



T.C.

ACIBADEM MEHMET ALİ AYDINLAR ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> SİMPORTER (NIS) İNHİBİTÖR DÜZEYLERİ YÜKSEK  
VE DÜŞÜK OLAN İNSAN KOLOSTRUM WHEY  
PROTEİNLERİNİN KARŞILAŞTIRILMALI PROTEOMİK  
ANALİZİ**

İREP URAS

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOKİMYA VE MOLEKÜLER BİYOLOJİ

TEZLİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

DANIŞMAN

Prof. Dr. Aysel Özpınar

İSTANBUL – 2018





T.C.

ACIBADEM MEHMET ALİ AYDINLAR ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> SİMPORTER (NIS) İNHİBİTÖR DÜZEYLERİ YÜKSEK  
VE DÜŞÜK OLAN İNSAN KOLOSTRUM WHEY  
PROTEİNLERİNİN KARŞILAŞTIRILMALI PROTEOMİK  
ANALİZİ**

İREP URAS

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOKİMYA VE MOLEKÜLER BİYOLOJİ

TEZLİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

DANIŞMAN

Prof. Dr. Aysel Özpınar

İSTANBUL – 2018

Anabilim Dalı: Biyokimya ve Moleküler Biyoloji

Program: Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Tezli Yüksek Lisans Programı

Tez Başlığı: Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> SİMPORTER (NIS) İNHİBİTÖR DÜZEYLERİ YÜKSEK VE DÜŞÜK OLAN İNSAN KOLOSTRUM WHEY PROTEİNLERİNİN KARŞILAŞTIRILMALI PROTEOMİK ANALİZİ

Öğrencinin Adı-Soyadı: İrep Uras

Savunma Sınavı Tarihi: 07 / 06 / 2018

Bu tez çalışması jürimiz tarafından Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı

Prof. Dr. Aysel ÖZPINAR  
Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar  
Üniversitesi

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Aysel ÖZPINAR  
Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar  
Üniversitesi

Üye

Dr. Öğr. Üyesi Saime BATIREL  
Marmara Üniversitesi

Üye

Yasemin UÇAL  
Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar  
Üniversitesi

Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca bu tez yukarıdaki jüri tarafından onaylanmış ve Sağlık Bilimleri Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Uğur Özbek

Enstitü Müdürü

## BEYAN

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

24.05.2018

İrep Uras

## ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR

Doğumdan hemen sonra gelen kolostrum yeni doğan için olan öneminden dolayı en değerli süt olarak kabul edilmektedir. Kolostrumda bulunan low abundant proteinlere yönelik çalışmalar, yeni doğan için önem teşkil ettiğinden bu alandaki çalışmalar artmaktadır. İleri proteomik teknikleri kullandığımız bu çalışmada NIS inhibitör düzeyleri yüksek olan kolostrum örneklerinin farklı protein profillerini belirlemeyi hedefledik.

Acıbadem Mehmet Aydınlar Üniversitesi'ne başladığım andan itibaren lisansüstü eğitimimin her aşamasında çalışma disiplini, tecrübesi ve engin bilgileriyle çalışmalarına destek olan hayatın her yönünde örnek aldığım çok değerli hocam Prof. Dr. Aysel Özpınar'a

Lisansüstü eğitimimde büyük emeği geçen Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Programı'nın değerli öğretim üyelerine,

Deneyimleriyle, bilgisiyle, dostluğuyla ve güler yüzüyle her zaman yanımda olan Dr. Öğr. üyesi Yasemin Uçal'a

Tez çalışmalarımın her aşamasında yanımda olup usanmadan bana gece gündüz destek olan çok değerli yol arkadaşım Muazzez Ceren Yılmaz'a,

Tanıştığımız andan itibaren hayatın her yönünde benden desteklerini esirgemeyen ve her zaman yanımda olan canım arkadaşlarım Baran Edige, Dilara Berberoğlu ve Selin Tomay'a

Hayatım boyunca arkamda durup bana maddi, manevi ve psikolojik olarak hep destek olarak yanımdan hiç ayrılmayan sevgili babam Hasan Uras ve canım halam Sultan Uras başta olmak üzere çok sevdiğim canım aileme gönülden teşekkür ederim.

İrep URAS

# İÇİNDEKİLER

BEYAN.....	ii
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR .....	iii
KISALTMALAR .....	vii
TABLolar LİSTESİ.....	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ .....	x
ÖZET.....	1
SUMMARY .....	2
1. GİRİŞ VE AMAÇ .....	3
2. GENEL BİLGİLER .....	5
2.1. Süt ve Kolostrumun Önemi .....	5
2.1.1. Kolostrum Sentezi ve İçeriği .....	5
2.1.2. Süt ve Kolostrum İçeriğini Etkileyen Faktörler .....	10
2.2. Süt ve Kolostrum Protein Fraksiyonları .....	11
2.2.1. High Abundant Proteinler.....	11
2.2.2. Low Abundant Proteinler .....	13
2.3. İyot.....	15
2.3.1. İyot Metabolizması.....	15
2.4. NIS İnhibitörleri.....	16
2.4.1. Perklorik Asit.....	17
2.4.2. Nitrat.....	17
2.5. Proteomik Teknikler .....	17
2.5.1. İki Boyutlu Jel Elektroforezi .....	18
2.5.2. ProteoMiner Enrichment Kit .....	20

3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	22
3.1. Çalışma Planı .....	22
3.2. Gereçler.....	23
3.3. Yöntem.....	24
3.3.1. Kolostrum Örneklerinin Toplanması.....	24
3.3.2. Protein Ekstraksiyonu.....	25
3.3.3. Protein Konsantrasyon Tayini .....	26
3.3.4. ProteoMiner Kit Uygulaması .....	26
3.3.5. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrez (SDS-PAGE) .....	27
3.3.6. ProteoMiner Kit'inden Elde Edilen Proteinlerin İki Boyutlu Jel Elektrofrez için Optimizasyonu.....	27
3.3.7. TCA/Aseton Çöktürmesi.....	28
3.3.8. 2D Clean-up Kit Uygulaması .....	28
3.3.9. İki Boyutlu Jel Elektrofrez .....	28
4. BULGULAR.....	34
4.1. ProteoMiner Kit'i Optimizasyon Sonuçları .....	34
4.2. İki Boyutlu Jel Elektrofrez Sonuçları .....	38
5. TARTIŞMA VE SONUÇ .....	44
6. KAYNAKLAR .....	49
7. EKLER.....	60
7.1. Etik Kurul Onayı.....	60
7.2. PDQuest Spot Analiz Tabloları. ....	62
8. ÖZGEÇMİŞ .....	65

## KISALTMALAR

<b>AMP</b>	Antimikrobiyel Peptidler
<b>BDNF</b>	Brain-derived Neurotrophic Factor
<b>BMB</b>	Bromofenol Mavisi
<b>BSA</b>	Bovin Serum Albumin
<b>CHAPS</b>	3-[(3-kolamidopropil)dimetilamoniyo]-1-propansulfonat
<b>CNTF</b>	Ciliary Neurotrophic Factor
<b>DIT</b>	Diiyodityrozin
<b>DTT</b>	Ditiyotretol
<b>EGF</b>	Epidermal Büyüme Faktörü
<b>Epo</b>	Eritropoietin
<b>G-CSF</b>	Granulocyte-colony Stimulating Factor
<b>GDNF</b>	Glial-cell Line Derieved Neurotrophic Factor
<b>HCl</b>	Hidroklorik Asit
<b>HSA</b>	Human Serum Albümin
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	İnterferon Gamma
<b>IPG</b>	Immobilize pH Gradient
<b>IAA</b>	İyodoasetamit
<b>LBP</b>	Lipopolysaccharide-binding Protein
<b>LCPUFA</b>	Uzun Zincirli Çoklu Doymamış Yağ Asitleri

<b>LPS</b>	Lipopolisakkaritler
<b>MFGM</b>	Milk Fat Globule Membrane
<b>MIT</b>	Monoiyodotirozin
<b>MUC-1</b>	Mucin-1
<b>NIS</b>	Na <sup>+</sup> /I <sup>-</sup> Simporteri
<b>PIT</b>	Pasif İmmün Transferin
<b>SAA-3</b>	Serum Amiloid A3
<b>SDS</b>	Sodyum Dodesil Sülfat
<b>T3</b>	Triiodotironin
<b>T4</b>	Tiroksin
<b>Tg</b>	Tiroglobulin
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Transforming Growth Factor Beta
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Tumor Necrosis Factor Alpha
<b>TPO</b>	Tiroid Peroksidaz
<b>TSH</b>	Tiroid Uyarıcı Hormon
<b>VEGF</b>	Vascular Endothelial Growth Factor
<b>XDH/XO</b>	Anthine Dehysrogenase/oxidase

## TABLolar LİSTESİ

<b>Tablo 1.</b> Kullanılan cihazlar ve malzemeler.....	23
<b>Tablo 2.</b> Kullanılan kimyasal maddeler .....	24
<b>Tablo 3.</b> Rehidrasyon basamağında eklenen kimyasallar ve proteinler üzerindeki etkileri .....	29
<b>Tablo 4.</b> 17cm pH 3-10 non-lineer Stripler için İzoelektrik Fokuslama Parametreleri .....	30
<b>Tablo 5.</b> Serva 2D HPE Large Gel Yürütme Parametreleri .....	31



## ŞEKİLLER LİSTESİ

<b>Şekil 1.</b> Kolostrum İçeriği.....	6
<b>Şekil 2.</b> İki boyutlu jel elektroforezi (BioRad) .....	19
<b>Şekil 3.</b> ProteoMiner Çalışma Prensibi (BioRad).....	21
<b>Şekil 4.</b> Çalışmada uygulanan deneysel basamaklar.....	22
<b>Şekil 5.</b> HPE (High Performance Electrophoresis) BlueHorizon yatay elektroforez sistemi .....	32
<b>Şekil 6.</b> ProteoMiner Kit uygulaması öncesinde ve sonrasında 6 örnekten alınan Bradford protein konsantrasyon ölçümleri.....	34
<b>Şekil 7.</b> ProteoMiner öncesi ve sonrası yürütülen kolostrum örneğinin SDS-PAGE jel görüntüsü.....	35
<b>Şekil 8.</b> ProteoMiner Kit'inin iki boyutlu jel elektroforezine optimizasyonu için yürütülen jel görüntüleri.....	37
<b>Şekil 9.</b> Çalışmada kullanılan kolostrum örneklerinin gruplandırılması .....	38
<b>Şekil 10.</b> Perklorik asit düzeyleri yüksek (grup 1) kolostrum örneklerinin iki boyutlu jel elektroforezi görüntüleri (pH 3-10NL, 17cm) .....	39
<b>Şekil 11.</b> Nitrat düzeyleri yüksek (grup 2) kolostrum örneklerinin iki boyutlu jel elektroforezi görüntüleri (pH 3-10NL, 17cm) .....	40
<b>Şekil 12.</b> Perklorik asit ve nitrat düzeyleri düşük (kontrol) kolostrum örneklerinin iki boyutlu jel elektroforezi görüntüleri (pH 3-10NL, 17cm) .....	41
<b>Şekil 13.</b> Yürütülen jellerden elde edilen master jel görüntüsü .....	42
<b>Şekil 14.</b> Yürütülen jellerde gruplar arası farklılık gösteren proteinler .....	43

## ÖZET

Kolostrum, immunoglobulin geçişi ve içerdiği biyoaktif moleküller nedeniyle yeni doğanın bağışıklık sisteminin gelişimi için çok önemlidir. Kolostrumun yeni doğanın gelişmesindeki büyük rolü, içerisindeki farklı fraksiyonlarda bulunan proteinler sayesinde gerçekleşmektedir. Whey proteinleri insan kolostrum içeriğinin %80'nini oluşturduğu için bu fraksiyonun proteomik açıdan incelenmesi büyük önem taşımaktadır.

İyot, normal büyüme için gerekli ve bu nedenle yeni doğanların gelişimi için önemli olan tiroid hormonlarının sentezinde başrol oynayan bir eser elementtir. Çeşitli çalışmalar, bebeklerde önemli gelişme dönemlerinde (prenatal ve neonatal) iyot eksikliğinin büyüme ve zekâ geriliğine, işitme kapasitesinde bozulmaya ve bilişsel işlevlerde azalmaya neden olduğunu göstermiştir. Tiroid hücrelerine iyot alımı integral plazma membran proteini  $\text{Na}^+/\text{I}^-$  simporteri (NIS) aracılığıyla gerçekleşmektedir (1). İyot alımı, tiroid hormon sentezinde ilk ve en önemli adımdır ve iyot alımının inhibisyonu (NIS inhibisyonu), tiroid hormon sentezinin bozulmasıyla sonuçlanmaktadır. İyotun NIS aracılığı ile taşınması, perklorat, tiosiyanat ve nitrat gibi çevresel kimyasallar tarafından inhibe edilebilmektedir. Bu nedenle, NIS inhibitörleri olan perklorik asit ve nitrat iyot metabolizmasını ve tiroid hormon sentezini bozarak hem annenin hem de yeni doğanın sağlığını olumsuz yönde etkilemektedir.

Bu tez çalışması kapsamında kolostrum örneklerinin proteomik çalışmaların temelini oluşturan iki boyutlu jel elektroforezi yöntemi için optimize edilmesi ve ardından NIS inhibitör düzeyleri yüksek ve düşük olan kolostrum örneklerinin iki boyutlu jel elektroforezi yöntemi ile ön çalışma olarak karşılaştırılması amaçlanmıştır. Yapılan iki boyutlu jel elektroforezi çalışmasında, NIS inhibitörü olan perklorik asit ve nitrat düzeyleri yüksek olan kolostrum örneklerinin NIS inhibitör düzeyleri düşük olan kolostrum örneklerine kıyasla whey protein profillerinde farklılıklar gözlemlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Kolostrum, Whey Proteinleri,  $\text{Na}^+/\text{I}^-$  inhibitörleri, perklorik asit, nitrat, iki boyutlu jel elektroforezi, proteomiks

## **SUMMARY**

### **Comparative Proteomic Analysis of Human Colostrum Whey Proteins from Samples with High & Low Na<sup>+</sup> / I- Symporter (NIS) Inhibitor Levels**

Colostrum is crucial for the development of the immune system of the newborn due to the immunoglobulins and the bioactive molecules. The great role of colostrum in the development of newborn occurs due to the proteins present in different fractions. Since whey proteins constitute 80% of human colostrum content, it is of utmost importance to investigate this fraction in terms of proteomics.

Iodine is a trace element that plays a leading role in the synthesis of thyroid hormones essential for normal growth and it is very important for the development of newborns. Various studies have shown that iodine deficiency in during infancy (prenatal and neonatal) leads to decreased intelligence, impaired hearing capacity, and decreased cognitive functioning. Iodine uptake into thyroid cells is mediated by the integral plasma membrane protein Na<sup>+</sup> / I-simporter (NIS) (1). Iodine uptake is the first and most important step in thyroid hormone synthesis and inhibition of iodine uptake (NIS inhibition) results in impaired thyroid hormone synthesis. Iodine transport via NIS can be inhibited by environmental chemicals such as perchlorate, thiocyanate and nitrate. For this reason, NIS inhibitors such as perchloric acid and nitrate are detrimental to iodine metabolism and thyroid hormone synthesis.

The aim of this thesis study is to optimize the colostrum samples for two dimensional gel electrophoresis method and to compare the colostrum samples with high and low NIS inhibitor levels as a preliminary study by two dimensional gel electrophoresis method. Optimization studies were successfully completed and colostrum samples with high NIS inhibitor levels (perchloric acid and nitrate) showed differences in whey protein profiles compared to colostrum samples with low NIS inhibitor levels.

**Keywords:** Colostrum, whey protein, NIS inhibitors, perchloric acid, nitrate, 2D gel electrophoresis, proteomics

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Süt anne meme bezinden salgılanan; enfeksiyon önleyici faktörleri ve bağışıklık öğeleri yüksek, metabolik enzimlerle dolu kompleks bir içeriğe sahip eşsiz bir biyolojik sıvıdır. Ağız sütü olarak da bilinen kolostrum doğumdan hemen sonra annenin süt bezleri tarafından üretilen ilk süttür. Süte kıyasla daha yoğun bir yapıya sahip biyolojik sıvıdır. Kolostrum alımı anneden yeni doğana immunoglobulin geçişi ve biyoaktif moleküllerden zengin olmasından dolayı yeni doğanın bağışıklık sisteminin gelişimi için çok önemlidir (2). Anne sütünün yeni doğanın gelişmesindeki büyük rolü sütün veya kolostrumun farklı fraksiyonlarında bulunan proteinler sayesinde gerçekleşmektedir. Bu proteinler 3 gruba ayrılır: MFGM (milk fat globule membrane) proteinleri, kazein ve whey proteinleridir. Whey proteinlerinin insan kolostrum içeriğinin %80'nini oluşturduğundan ve majör protein kaynağı olmasından dolayı bu fraksiyonun proteomik açıdan incelenmesi büyük önem taşımaktadır (3).

Eser elementlerden biri olan iyot yeni doğanların gelişimi için önemli olan tiroid hormonlarının sentezinde başrol oynamaktadır. Çeşitli çalışmalar, bebeklerde önemli gelişme dönemlerinde (prenatal ve neonatal) iyot eksikliğinin büyüme ve zekâ geriliğine, işitme kapasitesinde bozulmaya ve bilişsel işlevlerde azalmaya neden olduğunu göstermiştir (4).

Tiroid hücrelerine iyot alımı integral plazma membran proteini Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> simporteri (NIS) aracılığıyla gerçekleşmektedir (1). İyot alımı, tiroid hormon sentezinde ilk ve en önemli adımdır ve iyot alımının inhibisyonu (NIS inhibisyonu), tiroid hormon sentezinin bozulmasıyla sonuçlanmaktadır.

Perklorik asit, tiroid bezinde iyot alımından sorumlu taşıyıcı olan NIS ile etkileşerek tiroid işlevini bozan çevresel bir kimyasal ajandır (5). Perklorik asit, NIS tarafından iyot taşınımında rekabetçi bir inhibitördür ve doza bağımlı olarak tiroid uyarıcı hormonu (TSH), tiroksin (T4) ve triiodotironin (T3) düzeylerini önemli ölçüde değiştirebilmektedir (6).

Nitrat çevrede bulunan bir kimyasaldır ve vücuda nitrat alımı nitrat bazlı gübrelerin suyu kontamine etmesiyle gerçekleşmektedir. Çeşitli yiyeceklerde ve suda saptanan nitrat da, perklorik asite benzer şekilde, aynı mekanizma üzerinden iyot alımını engellemekte ve bunun sonucu olarak tiroid hormon sentezini olumsuz yönde etkilemektedir (7).

Gebelik döneminde yeterli miktarda iyot alımı hem annenin tiroid sağlığı hem de anne sütünden bebeğe tiroid hormonlarının aktarılması açısından önem arz etmektedir (8). Laktasyon dönemindeki iyot eksikliği ya da yetersizliği, tiroid fonksiyonunu etkileyerek annede yan etkilere neden olabilmekte ve bu nedenle emzirilen bebeğin büyüme ve beyin gelişimine kritik bir tehlike teşkil etmektedir (4). Bu nedenle, kolostrumda bulunan NIS inhibitörlerine yönelik çalışmalar hem anne hem de yeni doğan sağlığı için büyük önem teşkil etmektedir.

Bu tez çalışması kapsamında kolostrum örneklerinin proteomik çalışmaların en temelini oluşturan iki boyutlu jel elektroforezi yöntemi için optimize edilmesi ve ardından NIS inhibitör düzeyleri yüksek ve düşük olan kolostrum örneklerinin iki boyutlu jel elektroforezi yöntemi ile ön çalışma olarak karşılaştırılması amaçlanmıştır. Literatürde NIS inhibitörlerinin kolostrum protein profiline etkisinin araştırıldığı proteomik çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle, bu tez çalışmasının hem yöntem optimizasyon basamaklarının hem de NIS inhibitörlerinin kolostrum protein profiline etkisinin araştırılmasının literatüre katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

## **2. GENEL BİLGİLER**

### **2.1. Süt ve Kolostrumun Önemi**

Süt, anne meme bezinden salgılanan, büyüme ve bağışıklık sisteminin gelişimi için gerekli makro ve mikro besinleri içeren, enfeksiyon önleyici faktörleri ve bağışıklık öğeleri yüksek, metabolik enzimlerle dolu kompleks bir içeriğe sahip eşsiz bir biyolojik sıvıdır (9). Ayrıca yeni doğan organ gelişimini destekleyen süt, en az ilk 6 aya kadar bebek beslenmesi için en önemli kaynak olarak kabul edilmektedir (10).

