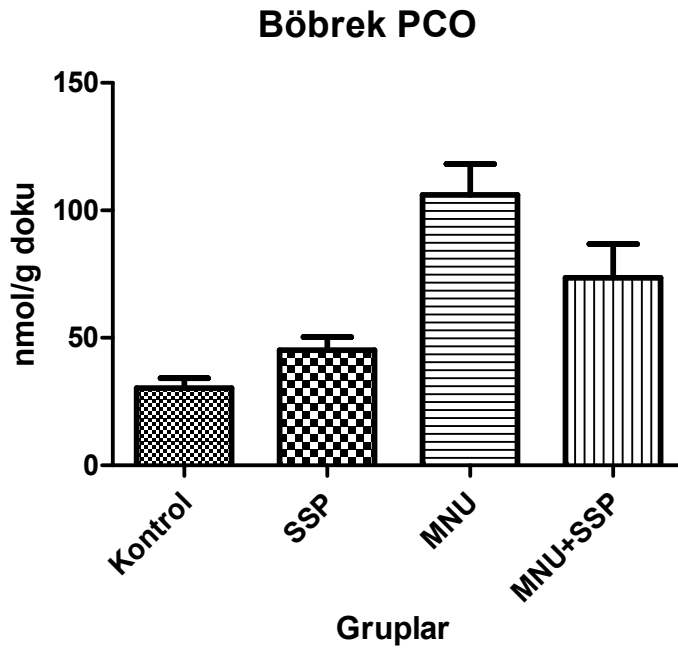
Şekil 6.7. Karaciğer dokusu PCO değerleri.

MNU grubu 90 gün ara ile iki kez 50 mg/ kg MNU enjekte edilmiştir. MNU+SSP grubuna 90 gün ara ile iki kez 50 mg/kg MNU enjeksiyonu ve 6 ay boyunca haftada iki kez 2ml SSP orogastrik gavajla verilmiştir. SSP grubuna 6 ay boyunca haftada iki kez 2 ml SSP orogastrik gavajla verilmiştir. Kontrol grubuna 6 ay boyunca haftada iki kez 2 ml fizyolojik su orogastrik gavajla verilmiştir.

Böbrek protein karbonilleri (PCO) seviyeleri Tablo 6.8 ve Şekil 6.8 ile gösterilmiştir. Böbrek dokusunda en yüksek PCO değeri MNU grubunda, en düşük değer ise kontrol grubunda tespit edilmiştir. SSP ve kontrol grupları arasında bir karşılaştırma yapıldığında; SSP grubuna ait PCO değerleri kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($P<0.0001$). MNU grubu PCO değerleri MNU+SSP grubuna göre anlamlı derecede yüksektir ($P<0.0001$). MNU grubu PCO değerleri, SSP grubuna göre; anlamlı derecede yüksektir ($P<0.0001$). MNU ve kontrol grubu karşılaştırıldığında da MNU grubu PCO değerleri anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($P<0.0001$). MNU+SSP grubu değerleri ile SSP grubu değerleri karşılaştırıldığında, SSP grubu değerleri anlamlı derecede düşük bulunmuştur ($P<0.0001$). MNU+SSP değerleri kontrol grubu karşılaştırmasında da MNU+SSP değerleri anlamlı derecede yüksektir ($P<0.0001$)).

Tablo 6.8. Böbrek dokusu PCO değerleri.

GRUPLAR	n mol/g doku
Kontrol (n=10)	30.28 ± 1.30
SSP (n=9)	45.18 ± 1.62
MNU (n=9)	106.01 ± 3.84
MNU+SSP (n=10)	73.62 ± 4.40



Şekil 6.8. Böbrek dokusu PCO değerleri

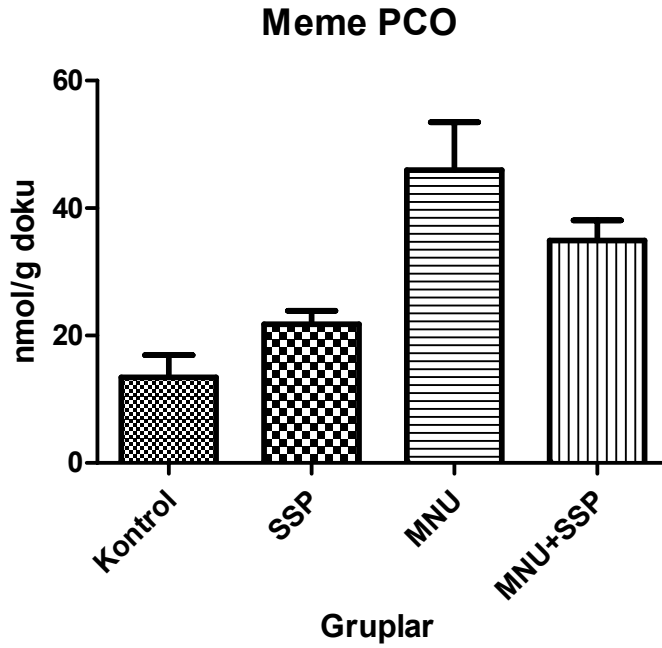
MNU grubu 90 gün ara ile iki kez 50 mg/ kg MNU enjekte edilmiştir. MNU+SSP grubuna 90 gün ara ile iki kez 50 mg/kg MNU enjeksiyonu ve 6 ay boyunca haftada iki kez 2ml SSP orogastrik gavajla verilmiştir. SSP grubuna 6 ay boyunca haftada iki kez 2 ml SSP orogastrik gavajla verilmiştir. Kontrol grubuna 6 ay boyunca haftada iki kez 2 ml fizyolojik su orogastrik gavajla verilmiştir.

Meme dokusu protein karbonilleri (PCO) seviyeleri Tablo 6.9 ve Şekil 6.9 ile gösterilmiştir. Bu bulgulara göre meme dokusunda en yüksek PCO değerleri MNU grubunda, en düşük PCO değerleri ise kontrol grubunda tespit edilmiştir. SSP ve kontrol grupları meme PCO değerleri açısından karşılaştırıldığında; SSP grubu PCO değerleri, anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($P<0.0001$). MNU ve MNU+SSP grupları arasındaki karşılaştırmada ise MNU+SSP grubu PCO değerleri

anlamli derecede dūřūktūr (P=0.0037). MNU grubu PCO deęerleri SSP grubu deęerlerine gōre de kontrol grubu deęerlerine gōre de derecede yūksektir (Her ikisi iēin de: P<0.0001). MNU+SSP grubu, SSP grubu ve kontrol grubu ile karřılařtırıldıęında MNU+SSP grubu PCO deęerleri anlamli derecede yūksektir (Her ikisi iēin de: P<0.0001).

Tablo 6.10. Meme dokusu PCO değerleri

GRUPLAR	n mol/g doku
Kontrol (n=8)	13.43 ± 1.23
SSP (n=9)	21.77 ± 0.70
MNU (n=7)	45.97 ± 2.84
MNU+SSP (n=7)	34.91 ± 1.20



şekil 6.9. Meme dokusu PCO değerleri

MNU grubu 90 gūn ara ile iki kez 50 mg/ kg MNU enjekte edilmiřtir. MNU+SSP grubuna 90 gūn ara ile iki kez 50 mg/kg MNU enjeksiyonu ve 6 ay boyunca haftada iki kez 2ml SSP orogastrik gavajla verilmiřtir. SSP grubuna 6 ay boyunca haftada iki kez 2 ml SSP orogastrik gavajla verilmiřtir. Kontrol grubuna 6 ay boyunca haftada iki kez 2 ml fizyolojik su orogastrik gavajla verilmiřtir.

