

DeneySEL Meme Kanseri Modelinde Süt Proteinlerinin Koruyucu Etkisi

Ayşe Mine Yılmaz¹, Wafi Attaallah², Gökhan Biçim¹, Evren Önay Uçar³,
Nazlı Arda³, A. Özdemir Aktan², A. Suha Yalçın¹

¹Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, İstanbul-Türkiye

²Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Genel Cerrahi Anabilim Dalı, İstanbul-Türkiye

³İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, İstanbul-Türkiye

Yazışma Adresi / Address reprint requests to: A. Suha Yalçın

Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Haydarpaşa, İstanbul-Türkiye

Telefon / Phone: +90-216-414-4733 Faks / Fax: +90-216-418-1047 Elektronik posta adresi / E-mail address: asyalcin@marmara.edu.tr

Kabul tarihi / Date of acceptance: 31 Mayıs 2011 / May 31, 2011

ÖZET:

DeneySEL meme kanseri modelinde süt proteinlerinin koruyucu etkisi

Amaç: Süt serumu proteinlerinin insan sağlığına üzerine birçok yararlı etkileri olduğu bilinmektedir. Çalışmamızda, sıçanlarda N-metil-N-nitrozüre ile indüklenen meme kanseri modelinde süt serumu proteinlerinin koruyucu etkileri araştırılmıştır.

Yöntemler: 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 sakrifiye edildi doku örnekleri toplandı. Karaciğer, böbrek ve meme dokularındaki glutatyon, malondialdehit ve protein karbonil değerleri karşılaştırıldı.

Bulgular: Tüm dokularda en yüksek malondialdehit ve protein karbonil değerleri N-metil-N-nitrozüre grubundaki sıçanlarda en düşük malondialdehit ve protein karbonil değerleri de kontrol grubunda gözlemlendi. N-metil-N-nitrozüre ile birlikte süt serumu proteinleri verildiğinde ise bu değerlerdeki artışların baskılanarak kontrol grubu değerlerine yaklaştığı gözlemlendi.

Sonuç: Çalışmamızda N-metil-N-nitrozüre ile oluşturulan meme kanseri modelinde N-metil-N-nitrozüre etkisiyle oluşan biyokimyasal değişikliklere karşı süt serumu proteinlerinin koruyucu etkisi olduğu gözlemlenmiştir.

Anahtar sözcükler: Süt serumu proteinleri, deneySEL meme kanseri, N-metil-N-nitrozüre

ABSTRACT:

Protective effect of whey proteins in experimental breast cancer model

Objective: It is known that whey proteins have a number of effects on maintaining human health. In this study protective effect of whey proteins in N-methyl-N-nitrosourea induced breast cancer model was investigated.

Methods: 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.

Results: Among all groups, the highest malondialdehyde and protein carbonyl levels were detected in the N-methyl-N-nitrosourea group. The increase in these values were reversed back by whey proteins.

Conclusion: The protective role of whey proteins against biochemical changes were observed in N-methyl-N-nitrosourea induced breast cancer model.

Key words: Whey proteins, experimental breast cancer, N-methyl-N-nitrosourea

GİRİŞ

Meme kanseri kaynaklı ölümler kanserden ölüm nedenleri arasında akciğer kanserinden sonra ikinci sırada yer almaktadır (1). Yapılan kapsamlı araştırmalara rağmen, meme kanserine sebep olan etiyoloji büyük ölçüde belirsizdir. Malignansinin görüldüğü kadınların yaklaşık %75' inde

risk faktörleri dışında, yaş ve batı tarzı yaşamın önemli olduğu belirtilmektedir (2). Öte yandan, süt serumu proteinleriyle beslenen sıçanlarda, kimyasallar tarafından indüklenmiş meme tümörlerinde çeşitlilik yönünden azalma gözlemlenmiştir (3). Bir diğer çalışmada, dimetilbenzaldehit (DMBA) ile indüklenmiş meme tümörü olan sıçanlarda süt serumu proteinlerinin yaşa bağlı tümör gelişimini geciktirdiği belirtil-

mektedir (4). Ancak, süt serumu proteinlerinin karsinogenezi nasıl değiştirdiği henüz tam olarak açıklanamamıştır. Bu açıdan, glutatyon (GSH) ve biyoaktif peptidler özellikle ilgi çekmektedir. Süt serumu proteinlerinin tüketimi dokularda GSH miktarını arttırmaktadır (5). 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 biyoaktif peptidleri içerir. Süt serumunun ve süt serumu hidrolizatlarının içerdiği biyoaktif peptidlerin birçok hücresel olayda rol alarak tümör insidansını azalttığı düşünülmektedir (4). Normal meme dokusunda, ısı şok proteini 27 (HSP 27) ya çok düşük seviyelerde eksprese olur ya da ekspresyonuna hiç rastlanmaz (6,7). Ancak yüksek ekspresyonu bildirilen insan meme kanseri tümörlerine zıt olarak HSP 27'nin düşük ya da sınırlı eksprese olduğu tümör tiplerinden de bahsedilmiştir (8,9). Sıçan meme kanseri modelinde, agresif tümörlerin oluşturulmasında genellikle polisiklik hidrokarbonlar kullanılmaktadır (10). Meme kanseri modellerinde genellikle N-metil-N-nitrozüre (MNU) ve dimetil benzantrasen (DMBA) kullanılmaktadır. Bu iki karsinogen maddeyle oluşturulan tümörler histolojik ve biyolojik olarak insandaki lezyonlara benzemektedir (11). Her iki karsinogen de meme adenokarsinomlarının gelişmesini sağlarken, uygulanan hayvanlarda herhangi bir sistemik toksisiteye rastlanmamaktadır. Ayrıca, değişik dozlarla farklı tipte tümörlerin oluşması sağlanabilmektedir. Bu çalışmada bir kimyasal karsinogen olan N-metil-N-nitrozüre (MNU) ile oluşturulan sıçan meme kanseri modelinde süt serumu proteinlerinin koruyucu etkilerinin mekanizması oksidatif stres parametreleri üzerinden aydınlatılmaya çalışılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamızda kullanılan MNU Sigma firmasından (Product no. N-1517) süt serumu proteinleri konsantresi Kavi Gıda (İstanbul)'dan temin edildi. Dört deney grubu için 130 günlük 40 adet dişi, virjin, Wistar Albino türü sıçan kullanıldı. Çalışma protokolü Marmara Üniversitesi Deney Hayvanı Etik Kurulu tarafından onaylandı. Bu gruplar kontrol, MNU, MNU ile birlikte süt serumu proteinleri (MNU+SSP) ve süt serumu proteinleri (SSP) olarak belirlendi. Sıçanlara intraperitoneal enjeksiyonla 50 mg/ml MNU 100 gün ara ile iki kez verilerek