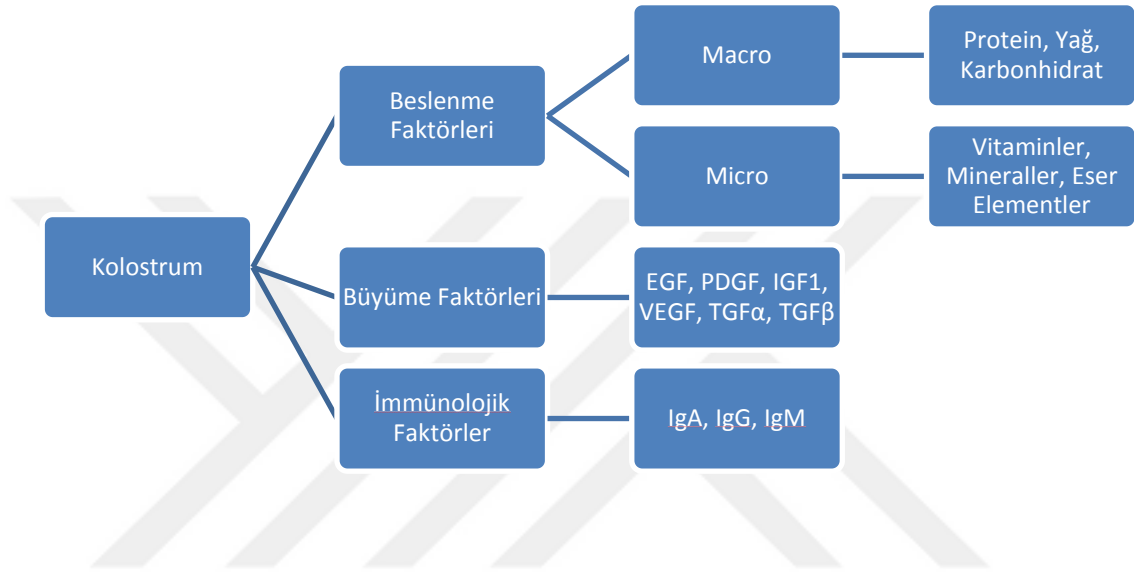
Ağız sütü olarak bilinen kolostrum doğumdan hemen sonra annenin süt bezleri tarafından üretilen ilk süttür. Süte kıyasla daha yoğun bir yapıya sahip biyolojik bir sıvıdır. Tarihsel olarak kolostrum binlerce yıldır Hindistan'da ve yurtdışında çeşitli hastalıklarda kullanılmıştır (2).

Kolostrum alımı anneden yeni doğana immunoglobulin geçişi ve biyoaktif moleküllerle zengin olmasından dolayı yeni doğanın bağışıklık sisteminin gelişimi için çok önemli kabul edilmektedir. Emzirmenin obezite, diyabet ve kardiyovasküler hastalıkların başlangıcından koruyabileceği bilinmektedir. Ayrıca, kolostrumun tip 2 diyabet ve obezite riskini azaltmasına ek olarak yeni doğan üzerinde alerjik ve kronik hastalıklara karşı kendine özgü bir rolü olduğu düşünülmektedir (10).

#### **2.1.1. Kolostrum Sentezi ve İçeriği**

İmmunoglobulinlerin maternal dolaşımdan süt bezlerine taşınması olarak tanımlanan kolostrum sentezi mamogenezin ardından gerçekleşmektedir (11). Yeni doğanın ilk defa memeden süt emmesiyle anne sütünün salgılanması başlamaktadır. Emmenin etkisiyle meme ucundaki reseptörlerden hipotalamustaki reseptörlere uyarı gönderilirken, hipofiz hormonlarından biri olan oksitosin meme bezine doğru gönderilir. Oksitosin sağlayan nöronlar, hipofizin arka lobunda bulunan paraventriküler nukleusta ve hipotalamik supraoptik nukleusta bulunmaktadır. Meme

ucunun uyarılması üzerine, meme alveollerini çevreleyen mioepitelyal hücreler kasılmaya başlar ve oksitosin kan dolaşımına salgılanır, böylelikle alveollerde depolanan süt salgılanması başlamaktadır (12). Kolostrumun içeriği Şekil 1’de verilmiş ve aşağıda açıklanmıştır.



Şekil 1. Kolostrum İçeriği

### İmmünolojik Faktörler

Anne sütü, yeni doğan sağkalımını sağlamaya yardımcı olan enfeksiyonu ve enflamasyonu engelleyen birçok immünolojik faktörlerle zenginleştirilmiştir. Anne sütü T hücreleri, kök hücreler, makrofajlar ve lenfositler de dahil olmak üzere çeşitli hücreler içermektedir (13–17). Laktasyonun ilk evrelerinde, anne sütü ile beslenen yeni doğanlar, lökosit miktarı anneler arası farklılık gösterse de günde yaklaşık olarak  $10^8$  maternal lökosit almaktadır (18). Laktasyonun başında gelen anne sütündeki hücrelerin yaklaşık %80’ini makrofajlar oluşturmaktadır. Bu makrofajlar kan dolaşımından çıkıp meme epitelyumundan süte geçen periferik kan monositlerden oluşmaktadır. İnsan sütü bileşenlerinin fagositozu, bu monositleri, bebek T hücresi aktivitesini uyaran dendritik hücrelere farklılaşma kabiliyeti dahil

olmak üzere, benzersiz fonksiyonel özellikleri olan güçlü anne sütü makrofajlarına dönüştürmektedir (16). Bu dönüşme yeteneği yeni doğanların kendi bağışıklık sistemleri gelişinceye kadar patojenlere karşı güçlü bir koruma sağlamaktadır. Ancak HIV-1 ve HLTV-1 (human T-lymphotropic virüs 1) virüsünün anneden yeni doğana süt yoluyla geçişi bu yeteneğin olumsuz bir sonucu olarak bildirilmiştir (13).

Anne sütünde ayrıca otokrin ve parakrin olarak hareket eden çok fonksiyonlu peptidler olan sitokinler ve sitokinlerin alt sınıfı olan ve diğer hücrelerin hareketlerini indükleyen kemokinler bulunmaktadır (19). İnsan sütü sitokinleri bağışıklık aktivitesini etkilemek için hücrelerle iletişim kurdukları bağırsak bariyerini geçebilmektedirler. Sitokinler ve kemokinler birçok birden fazla fonksiyona sahip olsa da süt kaynaklı sitokinler; enfeksiyonlara karşı savunular ve enflamasyonu azaltanlar olarak gruplandırılabilirler (13).

Sitokin ailesinin üyesi olan ve insan sütünde en çok bulunan sitokin olan TGF- $\beta$  (transforming growth factor beta); enflamasyonu ve yara onarımını düzenlemekte ve alerjik hastalıkların önlenmesine yardımcı olmaktadır (20). Anne sütünde bulunan diğer bir sitokin olan G-CSF (granulocyte-colony stimulating factor) bağırsak gelişimi ve sepsisin tedavisinde etki göstermektedir (21). Proenflamatuar sitokinlerden olan TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor alpha), IL-6 (interleukin 6), IL-8 (interleukin 8) ve IFN- $\gamma$  (interferon gamma) anne sütünde düşük seviyelerde bulunmakta ve laktasyon süresince azalmaktadır (22).

İmmünoglobulinler, süt ve kolostrumda bulunan immünolojik aktivitenin önemli bir parçasını oluşturan koruyucu biyoaktiviteye sahip protein ailesidir. Anneden yenidoğana pasif immün transferinde büyük rol oynamaktadırlar. İmmünoglobulinler IgM, IgA, IgG, IgE ve IgD gibi çeşitli sınıflara ayrılır (23), fakat bunlardan yalnızca IgG, IgA ve IgM, memelilerde majör olarak görülmektedir. IgM, bir organizmanın ilk kez (birincil enfeksiyon) bir antijene maruz kaldığı zaman ortaya çıkan sınıftır. Düşük spesifiteye sahip olduğundan dolayı enfeksiyonu yenmekte düşük bir güce sahiptir. IgA, mukozal sekresyonlarda bulunan başlıca immünoglobulin sınıfıdır ve mukozal enfeksiyonları önlemektedir (24). İnsan kolostrumu düşük bir IgG içeriğine (% 2) sahiptir ve yeni doğan için lokal enfeksiyonlara karşı savunmada görevli sistemik bağışıklık sağlamak için gerekli olan IgG, doğumdan önce plasenta boyunca

transfer edilir (24). İnsanda bulunan immünoglobulin profili genel olarak kolostrum ve sütte benzerlik göstermektedir (24,25).

### **Büyüme faktörleri/Hormonlar**

İnsan sütü, bağırsak sistemi, damar sistemi, sinir sistemi ve endokrin sistemi üzerinde geniş kapsamlı etkileri olan çok sayıda büyüme faktörü içermektedir (13).

Hem amniyotik sıvıda hem de anne sütünde bulunan epidermal büyüme faktörü (EGF) bağırsak mukozasının olgunlaşması ve iyileşmesi için kritik öneme sahiptir. (26,27) EGF'nin düşük pH ve sindirim enzimlerine karşı dirençli olması mideden bağırsağa geçerek enterositlerin DNA sentezi, hücre bölünmesi, su ve glukozun absorbanı ve protein sentezi yapmasına izin vermektedir. EGF miktarı laktasyon süresi boyunca azalır ve EGF seviyesi maternal seruma kıyasla kolostrumda ortalama 2000 kat, sütte ise 100 kat daha yüksektir (28,29).

Pre-term bağırsakta sık sık bozulan perispaltik hareket nöral büyüme faktörlerinden BDNF (brain-derived neurotrophic factor) tarafından düzenlenmektedir (30). BDNF, nöron sağkalımı ve büyümesini arttıran GDNF (glial-cell line derieved neurotrophic factor) ve bunlarla ilişkili CNTF (ciliary neurotrophic factor) doğumdan sonra 90 güne kadar kolostrum ve anne sütünde tespit edilmektedir (31,32).

İnsülin benzeri büyüme faktörü (insülin-like growth factor) olan IGF-I ve IGF-II, IGF bağlayıcı proteinler ve IGF spesifik proteazlar, insan sütünde bulunmaktadır (13,33). Düzeyleri kolostrumda en yüksektir ve laktasyon süresince düşüş göstermektedir (34,35).

Kan damarlarının oluşumu olan anjiogenez öncelikli olarak VEGF (vascular endothelial growth factor) ve onun antagonistlerinin ekspresyonu tarafından düzenlenmektedir. VEGF konsantrasyonu süte kıyasla kolostrumda daha yüksektir (36).

İnsan sütü çeşitli büyüme faktörlerine ek olarak aynı zamanda bir sürü hormon içermektedir. Gelişimi düzenlemekte görevli olan (growth-regulating hormones)

kalsitonin ve onun prekürsörü olan prokalsitonin hormonları sütte bol miktarda bulunmaktadır (37). Enterik nöronlar, kalsitonin reseptör immüno reaktivitesini geç gestasyondan bebeklik dönemine kadar eksprese etmektedir (38).

Sütte bulunan diğer bir hormon da büyüme faktörlerini inhibe eden somatostatindir. Somatostatin jejunumda hızla parçalanır ve bağırsak duvarından transfer edilemez. Fakat, süt ile alınımı parçalanmayı engelleyerek bu hormonun biyoaktivitesini korumaktadır (39).

Süt, kırmızı kan hücrelerinin (RBC) artmasından sorumlu en önemli hormon olan eritropoietin (Epo) içerir. Kan kaybı, bağırsak patolojisi ve hematopoietik sistemin olgunlaşmaması, büyüme ve gelişmeyi derinden etkileyen prematüre anemisine sebep olmaktadır (40). Yapılan çalışmalarda eritropoietin'in HIV virüsünün anneden çocuğa geçmesini önlemede rolü olabileceği de gösterilmiştir (41).

İnsan sütünde yüksek miktarda bulunan adinopektin bağırsak bariyerini geçerek enflamasyonu baskılayan ve yeni doğan metabolizmasını aktif olarak düzenleyen çok fonksiyonlu bir hormondur (42).

İnsan sütünde etkili miktarlarda bulunan diğer metabolizma düzenleyici hormonlar, enerji dönüşümü, vücut kompozisyonu ve iştah kontrolünün düzenlenmesinde önemli rol oynayan leptin, resistin ve ghrelin'dir (43–45).

### **Macro/Micro Besinler**

İnsan sütünün makro besin bileşimi, annelere ve emzirme dönemlerine göre değişmektedir, ancak annenin beslenme durumundaki değişikliklere rağmen popülasyonlar arasında önemli ölçüde korunmuştur. İnsan sütünün içinde bulunan yağ, yüksek oranda palmitik ve oleik asit içermektedir. İnsan sütünün yağlı asit profili, özellikle uzun zincirli çoklu doymamış yağ asitleri (LCPUFA'lar), anne diyetine bağlı olarak değişmektedir. İnsan sütünün içinde bulunan başlıca şeker disakkarit laktozdur. İnsan sütündeki laktoz konsantrasyonu, makro besinler arasında en az değişken olanıdır, ancak daha yüksek miktarlarda süt üreten annelerin sütünde daha yüksek laktoz konsantrasyonları bulunduğu bildirilmiştir (13).

A, B1, B2, B6, B12, D vitaminleri ve iyot gibi birçok mikro besin anne sütü ve vücut depolarına bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. K vitamini insan sütünde aşırı derecede düşüktür ve bu nedenle Amerikan Pediatri Akademisi, yeni doğanın hemorajik hastalığından kaçınmak için bu vitaminin enjeksiyonunu önermektedir. Dünya çapında popülasyonlarda yaygın olan D vitamini eksikliği de görülmektedir (13).

### **2.1.2. Süt ve Kolostrum İçeriğini Etkileyen Faktörler**

Annenin yaşı, beslenme şekli, çocuk sayısı, enerji dengesi, meme bezinin genel sağlık durumu, laktasyon dönemi ve çevresel faktörler gibi birçok dış etken süt ve kolostrumun içeriğini etkilemektedir (13,46,47).

Anne sütünün içeriği bebeğin büyüme ve gelişme gereksinimlerini karşılamak ve yeni doğan bağırsak mikrobiyomunun değişimlerine ayak uydurmak için laktasyon dönemine göre değişiklik göstermektedir (48). Örneğin, daha sonra gelen süte kıyasla kolostrumda bulunan sodyum, klorür ve magnezyum seviyeleri yüksek, potasyum ve kalsiyum seviyeleri düşüktür (13). Kolostrumda bulunan proteinlerin konsantrasyonu daha yüksekken, süt olgunlaştıkça içerisindeki protein konsantrasyonu düşmektedir (49).

Sütün içeriği, doğumdan sonraki ilk günlerde salgılanan kolostrumun süte dönüştüğü zaman dramatik olarak değişir. İlk 1 veya 2 hafta sonra içerik stabilize olur ve içerik değişimi artık daha uzun bir zaman dilimi içerisinde meydana gelmeye başlar. Süt içeriği laktasyon boyunca değişmeye devam eder. Laktasyonun ilk 3-6 ayında bulunan çoğu bileşimin yoğunluğu azalırken, geç laktasyonda (sonraki süt) platoya ulaşır (50).

Anne sütünün içerik değişiminin doğum sayısı, doğum sıklığı, menstürasyona geri dönme, protein alımı ve BMI (vücut kitle indeksi) gibi farklı etkenlere bağlı olduğu bildirilmiştir (13). Anne sütü protein konsantrasyonunun BMI ile doğru orantılı, süt hacim artışı ile ters olduğu yayınlanmıştır (51).

## 2.2. Süt ve Kolostrum Protein Fraksiyonları

Süt ve kolostrumda bulunan yoğun protein konsantrasyonu nedeniyle kolostrum proteomunun incelenmesi için genel bir protokol bulunmamaktadır. Bu nedenle, kolostrum proteomunu incelemek için sütü ve kolostrumu farklı fraksiyonlara ayırmak gerekmektedir (52).

Süt proteinleri kazein, whey proteinleri ve MFGM (milk fat globular membrane) proteinleri olarak üç ana fraksiyon halinde gruplandırılmıştır (48,52).

MFGM, triasilgliserol damlacıklarını çevreleyen kompleks bir membranda bulunmaktadır (52).

Kolostrumda bulunan diğer bir protein grubu, whey proteinleridir. İnek sütü referans alındığında whey protein fraksiyonunun  $\beta$ -laktoglobulin,  $\alpha$ -laktalbumin, bovine serum albümin (BSA), immünoglobulinler ve laktoferrin başta olmak üzere 200'den fazla protein içerdiği belirtilmiştir. Bu proteinler arasında immünoglobulinler doğal bağışıklık transferinde en önemli rolü üstlenmiştir (52).

Dört tipi bulunan kazein ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta$  ve  $\kappa$ ), iyon taşıyıcıları (Kalsiyum, Fosfat, Demir, Çinko, Cupper), biyoaktif peptit öncüleri ve immünomodülatörler gibi önemli biyolojik fonksiyonlardan sorumludur. Kazeinin proteolitik fragmanlarının antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir (52). Meme bezindeki doğal bağışıklık sistemini uyardıkları ve meme enfeksiyonlarını önledikleri için kazeinden türetilen peptidler olası doğal biyoaktivite kaynakları olarak dikkat çekmektedir (53,54).

### 2.2.1. High Abundant Proteinler

Kazein,  $\alpha$ -laktalbumin, laktotransferrin, IgA, salgısal bileşenler ve HSA (human serum albümin) gibi high abundant proteinler insan sütü içindeki süt proteinlerinin %90'ından fazlasını oluşturmaktadır (55).  $\alpha$ -laktalbumin laktoz üretiminin düzenlenmesiyle ilişkilendirilmiştir. Bununla birlikte, yakın zamanda bu proteinin insan kolostrum ve sütünde bir immünomodülatör olarak rol oynadığı belirtilmiştir

(52). Enfeksiyonlara karşı bağışıklık yanıtında önemli bir rol oynayan diğer bir high abundant protein laktoferrindir. Laktoferrinin ana işlevi demir iyonlarının bağlanması ve taşınmasıdır. Laktoferrin, meme epiteliyle sentezlenen doğuştan gelen bir bağışıklık faktörü olarak çalışmaktadır, bu da meme bezine ve ayrıca yeni doğana antimikrobiyal aktivite (bakterisit ve fungusit) sağlamaktadır (52,56). Enflamatuar reaksiyonlar ve bazı viral enfeksiyonlar sırasında konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak, bir akut faz proteini olarak sınıflandırılmıştır (52).

Sütün diğer bir fraksiyonu olan MFGM proteinleri triasilgliserol damlacıklarını çevreleyen kompleks bir membranda bulunmaktadır (52). Mather (57) ve arkadaşlarının 2000 yılında yaptığı bir çalışmada sütün MFGM fraksiyonunda 7 adet high abundant protein bulunduğu belirtilmiştir. Bulunan bu 7 proteinden ikisinin bağışıklıkla ilgili en önemli iki protein olan MUC-1 (mucin-1) ve XDH/XO (xanthine dehydrogenase/oxidase) olduğu belirtilmiştir (52). MUC-1; akciğerler, mide, bağırsak ve diğerleri gibi farklı organlardan epitel hücrelerinin apikal yüzeyinde bulunan bir glikoproteindir (58). MUC-1 proteinin biyolojik işlevi fiziksel hasar ve invaziv patojenik mikroorganizmalara maruz kalan yüzeylerin korunmasında önemli bir rol oynamaktadır (59). Ayrıca, bağırsak lümenindeki patojenik mikroorganizmalara bağlanma ve ayırma kapasitesi nedeniyle, MUC-1, yeni doğanın bağışıklık reaksiyonuna katkıda bulunduğu belirtilmiştir (52,60).

XDH/XO proteini meme bezinde sentezlenir, hamileliğin son döneminde ve doğumdan sonra maksimum seviyelere ulaşmaktadır. Bu proteinin işlevi tam olarak tanımlanmamıştır, ancak MFGM'nin oluşumunda yapısal ve fonksiyonel rol oynayabileceği ve aynı zamanda kolostrum ve sütte antibakteriyel özelliklere sahip olabileceği ve laktoperoksidaz için bir H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kaynağı sağlayabileceği öne sürülmüştür. Ayrıca bu protein, immünomodülatör olarak etki göstererek doku hasarına ve inflammatuar yanıtın alevlenmesine veya kodlayan genlerin ekspresyonunu indüklemeye neden olabilmektedir (52).

### 2.2.2. Low Abundant Proteinler

Kolostrumda bulunan high abundant proteinler içeriğin %90'ından fazlasını oluşturduğundan geriye kalan yaklaşık %10'luk kısmı low abundant proteinler oluşturmaktadır (55). High abundant proteinler low abundant proteinleri maskeleydiğinden low abundant proteinlerinin tanımlanması ve fonksiyonlarının belirlenmesi çalışmaları hala devam etmektedir (52). Örneğin, Murakami (3) ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada insan kolostrumunda yaklaşık 400 low abundant protein spotu görülürken, high abundant proteinlerin yoğunluğundan dolayı bunlardan yalnızca 22'si tanımlanabilmiştir. Bu nedenle, low abundant proteinleri tanımlanmada farklı tekniklerin kullanılması gerekmektedir (52).

