



**T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**EŞEK (*Equus asinus* L. 1758) SÜTÜNÜN SİTOTOKSİK VE GENOTOKSİK
ETKİLERİNİN KANSERLİ VE SAĞLIKLI İNSAN AKCİĞER HÜCRE
HATLARI ÜZERİNE KARŞILAŞTIRMALI OLARAK ARAŞTIRILMASI**

Çetin AKCA

**Prof. Dr. Tolga CAVAŞ
(Danışman)**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

Bursa – 2015

Her Hakkı Saklıdır

TEZ ONAYI

Çetin AKCA tarafından hazırlanan “Eşek (*Equus asinus* L. 1758) Sütünün Sitotoksik ve Genotoksik Etkilerinin Kanserli ve Sağlıklı İnsan Akciğer Hücre Hatları Üzerine Karşılaştırmalı Olarak Araştırılması” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Tolga CAVAŞ
Uludağ Ü. Fen-Edebiyat Fakültesi
Biyoloji Anabilim Dalı

İmza

Başkan: Prof. Dr. Tolga CAVAŞ
Uludağ Ü. Fen-Edebiyat Fakültesi
Biyoloji Anabilim Dalı

İmza

Üye: Prof. Dr. Nilüfer ÇİNKİLİÇ
Uludağ Ü. Fen-Edebiyat Fakültesi
Biyoloji Anabilim Dalı

İmza

Üye: Yrd. Doç.Dr. Figen ERSOY
Uludağ Ü. Fen-Edebiyat Fakültesi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

İmza

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. Ali Osman ÖZDEMİR
Enstitü Müdürü
. .2015

U.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada:

- Tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı beyan ederim.

13.01.2015
Çetin AKCA

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

EŞEK (*Equus asinus* L. 1758) SÜTÜNÜN SİTOTOKSİK VE GENOTOKSİK ETKİLERİNİN KANSERLİ VE SAĞLIKLI İNSAN AKCİĞER HÜCRE HATLARI ÜZERİNE KARŞILAŞTIRMALI OLARAK ARAŞTIRILMASI

Çetin AKCA

Uludağ Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Tolga CAVAŞ

Yüzyıllar boyunca eşek sütü tedavi edici, iyileştirici, besleyici ve kozmetik ürünler olarak kullanılmıştır. Eşek sütü son zamanlarda ise zengin bileşimi nedeniyle bilimsel bir ilgi uyandırmıştır.

Bu çalışmada eşek sütünün sağlıklı (BEAS-2B) ve kanser (A549) insan akciğer hücre hatları üzerindeki *in vitro* sitotoksik ve genotoksik etkileri, Klonojenik, WST-1, XTT, Comet ve MN test yöntemleri kullanılarak araştırılmıştır. Sağlıklı akciğer hücre hatları için (BEAS-2B) Klonojenik, WST-1 ve XTT deneylerinde elde edilen IC₅₀ değerleri sırasıyla 2476µg/mL, 2294µg/mL ve 2381µg/mL olarak belirlenmiştir. İnsan akciğer kanser (A549) hücre hatları için elde edilen IC₅₀ değerleri ise 850µg/mL, 1109 µg/mL ve 830µg/mL olarak belirlenmiştir. Eşek sütünün özellikle İnsan akciğer kanser (A549) hücre hatlarında yüksek anti-proliferatif etkiye sahip olduğu gözlenmiştir. Çalışmamızda eşek sütünün sağlıklı hücrelere zarar vermediği gözlenirken, kanserli hücre hatlarının büyümesinde gösterdiği sitotoksik etki istatistiksel olarak önemli bulunmuştur (p<0.05).

Eşek sütünün sağlıklı hücrelere minimum zarar veren dozları (50, 100, 200 ve 400µg/mL) göz önüne alınarak genotoksik etkilerini sağlıklı ve kanser hücreleri üzerinde karşılaştırmalı olarak belirlemek amacıyla Tek hücre jel elektroforez (COMET) ve Mikronükleus (MN) yöntemleri kullanılmıştır. Comet testi sonucunda, tamamen doğal bir madde olan eşek sütünün A549 kanser hücreleri üzerinde doza bağlı olarak DNA hasarına yol açtığı gözlenmiştir. Ayrıca kromozomal kırıkları gösteren Mikronükleus testi sonucunda ise ‰ Mikronükleus frekansında önemli derecede artış tespit edilmiştir (p<0.05). Ancak Comet ve MN testinde sağlıklı (BEAS-2B) hücre hattında istatistiksel olarak önemli bir değişim gözlenmemiştir.

Anahtar Kelimeler: Eşek Sütü, Sitotoksiste, Genotoksiste, Akciğer epiteli, Kanser

2014, VIII + 98 sayfa

ABSTRACT

MSc Thesis

COMPARATIVE EVALUATION OF CYTOTOXIC EFFECTS OF DONKEY MILK (*Equus asinus* L. 1758) ON CANCER AND HEALTHY HUMAN LUNG EPITHELIAL CELL LINES

Çetin AKCA

Uludag University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Tolga CAVAŞ

For centuries, donkey milk has been used as a curative, reformatory, nutritive substance as well as cosmetics. Due to its rich content, it aroused scientific interest recently.

In this research, in vitro cytotoxic and genotoxic effects of donkey milk on healthy (BEAS-2B) and cancerous (A549) human epithelial cells, using clonogenic, WST-1, XTT, Comet and MN testing methods, were investigated. IC₅₀ values obtained from clonogenic, WST-1, XTT tests for healthy epithelial cells were determined as 2476 µg/mL, 2294 µg/mL ve 2381 µg/mL respectively. IC₅₀ values for cancerous epithelial cells were determined as 850 µg/mL, 1109 µg/mL, and 830 µg/mL. It was observed that donkey milk had high anti-proliferative effect on cancerous epithelial cells (A549). While it was observed that donkey milk did no harm to healthy cells, its cytotoxic effect on the growth of cancerous cells was found statistically important ($p < 0.05$).

Considering donkey milk's least harmful doses (50, 100, 200 ve 400 µg/mL) to healthy cells, Comet and MN methods were used with the aim of determining its genotoxic effects on healthy and cancerous cells comparatively. As a consequence of Comet test, it was observed that donkey milk, a completely natural substance, caused DNA harm on cancerous (A549) cells depending on dose. Besides, in consequence of micronucleus test that shows chromosomal fractures, a markedly increase in % MN frequency was determined ($p < 0.05$). However, as a consequence of Comet and MN tests, no statistically valuable change in healthy cells (BEAS-2B) was observed.

Key words: Donkey milk, Cytotoxicity, Genotoxicity, Lung Epithelium, Cancer

2014, VIII + 98 pages

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim boyunca ılımlı ve eğitici yönüyle bize yol gösteren, tezin yürütülmesi ve bütün çalışmalarım boyunca ilgi ve yardımlarını esirgemeyen Sayın Hocam **Prof. Dr. Tolga ÇAVAS**'a,

Tez deneylerimde, deneyimlerimden ve yardımlarından faydalandığım sevgili hocalarım **Prof. Dr. Nilüfer ÇINKILINÇ**'a, **Arş. Gör. Dr. Özgür VATAN**'a, **Arş. Gör. Dilek YILMAZ**'a, **Ümit KUMBIÇAK**'a,

Güzel bir çalışma ortamı oluşmasında ve deney aşamalarında yardımları ile bana destek olan sevgili arkadaşım **Özgün TEKSOY**'a,

Özellikle Yüksek lisans yapmamızda bizi teşvik eden ve her türlü konuda yardımcı olmaya çalışan **Işıklar Askeri Hava Lisesi**'ndeki komutanlarıma ve arkadaşlarıma,

Yüksek lisans eğitimim süresince birlikte eğitim gördüğüm ve arkadaşlıkları ile bana moral olan herkese,

Tezimin Türkçe dil ve yazım kurallarına uygunluğunu kontrol eden **Hv.Öğ.Ütğm. Recep KILIÇ**'a,

Eşek sütü tozunun temin edilmesinde herhangi bir ücret beklemeden gönderen Portekiz'li **Naturasin** firmasına,

Tüm bu zahmetli süreçte destek ve yardımlarını devamlı üzerimde hissettiğim, sevgili eşime,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	I
ABSTRACT.....	II
TEŞEKKÜR.....	II
İÇİNDEKİLER	IV
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	V
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VI
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	VIII
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	2
2.1. Eşek ve Eşek Sütü ile İlgili Genel Bilgiler.....	2
2.2. Eşek Sütünün İçeriği	5
2.3. Eşek Sütü ve Yapısı	7
2.3.1 Eşek Sütünün Mineral İçeriği	8
2.3.2. Eşek sütünün Laktoz İçeriği	8
2.3.3. Eşek Sütünün Yağ İçeriği	9
2.3.4. Eşek Sütünün Protein İçeriği	11
2.4. Sitotoksite Test Yöntemleri.....	19
2.4.1. Klonojenik Test.....	19
2.4.2. WST-1 Yöntemi.....	20
2.4.3. XTT Yöntemi.....	21
2.5. Genetoksisite Test Yöntemleri	21
2.5.1. Tek hücre Jel Elektroforez (COMET) Yöntemi	22
2.5.2. Mikronükleus Testi	24
3. MATERYAL VE METOT	25
3.1. Etken maddemiz olan eşek sütü tozunun temin edilmesi.....	25
3.2. Deneyimizde kullanılan cihaz ve sarf malzemeleri	26
3.3. Sağlıklı (BEAS-2B) akciğer epiteli ve kanserli (A549) akciğer hücre kültürü çalışmaları	28
3.4. Klonojenik Hücre Canlılığı Belirleme Testi	34
3.5. WST-1 Hücre Canlılığı Belirleme Testi	37
3.6. XTT Hücre Canlılığı Belirleme Testi	41
3.7. Tek Hücre Jel Elektroforez (Comet) Yöntemi	43
3.8. Mikronükleus (MN) Yöntemi	48
3.9. İstatistiksel Analizler.....	52
4. BULGULAR	53
4.1. Klonojenik Test Bulguları.....	53
4.2. WST-1 Test Bulguları	58
4.3. XTT Testi Bulguları.....	61
4.4. Tek Hücre Jel Elektroforez (COMET) Bulguları.....	66
4.5. Mikronükleus (MN) Test Bulguları	75
TARTIŞMA ve SONUÇ:.....	81
EK 1: Naturasin firmasından gelen eşek sütünün içerik bilgileri	87
ÖZGEÇMİŞ:	98

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

$\mu\text{g}/\text{mL}$

KCl

H_2O_2

KH_2PO_4

NaCl

NaOH

R^2

kDa

Açıklama

Mikrogram /Mikrolitre

Potasyum klorür

Hidrojen peroksit

Potasyum Dihidrojen Fosfat

Sodyum Klorür

Sodyum Hidroksit

Belirlilik katsayısı

Kilo Dalton

Kısaltmalar

A549

BEAS-2B

IC_{50}

FBS

NPN

HAMLET

PSA

DMSO

DNA

EDTA

LMA

PBS

rpm

Cyt-B

ÇBİ

MN

MI

MII

MIII

MIV

ÇBI

COX-2

Açıklama

İnsan akciğer kanseri epitel hücre hattı

İnsan sağlıklı akciğer epiteli hücre hattı

%50'lik İnhibitör Konsantrasyonu

Fetal Bovine Serum

Azotsuz proteinler

Human α -laktalbümin made lethal tümör cells

Penisilin, Streptomisin, Anfetoresin

Dimetil Sülfoksit

Deoksiribo Nükleik Asit

Etilen Diamin Tetra Asetik asit

Low Melting Agarose (Düşük Erime noktalı Agaroz)

Phosphate Buffered Saline (Tuzlu Fosfat Tamponu)

Revolutions per minute (devir/dakika)

Sitokalsin-B

Çekirdek Bölünme İndeksi

Mikronükleus

Mononükleuslu hücrelerin sayısı

Binükleuslu hücrelerin sayısı

Trinükleuslu hücrelerin sayısı

Tetranükleuslu hücrelerin sayısı

Çekirdek Bölünme Frekansı

Siklooksijenaz-2

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Eşek sütünün kullanım alanları.....	2
Şekil 2.2. Eşek sütünün toplanması, St Vincent de Paul Hastahanesi, Paris, XIX yüzyıl	4
Şekil 2.3. Eşek sütünün içeriği	5
Şekil 2.4. Eşek sütünün içeriğindeki mikroelementler	6
Şekil 2.5. Eşek sütünün içeriğindeki azot fraksiyonları.....	6
Şekil 2.6. Eşek sütünün fraksiyonlarına ayrılması	12
Şekil 2.7. α -Laktalbüminin yapısı	16
Şekil 2.8. Klonojenik test sonucu oluşan kolonilerin petri ve mikroskopik görüntüsü ..	19
Şekil 2.9. Komet testinin aşamaları.....	23
Şekil 2.10. Komet yöntemi ile agaroz jel üzerinde elektroforetik ortamda negatif kutuptan pozitif kutuba (soldan sağa) doğru göç eden farklı seviyelerde hasara uğramış DNA'ların görüntüleri.....	23
Şekil 2.11. Genotoksik ajan muamelesi akabinde, sitokinezi bloklanmış hücre kültürlerinde ortaya çıkabilecek çeşitli sonuçlar	24
Şekil 3.1. Nurasin firması tarafından gönderilen eşek sütü tozu paketi.....	25
Şekil 3.4. Klonojenik testin ayrıntılı basamakları.....	36
Şekil 3.5. WST-1 yönteminin aşamaları	38
Şekil 3.6. IC_{50} değerinin hesaplanması	39
Şekil 3.8. DNA hasar seviyelerinin kameram programı ile belirlenmesi	46
Şekil 3.9. Comet testinin aşamaları.....	47
Şekil 3.10. Mikronükleus testinin aşamaları	51
Şekil 4.1. Klonojenik test ile belirlenen BEAS-2B hücre hatlarında dağılım grafiği	54
Şekil 4.2. Klonojenik test ile belirlenen A549 hücre hatlarında dağılım grafiği	54
Şekil 4.3. BEAS-2B hücrelerinde Klonojenik test ile belirlenen canlılık oranlarının çubuk grafik ile gösterilmesi.....	55
Şekil 4.4. A549 hücrelerinde Klonojenik test ile belirlenen canlılık oranların çubuk grafik ile gösterilmesi.....	55
Şekil 4.5. BEAS-2B hücrelerinde koloni oluşumları	57
Şekil 4.6. A549 hücrelerinde koloni oluşumları.	57
Şekil 4.7. WST-1 testi ile belirlenen BEAS-2B hücre hattında dağılım grafiği	59
Şekil 4.8. WST-1 testi ile belirlenen A549 hücre hattında dağılım grafiği.....	59
Şekil 4.9. BEAS-2B hücrelerinde WST-1 testi ile belirlenen canlılık oranların çubuk grafik ile gösterilmesi.....	60
Şekil 4.10. A549 hücrelerinde WST-1 testi ile belirlenen canlılık oranların çubuk grafik ile gösterilmesi	60
Şekil:4.11. XTT testi ile belirlenen BEAS-2B hücre hattında dağılım grafiği	62
Şekil:4.12. XTT testi ile belirlenen A549 hücre hattında dağılım grafiği	63
Şekil 4.13. BEAS-2B hücrelerinde XTT testi ile belirlenen canlılık oranların çubuk grafik ile gösterilmesi.....	63
Şekil 4.14. A549 hücrelerinde XTT testi ile belirlenen canlılık oranların çubuk grafik ile gösterilmesi	64
Şekil 4.15. Comet testi sonunda sağlıklı akciğer (BEAS-2B) hücre hatlarında çeşitli konsantrasyonlarda hazırlanan preparatlardan örnek florasan mikroskop görüntüsü (X20).....	67

Şekil 4.16. BEAS-2B hücre hattında Comet testi ile belirlenen hasarlı DNA'ların kuyruk uzunluğunun çubuk grafik ile gösterilmesi	68
Şekil 4.17. BEAS-2B hücre hattında Comet testi ile belirlenen hasarlı DNA'ların kuyruk % DNA miktarı çubuk grafik ile gösterilmesi	69
Şekil 4.18. BEAS-2B hücre hattında Comet testi ile belirlenen hasarlı DNA'ların Olive kuyruk momenti miktarı çubuk grafik ile gösterilmesi.....	69
Şekil 4.19. Comet testi sonunda kanserli akciğer (A549) hücre hatlarında çeşitli konsantrasyonlarda hazırlanan preparatlardan örnek florasan mikroskop görüntüsü (X20).	72
Şekil 4.20. A549 hücre hattında Comet testi ile belirlenen hasarlı DNA'ların kuyruk uzunluğunun gösterilmesi	73
Şekil 4.21. A549 hücre hattında hasarlı kuyruk % DNA miktarının gösterilmesi.....	73
Şekil 4.22. A549 hücre hattında hasarlı DNA'ların Olive kuyruk momenti miktarının gösterilmesi	74
Şekil 4.23. MN testi bulguları. İki çekirdekli 1000 hücredeki MN sayısı(‰)	76
Şekil 4.24. MN testi çekirdek bölünme indeksi bulguları	77
Şekil 4.25. A549 MN testi bulguları. İki çekirdekli 1000 hücredeki MN sayısı(‰)	78
Şekil 4.26. A549 MN testi çekirdek bölünme indeksi bulguları	79
Şekil 4.27. MN testi preparatlarından elde edilen mikroskopik görüntü örnekleri (20X)	80

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Eşek sütünün bileşenleri ve diğer türleri ile karşılaştırılması (g/kg)	8
Çizelge 2.2. Eşek, anne, kısrak ve inek sütlerinin ortalama bileşenleri (%)	9
Çizelge 2.3. Eşek, anne, kısrak ve inek sütlerinin yağ asitleri kompozisyonu (g/100 g yağ).....	10
Çizelge 2.4. Eşek, anne, kısrak ve inek sütlerinin kazein ve serum proteini içerikleri (g/kg).....	14
Çizelge 2.5. Çeşitli proteinlerin aktiviteleri	15
Çizelge 3.1. Çalışmalarda kullanılan cihazlar	26
Çizelge 3.2. Çalışmalarda kullanılan sarf malzemeler.....	27
Çizelge 3.3. Eşek sütünün çeşitli konsantrasyonları	32
Çizelge 4.1. Klonojenik test ile belirlenen canlılık yüzdeleri ve Standart Sapma.	53
Çizelge 4.2. WST-1 ile belirlenen canlılık yüzdeleri ve Standart Sapma.....	58
Çizelge 4.3. BEAS-2B ve A549 hücrelerinde XTT ile belirlenen canlılık yüzdeleri ve Standart Sapma.....	62
Çizelge 4.4. Klonojenik test, XTT ve WST-1 testi ile belirlenen IC ₅₀ değerleri	65
Çizelge 4.5. Eşek sütü maddesinin BEAS-2B sağlıklı hücreler üzerindeki komet uygulamaları, Standart hata: SH	67
Çizelge 4.6. Eşek sütü maddesinin A549 kanserli hücreler üzerindeki Comet uygulamaları.....	71
Çizelge 4.7. MN testi bulguları. MN; ‰ mikronükleus frekansı, ÇBİ; Çekirdek Bölünme İndeksi.	75
Çizelge 4.8. A549 hücre hatlarında MN testi bulguları. MN; ‰ mikronükleus frekansı, ÇBİ; Çekirdek Bölünme İndeksi.....	77

1. GİRİŞ

Süt, dişi memelilerin yeni doğan yavruları beslemek için salgıladıkları beyaz renkli özel biyolojik bir sıvıdır. Klinik çalışmalarda inek sütünün Ig-E proteinlerinden dolayı alerjik etkiye sahip olduğu bildirildiğinden, bebek beslenmesinde anne sütüne alternatif olarak eşek sütünün kullanılabilceği gösterilmiştir. Eşek sütü protein içeriği bakımından insan sütüne yüksek benzerliği nedeniyle diğer memeli sütlerinden ayrılmıştır. Ayrıca eşek sütünün yüksek lizozim ve laktoferrin proteinleri sayesinde anti-mikrobiyal etki gösterdiği bilinmektedir.

Son dönemlerde eşek sütünün popülaritesi tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde artmıştır. Çeşitli gazete ve televizyon kanallarında eşek sütünün kansere iyi geldiği ile ilgili bilimsel temeli olmayan bir çok haber yapılmıştır. Hatta çoğu kanser hastasının eşek sütünü temin edebilmek için litresine yüksek miktarlarda ücretler ödediği bilinmektedir. Ayrıca eşek sütünün güzelliği koruduğu, gençleştirdiği bilgileri insanları eşek sütünden kozmetik ürünleri üretmeye ve pazarlamaya teşvik etmiştir. Bu noktada eşek sütü çiftlikleri açarak eşek sütü pazarlama ihtiyacına girilmiştir.

Diğer memeli sütleri ile karşılaştırıldığında eşek sütünün az çalışıldığı görülmektedir. Bununla birlikte son yıllarda eşek sütünün bileşiminde bulunan peynir altı suyu proteinleri çeşitli özellikleri ile ilgi çekmiştir. Bazı eşek sütü fraksiyonlarının, tümör hücrelerinin çoğalması ve farklılaşmasını önleyen belirli sitokinlerin üretimini uyarma kapasitesine sahip oldukları gösterilmiştir (Mao ve ark. 2009). Ancak yapılan literatür taramalarında eşek sütünün kanser ve sağlıklı hücre hatlarındaki sitotoksik ve genotoksik etkilerine dair herhangi bir veriye rastlanılamamıştır.

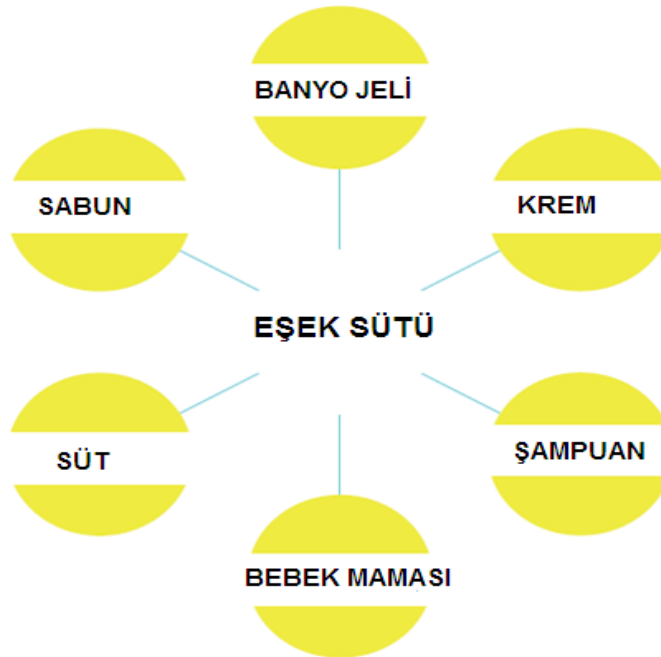
Bu çalışmada, eşek sütünün bileşimi, besin değeri, sağlığa yararlı özellikleri ve antimikrobiyal nitelikleri hakkında bilgiler derlenip anne, kısrak ve inek sütleri ile benzer ve benzer olmayan yönleri irdelenmiştir. Bu bilgilerin ışığında, eşek sütünün A549 (Kanserli akciğer epitel hücresi) ve BEAS-2B (Sağlıklı akciğer epitel hücresi) hücre hatları üzerine sitotoksik ve genotoksik etkileri incelenmesi amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Eşek ve Eşek Sütü ile İlgili Genel Bilgiler

Eşek (*Equus asinus*), Equidae familyasının, Equus (At) cinsine bağlı bir tür oluportalma ömür uzunluğu 25-30 yıldır. Yaklaşık olarak 4-5 yaşlarında vücut büyümelerini tamamlayan eşeklerin büyüklükleri 0.9-1.6 metre arasında değişmekte olup gebelik süreleri ortalama 12 aydır.

Dünyadaki toplam eşek popülasyonunun yarısına yakını Çin’de bulunmaktadır. Çin’in yanı sıra, Afganistan, Brezilya, Mısır, Hindistan, Pakistan, İran, Mısır, Meksika, Peru ve Sudan gibi ülkelerde eşek yoğunluğunun fazla olduğu bildirilmiştir (Kandır 2014). Yukarıda sayılan ülkelerde eşek yetiştiriciliği, biyolojik ürün eldesinden ziyade, geleneksel olarak hayvanın fiziksel gücünden yararlanmak amacıyla devam ettirilmektedir (Yılmaz ve Ertuğrul 2011). Bununla birlikte bazı Avrupa ülkelerinde eşek çiftliklerinde üretilen sütlerin beslenme ve sağlık sektörlerinin yanısıra kozmetik üretiminde de kullanılmakta olduğu bilinmektedir (Şekil 2.1). Ülkemizde ise 2009 yılında Kırklareli’nde kurulan ilk eşek sütü üretim işletmesinin ardından aralarında Bursa’nın da bulunduğu çeşitli illerimizde yeni çiftlikler faaliyete geçirilmiştir (Kandır 2014).



Şekil 2.1. Eşek sütünün kullanım alanları.

Gebelikte süt verimi yaklaşık 6 ay süren bir eeğin ortalama süt verimi hayvan başına günlük 1 lt civarındadır. Bu durum eşek sütünün pahalı bir faaliyet olmasının temel sebebidir. Ülkemizde eşek sütünün litresi 50-100 TL arasında değişen fiyatlarda alıcı bulmaktadır. Her ne kadar eeklerin süt verimleri göreceli olarak daha düşük olsa meme yapıları nedeniyle enfeksiyonlara yakalanma riskleri düşüktür. Ayrıca bileşiminde yüksek oranda bulundurduğu laktoferrin ve lizozimin sayesinde düşük bakteri yüküne yüksek dayanıklığa sahip olması eşek sütünün inek sütünün göre daha avantajlı hale getirmektedir (Salimei ve ark. 2004).

Eşek sütünün sağlık yönünden önemi çok eski tarihlerden beri bilinmektedir. Yüzyıllar boyunca eşek sütü tedavi edici, iyileştirici, besleyici ve kozmetik ürünler olarak kullanılmıştır. Örneğin Eski Mısır'da, eşek sütü bitkisel ilaç olarak, eski Yunan'da tıbbi amaçlar için kullanılmıştır. Aşağıda eşek sütünün tarihsel olarak popüler kullanıma dair elde edilen bazı bilgiler verilmiştir.

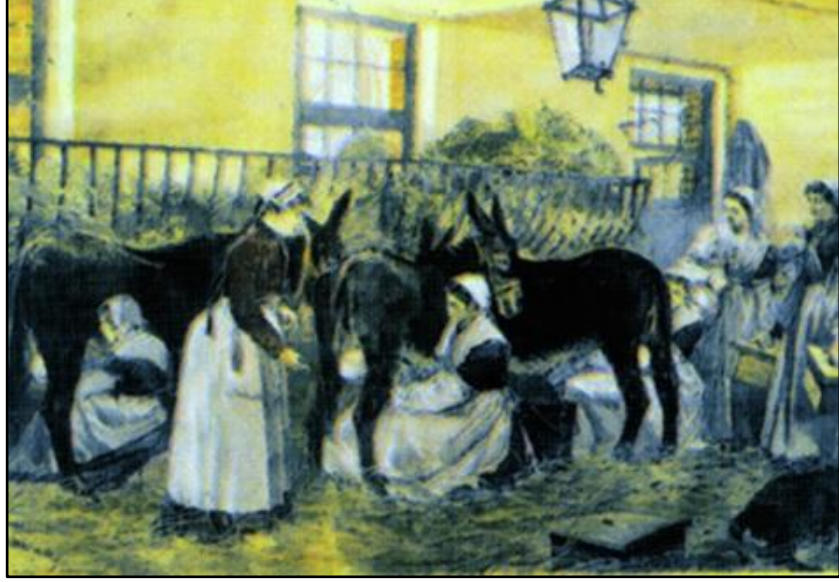
- Tıbbın babası olarak bilinen Hipokrat' ın (M, 460-370); eşek sütünü, karaciğer sorunları, enfeksiyon hastalıkları, ateş, dem, burun kanamaları ve zehirlenmeler gibi bir çok farklı hastalık için hastalarınareete olarak önerdiği bildirilmiştir (Hippocrates 1843)

- Antik Mısır kraliçesi Kleopatra'nın (M. 51-30), vücudunun güzelliğini ve gençliğini korumak için eşek sütü banyoları yaptığı anlatılmaktadır (Bidasolo 2012). Hatta Legend kitaplarında, Kleopatra' nın banyo yapmak ve gerekli süt miktarını sağlamak için 700'den fazla eeğe sahip olduğunu bildirmiştir (Pliny 1855).

- Roma imparatoru Nero'nun (MS.30-65) ikinci ei Poppaea Sabina'nın kırııklarını gidermek, yüzünün beyazlığını korumak için eşek sütünün kullandığı Pliny yazılarında bildirmiştir. Hatta seyahatlerinde eekleri yanında götürüp süt banyoları yaptığı ifade edilmiştir (Pliny 1855).

- Napolyon' un kız kardeşi, Pauline Bonaparte'de (1780-1825), cildinin sağlığı için eşek sütünün kullandığı bildirilmiştir (http://en.wikipedia.org/wiki/Donkey_milk, 2014)

- Georges-Louis Leclerc, Comte de Buffon (1707-1788), Histoire Naturelle kitabında eşek sütünün yararlarını ve bazı hastalıklar için özel bir ilaç olduğunu ve Yunanlılar tarafından muhafaza edildiğini bildirmiştir (Leclerc 1835).



Şekil 2.2. Eşek sütünün toplanması, St Vincent de Paul Hastahanesi, Paris, XIX yüzyıl (Mariani 2009).

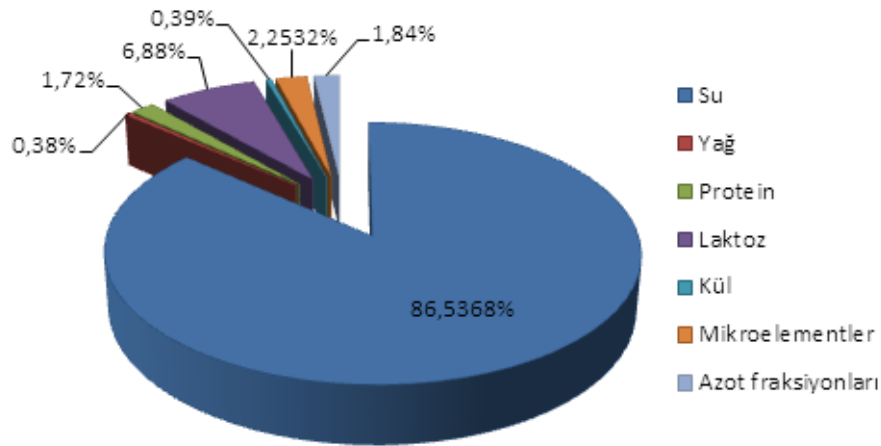
Eşek sütünün yararları hakkındaki ilk bilimsel çalışmalardan birinin 1887 Fransa'daki Paris Saint-Vincent de Paul hastanesinde gerçekleştirildiği bildirilmiştir. Fransız Devleti terk edilmiş bebekler için hastahane insan sütü yerine çocukların beslenmesinde eşek sütü kullanılmış olup, bebeklerin eşek sütü ile beslenmeleri sonucu herhangi bir beslenme bozukluğu ortaya çıkmadığını aksine eşek sütünün kullanımı sonucunda daha sağlıklı ve güçlü olduklarını ifade edilmiştir (Mariani 2009).

Dolayısıyla, emzirmenin yetersiz olduğu durumlarda, yeni doğan bebeklerin veya süttten kesilen çocukların beslenmesi açısından alternatif bir gıda olarak değerlendirilen eşek sütü, bileşiminde yüksek oranda bulunan esansiyel yağ asitleri, laktoz, immünoglobülinler, laktoferrin ve lizozim gibi bileşenleri nedeniyle, besleyici ve sağlığa yararlı özelliklerinin dışında, yaşlanmayı geciktirici özelliğine bağlı olarak kozmetik ve bakım ürünlerinin üretimi için de uygun bir hammadde olarak bilinmektedir (Budak ve Gürsel 2012).

Son yıllarda, eşek sütüne karşı artan ilginin temel nedenlerinin başında; besleyici ve işlevsel niteliklerinin yanı sıra, kozmetik sektöründe yaşlanma karşıtı bir ürün olarak ve kanser tedavisinde de alternatif bir tedavi yöntemi olarak kullanılabileceğine inanılması gelmektedir. Bununla birlikte ülkemizde eşek sütüne dair yürütülmüş bir bilimsel çalışmaya rastlanmamıştır.

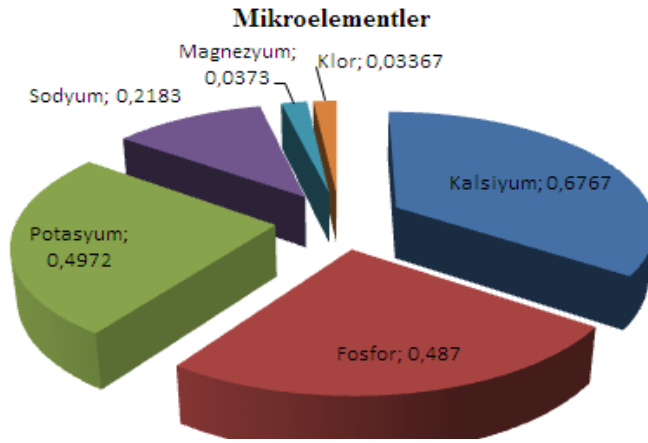
2.2. Eşek Sütünün İçeriği

1 litre eşek sütünün; 865,3 gr'ı su olup geriye kalan kısımları 68,8 gr laktoz (süt şekeri), 22,5 gr'ı mikroelement, 3,8 gr'ı yağ ve 3,9 gr'ı azot fraksiyonlarından oluşur. Yüzdeler olarak ifade edecek olursak; 100 gram yağsız eşek sütünün yaklaşık olarak % 86,53'ü su, % 6,88'i laktoz, % 1,84'ü kül, % 2,25'i mikroelementler, % 0,38 yağ, % 0,39'u azot fraksiyonlarını oluşturmaktadır (Şekil 2.3).



