



TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**İNSAN KOLON KARSİNOMA HÜCRELERİNDE (CACO2)  
LAKTOFERRİNİN BAZI ANTİOKSİDAN ENZİM  
AKTİVİTELERİ, YARA İYİLEŞMESİ VE  
GLUKOZ TRANSPORTU ÜZERİNE ETKİLERİNİN  
İNCELENMESİ**

**Mahmut BODUR**

**BESLENME VE DİYETETİK ANABİLİM DALI  
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN  
Prof. Dr. Ayşe Özfer ÖZÇELİK**

**ANKARA  
2023**

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**İNSAN KOLON KARSİNOMA HÜCRELERİNDE (CAC02)  
LAKTOFERRİNİN BAZI ANTİOKSİDAN ENZİM  
AKTİVİTELERİ, YARA İYİLEŞMESİ VE  
GLUKOZ TRANSPORTU ÜZERİNE ETKİLERİNİN  
İNCELENMESİ**

**Mahmut BODUR**

**BESLENME VE DİYETETİK ANABİLİM DALI  
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN**

**Prof. Dr. Ayşe Özfer ÖZÇELİK**

**İKİNCİ DANIŞMAN**

**Prof. Dr. Yasemin Gülgün İŞGÖR**

**ANKARA**

**2023**

## **Etik Beyan**

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğü'ne,

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “İnsan Kolon Karsinoma Hücrelerinde (Caco2) Laktoferrinin Bazı Antioksidan Enzim Aktiviteleri, Yara İyileşmesi ve Glukoz Transportu Üzerine Etkilerinin İncelenmesi” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Mahmut BODUR

Tarih:

İmza:

## KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Beslenme ve Diyetetik Anabilim Dalında

Mahmut BODUR tarafından hazırlanan

“İnsan Kolon Karsinoma Hücrelerinde (Caco2) Laktoferrinin Bazı Antioksidan Enzim Aktiviteleri, Yara İyileşmesi ve Glukoz Transportu Üzerine Etkilerinin İncelenmesi” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından DOKTORA TEZİ olarak OY BİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 19.07.2023

Prof. Dr. Sultan Belgin İŞGÖR  
Atılım Üniversitesi  
Jüri Başkanı

Prof. Dr. Ayşe Özfer ÖZÇELİK  
Ankara Üniversitesi  
Üye

Prof. Dr. Funda Pınar ÇAKIROĞLU  
Ankara Üniversitesi  
Üye

Prof. Dr. Aslı UÇAR  
Ankara Üniversitesi  
Üye

Doç. Dr. Zeynep GÖKTAŞ  
Hacettepe Üniversitesi  
Üye

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

Prof. Dr. Fügen AKTAN  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

# İÇİNDEKİLER

|                                                      |           |
|------------------------------------------------------|-----------|
| Etik Beyan                                           | ii        |
| Kabul ve Onay                                        | iii       |
| İçindekiler                                          | iv        |
| Önsöz                                                | vi        |
| Simgeler ve Kısaltmalar                              | vii       |
| Şekiller                                             | ix        |
| Çizelgeler                                           | xi        |
| <br>                                                 |           |
| <b>1.GİRİŞ</b>                                       | <b>1</b>  |
| 1.1.Laktoferrin Yapısı                               | 2         |
| 1.2.Laktoferrinin Keşfi                              | 3         |
| 1.3.Laktoferrinin Metabolizması                      | 4         |
| 1.4.Farklı Sütlerin Laktoferrin İçerikleri           | 6         |
| 1.5.Laktoferrinin Besin Endüstrisinde Yeri ve Önemi  | 7         |
| 1.6.Laktoferrinin Biyolojik Fonksiyonları            | 8         |
| 1.6.1. Laktoferrinin Antiviral Etkisi                | 10        |
| 1.6.2. Laktoferrinin Antibakteriyel Etkisi           | 10        |
| 1.6.3. Laktoferrinin İmmün Sistem Üzerine Etkisi     | 11        |
| 1.6.4. Laktoferrinin Antikanser etkisi               | 12        |
| 1.6.5. Laktoferrinin Yara İyileşmesi Üzerine Etkisi  | 12        |
| 1.6.6. Laktoferrinin Oksidatif Stres Üzerine Etkisi  | 13        |
| 1.7.Oksidatif Stres                                  | 13        |
| 1.7.1. Reaktif Oksijen Türleri                       | 14        |
| 1.7.1.1.Endojen Oksidan Ajanlar                      | 15        |
| 1.7.1.2.Ekzojen Oksidan Ajanlar                      | 17        |
| 1.7.2. Antioksidanlar                                | 18        |
| 1.7.2.1.Enzimatik Antioksidanlar                     | 20        |
| 1.7.2.1.1. Süperoksit Dismutaz                       | 21        |
| 1.7.2.1.2. Glutasyon Peroksidaz                      | 22        |
| 1.7.2.1.3. Glutasyon-S-Transferaz                    | 24        |
| 1.7.2.2.Enzimatik Olmayan Antioksidanlar             | 25        |
| 1.8.Glukoz Transportu                                | 26        |
| 1.8.1. Glukoz Transportunun Saptanması               | 28        |
| 1.9.Yara İyileşmesi                                  | 29        |
| 1.10. Caco2 Hücre Hattı                              | 29        |
| <br>                                                 |           |
| <b>2. GEREÇ VE YÖNTEM</b>                            | <b>32</b> |
| 2.1.Araştırma Yeri ve Zamanı                         | 32        |
| 2.2.Kullanılan Ekipman ve Kimyasal Malzemeler        | 33        |
| 2.3.Deneyler                                         | 35        |
| 2.3.1. Kolon Karsinoma Hücre Hattı Temini ve İdamesi | 35        |

|                                                                                           |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.3.2. Hücre Hattının Çözdürülmesi                                                        | 36 |
| 2.3.3. Besiyeri Hazırlanması ve Hücre Hattı Ekimi                                         | 37 |
| 2.3.4. Hücre Hattının Pasajlanması                                                        | 37 |
| 2.3.5. Hücre Hattının Sayılması                                                           | 37 |
| 2.3.6. Hücre Hattının Laktoferrin ile İnkübasyonu ve Hücre Homojenatlarının Oluşturulması | 38 |
| 2.3.7. Hücre Hattının Dondurulması                                                        | 38 |
| 2.3.8. Hücre Homojenatlarında Protein Konsantrasyonunun Belirlenmesi                      | 39 |
| 2.4.Yarı Maksimum İnhibisyon Konsantrasyonunun Belirlenmesi                               | 40 |
| 2.5.Yara İyileşmesi Deneyi                                                                | 41 |
| 2.6.Glukoz Transportunun (Taşınmasının) Belirlenmesi                                      | 42 |
| 2.7.Antioksidan Enzim Aktivitelerinin Saptanması                                          | 43 |
| 2.7.1. Glutasyon-S-Transferaz (GST) Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi                      | 43 |
| 2.7.2. Glutasyon Peroksidaz (GPX) Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi                        | 44 |
| 2.7.3. Süperoksit Dismutaz (SOD) Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi                         | 45 |
| 2.8.Verilerin İstatistiksel Değerlendirilmesi                                             | 47 |
| <b>3. BULGULAR</b>                                                                        | 48 |
| 3.1.Hücre Canlılığının Belirlenmesi                                                       | 48 |
| 3.2.Yara İyileşmesi Deneyi                                                                | 50 |
| 3.3.Antioksidan Enzim Aktiviteleri                                                        | 55 |
| 3.3.1. Glutasyon-S-Transferaz (GST) Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi                      | 55 |
| 3.3.2. Glutasyon Peroksidaz (GPX) Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi                        | 59 |
| 3.3.3. Süperoksit Dismutaz (SOD) Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi                         | 61 |
| 3.4.Glukoz Transportunun Belirlenmesi                                                     | 66 |
| <b>4. TARTIŞMA</b>                                                                        | 68 |
| <b>5. SONUÇ VE ÖNERİLER</b>                                                               | 77 |
| <b>ÖZET</b>                                                                               | 80 |
| <b>SUMMARY</b>                                                                            | 81 |
| <b>KAYNAKLAR</b>                                                                          | 82 |
| <b>EKLER</b>                                                                              | 95 |
| EK-1.Laboratuvar İzni                                                                     | 95 |
| EK-2.Hücre Hattının Temini                                                                | 96 |
| <b>ÖZGEÇMİŞ</b>                                                                           | 97 |

## ÖNSÖZ

Son yıllarda laktoferrin gibi biyoaktif peptitlerin önemi anlaşılmakta ve terapötik etkileri üzerine yapılan çalışmaların sayısı hızla artmaktadır. Ancak, laktoferrinin antioksidan enzim aktiviteleri, yara iyileşmesi ve glukoz transportu üzerine yapılan çalışmalar kısıtlıdır. Bu nedenle, bu çalışmanın amacı laktoferrinin insan kolon karsinoma hücre hattında (Caco2) süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon-S-transferaz (GST) ve glutatyon peroksidaz (GPx) antioksidanların enzim aktiviteleri, yara iyileşmesi ve glukoz transportu üzerine etkilerini araştırmaktır.

Doktora eğitimim, tez sürecim ve araştırma görevliliğim süresince görüşleri, sonsuz desteği ve tecrübeleri ile ihtiyaç duyduğum her noktada yardımlarını esirgemeyen ve vizyonumu geliştirmemde rol oynayan değerli danışman hocam Prof. Dr. Ayşe Özfer ÖZÇELİK'e; tez çalışmam boyunca beni her noktada destekleyen ve çalışmanın ortaya çıkmasında büyük emeği olan ikinci danışmanım Prof. Dr. Yasemin Gülgün İŞGÖR'e teşekkür ederim.

Doktora sürecinde çalışmaya verdikleri katkılarından dolayı değerli Tez İzleme Komitesi üyelerim Prof. Dr. Funda Pınar ÇAKIROĞLU ve Prof. Dr. Sultan Belgin İŞGÖR'e teşekkür ederim.

Tez çalışmam sürecinde destekleri ile bana yardımcı olan Atılım Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümü Arş. Gör. Fırat AYAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Akademik yaşantım ve tez çalışmam boyunca bana sonsuz destek sağlayan Ankara Üniversitesi Beslenme ve Diyetetik Bölümü'nün değerli öğretim üyelerine ve değerli oda arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Bugünlere gelmemde emeği olan ve merakımı her daim diri tutarak hayat hazineme katkıda bulunan başta sayın Tijen DOĞAN olmak üzere bütün öğretmenlerime teşekkürlerimi sunarım.

Hayatımın her evresinde bana güvenen ve desteklerini esirgemeyen annem Rahime BODUR, babam Ömer BODUR, abim Ali Osman BODUR ve değerli eşi Hülya'ya, kardeşim Mehmet Akif BODUR'a tüm içtenliğimle teşekkür ederim. Hayatıma değer katan, ikinci ailem ŞAHİN ailesine teşekkür ederim.

Hayat yolculuğunda en büyük destekçim, ilham kaynağım ve yoldaşım olan sevgili eşim Gülsüm ŞAHİN BODUR'a sonsuz sabrı, desteği ve hoşgörüsü için teşekkür ederim. Bu çalışmanın, dünyaya gözlerini henüz açan oğlum Mert'e ve yeğenim Ömer İlbay'a ilham olmasını dilerim.

Son olarak, çalışmamı sonsuz merak ve istek ile sürekli kendisini geliştiren ve bütün öğrencilerine de bunu aşılamaaya çalışan ancak sağlık sorunları nedeniyle genç yaşta hayatını kaybeden Değerli Öğretmenim İsmail KARATAŞ'a ve 6 Şubat 2023 depreminde hayatını kaybeden bütün canlarımıza ithaf ediyorum.

## SİMGELER VE KISALTMALAR

|            |                                                                        |
|------------|------------------------------------------------------------------------|
| %95 GA     | Yüzde 95 güven aralığı                                                 |
| °C         | Santigrat                                                              |
| 2-NBDG     | 2-deoksi-2-[(7-nitro-2,1,3- benzoksadiazol-4-yl) amino]-D-glukoz       |
| AB         | Avrupa Birliği                                                         |
| ABD        | Amerika Birleşik Devletleri                                            |
| AKT        | Protein kinaz B                                                        |
| ANOVA      | Tek yönlü varyans analizi                                              |
| Apo-LF     | Apolaktoferrin                                                         |
| bLf        | İnek sütü laktoferrini                                                 |
| BSA        | Bovine Serum Albumine/ Sığır serum albümini                            |
| Caco2      | İnsan kolon karsinoma hücre hattı                                      |
| CAT        | Katalaz                                                                |
| CCl4       | Karbon tetra klorür                                                    |
| CDNB       | 1-kloro-,4-dinitrobenzen                                               |
| CuSO4.5H2O | Bakır sülfat penta hidrat                                              |
| DEN        | Dietilnitrozamin                                                       |
| DHA        | Dehidroaskorbik asit                                                   |
| DMEM       | Dulbecco's Modified Eagle Medium/ Dulbecco'nun modifiye eagle besiyeri |
| DMSO       | Dimetil sülfoksit                                                      |
| DTT        | 1,4-Dithiothreitol                                                     |
| DU-145     | Prostat kanseri hücre hattı                                            |
| EFSA       | European Food Safety Agency/Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi            |
| ERK1/2     | Ekstraselüler sinyale bağlı kinaz 1/2                                  |
| ESH        | Endometrial stromal hücrelerde                                         |
| ETZ        | Elektron taşıma zinciri                                                |
| FBS        | Fetal Bovine Serum                                                     |
| FDA        | Food and Drug Administration/Amerika Gıda ve İlaç Dairesi              |
| GLP-1      | Glukagon benzeri peptid-1                                              |
| GLUT2      | Glukoz transport protein-2                                             |
| GLUT4      | Glukoz transport protein 4                                             |

|                                    |                                                                          |
|------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|
| GPx                                | Glutasyon peroksidaz                                                     |
| GSH                                | İndirgenmiş glutasyon                                                    |
| GSSG                               | Oksitlenmiş glutasyon                                                    |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>      | Hidrojen peroksit                                                        |
| HBV                                | Hepatit B                                                                |
| HCT-116                            | Kolon kanseri hücre hattı                                                |
| HCV                                | Hepatit C                                                                |
| HepG2                              | Karaciğer kanseri hücre hattı                                            |
| hGF                                | İnsan gingival fibroblast hücre hattı                                    |
| HIV                                | İnsan bağışıklık yetmezliği virüsü                                       |
| hLf                                | İnsan sütü laktoferrini                                                  |
| Holo-LF                            | Hololaktoferrin                                                          |
| HOO                                | Hidroperoksil radikali                                                   |
| HPV                                | Human papilloma virus/İnsan papilloma virüs                              |
| HT29                               | Human colorectal adenocarcinoma cell line/İnsan kolon kanser hücre hattı |
| IC <sub>50</sub>                   | Inhibitory concentration/Yarı maksimum inhibisyon konsantrasyonu         |
| IL-1B                              | İnterlökin-1B                                                            |
| IRS-1                              | İnsülin reseptörü-1                                                      |
| kDa                                | Kilodalton                                                               |
| KNaC <sub>4</sub> H <sub>4</sub> O | Potasyum sodyum tartarat                                                 |
| LF                                 | Laktoferrin                                                              |
| MDA                                | Malondialdehit                                                           |
| mg                                 | Miligram                                                                 |
| mL                                 | Mililitre                                                                |
| MTT                                | 3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il)-2,5-Difeniltetrazolyum Bromür                |
| Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>    | Sodyum karbonat                                                          |
| NBT                                | Nitrotetrazolyum mavi klorid                                             |
| O <sub>2</sub> -                   | Süperoksit anyonu                                                        |
| OGTT                               | Oral glukoz tolerans testi                                               |
| OH•                                | Hidroksil radikali                                                       |
| PBS                                | Fosfat tamponlu salin çözeltisi                                          |
| PEG                                | Polietilen glikol                                                        |
| Pen                                | Penisilin                                                                |

|               |                                                                                  |
|---------------|----------------------------------------------------------------------------------|
| PI3K          | Fosfotidil inositol 3 kinaz                                                      |
| ROO•          | Peroksil radikali                                                                |
| ROS           | Reactive Oxygen Species/Reaktif oksijen türleri                                  |
| Rpm           | Revolutions per minute/1 dakika içerisinde gerçekleştirilen dönüş / devir sayısı |
| SGLT1         | Sodyum glukoz transport protein-1                                                |
| SOD           | Süperoksit dismutaz                                                              |
| Strep         | Streptomisin                                                                     |
| TNF- $\alpha$ | Tümör nekrozis faktör- $\alpha$                                                  |
| TRx           | Tioredoksin                                                                      |
| UV            | Ultraviyole                                                                      |
| XOD           | Ksantin oksidaz                                                                  |
| $\mu$ g       | Mikrogram                                                                        |
| $\mu$ M       | Mikromol                                                                         |

## ŞEKİLLER

|                                                                                                                                                                                                                                                                               |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Şekil 1.1</b> Laktoferrinin 3 boyutlu yapısı                                                                                                                                                                                                                               | 3  |
| <b>Şekil 1.2.</b> Laktoferrinin biyolojik fonksiyonları                                                                                                                                                                                                                       | 9  |
| <b>Şekil 1.3.</b> Reaktif oksijen türleri                                                                                                                                                                                                                                     | 15 |
| <b>Şekil 1.4.</b> Antioksidan savunma sistemi                                                                                                                                                                                                                                 | 20 |
| <b>Şekil 1.5.</b> Süperoksit dismutaz enzimi tarafından katalizlenen reaksiyon                                                                                                                                                                                                | 22 |
| <b>Şekil 1.6.</b> Glutasyon peroksidaz enziminin glutasyon redoks tepkimesindeki rolü                                                                                                                                                                                         | 24 |
| <b>Şekil 2.1.</b> Çalışma akışı                                                                                                                                                                                                                                               | 32 |
| <b>Şekil 3.1.</b> Caco2 hücre hattı <b>a)</b> Konfluent hücre hattı, <b>b)</b> Pasajlanmış hücre hattı                                                                                                                                                                        | 48 |
| <b>Şekil 3.2.</b> Caco2 hücre hattının farklı LF dozları ile 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyonu sonucu hücre canlılığı                                                                                                                                                          | 49 |
| <b>Şekil 3.3.</b> Farklı LF dozlarının Caco2 hücre hattında yara iyileşmesi deneyi üzerine zamana bağlı etkileri                                                                                                                                                              | 51 |
| <b>Şekil 3.4. a)</b> Farklı LF dozlarının Caco2 hücre hattında zamana bağlı yara iyileşme yüzdeleri. <b>b)</b> Laktoferrinin 4 farklı dozunun Caco2 hücrelerinde yara iyileşmesine 24 saat aralıklarla ölçülen etkisinin zamana karşı yüzde iyileşme olarak grafiksel ifadesi | 54 |
| <b>Şekil 3.5.</b> Farklı laktoferrin dozlarına bağlı olarak Glutasyon-S-transferaz enziminin zamana bağlı enzim aktivitesi                                                                                                                                                    | 56 |
| <b>Şekil 3.6.</b> Caco2 hücre hattının farklı LF dozları ile inkübasyonu sonucu görülen GST enzim aktivitesi                                                                                                                                                                  | 57 |
| <b>Şekil 3.7.</b> Farklı LF dozlarının Caco2 hücre hattında GST enzim aktivitesi üzerine etkisi                                                                                                                                                                               | 58 |
| <b>Şekil 3.8.</b> Farklı laktoferrin dozlarına bağlı olarak Glutasyon peroksidaz enziminin zamana bağlı enzim aktivitesi                                                                                                                                                      | 59 |
| <b>Şekil 3.9.</b> Caco2 hücre hattının farklı LF dozları ile inkübasyonu sonucu görülen GPx enzim aktivitesi                                                                                                                                                                  | 60 |
| <b>Şekil 3.10.</b> Farklı LF dozlarının Caco2 hücre hattında GPx enzim aktivitesi üzerine etkisi                                                                                                                                                                              | 61 |
| <b>Şekil 3.11.</b> Farklı laktoferrin dozlarına bağlı olarak süperoksit dismutaz enziminin zamana bağlı enzim aktivitesi                                                                                                                                                      | 62 |
| <b>Şekil 3.12.</b> Caco2 hücre hattının farklı LF dozları ile inkübasyonu sonucu görülen SOD enzim aktivitesi                                                                                                                                                                 | 63 |
| <b>Şekil 3.13.</b> Farklı LF dozlarının Caco2 hücre hattında SOD enzim aktivitesi üzerine etkisi                                                                                                                                                                              | 64 |
| <b>Şekil 3.14.</b> LF konsantrasyonuna göre % Glukoz transportu                                                                                                                                                                                                               | 66 |
| <b>Şekil 3.15.</b> LF konsantrasyonuna göre % Glukoz transportu                                                                                                                                                                                                               | 67 |

## ÇİZELGELER

|                                                                                                                        |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Çizelge 1.1</b> Farklı türdeki sütlerin laktoferrin içerikleri                                                      | 7  |
| <b>Çizelge 1.2</b> Başlıca endojen oksidan ajanlar                                                                     | 16 |
| <b>Çizelge 2.1.</b> Çalışmada kullanılan ekipmanlar                                                                    | 33 |
| <b>Çizelge 2.2.</b> Çalışmada kullanılan kimyasal ve biyolojik sarflar dışında kullanılan temel malzemeler             | 34 |
| <b>Çizelge 2.3.</b> Protein miktarı saptanmasında kullanılan kimyasallar                                               | 40 |
| <b>Çizelge 2.4.</b> GST aktivitesinin belirlenmesinde kullanılan reaktifler                                            | 44 |
| <b>Çizelge 2.5.</b> GPx aktivitesinin belirlenmesinde kullanılan reaktifler                                            | 45 |
| <b>Çizelge 2.6.</b> SOD aktivitesinin belirlenmesinde kullanılan reaktifler                                            | 46 |
| <b>Çizelge 3.1.</b> Caco2 hücre hattının farklı LF dozları ile 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyonu sonucu hücre canlılığı | 50 |
| <b>Çizelge 3.2.</b> Laktoferrinin farklı dozlarda uygulamasının antioksidan enzim aktiviteleri üzerine etkisi          | 65 |

# 1. GİRİŞ

Biyoaktif peptitler, bilinen besin değerinin ötesinde, vücut işlevleri üzerinde yararlı bir etki gösteren ve/veya insan sağlığını olumlu yönde etkileyen bir protein içindeki peptit dizileridir (Kitts ve ark., 2003). Yeterli ve dengeli bir beslenmenin kronik hastalıkların oluşumu, önlenmesi ve prognozunda meydana getirdiği iyileştirmelerle birlikte besinlerde bulunan biyoaktif peptitlerin metabolizmadaki terapötik etkileri ön plana çıkmaktadır (Chakrabarti ve ark., 2018). Son yıllarda yapılan çalışmalar, besinlerin enerji, makro ve mikro besin ögeleri kaynağı olmasının yanı sıra içerdikleri biyoaktif peptitler aracılığıyla vücudun fizyolojik fonksiyonlarında da görev alabileceğini göstermektedir (Chakrabarti ve ark., 2018; Martini ve ark., 2023). Bu peptitler; antihipertansif, antimikrobiyal, antitrombotik, immün modülatör, opioid, antioksidan ve mineral bağlama fonksiyonları dahil olmak üzere sayısız aktiviteleri aracılığı ile önemli vücut fonksiyonlarını düzenleyebilmektedir (Chakrabarti ve ark., 2018; Kitts ve ark., 2003; Martini ve ark., 2023).

Biyoaktif peptitlerin metabolizmada gösterdiği yararlı etkilerden dolayı metabolik süreçlerdeki görevlerinin ve etki mekanizmalarının belirlenmesi ve bunlara bağlı olarak besin zenginleştirmede, besin takviyelerinde ve ilaç üretiminde kullanılmasının gerekliliği anlaşılmaktadır (Chakrabarti ve ark., 2018; Kitts ve ark., 2003; Wada ve ark., 2020). Bu nedenle doğal olarak tüketilen besinlerin zengin biyoaktif peptit yapıları öne çıkmaktadır. Süt, birçok biyoaktif peptit içeren özel bir besin ögesi kaynağıdır (Koirala ve ark., 2023). Özellikle anne sütünde bulunan bazı biyoaktif peptitlerin biyoaktivitelerinin ancak proteinlerin gastrointestinal kanalda sindiriminden sonra ortaya çıktığı belirtilmektedir (Wada ve ark., 2020). İnsan sütünün zengin biyoaktif peptit yapısı düşünüldüğünde teknolojik gelişmeler, insan sütü proteinlerinden türetilen peptitleri tanımlanmasını ve karakterize edilmesini sağlamaktadır. Bununla birlikte, anne sütü ile beslenen bebeklerin büyüme ve gelişmesinde bu biyoaktif peptitlerin fizyolojik önemi ve metabolizmadaki rolleri

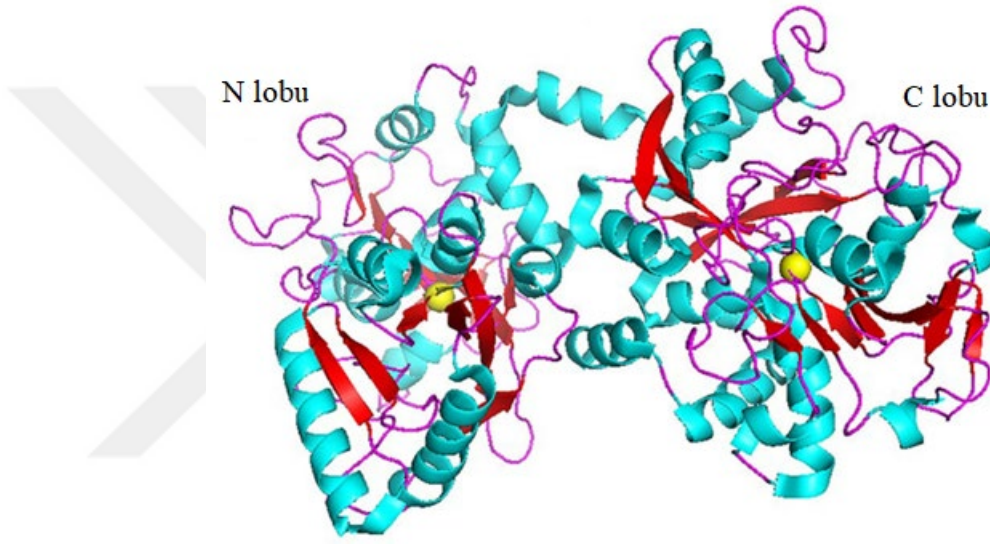
yeterince açıklanamamıştır. Bu alanda daha fazla in vivo deneyler ve klinik çalışmaların gerekliliği vurgulanmaktadır (Chakrabarti ve ark., 2018; Kitts ve ark., 2003; Wada ve ark., 2020).

Sütte bulunan biyoaktif peptitlerin başlıca kaynağı kazein ve whey proteinleri olarak gösterilmektedir. Laktoferrin (LF), whey proteini ailesine ait, başlıca sütte bulunan biyoaktif bir peptittir (Gonzalez-Chavez ve ark., 2009; Moreno-Exposito ve ark., 2018). Laktoferrin tükürük, gastrointestinal sistem salgıları, gözyaşı, burun, safra, bronşiyal sıvılar gibi mukozal salgılarda da bulunmaktadır (Actor ve ark., 2009; Farid ve ark., 2021; Wang ve ark., 2019). Laktoferrinin, immün modülatör etkisi, antimikrobiyal kapasite, antioksidan kapasitesi, anti-inflamatuvar ve antikanserojen aktivitesi bulunmaktadır (Gonzalez-Chavez ve ark., 2009; Moreno-Exposito ve ark., 2018). Bu fonksiyonel özelliklerinden dolayı laktoferrin besin endüstrisinde, ilaç sektörü ve kozmetik sektöründe bir bileşen olarak kullanılmaktadır (Janczuk ve ark., 2022).

### **1.1. Laktoferrin Yapısı**

Laktoferrin, tek bir peptit zincirinde 692 aminoasitten oluşan ve yaklaşık 80 kilodalton (kDa) molekül ağırlığına sahip kırmızı renkli bir whey proteindir. Laktoferrin amino asit dizisinin transferrin proteini ile yüksek benzerliğe sahip olması nedeni ile laktotransferrin olarak da adlandırılmaktadır (Gonzalez-Chavez ve ark., 2009; Moreno-Exposito ve ark., 2018; Sienkiewicz ve ark., 2022). Laktoferrin memeli türlerinde benzer bir aminoasit dizisine sahiptir. İnsan ve inek LF yaklaşık %70 sekans özdeş iken, insan ve şempanze LF neredeyse %97 sekans özdeşliği paylaşmaktadır (Yount ve ark., 2007).

Şekil 1.1.'de gösterildiği gibi laktoferrin N-lobu ve C-lobu olmak üzere 2 farklı alt ünite içermektedir (Sienkiewicz ve ark., 2022). Bu lobların (N1 ve N2, C1 ve C2) bir araya gelmesi ile oluşan her bir alt ünite, bir demir iyonuna bağlanabilmektedir. Laktoferrin, demir doygunluğuna göre üç farklı sınıfta kategorize edilmektedir. Düşük demir yoğunluğuna sahip form apolaktoferrin (apo-LF), %30-40 oranında demir doygunluğuna sahip form doğal (native) laktoferrin ve %70-80 oranında demir yoğunluğuna sahip form hololaktoferrin (holo-LF) olarak adlandırılmaktadır (Baker ve ark., 2009; Gonzalez-Chavez ve ark., 2009).



**Şekil 1.1** Laktoferrinin 3 boyutlu yapısı (Sienkiewicz ve ark., 2022)

## **1.2. Laktoferrinin Keşfi**

Laktoferrinin ilk keşfinin Sorensen ve arkadaşları tarafından 1940 yılında yapıldığı belirtilmektedir (Brock, 2012). Ancak laktoferrinin, anne ve inek sütünden izolasyonu ve saflaştırılması 1960'lı yıllara dayanmaktadır (Derechin ve ark., 1962; Johanson, 1960).

Laktoferrin üzerine yapılan ilk çalışma, demir bağlayıcı bir protein olan transferrin proteinine benzerliğinden dolayı bağırsakta demir emiliminde yer alan bir demir transport proteini ve mukozal dokularda mikrobiyal büyümenin düzenleyicisi olmasına odaklanmaktadır (Brock, 2012). Ancak ilerleyen yıllarda, laktoferrinin organizmanın vücut sıvılarında ve nötrofil gibi çeşitli hücrelerde keşfi ile birlikte, laktoferrinin sistematik etkileri üzerine yapılan çalışmaların sayısı artmıştır. Rumke ve ark.larının, 1971 yılında yaptıkları bir çalışmada kanserli bireylerin serum laktoferrin düzeylerinin artışı, laktoferrinin bir kanser biyobelirteci olarak düşünülmesine yol açmıştır (Rumke ve ark., 1971). Laktoferrinin rekombinant olarak tütün, patates, pirinç, domates ve havuç gibi çeşitli bitkilerde başarılı bir şekilde ekspresyonu ile birlikte endüstriyel olarak kullanımı öne çıkmıştır (Mitra ve ark., 1994).

Rekombinant olarak büyük ölçekli üretimi laktoferrinin besin endüstrisi ve kozmetik sektöründe kullanımını kolaylaştırmıştır. Laktoferrin, Amerika Gıda ve İlaç Organizasyonu (Food and Drug Administration-FDA) ve Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (European Food Safety Agency-EFSA) tarafından tüketimi güvenilir ve besin takviyesi olarak kullanılabilir olarak sınıflandırılmaktadır (FDA 2016; EFSA 2012). Hem hayvanlarda hem de insanlarda, yüksek doz laktoferrin alımının iyi tolere edildiği ve güvenli olduğu rapor edilmektedir (Cutone ve ark., 2020; Kaufman ve ark., 2021). Bilinen etkilerinden dolayı, laktoferrin ile zenginleştirilen yenidoğan formülleri, sporcu içecekleri gibi besinlerin yanı sıra farmasötik ve kozmetik ürünleri de vardır (Legrand, 2016; Lonnerdal, 2016).