Kolostrumda tanımlanan bazı low abundant proteinlerin yeni doğanda büyümenin düzenlenmesi, besin transportu ve en önemlisi pasif immün transferin (PIT) sağlanması gibi önemli görevler taşıdığı düşünülmektedir. Bu nedenle, kolostrumda bulunan low abundant proteinlerin immün sistemi ile ilişkisini anlamak çok önemlidir. Plazmin, serum amiloid A, fibrinojen, tripsin inhibitörü, LBP (lipopolysaccharide-binding protein), antimikrobiyel peptidler (AMP), defensin ve cathelicidin anne ve yeni doğanda immün sisteme destek veren başlıca low abundant proteinlerdir (52).

Kanda, kolostrum ve sütte bulunan plazmin, trombozu önlemek için fibrin kan pıhtılarının erimesinde önemli rol oynayan fibrinolitik bir enzimdir (61). Vücutta oluşan enfeksiyon sırasında nötrofil göçüne katkı sağladığı belirtilmiştir (62).

Kolostrumda tanımlanan ve lipoprotein komplekslerinde bulunan serum amiloid A, enflamasyonun akut fazının bir parçası olan doğuştan gelen bağışıklık sisteminde temel ve önemli bir role sahiptir. Bu akut faz proteininin bir varyantı olan serum amiloid A3'ün (SAA-3), patojenlere veya patojen türevli lipoteikotik aside yanıt olarak meme hücrelerinde eksprese olduğu ve mastitis (meme iltihabı) sırasında kolostrum ve sütte mevcut olduğu bulunmuştur (52,63).

Kan pıhtılaşmasında rol oynayan fibrinin prekürsörü olan fibrinojenin Yamada ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada yalnızca kolostrum içeriğinde bulunduğu ortaya çıkarılmıştır (25). Akut faz reaksiyonları sırasında fibrinojen

konsantrasyonunun yükselmesi koruyucu fonksiyonuna sahip olduğunu göstermektedir (52).

Kolostrumda bulunan ve  $\alpha$ 1-antitripsin olarak da bilinen tripsin inhibitörü biyolojik olarak aktif tripsini azaltarak proteolitik bölünmeye karşı koymaktadır. Kolostrumda bulunan tripsin inhibitörünün süte kıyasla 100 kat daha fazla olduğu ve proteolitik bölünmeye karşı koyarak immün bileşenlerinin emilimini sağladığı belirtilmiştir (64).

LBP (lipopolysaccharide-binding protein) iki boyutlu jel elektroforezi, LC-MS/MS ve ELİSA yöntemleriyle kolostrumda tespit edilmiştir. LBP'nin Gram-negatif bakteriyel enfeksiyonlarda en çok üretilen protein olduğu ve Gram-pozitif bakteriyel enfeksiyonlarda ise aktif rol oynadığı belirtilmiştir. Bu proteinin temel işlevi bakterilerin dış hücre duvarında eksprese edilen bakteriyel lipopolisakkaritlere (LPS) bağlanıp LPS taşıyıcısı gibi davranarak LPS'ye dayalı monosit yanıtlarını kontrol etmeye yardımcı olmaktır (52,65).

Antimikrobiyel peptidler (AMP) enfeksiyon yaratan ajanların membran bütünlüğünü bozarak onları inaktive etmektedir. Memelilerde görülen iki ana AMP ailesi üyeleri cathelicin ve defensindir (66). Sütte ve kolostrumda tanımlanmış olan cathelicin memeli immün savunmasında invazif bakteriyel enfeksiyonlara karşı kritik bir rol oynayan peptid grubudur. Mikrobik yüzeydeki moleküler modellerin tanınmasına dayalı bir mekanizmayla çalıştığı saptanmıştır. Bu mekanizma, katyonik peptid ve anyonik bakteriyel bileşenler arasındaki elektrostatik etkileşimlere ve bu peptidlerin lipit tabakasının içine yerleşerek mikrobiyal membran bütünlüğünü bozması prensibine dayanmaktadır (67). Defensin, adaptif immün tepkisi ile etkileşime giren bir grup küçük antimikrobiyal peptiddir. Sütte ve insan kolostrumunda yüksek seviyelerde tespit edilen bu peptidler, yapısal olarak mikrobiyal ürünlere veya pro-enflamatuar sitokinlere yanıt olarak üretilmektedir (52) Özellikle,  $\beta$ -defensin ailesinin üyelerinin mastitis sırasında meme epitel hücreleri tarafından eksprese edildiği belirtilmiştir (68).

### 2.3. İyot

İyot, tüm bireylerin sağlığı için çok önemli bir mikro besin kaynağı olan bir eser elementtir. İyot doğada bazı minerallerde, toprakta, iyot bakımından zengin topraklarda yetiştirilen sebzelerde deniz suyunda ve deniz bitkilerinde (yosun gibi) bulunmaktadır (69,70).

İyot alımı için önerilen günlük dozlar yetişkinlerde 150 µg, gebe kadınlarda 220–250 µg ve emziren kadınlarda 250–290 µg 'dır (71). Sağlıklı bir yetişkinde çoğunluğu tiroid bezinde depolanmış 15-20 mg iyot bulunmaktadır. Fakat, iyot eksikliğinde bu miktarın 20µg'a kadar düşebildiği gözlemlenmiştir. Tiroid bezi tarafından tutulan iyot miktarı iyot eksikliğinde %80'e kadar ulaşırken, yeterli iyot alımında bu iyot tutulum oranı %10 civarında görünmektedir (72).

#### 2.3.1. İyot Metabolizması

Aktif taşıma ile tiroid foliküler hücrenin içerisine iyot alımı, iyot metabolizmasındaki ilk adımdır. İyotun içeriye alınması, tiroid foliküler hücrenin bazolateral membranında bulunan sodyum/iyodür simpatörü (NIS) tarafından gerçekleştirilmektedir. Bu işlem için gerekli olan enerji ATP'ye bağımlı  $Na^+$ ,  $K^+$  pompası tarafından sağlanmaktadır.  $Na^+$ , elektrokimyasal gradyanına doğru hareket ederken, aynı zamanda iyodür (I<sup>-</sup>) elektrokimyasal gradyanının tersine doğru hareket etmektedir (70). Sodyum/iyodür simpatörünün (NIS) her bir iyodür anyonu için iki sodyum katyonunu ( $Na^+$ ) taşıdığı belirtilmektedir (73).

İyot metabolizmasının ikinci adımı tiroid foliküler hücrenin içerisindeki bir başka bağımsız işlem olan tiroglobulinin (Tg) sentezi ve sekresyonudur. TG sentezi, peptidler olarak endoplazmik retikulumda başlamakta ve ardından bu peptidlerin dimere çevrilip karbohidratlar eklenerek Golgi cisimciğine gönderilmesiyle devam etmektedir. Sentezi tamamlanan Tg molekülü tiroid hormonlarının sentezi için substrat görevi gören yaklaşık 140 tirozin kalıntısı içermektedir. Küçük veziküller içerisinde bulunan Tg, önce apikal membrana doğru yol alıp, oradan foliküler lümene gönderilmektedir (70).

İyot metabolizmasının üçüncü adımı iyodürün oksidasyonudur. Foliküler hücre içinde bulunan iyodür, pendrin isimli iyodür/klorür taşıyıcısı ile foliküler lümene gönderilmek üzere plazma membranının apikal yüzeyine doğru hareket etmektedir. Bu işlemin ardından, iyodür anyonu hemen iyota oksitlenmektedir (70).

Bu işlemleri, tiroglobülin molekülünde mevcut olan tirozin kalıntılarının iyodinasyonunun meydana geldiği tiroglobulinin organifikasyonu takip etmektedir. İyodinasyon, önce monoiyodotirozin (MIT) oluşturmak için 3. pozisyonda, daha sonra diiyodityrozin (DIT) oluşturmak için 5. pozisyonda gerçekleşmektedir.

Tiroid peroksidaz (TPO) ile katalize edilen tirozin iyodinasyonda iki DIT molekülünün birleşmesiyle tiroksin (T4) hormonu ve bir MIT molekülünün diğer bir DIT molekülüyle birleşmesiyle triiyodotironin (T4) hormonu oluşmaktadır. Tiroid hormonları, tiroid foliküllerinin içinde birkaç ay boyunca kolloid olarak depolanabilmekte ve depolanan bu hormonlar 3 aya kadar vücut gereksinimlerini karşılayabilmektedir (70).

İyodine edilmiş triroglobulini içeren kolloid, apikal membranda bulunan Tg reseptörü megalin tarafından endositoza uğrayarak kolloid damlacıklarına dönüştürülmektedir. Bu kolloid damlacıkları ile proteolitik enzimler içeren lizozom vezikülleriyle birleşmesinden dolayı serbest kalan MIT, DIT, T3 ve T4 hormonları sitoplazmaya girmektedir. Serbest kalan T3 ve T4 bazal yüzeyden kana karışırken, MIT ve DIT enzim deiyodinaz ile hızla deiyodinlenmektedir (70).

#### **2.4. NIS İnhibitörleri**

İyotun NIS aracılığı ile taşınması, perklorat, tiyosiyanat ve nitrat gibi çevresel kimyasallar tarafından inhibe edilebilmektedir. Perklorik asitin iyot tutunumunu inhibe etme potansiyelinin tiyosiyanatın potansiyeline kıyasla 15 kat, iyodürün potansiyeline kıyasla 30 kat ve nitratın potansiyeline kıyasla 240 kat daha fazla olduğu belirtilmiştir (74). NIS'nin bu anyonlara olan afinitesi iyottan daha yüksektir, bu nedenle iyodürün tiroid hücrelerine girişini bloke edebilmektedirler. İyot alımının uzun süreli inhibisyonu, tiroid hormon üretiminin azalması ve tiroid hormon

üretimnin artması ile sonuçlanmaktadır (75). NIS inhibitörlerine kronik maruziyet özellikle hamile ve emziren kadınlar, yeni doğanlar ve çocuklar için çok tehlikelidir. Süt salgılayan memedeki iyot transportunun azalarak tiroid fonksiyonlarının bozulması yeni doğan gelişiminde zihinsel ve fiziksel aksaklıkların görülmesi gibi ciddi sağlık sorunlarına neden olabilmektedir (76).

#### **2.4.1. Perklorik asit**

Perklorik asit, atmosferde doğal olarak oluşabilen, katı roket yakıtlarında, patlayıcılarda, yol işaretlerinde ve havai fişeklerde oksitleyici ajan olarak kullanılan NIS'in rekabetçi bir inhibitörüdür. Endüstriyel atıklardan dolayı yer altı sularının kontamine olarak gıdalar ve içme sularını etkilenmesiyle perklorik aside maruz kalınmaktadır. Perklorik asidin süt, yumurta ve tahıllar gibi çeşitli gıdalarda bulunduğu saptanmıştır. Yüksek enerjisinden dolayı metabolize olmayan perklorik asit, sindirim sistemi tarafından emilerek tiroid bezine ulaşmaktadır (77).

#### **2.4.2. Nitrat**

Nitrat; yeşil yapraklı sebzelerde, et ve balık için kullanılan koruyucularda ve pek çok gıda ürünüde bulunan bir kontaminanttır (69). Nitrat alımı, nitrat bazlı gübre ve minerallerin suyu kontamine etmesiyle gerçekleşmektedir. Perklorik asite benzer şekilde, aynı mekanizma üzerinden iyot alımını engelleyerek tiroid hormon sentezini olumsuz yönde etkilemektedir (7).

### **2.5. Proteomik Teknikler**

Bütün, her şey veya tam anlamına gelen “omics” kelimesi, Yunanca'nın “ome” ekinden türetilmiştir. Moleküler biyolojideki bilimsel alanlara eklenen bu “-omics” eki, yaşamı ve varoluşu anlamak için biyolojik sistemlere bütünsel, geniş ve evrensel bir bakış açısıyla bakmayı amaçlamaktadır. 1990 yılında İnsan Genom Projesi ile başlayan genomlarla ilgili bilgi birikimi farklı “omics” yaklaşımlarını (genomik,

proteomik, transkriptomik, metabolamik, bakteriyomik gb) da beraberinde getirmiştir. Projenin tamamlanması ve insan genomunun dizilenmesinden sonra, proteom (genom tarafından kodlanan tüm proteinler) çalışmaları post-genomik çağda en önemli konu haline gelmiş ve proteomik terimi bilimsel literatürde yerini almıştır. Genom canlı bir organizmanın ömrü boyunca stabil/aynı kalırken, proteom iç ve dış uyarılara karşı cevap vererek sürekli değişmektedir. Proteom, sadece genom tarafından kodlanan proteinleri değil aynı zamanda transkripsiyonu, translasyonu, post-translasyonel modifikasyona uğramış proteinleri veya alternatif yapılandırılan protein varyantlarını da temsil etmektedir. Bu nedenle, geniş kapsamlı proteomik çalışmalar genomik çalışmalara tamamlayıcı bir araç olarak görülmektedir

Proteomik; hücre, organizma, doku veya herhangi bir biyolojik sıvıdan elde edilen proteinlerin çeşitli yöntemlerle analizidir. Proteomik analizler, sadece proteinlerin tanımlanmasını ve miktarlarının ölçümünü değil, aynı zamanda işlevlerinin, aktivitelerinin, modifikasyonlarının ve lokalizasyonlarının belirlenmesini de kapsamaktadır (78). Proteom analizi ilk olarak 1970'te Kenrick tarafından bulunan iki boyutlu jel elektroforezi ile başlamış, 1975'te O'Farrell tarafından iyileştirilmiş ve günümüze kadar farklı optimizasyonlar ile geliştirilmiştir (79,80).

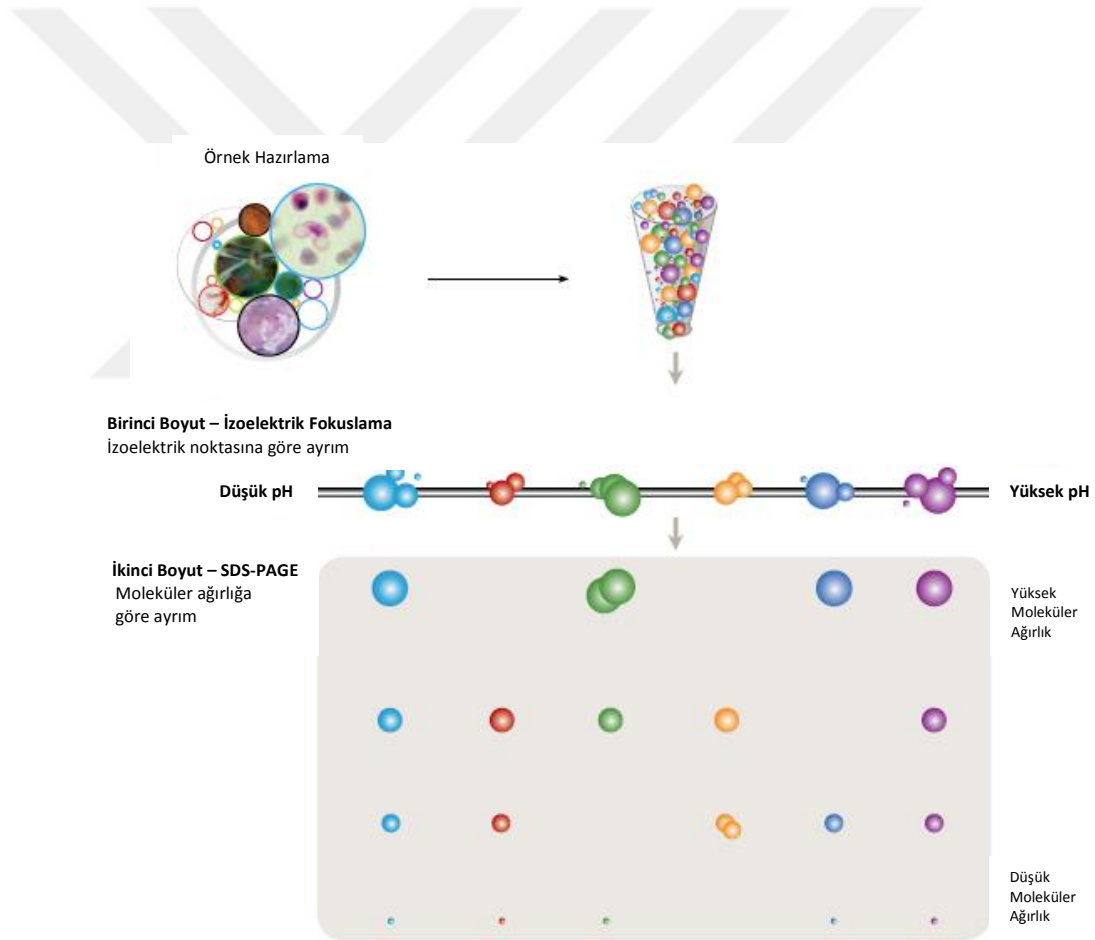
### **2.5.1. İki Boyutlu Jel Elektroforezi**

Proteomik çalışmalarda en çok kullanılan iki yöntem proteinleri ayırma ve boyama işlemlerinin kombinasyonu olan iki boyutlu jel elektroforezi ve bu proteinlerin tanımlanması için kullanılan kütle spektrometresidir. İki boyutlu jel elektroforezi yöntemi hücrelerden, dokulardan veya biyolojik sıvılardan elde edilen kompleks protein karışımlarının jel bazlı proteomik analizidir. Bu yöntem sayesinde örneğin iki boyutlu protein haritası (yaklaşık 2000 proteine kadar) çıkarılabilmektedir (81).

İki boyutlu jel elektroforezi birinci boyutta proteinlerin yüklerine göre ve daha sonra ikinci boyutta molekül ağırlıklarına göre ayrılması prensibine dayanmaktadır. (Şekil 2)

Birinci boyutta gerçekleşen ayırım, önceden denatüre edilmiş proteinlerin bir pH gradyanında izoelektrik noktalarına ulaşp ( $p_i$ ) sıfır net yük aldıklarında oldukları yere odaklanarak birbirlerinden ayrılması prensibine dayanmaktadır. Bu yöntem için 1982 yılında Bjellqvist tarafından bulunan “Immobilize pH Gradient” (IPG) stripler yaygın olarak kullanılmaktadır (82).

İkinci boyutta ise proteinler moleküler ağırlıklarına göre sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile ayrılmaktadır. Molekül ağırlığı büyük olan proteinler, moleküler ağırlığı küçük olan proteinlere kıyasla daha yavaş yürüdüğü için jelin üst kısmında konumlanırken, moleküler ağırlığı küçük olan proteinler jelin alt kısmında konumlanmaktadır.

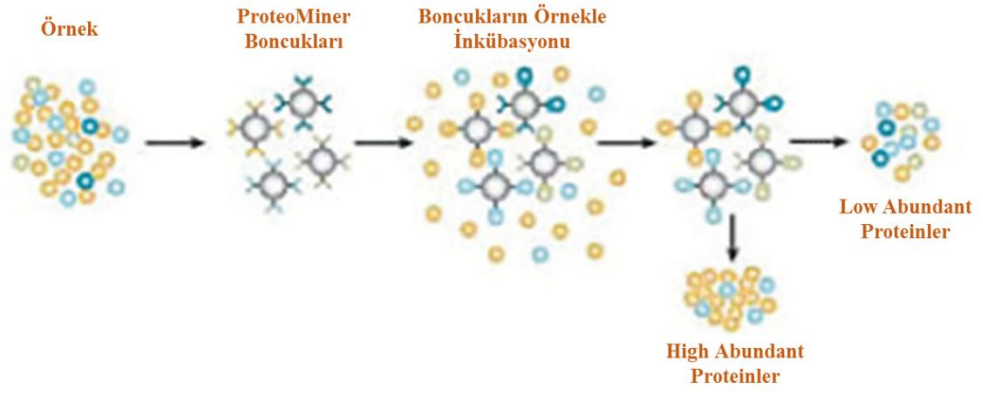


Şekil 2. İki boyutlu jel elektroforezi (BioRad)

İki boyutlu jel elektroforezi yönteminin 30 yılı aşkın süredir kullanılmasına ve üzerinde metodolojik iyileştirilmeler yapılmasına rağmen, bu yöntemde hala çeşitli zorluklar ve kısıtlamalar mevcuttur (83). Bu kısıtlamalardan biri aşırı asidik ( $pI < 3$ ), aşırı bazik ( $pI > 12$ ) veya hidrofobik proteinlerin birinci boyutta iyi ayırlamaması ve buna bağlı olarak ikinci boyutta düzgün yürütülememesidir (84). Bu sorun, farklı pH aralıkları bulunan IPG stripler kullanarak (örn. pH 4-7, pH 6-10 IPG strip), örnekler hazırlama aşamasında farklı kaotrop veya deterjanlar eklenerek kısmen giderilebilmektedir. Diğer bir kısıtlamada moleküler ağırlığı düşük proteinlerin boyanması zor olduğundan jelde görüntülenmeleri de zordur. İki boyutlu jel elektroforezi yönteminde çok sık karşılaşılan diğer bir kısıtlama da örnekte çok miktarda bulunan proteinlerin (high abundant proteins) az miktarda bulunan proteinleri (low abundant proteins) maskeleyenmesi problemidir (52,84). pH aralığı düşük striplerin kullanılması ve high abundant proteinlerin uzaklaştırılmasına yönelik ticari kitlerin üretilmesi bu problemi kısmen çözmektedir. Proteomik çalışmalar her ne kadar çoğunlukla başarılı sonuçlar verse de tekrar jellerinin (replicate) yürütülmesi, görüntülerin incelenmesi ve geçerli istatistiksel analizlerin yapılması kapsayan yoğun iş gücü gerektiren bir yöntemdir.

