

Sıçanlarda Deneysel Mide Ülseri Modelinde Yeşil Çay Ekstraktı ve Peynir Altı Suyu Proteinlerinin Etkileri

Ayliz Velioğlu Öğünç¹, ✉, Ahmet Özer Şehirli^{2,6}, Berna Karakoyun Laçın³, Feriha Ercan⁴, Hülya Güçlü¹, Güler Topçu⁵

¹Marmara Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Tıbbi Laboratuvar Teknikleri Programı, İstanbul

²Marmara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakoloji Anabilim Dalı, İstanbul

³Marmara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Hemşirelik Bölümü, İstanbul

⁴Marmara Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı, İstanbul

⁵Dr. Siyami Ersek Göğüs, Kalp ve Damar Cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Biyokimya Laboratuvarı, İstanbul

⁶Yakın Doğu Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi, Kuzey Kıbrıs Türk Cumhuriyeti

Geliş Tarihi (Received): 25.11.2015, Kabul Tarihi (Accepted): 21.12.2015

✉ *Yazışmalardan Sorumlu Yazar (Corresponding author): avogunc@marmara.edu.tr (A.V.Öğünç)*

☎ 0 216 336 47 66 📠 0 216 541 00 75

ÖZ

Bu çalışmada, çok yönlü tedavi edici etkileri tartışılan yeşil çay ile antioksidan ve bağışıklık sistemini destekleyen etkileriyle ön plan çıkan peynir altı suyu proteinlerinin, sıçanlarda asetik asit uygulamasıyla oluşturulan mide ülseri modeli üzerinde koruyucu ve iyileştirici etkilerinin aydınlatılması amaçlanmıştır. Her iki gıdanın ülser üzerine etkilerini araştırmak amacıyla, on günlük uygulamaları içeren iki hayvan deneyi aşaması oluşturulmuştur. Toplanan dokularda, lipid peroksidasyon, glutatyon, miyeloperoksidaz enzim aktivitesi, reaktif oksijen türleri, Tümör Nekroz Faktör-α ve İnterlökin-1β ölçümleri ile histolojik değerlendirmeler yapılmıştır. Çalışma sonucunda, peynir altı suyu proteinlerinin ve yeşil çayın birlikte tüketimiyle, ülser nedeniyle oluşacak reaktif oksijen türleri üretimini ve lipid peroksidasyonunu tek başlarına kullanımlarına göre daha fazla önlediği saptanmıştır. Doku hasarını belirleyen bulgular ve histolojik değerlendirmeler de bu sonucu desteklemiştir. Sonuç olarak, mide ülseri için iyileştirici ve önleyici özellikleri belirgin olsa da, yeşil çay ve peynir altı suyu proteinlerinin klinik uygulamaları destekleyen "fonksiyonel gıda alternatifi" olabileceği, ancak ilaç tedavilerinin önüne geçemeyeceği görülebilir.

Anahtar Kelimeler: Mide ülseri, Peynir altı suyu proteinleri, Yeşil çay, Oksidatif hasar, Fonksiyonel gıdalar

Effect of Green Tea Extract and Whey Proteins on Experimental Gastric Ulcer Model in Rats

ABSTRACT

Green tea has multiple effects on human health while whey proteins exhibit antioxidative and supporting effects on immunity. In this present study, preventive and curative effects of green tea and whey proteins were investigated on rat gastric ulcer model. To determine their effects, experiments were planned at two stages involving 10-day-administration. Lipid peroxidation, glutathione, myeloperoxidase, reactive oxygen species, levels of TNF-α and IL-1β and histological evaluations were determined in collected tissues. As a result, combined consumption of these foods reduced the production of reactive oxygen species and lipid peroxidation, and this type of consumption had a synergistic effect for the prevention of gastric ulcer in a rat model. Biochemical and histological data in assessed tissue damages were also compatible. In conclusion, although their curative and preventive properties for gastric ulcer were significant, combined consumption of green tea and whey proteins can be considered as "functional food alternative" to support clinical therapy; however, they should not replace drug therapies.

Keywords: Gastric ulcer, Whey proteins, Green tea, Oxidative damage, Functional foods

GİRİŞ

Kaliteli yaşam sürebilmek için gıdalarımızın besleyici nitelikte olması şarttır. Son yıllarda bazı besin maddelerinin besleyicilik niteliklerinin yanında önemli hastalıkları önleyici ve tedavi edici özelliklerini vurgulayan çok sayıda bilimsel araştırma bulgusu bildirilmiştir. Bu çalışmalar sayıları artarak devam etmektedir [1]. Araştırmamızda, besinlerin terapötik özelliklerini ortaya çıkarabilme çabasına katılarak, ciddi yan etkileri olmayan ve çok yönlü olumlu etkisi bildirilmiş iki gıda maddesinin, toplumda yaygın bir sağlık sorunu olan mide ülseri üzerine etkilerini gösterilmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla yeşil çay ve peynir altı suyu proteinlerinin etkilerini, *in vivo* modelimizdeki deneylerle araştırdık.

Araştırmada kullanılan her iki gıda maddesinin ortak özelliği reaktif oksijen türlerini (ROT) önleyici etkilerinin diğer biyoyararlarının arasında öne çıkmasıdır. Yeşil çay içerdiği kateşinler adını alan polifenolik bileşikler nedeniyle, peynir altı suyu proteinleri ise zengin bir sistein amino asidi kaynağı olmasıyla organizmanın antioksidan savunmasında büyük değeri olan glutatyon (GSH) miktarını arttırarak, ROT'ni süpürücü özellik göstermektedir [2-4]. Bu iki besin maddesinin ortak antioksidan gücü nedeniyle, mide ülseri modelindeki etkilerini, ROT düzeylerindeki değişimleri, dokularda lipid peroksidasyon (MDA) düzeyi, ROT kemilüminesans ölçümleri ve GSH düzeyi aracılığıyla saptadık. Doku iyileşmesinin takibinde ise miyeloperoksidaz ölçümü, histolojik incelemeler, ülser indeksi değerlendirmesi ve sitokin ölçümlerinden yararlanıldı.

Mide dokusunun mukozal bütünlüğü, hidroklorik asit, pepsin, safra, pankreatik enzimler gibi endojen faktörlerle, gastrik mukozal bariyer, mukus sekresyonu, mikrosirkülasyon, hücre rejenerasyonu ve endojen koruyucu ajanlar arasındaki denge ile sağlanır. Peptik ülser, bu dengelerin bozulmasıyla oluşan doku erezyonları, küçük ülseratif lezyonlar ve peteşiler ardından gelişir [5]. Serbest radikallerin ülserasyon döneminde anlamlı rolü olduğu bildirilmiştir [6].

Ülser tedavisi için günümüzde, H₂ reseptör antagonistleri, antibiyotikler, proton pompası inhibitörleri gibi değişik tedavi protokolleri uygulanmakta ve tedavide başarılı olunan olgular olmasına karşın, her geçen gün tam olarak tedavi edilememiş veya yeni teşhis konmuş olgular hasta grubuna katılmaktadır [7]. Sorun hem ülser oluşumunun önlenmesi hem de tedavi edilmesi noktalarında yoğunlaştığı için araştırmamız, ülserden korunmada yeşil çay ve peynir altı suyu proteinlerinin etkilerinin değerlendirilmesi ve ülser oluşumu sonrası tedavi amaçlı uygulanması şeklinde iki basamakta yapılmıştır. İki gıdanın tek başlarına etkileri çok sayıda araştırmaya konu olmuşken, ilk kez mide ülseri üzerine kombine etkileri ve karşılaştırılmaları araştırılmıştır. Daha önce peynir altı suyu proteinlerinin etanolle indüklenmiş mide ülseri modelinde etkileri araştırılmış, ancak bu araştırmada protein içeriği daha düşük olan peynir altı suyu tozu kullanılmıştır [8].

Çalışmamızın bulgularıyla, bireylerin mide ülserinden korunmaları ve hastaların tedavileri için değerlendirilebilecek bir alternatif sunabilmeyi, gerek yeşil çay ve gerekse peynir altı suyu proteinlerinin terapötik etkilerine bir yenisini ekleyip, bu etkinin mekanizmasının açıklanabilmesi adına yol almayı amaçladık. Ayrıca mide ülserinde ilaç tedavisinin yanında uygulanabilecek yeşil çay ve peynir altı suyu proteinlerinin dahil olduğu bir beslenme protokolü için *in vivo* bulgulara dayanan veriler elde edilmesi de amaçlandı.

MATERYAL ve YÖNTEM

Bu çalışmada dişi/erkek Wistar albino sıçanları (250-300g) kullanıldı. Sıçanlar ısı ve ışık kontrolü sağlanmış ortamda takip edilerek ve ülser oluşturulmasından 12 saat öncesinden itibaren sadece su içebilecek şekilde aç bırakıldı. Deney süresince ışık düzeni 12 saat gündüz, 12 saat gece olacak şekilde ayarlandı. Gece açlığını takiben ketamin (10 mg/kg; i.p.) ve klorpromazin (0.75 mg/kg, i.p.) anestezisi altında orta hat kesisi yapılarak ve sıçanların mideleri dikkatlice dışarıya çıkarıldı. 0.5 mL asetik asidin (%80, hacim/hacim), mide korpusuna yerleştirilen 3 mL'lik şırınga yardımı ile serozal yüzeyle 1 dakika boyunca teması sağlandı. Daha sonra, sıvı ortamdan dikkatlice uzaklaştırıldı ve ülser alanı fizyolojik tuzlu su ile yıkandı [9]. Bu şekilde asetik asit ile temas eden yüzey alanı yaklaşık 60 mm² oldu.