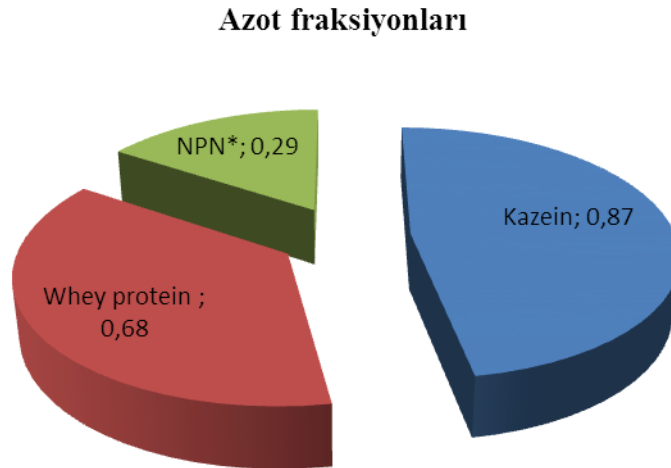
Şekil 2.3. Eşek sütünün içeriği (Ek 1' deki verilerden yararlanılarak hazırlanmıştır)

100 gram yağsız eşek sütünde 2,25 gr mikroelement bulunur. Bu mikroelementlerin % 0,4972'sini potasyum, % 0,487'sini fosfor, % 0,6767'sini kalsiyum, % 0,2183'ünü sodyum, % 0,0373'ünü magnezyum, % 0,03367'sini klor elementleri oluşturur (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Eşek sütünün içeriğindeki mikroelementler (Ek 1’ deki verilerden yararlanılarak hazırlanmıştır).

100 gram yağsız eşek sütü 1,84 gram azot fraksiyonları içermektedir. Azot fraksiyonlarının % 0,68’i whey proteinlerinden, % 0,87’si kazein proteinlerinden, % 0,29’u NPN*(Azotsuz proteinler)’ den oluşmaktadır (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Eşek sütünün içeriğindeki azot fraksiyonları (Ek 1’ deki verilerden yararlanılarak hazırlanmıştır).

2.3. Eşek Sütü ve Yapısı

Eşek sütü diğer memelilerin sütü ile karşılaştırıldığında daha az çalışılmış ve incelenmiştir, ancak son yıllarda bileşimi insan sütüne çok benzediği ortaya çıkan eşek sütü daha fazla oranda ilgi çekmeye başlamıştır. Eşek sütü son zamanlarda besin kompozisyonu, özellikle protein içeriği bakımından insan sütüne çok benzer olduğundan eşek sütünün bebek mamaları için iyi bir alternatif olarak kabul edilmiştir (Andrea ve ark. 2009, Mao ve ark. 2009). Ayrıca eşek sütünün de yapılan çalışmalarda anti-tümör ve anti-proliferatif aktivite gösterdiği, ayrıca çok güçlü bir anjiyotensin dönüştürücü enzim (ACE) aktivitesine sahip olduğu belirlenmiştir. Eşek sütünün oksidan sistemlere karşı özelliği ile ilgili olarak keçi sütünden sonra ikinci sırada yer aldığı bildirilmiştir (Simos ve ark. 2011).

Atgiller familyasına dâhil hayvanların sütlerinin sağlık açısından faydaları, yukarıda belirtilen bağışıklık uyarıcı kapasiteden kaynaklanmakta olup, son yıllardaki çalışmalar bu sütlerin anti-inflamatuar bir etkiye de sahip olabileceklerini göstermiştir (Jirillo ve ark. 2010). Yüksek miktarda lizozim ve laktoz içermesi nedeniyle, probiyotik laktobasillerin gelişmesinde iyi bir aracı olduğu kanıtlandığından, eşek sütünün aynı zamanda probiyotik amaçlarla kullanılabilmesi açıklanmaktadır. Eşek sütü, alerji, sindirim sistemi rahatsızlıkları ve kalp-damar hastalıklarının tedavisinde kullanılabilir potansiyel bir kaynak olarak nitelendirilmektedir (Coppola ve ark. 2002).

Eşek sütünde bulunan epidermal gelişme faktörü, emzirmenin ilk dört ayında bebeğin bağırsak mukozasının gelişimini ve iyileştirilmesini arttırıcı bir etkiye sahiptir (Muraro ve ark. 2002, Tafaro ve ark. 2007, Scafizzari ve ark. 2009) tarafından eşeklerin hem kolostrumunun hem de normal sütlerinin immünolojik aktivite gösterdiği ileri sürülerek, insanlarda bağışıklık sistemiyle bağlantılı hastalıkların tedavisinde ve damar tıkanıklığının önlenmesinde yararlı olabilecekleri kaydedilmektedir.

Eşek sütünün bir çok olumlu etkisi olduğu bir çok makalede belirtilmiş olup, bu etkileri içerisinde bulundurduğu zengin içeriğinden kaynaklandığı bildirilmiştir. Eşek sütü yapı

olarak bol miktarda laktoz, mineral madde, doymamış yağ asitleri ve düşük miktarda yağ, protein içermektedir. Çizelge 2.1' de eşek sütünün genel bileşeni inek, insan, kısrak sütler ile karşılaştırılmalı olarak verilmiştir.

Çizelge 2.1. Eşek sütünün bileşenleri ve diğer türleri ile karşılaştırılması (g/kg)(Nikkah 2011).

İçerik	Eşek	Anne	Kısrak	İnek
Yağ, g	11	40	13	40
Protein, g	17	10	21	34
Laktoz, g	66	65	64	48
Mineraller	4	2	4	7
Katı maddeleri (Yağ içermez), g	92	73	93	90
Toplam madde, g	102	121	105	133
Kolesterol, mg	22	200	45	140
Kalsiyum, mg	680	320	890	1200
Fosfor, mg	500	140	560	930
Doymuş yağ asitleri, g	4	18	4	24
Tekli doymuş yağ asitleri, g	2	16	3	11
Çoklu doymuş yağ asitleri, g	4	5	5	1

2.3.1 Eşek Sütünün Mineral İçeriği

Eşek sütünün mineral içeriği (4gr/kg) insan sütünden (2gr/kg) daha fazladır. Özellikle kalsiyum ve fosfor oranı anne sütünden çok daha fazladır. Yaşlanmayı geciktirici maddeler arasında sayılan minerallerin eşek sütünde fazla oluşu eşek sütünün kozmetik ürünler olarak kullanılmasının bir sebebini teşkil edebilir.

2.3.2. Eşek sütünün Laktoz İçeriği

Karbonhidrat olarak sütün içerisinde bulunan tek şeker laktozdur. Sütün santrifüjlendikten sonra üstte kalan yağın alınması sonucu yağsız süt elde edilir. Elde edilen yağsız sütün pH'nının düşürülmesiyle dibe çöken maddeler kazein proteinleri

olarak adlandırılır. Geriye kalan sıvı kısım peynir altı suyu proteindir. Peynir altı suyu içerisinde yüksek miktarda bulunan bir şekerdir (Tarakçı ve Küçüköner, 2005). Laktoz eşek sütünün içerisinde anne sütü ile yakın oranda bulunurken, inek sütü ile karşılaştırıldığında çok daha yüksektir (Çizelge 2.2). Yüksek laktoz içeriği sütün tatlı olmasından sorumludur. Laktozun, diğer şekerler kadar kolay parçalanmaya uğramaması çocuk beslenmesinde önemlidir. Laktozun daha az bağırsak bozuklukları olmasına yardım ettiği ve vitaminlerin (B vitaminleri) sentezine teşvik ettiği bildirilmiştir. Asitlerle laktozun hidrolizi sakkarozunkinden çok daha yavaş seyrettiği için sindirimi de yavaş olduğu belirtilmiştir. Bu şekilde bağırsakta daha uzun zaman kalabilen laktoz, hafif asidik bir ortam oluşturmaktadır ve bakteri gelişimini engellemektedir (Barth ve Behnke 1997). Bu ortam bebeğin kemik mineralizasyonu için gerekli olan kalsiyumun bağırsakta emilimini kolaylaştırmaktadır (Schaafsma 2003).

Çizelge 2.2. Eşek, anne, kısırak ve inek sütlerinin ortalama bileşeni (%)

	Eşek ^a	Anne ^b	Kısırak ^c	İnek ^d
Toplam kuru madde	8,84	12,4	10,2	12,7
Yağ	0,38	3,8	1,21	3,7
Laktoz	6,88	7	6,37	4,8
Protein	1,72	0,94	2,14	3,4
Kül	0,39	0,2	0,42	0,7

^aChiavari ve ark, (2005)

^bSalimei ve ark, (2004)

^cMiranda ve ark, (2004)

^dMalacarneve ark, (2002)

2.3.3. Eşek Sütünün Yağ İçeriği

İnsan beslenmesinde yüksek enerji kaynağı olarak kullanılan yağlar içermiş oldukları doymuş ve doymamış yağ asitleri ile bir çok önemli görevler icra etmektedirler. Eşek sütünün yağ içeriği (11 gr/kg), inek sütünün yağ içeriğinden (40 gr/kg) daha düşük orandadır (Çizelge 2.2). Eşek sütü insan sütü ile karşılaştırıldığında daha düşük yağ içermesi nedeniyle daha az enerji değerine sahiptir (Budak ve Gürsel 2012). Süt yağında, doymuş yağ asitleri insan ve inek sütünde fazla bulunurken eşek sütündeki miktarı düşüktür. Doymuş yağ asitlerinin sütte fazla olması beslenmede vücutta kilo alınımı gibi çeşitli problemlere sebep olabilir.

Yağ asitleri kompozisyonunda (Çizelge 2.3), doymamış yağ asitleri, özellikle de omega 3 ve omega 6 gibi çoklu doymamış yağ asitlerinin anne sütündekine yakın bir düzey göstermesi, eşek sütünü anne sütüyle kıyaslanabilebilir bir niteliğe sahip kılmaktadır (Gastaldi ve ark. 2010). Hücre zarının yapısına katılan ve dayanıklılığını sağlayan kolestrol miktarı anne sütüne ve inek sütüne oranla çok düşüktür.

Çizelge 2.3. Eşek, anne, kısrak ve inek sütlerinin yağ asitleri kompozisyonu (g/100 g yağ)

	Eşek ^a	Anne ^a	Kısrak ^b	İnek ^b
Doymuş yağ asitleri	58.3	39,5	55.8	70,8
Bütirik asit(C4:0)	0,57	0,01	0.2	3,77
Kaproik asit(C6:0)	1,16	0,02	0.4	2,32
Kaprilik asit(C8:0)	2,33	0,1	3.3	1,39
Kaprik asit (C10:0)	6,58	0,15	8.6	3,34
Laurik asit (C12:0)	6,99	6,54	9.3	4,15
Miristik asit (C14:0)	6,67	5,38	8.5	11,3
Palmitik asit (C16:0)	26,3	20	23.8	28,8
Stearik asit (C18:0)	2,68	6,15	1.7	14
Doymamış yağ asitleri	42,7	60,5	44.2	29,2
Oleik asit (C18:1)	17	32,6	19.1	20,7
Linoleik asit (C18:2)	9,5	12,2	9.6	2,44
α -linolenik asit(C18:3)	7,25	1,14	9.4	0,48
Omega 3 yağ asitleri	9.52 ^c	1,82	10.50	0.78 ^a
Omega 6 yağ asitleri	12.54 ^c	12,89	9.78	2.84 ^a

^aGastaldi ve ark (2010)

^bMalacarne ve ark (2002)

^cSalimei ve Fantuz (2012)

Yağ asitleri kompozisyonunda linolenik asitlerin yüksek düzeyde bulunması eşek sütünün kolesterol düşürücü bir aktiviteye sahip olmasını sağlamakta ve bu da beslenmede eşek sütüne yer verilmesi için önemli bir neden olarak görülmektedir (Uniacke-Lowe 2010). Günlük olarak tüketilen besinlere linoleik asit eklenmesi bazı alerjik dermatitlerin tedavisinde faydalı görülmekte, dolayısıyla bu tip rahatsızlığı olan çocuklar için eşek sütünün iyi bir kaynak olabileceği belirtilmektedir (Horrobin 2000).

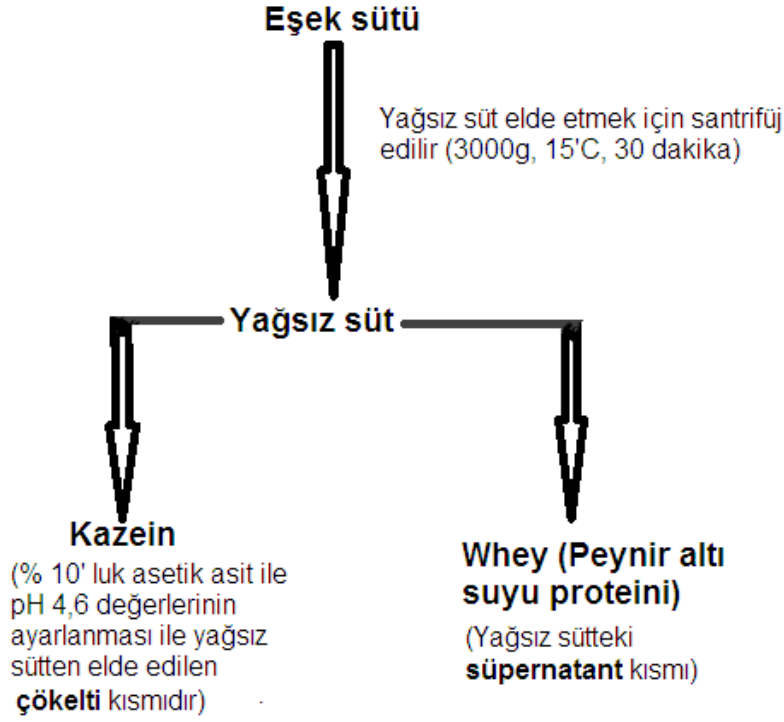
Çoklu doymamış yağ asitlerinden omega 3 ve omega 6 yağlarının beyin ve zekâ gelişiminde önemli etkiye sahip olduğu bilinmektedir (Blasi ve ark. 2008, Salimei ve ark. 2012). Eşek sütü bu yağlar bakımından zengin olduğu için, özellikle çocukların zihinsel gelişiminde ve yaşlılar için fonksiyonel gıda olarak kullanılabilceği bazı araştırmacılar tarafından da kabul edilmektedir (Salimei ve ark. 2012, Martemucci ve Alessandro 2012)

2.3.4. Eşek Sütünün Protein İçeriği

Süt ve süt ürünlerinden üretilen ürünler proteince zengin bileşiklerdir. Ancak eşek sütünün protein bileşimi inek sütünden önemli ölçüde düşüktür. Eşek sütünün toplam protein içeriği insan ve kısrak sütüne oldukça benzerdir (Şekil 2.2). Protein içeriğinin düşük olması böbrekte çözünen aşırı yük miktarını önlediği bildirilmektedir (Herrouin ve ark. 2000). Ayrıca inek sütünde bulunan çeşitli proteinlerin (kazein ve β -laktoglobülin) alerjiye yol açtığı ve çocuk ölümlerine neden olduğu bilinmektedir. İnek sütü proteini, 0-3 yaş arası çocukların yaklaşık % 3'ünü etkileyen en yaygın gıda alerjenidir (Salimei ve ark. 2012). Anne sütüne yakın bileşimi ve fonksiyonel özellikleri nedeniyle eşek sütü, alerjisi olan bireylerde rahatlıkla kullanılabilmesi açısından önem taşımaktadır. Bu sebeple eşek sütünün iyi bir alternatif süt kaynağı olduğu görülmektedir. Ayrıca sütte bulunan süt proteinleri genel olarak peyniraltı suyu proteinleri (Whey) ve Kazein olmak üzere iki alt gruptan oluşmaktadır.

Kazein

Süt içindeki baskın olan bir grup proteine verilen addır. Kazeinler, insan sütü de dahil olmak üzere hayvansal sütlerin tümünde mevcuttur. Eşek sütündeki proteinlerin neredeyse % 47' si kazeindir. Kazein elde etmek için, süte asit eklenirse veya asit-üreten bakterinin süt içinde üremesine izin verilirse pH düşecektir. Normal pH'ı 6.5-6.7 civarında olan sütün asitliği artırıldığı zaman birçok ürün meydana geldiği görülmüştür. Eşek sütünü kazein ve whey proteinlerine ayırmak için % 10' luk asetik asit ile pH'ı 4.5 düşürülüp, 3000 g de 10 dakika santrifüj edilmesi gerektiği bildirilmiştir (Şekil 2.6) (Vincetti ve ark. 2007).



Şekil 2.6. Eşek sütünün fraksiyonlarına ayrılması

Eşek Sütündeki Peyniraltı Suyu (Whey) Proteinleri

Süt içinde birçok protein bulunmaktadır, bu proteinlerin ekonomik değeri olduğu kadar, sağlık açısından da çok değerli olanları mevcuttur. Özellikle sütün içerisindeki peynir altı suyu proteinlerinin içeriğinde; yüksek oranda laktoz, mineral maddeler, vitaminler, protein ve az miktarda da süt yağını içermektedir. Proteinler kimyasal veya fiziksel özelliklerine ve biyolojik işlevlerine göre çeşitli şekillerde sınıflandırılabilirler. Geleneksel olarak süt proteinleri kazeinler, peyniraltı suyu proteinleri ve azınlık proteinler olarak sınıflandırılırlar. Yağ kürelerinin yüzeyinde bulunan proteinler ve enzimler azınlık proteinler grubuna aittir (Karagözlü ve Bayerer 2004). Peyniraltı suyu proteini, sütün peynire dönüştürülmesi sırasında, pıhtının ayrılmasından sonra geride kalan yeşilimsi-sarı renkteki sıvı kısımdır. Fransızca'da "Lactoserum", İngilizcede "Whey", Almandada "Molke" olarak adlandırılır (Yerlikaya ve ark. 2010).

Son yıllarda, bazı hastalık modellerinde yapılan çalışmalarda süt serumu proteinlerinin farklı yollardan koruyucu etkilere sahip olduğu gösterilmiştir. Özellikle peyniraltı suyu proteinleri (Whey) ile ilgili çalışmaların sayısında son derece artış

olmuştur ve antioksidan etkileri ön plana çıkmaya başlamıştır (Yılmaz ve Ertuğrul 2011). Whey proteini sığınlarda kolestrol düşürücü etkisi olduğu bildirilmiş, laktoferrin ve glikomakropeptidlerin antimikrobiyal aktivitesi rapor edilmiştir. Glikoprotein yapıda olan glikomakropeptidler ile laktoferrin ve laktoperoksidazın oldukça ilginç biyolojik aktiviteleri olduğu öne sürülmektedir. Laktoferrin, antiviral, antimikrobiyal ve immünomodülatör ve antioksidan aktivitelere; laktoperoksidaz ise anti-bakteriyel aktiviteye sahiptir. B-laktoglobülin diğer özellikleri yanında anti-hipertansif, anti-kanser, hipokolesterolemik, opioidlerjik ve antimikrobiyal etkiler de dâhil olmak üzere artan sayıda birçok biyolojik aktivite göstermektedir (Çizelge2.5) (Korhonen 1998).

Peyniraltı suyu proteinleriyle beslenen sığınlarda, kimyasallar tarafından induklenmiş meme tümörlerinde, çeşitlilik yönünden azalma gözlenmiştir Bir diğer çalışmada, dimetilbenzaldehit (DMBA) ile induklenmiş meme tümörü olan sığınlarda süt serumu proteinlerinin yaşa bağlı tümör gelişimini geciktirdiği belirtilmektedir (Gervais 1989).

Toplam serum proteini eşek sütünde, inek sütünde ise kazein proteini yüksektir. Eşek sütünün peyniraltı suyunda bulunan lizozim ve laktoferrin proteinleri diğer memeli sütlerine göre daha çok miktarda bulunmaktadır (Çizelge 2.4). Bu özellikler eşek sütünün bakteri yoğunluğunun düşük olmasını nedenini yansıtmaktadır. Çizelge 2.4'de eşek, anne, inek ve kısrak sütlerindeki kazein ve serum proteinlerinin miktarları karşılaştırmalı olarak verilmiştir.

Çizelge 2.4. Eşek, anne, kısrak ve inek sütlerinin kazein ve serum proteini içerikleri (g/kg)

	Eşek ^a	Anne ^a	Kısrak ^b	İnek ^b
Toplam kazein	6.60 ^a	3.7	13.56	26.0
α s1-kazein	-	1.18	2.4	10.7
α s2-kazein	-	-	0.2	2.8
β -kazein	-	6.48	10.66	8.6
k-kazein	-	(<%15)	0.71 ^d	3.1
γ -kazein	-	-	-	0.8

Toplam serum proteini	7.50 ^a	7.6	8,37	6.3
β -laktoglobülin	3.75 ^a	-----	2.55	3.2
α -laktalbümin	1.80 ^a	1.60 ^e	2.37	1.2
Serum albümini	0.62 ^a	0.75	0.37	0.4
İmmüoglobülinler	1.15 ^a	1.82	1.63	0.80
Lizozim	1.00 ^a	0.30	0.87	izmiklarda ^b
Laktoferrin	2.10 ^b	1.66	0.58	0.10

^aVincenzetti ve ark. (2008)

^bMalacarne ve ark. (2002)

^cUniacke-Lowe ve ark. (2010)

^dSalimei ve ark. (2004)

^eMiranda ve ark. (2004)

Süt proteinlerinin her biri farklı moleküler ağırlıkta ve sağlık için önemli olan minör ve majör proteinler olarak adlandırılır. Major süt proteinleri, β -laktoglobülin, α -laktalbümin, serum albümin, immüoglobülinleri ve glikomakropeptiddir. Minor proteinler ise, laktoperoksidaz, laktoferrin, mikroglobülin, lizozim, insülin benzeri büyüme faktörü (IGF), γ -globülinler ve diğer birkaç küçük proteindir (Fox 1992).

Protein	Biyolojik aktivite
Kazeinler	İyon taşıyıcı (Ca, PO ₄ , Fe, Zn,Cu) Biyoaktif peptid öncüsü
B-Laktoglobülin	Retinol taşıyıcısı Yağ asidi bağlayıcısı Antioksidan
α -laktalbümin	Laktoz sentezi Ca taşıyıcısı İmmünomodülasyon Anti-karsinojenik
İmmüoglobülinler	İmmün koruma
Glikomakropeptid	Bifido bakteri büyümesi İmmünomodülasyon Anti-viral
Laktoferrin	Anti-mikrobiyal Yara iyileşmesi Anti-viral Antioksidan Antikorsinojenik Antitoksin Antienflamatuar Antitrombotik İmmünomodülasyon Fe Emilimi
Laktoperoksidaz	Antimikrobiyal Yara iyileşmesi
Lizozim	Antimikrobiyal Yara iyileşmesi Laktoferrin ile sinerjistik etki İmmüoglobülinler ile sinerjistik etki

Çizelge 2.5. Çeşitli proteinlerin aktiviteleri (Korhonen 1998).

Eşek sütündeki peyniraltı suyu proteinleri;

1. α -laktalbümin

Anne ve inek sütlerinde α -laktalbüminin 2 genetik varyantı, eşek sütünde ise 3 genetik varyantı bulunmaktadır. Üç tür süt arasında α -laktalbümin primer yapısı yalnızca birkaç aminoasit yönünden farklılık göstermektedir (Salimei 2004). α -laktalbümin kalsiyum bağlayan bir proteindir; kalsiyum emilimini artırır ve lizin, lösin, treonin, triptofan ve sistein bakımından zengin bir kaynaktır (Yalçın 2006). Ayrıca, siklooksijenaz-2 inhibisyonu (COX-2) ve fosfolipaz A2 tarafından uygulanan anti-inflamatuar aktiviteye sahip olduğu gözlenmiştir. Anne sütündeki α -laktalbümine yakın bir değere sahiptir (Çizelge 2.4).



Şekil 2.7. α -Laktalbüminin yapısı (Acharya 1991)

2. β -laktoglobülin

İnek sütündeki başlıca serum proteinlerinden olup, midede proteolitik enzimlerle parçalanmaya karşı çok dirençli olduğu için β -laktoglobülinin çocuklarda alerjiye yol açtığı söylenmiştir (Monti 2007, Vincenzetti ve ark. 2008).

İnsan sütünde β -laktoglobülin yoktur (Chatterton 2004, Miranda 2004). Eşek sütünde ise, β -laktoglobülinin üç genetik varyantı mevcuttur ve inek sütündeki β -laktoglobülinin aksine sindirim enzimleri ile daha fazla düzeyde parçalanabilmektedir. Eşek sütünün β -laktoglobülin içeriği inek sütüne göre daha düşüktür. Bu durum eşek sütünün hipoalerjenik özelliği ile ilgili olduğu açıklanmıştır (Bordonaro 2011). Ayrıca, inek sütünden farklı olarak β -laktoglobülinin yapısında sülfidril yer almaması eşek sütünü ısıyla denatürasyona karşı dayanıklı hale getirmektedir (Civardi 2002).

3. Lizozim

Anne sütü ile beslenen çocuklarda enfeksiyonlarla mücadelede lizozimin önemli rol oynadığı ayrıca yüksek lizozim içeriğinin düşük bakteri konsantrasyonuna sebep olduğu bildirilmiştir (Salimei ve ark. 2004). Ayrıca lizozimin bir hasarlı doku içine nötrofil göçünü sınırlayabildiği ve bir anti-inflamatuar ajan olarak görev yaptığı belirtilmiştir (İbrahim ve Aoki. 2003).

Lizozim, bakteriyal hücre duvarlarındaki mukopolisakkarit bağlarının hidrolizini katalize ettiği için, doğal antimikrobiyal olarak kabul görmektedir (Malacarne 2002). Önceki çalışmalar eşek sütündeki lizozim enzimin anti-inflamatuar ve anti-mikrobiyal aktiviteye katkıda bulunabileceğini göstermiştir (Salimei ve ark. 2004). Bu enzim, immünoglobülinleri, laktoferrin ve laktoperoksidazla birlikte bebeğin sindirim sisteminde ortaya çıkabilecek enfeksiyonları azaltan bir işlev görebilmektedir (Chiavari 2005).

Hem sindirim faaliyeti sırasında ortaya çıkan peptitler hem de bileşiminde yer alan lizozim ve laktoferrin gibi diğer doğal inhibitör maddeler eşek sütünün önemli bir antimikrobiyal madde işlevi görmesini sağlamaktadır (Baldi ve ark. 2005, Guo ve ark. 2007, Vincenzetti ve ark. 2008, Tidona ve ark. 2011).

4. Laktoperoksidaz

Sütte mikropların üremesini engelleyen koruyucu madde olarak görev yapan bir peyniraltı suyu proteindir. Özellikle diş macunlarında, ağız çalkalama gibi ağız sağlığı ile ilgili ürünlerde diş cürümesinin engellenmesinde kullanılmaktadır. (German ve ark. 2001). Laktoperoksidaz enzimi hidrojen peroksit ve tiyosiyonat (SCN) iyonu varlığında hipothiocyanate sentezini (OSCN-) sağlayarak antimikrobiyal aktiveden sorumlu bir bileşik oluşturur (Lønnerdal 1985).

5. Laktoferrin

Eşek sütünde bol miktarda bulunan bu proteinin bir çok biyolojik aktivitelerden sorumlu olduğu rapor edilmiştir (Şekil 2.4). Laktoferin, mikroorganizmaların büyümesini engelleyen mukoza alanlarında, inflamasyon önleyici ve antimikrobiyal aktivitesi bulunmaktadır. İmmün sistemin düzenlenmesinde yararlı biyofonksiyonel özelliklere sahip olan eşek sütünün, özellikle çocuklar, yaşlılar ve iyileşme döneminde olan hastalarda boğaz sağlığı bakımından yararlı etkileri bulunduğu bildirilmektedir (Whang ve ark. 2000).

6. Immunoglobülinler

Antikor olarak görev yapan immünoglobülinler B-lenfositlerinin değişimi ile oluşan plazma hücreleri tarafından sentezlenirler. Birbirlerinden farklı IgA, IgG, IgM, IgD ve IgEolarak isimlendirirler. Bu immünoglobulinlerin enfeksiyonu önleyici ve vücut hücrelerini koruyucu etkileri olduğu bildirilmiştir (Smithers 1996).

7. Serum albümin

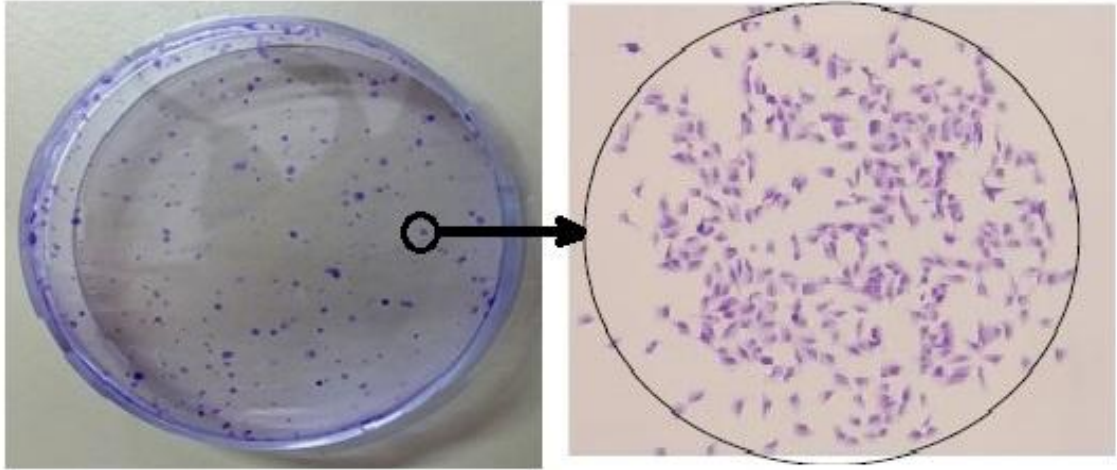
Serbest radikallerin yakalanmasında ve organizmada zararlı bileşiklerin etkisiz hale getirilmesinde görev yapan glutatyonun karaciğerde sentezini artırdığı tespit edilmiştir. Ayrıca kanda çözünmeyen yağ asitlerinin taşınmasından sorumludur (German ve ark. 2001)

2.4. Sitotoksite Test Yöntemleri

Uygulanan materyalin hücrenin yaşamına olan etkisi, canlı sistemlerine uyumluluğu belirleyici etkindir. Sitotoksikite moleküler olaylar sonucu çeşitli makromoleküler sentezlenmesinin engellenmesi ve buna bağlı olarak hücrenin fonksiyonlarında ve yapısında belirgin hasarlar meydana gelmesi olarak tanımlanır (Aldridge 1993, Murray 2007).

2.4.1. Klonojenik Test

Klonojenik veya koloni oluşum testi in-vitro koşullarda tek bir hücrenin bir koloni oluşturma potansiyeline dayalı, hücresel hayatta kalım ölçüsüdür. Böyle bir ölçümde koloni tek bir hücrenin bölünmesiyle oluşmuş en az 50 hücrelik bir kitledir (Şekil 2.8). Klonojenik test popülasyondaki her bir hücrenin bölünebilme yeteneğini test etmek için kullanılır (Franken ve ark. 2006). İyonize radyasyon veya çeşitli sitotoksik ajanların etkilerini belirlemek amacıyla bu ajanlara ait çeşitli konsantrasyon uygulamaları sonrası oluşan hücresel yıkımın tolere derecesinin tespiti temel hedefdir (Muller ve ark., 2011).



Şekil 2.8. Klonojenik test sonucu oluşan kolonilerin petri ve mikroskopik görüntüsü

Klonojenik test, bir hücrenin geniş bir koloni ya da klon oluşturacak şekilde üreme kabiliyetini korumasına ve süresiz olarak proliferasyon olabilmeye dayanmaktadır. Bu şekilde üreyen hücrelere klonojenik hücreler denilmektedir (Fabre ve ark. 2011). Ekilen

hücrelerden sadece bir fraksiyonu koloni oluşturabilme yeteneğini koruyabilecektir. Hücrelerin uygun miktarlardaki ekimleri sonrası istenilen ajan ile dozlama yapılarak inkübasyon gerçekleştirilir. Petride oluşan koloniler fikse edilerek kristal viyole ile boyanır. Boyanan koloniler sterio mikroskop veya çıplak gözle sayılır. Hayatta kalım eğrisi çizilerek incelenen veriler yorumlanır.

Klonojenik hücrelerden hayatta kalmış DNA ve protein sentezi gibi canlılık faaliyetlerini koruyabilen hatta bölünebilen hücrelerden bazıları belirlenen sürede yeterli proliferasyon gerçekleştiremediğinden koloni oluşturamazlar ve ölü olarak nitelendirilirler. Bu nedenle koloni sayımı yapılırken en az 50 hücre içeren koloniler sayılmaktadır (Prasad ve ark. 2011). Potansiyel olarak uygun koşullarda belirli sayıda ekilen her bir hücreden bir koloni oluşması idealdir. Fakat büyüme ortamının optimal olarak hazırlanamaması ve hatalı hücre sayımı gibi bazı nedenlerden dolayı çoğu zaman bu ideal sayıya ulaşılamaz.

2.4.2.WST-1 yöntemi

WST-1 yöntemiyle bir hücre topluluğundaki canlı hücrelerin oranı kolorimetrik yöntemle kantitatif olarak saptanabilmektedir. Bu yöntem, canlı hücrelerde mitokondrinin WST-1 ajanının tetrazolium halkasını parçalayabilmesi ilkesine dayanmaktadır. Bu reaksiyon hassas bir mitokondrial enzim olan süksinat dehidrogenaz enziminin aktivitesine bağlıdır. Tetrazolium halkasının parçalanması sonucu soluk sarı renkli WST-1 ajanı sarı formazan ürününe dönüşmektedir (Şekil 9-10).

Sonuç olarak; canlı ve mitokondri fonksiyonu bozulmamış hücreler sarı renkte boyanmakta, ölü ya da mitokondri fonksiyonu bozulmuş hücreler boyanmamaktadır. Bu yöntem hücrelerin WST-1 ajanı inkübasyonu, çökelmiş reaksiyon ürününün çözünür hale getirilmesi, reaksiyon ürününün kolorimetrik olarak ölçümü ve canlılığın yüzde olarak hesaplanması basamaklarından oluşmaktadır.

2.4.3. XTT yöntemi

XTT ayracında bulunan tetrazolium halkası canlı hücre mitokondrilerinde bulunan dehidrogenaz enzimlerince parçalanarak kırmızı renkli formazan kristalleri oluşturur. XTT yöntemi, MTT ile kıyaslandığında daha güvenilir bir yöntemdir. MTT kullanıldığında çözünmeyen formazan kristalleri oluşmakta ve bunu ölçmek için bazı çözücüler kullanarak çözmek gerekmektedir. XTT de ise direkt çözünen kristaller oluşmakta ve test daha kısa sürede sonuçlanmaktadır. XTT radyoaktif izotoplar içermediğinden MTT gibi toksik değildir ve daha güvenli bir testtir (Scudiero 1988, Weislow ve ark. 1989, Roehm ve ark. 1991)

2.5. Genotoksisite Test Yöntemleri

Genetik toksisite ya da genotoksisite; çekirdek, kromozom ve DNA yapısında meydana gelen DNA eklentileri, DNA kırıkları, gen mutasyonları, kromozom anormallikleri ve anöploidi gibi hasarları kapsayan genel bir terimdir. DNA veya genomun kopyasının çıkarılmasını sağlayan enzimlerle etkileşime giren ve mutasyona neden olan genotoksik maddelerin DNA'da hasar meydana getirmesi veya bazı değişimlere yol açması ise genotoksik etki olarak tanımlanmaktadır (Choy 2001, Mortelmans ve ark. 2004, Şekerçioğlu ve Şekerçioğlu 2011).