### **2.5.2. ProteoMiner Enrichment Kit**

Proteomik araştırmaların başlıca zorluklarından biri biyolojik örneklerde bulunan low abundant proteinlerin nasıl verimli bir şekilde zenginleştirileceği, tespit edileceği ve çalışılacağıdır. ProteoMiner Protein Enrichment Kit (BioRad), bu problemi çözmeye yönelik üretilen ticari kitlerden biridir. Örneklerde bulunan high abundant proteinleri uzaklaştırarak low abundant proteinleri zenginleştirmek ve tespit etmek için kullanılmaktadır. ProteoMiner teknolojisi, kromatografik boncuklara bağlanan kombinatorial bir heksapeptid kütüphanesine dayanmaktadır. Çalışılan örnek bu boncukların üzerine eklendiğinde, high abundant proteinler iyonik etkileşim, hidrofobik etkileşim, hidrojen bağı ve Van der Waals kuvveti gibi çeşitli etkileşimlerin kombinasyonu aracılığıyla spesifik ligandlarına bağlanırlar. Böylelikle, high abundant proteinler spesifik ligandları ile eşleşerek low abundant proteinlerden ayrıştırılır (Şekil 3).

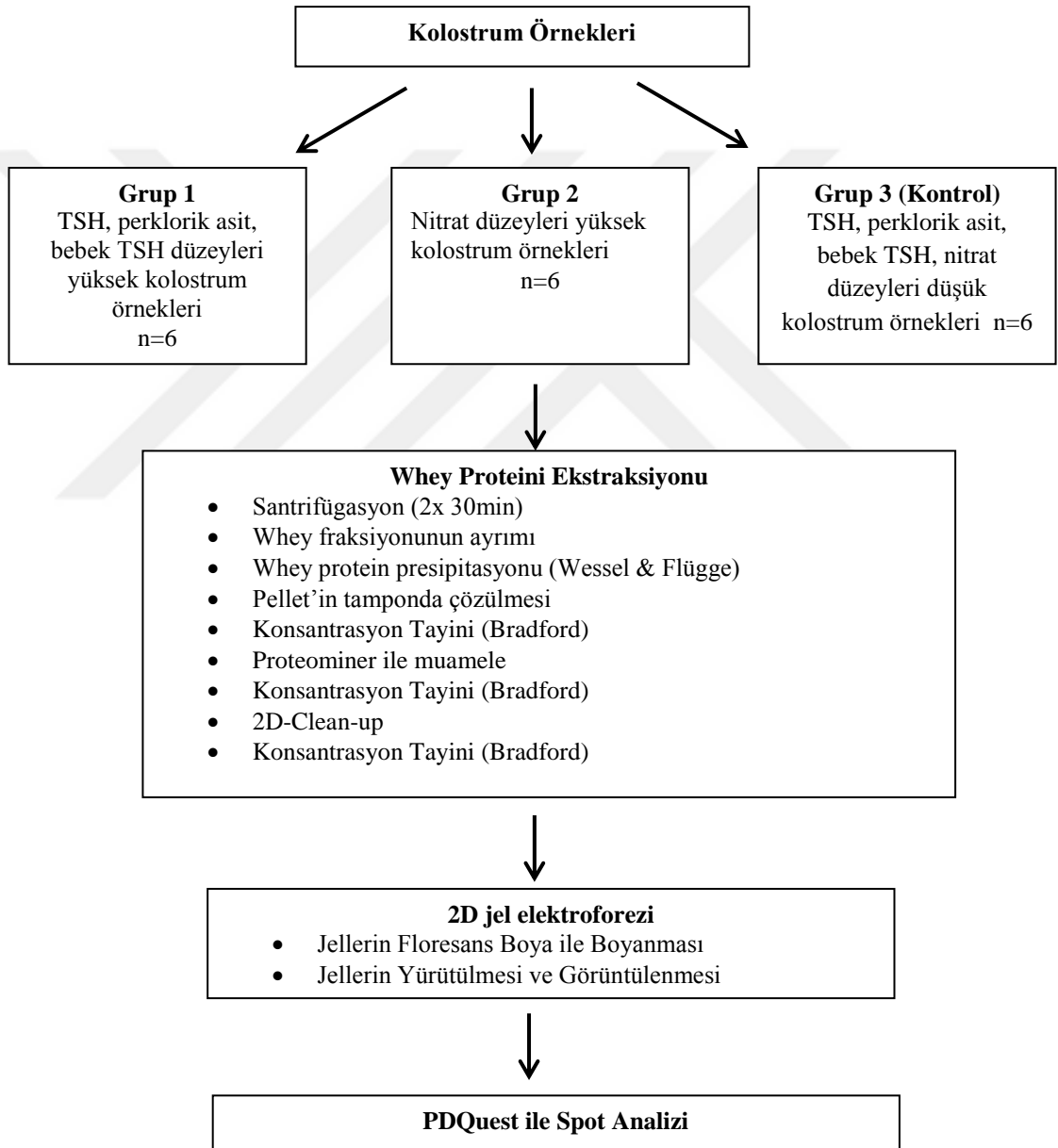


**Şekil 3.** ProteoMiner Çalışma Prensibi (BioRad)

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Çalışma Planı

Bu tez çalışmasında uygulanan deneysel basamaklar ve çalışma planı Şekil 4'te özetlenmiştir.



Şekil 4. Çalışmada uygulanan deneysel basamaklar

### 3.2. Gereçler

Bu tez çalışmasında kullanılan kimyasallar, cihazlar ve laboratuvar malzemeleri marka, model ve firma kodlarıyla birlikte Tablo 1 ve Tablo 2’de verilmiştir.

**Tablo 1.** Kullanılan cihazlar ve malzemeler

Kullanılan Cihaz, Alet ve Malzeme	Marka/Model
Santrifüj	MicroL17 Thermo Fischer Scientific
Derin Donduruculu Buzdolabı (+4 <sup>0</sup> C ve -20 <sup>0</sup> C)	Kirsch Medical
Derin dondurucu (-80 <sup>0</sup> C)	Haier Biomedical
Hassas Analitik Terazı	Kern ABJ
Etüv (37 <sup>0</sup> C)	Hera Term Oven Thermo Scientific
Otoklav	Nüve SteamArt
pH Metre	Thermo Scientific
Vorteks	VWR VV3
Microplate Spektrofotometre	PowerWave HT, BioTek
Çeşitli Hacimlerde Otomatik Pipetler	Thermo Scientific
Mikrosantrifüj	Combi-Spin, Biosan
Çalkalayıcı Isı Bloğu	Witeg Wisd Laboratory Instruments
Azot Tankı	Thermo 30 Thermo Scientific
Izoelektrik Fokuslama Cihazı	Protean i12 IEF Cell, Biorad
İkinci Boyutta Ayrım Cihazı	Serva Electrophoresis GmbH
Floresans Jel Görüntüleme Cihazı	Typhoon FLA 9500, GE Healthcare
Jel Görüntüleme Cihazı	Chemidoc Imaging System BioRad
0.5, 1.5 ve 5 mL Hacimli kapaklı Tüpler	Axygen ve Eppendorf
Çeşitli Hacimlerde Pipet Uçları	Axygen
5, 10 ve 25 mL hacimli Steril Serolojik Pipetler	Isolab
15 ve 50 mL hacimli Steril Falkon Tüpler	Isolab
Çeşitli Cam Malzemeler	Isolab
Yuvarlak rotatör	Rotator-AG FINEPCR
pH İndicator Strips	Merck
SDS-PAGE Cihazı	Mini-PROTEAN, BioRad

**Tablo 2.** Kullanılan kimyasal maddeler

<b>Kullanılan Kimyasal Maddeler</b>	<b>Firma/Kodu</b>
(Hidroksimetil)aminometan (Tris)	Sigma, 252859
Sodyum dodesil sülfat (SDS)	Sigma, 862010
Üre (CH <sub>4</sub> N <sub>2</sub> O)	SERVA Electrophoresis, 24525.01
Tiyüre (CH <sub>4</sub> N <sub>2</sub> S)	Merck, 107979
Bromofenol mavisi	Sigma, B0126
pH 3-10 Amfolit	SERVA Electrophoresis, 43368.01
Commasie Brilliant Blue G-250	BioRad, 161-0406
DL-Dithiothreitol (DTT) (C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub> S <sub>2</sub> )	GE Healthcare, 17-1318-02
Acrylamide/Bis Solution	Serva, 10680.01
Metanol (CH <sub>3</sub> OH)	Sigma, 322415
Kloroform (CHCl <sub>3</sub> )	Sigma, 288306
Lightning Red Floresans Boya	SERVA Electrophoresis, 43400.01
İyodoasetamit (C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> INO)	GE Healthcare, RPN6302
Bovin serum albumin (BSA)	Bruker Daltonics, 8217498
Etanol (C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O)	Merck, 111727
3-((3-kolamidopropil) dimetilamonyo)-1-propansülfonat (CHAPS)	SERVA Electrophoresis, 17038.03
cOmplete™, Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail	Roche, 04693159001
Kalsiyum Klorür (CaCl <sub>2</sub> ) dihydrate	Sigma, C3306
1M Hidroklorik asit (HCL)	Merck, 1090571000
Trikloroasetik asit (TCA)	Sigma, T6399
Aseton	Sigma, 24201-5L
ReadyPrep 2-D Cleanup Kit	BioRad, 163-2130
ProteoMiner Enrichment Kit	BioRad, 163-3006

### **3.3. Yöntem**

#### **3.3.1. Kolostrum Örneklerinin Toplanması**

Bu tez çalışmasında, Zeynep Kamil Kadın ve Çocuk Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nde 38-42. haftalarında doğum yapan annelerden toplanan kolostrum örnekleri kullanılmıştır. Bu tez çalışması Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi Tıbbi Araştırmalar Değerlendirme Kurulu tarafından 2 Eylül 2014

tarihinde incelenmiş ve etik açıdan uygun bulunmuştur (ATADEK 2014-702) (EK 1). Örnekler, laktasyon başlangıcından itibaren 12-24 saat içerisinde el ile sağma yöntemi ile 50mL'lik steril falkon tüplere toplanmıştır. Sonrasında bu örnekler 2mL'lik Eppendorf marka tüplere porsiyonlanmış ve analizler yapılana kadar -80°C dondurucuda saklanmıştır.

### 3.3.2. Protein Ekstraksiyonu

Çalışmada kullanılacak whey proteinlerinin ekstraksiyonu Grapov ve arkadaşlarının (2015) ve Liao ve arkadaşlarının (2011) yayınladığı protokoller baz alınarak gerçekleştirilmiştir (85,86).

Whey Proteinleri Ekstraksiyon Protokolü:

1. -80°C'den çıkarılan kolostrum örnekleri oda sıcaklığında çözülmüştür.
2. Örnekler 250 µl proteaz inhibitörü eklenmiştir. (Roche, complete mini EDTA-free protease inhibitör cocktail, 7X stock)
3. Örnekler hacimlerine göre final konsantrasyonu 0.06M olacak şekilde CaCl<sub>2</sub> eklenmiştir. (kazein depletion için)
4. 1M HCl eklenerek pH 4.6'ya ayarlanmış ve örnekler oda sıcaklığında 1 saat boyunca inkübe edilmiştir.
5. Ardından 13.000 x g, 4°C'de 1 saat boyunca santrifüj edilmiş, kolostrumun fraksiyonlarına ayrılması sağlanmıştır.
6. Elde edilen orta whey fraksiyonu mikropipet yardımıyla üzeri işaretlenmiş yeni bir 2mL'lik Eppendorf mikrosantrifüj tüpü içine toplanmıştır.

Örneklerin temizlenmesi, lipidlerin uzaklaştırılması ve whey proteinlerinin çöktürülmesi için Wessel & Flügge (87) metodu olan metanol/kloroform çöktürmesi kullanılmıştır.

7. 200 µl örneğe 800 µl methanol eklenmiş ve vorteks edilmiştir.
8. Örnekler 9000 x g'de 10 saniye boyunca santrifüj edilmiştir.
9. 200 µl kloroform eklenmiş ve vorteks edilmiştir.
10. Örnekler 9000 x g'de 10 saniye boyunca santrifüj edilmiştir.

11. 600 µl ddH<sub>2</sub>O eklenmiş ve hızlıca vorteks edilmiştir.
12. Örnekler 9000 x g'de 1 dakika boyunca santrifüj edilmiştir.
13. Ara faza dokunmadan üst faz dikkatlice alınmış ve atılmıştır.
14. Tekrardan 600 µl metanol eklenmiş ve vorteks edilmiştir.
15. Örnekler 9000 x g'de 2 dakika boyunca santrifüj edilmiştir.
16. Süpernatant dikkatlice alınmış ve atılmıştır.
17. Elde edilen protein pelletleri oda sıcaklığında tüplerin ağzı açık şekilde kurutulmuştur.
18. Pelletler 200 µl rehidrasyon tamponu içerisinde çözülerek -80°C'de saklanmıştır.

### **3.3.3. Protein Konsantrasyon Tayini**

İlk aşamada elde edilen proteinlerin miktarlarının tayini için Bradford (Bradford Protein Assay, BioRad, USA) metodu kullanılmıştır. Üretici firma tarafından önerilen protokol uygulanmış ve ölçümler microplate spektrofotometresi (PowerWave HT, BioTek, USA) kullanılarak alınmıştır. Ölçümlerin hassasiyeti ve doğruluğu için 9 adet BSA standardı ve bir adet boş solüsyon kullanılmış, kalibrasyon eğrisini oluşturulmuş ve her standard ve örnekten 3 tekrarlı ölçüm alınmıştır.

### **3.3.4. Proteominer Kit Uygulaması**

Kolostrumun whey fraksiyonunda majör olarak bulunan high abundant proteinlerin uzaklaştırılıp low abundant proteinlerin çalışılabilmesi için ProteoMiner Protein Enrichment Kit (BioRad, USA) kullanılmıştır. Örneklerle üretici firma tarafından önerilen protokol uygulanmıştır. Kitin uygulanması gereken, önerilen minimum protein miktarı 10 mg olduğundan, önceden Bradford yöntemi ile ölçülen örneklerden 10 mg'a denk gelen miktar ProteoMiner Kit'inden geçirilmiştir. Ardından, elde edilen low abundant proteinlerin konsantrasyonu tekrardan Bradford metodu kullanılarak ölçülmüştür.

### **3.3.5. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofözezi (SDS-PAGE)**

ProteoMiner Kit uygulaması öncesinde ve sonrasında elde edilen protein örnekleri SDS-PAGE ile yürütölmüştür. SDS-PAGE jeli Brunelle ve arkadaşlarının 2014 yılında yayınladığı protokol baz alınarak hazırlanmış ve 120V'da oda sıcaklığında yürütölmüştür (88). Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra, jel 3 kere 3 dakika boyunca ddH<sub>2</sub>O ile yıkanmış, ardından 45 dakika boyunca fixing (%10 asetik asit, %40 metanol, %50 ddH<sub>2</sub>O) solüsyonunda inkübe edilmiştir. Jele fikse edilen proteinler 1 saat 30 dakika boyunca Commasie Brilliant Blue (CBB, BioRad) boyası ile boyanmış ve ardından destain (%5 asetik asit, %20 metanol, %75 ddH<sub>2</sub>O) solüsyonu ile inkübe edilmiştir. Jelin yıkanması, fikse edilmesi, boyanması ve destain edilmesi işlemleri üç boyutlu çalkalayıcı üzerinde oda sıcaklığında gerçekleşmiştir. Elde edilen jel Chemidoc Imaging System (BioRad) cihazı kullanılarak görüntölenmiştir.

### **3.3.6. ProteoMiner Kit'inden Elde Edilen Proteinlerin İki Boyutlu Jel Elektrofözezi için Optimizasyonu**

ProteoMiner Protein Enrichment Kit'inin iki boyutlu jel elektrofözezi çalışmalarına adapte edilebilmesi için optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. ProteoMiner kolonlarından örneklerin geçirilmesinde kullanılan kit tamponunun asetik asit içermesinden dolayı, iki boyutlu jel elektrofözezi için proteinlerin floresans boya ile işaretlenmesi sırasında sorunlar gözlemlenmiştir. Bu nedenle, ProteoMiner kiti sonrasında elde edilen low abundant proteinlerin çöktürölüp iki boyutlu jel elektrofözine uyumlu rehidrasyon tamponunda çözünmesi gerekmektedir. Bu çöktürme işlemi için iki farklı yöntem denenmiştir. Bunlardan birincisi literatürde de sık kullanılan TCA/aseton çöktürmesi (89), ikincisi ise ticari olarak satılan 2D Clean-up kit (BioRad) uygulamasıdır.

### **3.3.7. TCA/Aseton Çöktürmesi**

ProteoMiner Kit'i sonrasında elde edilen proteinlerin çöktürülmesi Fic ve arkadaşlarının (2010) yayınladığı protokol baz alınarak gerçekleştirilmiştir (89). Protokol sonucunda elde edilen protein pelletleri oda sıcaklığında tüplerin ağzı açık şekilde kurutulmuş ve üzerine rehidrasyon tamponu (7M üre, 2M tiyoüre, %4 CHAPS, proteaz inhibitörü, BMB) eklenerek çözülmüş ve Bradford metodu ile konsantrasyon tayini yapılmıştır.

### **3.3.8. 2D Clean-up Kit Uygulaması**

Yapılan optimizasyon çalışmaları doğrultusunda örneklerin iki boyutlu jel elektroforezi için kullanılan rehidrasyon tamponunda çözünmesi ve temizlenmesi için ReadyPrep 2D Clean-up Kit (BioRad, USA) kullanılmıştır. Kit, üretici firma tarafından önerilen protokole göre uygulanmıştır. En son aşamada çöktürülen protein pelletleri oda sıcaklığında tüplerin ağzı açık şekilde kurutulmuş ve üzerine rehidrasyon tamponu (7M üre, 2M tiyoüre, %4 CHAPS, proteaz inhibitörü, BMB) eklenerek çözülmüş ve Bradford metodu ile konsantrasyon tayini yapılmıştır.

### **3.3.9. İki Boyutlu Jel Elektroforezi**

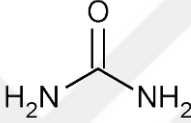
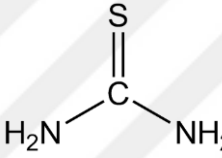
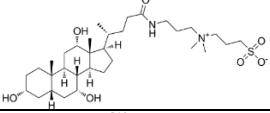
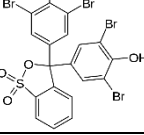
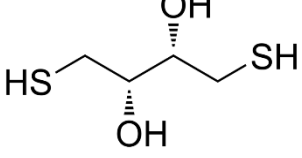
#### **Striplerin Rehidrasyonu**

Bu tez çalışmasında, iki boyutlu jel elektroforezi yönteminin ilk adımı olan strip rehidrasyonu için 17cm pH 3-10 non-lineer (Serva Electrophoresis GmbH, Almanya) IPG stripler kullanılmıştır. Üretici firma (Serva) tarafından önerilen parametreler dikkate alınarak striplere 100 µg protein yüklenmiştir.