### **1.3. Laktoferrinin Metabolizması**

Laktoferrin, protein yapısı nedeni ile insan vücudunda sindirim sonucunda küçük peptitler halinde emilmektedir. Bilindiği üzere, mide ve bağırsak sindirimi ön plana çıkmaktadır. Laktoferrin, bağırsaklarda bulunan reseptörler aracılığı ile

dolaşıma katılmaktadır. Laktoferrin daha sonra hücreler tarafından spesifik olarak tanınan reseptörler aracılığı ile hedef hücrelere taşınarak dolaşım sistemine dahil olabilir. Laktoferrin endositoz yoluyla enterositler tarafından da emilebilir (Mayeur ve ark., 2016). Laktoferrin reseptörleri, bağırsak mukozasında ve bağırsaktaki lenfatik doku hücrelerinin yanısıra özellikle lökositler ve makrofajlar gibi bağışıklık sistemi hücrelerinde yüksek oranda bulunmaktadır (Jiang ve ark., 2011; Takeuchi ve ark., 2006; Yamano ve ark., 2010). Laktoferrin bu sayede fizyolojik etkilerini gösterebilmektedir. Sağlıklı insanlarda, laktoferrinin serumdaki düzeyi yaklaşık 0,02-2,00 µg/mL'dir ve enfeksiyon sırasında hızla 200 µg/mL'ye kadar yükselebilmektedir (Embleton ve ark., 2013; Latorre ve ark., 2010).

Yapılan *in vivo* çalışmalarda laktoferrinin sindirimi tam olarak anlaşılamamıştır (Sanchez ve ark., 1992; van Veen ve ark., 2004). *In vivo* sindirim çalışmalarında laktoferrin kaynağı, demir doygunluğu, *in vivo* modeldeki mide boşalma hızı ve intragastrik pH'nın laktoferrinin sindiriminde önemli rol oynadığı gösterilmiştir. Anne sütünden elde edilen laktoferrinin, inek sütünden elde edilene kıyasla sindirime daha dirençli olduğu belirtilmektedir (Brines ve ark., 1983; van Veen ve ark., 2004). Demir doygunluğu yüksek olan laktoferrinin, apolaktoferrine kıyasla sindirime daha dirençli olduğu rapor edilmiştir (Spik ve ark., 1982). Benzer şekilde, 20-22 yaşındaki gönüllüler üzerinde gerçekleştirilen başka bir *in vivo* çalışmada inek sütünden elde edilen laktoferrinin %60'ının gastrik sindirimden yapısal olarak bozulmamış biçimde geçtiği bildirilmektedir (Troost ve ark., 2002). Yenidoğanlar ve bebeklerde ise sindirim sisteminin yeterince gelişmemiş olması nedeni ile laktoferrinin tam olarak sindirilemediği ve dışkı örneklerinde laktoferrine rastlandığı ifade edilmektedir (Gisbert ve ark., 2009; Spik ve ark., 1982). Oral, mide ve bağırsak olmak üzere farklı sindirim aşamalarında laktoferrin sindirimini ve sindirim sonucu elde edilen peptitlerin kimyasal yapı ve fonksiyonel özelliklerini kesin olarak gösteren bir *in vivo* çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle, laktoferrinin ve sindirimi sonucu farklı sindirim aşamalarında (gastrik ve bağırsak sindirimi) ortaya çıkan bileşiklerin araştırılması önerilmektedir (Mayeur ve ark., 2016).

Laktoferrinin in vitro sindirim modellerinde ise insan sütü laktoferrini (hLf) ve inek sütü laktoferrininin (bLf) enterositleri hedefleyebileceği, hücre proliferasyonu ve farklılaşması sağlayabileceğini göstermektedir (Akiyama ve ark., 2013; Lonnerdal ve ark., 2011). Ancak, in vitro modellerde laktoferrinin fonksiyonel özellikleri değişebilmektedir. Örneğin, LF'nin demir bağlama kapasitesinin gastrik sindirim esnasında %80-90 oranında azaldığı; antioksidan aktivitelerinin oral ve bağırsak sindirimine kıyasla 3-8 kat daha fazla olduğu saptanmıştır (Wang ve ark., 2017). Bu sonuçlar, in vitro koşullarda mide sindiriminin laktoferrinin fonksiyonel özellikleri üzerinde önemli bir etki gösterdiğini ve laktoferrinin fonksiyonel olarak aktif formda emilim bölgelerine iletilmesi için korunması gerektiğini göstermektedir. Bu nedenle demir doğunluğunun artırılması, polietilen glikol (PEG) ile kaplama ve mikrokapsülasyon gibi yöntemler kullanılarak laktoferrinin, oral ve gastrik (mide) sindirimden daha az etkilenerek bağırsaklara ulaşması hedeflenmektedir (Wang ve ark., 2019).

#### **1.4. Farklı Sütlerin Laktoferrin   cerikleri**

Laktoferrinin diyetteki en önemli kaynağı süt ürünleridir. Laktoferrin ile zenginleştirilmiş besin destekleri, yenidoğan formülleri de diyetteki laktoferrin kaynağı olabilmektedir. Sütte bulunan laktoferrin miktarı, t  re ve laktasyon evresine göre değişkenlik göstermektedir. Laktoferrinin diyetteki temel kaynağı insan ve hayvan s  tleridir. Çizelge 1.1'de gösterildiği üzere kolostrum sütlerinde bulunan laktoferrin miktarı, olgun sütlere kıyasla daha yüksektir. Ayrıca, insan kolostrumu ve anne sütü diğer hayvan kolostrumu ve sütlerine kıyasla daha yüksek oranda laktoferrin içermektedir (Wang ve ark., 2019).

**Çizelge 1.1** Farklı türdeki sütlerin laktoferrin içerikleri (Wang ve ark., 2019)

| <b>Biyolojik Sıvılar</b> | <b>Konsantrasyon (mg/mL)</b> |
|--------------------------|------------------------------|
| İnsan kolostrum          | 5.80 ± 4.30                  |
| İnek kolostrumu          | 0.82 ± 0.54                  |
| Deve kolostrumu          | 0.81 ± 0.31                  |
| Keçi kolostrumu          | 0.39 ± 0.07                  |
| Anne sütü                | 2.00 – 3.30                  |
| İnek sütü                | 0.03 – 0.49                  |
| Deve sütü                | 0.06 – 0.89                  |
| Keçi sütü                | 0.17- 0.59                   |

### **1.5. Laktoferrinin Besin Endüstrisindeki Yeri ve Önemi**

Günümüzde, insan sağlığı üzerine olumlu etkileri olabilecek olan besin ve besin bileşenlerinin kullanımına yönelik artan bir ilgi vardır. Potansiyel olarak sağlığa olumlu etkileri olacağı düşünülen besin ya da besin öğelerinin işlenmesi, paketlenmesi ve kullanıma sunulması üzerine bilimsel çalışmalar artmaktadır. Laktoferrin başta olmak üzere süt proteinleri son yıllarda özel bir önem kazanmıştır (Janczuk ve ark., 2022; Koirala ve ark., 2023).

Laktoferrinin küresel pazardaki değerinin 2014-2020 yılları arasında iki katına çıktığı rapor edilmektedir. Dünya genelinde 2021 yılında inek sütünden elde edilen laktoferrin pazarının 235,9 milyon Amerika Birleşik Devletleri (ABD) doları büyüklüğüne sahip olduğu ve bu değer 2028'de 411,8 milyon ABD dolarına ulaşacağı öngörülmektedir (Janczuk ve ark., 2022). Benzer şekilde, Avrupa pazarındaki değeri ise 2021'de 15,37 milyon ABD doları iken bu değer 2026 yılına kadar 23,53 milyon ABD dolarına çıkması beklenmektedir (Janczuk ve ark., 2022).

Laktoferrin, besin endüstrisi, ilaç sektörü ve kozmetik sektöründe kullanılmaktadır. Besin endüstrisinde; bebek formülleri, nutrasötikler, fermente süt

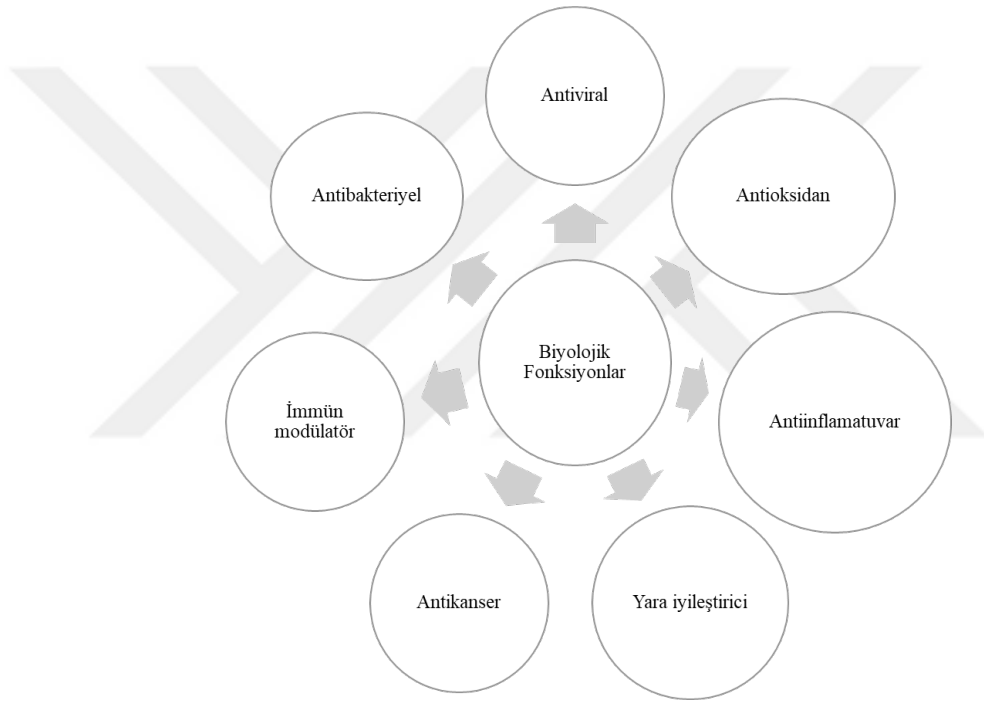
ürünleri, işlenmiş etler ve diyet takviyelerinde zenginleştirme amacıyla kullanılmaktadır (Balcão ve ark., 2013; Conesa ve ark., 2010). İlaç ve kozmetik endüstrilerinde ise laktoferrin, herpes veya cilt lezyonlarının tedavisi, bağışıklığın güçlendirilmesi, demir seviyelerinin artırılması, bağırsak mikrobiyotasının desteklenmesi ve bakteri üremesinin sınırlandırılmasında bir bileşen olarak yer almaktadır (Janczuk ve ark., 2022).

Laktoferrinin, 2012'den beri Avrupa Birliği (AB) tarafından bir besin bileşeni olarak kullanımına onay verilmiş ve ürün etiketlerinde belirtilmesi zorunlu hale getirilmiştir (EFSA, 2012). Besin endüstrisinde, sahip olduğu biyolojik fonksiyonlara göre laktoferrinle zenginleştirilen birçok ürün bulunmaktadır. Bunlar arasında bebek formülleri, süt ve süt ürünleri, sakızlar, şekerlemeler, yoğurt ve işlenmiş et ürünleri sayılabilir. Laktoferrin, bağışıklığı artırması ve sindirimi kolaylaştırıcı etkileri nedeniyle bebek formüllerinde de kullanılmaktadır (Janczuk ve ark., 2022). Ayrıca, antibakteriyel özelliği sayesinde işlenmiş et ürünlerinde ve antimikrobiyal özelliği sayesinde besinlerin saklanması da kullanılmaktadır (Erdem-Buyukkiraz ve ark., 2022; Janczuk ve ark., 2022). Ancak Türkiye’de besinlerin laktoferrinle zenginleştirilmesine yönelik herhangi bir politika ve laktoferrinle zenginleştirilmiş herhangi bir ürün bulunmamaktadır.

## **1.6. Laktoferrinin Biyolojik Fonksiyonları**

Laktoferrinin, kristal yapısının belirlenmesi, yapısal özelliklerinin tanımlanmasında ve olası biyolojik aktivitelerinin açıklanmasında öncü olmuştur (Anderson ve ark., 1989). Laktoferrinin fizyolojik fonksiyonlarına yönelik ilk çalışmalar, transferrin proteinine benzerliğinden ötürü bağırsaklarda demir emilimini artırmak ve demir yoksunluğuna bağlı mukozal hasarın önlenmesine yönelik çalışmalardır. Ancak, ilerleyen zamanlarda, laktoferrinin nötrofillerin spesifik

granüllerinde bulunmasının keşfi ile birlikte, bağışıklık sistemi ve inflamasyondaki potansiyel etkileri de araştırma konusu olmuştur (Brock, 2012). Güncel çalışmalar, laktoferrinin bağışıklık sistemi üzerine etkisi, antimikrobiyal ve antibakteriyel etkinliği, antioksidan kapasitesi, antiinflamatuvar, antikanser ve yara iyileşmesine olan etkileri üzerine yoğunlaşmıştır (Cutone ve ark., 2020; Gonzalez-Chavez ve ark., 2009; Janczuk ve ark., 2022; Mayeur ve ark., 2016). Şekil 1.2’de laktoferrinin biyolojik fonksiyonları gösterilmiştir (Cutone ve ark., 2020; Gonzalez-Chavez ve ark., 2009; Janczuk ve ark., 2022; Mayeur ve ark., 2016) (Şekil 1.2).



**Şekil 1.2.** Laktoferrinin biyolojik fonksiyonları (Cutone ve ark., 2020; Gonzalez-Chavez ve ark., 2009; Janczuk ve ark., 2022; Mayeur ve ark., 2016)

### 1.6.1. Laktoferrinin Antiviral Etkisi

Laktoferrinin, hepatit B (HBV) ve hepatit C virüsü (HCV), insan bağışıklık yetmezliği virüsü (HIV), insan papilloma virüsü (HPV), influenza ve poliomiyelit dahil olmak üzere çok çeşitli zarflı ve zarfsız RNA ve DNA virüslerine karşı güçlü bir antiviral yanıt sergilediği belirtilmektedir (Kanwar ve ark., 2012; Kanwar ve ark., 2011; Ward ve ark., 2005).

Laktoferrinin antiviral etkiyi genellikle viral enfeksiyonun başlangıç aşamasında virüslere doğrudan ya da virüsün konakçı hücreye bağlandığı reseptörlere bağlanarak gösterdiği belirtilmektedir (Gonzalez-Chavez ve ark., 2009). Etki mekanizması araştırıldığında laktoferrinin özellikle heparan sülfat gibi glikoz amino glikan yapıda olan viral reseptörlere bağlanıp bunları bloke ederek yaptığı belirtilmektedir. Bunun sonucunda, virüsün konak hücreye girişi önlenmektedir (van der Strate ve ark., 2001).

### 1.6.2. Laktoferrinin Antibakteriyel Etkisi

Laktoferrinin *Candida albicans*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus canis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus zooepidemicus*, *Proteus mirabilis* ve *Yersinia pestis* gibi çok sayıda bakteriye karşı antibakteriyel potansiyel gösterdiği rapor edilmiştir (Gonzalez-Chavez ve ark., 2009; Kutila ve ark., 2003). Laktoferrin bakteriler, mantarlar, parazitler ve virüsler dahil olmak üzere birçok patojene etki gösterdiği bulunmuştur (Baker ve ark., 2009; Valenti ve ark., 2005). Laktoferrinin antibakteriyel etki mekanizması, demir doygunluk durumuna bağlı olarak değişmektedir. Laktoferrinin demirden zengin olan formu holo-LF'te bulunan demir, proteinin bağlanma yerlerinde tutularak bakterilerin demire erişmesini

önleyerek bakterilerin büyümelerini engeller ve çoğalmalarını kısıtlar. Ek olarak, laktoferrinde bulunan demir bağlama bölgeleri, bakteri hücre duvarlarına bağlanarak hücre duvar bütünlüklerini bozduğundan bakteri ölümüne yol açmaktadır. Bunun ile birlikte laktoferrin yüksek katyonik yapısı sayesinde gram-negatif bakterilerin negatif yüklü lipopolisakkaritleri ile doğrudan etkileşime girerek antibakteriyel etki göstermektedir (Ellison ve ark., 1988).

### **1.6.3. Laktoferrinin İmmün Sistem Üzerine Etkisi**

Laktoferrinin immün modülatör, yani bağışıklık düzenleyici işlevi kapsamlı bir şekilde araştırılmış ve beslenme faydaları nedeni ile önemli bir özellik olarak kabul edilmiştir. Bu özellikleri nedeni ile besin ve ilaç endüstrisinde daha fazla dikkat çekmiştir (Ashraf ve ark., 2023).

Yapılan in vitro ve in vivo araştırmalar, laktoferrinin birden fazla mekanizma yolu ile immün modülatör etkileri olduğunu düşündürmektedir. Moleküler mekanizmaları net olmamakla birlikte laktoferrinin hem adaptif hem de doğal bağışık yanıtların oluşmasını doğal olarak tetikleyen bir immünolojik aracı olduğu düşünülmektedir (Actor ve ark., 2009; Legrand ve ark., 2010). Laktoferrinin, immün hücrelerin fizyolojik fonksiyonlarını, olgunlaşmasını ve migrasyonunu moleküler düzeyde modüle edebildiği rapor edilmiştir (LeGrand ve ark., 2005). Antijen sunan hücreleri (B-lenfositleri) aktive ederek antikor yanıtını uyardığı ve daha sonra T-lenfositleriyle etkileşime girdiği, böylece T hücre öncüllerinin yetkin yardımcı hücrelere olgunlaşmasına yol açtığı bildirilmektedir (Kawasaki ve ark., 2000).

#### **1.6.4. Laktoferrinin Antikanser Etkisi**

Kanser, birçok bilinmeyen ve etyolojik faktörlere bağlı olarak hücrelerin kontrolsüz ve anormal çoğalması ile sonuçlanan çoklu mekanizmalı bir kronik süreçtir. Laktoferrin ve laktoferrinin sindirimi ile meydana gelen peptitlerin farklı kanser türlerine karşı koruyucu etkilerinin altında yer alan mekanizmalar net olmamakla birlikte bu konuda farklı hipotezler bulunmaktadır. Yapılan in vitro çalışmalarda farklı dozlarda laktoferrinin hücre hatlarında hücre canlılığını, hareketliliğini ve invazyonunu azalttığı ve apoptozu tetiklediği rapor edilmiştir (Li ve ark., 2020; Li ve ark., 2017).

#### **1.6.5. Laktoferrinin Yara İyileşmesi Üzerine Etkisi**

Yaralanma durumunda epitel hücrelerden vücut sıvılarına salgılanan demir bağlayıcı bir glikoprotein olan laktoferrin, ilk inflamatuvar fazı artırarak cilt yara iyileşmesini desteklemektedir. Laktoferrin, anti-inflamatuvar özellikleri sayesinde yaralanma durumunda konağın gösterdiği aşırı bağışıklık tepkisini nötralize etmektedir. Bununla birlikte, laktoferrinin doğrudan hem granülasyon dokusu oluşumunu hem de yeniden epitelizasyonu desteklediği belirtilmektedir. Laktoferrinin, fibroblastların ve keratinositlerin çoğalmasını ve yara bölgesine doğru hücre göçünü ve kolajen gibi hücre dışı matris bileşenlerinin sentezini de uyardığı gösterilmiştir (Takayama ve ark., 2012).

### 1.6.6. Laktoferrinin Oksidatif Stres Üzerine Etkisi

Oksidatif stres, obezite, tip 2 diyabet, kanser, nörodejeneratif hastalıklar, ateroskleroz, yaşlanma ve patojenlere karşı savunma gibi bazı kronik dejeneratif bozuklukların gelişiminde rol oynamaktadır (Marnett 2000; Misonou ve ark., 2000). Laktoferrin, metal iyonlarını bağlama kapasitesine sahiptir. Oksidatif stres durumunda doku ve hücrelerden salınan reaktif oksijen türlerinin (Reactive Oxygen Species-ROS) miktarı artmaktadır. Ayrıca, Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonu gibi demir katalizli reaksiyonlar da ROS seviyelerini artırmaktadır. Laktoferrin ise demir şelasyonu aracılığıyla bu reaksiyonların azaltılmasında rol oynamaktadır (Fillebeen ve ark., 2001). Farklı dozlarda laktoferrinin (25-100 µg/mL) in vitro koşullarda H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tarafından indüklenen oksidatif strese karşı hücre içi ve hücre dışı hidrojen peroksit seviyelerini düşürerek koruyucu etkileri olduğu saptanmıştır (Safaeian ve ark., 2015). Laktoferrin ayrıca, antioksidan enzimler olan süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GPx) gibi enzimlerin seviyelerini artırarak da oksidatif strese karşı koruyucu etki gösterebilmektedir (Gonzalez-Chavez ve ark., 2009; Moreno-Exposito ve ark., 2018).

### 1.7. Oksidatif Stres

Vücutta diyet ile alınan besinlerin sindirimi, alkol ve ilaçların metabolizması, solunum gibi metabolik süreçlerin sonucunda serbest radikaller oluşmaktadır. Oluşan serbest radikaller belirli bir konsantrasyona kadar hücre sinyalizasyonu ve gen ekspresyonunun düzenlenmesi gibi fizyolojik süreçlerde rol alırken, yüksek konsantrasyonlarda hücresel bileşenler olan DNA, lipit ve proteinlerde hasara yol açmaktadır. Doğal süreçler ya da çevresel etkenlere maruziyet sonucunda oluşan serbest radikaller ve vücudun savunma mekanizması olan antioksidan savunma sistemi arasında bir denge bulunmaktadır. Ancak, bu dengenin oluşan ROS artışı ya da

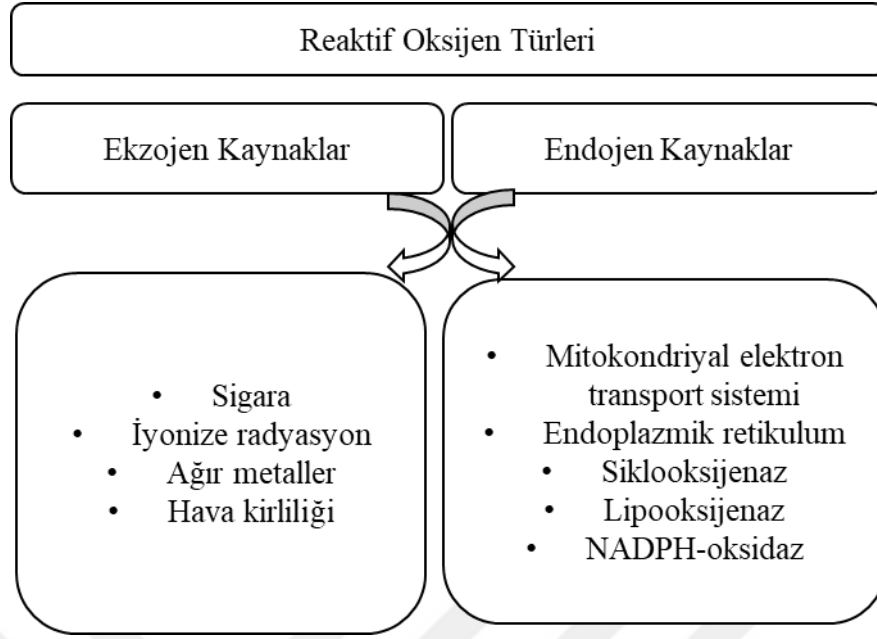
antioksidan savunma sisteminin yetersiz kalması ile oksidatif stres meydana gelmektedir (Lobo ve ark., 2010; Sharifi-Rad ve ark., 2020; Valko ve ark., 2007).

Oksidatif stres, obezite, diyabet, kardiyovasküler hastalıklar, nörodejeneratif hastalıklar ve kanser gibi kronik hastalıkların patogeneğinde önemli bir rol oynamaktadır (Sharifi-Rad ve ark., 2020; Valko ve ark., 2007). Artan işlenmiş besin tüketimi ve düzenli fiziksel aktivite eksikliği ile karakterize edilen modern yaşam tarzının, oksidatif stres indüksiyonunda önemli bir rol oynadığı çalışmalarda gösterilmektedir (Sharifi-Rad ve ark., 2020; Valko ve ark., 2007).

### **1.7.1. Reaktif Oksijen Türleri**

Serbest radikaller, dış yörüngelerinde bir ya da daha fazla eşlenmemiş elektron içeren moleküler yapılardır. Bu moleküller, oksijenin kısmen indirgenmesi sonucu oluşan kısa ömürlü ve güçlü oksidan özelliktedir. Serbest oksijen radikalleri başka bir radikalle veya radikal olmayan bir ajanla birleşerek moleküler düzeyde birçok biyolojik etkiye yol açabilmektedir (Birben ve ark., 2012; Lobo ve ark., 2010).

Vücutta endojen ve ekzojen olmak üzere iki farklı serbest radikal türü bulunmaktadır. Hücresel solunum, sindirim gibi metabolik süreçler sonucunda endojen reaktif oksijen türleri meydana gelirken; ilaç toksisitesi, sigara dumanı, ultraviyole radyasyon, hava kirliliği, yoğun fiziksel aktivite, alkol tüketimi gibi çevresel etmenler sonucunda da ekzojen ROS'lar üretilmektedir (Birben ve ark., 2012; Lobo ve ark., 2010). Reaktif oksijen türleri Şekil 1.3'te özetlenmiştir (Sharifi-Rad ve ark., 2020).



**Şekil 1.3.** Reaktif oksijen türleri (Sharifi-Rad ve ark., 2020)

#### 1.7.1.1.Endojen Oksidan Ajanlar

Reaktif oksijen türleri, normal hücrel metabolizmanın bir sonucu olarak moleküler oksijenden üretilmektedir. Bir veya daha fazla eşleşmemiş elektron içeren ve bu nedenle moleküler reaktif olan moleküllere serbest radikaller denir. İki serbest radikal, eşleşmemiş elektronlarını paylaştığında, radikal olmayan formlar meydana gelmektedir. Süperoksit anyonu ( $O_2^-$ ), hidroksil radikali ( $OH^\bullet$ ) ve hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) olmak üzere fizyolojik olarak öneme sahip üç temel ROS bulunmaktadır (Birben ve ark., 2012). Bu endojen oksidan ajanların meydana getirdiği reaksiyonlar Çizelge 1.2’de özetlenmiştir (Birben ve ark., 2012).

**Çizelge 1.2** Başlıca endojen oksidan ajanlar (Birben ve ark., 2012)

| Oksidan                | Formülü       | Reaksiyon                                                                                                                       |
|------------------------|---------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Süperoksit anyon       | $O_2^-$       | $NADPH + 2 O_2 \leftrightarrow NADP^+ + 2 O_2^- + H^+$<br>$2 O_2^- + H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2$                              |
| Hidrojen peroksit      | $H_2O_2$      | $Hipoksantin + H_2O + O_2 \leftrightarrow ksantin + H_2O_2$<br>$ksantin + H_2O + O_2 \leftrightarrow \text{ürük asit} + H_2O_2$ |
| Hidroksil radikali     | $OH^\bullet$  | $Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + OH^\bullet$                                                                      |
| Hipokloröz asit        | $HOCl$        | $H_2O_2 + Cl^- \rightarrow HOCl + H_2O$                                                                                         |
| Peroksil radikali      | $ROO^\bullet$ | $R^\bullet + O_2 \rightarrow ROO^\bullet$                                                                                       |
| Hidroperoksil radikali | $HOO^\bullet$ | $O_2^- + H_2O \leftrightarrow HOO^\bullet + OH^-$                                                                               |

Süperoksit anyonu ( $O_2^-$ ), moleküler oksijene bir elektronun eklenmesi ile oluşur. Süperoksit anyonu başlıca hücrenin adenosin trifosfat (ATP) üretimi olan mitokondride meydana gelir. Normal şartlarda, elektronlar mitokondriyal elektron taşıma zinciri (ETZ) aracılığı ile oksijenin suya indirgenmesi için transfer edilir, ancak tüm elektronların yaklaşık %1-3'ü sistemden sızar ve süperoksit anyonu üretir (Miller ve ark., 1990). Süperoksit anyonu, süperoksit dismutaz enzimlerinin (SOD) etkisi ile hidrojen peroksit'e dönüştürülür. Hidrojen peroksit ayrıca metabolik reaksiyonlarda moleküler oksijenin kullanılması ile ksantin oksidaz, amino asit oksidaz ve NAD(P)H oksidazı tarafından da üretilabilmektedir. Hidrojen peroksit, Haber-Weiss ve Fenton reaksiyonları sonucunda, ortamda  $Fe^{2+}$  veya  $Cu^{2+}$  gibi metallerin varlığında hidroksil ( $OH^\bullet$ ) iyonuna dönüşmektedir (Fenton 1894; Haber ve ark., 1997; Miller ve ark., 1990).

Süperoksit anyonu ( $O_2^-$ ), hidrojen peroksit ile reaksiyona girerek hidroksil radikali ( $OH^\bullet$ ) oluşturabilmektedir. En reaktif ROS türevidir olan hidroksil radikali ( $OH^\bullet$ ) protein, lipid, DNA gibi hücresel bileşenlere zarar verebilmektedir. Klorür iyonunun varlığında, hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) hipokloröz asite ( $HOCl$ ) dönüştürülür. Hipokloröz asit ( $HOCl$ ) yüksek derecede oksidatif bir madde olup, solunum yollarındaki patojenlerin öldürülmesinde önemli bir rol oynayabilir. Ancak, reaktif

olarak aktif olan hipokloröz asit (HOCl) DNA ile reaksiyona girerek DNA-protein etkileşimlerine ve pirimidin oksidasyonuna yol açabilmektedir (Birben ve ark., 2012; Lobo ve ark., 2010).

Diğer oksijen türevi serbest radikaller peroksil radikalleridir (ROO•). Bu radikallerin en basit formu olan hidroperoksil radikali (HOO•) yağ asidi peroksidasyonunda rol oynar. Serbest radikaller, yan zincir metilen karbonundan bir hidrojen atomunu çalarak lipid peroksidasyonu zincir reaksiyonlarını tetikleyebilir (Birben ve ark., 2012; Lobo ve ark., 2010; Sharifi-Rad ve ark., 2020). Lipid radikali daha sonra oksijenle reaksiyona girerek peroksil radikal (ROO•) üretir. Peroksil radikal (ROO•) başlattığı zincir reaksiyonu ile çoklu doymamış yağ asitlerini lipid hidroperoksitlere dönüştürür. Kararsız yapıda olan lipid hidroperoksitler hızlı bir şekilde aldehitler ve malondialdehitler (MDA) gibi ikincil ürünlere ayrışır. Metabolik süreçler sonucunda oluşan hidrojen peroksit, süperoksit radikal, oksitlenmiş glutatyon (GSSG), malondialdehit (MDA), izoprostanlar, karboniller ve nitrotirozin gibi ürünler oksidasyonun biyobelirteçleri olarak standartlaştırılmış testler aracılığı ile plazma, kan, idrar örneklerinden kolayca ölçülebirlirler (Aslankoç ve ark., 2019; Valko ve ark., 2007).

#### **1.7.1.2. Ekzojen Oksidan Ajanlar**

Sigara dumanı, ultraviyole (UV) radyasyonu, ağır metal iyonları, alerjenler, ilaçlar veya toksinler, kirleticiler, böcek ilaçları gibi çevresel tetikleyicilerin tümü, hücrelerde ROS üretiminin artmasına katkıda bulunan ekzojen oksidan ajanlardır (Antunes Dos Santos ve ark., 2018; Mahajan ve ark., 2018).

Sigara dumanı birçok oksidan ve serbest radikal ile süperoksit ve nitrik oksit gibi organik bileşikler içermektedir. Sigara dumanının akciğerlere inhalasyonu sonucu, nötrofil ve makrofaj birikimine yol açarak oksidan hasarı artırmaktadır. Bu yol aracılığı ile sigara, oksidan hasarı daha da arttıran bazı endojen mekanizmaları aktive eder (Valavanidis ve ark., 2009).

İyonize radyasyon, hidroksil radikallerini, süperoksitleri ve organik radikalleri organik hidroperoksitlere ve hidrojen peroksit'e dönüştürerek etki eder. Daha sonra peroksitler, ikincil oksidatif aktivite ile redoks reaksiyonları yoluyla hücresel düzeyde demir (Fe) ve bakır (Cu) metal iyonları ile reaksiyona girer (Spitz ve ark., 2004).

Ultraviyole radyasyon (UV) riboflavin, porfirinler ve NADPH-oksidadı uyarak oksidatif reaksiyonları tetikler, ana sonucu 8-okso-guanin üretimi ve maruz kalmanın kesilmesinden sonra hücre içi glutatyon (GSH) seviyesinin düşmesi ve normale dönmesidir (Marchitti ve ark., 2011).