deneysel meme kanseri oluşturulması amaçlandı (12). Diğer gruplara MNU enjeksiyonu ile aynı anda, haftada iki kez 2 ml orogastrik gavajla süt serumu proteinleri çözeltisi (%10), veya fizyolojik tuzlu su (%0.9 NaCl) verildi. Sıçanlar 180 gün sonunda hafif eter anestezisi altında intrakardiyak kan alınarak sakrifiye edildi ve doku örnekleri alındı. Elde edilen dokularda oksidatif stresi gösteren parametreler ölçülerek olası değişiklikler araştırıldı. Ayrıca, gruplar arasındaki doku HSP 27 ekspresyonundaki farklar incelenerek süt proteinleri ile meme kanseri arasındaki ilişki aydınlatılmaya çalışıldı.

Örnek Hazırlığı

Hayvanlar hafif eter inhalasyon anestezisi altında iken 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. Doku homojenatlarının hazırlanması için 200-300 mg doku, kan pıhtısı ve eritrositlerden arındırmak üzere 50 mM fosfat tamponu (pH=6.7) ile durulandı, 1.2 ml fosfat tamponu ile homojenize edildi. Homojenat 15 dakika süreyle 10,000 x g ve +4°C'de santrifüj edilerek süpernatant ayrıldı, -80°C'de muhafaza edildi.

Dokuda lipit peroksidasyonu

250 µl homojenat, eşit hacim 250 µl tiyobarbitürik asit (TBA) ayıracıyla karıştırıldı. Kaynar su banyosunda 1 saat tutuldu. Soğuduktan sonra 1.5 ml metanol konuldu ve 532 nm'de absorpsanlar okundu. Sonuçlar, malondialdehit (MDA) için saptanmış olan ekstinksiyon katsayısı ($1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) kullanılarak nmol/g doku cinsinden hesaplandı (13).

Dokuda protein oksidasyonu

Homojenatın protein içeriği ölçüldükten sonra 250 µl örnek alındı ve 500 µl %20 trikloroasetik asit (TCA) ile karıştırıldı, 11,000 x g'de santrifüj edildikten sonra süpernatant atıldı. Çökelti üzerine 500 µl dinitrofenilhidrazin (DNPH) ilave edildi. Oda sıcaklığında ara ara 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 1 N NaOH eklendi ve 37°C'de tutularak çözülmesi sağlandı. Oluşan

renjin absorbanansı 360 nm'de okundu. Kör olarak 2 N HCl kullanıldı. Sonuçlar protein karbonilleri için ekstinksiyon katsayısı olan $22,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ kullanılarak nmol/mg protein olarak ifade edildi (14).

Dokuda glutatyon tayini

Stok glutatyon (GSH) standardı hazırlandı (100 mg/dl) ve seri dilüsyon ile 10, 20, 30, 40 ve 50 mg/dl olacak şekilde hazırlandı. Örnek hazırlığı için 100 µl doku homojenatına meta-fosforik asit çözeltisi eklendi, 1000 x g'de 10 dakika santrifüjlendi ve supernatant ayrıldı. Bir floresans plağına 200 µl fosfat tamponu pipetlendi üzerine 10 µl standart, örnek ve kontrol eklendi. Daha sonra her kuyuya 10 µl o-phtaldialdehit ilave edildi, 15 dakika inkubasyon sonunda 350 nm'de ekstasyon ve 420 nm'de emisyon olacak şekilde floresans değerleri alındı. Standart grafik çizilerek sonuçlar grafikten okundu ve değerler µmol/g doku olarak ifade edildi (15).

Elektroforetik analiz için örnek eldesi

Meme dokuları (100 mg), 2 ml soğuk parçalama tampo- nu (%0.04 EDTA), %1 Triton X-100, 1 mM PMSF ve %0.02 Tris-HCl (pH 6.8) ile parçalandı. Homojenat +40°C'de 15,000 x g'de 20 dakika santrifüj edildi. Süpernatanttaki suda çözü- nebilen proteinler, SDS-PAGE ve Western-Blot analizinde kullanılmak üzere -70°C'de saklandı (16). Protein konsant- rasyonlarının belirlenmesinde Lowry yöntemi kullanıldı. Sığır serum albumin çözeltisi kullanılarak standart grafiği oluşturuldu (17).

Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE)

Suda çözünebilir hücre proteinlerinin denatüre jel elektroforezi ile ayrıştırılmasında %10'luk ayırma jeli ile %5'lik yükleme jeli kullanıldı. Önce jelin birinci 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 ikinci kısmı (yükleme jeli) dökülüp tarak yerleştirildi. Poli- merizasyon sonunda (yaklaşık 30 dakika) jel kaseti elektro- forez aletine (Mini-Protean 3 Cell, BIO-RAD) yerleştirildi ve örnekler 1:1 oranında örnek yükleme tampo- nu ile karıştırılıp 5 dakika kaynatıldıktan sonra, her bir cepte 15 µg protein

olacak şekilde uygulandı. 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.

İmmünolojik Analizler

Bu analizlerde, %10 poliakrilamid içeren SDS-PAGE (16) ile ayrılan proteinler, elektroblot yöntemi ile 1 saat boyunca 100 V akım uygulayarak polivinilidinden diflorür (PVDF) memb- rana aktarıldı. Proteinlerin, doğru bir şekilde aktarımının yapı- lıp yapılmadığını göstermek için membran, proteinlere geçi- ci olarak bağlanan Ponceau S boyası ile boyandı. Daha sonra membran %5 (w/v) süt tozu ile bloke edildikten sonra, primer antikorla (HSP27) oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. Son olarak, membran yıkama solüsyonu 15 dakika aralıklarla değiştirilerek 1 saat yıkandıktan sonra, bloklama solüsyonu içinde hazırlanan yaban turpu peroksidazı ile işaretli konjuge antikor (keçi anti-fare IgG) oda sıcaklığında 1 saat inkübe edil- di. Membran yıkama solüsyonu ile tekrar yıkandıktan sonra, spesifik protein bantları röntgen filmi üzerine yansıtıldı.