DNA molekülünde mutasyonlara yol açan ajanlar ya da mutajenler, DNA üzerindeki etkilerini ya doğrudan, ya da genomik bilgilere göre sentezlenen proteinlere bağlanarak dolaylı yolla gösterirler. DNA hasarında rol alan kilit moleküllerde ve yollardaki bozukluklar ise doku hasarı, yaşlanma, kanser, infertilite ve bazı genetik ve multifaktoryal hastalıklara yol açmaktadır (Şekerçioğlu ve Şekerçioğlu 2011).

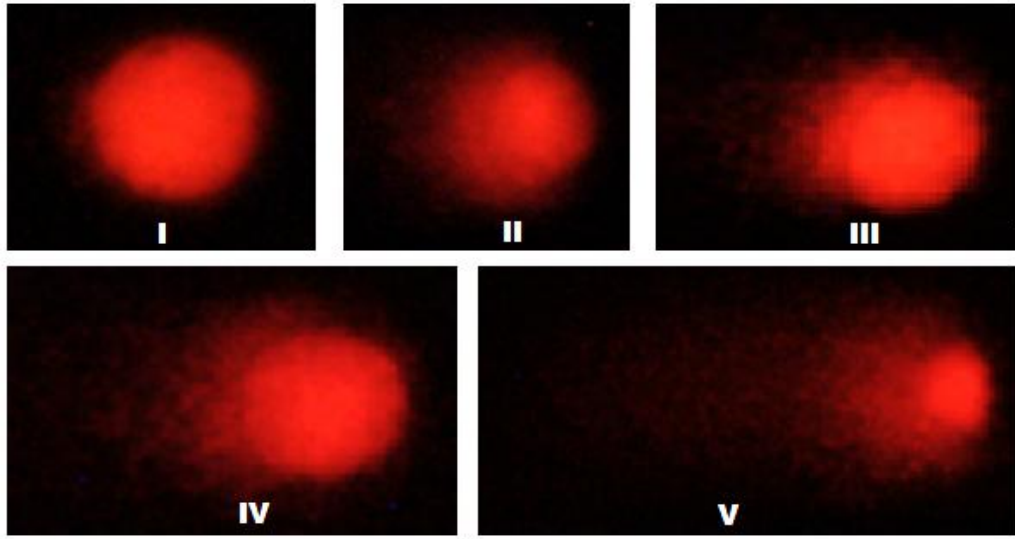
2.5.1. Comet Testi (Tek hücre jel elektroforez yöntemi)

Comet analiz yöntemi olarak da bilinen tek hücre jel elektroforez yöntemi uygulama alanı, güvenilirliği ve uygulaması kolay olması bakımından kimyasal ve fiziksel etmenlerin canlılar üzerinde yol açtığı genotoksik ve sitotoksik etkilerin bir göstergesi olan **DNA hasar seviyelerinin ölçülmesini sağlayan** önemli bir metottur (Dikilitaş ve Koçyiğit 2010). Tek hücre jel elektroforez (Single cell gel electrophoresis) tekniği olarak da adlandırılan Comet yöntemi, DNA kırıklarının tayini prensibine dayanan bu yöntem, pek çok fiziksel ve kimyasal mutajenin özellikle insanlarda yol açtığı DNA hasarının tayininde, kanser hastalarında DNA hasarının derecesini ve tamirini tespit etmede, bazı kalıtsal hastalıkların prenatal tanısında, bazı hastalıklarda artmış DNA hasarını belirlemede kullanılan bir biyoizlem testidir. Ayrıca genotoksinleri ilk etki bölgelerde değerlendirebilmesi, hemen hemen tüm ökaryotik hücrelere uygulanabilmesi, düşük hasar seviyesini ölçebilmesi, az sayıda hücre örneği gerektirdiği için hızlı, basit ve ucuz bir yöntem olması gibi avantajlarından dolayı geniş bir kullanım alanına sahiptir (Östling ve ark. 1984, Şekerçioğlu ve Şekerçioğlu 2011).

Comet yöntemi, alkali pH'da farklı molekül ağırlıklarına ve farklı elektrik yüküne sahip DNA moleküllerinin elektriksel alanda farklı uzaklığa göç etmeleri esasına dayanmaktadır. Bu yöntemde göre, hücreler veya çekirdekçikler öncelikle agarozaya yerleştirilmekte, daha sonra lizis ve alkali elektroforez tamponunda yürütme ve nötralizasyon işlemlerinden geçirilerek floresan boya ile boyanmaktadır. Floresan mikroskop ile incelenen preparatlarda zarar görmemiş DNA'lar comet (kuyruk) oluşturmazken, hasar görmüş DNA moleküllerindeki fragmentler farklı moleküler ağırlıklarına ve farklı elektrik yüklerine sahip olacaklarından elektriksel alanda farklı hızlarda hareket ederek çekirdekten dışarı doğru göç etmekte ve kuyruklu yıldız görünümü oluşturmaktadırlar. Hasarlanan hücre DNA'ları hasarın derecesine göre Şekil 2.10' da görüldüğü gibi beş kategoride değerlendirilmektedir. Bu görünüm nedeniyle bu tekniğe "Comet" adı verilmiştir (Östling ve ark. 1984, Martin ve ark. 1993, Singh ve ark. 1988, Çelik ve ark. 2005).



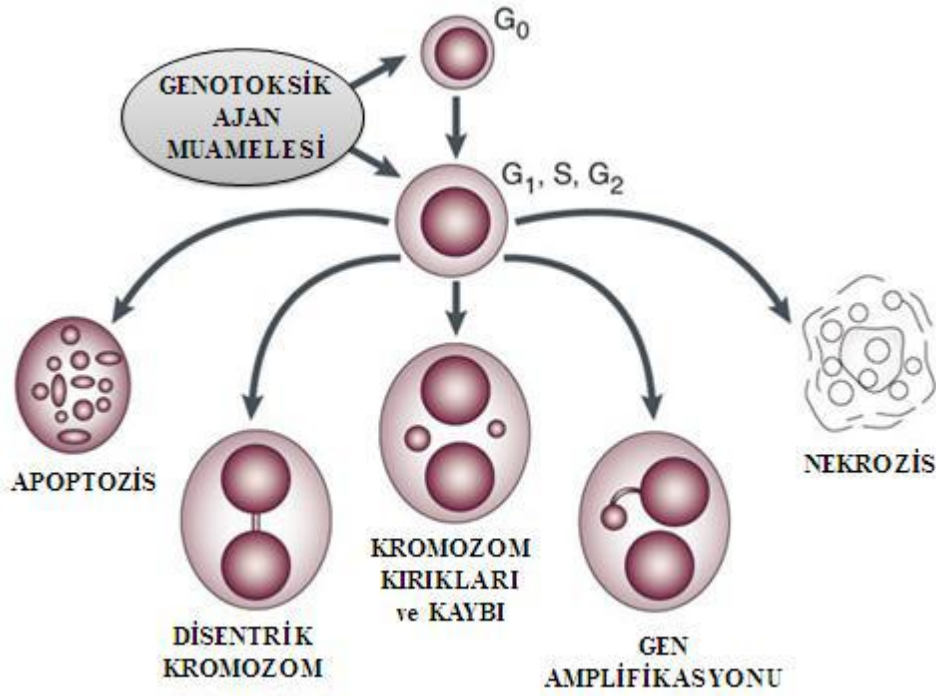
Şekil 2.9. Komet testinin aşamaları



Şekil 2.10. Komet yöntemi ile agaroz jel üzerinde elektroforetik ortamda negatif kutuptan pozitif kutuba (soldan sağa) doğru göç eden farklı seviyelerde hasara uğramış DNA'ların görüntüleri. I- Hasarsız DNA II-Çok az hasarlanmış DNA III-Az hasarlanmış DNA IV-hasarlanmış DNA V- Tümüyle hasarlanmış DNA

2.5.2.Mikronükleus Testi

MN'ler genellikle hücre siklusunu kontrol eden genlerdeki eksiklerden, iç ipliğindeki hatalardan, kinetokordan veya mitotik aygıtın diğer parçalarından ve kromozomal hasarlardan kaynaklanan, hücrenin mitoz bölünmesi sırasında ortaya çıkan, esas çekirdeğe dahil olmayan, tam kromozom veya asentrik kromozom fragmanlarından köken alan oluşumlardır (Şekil 2.11). MN sayısındaki artış, çeşitli ajanların hücrelerde oluşturduğu kromozom düzensizliklerinin ve somatik hücrelerdeki genomik kararsızlığın indirekt göstergesi olarak değerlendirilmektedir. Yapılan çalışmalarda, çeşitli fiziksel ve kimyasal ajanlara maruz kalan insanlarda, kanser ve genomik düzensizlik ile karakterize edilen çeşitli hastalıklarda MN frekansının önemli ölçüde yüksek olduğu bulunmuştur (Kirsch-Volders ve ark. 1997, Choy 2001, Demirel ve Zamani 2002).



Şekil 2.11. Genotoksik ajan muamelesi akabinde, sitokinezi bloklanmış hücre kültürlerinde ortaya çıkabilecek çeşitli sonuçlar (Fenech 2007).

MN testi, mitoz ile oluşan tüm hücre tipleri üzerinde in-vitro ve in-vivo olarak uygulanabilmesi nedeniyle genetik toksikoloji araştırmalarında kullanılan yaygın bir test haline gelmiştir (Kirsch-Volders ve ark. 1997, Stopper ve Müler 1997).

3. MATERYAL VE METOT

Tez çalışmamız **Uludağ Üniversitesi Biyoloji Bölümü** bünyesinde bulunan **Hücre Kültürü ve Genetik Toksikoloji** laboratuvarında yürütülmüştür. Bu çalışmamızda, sağlıklı (BEAS-2B) akciğer epteli ve kanserli (A549) akciğer hücre hatları kullanılmıştır. Eşek sütünün bu hücre hatları üzerindeki etkilerini belirleme basamakları aşağıdaki gibidir;

3.1. Etken maddemiz olan eşek sütü tozunun temin edilmesi

3.2. Deneyimizde kullanılan cihazlar ve sarf malzemeleri.

3.3. Sağlıklı (BEAS-2B) akciğer ve Kanserli (A549) akciğer hücre kültürü çalışmaları

3.4. Klonojenik Hücre Canlılığıbelirleme testi

3.5. WST–1 Hücre Canlılığı belirleme testi

3.6. XTT Hücre Canlılığı belirleme testi

3.7. Tek Hücre Jel Elektroforez (COMET) yöntemi

3.8. Mikronükleus (MN) yöntemi

3.1. Etken maddemiz olan eşek sütü tozunun temin edilmesi

Çalışmamızda doğal bir madde olan, **Portekiz' in** Miranda bölgesinde yaşayan eşeklerden (*Equus asinus*) elde edilen eşek sütü tozu kullanılmıştır. Bu madde Portekiz' in Naturasin firmasından 0,5 kg eşek sütü tozu kargo aracılığıyla temin edilmiştir. Bu özel paketle ışık geçirmeyen, vakumlanmış ve iki yıl geçerliği olan, oda sıcaklığında saklanabilir haldedir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Naturasin firması tarafından gönderilen eşek sütü tozu paketi

3.2. Deneyimizde kullanılan cihaz ve sarf malzemeleri

Çalışmada kullanılan cihazlar Çizelge 3,1’de, sarf malzemelerine ilişkin bilgiler ise Çizelge 3.2’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1.Çalışmalarda kullanılan cihazlar

Ekipman	Marka/Model
Floresan/Işık mikroskop	NIKON – ECLIPSE 80i
Görüntüleme sistemi	KAMERAM
-80°C derin dondurucu	ELCOLD
Distile su cihazı	MP MINI PURE – DEST UP
Su banyosu	NÜVEBATH NBS
Ultrasonik su banyosu	BANDELIN – RK 31
Isıtmalı manyetik karıştırıcı	MTOPS – MS300HS
Hassas terazi (Max: 220/82 g)	SHIMADZU – AUW220D
Kaba Terazi (Max: 2000 g)	RADWAG – WTB2000
Azot tankı INT.	CRYOGENICS – IC 20R
pH metre	HANNA – HI 221
-20°C derin dondurucu	ALASKA – ADF 06 V
+4°C cam kapaklı buzdolabı	HORECA – HRS 375 CHL
Soğutmalı santrifüj	SIGMA – 2-16PK
Etüv (37°C ve %5 CO ₂ takviyeli)	BINDER – CB 150
Class II steril kabin (laminar flow)	THERMO
Inverted mikroskop	SOIF
Elisa Reader	
Fluoroskan Ascent	FL 2.6 THERMO
Hücre sayım cihazı	ROCHE

Çizelge 3.2. Çalışmalarda kullanılan sarf malzemeler

Sarf Malzeme	Firma / Katalog No
96 kuyucuklu lamalar	BD BIOCOAT – LOT:87501
Steril 15 ml lik tüpler	FALCON
Steril flasklar (T-12,5, T-25 ve T-75)	FALCON
Steril petriyerler (60 ve 100 mm'lik)	FALCON
Etil alkol	AY-KİM
Metanol	MERCK 1060082500
Asetik asit	MERCK 1000632511
Potasyum	MERCK 1049361000
Sitokalsin-B	SIGMA C6762
Giemsa	MERCK 1092040500
Kristal viyole	MERCK 1159400100
Paraformaldehit	SIGMA – ALDRICH P6148
Triton X-100	GERBU 2000
Bovine Serum Albumin	SIGMA- ALDRICH A9418
RPMI-1640 (500 ml)	LONZA 12-702F
DPBS (500 ml)	SIGMA 08537
Penisilin – Streptomisin	THERMO SH40003.12
Sodyum piruvat (100 ml)	THERMO SH30239.01
L-Glutamin (100 ml)	SIGMA – ALDRICH G7513
Fetal Bovine Serum	SIGMA – ALDRICH F9665
% 0,25 Tripsin-EDTA	SIGMA – ALDRICH T4049
DPBS/Modified	THERMO SH30028.02

3.3. Sağlıklı (BEAS-2B) akciğer epiteli ve kanserli (A549) akciğer hücre kültürü çalışmalarını

- a) Hücrelerin yüzeye tutunmaları ve çoğalmaları için inkübe edilmesi
- b) Hücrelerin pasajlanması (Kültürleri devam ettirmek ve yeni bir deney seti kurmak için)
- c) Toma lamında veya cedex cihazında sayım yapılması
- d) Hücrelerin 96 kuyucuklu kültür kaplarına ekimi

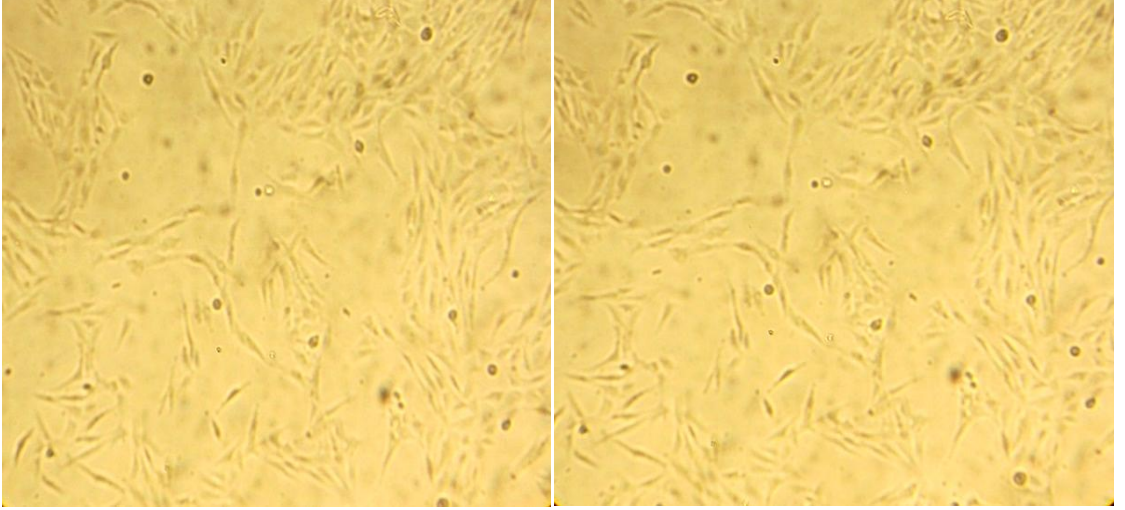
Çalışmamızda sağlıklı (BEAS-2B) insan akciğer epitel hücreleri ve kanserli (A549) akciğer hücre kültürleri kullanılmıştır. Bu hücrelerin kültürü ve ekimi için % 10 fetal sığır serumu (FBS), %1 PSA (Penisilin, Streptomisin, Anfeterosin) ve 1g/L glukoz içeren RPMI besiyeri kullanılmıştır. Besiyerlerinin çoğunda asidik ortamda sarıya bazık ortamda ise mora dönen PH indikaötrü bulunur. Fazlasıyla asidik veya bazık ortam kontaminasyonu, ölü veya fazla büyümüş kültürü belirlenebilir. Bulanık besiyeri ortamı ise kontaminasyonu aşırı büyümüş kültürü işaret eder.

Besiyerinin hazırlanması: 500ml'lik RPMI-1640 üzerine; 60 ml Fetal Bovine Serum (FBS), 6 ml Penisilin – Streptomisin, 6 ml Sodyum piruvat, 3 ml L-Glutamin eklenir ve besiyeri şişesi 1-2 kez hafifçe çalkalanarak deneylerde kullanılacak besiyeri hazırlanmış olur. Çalışmamız bittikten sonra ağzı sıkıca parafin ile kapatılarak +4⁰C ye kaldırılır. Tekrar çalışılacaksa su banyosuna konularak sıcaklığının dengelenmesi sonucu kullanılmasına dikkat edilir.

Tripsin çözeltisinin hazırlanması: 80 ml' lik PBS' e 20 ml' lik Tripsin eklenir.

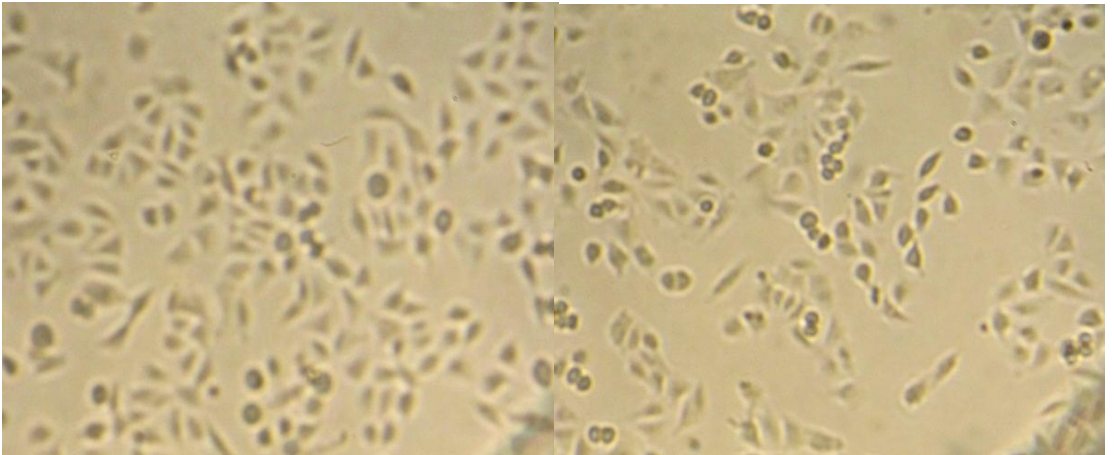
a) Hücrelerin yüzeye tutunmaları ve çoğalmaları için inkübe edilmesi

Sağlıklı (BEAS-2B) insan akciğer epiteli ve kanserli (A549) akciğer hücrekültürleri kullanılmıştır. Bu hücrelerin kültürü ve ekimi için % 10 fetal sığır serumu (FBS), %1 PSA (Penisilin, Streptomisin, Anfeterosin) ve 1g/L glikoz RPMI-1680 besiyerinde beslenmiş ve 37 °C' lik %5 CO₂ içeren ortamda büyütülmüştür.



Şekil 3.2. BEAS-2B akciğer hücre hatları (Farklı görünüm,10x40).

Işık mikroskobu altında özellikle sağlıklı (BEAS-2B) akciğer epitel hücrelerinin görünümü çubuğu; kanserli (A549) akciğer hücrelerinin görünümü ise çubuktan ziyade daireye andırmaktadır (Şekil 3.2 ve Şekil 3.3).



Şekil 3.3. A549 kanserli akciğer hücre hatları (Farklı görünüm, 10x40).

Akciğer kanseri hücrelerinin bölünme hızları, sağlıklı akciğer hücrelerine göre daha yüksektir. Ekim yaparken bunun dikkate alınması gerekir.

b) Hücrelerin pasajlanması (Kültürleri devam ettirmek ve yeni bir deney seti kurmak için)

Kültürleri devam ettirmek veya yeni bir deney seti kurmak için dolu flaskların yenilenmesi olayına pasajlama denir. Hücreler kültür kabı içinde bulunma durumlarına göre üçe ayrılırlar: Bunlar **ankoraj bağımlı hücreler, ankoraj bağımsız hücreler** ve her iki şekilde de kültüre edilebilen hücrelerdir. Ankoraj bağımlı hücreler kültür kabının yüzeylerine tutunarak büyüdüklerinden, hücre çoğalması için bir yüzeye ihtiyaç duyarlar. Ankoraj bağımsız hücreler kültür kabının yüzeyine tutunmazlar. Çünkü büyüme için yüzeye ihtiyaç duymazlar. Her iki şekilde kültüre edilen hücreler ise besiyeri içerisinde hem yüzerek hem de kültür kabının yüzeylerine tutunarak büyürler.

BEAS-2B ve A549 hücre hatları tek katmanlı büyüyen ankoraj bağımlı hücre hatlarıdır. Bu yüzden hücrelerin elde edilebilmesi için yapışık olduğu yüzeylerden ayrılmaları gerekmektedir. Bu işlem protein sindiren bir enzim olan **tripsinle** gerçekleştirilir. Bu işleme **tripsinizasyon** adı verilir. Hücreler bu işleme tabi tutulmadan önce RPMI besiyerinde, 37°C'de %5'lik CO₂' li ortamda kültüre edilmiş ve inkübatörde büyümeye bırakılmıştır.

c) Toma lamında veya cedex cihazında sayım yapılması

Toma Lamında Hücre Sayımı

-Santrifüj işleminden sonra **süpernant (sıvı kısım)** pellete (**hücreler**) kadar aspire edilir. Kalan kısım hafifçe vurularak süspanse edilir. Toma lamında hücre sayımı yapılabilmesi için 100 µl hücre ile 100 µl trypan-blue boyası aynı ependorfa koyularak süspanse edilir. Bu karışımın 50 µl'si toma lamına "H" şeklinde yayılır Trypan Blue'nun çalışma prensibine baktığımızda; ölü hücreler bu boyayı atamayıp, maviye boyanırken; canlı hücreler bu boyayı atabildikleri için maviye boyanmazlar. Bu sayede sayım işlemi yaparken ölü hücreleri fark eder ve onları saymayız)

-Süspansiyonu yapılan hücre ve trypan blue karışımı toma lamına yayıldıktan sonra üzeri lam ile kapatılır.

-Sayım işlemleri binoküler ışık mikroskobu altında gerçekleştirilmiştir. Sayım işlemi gerçekleştirilirken; önce şekildeki görüntüdeki ortadaki karenin içerisinde bulunan hücreler analog numara sayacı vasıtasıyla sayılmış, ortalaması alınmış ve önce 2, daha sonra da 10.000 ile çarpılmıştır. Sayılan hücrelerle ne kadar miktarda hücreyi besiyere ekeceğimiz hesaplanır. Sayımı yapılan hücre hatları uygun konsantrasyonlarda Klonojenik, WST-1 ve XTT analizleri için hazır hale getirilmiştir.

Cedex Cihazında Hücre Sayımı

-Santrifüj işleminden sonra süpernant(sıvı kısım) pellete(hücreler) kadar aspire edilir. Kalan kısım hafifçe vurularak süspansiyon edilir. Cedex cihazında hücre sayımı yapılabilmesi için 50 µl hücre ile 50 µl trypan-blue boyası aynı ependorfa koyularak süspansiyon edilir. Bu karışımın 10 µl'si A ve B olacak şekilde 4'erden toplam 8 bölmeli olan Cedex lamına yayılır.

-Hücreler cedex lamına yayıldıktan sonra Cedex cihazına yerleştirilir. Yerleştirme yapılırken hücrelerin A veya B bölmesinin kaçınca sırasına ekim yapılmışsa o sıranın cedex lamında okutulmasına dikkat edilir. Okutulma bilgisayarda Cedex okutma programı ile yapılır. Programda çıkan sonuca göre canlı hücre sayısı kullanılarak hesaplama yapılır.

-Cedex cihazı otomatik olarak hesaplama yapmaktadır. Cedex cihazında toma lamına göre hücre sayımının yapılması kolaydır. Canlı ve ölü hücre miktarlarını, yüzdelikleri verir. Toma lamında sayım yapmak uzun ve zahmetli bir iştir. Fakat toma lamı cedex lamına göre ucuzdur.

-Cedex cihazında 1000 µl' deki hücre sayısını vermektedir. Canlılık testlerinde 96 kuyucukların her birine 5000 hücre atabilmemiz için kaç µl çekeceğimiz hesaplanır.

El sayım cihazı (Scepter TM) ile Hücre Sayımı:

El sayım cihazı ile sayım yapmak çok kolaydır, canlı ve ölü sayısını ayırtmadan toplam hücre sayısını verir. Bir ependorfa 900 µl PBS ve 100 µl tüplerdeki pellet hücre

kısmındanaktarılr. El sayım cihazına ölçüm analiz çubuğu takılarak tüpün içine daldırılır. Cihazın ekranında 1ml' deki (1000 µl) hücre sayısını verir.

d) Hücrelerin 96 kuyucuklu kültür kaplarına ekimi

Sayımın ardından elde edilen hücreler kuyucuk başına 5000 hücre olacak şekilde 96 kuyucuklu kültür kaplarına ekilmiştir. Ekim işlemlerinin tamamı güvenlik kabini içerisinde gerçekleştirilmiştir. Bu işlemlerde ependorf marka çok kanallı küvet ve serolojik pipetler kullanılmıştır.

e) Canlılık testlerinde kullanılacak olan dozların ve kontrol gruplarının belirlenmesi

Yapılan canlılık testlerinde BEAS-2B sağlıklı akciğer epiteli ve A549 kanserli akciğer hücre hatlarına aynı doz miktarları denenmiştir. Bu deneydeki amacımız sağlıklı hücrelere zarar vermeyen dozun kanserli hücreler üzerindeki etkisini kıyaslamaktır. Mümkün olduğunca sağlıklı hücreleri öldürmeyecek ama kanserli hücreleri ölüme sürükleyecek dozun tespiti önemlidir. Bu doğrultuda hücre kültürlerine uygulanan madde konsantrasyonları **Çizelge 3.3.** belirtilmiştir.

Çizelge 3.3. Eşek sütünün çeşitli konsantrasyonları

Dozlar	Eşek sütü çözeltilisinden eklenen miktarlar (200 µl besiyeri için)
Büyüme Kontrol	-----
Solvent Kontrol	20 ul dH ₂ O
100 µg/mL	0,612 µl
200 µg/mL	1.25 µl
400 µg/mL	2.5 µl
800 µg/mL	5 µl
1600 µg/mL	10 µl
3200 µg/mL	20 µl
Pozitif Kontrol (H ₂ O ₂)	4 µl

Eşek sütü çözeltisinin hazırlanması

0.16 gr eşek sütü tozu tartılıp 5ml distile suda çözülür. Stok çözeltiden belirlenen eşek sütü dozları Çizelge 3.3' te gösterilmiştir.

Kontrol Grupları

Deneylelerimizde negatif, pozitif ve solvent olmak üzere üç tip kontrol grubu kullanılmıştır.

Büyüme Kontrol (BK): Herhangi bir ajana maruz kalmayan kontrol grubudur. Sadece besiyerine hücre ekimi yapılmıştır. Deneyle sonuçlarımızın yorumlanması ölüm ve yaşam oranlarının belirlenmesi büyüme kontrol ile kıyaslanacaktır.

Solvent Kontrol (SK): Solvent (distile su) kontrol grubumuzda final konsantrasyonu % 0,05'i geçmeyecek şekilde distile su kullanılmıştır. Kullandığımız çözücünün su olması nedeniyle hücrelere öldürücü etkisi olup olmadığını göstermek için kullanılmıştır.

Pozitif Kontrol (PK): Genotoksisite karşılaştırmalarında ve test sistemlerinin doğru çalışıp çalışmadığını kontrol amacıyla 0,05 M'lık hidrojen peroksit (H_2O_2) kullanılmıştır. Hidrojen peroksit çözeltisinin hazırlanışı; %35'lik ana stok çözeltisinden 6,318 μ l H_2O_2 üzerine 4993,682 μ l saf su eklenerek 5 ml'lik yeni stok çözeltisi hazırlanmış olur.

96 kuyucuklara ekim ve dozlama planı hazırlanmıştır. Bu planda birinci sırada yer alan BLK yani sadece besiyeri konulmuştur. BLK' nın konulmasının amacı plaka okuyucusu ELİSA cihazında besiyerinin absorbans değerlerini ne kadar etkilediğini bulup sonuçlarımızın ortalamasından çıkarmaktır. Böylece daha doğru sonuçlar ortaya çıkmış olacaktır.

3.4. Klonojenik Hücre Canlılığı Belirleme Testi

Bir toksik etkiye maruz bırakılan hücrelerin tutunma ve bölünebilme yeteneklerini belirlenmesine dayanan klonojenik test, sitotoksik etkilerin belirlenmesinde sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. Klonojenik test sonucunda elde edilen bulgular bize genotoksikite testlerinde kullanılacak konsantrasyonların/dozların belirlenmesi esnasında yön göstermektedir (Munshi ve ark. 2005). Klonojenik testte **% 75'den daha yüksek** hayatta kalış oranı veren (düşük sitotoksik) konsantrasyonlar seçilmektedir.

Testin prosedürü;

-T75 flaksta bulunan ve flakşı doldurmuş hücreler pasajlanır. Flakslardan toplanan hücreler +4°C'de 2500 rpm'da santrifüj edilir. Santrifüjden sonra hücrelerin supernatant kısmı atılır ve geriye pellet yani hücreler kalır. Peletteki toplam hücre sayısı hücre sayım cihazında ya da hemositometrede hesaplanır. Deney gruplarımızın sayısı kadar T25 flaska istediğimiz sayıda hücre ekeriz.

-Yukarıda bulduğumuz konsantrasyonlar 200 µl'lik 96 kuyucuklulara göre hesaplanmıştır. Klonojenik deneyimizde dozlama yapacağımız konsantrasyonlar 5 ml'lik petrilere göre hesaplanmıştır.

-Ekimden birkaç gün sonra hücreler T25 flakşın yüzeyini doldurmaya başladığı zaman hücreler belirlenen eşek sütü dozlarıyla dozlanır.

-Dozlamadan 24 saat sonra flakslardaki hücreler pasajlanır ve falkonlara alınır. Santrifüjden sonra supernatant kısmı atılır ve kalan pelletten canlı hücre sayımı yapılır. Canlı hücre sayımı için 50 µl tripan mavisi ve 50 µl hücre karıştırılarak hücre sayım cihazı lamına 10 µl aktarılır ve cihazda okuma yaptırılır.

-Okuma sonucuna göre her 60 mm'lik petriye 500 canlı hücre aktarılacak şekilde hesaplama yapılır. Çalışılan hücre hattına göre kullanılan petri büyüklüğü değişebilmektedir. 100 mm'lik petrilere kullanılıyor ise petrilere 1000 canlı hücre ekilir. Her doz için 4 petri kullanılır.

-Petri'lere hücre aktarımından sonra petri'ler 37°C %5'lik inkübatöre kaldırılır. Petri'ler hergün inverted mikroskopta kontrol edilir ve koloniler belli büyüklüğe ulaştıktan sonra petri'ler boyanır.

-Koloni olarak sayım yapılabilmesi için her kolonide en az 50 hücre bulunması gerekmektedir.

Kristal viyole boyasının hazırlanması

0,5 g toz halindeki kristal viyole boyası 20 ml metanol içerisinde çözdürülerek 100 ml'ye tamamlanmıştır.

-Boyama için petri'ler PBS ile yıkanır, etanolla 5 dk fikse edilir ve kristal viyole ile de 5 dk boyanır, böylece her bir petrideki koloniler sayılarak elde edilen sonuçlar tablo haline getirilmiştir.

Aşağıda belirtilen formül ile yüzde yaşayabilirlik oranı (sitotoksosite) hesaplanmıştır.

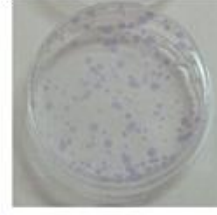
$$\text{Yaşayabilirlik (sitotoksosite)} = \frac{\text{Petri başıma düşen ortalama koloni sayısı}}{\text{Kontrol petrisindeki ortalama koloni sayısı}} \times 100$$

1 HÜCRELERİN FLASKLARA EKİMİ



Doz sayımız kadar (BK,SK,PK dahil) flaska hücre ekimi yapılır.

7 KOLONİ SAYIMI



Her petri için en az 50 hücre içeren kolonilerin sayısı yapılır.

2 DOZLAMANIN YAPILMASI



Flasklarda yeterli yoğunluğa ulaşmış (%80 ve üzeri konfluent) test edilecek ajanlarla dozlanması ve belirli bir süre inkübasyonu

6 BOYAMA



Oluşan kolonilerin birleşecek kadar uzun süre inkübe edilmemesine dikkat edilir. Uygun süre inkübasyondan sonra petriler PBS ile yıkanır, mutlak etanol ile 5 dk fikse edilir ve kristal viyole boyası ile 5 dk boyanır.