100 µg proteine denk gelecek kadar örnek, DTT, amfolit ve Lightning Red (Serva Electrophoresis GmbH, Almanya) floresans boyası total hacim 300 µl olacak şekilde rehidrasyon tamponuna eklenerek strip rehidrasyon solüsyonu hazırlanmıştır. Rehidrasyon tamponu içeriğinde bulunan ve rehidrasyon basamağında eklenen kimyasallar ve proteinler üzerindeki etkileri Tablo 3'te verilmiştir. Floresans boyama

işlemi üretici firma tarafından önerilen protokole uygun olarak pH ayarlanarak ve 20 dakika inkübasyon gerçekleştirilerek yapılmıştır. Hazırlanan rehidrasyon solüsyonu rehidrasyon tepsisinin içine pipetlenmiş ve üzerine solüsyon stripin jel kısmı ile temas edecek şekilde (jel side down) strip yerleştirilmiştir. Daha sonra, rehidrasyon tepsi IEF PROTEAN i12 IEF CELL (BioRad, USA) cihazı içerisine yerleştirilerek strip rehidrasyonu (yaklaşık 16 saat, gece boyu) gerçekleştirilmiştir.

**Tablo 3.** Rehidrasyon basamağında eklenen kimyasallar ve proteinler üzerindeki etkileri

Kimyasal	Yapısı	Kimyasal Formülü	Proteinler Üzerindeki Etkileri
Üre		CH <sub>4</sub> N <sub>2</sub> O	Hidrojen bağlarını kıran ve proteinlerin denatüre olmasını sağlayan kaotropik bir ajandır.
Tiyüre		CH <sub>4</sub> N <sub>2</sub> S	Üreye ek olarak çözünmeyen proteinlerin çözünmesine yardımcı olarak kullanılır.
CHAPS		C <sub>32</sub> H <sub>58</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub> S	Proteinlerin çözünmesini sağlayan zwitter iyonik bir deterjandır.
Bromofenol mavisi		C <sub>19</sub> H <sub>10</sub> Br <sub>4</sub> O <sub>5</sub> S	Striplerin rehidrasyonu sırasında örneği takip etmek için kullanılan bir boyadır.
DTT		C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub> S <sub>2</sub>	Proteinlerin sistein kalıntıları arasında oluşan disülfid bağlarını engellemek için kullanılan indirgeyici bir ajandır.
<b>Eklenen Diğer Kimyasallar ve Etkileri</b>			
Amfolit	Amfolitler, hem asidik hem de bazik grupları içeren amfoterik moleküllerdir. Jelde gradyan oluşmasına yardımcı olarak kullanılırlar.		
Proteaz İnhibitörü	Amino asitler arasındaki bağları hidrolize ederek proteinlerin parçalanmasına ve yıkılmasına yardımcı olan proteazların işlevini engelleyen moleküllerdir.		

## İzoelektrik Fokuslama

Rehidrasyon işleminin ardından yüklenen proteinlerin izoelektrik noktalarına göre ayrımını gerçekleştirmek için stripler rehidrasyon tepsisinden alınmış ve jel kısmı yukarı bakacak şekilde (jel side up) IEF tepsisine (BioRad, USA) yerleştirilmiştir. Striplerin anodik ve katodik uçlarına dH<sub>2</sub>O ile ıslatılmış wickler yerleştirildikten sonra wickler ile temas edecek şekilde elektrotlar takılmıştır. Daha sonra, %0.06 DTT içeren ddH<sub>2</sub>O ile ıslatılmış wickler striplerin bazik tarafına, elektrotun bittiği yere yerleştirilmiştir. IEF tepsisi IEF PROTEAN i12 IEF CELL (BioRad, USA) cihazı içine yerleştirilerek strip yüzeyleri jel tabakanın kurumasını ve ürenin kristalize olmasını önleyen mineral yağ (Serva) ile kaplanmıştır. Böylece, strip rehidrasyonundan sonra yüklenen proteinlerin izoelektrik noktalarına göre ayrımı (birinci boyut) Tablo 4’de verilen (önceden optimize edilmiş) izoelektrik fokuslama parametrelerine göre gece boyunca gerçekleştirilmiştir.

**Tablo 4.** 17cm pH 3-10 non-lineer Stripler için İzoelektrik Fokuslama Parametreleri

Adım	Volt	Gradyen	µAmp	Süre
1.	100	Rapid	50	2 saat
2.	200	Rapid	50	1 saat
3.	500	Rapid	50	1 saat
4.	1000	Rapid	50	1 saat
5.	2000	Rapid	50	2 saat
6.	5000	Gradyen	50	3 saat
7.	5000	Rapid	50	45000Vhr
8.	1000	Hold	50	

## Dengeleme

Stripler ikinci boyutta yürütülmeden önce dengeleme tamponu (Serva) ile muamele edilmiştir. Üre, SDS ve DTT eklenerek ilk dengeleme tamponu hazırlanmıştır. Dengeleme tamponu stripler üzerine pipetlenmiş ve üzeri alüminyum ile kapatılarak oda sıcaklığında üç boyutlu çalkalayıcı üzerinde 15 dakika inkübe edilmiştir. Ardından, aynı dengeleme tamponu üre, SDS ve İAA ile hazırlanmış, striplerin üzerine pipetlenmiş ve aynı şekilde 15 dakika boyunca inkübe edilmiştir.

## Proteinlerin İkinci Boyutta Ayrımı / Jellerin Yürütülmesi

Proteinlerin ikinci boyutta ayrımı ve jellerin yürütülmesi için HPE (High Performance Electrophoresis) BlueHorizon (Serva Electrophoresis GmbH, Almanya) yatay elektroforez sistemi kullanılmıştır (Şekil 5). Jellerin yürütüldüğü plakanın harici bir soğutucuya bağlandığı bu sistem sayesinde ısı sabit tutularak (+15°C) yürütülen jelin ısınması ve proteinlerin difüze olması engellenmiştir. Serva tarafından hazır alınan jeller (2D HPE Large Gels, 25cm, Serva) önceden soğutulan (+15°C) ve üzerine soğutma sıvısı (cooling fluid) eşit bir şekilde dağıtılmış plaka üzerine altında baloncuk kalmayacak şekilde yerleştirilmiştir. Anodik ve katodik wickler uygun yerlerine yerleştirildikten sonra önceden dengelemesi yapılmış strip hazır jel üzerindeki yuvasına jel kısmı hazır jel ile temas edecek şekilde (jel side down) yerleştirilmiştir. Üretici firma tarafından önerilen yürütme parametreleri uygulanmış (Tablo 5), yürütme işlemi 4,5 saatte tamamlanmıştır.

**Tablo 5.** Serva 2D HPE Large Gel Yürütme Parametreleri

Adım	max V	max mA	max W	Süre
1	100 V	7 mA	1 W	30 dk
2	200 V	13 mA	3 W	30 dk
3	300 V	20 mA	5 W	10 dk
<b>IPG Strip'in Çıkarılması</b>				
4	1000 V	40 mA	30 W	3 sa 20 dk



**Şekil 5.** HPE (High Performance Electrophoresis) BlueHorizon yatay elektroforez sistemi

### **Jellerin Görüntülenmesi**

Yürütme işlemi tamamlanan jeller; proteinlerin, nükleik asitlerin ve diğer biyomoleküllerin miktar tayini için hem çok yönlü hem de esnek görüntüleme sağlayan, gelişmiş floresan algılama ve yüksek görüntü çözünürlüğü olan lazer tarayıcı Typhoon FLA 9500 (GE Healthcare) kullanılarak görüntülenmiştir. Protein işaretlemesinde kullanılan floresans boyanın (Lightning Red, Serva) eksitasyon değeri 530 nm ve emisyon değeri 610 nm olduğundan görüntü alınırken LPG emisyon filtresi ( $\geq 575$  nm) kullanılmıştır. Yürütülen tüm jeller  $100\mu\text{m}/\text{pixel}$  çözünürlükte taranmıştır. Görüntülenen jeller gece boyunca üç boyutlu çalkalayıcı üzerinde fixing solüsyonu (%10 asetik asit, %40 metanol) içerisinde fikse edilmiş ve  $+4^{\circ}\text{C}$ 'de kapalı plastik kutularda %20 etanol içerisinde saklanmıştır.

### **Jellerin İstatistiksel Analizi/Spotların Belirlenmesi**

Görüntülenen jeller PDQuest Advanced 2D Analysis Software V8.0.1 (BioRad, USA) kullanılarak analiz edilmiştir. Yürütülen jellere ait görüntüler PDQuest yazılımına aktarılmış ve jellerde bulunan spotların seçimi duyarlılık, spot büyüklüğü ve Gaussian dağılım seçilerek yapılmıştır. Ortak olan spotların belirlenmesi için tüm görüntüler kullanılarak bir master jel oluşturulmuştur. Student's t-test kullanılarak

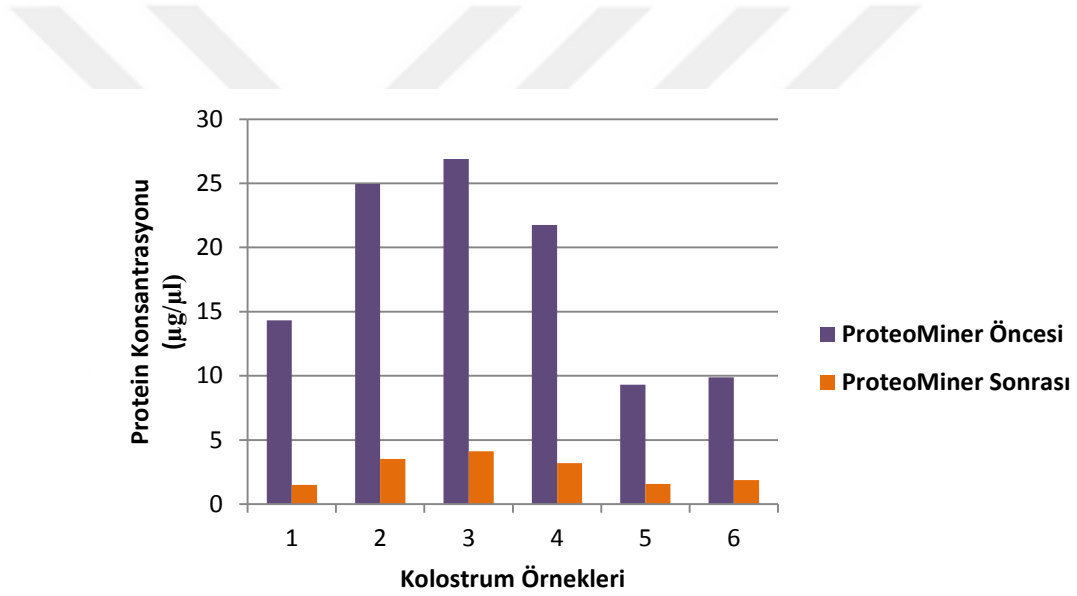
istatistiksel olarak anlamlı ( $p \leq 0.005$ ) ve jellerde gruplar arası farklılık gösteren spotlar belirlenmiştir. Spotlar PDQuest Programı tarafından jel üzerindeki konumlarına göre numaralandırılmış ve bu sayede spot listesi oluşturulmuştur.



## 4. BULGULAR

### 4.1. ProteoMiner Kit'i Optimizasyon Sonuçları

Kolostrumda bulunan high abundant proteinlerin uzaklaştırılıp low abundant proteinlerin çalışılabilmesi için ProteoMiner Protein Enrichment Kit'i kullanılmıştır. ProteoMiner Kit uygulaması sonrasında alınan Bradford protein konsantrasyon ölçümünü kit uygulaması öncesinde alınan protein konsantrasyon ölçümüne göre düşüş göstermiştir (Şekil 6).

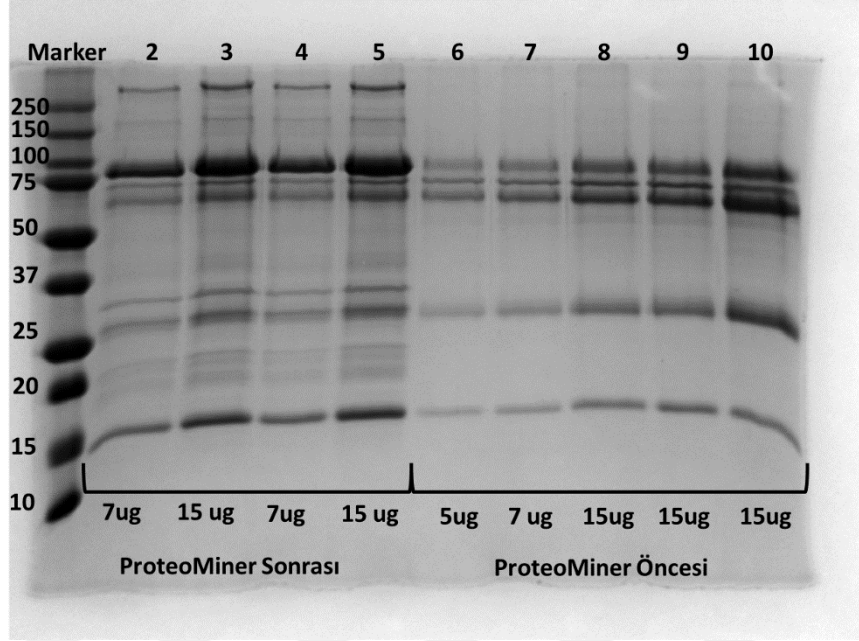


Şekil 6. ProteoMiner Kit uygulaması öncesinde ve sonrasında 6 örnekten alınan Bradford protein konsantrasyon ölçümleri

İki boyutlu jel elektroforezi deneylerine başlamadan önce Bradford metodu ile konsantrasyon ölçümü alınan örneklerin ölçümlerinin doğru yapıldığı SDS-PAGE ile teyit edilmiştir. Böylelikle, Bradford yöntemi ile alınan konsantrasyon ölçümlerinin hassas olduğu gösterilmiş ve örneklerin kalite kontrolü yapılmıştır.

SDS-PAGE jelinin ilk kuyucuğuna moleküler ağırlıkları belli olan protein standardı (BioRad) yüklenmiştir. 2-5 numaralı kuyucuklara 7 µg ve 15 µg'a denk gelen ProteoMiner uygulanmış protein örneği yüklenmiştir. 6-10 numaralı kuyucuklara ise

7 µg ve 15 µg'a denk gelen ProteoMiner uygulanmamış protein örneği yüklenmiştir. (Şekil 7)



Şekil 7. ProteoMiner öncesi ve sonrası yürütülen kolostrum örneğinin SDS-PAGE jel görüntüsü

ProteoMiner Protein Enrichment Kit uygulaması sonrasında yapılan optimizasyon çalışması için iki farklı yöntem (TCA/aseton çöktürmesi ve 2D Clean-up kit) denenmiştir. Bu yöntemler kullanılarak çöktürülen kolostrum whey proteinlerinin iki boyutlu jel elektroforezi görüntüleri Şekil 8'de verilmiştir.

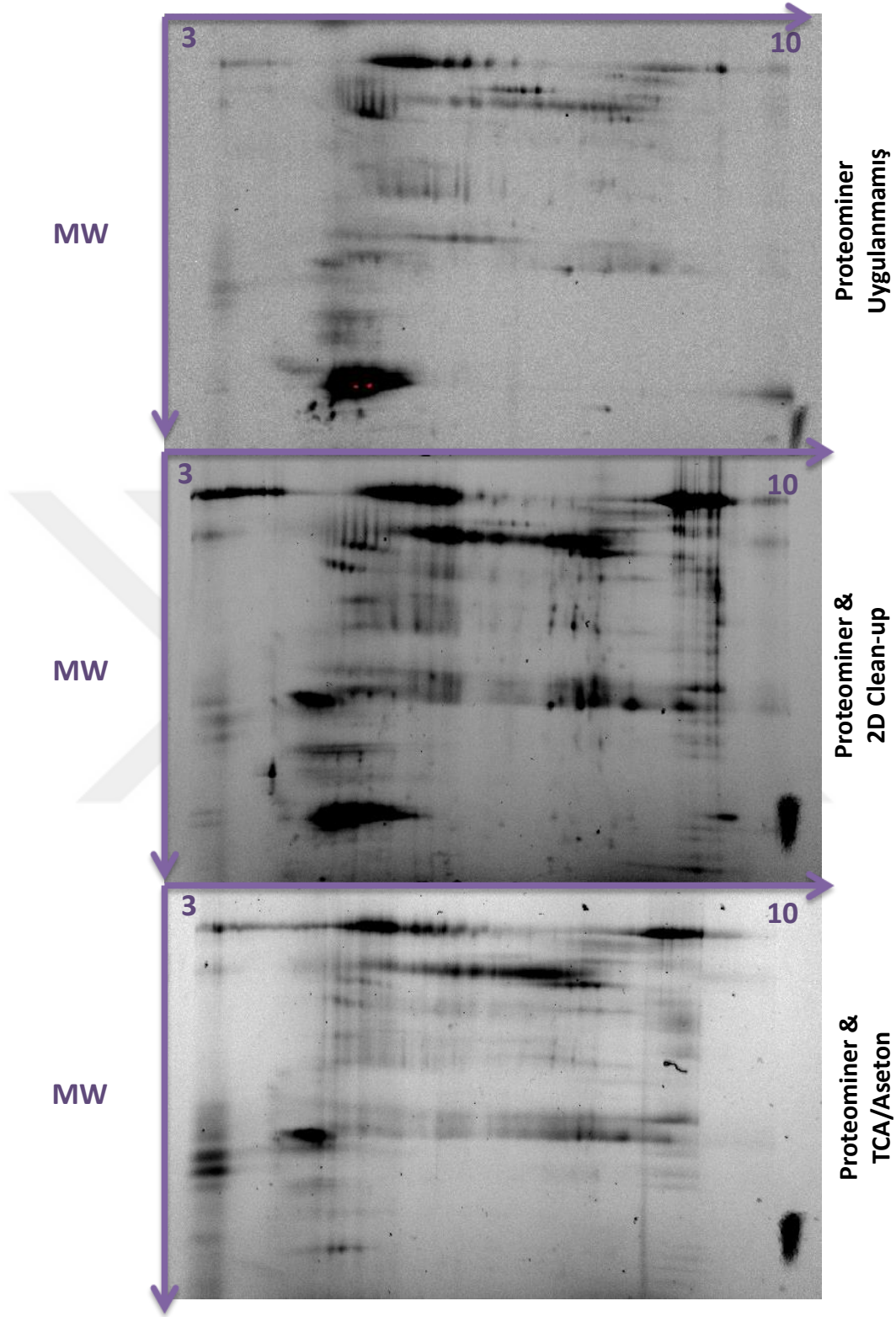
Şekil 8'de gösterilen ilk jel görüntüsü ProteoMiner uygulanmamış örnekle yürütülen jele aittir. ProteoMiner sonrasında 2D Clean-up Kit uygulanarak hazırlanan örneğe ait jel görüntüsü ikinci sıradadır. Son olarak, ProteoMiner sonrasında TCA/aseton çöktürmesi ile hazırlanan örneğe ait iki boyutlu jel elektroforezi görüntüsü verilmiştir.

ProteoMiner Kit'i ardından 2D Clean-up Kit'i uygulanarak hazırlanan örnekle yürütülen jelin, TCA/aseton çöktürmesi ile hazırlanan örnekle yürütülen jele kıyasla daha temiz olduğu ve daha belirgin spotlar içerdiği gözlemlenmiştir. Bu nedenle, bu

tez çalışmasında önce ProteoMiner Kit'i ve ardından 2D Clean-up Kit'i ile muamele edilerek hazırlanan örnekler kullanılmıştır.

PDQuest Advanced 2D Analysis yazılımı kullanılarak yapılan jel analizleri sonucunda, ProteoMiner uygulanmamış örnekle yürütülen jelde 163 protein spotu görülürken, ProteoMiner ile muamele edilip 2D Clean-up Kit'i uygulanan örnekle yürütülen jelde 350 protein spotu gözlemlenmiştir.

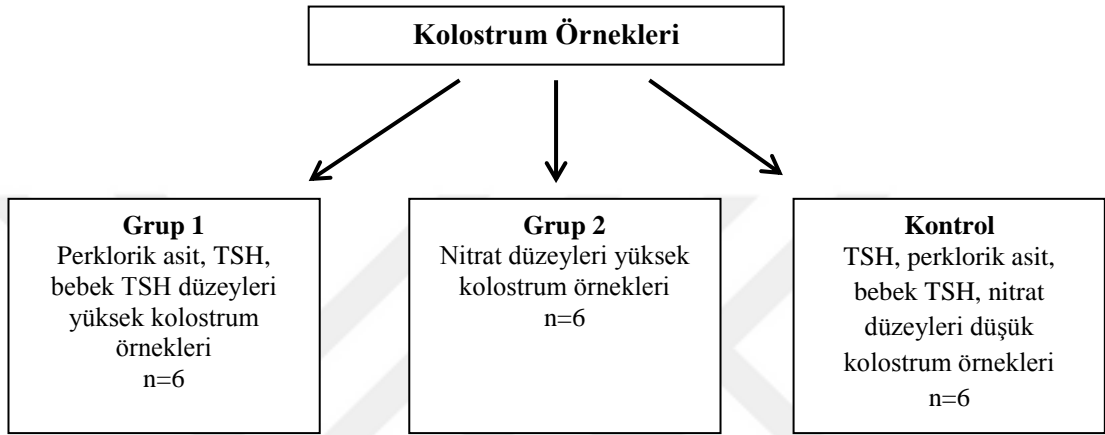




**Şekil 8.** ProteoMiner Kit'inin iki boyutlu jel elektroforezine optimizasyonu için yürütülen jel görüntüleri

## 4.2. İki Boyutlu Jel Elektroforezi Sonuçları

Perklorik asit düzeyleri yüksek (grup 1), nitrat düzeyleri yüksek (grup 2) ve perklorik asit ve nitrat düzeyleri düşük (kontrol) olan kolostrum örneklerinin her birinden alınan 100 µg protein pH 3-10 NL stripler (Serva) kullanılarak ayrı ayrı 17 cm'lik jellerde yürütülmüştür. Bu tez çalışmasında kullanılan örneklerin gruplandırılmasına dair şekil aşağıda verilmiştir (Şekil 9).