Densitometrik Analizler

Western blot ile film üzerine aktarılan görüntüler densi- tometrede görüntülendi ve karşılaştırıldı. Milimetre kare başına düşen optik dansite hesaplandı.

Denatüre Jel Elektroforezi ve Western Blot

Dört farklı hayvan grubundan (NMU uygulananlar, NMU ve SSP uygulananlar, SSP uygulananlar ve kontrol grubu) elde edilen suda çözünebilir 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 Detec- tion System (Amersham)" kullanılarak röntgen filmi (Hyper- film) üzerine yansıtıldı.

İstatistiksel Analizler

Analizlere ait tüm sayısal veriler istatistiksel olarak değerlendirildi. Aritmetik ortalamalar ve standart sapmalar

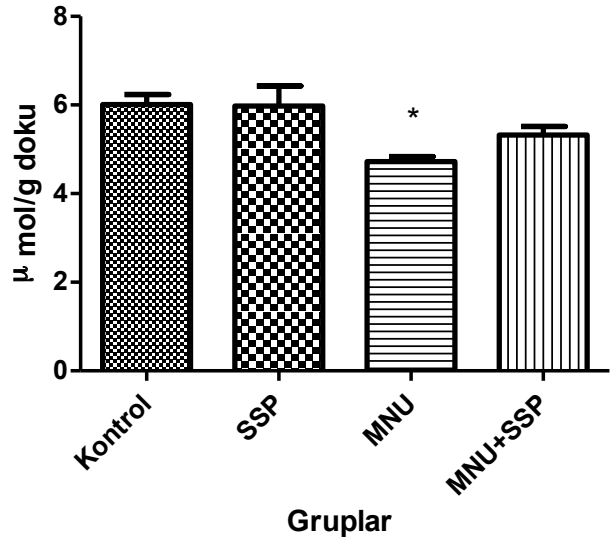
hesaplandı. Gruplar arasındaki farkların anlamlı olup olmadığını belirlemek için ANOVA (tek yönlü varyans analizi; one-way ANOVA) testi yapıldı. Anlamlılık sınırı olarak $P < 0.05$ olarak kabul edildi. Bu istatistiksel işlemler GraphPad Prism 4.0 paket programı ile gerçekleştirildi.

BULGULAR

Hayvanların ön değerlendirmesi hastalık, sağ kalım, toksisite, kilo alımı gibi parametreler ile yapıldı. Gruplar arasında kilo artışı, sağ kalım, hastalık açısından herhangi bir farka rastlanmadı. Ayrıca, haftada bir kez MNU enjeksiyonu yapılan gruplarda palpasyonla muayenede tümör dokusuna rastlanmadı.

Çalışmamızda karaciğer, böbrek ve meme dokusu incelemelerinden elde edilen sonuçlar sırasıyla Şekil 1, Şekil 2 ve Şekil 3'de verilmiştir. Şekil 1'de karaciğer, böbrek ve meme dokusu glutatyon (GSH) düzeyleri, Şekil 2'de karaciğer, böbrek ve meme dokusu malondialdehit (MDA) düzeyleri, Şekil 3'de ise karaciğer, böbrek ve meme dokusu protein karbonil (PCO) düzeyleri görülmektedir.

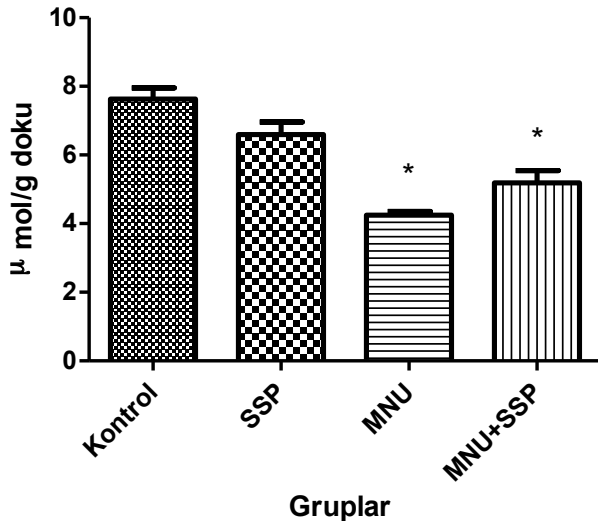
Böbrek GSH



Şekil 1b: Böbrek dokusu glutatyon (GSH) değerleri
Kontrol grubuna (n=10) 6 ay boyunca haftada iki kez 2 ml fizyolojik tuzlu su, SSP grubuna (n=10) 6 ay boyunca haftada iki kez 2 ml süt serumu proteinleri orogastrik gavajla verilmiştir MNU grubuna (n=9) 90 gün ara ile iki kez 50 mg/kg MNU enjekte edilmiştir. MNU+SSP grubuna (n=10) 90 gün ara ile iki kez 50 mg/kg MNU enjeksiyonu ve 6 ay boyunca haftada iki kez 2 ml SSP orogastrik gavajla verilmiştir.

*Kontrol ve SSP grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı derecede düşük ($p < 0,05$)