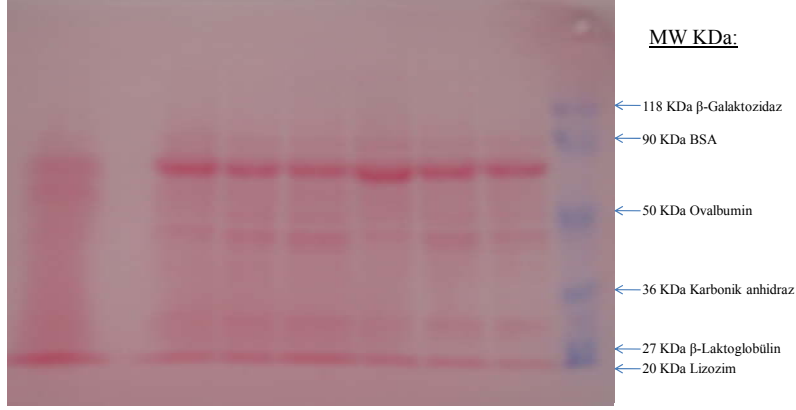
6.4 Meme Dokusu Isı Şok Proteini Ölçümü

HSP 27 ölçümü meme dokusunda yapılmıştır. En yüksek HSP 27 miktarı MNU enjeksiyonu yapılan grupta bulunmuştur. En düşük miktar ise kontrol grubunda tespit edilmiştir. MNU grubunda 8 ve 9 numaralı sıçanlarda HSP 27 miktarları tüm gruplarda ki sıçanlardan daha yüksek bulunmuştur (8 sıçan HSP 27 değeri 11.0856, 9 sıçan HSP 27 değeri 11.4812). MNU+SSP grubunda HSP27 miktarları MNU grubundan daha düşük bulunmuştur, ancak gruplar arasında anlamlı bir fark saptanamamıştır ($P=0.342$).

Tablo 6.10. Meme dokusu HSP27 miktarları

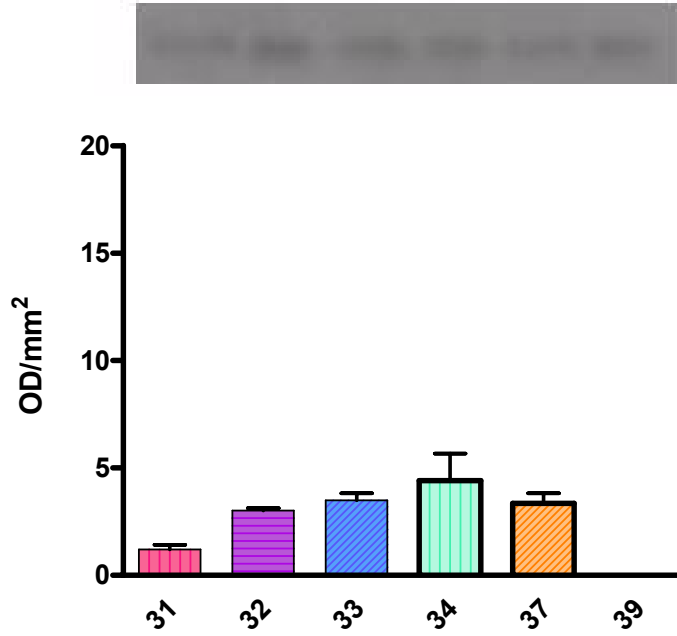
GRUPLAR	OD/ mm ²
Kontrol (n=6)	3.149 ± 0.432
SSP (n=9)	5.326 ± 0.361
MNU (n=9)	5.821 ± 1.126
MNU+SSP (n=7)	4.490 ± 0.485

Gruplara ait tüm membran görüntüleri ve HSP27 miktarları aşağıdaki şekillerde (Şekil 6.10 - Şekil 6.17) verilmiştir.



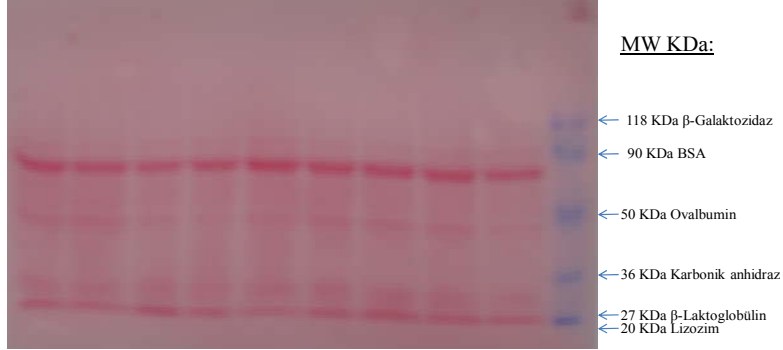
Şekil 6.10 Kontrol grubuna ait membran görüntüsü

Gruptaki sıçanlara haftada iki kez 2 ml SSP verilmiştir. Ölçümler iki tekrarlı olarak yapılmıştır.



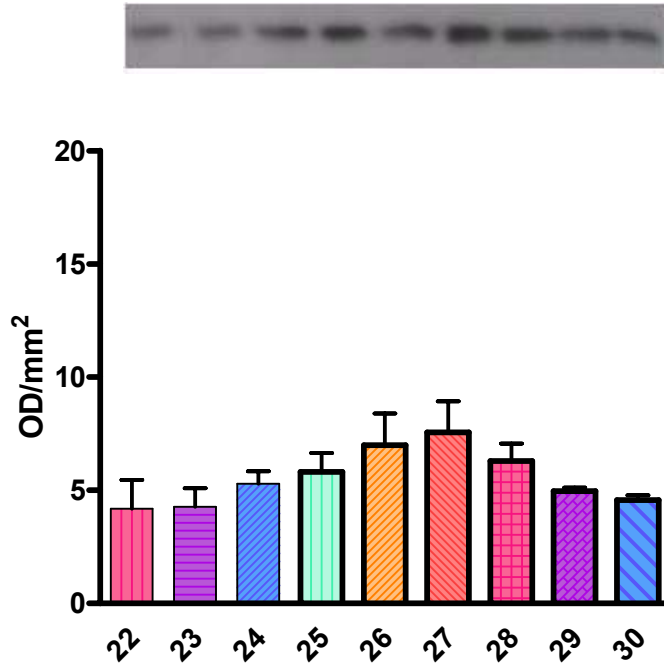
Şekil 6.11. Kontrol grubu HSP 27 miktarları

Gruptaki sıçanlara haftada iki kez 2 ml SSP verilmiştir. Ölçümler iki tekrarlı olarak yapılmıştır.



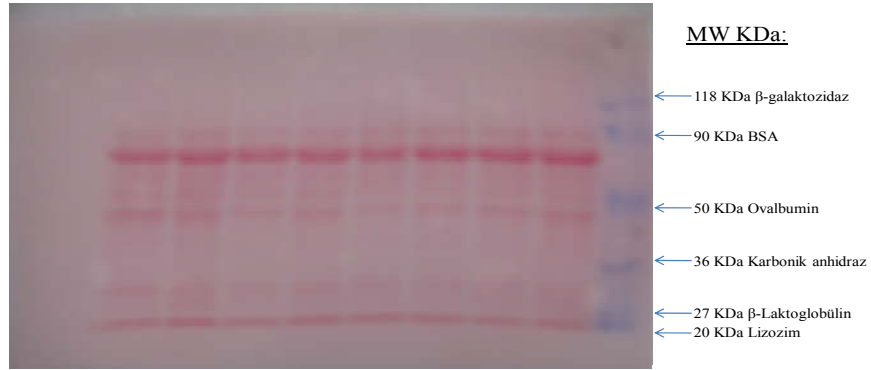
Şekil 6.12 SSP grubuna ait membran görüntüsü

Gruptaki sıçanlara haftada iki kez 2 ml SSP verilmiştir. Ölçümler üç tekrarlı olarak yapılmıştır.