Şekil 9. Çalışmada kullanılan kolostrum örneklerinin gruplandırılması

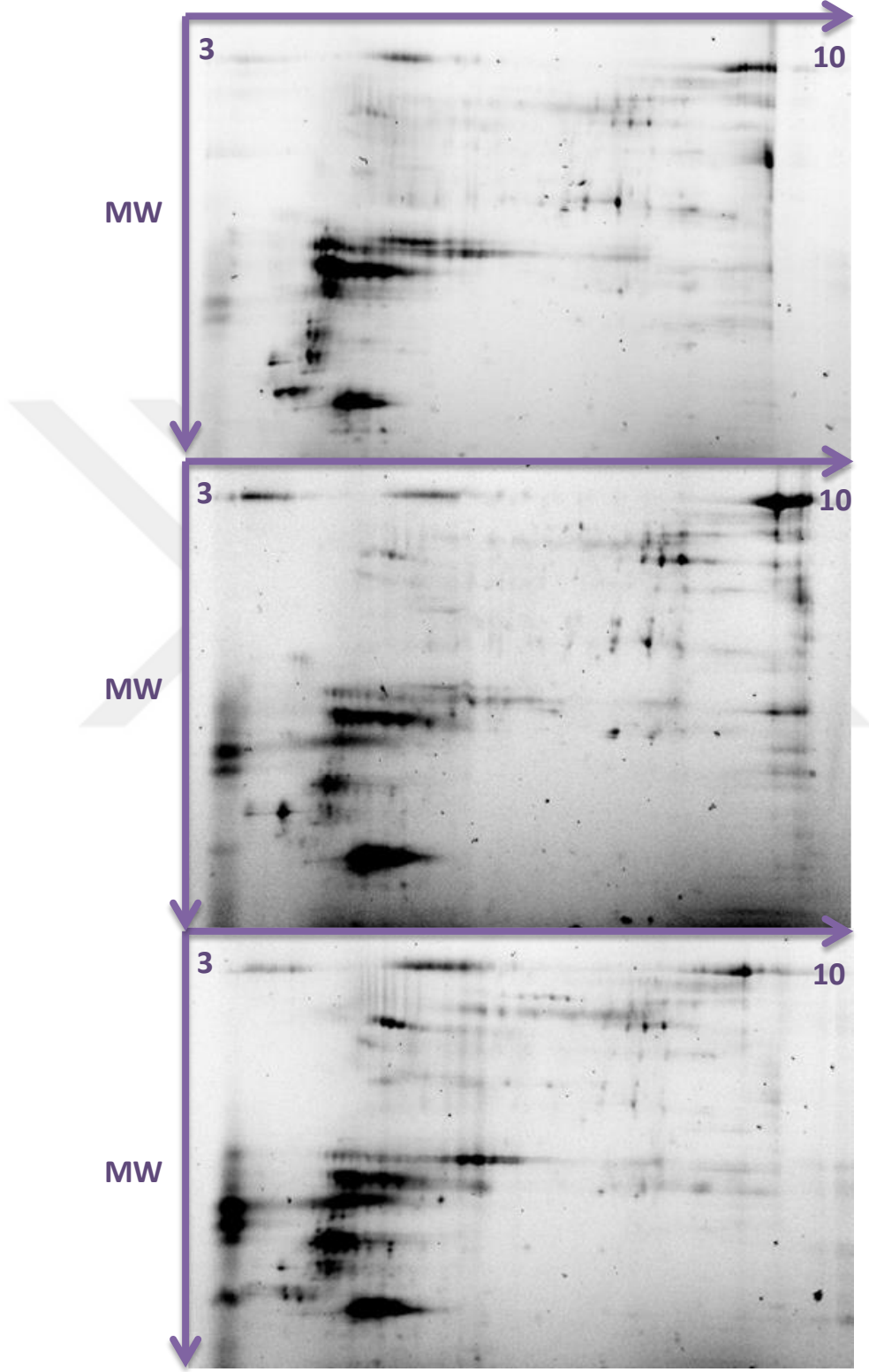
Bu çalışmada, 3 farklı gruptan 6'şar jel olmak üzere toplamda 18 tane jel yürütülmüştür. Her bir jel görüntüsü yeni doğum yapmış anneden toplanan kolostrum örneğini temsil etmektedir. Yürütülen jellere ait 3'er tane temsili görüntü Şekil 10, 11 ve 12'de verilmiştir.

İki boyutlu jel elektroforezi sonrasında PDQuest Advanced 2D Analysis yazılımı ile master jel görüntüsü oluşturulmuştur (Şekil 13).

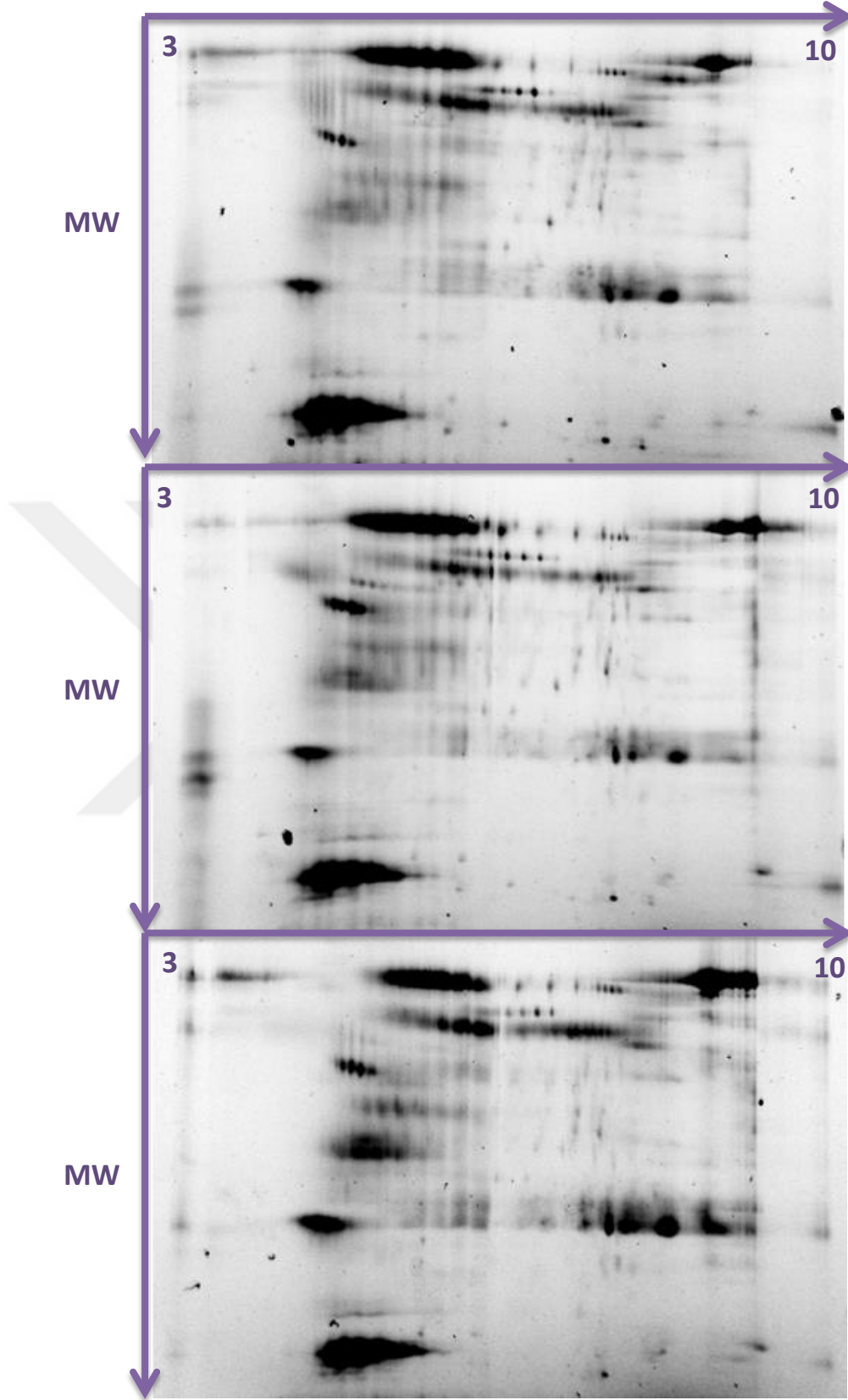
PDQuest yazılımı kullanılarak yapılan analizler sonucunda, jellerde bulunan toplam spot sayıları ve jeller arası farklılıklar belirlenmiştir.

Perklorik asit düzeyleri yüksek olan grubun (grup 1) yürütülen 6 jeli de incelendiğinde her bir jelde ortak 68 protein spotu tespit edilmiştir. Nitrat düzeyleri yüksek olan grubun (grup 2) yürütülen 6 jeli de incelendiğinde her bir jelde ortak 74 protein spotu tespit edilmiştir. Perklorik asit ve nitrat düzeyleri düşük (kontrol grubu)

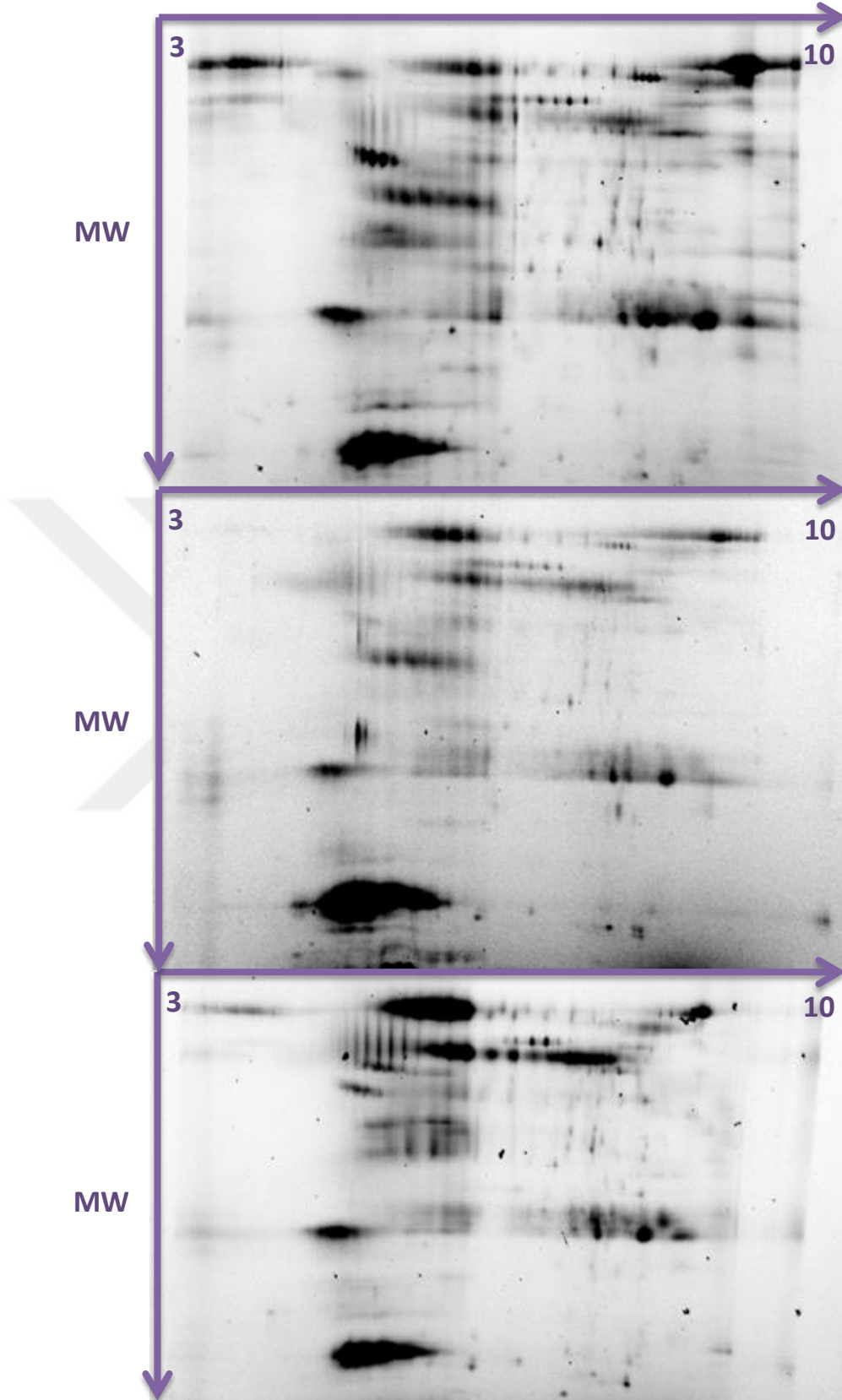
olan grubun yürütülen jelleri incelendiğinde her bir jelde ortak 70 protein spotu tespit edilmiştir.



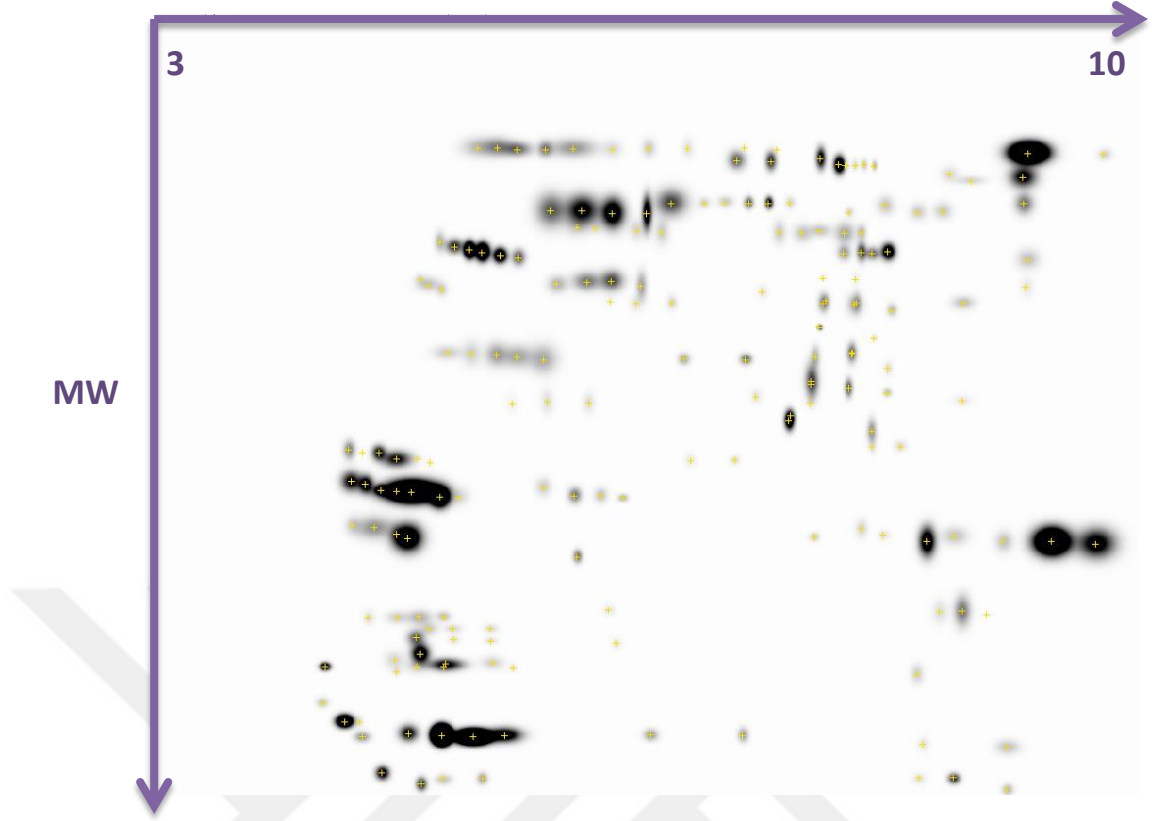
**Şekil 10.** Perklorik asit düzeyleri yüksek (grup 1) kolostrum örneklerinin iki boyutlu jel elektroforezi görüntüleri (pH 3-10NL, 17cm)



**Şekil 11.** Nitrat düzeyleri yüksek (grup 2) kolostrum örneklerinin iki boyutlu jel elektroforezi görüntüleri (pH 3-10NL, 17cm)



Şekil 12. Perklorik asit ve nitrat düzeyleri düşük (kontrol) kolostrum örneklerinin iki boyutlu jel elektroforezi görüntüleri (pH 3-10NL, 17cm)



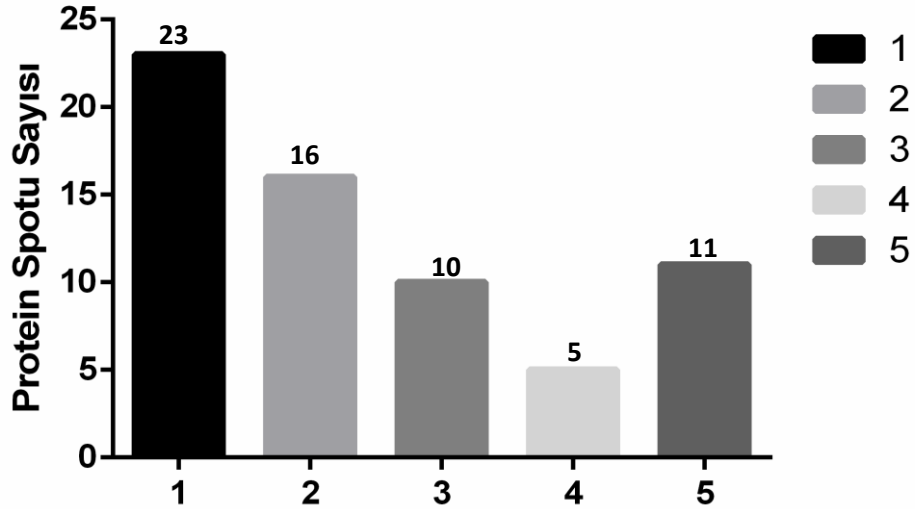
Şekil 13. Yürütülen jellerden elde edilen master jel görüntüsü

PDQuest spot analizinde toplam 60 spot gruplar arasında anlamlı farklılık göstermiş ve bu anlamlı farklılık gösteren spotlardan tablo oluşturularak gruplar arası farklılıklar belirlenmiştir ( $p < 0.05$ ) (Ek 7.2). PDQuest analizi sırasında anlamlı farklılık gösteren spotlara program tarafından spot numarası verilmiştir. Ek 7.2’de, jellerde görüntülenen spotlar jel numaraları ve gruplarına göre artı (+) işareti ile belirtilmiştir. Eğer bir spot herhangi bir jelde görülmemişse, o jele denk gelen kutu boş bırakılmıştır. Bu hazırlanan tabloya göre, bir proteinin ekspresyonunun artması veya azalmasına o protein spotunun en az 4 jelde bulunup bulunmamasına göre karar verilmiştir.

PDQuest yazılımı tarafından anlamlı farklılık gösteren spotlar ile oluşturulan tabloya göre perklorik asit düzeyi yüksek olan grup (grup 1) ile kontrol karşılaştırıldığında, 23 proteinin ekspresyonunda artış görülürken, 27 proteinin ekspresyonunda ise azalma görülmüştür.

Nitrat düzeyi yüksek olan grup ile nitrat düzeyi düşük olan kontrol grubu karşılaştırıldığında, 10 proteinin ekspresyonunda artış görülürken, 5 proteinin ekspresyonunda azalma görülmüştür.