3 CANLI HÜCRE SAYIMI



Elde edilen hücre süspansiyonundan canlı hücre sayısı yapılması

5 PETRİLERİN İNKÜBASYONU



Petrilerin yeterli süre inkübasyonu (hücre hattına göre 7-14 gün arası değişebilir)

4 PETRİLERE EKİM YAPILMASI



Hücre sayımı yapıldıktan sonra 60mm'lik petrilere 500 canlı hücre ekilmesi

Şekil 3.4. Klonojenik testin ayrıntılı basamakları

3.5. WST-1 Hücre Canlılığı Belirleme Testi

Yapacağımız bu ilk denemelerde amaç sağlıklı hücrelerde ölüme yol açan ve yarısını öldüren (IC₅₀) değerini bulmaktır. Aynı şekilde A549 kanserli hücre hatlarında da yarısını öldüren dozu bulduğumuzda BEAS-2B sağlıklı akciğer ve A549 kanserli akciğer hücre hatları arasındaki farkı görmüş olacağız. Bu iki değer bize eşek sütünün kanserli akciğer üzerindeki etkisini gösterecektir. Ayrıca A549 hücre hattında bulduğumuz IC₅₀ değerlerinin altındaki dozlar, Comet ve Mikronükleus testinde sağlıklı ve kanserli hücre hatlarında kullanacağımız dozları belirleyecektir.

Deneyimizin ayrıntılı basamakları şu şekildedir:

Hücre ekimi:

-Her kuyucuğa 5000 hücre ekimi yapılır.

-96 kuyucuklu kaplara ekimi yapılan hücreler 24 saat süreyle inkübatörde bekletilmiştir.

Dozlama:

-24 saat sonra hücre hatlarımız bulunduğu inkübatörden çıkartılmıştır. Besiyeri aspire edilerek, 20 0µl yeni besiyeri çok kanallı pipet yardımıyla eklenmiştir.

-Dozlama yapmadan önce hazırlanan eşek sütü çözeltisi deneye başlamadan önce hazırlanmış olup tablodaki değerlere göre dozlanmıştır. **5 µl** ve üzerindeki dozlardan dozlama yapılırken deney sonuçlarının etkilenmemesi için koyulan miktar kadar kuyucuklardan çekilir.

-96 kuyucuklunun alt ve üst sırasında boş kalan yerlere dH₂O (distile su) konulmuştur.

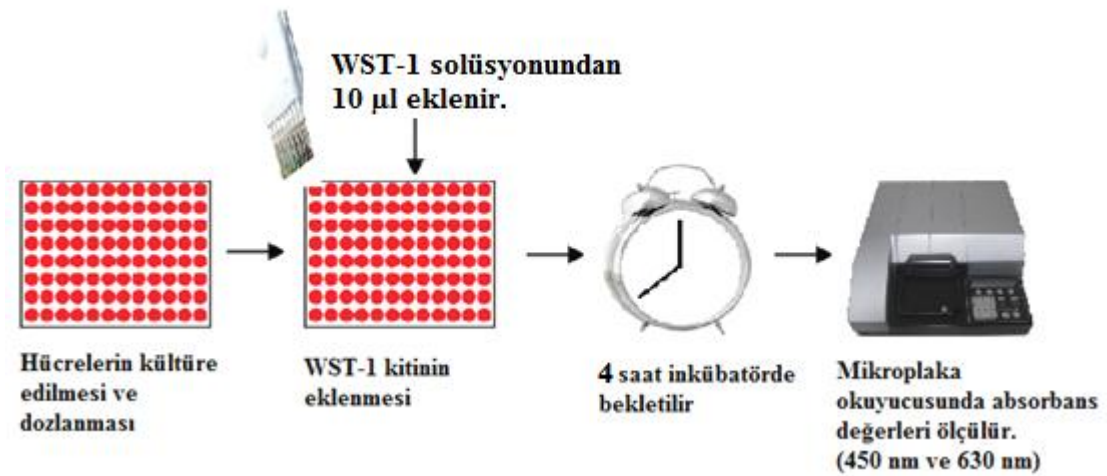
WST-1 kitinin hazırlanması;

-Dozlama yapıldıktan 24 saat sonra inkübatörden çıkarılan 96 kuyucukludaki RPMI besiyeri pipet yardımıyla aspire edilmiştir. PBS yıkama solüsyonu ile 100 µl koyularak yıkanmıştır. Bu sayede ölü hücreler uzaklaştırılmıştır. Besiyerleri rezervuara dökülerek çok kanallı pipet yardımıyla 100 µl RPMI besiyeri kuyucuklara eklenmiştir.

-Bu esnada -20°C den çıkartılan WST-1 solüsyonunun su banyosunda çözülmesi sağlanmıştır. Bu işlemleri yaparken WST-1 ayracı ışıktan etkilenebileceği için mümkün olduğunca ışık görmemelidir.

-**WST-1 kiti** doğrudan güvenlik kabininde her bir kuyucuğa **10 µl** olarak eklenmiştir. Kültür plakları %5 karbondioksitli nemli hava içeren karbondioksit inkübatöründe 37°C sıcaklıkta **4saat** süreyle tutulmuştur. WST-1 çözeltisi ışığa karşı duyarlı bir madde olduğundan ışıktan uzak tutulmuştur.

-96 kuyucuklular laboratuarda bulunan Biotek marka EL800 tipi ELISA sistem spektrofotometre mikroparka okuyucusuna konularak absorbans değerleri 450 nm dalga boyunda okutulmuştur. Referans dalga boyu olarak 630 nm dalga boyu kullanılmıştır. Canlılık oranı absorbans değerleri karşılaştırılarak incelenmiştir.



Şekil 3.5. WST-1 yönteminin aşamaları

IC₅₀ (Half maximal inhibitory concentration) değerin hesaplanması;

IC₅₀ değeri maksimum inhibisyonun % 50 sini oluşturan doz konsantrasyonudur. Başka bir ifade ile büyüme kontrolümüze göre hücrelerin yarısını öldüren dozu ifade eder. IC₅₀ değerin hesaplanmasında izlenecek yollar aşağıdaki Şekil 3.6' da gösterilmiştir.



Şekil 3.6. IC₅₀ değerin hesaplanması

1. Doz değerlerin ortalaması alınır ve bulunan ortalamadan besiyerinin (BLK) absorbans değerleri çıkartılır.
2. İnhibisyon hesaplaması yapılır. İnhibisyon hesaplaması yapmak için ilk doz değerimizin bulunduğu sütun ile inhibisyonun bulunduğu satır ile çakışan bölmenin üzerine tıklatılarak inhibisyon oranı bulunur.

$$\text{Formül} = \left(1 - \frac{\text{Dozun ortalama değeri}}{\text{Kontrol ortalaması}}\right) * 100$$

$$\text{Canlılık} = (100 - \text{İnhibisyon})$$

3. Bulunan inhibisyondan canlılık yüzdeleri belirlenir. Canlılık ile ilk dozumuzun çakıştığı bölmeye tıklanarak büyüme kontrolümüzün oranını 100 kabul ederek inhibisyon oranından çıkartılır.

4. Elde edilen verilerden grafik yapmak için herhangi bir satıra kullandığımız dozları, alt satıra ise bulduğumuz yüzde canlılık oranları yazılmalıdır. Dozlar ve canlılık oranları seçilerek ekle menüsünden dağılım grafiği oluşturulur. Çizilen grafiğin üzerine sağa tıklanarak eğim cizgisi ekle seçilir. Görüntülenen tablodan grafik üzerinde denklemi görüntüle (regresyon denklemi) ve grafik üzerinde R-kare değerini görüntüle seçilerek denklem görüntülenir.

Dağılım grafiğinde önemli olan iki değer IC_{50} ve R^2 (**belirlilik katsayısı ya da tanımlayıcılık katsayısı**) değerlerinin bulunması sağlanır. Böylece yukarıda grafikte görüldüğü gibi deney noktalarından geçen bir düz çizgi oluşturulur. İki değişken arasında belirli bir ilişki olduğunda, bu ilişki dağılım grafiğindeki noktalar arasından uygun doğru ile tanımlanabilir. Bu doğruya regresyon doğrusu denir ve matematiksel olarak bir denklem ile gösterilir. Bu denklemede regresyon denklemi denir. Regresyondenklemini yardımı ile bağımsız değişkene verilen herhangi bir değere karşı bağımlı değişkenin alacağı değer hesaplanır. İki değişken arasında tam bir ilişki varsa ($r = \pm 1$) dağılımındaki bütün noktalar regresyon doğrusu üzerine düşer. Böyle bir durumda iki değişken arasındaki ilişki ile uygunluk sağlar. Ancak, iki değişken arasındaki ilişki nadiren tam bir ilişkidir. Çoğu kez regresyon doğrusu bütün noktaların üzerinden geçmez ve dağılım yaklaşık olarak temsil edilir. **Regresyon analizi ile değişkenlerden birinin değişim göstermesi ile diğer değişkenin nasıl değişim gösterdiği bulunur.** Bir değişkeni etkileyen değişkenlere bağımsız değişkenler denir ve "x" ile gösterilir. Bağımsız değişkenlerden etkilenen değişkene ise bağımlı değişken denir ve "y" ile gösterilir (Sümbüllüoğlu ve Sümbüloğlu 2010).

Belirlilik katsayısı: R^2 ile gösterilir. Oluşturulan regresyon denkleminin ya da deneyimizin ne kadar önemli bir sonuç verdiğini belirleyen orandır. Belirlilik katsayısı aralığında değer alabilir. Belirlilik katsayısı $0 \leq R^2 \leq 1$ aralığında değerler alır. R^2 değeri 1'e ne derece yakın ise deneyimizin o derece iyi, sıfıra ne derece yakın ise deneyimizin o derece kötü bir tahminleyici olarak kabul edilir.

5. Regresyon denkleminin "y" yerine 50 yazılarak x değeri hesaplanır, yani IC_{50} değeri bulunur.

3.6. XTT Hücre Canlılığı Belirleme Testi

WST-1 testi ile bulduğumuz canlılık oranlarının doğruluğunu karşılaştırmak ve deneyimizin daha güvenilir sonuçlar vermesi için diğer bir hücre proliferasyon belirleme yöntemi olan XTT canlılık testi denenmiştir.

Hücre ekimi:

-Her kuyucuğa 5000 hücre ekimi yapılır.

-96 kuyucuklu kaplara ekimi yapılan hücreler 24 saat süreyle inkübatörde bekletilmiştir.

Dozlama:

-24 saat sonra hücre hatlarımız bulunduğu inkübatörden çıkartılmıştır. Besiyeri aspire edilerek, 200 µl yeni besiyeri çok kanallı pipet yardımıyla eklenmiştir.

-Dozlama yapmadan önce hazırlanan eşek sütü çözeltisi deneye başlamadan önce hazırlanmış olup tablodaki değerlere göre dozlanmıştır. **5 µl** ve üzerindeki dozlardan dozlama yapılırken deney sonuçlarının etkilenmemesi için koyulan miktar kadar kuyucuklardan çekilir.

-96 kuyucuklunun alt ve üst sırasında boş kalan yerlere dH₂O (distile su) konulmuştur.

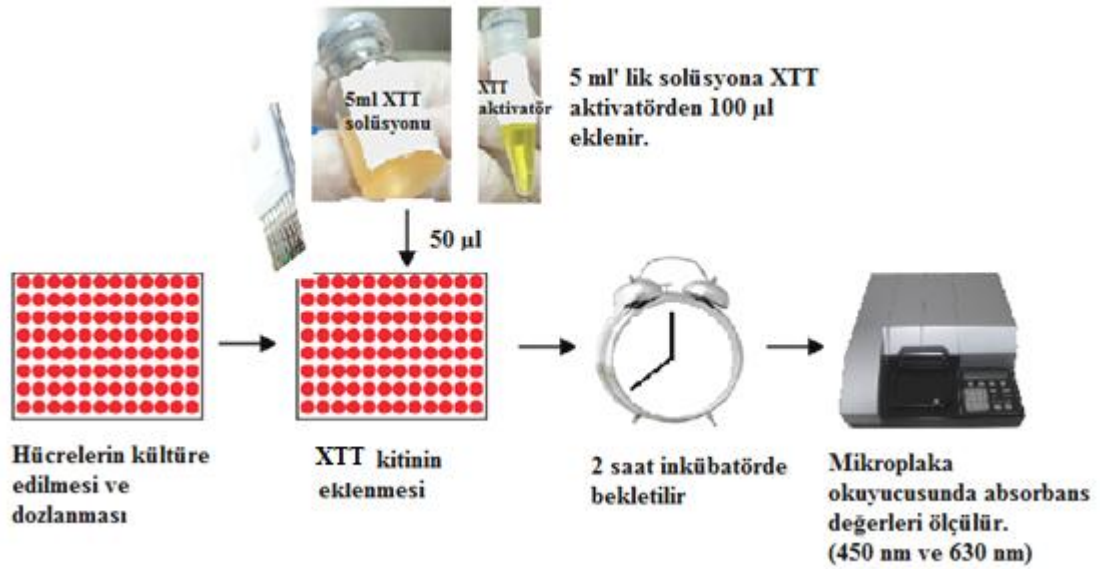
XTT kitinin hazırlanması:

-Dozlama yapıldıktan 24 saat sonra inkübatörden çıkarılan 96 kuyucuklulardaki RPMI besiyeri pipet yardımıyla aspire edilmiştir. PBS yıkama solüsyonundan 100 µl koyularak yıkanmıştır. Besiyerleri rezervuara dökülerek çok kanallı pipet yardımıyla 100 µl RPMI besiyeri kuyucuklara eklenmiştir.

--20 °C' den çıkartılan XTT solüsyonunun su banyosunda çözülmesi sağlanmıştır. XTT kiti içerisinde biri **5ml** olan büyük ajan ve diğeri aktivatör olan küçük ajandan oluşur. **5 ml** büyük ajan solüsyonuna XTT aktivatör B' den **100 µl** eklenmiştir. Hazırlanan XTT ayırıcından **50 µl** alınarak kuyucuklara eklenmiştir.

-Kültür plakları %5 karbondioksitli nemli hava içeren karbondioksit inkübatöründe 37°C sıcaklıkta **2 saat** süreyle tutulmuştur.

-Laboratuarda bulunan Biotek marka EL800 tipi ELISA sistem spektrofotometre mikrolaka okuyucusuna konularak absorbans değerleri 450 nm dalga boyunda okutulmuştur. Referans dalga boyu olarak 630 nm dalga boyu kullanılmıştır. Canlılık oranı absorbans değerleri karşılaştırılarak incelenmiştir.



Şekil 3.7. XTT yönteminin aşamaları

3.7. Tek Hücre Jel Elektroferez (Comet) yöntemi

Comet testinde kullanacağımız dozlar canlılık testleri sonucu belirlenen dozlara bakılarak belirlenmiştir. Özellikle sağlıklı (BEAS-2B) akciğer hücreleri ile yapılan denemeler sonucu canlılık oranı % 75 ve üzeri olan değerler seçilir. Bu testimizde ise 50 µg/mL,- 100 µg/mL- 200 µg/mL- 400 µg/mL dozları belirlenmiştir.

Bu testin yapılabilmesi için flaskların en az % **40-50** dolu olması gerekir. Onun için mikroskop altında flaskların yüzeyine tutunmuş BEAS-2B ve A549 hücreleri gözlenilmiştir. Ortamın soğuk ve karanlık (loş) olmasına özen gösterilmelidir. Çünkü ışıktan DNA' lar etkilenebilir.

Lamların hazırlanması ve normal Agar ile kaplama:

-Comet testinde deneye başlamadan bir gün önce DNA' ların tutunması için lamların agarla kaplanması gerekir. 0,75g normal melting agaroz 100 ml dH₂O'da çözülmüştür. Çözme işlemi sırasında ısıtmak amacıyla ısıtıcı ceketler kullanılmıştır. Balık atarak karıştırmaya gerek duyulmamıştır çünkü ısıtılınca agar kendiliğinden çözünür. Çözelti kaynayıp saydam hale gelince çözülmüş normal agar dolu beher ısıtıcıdan alınmıştır.

-Lamların kullanılacak yüzeylerinin buzlu kısımlarına kullandığımız madde olan eşek sütü, hücre hatları ve A-B yazılarak işaretlenmiştir. Lamlar buzlu kısmının yarısına kadar agarozla batırılmış, hemen lamların alt yüzeyleri silinmiştir. Kurutma kâğıdının üzerine dizilmiş ve kurumaya bırakılmıştır. (Lamlar deneyden 1 gün önce hazırlanarak pratiklik sağlanabilir) Bir lama iki farklı doz yayılabilir. Bu sebeple buzlu kısım enine bir çizgiyle ikiye ayrılarak iki ayrı doz yaymak için hazırlanmıştır. Yürüme sırasında LMA' nın lamlar üzerinde sabit kalması için normal agar ile kaplanması gerekmektedir.

-Hücrelerin ekimi 25' lik flasklara 5 ml besiyeri konulup belirli hücre miktarı kaplara atılarak yapılmıştır.

-İnkübatörde bulunan A549 kanserli akciğer ve BEAS-2B sağlıklı akciğer hücre hatlarının ekimi deneyimizde kullanılmak suretiyle yapılmıştır. Dört tane dozumuz üç tane de kontrol grubumuz olduğu için her bir hücre hattı için yedi flaska ekim yapılmıştır. Flasklara ekimi yapılan hücrelerin yüzeyin % 40-50 sini doldurması gerekmektedir.

-Yüzeyin yarısını dolduran hücreler, dozlama için steril kabine alınmıştır. Flasklar PBS ile yıkanmış ve hemen aspire edilmiştir.

-Flasklara uygun miktarda tripsin eklenerek hücreler kaldırılmıştır. Kanser hücre hatlarıyla çalışırken hücreleri kolay kaldırmak amacıyla flasklar 2 dakika inkübatöre koyulmuştur. Sağlıklı hücre hatları için tripsin uygulamadan hemen sonra yavaşça vurularak kaldırılabilir.

-Hücreler kaldırıldıktan sonra eklenilen tripsin kadar besiyeri eklenerek tripsinin etkisi nötralize edilmiştir.15 ml' lik falkon tüplerin üzerine dozlar yazılarak tüpler adlandırılmıştır (Aynı numaraları tüpün kapağına da yazmak çalışma sırasında kolaylık sağlar).

-Flasklardaki besiyeri+tripsin karışımı tüplere aktarılmıştır. 2500 rpm de 5 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatantı atılmıştır.

-PBS hücre süspansiyonundan 100 µl alınarak, daha önceden hazırlanıp sıcak su banyosuna konulmuş olan ependorfların içerisindeki LMA (250 µl) ile süspanse edilmiş ve hemen bu süspansiyondan 35 µl alınarak lamın buzlu kısımda belirtilen yarısına bir çizgi şeklinde yavaşça yayılmıştır ve beklemeksizin üzeri lamel ile kaplanmıştır. İki bölüm arasında küçük bir açıklık olması gerekmektedir. Böylece dozların karışması önlenmiş olur.

-Lamel ile kaplanan preparatlar vakit kaybetmeksizin üzerine kâğıt konulmuş olan buz akülerinin üzerine konularak soğumaya bırakılmıştır.

-Yayma işlemi tamamlanınca lamalar düz bir tepsiye dizilerek +4°C'de **1-2 dk** bekletilmiştir. Daha sonra dolaptan çıkarılan preparatların üzerindeki lameller yavaşça yana doğru kaydırılarak alınmıştır.

-Kapaklar dahil alüminyum folyo ile sarılı şalelere iki lamında boş yüzeyi birbirine gelecek şekilde yerleştirilmiştir ve **lisis buffer** eklenmiştir. Kapağı kapatılarak +4°C'de 1 gece bekletilmiştir.

-Ertesi gün elektroforez tankı hazırlanmıştır. Bir gün önceden hazırlayarak +4°C' ye kaldırmış olduğumuz **running buffer**, tankın sağından ve solundan yavaşça tanka dökülerek lamaların üzerini kaplayacak şekilde tanka doldurulmuştur.

-DNA zarar görmüş olsa da LMA içinde yumak halde bulunur. Yürütmenin başarılı olması için DNA' nın çözülmesi gerekir. Bunda ötürü **25 ve 30 dakika** arasında **running buffer** içerisinde elektroforez cihazı çalıştırılmadan beklenilmiştir. Beklemenin ardından tankın kırmızı ve siyah uçları aynı renkteki kablolarla bağlanılarak cihaz çalıştırılmış ve **30 dakika** yürüme yaptırılmıştır.

-Yürütmenin ardından lamalar şalelere dizilmiştir. Ardından **5 dk** karanlıkta +4°C' de **nötralizasyon sıvısı** içerisinde bekletilmiştir.

- Şalenin içine soğuk dH₂O konulup boşaltılarak, **lamalar yıkanmış** ve **kuruması** için bir kutunun kenarlarına buzlu kısımları üst tarafta olacak şekilde eğimli olarak dizilerek kurumaya bırakılmıştır.

- Kuruyan preparatlar aynı gün incelenmeyecekse; lamalar tekrar şaleye dizilir ve üzerine soğuk etanol ilave edilir. **5dk soğuk etanolda** bekletilerek DNA fikse edilir ve tekrar kurumaya bırakılır.

-100 mililitre distile suya 80 µl **etidyum bromid** eklenerek boya hazırlanmıştır.

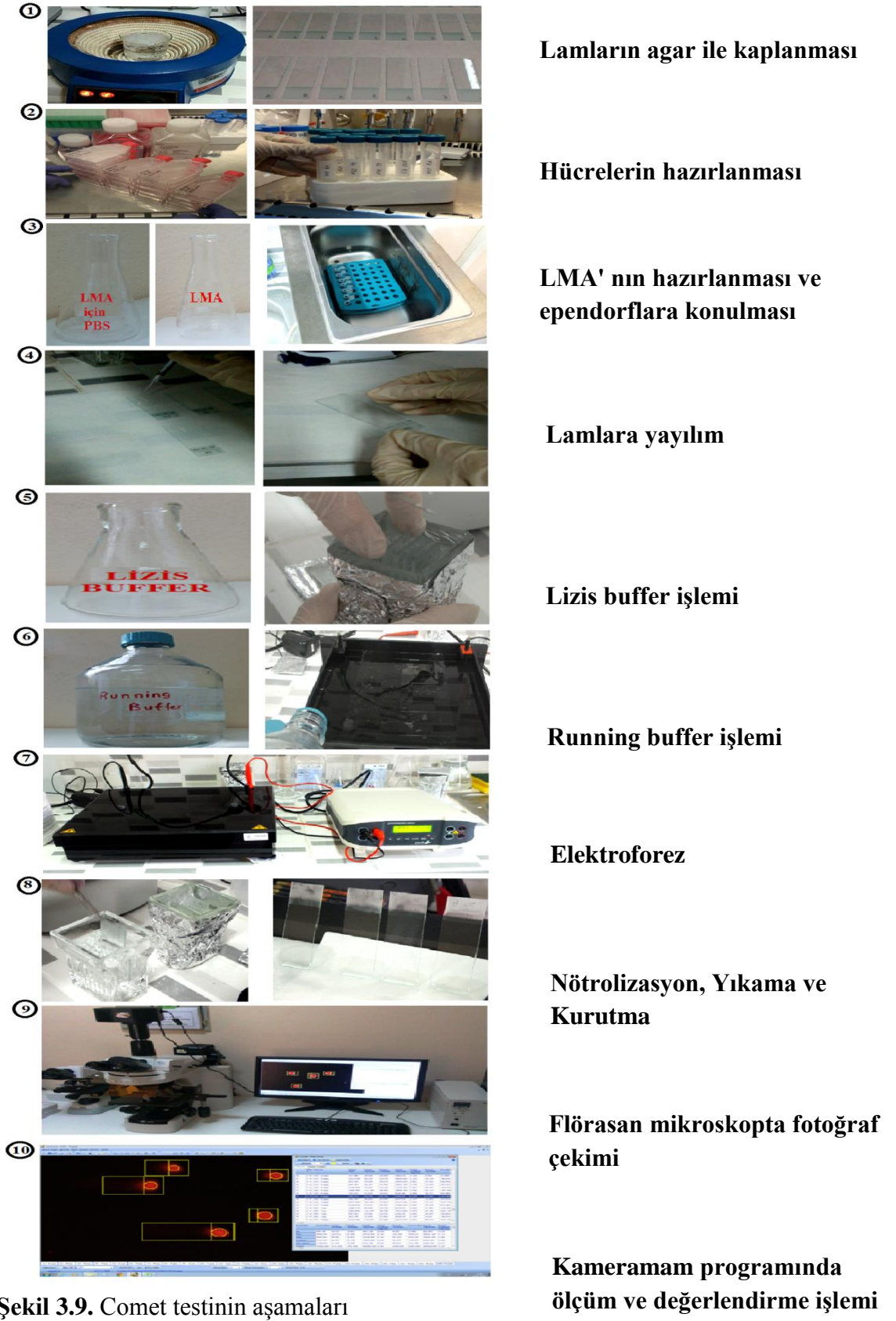
-Comet fotoğrafları çekilmeden önce lamalar etidyum bromid ile boyanmıştır. Boyama için maksimum süre bir dakikadır. Boyadan çıkarılan lamdaki fazla boya kurutma kâğıdına dik bir şekilde yavaşça vurularak akıtılmıştır. Lamın alt tarafı silinmiş ve üst tarafına komet lamı kapatılarak DNA' nın floresan mikroskopta fotoğrafları çekilmiştir.

-Florasan mikroskopta her bir preparattaki dozdan 100 fotoğraf çekilmiştir. Toplam 14 preparattan 2000 civarında fotoğraf çekilerek değerlendirilmesi yapılmıştır. Hücredeki DNA hasar seviyelerinin belirlenmesi için **Kameram** programı kullanılmıştır. Bu programda hücrenin baş ve kuyruk kısmının uzunluğu ölçülerek hesaplama yapılmıştır. Her preparattan çekilen kuyruk uzunlukları bir excel dosyasına kaydedilerek ortalama hasar seviyeleri belirlenmiştir.



Şekil 3.8. DNA hasar seviyelerinin kameram programı ile belirlenmesi

-Her bir doz için preparatlardaki 100 farklı alandan fotoğrafı çekilmiş hücrelerin ayrı ayrı değerlendirilmesi yapıp ortalaması ve standart hatası alınmıştır



Şekil 3.9. Comet testinin aşamaları

3.8. Mikronükleus (MN) yöntemi

Yapısal ve sayısal kromozom bozuklukların tespit edilmesine olanak sağlayan mikronükleus testi genotoksik etkilerin belirlenmesi amacıyla kullanılmıştır. BEAS-2B ve A549 hücrelerinde Sitokalsin-B ile sitokinez bloke yöntemine dayalı olarak gerçekleştirilen mikronükleus testinin aşamalarını şöyle sıralayabiliriz:

Lamların temizlenmesi:

- +4 °C' de lamlar temizlenmesi için etanol dolu bir beherin içersine bir gün önceden bırakılır. MN deneyine başlanmadan önce etanol içindeki lamlar arka ve ön tarafları olmak üzere temizlenir. Lamların ön kısmı numaralandırılarak şalelere dizilir kapağı kapatılarak +4 °C' ye konur.
- Kullanacağımız hücre hatları pasajlama prosedüründe anlatıldığı üzere tripsinleme yolu ile 15 ml'lik steril tüplere toplanmışlardır. Hücre süspansiyonundan sayım yapılarak tüpteki toplam hücre sayısı belirlenmiştir. Tüp içerisindeki hücreler +4 °C'de, 1000 rpm'de, 5 dk santrifüjedildikten sonra süpernatant aspire edilerek kalan pellet yeniden süspanse edilmiş ve dozlanacak T25 flasklara 30.000 hücre/flask olacak şekilde ekim yapılmıştır.
- Ekim yapıldıktan 24 saat sonra dozlama yapılarak hücreler tekrar inkübasyona bırakılır.

Sitokalsin-B hazırlanması

0,001 g Sitokalsin-B, % 70'lik bir miktar etanolde çözülmüş ve steril saf su ile 5 ml' e tamamlanmıştır. -20°C'de alıquotlanarak saklanmıştır.

-48. ci saatte ise flasklardaki besiyeri aspire edilerek PBS ile yıkanmıştır. Sonra 3 ml taze besiyeri ve 90 µl Sitokalsin-B eklenerek 24 saat daha inkübasyona bırakılmıştır.

-72. ci saatte ise tüpler +4 °C'de, 800 rpm'de, 6 dk santrifüj edildikten sonra süpernatant hücrelerin üzerinde yaklaşık 200 µl kalacak şekilde aspire edilmiştir ve tüplerin diblerindeki pelletler hafifce vurularak kaldırılmıştır.

Hipotonik çözeltisinin (KCL) hazırlanması

Amaç; Hücrelerin şişmesini kromozomların ayırt edilmesini sağlamaktır. 1,397 g KCL tartılarak 250 ml' lik balon jöjeye konur ve üstüne 250 ml oluncaya kadar distile su eklenir ve çözünmesi sağlanır. Potasyum klörür (KCl) oda sıcaklığında bekletilir.

-Tüplere oda sıcaklığındaki taze hazırlanmış hipotonik çözeltisinden yavaş yavaş 5 ml eklenerek ~3 dk süresince hücrelerin şişmesi için beklenmiştir. (Kanserli hücrelerde hücrenin şişmesi daha önce gerçekleşir, bunun için 2 dakika, sağlıklı hücrelerde 3 dakika bekletilir). Bu süre sonunda tüpler +4 °C'de, 800 rpm'de, 6 dk santrifüledikten sonra hipotonik uzaklaştırılmıştır (Hipotonik eklemek için 1 ml' lik pipetler ile ekleme 4 aşamada gerçekleştirilir).

Fiksatif (Karnoy çözeltisinin) hazırlanışı

60 ml metanol (-20 °C' den) ve 20 ml Asetik asit (oda sıcaklığındaki) karıştırılarak elde edilir. Hazırlandıktan sonra soğutucuya kaldırılır. Fiksatif ve Formaldehit; canlılardan alınan parçaların daha sonra bozulmalarını engellemek ve canlı hallerine en yakın şekilleriyle muhafaza etmek için kullanılır.

-Hipotonik işleminden sonra hücrelerin üzerine yavaşca taze hazırlanmış karnoy fiksatifi (3:1 metanol: asetik asit) 5 ml oluncaya kadar eklenmiştir. Ayrıca 1. fiksatif ile birlikte formaldehitten 8 damla damlatılmıştır. Bu işleminden sonra tüpler +4 °C'de, 800 rpm'de 6 dk santrifüjlenmişlerdir. Her fiksatif işleminden sonra 10 dakika bekletilmiştir.

Lamlara yayılması

-Fiksatif işlemin bittikten sonra her kültürden iki lam olacak şekilde yüksekte (yaklaşık 7 cm' den) damlatma şeklinde hücreler önceden temizlenmiş lamlara yayıldı. Lamlar düz bir yere dizilerek kurumaya bırakılır. Lamların sallanarak kurutulmamasına dikkat edilir.

Giemsa ile boyama (% 5' lik)

100 ml' lik bir mezürün 95 ml' lik kısmına **PBS** konur. 5ml' lik giemsa boyası şırınga ile çekilerek mezüre eklenir. Kurutma kâğıdı hüni şekline getirilerek şalenin üzerine yerleştirdikten sonra hazırlanan % 5' lik giemsa süzümüş olur.

-Kuruyan lamlar şale içerisinde % 5'lik giemsa boyası ile 15 dk boyandıktan sonra lamlar sudan geçirilmiş ve analiz zamanına kadar kurutulularak saklanmışlardır.

Mikronükleuslu hücrelerin sayımı

Sitokinez bloke mikronükleus testi analizlerinde öncelikle hücre tipleri belirlenmelidir. Hücreler, mononükleus, binükleus, multinükleus, apoptotik veya nekrotik hücre tipinde olabilirler.

Çekirdek bölünme bölünme frekansını hesaplamak için aşağıdaki formül kullanılmıştır.

$$\text{ÇBI: } [M1 + 2(M2) + 3(M3) + 4(M4)] / N$$

M1: Bir nükleuslu hücre,

M2: İki nükleuslu hücre,

M3: Üç nükleuslu hücre,

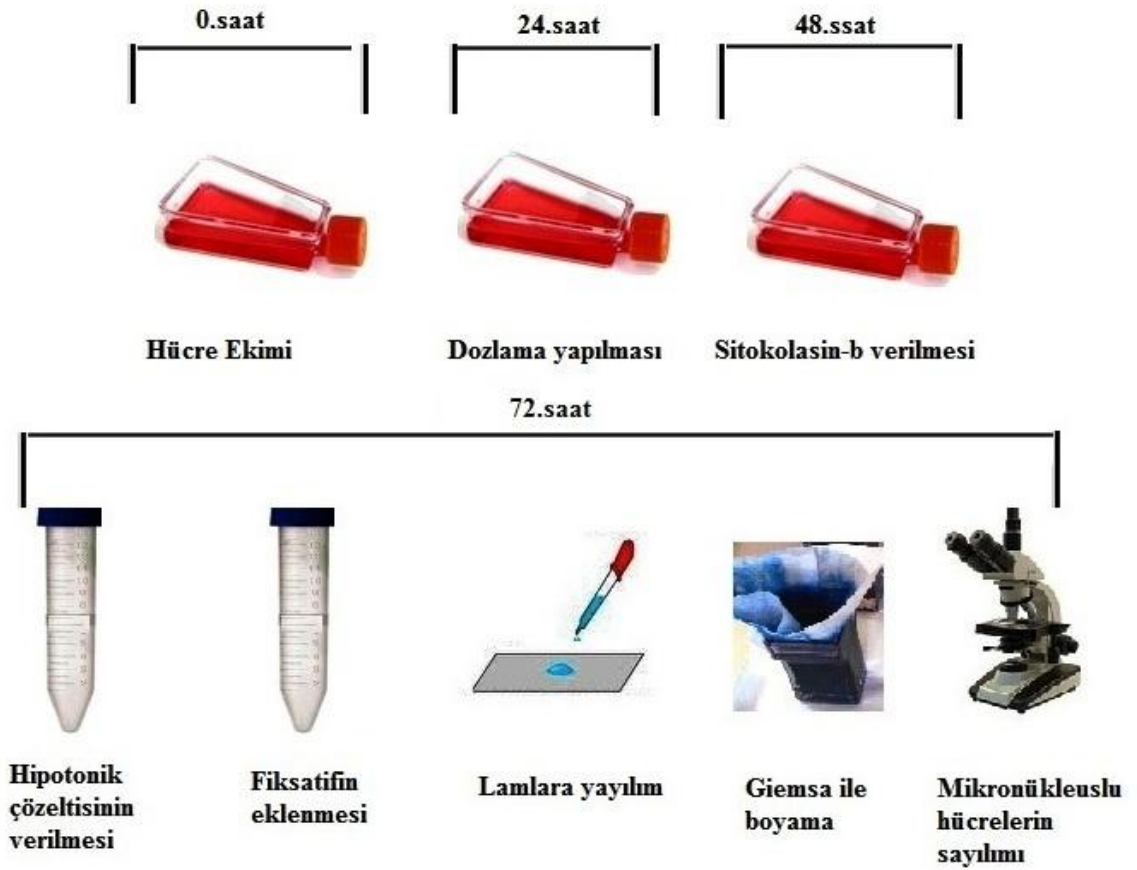
M4: Dört nükleuslu hücre,

N: Toplam yaşayan hücre,

Her bir grup için preparatlardan 2000 hücre sayılarak, bu hücreler arasında mikronükleus taşıyan çift nükleuslu hücre frekansları yanında, bir (MI), iki (MII) üç (MIII) ve dört (MIV) nükleus taşıyan hücrelerin sayısı da kaydedilmiştir.

Sitotoksitenin hesaplanması: Her bir preperattan bir, iki, üç, dört nükleus taşıyan toplam 2000 hücre sayılarak kaydedilmiştir. Yukarıdaki Çekirdek Bölünme Sitotoksite frekansı formülüne göre hesaplama yapılmıştır.

MN frekansının hesaplanması: Hücre sayımı yapılırken sadece binükleuslu hücrelerdeki MN oluşumları kaydedilir. MN frekansı 1000 hücreye tamamlanarak toplam (‰) mikronükleus hesaplanır.



Şekil 3.10. Mikronükleus testinin aşamaları

3.9. İstatistiksel Analizler

Sitotoksisite ve Genotoksisite belirleme testleri olan WST-1, XTT, Klojenik, Comet ve Mikronükleus yöntemlerinden elde edilen verilerin karşılaştırılması için parametrik testler kullanılmıştır. Tek yönlü varyans analizi **ANAVO ve Tukey HSD testi** kullanılarak karşılaştırmalar yapılmıştır. Tüm istatistik analizler **SPSS 22** yazılımı kullanılarak bilgisayarda gerçekleştirilmiştir. Anlamlılık düzeyi **0.05** göre belirlenmiştir.

4.BULGULAR

Eşek sütünün sitotoksik ve genotoksik etkilerinin sağlıklı akciğer ve kanserli akciğer insan hücre hatları üzerine karşılaştırmalı olarak etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

4.1. Klojenik testbulguları

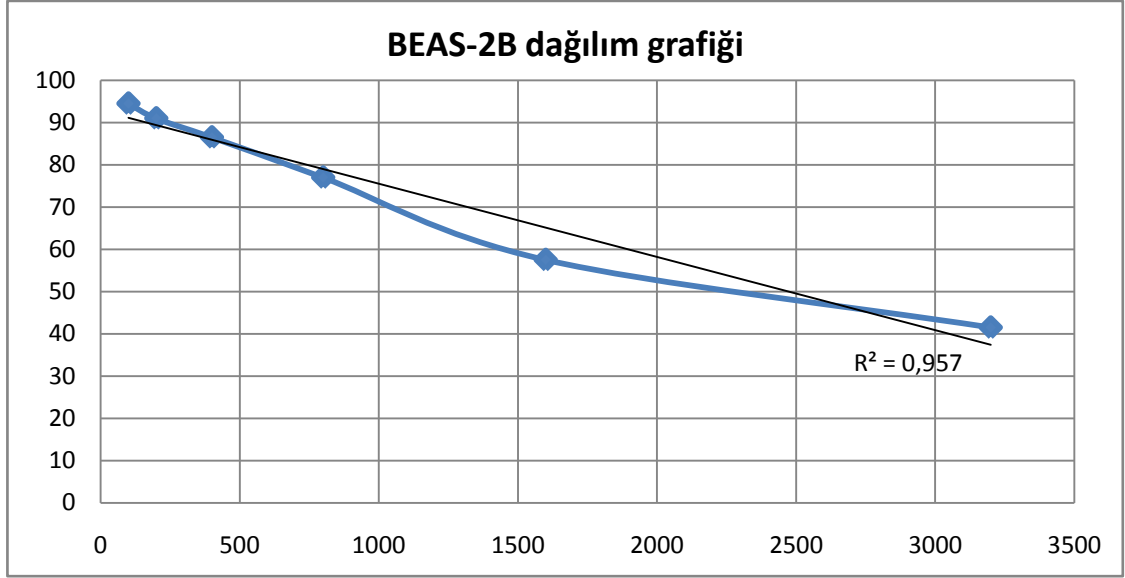
Klojenik test uygulaması sonuçlarına göre test gruplarından elde edilencanlilik yüzdeleri ve standart sapma miktarları belirlenmiştir. Ayrıca bu verilerden IC_{50} değeri ve R^2 değerleri excel programı kullanılarak hesaplanmıştır. BEAS-2B sağlıklı akciğer hücrelerinde bulunan IC_{50} değeri **2476 $\mu\text{g/mL}$** , $R^2= 0,95$; A549 kanserli akciğer hücrelerinde ise IC_{50} değeri **850 $\mu\text{g/mL}$** , $R^2= 0,84$ olarak bulunmuştur (Çizelge 4.1)

Çizelge 4.1. Klojenik test ile belirlenen canlılık yüzdeleri ve SS; Standart Sapma.

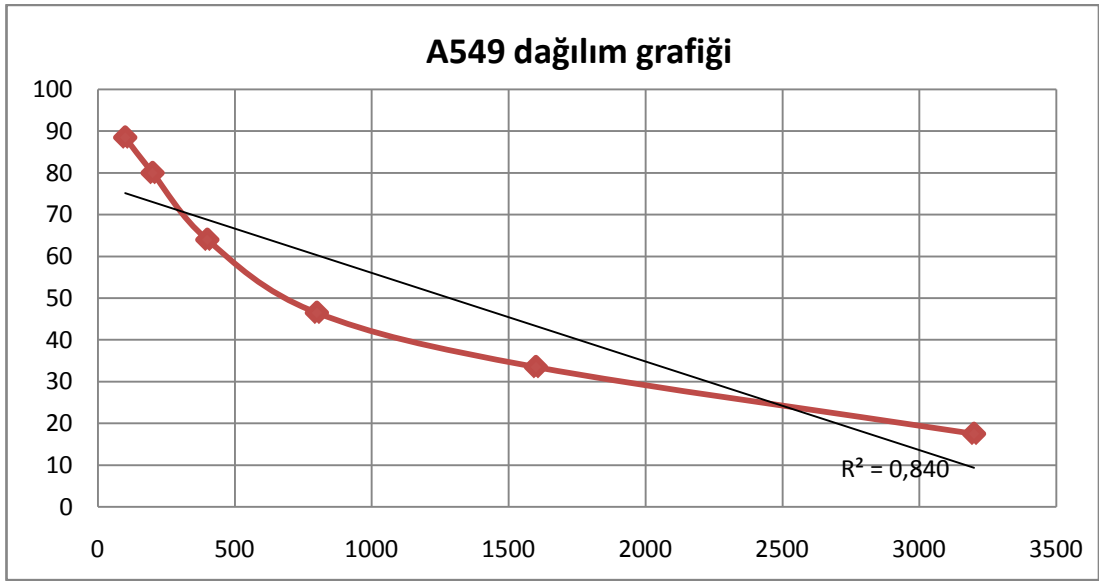
Doz grupları	BEAS-2B hücre hattında canlılık yüzdesi		A549 hücre hattında canlılık yüzdesi \pm SS	
BK	100 \pm 0		100 \pm 0	
SK	98,8 \pm 1,13		98,5 \pm 0,70	
100 $\mu\text{g/mL}$	94,5 \pm 2,12		88,5 \pm 0,70*	
200 $\mu\text{g/mL}$	91 \pm 1,41		80 \pm 2,82*	
400 $\mu\text{g/mL}$	86,5 \pm 3,53*	$R^2= 0,95$	64 \pm 1,41*	$R^2= 0,84$
800 $\mu\text{g/mL}$	77 \pm 2,82*		46,5 \pm 0,70*	
1600 $\mu\text{g/mL}$	57,5 \pm 3,53*		33,5 \pm 2,12*	
3200 $\mu\text{g/mL}$	41,5 \pm 2,12*		17,5 \pm 3,53*	
PK	17,5 \pm 4,94*		5,5 \pm 2,12*	

$p<0,05$

Çeşitli eşek sütü dozlarına maruz kalan sağlıklı akciğer hücrelerinin Şekil 4.1' de ve kanserli akciğer hücrelerinin Şekil 4.2' de klojenik test sonucu bulunan verilerden oluşturulan dağılım grafiği gösterilmiştir.

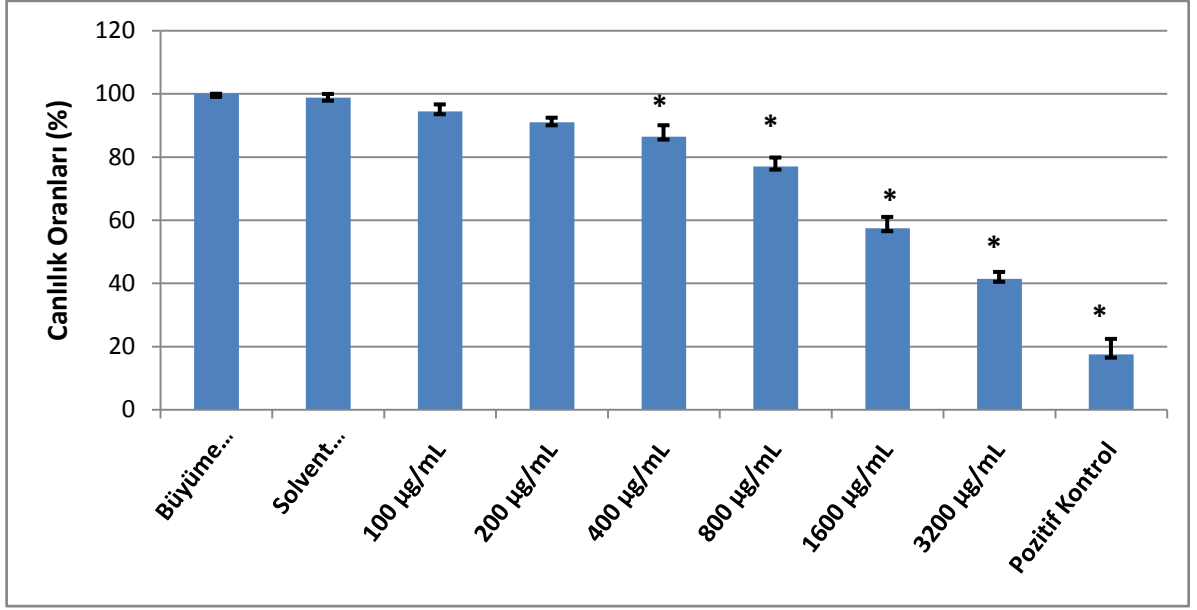


Şekil 4.1. Klonojenik test ile belirlenen BEAS-2B hücre hatlarında dağılım grafiği

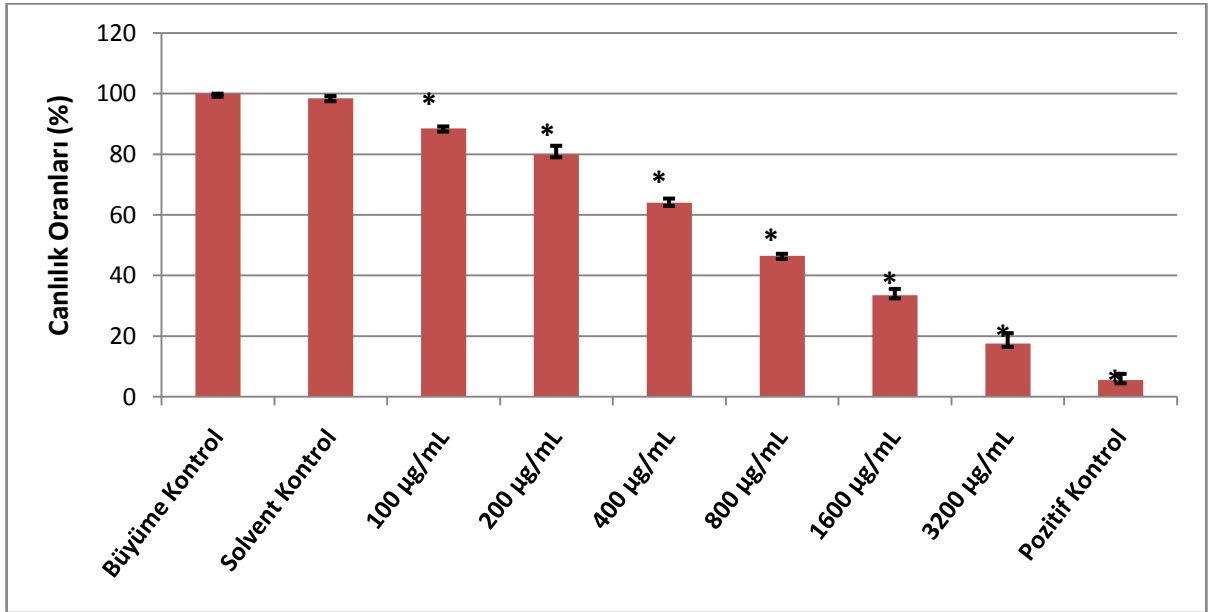


Şekil 4.2. Klonojenik test ile belirlenen A549 hücre hatlarında dağılım grafiği

Klonojenik test uygulaması sonuçlarına göre BEAS-2B ve A549 hücre hatlarında elde edilen ortalama canlılık oranları ve standart sapma miktarları Şekil 4.3 ve Şekil 4.4' te belirtilmiştir.



Şekil 4.3. BEAS-2B hücrelerinde Klojenik test ile belirlenen canlılık oranlarının çubuk grafik ile gösterilmesi



Şekil 4.4. A549 hücrelerinde Klonojenik test ile belirlenen canlılık oranların çubuk grafik ile gösterilmesi

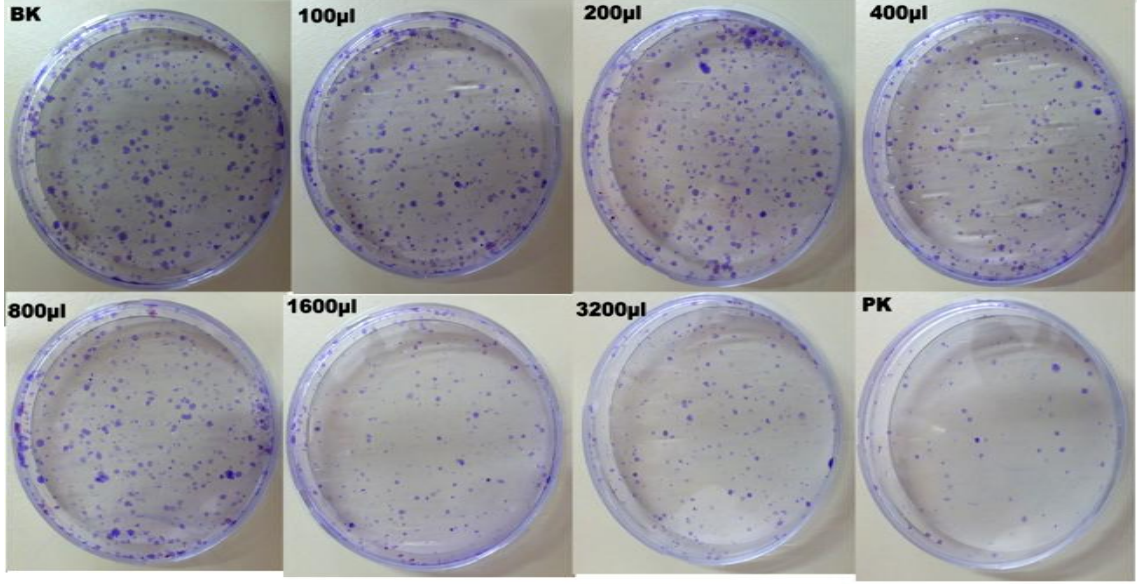
BEAS-2B hücre hattında; Klonojenik deneyi sonucunda dozların artmasına paralel olarak anlamlı bir azalma meydana geldiği ANAVO testi ile belirlenmiştir ($p < 0,05$). Bu anlamlı farkın hangi gruplar arasında olduğunu belirlemek için Tukey HSD testi veya Tamhane' s T2 testi yapılmıştır. 100 $\mu\text{g/mL}$ ' de % 94,5; 200 $\mu\text{g/mL}$ ' de % 91 ve SK' de % 98.8 olarak canlılık yüzdeleri hesaplanmıştır. Bu konsantrasyonlarda BEAS-2B hücre hattında canlılık yüzdeleri kontrole göre karşılaştırıldığında anlamlı bir azalma saptanmamıştır ($p > 0,05$). Ancak 400 - 800 - 1600 - 3200 $\mu\text{g/mL}$ dozlarında büyüme kontrol ile arasında önemli bir değişim olduğu görülmüştür ($p < 0,05$).

A549 hücre hattında ise; Büyüme kontrole göre canlılık oranlarının dozlara göre katlanarak azaldığını görmekteyiz ($p < 0,05$). 100 $\mu\text{g/mL}$ 'de % 88.5, 200 $\mu\text{g/mL}$ 'de % 80, 400 $\mu\text{g/mL}$ ' de % 64, 800 $\mu\text{g/mL}$ 'de % 46.5, 1600 $\mu\text{g/mL}$ 'de % 33.5, 3200 $\mu\text{g/mL}$ 'de % 17,5 olarak canlılık yüzdeleri hesaplanmıştır.

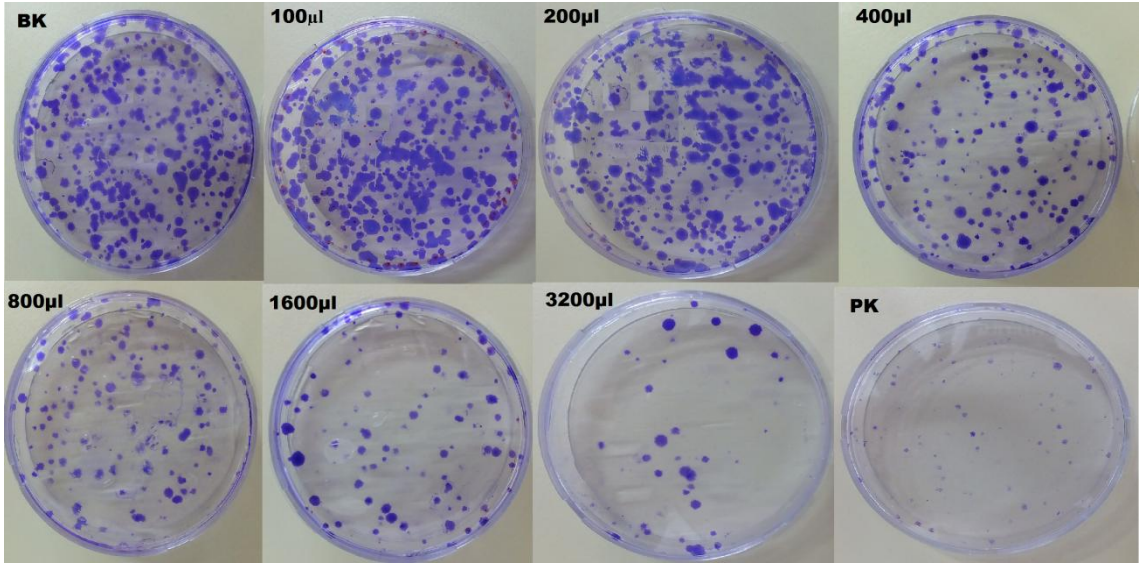
Her iki deneyde büyüme kontrole göre solvent kontrolün canlılık oranı % 98,8 ve % 98,5 olarak gerçekleşmiştir. Solvent kontrolümüz olan suyun hücreler üzerinde anlamlı bir etkisinin olmadığı gözlenmiştir ($P > 0,05$).

Pozitif kontrol olarak hidrojen peroksit (H_2O_2) çözeltisinden 4 μl kullanılmıştır. Hidrojen peroksitin büyüme kontrole göre canlılık yüzdeleri 17 ve 5,5 olarak hesaplanmıştır. Bu değerlere bakıldığında H_2O_2 ' in hücreler üzerinde önemli derecede ölümcül olduğu tespit edilmiştir ($p < 0,05$).

Klonojenik test sonuçlarının değerlendirilmesi aşamasında, en az 50 hücre içeren kolonilerin sayımı yapılmıştır. Eşek sütünün çeşitli dozlarına maruz kalan BEAS-2B ve A549 hücre hatlarında koloni oluşumları Şekil 4.5 ve Şekil 4.6' da gösterilmiştir.



Şekil 4.5. BEAS-2B hücrelerinde koloni oluşumları



Şekil 4.6. A549 hücrelerinde koloni oluşumları.

4.2. WST-1 test bulguları

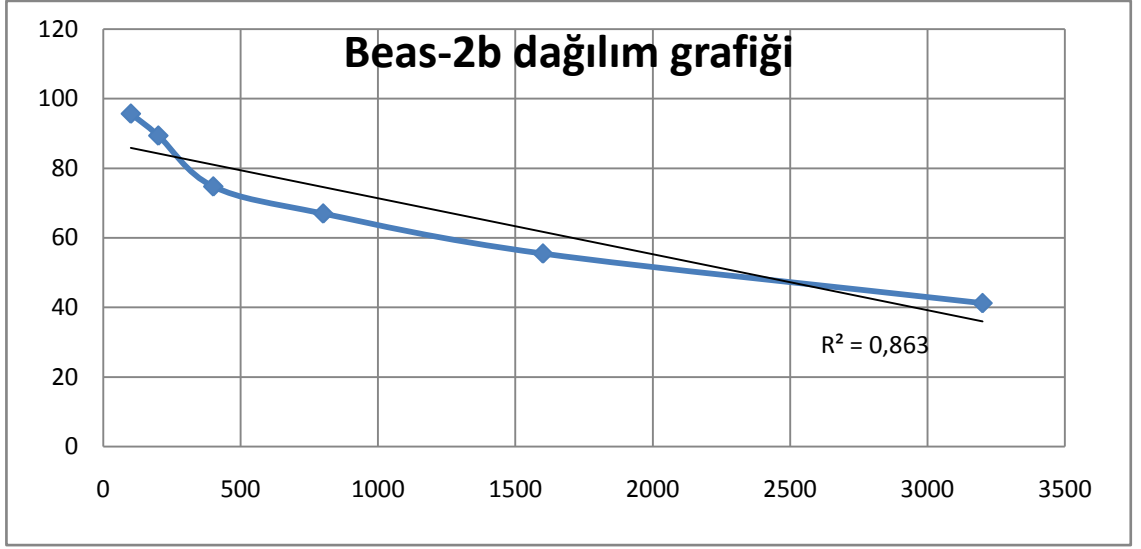
WST-1 uygulaması sonuçlarına göre test gruplarından elde edilencanlılık yüzdeleri ve standart sapma miktarları belirlenmiştir. Ayrıca bu verilerden IC_{50} değeri ve R^2 değerleri excel programı kullanılarak hesaplanmıştır. BEAS-2B sağlıklı akciğer hücrelerinde bulunan IC_{50} değeri **2294 $\mu\text{g/mL}$** , $R^2 = 0,86$; A549 kanserli akciğer hücrelerinde ise IC_{50} değeri **1109 $\mu\text{g/mL}$** , $R^2 = 0,86$ olarak bulunmuştur (**Çizelge 4.2**)

Çizelge 4.2. WST-1 ile belirlenen canlılık yüzdeleri ve SS; Standart Sapma.

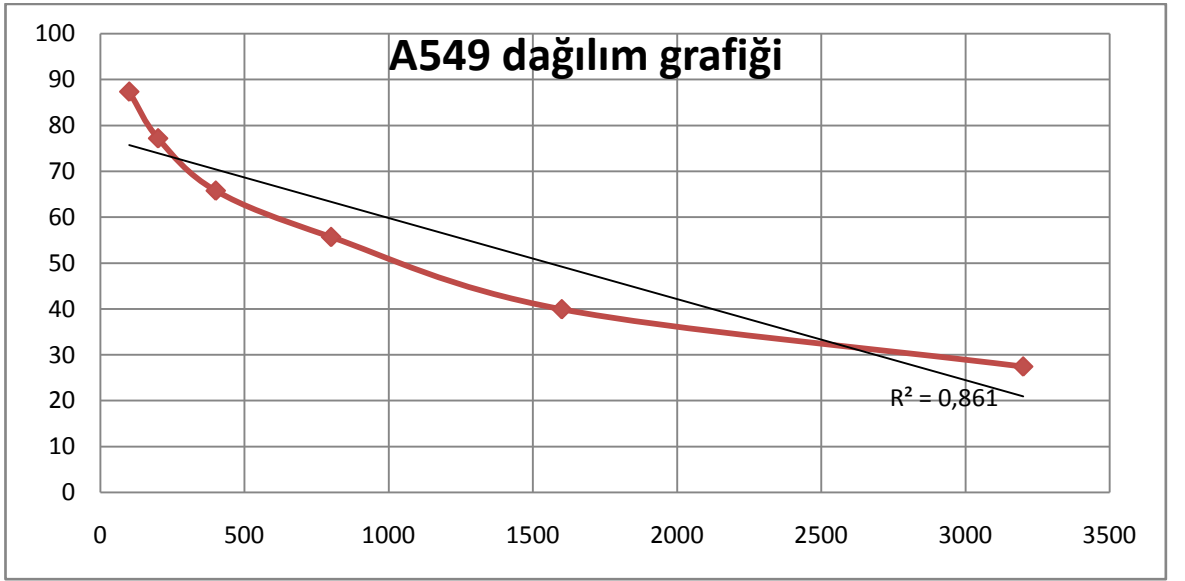
Doz grupları	Beas-2b hücre hattında canlılık yüzdesi	A549 hücre hattında canlılık yüzdesi \pm SS
BK	100 \pm 0	100 \pm 0
SK	98,5 \pm 0,70	98,3 \pm 0,42
100 $\mu\text{g/mL}$	95,6 \pm 3,13	87,3 \pm 2,06
200 $\mu\text{g/mL}$	89,37 \pm 7,17	77,17 \pm 5,89*
400 $\mu\text{g/mL}$	74,74 \pm 0,09*	65,7 \pm 4,63*
800 $\mu\text{g/mL}$	66,96 \pm 1,24*	55,7 \pm 11,15*
1600 $\mu\text{g/mL}$	55,45 \pm 1,21*	39,96 \pm 4,46*
3200 $\mu\text{g/mL}$	41,2 \pm 5,23*	27,47 \pm 6,88*
PK	3,25 \pm 1,06*	3 \pm 1,41*

$p < 0,05$

Çeşitli eşek sütü dozlarına maruz kalan sağlıklı akciğer hücrelerinin Şekil 4.7 ve kanserli akciğer hücrelerinin Şekil 4.8' de klonojenik test sonucu bulunan verilerden oluşturulan dağılım grafiği gösterilmiştir.

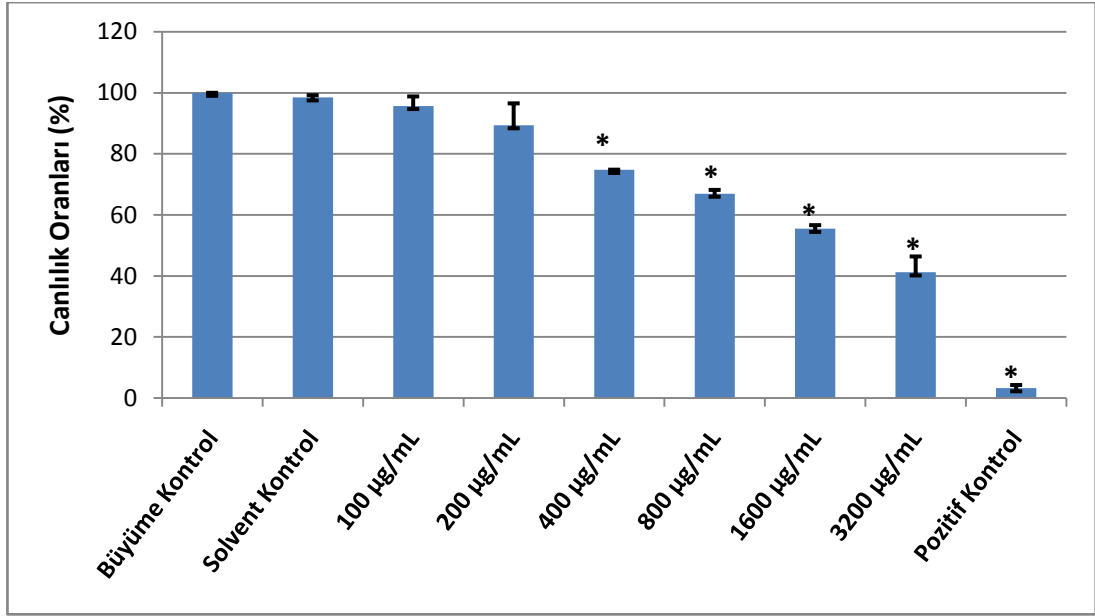


Şekil 4.7. WST-1 testi ile belirlenen BEAS-2B hücre hattında dağılım grafiği

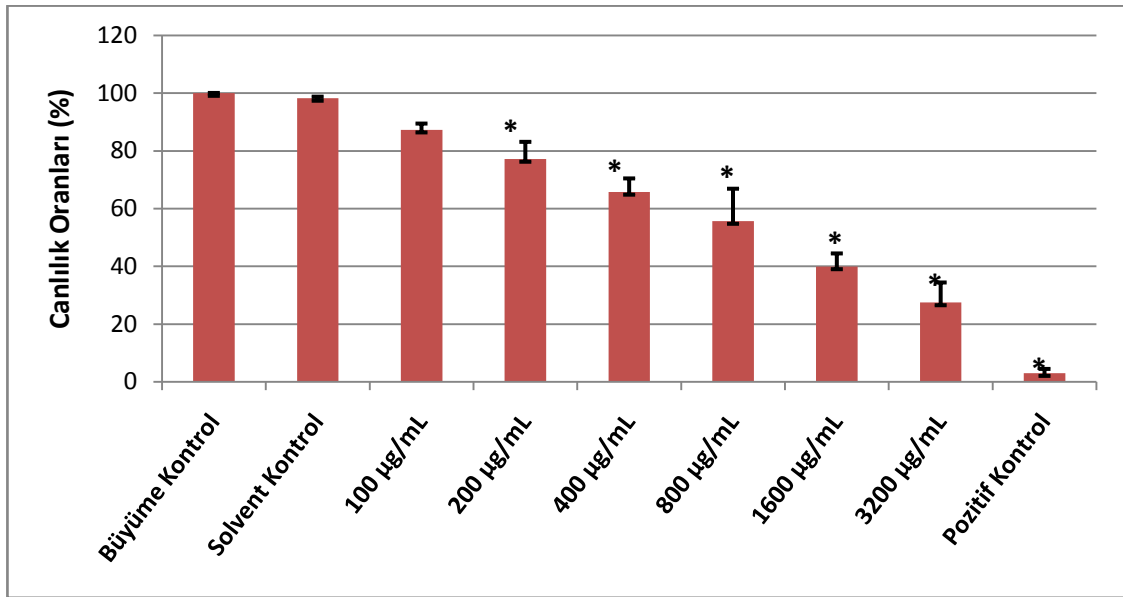


Şekil 4.8. WST-1 testi ile belirlenen A549 hücre hattında dağılım grafiği

WST-1 uygulaması sonuçlarına göre BEAS-2B ve A549 hücre hatlarında elde edilen ortalama canlılık oranları ve standart sapma miktarları Şekil 4.9 ve Şekil 4.10' da belirtilmiştir.



Şekil 4.9. BEAS-2B hücrelerinde WST-1 testi ile belirlenen canlılık oranların çubuk grafik ile gösterilmesi



Şekil 4.10. A549 hücrelerinde WST-1 testi ile belirlenen canlılık oranların çubuk grafik ile gösterilmesi

BEAS-2B hücre hattında; WST-1 deneyi sonucunda dozların artmasına paralel olarak anlamlı bir azalma meydana geldiği ANAVO testi ile belirlenmiştir ($p<0,05$). Bu anlamlı farkın hangi gruplar arasında olduğunu belirlemek için Tukey HSD yapılmıştır. 100 $\mu\text{g/mL}$ ' de % 95,6; 200 $\mu\text{g/mL}$ ' de % 89,4 ve SK' de % 98,5 olarak canlılık yüzdeleri hesaplanmıştır. Bu konsantrasyonlarda BEAS-2B hücre hattında canlılık yüzdeleri kontrole göre karşılaştırıldığında anlamlı bir azalma saptanmamıştır ($p>0,05$). Ancak 400 - 800 - 1600 - 3200 $\mu\text{g/mL}$ dozlarında büyüme kontrol ile arasında önemli bir değişim olduğu görülmüştür ($p<0,05$).

A549 hücre hattında ise; Büyüme kontrole göre canlılık oranlarının dozların artmasıyla azaldığını görmekteyiz ($p<0,05$). Kanserli hücreler üzerinde eşek sütü dozlarının artmasına paralel olarak 100 $\mu\text{g/mL}$ ' de % 88,79; 200 $\mu\text{g/mL}$ ' de % 73; 400 $\mu\text{g/mL}$ ' de % 62,5; 800 $\mu\text{g/mL}$ ' de % 47,8; 1600 $\mu\text{g/mL}$ ' de % 36,8; 3200 $\mu\text{g/mL}$ ' de % 22,6 oranında canlılık gözlenmiştir.

Her iki deneyde büyüme kontrole göre solvent kontrolün canlılık oranı % 98,5 ve % 98,3 olarak gerçekleşmiştir. Solvent kontrolümüz olan suyun hücreler üzerinde anlamlı bir etkisinin olmadığı gözlenmiştir ($P>0,05$).

Pozitif kontrol olarak hidrojen peroksit (H_2O_2) çözeltisinden 4 μL kullanılmıştır. Hidrojen peroksitin büyüme kontrole göre canlılık yüzdeleri 3,25 ve 3 olarak hesaplanmıştır. Bu değerlere bakıldığında H_2O_2 ' in hücreler üzerinde önemli derecede ölümcül olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$).

4.3. XTT testi bulguları

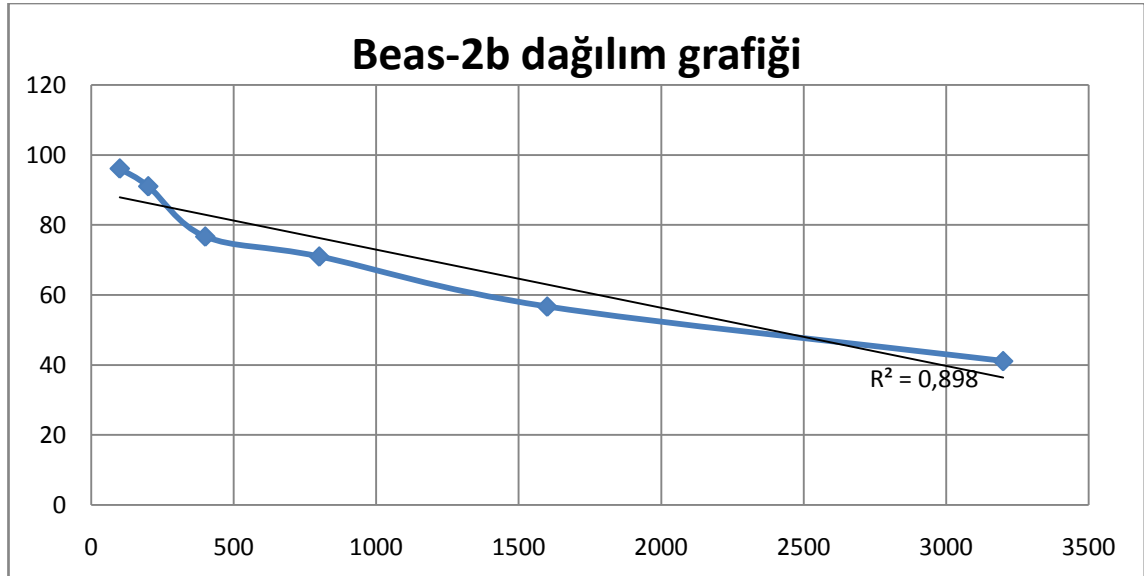
XTT uygulaması sonuçlarına göre test gruplarından elde edilen canlılık yüzdeleri ve standart sapma miktarları belirlenmiştir. Ayrıca bu verilerden IC_{50} değeri ve R^2 değerleri excel programı kullanılarak hesaplanmıştır. BEAS-2B sağlıklı akciğer hücrelerinde bulunan IC_{50} değeri **2381 $\mu\text{g/mL}$** , $\text{R}^2= 0,90$; A549 kanserli akciğer hücrelerinde ise IC_{50} değeri **830 $\mu\text{g/mL}$** , $\text{R}^2= 0,83$ olarak bulunmuştur (**Çizelge 4.3**)

Çizelge 4.3. BEAS-2B ve A549 hücrelerinde XTT ile belirlenen canlılık yüzdeleri ve SS; Standart Sapma.

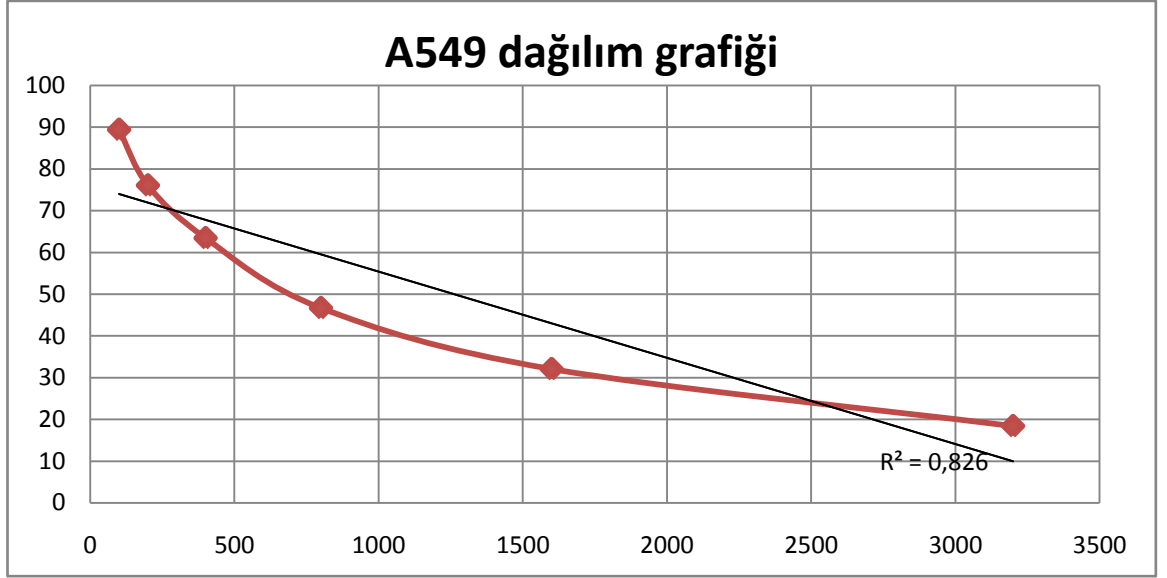
Doz grupları	Beas-2b hücre hattında canlılık yüzdesi	A549 hücre hattında canlılık yüzdesi±SS
BK	100±0	100±0
SK	99.4±0.56	98.7±0.99
100 µg/mL	96.12±2.46	89.39±0.01
200 µg/mL	91.05±3.52	76.06±1.92*
400 µg/mL	76.6±2.08*	63.45±1.20*
800 µg/mL	70.99±0.72*	46.75±3.17*
1600 µg/mL	56.69±2.68*	32.09±3.09*
3200 µg/mL	41,12±4.84*	18.43±7.67*
PK	2.5±0.70*	4.45±2.05*

p<0,05

Çeşitli eşek sütü dozlarına maruz kalan sağlıklı akciğer hücrelerinin Şekil 4.11' de ve kanserli akciğer hücrelerinin Şekil 4.12' de XTT testi sonucu bulunan verilerden oluşturulan dağılım grafiği gösterilmiştir.

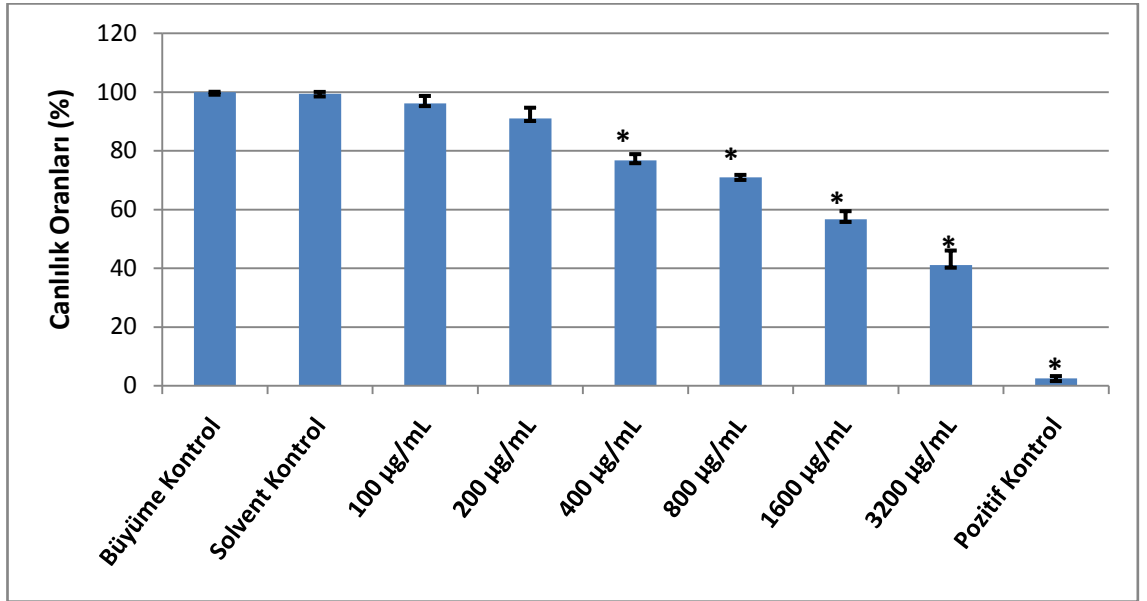


Şekil 4.11. XTT testi ile belirlenen BEAS-2B hücre hattında dağılım grafiği

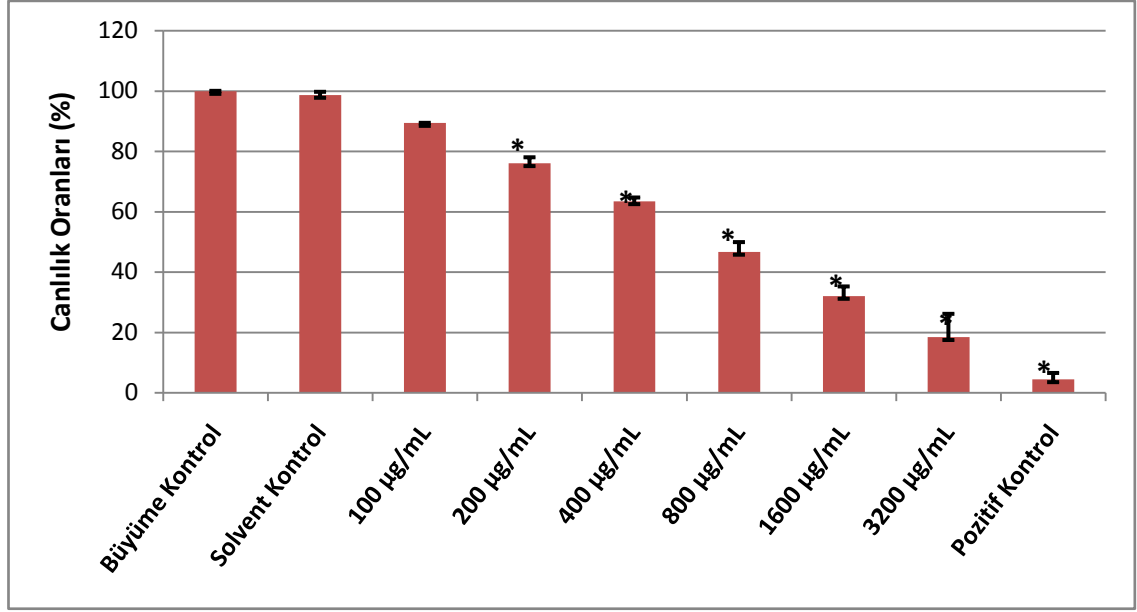


Şekil 4.12. XTT testi ile belirlenen A549 hücre hattında dağılım grafiği

XTT uygulaması sonuçlarına göre BEAS-2B ve A549 hücre hatlarında elde edilen ortalama canlılık oranları ve standart sapma miktarları Şekil 4.13 ve Şekil 4.14' de belirtilmiştir.



Şekil 4.13. BEAS-2B hücrelerinde XTT testi ile belirlenen canlılık oranlarının çubuk grafik ile gösterilmesi



Şekil 4.14. A549 hücrelerinde XTT testi ile belirlenen canlılık oranların çubuk grafik ile gösterilmesi

BEAS-2B hücre hattında; XTT deneyi sonucunda dozların artmasına paralel olarak anlamlı bir azalma meydana geldiği ANAVO testi ile belirlenmiştir ($p < 0.05$). Bu anlamlı farkın hangi gruplar arasında olduğunu belirlemek için Tukey HSD yapılmıştır. 100 µg/mL' de % 96.12; 200 µg/mL' de % 76 ve SK' de % 99,4 olarak canlılık yüzdeleri hesaplanmıştır. Bu konsantrasyonlarda BEAS-2B hücre hattında canlılık yüzdeleri kontrole göre karşılaştırıldığında anlamlı bir azalma saptanmamıştır ($p > 0.05$). Ancak 400 - 800 - 1600 - 3200 µg/mL dozları ile büyüme kontrol arasında önemli bir değişim olduğu görülmüştür ($p < 0.05$).

A549 hücre hattında ise; Büyüme kontrole göre canlılık oranlarının dozların artmasıyla azaldığını görmekteyiz ($p < 0.05$). Kanserli hücreler üzerinde eşek sütü dozlarının artmasına paralel olarak, 200 µg/mL' de % 76; 400 µg/mL' de % 63,45; 800 µg/mL' de % 46.8; 1600 µg/mL' de % 32; 3200 µg/mL' de % 18,43 oranında canlılık gözlenmiştir.

Her iki deneyde büyüme kontrole göre solvent kontrolün canlılık oranı % 99.4 ve % 98.7 olarak gerçekleşmiştir. Solvent kontrolümüz olan suyun hücreler üzerinde anlamlı bir etkisinin olmadığı gözlenmiştir ($P > 0.05$).

Pozitif kontrol olarak hidrojen peroksit (H₂O₂) çözeltisinden 4 µl kullanılmıştır. Hidrojen peroksitin büyüme kontrole göre canlılık yüzdeleri 2.5 ve 4.45 olarak hesaplanmıştır. Bu değerlere bakıldığında H₂O₂' in hücreler üzerinde önemli derecede ölümcül olduğu tespit edilmiştir (p<0.05).

Çeşitli konsantrasyonlarda eşek sütüne maruz bırakılan BEAS-2B ve A549 hücre hatlarında klonojenik, WST-1 ve XTT testi ile belirlenen canlılık oranlarının yüzdeleri Şekil 4.13 ve 4.14' te verilmiştir. Canlılık oranlarına bakıldığında eşek sütünün sağlıklı hücreler üzerinde % 75 üstü canlılık gösteren dozları seçilerek Comet ve MN testleri yapılmıştır.

Çizelge 4.4' te BEAS-2B ve A549 hücre hatlarında yapılan Klonojenik test, WST-1 ve XTT testi ile belirlenen tüm IC₅₀ değerleri verilmiştir. Tüm sağlıklı hücrelerin ortalama değerlerine bakıldığında Klonojenik test ile yapılan deneylerin ortalaması 2476 µg/mL, WST-1 testi ile yapılan deneylerin ortalaması 2294 µg/mL, XTT testi ile yapılan değerlerin ortalaması ise 2381 µg/mL' dir. Kanserli hücrelerin IC₅₀ değerlerinin ortalama değerlerine bakıldığında Klonojenik test ile yapılan deneylerin ortalaması 850 µg/mL, WST-1 testi ile yapılan deneylerin ortalaması 1109 µg/mL, XTT testi ile yapılan değerlerin ortalaması ise 830 µg/mL' dir.

Çizelge 4.4. Klonojenik test, XTT ve WST-1 testi ile belirlenen IC₅₀ değerleri

Hücre hatları	Klonojenik (µg/mL)	WST-1 (µg/mL)	XTT (µg/mL)
BEAS-2B	2476	2294	2381
A549	850	1109	830

4.4. Tek Hücre Jel Elektroferez (COMET) bulguları

İn vitro komet testinde elde edilen bulgular içerisinde Kuyruk uzunluğu (μm), Kuyruk %DNA (K.%DNA) ve Olive Kuyruk Momenti (OTM; Olive Tail Moment) parametreleri değerlendirilmiştir. DNA migrasyonu genellikle μm cinsinden ifade edilmektedir. Göç uzunluğu fragmentasyon oranıyla ve dolayısıyla DNA hasarı ile ilişkilidir. Yalnızca kuyruk uzunluğu DNA hasarını doğru bir şekilde yansıtmaz ayrıca bu kuyruk bölgesinde sürüklenen DNA'nın yüzdesi de önemlidir. Olive ve ark. yaptıkları çalışmalar sonucunda nötral pH'da ve pH 12,3'de (alkali) DNA migrasyonunun belirli bir yere kadar devam ettiğini ve bu noktadan ileriye gidemediğini bildirmişlerdir. Buna karşılık migrasyon uzunluğunun artmamasına rağmen göç eden DNA yüzdesinin ise arttığını ifade etmişlerdir. pH >13 olduğu alkali koşullarda ise böyle bir durumun söz konusu olmadığını bu pH'da migrasyon uzunluğunun DNA hasarını doğru bir şekilde yansıttığını rapor etmişlerdir. Tüm bu karışıklığı ortadan kaldırmak için Olive ve ark. Kuyruk momenti terimini tanımlamışlardır (Durmaz ve ark. 2010' göre Olive ve ark. 1990)

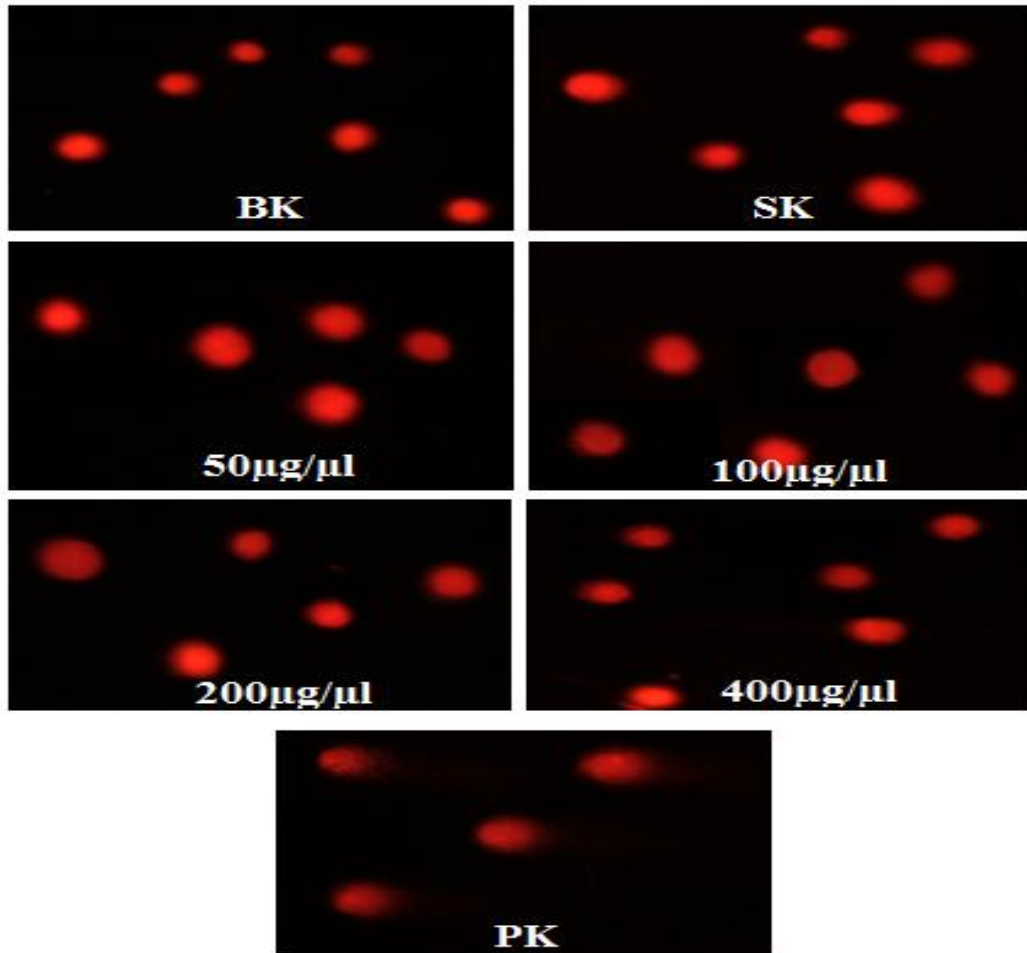
a) BEAS-2B sağlıklı akciğer hücre hatlarında DNA hasar seviyelerinin Comet yöntemi ile belirlenmesi

Elde edilen verilerin ortalama değerleri Çizelge 4.5'de verilmiştir. Eşek sütü uygulamaları gerçekleştirilen *İn vitro* komet testinde elde edilen mikroskopik görüntü örnekleri Şekil 4.15' te gösterilmiştir.

Çizelge 4.5. Eşek sütü maddesinin BEAS-2B sağlıklı hücreler üzerindeki komet uygulamaları, Standart hata: SH

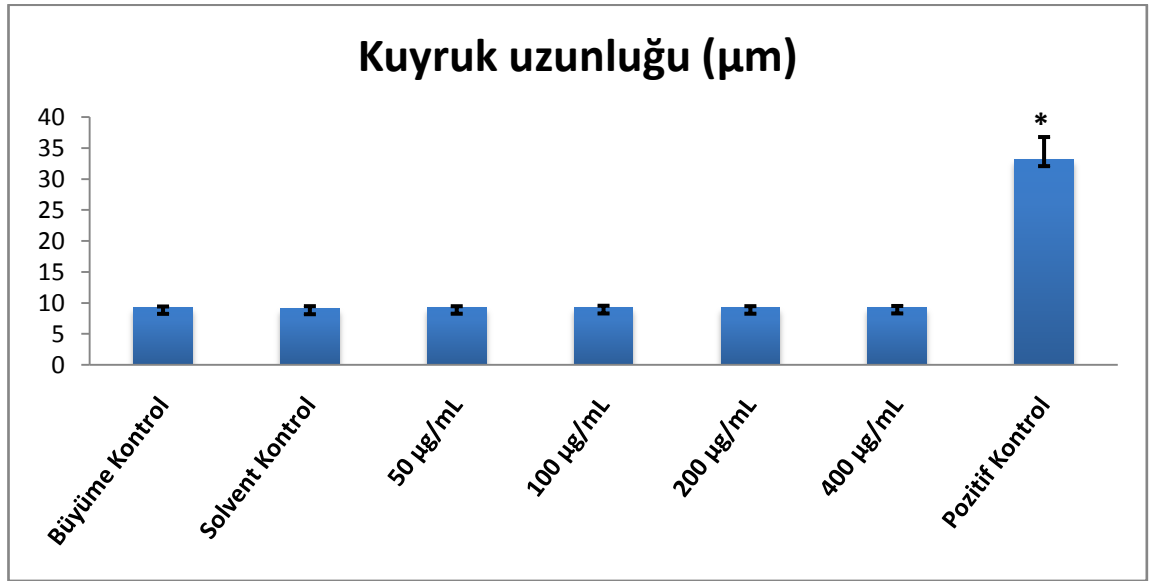
Doz grupları	Kuyruk uzunluğu(μm) \pm SH	Kuyruk %DNA miktarı) \pm SH	Olive kuyruk momentı) \pm SH
BK	9,22 \pm 0,19	15,58 \pm 0,19	2,03 \pm 0,07
SK	9,16 \pm 0,30	17,39 \pm 0,30	2,23 \pm 0,16
50 $\mu\text{g}/\text{mL}$	9,24 \pm 0,21	18,32 \pm 0,21	2,27 \pm 0,12
100 $\mu\text{g}/\text{mL}$	9,28 \pm 0,25	17,14 \pm 25	2,24 \pm 0,12
200 $\mu\text{g}/\text{mL}$	9,24 \pm 0,22	18,33 \pm 0,22	2,32 \pm 0,11
400 $\mu\text{g}/\text{mL}$	9,29 \pm 0,20	23,94 \pm 0,20*	2,74 \pm 0,13
PK	33,06 \pm 3,7*	41,19 \pm 3,70*	12,49 \pm 1,72*

* İstatistiksel anlam düzeyi: $p < 0.05$

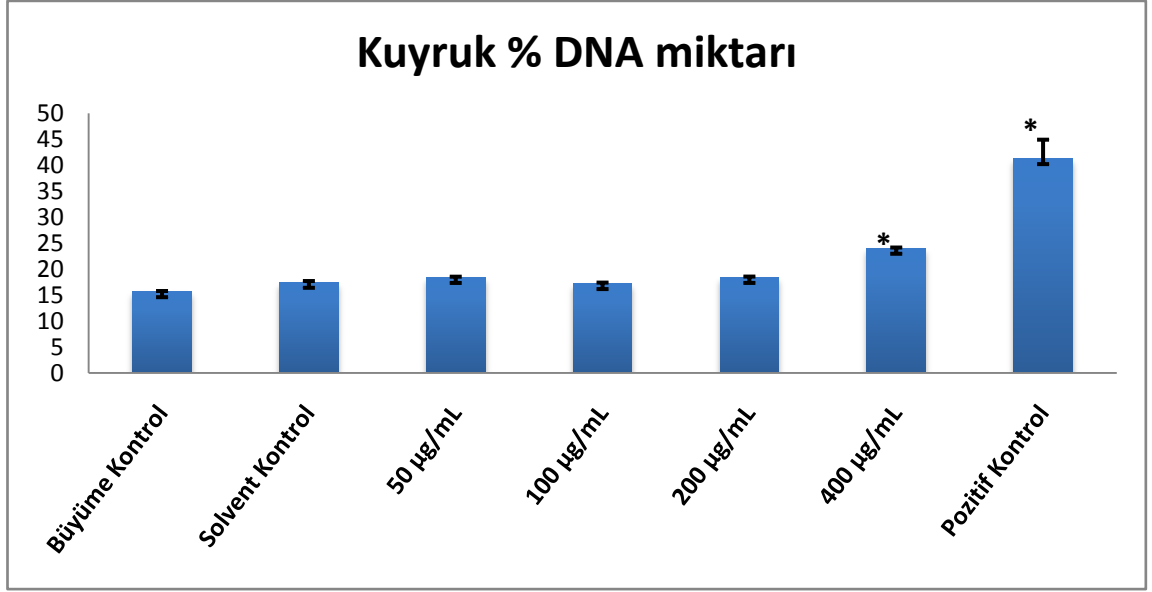


Şekil 4.15. Comet testi sonunda sağlıklı akciğer (BEAS-2B) hücre hatlarında çeşitli konsantrasyonlarda hazırlanan preparatlardan örnek florasan mikroskop görüntüsü (X20).

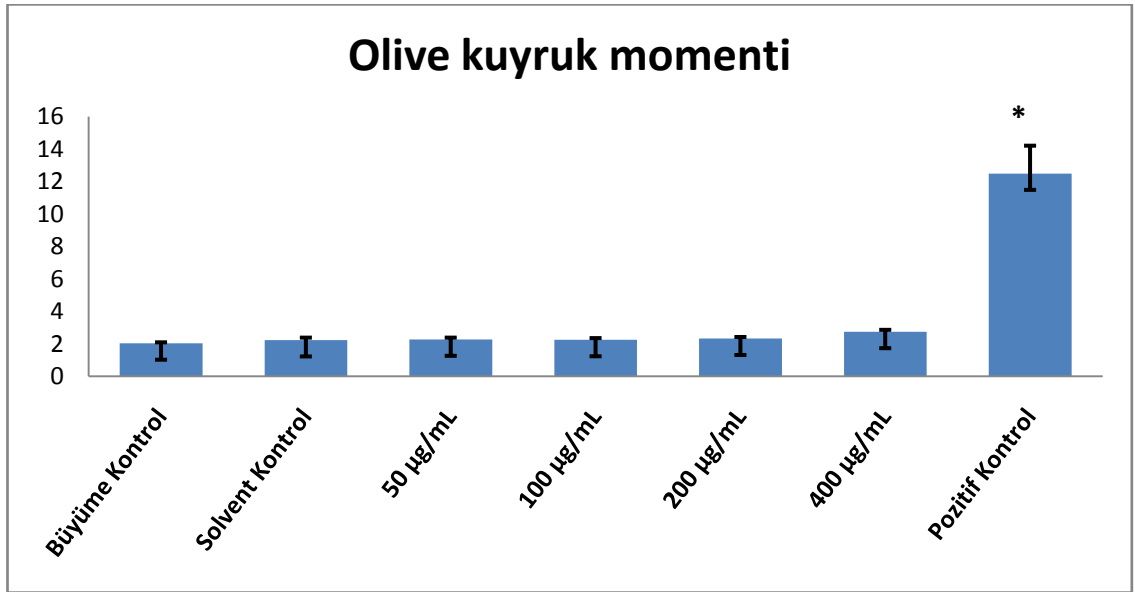
In vitro Comet testinde değerlendirilen parametreler içerisinde Kuyruk uzunluğu değerlerinden elde edilen Şekil 4.16'da gösterilmiştir. Kuyruk uzunluğu değerlerinin istatistiksel analizleri ANOVA ve Tukey HSD testleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ortalama kuyruk uzunluğu değerleri (μm), kontrol grubunda $9,22 \pm 0,19$ μm olarak belirlenmiştir. Kontrol grubuna göre karşılaştırdığımız grupların kuyruk uzunluğu ortalamalarında (SK: $9,16 \pm 0,30$; 50 $\mu\text{g/mL}$: $9,24 \pm 0,21$; 100 $\mu\text{g/mL}$: $9,28 \pm 0,25$; 200 $\mu\text{g/mL}$: $9,24 \pm 0,22$; 400 $\mu\text{g/mL}$: $9,29 \pm 0,20$) anlamlı bir artış saptanmamıştır ($p > 0,05$). Özellikle pozitif kontrol grubunun ($33,06 \pm 3,7$) büyüme kontrole göre kuyruk uzunluğunda anlamlı bir artış olduğu tespit edilmiştir ($p < 0,05$). Pozitif kontrolün DNA üzerinde hasarlara yol açması deneyimizin düzgün çalıştığını göstermektedir. Büyüme kontrol ile en yüksek dozumuz olan 400 $\mu\text{g/mL}$ olan dozumuz arasında herhangi bir farklılık görülmemektedir.



Şekil 4.16. BEAS-2B hücre hattında Comet testi ile belirlenen hasarlı DNA'ların kuyruk uzunluğunun çubuk grafik ile gösterilmesi



Şekil 4.17. BEAS-2B hücre hattında Comet testi ile belirlenen hasarlı DNA'ların kuyruk % DNA miktarı çubuk grafik ile gösterilmesi



Şekil 4.18. BEAS-2B hücre hattında Comet testi ile belirlenen hasarlı DNA'ların Olive kuyruk momenti miktarı çubuk grafik ile gösterilmesi

In vitro komet testinde değerlendirilen bir diğer parametre ise Kuyruk % DNA iğeriği (K.%DNA) parametresidir. K.%DNA değerleri Şekil 4.17' de gösterilmiştir. Ortalama K.%DNA değerleri, kontrol grubunda 15.58 ± 0.19 , Solvent kontrolümüzde grubunda 17.39 ± 0.30 olarak belirlendi. Yine ortalama K.%DNA değerleri, 50 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$, 200 $\mu\text{g/mL}$ ve 400 $\mu\text{g/mL}$ ęeřitli eşek sütü dozlarında ise sırasıyla, 18.32 ± 0.21 ; 23.94 ± 0.20 ; 41.19 ± 3.70 olarak belirlendi. Bu beş grubun kendi aralarındaki istatistiksel karşılaştırmalarında anlamlı düzeyde bir farklılık belirlenemedi ($p > 0.05$).

In vitro komet testinde değerlendirilen son parametre ise Olive Tail Moment (OTM; Olive Kuyruk momenti) parametresidir. OTM değerleri Şekil 4.18' de gösterilmiştir. Ortalama Olive kuyruk momenti değerleri, kontrol grubunda, 2.03 ± 0.07 , Solvent kontrolümüzde 2.23 ± 0.16 olarak belirlendi. Yine ortalama Olive kuyruk momenti değerleri, 50 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$, 200 $\mu\text{g/mL}$ ve 400 $\mu\text{g/mL}$ ęeřitli eşek sütü dozlarında ise sırasıyla, 2.27 ± 0.12 ; 2.24 ± 0.12 ; 2.32 ± 0.11 ve 2.74 ± 0.13 olarak belirlendi. Bu beş grubun kendi aralarındaki istatistiksel karşılaştırmalarında anlamlı düzeyde bir farklılık belirlenemedi ($p > 0.05$).

b) A549 kanserli akciğer hücre hatlarında DNA hasar seviyelerinin komet yöntemleriyle belirlenmesi

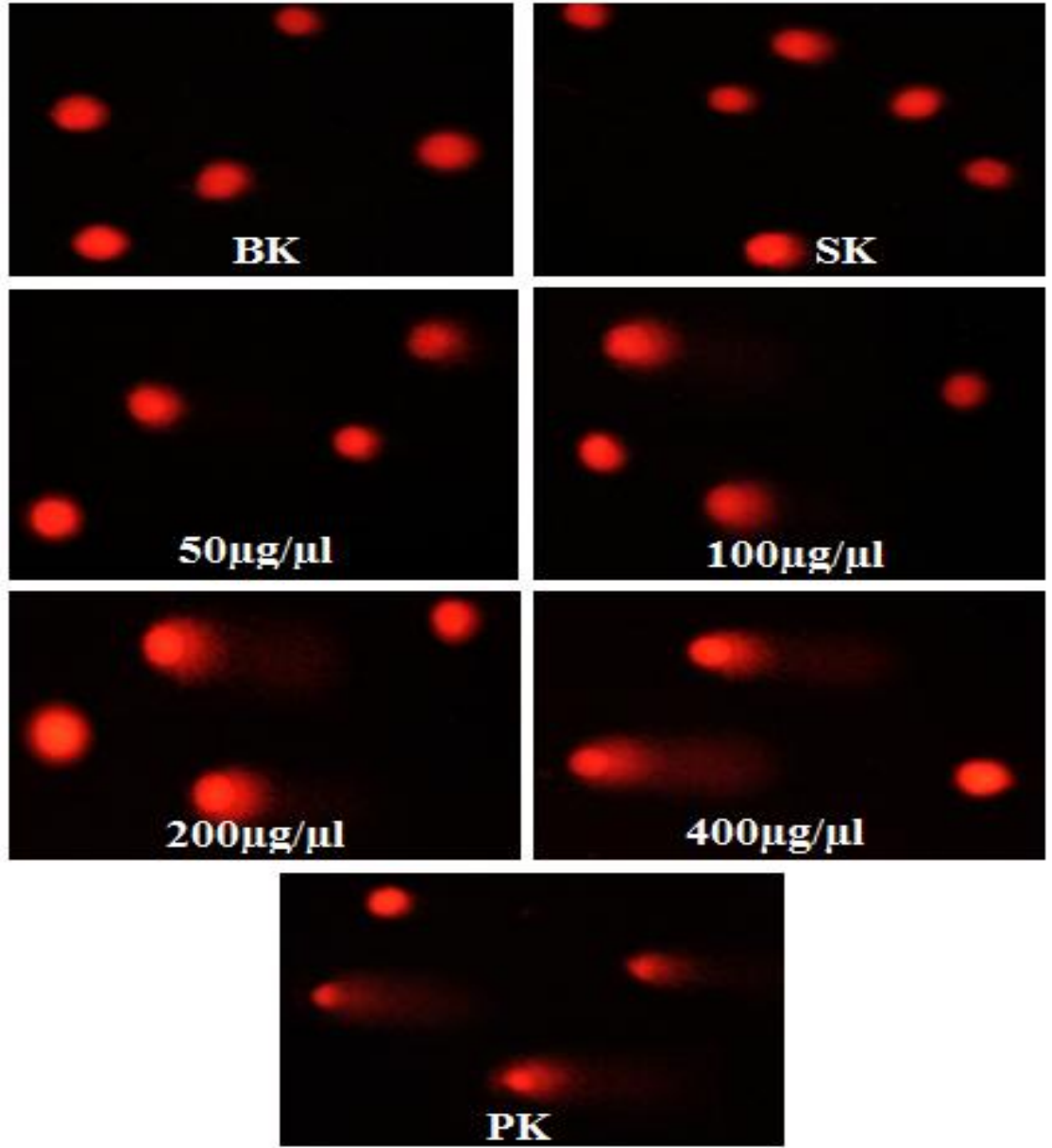
In vitro komet testinde elde edilen bulgular iğerisinden Kuyruk uzunluğu (μm), Kuyruk %DNA (K.%DNA) ve Olive Kuyruk Momenti (OTM; Olive Tail Moment) parametreleri değerlendirilmiştir. Elde edilen verilerin ortalama değerleri izelge 4.6' da verilmiştir. Eşek sütü maddesi ile geręekleřtirilen *In vitro* komet testinde elde edilen mikroskopik görüntü rnekleri Şekil 4.19' da gösterilmiştir.

Çizelge 4.6. Eşek sütü maddesinin A549 kanserli hücreler üzerindeki Comet uygulamaları

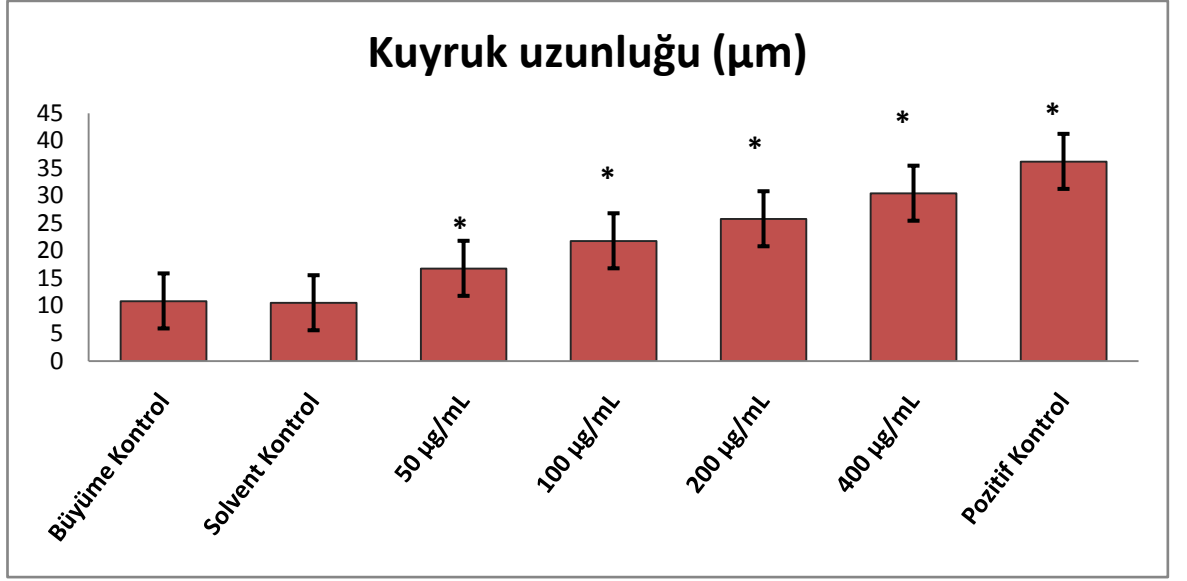
Doz grupları	Kuyruk uzunluğu(µm)±SH	Kuyruk %DNA miktarı)±SH	Olive kuyruk momenti)±SH
BK	10,90±0,34	25,39±2,03	3,06±0,21
SK	10,57±0,23	22,88±1,56	2,71±0,13
50 µg/mL	16,82±1,18*	27,22±1,63	5,23±0,55*
100 µg/mL	21,82±1,77*	29,47±2,14	6,94±0,79*
200 µg/mL	25,82±2,35*	24,82±2,19	7,62±1,08*
400 µg/mL	30,46±2,92*	28,11±2,16	9,21±1,21*
PK	36,24±3,79*	40,81±3,52*	12,75±1,70*

* İstatistiksel anlam düzeyi: p<0.05

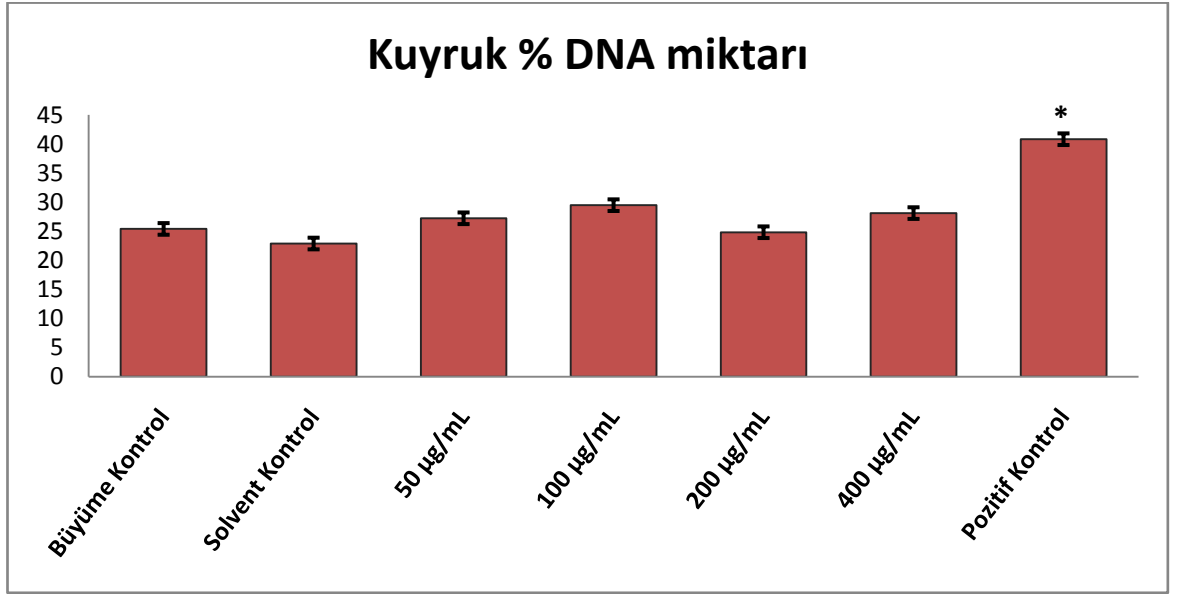
İn vitro komet testinde değerlendirilen parametreler içerisinde Kuyruk uzunluğu(µm) değerlerinden elde edilen Şekil 4.20’de gösterilmiştir. K.U. değerlerinin istatistiksel analizleri ANOVA ve TukeyHSD testleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ortalama K.U. değerleri (µm), kontrol grubunda 10,90±0,34olarak belirlenmiştir. Kontrol grubuna göre karşılaştırdığımız grupların kuyruk uzunluğu ortalamalarında (SK;10,57±0,23) anlamlı bir artış saptanmamıştır (p>0.05). Ancak 50 µg/mL:16,82±1,18,100 µg/mL:21,82±1,77, 200 µg/mL:25,82±2,35, 400 µg/mL:30,46±2,92dozlarımızda kontrol grubuna göre anlamlı bir fark görülmüştür (p<0.05). Pozitif kontrol grubumuzun da büyüme kontrole göre kuyruk uzunluğunda anlamlı bir artış olduğu tespit edilmiştir (p<0.05).



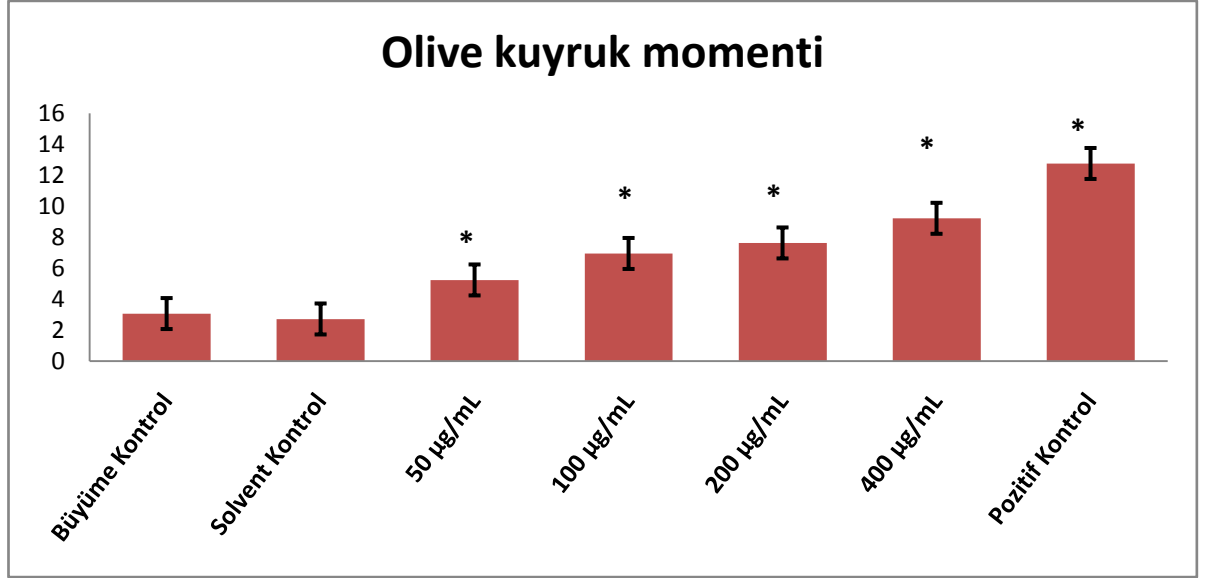
Şekil 4.19. Comet testi sonunda kanserli akciğer (A549) hücre hatlarında çeşitli konsantrasyonlarda hazırlanan preparatlardan örnek florasan mikroskop görüntüsü (X20).



Şekil 4.20. A549 hücre hattında Comet testi ile belirlenen hasarlı DNA'ların kuyruk uzunluğunun gösterilmesi



Şekil 4.21. A549 hücre hattında hasarlı kuyruk % DNA miktarının gösterilmesi



Şekil 4.22. A549 hücre hattında hasarlı DNA'ların Olive kuyruk momentı miktarının gösterilmesi

İn vitro Comet testinde değerlendirilen bir diğer parametre ise Kuyruk % DNA içeriği (K.%DNA) parametresidir. K.%DNA değerleri Şekil 4.21' de gösterilmiştir. Ortalama K.%DNA değerleri, kontrol grubunda, $25,39 \pm 2,03$, Solvent kontrolünde $22,88 \pm 1,56$ olarak belirlendi. Yine diğer ortalama K.%DNA değerleri, 50 µg/mL, 100 µg/mL, 200 µg/mL ve 400 µg/mL çeşitli eşek sütü dozlarında ise sırasıyla, $27,22 \pm 1,63$; $29,47 \pm 2,14$; $24,82 \pm 2,19$; $28,11 \pm 2,16$ olarak belirlendi. Bu dört grubun kontrol grubuna göre istatistiksel karşılaştırmalarında anlamlı düzeyde bir farklılık olmadığı belirlenmiştir ($p > 0,05$).

İn vitro komet testinde değerlendirilen son parametre ise Olive Tail Moment (OTM; Olive Kuyruk momentı) parametresidir. OTM değerleri Şekil 4.22' de gösterilmiştir. Ortalama Olive kuyruk momentı değerleri, kontrol grubunda, $3,06 \pm 0,21$, Solvent kontrolümüzde $2,71 \pm 0,13$ olarak belirlendi. Yine ortalama Olive kuyruk momentı değerleri, 50 µg/mL' de $2,71 \pm 0,13$ dir. SK değerlerimizde anlamlı bir fark görülmemiştir ($p > 0,05$). Diğer doz gruplarımız 50 µg/mL, 100 µg/mL, 200 µg/mL ve 400 µg/mL' deki ortalamamız $5,23 \pm 0,55$; $6,94 \pm 0,79$; $7,62 \pm 1,08$ ve $9,21 \pm 1,21$ olarak bulunmuştur. Bu dört grubun kendi aralarındaki istatistiksel karşılaştırmalarında anlamlı düzeyde bir farklılık belirlenmiştir ($p < 0,05$).

Kuyruk uzunluğu, Kuyruk % DNA miktarı ve Olive kuyruk momentinde solvent kontrol grubumuz üç parametrede de kontrol grubuna göre anlamsız bulunmuştur ($p>0.05$). Yani bizim çözücü olarak kullandığımız etanolün hasarlı DNA üzerisine etkisinin olmadığı tespit edilmiştir.

4.5.Mikronükleus (MN) test bulguları

Yapılan çalışmada kullanılan eşek sütünün genotoksik etkilerinin belirlemek amacıyla karşılaştırmalı olarak BEAS-2B ve A549 hücre hatlarında mikronükleus testi uygulanmıştır. MN preparatlarının değerlendirilmesinde bir, iki, üç ve dört çekirdekli toplam 2000 hücre sayılmış ve iki çekirdekli hücrelerin sayıları 1000'e tamamlanmıştır. Böylece her doz grubu için ‰ mikronükleus frekansı (MN) ve çekirdek bölünme indeksi bulunmuştur. Çalışmada kullanılan eşek sütü konsantrasyonlarının herhangi bir sitotoksik etkisinin olup olmadığını belirlemek amacıyla çekirdek bölünme indeksi değerleri (ÇBİ) hesaplanmıştır.

a) BEAS-2B Sağlıklı akciğer hücre hatlarında mikronükleus testi bulguları

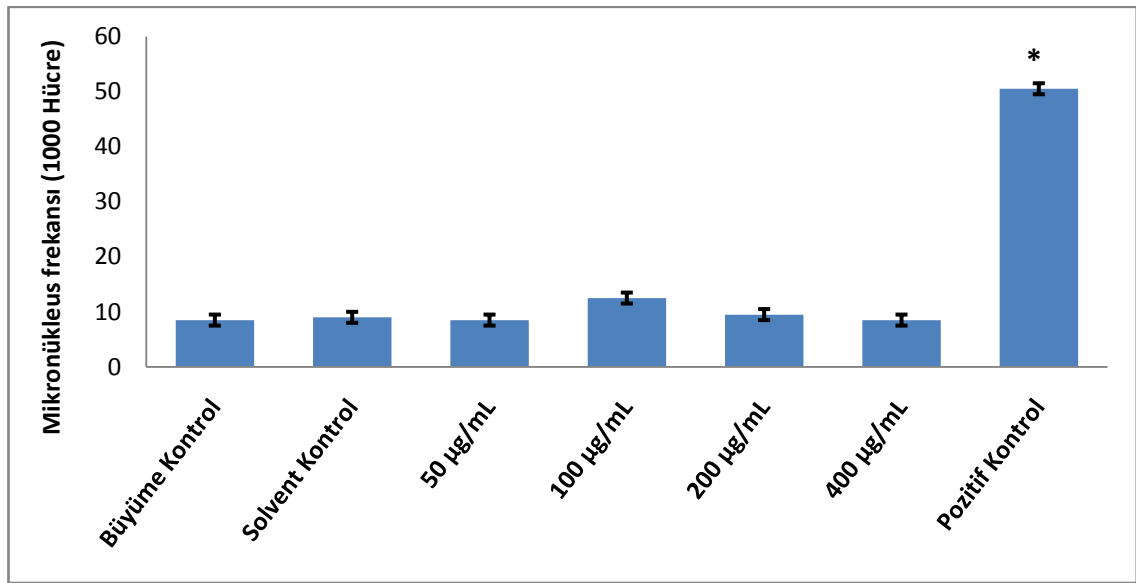
Sağlıklı akciğer hücre hatlarında elde edilen MN frekansı, ÇBİ' i bulguları Çizelge 4.7'de verilmiştir.

Çizelge 4.7. MN testi bulguları. MN; ‰ mikronükleus frekansı, ÇBİ; Çekirdek Bölünme İndeksi, SS; Standart Sapma.

Doz grupları	MN±SS	ÇBİ±SS
Büyüme Kontrol	8,5±0,7	1,95±0,1
Solvent Kontrol	9±2,83	1,96±0,00
50 µg/mL	8,5±0,71	1,94±0,01
100 µg/mL	12,5±0,71	1,95±01
200 µg/mL	9,5±0,70	1,95±00
400 µg/mL	8,5±0,70	1,92±0,0
Pozitif Kontrol	50,5±2,12*	1,41±0,14*

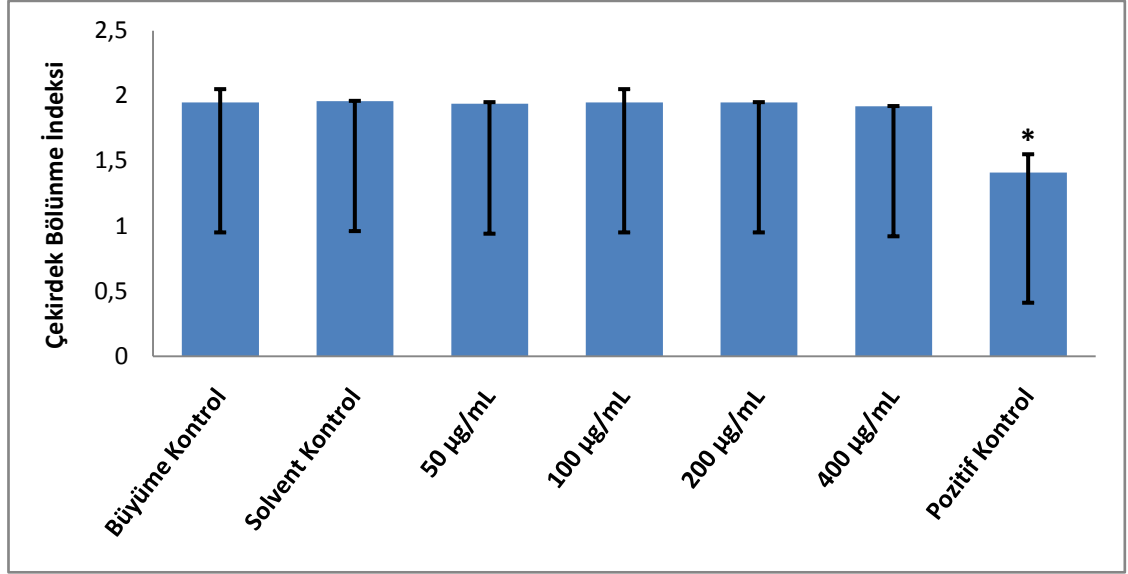
MN frekansı kontrol grubunda $8,5 \pm 0,7$, Pozitif kontrol (H_2O_2) grubunda ise $50,5 \pm 2,12$ olarak belirlenmiştir. $50 \mu\text{g/ml}$; $100 \mu\text{g/ml}$; $200 \mu\text{g/ml}$; $400 \mu\text{g/ml}$; uygulamalarında ise sırasıyla $8,5 \pm 0,71$; $12,5 \pm 0,71$; $9,5 \pm 0,70$; $8,5 \pm 0,70$ olarak belirlenmiştir.

Bu verilerden elde edilen MN testi bulguları Şekil 4.23'de verilmiştir. Doz artışına bağlı olarak, sağlıklı hücrelerde MN frekansı $P > 0,05$ düzeyinde anlamlı bir artış göstermediği görülmüştür. Pozitif kontrolümüz hidrojen peroksitte büyüme kontrole göre anlamlı bir azalış göstermiştir. ($p < 0,05$).



Şekil 4.23. MN testi bulguları. İki çekirdekli 1000 hücredeki MN sayısı(‰) (Büyüme kontrole göre fark * $P < 0,05$)

Çalışmada kullanılan eşek sütü konsantrasyonlarının herhangi bir sitotoksik etkisinin olup olmadığını belirlemek amacıyla çekirdek bölünme indeksi değerleri (ÇBİ) hesaplanmıştır. MN testi ÇBİ bulguları Şekil 4.24'de gösterilmiştir.



Şekil 4.24.MN testi çekirdek bölünme indeksi bulguları ($P<0.05$)

Pozitif kontrol grubunun ÇBİ değeri kontrol grubuna göre $P<0.05$ düzeyinde anlamlı bir azalma göstererek $1,41\pm 0,14$ ' e düşmüştür. Ancak doz artışına bağlı olarak ÇBİ değerleri, kontrol grubuna göre $P<0.05$ düzeyinde anlamlı bir düşüş göstermemiştir ($P>0.05$).

b) A549 kanserli akciğer hücre hatlarında mikronükleus testi bulguları

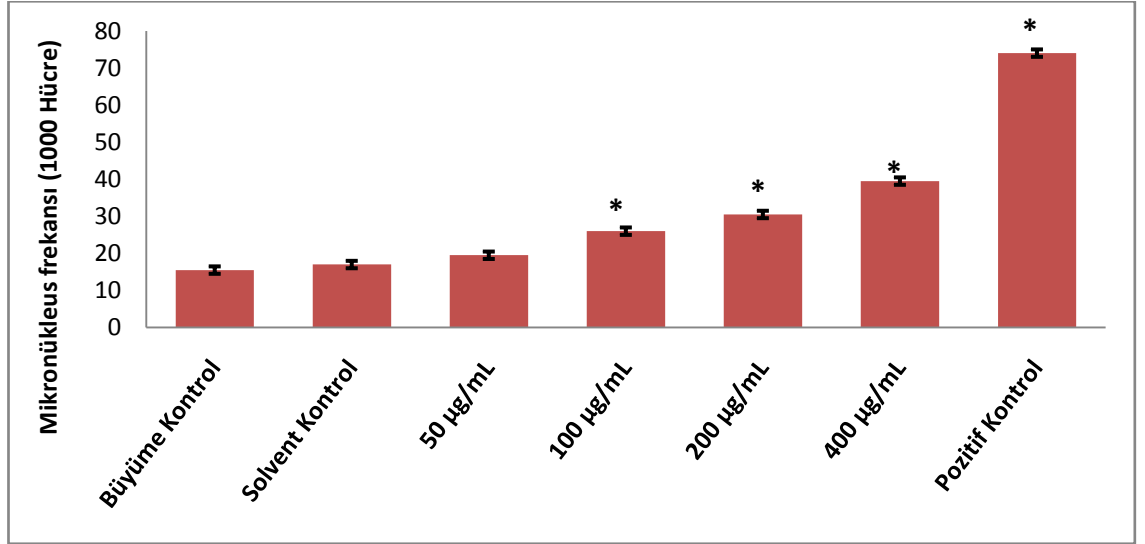
Kanserli akciğer hücre hatlarında elde edilen MN frekansı, ÇBİ' i bulguları Çizelge 4.8'de verilmiştir.

Çizelge 4.8. A549 hücre hatlarında MN testi bulguları. MN; % mikronükleus frekansı, ÇBİ; Çekirdek Bölünme İndeksi, SS; Standart Sapma.

Doz grupları	MN±SS	ÇBİ±SS
Büyüme Kontrol	15,5±2,12	1,94±0,14
Solvent Kontrol	17±1,41	1,91±0,15
50 µg/mL	19,5±0,70	1,85±0,1
100 µg/mL	26±2,83*	1,83±0,13
200 µg/mL	30,5±0,71*	1,81±0,1
400 µg/mL	39,5±3,54*	1,76±0,1
Pozitif Kontrol	74±2,83*	1,31±0,14*

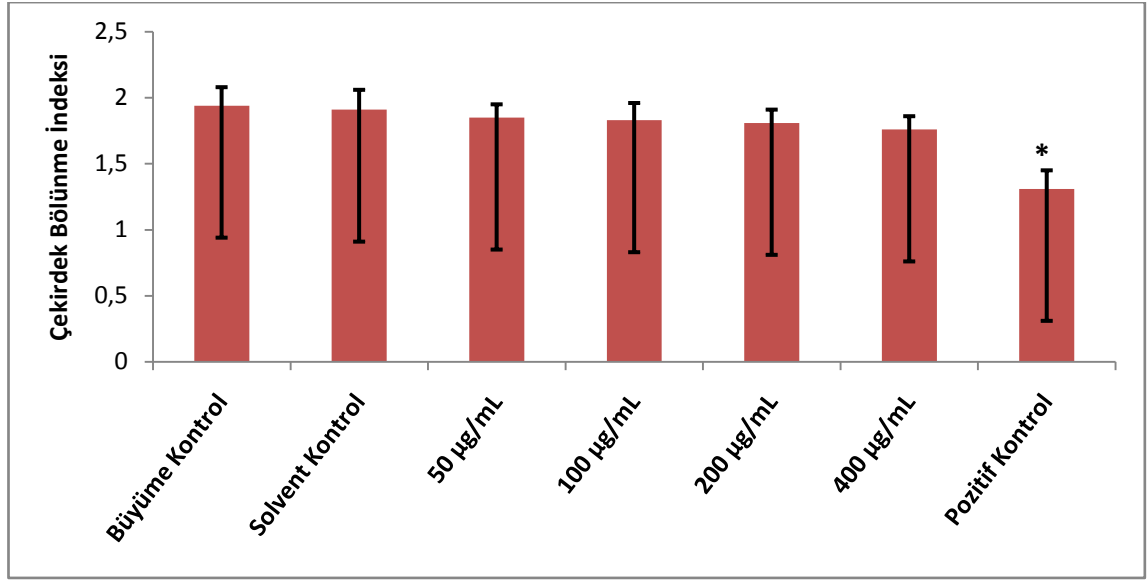
MN frekansı kontrol grubunda $15,5 \pm 2,12$, Pozitif kontrol (H_2O_2) grubunda ise $74 \pm 2,83$ olarak belirlenmiştir. Büyüme kontrole göre SK ve $50 \mu\text{g/ml}$ dozlarda önemli bir farklılık gözlenmemiştir ($P > 0,05$). $100 \mu\text{g/ml}$; $200 \mu\text{g/ml}$; $400 \mu\text{g/ml}$; uygulamalarında ise sırasıyla $26 \pm 2,83$; $30,5 \pm 0,71$; $39,5 \pm 3,54$ olarak belirlenmiştir.

Bu verilerden elde edilen MN testi bulguları Şekil 4.25’de verilmiştir. Doz artışına bağlı olarak, kanserli hücrelerde MN frekansı $P < 0,05$ düzeyinde anlamlı bir artış gösterdiği görülmüştür. Pozitif kontrolümüz hidrojen peroksitte büyüme kontrole göre anlamlı bir azalış göstermiştir. ($p < 0,05$).



Şekil 4.25. A549 MN testi bulguları. İki çekirdekli 1000 hücredeki MN sayısı(‰) (Büyüme kontrole göre fark $*P < 0,05$)

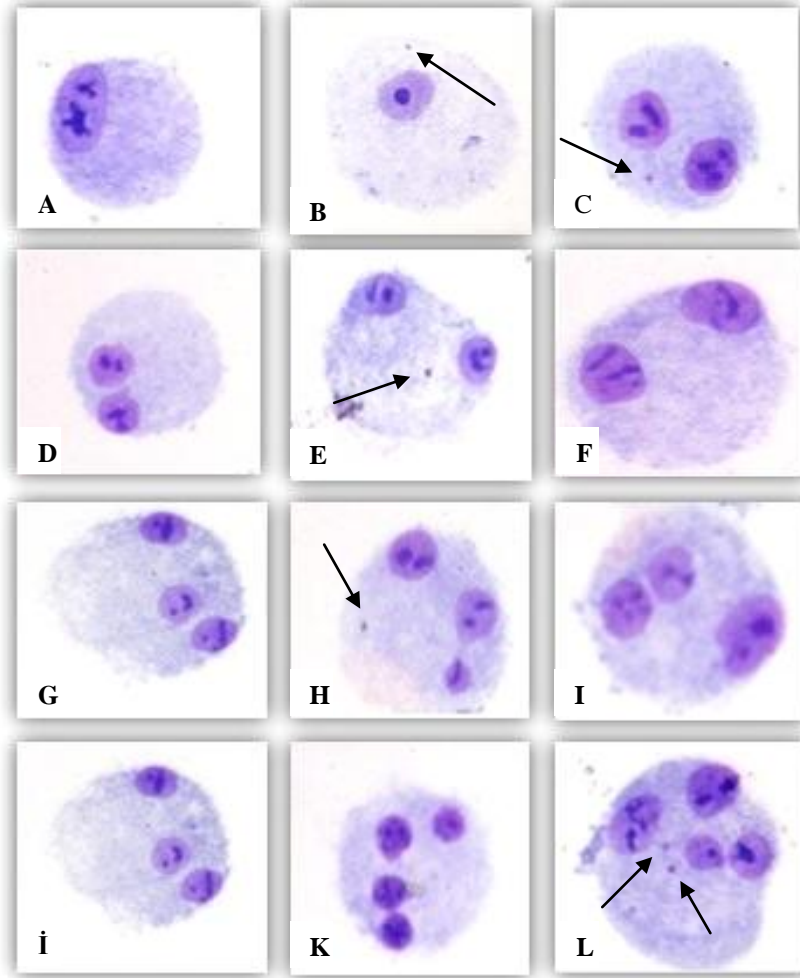
Çalışmada kullanılan eşek sütü konsantrasyonlarının herhangi bir sitotoksik etkisinin olup olmadığını belirlemek amacıyla çekirdek bölünme indeks değerleri (ÇBİ) hesaplanmıştır. A549 hücre hattı MN testi ÇBİ bulguları Şekil 4.26’da gösterilmiştir



Şekil 4.26. A549 MN testi çekirdek bölünme indeksi bulguları ($P < 0.05$)

Pozitif kontrol grubunun ÇBİ değeri kontrol grubuna göre $P < 0.05$ düzeyinde anlamlı bir azalma göstererek $1,31 \pm 0,14$ e düşmüştür. Ancak doza artışına bağlı olarak ÇBİ değerleri, kontrol grubuna göre $P < 0.05$ düzeyinde anlamlı bir düşüş göstermemiştir ($P > 0.05$).

Eşek sütü uygulaması sonucu A549 hücre hattında oluşan oluşan mikronükleus örnekleri Şekil 4.27’de verilmiştir



Şekil 4.27. MN testi preparatlarından elde edilen mikroskopik görüntü örnekleri (20X)
A. Bir çekirdekli hücre B. Bir çekirdekli hücre bir MN C. İki çekirdekli hücre bir MND.
İki çekirdekli hücre E. İki çekirdekli hücre bir MN F. İki çekirdekli hücre G. Üç
çekirdekli hücre H. Üç çekirdekli hücre bir MN I. Üç çekirdekli hücre İ. Üç çekirdekli
hücre K. Dört çekirdekli hücre L. Dört çekirdekli hücre iki MN

TARTIŞMA ve SONUÇ:

Süt; yeni dünyaya gelmiş bir bebeğin çeşitli fonksiyonlarının gelişmesine kadar, gelişme ve büyümesini devam ettirmek için gerekli olan tüm ihtiyaçların karşılandığı özel bir sıvıdır. Bu özel sıvı çocuğunun yaşına ve durumuna göre anne tarafından ayarlanmaktadır. İnsan yaşamının her aşamasında gerekli olan süt özel hazırlanmış, özel maddeler içeren bir formüldür. Özellikle son günlerde süt tüketimi ve üretimi, süt içerisindeki proteinlerinin çeşitli alanlarda çeşitli amaçlar için kullanımı artmıştır. Bu özel sıvılar içerisinde günümüze kadar en önemli sütün anne sütü olduğu bilinmektedir. Anne sütünün protein, vitamin ve mineral yönünden zengin olması nedeniyle tüm sütler içinde özel bir yeri vardır. Ancak yapılan araştırmalarda eşek sütünün zengin bileşimi ile anne sütüne yakın, hatta bazı özellikler ile üstün içeriklere sahip olduğu görülmüştür.

Eşek sütü eski çağlardan itibaren birçok hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır. Özellikle günümüzde halk arasında eşek sütünün kanser tedavisinde kullanıldığı dile getirilmekte ancak birkaç bilimsel çalışma dışında kanser hücrelerine etkisi çok bilinmemektedir. Eşek sütünün tedavideki üstünlüğü içerisindeki kalsiyum, lizozim, laktoferrin, α -laktalbümin, serum albümin, immüoglobülinler, Omega-3 (α -linolenik asit), Omega-6 (linolenik asit) yağ asitlerinin diğer sütlere oranla fazlaca bulunmasından kaynaklanabilir olduğu değerlendirilmektedir (Şekil 2.3-Şekil 2.4).

Süt ve süt proteinleri ile birçok araştırma yapılmıştır. Yapılan bu çalışmalarda özellikle sütün içerisinde bulunan peynir altı suyu proteinlerinin etkileri ön plana çıkmıştır. Sütteki kazeinin çöktürmesi sonucunda elde edilen sıvı kısım peyniraltı suyudur. Elde edilen zengin protein içeriği ile peyniraltı suyu; yüksek miktarda laktoz, düşük miktarda mineral madde, vitamin, protein ve çok az miktarda da süt yağını içermektedir. Bununla beraber sütün içerisinde yüksek miktarda sülfür içeren aminoasitlerin bulunması antioksidan aktiviteyi desteklenmektedir (Smithers ve ark. 2008).

Bu proteinlerin immun yanıtı destekleyici özellikleri, oksidan sistemin oluşturacağı olumsuz etkileri ortadan kaldırdığı, bakteri gelişimini engellediği, ağız sağlığı gibi insan sağlığını korumadaki olumlu etkilerini bilinmektedir. Ayrıca bunun yanında çeşitli

kanser türlerinde (meme kanseri, prostat, kolon ve uterus kanseri gibi.) antikarsinojenik etkisi gösterilmektedir (Lothian 2000).

Süt incelendiğinde bütün bu etkilerinin çoğunun peyniraltı suyunda bulunan proteinlerden kaynaklandığı görülmektedir. Bunların yanı sıra eşek sütünde mineraller içerisinde yüksek oranda bulunan kalsiyum oranı anne sütüne oranla iki kat fazla bulunmaktadır (Nikkah 2011). Eşek sütünde yüksek miktarda bulunan kalsiyumun kolon kanseri tedavisinde koruyucu etkileri olduğu bildirilmektedir (Marcus ve ark. 1998). New York Kanser Araştırma Merkezi tarafından incelenen kanser hastalarında süt içenlerde kanser gelişiminin gerilediği bu etkiyi ise kalsiyumdan kaynaklanabileceği bildirilmiştir (Aydın 2012).

Sütte bulunan diğer önemli bir bileşik doymamış yağ asitleridir. Eşek sütünde anne ve inek sütlerine kıyasla çok fazla doymamış yağ asitleri bulunmaktadır (Çizelge 2.3). Bu yağ asitlerinin içerdiği bileşiklerin hayvanlarda kanser hücrelerini bloke edebildiğini, Omega-3 yağ asitleri ise özellikle göğüs kanseri olmak üzere, kalın bağırsak ve prostat kanserlerinde tümör gelişimini azalttığı, kanser hücrelerindeki bu hasarı yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucu oluşan toksik bileşiklerden kaynaklandığı gösterilmiştir (Pigott ve Tucke 1990).

Peyniraltı suyu proteinlerinin tamamının antikarsinojenik etki gösterdiği bildirilmiştir.(Karagözlü ve Bayerer 2004). Peynir altında bulunan proteinler; α -laktalbümin, β -laktoglobülin, Lizozim, Laktoferrin, Serum albümin ve İmmünoglobülinlerdir (Çizelge 2.4). Sütte peyniraltı suyunda bulunan proteinler dışında kazein proteini mevcuttur. Kazein proteinlerinin kanser hücreleri üzerindeki sitotoksitesi peynir altı suyu proteinlerine ile karşılaştırıldığında daha az etkisinin olduğu görülmüştür (Bounous ve ark. 1988).

Peyniraltı suyu proteinlerinin içersinde yaklaşık %50' sini oluşturan (Çizelge 2.4) β -laktoglobülin proteindir. Sisteince zengin olan bu protein glutasyonun üretimini teşvik eder. İmmün sistemin çalışmasını teşvik ederek glutasyon yabancı maddelerin parçalanmasından sorumlu olup bağırsak tümörlerine karşı koruyucu etki gösterdiği bilinmektedir (Bounous ve ark. 1991).

Özellikle eşek sütünün serum proteinlerinde diğer sütlere oranla laktoferrin yüksek miktarda bulunmaktadır (Çizelge 2.4) Her derde deva özellikleri olan bu protein demir bağlama özelliğine sahip olup hücrelerin zarar görmesini engeller. İnsan göğüs kanseri (HS578T ve T47D) hücreleri ile muamele edilen laktoferrinin hücrelerin çoğalma hızını azalttığı ve büyümesini engellediği bildirilmiştir (Duarte ve ark. 2011). Brink 2001' de yapmış olduğu çalışmada çeşitli ajanların farelerde oluşturdukları toksik etkisinin laktoferrinle azaltılarak, ayrıca tümörlerin beslenmesi için gerekli olan kan damarlarının oluşumunu bloke ettiğini bildirmiştir. Laktoferrinin deneysel olarak kimyasal yol ile oluşturulan karaciğer, özafagus ve kolon tümörlerini baskıladığı bildirilmiştir (Reghunathan ve ark. 2005). Özellikle kemoterapi gören farelerde humoral ve hücrel immun cevabı hızlandırdığı, ayrıca bağırsak epitel hücrelerinde İnterlökin 1-8 (İL-1-8), sindirim kanalı duvarında, yüzeysel epitel tabakası ile altındaki kas tabakası arasında yer alan bağ dokusu tabakası hücrelerinde İnterferon- γ (İNF- γ), bağırsak mukozasında T lenfositleri (CD4+, CD8+) ve Naturel killer (NK) hücrelerinin üretimini arttırmıştır (Kuhara ve ark. 2000, Wang ve ark. 2000, Artym ve ark. 2005).

Eşek sütünde bulunan diğer önemli bir protein α -laktalbümindir. Yapılan bir çalışmada anne sütündeki α -laktalbümin formları ile oleik asit kompleksi HAMLET olarak adlandırılmıştır. HAMLET (**Human α -laktalbumin made lethal to tümör cells**) molekülünün tümör hücrelerinde apoptozise sürüklediği, ancak bunu yaparken de sağlıklı hücrelere olumsuz etki etmediği gözlenmiştir. HAMLET molekülünün tümör hücrelerinde tümörü ortadan kaldırması ve bunu sağlıklı hücrelere zarar vermeden gerçekleştirmesi molekülün önemini ortaya koymaktadır. (Mok ve ark. 2007).

Eşek sütündeki yüksek miktardaki bulunan lizozimin yukarıda bahsedilenler dışında bir çok fizyolojik etkisi vardır. Virüslerin inhibe edilmesinde, bağışıklık düzenleyici aktiviteye sahip olması, anti-inflamatuar ve anti-tümörel aktiviteye sahip olduğu bildirilmektedir (Ibrahim ve Aoki. 2003). Tavuk yumurta akı, deniz bakterisi ve köpek balığı kıkırdağından elde edilen lizozim etkili kanserli hücrelerin beslenmesini sağlayan damarların gelişimini etkilediği ve anti-tümör etkileri sahip olduğunu göstermiştir (Jiao ve ark. 2004, Sava 1989, Ye ve ark. 2008). Buna ek olarak, lizozim birçok fizyolojik etkiye sahiptir. Çeşitli çalışmalarda tavuk yumurta akı ve köpek balığının kıkırdağından elde edilen lizozim etkili anjiyogenik inhibisyonu ve anti-tümör aktiviteleri sahip olduğu bildirilmiştir (Ibrahim ve Aoki. 2003). Tavuk yumurtasının beyazında bulunan lizozim içeriği B16 melanoma taşıyan farelerde oral uygulama ile uygulandığında önemli bir şekilde spontan metastaz oluşumunu azalttığı belirtilmektedir (Sava 1989). Hem in vitro hem de in vivo olarak anti-tümör ve antiyojenez araştırması deniz kaynaklı lizozimlerin özellikle farelerde endotel hücrelerin tümör büyümesi (ECV304) proliferasyonunu inhibe etmiştir (Ye ve ark. 2008).

Mao ve ark. (2009)' nın yapmış oldukları çalışmada eşek sütünün bileşenlerini çeşitli fraksiyonlara ayırarak kanserli (A549) hücre hatlarında anti-proliferatif ve anti-tümör etkilerini incelemişlerdir. Bu çalışmada eşek sütü I. Yağsız süt, II. Kazein III. Peyniraltı suyu (Eşek sütündeki Whey proteinleri), IV. Whey proteinlerinden molekül kütlesi 10 kDa' dan daha büyük olanlar, V. Eşek sütü peynir altı suyu proteinlerinden 10 kDa ve 3 kDa arasında olanlar, VI. Eşek sütü peyniraltı suyu proteinlerinden 3 kDa' dan daha küçük olanlar şeklinde altı fraksiyona ayrılmıştır. 800 mg/mL' lik konsantrasyonlarda fraksiyonların büyümeye etkisi araştırılmıştır. En etkili fraksiyonun hücre proliferasyonunda % 52,2 olarak Fraksiyon-IV olarak bulmuştur. Fraksiyon-IV ile yapılan çalışmada eşek sütünün anti-tümör etkisinin mekanizması iki şekilde olduğu açıklanmıştır. İmmün artırıcı etkisiyle bağışıklık geliştirme ya da tümör hücrelerini apoptoz yoluyla yok etmektedir. Bu çalışmada A549 tümör hücrelerinin çoğalması vefarklılaşmasını önleyen TNF- α , IL-a, IFN-y, IL-6, IL-1 β sitokinlerin üretimini uyarma kapasitesine sahip olduğu gözlenmiştir. Yapılan bu çalışmada fraksiyonların lizozim içerikleri tespit edilmiştir. Fraksiyon I,II,III,IV,V ve VI' nın lizozim içeriği sırası ile

9.21, 0.32, 26.83, 42.82, 2.32 ve 0.21 bulunmuştur. Fraksiyon-IV' ün anti-tümör etkisinin içersindeki lizozim enziminin neden olduğu değerlendirilmiştir.

Süt içersindeki bazı proteinlerinin etkilerinin belirlenmesine yönelik çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Bütün bu içerimlere sahip eşek sütü hakkında herhangi bir genotoksik çalışma yapılmamıştır. Bu nedenle kanser hücrelerinin ölümüne sebep olan süt içinde bulunan kalsiyum, omega-3 omega-6, yüksek miktarda bulunan laktoferrin ve lizozimden oluşan eşek sütünün, bir bütün olarak ele alınıp kanser modellerinde etkilerinin belirlenmesine yönelik yapılacak çalışmaların tedavi amaçlı umut verici potansiyel sonuçlar taşıdığı ve bu nedenle önemli olduğu düşünülmektedir.

Bu amaçla çalışmamızda, eşek sütü'nün sitotoksik ve genotoksik etkileri sağlıklı insan akciğer (BEAS-2B) ve kanserli insan akciğer (A549) hücre hatları üzerine karşılaştırmalı *in vitro* olarak Klojenik, WST-1, XTT, Comet ve Mikronükleus yöntemleri kullanılarak araştırılmıştır. Yapmış olduğumuz çalışmamızda kullanmış olduğumuz tüm yöntemlerle eşek sütünün, BEAS-2B ve A549 hücrelerinde 24 saat doz uygulamalarında anti-proliferatif etkisi belirlenmiştir. Çalışmalarımız sonucunda düşük dozlardaki eşek sütünün (50, 100, 200, 400 µg/mL) A549 hücrelerinde proliferasyonunu engellediği gözlenmiştir.

Bununla birlikte sağlıklı akciğer (BEAS-2B) hücre hatlarında Klonojenik, WST-1 ve XTT testi sonuçlarına göre elde edilen IC₅₀ değerleri birbirine uyumlu olarak bulunmuş ve aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı ortaya konulmuştur. Kanserli hücrelerin IC₅₀ değerleri de birbiriyle uyumlu bulunmuştur. Bu sonuçlar değerlendirildiğinde, eşek sütünün deneyimizde kullanmış olduğumuz dozlarında A549 (kanserli akciğer) hücre hatları için sitotoksikiteye sahipken aynı doz gruplarında BEAS-2B (sağlıklı akciğer) hücre hatları için sitotoksikiteyi göstermediği tespit edilmiştir.

Eşek sütünün sağlıklı hücrelere minimum zarar veren dozları (50, 100, 200 ve 400 µg/mL) göz önüne alınarak genotoksik etkilerini sağlıklı ve kanser hücreleri üzerinde karşılaştırmalı olarak belirlemek amacıyla Tek hücre jel elektroforez (COMET) ve Mikronükleus (MN) yöntemleri kullanılmıştır. Comet testi sonucunda, tamamen doğal

bir madde olan eşek sütünün A549 kanser hücresi üzerinde doza bağlı olarak DNA hasarına yol ağtığı gözlenmiştir. Ayrıca kromozomal kırıkları gösteren Mikronükleus testi sonucunda ise ‰ Mikronükleus frekansında istatistiksel olarak artış tespit edilmiştir ($p<0.05$). Ancak Comet ve MN testinde sağlıklı (BEAS-2B) hücre hattında istatistiksel olarak önemli bir değişim gözlenmemiştir.

Sonuç olarak; Eşek sütünün önemli ölçüde sağlıklı akciğer hücrelerinde toksik etki göstermeden seçici davranarak akciğer kanser hücrelerinin büyümesini inhibe ettiği görülmüştür. Eşek sütünün sağlıklı hücrelere zarar vermeyen dozlarında, kanser hücreleri üzerinde doza bağlı olarak DNA hasarına yol ağtığı belirlenmiştir. Eşek sütünün, akciğer kanseri tedavisinde kullanılabilecek doğal bir madde olduğu değerlendirilmektedir.

EK 1: Naturasin firmasından gelen eşek sütünün içerik bilgileri

Technical Data Sheet

Product: Lyophilized and Pasteurized Donkey Milk 11:1

Presentation	Powder
Colour	Cream white
Preservatives	Absent
Fat (%)	2 - 10
Acidity (°T)	1,5 - 6
Protein (%)	> 14
pH	6,5 - 7,5
Dispersibility (s)	30 - 35
Humidity (%)	< 5
Additives	Absent

Due date: Two years from the date of packaging

Packaging: Packaging in ATM (modified atmosphere) of 0.5 kg

Storage: should be done at a temperature of 10-20 ° C in a dry place.

Handling: the opening of the bags must be in clean room. After opening the package, its use should be immediate.

Donkey Milk is a product 100 % of Portuguese origin, with origin in the asinine indigenous breed *Raça Asinina de Miranda*.

There are scientific studies about Donkey Milk that prove it as the best substitute of the motherly milk. A study done in the University of Annunziata in Italy, referring to the structure of the Donkey Milk of the breed *Ragusa*, proving that in this milk contains more polyunsaturated fat acids that on the most of the other milking animals, rounding 17 %. These acids are of the family of the omegas containing from two to six double connections.

The energetic brutish value of the Donkey Milk is 1708 kJ for kg.

Having in attention the necessity of an extended term of validity for this sensitive product, not losing sight of a handling easiness, it was opted for the lyophilisation of the product. This mechanical process, on the contrary of the usual processes, does not use the high temperatures for the dehydration of the milk, allowing that the proteins, the most important factor of the milk, do not denature, allowing so a product of high quality, with all the characteristics of the fresh milk.

The Donkey Milk, due to all his constituents, it is susceptible of several applications:

1. Cosmetic (toilet soaps, shampoos, bath gel, hydration creams, etc.)
2. Food (Milk Substitute, etc.)
3. Food supplements

Important to refer that the Donkey Milk is what more is likened to the human milk by his composition, being richer in albumin, casein and salts, more poor in fat and with a quantity of sugar perceptibly equally.

Donkey Milk Constituent Information

Constituent	Average Quantity (g.100g ⁻¹ of milk)
Dry Material (SNG [*])	8.84
Fat	0.38
Protein	1.72
Lactose	6.88
Ashes	0.39

Source: Chiofalo et al (2004)

* Non fat Solids

Microelements	Average Quantity (mg.g ⁻¹ of milk)
Calcium	0.6767
Phosphorus	0.4870
Potassium	0.4972
Sodium	0.2183
Magnesium	0.0373
Chloride	0.3367

Source: Chiofalo et al (2004)

Azotes fractions	Average Quantity (g.100g ⁻¹ of milk)
Casein	0.87
Whey Protein	0.68
NPN ^{**}	0.29

Fonte: Chiofalo et al (2004)

** Non Protein Nitrogen

1. IDENTIFICATION	
	DONKEY MILK
Supplier	Naturasin, Lda Largo do Lagar, nº 7 7490-051 Cabeção - Portugal
Email	geral@naturasin.pt
2. HAZARDS IDENTIFICATION	
	Donkey Milk Powder
3. COMPOSITION/ INFORMATION ON INGREDIENTS	
Description	Powered Milk INCI: Donkey Milk
Hazards components	None
Additives	None
4. FIRST AID MEASURES	
Eye contact	No danger, flush eyes with water.
Skin contact	No danger
Ingestion	No danger
5. FIRE FIGHTING MEASURES	
Special risks	None identified
Extinguishing Media	Water or dry chemical
6. ACCIDENTAL RELEASE MEASURES	
Individual precautions	No special measures are necessary
Environmental precautions	No special measures are necessary
Clean up procedure	Discharge into sewer
7. HANDLING AND STORAGE	
Handling	Observe good industrial hygiene practices
Conditions for storage	Should be done at a temperature of 10 - 20° C in a dry place in original packaging. Protect from direct heat sources
8. EXPOSURE CONTROLS AND PERSONAL PROTECTION	
	No special equipment is necessary

9. PHYSICAL AND CHEMICAL PROPERTIES

Appearance	Powder
Colour	Cream white, slightly yellow
Odor	Characteristic
pH (state on delivery)	6- 8
Flash point	Non combustible
Explosion characteristics	Not applicable
Solubility	Soluble in water, oils and organic solvents

10. STABILITY AND REACTIVITY

Stability of the product	Stable when handled and stored as recommended
Hazardous reactions	None
Hazardous decomposition products	None

11. TOXICOLOGICAL INFORMATION

Acute toxicity	No known toxicity
Local effects	No known toxicity

12. ECOLOGICAL INFORMATION

Biodegradable product

13. INFORMATION CONCERNING DISPOSAL

Disposal of residues	Disposal must be in accordance with local regulations
Solled packaging	According local regulations

14. TRANSPORTATION INFORMATION

Not classified as dangerous substance under IMDG or ADR

15. REGULATION INFORMATION

Labelling according to EC directives

16. OTHER INFORMATION

The information contained herein is furnished without warranty of any kind. Employers should use this information only as a supplement to other information gathered by them and must make independent determinations of suitability and completeness of information from all sources to assure proper use

KAYNAKLAR

- Acharya, K.R., Ren, J., Stuart, D.I, Phillips, D.C., Fenna, R.E. 1991.** Crystal structure of human α -lactalbumin at 1.7 Å resolution. *J. mol. biol.* 221: 571-581.
- Aldridge, W.N., 1993.** The biochemical principles of toxicology. *Exp. Toxicol* ;5:56-78.
- Artym, J., Zimecki, M., Kruyszko, J., Kruzel, M.L., 2005.** Lactoferrin accelerates reconstitution of the humoral and cellular immune response during chemotherapy-induced immunosuppression and bone marrow transplant in mice. *Stem Cell Dev* ; 14: 548-555.
- Andrea, C., Vincenzo, C., Salvatore, B., Anna, M. G., Rosaria, S., Antonio, Z. 2009.** Donkeys' milk protein fraction investigated by electrophoretic methods and mass spectrometric analysis. *International Dairy Journal*, 19, 190–197.
- Aydın, G. 2012.** Süt ve Süt Hayvancılığı Öğrenci Kongresi. Kongre Kitabı. Aksaray.
- Anonim, 2014.** Donkey milk. <http://www.wikipedia.org/wiki> (Erişim tarihi. 13.10.2014).
- Bounous, G. Papenburg, R. Kongshavn, P.A. Gold, P., Fleiszer, D. 1988.** Dietary whey protein inhibits the development of dimethylhydrazine induced malignancy. *Clin Invest Med*, 11, 213–217.
- Bounous, G., Batist, G., Gold, P. 1991.** Whey proteins in cancer prevention. *Cancer Letters*, 57: 91-94.
- Barth, G.A., Batist, G. 1997.** Nutritional significance of whey and whey components. *Nahrung*, 41:2-12.
- Baldi, A., Politis, I., Pecorini, C., Fusi, E., Roubini, C., Dell'Orto, V. 2005.** Biological effects of milk proteins and their peptides with emphasis on those related to the gastrointestinal ecosystem. *J. Dairy Res* 72: 66-72.
- Berridge, M.V., Herst, P.M., Tan, A.S. 2005.** Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. *Biotechnology Annual Review*, 11: 127–152.
- Blasi, F., Montesano, D., De Angelis, M., Maurizi, A., Ventura, F., Cossignani, L., Simonetti, MS., Damiani, P. 2008.** Results of stereospecific analysis of triacylglycerol fraction from donkey, cow, ewe, goat and buffalo milk. *Journal of Food Composition and Analysis* 21:1-7.
- Bordonaro, S., Marlette, D., Vegarud, GE. 2011.** Antimicrobial effect of donkeys' milk digested in vitro with human gastrointestinal enzymes. *Int Dairy J*, 21: 158-165.

Brink, W. 2011. Laktoferrin: The Bioactive Peptide that Fights Disease. <http://www.brinkzone.com/lokto.html>.

Bidasolo, I.B., Ramos, M., Gomez-Ruiz, J.A. 2012. In vitro simulated gastrointestinal digestion of donkeys' milk. Peptide characterization by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Int Dairy J.* 24: 146-152.

Budak, Ş.Ö., Gürsel, A. 2012. Alternatif Eşek Sütü, *GIDA*: 37 (4): 243-250.

Choy, W.N. 2001. "Genetic toxicology and cancer risk assessment", *Marcel Dekker*, New York, 29-187.

Civardi, G., Curadi, MC., Orlandi, M., Cattaneo, TMP., Giangiacomo, R., Egito, AS., Haertlé, T. 2002. Composition of mare and donkey milk fatty acids and protein. *Milchwiss.* 57:515-517.

Coppola, R., Salimei, E., Succi, M., Sorrentino, E., Nanni, M., Ranieri. 2002. Behaviour of *Lactobacillus rhamnosus* strains in ass' milk. *Ann Microbiol* 52: 55-60.

Çelik, A., Mazmanci, B., Çamlica, Y., Çömelekoğlu, Ü., Aşkın, A. 2005. "Evaluation of cytogenetic effects of lambda-Cyhalothrinon wistar rat bone marrow by gavage administration", *Environ Safe*, 61: 128–133.

Chatterton, D., Rasmussen, J.T., Heegaard, C.W., Sorensen, E.S., Petersen, T.E. 2004. In vitro digestion of novel milk protein ingredients for use in infant Formula: Research on biological functions. *Food Sci. and Technol.*, 15, 373-383. 26. Tidona F, Sekse C, Criscione A, Jacobsen M.

Chiavari, C., Coloretti, F., Nanni, M., Sorrentino, E., Grazia, L. 2005. Use of donkey's milk for a fermented beverage with lactoobacilli. *Lait*, 85: 481-490.

Demirel, S., Zamani, A. 2002. MN tekniği ve kullanım alanları. *Genel Tıp Dergisi*, 12(3): 123 – 127.

Dikilitaş, M., Koçyiğit, A. 2010. Canlılarda "Tek hücre jel elektrofez" yöntemi ile DNA hasar analizi: Comet analiz yöntemi, *J.ASgric. Fac.*, HR.U., 2010, 14(2): 77-89.

Durmaz, A., Dikmen, N., Gündüz, C. 2010. DNA Hasar Analizinde Tek Hücre Jel Elektroforezi (Komet Yöntemi). *Archives Medical Review Journal.*, 19(4):236.

Duarte, D.C., Nicolau, A., Teixeira J.A., Rodrigues, L.R. 2011. The effect of bovine milk lactoferrin on human breast cancer cell lines. *J. Dairy Sci.*, 94; 66-76.

Fox, P.F., Flym A. 1992. "Biological properties of milk proteins", in *Advanced Dairy Chemistry*. Ed: Fox: PF., Proteins. Vol. 1,s.255-284, *Elsevier*. London.

Fenech, M., 2007. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature Protocols*, 2, 1084 – 1104.

- Franken, N.A., Rodermond, H.M., Stap, J., Haveman, J., Van Bree, C. 2006.** Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat Protoc*, 1(5): 2315-9.
- Fabre, K., M., Saito, K., Degraff, W., Sowers, A.L., Thetford, A., Cook, J.A., Krishna, M.C., Mitchell, J.B., 2011.** The effects of resveratrol and selected metabolites on the radiation and antioxidant response. *Cancer Biol Ther*, 12(10):915-23.
- Fantuz, F., Ferraro, S., Todini, L., Piloni, R., Mariani, P., Salimei, E. 2012.** Donkey milk concentration of calcium, phosphorus, potassium, sodium and magnesium. *Int Dairy J* 24: 143-145.
- Gervais, F., Amer, V., Batist, G., Gold, P. 1989.** The influence of dietary wheyprotein on tissue glutathione and diseases of aging. *Clin Invest Med*: 12: 343-349.
- Guo, H.Y., Pang, K., Zhang, X.Y., Zhao, L., Chen, S.W., Dong, M.L., Ren, F.Z. 2007.** Composition, physicochemical properties, nitrogen fraction distribution, aminoacid profile of donkey milk. *J.Dairy Sci*, 90(4): 1635-1643.
- Gastaldi, D., Bertino, E., Monti, G., Baro, C., Fabris, C., Lezo A, Medana, C., Baiocchi, C., Musap, M., Galvano, F., Conti, A. 2010.** Donkey's milk detailed lipid composition. *Frontiers in Bioscience*, E2: 537-546.
- German, J.B., Dillard, C.J., Walzem, R.L. 2001.** U.S. Whey Products and Dairy Ingredients for Health: A Review. May 2000. *U.S. Dairy Export Council*.
- Hippocrates. 1843.** The Genuine Work of Hippocrates. Vol. 1. Sydenham Society.
- Horrobin, D.F. 2000.** Essential fatty acid metabolism and its modification in atopic eczema. *Am J Clin Nutri* 71: 367-372.
- Herrouin, M., Molle, D., Fauquant, J., Ballestra, F., Maubois, JL., Leonil, J. 2000.** New genetic variants identified in donkey's milk whey proteins. *J Protein Chem* 19, 105-115.
- Ibrahim, H. R., Aoki, T. 2003.** New promises of lysozyme as immune modulator and antimicrobial agent for nutraceuticals. *Foods and Food Ingredients Journal of Japan*, 208, 361–374.
- Jirillo, F., Jirillo, E., Magrone, T. 2010.** Donkeys' and goat's milk consumption and benefit to human health with special references to the inflammatory status. *Curr Pharmaceut Design* 16: 859-863.
- Kirsch-Volders, M.A., Elhajouji, E., Cundari, P., Van, Hummelen. 1997.** "The in vitro micronucleus test: A multiendpoint assay to detect simultaneously mitotic delay, apoptosis, chromosome breakage, chromosome loss and nondisjunction", *Mutat Res*, 392 (1-2): 19-30.

- Korhonen, H., Pihlanto-Leppala, A., Rantamaki, P., Tupasela, T. 1998.** Impact of processing on bioactive proteins and peptides. *Trends Food Sci. Technol.*, 9: 307-319.
- 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.
- Karagözü, C., Bayerer, M. 2004.** Peyniraltı Suyu Proteinlerinin Fonksiyonel Özellikleri Ve Sağlık Üzerine Etkileri. *Ege Üniv. Ziraat Fak. Dergisi*: 41 (2):197-207.
- Kandır, E - Hesna. 2014.** Türkiye Hayvancılık sektöründe yeni trend: Eşek sütü üretimi. *Göller Bölgesi Aylık Hakemli Ekonomi ve Kültür Dergisi Ayrıntı/7*.
- Leclerc, G.L. 1835.** L'Histoire naturelle, générale et particulière, avec la description du Cabinet du Roy. Tome Cinquième. P. Duménil; 40.
- Lönnerdal, B. (1985)** Biochemistry and physiological function of human milk proteins. *Am. J. Clin. Nutr.* 42: 1299-1317.
- Lothian, B. 2000.** Treatment of obstructive airway disease with a cysteine donor protein supplement: a case report. *Chest*; 117: 914-916.
- Marcus, P.M., Newcomb, P.A. 1998.** The association of calcium and vitamin D, and colon and rectal cancer in Wisconsin women. *Int J Epidemiol*, 27, 788–793.
- Malacarne, M., Martuzzi, F., Summer, A., Mariani, P. 2002.** Protein and fat composition of mare's milk: Some nutritional remarks with reference to human and cow's milk. *Int Dairy J.*, 12: 869-877.
- Muraro, M.A., Giampietro, P.G., Galli, E. 2002.** Soy formulas and nonbovine milk. *Ann Allerg Asthma Im*, 89(1): 97-101.
- Miranda, G., Mahe, MF., Leroux, C., Martin, P. 2004.** Proteomic tools to characterize the protein fractions of Equidae milk. *Proteomics* 4: 2496-2509.
- Munshi, A., Hobbs, M., Meyn, R.E. 2005.** Clonogenic Cell Survival Assay. Methods in Molecular Medicine, vol. 110: Chemosensitivity: Vol. 1: In Vitro Assays Edited by: R.D. Blumenthal © Humana Press Inc., Totowa, NJ.
- Murray, P.E, García Godoy, C., García Godoy., F. 2007.** How is the biocompatibility of dental biomaterials evaluated? *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.*;12(3):E258-66.
- Monti, G., Bertino, E., Muratore, MC., Coscia, A., Cresi, F., Silvestro, L., Fabris C, Fortunato, D., Giuffrida, MG., Conti, A. 2007.** Efficacy of donkey's milk in treating highly problematic cow's milk allergic children: An in vivo and in vitro study. *Pediatr Allergy Immunol* 18: 258-264.

Mok, K.H., Petersson, J., Orrenius, S., Svanborg, C. 2007: HAMLET, protein folding, and tumor cell death . *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 354;1-7.

Mao, X., Gu, J., Sun, Y., Xu, S., Zhang, X., Yang, H., Ren, F. 2009. Anti-proliferative and anti-tumour effect of active components in donkey milk on A549 human lung cancer cells. *Int Dairy J.*, 19: 703-708.

Mariani, P.L. 2009. Donkey milk nutraceutical characteristics: A biochemical evaluation of nutritious and clinical properties. *Ph. D. Thesis*, University of Camerino, Camerino.

Muller, S., Yang, X., Sottero, T.L., Gragg, A., Prasad, G., Polley, M.Y., Weiss W.A., Matthay, K.K., Davidoff, A.M., DuBois, S.G., Haas-Kogan, D.A., 2011. Cooperation of the HDAC inhibitor vorinostat and radiation in metastatic neuroblastoma: efficacy and underlying mechanisms. *Cancer Letters*, 306(2): 223-9.

Martemucci, G., D'Alessandro, A.G. 2012. Fat content, energy value and fatty acid profile of donkey milk during lactation and implications for human nutrition, *Lipids in Health and Disease*, 11:113 doi:10.1186/1476-511X-11-113.

Nikkah, A. 2012. Equidae milk promises substitutes for cow and human breast milk. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.*,36(5): 470-475.

Östling, O., Johanson, K.J. 1984. “Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells”, *Biochem Biophys Res Commun*, 123 (11): 291–298.

Pliny, E. 1855. The Natural History. Book XXVIII “Remedies derived from living creatures”. John Bostock .

Pigott, G.M., Tucker, B.W. 1990. Seafood effects of technology on nutrition. Marcel Dekker, Inc. New York.

Prasad, G., Sottero, T., Yang X., Mueller, S., James, C.D., Weiss W.A., Polley M.Y., Ozawa, T., Berger, M.S., Aftab, D.T., Prados, M.D., Haas-Kogan, D.A., 2011. Inhibition of PI3K/mTOR pathways in glioblastoma and implications for combination therapy with temozolomide. *Neuro Oncol*, 13(4): 384-92.

Roehm, N.W., Rodgers, G.H., Hatfield, S.M., and Glasebrook, A.L. 1991. An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT. *J. Immunol. Meth.* 142:257–265.

Reghunathan, R., Jayapal, M., Hsu, L.Y., Chng, H.H., Tai D, Leung, B.P, Melendez, A.J. 2005. Expression profile of immune response genes in patients with severe acute respiratory syndrome. *BMC Immunol* ;6: 2-18.

Scudiero, D.A., Shoemaker, R.H., Paull, K.D., Monks, A., Tierney, S., Nofziger, T.H., Currens, M.J., Seniff, D., and Boyd, M.R. 1988. Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Res.* 48:4827–4833.

Singh, N.P., Mc-Coy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L. 1988. “A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells”, *Exp Cell Res*, 175: 184-191.

Sava, G. 1989. Reduction of B16 melanoma metastases by oral administration of egg-white lysozyme. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 25, 221–222.

Smithers, G.W., F.J. Ballard, A.D., Copeland, K.J., De Silva, D.A., Dionysius, G.L., Francis, C., Goddard, P.A., Grieve, G.H., McIntosh, I.R., Mitchell, R.J. Pearce and G.O, Regester. 1996. New Opportunities From The Isolation and Utilization of Whey Proteins. *Journal of Dairy Science*: 79 (8) 1454-1459.

Schaafsma, G. 2003. Nutritional significance of lactose and lactose derivatives. In H Roginski, JW Fuquay, & PF Fox (eds) *Encyclopedia of Dairy Science*. pp.1529-1533. Academic Pres. London, UK.

Salimei E, Fantuz F, Coppola R, Chiofalo B, Polidori P, Varisco G. 2004. Composition and characteristics of ass’s milk. *Anim Res.*, 53, 67-78.

Smithers, G.W. 2008. Whey and whey proteins-From ‘gutter-to-gold’. *International Dairy Journal*.18: 695-704.

Scafizzari, M., Giannico, F., Potere, O., Trani A., Colonna, MA., Zezza, L. 2009. Epidermal growth factor (EGF) in mare and ass milk: a preliminary investigation. *Ital J Anim Sci* 8(2): 737-742.

Sümbüloğlu, V., Sümbüloğlu, K. 2010. Biyoistatistik. Karaelmas Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Ankara, 299 s.

Simos, Y., Metsios, A., Verginadis, I., D’alessandro, AG., Loudice, P., Jirillo, E., Charalampidis, P., Kouimanis, V., Boulaka, A., Martemucci, G., Karkabounas, S. 2011. Antioxidant and anti-platelet properties of milk from goat, donkey, and cow: An in-vitro, ex vivo and in vivo study. *Int Dairy J* 21: 901-906.

Salimei, E., Fantuz, F. 2012. Equid milk for human consumption. *International Dairy Journal* 24: 130-142.

Şekerçioğlu, Z.A. Şekerçioğlu, V. 2011. Genetik toksisite testleri, *Tübbav bilim dergisi*. Cilt:4, Sayı:3, Sayfa:221-229.

Tarakçı, Z., Küçüköner, E. 2005. Laktoz, Laktoz ve türevlerinin sanayide kullanımı. *GIDA*, 30(4): 261-267

Tafaro, A., Magrone, T., Jirillo, F., Martemucci, G., D'Alessandro, AG., Amati, L., Jirillo, E. 2007. Immunological properties of donkey's milk: its potential use in the prevention of atherosclerosis. *Curr Pharmaceut Design.* 13: 3711-3717.

Tidona, F., Sekse, C., Criscione, A., Jacobsen, M., Bordonaro, S., Marlette, D., Vegarud, GE. 2011. Antimicrobial effect of donkeys' milk digested in vitro with human gastrointestinal enzymes. *Int. Dairy J* 21: 158-165.

Uniacke-Lowe, T., Huppertz, T., Fox, PF. 2010. Equine milk proteins: chemistry, structure and nutritional significance. *Int. Dairy J.* 20, 609-629.

Vincenzetti, S., Polidori, P., Mariani, P., Cammertoni, N., Fantuz, F., Vita, A. 2008. Donkey's milk protein fractions characterization. *Food Chem.* 106: 640-649.

Weislow, O.S., Kiser, R., Fine, D.L., Bader, J., Shoemaker, R.H., Boyd, M.R. 1989. New soluble-formazan assay for HIV-1 cytopathic effects: application to high-flux screening of synthetic and natural products for AIDS-antiviral activity. *J. Natl. Cancer Inst.* 81: 577-586.

Wang, W.P., Ligo, M., Sato, J., Sekine, K., Adachi, I., Tsuda, H. 2000. Activation of intestinal mucosal immunity in tumor-bearing mice by lactoferrin. *Jpn. J. Cancer Res;* 91: 1022-1027.

Yalçın, A.S. 2006. Emerging therapeutic potential of whey proteins and peptides. *Curr. Pharm. Des.*, 12: 1637-1643.

Ye, J. L., Wang, C. B., Chen, X. H., Gu, S. B., & Sun, M. (2008). Marine lysozyme from a marine bacterium that inhibits angiogenesis and tumour growth. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 77, 1261-1267.

Yerlikaya, O., Kımık, Ö., Akbulut, N. 2010. Peynir altı suyunun fonksiyonel özellikleri ve peynir altı suyu kullanılarak üretilen fonksiyonel özellikler. *GIDA (2010)* 35 (4): 289-296.

Yılmaz, O., Ertuğrul, M. 2011. Eşegin (Equus asinus) Evcilleştirilmesi, Iğdır Üni. Fen Bilimleri Enst. Der. / Iğdır Univ. *J. Inst. Sci. and Tech.*, 1(3): 111-115.

ÖZGEÇMİŞ:

Adı Soyadı	Çetin AKCA
Doğum Tarihi	1.2.1985
Doğum Yeri	Taşköprü/Kastamonu
Yabancı Dili	İngilizce
Medeni Durumu	Evli
İletişim (e-posta)	cakca16@gmail.com
Öğrenim Durumu	
2012- 2014	Yüksek Lisans Uludağ Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Anabilim Dalı
2003-2008	Lisans Atatürk Üniversitesi Kazım Karabekir Eğitim Fakültesi Biyoloji Bölümü
1999-2003	Lise Göl Anadolu Öğretmen Lisesi
1996-1999	Ortaokul Şehit Faruk Karagöz İlköğretim Okulu
1991-1996	İlkokul Küreçayı İlköğretim Okulu
Çalıştığı Kurum	Işıklar Askeri Hava Lisesi Biyoloji Öğretmeni