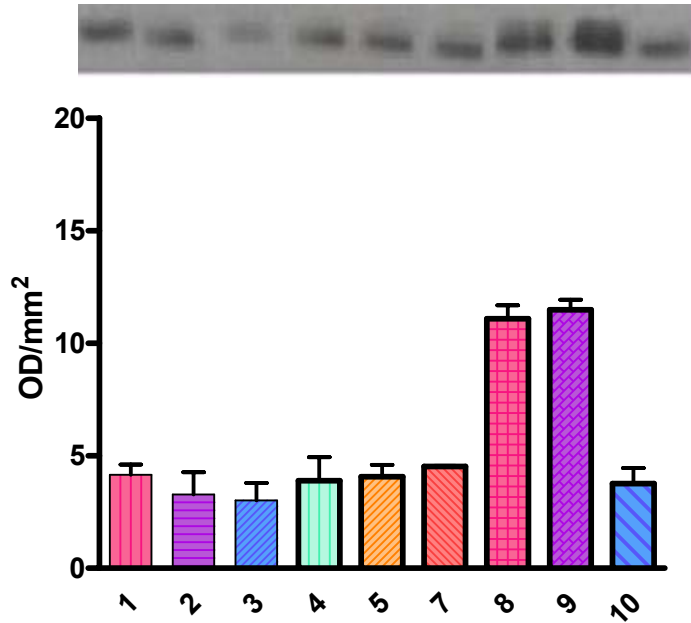
Şekil 6.13 SSP grubu HSP 27 miktarları

Gruptaki sıçanlara haftada iki kez 2 ml SSP verilmiştir. Ölçümler üç tekrarlı olarak yapılmıştır.



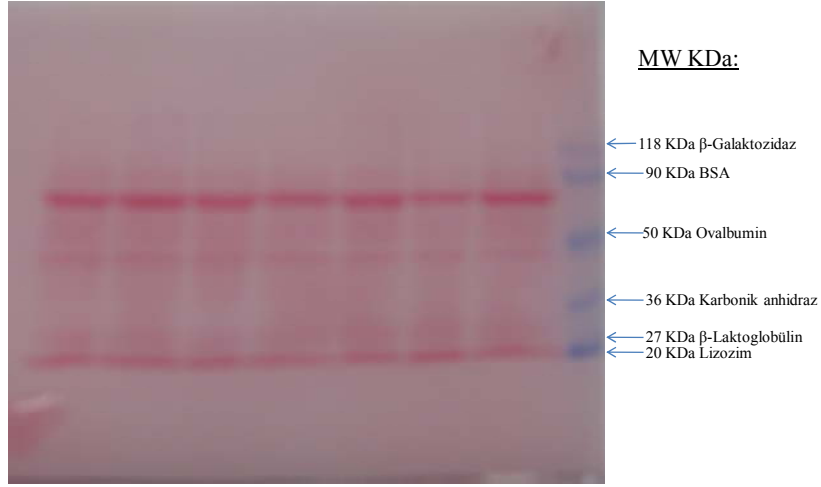
Şekil 6.14 MNU grubu membran görüntüsü

Gruptaki sıçanlara 100 gün ara ile iki kez i.p. 50 mg/kg MNU enjeksiyonu yapılmıştır. Ölçümler üç tekrarlı olarak yapılmıştır.



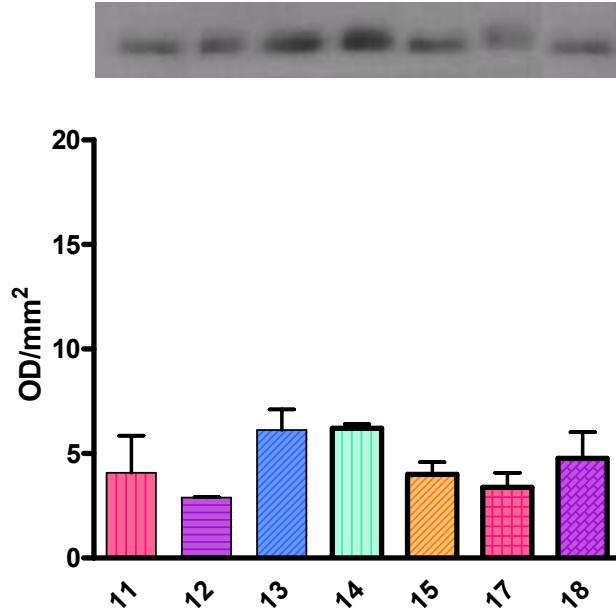
Şekil 6.15 MNU alan gruptaki HSP 27 miktarları

Gruptaki sıçanlara 100 gün ara ile iki kez i.p. 50 mg/kg MNU enjeksiyonu yapılmıştır. Ölçümler üç tekrarlı olarak yapılmıştır.



Şekil 6.16 MNU+SSP grubuna ait membran görüntüsü

Gruptaki sıçanlara 100 gün ara ile iki kez i.p. 50 mg/kg MNU enjeksiyonu ve haftada iki kez 2 ml SSP verilmiştir. Ölçümler üç tekrarlı olarak yapılmıştır.



Şekil 6.17 MNU+SSP alan gruptaki HSP 27 miktarları

Gruptaki sıçanlara 100 gün ara ile iki kez i.p. 50 mg/kg MNU enjeksiyonu ve haftada iki kez 2 ml SSP verilmiştir. Ölçümler üç tekrarlı olarak yapılmıştır.

7.TARTIŞMA ve SONUÇ

Süt serumu proteinlerinin antioksidan, antimikrobiyal, immün yanıtı destekleyici, ağız sağlığını koruma gibi pozitif etkilerinin yanı sıra meme kanseri, prostat kanseri, kolon kanseri ve uterus kanseri gibi kanser türlerinde antikarsinojenik etkisi gösterilmiştir (8). Diyetle alınan süt serumu proteinlerinin, sıçanlarda tümör oluşum sürecinde kronik global gen ekspresyonunu değiştirdiği gösterilmiştir. Süt serumu proteinlerinin büyüme faktörü, nöroendokrin ve immün sistem genleri gibi genlerin transkripsiyonunu düzenleyerek anti-tümör etki gösterdiği düşünülmektedir. Ayrıca süt serumu proteinleri kanser hücreleri için antiproliferatif ajan olan somatostatini indükleyerek tümör oluşum sürecini inhibe ederler. Rowlands ve arkadaşları (89), diyet ile alınan soya ve süt serumu proteinlerinin karaciğer ve meme dokusunda bulunan ve karsinojen aktivasyonunda görev alan faz I enzimlerinin ekspresyonunu azalttığını da rapor etmişlerdir.

Kanserden ölüm nedenleri arasında akciğer kanserinden sonra ikinci sırada yer alan meme kanseri, gelişmekte olan ülkelerde yaşayan kadınlar arasında en sık görülen malignansilerden biridir. (32)

İnsan meme kanseri modeli olarak DMBA veya MNU ile indüklenmiş meme tümörleri kullanılmaktadır (117) Her iki kimyasal da meme dokusunda etkilidir. Oluşan tümörler duktal orijinlidir ve farklı hormonlara pozitif yanıt verir. DMBA ile indüklenmiş tümörler MNU ile indüklenmiş olanlara göre daha fazla prolaktin bağımlı ve daha az agresif türdedir (39). MNU ile indüklenmiş olanlar DMBA'ya göre östrojene daha bağımlı, bölgesel, invazif ve metastaza daha yatkındır (66). Deneysel meme kanseri çalışmalarında çeşitli ajanların koruyucu etkileri incelenmiştir (109). Bu çalışmada sıçanlarda kimyasal bir karsinojen olan MNU ile deneysel meme tümörü oluşturularak süt proteinlerinin koruyucu etkileri araştırılmıştır.

Hayvan modelleriyle yapılan deneysel meme kanseri çalışmalarında çeşitli ajanların koruyucu etkileri gösterilmiştir (4, 5, 26, 29, 42). Süt serumu proteinlerinin antioksidan etkilerinden yararlanılarak benzer sonuçlar elde edilmiştir (9, 10, 35). Hakkak R. ve arkadaşlarının çalışmasında (35); DMBA ile indüklenmiş tümörlerin gelişimine diyetle alınan süt proteinleri, soya proteinleri ve kazeinin etkisi araştırılmıştır. Bu çalışmada süt serumu proteinleri ile beslenen sıçanlarda daha az

sayıda tümör geliştiği, tümör gelişen sıçan sayısının yüzde olarak azaldığı ve tümörlerin çeşitliliğinin azaldığı bildirilmiştir. (35)

Süt proteinlerinin meme kanserindeki koruyucu etkisinin araştırıldığı çalışmamızda bu amaçla kontrol, MNU, MNU+SSP ve SSP grupları oluşturulmuştur. Sıçanlarda MNU enjeksiyonu sonrasında makroskopik olarak yapılan incelemede meme tümörüne rastlanamamıştır, ancak MNU grubunda iki sıçanda invazif tümör dokularında artan HSP 27 ekspresyonunun arttığı bulunmuştur. Ayrıca oksidatif stres parametrelerinin değişimleri incelenerek meme kanserindeki rolleri açıklanmaya çalışılmıştır. Oksidatif stres parametreleri genel olarak incelendiğinde; MNU enjeksiyonu yapılan sıçanlarda, tüm dokularda oksidatif stres olduğu anlaşılmaktadır. Grupların tümü için elde edilen değerler kontrol grupları ile karşılaştırıldığında oksidatif stres koşullarına uygun değişiklikler gözlenmiştir. MNU enjeksiyonu ile birlikte süt serumu proteinleri verildiğinde bu parametrelerin normal değerlere yaklaştığı gözlenmiştir.

MNU ve süt proteinleri verilen sıçanlar oksidatif stres parametreleri açısından değerlendirildiğinde; kontrol grubu ile istatistiksel bir farka rastlanmazken, böbrek ve karaciğer dokularında MNU grubuna göre anlamlı derecede yüksek değerler bulunmuştur. İncelenen gruplar içinde GSH miktarı en az olarak tespit edilen sıçanlar, tüm dokular için MNU enjeksiyonu yapılanlardır. Süt serumu proteinleri verilip MNU enjeksiyonu yapılan gruba, kontrol grubu karşılaştırıldığında ise GSH miktarlarının kontrol grubu değerlerine yaklaştığı gözlenmektedir. Gelişen tümörlerde oksidatif stresle savaşan dokularda GSH konsantrasyonları artmaktadır (52).

Süt serumu proteinlerinin zengin sistein içerikleri ile doku glutatyon miktarlarını arttırdığı ve proliferasyonunun gerilemesine yol açtığı bildirilmiştir (9). Ayrıca, besin takviyesi olarak alınan, süt serumu kaynaklı sisteinin, lenfosit glutatyon seviyelerini anlamlı biçimde arttırdığı gösterilmiştir (121). Öte yandan, sistein ve glutatyonun sentetik bir öncülü olan ve genellikle mukolitik bir ajan olarak bilinen N-asetilsisteinin DNA'ya bağlanan çeşitli karsinojenleri bloke ederek, hücre proliferasyonunu ve metastazı inhibe ettiği ve DNA tamir mekanizmalarını düzenlediği bildirilmiştir (121). Süt serumu proteinleri ile yapılan bir çalışmada sıçanlarda doku GSH konsantrasyonlarının arttığı görülmüştür, bunun süt serumu

proteinlerinde bulunan ve glutatyon sentetazın substratı olan γ -glutamil sistein seviyelerinin yüksekliğine bağılı olduğu düşünülmüştür (11).

Süt serumu proteinlerinden biri olan LF'nin oral yoldan alındığında, kimyasal karsinojenle indüklenen kolon, karaciğer ve özafagus tümörlerini baskıladığı bildirilmiştir (86). Çalışmamızda, doku MDA miktarları için de benzer sonuçlar bulunmuştur. En yüksek MDA değerleri, MNU enjeksiyonu yapılan sıçan dokularında tespit edilmiştir. Karaciğer böbrek ve meme dokularında MDA değerleri MNU verilen grupta yükselirken, MNU+SSP grubunda MDA değerlerinin yükseldiği görülmüştür. Süt serumu proteinleri içindeki LF ve α -laktalbümin etkisiyle doku lipid peroksidasyon miktarının azaldığı düşünülmektedir (52). Yaklaşık otuz çalışmanın sonuçlarına göre sığır LF'ni tümör gelişimini azaltmaktadır (52). Karsinogenezis tümör etkilerinin yanı sıra, farelerde kemoterapi sırasında humoral ve hücrel immün yanıtı hızlandırmaktadır (4). Tümör taşıyan farelere oral yoldan verilen LF'nin, intestinal epitel hücrelerden IL-18 üretimini, lamina propiadan IFN- γ , intestinal mukozadan CD4+, CD8+ ve NK hücreleri üretimini arttırmaktadır (53, 114). Farelerde oral yolla alınan rekombinant insan LF, meme kanseri ve skuamoz tümör gelişimini engellediği bildirilmiştir. Radyoterapi sırasında, cis-platinyumla sinerjik etki göstererek tümör gelişimini, bağırsaktan IL-18 ekspresyonunu, dalakta NK hücre aktivitesini, kanda ise CD8+T hücre sayısını artırır (112).

Öte yandan, süt proteinlerinin antioksidan etkileri zengin sülfidril gruplarıyla ilişkilendirilmektedir. Protein karbonilleri açısından karşılaştırılan gruplarda da, karaciğer, böbrek ve meme dokularında en yüksek PCO değerlerine MNU enjeksiyonu yapılan sıçanlarda rastlanmıştır. Süt serumu proteinlerinden biri olan ve ağır metallerle şelat oluşturabilen α -laktalbüminin bu özelliği ile etanol ile indüklenmiş mide ülseri için koruyucu olduğu ve oksidatif stresi azalttığı bildirilmiştir (15).

Çalışmamızın, daha önce kolon, melanoma, prostat, papiloma gibi kanser türlerinde etkisi belirtilmiş olan süt serumu proteinlerinin, kanser gelişiminde protektif etkileri olan bir diyet desteği olduğunu öne süren çalışmaları destekleyeceğini umuyoruz.