Peynir altı suyu proteini ve yeşil çayın mide ülserini önleme ve tedavi etme şeklindeki iki farklı yöndeki etkilerini araştırabilmek için, sıçanlar iki ana gruba ayrıldı. Birinci ana gruptaki sıçanlar (ön tedavi deneyi) kendi içinde 4 alt gruba ayrılıp, ülser oluşturmada önce 10 gün boyunca serum fizyolojik (SF; i.p.) veya yeşil çay ekstraktı (50 mg/kg Solgar, gastrik gavaj) veya diyet yoluyla peynir altı suyu proteini (6 g/100 g sıçan başına, GNC pure whey) veya hem yeşil çay hem de peynir altı suyu proteini tedavisi aldı. Birinci ana gruptaki sıçanlar ülser oluşturulduktan 24 saat sonra dekapite edilerek mide, karaciğer ve kan örnekleri alındı.

İkinci ana gruptaki sıçanlar da (kronik ülser-terapötik etki deneyi), kendi içinde 4 alt gruba ayrılarak, ülser oluşturulduktan sonra 10 gün boyunca serum fizyolojik (SF; i.p.) veya yeşil çay ekstraktı (50 mg/kg, gastrik gavaj, Solgar) veya diyet yoluyla peynir altı suyu proteini (6 g/100 g sıçan başına) veya hem yeşil çay hem de peynir altı suyu proteini tedavisi aldı. 10 günlük tedavi sonunda dekapite edilerek, mide karaciğer ve kan örnekleri alındı. Çalışmamızda uygulanan ülser modelinde, ülserin 2-3 gün içinde kronikleştiği ve herhangi bir perforasyon veya çevre organlara penetre olmadan 2-3 hafta içinde tamamen iyileştiği gösterilmiştir [10, 11]. Çalışmamızdaki 10 günlük tedavi süresi bu verilere göre belirlenmiştir.

Peynir Altı Suyu Proteini İçeren Diyet

Diyet yolu ile peynir altı suyu proteini alacak sıçanlar için günlük (6 g/100 g, sıçan başına) miktarında peynir altı suyu proteini, standart sıçan yemi tozu ile 1:1 oranında

karıştırılıp, %15 oranında su eklenerek hamur haline getirildi. Pelet formu verilerek, etüvde 40°C'de dört saat bekletilip, kurutularak kullanıma hazır hale geldi [12].

Biyokimyasal Analizler

Doku Miyeloperoksidaz (MPO) Aktivitesi Ölçümü

Doku MPO aktivitesi, 0.2-0.5 g doku örneklerinde ölçüldü. Dokular ilk önce 20 mM K_2HPO_4 (pH:7.4) çözeltisi ile 10 kez sulandırılıp homojenize edildikten sonra 12000 devir/dakika hızda 10 dakika süre ile 4°C'de santrifüjlendi. Pelet, aynı hacimde %0.5'lik heksadesiltrimetilamonyum hidroksit içeren 50 mM K_2HPO_4 ile yeniden homojenize edildi. MPO aktivitesi, o-dianizidin 2 HCl'in H_2O_2 'e bağımlı oksidasyonunun spektrofotometrik ölçülmesi ile saptandı. Bir ünite enzim aktivitesi, 37°C'de, 460 nm absorbansta (1.0 mL/dk) meydana gelen değişiklik olarak saptandı [13].

Lipid Peroksidasyonu (LP) ve Glutasyon (GSH) Ölçümü

Lipid peroksidasyonu ölçümü için doku örneklerinden %10'luk trikloroasetik asit (TCA) ile %10'luk homojenat hazırlandı. Bu homojenatlar santrifüjlendikten sonra süpernatant örnekleri %0.67'lik tiyobarbitürik asit (TBA) ile kaynar su banyosunda inkübe edilip 535 nm dalga boyunda absorban değerleri okundu. Sonuçlar nmol MDA (malondialdehit)/g doku şeklinde ifade edildi [14]. Glutasyon ölçümlerinde de aynı süpernatantlardan faydalanıldı. Süpernatant örneklerinde 0.3 M Na_2HPO_4 ve Ellman ayırıcı (DTNB ve sodyum sitrat tamponu) eklendi. Karanlıkta 10 dakika bekletilen tüpler 412 nm dalga boyunda köre karşı okundu. Sonuçlar nmol GSH/g doku şeklinde ifade edildi [15].

Kemilüminesans Yöntemi

Doku örneklerindeki ROT'lerinin ölçümü kemilüminesans yöntemi ile yapıldı. Bu amaçla hücre süspansiyonlarına luminol (5- amino-2,3 -dihidro-1,4-ftalazindion, 0.2mM) veya lusigenin (bis-N-metillakridinyum nitrat, 0.2mM) araçları (prob) eklendi. Lusigenin süperoksit radikali, luminol ise hidroksil anyonu, hidrojen peroksit, hipoklorit ve hidroperoksit radikallerine duyarlıdır. Luminol ve lusigenin eklenen tüpler, luminometrede (Berthold EG & G Minilumat LB 9506, Almanya) 1 dakikalık aralıklarla 10 dakika süreyle sayılarak ve sonuçlar eğri altında kalan alan (AUC) relatif ışık ünitesi (RLU) olarak ifade edildi [16].

Sitokinlerin Ölçümü

Her iki sitokin ölçümü de, ülserde doku iyileşmesi için anlamlı kabul edilecek değişimleri incelemek amacıyla yapıldı. Sıçan serum örneklerinde TNF- α ve IL-1 β düzeyleri ticari ELISA kiti (Biosource) aracılığıyla ölçüldü.

Ülser İndeksinin Değerlendirilmesi

Ülser oluşturulduktan 24 saat ve 10 gün sonra, sıçanların mideleri büyük kurvatürden açıldı ve lezyonlar makroskopik olarak ülser uzunlukları (ülser indeks, mm) ölçülerek değerlendirildi.

Histolojik Değerlendirme ve Analiz

Ülser oluşturulduktan 10 gün sonra (kronik dönem) sıçanlardan alınan mide örnekleri %10'luk nötral tamponlu formaldehit içinde fikse edildi. Fikse edilen doku parçalarından 5 μ m kalınlığında kesitler alınarak ve histolojik inceleme için Hematoksilin ve Eozin (H+E) ile boyandı. Tüm örnekler ışık mikroskobu altında (Olympus-BH-2) incelendi. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) incelemeleri için, mide örnekleri 2 saat boyunca önce %2.5'lik fosfat tamponlu glutaraldehit solüsyonu içinde daha sonra da 1 saat boyunca %1'lik osmium tetroksit solüsyonu içinde fikse edildi. Örnekler, artan etil alkol ve amil asetat serilerinden geçirildi. Doku örnekleri "BİORAD" nokta kurutucusu ile kurutulduktan sonra BİORAD SC502 yardımıyla altın ile kaplanıp, SEM'de (JEOL 5200 JSM) incelendi. Histopatolojik bulguların derecelendirilmesi şu şekilde yapıldı; 0=hasar yok, 1=hafif derecede hasar, 2=orta derecede hasar ve 3=ağır derecede hasar.

Hasar derecelendirilmesinde kullanılan kriterler; epitel deskuamasyon, hemoraji, glandüler düzensizlik, eosinofil infiltrasyonu, vasokonjesyon'du. Her bir örneğin skorlanması en az beş mikroskopik alan incelendi ve toplam hasar skoru her bir kriter için verilen skorların toplamı olarak hesaplandı [17].

İstatistiksel Analizler

Gruplar arasındaki istatistiksel olarak anlamlı farklılık ANOVA varyans analizi, Tukey-Kramer testi kullanılarak belirlendi. Farklılıklar p <0.05 düzeyinde anlamlı olarak kabul edildi ve hesaplamalar GraphPad Instat programı ile yapıldı (p <0.05, p <0.01, p <0.001, sırasıyla anlamlı, çok anlamlı, çok ileri düzeyde anlamlı).

ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

Ülser İndeksinin Değerlendirilmesi ve Skorlanması

Tablo 1 ve 3'te görüldüğü üzere, peynir altı suyu proteinleri, yeşil çay ve peynir altı suyu proteini + yeşil çay uygulaması yapılan ön tedavi ve kronik dönem gruplarında ülser indeksi ortalaması ve makroskopik skor, ülser grubuna göre düşük bulunmuş, en düşük değerler peynir altı suyu proteinleri + yeşil çay grubunda saptanmıştır.

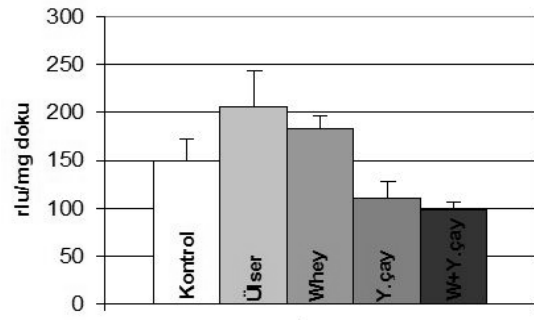
Reaktif Oksijen Türleri (ROT) Ölçümleri, Kemilüminesans (KL) Bulguları

Ön tedavi dönemine ait karaciğer dokusunda ROT ölçümlerinde, süperoksit radikali dışındaki ROT miktarını ifade eden luminol ve süperoksit radikali ifade eden

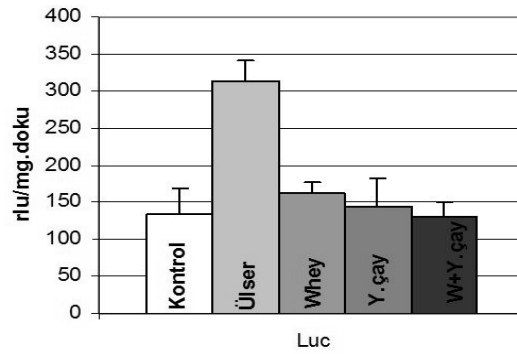
lusigenin kemilüminesans değerleri (RLU/mg doku) gruplarda (Şekil 1a-b)'de görüldüğü gibidir. Ölçülen luminol kemilüminesans değerleri gruplara göre; kontrol: 149.52 ± 22.9 , ülser: 206.7 ± 37.7 , peynir altı suyu proteinleri: 182.15 ± 15.3 , yeşil çay: 110.48 ± 17.6 ve peynir altı suyu proteini + yeşil çay: 98.18 ± 7.8 olarak bulunmuştur. Gruplar arasındaki anlamlılık karşılaştırmalarında; kontrole göre ülser grubu $p < 0.01$, yeşil çay $p < 0.05$ ve peynir altı suyu proteini + yeşil çay grubu $p < 0.01$ anlamlı fark göstermiştir. Ülser grubuna göre ise, yeşil çay $p < 0.001$, peynir altı suyu proteini + yeşil çay grubu değerleri $p < 0.001$ anlamlı fark göstermiştir. Ayrıca peynir altı suyu proteini ile yeşil çay grubu arasında $p < 0.001$, peynir altı suyu proteini ile

peynir altı suyu proteini + yeşil çay grubu arasında $p < 0.001$ bulunmuştur.

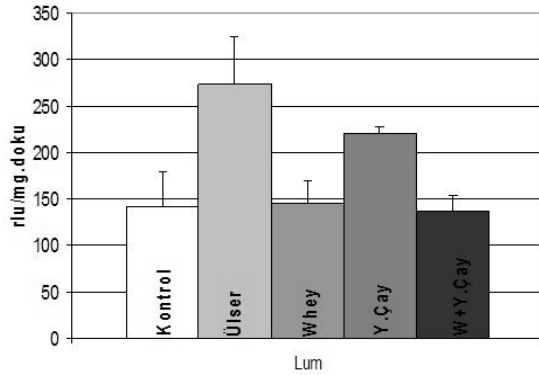
Karaciğer dokusu lusigenin KL değerleri gruplara göre; kontrol: 133.74 ± 35.2 , ülser: 313.06 ± 27.4 , peynir altı suyu proteini: 163.15 ± 13.3 , yeşil çay: 143.15 ± 40.4 , peynir altı suyu proteini + yeşil çay: 129 ± 21.2 . Gruplar arasındaki karşılaştırmalarda; kontrole göre ülser grubu $p < 0.001$, ülser grubuna göre ise, peynir altı suyu proteini $p < 0.001$, yeşil çay $p < 0.001$ ve peynir altı suyu proteini + yeşil çay grubu değerleri $p < 0.001$ anlamlı fark göstermiştir. Diğer grup karşılaştırmaları arasında anlamlı fark görülmemiştir.



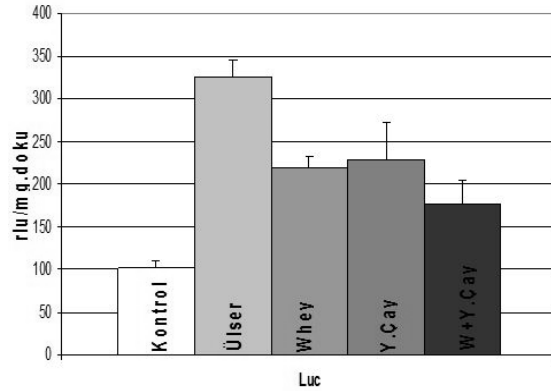
(A)



(B)



(C)



(D)

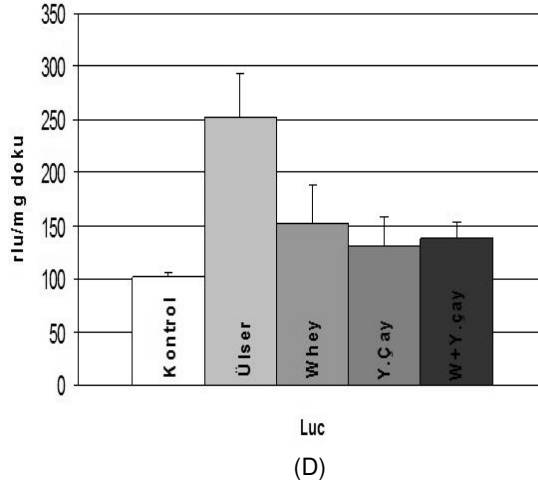
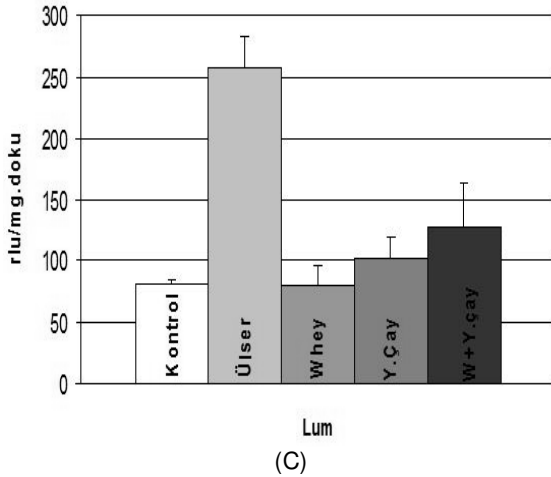
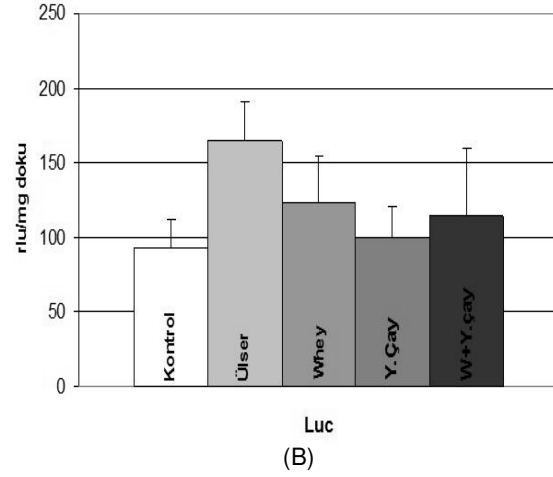
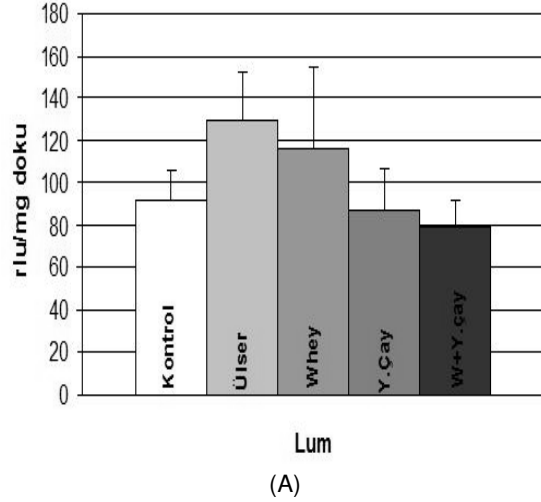
Şekil 1. Karaciğer akut dönem luminol KL (A) ve lusigenin KL (B) bulguları ile mide akut dönem luminol KL (C) ve lusigenin KL (D) bulguları

Mide dokularına ait ROT ölçümleri (Şekil 1c-d)'de görülmektedir. Mide bulgularında da karaciğer ölçümlerine benzer şekilde en düşük değer peynir altı suyu proteini + yeşil çay grubunda görülmektedir. Ön tedavi dönemi, mide luminol KL değerleri gruplara göre; kontrol: 141.6 ± 37.6 , ülser: 213.8 ± 50.3 , peynir altı suyu proteini: 145.34 ± 24 , yeşil çay: 220.14 ± 7.7 , peynir altı suyu proteini + yeşil çay: 136.63 ± 17.6 'dır. Gruplar arasındaki karşılaştırmalarda; kontrole göre ülser ve yeşil çay grupları $p < 0.001$, peynir altı suyu proteini ve peynir altı suyu proteini + yeşil çay grubu $p < 0.05$ düzeyinde anlamlı fark göstermiştir. Ayrıca peynir altı suyu proteini grubu ile yeşil çay grubu arasında $p < 0.01$, yeşil çay ile peynir altı suyu proteini + yeşil çay grubu arasında $p < 0.001$ düzeyinde anlamlı fark bulunmuştur.

Mide lusigenin KL değerleri gruplara göre; kontrol: 102.13 ± 7.5 , ülser: 324.88 ± 19.1 , peynir altı suyu proteini: 219.61 ± 12.1 , yeşil çay: 228.51 ± 43.4 , peynir altı suyu proteini + yeşil çay: 176.53 ± 28.8 olarak bulundu. Kontrole göre, ülser grubu $p < 0.001$, peynir altı suyu proteini $p < 0.001$, yeşil çay $p < 0.001$ ve peynir altı suyu proteini + yeşil çay grubu $p < 0.001$ düzeyinde anlamlı fark göstermiştir. Ülser grubuna göre, peynir altı suyu proteini grubu $p < 0.001$, yeşil çay $p < 0.001$, peynir altı suyu proteini + yeşil çay $p < 0.001$ düzeyinde anlamlı fark göstermiştir. Ön tedavi KL bulgularının genelinde peynir altı suyu proteini + yeşil çay uygulamasının en güçlü antioksidan etkiye yol açtığı görülmüştür. Bu doğrultuda peynir altı suyu proteini ve yeşil çayın birlikte sinerjist etki gösterdiği yorumlanabilir.

Kronik ülser modelinde, karaciğer luminol KL bulguları gruplara göre sırasıyla, kontrol: 92 ± 14.1 , ülser: 129.9 ± 21.9 , peynir altı suyu proteini: 116.08 ± 38 , yeşil çay: 87.52 ± 19.5 ve peynir altı suyu proteini + yeşil çay: 78.76 ± 13.2 (Şekil 2a). Gruplar karşılaştırıldığında, ülser grubuna göre yeşil çay $p < 0.05$ ve peynir altı suyu proteini + yeşil çay grubu $p < 0.01$ düzeyinde anlamlı fark gösterirken, diğer gruplar arasında anlamlı fark

bulunmamıştır. Karaciğer lusigenin KL ölçümleri gruplara göre; kontrol: 93.13 ± 18.2 , ülser: 164.28 ± 26.2 , peynir altı suyu proteini: 122.46 ± 32.4 , yeşil çay: 99.6 ± 20.5 ve peynir altı suyu proteini + yeşil çay: 114.26 ± 45.6 (Şekil 2b). Kontrol grubuna göre ülser $p < 0.01$, ülser grubuna göre yeşil çay $p < 0.01$ anlamlı fark gösterirken, diğer grup karşılaştırmalarında anlamlı fark görülmemiştir.



Şekil 2. Karaciğer kronik dönem luminol KL (A) ve lusigenin KL (B) bulguları ile mide kronik dönem luminol KL (C) ve lusigenin KL (D) bulguları

Toplanan mide dokularındaki luminol KL bulguları gruplara göre; kontrol: 81.6 ± 3.7 , ülser: 258.12 ± 25.3 , peynir altı suyu proteini: 79.66 ± 16.9 , yeşil çay: 101.7 ± 18 ve peynir altı suyu proteini + yeşil çay: 127.6 ± 35.5 olarak bulunmuştur. En düşük değer peynir altı suyu proteini grubunda görülmüştür. Gruplar karşılaştırıldığında, kontrol grubuna karşı ülser $p < 0.001$, peynir altı suyu proteini + yeşil çay $p < 0.05$, ülser grubuna göre peynir altı suyu proteini, yeşil çay ve peynir altı suyu proteini + yeşil çay grubu $p < 0.001$ düzeyinde anlamlı fark göstermiştir. Peynir altı suyu proteini grubuna göre peynir altı suyu proteini + yeşil çay grubu $p < 0.01$ düzeyinde anlamlı fark göstermiştir (Şekil 2c).

Mide lusigenin KL ölçümleri gruplara göre, Kontrol: 101 ± 5.5 , Ülser: 252.72 ± 40.1 , peynir altı suyu proteini: 152.34 ± 36.4 , Yeşil Çay: 131 ± 27 ve peynir altı suyu proteini + yeşil çay: 138.18 ± 15.5 . Gruplar karşılaştırmaları sonucunda, kontrol grubuna karşı ülser grubu $p < 0.001$, peynir altı suyu proteini grubu $p < 0.05$, ülser grubuna göre peynir altı suyu proteini, yeşil çay ve peynir altı suyu proteini + yeşil çay grubu $p < 0.001$ anlamlı fark göstermiştir. Diğer grup karşılaştırmaları anlamlı fark göstermezken, en düşük değer yeşil çay grubunda görülmüştür (Şekil 2d). Kronik model KL bulgularında da peynir altı suyu proteini + yeşil çayın sinerjistik etkisi görülmüşken, peynir altı suyu proteinin ve yeşil çayın tek başına da uygulamaları da etkili olabilmektedir.

Karaciğer ve Mide Dokularında Lipid Peroksidasyon (LP) ve Glutasyon (GSH) Değerleri

Reaktif oksijen türlerinin yol açtığı hücre membran hasarının bir bulgusu olarak doku LP düzeyi, dokularda ölçülen malondialdehit (MDA, nmol/g doku) metaboliti miktarlarıyla belirlenmiştir. Oksidan hasara karşı en önemli savunma mekanizmalarından olan GSH değerlerindeki değişim de doku GSH ölçümleriyle değerlendirilmiştir. Ön tedavi dönemine ait karaciğer ve mide MDA ve GSH bulguları Tablo 1'de görülmektedir. Karaciğer dokusu LP bulgularında en düşük değer

peynir altı suyu proteini + yeşil çay grubunda saptanırken, bu grup ülser grubuna göre $p<0.05$ anlamlı fark göstermiştir. Diğer grup karşılaştırmalarında anlamlı fark görülmemiştir. Mide dokusu LP bulgularında ise, en düşük değer peynir altı suyu proteini grubunda görüldü. Grup karşılaştırmalarında, kontrole göre ülser grubu $p<0.001$, yeşil çay $p<0.05$ ve peynir altı suyu proteini + yeşil çay grubu $p<0.01$ anlamlı fark göstermiştir. Ülser grubuna göre ise, peynir altı suyu proteini $p<0.001$, yeşil çay $p<0.01$ ve peynir altı suyu proteini + yeşil çay grubu $p<0.05$ farklılık göstermiştir.

Tablo 1. Ön tedavi uygulamasıyla toplanan mide, karaciğer ve serum örneklerinde MDA, GSH, MPO bulguları

Bulgular/Gruplar	Kontrol	Ülser	Peynir Altı Suyu Proteini	Yeşil Çay	Peynir Altı Suyu Proteini + Yeşil Çay
MDA (nmol/g doku) (mide)	15.73±1.49	36.74±8.3 ^{xxx}	20.52±4.8 ⁺⁺⁺	25.46±3.3 ^{x++}	27.82±5.7 ^{xx++}
MDA (nmol/g doku) (karaciğer)	13.48±0.68	19.08±8.5	14.38±2.3	15.31±0.7	11.85±0.4 ⁺
GSH (mikromol/g doku) (mide)	10.17±2.9	5.9±2.2 ^x	12.88±4.59 ⁺	13.7±4.1 ⁺⁺	14.13±2.6 ⁺⁺
GSH (mikromol/g doku) (karaciğer)	6.02±3.6	4.9±1.5	30.93±23.2 ^{xx++}	12.96±3.9 ⁺	20.49±5.02 ^{xx++}
MPO (U/g) (mide)	69.25±22	145.1±55.9 ^{xxx}	81.85±29.8 ⁺	88.56±25.27 ⁺	62.34±17.12 ⁺⁺⁺
MPO (U/g) (karaciğer)	27.27±3.5	52.09±8.9 ^{xxx}	37.16±5.4 ⁺⁺	34.21±10.8 ⁺⁺⁺	28.11±5.5 ⁺⁺⁺
Ülser İndeksi (mm)	0	23.8±0.3	6.8±2	7.16±3.6	2.28±1.5
Makroskopik skor	0	3	2	2	1

x,xx,xxx: Kontrol grubuna göre $p<0.05$, $p<0.01$, $p<0.001$, +, ++, +++: Ülser grubuna göre $p<0.05$, $p<0.01$, $p<0.001$

Karaciğer dokusu GSH bulgularında en yüksek değer peynir altı suyu proteini alan grupta görülmüştür. Kontrol grubuna göre, peynir altı suyu proteini ve peynir altı suyu proteini + yeşil çay grubu $p<0.01$, ülser grubuna göre peynir altı suyu proteini $p<0.01$, yeşil çay $p<0.05$ ve peynir altı suyu proteini + yeşil çay grubu $p<0.01$ anlamlı fark göstermiştir. Mide dokusu GSH bulgularında, en yüksek değer peynir altı suyu proteini + yeşil çay grubunda bulundu. Kontrole göre, ülser grubu $p<0.05$, ülser grubuna göre peynir altı suyu proteini $p<0.05$, yeşil çay $p<0.01$ ve peynir altı suyu proteini + yeşil çay $p<0.01$ farklılık göstermiştir.

Ön tedavide karaciğer dokusu için peynir altı suyu proteini uygulaması dikkat çekici şekilde GSH artışına yol açmıştır ve bu beklenen bir sonuçtur. Peynir altı suyu proteini yapısındaki zengin sistein amino asidi nedeniyle, karaciğerde GSH sentezi artabilir. Mide dokusu sonuçlarında ise peynir altı suyu proteini + yeşil çayın sinerjistik etkisi tekrar görülmektedir.

Kronik döneme ait karaciğer ve mide dokusu LP ve GSH bulguları Tablo-3'de görülmektedir. Kronik ülser modelinde karaciğer dokusundaki LP değerleri karşılaştırıldığında anlamlı fark görülmemiştir ve en yüksek GSH değeri peynir altı suyu proteini uygulanan gruptadır. GSH bulgularında, kontrol grubuna göre, ülser, peynir altı suyu proteini ve peynir altı suyu proteini + yeşil çay grubu $p<0.001$, yeşil çay grubu $p<0.01$, ülser grubuna göre ise, yeşil çay grubu $p<0.01$ anlamlı fark göstermiştir. Mide dokusundaki LP bulgularında, en düşük bulgu yeşil çay grubunda görülmüştür. Ülser grubuna göre yeşil çay grubu $p<0.05$ anlamlı fark gösterirken, diğer grup karşılaştırmaları anlamlı değildir. Mide dokusuna ait en yüksek GSH değeri peynir altı suyu proteini + yeşil çay uygulanan grupta görülmüştür. Ülser grubuna göre peynir altı suyu proteini + yeşil çay grubu $p<0.01$ anlamlı fark göstermiştir. Kronik modelde, ön tedavi bulgularına benzer şekilde, tek başına peynir altı suyu proteini uygulaması karaciğer dokusunda en yüksek GSH artışına, mide dokusunda ise peynir altı suyu proteini + yeşil çay uygulaması sinerjistik etkiyle en yüksek GSH artışına neden olmuştur.

Tablo 3. Kronik döneminde toplanan mide, karaciğer ve serum örneklerinde MDA, GSH, MPO bulguları

Bulgular/Gruplar	Kontrol	Ülser	Peynir Altı Suyu Proteini	Yeşil Çay	Peynir Altı Suyu Proteini + Yeşil Çay
MDA (nmol/g.doku) (mide)	15.73±1.5	39.85±7.0	36.15±16	22.5±6.4 ⁺	36.12±4.3
MDA (nmol/g.doku) (karaciğer)	13.48±0.68	17.91±3.7	15.18±3.1	16.11±4.0	15.28±6.1
GSH (mikromol/g.doku) (mide)	10.17±9.0	9.72±2.5	10.16±1.8	5.16±3.0	15.2±2.2 ⁺⁺
GSH (mikromol/g.doku) (karaciğer)	6.02±3.6	32.36±10.3 ^{xxx}	39.06±2.07 ^{xxx}	18.21±1.2 ^{xx+++}	29.92±3.5 ^{xxx}
MPO (U/g) (mide)	69.25±22	158.9±25.2 ^{xxx}	81.93±41.4 ⁺⁺	95.37±42.9 ⁺⁺	91.23±15.1 ^{x++}
MPO (U/g) (karaciğer)	27.27±3.5	136.3±23 ^{xxx}	122.7±22.5 ^{xxx}	134.7±11.7 ^{xxx}	118.4±13.6 ^{xxx}
Ülser İndeksi (mm)	0	21.7±6.0	5.9±4.0	7.58±8.0	3.2±4.0
Makroskopik skor	0	3	2	2	1

x,xx,xxx: Kontrol grubuna göre $p<0.05$, $p<0.01$, $p<0.001$, +, ++, +++: Ülser grubuna göre $p<0.05$, $p<0.01$, $p<0.001$

Doku Miyeloperoksidaz (MPO) Enzim Değerleri

Dokulardaki hasarın değerlendirilmesinde MPO(U/g) değerleri hem mide hem de karaciğer dokularında araştırılarak, ön tedavinin ve kronik ülser sürecinin bulguları içinde değerlendirilerek yorumlandı.

Ön tedavi döneminde, karaciğer ve mide dokularında en düşük MPO değeri peynir altı suyu proteini + yeşil çay grubunda görüldü (Tablo 1) ve sinerjist etkiyi işaret etti. Karaciğer dokusunda MPO ölçümlerinde kontrole göre, ülser $p<0.001$, ülser göre peynir altı suyu proteini $p<0.01$, yeşil çay ve peynir altı suyu proteini + yeşil çay $p<0.001$ anlamlı fark gösterdi. Mide MPO bulgularında ise, kontrole göre ülser grubu $p<0.001$, ülser grubuna göre peynir altı suyu proteini ve yeşil çay $p<0.05$, peynir altı suyu proteini + yeşil çay $p<0.001$ anlamlı farklılık gösterdi.

Kronik dönemde karaciğer dokusu MPO değerleri gruplara göre şu şekilde belirlendi (Tablo 3): En düşük değer peynir altı suyu proteini + yeşil çay grubunda görüldü. Gruplar karşılaştırıldığında, kontrol grubuna göre ülser, peynir altı suyu proteini, yeşil çay ve peynir altı suyu proteini + yeşil çay grubu $p<0.001$ anlamlı fark gösterirken diğer grup karşılaştırmaları anlamlı fark göstermedi.

Kronik dönemde mide dokusu MPO değerleri gruplara göre şu şekilde belirlendi (Tablo 3): En düşük değer

peynir altı suyu proteini grubunda görüldü. Gruplar karşılaştırıldığında, kontrol grubuna göre ülser $p<0.001$, peynir altı suyu proteini + yeşil çay $p<0.05$, ülser grubuna göre peynir altı suyu proteini, yeşil çay ve peynir altı suyu proteini + yeşil çay $p<0.01$ anlamlı fark göstermiştir.

Sitokin Bulguları (TNF- α ve IL-1 β)

Ön tedavi sonrasında oluşturulan ülser modelinin akut döneminde oluşan inflamasyon sürecinin tedaviyle ne yönde etkilendiğini anlamak için, sıçan serumlarında TNF- α ve IL-1 β düzeyleri ölçüldü ve her iki sitokin için de en düşük değer peynir altı suyu proteini + yeşil çay grubunda saptandı (Tablo 2). TNF- α (pg/mL) bulgularında kontrole göre, ülser grubu $p<0.01$, peynir altı suyu proteini $p<0.001$ ve yeşil çay $p<0.00$ anlamlı fark gösterirken, ülser grubuna göre, peynir altı suyu proteini + yeşil çay $p<0.001$, peynir altı suyu proteini ile peynir altı suyu proteini + yeşil çay arasında ise $p<0.001$ anlamlı fark bulundu.

Serum örneklerinde IL-1 β (pg/mL) düzeyi gruplarda şu şekilde, en yüksek değer peynir altı suyu proteini + yeşil çay grubunda izlendi. Kontrol grubuna göre peynir altı suyu proteini + yeşil çay $p<0.05$, ülser grubuna göre yine peynir altı suyu proteini + yeşil çay $p<0.05$ anlamlı fark gösterirken, diğer grup karşılaştırmaları anlamlı değildi.

Tablo 2. Ön tedavi uygulamasıyla toplanan serum örneklerinde IL-1 β , TNF- α bulguları:

Bulgular/Gruplar	Kontrol	Ülser	Peynir Altı Suyu Proteini	Yeşil Çay	Peynir Altı Suyu Proteini + Yeşil Çay
IL-1 β (pg/mL)	103.7 $\pm$ 11.07	113.55 $\pm$ 17.2	134.65 $\pm$ 28.3	137.62 $\pm$ 33.4	173.59 $\pm$ 59.06 ^{x,++}
TNF- α (pg/mL)	75.06 $\pm$ 5.2	115.34 $\pm$ 20.2 ^{xx}	136.64 $\pm$ 25.7 ^{xxx}	121.18 $\pm$ 24.7 ^{xx}	68.29 $\pm$ 3.4 ⁺⁺

x,xx,xxx:Kontrol grubuna göre $p<0.05$, $p<0.01$, $p<0.001$

+,++,+++ :Ülser grubuna göre $p<0.05$, $p<0.01$, $p<0.001$

Kronik dönemde serum örneklerinde en yüksek TNF- α (pg/mL) ülser grubunda, en düşük değer peynir altı suyu proteini + yeşil çay grubunda saptandı (Tablo 4): Gruplar karşılaştırıldığında, kontrol grubuna göre ülser grubu $p<0.001$, peynir altı suyu proteini grubu $p<0.01$, yeşil çay grubu ise $p<0.05$ anlamlı fark gösterdi. Ülser

grubuna göre peynir altı suyu proteini $p<0.05$, yeşil çay $p<0.01$, peynir altı suyu proteini + yeşil çay $p<0.001$ anlamlı fark gösterirken, peynir altı suyu proteini grubu ile peynir altı suyu proteini + yeşil çay arasında $p<0.01$, yeşil çay grubu ile peynir altı suyu proteini + yeşil çay arasında ise $p<0.05$ anlamlı fark görüldü.

Tablo 4. Kronik dönemde toplanan serum örneklerinde IL-1 β , TNF- α bulguları

Bulgular/Gruplar	Kontrol	Ülser	Peynir Altı Suyu Proteini	Yeşil Çay	Peynir Altı Suyu Proteini + Yeşil Çay
IL-1 β (pg/mL)	103.7 $\pm$ 11.07	118.49 $\pm$ 8.2	98.35 $\pm$ 5.0 ⁺	105.92 $\pm$ 14.3	141.81 $\pm$ 9.2 ^{xxx,++}
TNF- α (pg/mL)	75.06 $\pm$ 5.2	158.87 $\pm$ 12.0 ^{xxx}	121 $\pm$ 20.1 ^{xx,+}	110.68 $\pm$ 34.3 ^{x,++}	73.67 $\pm$ 1.4 ⁺⁺⁺

x,xx,xxx:Kontrol grubuna göre $p<0.05$, $p<0.01$, $p<0.001$

+,++,+++ :Ülser grubuna göre $p<0.05$, $p<0.01$, $p<0.001$

Kronik dönemde serum örneklerinde IL-1 β (pg/mL) düzeyi en yüksek değer peynir altı suyu proteini + yeşil çay grubunda izlendi (Tablo 4). Gruplara ait bulgular karşılaştırıldığında, kontrol grubuyla peynir altı suyu proteini + yeşil çay grubu arasında $p<0.001$, ülser grubu ile yine peynir altı suyu proteini grubu arasında $p<0.05$ ve peynir altı suyu proteini + yeşil çay grubu arasında $p<0.01$, peynir altı suyu proteini ile peynir altı suyu

proteini + yeşil çay $p<0.001$, yeşil çay ile peynir altı suyu proteini + yeşil çay $p<0.001$ anlamlı fark bulundu.

Histolojik Bulgular

Kontrol grubuna ait mide dokularındaki ışık mikroskobu ve SEM incelemelerde, düzenli glandular epitel ve gastrik pit ve glandular hücreler izlendi (Şekil 3A). Ülser grubunun mide dokularında (Şekil 3B) yüzey mukoza

hücrelerinde yoğun hasar, gastrik pit ve glandular hücrelerin çoğu dejenere olurken, yoğun inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve mukozal hemoraji izlenmiştir. Whey alan gruba ait mide dokuların (Şekil 3C), yüzey mukozal hasar hafif, gastrik pit, glandular hücrelerle birlikte hafif inflamatuvar hücre infiltrasyonu izlenmiştir. Yeşil çay alan grubun mide dokularında (Şekil 3D), hafif yüzeyel mukozal hasar, gastrik pit, glandular hücrelerle birlikte orta dereceli inflamatuvar hücre infiltrasyonu izlenmiştir. Peynir altı suyu proteini ile birlikte yeşil çay alan grubun dokularında (Şekil 3E), hafif yüzeyel mukozal hasar, gastrik pit, glandular hücrelerle birlikte hafif inflamatuvar hücre infiltrasyonu izlenmiştir.

TARTIŞMA

Süt tüm ana besin unsurlarını ve organizmanın metabolik işlevleri için gerekli vitamin, enzim ve eser elementleri içeren bir gıda maddesidir. Sütün tedavi edici etkisini araştıran çalışmalarda, süt içinde çok miktarda antioksidan molekülün bulunduğu belirlenmiştir. Bu moleküller sütün işlenmesi sırasında kısmen ya da tamamen kayba uğrayarak, sütün insanlar tarafından tüketime uygun hale getirilen ticari formlarının antioksidan moleküller açısından daha fakir bir gıdaya dönüşmesine yol açmaktadır [18,19]. Sütün tedavi potansiyeli adına en önemli fraksiyonları kazeinler ve süt serumu proteinlerinden (whey proteinleri) oluşan protein fraksiyonudur. Süt serumu proteinleri için; antioksidan, antikanserijen, antimikrobiyal, antitümoral, antihipertansif, bağışıklık destekleyici ve kas yapılandırıcı etkiler bildirilmiştir [20-23].

Yeşil çay bitkisinin başlıca polifenolik bileşeni olan Epi gallo kateşin gallat (EGCG), antiinflamatuvar, antitümoral, antianjiyogenik etkileriyle birlikte, histamin üretiminin regülatör enzimi histidin dekarboksilazın potent inhibitörü olarak da bildirilmiştir. Ayrıca histamin üreten hücreleri hedefleyerek, bu hücrelerin adezyon, migrasyon ve invazyon özelliklerini de etkilemektedir [24]. İnflamasyona dayalı patolojilerle tanımlanan bazofilik lösemi, gastrik ülser, Crohn hastalığı gibi birçok hastalık için EGCG'nin terapötik etkisi araştırılmaya değerdir. Karsinogenezi birçok adımda bloke eden, MAP kinaz, yolağına, NFkB ve Janus kinaz sinyal aracılara olan etkileri bildirilmiştir [25]. Çay polifenollerinin, inflamasyon kaskadını önemli inflamatuvar araçların, sitokinlerin (TNF- α) ve birçok interlökinin ekspresyonunu azaltarak baskıladığı da bildirilmiştir [26]. Bazı araştırmalarda EGCG, vitamin C ve E'den daha güçlü bir antioksidan olarak öne sürülürken, çoğu hastalık için korunma ya da tedavi amaçlı kullanılabileceği belirtilmektedir. EGCG'nin, anti-inflamatuvar özellikleri son yıllarda dikkat çekmektedir. Kolitli IL-2 yetmezliği olan farelerde yeşil çay ve EGCG'nin inflamasyonu azaltan etkisi gözlenmiştir [27]. Benzer etki *Helicobacter pylori* tarafından indüklenen gastrik toksisite çalışmasında da bildirilmiştir [28].

Non-steroid antiinflamatuvar ilaçların (NSAİİ) yaygın biçimde kullanımı, gastrik, peptik ve duodenal ülser insidansında tehlikeli bir artışa yol açmaktadır. Gastrik ülser vakalarının %25'inden NSAİİ'lerin kullanımı sorumlu tutulurken, aynı ilaçlar ülser iyileşmesini de

yavaşlatmaktadır. Sentetik anti-ülser ilaçların, pahalı olma, çok sayıda yan etki gösterme ve ülser tekrarını önleyememe gibi bazı dezavantajlar bulunmaktadır [29].

Süt ve süt proteinlerinin inflamasyon üzerine olan etkilerine odaklandığımızda, bu proteinlerden kazeinlerin, immünomodülatör, lökosit adhezyonunu ve kemotaksiyi regüle eden, inflamasyonu iyileştiren etkileri bildirilmiştir. Monositlerin dendritik hücrelere olgunlaşmasını stimüle ederler [30]. Peynir altı suyu proteinlerinden ise, α -laktalbumin; nötrofil, monosit ve lenfositleri inflamasyon sahasına yönlendiren CXCL8, MIP-1 α ve MIP-1 β 'nin nötrofillerinden salgılanmasını stimüle etmektedir [31]. Ayrıca direkt etki edebildiği bağırsak lümeninde, intestinotropik hormonu arttırarak, lümendeki enterosit maturasyonunu hızlandırmaktadır [32].

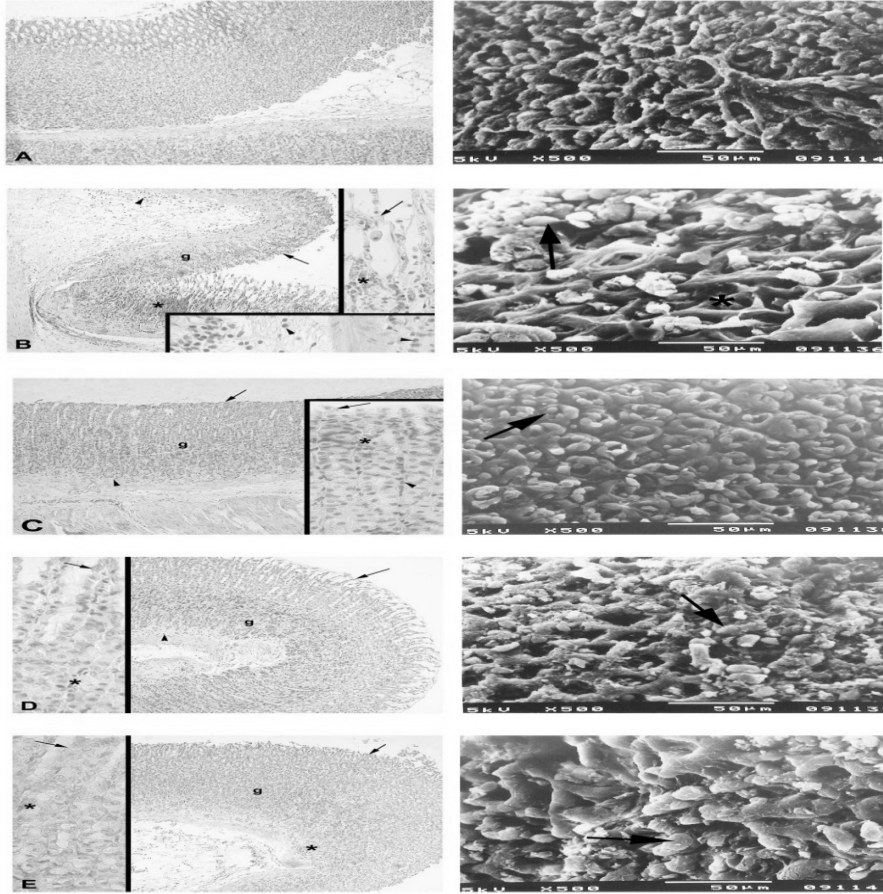
Süt proteinlerinin kendi fraksiyonlarına özgü faydaları araştırıldığında, yenidoğanlarda anne sütü kazeinlerinin tamponlama kapasitesi sayesinde, gastrik pH, pH 7'e yükselir. Beslenme sıklığına göre pH, dört saat içinde düşer. İnsan ve inek sütü proteinlerinin tamponlama özelliği, gastrik pH'nın pepsin A ve pepsin B enzimleri için optimum değere ulaşmasını geciktirerek, süt proteinlerinin yavaşça ve az miktarda sindirilmesini sağlarlar. Bu presipitasyon sırasında ortaya çıkan glikomakropeptid (GMP), süt serumu fraksiyonuna dahil bir peptiddir [33]. GMP'in koruyucu etkilerini bildiren çalışmalarda, fare modelinde intestinal inflamasyonda lenfositlerden inflamatuvar sitokinlerin salgılanmasını inhibe ettiği [34], sıçanlarda kolit modelinde ise, IL-6, TNF- α , IFN γ , IL-2 ve COX2 düzeylerini baskıladıkları bildirilmiştir [35].

Ülser iyileşmesi çok sayıda faktörün dahil olduğu kompleks bir işlemdir. Gastrik toksisite tablosunda reaktif oksijen metabolitlerinin oluşumu artarken, prostoglandin sentezi COX izoenzimlerinin inhibisyonuyla azalmaktadır. Ek olarak, NSAİİ gibi etkenler, hemorajik ülsere, gastrik mukus üretimini azaltarak sebep olurlar [36]. Ülser iyileşmesini destekleyen ilaçlar ve maddeler, antioksidanlar gibi davranarak, gastrik mukus sekresyonunu ve sentezini, prostoglandin sentezini arttırarak iyileştirme etkilerini gösterirler [29].

Peynir altı suyu proteinlerinin oksidan hasardan korunmadaki etkinliğini, etil alkolle indüklenen mide ülseri modelindeki çalışmamızda gösterilmiştir [8]. Bu çalışmamızda ise, ülser oluşumu öncesi ön tedavi süresinin uzatılması ve yeşil çay kombinasyonu ile etkinin değerlendirilmesi sonucunda, sıçan karaciğer ve mide dokularında oksidan hasarı en düşük düzeye indiği kemilüminesans aracılı ROT ölçümleriyle belirlenmiştir (Şekil 1A-D). Oksidan hasara karşı görülen etkiyi destekleyecek şekilde, karaciğer MDA ve GSH değerleri saptanırken, karaciğerde dokularında sadece peynir altı suyu proteini uygulanan grubun antioksidan etkinliği en üst düzeydedir. Mide dokularında ise kombine peynir altı suyu proteini + yeşil çay alan gruptadır. Doku hasarının değerlendirilmesi için, MPO bulguları incelendiğinde, hem karaciğer hem de mide dokusunda peynir altı suyu

proteini ve yeşil çay kombinasyon uygulamasının sinerjist bir etki gösterdiği görülmüştür (Tablo1). Ülserle birlikte oluşacak inflamasyonu değerlendirmek için yaptığımız TNF- α ve IL-1 β ölçümlerinde, serum TNF- α değerlerinin kombine uygulama grubunda anlamlı düzeyde düştüğü saptanmıştır, ancak tek başına uygulandıklarında anlamlı etki görülmemiştir. IL-1 β için tam tersi bir sonuçla karşılaşılmış, hem tekli uygulama

ve özellikle kombine uygulama bu sitokin düzeyini arttırmıştır (Tablo 2). İnflamasyon lehine olan bu bulgunun değerlendirilmesinde öncelikle denek sayısı, inflamasyon gelişiminde hangi süreçte olduğu hücresel ve humoral mekanizmanın nasıl etkilendiği de aydınlatılmalıdır. Fonksiyonel gıdaların anti-inflamatuvar etkilerinin fayda-zarar analizi için çelişen verilerle birlikte, araştırma sayısı da azdır.



Şekil 3(A-E). Farklı gruplara ait mide dokularının histolojik görünüşleri

Kontrol grubu (A) Düzenli gastrik mukozası, yüzey epiteli ve glandular hücreler. Ülser grubu: (B) yüzey mukozası hücrelerinde yoğun hasar(ok), glandular(g) hücreleri ve hemoraji, soyulmuş lamina propria (*) ve mukozada inflamatuvar hücre infiltrasyonu (ok uc). Peynir altı suyu proteini grubu: (C) Çoğu alanda düzenli yüzey mukozası(ok) ve glandular hücreler(g), hafif vasküler konjesyon(*) ve mukozada hafif inflamatuvar hücre infiltrasyonu. Yeşil Çay grubu: (D) Çoğu alanda düzenli yüzey mukozası (ok) glandular hücreler (g), mukozada hafif vasküler konjesyon(*) ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu (ok uc). Peynir altı suyu proteini + Yeşil Çay grubu: (E) Çoğu alanda düzenli yüzey mukozası (ok) glandular hücreler (g), mukozada hafif vasküler konjesyon(*) ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu (ok uc). Boyamalar ve orijinal büyütme: Sol, ışık photomicrograph, H & E boyama, 100 x; sağ: SEM foto, 500 x

Peynir altı suyu proteinlerinin diyabetik olmayan ve diyabetik hayvanlarda immün yanıtı etki ederek inflamatuvar ve antiinflamatuvar sitokinleri regüle ederek yara iyileşmesini kolaylaştırdığı bildirilmiştir [37]. Yine diyabetik sıçanlarda yapılan çalışmalarda peynir altı suyu proteini uygulanan sıçanlarda TNF- α ve IL-1 β değerlerinde diyabetik yara oluşmuş ve oluşmamış gruplar arasında değişkenlik gözlemlenmiş ve 8 günlük ölçümlerde değerler farklılaşmıştır. Ağır egzersiz yapan bireylerde, egzersiz sırasında yükselen IL-6 ve IL-10

değerlerinin peynir altı suyu proteini kullanan sporcularda azaldığı da bildirilmiştir [38]. Tip 2 diyabetli sıçanlarda diyet ECGC eklenmesi sonucunda, IL-1 β ve TNF- α mRNA düşük dozlarda ekspresyon baskılayıcı etki görülmüşse de, artan dozlarda etki yok olmuştur [39]. Bizim bulgularımız ve literatür bulgularındaki paralellikler ve ayrılıklar, sitokin regülasyonu ve peynir altı suyu proteini ve diğer fonksiyonel gıdaların etkileşiminin odaklanması gereken bir soru olduğunu belirginleştirmiştir.

Çalışmamızın kronik ülser modelindeki, peynir altı suyu proteini ve yeşil çayın oksidan hasarı birlikte azaltma gücü değerlendirildiğinde, ön tedavi modelimizde saptanan baskın sinerjist etki biraz değişmiştir. Karaciğer dokusunda süperoksit radikali dışı ROT'ları belirleyen KL bulgularında (lum ölçümleri) peynir altı suyu proteini + yeşil çay kombinasyonunun sinerjist etkisi görülürken, mide dokusunda peynir altı suyu proteininin tek başına uygulaması en fazla etkiyi göstermiştir. ROT bulgularına bakıldığında, peynir altı suyu proteini ve yeşil çayın koruyuculuğu ile tedavi etkinliği oksidan hasarın geriletilmesi noktasında farklılık göstermiştir. Lipid peroksidasyonu değerlendirildiğinde, karaciğer dokusu için gruplar arasında anlamlı fark görülmemesine karşın, en düşük ölçüm peynir altı suyu proteini uygulanan gruptan alınmıştır. Anlamlı fark oluşturacak değerlere ulaşılmaması denek sayısı ve karaciğer için uzak organ etkisine bağlanabilir. Mide dokusunda ise bu kez yeşil çay lipid peroksidasyonunun en fazla azaltan etkiyi göstermiştir. Bu bulgu literatürde yer alan kolit ve ülser modelinde bildirilenlerle uyumludur [40-42].

GSH değerlerinde ise, karaciğer dokusunda sadece peynir altı suyu proteini alan grupta çok anlamlı düzeyde yüksek bulunurken, mide dokusunda ise kombine uygulamada anlamlı GSH yüksekliği saptanmıştır. Peynir altı suyu proteini kullanımının GSH düzeyini artırdığı ve bunun protein profilindeki aminoasit çeşitleriyle ilişkili olduğu bilinmektedir [43]. Ayrıca bulgularımızda da görüldüğü üzere, karaciğer dokusu ile mide dokusunun peynir altı suyu proteini etkisiyle GSH sentezini artırıcı yanıtının farklılık göstermesi ve karaciğer dokusunun metabolizma özellikleriyle bu noktada daha fazla öne çıkması beklenir bir bulgudur [43,44]. Kronik ülser dönemini gözlemlediğimiz kombine etki, oksidan hasarın önlenmesinde peynir altı suyu proteini ya da yeşil çayın tek başına kullanımına göre çok anlamlı bir fark göstermemektedir. Doku hasarının engellenmesiyle ilgili MPO bulguları üzerinden değerlendirmelerimizde, istatistiksel anlamlılığı olmasa da karaciğerde en düşük

MPO düzeyi kombine uygulamada görülmüş, mide dokusunda ise en düşük peynir altı suyu proteini uygulanan grupta bulunmuş ve anlamlı fark göstermiştir. İnflamasyon dönemi sitokin değerleri aracılığıyla değerlendirildiğinde, ön tedavi modelinde de görüldüğü gibi TNF- α değerlerinin peynir altı suyu proteini-yeşil çay kombinasyonu ile baskılandığı ve IL-1 β düzeyinin de aynı grupta yükseldiği saptanmıştır. Histolojik bulgulara bakıldığında, mide de mukozal hasar ve inflamatif hücre infiltrasyonu peynir altı suyu proteini + yeşil çayın kombine kullanımında en hafif düzeyde görülmekte, histolojik bulgular ve ülser skorlama bulguları kombine etkinin sinerjist faydasına işaret etmektedir.

Yirmi birinci yüzyılın getirdiği gelişmişlik düzeyi ve toplumun artan hastalıklar ve neden olduğu büyük maliyetler için çözüm beklentisi, sadece ilaçlarla değil "optimum beslenme" ve "bireysel beslenme" kavramlarına olan ilgiyi ve gereksinimi arttırmıştır. Böylece dengeli beslenme amacının ötesinde, genel sağlığı iyileştirici ve hastalıklardan koruyucu nitelik

taşıyan gıdaların tüketimi ve bu tip "fonksiyonel nitelik" taşıyan gıdaların hangileri olduğu sadece bilimsel çalışmaların değil toplumun da büyük dikkat gösterdiği konulardır. Çalışmamızda iki farklı fonksiyonel gıdanın tek başlarına ve kombine halde uygulanması, bu tip gıdaların etkinliklerinin karşılaştırılabilmesi, bir arada kullanımlarının sonuçlarının bilinmesi açısından önemlidir. Çünkü çoğu birey tıbbi danışma almaksızın, bu tip gıdaları birlikte ve çok fazla dozda kullanabilmektedir. İlaç değil "gıda" olarak kabul gören ve tıbbi danışma almadan temin edilen ve kullanılabilen "fonksiyonel gıdalar" için *in vivo* çalışmaların hızla yaygınlaşması ve gönüllü çalışmalarına etik kurallar dahilinde yoğunlaşılması zorunludur. Hem gıdaların fonksiyonel fayda/zarar profillerini ve ilerde aydınlatılacak moleküler mekanizmaların anlamak, hem de bireylere bilimsel önerilerde bulunmak için çalışmalarımızın iki yönlü görevi olduğu kanısındayız.

SONUÇ ve ÖNERİLER

Araştırmamızda ülser modelinin iki dönemi üzerinde tamamladığımız deneylerden genel anlamda şu sonuçlara ve yeni sorulara vardık: peynir altı suyu proteini proteinlerinin ve yeşil çayın birlikte tüketimi ülser nedeniyle oluşacak ROT üretimini tek başlarına kullanımlarına göre daha fazla önlemektedir. Doku hasarını değerlendiren bulgularımız ve histolojik değerlendirmeler de buna eşlik ederken, inflamatuvar sitokinler için tam ters yönde bazı bulgularımız da bulunmaktadır. Sonuç da antioksidan faydası iyileştirici ve önleyici özellikleri belirgin olsa da, ülser tedavisinde yeşil çay ve peynir altı suyu proteinlerinin mevcut tedavilere destek gıda protokolünde düşünülebileceği, ancak henüz ilaç tedavilerinin önüne geçemeyeceği görülebilir. Daha kesin bulgular anti-ülser ilaçlarla karşılaştırmalı çalışmalarla ortaya çıkacaktır. Fonksiyonel gıdaların inflamasyon sürecine etkisini araştırarak çalışmalarda, gıdaların farklı uygulama dozları ve sürelerine, inflamasyonun farklı dönemlerinde bulguları tekrarlama prosedürlerine önem verilmesi gerekmektedir. Genel olarak fonksiyonel gıdaların, güçlü antioksidan olduklarını ve doku hasarını azalttığını belirleyen bulguları, bu maddelerin moleküler etki mekanizmalarının aydınlatılması zorunluluğunu ortaya koymaktadır ve yeni araştırma hedefimizi göstermektedir.

TEŞEKKÜR

Araştırmayı destekleyen Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyon Başkanlığı'na (SAG-B-060308-0028) teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

- [1] Başer, K.H.C., 2003. Industrial plants as sources of dietary supplements, in: Dietary supplements of plants origin, ed. M. Maffei, Taylor and Francis, London, pp 31-42.
- [2] De la Fuente, M.A., Hemar, Y., Tamehana, M., Munro, P.A., Singh, H., 2002. Process induced changes in whey proteins during the manufacture of

- whey protein concentrates. *Int. Dairy. J.* 12: 361-369.
- [3] Sang, S., Tian, S., Wang, H., Stark, R.E., Rosen, R.T., Yang, C.S., Ho, C.T., 2003. Chemical studies of the antioxidant mechanism of tea catechins. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 11: 3371-3378.
 - [4] Bounous, G., 2000. Whey protein concentrate (WPC) and glutathione modulation in cancer treatment. *Anticancer Res.* 20: 4785-4792.
 - [5] Grossman, M.I., 1980. Peptic ulcer, the pathophysiological background, *Scand J Gastroenterology* 15(Suppl 58):7-15.
 - [6] Pinhan, G., Regilo, G., Szabo, S., 1987. Free radicals and lipid peroxidation in ethanol or aspirin induced gastric mucosal injury. *Dig. Dis. Sci.* 32: 1395-1401.
 - [7] Biswas, K., Bandyopadhyay, U., Chattopadhyay, I., Varadaraj, A., Ali, E., Banerjee, R.K., 2003. A novel antioxidant and antiapoptotic role of omeprazole to block gastric ulcer through scavenging of hydroxyl radical. *J. Biol. Chem.* 278: 10933-11001.
 - [8] Jahoviç, N., Veliöğlu Ögünç, A., Güzel, E., Ars, D., Ercan, F., Erkanlı, G., Yeğen, B.Ç., Yalçın, A.S., 2005. Whey pretreatment ameliorates gastric and hepatic oxidative damage in ethanol-induced gastric ulcer via a neutrophil-dependent mechanism. *Marmara Medical Journal* 18: 64-70.
 - [9] Okabe, S., Pfeiffer, C.J., 1972. Chronicity of acetic acid ulcer in the rat stomach. *Am. J. Dig. Sys.* 7: 619-629.
 - [10] Konturek, S.J., Brzozowski, T., Dembinaki, A., Warzecha, Z., Konturek, P.K., Yanaihara, N., 1988. Interaction of growth hormone-releasing factor and somatostatin on ulcer healing and mucosal growth in rats. Role of gastrin epidermal growth factor. *Digestion* 41: 121-128.
 - [11] Okabe, S., Pfeiffer, C.J., Roth, I.L.A., 1971. A method for experimental penetrating ulcer in rats. *Am. J. Dig. Dis.* 916: 277-284.
 - [12] Öner, O.Z., Ögünç, A.V., Cingi, A., Uyar, S.B., Yalçın, A.S., Aktan, A.O., 2006. Whey feeding suppresses the measurements of oxidative stress experimental burn injury. *Surgery Today*, 36:376-81.
 - [13] Bradley, P.P., Priebat, D.A., Christenser, R.D., Rothstein, G., 1982. Measurement of cutaneous inflammation: Estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J. Invest. Dermatol.* 78: 206-209.
 - [14] Casini, A., Ferrali, M., Pompella, A.S., Maellaro, E., Comporti, M., 1986. Lipid peroxidation and cellular damage in extrahepatic tissues of bromobenzene toxicated mice. *Am. J. Pathol.* 123: 520-531.
 - [15] Aykaç, G., Uysal, M., Yalçın, A.S., Koçak-Toker, N., Sivas, A., Öz, H., 1985. The effect of chronic ethanol ingestion on hepatic lipid peroxide, glutathione peroxidase and glutathione transferase in rats. *Toxicology* 36: 71-76.
 - [16] Haklar, G., Özver, E.S., Yüksel, M., Aktan, A.Ö., Yalçın, A.S., 2001. Different kinds of reactive oxygen and nitrogen species were detected in colon and breast tumors. *Cancer Letters* 165: 219-224.
 - [17] Russel, R.J., 1990. Endoscopic evaluation of etodolac and naproxen and their relative effects on gastric and duodenal prostaglandins. *Rheumatol Int.* 10: 17-21.
 - [18] Enslinger, A.H., Enslinger, M.E., Konlande, J.E., Robson, J.R.K., 1995. Milk and milk products. The Concise encyclopedia of foods and nutrition. CRC Press Inc, U.S.A, p: 691-710.
 - [19] Lindmark-Mansson, H., Akesson, B., 2000. Antioxidative factors in milk. *Br. J. Nutr. (Suppl-1)*, 84: 103-110.
 - [20] Buttriss, J., Milk. Ed: Macrae, R., Robinson, R.K., Sadler, M.J., 1993. Encyclopaedia of food science, food technology and nutrition, Academic Press, London, San Diego., Vol: 5, pp.:3066-3090.
 - [21] Bounous, G., Kongshavn, P.A.T., 1978. The effect of dietary amino acids on immune reactivity. *Immunology* 35: 257-266.
 - [22] Bounous, G., Papenburg, R., Kongshavn, P.A.T., Gold, Fleiser, D., 1988. Dietary whey proteins inhibits the development of dimethylhydrazine induced malignancy. *Clin. Invest. Med.* 11: 213-217.
 - [23] Lothian, B., Grey, V., Kimoff, R.J., Lands, L.C., 2000. Treatment of obstructive airway disease with a cysteine donor protein supplement. *Chest* 117: 914-916.
 - [24] Melgarejo, E., Medina, M.A., Sanchez Jimenez, F., Urdiales, J.L., 2010. Targeting of histamine producing cells by EGCG: a green dart against inflammation *J. Physiol Biochem.* 66: 265-270.
 - [25] Hou, C., Amarnani, S., Chong, M.T., Bishayee, A., 2013. Green tea and the risk of gastric cancer: Epidemiological evidence, *World J. Gastroenterol.* 19(24): 3713-3722.
 - [26] Darvesh, A.S., Bishayee, A., 2013. Chemopreventive and therapeutic potential of tea polyphenols in hepatocellular cancer. *Nutrition and Cancer* 65(3): 329-344.
 - [27] Varliek, G.W., Yang, F., Lee, E.Y., de Villiers, W.J., Zhory, J., Oz, H.S., Westberry, K.F., Mc Clain, C.J., 2001. Green Tea polyphenol extract attenuates inflammation in interleukin-2 deficient mice, a model of autoimmunity. *J. Nutr.* 131(7): 2034-9.
 - [28] Lee, S.Y., Shin, Y.W., Hahm, K.B., 2008. Phytochemicals: Mighty but ignored weapons against *Helicobacter pylori* infection. *J. Digest. Dis.* 9: 129-139.
 - [29] Adhikary, B., Yadav, S.K., Bandyopadhyay, S.K., Chattopadhyay, S., 2011. Epigallocatechin gallate accelerates healing of indomethacin-induced stomach ulcers in mice. *Pharmacological Reports* 63: 527-536.
 - [30] Vordenbaumen, S., Braukmann, A., Petermann, K., Schaf, A., Bleck, E., Von Mikelz, A., Jose, J., Schneider, M., 2011. Casein α s1 is expressed by human monocytes and upregulates the production of GM-CSF via p 38. *J. Immunol.* 186(1): 592-601.
 - [31] Rusu, D., Droin, R., Pouliot, Y., Gauthier, S., Poubelle, P.E., 2010. A bovine whey protein extract stimulates human neutrophils to generate bioactive IL-1 α through a NF- κ B and MAPK dependent mechanism. *J. Nutr.* 140(2): 382-91.
 - [32] Dube, P.E., Brubaker, P.L., 2007. Frontiers in Glucagon-like peptide 2: Multiple actions, multiple mediators. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 293(2): 460-465.

- [33] Chatterton, D.E.W., Nguyen, D.N., Bering, S.B., Sangild, P.T., 2013. Antiinflammatory mechanisms of bioactive milk proteins in the intestine of newborns. *Int. J. Biochem. Cell. Bio.* 45: 1730-1747.
- [34] Monnai, M., Horimoto, Y., Otani, H., 1998. Immunomodulatory effect of dietary bovine kappa-caseinoglycopeptide on serum antibody levels and proliferative responses of lymphocytes in mice. *Milchwissenschaft* 53: 129-132.
- [35] Lopez-Posadas, R., Requena, P., Gonzales, R., Suarez, M.D., Zarzuelo, A., Sanchez, M., 2010. Bovine glycomacropeptide has intestinal antiinflammatory effects in rats with dextran sulfate-induced colitis. *J. Nutr.* 140: 2014-2019.
- [36] Rainsford, D., 1978. The role of aspirin in gastric ulceration. Same factors involved in the development of gastric mucosal damage induced by aspirin in rats exposed to various stress conditions. *Am. J. Dig. Dis.* 23(6): 521-530.
- [37] Ebaid, H., Ahmed, O.M., Mahmoud, A.M., Ahmed, R.R., 2013. Limiting prolonged inflammation during proliferation and remodeling phases of wound healing in streptozotocin- induced diabetic rats supplemented with camel undenatured whey protein. *BMC Immunology* 14: 31.
- [38] Kerasioti, E., Stagos, D., Jamurtas, A., Kiskini, A., Koutedakis, Y., Goutzourelas, N., Pournaras, S., Tsatsakis, A.M., Kouretas, D., 2013. Anti-inflammatory effects of a special carbohydrate-whey protein cake after exhaustive cycling in human. *Food and Chemical Toxicology* (61): 42-46.
- [39] Uchiyama, Y., Suzuki, T., Mochizuki, K., Goda, T., 2013. Dietary supplementation with (-) epigallocatechin-3-gallate reduces inflammatory response in adipose tissue of non-obese type 2 diabetic Goto-Kakizaki(GK) rats. *J. Agric. Food Chem.* 61: 11410-1417.
- [40] Mazzon, E., Muia, C., Di Paola, R., Genovese, T., Menegazzi, M., De Sarro, A., Suzuki, H., Cuzzocrea, S., 2005. Green tea polyphenol extract attenuates colon injury induced by experimental colitis. *Free Radical Research* 39(9): 1017-1025.
- [41] Khan, A.S., Priyanda, S., Arivarasu, N., Khan, S., Yusufi, A.N.Y., 2007. Influence of green tea on enzymes of carbohydrate metabolism, antioxidant defense, and plasma membrane in rat tissues. *Nutrition* 23: 687-695.
- [42] Ostrowska, J., Luczaj, W., Kasacka, I., Rozanski, A., Skrzydlewska, E., 2004. Green tea protects against ethanol-induced lipid peroxidation in rat organs. *Alcohol* 32: 25-32.
- [43] Bounous, G., Batist, G., Gold, P., 1989. Immunoenhancing property of dietary whey protein in mice: role of glutathione. *Clin. Invest. Med.* 12: 154-161.
- [44] Beutler, E., 1989. Nutritional and metabolic aspects of glutathione. *Ann. Rev. Nutr.* 9: 287-302.