Ağır metaller, serbest radikallerin üretiminde önemli bir rol oynar. Demir, bakır, kadmiyum, nikel, arsenik ve kurşun, Fenton veya Haber-Weiss tipi reaksiyonlarla serbest radikalleri indükleyebilir, ancak aynı zamanda metal iyonları ve benzer etkilere sahip hücresel bileşikler arasındaki doğrudan reaksiyonlarla örneğin tiyol tipi radikallerin üretimi ile indükleyebilir (Sciskalska ve ark., 2014).

### **1.7.2. Antioksidanlar**

Antioksidanlar, oksidatif strese bağlı gelişen hasarı önleyerek serbest radikal zincir reaksiyonlarının önlenmesinde rol oynarlar. Antioksidanlar kimyasal yapılarına,

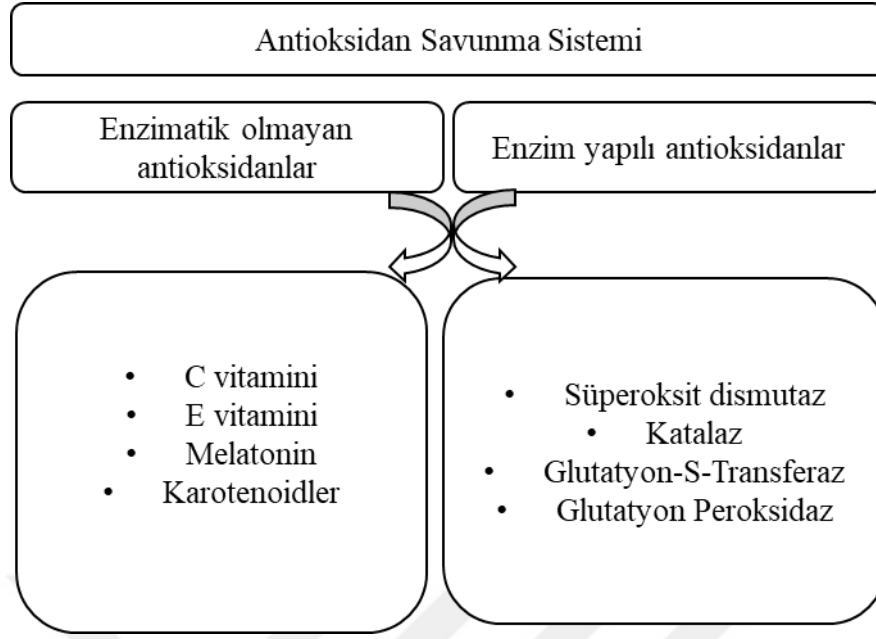
vücutta sentezlenme durumlarına ya da suda çözünme durumlarına göre sınıflandırılabilir. Vücutta sentezlenebilen antioksidanlar endojen olarak isimlendirilirken, diyetle alınan antioksidan kaynaklar ekzojen olarak adlandırılmaktadır. Vücutta sentezlenebilen antioksidanlar, enzim yapıda olan ve enzim yapıda olmayan antioksidanlar olarak alt sınıflara ayrılmaktadır (Birben ve ark., 2012; Sharifi-Rad ve ark., 2020).

Endojen yapıda olan enzimatik antioksidanlar, hücrelerde sentezlenebilmektedir. Bilinen en önemli enzimatik antioksidanlar süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz, Glutatyon-S-Transferaz'dır. Bunun aksine, ekzojen antioksidanların ökaryotik hücrelerde sentezlenmesi mümkün olmadığından diyet yoluyla alınmaktadır. Diyetle bulunan sebze ve meyvelerden alınan askorbik asit, E vitamini, karoten gibi ögeler ekzojen antioksidan kaynaklara örnektir (Birben ve ark., 2012; Sharifi-Rad ve ark., 2020).

Antioksidanların etki mekanizmaları birbirinden farklılık gösterebilmektedir. Literatür incelendiğinde antioksidanların;

1. Reaktif oksijen türlerinin temel kaynağı olan oksijeni ortamdan uzaklaştırarak ya da ROS'ların ortamdaki konsantrasyonunu azaltarak,
2. Katalitik metal iyonlarını ortamdan uzaklaştırarak,
3. Süperoksit anyonu ya da hidrojen peroksit gibi önemli ROS'ları ortamdan uzaklaştırarak ya da metabolizma açısından daha zayıf moleküllere çevirerek,
4. Serbest radikal hasarına yol açan zincirleme reaksiyonların oluşmasını engelleyerek ya da serbest radikallerin indüklediği hasarı onararak etki gösterdiği belirtilmektedir (Özcan ve ark., 2015; Valko ve ark., 2007).

Şekil 1.4'te antioksidan savunma sisteminde rol oynayan enzim yapılı olan ve enzim yapılı olmayan antioksidanlar özetlenmiştir (Sharifi-Rad ve ark., 2020).



**Şekil 1.4.** Antioksidan savunma sistemi (Sharifi-Rad ve ark., 2020)

#### 1.7.2.1. Enzimatik Antioksidanlar

Enzimatik antioksidanlar, serbest radikaller üstünde dört farklı seviyede etki göstermektedir. Antioksidan sistemde rol oynayan antioksidanlar, serbest radikallere karşı önleyici, serbest radikalleri ortamdan süpürücü, serbest radikallerin yol açtığı hasara karşı onarım ve serbest radikallere karşı adaptasyon olmak üzere farklı seviyelerde görev yaparlar (Ighodaro ve ark., 2019; Lobo ve ark., 2010).

İlk savunma hattı, serbest radikal oluşumunu önleyici antioksidanlardır. Bu tepkimeleri bastırmak için bazı antioksidanlar, serbest radikal oluşmadan önce hidroperoksitleri ve hidrojen peroksitleri daha zararsız olan alkollere ve suya indirgerler ve bazı proteinler metal iyonlarını hapsederler. İkinci savunma hattı, aktif radikalleri ortamdan süpürerek zincir reaksiyonun başlamasını baskılamak ve/veya gelişen zincir reaksiyonunu kesmek için rol oynayan antioksidanlardır. Üçüncü

savunma hattı ise serbest radikallerin yol açtığı hasara karşı onarıcı görev alan antioksidanları kapsamaktadır. Dördüncü savunma hattı antioksidanların görevi ise, temel olarak serbest radikallerin oluşumunu veya tepkimeye girmesini önlemek için gerekli sinyalleri kullanan bir adaptasyon mekanizmasını içerir (Ighodaro ve ark., 2019; Lobo ve ark., 2010).

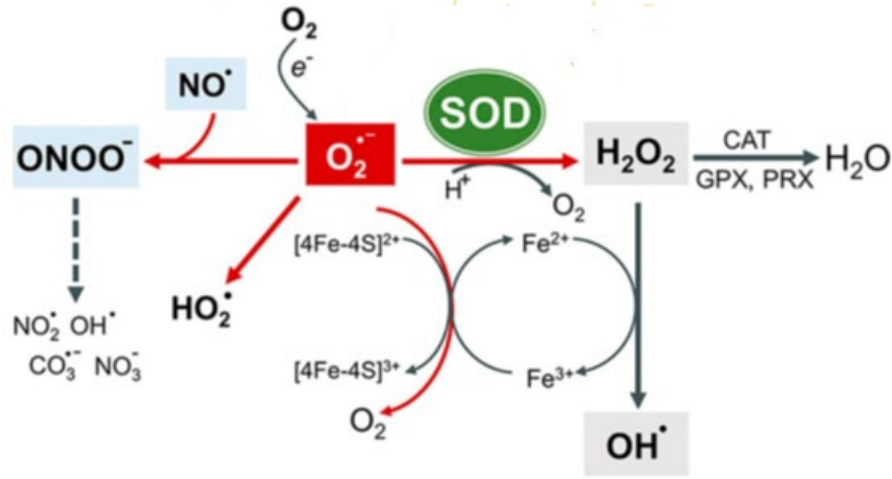
#### **1.7.2.1.1. Süperoksit Dismutaz**

Hücrelerde bulunan en güçlü antioksidan olan süperoksit dismutaz (SOD) bir detoksifikasyon enzimidir (Ighodaro ve ark., 2019; Wang ve ark., 2018). Süperoksit dismutaz enziminin bir metalloenzim olarak aktivite göstermesi için metal kofaktör gerektirmektedir. Gerekli olan metal iyonlarının türüne bağlı olarak SOD'nin çeşitli formları bulunmaktadır. Süperoksit dismutaz ile bağlanan metal iyonları demir (Fe), çinko (Zn), bakır (Cu) ve manganezdır (Mn). Bu bağlamda, SOD'ler üç formda sınıflandırılmaktadır. Bu izoenzimlerin yaygın olarak bulunduğu yapılar birbirinden farklılık göstermekte olup, görevleri itibariyle benzer rollere sahiptirler.

- (i) Fe-SOD; prokaryotlar ve bazı bitkilerin kloroplastlarında,
- (ii) Mn-SOD; prokaryotlar ve bazı ökaryotların mitokondrilerinde,
- (iii) Cu/Zn-SOD; ökaryotlarda yaygın olarak bulunmaktadır (Ighodaro ve ark., 2019).

Süperoksit dismutaz, ROS'lara karşı birinci basamak savunma sisteminin bir bileşeni olarak görev yapmaktadır. Süperoksit dismutazın en temel görevi hücrelerde ROS'ların temel kaynağı olan süperoksit anyon molekülünün ( $O_2^{\bullet-}$ ), hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) ve moleküler oksijene ( $O_2$ ) dönüşmesini katalize etmektir. Daha sonraki aşamada katalaz (CAT), glutatyon peroksidazları (GPX'ler) ve PRX'ler hidrojen peroksiti suya dönüştürürler. Hidrojen peroksit, redoks-aktif metallerle (örneğin demir) reaksiyona girerek Fenton/Haber-Weiss reaksiyonu aracılığıyla hidroksil

radikalini ( $\text{OH}^\bullet$ ) oluşturabilir. Süperoksit anion molekülü ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) ve nitrik oksit ( $\text{NO}^\bullet$ ) arasındaki reaksiyon  $\text{ONOO}^-$ 'yi üretir ve bu da  $\text{NO}_2^\bullet$ ,  $\text{OH}^\bullet$ ,  $\text{CO}_3^{\bullet-}$  gibi yüksek derecede oksitlenmiş ara ürünlerin yanı sıra nihayetinde kararlı  $\text{NO}_3^-$ 'e yol açar. Bu nedenle, yükseltilmiş  $\text{O}_2^{\bullet-}$  seviyeleri  $\text{NO}^\bullet$  biyoerişilebilirliğini azaltabilir ve  $\text{ONOO}^-$  toksisitesi oluşturabilir.  $\text{O}_2^{\bullet-}$  tek başına proteinlerin demir-kükürt merkezlerinde ferröz demir ( $\text{Fe}^{2+}$ ) oluşumuna neden olarak enzim inaktivasyonuna ve buna bağlı olarak enzimlerden  $\text{Fe}^{2+}$  kaybına yol açabilir. Bu durum da Fenton kimyasını besler.  $\text{O}_2^{\bullet-}$  protonasyonu, daha reaktif hidroperoksi radikalini ( $\text{HO}_2^\bullet$ ) oluşturabilir (Şekil 1.5) (Wang ve ark., 2018).



**Şekil 1.5.** Süperoksit dismutaz enzimi tarafından katalizlenen reaksiyon (Wang ve ark., 2018)

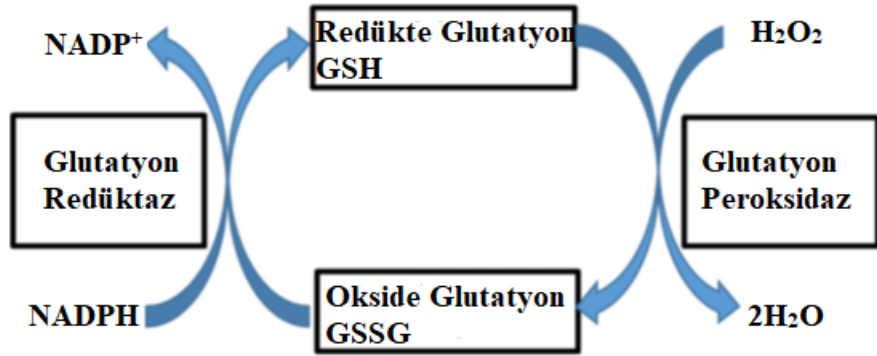
#### 1.7.2.1.2. Glutasyon Peroksidaz

Hücre içinde hidrojen peroksitleri ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) suya ve lipid peroksitleri de uygun alkol şekillerine dönüştüren önemli bir enzim olan glutasyon peroksidaz (GPx), genellikle mitokondrilerde ve bazen de sitozollerde faaliyet gösterir. Koenzim olarak selenyum minerali, GPx enziminin bir bileşenidir. Bu nedenle GPx selenosistein peroksidazı

olarak adlandırılır. Enzim, lipid peroksidasyon sürecini engelleyerek hücreleri oksidatif strese korur (Lubos ve ark., 2011).

İnsanda en az sekiz GPx enzimi olduğu belirtilmektedir. Glutasyon peroksidazlar arasında GPx1, en yaygın selenoperoksidaz olarak isimlendirilir ve nerede ise tüm hücrelerde bulunmaktadır. GPx2, bağırsakta daha çok bulunur. GPx3, diğer dokulara kıyasla böbrekte temel bir konumdadır, ancak aynı zamanda bir glikoprotein olarak ekstraselüler sıvılarda da bulunur. GPx4, genellikle fosfolipid hidroperoksit olarak kabul edilir ve substrat özgüllüğünde farklılık gösteren bir monomerdur. Bu, GPx4'ün fosfolipid hidroperoksitlerini parçalayan tek GPx enzimi olması nedeniyle ortaya çıkar. Enzimin ayrıca, oksidatif stresin apoptotik yanıtını düzenleyen mitokondriyal bir izoformu vardır ve sperm olgunlaşmasında peroksidaz bağımsız yapısal bir rolü vardır. Hem insan hem de kemirgen GPx5 ve kemirgen GPx6'nın diğer glutasyon peroksidazlarından bağımsız olarak aktiviteleri selenyumdan bağımsızdır (Dringen ve ark., 2005; Lubos ve ark., 2011).

Şekil 1.6.'da glutasyon peroksidaz enziminin glutasyon redoks tepkimesindeki rolü özetlenmiştir (Alamu ve ark., 2020). Glutasyon peroksidaz (GPx), substrat olarak indirgenmiş glutasyon (GSH) kullanarak enzimatik olarak  $H_2O_2$ 'yi  $H_2O$ 'ya dönüştürür ve bu daha sonra proseste oksitlenmiş formu olan glutasyon disülfüre (GSSG) dönüştürülür. Glutasyon disülfür, glutasyon redüktaz enzimini içeren ikinci bir reaksiyonda tekrar GSH'ye dönüştürülür. Glutasyon redüktaz, bu reaksiyon sonucunda hücre içi GSH/GSSG oranını düzenler (Dringen ve ark., 2005; Lubos ve ark., 2011).



**Şekil 1.6.** Glutasyon peroksidaz enziminin glutasyon redoks tepkimesindeki rolü (Alamu ve ark., 2020)

#### 1.7.2.1.3. Glutasyon-S-Transferaz

Glutasyon-S-Transferazlar (GST), endojen veya eksojen kaynaklı elektrofilik ve hidrofobik özellik gösteren bileşiklerin glutasyon ile konjugasyonunu sağlayarak bu moleküllerin daha az toksik metabolitlere dönüşümünü ve/veya daha kolay atılabilen formlara dönüşümünü katalizleyen bir detoksifikasyon enzimidir (Hayes ve ark., 2005; Mazari ve ark., 2023).

Glutasyon-S-Transferaz, genellikle 23-28 kDa ağırlığında olup, konumuna göre sitozolik GST, mitokondriyal GST ve mikrozomal GST olmak üzere üç farklı sınıfa ayrılmaktadır (Hayes ve ark., 2005; Mazari ve ark., 2023). En büyük aileyi oluşturan sitozolik GST, amino asit dizileri ve diğer yapısal benzerliklerine göre alfa (A), mu (M), omega (O), pi (P), sigma (S), teta (T) ve zeta (Z) olmak üzere yedi sınıfa ayrılır (Townsend ve ark., 2003). Glutasyon-S-Transferazlar, doymamış aldehitler ve hidroperoksitler gibi ikincil metabolitlerin etkisiz hale getirilmesinde görev almaktadır. Glutasyon-S-Transferaz, bir biyotransformasyon enzimi olup, zehirsizleştirme reaksiyonları, organizmayı karsinojenik bileşimler ile bu bileşimlerin

dokudaki ve kandaki toksik etkilerinden korumak gibi yararlı etkileri bulunur. Bu etkilerinin yanı sıra, GST'ler hücre sinyali, translasyon sonrası modifikasyonlar ve kemoterapötik ilaç direnci gibi diğer önemli fonksiyonlarda da görev almaktadır (Hayes ve ark., 2005; Mazari ve ark., 2023).

Glutasyon-S-Transferaz enzimi ksenobiyotik biyotransformasyon yolağında görev almaktadır. Ekzojen ya da endojen kaynaklı toksik moleküller, hücre içine girdikten sonra detoksifikasyon sisteminin farklı enzimleri tarafından hedeflenmektedir. Lipofilik moleküller, Faz I enzimleri, yani Sitokrom P450'ler tarafından metabolize edilir. Glutasyon-S-Transferazlar ise aktif ksenobiyotikleri GSH ile konjuge ederek daha zararsız bileşenlere dönüştürür ve son aşamada faz III enzimleri tarafından hücre dışına atılır (Hayes ve ark., 2005).

#### **1.7.2.2. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar**

Düşük moleküler ağırlıklı bazı kimyasal moleküller de doğrudan antioksidan görevi görebilmektedir. Enzimatik yapılı olmayan bu moleküllerden bazılarının sürekli olarak diyetle alınması gerekirken bazıları ökaryotik hücreler tarafından sentezlenebilmektedir. Buna göre enzimatik yapılı antioksidanlar da eğer ökaryotik hücre tarafından sentezlenebiliyorsa endojen; diyetle sürekli alınması gerekiyorsa ekzojen olarak adlandırılmaktadır (Sharifi-Rad ve ark., 2020).

Enzimatik yapılı olmayan endojen antioksidanlara glutasyon ve tioredoksin (TRx) örnek verilebilir. Bu moleküller, enzimatik yardım olmaksızın doğrudan güçlü ROS süpürücüleri (OH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, organik peroksitler ve ONOO dahil) olarak hareket etmektedir (Kocot ve ark., 2017; Liu ve ark., 2018).

Enzimatik yapılı olmayan ekzojen antioksidanların diyet yoluyla sürekli olarak alınması gerekmektedir. Bu sınıf antioksidanlara örnek olarak karotenoidler, C ve E vitaminleri verilebilir (Sharifi-Rad ve ark., 2020).

Askorbik asit (AA) olarak bilinen C vitamini, yüksek elektron verme gücü nedeni ile iki elektronlu oksidasyona uğrayarak dehidroaskorbik asit (DHA) oluşturabilir (Kocot ve ark., 2017). Oluşan dehidroaskorbik asit DHA, GSH- veya Trx'e bağlı mekanizmalar tarafından aktif AA formuna yeniden sentezlenebilmektedir. Askorbik asit, günlük diyetle portakal, mandalina, limon gibi narenciye meyveleri ve taze sebzelerin yanı sıra supleman ile de alınmaktadır (Amir Aslani ve ark., 2016). Askorbik asit, oksitlenmiş E vitamini, GSH ve karotenoidler ile birlikte hem doğrudan hem de iş birliği içinde ROS'u ortamdan süpürmekte görev almaktadır (Sharifi-Rad ve ark., 2020).

E Vitamini, diyetle çoğunlukla bitkisel yağlar, fındık ve balıkta bulunan, yağda çözünen bir vitamindir. Farklı formlara sahip olan E vitamininin en yüksek antioksidan kapasiteye sahip olan formu  $\alpha$ - tokoferoldür. Bu form aracılığı ile E vitamini süperoksit anyonu ve peroksil radikalleri dahil olmak üzere ROS'un süpürülmesinde görev almaktadır (Salehi ve ark., 2020). Benzer şekilde, A vitamini öncülü olan karotenoidler de ortamdan ROS'ların süpürülmesinde görev alır (Liu ve ark., 2018).

## **1.8. Glukoz Transportu**

Glukoz, sindirim sonrası ince bağırsakta bulunan enterosit hücreleri aracılığı ile emilmektedir. Monosakkaritler hidrofilik oldukları için, hücre zarlarını pasif olarak geçemezler. Dolayısı ile glukoz, galaktoz ve fruktozun emilimi için, enterositlerde

lüminal fırça kenarı membran ile bazolateral membran arasında taşıyıcı proteinler gereklidir (Koepsell, 2020).

Kompleks karbonhidratlar ince bağırsağa ulaştığında, barsak mukozasından geçebilmesi için glukoz veya galaktoz gibi monosakkaritlere hidrolize edilirler. Glukozun emilimi, lüminal fırça kenarı membranında, iki sodyum (Na<sup>+</sup>) molekülünü bir glukoz molekülü ile birleştiren sodyum glukoz transport protein-1 (SGLT1) adlı membran proteini aracılığı ile olur. Glukozun bazolateral membran yüzeyinden  ıkı ı kolaylaştırılmış bir glukoz taşıyıcısı olan glukoz transport protein-2 (GLUT2) aracılığı ile gerçekleşir (Roder ve ark., 2014). Glukozun emilimi GLUT2 gibi diğer taşıyıcılar tarafından ayarlanabilir (Ait-Omar ve ark., 2011; Boudry ve ark., 2007). GLUT2'nin sitoplazmik veziküllerden apikal membrana translokasyonu, enterositin glukoz alım kapasitesini önemli ölçüde arttırır. Bu nedenle, SGLT1 ve GLUT2 aktivitelerini etkileyen herhangi bir faktör, glukozun emilimini ve metabolizmasını da değiştirebilir (Grefner ve ark., 2015; Zheng ve ark., 2012).

Obezite ve diyabet gibi kronik hastalıklar çoklu faktörler tarafından indüklenen bir metabolik hastalık olmasına rağmen, temel olarak enerji alımı ve harcaması arasındaki dengesizlikten kaynaklanmaktadır. Enerji alımı, bağırsak epitelyal hücrelerin fırça kenarı membranı tarafından emilen besin miktarı ile sonrasında mezenterik kapiller ve lakteallere taşınan besin miktarına bağlıdır. Obezite ve diyabette enterosit hücrelerden glukoz emiliminin düzeyi ve hızı önemlidir. Enterosit hücrelerinde glukoz alımının farmakolojik olarak kontrol edilebildiği gösterilmiştir. Bu nedenle aşırı glukoz alımının seçici olarak inhibe edilmesi ya da glukoz emiliminin yavaşlatılması, hiperglisemiye bağlı gelişen kronik hastalıkların önlenmesi ve tedavisinde etkin bir stratejidir (Chen ve ark., 2016; Koepsell, 2020).

### 1.8.1. Glukoz Transportunun Saptanması

Diyabette, insüline yanıt olarak periferik dokulara glukoz alımının artırılmasında defektler bulunmakta ve bu da dolaşımda kronik olarak yüksek glukoz seviyelerine yol açmaktadır (Friedman, 2002). Mevcut anti-diyabetik ilaç araştırmalarının odak noktası, hücre glukoz alım oranını uyarmak için potansiyel insülinomimetik etkileri olan bileşiklerin geliştirilmesi ve taranmasıdır (Ball ve ark., 2002).

Literatür incelendiğinde glukoz transportunun saptanması için birkaç farklı yöntemin bulunduğu görülmektedir. Yöntemlerin avantaj ve dezavantajları bulunmakla birlikte kullanımları deney koşullarına göre değişkenlik göstermektedir. Bu yöntemler arasında radyoaktif işaretli glukoz yöntemi (3H-glukoz, 14C-glukoz), floresan işaretli glukoz analogu 2-deoksi-2-[(7-nitro-2,1,3- benzoksadiazol-4-yl) amino]-D-glukoz (2-NBDG) yöntemi, glukoz transport proteinleri olan SGLT1 ve GLUT2 düzeylerinin saptanması yer almaktadır (Scheepers ve ark., 2004; Yamada ve ark., 2000; Yamamoto ve ark., 2015; Zou ve ark., 2005).

Radyoaktif işaretli glukoz yöntemi, glukozun karbon (C) ya da hidrojen (H) atomunun işaretlenmesi ile hücre içerisine alınan glukoz miktarının radyoaktivite yöntemi ile saptanmasını içermektedir (Yamada ve ark., 2000). Glukoz transport proteinleri olan SGLT1 ve GLUT2 düzeyleri western blot ya da real time polimeraz zincir reaksiyonu aracılığı ile saptanmaktadır. Bu proteinlerin ekspresyonunun artışı glukozun hücre içine alımını göstermektedir (Scheepers ve ark., 2004). Floresan işaretli glukoz analogu yöntemi ise hücre içine geçen glukoz analogu olan bileşiğin floresan yöntemle saptanmasını kapsamaktadır (Zou ve ark., 2005).

Literatür incelendiğinde, glukoz analogu olarak farklı bileşiklerin kullanıldığı görülmektedir. 2-NBDG bunlardan sıklıkla kullanılanıdır. Radyoaktif olmayan bu

yöntem kolaylıkla tekrarlanabilir ve radyasyon tehlikesi oluşturmamaktadır. Ayrıca, 2-NBDG yöntemi, uygun deney stratejileri ile birlikte, in vitro çalışmalarda hücre içi glukoz birikimi ve metabolizma mekanizmaları hakkında bilgi sağlayabilmektedir (Zou ve ark., 2005).

### **1.9.Yara İyileşmesi**

Yara, dokunun anatomik ve fizyolojik olarak bütünlüğünün bozulmasıdır. Yaralanmayı takiben bağışıklık hücreleri, keratinositler, fibroblastlar ve endotel hücreleri dahil olmak üzere farklı hücre tiplerinin düzenlenmesi gerektiği için dokuda fonksiyon korunması ve kaybedilen fonksiyonların geri kazanılmasına yönelik mekanizmalar aktive olmaktadır. Deride yaralanma ile; inflamatuvar hücre infiltrasyonu, hücre proliferasyonu ile yeni doku oluşumu, matriks ve dokusunun yeniden şekillenmesini içeren sürekli bir olay dizisi başlar (Theoret 2005).

Yara iyileşmesi, kısaca hücre kültürü tabakasında bir "yara" oluşturmayı, yarayı kapatmak için hücre göçü sırasında başlangıçta ve düzenli aralıklarla görüntüleri yakalamayı ve hücrelerin göç hızını ölçmek için görüntüleri karşılaştırmayı içerir (Rodrigues ve ark., 2019).

### **1.10. Caco2 Hücre Hattı**

İnce bağırsaklar, birbirinden farklı görevleri olan özelleşmiş ve farklılaşmış enterosit, goblet, paneth ve endokrin hücrelerden oluşmaktadır. Tüm barsak villuslarını kapsayan enterosit hücrelerinin asıl görevi ise besin maddelerini absorbe

etmektedir (Shirazi-Beechey, 1995). Bu hücreler, postprandiyal fazda besinlerle temas eden ilk hücre grubudur ve bağırsaktaki tüm hücre popülasyonunun yaklaşık %90'ını oluşturmaktadır (Shirazi-Beechey ve ark., 2011). Enterositler glukoz emiliminden sorumlu hücre grubudur. Enterosit hücrelerinin besin öğelerinin emiliminde görev almalarını sağlayan temel mekanizma bu hücrelerin polarize olmasıdır. Enterositlerin bu özellikleri kontrollü bir şekilde glukoz alımında aktif rol oynamalarını sağlar. Enterositlerin apikal tarafı, reseptör ve taşıma proteinleri aracılığı ile belirli diyet bileşenlerini tanıyabilmektedir (Vereecke ve ark., 2011). İnsan kolon karsinoma hücre hattı (Caco2), standart hücre kültürü ortamında inkübe edildiğinde polarize bir yapı göstererek olgun enterosit hücrelerine benzer fonksiyon göstermektedir. Bu özelliğinden dolayı ilaç ve besin ögesi emiliminde altın standart olarak kabul edilmektedir (Panse ve ark., 2022).

Son yıllarda, Caco2 hücre hattı üzerinde hücresel geçirgenlik çalışmaları yaygın bir şekilde yapılmaktadır. Diğer hücre modellerine kıyasla, Caco2 hücre hattı aracılığı ile maddenin geçirgenliği insanlarda oral absorpsiyon ile tam olarak ilişkili bulunmuştur. Benzer biyolojik aktiviteleri ve insan bağırsağına benzetilen mikrovilus yapısı nedeni ile Caco2 hücre modeli ilaç taşıma ve besin öğelerinin emilim mekanizmasını incelemek için kullanılmaktadır (Iftikhar ve ark., 2020; Keemink ve ark., 2018).

Polarize olmuş Caco2 hücre hattı, insan kolon kanser hücre hattı (HT29) gibi diğer hücre hattı modellerine kıyasla in vivo koşullara daha uygun olduğu bulunmakla birlikte, insan epitel dokusuna kıyasla daha düşük bir geçirgenliğe sahip olduğu belirtilmektedir. Ancak, Caco-2 hücre hattı, besin öğeleri ve ilaçların absorpsiyon ve metabolizma prosedürlerinin incelenmesinde kullanımı da kabul görmektedir (Kamiloglu ve ark., 2015).

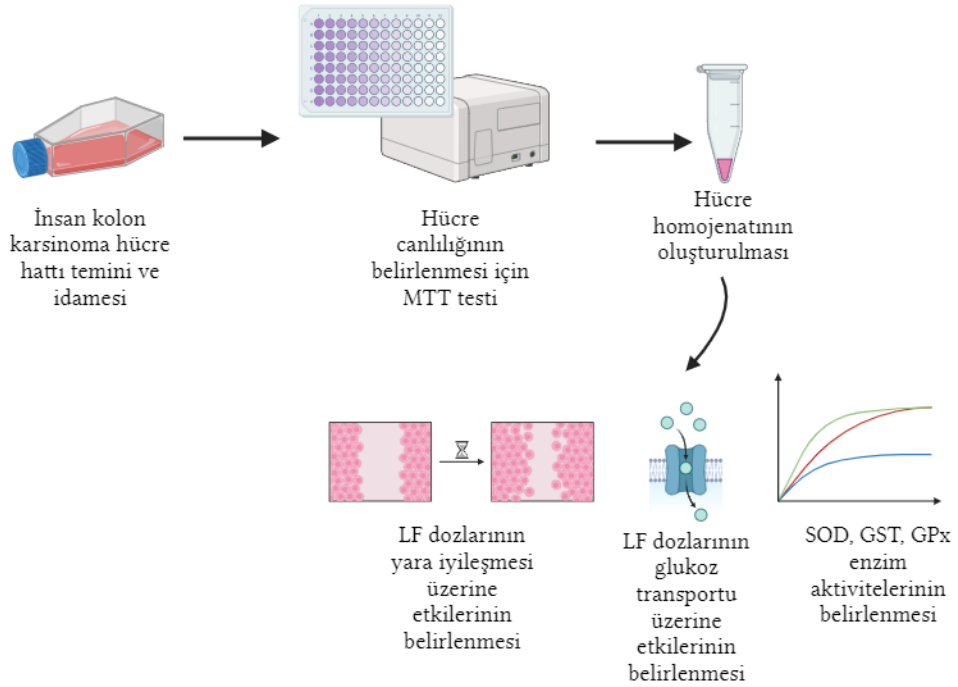
Sonuç olarak, laktoferrinin antioksidan enzim aktivitelei, yara iyileşmesi ve glukoz transportu üzerine yapılan çalışmalar kısıtlıdır. Bu bilgiler ışığında bu çalışmanın amacı laktoferrinin Caco2 hücre hattında SOD, GST ve GPx antioksidanların enzim aktivitelei, yara iyileşmesi ve glukoz transportu üzerine etkilerinin incelenmesidir.



## 2. GEREÇ VE YÖNTEM

### 2.1. Araştırma Yeri ve Zamanı

Bu çalışma farklı dozlarda laktoferrinin bazı antioksidan enzimlerin aktiviteleri, yara iyileşmesi ve glukoz transportu üzerine etkilerinin saptanması amacıyla Haziran 2022-Nisan 2023 tarihleri arasında yürütülmüştür. Gerekli izinlerin alınmasını takiben araştırmanın laboratuvar analizleri Atılım Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Kimya Mühendisliği Bölümü Biyokimya Araştırma Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir (Ek 1. Laboratuvar Çalışma İzni). Çalışma planı Şekil 2.1'de çalışma akışı ile özetlenmiştir.



Şekil 2.1. Çalışma akışı

## 2.2.Kullanılan Ekipman ve Kimyasallar

Çalışma kapsamında kullanılan ekipmanlar ve kullanım gerekçeleri Çizelge 2.1.'de listelenmiştir.

**Çizelge 2.1.** Çalışmada kullanılan ekipmanlar

| Ad- Model                                                       | Kullanım gerekçesi                                                       |
|-----------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|
| Laminer Flow Kabin (Thermo MSC- Advantage CII)                  | Hücre kültürü için steril ortamın sağlanması                             |
| CO <sub>2</sub> inkübatör (Thermo Fisher Water Jacketed 3010)   | Hücrelerin inkübasyonu                                                   |
| Ters-faz Mikroskop (Olympus Ckx31)                              | Hücrelerin sayılması ve çoğalmalarının incelenmesi                       |
| Santrifüj (ThermoMega Fuge 16R)                                 | Hücre pelletinin elde edilmesi                                           |
| Derin Dondurucu -80 °C (Sanyo)                                  | Hücrelerin dondurulması                                                  |
| Derin Dondurucu (-20 °C) ve soğutucu (+4 °C) (Beko, Arçelik)    | Kimyasalların ve solüsyonların saklanması                                |
| Sonikatör (Sonic Ruptor 400)                                    | Hücre homojenatlarının oluşturulması                                     |
| Spektrofotometre (PG Instruments, T80 UV/VIS Spectrophotometer) | 96 kuyucuklu plakaların absorbanslarının okunması                        |
| Çoklu mikrolaka okuyucu (Molecular Devices, Spectramax M2)      | 96 kuyucuklu plakaların absorbanslarının okunması                        |
| Otoklav (Heraus RB500)                                          | Kullanılan malzemelerin sterilizasyonu                                   |
| Thoma Lamı (Hemositometri)                                      | Hücrelerin sayılması                                                     |
| Sıcak Su Banyosu (Thermo Precision SWB 15)                      | Kullanılan kimyasalların uygulamalar için uygun sıcaklıklara getirilmesi |
| Pipetleme Cihazı (Eppendorf, Gilson)                            | Pipetleme uygulaması                                                     |
| Hassas terazi (RADWAG AS220C/2)                                 | Kullanılan kimyasalların tartılması                                      |
| Vorteks (Biosan Biovorteks V1)                                  | Karışımların homojen bir şekilde karışması                               |

Çizelge 2.2'de çalışma kapsamında kullanılan kimyasalların adı ve kullanım amaçları listelenmiştir.

**Çizelge 2.2.** Çalışmada kullanılan kimyasal ve biyolojik sarflar dışında kullanılan temel malzemeler

| Ad- Model                                                                                                   | Ürün Bilgileri                        | Kullanım gerekçesi                                                             |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|
| Dulbecco's modification of Eagle's Medium (DMEM)<br>High glucose w/stable<br>Glutamine w/Sodium<br>Pyruvate | Gibco 11965092                        | Hücre besiyeri hazırlanması                                                    |
| Fetal Bovine Serum (FBS)                                                                                    | Sigma F7524                           | Hücre besiyeri hazırlanması                                                    |
| Trypsin-EDTA (0.25%), fenol<br>kırmızısı                                                                    | Sigma T2601                           | Hücreleri kültür kabı<br>yüzeyinden kaldırılması                               |
| L-Glutamin                                                                                                  | Biological<br>Industry, 03-020-<br>1A | Hücre besiyeri hazırlanması                                                    |
| Dimetil sülfoksit (DMSO)                                                                                    | Merck 116743                          | Hücrelerin dondurulması ve<br>MTT analizinde                                   |
| Fosfat tamponlu salin<br>çözeltisi (PBS)                                                                    | Biochrom L1815                        | Hücreleri yıkamada                                                             |
| Penisilin/Streptomisin<br>(Pen/strep)                                                                       | Sigma P4333                           | Besiyeri hazırlarken<br>kontaminasyon riskinin<br>elimine edilmesinde          |
| Caco2 hücre hattı                                                                                           | Türkiye Şap<br>Enstitüsü              | Model hücre hattı                                                              |
| Laktoferrin (insan,<br>rekombinant)                                                                         | Sigma L-1294                          | Deney protokolüne uygun<br>etkinliğin araştırılması                            |
| Tripan mavisi                                                                                               | Merck 111732                          | Hücrelerin sayılması                                                           |
| 1,4-Dithiothreitol (DTT)                                                                                    | Merck 111474                          | Hücre homojenatı eldesi                                                        |
| MTT                                                                                                         | Sigma Aldrich<br>475989               | Laktoferrinin yarı maksimum<br>inhibisyon<br>konsantrasyonunun<br>belirlenmesi |
| Bakır sülfat penta hidrat<br>(CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O)                                         | Carlo Erba<br>UN3077                  | Protein miktarının tayini                                                      |
| Potasyum sodyum tartarat<br>(KNaC <sub>4</sub> H <sub>4</sub> O)                                            | Merck 1,06392                         | Protein miktarının tayini                                                      |
| Sodyum hidroksit (NaOH)                                                                                     | Merck 1,06462                         | Protein miktarının tayini                                                      |
| Sodyum karbonat (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )<br>(Merck 106392)                                        | Merck 106392                          | Protein miktarının tayini                                                      |
| Folin Ciocalteu reaktifi                                                                                    | Sigma Aldrich<br>F9252                | Protein miktarının tayini                                                      |
| Sığır serum albümini (BSA)                                                                                  | Sigma-A2153                           | Protein miktarının tayini                                                      |
| 2-deoksi-2-[(7-nitro-2,1,3-<br>benzoksadiazol-4-yl) amino]-<br>D-glukoz (2-NBDG) hücre<br>bazlı test kiti   | Cayman<br>Chemicals<br>600470)        | Glukoz transportunun tayini                                                    |

**Çizelge 2.2. Devamı** Çalışmada kullanılan kimyasal ve biyolojik sarflar dışında kullanılan temel malzemeler

| Ad- Model                          | Ürün Bilgileri       | Kullanım gerekçesi             |
|------------------------------------|----------------------|--------------------------------|
| 1-kloro-2,4 dinitro benzen (CDNB)  | Sigma Aldrich 237329 | GST enzim aktivitesinin tayini |
| Redükte glutatyon (GSH)            | Sigma Aldrich G6013  | GST enzim aktivitesinin tayini |
| Tert-butil hidroperoksit (t-BUOOH) | Across 10266090      | GST enzim aktivitesinin tayini |
| Glutatyon redüktaz enzimi (GR)     | Sigma Aldrich G3664  | GPx enzim aktivitesinin tayini |
| Tris hidroklorid (Tris-HCl)        | Merck 10812846001    | GPx enzim aktivitesinin tayini |
| Nitrotetrazolyum mavi klorid (NBT) | Thermo               | SOD enzim aktivitesinin tayini |
| Ksantin oksidaz (XOD)              | Calbiochem           | SOD enzim aktivitesinin tayini |
| Xanthine                           | Sigma-Aldrich        | SOD enzim aktivitesinin tayini |

## 2.3.Deneyler

### 2.3.1. Kolon Karsinoma Hücre Hattı Temini ve İdamesi

İnsan Kolon Karsinoma hücre hattı (Caco2) hücreleri, Türkiye Şap Enstitüsü'nden 30.06.2022 tarihinde temin edilmiştir (Tarım ve Orman Bakanlığı Türkiye Şap Enstitüsü, Hücre Kayıt No:98052301) (Ek 2. Hücre hattı satın alma faturası). Bu çalışmanın bütçesi Ankara Üniversitesi Uluslararası Bilimsel Etkinlikleri Destekleme (UBED) biriminin katkılarından ve araştırmacı bütçesinden karşılanmıştır.

### **2.3.2. Hücre Hattının Çözdürülmesi**

Hücre hattının çözdürülmesi için derin dondurucudan ( $-80^{\circ}\text{C}$ ) çıkartılan hücreler  $37^{\circ}\text{C}$ 'de bulunan su banyosunda hızlıca çözdürülmüştür. Ardından hücreler, içerisinde besiyeri bulunan santrifüj tüplerine alınmıştır. Hücreler 800 rpm'de 3 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant dökülmüş ve oluşan hücre çökeltisi besiyeri içerisinde resüspanse edilerek büyüme ortamına (T25/T75 hücre kültür kabı) alınmış,  $37^{\circ}\text{C}$  sıcaklık ve %5  $\text{CO}_2$  içeren ortamda inkübe edilmiştir.

### **2.3.3. Besiyeri Hazırlanması ve Hücre Hattı Ekimi**

Hücre hattı besiyerinin hazırlanmasında Dulbecco'nun modifiye eagle besiyeri (DMEM) (Sigma D6429) içerisine %10 Fetal Bovine Serum (FBS) (Sigma F7524), %1 L-glutamine (Biological Industry, 03-020-1A), 100  $\mu\text{g/mL}$  penisilin/streptomisin (pen/strep) (Sigma P4333) ilave edilmiştir.

Hücre kültürü uygulamaları aseptik koşullar altında yürütülmüştür. Caco2 hücre hattı, steril şartlar korunarak,  $37^{\circ}\text{C}$  ve %5  $\text{CO}_2$  sağlanarak inkübe edilmiştir. Hücrelerin çoğalması için  $10^5$  hücre/ $\text{cm}^2$  yoğunlukta ekimleri gerçekleştirilmiş ve her 2-3 günde bir besiyeri değiştirilmiştir. Hücre yoğunluğu %80'e ulaştığında ise hücreler pasajlanmıştır.

#### 2.3.4. Hücre Hattının Pasajlanması

Hücrelerin pasajlanması sırasında hücreler önce iki defa fosfat tamponlu salin çözeltisi (PBS, Biochrom L1815) ile yıkanmış ölü hücreler ortamdan uzaklaştırılmıştır. Hücreler 37 °C’de 3-5 dk tripsin/EDTA (Sigma T2601) ile muamele edildikten sonra ortama fetal bovine serum (FBS) (Sigma F7524) içeren besiyeri eklenerek tripsin deaktive edilmiştir. Eklenen bu ortam santrifüj tüpüne aktararak 24 °C, 1000 rpm’de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemini takiben elde edilen hücre çökeltisi hazırlanan besiyeri içine alınarak yeniden hücre süspansiyonu (resüspansiyon) elde edilmiştir. Hücrelerin sayımı için Thoma lamına bu süspansiyondan bir miktar alınmıştır. Pasajlanan hücreler ise pasaj numarası, pasajlanma tarihi ve hücre sayısı (yoğunluk olarak) belirlenmiş ve bu bilgilerle etiketlenerek muhafaza edilmiştir.

#### 2.3.5. Hücre Hattının Sayılması

Hücrelerin sayılması sırasında Thoma lamı kullanılmış ve bu işlemde kullanılan malzemeler kullanım öncesi ve sonrası distile su ve alkol ile temizlenmiştir. Santrifüj sonrası elde edilen hücre çökeltisi üzerine yaklaşık 2,5 mL besiyeri ilave edilerek hücreler resüspanse edilmiştir. Tripan mavisi (Merck 111732) ve hücre süspansiyonu hacimce eşit olarak 1:1 oranında karıştırılarak, steril santrifüj tüpüne aktarılmıştır. Elde edilen tripan mavisi-hücre süspansiyonu ise mikropipet yardımıyla Thoma lamında yer alan lam ve lamelin birleştiği ortadaki kapiller boşluklara aktarılmıştır. Thoma lamının yüzeyinde, merkezi karelerde bulunan hücreler mikroskop altında sayılmıştır. Sayılan hücreler aşağıda belirtilen formüle göre hesaplanarak hücre hattının 1 mL’inde bulunan hücre sayısı saptanmıştır (Isgor ve ark., 2011).

$$\text{Hücre sayısı} = \frac{(\text{Canlı hücre} - \text{ölü hücre})}{\text{Sayılan kare sayısı}} \times \text{seyreltme faktörü} \times 10^4$$

### **2.3.6. Hücre Hattının Laktoferrin ile İnkübasyonu ve Hücre Homojenatlarının Oluşturulması**

Bu çalışmada kullanılan laktoferrin; insan laktoferrininden rekombinant yöntemle elde edilmiş olup, piyasadan temin edilmiştir (Sigma L1294). Deneyden önce, laktoferrin (Sigma L1294), fosfat tamponlu salin çözeltisi (PBS, Biochrom L1815) içerisinde 1 mg/mL olacak şekilde çözündürülmüş ve 0.22 µm sterilizasyon filtresi ile filtre edilmiştir (Millex-GP-SLGP033RS). Böylece stok çözelti elde edilmiştir. Filtrasyon işlemini takiben stok çözeltinin protein konsantrasyonu Lowry metoduna göre tayin edilmiş ve herhangi bir protein kaybı görülmemiştir.

Seçilen antioksidan enzimlerin aktivitelerinin belirlenmesi için hücre homojenatı hazırlanmıştır. Derin dondurucudan (-80 °C) çıkarılan hücreler öncelikle sıcaklığı 37 °C olan su banyosunda hızlıca çözündürüldükten sonra hücre çökeltisi fosfat tamponlu salin çözeltisi (PBS, Biochrom L1815) ile iki defa yıkanmıştır. Hücreler, oda sıcaklığında 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiş ve falkon tüpüne aktarılmıştır. Santrifüj sonrası elde edilen hücreler, parçalayıcı sonikatör kullanarak, buz içerisinde, üç döngü ve toplam bir dakika olacak şekilde homojenize edilmiştir. Elde edilen homojenatların +4 °C de, 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra homojenatlara hacimce %1 oranında 1,4-Dithiothreitol (DTT, Merck 111474) çözeltisi eklenmiş ve analizlere kadar dondurucuda (-20 °C) muhafaza edilmiştir.

### **2.3.7. Hücre Hattının Dondurulması**

Dondurulmak istenen hücreler Tripsin/EDTA (Sigma T2601) ile yüzeyden kaldırılmış ve oluşan hücre süspansiyonu 4000 rpm'de 6 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant ortamdan uzaklaştırılmıştır. Elde edilen hücre çökeltisi

üzerine dimetil sülfoksit (DMSO) (Merck 116743) içeren besiyeri eklenerek resüspanse edilmiş ve steril, vidalı kapaklı mikrotüplere (dondurucu tüplerine) aktarılmıştır. Dondurulacak olan hücre tüpleri üzerine hücre hattı ismi, pasaj numarası, tarihi not edilmiştir. Hücrelerin kademeli olarak dondurulması amacı ile hücre dondurma tüpleri önce -20 °C’de 1 saat, sonra -80 °C derin dondurucuda tekrar kullanılıncaya kadar muhafaza edilmiştir. Çok uzun süreli depolamalar için dondurulan hücreler sıvı nitrojen tankına aktarılmakta ve burada saklanmaktadır.

### **2.3.8. Hücre Homojenatlarında Protein Konsantrasyonunun Belirlenmesi**

Hücre homojenatlarının içerdiği protein miktarını saptamak için Lowry metodu kullanılmıştır (Lowry ve ark., 1951). Bu yöntem kısaca alkali ortamda +2 değerlikli bakırın, protein yapısında bulunan peptit bağlarıyla birleşerek +1 değerlikli bakıra indirgenmesi ve bunun sonucunda biüret kompleksi oluşturması prensibine dayanır. Sonrasında eklenen, Folin-Ciocolteu’nun fenol reaktifi ilavesi sonucunda fosfo tungstik ve fosfo molibdik asitlerin indirgenmesiyle molibdenyum mavisi ve tungsten mavisi renkleri meydana gelir. Oluşan renkli kompleksin 700 nm’deki optik dansitesi, spektrofotometrede ölçülerek protein konsantrasyonları saptanmaktadır.

Hücre homojenatlarında protein konsantrasyonunun belirlenmesinde kullanılan kimyasallar Çizelge 2.3’te verilmiştir. Deneyin gerçekleştirilmesi için reaksiyon karışımı ve folin reaktifi karışımı hazırlanmıştır. Reaksiyon karışımı için %2’lik bakır sülfat penta hidrat ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) (Carlo Erba UN3077), %2’lik potasyum sodyum tartarat ( $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}$ ) (Merck 1,06392) ve 0.1 normalite (N) sodyum hidroksit (NaOH) (Merck 1,06462) içerisinde çözülmüş %2’lik sodyum karbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) (Merck 106392) çözeltisi sırasıyla 1:1:100 oranında karıştırılmıştır. Folin reaktifi karışımı için Folin Ciocalteu reaktifi (Sigma Aldrich F9252) ve distile su eşit oranda karıştırılmıştır. Protein standardı olarak sığır serum albümini (BSA, Sigma-A2153) kullanılmıştır.

Hazırlanan deney tüpleri ve standart tüplerin her birisine ilk olarak hücre homojenatları ve protein standardından 0,1 mL, daha sonra deney tüplerine hazırlanan reaksiyon karışımından 2,5 mL eklenmiştir. Tüpler vortekslenmiş ve 25 °C’de 10 dakika bekletildikten sonra tüplere hazırlanan folin reaktifi karışımından 0,25 mL eklenmiştir. Oda sıcaklığında (25 °C) 30 dakikalık inkübasyonun ardından, hücre homojenatları ve protein standartlarının absorbansları spektrofotometrede (PG Instruments, T80 UV/VIS Spectrophotometer, UK) 700 nm’de köre karşı okunmuştur. Protein düzeyleri, standart ile çizilen absorbans-konsantrasyon grafiği üzerinden belirlenmiştir. Hücre homojenatlarının protein konsantrasyonları 1 mg/mL olacak şekilde seyreltme yapılmış, bu standardize edilmiş protein konsantrasyonuna göre enzim aktiviteleri saptanmıştır.

**Çizelge 2.3.** Protein miktarı saptanmasında kullanılan kimyasallar

| <b>Kimyasal</b>                                                                                                                                                                                                                  | <b>Her tüpe eklenen miktar</b> |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|
| Reaksiyon karışımı (%2’lik Bakır Sülfat Penta Hidrat (CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O), %2’lik Potasyum Sodyum Tartarat (KNaC <sub>4</sub> H <sub>4</sub> O), %2’lik Sodyum Karbonat (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> ) %2) | 2,5 mL                         |
| Folin reaktifi karışımı (Folin Ciocalteu/Distile Su)                                                                                                                                                                             | 0,25 mL                        |
| Protein standartları (BSA)                                                                                                                                                                                                       | 0,1 mL                         |
| Caco2 hücre homojenatı                                                                                                                                                                                                           | 0,1 mL                         |

#### 2.4. Yarı Maksimum İnhibisyon Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Laktoferrinin Caco2 hücre hattında yarı maksimum inhibisyon konsantrasyonunun belirlenmesi için 3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il)-2,5-Difeniltetrazolyum Bromür (MTT) analizi gerçekleştirilmiştir. Bu analiz, etkisi araştırılan deneysel materyalin canlı hücrelerin mitokondrisi ve hücre plazma enzimleri tarafından suda çözünmeyen formazan kristallerine dönüşümünün spektrofotometrik olarak ölçümüne dayanmaktadır (Mosmann, 1983).

En az %80 yoğunluğa ulaşan Caco2 hücreleri 96 kuyulu plakaya her bir kuyuda  $1.5 \times 10^4$  hücre olacak şekilde ekilmiştir. Belirlenen farklı laktoferrin konsantrasyonları seri dilüsyon ile, yani 0-500 µg/mL aralığında 1:2 oranında seyreltilerek hazırlanmış 6 doz ile oluşturulmuştur. Her bir laktoferrin dozu triplicate olarak 96 kuyulu plakaya eklenmiştir. Hücreler 24, 48 ve 72 saat olmak üzere 3 farklı süre ile laktoferrin dozları ile inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda besiyeri ortamdan uzaklaştırılmış ve 400 µl fetal bovine serum içermeyen besiyeri ile 40 µl MTT solüsyonu (Sigma Aldrich 475989) eklenmiştir. Dört saatlik inkübasyonun ardından MTT solüsyonu ortamdan uzaklaştırılmış ve oluşan formazan kristalleri 200 µL DMSO (Merck 116743) ile çözülmüştür. Absorbans, 570 nm dalga boyunda spektrofotometre aracılığıyla ölçülmüştür. Canlılık yüzdesi, her numunenin absorbans değerlerinin negatif kontrolün absorbans değerlerine bölünmesi ile hesaplanmıştır.

## **2.5.Yara İyileşmesi Deneyi**

Yara iyileşmesi deneyi, hücre göçü (migrasyon) ve etkileşiminin analiz edildiği bir testtir (Rodrigues ve ark., 2019). İnsan kolon karsinoma hücreleri (Caco2) en az %80 yoğunluğa ulaştığında, 6 kuyulu plakaya kuyu başına  $5 \times 10^5$  hücre olacak şekilde ekilmiştir. Kuyuların alt kısımları işaretlenmiş ve steril bir mikropipet ucu ile plakaların her kuyusunda çizik yarası oluşturulmuştur. Daha sonra ölü hücrelerin ortamdan uzaklaştırılması için hücreler iki kez PBS (Biochrom L1815) ile yıkanmış ve kuyulara farklı dozlarda laktoferrin (0-250 µg/mL, 1:2 seyreltilmiş, 5 doz) içeren DMEM eklenmiştir. Hücreler, farklı saat aralıklarında (24, 48, 72 ve 96 saat) tam olarak aynı noktada (düz çizgi ile işaretlenmiş) fotoğraflanmıştır. Yara alanlarının saptanmasında açık kaynak kodlu bir program olan Fiji programından yararlanılmıştır (Schindelin ve ark., 2012). Bu program üzerinde, araştırmacılar tarafından geliştirilmiş, açık kaynak kodlu bir eklenti aracılığı ile yara alanları belirlenmiş ve hücre göçü oranı, her grupta 0. saatteki yara alanı ile farklı zaman noktalarındaki yara

alanları karşılaştırılarak hesaplanmıştır. İyileşme yüzdelерinin hesaplanmasında aşağıda belirtilen formül kullanılmıştır (Suarez-Arnedo ve ark., 2020).

$$\% \text{Yara İyileşmesi} = \frac{(\text{T0 yara alanı} - \text{Tzaman yara alanı})}{\text{T0 yara alanı}} \times 100$$

## 2.6. Glukoz Transportunun (Taşınmasının) Belirlenmesi

İnsan kolon karsinoma hücrelerinde (Caco2) farklı laktoferrin dozlarına bağlı olarak glukoz transportunu takip edebilmek için floresan bazlı 2-deoksi-2-[(7-nitro-2,1,3- benzoksadiazol-4-yl) amino]-D-glukoz (2-NBDG) hücre bazlı test kiti (Cayman Chemicals 600470) kullanılmıştır. Bu yöntem kısaca, floresan olarak işaretlenmiş deoksi glukoz analogu olan 2-NBDG'nin inkübasyonu sonucunda hücre içerisine alınan glukozun saptanması temeline dayanmaktadır (Zou ve ark., 2005).

Glukoz transportu deneyi üreticinin talimatları doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. Bu deney için 96 kuyucuklu plakalara her bir laktoferrin dozu için triplike olacak şekilde  $1,5 \times 10^5$  hücre ekilmiş ve gece boyu hücrelerin plaka yüzeyine tutunması (epitel hücre adhezyonu) beklenmiştir. Ertesi gün, hücreler 5 farklı laktoferrin dozu (0-250 µg/mL, 1:2 seyreltilmiş 5 doz) ile glukoz içermeyen besiyeri ortamında inkübe edilmiştir. Glukoz transportunun zamana bağlı değişimini gözlemlemek için üretici talimatına göre inkübasyon süresi optimizasyonu yapılmış ve hücreler floresan işaretli 2-NBDG ile 30 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası mikroparka oda sıcaklığında 400 x g hızda 5 dakika santrifüj edilmiş ve ardından süpernatant aspire edilmiştir. Bu işlemi takiben hücreler kit içeriğinde yer alan tampon çözeltisi ile 2 defa yıkanmış ve ardından 485/535 nm'de absorbansları kaydedilmiştir.

## **2.7. Antioksidan Enzim Aktivitelerinin Saptanması**

İnsan kolon karsinoma hücre hattında laktoferrinin yarı maksimum inhibisyon konsantrasyonlarının (IC50) belirlenmesinin ardından hücrelerin enzim aktivitelerinin çalışılacağı en uygun laktoferrin doz aralığı da elde edilen IC50 verileri yardımı ile belirlenmiştir. Laktoferrinin bazı antioksidan enzim aktivitelerine olan etkisini belirlemek amacıyla, öncelikli olarak inkübasyon süresinin tespiti gerçekleştirilmiştir. Bu aşamada, 24, 48 ve 72 saat süresince Caco2 hücre hattı belirli laktoferrin dozları ile inkübe edilmiş, hücre canlılığının (mitokondriyal metabolizmanın) yüksek olduğu inkübasyon süresi belirlenmiştir. Her bir laktoferrin dozunun etkisinin belirlenebilmesi amacıyla eş zamanlı olarak iki seri Caco2 hücre hattı ile çalışılmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda hücre homojenatları oluşturulmuştur. Her bir hücre homojenatında protein konsantrasyonu belirlenmiş ve enzim aktiviteleri belirlenmeden önce homojenatlar protein son konsantrasyonu 1 mg/mL olacak şekilde seyreltilmiştir.

### **2.7.1. Glutasyon-S-Transferaz (GST) Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi**

Glutasyon-S-Transferaz enzim aktivitesinin ölçümü daha önce geliştirilen yöntemin optimizasyonu ve mikropalakaya adaptasyonu ile oluşturulan prosedür takip edilerek gerçekleştirilmiştir (Isgor ve ark., 2011). Bu yöntem redükte glutasyon (GSH) ile 1-kloro-,4-dinitrobenzen (CDNB) arasındaki konjugasyon yanıtının 340 nm'de görülen absorbans artışıyla orantılı olarak ölçülmesi ile belirlenmektedir. Enzim kaynağı olarak 0-250 µg/mL aralığında 1:2 oranında seyreltme ile hazırlanmış laktoferrin ile muamele edilen Caco2 hücre homojenatları kullanılmıştır. Laktoferrin dozları 0 µg/mL (kontrol), 31,25 µg/mL, 62,5 µg/mL, 125 µg/mL ve 250 µg/mL olarak belirlenmiştir.

Deneyin gerçekleştirilmesinde, Çizelge 2.4.'te verilmiş olan reaksiyon karışımı oluşturulmuştur. Oluşturulan bu karışımdan, 96 kuyulu plakanın her bir kuyusuna 200 µL eklenmiştir. Enzim kaynağı olarak, farklı dozlarda (kontrol dahil) laktoferrinle muamele edilmiş Caco2 hücre homojenatından 20 µL eklenmiştir.

Enzim kinetiği, reaksiyon süresi toplamda 5 dakika olacak şekilde her 20 saniyede bir 340 nm'de çoklu mikrolaka okuyucuda (Molecular Devices, Spectramax M2) absorbans değerleri kaydedilerek elde edilmiştir. Her bir laktoferrin dozu, 2 farklı hücre homojenatında triplike olacak şekilde saptanmıştır. Enzim kinetiğinin hesaplanmasında, GraphPad Prism programı aracılığıyla eğimler hesaplanmış ve sonuçlar normalize edilerek kontrole (0 µg/mL) kıyasla Glutatyon-S-Transferaz enzim aktivitesi hesap edilmiştir.

**Çizelge 2.4.** GST aktivitesinin belirlenmesinde kullanılan reaktifler

| <b>Kimyasal</b>                                                                                | <b>Her kuyucuğa eklenen miktar</b> |
|------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|
| Sitozol (Caco2 hücre homojenatı)                                                               | 20 µL                              |
| Reaksiyon karışımı (1g/mL CDNB 450 µL, 200mM GSH 150 µL, 7mL Potasyum-fosfat Tampon Çözeltisi) | 200 µL                             |

### **2.7.2. Glutatyon Peroksidaz (GPX) Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi**

Glutatyon peroksidaz enzim aktivitesi, literatürde mevcut olan yöntemin optimizasyonu ve mikrolakaya adaptasyonu ile oluşturulan prosedür takip edilerek gerçekleştirilmiştir (Isgor ve ark., 2011). Bu yöntem kısaca, glutatyon peroksidaz enziminin aktivitesi sonucunda NADPH absorbansındaki azalmanın 340 nm'deki absorbansının ölçülmesi ilkesine dayanmaktadır. Enzim kaynağı olarak 0-250 µg/mL aralığında 1:2 oranında seyreltme ile hazırlanmış laktoferrin ile muamele edilen Caco2

hücre homojenatları kullanılmıştır. Laktoferrin dozları 0 (kontrol), 31,25 µg/mL, 62,5 µg/mL, 125 µg/mL ve 250 µg/mL olarak belirlenmiştir.

Deneyin gerçekleştirilmesinde, Çizelge 2.5'te gösterildiği gibi mikropalkanın her bir kuyusuna enzim kaynağı olarak farklı doz laktoferrin ile muamele edilmiş Caco2 hücre homojenatından 50 µL, reaksiyon karışımından 30 µL ve substrat karışımından 120 µL eklenmiştir. Beş dakikalık inkübasyon süresi sonrasında çoklu mikroparka okuyucuda absorbans değerleri ölçülmüştür. Enzim kinetiği, toplamda 5 dakikada, her 20 saniyede bir 340 nm'deki absorbans değişiminin takibiyle çalışılmıştır. Her bir laktoferrin dozu, 2 farklı hücre homojenatında triplicate olacak şekilde okutulmuştur. Enzim kinetiğinin hesaplanmasında, GraphPad Prism programı aracılığıyla eğimler hesaplanmış ve sonuçlar normalize edilerek kontrole kıyasla hesap edilmiştir.

**Çizelge 2.5.** GPx aktivitesinin belirlenmesinde kullanılan reaktifler

| <b>Kimyasal</b>                                                                                                 | <b>Her kuyucuğa eklenen miktar</b> |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|
| Sitozol (Caco2 hücre homojenatı)                                                                                | 50 µL                              |
| Reaksiyon karışımı (20 µL 20 GSH, 5 µL 20 U/mL GR, 5µL 10 mM NADPH, 75 µL 200 mM pH 10 sodyum karbonat tamponu) | 30 µL                              |
| Substrat çözeltisi (2 µL 30 mM t-BUOOH, 118 µL 50Mm Tris-HCl çözeltisi, pH 8)                                   | 120 µL                             |

### 2.7.3. Süperoksit Dismutaz (SOD) Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

Süperoksit dismutaz enzim aktivitesi, daha önce geliştirilen yöntemin optimizasyonu ve mikroparkaya adaptasyonu ile oluşturulan prosedür takip edilerek gerçekleştirilmiştir (Isgor ve ark., 2011). Reaktif oksijen türlerinin (ROS), oksijen (O<sub>2</sub>) ve peroksite dönüşümü süperoksit dismutaz (SOD) enzimi katalizliğinde

gerçekleşir. Bu mekanizmada SOD ile oluşan peroksitler daha sonra suya dönüştürülürler. Bu yöntemde SOD aktivitesinin ölçümü için ksantin/ksantin oksidaz (XOD) sistemi kullanılarak ROS üretilmiştir. Ksantin oksidaz katalizliğinde ksantin, ürik asit ve hidrojen peroksit parçalanır. Bu reaksiyon sonucu oluşan süperoksit iyonları da NBT'nin (Nitrotetrazolyum mavi klorid) NBT-diformazan'a dönüşümünü katalize eder. Oluşan NBT-diformazan ise 550-560 nm dalgaboyu aralığında maksimum absorpsiyon yapar. SOD enzim aktivitesi ise oluşan NBT-diformazanın 550 nm'de absorbansı ölçülerek elde edilmiştir.

Deneyin gerçekleştirilmesinde, Çizelge 2.6.'da gösterildiği gibi reaksiyon karışımı oluşturulmuştur. Oluşturulan bu reaksiyon karışımından 96 kuyulu plakanın her bir kuyusuna 228 µL eklenmiştir. Enzim kaynağı olarak, 0-250 µg/mL aralığında 1:2 oranında seyreltme ile hazırlanmış laktoferrin ile muamele edilmiş Caco2 hücre homojenatından 40 µL eklenmiştir. Karanlık ortamda 5 dakikalık inkübasyondan sonra 10 µL ksantin oksidaz (XOD) eklenerek ROS üretimi başlatılmıştır.

Enzim kinetiği, reaksiyon süresi toplamda 5 dakika olacak şekilde her 20 saniyede bir 550 nm'de çoklu mikroparka okuyucuda absorbans değerleri ölçülerek elde edilmiştir. Her bir laktoferrin dozu, 2 farklı hücre lizatında triplicate olacak şekilde ölçülmüştür. Enzim kinetiğinin hesaplanmasında, GraphPad Prism programı aracılığıyla eğimler hesaplanmış ve sonuçlar normalize edilerek kontrole kıyasla aktivite hesaplamaları yapılmıştır.

**Çizelge 2.6.** SOD aktivitesinin belirlenmesinde kullanılan reaktifler

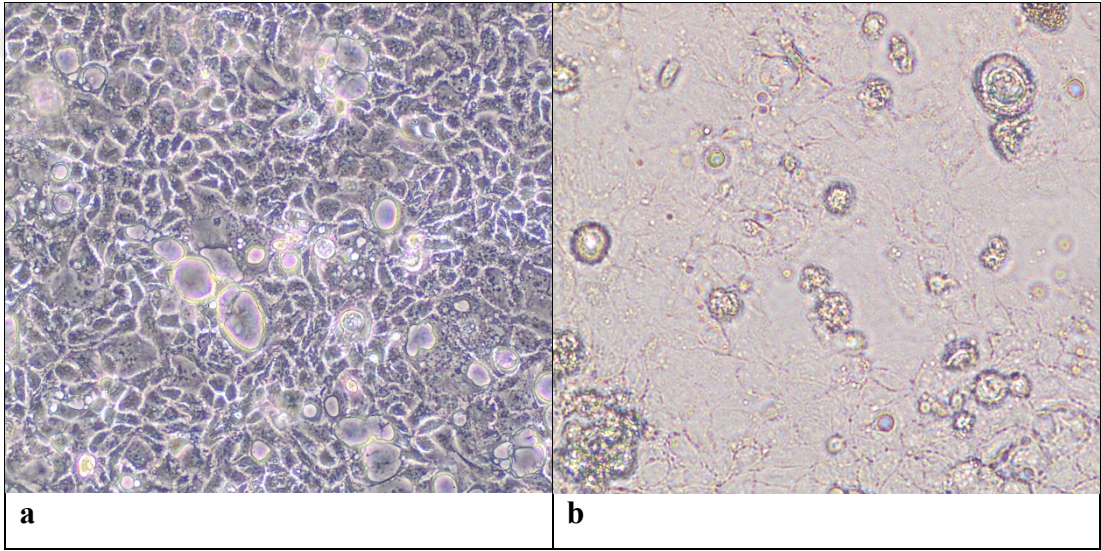
| <b>Kimyasal</b>                                                                                  | <b>Her kuyucuğa eklenen miktar</b> |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|
| Sitozol (Caco2 hücre homojenatı)                                                                 | 40 µL                              |
| Reaksiyon karışımı (150 µl 0.3 mM Ksantin, 3 µl 25 mM NBT, 75 µl 200 mM ph 10.1 sodyum karbonat) | 228 µL                             |
| XOD (60 U/mL)                                                                                    | 10 µL                              |

## 2.8.Verilerin İstatiksel Olarak Değerlendirilmesi

İstatiksel analizler ve verilerin görselleştirilmesi için Graphpad Prism programı kullanılmıştır. İstatistiksel analizler yapılmadan önce verilerin normal dağılıma uygunluğu görsel (histogram) ve çarpıklık-basıklık değerlerine göre kontrol edilmiştir. Buna göre verilerin normal dağılıma uygun olduğu belirlenmiş ve parametrik testler yapılmıştır. Laktoferrin dozlarına bağlı olarak enzim aktiviteleri ve glukoz transportunun saptanmasında doz ve enzim aktivitesi sürekli değişken olarak ele alınmış ve basit doğrusal regresyon analizi yapılarak trend için p değerleri saptanmıştır. Farklı laktoferrin dozlarının enzim aktiviteleri ve glukoz transportu arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlılığının test edilmesinde tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanılmıştır. Gruplar arasındaki ikili karşılaştırmalar yapılırken posthoc testlerinden Bonferroni düzeltmesi uygulanmıştır. İstatistiksel anlamlılık düzeyi olarak p değerinin 0.05 ve/veya altında olması kabul edilmiştir.

### 3. BULGULAR

Bu çalışmanın amacı farklı laktoferrin dozlarının Caco2 hücre hattında bazı antioksidan enzim aktiviteleri, yara iyileşmesi ve glukoz transportu üzerine etkilerini saptamaktır. Çalışma kapsamında temin edilen Caco2 hücrelerin kültür ortamında pasajlanmadan önceki halleri ve pasajlandıktan sonraki hallerinin mikroskop altındaki görüntüleri Şekil 3.1’de verilmiştir. Hücreler, kültür ortamında %80 yoğunluğa ulaştıklarında, pasajlanarak yeni hazırlanmış bir hücre kültürü kabına aktarılmıştır.

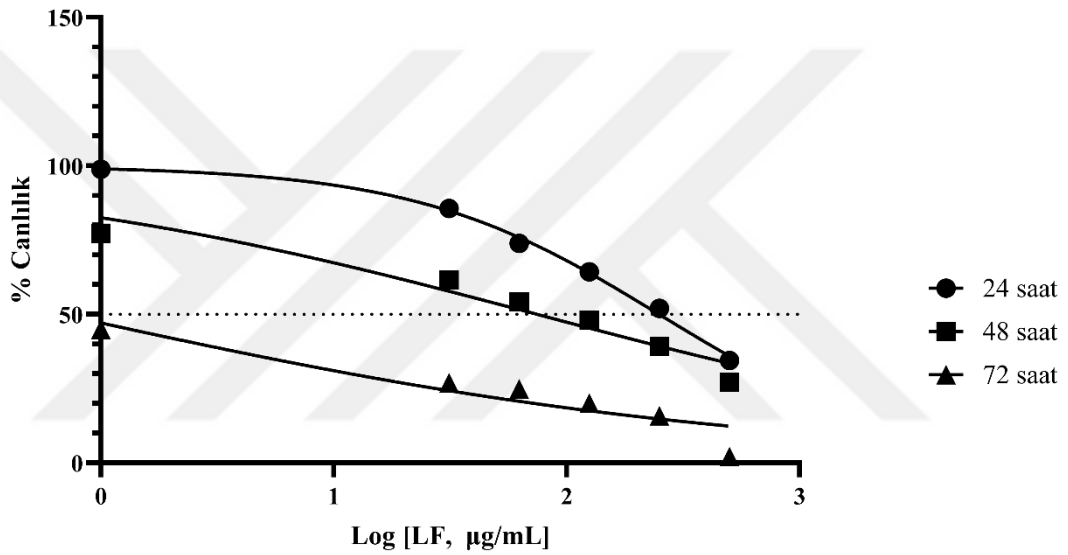


**Şekil 3.1.** Caco2 hücre hattı **a)** Konfluent hücre hattı, **b)** Pasajlanmış hücre hattı

#### 3.1. Hücre Canlılığının Belirlenmesi

Çalışma kapsamında laktoferrinin Caco2 hücrelerinde IC50 belirlenmesi için 3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il)-2,5-Difeniltetrazolyum Bromür (MTT) testi uygulanmıştır. Hücrelerin belirlenen laktoferrin dozları ile Caco2 hücre hattı 24, 48 ve 72 saat olmak üzere 3 farklı zaman diliminde inkübe edilmiştir. Bu analiz kapsamında laktoferrinin 6 farklı dozu (0-31,25-62,5-125-250 ve 500 µg/mL) ile Caco2 hücre hattının 24, 48 ve

72 saat inkübasyonu sonucunda elde edilen verilerden hücre canlılık grafiği oluşturulmuş ve Şekil 3.2’de verilmiştir. Laktoferrinin 24 saat inkübasyon ile Caco2 hücrelerinde yeterince metabolize edilemediği, 72 saatlik inkübasyon sonucunda hücre canlılıklarının beklenenden daha düşük olduğu saptanmıştır. Buna göre, Caco2 hücre hattı ile farklı laktoferrin dozlarının 48 saatlik inkübasyonunun, antioksidan enzim aktivitelerinin belirlenmesinin daha net sonuç vermesi açısından uygun olduğu sonucuna varılmıştır (Şekil 3.2.).



**Şekil 3.2.** Caco2 hücre hattının farklı LF dozları ile 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyonu sonucu hücre canlılığı

Veriler her bir doza maruz kalan 2 farklı hücre hattının triplike ölçümlerinin ortalamasını göstermektedir. Elde edilen absorbans değerleri, en yüksek ve en düşük absorbans değerine göre normalize edilmiştir. Yüzde hücre canlılığın hesaplanmasında normalize yanıtı karşılık gelen log(laktoferrin) dozu saptanmıştır. Tüm değerler ise kontrol (0 µg/mL) grubuna göre normalize edilmiştir.

Yapılan MTT analizi sonucunda laktoferrin dozları ile hücrelerin yüzde canlılıkları Çizelge 3.1’de verilmiştir. Buna göre, Caco2 hücre hattının 24 saat laktoferrin ile inkübasyonu sonucu IC50 değeri 249,7 µg/mL (%95 güven aralığı (GA) 227,8-275,5 µg/mL) olarak bulunmuştur ( $R^2=0.9952$ ). Kırk sekiz saat laktoferrin inkübasyonu sonucu IC50 değeri 74,91 µg/mL (%95 GA 56,50-98,04 µg/mL) olarak belirlenmiştir ( $R^2=0.9921$ ). Caco2 hücre hattının 72 saat boyunca laktoferrin ile inkübasyonu sonucu IC50 değeri 0,68 µg/mL (%95 GA 0,20-1,53 µg/mL) olarak

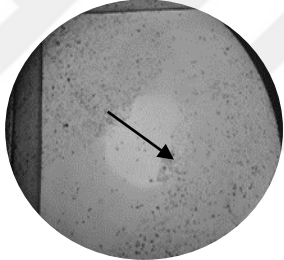
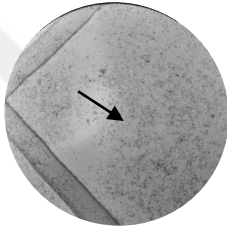
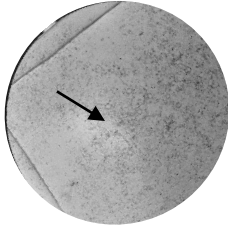
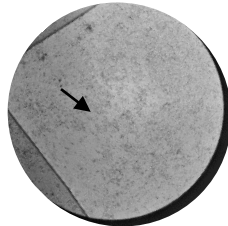
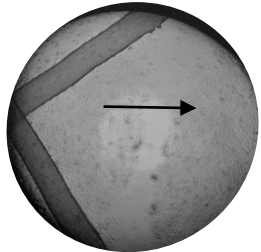
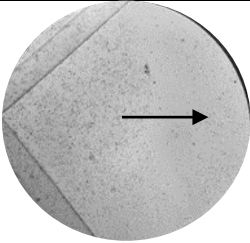
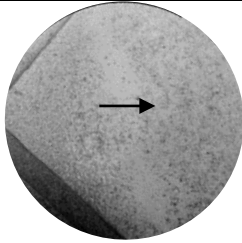
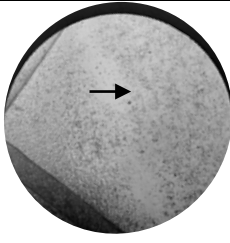
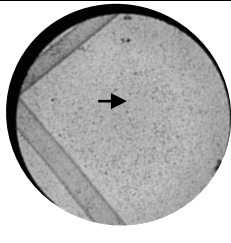
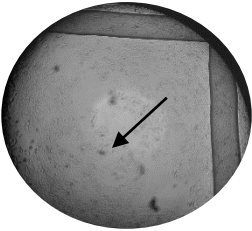
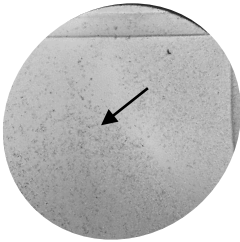
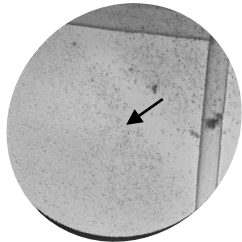
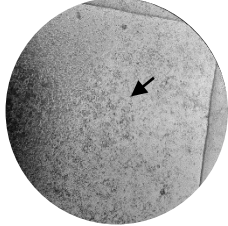
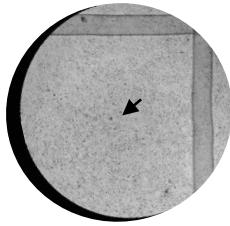
bulunmuştur ( $R^2=0.9911$ ). Buna göre laktoferrinin antioksidan enzim aktiviteleri ve glukoz alımı üzerine etkisinin belirlenmesinde 0 µg/mL (kontrol), 31,25 µg/mL, 62,5 µg/mL 125 µg/mL ve 250 µg/mL olmak üzere 5 farklı doz belirlenmiştir.

**Çizelge 3.1.** Caco2 hücre hattının farklı LF dozları ile 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyonu sonucu hücre canlılığı

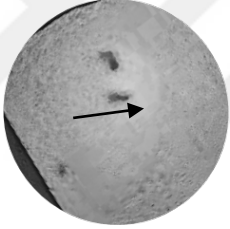
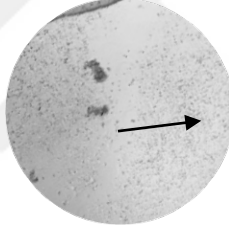
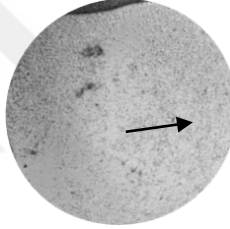
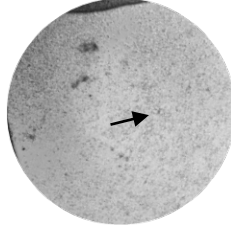
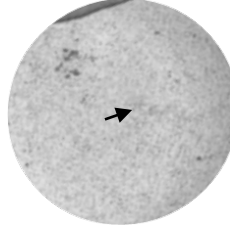
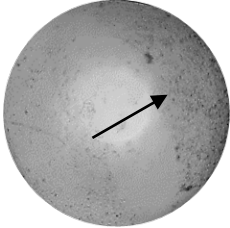
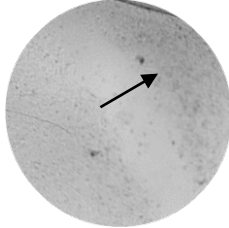
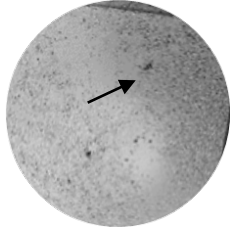
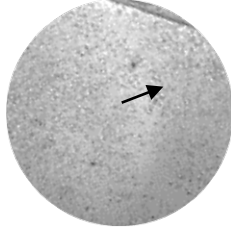
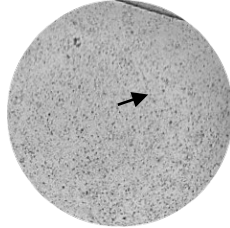
| Laktoferrin Dozu  | İnkübasyon Süresi |            |            |
|-------------------|-------------------|------------|------------|
|                   | 24 saat           | 48 saat    | 72 saat    |
|                   | % Canlılık        | % Canlılık | % Canlılık |
| 0 µg/mL (kontrol) | 99,90             | 77,22      | 44,97      |
| 31,25 µg/mL       | 85,69             | 61,58      | 26,96      |
| 62,5 µg/mL        | 73,94             | 54,21      | 24,87      |
| 125 µg/mL         | 64,31             | 48,05      | 20,10      |
| 250 µg/mL         | 52,03             | 39,19      | 15,83      |
| 500 µg/mL         | 34,53             | 27,16      | 2,09       |

### 3.2. Yara İyileşmesi Deneyi

Laktoferrinin yara iyileşmesi üzerine zamana bağlı etkisi Şekil 3.3 ve Şekil 3.4'te verilmiştir. Belirlenen 5 farklı doz laktoferrinin, 24-96 saat aralığında, Caco2 hücre hattında yara iyileşmesi üzerine etkileri belirlenmiştir. Başlangıçta oluşturulan yara alanının bütün dozlarda benzer olduğu ve yara alanları arasında istatistiksel olarak farklılık bulunmadığı saptanmıştır ( $p>0.05$ ). Elde edilen sonuçlara göre, laktoferrinin doza bağlı olarak yara iyileşmesini hızlandırdığı bulunmuştur ( $p<0.05$ ).

|                        | 0 saat                                                                             | 24 saat                                                                             | 48 saat                                                                              | 72 saat                                                                              | 96 saat                                                                              |
|------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| Kontrol<br>(0 µg/mL)   |   |   |   |   |   |
| Doz 1<br>(31,25 µg/mL) |   |   |   |   |   |
| Doz 2<br>(62,50 µg/mL) |  |  |  |  |  |

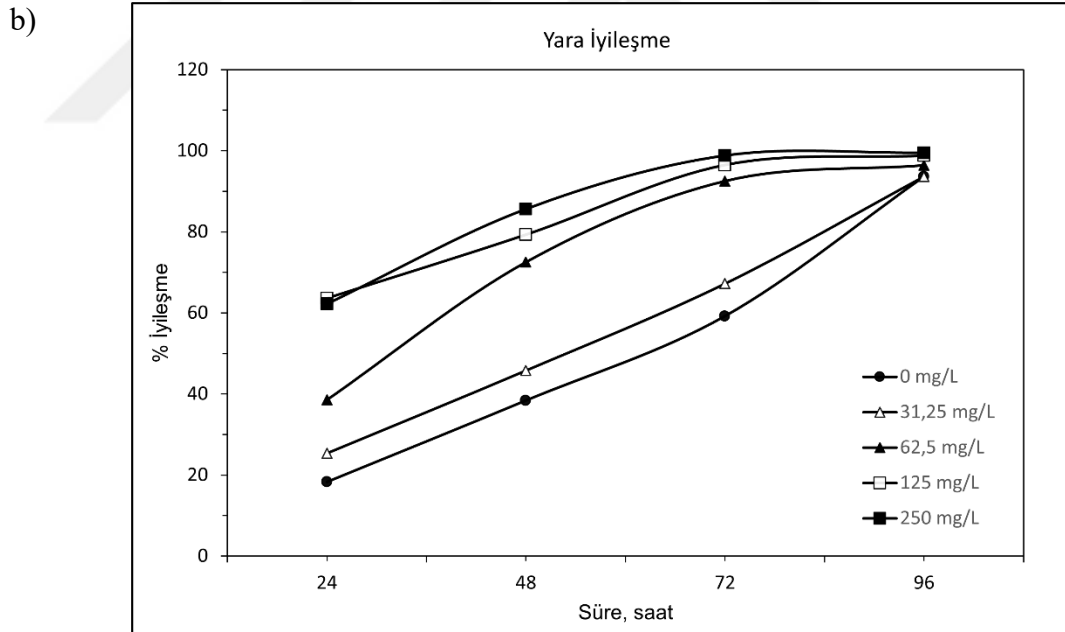
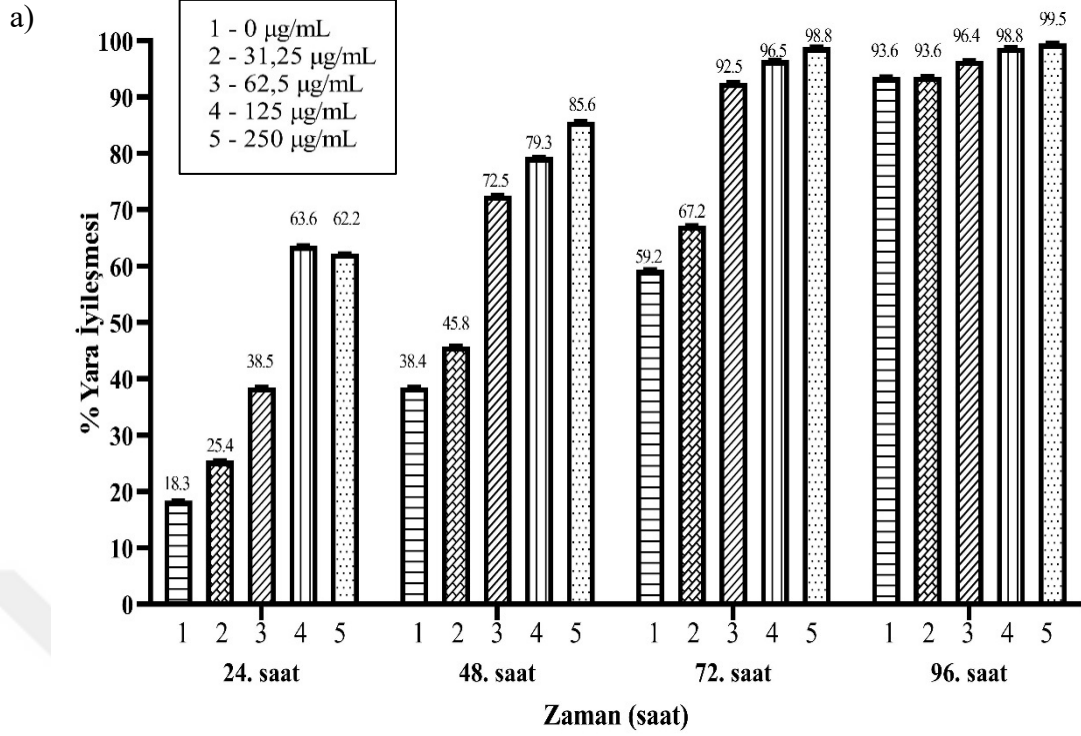
**Şekil 3.3.** Farklı LF dozlarının Caco2 hücre hattında yara iyileşmesi deneyi üzerine zamana bağlı etkileri

|                      | 0 saat                                                                            | 24 saat                                                                            | 48 saat                                                                             | 72 saat                                                                             | 96 saat                                                                             |
|----------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| Doz 3<br>(125 µg/mL) |  |  |  |  |  |
| Doz 4<br>(250 µg/mL) |  |  |  |  |  |

**Şekil 3.3. Devamı** Farklı LF dozlarının Caco2 hücre hattında yara iyileşmesi deneyi üzerine zamana bağlı etkileri

Şekil 3.4'te 5 farklı doz laktoferrinin 24 saat aralıklarla ölçülmüş olan yara iyileşme yüzdeleri verilmiştir. Buna göre, bütün dozlarda, zamana bağlı olarak yara iyileşmesinin arttığı ve 96. saat sonrasında yara iyileşmesinin %90'ların üzerine çıktığı belirlenmiştir. Kontrole kıyasla en hızlı yara iyileşmesinin 125 ve 250 µg/mL LF dozlarında olduğu saptanmıştır. Bu dozlarda 24 saat içerisinde yara iyileşmesinin %60'tan fazla olduğu, 62,5 µg/mL, 125 µg/mL ve 250 µg/mL dozlarının kontrole kıyasla 72. saatte %90'ların üstünde yara iyileşmesi sağladığı belirlenmiştir (Şekil 3.4).





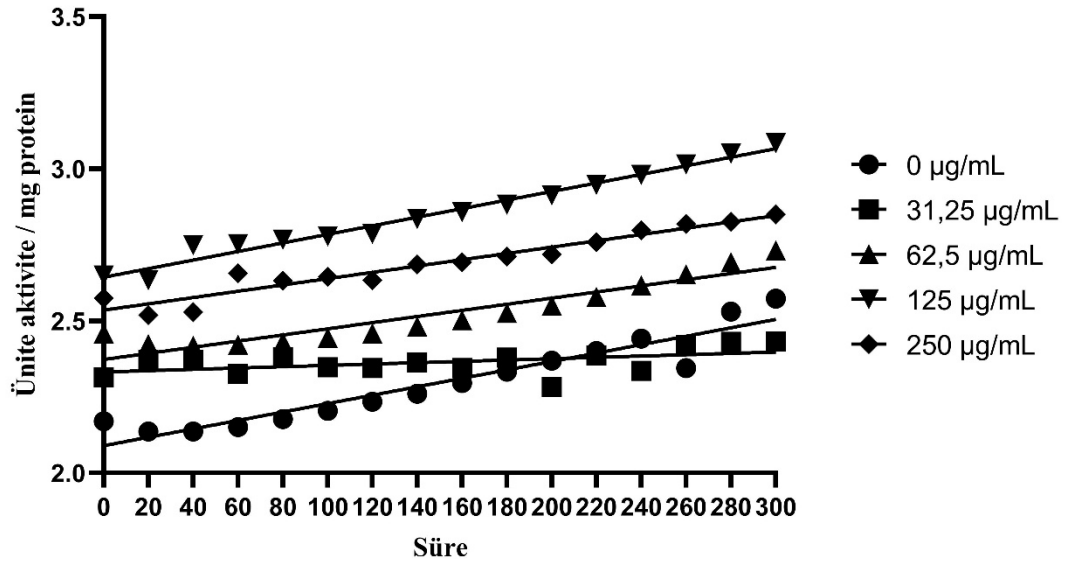
**Şekil 3.4. a)** Farklı LF dozlarının Caco2 hücre hattında zamana bağlı yara iyileşme yüzdeleri. **b)** Laktoferrinin 4 farklı dozunun Caco2 hücrelerinde yara iyileşmesine 24 saat aralıklarla ölçülen etkisinin zamana karşı yüzde iyileşme olarak grafiksel ifadesi. \*Dozlar mg/L ve zaman değişimi saat olarak gösterilmiştir.

### **3.3.Antioksidan Enzim Aktiviteleri**

Laktoferrinin antioksidan enzimler, GST, GPX ve SOD üzerine etkisi Caco2 hücrelerinin LF dozlarıyla inkübasyonun ardından elde edilen hücre homojenatlarında gerçekleştirilen ölçümlerle belirlenmiştir. Veriler 2 farklı hücre homojenatından elde edilen örneklerin triplike olarak çalışılması ile 6 bağımsız ölçümün ortalamasını göstermektedir. Zamana karşı absorbans grafiğinden elde edilen eğimlere bağlı basit doğrusal regresyon analizi yapılmıştır. Kontrol grubuna kıyasla enzimin aktivitesi hesaplanmıştır.

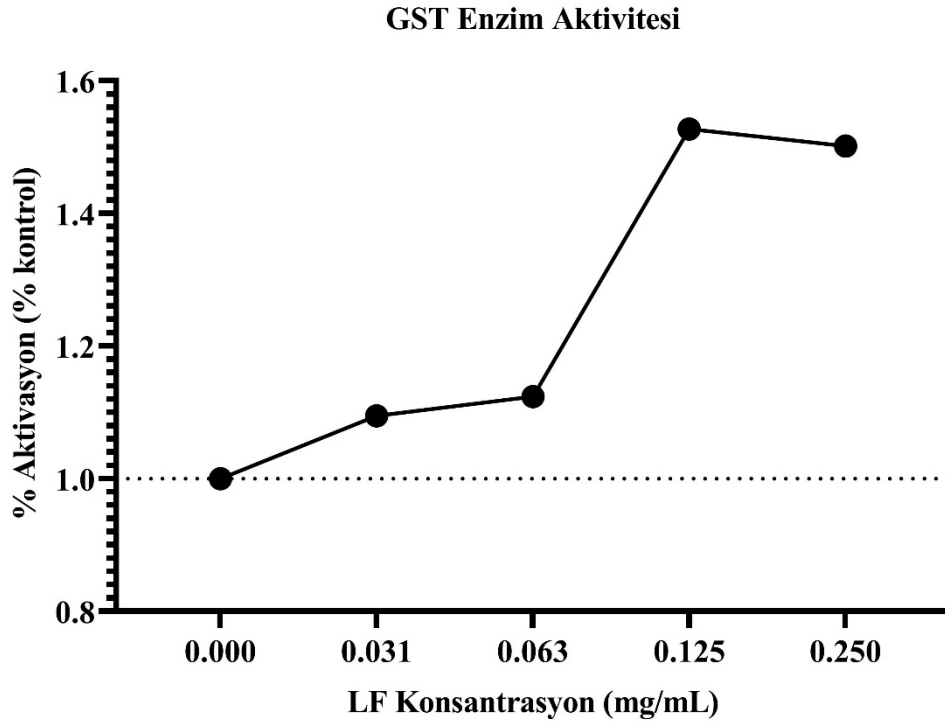
#### **3.3.1. Glutasyon-S-Transferaz (GST) Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi**

Laktoferrin dozlarına bağlı olarak GST enziminin zamana bağlı absorbans grafiği Şekil 3.5.'te verilmiştir. Doza bağlı olarak laktoferrinin Caco2 hücre hattında GST enzim aktivitesinde normalize edilmiş absorbans değerlerini artırdığı belirlenmiştir.



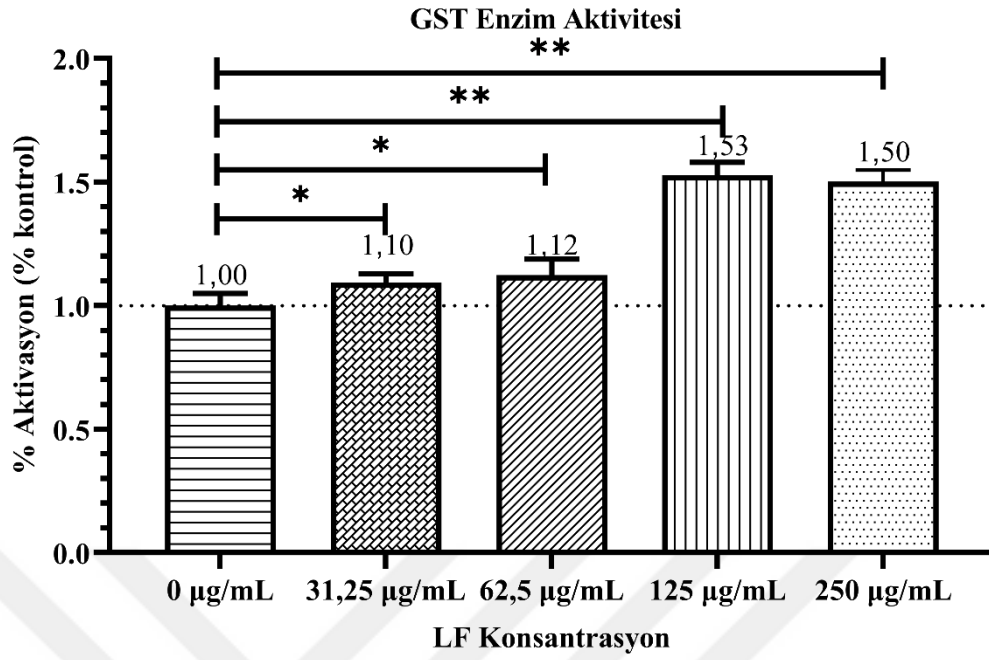
**Şekil 3.5.** Farklı laktoferrin dozlarına bağlı olarak Glutasyon-S-Transferaz enziminin zamana bağlı enzim aktivitesi

Farklı laktoferrin dozlarının GST enzim aktiviteleri üzerine etkileri Şekil 3.6 ve Şekil 3.7’de gösterilmiştir. Buna göre laktoferrinin doza bağlı olarak GST enzim aktivitesini artırdığı saptanmıştır Yapılan eğilim analizi sonucunda, laktoferrinin doza bağlı olarak Caco2 hücrelerinde GST enzim aktivitesini artırdığı bulunmuştur (eğilim için  $p < 0.001$ ,  $R^2 = 0,8129$ ) (Şekil 3.6).



**Şekil 3.6.** Caco2 hücre hattının farklı LF dozları ile inkübasyonu sonucu görülen GST enzim aktivitesi

Farklı laktoferrin dozlarının GST enzim aktivitesindeki artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Kontrol grubuna (0  $\mu\text{g/mL}$ ) kıyasla yapılan ikili karşılaştırmalarda laktoferrinin GST enzim aktivitesinde bütün dozlarda istatistiksel olarak anlamlı bir artış gösterdiği saptanmıştır ( $p<0,001$ ). Gruplar arasında GST aktivitesindeki en yüksek artış 125  $\mu\text{g/mL}$  laktoferrin uygulamasında saptanmış olup, GST enzim aktivitesinin yaklaşık %53 oranında arttığı görülmüştür ( $p<0.001$ ). Benzer şekilde, 250  $\mu\text{g/mL}$  laktoferrin uygulamasının da GST enzim aktivitesini %50 oranında artırdığı belirlenmiş olup ( $p<0.001$ ), 62,5  $\mu\text{g/mL}$  ve 31,25  $\mu\text{g/mL}$  LF uygulamasının da GST enzim aktivitesini sırası ile %10 ve %12 oranında artırdığı ve bu artışın da istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur ( $p<0.05$ ) (Şekil 3.7).

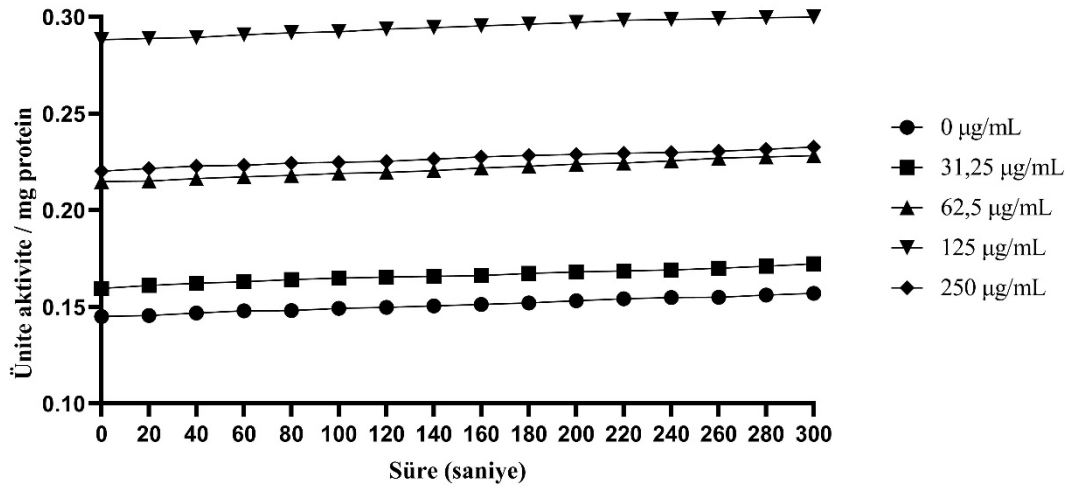


**Şekil 3.7.** Farklı LF dozlarının Caco2 hücre hattında GST enzim aktivitesi üzerine etkisi

\* $p<0.05$ , \*\*  $p<0.001$ , LF=laktoferrin, %aktivasyon=kontrole kıyasla yüzde aktivasyon,  $\mu\text{g/mL}$ =mikrogram/mililitre, Şekilde yer alan her bir sütun, 2 farklı hücre homojenatından elde edilen örneklerin triplicate olarak çalışılması ile 6 bağımsız ölçümün ortalama değerlerini temsil etmektedir. Gruplar arasındaki farklar tek yönlü varyans analizi (ANOVA) testi ile belirlenmiştir. İkili karşılaştırmalar için posthoc testlerinden Bonferroni testi yapılmıştır.

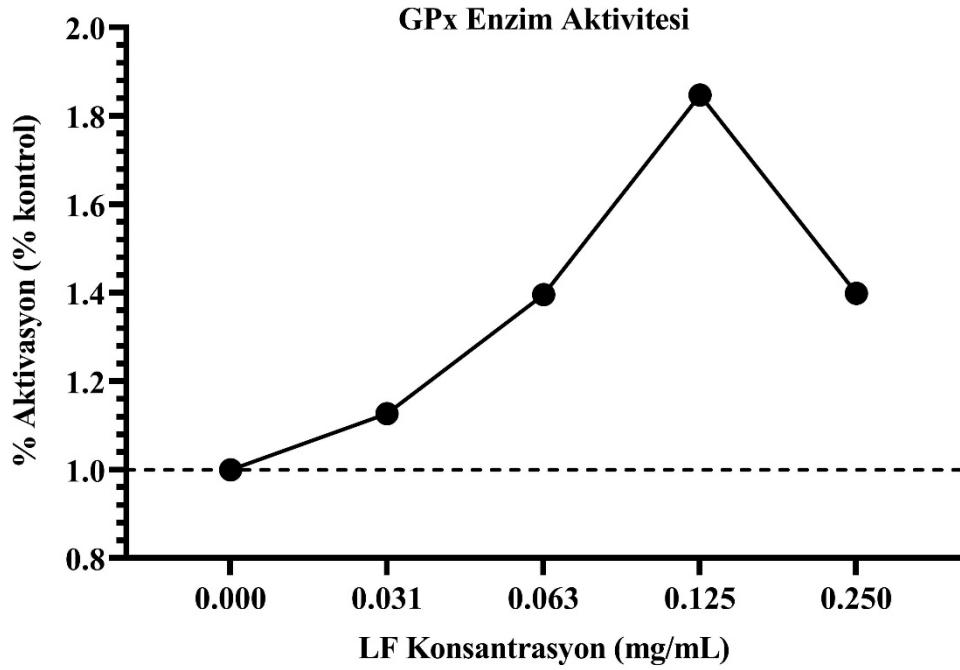
### 3.3.2. Glutasyon Peroksidaz (GPx) Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

Farklı laktoferrin dozlarına bağlı olarak glutasyon peroksidaz enziminin zamana bağlı absorbans grafiği Şekil 3.8.'de verilmiştir. Doza bağlı olarak laktoferrinin Caco2 hücre hattında GPx enzim aktivitesinde normalize edilmiş absorbans değerlerini artırdığı belirlenmiştir.



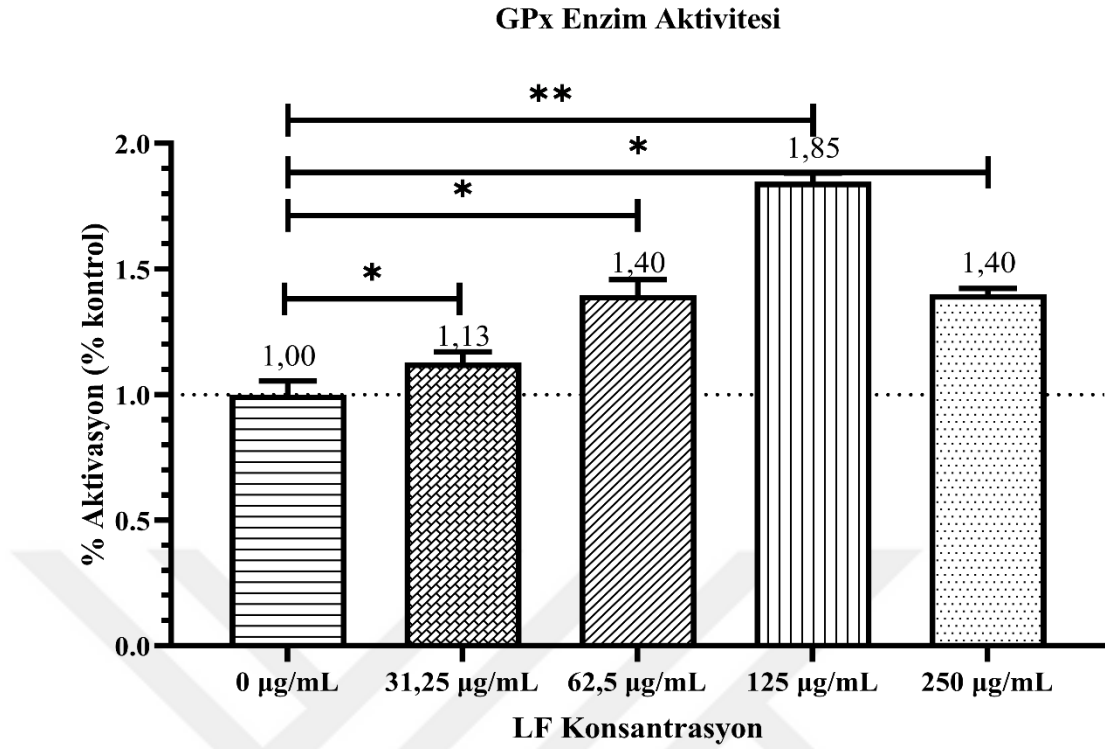
**Şekil 3.8.** Farklı laktoferrin dozlarına bağlı olarak glutasyon peroksidaz enziminin zamana bağlı enzim aktivitesi

Farklı laktoferrin dozlarının GPx enzim aktiviteleri üzerine etkileri Şekil 3.9 ve Şekil 3.10'da gösterilmiştir. Buna göre laktoferrinin doza bağlı olarak GPx enzim aktivitesini artırdığı saptanmıştır (Şekil 3.10). Yapılan analiz sonucunda, laktoferrinin doza bağlı olarak Caco2 hücrelerinde GST enzim aktivitesini artırdığı bulunmuştur (eğilim için  $p < 0.001$ ,  $R^2 = 0,5323$ ) (Şekil 3.9).



**Şekil 3.9.** Caco2 hücre hattının farklı LF dozları ile inkübasyonu sonucu görülen GPx enzim aktivitesi

Farklı laktoferrin dozlarının GPx enzim aktivitesindeki artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Kontrol grubuna (0 µg/mL) kıyasla yapılan ikili karşılaştırmalarda laktoferrinin GPx enzim aktivitesinde bütün dozlarda istatistiksel olarak anlamlı bir artış gösterdiği saptanmıştır ( $p < 0,001$ ). Gruplar arasında en yüksek glutatyon peroksidaz enzim aktivitesinin, 125 µg/mL laktoferrin uygulaması ile saptanmış olup, GPx aktivitesinin %85 oranında arttığı belirlenmiştir ( $p < 0.001$ ). Benzer şekilde, 62,5 µg/mL ve 250 µg/mL laktoferrin uygulamalarının da GPx enzim aktivitelerini %40 oranında artırdığı saptanmıştır ( $p < 0.05$ ). Son olarak, 31,25 µg/mL LF uygulamasının da GPx enzim aktivitesini %13 oranında artırdığı ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur ( $p < 0.05$ ) (Şekil 3.10).

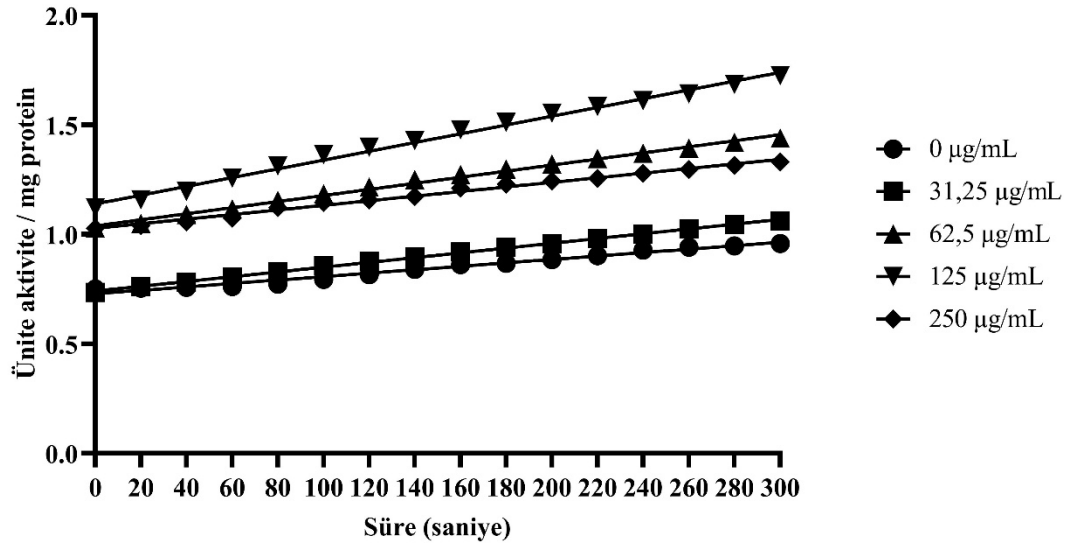


**Şekil 3.10.** Farklı LF dozlarının Caco2 hücre hattında GPx enzim aktivitesi üzerine etkisi

\*p<0.05, \*\* p<0.001, LF=laktoferrin, % aktivasyon=kontrole kıyasla yüzde aktivasyon, µg/mL= mikrogram/mililitre, Şekilde yer alan her bir sütun, 2 farklı hücre homojenatından elde edilen örneklerin triplicate olarak çalışılması ile 6 bağımsız ölçümün ortalama değerlerini temsil etmektedir. Gruplar arasındaki farklar tek yönlü varyans analizi (ANOVA) testi ile belirlenmiştir. İkili karşılaştırmalar için posthoc testlerinden Bonferroni testi yapılmıştır.

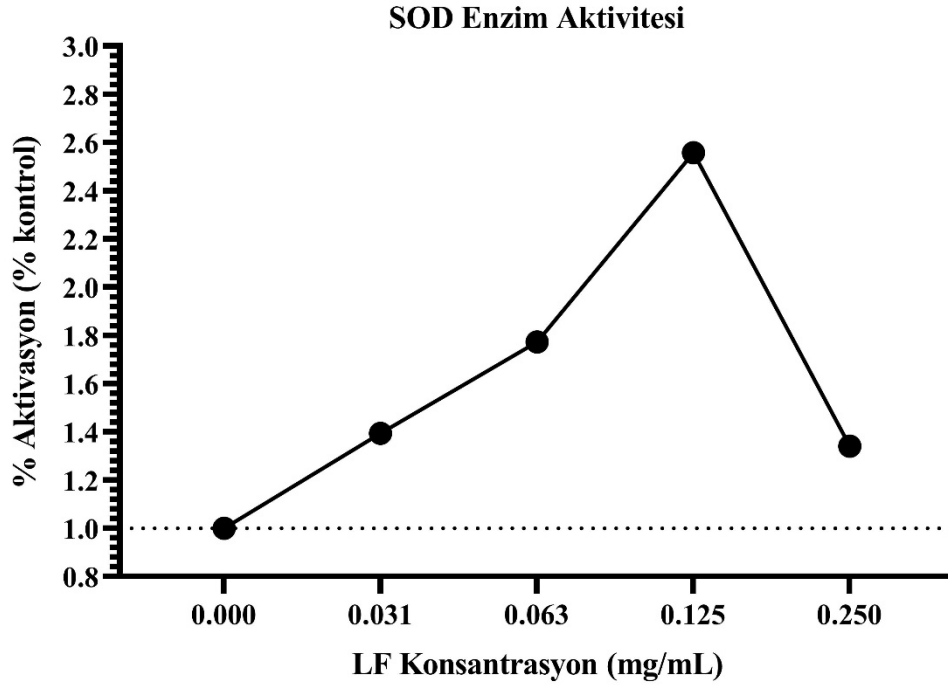
### 3.3.3. Süperoksit Dismutaz (SOD) Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

Farklı laktoferrin dozlarına bağlı olarak süperoksit dismutaz enziminin zamana bağlı absorbans grafiği Şekil 3.11’de verilmiştir. Doza bağlı olarak laktoferrinin Caco2 hücre hattında SOD enzim aktivitesinde normalize edilmiş absorbans değerlerini artırdığı belirlenmiştir (Şekil 3.11).



**Şekil 3.11.** Farklı laktoferrin dozlarına bağlı olarak süperoksit dismutaz enziminin zamana bağlı enzim aktivitesi

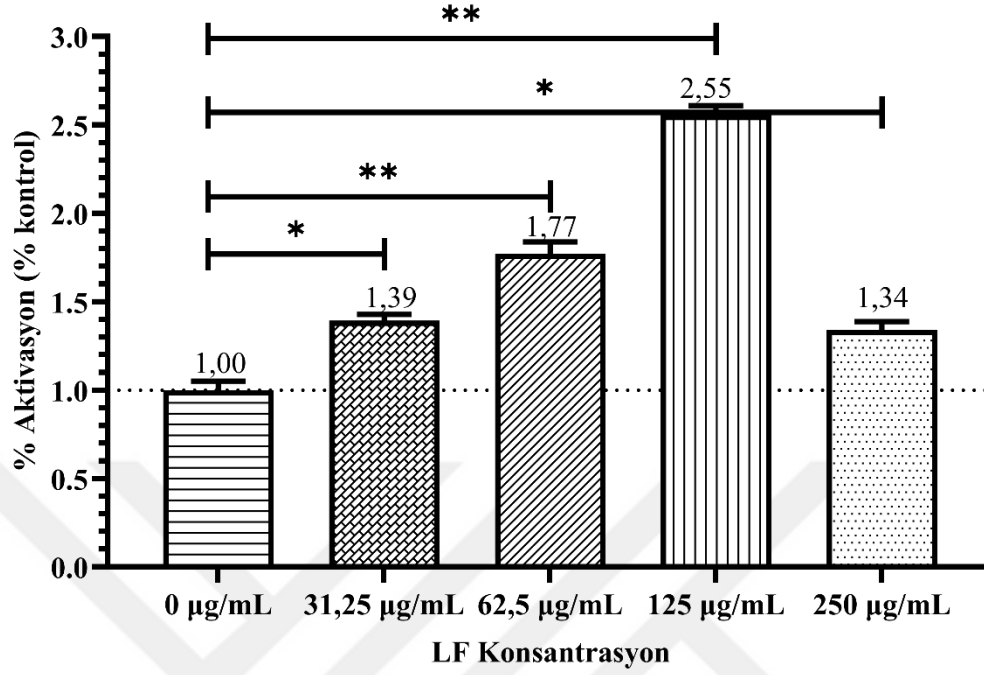
Farklı laktoferrin dozlarının SOD enzim aktiviteleri üzerine etkileri Şekil 3.12 ve Şekil 3.13'te gösterilmiştir. Laktoferrinin doza bağlı olarak SOD enzim aktivitesini artırdığı saptanmıştır. Yapılan trend analizi sonucunda, laktoferrinin doza bağlı olarak Caco2 hücrelerinde SOD enzim aktivitesini artırdığı bulunmuştur (eğilim için  $p < 0.001$ ,  $R^2 = 0,2390$ ) (Şekil 3.11).



**Şekil 3.12.** Caco2 hücre hattının farklı LF dozları ile inkübasyonu sonucu görülen SOD enzim aktivitesi

Farklı laktoferrin dozlarının SOD enzim aktivitesindeki artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Kontrol grubuna (0 µg/mL) kıyasla yapılan posthoc analizlerinde laktoferrinin SOD enzim aktivitesinde bütün dozlarda istatistiksel olarak anlamlı bir artış gösterdiği saptanmıştır. Süperoksit dismutaz enzim aktivitesinin, 125 µg/mL laktoferrin uygulaması ile en yüksek aktiviteye ulaştığı saptanmış olup, SOD aktivitesinin %155 oranında arttığı belirlenmiştir ( $p<0.001$ ). Ayrıca, 62,5 µg/mL laktoferrin uygulamasının da SOD aktivitesini %77 oranında artırdığı belirlenmiştir ( $p<0.001$ ). Benzer şekilde, 31,25 µg/mL ve 250 µg/mL laktoferrin uygulamalarının da SOD enzim aktivitelerini sırası ile %39 ve %34 oranında artırdığı bulunmuştur ( $p<0.05$ ) (Şekil 3.13).

### SOD Enzim Aktivitesi



**Şekil 3.13.** Farklı LF dozlarının Caco2 hücre hattında SOD enzim aktivitesi üzerine etkisi

\* $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.001$ , LF=laktoferrin, % aktivasyon=kontrole kıyasla yüzde aktivasyon, µg/mL= mikrogram/mililitre, Şekilde yer alan her bir sütun, 2 farklı hücre homojenatından elde edilen örneklerin triplike olarak çalışılması ile 6 bağımsız ölçümün ortalama değerlerini temsil etmektedir. Gruplar arasındaki farklar tek yönlü varyans analizi (ANOVA) testi ile belirlenmiştir. İkili karşılaştırmalar için posthoc testlerinden Bonferroni testi yapılmıştır.

Laktoferrinin 5 farklı dozda uygulamasının antioksidan enzim aktiviteleri üzerine etkileri ve %95 güven aralığı Çizelge 3.2’de verilmiştir. Laktoferrinin uygulanan bütün dozlarda antioksidan enzim aktivitelerini anlamlı bir şekilde artırdığı saptanırken; 125 µg/mL LF uygulamasının Caco2 hücrelerinde SOD, GPx ve GST enzimlerin aktivitelerini kontrol grubuna kıyasla (0 µg/mL) en yüksek oranda artırdığı belirlenmiştir (Çizelge 3.2).

**Çizelge 3.2.** Laktoferrinin farklı dozlarda uygulamasının antioksidan enzim aktiviteleri üzerine etkisi

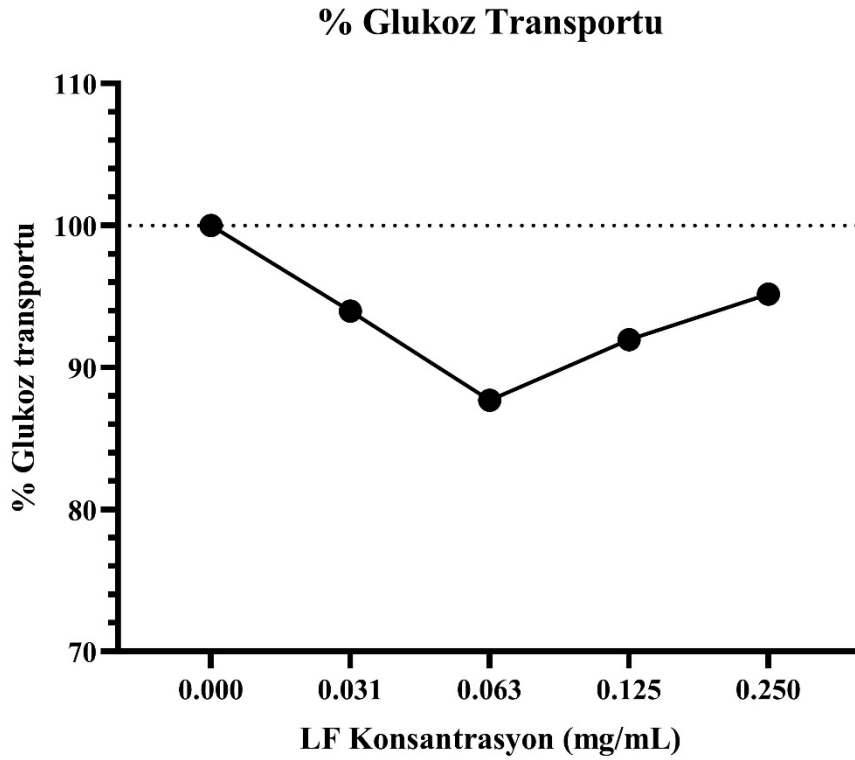
| <b>LF dozları</b> | <b>GST</b>                              | <b>GPx</b>                              | <b>SOD</b>                              |
|-------------------|-----------------------------------------|-----------------------------------------|-----------------------------------------|
|                   | <b>Rölatif aktivite<br/>(%95 GA)</b>    | <b>Rölatif aktivite<br/>(%95 GA)</b>    | <b>Rölatif aktivite<br/>(%95 GA)</b>    |
| 0 µg/mL (kontrol) | 1,00 ± 0,02 <sup>a</sup><br>(0,95-1,05) | 1,00 ± 0,05 <sup>a</sup><br>(0,94-1,06) | 1,00 ± 0,05 <sup>a</sup><br>(0,94-1,05) |
| 31,25 µg/mL       | 1,10 ± 0,01 <sup>b</sup><br>(1,06-1,13) | 1,13 ± 0,04 <sup>b</sup><br>(1,08-1,17) | 1,39 ± 0,04 <sup>b</sup><br>(1,36-1,43) |
| 62,5 µg/mL        | 1,12 ± 0,03 <sup>b</sup><br>(1,06-1,19) | 1,40 ± 0,06 <sup>c</sup><br>(1,33-1,46) | 1,77 ± 0,07 <sup>c</sup><br>(1,70-1,84) |
| 125 µg/mL         | 1,53 ± 0,02 <sup>c</sup><br>(1,47-1,58) | 1,85 ± 0,04 <sup>d</sup><br>(1,81-1,88) | 2,55 ± 0,05 <sup>d</sup><br>(2,50-2,61) |
| 250 µg/mL         | 1,50 ± 0,02 <sup>c</sup><br>(1,45-1,55) | 1,40 ± 0,02 <sup>c</sup><br>(1,37-1,43) | 1,34 ± 0,05 <sup>b</sup><br>(1,29-1,39) |

LF=Laktoferrin, GST=Glutasyon-S-Transferaz, GPx= glutasyon peroksidaz, SOD=Süperoksit dismutaz, µg/mL= mikrogram/mililitre, %95 GA= yüzde 95 güven aralığı.

Veriler 6 farklı bağımsız ölçümün ortalama±standart sapması (yüzde 95 güven aralığı) göstermektedir. Gruplar arasındaki farklar tek yönlü varyans analizi (ANOVA) testi ile belirlenmiştir. İkili karşılaştırmalar için posthoc testlerinden Bonferroni testi yapılmıştır. Aynı sütunda farklı harfler ile gösterilen değerler arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlıdır.

### 3.4. Glukoz Transportunun Belirlenmesi

Glukoz transportunu takip etmek için florometrik 2-NBDG yöntemi kullanılmıştır. Laktoferrin uygulanan doza göre hücre içine glukoz analogu olan 2-NBDG'nin geçişini gösteren % glukoz transportu Şekil 3.14'te gösterilmiştir. Buna göre laktoferrinin kontrol grubuna kıyasla hücre içine glukoz geçişini doza bağlı olarak azalttığı saptanmıştır (eğilim için  $p < 0.001$ ,  $R^2 = 0,1664$ ).

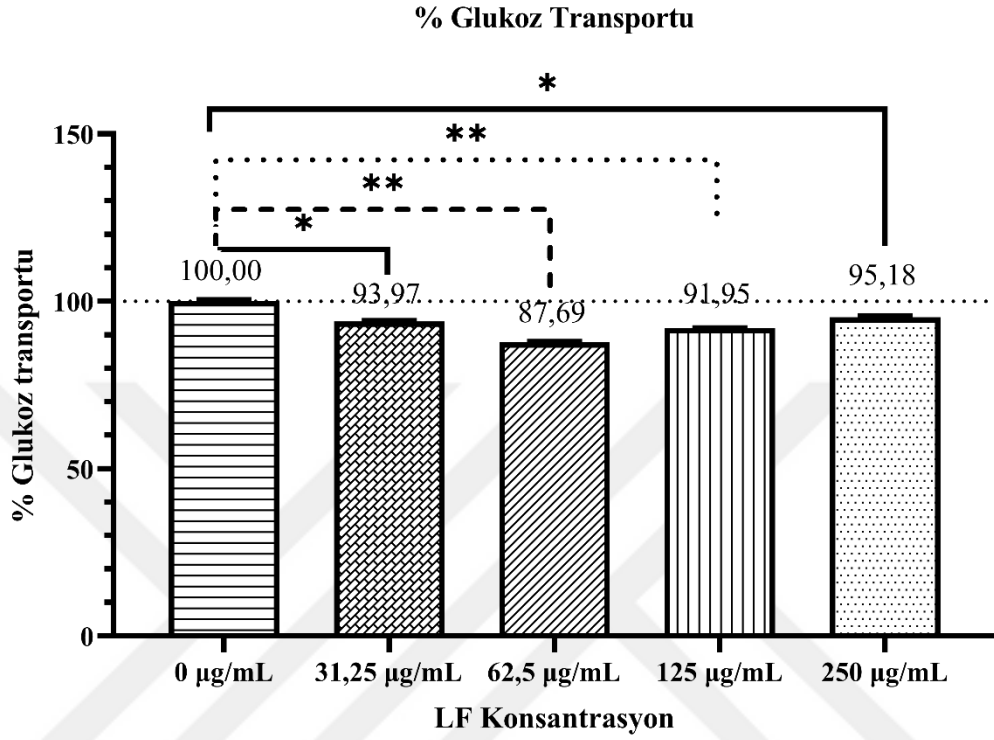


**Şekil 3.14.** LF konsantrasyonuna göre % glukoz transportu

Veriler 2 farklı hücre homojenatının triplicate ölçümlerinin ortalamasını göstermektedir. Değerler kontrol (0 µg/mL) grubuna göre normalize edilmiştir.

Laktoferrin dozlarına bağlı olarak hücre içine % glukoz transport düzeyleri Şekil 3.15'te gösterilmiştir. Laktoferrinin uygulanan her dozda hücre içine glukoz geçişini azalttığı belirlenmiştir. Özellikle, 62,5 µg/mL ve 125 µg/mL laktoferrin uygulamasının glukoz transportunu sırası ile yaklaşık %14 ve %8 oranlarında inhibe ettiği belirlenmiştir ( $p < 0.001$ ). Benzer şekilde, 250 µg/mL ve 31,25 µg/mL laktoferrin

uygulamalarının da glukoz transportunu sırası ile %5 ve %6 oranlarında inhibe ettiği saptanmıştır ( $p<0.05$ ).



**Şekil 3.15.** LF konsantrasyonuna göre % glukoz transportu

#### 4. TARTIŞMA

Yapılan bu çalışmada farklı dozlarda laktoferrin uygulamasının Caco2 hücre hattında hücre canlılığı, bazı antioksidan enzimlerin aktiviteleri, glukoz transportu ve yara iyileşmesi üzerine etkileri araştırılmıştır.

Biyoaktif peptit olan laktoferrin, sağlık üzerine gösterdiği olumlu etkiler nedeni ile ön plana çıkmaktadır. Laktoferrin ve laktoferrinin sindirimi ile meydana gelen laktoferrisin gibi peptitlerin antiinflamatuvar, antimikrobiyal, antioksidan, antikanser etkileri ön plana çıkmaktadır (Martini ve ark., 2023; Wada ve ark., 2020).

Günümüzde, tip 2 diyabet, obezite, kalp hastalıkları gibi kronik hastalıkların prevalansı dramatik bir şekilde artış göstermektedir (Bhupathiraju ve ark., 2016). Bu durum toplumlarda yaşam kalitesini etkilemekte, mortalite ve morbidite üzerinde etkili olmaktadır. Bu nedenle, kronik hastalıkların önlenmesi, tedavisi ve hastalığın prognozunda yeni yaklaşımlar benimsenmektedir (Bloomgarden 2008). Biyoaktif peptitler, özellikle son yıllarda dikkat çekmekte ve normal vücut fizyolojisinde oynadıkları roller nedeni ile ön plana çıkmaktadır. Laktoferrin, diyetle hayvan sütleri ve özellikle kolostrumun yanısıra nötrofiller, tükürük, gözyaşı, mide mukozası, dalak, lenf düğümleri, beyaz kan hücreleri gibi vücut sıvılarında da bulunmaktadır (Franco ve ark., 2018; Kruzel ve ark., 2017).

Hücre kültürü çalışmaları, spesifik olarak incelenen bir hücre hattının, çok hücreli organizmalardan elde edilerek, laboratuvar koşullarında, uygun ortam şartları sağlanarak yaşatılmasını kapsamaktadır. Hücre kültürü çalışmaları aşı ve ilaç geliştirilmesinde ya da besin öğelerinin etkisinin araştırılmasında sıklıkla kullanılan *in vitro* bir yöntemdir (Gilbert ve ark., 2016). *In vitro* yöntemlerde, deneysel olarak etkisi araştırılmak istenilen bir besin ögesi veya ilaç gibi kimyasal etkene maruz bırakılan

hücrelerin hücre canlılığının belirlenmesi, bu çalışmaların ilk aşamasını oluşturmaktadır. Etkisi araştırılmak istenilen kimyasal, sitotoksosite göstererek hücre hattı üzerinde incelenen maddenin dozuna ve maruziyet süresine bağlı olarak hücrelere değişik derecelerde etki göstererek apoptoz, otofaji veya nekroz gibi hücrelere zarar veren sonuçlara yol açabilmektedir (Tokur ve ark., 2017).

Hücre canlılığının belirlenmesinde kullanılan birçok farklı yöntem bulunmaktadır. Bu yöntemler, araştırılan deney materyali ve hücre hatlarına bağlı olarak değişkenlik göstermektedir (Crouch ve ark., 1993; Fan ve ark., 2007). Kolorimetrik bir metod olan 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum-bromür (MTT) testi, günümüzde en yaygın kullanılan ve hücre canlılığı testleri içerisinde altın standart olarak kabul edilen bir testtir (Mosmann, 1983).

Hücre canlılığının belirlenmesinde hücre hattı ve deneysel etkene göre farklı inkübasyon süreleri de uygulanmaktadır. Bu çalışma kapsamında, belirlenen 6 farklı doz (0-31,25-62,5-125-250 ve 500 µg/mL) laktoferrin ile Caco2 hücre hattı 3 farklı süre (24-48-72 saat) boyunca inkübe edilmiştir.

Bu çalışmada, Caco2 hücreleri 24 saat laktoferrin ile inkübe edildiğinde hücre canlılığı doza bağlı olarak (500 µg/mL; 250 µg/mL; 125 µg/mL; 62,5 µg/mL; 31,25 µg/mL; 0 µg/mL) sırası ile %34,53; %52,03; %64,31; %73,94; %85,69; %99,90 olarak belirlenmiştir. Aynı dozlarda 48 saat inkübasyonda hücre canlılığı doza bağlı olarak azalan doz sırasına göre %27,16; %39,19; %48,05; %54,21; %61,58; %77,22 olarak saptanmıştır. Caco2 hücrelerinin 72 saat inkübasyonu sonrasında ise azalan doz sırasına göre ve doza bağlı olarak hücre canlılığı %2,09; %15,83; %20,10; %24,87; %26,96; %44,97 olarak bulunmuştur. Laktoferrinin doza ve inkübasyon süresine bağlı olarak Caco2 hücre hattında beklendiği üzere hücre canlılığını azalttığı belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre laktoferrinin hücrelerin %50'sinde büyümeyi inhibe eden dozu, yani yarı maksimal inhibisyon konsantrasyonları (IC50) saptanmıştır. Buna

göre, Caco2 hücre hattında 24 saat inkübasyonu sonucu laktoferrinin IC50 değeri 249,7 µg/mL (%95 GA 227,8-275,5 µg/mL) iken; 48 saat inkübasyon sonucu IC50 değeri 74,91 µg/mL (%95 GA 56,50-98,04 µg/mL) ve 72 saat inkübasyon sonucu IC50 değeri 0,68 µg/mL (%95 GA 0,20-1,53 µg/mL) olarak hesaplanmıştır.

Yapılan bir çalışmada, laktoferrinin kolon kanseri hücre hattı (Caco2) 24 saatlik inkübasyonu sonunda IC50 değerinin 11,86 mg/mL olduğu belirtilmiştir. Laktoferrinin 10 mg/mL dozunda 48 saatlik inkübasyonu sonucu Caco2 hücre canlılığı %41,2 olarak saptanmıştır (Ma ve ark., 2013). Anne sütünden elde edilen laktoferrin ve inek sütünden elde edilen laktoferrinin osteoblast öncü hücrelerinde (MC3T3) 100 µg/mL 72 saat süreyle inkübasyon sonucu hücre canlılığı sırası ile %42,5 ve %36,7 olarak belirlenmiştir (Zhang ve ark., 2018). Deve sütünden elde edilen laktoferrinin kolon kanseri hücre hattı (HCT-116) ile 48 saatlik inkübasyonu sonucunda 3 mg/mL dozunda, %56 oranında inhibe ettiği gösterilmiştir (Habib ve ark., 2013). Yapılan bir başka çalışmada da deve sütünden saflaştırılan laktoferrinin Caco2 hücre hattında 24 saatlik inkübasyon sonucu IC50 değeri 723 µg/mL olarak saptanmış; 48 saatlik inkübasyon sonucu IC50 değeri 1020 µg/mL olarak bulunmuştur (Semen, 2019). Laktoferrinin, iki farklı tür meme kanseri hücre hattında (HS578T ve T47D) 48 saat süre ile 12.5 µM dozda inkübasyonunun kanser hücrelerinin proliferasyonunu sırası ile %47 ve %54 oranında azalttığı rapor edilmiştir (Duarte ve ark., 2011).

Laktoferrinin demir doygunluğu da hücre hattında IC50 dozunu etkileyen diğer önemli bir faktördür (Rocha ve ark., 2022). Yapılan bir çalışmada inek sütünden elde edilen apo-LF ve holo-LF'in doza bağlı olarak prostat kanseri hücre hattı (DU-145) üzerinde sitotoksik etki gösterdiği belirlenmiştir. Apolaktoferrinin 16 mg/mL dozunda 24 ve 48 saatlik inkübasyonu sonucunda DU-145 hücrelerinde sırası ile %60 ve %40'lık bir azalma gösterdiği saptanmıştır. Hololaktoferrinin ise 24 ve 48 saatlik inkübasyon sonucunda DU-145 hücrelerinde sırası ile %50 ve %90 oranında sitotoksikite gösterdiği belirtilmiştir (Rocha ve ark., 2022).

Yapılan benzer çalışmalar ile karşılaştırıldığında, laktoferrinin doza bağlı olarak sitotoksik etki gösterdiği ve hücre hattında büyümeyi inhibe ettiği belirlenmiştir. Ancak, laktoferrinin IC50 dozunun kullanılan laktoferrinin kaynağı, uygulanan hücre hattı ve inkübasyon süresine bağlı olarak değiştiği belirtilmektedir. Bu çalışmada da literatüre benzer şekilde laktoferrinin Caco2 hücre hattında sitotoksik etki gösterdiği ve bu durumun doza ve inkübasyon süresine bağlı olarak değiştiği saptanmıştır.

Yara iyileşmesi, birbirini takip eden hemostaz/inflamasyon fazı, proliferasyon fazı ve yeniden şekillenme fazı olmak üzere çok yönlü bir süreçtir. Yara iyileşmesi, hemostaz fazı ile birlikte görülen inflamasyon ile karakterizedir. İnflamasyon sürecinde, plateletlerden sitokin salınımı görülmekte ve yara bölgesinde nötrofil ve makrofajların düzeyi artmaktadır. İnflamasyon fazının ardından kolajen matrisinin oluşturulması için fibroblastlar, granülasyon dokunun oluşmasını sağlamak için yara bölgesine göç etmektedir. Bunun ardından yara bölgesinin yeniden şekillenmesi sağlanarak yaranın iyileşmesi tamamlanmaktadır (Conneely, 2001; Takayama ve ark., 2012).

Bu çalışmada, laktoferrinin, kontrole kıyasla yara iyileşmesini doza bağlı olarak hızlandırdığı saptanmıştır. Kontrole kıyasla 62,5 µg/mL, 125 µg/mL ve 250 µg/mL LF dozlarında yara iyileşmesinin daha hızlı olduğu belirlenmiştir. Bu dozlarda 72. saat sonucunda yara iyileşmesi sırası ile %92,5, %96,5 ve %98,8 olarak bulunmuştur. Literatürde yapılan benzer çalışmalarda, laktoferrinin yara iyileşmesi üzerine olumlu etkileri belirlenmiştir. Yapılan bir çalışmada 300 µg/mL laktoferrinin, insan gingival fibroblast hücre hattında (hGF) ekstraselüler sinyale bağlı kinaz 1/2 (ERK1/2) fosforilasyonunun aktivasyonunu artırarak hücrelerin proliferasyonunu desteklediği ve yara iyileşmesini hızlandırdığı rapor edilmiştir (Suzuki 2019). Wang ve ark., (2022) tarafından yapılan bir çalışmada ratlarda tam kat deri defekti üzerine etkilerini belirlemek için laktoferrin/lityum magnezyum silikat hidrojel geliştirilmiştir. Sentezlenen bu maddenin güçlü bir antibakteriyel etki göstermesinin yanında 14 gün içerisinde %99,1 oranında yara iyileşmesini uyardığı belirlenmiştir.

Laktoferrinin yara iyileşmesindeki rolü net olarak bilinmemekle birlikte, yara iyileşmesinin her aşamasında etkisi olabileceği belirtilmektedir. Demir bağlayıcı özelliği sayesinde laktoferrin, yara iyileşmesi sürecinde epitel hücrelerden vücut sıvılarına salgılanarak inflamasyon fazında yara iyileşmesini desteklemektedir. Ayrıca, laktoferrin bu süreçte antiinflamatuvar özelliği sayesinde immün sistemin aşırı reaksiyonunu da önleyerek kronik yara oluşumunu önlemektedir (Conneely, 2001). Yapılan bir çalışmada ise laktoferrinin fibroblast ve keratinositlerin özellikle yara bölgesine göçünü uyararak yara bölgesinin yeniden şekillenmesinde görev alabileceği belirlenmiştir. Buna ek olarak, laktoferrinin kolajen ve hiyalüron gibi hücre dışı matris bileşenlerinin sentezini artırdığı gösterilmiştir (Takayama ve ark., 2012).

Yapılan bir çalışmada yüksek yağlı diyetle beslenen farelerde oluşturulan tam kat deri defektlerinde inek sütünden elde edilen laktoferrinin yara iyileşmesi üzerine etkileri incelenmiştir. Tam kat deri defektleri oluşturulmuş ve oluşan yaraların büyüklükleri 1 ve 21. günde karşılaştırılmıştır. Buna göre inek sütünden elde edilen laktoferrinin, yüksek yağlı diyetle beslenen farelere kıyasla yara iyileşmesini hızlandırdığı belirlenmiştir. Laktoferrinin özellikle mukozal epitel hücrelerde inflamatuvar sitokin tepkilerini modüle ederek yara iyileşmesini desteklediği sonucuna ulaşılmıştır (Yıldırım, 2022).

Sonuç olarak, laktoferrinin yara iyileşmesinde doza bağlı olarak etkin olabileceği saptanmıştır. Ancak bu konuda daha kapsamlı mekanistik çalışmaların yapılması önerilmektedir.

Yapılan çalışmalar laktoferrinin, glukoz homeostazı üzerinde etkili olabileceğini göstermektedir (Maekawa ve ark., 2017; Moreno-Navarrete ve ark., 2009). Ancak, bu konuda yapılan çalışmalar oldukça kısıtlıdır. Postprandiyal fazda glukoz, enterosit hücrelerinden SGLT1 aracılığıyla alınmakta sonrasında GLUT2 aracılığıyla dolaşıma katılmaktadır. Glukozun ince bağırsakta emilmesi fizyolojik olarak kan glukoz

seviyelerinin düzenlenmesine katkıda bulunur. Bu nedenle tip 2 diyabet, obezite gibi kronik hastalıkların akut ve kronik komplikasyonlarının oluşmasında rol oynayan hiperglisemi tedavisi için önemli bir hedef olarak düşünülmektedir. Enterositlerde glukoz transportunun moleküler ve hücresel mekanizmalarının anlaşılmasının, kronik hastalıkların tedavisinde farklı yöntemlerinin geliştirilmesine yardımcı olacağı düşünülmektedir (Gromova ve ark., 2021). Bu nedenle, glukozun enterositlerden emilimini azaltan/engelleleyen kimyasal ve doğal bileşenlere yönelik çalışmalar artmaktadır.

Bu çalışmada, laktoferrinin doza bağlı olarak Caco2 hücrelerinde kontrol grubuna kıyasla glukoz transportunu önemli ölçüde azalttığı belirlenmiştir (Şekil 3.14). Özellikle, 62,5 µg/mL ve 125 µg/mL laktoferrin uygulamasının glukoz transportunu sırası ile yaklaşık %14 ve %8 oranlarında inhibe ettiği belirlenmiştir ( $p<0.001$ ). Benzer şekilde, 250 µg/mL ve 31,25 µg/mL laktoferrin uygulamalarının da glukoz transportunu sırası ile %5 ve %6 oranlarında inhibe ettiği saptanmıştır ( $p<0.05$ ).

Laktoferrinin, glukoz metabolizması üzerine etkilerini inceleyen in vivo ve in vitro az sayıda çalışma bulunmaktadır. Yapılan bir hayvan çalışmasında, inek sütünden elde edilen laktoferrinin, glukoz regülasyonunu, özellikle ince bağırsaktan glukoz emilimini etkileyip etkilemediği araştırılmıştır. Yapılan oral glukoz tolerans testi (OGTT) sonucunda, bLF (100 mg/kg) verilen grupta 15 dakikalık pikten sonra 180 dakikada daha düşük plazma glukoz düzeyi saptanmıştır. Laktoferrinin akut olarak inkretin bir hormon olan glukagon benzeri peptit-1 (GLP-1) salınımını hızlandırarak plazma insülin seviyelerini artırdığı ve hatta ince bağırsaktan glukoz emilimini artırabileceği sonucuna varılmıştır (Maekawa ve ark., 2017). Yapılan bir başka hayvan çalışmasında, 15 hafta yüksek yağlı diyetle beslendikten sonra streptozosin ile diyabet geliştirilen farelere 12 hafta süre ile %0,5 ve %2 laktoferrin desteği verilmiştir. Çalışma sonucunda, laktoferrinin açlık insülin, kolesterol ve trigliserid düzeylerini azalttığı ve karaciğerde insülin duyarlılığını artırdığı saptanmıştır. Laktoferrinin, insülin sinyal yolağında görevli olan insülin reseptörü, insülin reseptörü-1 (IRS-1),

glukoz transport protein 4 (GLUT4), protein kinaz B (AKT) ve fosfotidil inositol 3 kinaz (PI3K) proteinlerinin seviyesini artırdığı gösterilmiş, oksidatif stresi azaltarak, pankreasta görülen disfonksiyonu azalttığı belirtilmiştir (Du ve ark., 2022).

İnsanlarda yapılan bir başka çalışmada ise bozulmuş glukoz toleransı olan bireylerde laktoferrinin dolaşımında azalması ile birlikte insülin duyarlılığında azalma ve hiperglisemi görüldüğü rapor edilmiştir. Bunun nedeni olarak, endojen olarak nötrofillerden sentezlenen laktoferrinin, bozulmuş glukoz toleransı olan bireylerde azalması gösterilmiştir. Bu durum hiperglisemiye bağlı olarak nötrofillerin azaldığını ve bunun sonucunda da dolaşımdaki laktoferrin düzeyinin az olduğunu göstermektedir (Moreno-Navarrete ve ark., 2009).

Yapılan bu çalışmada, laktoferrinin, hücre içine glukoz transportunu doza bağlı olarak azaltabildiği saptanmıştır. Ancak bu konuda mekanistik olarak daha fazla çalışmanın yapılması gerektiği ve laktoferrinin enterositlerde glukoz transportu üzerine etkilerinin daha iyi anlaşılabilmesi için SGLT1, GLUT2 proteinlerinin tayini ve bu proteinlerin mRNA ekspresyonlarının saptanması önerilmektedir. Hücre içi ve hücre dışı glukoz miktarının saptanması da önem kazanmaktadır.

Oksidatif stres, vücutta kararsız yapıli serbest radikallerin artışının antioksidan enzimler tarafından elimine edilmediğinde ortaya çıkan ve günümüzde obezite, tip 2 diyabet gibi birçok kronik hastalığın etiyolojisinde yer alan bir komplikasyondur. Vücudun doğal savunma sistemi olan antioksidan enzimler, fizyolojik ya da metabolik süreçler sonunda meydana gelen serbest radikallerin elimine edilmesi ve uzaklaştırılmasında rol oynamaktadır (Sharifi-Rad ve ark., 2020; Valko ve ark., 2007).

Son yıllarda oksidatif hasarın oluşumunun önlenmesi veya oluşan serbest radikallerin uzaklaştırılmasında yeni tedavi yaklaşımları bulunmaktadır. Özellikle

antioksidan özellikleri bilinen doğal ve sentetik bileşiklerin antioksidan sistem veya serbest radikaller üzerindeki etkileri sıklıkla araştırılmaktadır. Bu tarz, enzimatik yapılı olmayan ekzojen antioksidan bileşikler, doğrudan radikal süpürücü ya da dolaylı olarak antioksidan enzimlerin aktivitesini artırarak oksidatif stresin önlenmesinde rol oynayabilmektedir. Laktoferrinin, demir bağlama kapasitesi özelliği nedeni ile transferrine benzer bir yapıya sahip olmasının yanısıra düşük pH koşullarında bile bağladığı demiri ortama bırakmaması demir tarafından indüklenen lipid peroksidasyonunu önleyerek antioksidan etki göstermektedir (Ponnampalam ve ark., 2022).

Bu çalışmanın sonucunda, laktoferrinin doza bağlı olarak Caco2 hücre hattında SOD, GST ve GPx antioksidan enzimlerinin aktivitelerini artırdığı saptanmıştır. Laktoferrinin 125 µg/mL dozunda uygulanması sonucunda SOD, GST ve GPx enzimlerinin aktivitelerini sırası ile 2,55 kat, 1,53 kat ve 1,85 kat artırdığı belirlenmiştir. Uygulanan diğer dozlarda da laktoferrinin kontrol grubuna kıyasla enzim aktivitelerini önemli ölçüde artırdığı belirlenmiştir.

Laktoferrinin antioksidan enzim aktiviteleri üzerine yapılan in vivo ve in vitro çalışmalar bulunmaktadır. Yapılan bir çalışmada, karbon tetra klorür (CCl<sub>4</sub>) verilerek karaciğer harabiyeti oluşturulan farelerde oral olarak 3 hafta süresince 300 mg/vücut ağırlığı laktoferrin takviyesinin, SOD ve GPx enzim aktivitelerini önemli ölçüde artırdığı ve bununla birlikte CCl<sub>4</sub> tarafından indüklenen yüksek MDA seviyelerini düşürdüğü rapor edilmiştir (Farid ve ark., 2021). Benzer şekilde, dietilnitrozamin (DEN) verilerek karaciğer kanser modeli oluşturulan bir çalışmada da 60 mg/kg laktoferrin takviyesinin, karaciğerde bulunan SOD, GPx ve CAT enzimlerinin aktivitesindeki azalışı önlediği ve glutatyon düzeylerini anlamlı ölçüde artırdığı bildirilmiştir (Mohammed ve ark., 2019). İnsan gingival fibroblast hücre hattı (hGF) üzerinde yapılan bir başka çalışmaya göre, 1000 µg/mL LF'in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tarafından indüklenen oksidatif hasara karşı koruyucu olduğu, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> radikali üzerinde radikal süpürücü etki gösterdiği ve GPx4'ün gen ekspresyonunu artırarak lipid

peroksidasyonunu önlediği gösterilmiştir (Odatsu ve ark., 2021). Başka bir in vitro çalışmada kronik endometrit olan hastalardan izole edilen endometrial stromal hücrelerde (ESH), inek sütünden izole edilerek 1 mg/mL dozunda eklenen laktoferrinin tümör nekrozis faktör- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) ve interlökin-1B (IL-1B) gibi inflamatuvar sitokinlerin düzeyini azaltarak antiinflamatuvar etki gösterdiği belirlenmiştir (Nakamura ve ark., 2022). Yapılan bir başka in vitro çalışmada, laktoferrinin karaciğer kanseri hücre hattında (HepG2) akrilamidin yol açtığı oksidatif hasara karşı koruyucu etki gösterdiği saptanmıştır. Akrilamid eklenmesi ile birlikte HepG2 hücre hattında artan malondialdehit ve azalan SOD, katalaz, glutatyon redüktaz düzeylerinin, 50 ve 100  $\mu$ M laktoferrin eklenmesi ile antioksidan enzimlerin düzeyleri anlamlı ölçüde arttığı belirlenmiştir (Bodur ve ark., 2022).

Öztürkler'in (2019), yaptığı bir çalışmada ratlarda laktoferrinin akut etkisini saptamak için tek doz 20 mg/kg laktoferrin verilmiştir. Buna göre laktoferrinin, serum total antioksidan kapasite düzeylerini ve antioksidan enzim olan paraoksonaz enzim aktivitesini önemli ölçüde artırdığı ve total oksidan kapasite düzeylerini azalttığı belirlenmiştir. Yapılan bir başka çalışma da 3 hafta boyunca günlük 300 mg/kg laktoferrin uygulamasının ratlarda karaciğerde lipid peroksidasyonuna bağlı gelişen malondialdehit seviyelerini anlamlı şekilde düşürdüğü ve SOD aktivitesini anlamlı ölçüde artırdığı gösterilmiştir (Farid ve ark., 2021).

## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

İnsan kolon karsinoma hücrelerinde farklı dozlarda laktoferrinin bazı antioksidan enzim aktiviteleri, yara iyileşmesi ve glukoz transportu üzerine etkilerini araştırmak amacıyla yürütülen bu çalışmanın temel sonuçları aşağıda özetlenmiştir.

Laktoferrinin, Caco2 hücre hattında IC50 değeri MTT yöntemiyle saptanmıştır. Bu kapsamda, laktoferrinin Caco2 hücre hattında 24 saatlik inkübasyonu sonucu IC50 değeri 249,9 µg/mL olarak saptanmıştır. Laktoferrinin 48 saatlik inkübasyonu sonucu Caco2 hücre hattında IC50 değeri 74,9 µg/mL olarak bulunmuştur. Son olarak, 72 saatlik inkübasyon sonucu laktoferrinin IC50 değeri 0,68 µg/mL olarak belirlenmiştir.

Farklı dozlarda laktoferrinin Caco2 hücre hattı üzerinde yara iyileşmesi üzerine etkileri değerlendirilmiştir. Laktoferrinin doza bağlı olarak yara iyileşmesini hızlandırdığı belirlenmiştir. Kontrol grubuna (0 µg/mL) kıyasla 62,5, 125 ve 250 µg/mL laktoferrin dozlarının Caco2 hücre hattında yara iyileşmesini istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde hızlandırdığı belirlenmiştir ( $p<0.001$ ).

Laktoferrinin Caco2 hücre hattında glukoz transportu üzerine etkisi florometrik bir yöntem 2-NBDG ile değerlendirilmiştir. Buna göre laktoferrinin doza bağlı olarak hücre içine glukoz transportunu azalttığı belirlenmiştir. Laktoferrinin 62,5 µg/mL ve 125 µg/mL dozlarında glukoz transportunu sırası ile yaklaşık %14 ve %8 oranlarında azalttığı belirlenmiştir ( $p<0.001$ ). Benzer şekilde, 250 µg/mL ve 31,25 µg/mL laktoferrin uygulamalarının da glukoz transportunu sırası ile %5 ve %6 oranlarında inhibe ettiği saptanmıştır ( $p<0.05$ ).

Laktoferrinin süperoksit dismutaz enzim aktivitesi üzerine etkileri spektrofotometrik yöntemle tayin edilmiştir. Buna göre, farklı laktoferrin dozlarının SOD enzim aktivitesindeki artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Süperoksit dismutaz enzim aktivitesi, 125 µg/mL laktoferrin uygulaması ile %155 oranında artarken ( $p<0.001$ ), 62,5 µg/mL laktoferrin uygulamasının da SOD aktivitesini %77 oranında artırdığı belirlenmiştir ( $p<0.001$ ). Benzer şekilde, 31,25 µg/mL ve 250 µg/mL laktoferrin uygulamalarının da SOD enzim aktivitelerini sırası ile %39 ve %34 oranında artırdığı bulunmuştur ( $p<0.05$ ).

Laktoferrinin glutatyon peroksidaz enzim aktivitesi üzerine etkileri spektrofotometrik yöntemle tayin edilmiştir. Buna göre, farklı laktoferrin dozlarının GPx enzim aktivitesindeki artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Glutatyon peroksidaz enzim aktivitesi, 125 µg/mL laktoferrin uygulaması ile %85 oranında artmıştır ( $p<0.001$ ). Benzer şekilde, 250 µg/mL ve 62,5 µg/mL laktoferrin uygulamalarının da GPx enzim aktivitelerini %40 oranında artırdığı saptanmış ( $p<0.05$ ), 31,25 µg/mL LF uygulamasının da GPx enzim aktivitesini %13 oranında artırdığı ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur ( $p<0.05$ ).

Laktoferrinin Glutatyon-S-Transferaz enzim aktivitesi üzerine etkileri spektrofotometrik yöntemle tayin edilmiştir. Buna göre, farklı laktoferrin dozlarının GST enzim aktivitesindeki artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Glutatyon-S-Transferaz aktivitesindeki en yüksek artış 125 µg/mL laktoferrin uygulamasında saptanmış olup, GST enzim aktivitesinin yaklaşık %53 oranında arttığı görülmüştür ( $p<0.001$ ). Benzer şekilde, 250 µg/mL laktoferrin uygulamasının da GST enzim aktivitesini %50 oranında artırdığı belirlenmiş ( $p<0.001$ ), 62,5 µg/mL ve 31,25 µg/mL LF uygulamasının da GST enzim aktivitesini sırasıyla %10 ve %12 oranında artırdığı ve bu artışın da istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur ( $p<0.05$ ). Laktoferrinin, antioksidan enzimlerin aktivitesini doyumluğa ulaştıran en etkin doz 125 µg/mL olduğu belirlenmiştir. Laktoferrinin 125 µg/mL doz inkübasyonu

sonucunda SOD, GPx, GST enzim aktiviteleri sırasıyla %155, %85 ve %53 oranında artırdığı saptanmıştır.

Sonuç olarak, laktoferrin antiinflamatuvar, oksidatif strese karşı koruyucu etki gösteren ve glukoz transportunun regulasyonunda görev alabilecek çok işlevli bir proteindir. Yapılan bu çalışma bir hücre hattı üzerinde yapıldığı için buradan hareketle insan beslenmesi üzerine laktoferrin dozuna özel bir öneri geliştirilmesi mümkün değildir. Bununla birlikte, insan beslenmesi düşünüldüğünde yalnızca ekzojen laktoferrin takviyesinin yanı sıra endojen laktoferrin metabolizması üzerinde de çalışılması ve laktoferrinin kaynağı, emilimi, biyoyararlılığı ve diğer makro ve mikro besin öğeleri ile etkileşimleri de göz önünde bulundurulmalıdır. Ancak bu çalışma özellikle planlanacak insan ve hayvan çalışmaları için bir başlangıç noktası oluşturmaktadır.

Yapılan bu çalışmada, laktoferrinin, hücre içine glukoz transportunu doza bağlı olarak azaltabildiği saptanmıştır. Ancak bu konuda mekanistik olarak daha fazla çalışmanın yapılması gerektiği ve laktoferrinin enterositlerde glukoz transportu üzerine etkilerinin daha iyi anlaşılabilmesi için SGLT1, GLUT2 proteinlerinin tayini ve bu proteinlerin mRNA ekspresyonlarının saptanması önerilmektedir. Hücre içi ve hücre dışı glukoz miktarının saptanması da önem kazanmaktadır.

Bu çalışma sonuçlarına göre, laktoferrinin doza bağlı olarak Caco2 hücre hattında seçilmiş antioksidan enzimlerin aktivitelerini artırdığı, glukoz transportunu azalttığı ve yara iyileşmesini hızlandırdığı belirlenmiştir. Bu bulgular ışığında, insan ve hayvan çalışmalarında endojen ve ekzojen laktoferrin metabolizmalarını da içeren ve doz, uygulama süresi ve farklı laktoferrin kaynaklarına ilişkin araştırıldığı daha kapsamlı çalışmaların yapılması önerilmektedir.

## ÖZET

### **İnsan Kolon Karsinoma Hücrelerinde (Caco2) Laktoferrinin Bazı Antioksidan Enzim Aktiviteleri, Yara İyileşmesi ve Glukoz Transportu Üzerine Etkilerinin İncelenmesi**

Laktoferrin, diyetle başlıca sütte bulunan ve sağlık üzerine olumlu etkileri olan bir proteindir. Bu çalışma farklı dozlarda laktoferrinin insan kolon karsinoma hücre hattında (Caco2) bazı antioksidan enzim aktiviteleri, yara iyileşmesi ve glukoz transportu üzerine etkilerinin incelenmesini amaçlamaktadır.

Bu çalışma kapsamında, laktoferrinin Caco2 hücrelerinde hücre canlılığı üzerine etkisi kolorimetrik MTT testi ile belirlenmiştir. Belirlenen laktoferrin dozlarının hücre çizik testi ile yara iyileşmesi ve florometrik 2-NBDG yöntemi ile glukoz transportu üzerine etkileri saptanmıştır. Farklı laktoferrin dozlarının Caco2 hücre hattında SOD, GST ve GPx antioksidan enzimleri üzerine etkileri spektrofotometrik yöntemle ölçülmüştür.

Yapılan çalışma sonucunda, laktoferrinin 48 saatlik inkübasyonu sonucu Caco2 hücre hattında IC50 değeri 74.9 µg/mL olduğu ve doza bağlı olarak yara iyileşmesini hızlandırdığı bulunmuştur. Laktoferrinin doza bağlı olarak SOD, GST ve GPx enzimlerinin aktivitelerini artırdığı ve 125 µg/mL laktoferrin dozunun enzim aktiviteleri sırasıyla %155, %53 ve %85 oranında artırdığı saptanmıştır ( $p<0.001$ ). Buna ek olarak, laktoferrinin doza bağlı olarak glukoz transportunu azalttığı ve 62,5 µg/mL ve 125 µg/mL laktoferrin dozlarının glukoz transportunu sırasıyla yaklaşık %14 ve %8 azalttığı belirlenmiştir ( $p<0.001$ ).

Sonuç olarak, laktoferrin, doza bağlı olarak Caco2 hücre hattında antioksidan enzimlerin aktivitelerini artırdığını, glukoz transportunu azalttığını ve yara iyileşmesini hızlandırmaktadır. Bu bulgular ışığında, laktoferrinin farklı kaynakları, dozu ve uygulama süresine ilişkin daha kapsamlı insan ve hayvan çalışmalarının yapılması önerilmektedir.

**Anahtar Sözcükler:** Laktoferrin, glukoz transportu, antioksidan, Caco2

## SUMMARY

### **Investigation of the Effects of Lactoferrin on Some Antioxidant Enzyme Activities, Wound Healing and Glucose Transport in Human Colon Carcinoma Cells (Caco2)**

Lactoferrin is a protein found mainly in milk in the diet and has positive effects on health. This study aims to investigate the effects of different doses of lactoferrin on some antioxidant enzyme activities, wound healing and glucose transport in human colon carcinoma cell line (Caco2).

In this study, the effect of lactoferrin on cell viability in Caco2 cells was determined by colorimetric MTT test. The effects of determined lactoferrin doses on wound healing by cell scratch test and glucose transport by fluorometric 2-NBDG method were determined. The effects of different lactoferrin doses on SOD, GST and GPx antioxidant enzymes in Caco2 cell line were measured by spectrophotometric method. As a result of the study, it was found that after 48 hours of incubation of lactoferrin, the IC<sub>50</sub> value in the Caco2 cell line was 74.9 µg/mL and it accelerated wound healing depending on the dose. It was determined that lactoferrin increased the activities of SOD, GST and GPx enzymes depending on the dose and 125 µg/mL lactoferrin dose increased the enzyme activities by 155%, 53% and 85%, respectively ( $p < 0.001$ ). In addition, it was determined that lactoferrin dose-dependently decreased glucose transport and 62.5 µg/mL and 125 µg/mL lactoferrin doses decreased glucose transport by approximately 14% and 8%, respectively ( $p < 0.001$ ).

As a result, lactoferrin increases the activities of antioxidant enzymes, decreases glucose transport and accelerates wound healing in Caco2 cell line depending on the dose. In the light of these findings, it is recommended that more comprehensive human and animal studies be conducted on different sources, dosage and duration of administration of lactoferrin.

**Keywords:** Lactoferrin, glucose transport, antioxidant, Caco2

## KAYNAKLAR

- ACTOR JK, HWANG SA, KRUZEL ML (2009). Lactoferrin as a natural immune modulator. *Curr Pharm Des*, **15**(17):1956-73.
- AIT-OMAR A, MONTEIRO-SEPULVEDA M, POITOU C, LE GALL M, COTILLARD A, GILET J, GARBIN K, HOULLIER A, CHATEAU D, LACOMBE A, VEYRIE N, HUGOL N, TORDJMAN J, MAGNAN C, SERRADAS P, CLEMENT K, LETURQUE A, BROU-LAROCHE E (2011). GLUT2 accumulation in enterocyte apical and intracellular membranes: a study in morbidly obese human subjects and ob/ob and high fat-fed mice. *Diabetes*, **60**(10):2598-607.
- AKIYAMA, Y, OSHIMA K, KUHARA T, SHIN K, ABE F, IWATSUKI K, NADANO D, MATSUDA T (2013). A lactoferrin-receptor, intelectin 1, affects uptake, sub-cellular localization and release of immunochemically detectable lactoferrin by intestinal epithelial Caco-2 cells. *J Biochem*, **154**(5):437-48.
- ALAMU O, RADO M, EKPO O, FISHER D (2020). Differential Sensitivity of Two Endothelial Cell Lines to Hydrogen Peroxide Toxicity: Relevance for In Vitro Studies of the Blood–Brain Barrier. *Cells*, **9**(2):403-416.
- AMIR ASLANI B, GHOBADI S (2016). Studies on oxidants and antioxidants with a brief glance at their relevance to the immune system. *Life Sci*, **146**:163-73.
- ANDERSON BF, BAKER HM, NORRIS GE, RICE DW, BAKER E (1989). Structure of human lactoferrin: crystallographic structure analysis and refinement at 2.8 Å resolution. *J Mol Biol*, **209**(4):711-34.
- ANTUNES DOS SANTOS A, FERRER B, MARQUES-GONCALVES F, TSATSAKIS AM, RENIERI EA, SKALNY AV, FARINA M, ROCHA JBT, ASCHNER M (2018). Oxidative Stress in Methylmercury-Induced Cell Toxicity. *Toxics*, **6**(3):47-62.
- ASHRAF MF, ZUBAIR D, BASHIR MN, ALAGAWANY M, AHMED S, SHAH QA, BUZDAR JA, ARAIN MA (2023). Nutraceutical and Health-Promoting Potential of Lactoferrin, an Iron-Binding Protein in Human and Animal: Current Knowledge. *Biol Trace Elem Res*, **14**: 1-17.
- ASLANKOÇ R, DEMİRCİ D, İNAN Ü, YILDIZ M, ÖZTÜRK A, ÇETİN M, SAVRAN EŞ, YILMAZ B (2019). Oksidatif stres durumunda antioksidan enzimlerin rolü - Süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GPX). *SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi*, **26**(3): 362-369.

- BAKER EN, BAKER HM (2009). A structural framework for understanding the multifunctional character of lactoferrin. *Biochimie*, **91**(1): 3-10.
- BALCÃO VM, COSTA CI, MATOS CM, MOUTINHO CG, AMORIM M, PINTADO ME, GOMES AP, VILA MM, TEIXEIRA JA (2013). Nanoencapsulation of bovine lactoferrin for food and biopharmaceutical applications. *Food Hydrocolloids*, **32**(2): 425-431.
- BALL SW, BAILEY JR, STEWART JM, VOGELS CM, WESTCOTT SA (2002). A fluorescent compound for glucose uptake measurements in isolated rat cardiomyocytes. *Can J Physiol Pharmacol*, **80**(3): 205-9.
- BHUPATHIRAJU SN, HU FB (2016). Epidemiology of Obesity and Diabetes and Their Cardiovascular Complications. *Circ Res*, **118**(11): 1723-35.
- BIRBEN E, SAHINER UM, SACKESSEN C, ERZURUM S, KALAYCI O (2012). Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J*, **5**(1): 9-19.
- BLOOMGARDEN ZT (2008). Approaches to treatment of pre-diabetes and obesity and promising new approaches to type 2 diabetes. *Diabetes Care*, **31**(7): 1461-6.
- BODUR M, AYDOGDU G, OZCELIK AO, YILMAZ E (2022). An in vitro Approach to Protective Effect of Lactoferrin on Acrylamide-induced Oxidative Damage. *An Acad Bras Cienc*, **94**(suppl 3): e20201882.
- BOUDRY G, CHEESEMAN CI, PERDUE MH (2007). Psychological stress impairs Na<sup>+</sup>-dependent glucose absorption and increases GLUT2 expression in the rat jejunal brush-border membrane. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **292**(2): R862-7.
- BRINES RD, BROCK JH (1983). The effect of trypsin and chymotrypsin on the in vitro antimicrobial and iron-binding properties of lactoferrin in human milk and bovine colostrum. Unusual resistance of human apolactoferrin to proteolytic digestion. *Biochim Biophys Acta*, **759**(3): 229-35.
- BROCK JH (2012). Lactoferrin--50 years on. *Biochem Cell Biol*, **90**(3): 245-51.
- CHAKRABARTI S, GUHA S, MAJUMDER K (2018). Food-Derived Bioactive Peptides in Human Health: Challenges and Opportunities. *Nutrients*, **10**(11): 1738-1755.
- CHEN L, TUO B, DONG H (2016). Regulation of Intestinal Glucose Absorption by Ion Channels and Transporters. *Nutrients*, **8**(1): 43-77.
- CONESA C, CALVO M, SANCHEZ L (2010). Recombinant human lactoferrin: a valuable protein for pharmaceutical products and functional foods. *Biotechnol Adv*, **28**(6): 831-8.

- CONNELLY OM (2001). Antiinflammatory activities of lactoferrin. *Journal of the American College of Nutrition*, **20**(5 Suppl), 389S–397S.
- CROUCH SP, KOZLOWSKI R, SLATER KJ, FLETCHER J (1993). The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity. *J Immunol Methods*, **160**(1): 81-8.
- CUTONE, A, ROSA L, IANIRO G, LEPANTO MS, BONACCORSI DI PATTI MC, VALENTI P, MUSCI G (2020). Lactoferrin's Anti-Cancer Properties: Safety, Selectivity, and Wide Range of Action. *Biomolecules*, **10**(3): 456-482.
- DERECHIN SS, JOHNSON P (1962). Red proteins from bovine milk. *Nature*, **194**: 473-4.
- DRINGEN R, PAWLOWSKI PG, HIRRLINGER J (2005). Peroxide detoxification by brain cells. *J Neurosci Res*, **79**(1-2): 157-65.
- DU Y, LI D, CHEN J, LI YH, ZHANG Z, HIDAYAT K, WAN Z, XU JY, QIN LQ (2022). Lactoferrin improves hepatic insulin resistance and pancreatic dysfunction in high-fat diet and streptozotocin-induced diabetic mice. *Nutr Res*, **103**: 47-58.
- DUARTE DC, NICOLAU A, TEIXEIRA JA, RODRIGUES LR (2011). The effect of bovine milk lactoferrin on human breast cancer cell lines. *J Dairy Sci*, **94**(1): 66-76.
- ELLISON RT, GIEHL TJ, LAFORCE FM (1988). Damage of the outer membrane of enteric gram-negative bacteria by lactoferrin and transferrin. *Infect Immun*, **56**(11): 2774-81.
- EMBLETON ND, BERRINGTON JE, MCGUIRE W, STEWART CJ, CUMMINGS SP (2013). Lactoferrin: Antimicrobial activity and therapeutic potential. *Semin Fetal Neonatal Med*, **18**(3): 143-149.
- EUROPEAN FOOD SAFETY AGENCY (2012). Scientific Opinion on bovine lactoferrin. *EFSA Journal*, **10**(5): 2701-2727.
- ERDEM-BUYUKKIRAZ M, KESMEN Z (2022). Antimicrobial peptides (AMPs): A promising class of antimicrobial compounds. *J Appl Microbiol*, **132**(3): 1573-1596.
- FAN F, WOOD KV (2007). Bioluminescent assays for high-throughput screening. *Assay Drug Dev Technol*, **5**(1): 127-36.
- FARID AS, EL SHEMY MA, NAFIE E, HEGAZY AM, ABDELHIEE EY (2021). Anti-inflammatory, anti-oxidant and hepatoprotective effects of lactoferrin in rats. *Drug Chem Toxicol*, **44**(3): 286-293.

FENTON HJH (1894). LXXIII.—Oxidation of tartaric acid in presence of iron. *J. Chem. Soc., Trans*, **65**(0): 899-910.

FILLEBEEN C, RUCHOUX MM, MITCHELL V, VINCENT S, BENAÏSSA M, PIERCE A (2001). Lactoferrin is synthesized by activated microglia in the human substantia nigra and its synthesis by the human microglial CHME cell line is upregulated by tumor necrosis factor alpha or 1-methyl-4-phenylpyridinium treatment. *Brain Res Mol Brain Res*, **96**(1-2): 103-13.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA) (2016). Generally Recognized As Safe (GRAS) Notice: The Use of Bovine Milk-derived Lactoferrin In Term Milk-based Infant Formulas and Toddler Formulas Agency Response Letter GRAS Notice No. GRN 000077. Erişim adresi: <https://www.fda.gov/media/124472/download>. Erişim tarihi: 4/4/2023

FRANCO I, PEREZ MD, CONESA C, CALVO M, SANCHEZ L (2018). Effect of technological treatments on bovine lactoferrin: An overview. *Food Res Int*, **106**: 173-182.

FRIEDMAN J (2002). Fat in all the wrong places. *Nature*, **415**(6869): 268-9.

GILBERT DF, BOUTROS M (2016). A Protocol for a High-Throughput Multiplex Cell Viability Assay. *Methods Mol Biol*, **1470**: 75-84.

GISBERT JP, MCNICHOLL AG, GOMOLLON F (2009). Questions and answers on the role of fecal lactoferrin as a biological marker in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*, **15**(11): 1746-54.

GONZALEZ-CHAVEZ SA, AREVALO-GALLEGOS S, RASCON-CRUZ Q (2009). Lactoferrin: structure, function and applications. *Int J Antimicrob Agents*, **33**(4): 301 e1-8.

GREFNER NM, GROMOVA LV, GRUZDKOV AA, KOMISSARCHIK YY (2015). Interaction of glucose transporters SGLT1 and GLUT2 with cytoskeleton in enterocytes and Caco2 cells during hexose absorption. *Cell and Tissue Biology*, **9**(1): 45-52.

GROMOVA LV, FETISSOV SO, GRUZDKOV AA (2021). Mechanisms of Glucose Absorption in the Small Intestine in Health and Metabolic Diseases and Their Role in Appetite Regulation. *Nutrients*, **13**(7): 2474-2492.

HABER F, WEISS J (1997). The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. *Proceedings of the Royal Society of London. Series A-Mathematical and Physical Sciences*, **147**(861): 332-351.

- HABIB HM, IBRAHIM WH, SCHNEIDER-STOCK R, HASSAN HM (2013). Camel milk lactoferrin reduces the proliferation of colorectal cancer cells and exerts antioxidant and DNA damage inhibitory activities. *Food Chem*, **141**(1): 148-52.
- HAYES JD, FLANAGAN JU, JOWSEY IR (2005). Glutathione transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **45**: 51-88.
- IFTIKHAR M, IFTIKHAR A, ZHANG H, GONG L, WANG J (2020). Transport, metabolism and remedial potential of functional food extracts (FFE) in Caco-2 cells monolayer: A review. *Food Res Int*, **136**: 109240.
- IGHODARO OM, AKINLOYE OA (2019). First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria Journal of Medicine*, **54**(4): 287-293.
- ISGOR YG, ISGOR BS (2011). Kinases and glutathione transferases: selective and sensitive targeting. *Frontiers in Biology*, **6**(2): 156-169.
- JANCZUK A, BRODZIAK A, CZERNECKI T, KROL J (2022). Lactoferrin-The Health-Promoting Properties and Contemporary Application with Genetic Aspects. *Foods*, **12**(1): 70-90.
- JIANG R, LOPEZ V, KELLEHER SL, LONNERDAL B (2011). Apo- and holo-lactoferrin are both internalized by lactoferrin receptor via clathrin-mediated endocytosis but differentially affect ERK-signaling and cell proliferation in Caco-2 cells. *J Cell Physiol*, **226**(11): 3022-31.
- JOHANSON B (1960). Isolation of an iron-containing red protein from human milk. *Acta Chemica Scandinavica*, **14**: 510-512.
- KAMILOGLU S, CAPANOGLU E, GROOTAERT C, VAN CAMP J (2015). Anthocyanin Absorption and Metabolism by Human Intestinal Caco-2 Cells-A Review. *Int J Mol Sci*, **16**(9): 21555-74.
- KANWAR JR, SAMARASINGHE RM, SEHGAL R (2012). Nano-Lactoferrin in Diagnostic, Imaging and Targeted Delivery for Cancer and Infectious Diseases. *Journal of Cancer Science & Therapy*, **04**(03): 31-42.
- KANWAR RK, SINGH N, GURUDEVAN S, KANWAR JR (2011). Targeting hepatitis B virus and human papillomavirus induced carcinogenesis: novel patented therapeutics. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov*, **6**(2): 158-74.
- KAUFMAN DA, BERENZ A, ITTELL HL, CONAWAY M, BLACKMAN A, NATARO JP, PERMAR SR (2021). Dose escalation study of bovine lactoferrin in preterm infants: getting the dose right. *Biochem Cell Biol*, **99**(1): 7-13.

- KAWASAKI Y, SATO K, SHINMOTO H, DOSAKO S (2000). Role of basic residues of human lactoferrin in the interaction with B lymphocytes. *Biosci Biotechnol Biochem*, **64**(2): 314-8.
- KEEMINK J, BERGSTROM CAS (2018). Caco-2 Cell Conditions Enabling Studies of Drug Absorption from Digestible Lipid-Based Formulations. *Pharm Res*, **35**(4): 74.
- KITTS DD, WEILER K (2003). Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery. *Curr Pharm Des*, **9**(16): 1309-23.
- KOCOT J, LUCHOWSKA-KOCOT D, KIELCZYKOWSKA M, MUSIK I, KURZEPA J (2017). Does Vitamin C Influence Neurodegenerative Diseases and Psychiatric Disorders? *Nutrients*, **9**(7): 659-688.
- KOEPSSELL H (2020). Glucose transporters in the small intestine in health and disease. *Pflugers Arch*, **472**(9): 1207-1248.
- KOIRALA P, DAHAL M, RAI S, DHAKAL M, NIRMAL NP, MAQSOOD S, AL-ASMARI F, BURANASOMPOB A (2023). Dairy Milk Protein-Derived Bioactive Peptides: Avengers Against Metabolic Syndrome. *Curr Nutr Rep*, 1-19.
- KRUZEL ML, ZIMECKI M, ACTOR JK (2017). Lactoferrin in a Context of Inflammation-Induced Pathology. *Front Immunol*, **8**: 1438-1453.
- KUTILA T, PYORALA S, SALONIEMI H, KAARTINEN L (2003). Antibacterial effect of bovine lactoferrin against udder pathogens. *Acta Vet Scand*, **44**(1-2): 35-42.
- LATORRE D, PUDDU P, VALENTI P, GESSANI S (2010). Reciprocal interactions between lactoferrin and bacterial endotoxins and their role in the regulation of the immune response. *Toxins (Basel)*, **2**(1): 54-68.
- LEGRAND D (2016). Overview of Lactoferrin as a Natural Immune Modulator. *J Pediatr*, **173 Suppl**: S10-5.
- LEGRAND D, ELASS E, CARPENTIER M, MAZURIER J (2005). Lactoferrin: a modulator of immune and inflammatory responses. *Cell Mol Life Sci*, **62**(22): 2549-59.
- LEGRAND D, MAZURIER J (2010). A critical review of the roles of host lactoferrin in immunity. *Biometals*, **23**(3): 365-76.

- LI, H, YAO Q, MIN L, HUANG S, WU H, YANG H, FAN L, WANG J, ZHENG N (2020). The Combination of Two Bioactive Constituents, Lactoferrin and Linolenic Acid, Inhibits Mouse Xenograft Esophageal Tumor Growth by Downregulating Lithocholyltaurine and Inhibiting the JAK2/STAT3-Related Pathway. *ACS Omega*, **5**(33): 20755-20764.
- LI HY, LI M, LUO CC, WANG JQ, ZHENG N (2017). Lactoferrin Exerts Antitumor Effects by Inhibiting Angiogenesis in a HT29 Human Colon Tumor Model. *J Agric Food Chem*, **65**(48): 10464-10472.
- LIU Z, REN Z, ZHANG J, CHUANG CC, KANDASWAMY E, ZHOU T, ZUO L (2018). Role of ROS and Nutritional Antioxidants in Human Diseases. *Front Physiol*, **9**: 477.
- LOBO V, PATIL A, PHATAK A, CHANDRA N (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn Rev*, **4**(8): 118-26.
- LONNERDAL B (2016). Bioactive Proteins in Human Milk: Health, Nutrition, and Implications for Infant Formulas. *J Pediatr*, **173** (Suppl): S4-9.
- LONNERDAL B, JIANG R, DU X (2011). Bovine lactoferrin can be taken up by the human intestinal lactoferrin receptor and exert bioactivities. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, **53**(6): 606-14.
- LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL, RANDALL RJ (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, **193**(1): 265-75.
- LUBOS E, LOSCALZO J, HANDY DE (2011). Glutathione peroxidase-1 in health and disease: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal*, **15**(7): 1957-97.
- MA J, GUAN R, SHEN H, LU F, XIAO C, LIU M, KANG T (2013). Comparison of anticancer activity between lactoferrin nanoliposome and lactoferrin in Caco-2 cells in vitro. *Food Chem Toxicol*, **59**: 72-7.
- MAEKAWA Y, SUGIYAMA A, TAKEUCHI T (2017). Lactoferrin potentially facilitates glucose regulation and enhances the incretin effect. *Biochem Cell Biol*, **95**(1): 155-161.
- MAHAJAN L, VERMA PK, RAINA R, PANKAJ NK, SOOD S, SINGH M (2018). Alteration in thiols homeostasis, protein and lipid peroxidation in renal tissue following subacute oral exposure of imidacloprid and arsenic in Wistar rats. *Toxicol Rep*, **5**: 1114-1119.
- MARCHITTI SA, CHEN Y, THOMPSON DC, VASILIOU V (2011). Ultraviolet radiation: cellular antioxidant response and the role of ocular aldehyde dehydrogenase enzymes. *Eye Contact Lens*, **37**(4): 206-13.

- MARNETT LJ (2000). Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis*, **21**(3): 361-70.
- MARTINI S, TAGLIAZUCCHI D (2023). Bioactive Peptides in Human Health and Disease. *Int J Mol Sci*, **24**(6): 5837-5841.
- MAYEUR S, SPAHIS S, POULIOT Y, LEVY E (2016). Lactoferrin, a Pleiotropic Protein in Health and Disease. *Antioxid Redox Signal*, **24**(14): 813-36.
- MAZARI AMA, ZHANG L, YE ZW, ZHANG J, TEW KD, TOWNSEND DM (2023). The Multifaceted Role of Glutathione S-Transferases in Health and Disease. *Biomolecules*, **13**(4): 688-705.
- MILLER DM, BUETTNER GR, AUST SD (1990). Transition metals as catalysts of "autoxidation" reactions. *Free Radic Biol Med*, **8**(1): 95-108.
- MISONOU H, MORISHIMA-KAWASHIMA M, IHARA Y (2000). Oxidative stress induces intracellular accumulation of amyloid beta-protein (Abeta) in human neuroblastoma cells. *Biochemistry*, **39**(23): 6951-9.
- MITRA A, ZHANG Z (1994). Expression of a human lactoferrin cDNA in tobacco cells produces antibacterial protein(s). *Plant Physiol*, **106**(3): 977-81.
- MOHAMMED MM, RAMADAN G, ZOHEIRY MK, EL-BEIH NM (2019). Antihepatocarcinogenic activity of whey protein concentrate and lactoferrin in diethylnitrosamine-treated male albino mice. *Environ Toxicol*, **34**(9): 1025-1033.
- MORENO-EXPOSITO L, ILLESCAS-MONTES R, MELGUIZO-RODRIGUEZ L, RUIZ C, RAMOS-TORRECILLAS J, DE LUNA-BERTOS E (2018). Multifunctional capacity and therapeutic potential of lactoferrin. *Life Sci*, **195**: 61-64.
- MORENO-NAVARRETE JM, ORTEGA FJ, BASSOLS J, RICART W, FERNANDEZ-REAL JM (2009). Decreased circulating lactoferrin in insulin resistance and altered glucose tolerance as a possible marker of neutrophil dysfunction in type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*, **94**(10): 4036-44.
- MOSMANN T (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, **65**(1-2): 55-63.
- NAKAMURA A, KIMURA F, TSUJI S, HANADA T, TAKEBAYASHI A, TAKAHASHI A, KITAZAWA J, MORIMUNE A, AMANO T, KUSHIMA R, MURAKAMI T (2022). Bovine lactoferrin suppresses inflammatory cytokine expression in endometrial stromal cells in chronic endometritis. *J Reprod Immunol*, **154**: 103761.

- ODATSU T, KUROSHIMA S, SHINOHARA A, VALANEZHAD A, SAWASE T (2021). Lactoferrin with Zn-ion protects and recovers fibroblast from H(2)O(2)-induced oxidative damage. *Int J Biol Macromol*, **190**: 368-374.
- ÖZCAN O, ERDAL H, ÇAKIRCA G, YÖNDEN Z (2015). Oxidative stress and its impacts on intracellular lipids, proteins and DNA. *Journal of Clinical and Experimental Investigations*, **6**(3): 331-336.
- ÖZTÜRKLER M (2019). Laktoferrinin antioksidan sistem ve bazı biyokimyasal parametreler üzerine akut etkisinin Araştırılması. Bilim Uzmanlığı Tezi, Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı
- PANSE N, GERK PM (2022). The Caco-2 Model: Modifications and enhancements to improve efficiency and predictive performance. *Int J Pharm*, **624**: 122004.
- PONNAMPALAM EN, KIANI A, SANTHIRAVEL S, HOLMAN BWB, LAURIDSEN C, DUNSHEA FR (2022). The Importance of Dietary Antioxidants on Oxidative Stress, Meat and Milk Production, and Their Preservative Aspects in Farm Animals: Antioxidant Action, Animal Health, and Product Quality-Invited Review. *Animals (Basel)*, **12**(23): 3279-3324.
- ROCHA VP, CAMPOS SPC, BARROS CA, TRINDADE P, SOUZA LRQ, SILVA TG, GIMBA ERP, TEODORO AJ, GONCALVES RB (2022). Bovine Lactoferrin Induces Cell Death in Human Prostate Cancer Cells. *Oxid Med Cell Longev*, **2022**: 2187696.
- RODER PV, GEILLINGER KE, ZIETEK TS, THORENS B, KOEPSSELL H, DANIEL H (2014). The role of SGLT1 and GLUT2 in intestinal glucose transport and sensing. *PLoS One*, **9**(2): e89977.
- RODRIGUES M, KOSARIC N, BONHAM CA, GURTNER GC (2019). Wound Healing: A Cellular Perspective. *Physiol Rev*, **99**(1): 665-706.
- RUMKE P, VISSER D, KWA HG, HART AA (1971). Radio-immuno assay of lactoferrin in blood plasma of breast cancer patients, lactating and normal women; prevention of false high levels caused by leakage from neutrophile leucocytes in vitro. *Folia Med Neerl*, **14**(4): 156-68.
- SAFAEIAN L, JAVANMARD SH, MOLLANOORI Y, DANA N (2015). Cytoprotective and antioxidant effects of human lactoferrin against H2O2-induced oxidative stress in human umbilical vein endothelial cells. *Adv Biomed Res*, **4**: 188-194.
- SALEHI B, RESCIGNO A, DETTORI T, CALINA D, DOCEA AO, SINGH L, CEBECI F, OZCELIK B, BHIA M, DOWLATI BEIRAMI A, SHARIFIRAD J, SHAROPOV F, CHO WC, MARTINS N (2020). Avocado-Soybean Unsaponifiables: A Panoply of Potentialities to Be Exploited. *Biomolecules*, **10**(1): 130-150.

- SANCHEZ L, CALVO M, BROCK JH (1992). Biological role of lactoferrin. *Arch Dis Child*, **67**(5): 657-61.
- SCHEEPERS A, JOOST HG, SCHURMANN A (2004). The glucose transporter families SGLT and GLUT: molecular basis of normal and aberrant function. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, **28**(5): 364-71.
- SCHINDELIN J, ARGANDA-CARRERAS I, FRISE E, KAYNIG V, LONGAIR M, PIETZSCH T, PREIBISCH S, RUEDEN C, SAALFELD S, SCHMID B, TINEVEZ JY, WHITE DJ, HARTENSTEIN V, ELICEIRI K, TOMANCAK P, CARDONA A (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods*, **9**(7): 676-82.
- SCISKALSKA M, ZALEWSKA M, GRZELAK A, MILNEROWICZ H (2014). The influence of the occupational exposure to heavy metals and tobacco smoke on the selected oxidative stress markers in smelters. *Biol Trace Elem Res*, **159**(1-3): 59-68.
- SEMEN Z (2019). Deve Sütü Laktoferrin'in Kolorektal Adenokarsinoma Hücre Hattı (Caco-2) Üzerine Antitümöral Etkinliği. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya (Veterinerlik) Anabilim Dalı
- SHARIFI-RAD M, ANIL KUMAR NV, ZUCCA P, VARONI EM, DINI L, PANZARINI E, RAJKOVIC J, TSOUH FOKOU PV, AZZINI E, PELUSO I, PRAKASH MISHRA A, NIGAM M, EL RAYESS Y, BEYROUTHY ME, POLITO L, IRITI M, MARTINS N, MARTORELL M, DOCEA AO, SETZER WN, CALINA D, CHO WC, SHARIFI-RAD J (2020). Lifestyle, Oxidative Stress, and Antioxidants: Back and Forth in the Pathophysiology of Chronic Diseases. *Front Physiol*, **11**: 694-711.
- SHIRAZI-BEECHEY SP (1995). Molecular biology of intestinal glucose transport. *Nutr Res Rev*, **8**(1): 27-41.
- SHIRAZI-BEECHEY SP, MORAN AW, BRAVO D, AL-RAMMAHI M (2011). Nonruminant Nutrition Symposium: intestinal glucose sensing and regulation of glucose absorption: implications for swine nutrition. *J Anim Sci*, **89**(6): 1854-62.
- SIENKIEWICZ M, JASKIEWICZ A, TARASIUK A, FICHNA J(2022). Lactoferrin: an overview of its main functions, immunomodulatory and antimicrobial role, and clinical significance. *Crit Rev Food Sci Nutr*, **62**(22): 6016-6033.
- SPIK G, BRUNET B, MAZURIER-DEHAINE C, FONTAINE G, MONTREUIL J (1982). Characterization and properties of the human and bovine lactotransferrins extracted from the faeces of newborn infants. *Acta Paediatr Scand*, **71**(6): 979-85.

- SPITZ DR, AZZAM EI, LI JJ, GIUS D (2004). Metabolic oxidation/reduction reactions and cellular responses to ionizing radiation: a unifying concept in stress response biology. *Cancer Metastasis Rev*, **23**(3-4): 311-22.
- SUAREZ-ARNEDO A, TORRES-FIGUEROA F, CLAVIJO C, ARBELAEZ P, CRUZ JC, MUNOZ-CAMARGO J (2020). An image J plugin for the high throughput image analysis of in vitro scratch wound healing assays. *PLoS One*, **15**(7): e0232565.
- SUZUKI N (2019). Lactoferrin Promotes Proliferation and Wound Healing of Human Gingival Fibroblasts -in vitro study. *Nihon Shishubyo Gakkai Kaishi (Journal of the Japanese Society of Periodontology)*, **61**(1): 18-27.
- TAKAYAMA Y, AOKI R (2012). Roles of lactoferrin on skin wound healing. *Biochem Cell Biol*, **90**(3): 497-503.
- TAKEUCHI T, JYONOTSUKA T, KAMEMORI N, KAWANO G, SHIMIZU H, ANDO K, HARADA E (2006). Enteric-formulated lactoferrin was more effectively transported into blood circulation from gastrointestinal tract in adult rats. *Experimental Physiology*, **91**(6): 1033-1040.
- THEORET CL (2005). The pathophysiology of wound repair. *Vet Clin North Am Equine Pract*, **21**(1): 1-13.
- TOKUR O, AKSOY A (2017). In Vitro Sitotoksiste Testleri. *Harran Üniv Vet Fak Derg*, **6**(1): 112-118.
- TOWNSEND D, TEW K (2003). Cancer drugs, genetic variation and the glutathione-S-transferase gene family. *Am J Pharmacogenomics*, **3**(3): 157-72.
- TROOST FJ, SARIS WH, BRUMMER RJ (2002). Orally ingested human lactoferrin is digested and secreted in the upper gastrointestinal tract in vivo in women with ileostomies. *J Nutr*, **132**(9): 2597-600.
- VALAVANIDIS A, VLACHOGIANNI T, FIOTAKIS K (2009). Tobacco smoke: involvement of reactive oxygen species and stable free radicals in mechanisms of oxidative damage, carcinogenesis and synergistic effects with other respirable particles. *Int J Environ Res Public Health*, **6**(2): 445-62.
- VALENTI P, ANTONINI G(2005). Lactoferrin: an important host defence against microbial and viral attack. *Cell Mol Life Sci*, **62**(22): 2576-87.
- VALKO M, LEIBFRITZ D, MONCOL J, CRONIN MT, MAZUR M, TELSER J (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*, **39**(1): 44-84.

- VAN DER STRATE BW, BELJAARS L, MOLEMA G, HARMSSEN MC, MEIJER DK (2001). Antiviral activities of lactoferrin. *Antiviral Res*, **52**(3): 225-39.
- VAN VEEN HA, GEERTS ME, VAN BERKEL PH, NUIJENS JH (2004). The role of N-linked glycosylation in the protection of human and bovine lactoferrin against tryptic proteolysis. *Eur J Biochem*, **271**(4): 678-84.
- VEREECKE L, BEYAERT R, VAN LOO G (2011). Enterocyte death and intestinal barrier maintenance in homeostasis and disease. *Trends Mol Med*, **17**(10): 584-93.
- WADA Y, LONNERDAL B (2020). Bioactive peptides derived from human milk proteins: an update. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, **23**(3): 217-222.
- WANG B, TIMILSENA YP, BLANCH E, ADHIKARI B (2017). Mild thermal treatment and in-vitro digestion of three forms of bovine lactoferrin: Effects on functional properties. *International Dairy Journal*, **64**: 22-30.
- WANG B, TIMILSENA YP, BLANCH E, ADHIKARI B (2019). Lactoferrin: Structure, function, denaturation and digestion. *Crit Rev Food Sci Nutr*, **59**(4): 580-596.
- WANG B, ZHAO J, LU W, MA Y, WANG X, AN X, FAN Z (2022). The preparation of lactoferrin/magnesium silicate lithium injectable hydrogel and application in promoting wound healing. *Int J Biol Macromol*, **220**: 1501-1511.
- WANG Y, BRANICKY R, NOE A, HEKIMI S (2018). Superoxide dismutases: Dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling. *J Cell Biol*, **217**(6): 1915-1928.
- WARD, PP, PAZ E, CONNEELY OM (2005). Multifunctional roles of lactoferrin: a critical overview. *Cell Mol Life Sci*, **62**(22): 2540-8.
- YAMADA K, NAKATA M, HORIMOTO N, SAITO M, MATSUOKA H, INAGAKI N (2000). Measurement of glucose uptake and intracellular calcium concentration in single, living pancreatic beta-cells. *J Biol Chem*, **275**(29): 22278-83.
- YAMAMOTO N, UEDA-WAKAGI M, SATO T, KAWASAKI K, SAWADA K, KAWABATA K, AKAGAWA M, ASHIDA H (2015). Measurement of Glucose Uptake in Cultured Cells. *Curr Protoc Pharmacol*, **71**: 12.14.1-12.14.26.
- YAMANO E, MIYAUCHI M, FURUSYO H, KAWAZOE A, ISHIKADO A, MAKINO T, TANNE K, TANAKA E, TAKATA T (2010). Inhibitory effects of orally administrated liposomal bovine lactoferrin on the LPS-induced osteoclastogenesis. *Lab Invest*, **90**(8): 1236-46.

YILDIRIM GS (2022). YÜKSEK YAĞLI DİYET ile BESLENEN ve TAM KAT DERİ DEFEKTİ MODELİ OLUŞTURULAN SIÇANLARDA LAKTOFERRİNİN ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI. Bilim Uzmanlık Tezi, Gaziantep Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fizyoloji Anabilim Dalı

YOUNT NY, ANDRES MT, FIERRO JF, YEAMAN MR (2007). The gamma-core motif correlates with antimicrobial activity in cysteine-containing kaliocin-1 originating from transferrins. *Biochim Biophys Acta*, **1768**(11): 2862-72.

ZHANG JL, HAN X, SHAN YJ, ZHANG LW, DU M, LIU M, YI HX MA Y (2018). Effect of bovine lactoferrin and human lactoferrin on the proliferative activity of the osteoblast cell line MC3T3-E1 in vitro. *J Dairy Sci*, **101**(3): 1827-1833.

ZHENG Y, SCOW JS, DUENES JA, SARR MG (2012). Mechanisms of glucose uptake in intestinal cell lines: role of GLUT2. *Surgery*, **151**(1): 13-25.

ZOU C, WANG Y, SHEN Z (2005). 2-NBDG as a fluorescent indicator for direct glucose uptake measurement. *J Biochem Biophys Methods*, **64**(3): 207-15.