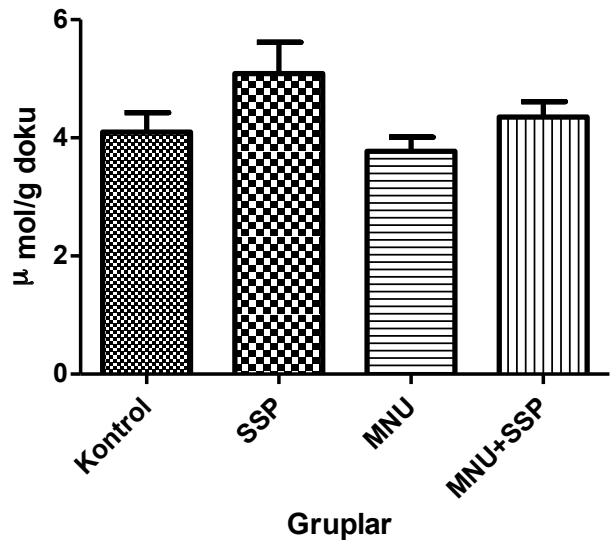
Karaciğer GSH



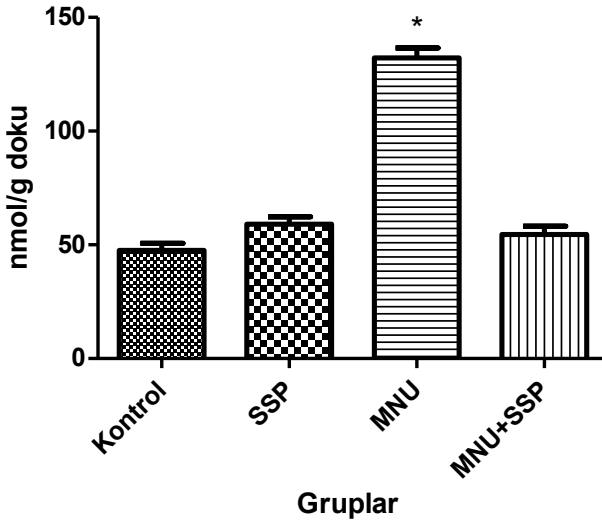
Şekil 1a: Karaciğer dokusu glutatyon (GSH) değerleri
Kontrol grubuna (n=10) 6 ay boyunca haftada iki kez 2 ml fizyolojik tuzlu su, SSP grubuna (n=10) 6 ay boyunca haftada iki kez 2 ml süt serumu proteinleri orogastrik gavajla verilmiştir MNU grubuna (n=9) 90 gün ara ile iki kez 50 mg/kg MNU enjekte edilmiştir. MNU+SSP grubuna (n=10) 90 gün ara ile iki kez 50 mg/kg MNU enjeksiyonu ve 6 ay boyunca haftada iki kez 2 ml SSP orogastrik gavajla verilmiştir.

*Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı derecede düşük ($p < 0,05$)

Meme GSH

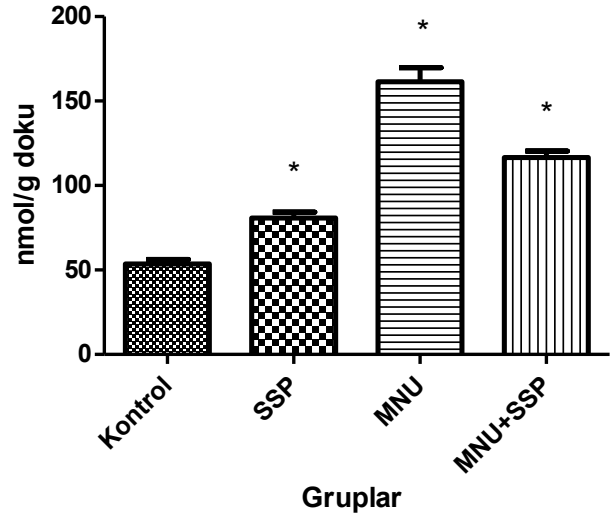


Şekil 1c: Meme dokusu glutatyon (GSH) değerleri
Kontrol grubuna (n=10) 6 ay boyunca haftada iki kez 2 ml fizyolojik tuzlu su, SSP grubuna (n=10) 6 ay boyunca haftada iki kez 2 ml süt serumu proteinleri orogastrik gavajla verilmiştir MNU grubuna (n=9) 90 gün ara ile iki kez 50 mg/kg MNU enjekte edilmiştir. MNU+SSP grubuna (n=10) 90 gün ara ile iki kez 50 mg/kg MNU enjeksiyonu ve 6 ay boyunca haftada iki kez 2 ml SSP orogastrik gavajla verilmiştir.

Karaciğer MDA**Şekil 2a:** Karaciğer dokusu MDA değerleri

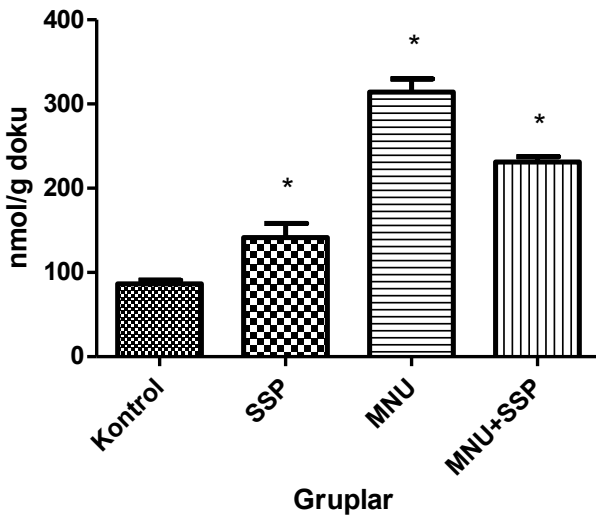
Kontrol grubuna (n=10) 6 ay boyunca haftada iki kez 2 ml fizyolojik tuzlu su, SSP grubuna (n=10) 6 ay boyunca haftada iki kez 2 ml süt serumu proteinleri orogastrik gavajla verilmiştir MNU grubuna (n=9) 90 gün ara ile iki kez 50 mg/kg MNU enjekte edilmiştir. MNU+SSP grubuna (n=10) 90 gün ara ile iki kez 50 mg/kg MNU enjeksiyonu ve 6 ay boyunca haftada iki kez 2 ml SSP orogastrik gavajla verilmiştir.

*Kontrol, SSP, MNU+SSP grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı derecede düşük (p<0,05)

Meme MDA**Şekil 2c:** Meme dokusu MDA değerleri

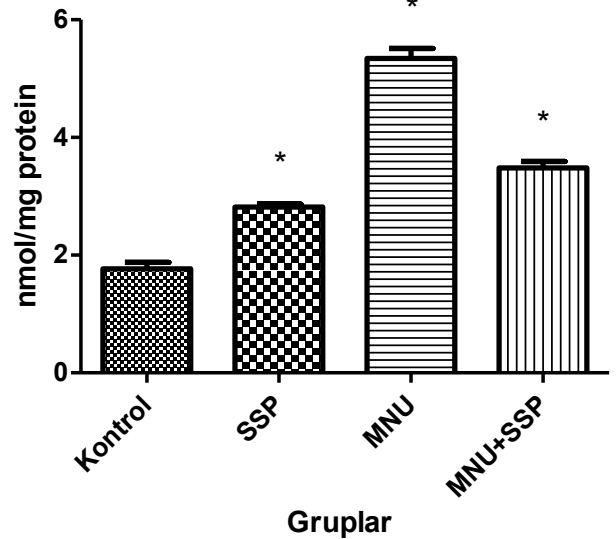
Kontrol grubuna (n=10) 6 ay boyunca haftada iki kez 2 ml fizyolojik tuzlu su, SSP grubuna (n=10) 6 ay boyunca haftada iki kez 2 ml süt serumu proteinleri orogastrik gavajla verilmiştir MNU grubuna (n=9) 90 gün ara ile iki kez 50 mg/kg MNU enjekte edilmiştir. MNU+SSP grubuna (n=10) 90 gün ara ile iki kez 50 mg/kg MNU enjeksiyonu ve 6 ay boyunca haftada iki kez 2 ml SSP orogastrik gavajla verilmiştir.

*Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı derecede düşük (p<0,05)

Böbrek MDA**Şekil 2b:** Böbrek dokusu MDA değerleri

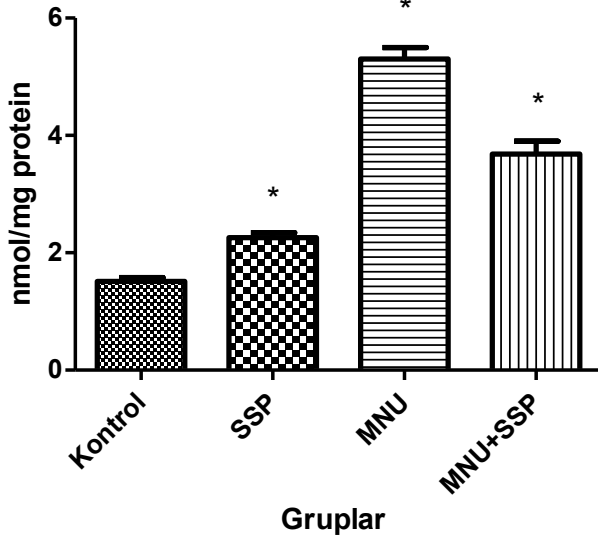
Kontrol grubuna (n=10) 6 ay boyunca haftada iki kez 2 ml fizyolojik tuzlu su, SSP grubuna (n=10) 6 ay boyunca haftada iki kez 2 ml süt serumu proteinleri orogastrik gavajla verilmiştir MNU grubuna (n=9) 90 gün ara ile iki kez 50 mg/kg MNU enjekte edilmiştir. MNU+SSP grubuna (n=10) 90 gün ara ile iki kez 50 mg/kg MNU enjeksiyonu ve 6 ay boyunca haftada iki kez 2 ml SSP orogastrik gavajla verilmiştir.

*Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı derecede düşük (p<0,05)

Karaciğer PCO**Şekil 3a:** Karaciğer dokusu PCO değerleri

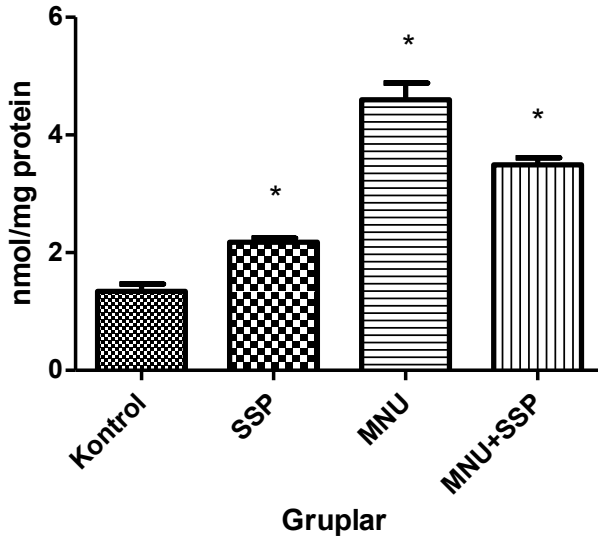
Kontrol grubuna (n=10) 6 ay boyunca haftada iki kez 2 ml fizyolojik tuzlu su, SSP grubuna (n=10) 6 ay boyunca haftada iki kez 2 ml süt serumu proteinleri orogastrik gavajla verilmiştir MNU grubuna (n=9) 90 gün ara ile iki kez 50 mg/kg MNU enjekte edilmiştir. MNU+SSP grubuna (n=10) 90 gün ara ile iki kez 50 mg/kg MNU enjeksiyonu ve 6 ay boyunca haftada iki kez 2 ml SSP orogastrik gavajla verilmiştir.

*Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı derecede yüksek (p<0,05)

Böbrek PCO**Şekil 3b:** Böbrek dokusu PCO değerleri

Kontrol grubuna (n=10) 6 ay boyunca haftada iki kez 2 ml fizyolojik tuzlu su, SSP grubuna (n=10) 6 ay boyunca haftada iki kez 2 ml süt serumu proteinleri orogastrik gavajla verilmiştir MNU grubuna (n=9) 90 gün ara ile iki kez 50 mg/kg MNU enjekte edilmiştir. MNU+SSP grubuna (n=10) 90 gün ara ile iki kez 50 mg/kg MNU enjeksiyonu ve 6 ay boyunca haftada iki kez 2 ml SSP orogastrik gavajla verilmiştir.

*Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı derecede yüksek (p<0,05)

Meme PCO**Şekil 3c:** Meme dokusu PCO değerleri

Kontrol grubuna (n=10) 6 ay boyunca haftada iki kez 2 ml fizyolojik tuzlu su, SSP grubuna (n=10) 6 ay boyunca haftada iki kez 2 ml süt serumu proteinleri orogastrik gavajla verilmiştir MNU grubuna (n=9) 90 gün ara ile iki kez 50 mg/kg MNU enjekte edilmiştir. MNU+SSP grubuna (n=10) 90 gün ara ile iki kez 50 mg/kg MNU enjeksiyonu ve 6 ay boyunca haftada iki kez 2 ml SSP orogastrik gavajla verilmiştir.

*Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı derecede yüksek (p<0,05)

Tablo 1: Meme dokusu HSP 27 değerleri (ortalama ± standart sapma)

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*

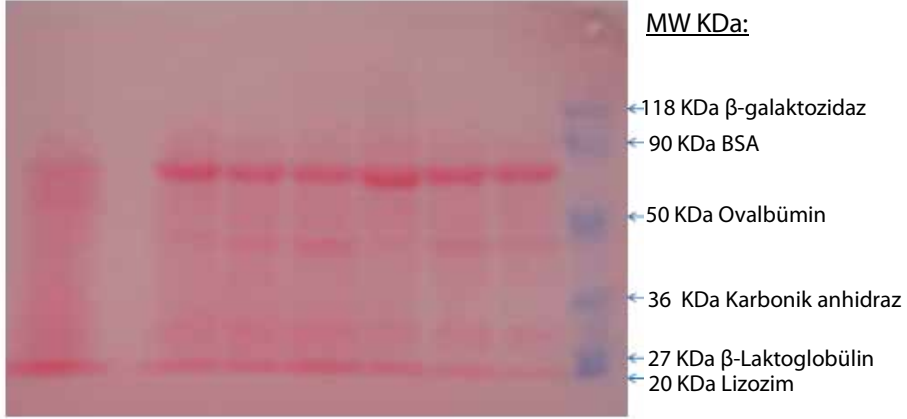
*Kontrol grubu değerleri ile karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir.