Son olarak, bütün grupları birbiri ile karşılaştırdığımızda, perklorik asit düzeyi yüksek olan kolostrum örnekleri ile yürütülen jellerde 23 proteinin ekspresyonunun arttığı ve 16 proteinin ekspresyonunun azaldığı gözlemlenmiştir. Nitrat düzeyi yüksek olan kolostrum örnekleri ile yürütülen jellerde ise 10 proteinin ekspresyonunun arttığı, 5 protein ekspresyonunun azaldığı gözlemlenmiştir. Buna ek olarak, 11 tane proteinin ekspresyonu ise hem perklorik asit düzeyleri yüksek olan grupta hem de nitrat düzeyleri yüksek olan grupta azalmıştır. (Şekil 14)



Şekil 14. Yürütülen jellerde gruplar arası farklılık gösteren proteinler

- 1: Perklorik asit düzeyleri yüksek olan jellerde artan spot sayısı
- 2: Perklorik asit düzeyleri yüksek olan jellerde azalan spot sayısı
- 3: Nitrat Düzeyleri yüksek olan jellerde artan spot sayısı
- 4: Nitrat düzeyleri yüksek olan jellerde azalan spot sayısı
- 5: Hem perklorik asit düzeyleri yüksek hem de nitrat düzeyleri yüksek jellerde azalan spot sayısı

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Eser elementlerden biri olan iyot, yeni doğanın gelişimi ve normal büyümenin devamlılığı için önemli olan tiroid hormonlarının sentezinde başrol oynamaktadır. Tiroid hücrelerine iyot alımında görevli olan integral plazma membran proteini, NIS'in meme dokusunda ifade edilmesi nedeniyle laktasyon döneminde iyot, kolostrum ve anne sütünün içinde yoğun olarak bulunmakta ve emzirme yoluyla çocuğa aktarılmaktadır (1,8). Bu nedenle, gebelik ve laktasyon döneminde yeterli miktarda iyot alınmaması veya iyot alımının perklorik asit ve nitrat gibi NIS inhibitörleri ile engellenmesi vücuttaki iyot metabolizmasını bozarak hem annenin hem de yeni doğanın sağlığını etkilemekte ve tiroid hormon sentezinin bozulmasıyla sonuçlanmaktadır. Dolayısıyla, perklorik asit ve nitrat düzeyleri yüksek insan kolostrum örneklerinde bulunan whey proteinlerinin perklorik asit ve nitrat düzeyleri düşük kontrol grubu ile proteomik yöntemler kullanılarak karşılaştırılması kolostrumun yeni doğan üzerindeki etkileri düşünüldüğünde büyük önem arz etmektedir. Literatürde NIS inhibitörlerinin kolostrum protein profiline etkisinin araştırıldığı hiçbir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle, bu tez çalışmasının literatüre katkıda bulunacağı düşünülmektedir. Bu amaçla, tez çalışması kapsamında kolostrum örneklerinin proteomik çalışmaların en temelini oluşturan iki boyutlu jel elektroforezi yöntemi için optimize edilmesi ve ardından NIS inhibitör düzeyleri yüksek ve düşük olan kolostrum örneklerinin iki boyutlu jel elektroforezi yöntemi ile ön çalışma olarak karşılaştırılması amaçlanmıştır.

İnsan kolostrumunun yeni doğan için öneminden dolayı bu eşsiz biyolojik sıvı çok değerli kabul edilmektedir. Daha önce insan kolostrumu üzerine proteomik çalışmalar yapılmasına rağmen, kolostrum whey fraksiyonundaki high abundant proteinlerin (immünoglobulin, kazein, albümin, laktoferrin, laktotransferrin, laktoglobulin ve laktalbumin gibi) low abundant proteinleri maskeleyesinden dolayı literatürde low abundant proteinlere yönelik çok fazla çalışma bulunmamaktadır. Murakami ve arkadaşları tarafından 1998 yılında yapılan çalışmada kolostrum low abundant proteinleri immunoabsorbent kolonlar kullanılarak ayrıştırılmış ve ardından

iki boyutlu jel elektroforezi yapılarak toplamda 400 spot elde edilmiştir. Ancak, bu spotlardan yalnızca 22 tanesi tanımlanabilmiştir (3). Ticari olarak üretilen kitlerin yaygınlaşmasıyla low abundant proteinlere yönelik çalışmalar da artmaktadır (86,90). Liao ve arkadaşları tarafından 2010 yılında yapılan çalışmada ticari olarak üretilen ProteoMiner Kit'i kullanılmış ve ardından LC-MS/MS yöntemi ile 115 protein tanımlanmıştır. Fakat bu üretilen kitlerin daha çok serum ve plazmaya yönelik olmasından dolayı ticari kitler kullanarak yapılan kolostrum çalışmaları sınırlı sayıdadır (86).

Bu tez çalışmasında, ProteoMiner Kit'i uygulanan kolostrum whey proteinlerinin iki boyutlu jel elektroforezi çalışmalarına adapte edilebilmesi için optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Optimizasyon çalışmasının ilk aşamasında, 2D Clean-up Kit'i kullanılarak hazırlanan örnek ile yürütülen jelde, TCA/aseton çöktürmesi kullanılarak hazırlanan örnek ile yürütülen jele kıyasla daha keskin spotlar gözlemlenmiştir. Bu nedenle, 2D Clean-up Kit'inin bu çalışma için daha uygun olduğuna karar verilmiş ve çalışmalara bu yöntemle devam edilmiştir.

ProteoMiner Kit'i uygulanan iki boyutlu jel elektroforezi görüntüsü ile ProteoMiner Kit'i uygulanmamış jel görüntüsü karşılaştırılmıştır. PDQuest yazılımı kullanılarak yapılan jel analizleri sonucunda, ProteoMiner uygulanmamış örnekle yürütülen jelde 163 protein spotu görülürken, ProteoMiner ile muamele edilip 2D Clean-up Kit'i uygulanan örnekle yürütülen jelde 350 protein spotu gözlemlenmiştir. Kit uygulaması sonrasında PDQuest tarafından tespit edilen spotların sayısının artışı göz önünde bulundurulduğunda ProteoMiner yöntemi ile high abundant proteinlerin uzaklaştırıldığı ve low abundant proteinlerin zenginleştirildiği tespit edilmiştir. Aynı zamanda, kit uygulaması sonrasında alınan Bradford protein konsantrasyon ölçümünün kit uygulaması öncesine kıyasla düşüş göstermesi ProteoMiner Kit'inin etkili bir şekilde çalıştığını kanıtlamaktadır. Ayrıca, ProteoMiner öncesinde ve sonrasında elde edilen protein örnekleri 1D SDS-PAGE kullanılarak yürütülmüş ve ProteoMiner sonrası protein bantlarında artış görülmüştür.

Bu tez çalışmasında, kolostrum örneklerinden elde edilen iki boyutlu jel elektroforezi görüntüleri, literatürde yayınlanan jel görüntüleri ile karşılaştırıldığında high abundant proteinlerin jel görüntülerindeki konumlarında benzerlikler görülmüştür.

Özellikle, jel görüntülerinin sol alt kadranının en alt tarafında bulunan yoğun protein spotu literatürde yayınlanan çalışmalara göre  $\alpha$ -laktalbumine ait olduğu düşünülmektedir (3,48,49). Bu da ProteoMiner Kit'inin high abundant proteinleri uzaklaştırma kapasitesinin nispeten sınırlı olduğunu göstermektedir.

Kolostrum örneklerinin iki boyutlu jel elektroforezi için optimizasyon çalışmaları başarı ile tamamlandıktan sonra, NIS inhibitör (perklorik asit ve nitrat) düzeyleri yüksek ve düşük olan insan kolostrum whey proteinlerinin karşılaştırılmasına yönelik ön çalışma yapılmıştır. Buna göre, PDQuest analizleri yapılan jel görüntüleri incelenerek NIS inhibitör düzeyleri yüksek olan örnekler ile kontrol grubu karşılaştırıldığında protein profillerinde farklılıklar görülmüştür. Bu da NIS inhibitörü olan perklorik asit ve nitratın kolostrum protein profilinin üzerinde etkisinin olduğunu göstermektedir. Perklorik asit düzeyleri yüksek jellerde ekspresyonlarında değişiklik gösteren protein sayısının nitrat düzeyleri yüksek olan jellerde ekspresyonlarında değişiklik gösteren protein sayısının yaklaşık 3.5 katı olması, perklorik asidin NIS üzerinde nitrata kıyasla daha güçlü bir etkisi olduğunu göstermektedir. Ayrıca, çevresel bir kontaminant olan perklorik asidin gıdalardan ve sudan alınıp meme bezinde biriktiği saptanmıştır. Fakat nitratın yarılanma ömrü çok kısa olduğu için birikimi bilinmemektedir (77). Tonacchera ve arkadaşları tarafından 2004 yılında yayınlanan çalışmada perklorik asidin nitrata kıyasla NIS'e bağlanma afinitesinin 240 kat daha yüksek olduğu belirtilmiştir (74). Perklorik asidin meme bezinde birikimi ve NIS'e olan bağlanma afinitesi göz önüne alındığında perklorik asit düzeyleri yüksek grubun protein profilinde daha fazla değişim görülmesi literatürde olan bulgular ile tutarlıdır.

Hücresele düzeyde baktığımızda, iyonik boyutta iyota olan benzerliğinden dolayı, perklorik asit NIS'in rekabetçi bir inhibitörüdür (91). Literatürde yapılan çalışmalarda perklorik asidin tiroid folliküler hücreye NIS tarafından taşınması nedeniyle perklorik asidin hücresele düzeyde alımının iyot ile aynı olduğu belirtilmiştir (92). Perklorik asit ve nitrat Hofmeister iyonları serisine aittir ve iyotun hücresele düzeyde alımını inhibe ederek tiroid fonksiyonunu baskılamaktadır (91). Perklorik asidin nitrattan daha güçlü bir inhibitör olması perklorik asit düzeyleri yüksek olan kolostrum örneklerin protein ekspresyon değişikliklerinin nitrata kıyasla

daha yüksek olmasını açıklamaktadır. Sonuç olarak elde edilen bu bulgular literatür bulgularını destekleyici yöndedir.

Özpinar ve arkadaşlarının yayınlanma aşamasında olan ön çalışmasında maternal perklorik asit düzeyleri yüksek olan annelerin yeni doğanlarında bebek TSH düzeyinin de yüksek olduğu bulunmuştur. Bu bulgu NIS inhibitörü olan perklorik asidin kolostrum yoluyla yeni doğana aktarılabilceğini öne sürmektedir. Bu nedenle, bu tez çalışması sonucunda belirlenen gruplar arası farklılık gösteren spotların ilerleyen çalışmalarda daha ileri teknikler kullanılarak tanımlanması ve tanımlanan proteinlerin çeşitli metabolik yollarla ilişkilendirilmesi planlanmıştır. Bu tanımlanacak protein spotları sayesinde NIS inhibitörlerinin kolostrum yoluyla yeni doğana aktarılma mekanizmasına ışık tutulabileceği düşünülmektedir.

Ayrıca, kolostrumun yeni doğan gelişimi üzerindeki öneminden dolayı, bu çalışmanın, NIS inhibitörü düzeyleri yüksek olan, emziren annelerin diyetlerinin içeriğine ve süt içeriği ile hazırlanan hazır mamaların içeriğine de katkısı bulunabileceği düşünülmektedir.

Bu tez çalışmasında doğumdan sonra annelerden toplanan kolostrum örnekleri havuz oluşturulmadan teker teker çalışılmıştır. Bu, çalışma sonuçlarına değer katarken aynı zamanda bireyler arası farklılıklardan dolayı varyasyonda eklemiştir. Fakat, genel olarak jel görüntülerine bakıldığında gruplar içinde protein profillerinin aynı paterni gösterdiği görülmüştür. Bu da çalışmanın tekrarlanabilirliğinin yüksek olduğunu göstermektedir. High abundant proteinlerin etkili bir şekilde uzaklaştırılmaması ve high abundant proteinlerin low abundant proteinlerle aynı moleküler ağırlık ve pH aralığına denk düşerek low abundant proteinleri maskeleymesi bu tez çalışmasının limitasyonları içinde yer almaktadır.

Sonuç olarak, ProteoMiner Enrichment Kit ile muamele edilmiş kolostrum örneklerinin iki boyutlu jel elektroforezi için optimizasyonu yapılmış ve NIS inhibitör düzeyleri, yüksek ve düşük olan kolostrum örnekleri ProteoMiner Kit uygulamasından sonra 2D Clean-up Kit'i kullanılarak hazırlanmıştır. NIS inhibitörü olan perklorik asit ve nitrat düzeyleri yüksek olan kolostrum örneklerinin NIS inhibitör düzeyleri düşük olan kolostrum örneklerine kıyasla whey protein

profillerinde farklılıklar gözlemlenmiştir. Protein profillerinde gözlemlenen bu farklılıkların daha ileri teknikler ile protein tanımlamaları yapılarak daha kapsamlı analizlerle detaylıca incelenmesi planlanmaktadır.



## 6. KAYNAKLAR

1. Carrasco N. Iodide transport in the thyroid gland. *BBA - Rev Biomembr.* 1993;1154(1):65–82.
2. Godhia M, Patel N. Colostrum - Its Composition, Benefits As A Nutraceutical : A Review. *Curr Res Nutr Food Sci J [Internet]*. 2013;1(1):37–47. Available from:  
<http://www.foodandnutritionjournal.org/volume1number1/colostrum-its-composition-benefits-as-a-nutraceutical-a-review/>
3. Murakami K, Lagarde M, Yuki Y. Identification of minor proteins of human colostrum and mature milk by two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis.* 1998;
4. Liu L, Wang D, Liu P, Meng F, Wen D, Jia Q, et al. The relationship between iodine nutrition and thyroid disease in lactating women with different iodine intakes. *Br J Nutr.* 2013;
5. Cianchetta S, di Bernardo J, Romeo G, Rhoden KJ. Perchlorate transport and inhibition of the sodium iodide symporter measured with the yellow fluorescent protein variant YFP-H148Q/I152L. *Toxicol Appl Pharmacol [Internet]*. 2010;243(3):372–80. Available from:  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2009.12.004>
6. Guruge KS, Wu Q, Kannan K. Occurrence and exposure assessment of perchlorate, iodide and nitrate ions from dairy milk and water in Japan and Sri Lanka. *J Environ Monit [Internet]*. 2011;13(8):2312. Available from:  
<http://xlink.rsc.org/?DOI=c1em10327j>
7. Can O, Blount B, Valentin-Blasini L, Erdemgil Y, Uzunoglu D, Aksoy M, et al. Perchlorate Exposure Through Water and Milk in Istanbul. *Bull Environ Contam Toxicol.* 2016;97(3):439–45.
8. Leung AM, Pearce EN, Hamilton T, He X, Pino S, Merewood A, et al. Colostrum iodine and perchlorate concentrations in Boston-area women: A

- cross-sectional study. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2009;
9. Le A, Barton LD, Sanders JT, Zhang Q. Exploration of bovine milk proteome in colostrum and mature whey using an ion-exchange approach. *J Proteome Res*. 2011;10(2):692–704.
  10. Bardanzellu F, Fanos V, Reali A. Omics in human colostrum and mature milk: Looking to old data with new eyes. *Nutrients*. 2017.
  11. Barrington GM, McFadden TB, Huyler MT, Besser TE. Regulation of colostrogenesis in cattle. *Livest Prod Sci*. 2001;70(1–2):95–104.
  12. Tsingotjidou AS, Papadopoulos GC. The milk-ejection reflex in the sheep: An anatomical study on the afferent pathway. *J Vet Med Ser C Anat Histol Embryol*. 2008;37(4):245–50.
  13. Ballard O, Morrow AL. Human Milk Composition. Nutrients and Bioactive Factors. *Pediatr Clin North Am* [Internet]. 2013;60(1):49–74. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pcl.2012.10.002>
  14. Järvinen KM, Suomalainen H. Leucocytes in human milk and lymphocyte subsets in cow's milk-allergic infants. *Pediatr Allergy Immunol*. 2002;13(4):243–54.
  15. Patki S, Kadam S, Chandra V, Bhonde R. Human breast milk is a rich source of multipotent mesenchymal stem cells. *Hum Cell*. 2010;23(2):35–40.
  16. Ichikawa M, Sugita M, Takahashi M, Satomi M, Takeshita T, Araki T, et al. Breast milk macrophages spontaneously produce granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and differentiate into dendritic cells in the presence of exogenous interleukin-4 alone. *Immunology*. 2003;108(2):189–95.
  17. Riskin A, Almog M, Peri R, Halasz K, Srugo I, Kessel A. Changes in immunomodulatory constituents of human milk in response to active infection in the nursing infant. *Pediatr Res*. 2012;71(2):220–5.
  18. Jarvinen K-M SH. Leucocytes in human milk and lymphocyte subsets in cow '

- s milk-allergic infants. *Reactions*. 2002;(3):243–54.
19. Garofalo R. Cytokines in Human Milk. *J Pediatr* [Internet]. 2010;156(2 SUPPL.):S36–40. Available from:  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jpeds.2009.11.019>
  20. S. Saito. M. Yoshida. M. Ichijo. S I& TT. Transforming growth factor-beta ( TGF-  $\beta$ ) in human milk. *Clin Exp Immunol*. 1993;94(June):220–5.
  21. Gilmore WS, McKelvey-Martin VJ, Rutherford S, Strain JJ, Loane P, Kell M, et al. Human milk contains granulocyte colony stimulating factor. *Eur J Clin Nutr* [Internet]. 1994;48(3):222–4. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7515007>
  22. Ustundag B, Yilmaz E, Dogan Y, Akarsu S, Canatan H, Halifeoglu I, et al. Levels of cytokines (IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ ) and trace elements (Zn, Cu) in breast milk from mothers of preterm and term infants. *Mediators Inflamm*. 2005;2005(6):331–6.
  23. Mix E, Goertsches R, Zett UK. Immunoglobulins - Basic considerations. In: *Journal of Neurology*. 2006.
  24. Hurley WL, Theil PK. Perspectives on immunoglobulins in colostrum and milk. *Nutrients*. 2011;3(4):442–74.
  25. Yamada M, Murakami K, Wallingford JC, Yuki Y. Identification of low-abundance proteins of bovine colostrum and mature milk using two-dimensional electrophoresis followed by microsequencing and mass spectrometry. *Electrophoresis*. 2002;
  26. Hirai C, Ichiba H, Saito M, Shintaku H, Yamano T, Kusuda S. Trophic effect of multiple growth factors in amniotic fluid or human milk on cultured human fetal small intestinal cells. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* [Internet]. 2002;34(5):524–8.
  27. Wagner CL, Taylor SN, Johnson D. Host factors in amniotic fluid and breast milk that contribute to gut maturation. *Clin Rev Allergy Immunol*.

2008;34(2):191–204.

28. Read LC, Francis GL, Ballard FJ, Upton FM, Wallace JC, Dahlenberg GW. Changes in the growth-promoting activity of human milk during lactation. *Pediatr Res.* 1984;18(2):133–9.
29. Dvorak B, Fituch CC, Williams CS, Hurst NM, Schanler RJ. Increased epidermal growth factor levels in human milk of mothers with extremely premature infants. *Pediatr Res.* 2003;54(1):15–9.
30. Boesmans W, Gomes P, Janssens J, Tack J, Vanden Berghe P. Brain-derived neurotrophic factor amplifies neurotransmitter responses and promotes synaptic communication in the enteric nervous system. *Gut.* 2008;57(3):314–22.
31. Li R, Xia W, Zhang Z. S100B protein, brain-derived neurotrophic factor, and glial cell line-derived neurotrophic factor in human milk. Vol. 6, *Plos One.* 2011. p. e21663-.
32. Fichter M, Klotz M, Hirschberg DL, Waldura B, Schofer O, Ehnert S, et al. Breast milk contains relevant neurotrophic factors and cytokines for enteric nervous system development. *Mol Nutr Food Res.* 2011;55(10):1592–6.
33. Blum JW, Baumrucker CR. Colostral and milk insulin-like growth factors and related substances: Mammary gland and neonatal (intestinal and systemic) targets. *Domest Anim Endocrinol.* 2002;23(1–2):101–10.
34. Milsom SR, Blum WF, Gunn AJ. Temporal changes in insulin-like growth factors I and II and in insulin-like growth factor binding proteins 1, 2, and 3 in human milk. *Horm Res.* 2008;69(5):307–11.
35. Prosser CG. Insulin-Like Growth Factors in Milk and Mammary Gland. *J M.* 1996;1(3):297–306.
36. Loui A, Eilers E, Strauss E, Pohl-Schickinger A, Obladen M, Koehne P. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and soluble VEGF receptor 1 (sFlt-1) levels in early and mature human milk from mothers of preterm versus

- term infants. *J Hum Lact*. 2012;28(4):522–8.
37. Struck J, De Almeida P, Bergmann A, Morgenthaler NG. High concentrations of procalcitonin but not mature calcitonin in normal human milk. *Horm Metab Res*. 2002;34(8):460–5.
  38. Wookey PJ, Turner K, Furness JB. Transient expression of the calcitonin receptor by enteric neurons of the embryonic and early post-natal mouse. *Cell Tissue Res*. 2012;347(2):311–7.
  39. Rao RK, Davis TP, Williams C, Koldovsky O. Effect of milk on somatostatin degradation in suckling rat jejunum in vivo. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 1999;28(1):84–94.
  40. Palti H. Anemia in infancy. *Public Health Rev*. 2000;28(1–4):89–92.
  41. Arsenault JE, Webb AL, Koulinska IN, Aboud S, Fawzi WW, Villamor E. Association between Breast Milk Erythropoietin and Reduced Risk of Mother-to-Child Transmission of HIV. *J Infect Dis* [Internet]. 2010;202(3):370–3. Available from: <https://academic.oup.com/jid/article-lookup/doi/10.1086/653706>
  42. Newburg DS, Woo JG, Morrow AL. Characteristics and Potential Functions of Human Milk Adiponectin. *J Pediatr* [Internet]. 2010;156(2 SUPPL.):S41–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpeds.2009.11.020>
  43. Savino F, Liguori SA. Update on breast milk hormones: Leptin, ghrelin and adiponectin. Vol. 27, *Clinical Nutrition*. 2008. p. 42–7.
  44. Savino F, Sorrenti M, Benetti S, Lupica MM, Liguori SA, Oggero R. Resistin and leptin in breast milk and infants in early life. *Early Hum Dev*. 2012;88(10):779–82.
  45. Dündar NO, Dündar B, Cesur G, Yilmaz N, Sütü R, Özgüner F. Ghrelin and adiponectin levels in colostrum, cord blood and maternal serum. *Pediatr Int*. 2010;52(4):622–5.