8.KAYNAKLAR

1. Abuja MP, Albertini R. (2001) Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins. *Clin Chim Acta*, 306: 1-17.
2. Anderson EL. Cancer Risk Assessments: an overview. Oncogene and transgenics correlates of cancer risk assessments. (Zervos C, ed). *New York: Plenum Press*: 1992; 1-20.
3. Anderson ME. (1998) Glutathione: an overview of biosynthesis and modulation. *Chem Biol Interact*, 111-112: 1-14.
4. Artym J, Zimecki M, Kruysko J, Kruzel ML. (2005) Lactoferrin accelerates reconstitution of the humoral and cellular immune response during chemotherapy-induced immunosppression and bone marrow transplant in mice. *Stem Cell Dev* ,14: 548-555.
5. Barners S, Grubbs C, Setchell KD, Carlson J. (1990) Soybeans inhibit mammary tumors in models of breast cancer. *Prog Clin. Biol Res*, 347: 239-253
6. Berner, L. A. (1993) Defining the role of milk fat in balanced diets. *Adv Food Nutr Res*, 37,131-257.
7. Björck L, Hopkin E. (1991) Significance of the indigenous antimicrobial agents of milk to the dairy industry. *Bull Int Dairy Fed*, 246:1-19.
8. Botsoglou N.A, (1994) Rapid sensitive and specific TBA method for measuring lipid peroxidation in animal tissue, food and feedstuff samples. *Agric Food Chem*, 42: 1931-1937.
9. Bounous G, Batist G, Gold P. (1991) Whey protein in cancer prevention. *Cancer Lett*, 57: 91-94.

10. Bounous G, Gervais F, Amer V, Batis G, Gold P, (1989) The influence of dietary whey protein on tissue glutathione and diseases of aging. *Clin Invest Med*, 12: 343-349.
11. Bounous G, Gold P.(1991) The biological activity of undenatured dietary whey proteins: role of glutathione. *Clin Invest Med*, 14: 296-309.
12. Bounous G, Letourneau L, Kongshavn PAL (1983). Influence of dietary protein type on the immune system of mice. *J Nutr*, 113: 1415-21.
13. Bouthegourd J-C J, Roseau SM, Makarios-Lanham L, Leruyet PM, Tome DG, Even PC (2002). A preexercise α -lactalbumin-enriched whey protein meal preserves lipid oxidation and decreases adiposity in rats. *Am J Physiol Endol M*, 46: E565-72.
14. Broerse JJ, Hennen LA, Klapwijk WM, (1987). Mammary carcinogenesis in different rat strains after irradiation and hormone administration. *Int J Radiat Biol*, 51: 1091-1100.
15. Browne R.W, Armstrong D. (1998). Reduced glutathione and glutathione disulfide. *Methods in Molecular Biology*, 108: 347-352.
16. Buderus S, Boone J, Lysterly D, Lentze MJ. (2004) Fecal lactoferrin: a new parameter to monitor infliximab therapy. *Dig Dis Sci*, 49: 1036-1039.
17. Buhl R, Jaffe HA, Holroyd KJ, Wells FB, Mastrangeli A, Saltini C. (1989) Systemic glutathione deficiency in symptom-free HIV seropositive individuals. *Lancet*, 2: 1294-1298.
18. Caplan LS, Schoenfeld ER, O'Leary ES. (2000) Breast cancer and electromagnetic fields- a review *Ann Epidemiol.*, 10: 31-44.
19. Ciocca DR, Oesterreich S, Chamness GC, Mc Guire WL, Fuqua S. (1993) Biological and clinical implications of heat shock protein 2700 (HSP 27): a review. *J. Natl. Cancer Inst*, 85: 1558-1570.

20. Clare DA, Swaisgood HE. (2000) Bioactive milk peptides: a prospectus. *J Dairy Sci*, 83: 1187-1195.
21. Cross ML, Gill HS. (2000) Immunomodulatory properties of milk. *Brit J Nutr*, 84: 81-89.
22. Dalle Done I, Giustarini D, Colombo R, Rossini R, Milzani A. (2003) Protein carbonylation in human diseases. *Trends Mo. Me*, 9: 169-176.
23. Dejava O, King RJB, Papadopoulos A, Raju KS. (1997) Heat shock protein 27(HSP27) and its role in female reproductive organs. *Eur J Gynaecol Oncol*, 18: 16-22.
24. El-Zahar K, Sitoy M, Choiset Y, Metro F, Haertle T, Chobert JM. (2004) Antimicrobial activity of ovine whey protein and their peptic hydrolysates. *Milchwissenschaft*, 59: 653-665.
25. Etzel MR. (2004). Manufacture and use of dairy protein fractions. *J Nutr*, 134: 996-1002.
26. Ficher W, Gustaffson L, Mosserberg AK, Gronli J, Mork S, Bjerkvig R, Svanberg C. (2004). Human α -lactalbumin made lethal to tumor cells (HAMLET) kills human glioblastoma cells in brain xenografts by an apoptosis-like mechanism and prolongs survival. *Cancer Res*, 64: 2105-2112.
27. Finerty JC, Binhammer RT, Schneider M. (1953). Neoplasms in rats exposed to single-dose total-body X-radiation. *J Natl Cancer Inst*, 14: 149-154.
28. Fisher B, Osborne CK, Margolis R, Bloomer W. (1993). Neoplasm of the breast. (5th ed) Canada *Cancer Med*, 1706-1774.
29. Fox PF, Flynn A. In: Fox PF Ed. (1992) Biological properties of milk proteins. advanced dairy chemistry. Elsevier, London vol. 1: 255-287.
30. Gustavo. B. (1993). Whey proteins as a food supplement in HIV – seropositive individuals. *Clin Inv Med*, 16: 204-209.

31. Gill HS, Doull F, Cross ML. (2000) Immunoregulatory peptides in milk. *Brit J Nutr*, 84: 111-117.
32. Greenberg DE, Jiang Z, Steffen R, Verenker MP; Dupont HL. (2002) Markers of inflammation in bacteria diarrhea among travelers, with a focus on enteroaggregative E. Coli pathogenecity. *J Infect Dis*, 185: 944-949.
33. Greenlee RT, Murray T, Boolden S, Wingo PA Cancer istatistic 2000. (2000).*CA Cancer J Clin*, 50: 7-33/1.
34. Gustafsson L, Leijonhufvud I, Aronsson A, Mosseberg AK, Svanborg C. (2004) Treatment of skin papillomas with topical α -lactalbumin-oleic acid. *N Engl J Med*, 350: 2663-2672.
35. Hakkak R, Korourian S, Shelnut SR, Lensing S, Ronis MJJ, Badger TM. (2000) Diets containing whey proteins or soy protein Isolate Protect against 7-12 dimethylbenzathrancene-induced mammary tumors in female rats. *Cancer Epidemiol Biomar*, 9: 113-117.
36. Halliwell B, Gutteridge JMC. (1999) Free radicals in biology and medicine (3rd ed.), Oxford University Press.
37. Hoppe C, Andersen J, Jacopcen S, Molgaard C, Friis H, Sangild PT, Michaelsen KF. (2008) The use of whey or skimmed milk powder in fortified blended foods for vulnerable groups. *J Nutr*, 138: 145-161.
38. Horton BS. (1995) Commercial utilization of minor milk components in the health and food industries. *J Dairy Sci*, 78: 2584-2589.
39. Huggins C, Yang NC. (1962) Induction and extinction of mammary cancer. *Science*, 137: 257-262.
40. Hussein MR, Ismael HH. (2004) Alterations of p53, Bcl-2, and Hmsh2 protein expression in the normal breast, benign proliferative breast disease, in situ and infiltrating ductal breast carcinomas in the upper *Cancer Biol Ther*, 3: 983-988.

41. Isaacs JT. (1986) Genetic control of resistance to chemically induced mammary adeno-carcinogenesis in rat. *Cancer Res*, 46: 3958-3963.
42. Ip C. (1996) Mammary tumorigenesis and chemoprevention studies in carcinogen-treated rats. *J. Mammary Gland Biol*, 1: 37-49.
43. Jenness R. In: Fox PF Ed, Inter-species comparison of milk proteins. developments in dairy chemistry. Appl Sci Pub, New York, 1982 87-114.
44. Jensen, RG (2002). The composition of bovine milk lipids. *J Dairy Sci*, 85: 295-350.
45. Jong BK. (2005) Three-dimensional tissue culture models in cancer biology. *Semin Cancer Biol*, 15: 365-377.
46. Jost R, Maire J-C. (1999) Maynard F, Secretin M-C. Aspects of whey protein usage in infant nutrition, a brief review. *Int J Food Sci Tech*, 34: 533-542.
47. Kaufman SN, Lusthans SN, Sagher U. (1990) Deep partial skin thickness burns: a reproducible animal model to study burn wound healing. *Burns*, 16: 13-16.
48. Kent KD, Harper WJ, Bomser JA. (2003) Effect of whey protein isolate on intracellular glutathione and oxidant-induced cell death in human prostate epithelial cells. *Toxicol In Vitro*, 17: 27-33.
49. Kim JB, Stein R, O'Hare MJ. (2004) Three-dimensional in vitro tissue culture models of breast cancer- a review. *Breast Cancer Res Tr*, 85: 281-291.
50. Korhonen H, Pihlanto A. (2003) Food-derived bioactive peptides—opportunities for designing future foods. *Curr Pharm Design*, 9: 1297-1308.
51. Korhonen H, Pihlanto-Leppala A, Rantamäki P, Tupasela T. (1998) Impact of processing on bioactive proteins and peptides. *Trends Food Sci Tech*, 9: 307-319.

52. Krissansen GW. (2007) Emerging health properties of whey proteins and their clinical implications. *J Nutr*, 26; 713-723
53. Kuhara T, Ligo M, Sato J, Itoh T, Ushida Y, Sekine K, Terada N, Okamura N, Tsyda H. (2000) Orally administered lactoferrin exerts an antimetastatic effect and enhances production of IL-8 in the intestinal epithelium. *Nutr Cancer*, 38: 192-199.
54. Kumar R, Vadlamudi RK, Adam L. (2000) Apoptosis in mammary gland and cancer. *Endocr Relat Cancer*, 7: 257-269.
55. Latchman DS. (1991) Heat shock proteins and human disease. *J. R. Coll. Physicians*, 25: 295-299.
56. Lai BT, Chin NW, Stanek AE, Ke W, Lannks KW. (1984) Quantitation and intracellular localization of the 85 kDa heat shock protein by using monoclonal and polyclonal antibodies. *Mol Cell Biol*, 4: 2802-2819.
57. Laugens GE, Coronato S, Spinelli O, Laguens RP, Di Girolamo W. (2001) Can breast cancer HSP27 (Heat shock protein 27000) expression influence axillary lymph node status? *Breast*, 10: 179-181.
58. Lee H, Gorley L, Duffy SW, Esteve J, Lee J. (1991) Dietary effects on breast cancer risk in Singapore *Lancet*, 337: 1097-1200.
59. Legrand D, Ellass E, Carpentier Mazurier J. (2005) Lactoferrin: A modulation of immune and inflammatory responses. *Cell. Mol Life Sci*, 62: 2549-2559.
60. Legrand-Poels S, Vaira D, Pincemail J, van de Vorst A, Piette J. (1990) Activation of human immunodeficiency virus type 1 by oxidative stress. *AIDS Res Hum Retrovir*. 6: 1389-1397.
61. Levine R.L., Garland D., Oliver C.N., Amici A., Climent I., Lenz A.G., Ahr B.W., Shaltiel S., Stadtman E.R. (1990). Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol*, 186: 464-473.

62. Lothian B. (2000) Treatment of obstructive airway disease with a cysteine donor protein supplement: a case report. *Chest*, 117: 914-916.
63. Macejova D, Radikova Z, Macho L, Liska J, Brtko j. (2005) MNU-induced carcinogenesis of mammary gland: Effect of thyroid hormone on expression of retinoic acid receptors in tumors of mammary gland. *Mol Cell Endocrinol*, 244: 47-56.
64. Maines MD, Gibbs PEM. (2005). 30 Some years of heme oxygenase: from a “molecular wrecking ball” to a “mesmerizing” trigger of cellular events. *Biochem Bioph Res Co*, 338: 568-577.
65. Mather, I.A.(2000). A review and proposed nomenclature for the major proteins of the milk fat globule membrane. *J Dairy Sci*, 83(2): 203-247.
66. Mc Cormik DL, Adamovski CB, Fiks A, Moon RC. (1981). Life time dose-response relation ships for mammary tumor induction by a single dose administration of N-methyl-N-nitrozurea. *Cancer Res*, 41: 1690-1694.
67. Mediana I, Tombo I, Satue-Gracia MT, German JB, Frankel EN. (2002) Effects of natural phenolic compounds on the antioxidant activity of lactoferrin in liposomes and oil-in-water emulsions. *J Agr. Food Chem*, 50: 2392-2399.
68. Meisel H. (2001) Bioactive peptides from milk proteins: a perspective for consumers and producers. *Aust J Dairy Technol*, 56: 83-92.
69. Meister A. (1988) Glutathione metabolism and its selective modification. *J Biol Chem*, 263: 17205-1728.
70. Menéndez-Pelaez A, Poeggeler B, Reiter RJ. (1993) Nuclear localization of melatonin in different mammalian tissues: immunocytochemical and radioimmunoassay evidence. *J Cell Biochem*, 53: 372–382.
71. Merdens J.(2003) The menopause, hormone replacement therapy and breast cancer. *J Steroid Biochem*, 83: 123-132.

72. Mertani HC, Garcia-Caballero T, Lambert A. (1998) Cellular expression of growth hormone and prolactin receptors in human breast disorders. *Int J Cancer*, 79: 202–211.
73. Michalski M.C, Januel C. (2006). Does homogenization affect the human health properties of cow's milk? *Trends In Food Sci Tech*, 17: 423-437.
74. Mobley JA, Brueggemeier RW. (2004) Estrogen receptor mediated regulation of oxidative stress and DNA damage in breast cancer. *Carcinogenesis*, 25: 3-9.
75. Mukarami M, Tonouchi H, Takahashi R, Kitazawa H, Kawai Y, Negishi H, Saito T. (2004) Structural analysis of a new anti-hypertensive peptide (β -lactozin B) isolated from a commercial whey product. *J Dairy Sci*, 87: 3183-3188.
76. Naidu AS, Chen J, Martinez C, Tulpinski J, Pal BK, Fowler RS. (2004) Activated lactoferrin's ability of to inhibit Candida growth and block yeast adhesion to the vaginal epithelial monolayer. *J. Reprod Med*, 49: 859-866.
77. Pastore A, Federici G, Bertini E, (2003). Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. *Clin Chim Acta*, 333: 19-39.
78. Pedersen L, Mollerup J, Hansen E, Jungbauer A. (2003). Whey protein as a model system for chromatographic separation of proteins, *Chromotogar (B)*, 790:161-173.
79. Pellegrini A, Dettling C, Thomas U, Hunziker P. (2001). Isolation and characterization of four bacterial domains in the bovine β -lactalbumin. *BBA*, 1526: 131-140.
80. Pellegrini A, Thomas U, Bramaz N, Hunziker P, Von Fellenberg R. (1999) Isolation and identification of three bactericidal domains in the bovine α -lactalbumin molecule. *BBA*, 1426: 372-378.

81. Pihlanto A, Korhonen H. In: Taylor SL Ed, (2003) Bioactive peptides and proteins. *Advances in Food and Nutrition Research*, Elsevier, SanDiego. 47: 175-276.
82. Pihlanto-Leppala A. (2000). Bioactive peptides from bovine whey proteins: opioid and ACE-inhibitory peptides. *Trends Food Sci Tech*, 11: 347-356.
83. Poeggeler B, Reiter RJ, Tan DX. (1993) Melatonin, hydroxyl radical-mediated oxidative damage and aging: a hypothesis. *J Pineal Res*, 14: 151-168.
84. Reghunathan R, Jayapal M, Hsu LY, Chng HH, Tai D, Leung BP, Melendez AJ, (2005) Expression profile of immune response genes in patients with severe acute respiratory syndrome. *BMC Immunol*, 6: 2-18.
85. Ritossa F (1962) A new puffing pattern induced by temperature, shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia*, 18: 571-573.
86. Roitt I, Brostoff J, Male D. (1985) *Immunology*. Churchill Livingstone, London.
87. Romanucci M, Marinelli A, Sarli G, Della Salda L. (2006) Heat shock protein expression in canine malignant mammary tumours. *BMC Cancer*, 6: 171-176.
88. Roos N, Mahe S, Benamouzig R, Sick H, Rauterau J, Tome D. (1995) ¹⁵N labeled immunoglobulins from bovine colostrum are partially resistant to digestion in human intestine. *J Nutr*, 125: 1238-44.
89. Rowlands JC, He L, Hakkak R, Ronis MJ, Badger TM. (2001) Soy and whey proteins downregulate DMBA-induced liver and mammary gland CYP1 expression in female rats. *J. Nutr*, 131: 3281-3287.
90. Russo IH, Medado J, Russo J. (1989) Endocrine influences on mammary structure and development. In: *Integument and mammary gland of laboratory animals* Uones TC, Mohr U, Hunt RD, eds). Berlin: Springer Verlag. 252-266.

91. Russo IH, Russo J. (1996) Mammary gland neoplasia in long-term rodent studies. *Environ Health Persp*, 104: 938-967.
92. Russo IH, Tewari M, Russo J. (1989). Morphology and development of rat mammary gland. *Integument and mammary gland of laboratory animals* (Jones TC, Mohr U, Hunt RD, eds). Berlin: Springer-Verlag. 233-252.
93. Russo J, Calaf G, Russo IHA. (1993) A critical approach to the malignant transformation of human breast epithelial cells. *Crit Rev Oncog*, 4: 403-417.
94. Russo J, Russo IH. (1987) Biological and molecular bases of mammary carcinogenesis. *Lab Invest*, 57: 112-137.
95. Sainz RM, Mayo JC, Reiter RJ. (2000) Melatonin regulates glucocorticoid receptor: an answer to its antiapoptotic action in thymus. *FASEB J*; 13: 1547–1556.
96. Schuessler H, Schilling K. (1984) Oxygen effect in radiolysis of proteins. Part.2 Bovine serum albumin. *Int. J. Radiat Biol*, 45: 267-281.
97. Severin S, Wenshui X. (2005) Milk biologically active components of as nutraceuticals. *Crit Rev Food Sci*, 645-656.
98. Shacer E. (2000) Quantification and significance of protein oxidation in biological samples. *Drug Metab Rev*, 32: 307-326.
99. Smithers GW, Ballard FJ, Copeland AD, De Silva KJ, DionysiusDA, Francis GL. (1996) New opportunities from the isolation and utilization of whey proteins. *J Dairy Sci*, 79: 1454-1459.
100. Sporn MB, Hong KW. (1997) Recent advances in chemoprevention of cancer. *Science*, 278: 1073-1077.
101. Staal FJ.(1998) Glutathione and HIV infection: reduced, or increased oxidized? *Eur J Clin Invest*, 28: 194-196.

102. Stadmant ER, Levine RL. (2003) Free radical-mediated oxidation free amino acids and amino acids residues in proteins. *Eur J Clin Invest*, 25: 207-218.
103. Svensson M., Fast J, Mossberg AK, Durringer C, Gustafsson L, Hallgren O, Brooks JL, Berliner L, Linse S, Svanborg J (2003). Alfa-lactalbumin unfolding is not sufficient to cause apoptosis, but is required for the conversion to HAMLET (human α -lactalbumin made lethal to tumor cells). *Protein Sci*, 12: 2794-2804.
104. Takahashi S, Narimatsu E, Asanuma H, Okazaki M, Okazaki A, Hirata K, Mori M, Chiba T, Sato N, Kikuchi K. (1995) Immunohistochemical detection of estrogen receptor in invasive human breast cancer: correlation with heat shock proteins, pS2 oncogen products. *Oncology-Basel*, 52: 371-375.
105. Tenovuo J. (2002). Clinical applications of antimicrobial host proteins lactoperoxidase, lysozyme and lactoferrin in xerostomia: efficacy and safety. *Oral Dis*, 8: 23-29.
106. Thompson HJ, Adlakha H. (1991) Dose-responsive induction of mammary gland carcinomas by the intraperitoneal injection of 1-methyl-1-nitrosourea. *Cancer Res*, 51: 3411-3415.
107. Thompson HJ. Methods for the induction of mammary carcinogenesis in the rat using 1-methyl-1-nitrosourea. *Methods in mammary gland biology and breast cancer research*. Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York 2000.
108. Tissières A, Mitchell HK, Tracey UM. (1974) Protein synthesis in salivary glands of *D. Melanogaster*. Relation to chromosome puffs. *J. Mol Biol*, 84: 389-398.
109. Tsuda H, Sekine L, Fujita K, Ligo M. (2002) Cancer prevention by bovine lactoferrin and underlying mechanisms. *Biochem. Cell Biol*, 80: 131-136.

110. Uruakpa FO, Ismond MAH, Akobundu ENT. (2002) Colostrum and its benefits: a review. *Nutr Res*, 22: 755-767.
111. Valko M, Leibfritz D, Moncol J.(2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell B*, 39: 44-84.
112. Varadhachary A, Wolf JS, Petrak K, O'Malley BW, Spadaro M, Curcio C, Forni G, Pericle F. (2004) Oral lactoferrin inhibits growth of established tumors and potentiates conventional chemotherapy. *Int J Cancer*, 111: 398-403.
113. Velioğlu-Öğünç A, Manukyan M, Cingi A, Aktan AÖ, Yalçın AS. (2003) The effect of dietary whey supplementation on wound healing. *Med J Kocatepe*, S: 51-54.
114. Wang WP, Ligo M, Sato J, Sekine K, Adachi I, Tsuda H, Activation of intestinal mucosal immunity in tumor-bearing mice by lactoferrin. *JPN J Cancer Res*, 38: 1022-1027.
115. Warner EA, Kanekanian AD, Andrews AT. (2001) Bioactivity of milk proteins: 1. Anticariogenicity of whey proteins. *Int J Dairy Technol*, 54: 151-153.
116. Warny M, Fatima A, Bostwick EF. (1999). Bovine immunoglobulin concentrate –*Clostridium difficile* retains *C. difficile* toxin neutralizing activity after passage through the human stomach and small intestine. *Gut*, 44: 212-217.
117. Welsch CW. (1985) Host factors affecting the growth of carcinogen-induced rat mammary carcinomas. *Cancer Res*, 45: 3415-3443.
118. Whitley D, Goldberg SP, Jordan WD. (1999) Heat shock proteins: a review of the molecular chaperones. *J. Vas Surg*, 29: 748-751.

119. Williams JM, Daniel CW. (1983) Mammary ductal elongation: differentiation of myoepithelium and basal lamina during branching morphogenesis. *Dev Biol*, 97: 274-290.
120. Zhang D, Wong L, Koay ESC. (2001) Phosphorylation of Ser 78 of HSP 27 correlated with HER-2/neu status and lymph node positivity in breast cancer. *Mol Cancer*, 6: 2-9.
121. Zhang SM, Willet CW, Selhub J, Manson JE, Colditz GA, Hankinson SE. (2003) A prospective study of plasma total cysteine and risk of breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 12: 1118-1193.
122. Zommara M, Tachibana N, Sakono M, Suzuki Y, Oda T, Hashiba H. (1996) Whey from cultured skim milk decreases serum cholesterol and increases antioxidant enzymes in liver and red blood cells in rats. *Nutrition Res*, 16: 293-302.

Hilmar™ 8010 Whey Protein Concentrate

TYPICAL AMINO ACID PROFILE

Amino acids represented as g/100g of product

Alanine	3.5
Arginine	2.3
Aspartic Acid	8.4
Cystine/Cysteine	1.7
Glutamic Acid	13.3
Glycine	1.4
Histidine	1.6
Hydroxyproline	<0.1
Isoleucine*[]	4.6
Leucine*[]	8.8
Lysine*	7.5
Methionine*	1.6
Phenylalanine*	2.6
Proline	6.6
Serine	4.6
Threonine*	4.5
Tryptophan*	1.3
Tyrosine	2.3
Valine*[]	4.4

* Essential Amino Acids [] Branched-Chain Amino Acids (BCAA)
81

TYPICAL FATTY ACID PROFILE

Fatty acids represented as g/100g of product

Saturated Fatty Acid	2.23
Monounsaturated Fatty Acid	1.20
Polyunsaturated Fatty Acid	0.87
Trans Fatty Acid	0.14

PROTEIN FRACTIONS

Beta-Lactoglobulin	50-60%
Alpha-Lactalbumin	12-16%
Glycomacropeptide (GMP)	15-20%
Immunoglobulin (IgG)	5-8%
Bovine Serum Albumin (BSA)	3-5%
Lactoferrin (Lf)	<1%

PHYSICAL CHARACTERISTICS

Hilmar™ 8010 is a spray-dried, cream-colored powder with a bland flavor profile. It is homogeneous, free flowing and non-caking.

PACKAGING

44.09 lb. (20 kg) heat-sealed, multi-wall kraft bag with inner polyethylene bag liner. Twenty-four bags per pallet.

STORAGE / SHELF LIFE

Shelf life is two years from the date of manufacture. Shelf life will be enhanced through ideal storage conditions, which include temperatures below 25° C, 75% relative humidity, and an odor-free environment. Stocks should be used in rotation, preferably within twelve months.

RECOMMENDED LABEL

Whey Protein Concentrate
Lecithin

ORDERING INFORMATION

PART CODE	FOB
200003	Hilmar, CA USA

This information is presented for consideration in the belief that it is accurate and reliable, however, no warranty, either expressed or implied, is made and no freedom from liability from patents, trademarks, or other limitations should be inferred. Any data listed are averages only and are not to be considered as guarantees, expressed or implied, nor as a condition of sale.

Hilmar Ingredients is a division of Hilmar Cheese Company

Product of USA



MARMARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
HAYVAN DENEYLERİ ETİK KURULU
PROJE ONAY FORMU

PROJENİN ADI : Deneysel meme kanseri modelinde süt proteinlerinin koruyucu etkisi

PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ : Prof.Dr.A. Süha Yalçın

PROJEDEKİ ARAŞTIRICILAR : Wafi Attaallah, Ayşe Mine Yılmaz

PROJENİN YÜRÜTÜLECEĞİ LABORATUVAR : Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Biyokimya AD

ONAY TARİHİ VE ONAY SAYISI 20.11.2008- 63.2008.mar

Sayın : Prof.Dr.A. Süha Yalçın

Hayvan Deneyleri Etik Kurulu'na "Deneysel meme kanseri modelinde süt proteinlerinin koruyucu etkisi " isimli projeniz"Hayvan Deneyleri Etik Kurulu " tarafından incelenerek onaylanmıştır.

Çalışmalarınızda başarılar dileriz.

Prof.Dr. Göksel ŞENER

Doç.Dr. Halil TUĞTEPE

Öğr. Gör. Dr. Gürkan SERT

Av. Serkan DURAN

Prof.Dr. Berrak YEĞEN
Hayvan Deneyleri Etik Kurul
Başkanı

Doç.Dr. Zafer GÖREN

Prof.Dr. Ayşen YARAT

Vet. Hek. Dilek ÖZBEYLİ

Av. Onur GİR

Not: Deneylerin yapılması sırasında ortaya çıkan zorluklar, deney protokolünde yapılması gereken değişiklikler, "Deney Hayvanları Araştırma Etik Kurulu'na" bildirilmelidir. Bütün yazışmalarda, proje onay tarihi ve onay sayısı belirtilmelidir. Araştırmacıların proje ile yapılan bütün yayınlarda proje onay tarih ve numarası belirtmesi zorunludur.

EK 5

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Ayşe Mine	Soyadı	YILMAZ
Doğum Yeri	Malkara / TEKİRDAĞ	Doğum Tarihi	06.06.1981
Uyruğu	Türkiye Cumhuriyeti	TC Kimlik No	29315572240
E-mail	aysemine.yilmaz@gmail.com	Tel	0505 641 37 05

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora/Uzmanlık		
Yüksek Lisans	Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya	2010
Lisans	İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü	2005
Lise	Tekirdağ Tuğlacılar Süper Lisesi	1999

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Proje Asistanı	TÜBİTAK Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü-Gebze	2009-2010
2.	Proje Asistanı	TÜBİTAK Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü- Gebze	2009-2010
3.	Proje Asistanı	Marmara ÜNİVERSİTESİ Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı	2007-2008

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*
İngilizce			

* Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

Yabancı Dil Sınav Notu								
KPDS	ÜDS	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE
	62,5							

Başarılmış birden fazla sınav varsa, tüm sonuçlar yazılmalıdır

KPDS: Kamu Personeli Yabancı Dil Sınavı; ÜDS: Üniversitelerarası Kurul Yabancı Dil Sınavı; IELTS: International English Language Testing System; TOEFL IBT: Test of English as a Foreign Language-Internet-Based Test TOEFL PBT: Test of English as a Foreign Language-Paper-Based Test; TOEFL CBT: Test of English as a Foreign Language-Computer-Based Test; FCE: First Certificate in English; CAE: Certificate in Advanced English; CPE: Certificate of Proficiency in English

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	70.734	71.531	71.299
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Word	Çok iyi
Excell	Çok iyi
Power point	Çok iyi

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

Uluslararası ve Ulusal Yayınları/Bildirileri/Sertifika ları/Ödü lleri/Diğer

- 19-24 Mayıs 2009, Antalya-XII.Ulusal Kolon ve Rektum Cerrahisi Kongresi ‘‘ Süt serum proteinlerinin (Whey) deneysel kolorektal kanser gelişimine etkisi. ‘‘ (2009) Özet kitabı, S: 221, P92 (Poster sunumu)
- 4-9 Temmuz 2009 Prag-34th FEBS Congress ‘‘Antioxidant activity of whey and whey hydrolysates. ‘‘ The FEBS Journal 276, Suppl.1 (2009) P 8-9, p.299. (Poster sunumu)
- 11 Eylül 2009, İstanbul-Yaşlanma ile İlgili Hastalıkların Moleküler Mekanizması ve Mikro Besinlerin Rolü ‘‘ Deneysel kolon kanseri modelinde süt serumu proteinlerinin koruyucu etkisi. ‘‘ (Sözlü sunum)
- 9-12 Haziran 2010, İstanbul - 3. IMPPS Third International Meeting on Pharmacy & Pharmaceutical Sciences ‘‘ Evaluation of antioxidant activity and chemical composition of black and green teas ‘‘ (Poster sunumu)