Elde ettiğimiz sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde; tüm dokulardaki en yüksek GSH değerleri kontrol grubunda en düşük değerler ise MNU grubunda bulundu, tüm dokularda en yüksek MDA ve protein karbonil değerleri MNU grubundaki sıçanlarda en düşük MDA ve protein karbonil değerleri ise kontrol grubunda gözlemlendi. Çalışmamızda HSP 27 ölçümü yalnızca meme dokusunda yapılmış, en yüksek HSP 27 miktarı MNU enjeksiyonu yapılan grupta bulunmuş, en düşük miktar ise kontrol grubunda tespit edilmiştir. Ancak değerler arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık yoktur (Tablo 1). Şekil 4'de her gruptan birer örnek membran görüntüsü verilmiştir.

TARTIŞMA

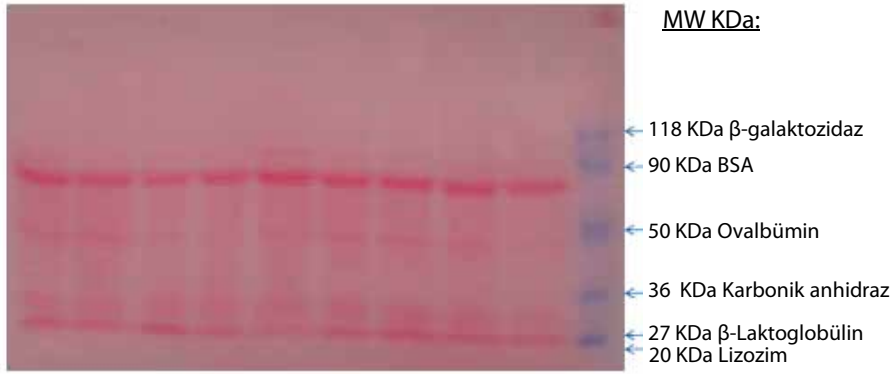
Kanserden ölüm nedenleri arasında akciğer kanserinden sonra ikinci sırada yer alan meme kanseri, gelişmekte olan ülkelerde yaşayan kadınlar arasında en sık görülen malignansilerden biridir (18). İnsan meme kanseri modelleri için yaygın olarak DMBA veya MNU ile indüklenmiş meme tümörleri kullanılmaktadır (19). Her iki kimyasal da meme dokusunda etkili olup, 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 (20). MNU ile indüklenmiş deneysel çalışmalar DMBA'ya göre östrojen daha bağımlı, bölgesel invazif ve metastaza daha yatkındır (21). Deneysel meme kanseri çalışmalarında, in vivo hayvan modelleri kullanılarak çeşitli ajanların koruyucu etkileri gösterilmiştir (22).

Süt serumu yapısında immüno globulinler, serum albümin, α-laktalbümin, β-laktoglobülin ve bazı küçük peptitleri içerir (23). Süt serumunun antioksidan aktivitesinin içeriğindeki enzimlerden ve vitaminler gibi faktörlerden ileri geldiği düşünülmektedir (24). Bu proteinlerin antioksidan, antimikrobiyal, immün yanıt, ağız sağlığı gibi insan sağlığını korumadaki pozitif etkilerinin yanı sıra meme kanseri, pros-



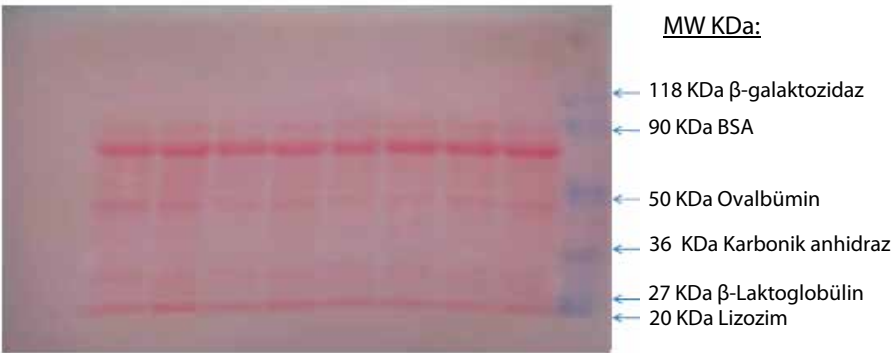
Şekil 4a: Kontrol grubuna ait PVDF membran görüntüsü

Kontrol grubuna (n=6) 6 ay boyunca haftada iki kez 2 ml fizyolojik tuzlu su, SSP grubuna (n=9) 6 ay boyunca haftada iki kez 2 ml süt serumu proteinleri orogastrik gavajla verilmiştir MNU grubuna (n=9) 90 gün ara ile iki kez 50 mg/kg MNU enjekte edilmiştir. MNU+SSP grubuna (n=7) 90 gün ara ile iki kez 50 mg/kg MNU enjeksiyonu ve 6 ay boyunca haftada iki kez 2 ml SSP orogastrik gavajla verilmiştir. Ölçümler üç tekrarlı olarak yapıldı. Kontrol grubu diğer gruplarla karşılaştırıldığında anlamlı bir farka rastlanmadı.



Şekil 4b: SSP grubuna ait PVDF membran görüntüsü

Kontrol grubuna (n=6) 6 ay boyunca haftada iki kez 2 ml fizyolojik tuzlu su, SSP grubuna (n=9) 6 ay boyunca haftada iki kez 2 ml süt serumu proteinleri orogastrik gavajla verilmiştir MNU grubuna (n=9) 90 gün ara ile iki kez 50 mg/kg MNU enjekte edilmiştir. MNU+SSP grubuna (n=7) 90 gün ara ile iki kez 50 mg/kg MNU enjeksiyonu ve 6 ay boyunca haftada iki kez 2 ml SSP orogastrik gavajla verilmiştir. Ölçümler üç tekrarlı olarak yapıldı. Kontrol grubu diğer gruplarla karşılaştırıldığında anlamlı bir farka rastlanmadı.



Şekil 4c: MNU grubuna ait PVDF membran görüntüsü

Kontrol grubuna (n=6) 6 ay boyunca haftada iki kez 2 ml fizyolojik tuzlu su, SSP grubuna (n=9) 6 ay boyunca haftada iki kez 2 ml süt serumu proteinleri orogastrik gavajla verilmiştir MNU grubuna (n=9) 90 gün ara ile iki kez 50 mg/kg MNU enjekte edilmiştir. MNU+SSP grubuna (n=7) 90 gün ara ile iki kez 50 mg/kg MNU enjeksiyonu ve 6 ay boyunca haftada iki kez 2 ml SSP orogastrik gavajla verilmiştir. Ölçümler üç tekrarlı olarak yapıldı. Kontrol grubu diğer gruplarla karşılaştırıldığında anlamlı bir farka rastlanmadı.

tat kanseri, kolon kanseri ve uterus kanseri gibi kanser türlerinde de antikarsinojenik etkisi gösterilmiştir (14). Bir diğer araştırma da gastrik ve hepatik lipid peroksidasyonu ile indüklenen ülserin diyetle alınan süt serum proteinleri etkisiyle azaltıldığını göstermektedir (25). Ayrıca diyetle alınan süt serumu proteininin sıçanlarda oluşturulan tümör gelişim sürecinde kronik global gen ekspresyonunu değiştirdiği de gösterilmiştir (26). Aynı çalışmada diyetle alınan süt serumu proteinlerinin karsinojen aktivasyonunda yer alan karaciğer ve meme dokusu faz I enzimlerinin ekspresyonunu baskıladığı rapor edilmiştir. Yapılan in vivo çalışmalarından biri de kolon ve meme tümörlerinde reaktif oksijen ve azot türleri hakkında olup, meme tümörlerinde süperoksit radikalinin normal dokulara göre arttığını bildirmektedir (27).

Çalışmamızda, kimyasal bir karsinojen olan MNU ile oluşturulan deneysel meme tümörü modeli kullanılarak süt serumu proteinlerinin koruyucu etkisi araştırıldı ve oksidatif stres parametreleri olan GSH, MDA, PCO ve HSP27 moleküllerinin dokulardaki değişikliklerinin ortaya konması amaçlandı.

MNU enjeksiyonu yapılan sıçanlar 130 günlük olduklarından meme gelişimleri tamamlanmıştı, buna bağlı olarak terminal duktus gelişimleri tamamlanan sıçanlarda MNU uygulaması sonrasında gelişmesi beklenen sürede makroskopik olarak tümör tespit edilemedi. Ancak verilen madde nin ileri derecede karsinojen olmasından dolayı oksidatif stres parametreleri açısından inceleme yapıldığında MNU enjeksiyonu yapılan sıçanlarda, tüm dokularda MNU etkisiyle oksidatif stres koşulları oluşturulduğu gözlemlendi. MNU enjeksiyonu ile birlikte süt serumu proteinleri verilen gruplarda bu parametrelerin normal değerlere yaklaştığı gözlemlendi.

Süt serumu proteinleri MNU'nun sebep olduğu oksidatif stresin etkilerini ortadan kaldırmaktadır. Araştırmalar bu proteinlerin yüksek oksidatif stres ile immün yetersizliğin tedavisinde kullanılabileceğini göstermektedir. Tümör gelişimi sırasında oksidatif stresle savaşılan dokularda GSH konsantrasyonları artmaktadır (28). Araştırmamızda MNU gru-

bundaki sıçanların karaciğer MDA değerleri tüm gruplardan yüksek bulunmuştur. Bu gruptaki sıçanların karaciğer MDA değerleri kontrol grubuna göre anlamlı derece yüksek iken, MNU enjeksiyonu ile birlikte süt serum proteinleri verildiğinde bu değer anlamlı derecede düşmektedir. Dolayısıyla, süt serumu proteinlerinin karsinojen madde ile indüklenen MDA miktarlarını anlamlı oranda düşürdüğü gözlemlenmiştir. Meme dokusunda da en yüksek MDA değeri MNU enjeksiyonu yapılan grupta tespit edilmiştir.

Süt serumu proteinlerinin içerdikleri laktoferrin (LF) ve α -laktalbümin etkisiyle dokularda lipid peroksidasyonunu azalttığı düşünülmektedir. Süt serumu proteinlerinden biri olan LF'nin oral yoldan alındığında kimyasal karsinojenle indüklenen kolon, karaciğer ve özofagus tümörlerini baskıladığı bildirilmiştir (29). LF karsinogenezde tümöre etkilerinin yanı sıra, farelerde kemoterapi sırasında humoral ve hücrel immün yanıtı da hızlandırmaktadır (30). Tümör taşıyan farelere oral yoldan verilen LF, intestinal epitel hücrelerinden IL-18, lamina propriadan IFN- γ , intestinal mukozadan CD4+, CD8+ ve NK hücrelerinin üretimini arttırmıştır (31,32). Ayrıca, farelerde oral yolla alınan rekombinant insan LF'in, meme kanseri ile skuamöz kanserin tümör gelişimini engellediği bildirilmiştir.

Sonuç olarak, hem bizim çalışmamızdaki bulgular hem de literatürdeki bilgiler, antioksidan, antimikrobiyal, antitümör etkileri olduğu bilinen süt serumu proteinlerinin ayrıca içerdikleri LF, α -laktalbümin, β -laktoglobülin gibi spesifik proteinler aracılığıyla meme kanseri ve diğer kanser türlerine karşı koruyucu etkiye sahiptir. Yapılacak ayrıntılı biyokimyasal ve moleküler çalışmalar aracılığıyla bu moleküllerin etkileri incelenmelidir.

Teşekkür

Bu çalışma Ayşe Mine Yılmaz'ın "Deneysel Meme Kanseri Modelinde Süt Proteinlerinin Koruyucu Etkisi" başlıklı yüksek lisans tezi kaynaklıdır ve Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenmiştir (Proje no: SAG-C-YLP-270109-0011).

KAYNAKLAR

1. Greenlee RT, Murray T, Boolden S, Wingo PA. Cancer statistics, 2000. *CA Cancer J Clin* 2000; 50: 7-33.
2. Fisher B, Osborne CK, Margolesse R, Bloomer W. Neoplasm of the breast. In: Bast RC, Kufe DW, Pollock RE, Weichselbaum RR, Holland JF, Frei E (Eds), *Holland-Frei Cancer Medicine*. 5th ed, BC Decker 2000.
3. Hakkak R, Korourian S, Shelnut SR, Lensing S, Ronis MJJ, Badger TM. Diets containing whey proteins or soy protein isolate protect against 7-12, dimethylbenzathracene-induced mammary tumors in female rats. *Cancer Epidemiol Biomarkers* 2000; 9: 113-117.
4. Gervais F, Amer V, Batist G, Gold P. The influence of dietary whey protein on tissue glutathione and diseases of aging. *Clin Invest Med* 1989; 12: 343-349.
5. Bounous G, Batist G, Gold P. Whey protein in cancer prevention. *Cancer Lett* 1991; 57: 91-94.
6. Ciocca DR, Oesterreich S, Chamness GC, Mc Guire WL, Fuqua S. Biological and clinical implications of heat shock protein 2700 (HSP 27): a review. *J Natl Cancer Inst* 1993; 85: 1558-15570.
7. Dejava O, King RJB, Papadopoulos A, Raju KS. Heat shock protein 27 (HSP27) and its role in female reproductive organs. *Eur J Gynaecol Oncol* 1997; 18: 16-22.
8. Laugens GE, Coronato S, Spinelli O, Laguens RP, Di Girolamo W. Can breast cancer HSP27 (Heat shock protein 27000) expression influence axillary lymph node status? *Breast* 2001; 10: 179-181.
9. Takahashi S, Narimatsu E, Asanuma H, Okazaki M, Okazaki A, Hirata K, Mori M, Chiba T, Sato N, Kikuchi K. Immunohistochemical detection of estrogen receptor in invasive human breast cancer: correlation with heat shock proteins, pS2 oncogen products. *Oncology-Basel* 1995; 52: 371-375.
10. Ip C. Mammary tumorigenesis and chemoprevention studies in carcinogen-treated rats. *J Mammary Gland Biol* 1996; 1: 37-49.
11. Sporn MB, Hong KW. Recent advances in chemoprevention of cancer. *Science* 1997; 278: 1073-1077.
12. Thompson HJ. Methods for the induction of mammary carcinogenesis in the rat using either 7,12-dimethylbenz[a]anthracene or 1-methyl-1-nitrosourea. In: Ip M, Asch BB, editors, *Methods in Mammary Gland Biology and Breast Cancer Research*. 8th ed. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2000: 19-29.
13. Botsoglou N.A. Rapid sensitive and specific TBA method for measuring lipid peroxidation in animal tissue, food and feedstuff samples. *Agric Food Chem* 1994; 42: 1931-1937.
14. Lothian B. Treatment of obstructive airway disease with a cysteine donor protein supplement: a case report. *Chest* 2000; 117: 914-916.
15. Browne R.W, Armstrong D. Reduced glutathione and glutathione disulfide. *Meth Molec Biol* 1998; 108: 347-352.
16. Zhang D, Wong L, Koay ESC. Phosphorylation of Ser 78 of HSP 27 correlated with HER-2/neu status and lymph node positivity in breast cancer. *Mol Cancer* 2001; 6: 2-9.
17. Lowry O.H, Rosebrough NJ, Farr AL, & Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951; 193: 263-275.
18. Greenberg DE, Jiang Z, Steffen R, Verenker MP, Dupont HL. Markers of inflammation in bacteria diarrhea among travelers, with a focus on enteroaggregative E. Coli pathogenicity. *J Infect Dis* 2002; 185: 944-949.
19. Welsch CW. Host factors affecting the growth of carcinogen-induced rat mammary carcinomas. *Cancer Res* 1985; 45: 3415-3443.
20. Huggins C, Yang NC. Induction and extinction of mammary cancer. *Science* 1962; 137: 257-262.
21. Mc Cormik DL, Adamovski CB, Fiks A, Moon RC. Life time dose-response relationships for mammary tumor induction by a single dose administration of N-methyl-N-nitrosourea. *Cancer Res* 1981; 41: 1690-1694.
22. Tsuda H, Sekine L, Fujita K, Ligo M. Cancer prevention by bovine lactoferrin and underlying mechanisms *Biochem Cell Biol* 2002; 80: 131-136.
23. Yalçın AS. Emerging therapeutic potential of whey proteins and peptides. *Curr Pharm Des* 2006; 12:1673-1643.
24. Bayram T, Pekmez M, Arda N, Yalçın AS. Antioxidant activity of whey protein fractions isolated by gel exclusion chromatography and protease treatment. *Talanta* 2008; 75: 705-709.
25. Jahovic N, Veliöğlu-Öğünç A, Güzel E, Ars D, Ercan F, Erkanlı G, Yeğen B, Yalçın AS. Whey pretreatment ameliorates gastric and hepatic oxidative damage in ethanol-induced gastric ulcer via a neutrophil-dependent mechanism. *Marmara Med J* 2005; 18: 64-70.
26. Romanucci M, Marinelli A, Sarli G, Della Salda L. Heat shock protein expression in canine malignant mammary tumours. *BMC Cancer* 2006;6: 171-176.
27. Haklar G, Özveri E, Yüksel M, Aktan Ö, Yalçın AS. Different kinds of reactive oxygen and nitrogen species were detected in colon and breast tumors. *Cancer Lett* 2001; 165: 219-224
28. Krissansen GW. Emerging health properties of whey proteins and their clinical implications. *J Nutr* 2007; 26: 713-723.
29. Reghunathan R, Jayapal M, Hsu LY, Chng HH, Tai D, Leung BP, Melendez AJ. Expression profile of immune response genes in patients with severe acute respiratory syndrome. *BMC Immunol* 2005; 6: 2-18.
30. Artym J, Zimecki M, Kruszko J, Kruzel ML. Lactoferrin accelerates reconstitution of the humoral and cellular immune response during chemotherapy-induced immunosuppression and bone marrow transplant in mice. *Stem Cell Dev* 2005; 14: 548-555.
31. Kuhara T, Ligo M, Sato J, Itoh T, Ushida Y, Sekine K, Terada N, Okamura N, Tsyda H. Orally administered lactoferrin exerts an antimetastatic effect and enhances production of IL-8 in the intestinal epithelium. *Nutr Cancer* 2000; 38: 192-199.
32. 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* 2000; 91: 1022-1027.
33. Varadhachary A, Wolf JS, Petrak K, O'Malley BW, Spadaro M, Curcio C, Forni G, Pericle F. Oral lactoferrin inhibits growth of established tumors and potentiates conventional chemotherapy. *Int J Cancer* 2004; 111: 398-403.