46. Csapó J, Csapó-Kiss Z, Martin TG, Szentpeteri J, Wolf G. Composition of colostrum from goats, ewes and cows producing twins. *Int Dairy J*. 1994;4(5):445–58.
47. Ontsouka CE, Bruckmaier RM, Blum JW. Fractionized Milk Composition During Removal of Colostrum and Mature Milk. *J Dairy Sci* [Internet]. 2003;86(6):2005–11. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030203737898>
48. Roncada P, Stipetic LH, Bonizzi L, Burchmore RJS, Kennedy MW. Proteomics as a tool to explore human milk in health and disease. *Journal of Proteomics*. 2013.
49. Marcia F. Goldfarb, Maureen S. Savadove JAI. Two-dimensional electrophoretic analysis of human milk proteins. *Electrophoresis*. 1989;67–70.
50. Jensen RG. *Handbook of Milk Composition*. 1995.
51. Nommsen LA, Lovelady CA, Heinig MJ, Lönnerdal B, Dewey KG. Determinants of energy, protein, lipid, and lactose concentrations in human milk during the first 12 mo of lactation: The DARLING Study. *Am J Clin Nutr*. 1991;53(2):457–65.
52. Hernandez-Castellano L, Almeida A, Castro N, Arguello A. The Colostrum Proteome, Ruminant Nutrition and Immunity: A Review. *Curr Protein Pept Sci* [Internet]. 2014;15(1):64–74. Available from: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1389-2037&volume=15&issue=1&spage=64>
53. Gauthier SF, Pouliot Y, Saint-Sauveur D. Immunomodulatory peptides obtained by the enzymatic hydrolysis of whey proteins. *Int Dairy J*. 2006;16(11):1315–23.
54. Silanikove N, Shapiro F, Shamay A, Leitner G. Role of xanthine oxidase, lactoperoxidase, and NO in the innate immune system of mammary secretion during active involution in dairy cows: Manipulation with casein hydrolyzates.

- Free Radic Biol Med. 2005;38(9):1139–51.
55. Mangé A, Bellet V, Tuailon E, Van de Perre P, Solassol J. Comprehensive proteomic analysis of the human milk proteome: Contribution of protein fractionation. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci*. 2008;876(2):252–6.
  56. Adlerova L, Bartoskova A, Faldyna M. Lactoferrin: A review. *Vet Med (Praha)*. 2008;53(9):457–68.
  57. Mather IH. A Review and Proposed Nomenclature for Major Proteins of the Milk-Fat Globule Membrane,. *J Dairy Sci* [Internet]. 2000;83(2):203–47. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030200748703>
  58. Hollingsworth MA, Swanson BJ. Mucins in cancer: protection and control of the cell surface. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2004;4(1):45–60. Available from: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nrc1251>
  59. Patton S, Gendler SJ, Spicer AP. The epithelial mucin, MUC1, of milk, mammary gland and other tissues. *BBA - Rev Biomembr*. 1995;1241(3):407–23.
  60. Schroten H, Hanisch FG, Plogmann R, Hacker J, Uhlenbruck G, Nobis-bosch R, et al. Inhibition of adhesion of S-fimbriated *Escherichia coli* to bucal epithelial cells by human milk fat globule membrane components: function of mucins in the nonimmunoglobulin fraction. *Infect Immun*. 1992;60(7):2893–9.
  61. Ogiwara K, Nogami K, Nishiya K, Shima M. Plasmin-induced procoagulant effects in the blood coagulation: A crucial role of coagulation factors v and VIII. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2010;21(6):568–76.
  62. Renckens R, Roelofs JJTH, Florquin S, Poll T van der. Urokinase-Type Plasminogen Activator Receptor Plays a Role in Neutrophil Migration during Lipopolysaccharide-Induced Peritoneal Inflammation but Not during

- Escherichia coli* –Induced Peritonitis. J Infect Dis [Internet]. 2006;193(4):522–30. Available from: <https://academic.oup.com/jid/article-lookup/doi/10.1086/499601>
63. McDonald TL, Larson MA, Mack DR, Weber A. Elevated extrahepatic expression and secretion of mammary-associated serum amyloid A 3 (M-SAA3) into colostrum. Vet Immunol Immunopathol. 2001;83(3–4):203–11.
  64. Honkanen-Buzalski T, Sandholm M. Trypsin-inhibitors in mastitic milk and colostrum: Correlation between trypsin-inhibitor capacity, bovine serum albumin and somatic cell contents. J Dairy Res. 1981;48(2):213–23.
  65. Stelwagen K, Carpenter E, Haigh B, Hodgkinson A, Wheeler TT. Immune components of bovine colostrum and milk. J Anim Sci. 2009;87(13 Suppl):3–9.
  66. Zasloff M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. Nature [Internet]. 2002;415(0028–0836 (Print)):389–95. Available from: <c:%5CKarsten%5CPDFs%5CInfektiologie-PDFs%5CInfekt-2002%5CZasloff-Antimicrobial peptides of multicellular organisms.pdf>
  67. Gennaro R, Zanetti M. Structural Features and Biological Activities of the Cathelicidin-Derived Antimicrobial Peptides. 1990;2:809–17.
  68. Swanson K, Gorodetsky S, Good L, Musgrave D, Stelwagen K, Farr V, et al. Expression of a  $\beta$  -Defensin mRNA , Lingual Antimicrobial Peptide , in Bovine Mammary Epithelial Tissue Is Induced by Mastitis Expression of a  $\alpha$  -Defensin mRNA , Lingual Antimicrobial Peptide , in Bovine Mammary Epithelial Tissue Is Induced by Mastitis. 2004;72(12):7311–4.
  69. Pérez-López FR. Iodine and thyroid hormones during pregnancy and postpartum. Gynecol Endocrinol. 2007;
  70. Ahad F, Ganie SA. Iodine, Iodine metabolism and Iodine deficiency disorders revisited. Indian J Endocrinol Metab. 2010;14(1):13–7.

71. Leung AM, Avram AM, Brenner A V., Duntas LH, Ehrenkranz J, Hennessey J V., et al. Potential Risks of Excess Iodine Ingestion and Exposure: Statement by the American Thyroid Association Public Health Committee. *Thyroid* [Internet]. 2015;25(2):145–6. Available from: <http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/thy.2014.0331>
72. Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Derneği. *Tiriod Hastalıkları Tanı Ve Tedavi Kılavuzu*. 2017.
73. Bizhanova A, Kopp P. Minireview: The sodium-iodide symporter NIS and pendrin in iodide homeostasis of the thyroid. *Endocrinology*. 2009;150(3):1084–90.
74. Tonacchera M, Pinchera A, Dimida A, Ferrarini E, Agretti P, Vitti P, et al. Relative Potencies and Additivity of Perchlorate, Thiocyanate, Nitrate, and Iodide on the Inhibition of Radioactive Iodide Uptake by the Human Sodium Iodide Symporter. *Thyroid*. 2004;
75. Cengiz MF, Bilgin AK. Determination of major sodium iodide symporter (NIS) inhibitors in drinking waters using ion chromatography with conductivity detector. *J Pharm Biomed Anal*. 2016;
76. Ozpinar A, Kelestimur F, Songur Y, Can O, Valentin L, Caldwell K, et al. Iodine status in Turkish populations and exposure to iodide uptake inhibitors. *PLoS One*. 2014;9(2):1–8.
77. Ozpinar A. Çevresel Guatrojenler (NIS İnhibitörleri) ve Subklinik Hipotiroidizm. *Acıbadem Üniversitesi Sağlık Bilim Derg*. 2010;
78. Fiels S. Proteomics: Proteomics in Genomeland. *Science* (80- ). 2001;291(February):1221–4.
79. Kenrick KG, Margolis J. Isoelectric focusing and gradient gel electrophoresis: A two-dimensional technique. *Anal Biochem*. 1970;33(1):204–7.
80. O'Farrell PH. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* [Internet]. 1975;250(10):4007–21. Available from:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2874754&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

81. Alberts B, Melorose J, Perroy R, Careas S. *Molecular Biology of the Cell*. Vol. 1, Statewide Agricultural Land Use Baseline 2015. 2015. 1464 p.
82. Bjellqvist B, Ek K, Righetti PG, Gianazza E, Görg a, Westermeier R, et al. Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology and some applications. *J Biochem Biophys Methods* [Internet]. 1982;6(4):317–39. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7142660>
83. Magdeldin S, Enany S, Yoshida Y, Xu B, Zhang Y, Zureena Z, et al. Basics and recent advances of two dimensional- polyacrylamide gel electrophoresis. *Clin Proteomics* [Internet]. 2014;11(1):16. Available from: <http://clinicalproteomicsjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/1559-0275-11-16>
84. O'Donnell R, Holland JW, Deeth HC, Alewood P. Milk proteomics. *Int Dairy J*. 2004;14(12):1013–23.
85. Grapov D, Lemay DG, Weber D, Phinney BS, Azulay Chertok IR, Gho DS, et al. The human colostrum whey proteome is altered in gestational diabetes mellitus. *J Proteome Res*. 2015;14(1):512–20.
86. Liao Y, Alvarado R, Phinney B, Lönnerdal B. Proteomic characterization of human milk whey proteins during a twelve-month lactation period. *J Proteome Res*. 2011;
87. Wessel D, Flügge UI. A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal Biochem*. 1984;138(1):141–3.
88. Brunelle JL, Green R. One-dimensional SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (1D SDS-PAGE) [Internet]. 1st ed. Vol. 541, *Methods in Enzymology*. Elsevier Inc.; 2014. 151-159 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-420119-4.00012-4>

89. Fic E, Kedracka-Krok S, Jankowska U, Pirog A, Dziedzicka-Wasylewska M. Comparison of protein precipitation methods for various rat brain structures prior to proteomic analysis. *Electrophoresis*. 2010;31(21):3573–9.
90. Palmer DJ, Kelly VC, Smit AM, Kuy S, Knight CG, Cooper GJ. Human colostrum: Identification of minor proteins in the aqueous phase by proteomics. *Proteomics*. 2006;
91. Soldin OP, Braverman LE, Lamm SH. Perchlorate Clinical Pharmacology and Human Health: A Review.
92. Vandenberg LN, Colborn T, Hayes TB, Heindel JJ, Jacobs DR, Lee DH, et al. Hormones and endocrine-disrupting chemicals: Low-dose effects and nonmonotonic dose responses. *Endocr Rev*. 2012;33(3):378–455.

## 7. EKLER

### 7.1. Etik Kurul Onayı



Sayı: B.30.2.ACÜ.0.00.00.050-06/46

05 Eylül 2014

Konu: ATADEK 2014-702

Sayın Prof. Dr. Aysel Özpınar;

ATADEK-2014-702 kodlu ve "**İnsan ve keçi kolostrum whey proteinlerinin karşılaştırılması**" başlıklı araştırma projeniz Acıbadem Üniversitesi Tıbbi Araştırmalar Değerlendirme Kurulu'nun 2 Eylül 2014 tarihli toplantısında incelenmiş ve etik açıdan uygun bulunmuştur.

ATADEK 2014-702 sayılı karar ektedir.



Prof. Dr. İsmail Hakkı Ulus

Tıbbi Araştırmalar Değerlendirme Kurulu Başkanı

**ACIBADEM ÜNİVERSİTESİ TIBBİ ARAŞTIRMALAR DEĞERLENDİRME  
KURULU (ATADEK)**

Etik onay istenen tıbbi araştırmanın başlığı:

**İnsan ve keçi kolostrum whey proteinlerinin karşılaştırılması**

Etik onay istenen tıbbi araştırmanın yürütücüsü (sorumlusu):

**Prof. Dr. Aysel Özpınar**

Karar:

Kabul (Etik olarak uygun)  Revizyon ( )\* Etik olarak uygun değil ( )\*\*

Toplantı tarihi: 2 / 9 / 2014

Karar numarası: 2014-702

Kurul Üyesi-Unvan Ad-soyad	İmza	Karara	
		Katılıyorum	Katılmıyorum***
Prof. Dr. İsmail Hakkı Ulus (Başkan)		( )	( )
Prof. Dr. Nadi Bakırcı		(x)	( )
Prof. Dr. Fevzi Toraman		(x)	( )
Prof. Dr. Yasemin Alanay		(x)	( )
Prof. Dr. Murat Saruç		( )	( )
Prof. Dr. Güldal Süyen		( )	( )
Prof. Dr. Mert Ülgen		(x)	( )
Doç. Dr. Ükke Karabacak		(x)	( )
Yrd. Doç. Dr. Emre Dorman		( )	( )
Uzman Dr. Sertaç Uzel		(x)	( )
Uzman Dr. Nalan Karadağ		(x)	( )
Avukat Ferda Öztürk		(x)	( )

\*

\*\*

\*\*\*

## 7.2. PDQuest Spot Analiz Tabloları

Spot ID	Perklorik Asit						Nitrat						Kontrol						Spot ID	
	Jel #						Jel #						Jel #							
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18		
0001							+	+	+	+	+	+							+	0001
0101	+	+	+	+	+	+														0101
0102	+	+	+	+	+	+														0102
0103	+	+	+	+	+	+	+				+	+							+	0103
0203	+	+	+	+	+	+	+													0203
0204	+	+	+	+	+	+	+													0204
0307	+	+	+	+	+	+	+													0307
0308	+	+	+	+	+	+	+													0308
0309	+	+	+	+	+	+	+													0309
0310	+	+	+	+	+	+														0310
0311	+	+	+	+	+	+														0311
0312	+	+	+	+	+	+														0312
1002							+	+	+	+	+	+	+	+	+					1002
1103	+	+	+	+	+	+														1103
1107	+	+	+	+	+	+														1107
1203	+	+	+	+	+	+	+				+	+								1203
1207	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1207
1302	+	+	+	+	+	+	+													1302
1303	+	+	+	+	+	+	+													1303
1304	+	+	+	+	+	+	+													1304
2003	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	2003
2209	+	+	+	+	+	+	+				+	+								2209
2210	+	+	+	+	+	+	+				+	+								2210
2304	+	+	+	+	+	+	+													2304
2305	+	+	+	+	+	+	+													2305
3206								+	+	+			+	+	+	+	+	+	+	3206
3207								+	+	+			+	+	+	+	+	+	+	3207
3403							+	+	+	+	+	+								3403
3501							+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	3501
3502													+	+	+	+	+	+	+	3502
3503													+	+	+	+	+	+	+	3503
4203													+	+	+	+	+	+	+	4203
4204							+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	4204
4301							+	+	+	+	+	+								4301
4302	+	+	+	+	+	+														4302
4303	+	+	+	+	+	+														4303
4401							+	+	+	+	+	+								4401
4501													+	+	+	+	+	+	+	4501
5201								+	+	+			+	+	+	+	+	+	+	5201
5301							+	+	+	+	+	+	+					+	+	5301
5404							+	+	+	+	+	+								5404
5503							+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	5503
5504													+	+	+	+	+	+	+	5504
5803							+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	5803
5804							+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	5804
6101								+	+				+	+	+	+	+	+	+	6101
6401							+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	6401
6505							+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	6505
6602							+	+	+	+	+	+								6602
6804							+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	6804
6805							+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	6805
7204							+				+	+	+	+	+	+	+	+	+	7204
7805							+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	7805
7806							+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	7806
8001							+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	8001
8003							+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	8003
8302								+	+	+			+	+	+	+	+	+	+	8302
8501							+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	8501
9601							+	+	+	+	+	+								9601
9702							+	+	+	+	+	+								9702

- Perklorik asit düzeyleri yüksek olan jellerde artan spotlar
- Perklorik asit düzeyleri yüksek olan jellerde azalan spotlar
- Nitrat Düzeyleri yüksek olan jellerde artan spotlar
- Nitrat düzeyleri yüksek olan jellerde azalan spotlar
- Hem perklorik asit düzeyleri yüksek hem de nitrat düzeyleri yüksek jellerde azalan spotlar



Spot ID	Nitrat						Kontrol						Spot ID
	Jel #						Jel #						
	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	
0001	+	+	+	+	+	+						+	0001
0103	+				+	+						+	0103
0203	+												0203
0204	+												0204
0307	+												0307
0308	+												0308
0309	+												0309
1002	+	+	+	+	+	+	+	+	+				1002
1205	+				+	+							1205
1207	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1207
1302	+												1302
1303	+												1303
2003	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	2003
2209	+				+	+							2209
2210	+				+	+							2210
3206		+	+	+			+	+	+	+	+	+	3206
3207		+	+	+			+	+	+	+	+	+	3207
3403	+	+	+	+	+	+							3403
3501	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	3501
3502							+	+	+	+	+	+	3502
3503							+	+	+	+	+	+	3503
4203							+	+	+	+	+	+	4203
4204	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	4204
4301	+	+	+	+	+	+							4301
4401	+	+	+	+	+	+							4401
4501							+	+	+	+	+	+	4501
5201		+	+	+			+	+	+	+	+	+	5201
5301	+	+	+	+	+	+	+				+	+	5301
5404	+	+	+	+	+	+							5404
5503	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	5503
5504							+	+	+	+	+	+	5504
5803	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	5803
5804	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	5804
6101		+	+				+	+	+	+	+	+	6101
6401	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	6401
6505	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	6505
6602	+	+	+	+	+	+							6602
6804	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	6804
6805	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	6805
7204	+				+	+	+	+	+	+	+	+	7204
7805	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	7805
7806	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	7806
8001	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	8001
8003	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	8003
8302		+	+	+			+	+	+	+	+	+	8302
8501	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	8501
9601	+	+	+	+	+	+							9601
9702	+	+	+	+	+	+							9702

Nitrat Düzeyleri yüksek olan jellerde artan spotlar  
 Nitrat düzeyleri yüksek olan jellerde azalan spotlar  
 Değişiklik görülmeyen spotlar

## 8. ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

Adı	İrep	Soyadı	Uras
Doğum Yeri	Kadıköy	Doğum Tarihi	1 Şubat 1988
Uyruğu	T.C.	Telefon	0532 345 80 81
E-mail	irep.uras@live.acibadem.edu.tr		

### Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora/Uzmanlık		
Yüksek Lisans		
Lisans	The Ohio State University	2011
Lise	Huron High School	2006

### İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1. Research Asistant	The Ohio State University	2009-2014

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*
İngilizce	Çok iyi	Çok iyi	Çok iyi
Fransızca	İyi	İyi	İyi

\* Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

Yabancı Dil Sınav Notu <input type="checkbox"/>									
YDS	YÖKDİL	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE	DiĞER
	93,750								

Başarılmış birden fazla sınav varsa, tüm sonuçlar yazılmalıdır

KPDS: Kamu Personeli Yabancı Dil Sınavı; ÜDS: Üniversitelerarası Kurul Yabancı Dil Sınavı; IELTS:

International English Language Testing System; TOEFL IBT: Test of English as a Foreign Language-Internet-Based Test TOEFL PBT: Test of English as a Foreign

Language-Paper-Based Test; TOEFL CBT: Test of English as a Foreign Language-Computer-Based Test; FCE: First Certificate in English;

CAE: Certificate in Advanced English; CPE: Certificate of Proficiency in English

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı	79,49294	80,36031	70,75170
(Diğer) Puanı			

### Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office Programları	Çok iyi

\*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin