FARKLI İŞLEMLERDEN GEÇMİŞ İNEK SÜTÜ VE KEFİRDE KOLİT İLE İLİŞKİLİ OLAN MİR-125B VE MİR-21'İN ANLATIM SEVİYELERİNİN ARAŞTIRILMASI

İrem Nur GÖZÜDOK

T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FARKLI İŞLEMLERDEN GEÇMİŞ İNEK SÜTÜ VE KEFİRDE KOLİT İLE İLİŞKİLİ OLAN MİR-125B VE MİR-21'İN ANLATIM SEVİYELERİNİN ARAŞTIRILMASI

İrem Nur GÖZÜDOK
0000-0001-5846-7648

Doç. Dr. Dilek PİRİM
(Danışman)

YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

BURSA– 2023
Her Hakkı Saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

FARKLI İŞLEMLERDEN GEÇMİŞ İNEK SÜTÜ VE KEFİRDE KOLİT İLE İLİŞKİLİ OLAN MİR-125B VE MİR-21'İN ANLATIM SEVİYELERİNİN ARAŞTIRILMASI

İrem Nur GÖZÜDOK

Bursa Uludağ Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Dilek PİRİM

MikroRNA'lar (miRNA'lar), gen anlatımını düzenleyerek önemli hücresel süreçlerde yer alan kısa kodlanmayan RNA'lardır ve miRNA aracılı gen regülasyonundaki değişiklikler çeşitli hastalıkların patogenezinde önemli rol oynar. Son yıllarda yapılan araştırmalarda besinsel miRNA'ların insana transfer olduğu gözlenmiştir. Bu kapsamda türler arası beslenme yoluyla miRNA transferini gösteren çalışmaların sonucunda süt miRNA'ları yeni bir biyoaktif besin komponenti olarak değerlendirilmektedir. MiRNA'ların gen regülasyonuna ve hücresel süreçlere etkileri sebebiyle süt miRNA araştırmalarının insan sağlığı açısından önemi büyüktür. İnek sütündeki miRNA'ların insan dolaşımına geçerek insan hastalıklarıyla ilişkili önemli biyolojik yolları etkileyebileceği literatürde öne sürülmektedir. Bu nedenle, içme sütü ve süt ürünlerindeki miRNA içeriğinin belirlenmesi büyük önem taşımaktadır. Ancak, bu konuda literatürde önemli bir boşluk olduğu gözlenmektedir ve bu nedenle bu konu üzerinde araştırmaların yapılmasını gerektirmektedir. Bu tez çalışmasında, ülkemizde sık tüketilen içme sütü ve kefir gibi fermente süt ürünlerinde kolit ile ilişkili olan miR-21 ve miR-125b inek sütü miRNA'larının, RT-qPCR yöntemi ile üretim aşamalarında kullanılan işlem basamakları ve bu yöntemlerin ürünlerin miRNA stabilitesine etkisi araştırılmıştır. Literatürde içme sütü üretim aşamalarında kullanılan homojenizasyon ve sıcaklık işlemlerinin miRNA spesifik farklı etkiler gösterdiği gözlemlenmiştir. Projemizde literatürden farklı olarak fermantasyon işleminde kullanılan probiyotik mikroorganizmaların ve prebiyotiklerin süt ürünlerindeki miRNA içeriğine etkisi ilk kez araştırılmıştır. Tez çalışmamız sonucunda işlenmemiş süt ile karşılaştırıldığında homojenizasyon, pastörizasyon ve fermantasyon işlemlerinin miR-21 ve miR-125b'nin miktarlarını anlamlı (p<0,05) olarak azalttığını ve miRNA stabilitisine etki ettiği gözlenmiştir. İleriki çalışmalarda farklı miRNA'ların da analiz edilmesi ve bu ürünlerin biyoaktif besin içerikleri ve teröpatik kullanımları bakımından total miRNA içeriğinin belirlenmesi gereklidir.

Anahtar Kelimeler: mikroRNA, miRNA, inek sütü, kefir, kolit, RT-qPCR, miR-21, miR-125b
2023, vii + 49 sayfa.

ABSTRACT

MSc Thesis

INVESTIGATION OF THE EXPRESSION LEVELS OF MIR-125B AND MIR-21 ASSOCIATED WITH COLITIS IN DIFFERENTLY PROCESSED COW'S MILK AND KEFIR

İrem Nur GÖZÜDOK

Bursa Uludağ University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Dilek PİRİM

MicroRNAs (miRNAs) are short non-coding RNAs involved in important cellular processes by regulating gene expression and alterations in miRNA-mediated gene regulation play an important role in the pathogenesis of various diseases. In recent years, it has been observed that dietary miRNAs are transferred to humans. In this context, milk miRNAs are considered as a new bioactive nutritional component. Due to the effects of miRNAs on gene regulation and cellular processes, milk miRNA research is of great importance for human health. In the literature, it is suggested that cow's milk miRNAs may enter the human circulation and affect important pathways associated with human diseases. Therefore, it is important to determine the miRNA content in consumed milk and dairy products, yet there is a significant gap in the literature on this subject. In this thesis, the effects of the production steps of consumed milk and fermentation on the abundance of miR-21 and miR-125b, which are associated with colitis in fermented milk products such as drinking milk and kefir, were investigated by RT-qPCR method. In the literature, it has been observed that homogenization and temperature processes used in drinking milk production stages show miRNA-specific effects. However, the effect of probiotic microorganisms and prebiotics used in the fermentation process on miRNA content in dairy products was investigated for the first time. Notably, our results demonstrated that homogenization, pasteurization and fermentation processes decreased the amounts of miR-21 and miR-125b significantly ($p<0.05$) and affected miRNA stability when compared with unprocessed milk. In future studies, it is necessary to analyze different miRNAs and determine the total miRNA content of these products in terms of their bioactive nutritional content and therapeutic uses.

Key words: microRNA, miRNA, cow's milk, kefir, colitis, RT-qPCR, miR-21, miR-125b
2023, vii + 49 pages.

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans yaptığım dönem içerisinde bana desteğini esirgemeyen ve yol gösteren danışmanım Sayın; Doç. Dr. Dilek PİRİM'e teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamıza katkı sağlayan Sayın; Prof. Dr. Metin GÜLDAŞ ve Sayın; Prof. Dr. Özden ÇOBANOĞLU'na teşekkürlerimi sunarım.

TUBİTAK 2210-A Yurtiçi Genel Yüksek Lisans bursu, bursiyer öğrencisi olarak yüksek lisans eğitimim boyunca beni destekleyen TUBİTAK kurumuna teşekkürlerimi sunarım.

Projeme bütçe desteği sağlayan Bursa Uludağ Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri birimine ve Bursa Uludağ Üniversitesi rektörlüğüne teşekkürlerimi sunarım.

Bursa Uludağ Üniversitesi Omik Analiz ve Araştırma Laboratuvarı ekibindeki arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Değerli aileme teşekkürlerimi sunarım.

İrem Nur GÖZÜDOK
…/…/…..

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET i
ABSTRACT ii
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ v
ŞEKİLLER DİZİNİ vi
ÇİZELGELER DİZİNİ vii
1.GİRİŞ 1
2.KURAMSAL TEMELLER 3
2.1.Kolit Hastalığı 3
2.2.Kolit Hastalığının Epidemiyolojisi 3
2.3.Kolit Hastalığının Risk Faktörleri 4
2.3.1.Çevresel Risk Faktörleri 6
2.3.2.Genetik Risk Faktörleri 6
2.3.3.Epigenetik Risk Faktörleri 7
2.4.MiRNA'lar (MiRNA'lar) 8
2.4.1.MiRNA'ların Biyogenezi 8
2.4.2.MiRNA'ların Fonksiyonları 11
2.5.MiRNA Aracılı Gen Regülasyonu 11
2.6.Besinsel MiRNA'lar 12
2.7.Vücut Sıvılarındaki MiRNA'lar 14
2.8.Süt MiRNA'ları 15
2.9.Süt İşleme Aşamalarının MiRNA'lar Üzerinde Etkisi 18
2.10.miR-125b ve Fonksiyonları 20
2.11.MiR-125b'nin Kolit Hastalığındaki Rolü 20
2.12.MiR-21 ve Fonksiyonları 21
2.13.MiR-21'in Kolit Hastalığındaki Rolü 22
3.MATERYAL VE YÖNTEM 24
3.1.Numunelerden Total RNA İzolasyonu 24
3.2.cDNA Sentezi 26
3.3. Veri Analizi ve Yorumlanması 29
4.BULGULAR 30
4.1.RNA İzolasyonu Sonuçları 30
4.2.RT-qPCR Analizi Sonuçları 30
4.3.İstatistiksel Analiz Sonuçları 32
5.TARTIŞMA ve SONUÇ 37
KAYNAKLAR 42
ÖZGEÇMİŞ 49

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler	**Açıklama**
=	Eşittir
<	Küçüktür
µL	Mikrolitre
mL	Mililitre
sn	Saniye
dk	Dakika
°C	Santigrat derece
P	P değeri
%	Yüzde
bar	100.000 Pa olarak tanımlanmış basınç birimi
~	Yaklaşık
Δ	Delta

Kısaltmalar	**Açıklama**
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
miRNA	MikroRNA
RISC	RNA-İndüklenmiş Susturma Kompleksi
sncRNA	Küçük Kodlanmayan RNA
RNA	Ribonükleik Asit
UTR	Kodlanmayan Bölge

ŞEKİLLER DİZİNİ

		Sayfa
Şekil 2.1.	1990'dan 2016'ya kadar farklı yetki alanlarında ülseratif kolit (UC) insidansı.....…….	4
Şekil 2.2.	Kolit hastalığının risk faktörleri.....	5
Şekil 2.3.	MiRNA biyogenezi…….....	9
Şekil 2.4.	Süt kaynaklı miRNA'ların A) Beslenme hipotezinin ve B) Fonksiyonel hipotezinin şematik gösterimi….....	10
Şekil 2.5.	MiRNA aracılı gen regülasyonu...……..	12
Şekil 2.6.	Besinsel miRNA'lar……	14
Şekil 2.7.	Vücut sıvılarındaki miRNA'lar…….....	15
Şekil 2.8.	Süt miRNA'larının farklı özelliklerinin şematik gösterimi…….	16
Şekil 2.9.	Eksozomların rollerinin ve içeriklerinin basitleştirilmiş gösterimi	17
Şekil 2.10.	mikroRNA-21, zebra balığındaki PI3K/AKT, STAT3 ve PDCD4/TNF-α sinyal yolakları aracılığıyla kolite bağlı karsinom ve kolorektal kanserdeki rolü……..	22
Şekil 3.1.	Süt ve süt ürünleri eldesinin şematik gösterimi….....	24
Şekil 3.2.	Numunelerin eldesi ve RNA izolasyonu çalışma ortamı.....	26
Şekil 4.1.	RT-qPCR yöntemi ile analiz edilen miR-21'in melting curve analiz eğrisi.....	31
Şekil 4.2.	RT-qPCR yöntemi ile analiz edilen miR-125b'nin melting curve analiz eğrisi.....	31
Şekil 4.3.	RT-qPCR yöntemi ile analiz edilen miRNA'ların %3'lük jel elektroforezinde görüntülenmesi……	31
Şekil 4.4.	miR-125b için 1. ve 2. numunenin CT değerlerinin karşılaştırılması	32
Şekil 4.5.	miR-21 için 1. ve 2. numunenin CT değerlerinin karşılaştırılması....	32
Şekil 4.6.	miR-125b için 2, 3 ve 4. numunelerin CT değerlerinin karşılaştırılması.....	33
Şekil 4.7.	miR-21 için 2, 3 ve 4. numunelerin CT değerlerinin karşılaştırılması	33
Şekil 4.8.	miR-125b için 1. ve 2. numunelerin ΔCT değerlerinin karşılaştırılması……...	34
Şekil 4.9.	miR-21 için 1. ve 2. numunelerin ΔCT değerlerinin karşılaştırılması	35
Şekil 4.10.	miR-125b için 2, 3 ve 4. numunelerin ΔCT değerlerinin karşılaştırılması……..	35
Şekil 4.11.	miR-21 için 2, 3 ve 4. numuneler için ΔCT değerlerinin karşılaştırılması……..	36

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 2.1.	MiRNA biyogenezi aşamaları.....	8
Çizelge 2.2.	Farklı sütlerdeki miRNA stabiliteleri.....	19
Çizelge 3.1.	Ters transkripsiyon reaksiyonu protokolü…….....	27
Çizelge 3.2.	Ters transkripsiyon reaksiyon sıcaklığı döngü protokolü……	28
Çizelge 3.3.	miRCURY LNA miRNA Syber Green PCR protokolü için reaksiyon karışımı protokolü……...	28
Çizelge 3.4.	miRCURY LNA miRNA PCR Syber Green PCR protokolü……..	32

1. GİRİŞ

Son yıllarda yapılan araştırmalar, besinlerde bulunan miRNA'ların, hedef mRNA ifadesini etkileyerek hastalıkların moleküler mekanizmalarında potansiyel bir rol oynayabileceğini göstermektedir. Özellikle inek sütünde bulunan miRNA'lar, eksozomlar tarafından korunmakta ve beslenme yoluyla türler arası geçiş yapabilmektedir. Bu nedenle, süt miRNA'larının insan genomu üzerindeki moleküler etkilerini ve biyoaktif besin özelliklerini araştırmak için içme sütü ve süt ürünlerinin içeriklerinin kapsamlı bir şekilde belirlenmesi gerekmektedir.

Yapılan çalışmalar, inek sütünün içme sütü üretimi sırasında uygulanan farklı sıcaklık koşullarının inek sütü miRNA içeriği üzerinde miRNA özgül etkileri olduğunu göstermektedir. Ancak, ısıl işlem süresi ve sıcaklığındaki artışla birlikte zıt sonuçlar elde edildiği de belirlenmiştir. Bu farklılıkların, süt sağlanan inek ırkları, kullanılan ekipmanlar ve hammadde sütün bileşimi ile örnek hazırlama koşullarından kaynaklandığı düşünülmektedir. Ülkemizde tüketilen içme sütündeki miRNA içeriklerinin henüz araştırılmadığı da bir gerçektir. Ayrıca, sütün fermantasyonunun miRNA içeriği üzerindeki etkisi de henüz aydınlatılmamıştır. Çünkü laktik asit bakterileri gibi fermantasyondan sorumlu ve probiyotik gruplara ait olan organizmaların, üretilen laktik aside ek olarak miRNA'larda hangi düzeyde değişikliklere yol açtığı bilinmemektedir. Ülkemizde sıkça tüketilen kefir ürünleri, projemizdeki odak noktasıdır ve bu ürünlerdeki miRNA ifade düzeylerinin araştırılması planlanmıştır. Literatürde bu konuda büyük bir boşluk bulunmaktadır ve projemiz, süt ürünlerindeki kültürleme aşamalarının miRNA ifadesine etkisini araştırmak amacıyla kefir ürünlerinden de örnekler alarak karşılaştırmalar yapmaktadır. Projenin tasarlanmasında literatürdeki boşluklar dikkate alınmış ve Türkiye şartlarında içme sütü üretimi için kullanılan sıcaklık yöntemi ile ısıl normlarda ve fermente edilmiş süt örneklerindeki miRNA ifadeleri, kolit ile ilişkili insanlarda transfer edilebilecek miRNA'ların araştırıldığı bir çalışmada incelenmiştir. Seçilen işlemler sonrasında oluşabilecek miRNA ifade farklılıklarının insanlara transfer edilebilen süt miRNA ifadeleri üzerindeki etkisini araştırmamız, süt miRNA araştırmalarına ve süt üretim teknolojilerine farklı bir perspektif sunarak yeni bir besin içeriği alanında önemli bir katkı sağlamaktadır. Çalışmamızda, seçilen miRNA'ların ifade düzeylerinin, çiğ sütün işlenme aşamalarıyla nasıl etkilendiği kantitatif olarak

araştırılmıştır. Bu şekilde, farklı süt işleme yöntemlerinin terapötik etkileri değerlendirilebilmiş ve bu işlemlerin sütün miRNA içeriği üzerindeki etkisi belirlenerek ileride yapılacak araştırmalara yol gösterici ön veriler elde edilmiştir. Ayrıca, bu çalışma ile süt kalitesi için seçilen miRNA'ların biyobelirteç potansiyelleri de incelenmiştir.

Çalışmamızda, işlenmemiş süt örneklerinin homojenizasyon işleminden sonra ülkemizde yaygın olarak kullanılan 3 farklı ısı işlemine tabi tutulmuş ve bu işlemlerin miRNA'lar üzerindeki etkisi incelenmiştir. Ayrıca, literatürden farklı olarak, fermantasyon (kültürleme) işleminin miRNA içeriğine etkisi, sade ve prebiyotik olarak zenginleştirilmiş kefir örnekleri üzerinden araştırılmıştır. Bu nedenle, kolit ile ilişkili insanlarda transfer edilebilecek miRNA'ların, toplumumuzda yaygın olarak uygulanan içme sütü üretim aşamalarına karşı direnç düzeylerinin araştırılması, gelecek çalışmalara önemli veriler sağlama potansiyeline sahiptir. Bu alanda yapılan araştırmaların literatürde sınırlı olduğu gözlemlenmekte ve projemizin, yeni besinsel miRNA araştırmaları için literatüre ön veri oluşturma potansiyeli taşıdığı düşünülmektedir.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. Kolit Hastalığı

Kolit, bağırsak iltihabı hastalığıdır ve kalın bağırsağı etkileyebilir. Kolit, kalın bağırsağın iç yüzeyindeki iltihaplanma nedeniyle oluşur ve sindirim sistemi sorunlarına neden olabilir. Kolit, genellikle karın ağrısı, ishal, kabızlık, kanlı dışkı, yorgunluk, kilo kaybı ve ateş gibi semptomlarla ilişkilidir (Ungaro vd., 2017, Torres vd., 2017).

Kolit, farklı alt tipleri olan bir hastalıktır. En yaygın alt tipleri şunlardır:

- Ülseratif kolit: Kolonun iç yüzeyindeki iltihaplanma ile karakterizedir ve genellikle kanlı ishal, karın ağrısı, ateş ve kilo kaybı gibi semptomlara neden olur (Ungaro vd., 2017).
- Crohn hastalığı: İltihaplanma, kalın bağırsak veya ince bağırsak gibi sindirim sistemi farklı bölümlerinde meydana gelir. Semptomları, ishal, karın ağrısı, iştah kaybı, yorgunluk ve kilo kaybı gibi geniş bir yelpazede olabilir (Torres vd., 2017).

Kolit, genetik, çevresel ve diyet faktörleri gibi birçok farklı nedenden kaynaklanabilir. Tedavisi, semptomların şiddetine, kolitin türüne ve hastanın genel sağlık durumuna göre değişebilir. Tedavi seçenekleri arasında ilaçlar, diyet değişiklikleri ve bazı durumlarda cerrahi müdahale yer alabilir.

2.2. Kolit Hastalığının Epidemiyolojisi

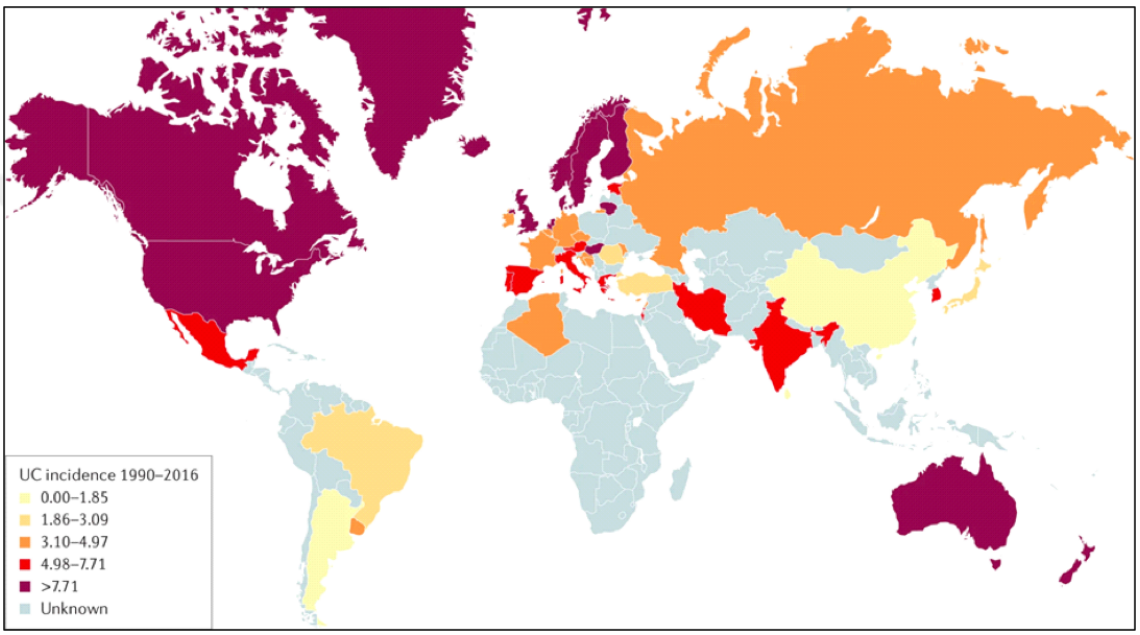
Kolit, bağırsakların iltihaplanması nedeniyle oluşan bir hastalıktır ve çeşitli nedenlerden kaynaklanabilir. Kolit, tüm dünyada yaygın bir sağlık sorunu haline gelmiştir ve sıklığı giderek artmaktadır (Khor vd., 2011).

Kolit hastalığının epidemiyolojisi, hastalığın yaygınlığı, dağılımı ve risk faktörleri hakkında bilgi sağlar. Uluslararası çalışmalar, kolitin özellikle gelişmiş ülkelerde daha sık görüldüğünü göstermektedir (Kaplan vd., 2015). Özellikle Batı ülkelerinde artan bir insidans görülmüştür (Ng vd., 2018).

Kolitin görülme sıklığı, yaş ve cinsiyete göre farklılık göstermektedir. Çocukluk çağında görülme sıklığı daha azdır ancak yaşın ilerlemesiyle birlikte artar (Kappelman vd., 2008).

Kadınlarda erkeklere göre daha sık görülmektedir (Molodecky vd., 2011). Şekil 2.1'de 1990'dan 2016'ya kadar farklı ülkelerdeki kolit insidansı gösterilmiştir.

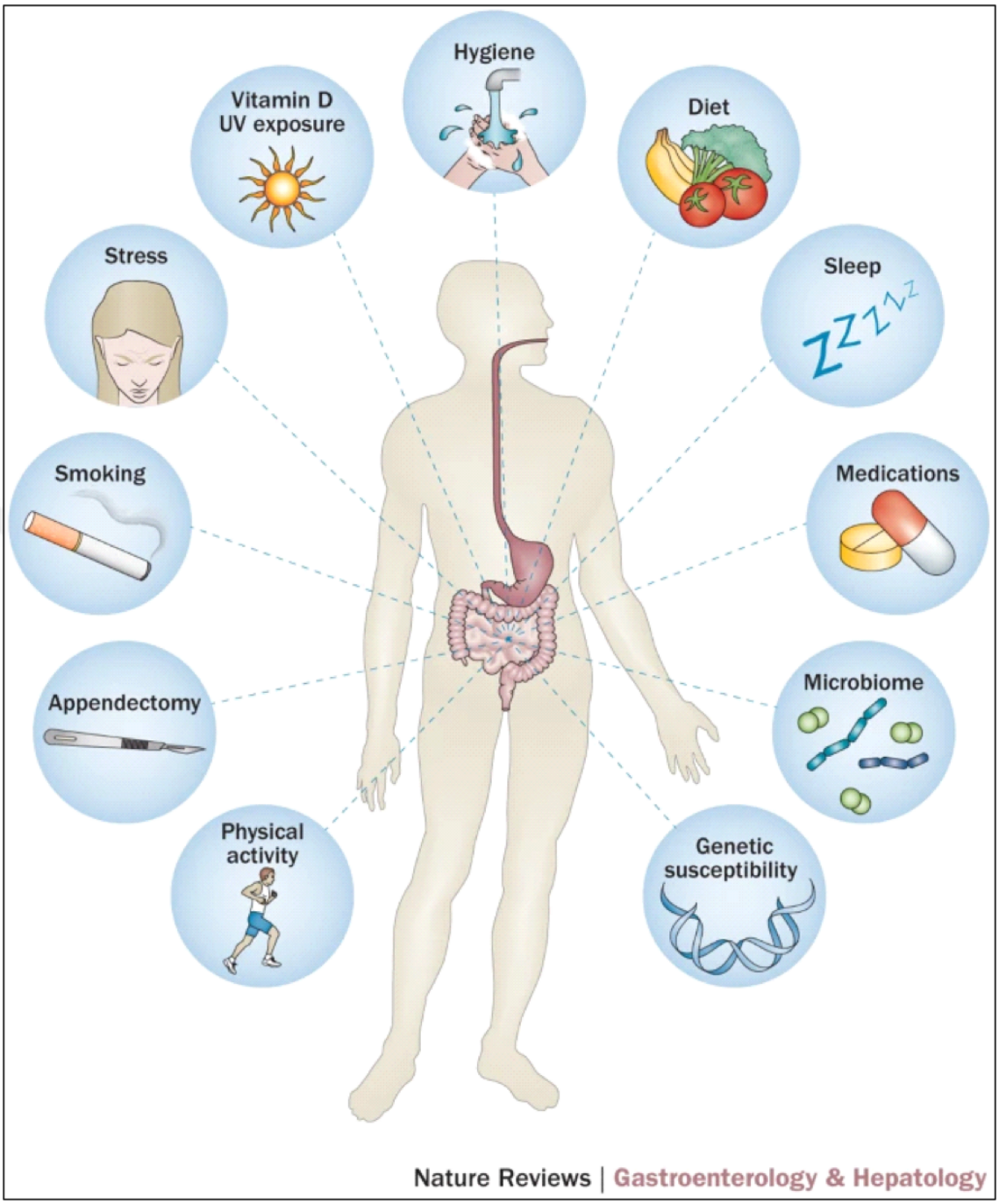
Kolitin risk faktörleri arasında genetik yatkınlık, diyet, enfeksiyonlar, sigara içme, stres ve çevresel faktörler bulunmaktadır (Molodecky vd., 2011). İnflamatuvar bağırsak hastalığı geliştirme riski olan kişilerin takibi ve önleme stratejileri, kolitin epidemiyolojik profilini anlamada önemlidir.



Şekil 2.1. 1990'dan 2016'ya kadar farklı yetki alanlarında ülseratif kolit (UC) insidansı (Taku vd., 2020)

2.3. Kolit Hastalığının Risk Faktörleri

Kolit hastalığının artmasında birçok faktör rol oynayabilir. Bazı araştırmalar, artan farkındalık, tanı yöntemlerindeki gelişmeler ve beslenme alışkanlıklarındaki değişikliklerin kolit vakalarının artmasına neden olabileceğini göstermiştir (Loftus vd., 2004). Kolit hastalığına yakalanma riskini artıran diğer faktörler arasında sigara içmek, stres, genetik yatkınlık, bağırsak enfeksiyonları, antibiyotik kullanımı ve beslenme alışkanlıkları yer almaktadır (Baumgart vd., 2007). Şekil 2'de kolit hastalığının risk faktörleri şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 2.2. Kolit hastalığının risk faktörleri (Ananthakrishnan, 2015)

2.3.1. Çevresel Risk Faktörleri

Kolit hastalığı, inflamatuvar bağırsak hastalıkları (İBH) arasında yer alan bir hastalıktır. Çevresel faktörlerin İBH gelişimi üzerinde önemli bir etkisi olduğu bilinmektedir (Ananthakrishnan vd., 2013). Sigara içmek, kolit hastalığının riskini artıran çevresel faktörlerden biridir. Sigara içenlerde İBH gelişme riski, sigara içmeyenlere göre daha yüksektir (Ananthakrishnan vd., 2015). Diyet de kolit hastalığının gelişimi ile ilgili bir risk faktörüdür. Fast-food, işlenmiş gıdalar, şekerli içecekler gibi bazı gıdalar kolit hastalığı için risk faktörü olarak kabul edilirken, sebzeler, meyveler ve tam tahıllı gıdaların tüketimi İBH riskini azaltabilir (Hou vd., 2011). Kirlilik, sanitasyon eksikliği ve hijyenik olmayan koşulların yaşandığı ortamlarda yaşayanlarda kolit hastalığına yakalanma riski yüksektir (Kaplan vd., 2011). Ayrıca, stresin İBH gelişiminde rolü olduğu da düşünülmektedir. Stres, bağırsak hareketliliği ve mukozal bariyer fonksiyonunda değişikliklere neden olabilir ve İBH riskini artırabilir (Mawdsley vd., 2005).

2.3.2. Genetik Risk Faktörleri

Kolit hastalığı, İBH arasında yer alan bir hastalıktır. İBH'nin gelişiminde genetik faktörlerin önemli bir rolü olduğu bilinmektedir (Xavier vd., 2007). İBH ailesel geçiş gösterir ve aile üyelerinde İBH varlığı olan kişilerde İBH riski daha yüksektir. Bu nedenle, İBH'nin ailevi bir hastalık olduğu düşünülmektedir (Jostins vd., 2012). Genetik faktörlerin İBH gelişimindeki rolü, İBH ile ilişkili olan bazı genlerin belirlenmesiyle daha iyi anlaşılmıştır. Örneğin, *NOD2* genindeki mutasyonlar Crohn hastalığı için bir risk faktörüdür. Bunun yanı sıra, *IL23R, ATG16L1, IRGM* gibi genlerin de İBH ile ilişkisi olduğu gösterilmiştir (Khor vd., 2011). Genetik faktörlerin İBH gelişimindeki rolü ayrıca, hastalık seyrinde de etkilidir. Bazı genetik faktörler, hastalık aktivitesi ve prognozu üzerinde etkili olabilir (Ananthakrishnan vd., 2015). Ancak, İBH gelişimindeki genetik faktörlerin tamamı henüz anlaşılamamıştır ve İBH'nin gelişiminde diğer faktörlerin de etkili olduğu düşünülmektedir (Liu vd., 2014).

2.3.3. Epigenetik Risk Faktörleri

Epigenetik değişiklikler, gen ifadesini etkileyen ancak DNA dizisinde değişiklik yapmayan faktörlerdir. miRNA'lar, post-transkripsiyonel seviyede gen ifadesini düzenleyen bir tür epigenetik faktördür (Markowitz vd., 2009). MiRNA'ların İBH patogenezindeki rolü, son yıllarda yapılan çalışmalarla daha iyi anlaşılmaktadır. MiRNA'ların, inflamatuvar yanıtı düzenleyen genlerin ifadesinde önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir (Coskun vd., 2012). Örneğin, miR-21 ve miR-146a gibi miRNA'ların İBH'de artmış bir ifade düzeyine sahip olduğu gösterilmiştir. Bu miRNA'ların, inflamasyonu düzenleyen faktörler olan *NF-kB* ve *TNF-α*'yı hedef aldığı düşünülmektedir (Coskun vd., 2012). Ayrıca, miR-192, miR-195 ve miR-365 gibi miRNA'ların da İBH patogenezinde rol oynadığı gösterilmiştir. Bu miRNA'ların, inflamatuvar yanıtı düzenleyen genlerin ifadesini inhibe ettiği düşünülmektedir (Paraskevi vd., 2012). İBH'de miRNA'ların etkisi, hastalık aktivitesi ve prognozu üzerinde de etkilidir. Bazı çalışmalar, miRNA'ların İBH'nin klinik seyrini tahmin etmede kullanılabileceğini göstermiştir (Viennois vd., 2020).

RNaz aktivitesi sütte mevcuttur (Ibuki vd., 1965). Rnaz aktivitesinin varlığına rağmen, miRNA'lar sütte kararlı bir şekilde bulunur. İnsan anne sütü, Rnaz sindirimi, düşük pH, donma çözülme döngüleri ve kaynatma gibi zorlu işlemlere dirençli RNA içerirken, diğer yandan eklenen eksojen miRNA'lar bu tedavilerle bozulur (Kosaka vd., 2010, Zhou vd., 2012). Son zamanlarda, bu süt eksozomal miRNA'larının, sütün 10 dakika kaynatılması, sütün bir gün 4 °C'de saklanması ve beş kez donma-çözülme döngüleri dahil olmak üzere aşırı sıcaklık işlemlerinden sonra bile lipit çift tabakası nedeniyle çok kararlı olduğunu kanıtlanmıştır (Baddela vd., 2016). Bu miRNA'ların sütteki sert muamelelere karşı kararlılığı, bu nükleik asit türlerinin fizyolojik ve fonksiyonel yönlerinin varlığını göstermektedir. Bu miRNA'ların mide-bağırsak sisteminin asidik ortamını tolere edebildiğini ve bağırsak yoluyla emilebildiğini ve bebeğin vücut sistemini etkileyebileceğini gösterir. Aynı şekilde sığır sütü durumunda, düşük pH ortamında ve Rnaz işleminden sonra stabildirler (Hata vd., 2010, Izumi vd., 2012). Sığır sütünün ayrıca, gastrointestinal sindirimi atlayabilen ve vücudun süreçlerini etkileyebilen ve biyoaktif bileşen olarak süt miRNA'sının gerçeğini güçlendiren kararlı miRNA'lar içerdiğini ileri sürer.

2.4. MiRNA'lar (MiRNA'lar)

MikroRNA (miRNA), yaklaşık 22 nükleotidden oluşan küçük, tek sarmallı RNA moleküllerdir. Bu moleküller, gen ifadesini düzenleyen post-transkripsiyonel regülatörler olarak görev yaparlar (Lee vd., 1993). MiRNA'lar, gen ifadesini düzenleyerek, protein sentezini inhibe ederler veya mRNA moleküllerini hızlandırırlar. Bu nedenle, hücre döngüsü, apoptoz, hücre farklılaşması ve tümör supresyonu gibi birçok biyolojik süreci düzenlerler (Bartel vd., 2004). Ayrıca, miRNA'ların patolojik süreçlerde de önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. Örneğin, kanser, kalp hastalıkları, nörolojik bozukluklar ve inflamatuvar hastalıklar gibi birçok hastalıkta miRNA'ların düzensiz ifade edilmesi gözlemlenmiştir (Peng vd., 2016). MiRNA'ların düzenlenmesi ve ifade düzeyleri, epigenetik mekanizmalar tarafından kontrol edilir. Bu mekanizmalar arasında DNA metilasyonu, histon modifikasyonları, non-kodlayan RNA'lar ve kromatin yapısal değişiklikleri yer alır. Son yıllarda, miRNA'ların biyolojik işlevleri ve patolojik süreçler üzerindeki etkileri hakkında birçok çalışma yapılmıştır ve bu çalışmalar, miRNA'ların terapötik hedef olarak kullanım potansiyelini artırmıştır (Krol vd., 2010).

2.4.1. MiRNA'ların Biyogenezi

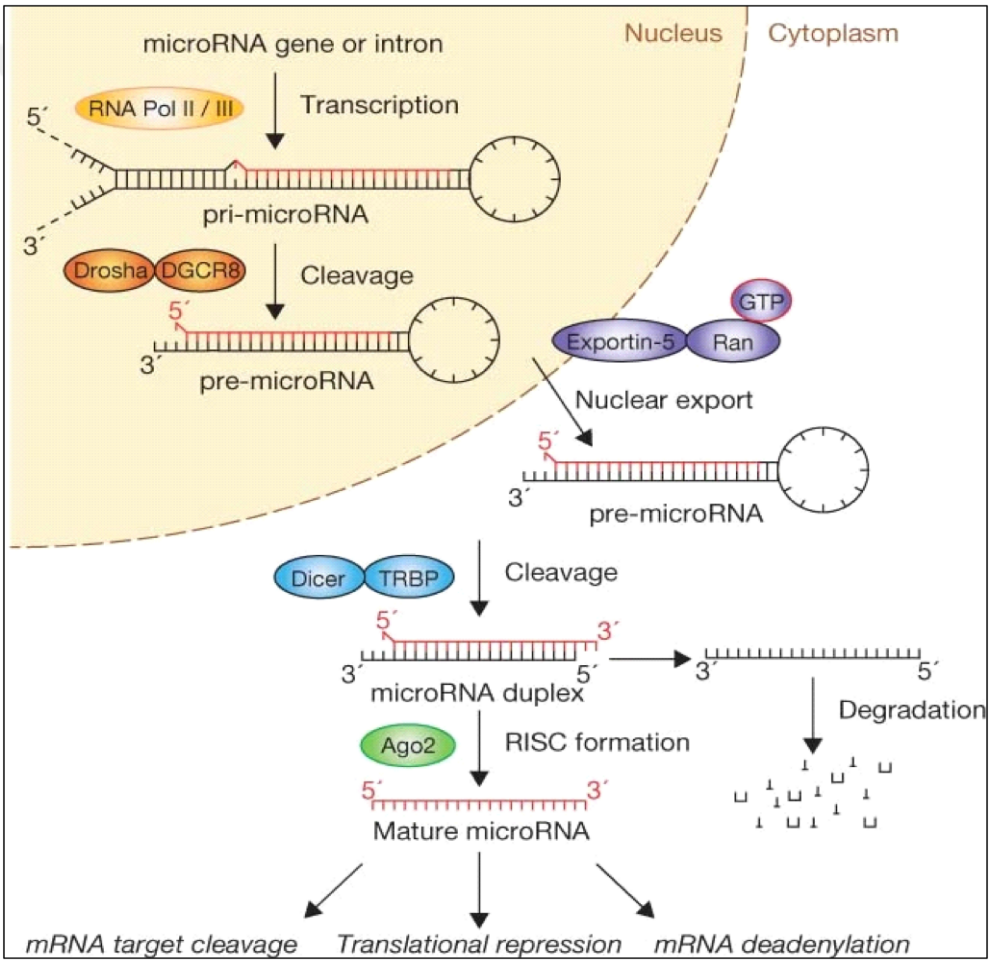
Çizelge 2.1'de mikroRNA'ların biyogenezi aşamaları ve ilgili proteinler verilmiştir.

Çizelge 2.1. MiRNA biyogenezi aşamaları

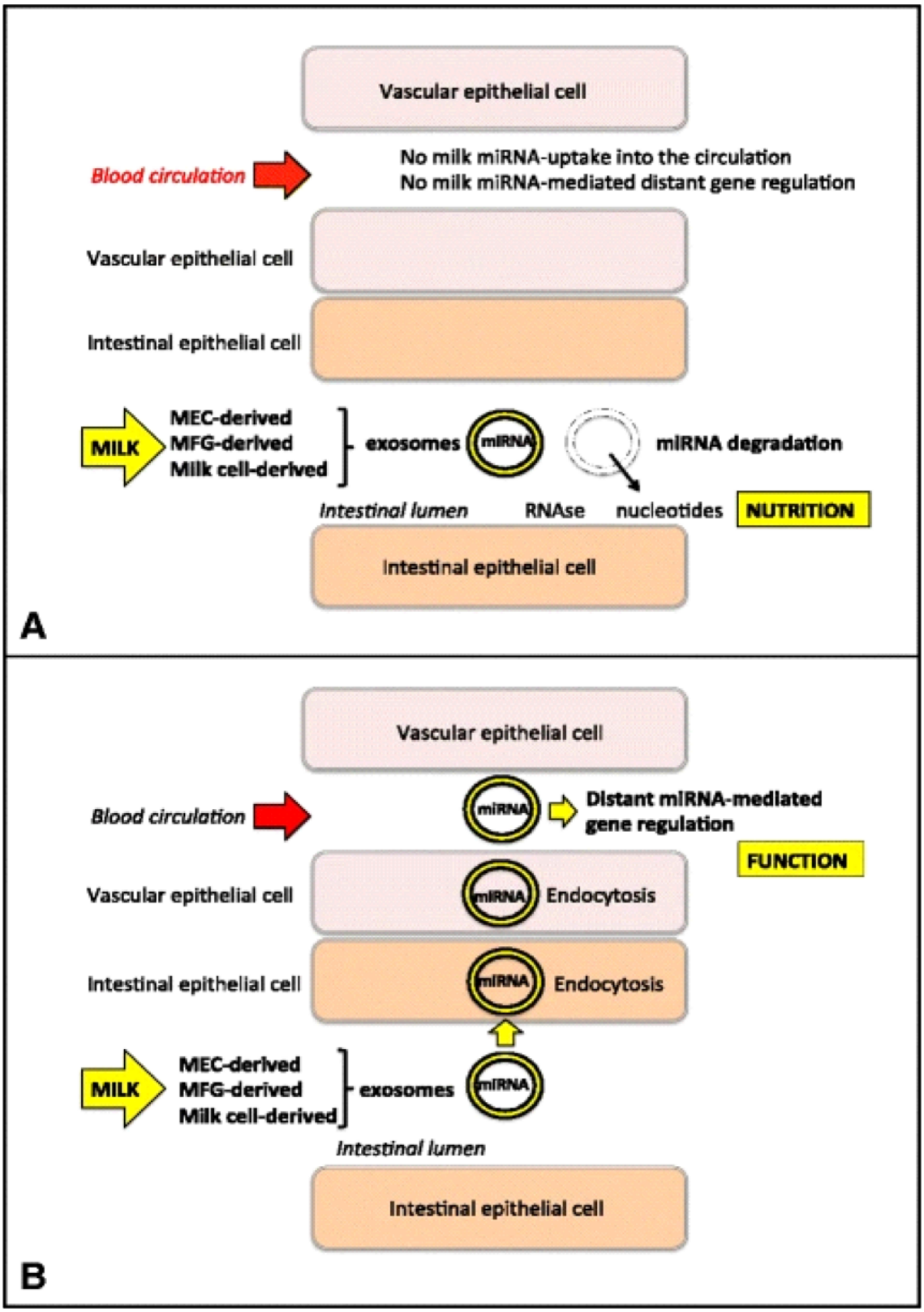
Aşama	Açıklama	İlgili Proteinler
1	Transkripsiyon sonrası başlangıç	Drosha, DGCR8
2	Pri-miRNA oluşumu	DGCR8
3	Pre-miRNA oluşumu	Exportin-5
4	Hedef mRNA'larla bağlanma ve translasyon inhibisyonu	RISC (Argonaute)

- Transkripsiyon sonrası başlangıç: miRNA'lar, kodlamayan bir DNA bölgesindeki genlerin transkripsiyonu sonucu oluşurlar. Bu aşamada, RNA polimeraz II tarafından transkripsiyon gerçekleştirilir.

- Aşama 2: Pri-miRNA oluşumu: Transkripsiyon sonrasında, Drosha ve DGCR8 kompleksi tarafından işlenirler. Bu kompleks, miRNA'ların öncül formlarını (pri-miRNA) oluşturur. Pri-miRNA'lar daha sonra pre-miRNA'ya dönüştürülecektir.
- Aşama 3: Pre-miRNA oluşumu: Exportin-5 tarafından pre-miRNA'ya işlenirler. Exportin-5, pre-miRNA'ların çekirdek zarından sitoplazmaya taşınmasını sağlar.
- Aşama 4: Hedef mRNA'larla bağlanma ve translasyon inhibisyonu: miRNA'lar, RISC (RNA-indüklenmiş susturma kompleksi) tarafından hedef mRNA'larla bağlanır. Bu bağlanma, translasyonun inhibisyonuna veya hedef mRNA'nın yıkımına neden olur (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. MiRNA biyogenezi (Winter vd., 2009)



Şekil 2.4. Süt kaynaklı miRNA'ların **A)** Beslenme hipotezinin ve **B)** Fonksiyonel hipotezinin şematik gösterimi (Melnik vd., 2016)

Beslenme hipotezi, süt kaynaklı miRNA'ların bağırsak lümeninde parçalandığını ve sadece bağırsak büyümesi veya diğer organların kan dolaşımı yoluyla büyümesi için lokal beslenme gereksinimlerini karşılayan nükleotidler sağladığını öne sürer. Ancak, fonksiyonel hipoteze göre, sütten elde edilen miRNA'lar, eksozomların endositozu, diğer süt mikroveziküllleri veya süt hücrelerinin doğrudan transferi yoluyla kan dolaşımına emilir ve uzak gen düzenleyici fonksiyonlar uygularlar. Bu hipotez, miRNA'ların bağırsak dışındaki organlarda gen ifadesini değiştirebileceğini ve insan metabolizmasını etkileyebileceğini öne sürmektedir (Şekil 2.4) (Melnik vd., 2016).

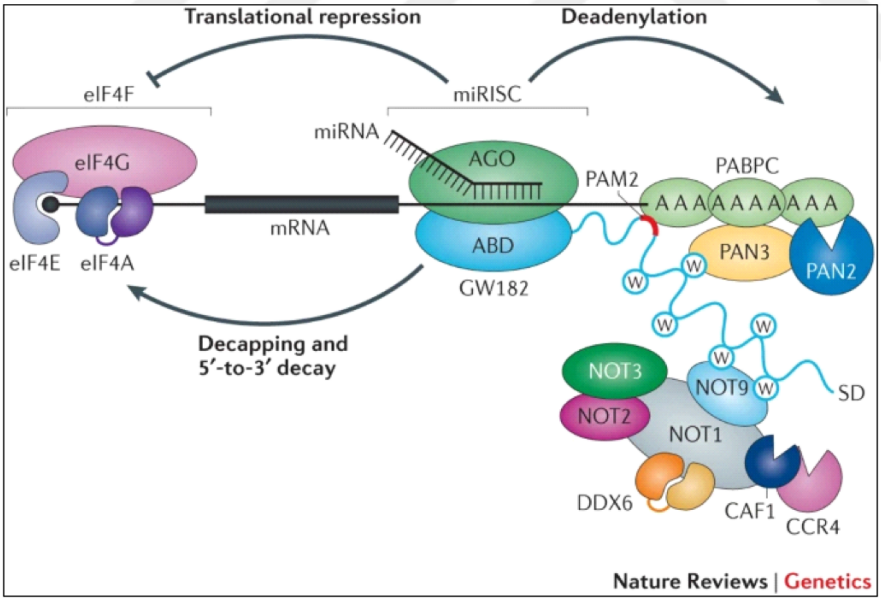
2.4.2. MiRNA'ların Fonksiyonları

MikroRNA'ların (miRNA) birçok biyolojik süreçte rol aldığı bilinmektedir. MiRNA'ların en önemli fonksiyonlarından biri gen ekspresyonunun düzenlenmesidir (Bartel vd., 2009). MiRNA'lar, hücrelerdeki mRNA'larla tamamlayıcı baz çiftleri oluşturarak mRNA hedeflerine bağlanırlar ve translasyonu inhibe ederler ya da mRNA'yı çevreleyen RISC kompleksleri tarafından yıkıma uğratılırlar. Bu şekilde, miRNA'lar hücre içindeki birçok sürecin düzenlenmesinde görev alırlar, örneğin; hücre proliferasyonu, hücre farklılaşması, apoptoz, metabolizma ve bağışıklık yanıtı (Treiber vd., 2019). Ayrıca, miRNA'ların hastalıkların patogeneziyle ilişkili olduğu da belirlenmiştir. Örneğin, kanser, kardiyovasküler hastalıklar, nörolojik hastalıklar ve otoimmün hastalıklar gibi birçok hastalığın patogenezinde miRNA'ların rolü olduğu gösterilmiştir (Anastasiadou vd., 2018). Son olarak, miRNA'ların hücreler arasında iletişim kurmada da önemli bir rolü olduğu öne sürülmüştür. Eksozom olarak adlandırılan küçük veziküller, miRNA'lar tarafından taşınabilir ve bu şekilde hücreler arasında iletişim sağlanabilir (Koppers-Lalic vd., 2014).

2.5. MiRNA Aracılı Gen Regülasyonu

MikroRNA (miRNA) aracılı gen regülasyonu, hücrelerdeki birçok biyolojik sürecin düzenlenmesinde kritik bir rol oynar. MiRNA'lar, hedef mRNA'ların 3'UTR bölgesinde bulunan tamamlayıcı bölgelerle eşleşirler ve bu bölgelere bağlanarak mRNA'nın translasyonunu inhibe ederler veya mRNA'yı parçalanmaya uğratırlar. Bu şekilde, miRNA'lar hücredeki gen ekspresyonunu kontrol ederler ve hücre proliferasyonu, hücre farklılaşması, apoptoz, metabolizma ve bağışıklık yanıtı gibi birçok biyolojik sürecin

düzenlenmesinde görev alırlar (Bartel vd., 2009). MiRNA'lar, hedef mRNA'ların translasyonunu inhibe etmek veya parçalamak için RISC adı verilen protein kompleksleriyle birleşirler. RISC kompleksi, miRNA ile hedef mRNA arasındaki baz eşleşmelerine dayanarak miRNA hedefini tanır ve mRNA'nın translasyonunu inhibe etmek veya mRNA'yı parçalamak için gerekli enzimleri içerir (Şekil 2.5) (Jonas vd., 2015). MiRNA'ların hedeflediği mRNA'lar, miRNA tarafından tanınabilen tamamlayıcı bölgeler içerirler. MiRNA ve mRNA arasındaki tamamlayıcı bölge eşleşmelerinin seviyesi, miRNA tarafından hedeflenen mRNA'nın seviyesini belirler. Tamamlayıcı bölge eşleşmeleri daha yüksekse, hedeflenen mRNA'nın seviyesi daha düşük olur. Ayrıca, miRNA'ların aynı hedef mRNA'ya bağlanabilen farklı tipleri de vardır ve bu miRNA'lar arasındaki rekabet, hedef mRNA'nın translasyon seviyesini değiştirebilir (Hausser vd., 2014). Son olarak, miRNA'lar, hücreler arasında sinyal iletiminde de önemli bir rol oynayabilirler. Bazı çalışmalar, miRNA'ların hücreler arasındaki iletişimde önemli bir rol oynadığını ve eksozom adı verilen küçük veziküller aracılığıyla diğer hücrelere taşınabildiğini göstermiştir (Koppers-Lalic vd., 2014).



Şekil 2.5. MiRNA aracılı gen regülasyonu (Jonas vd., 2015)

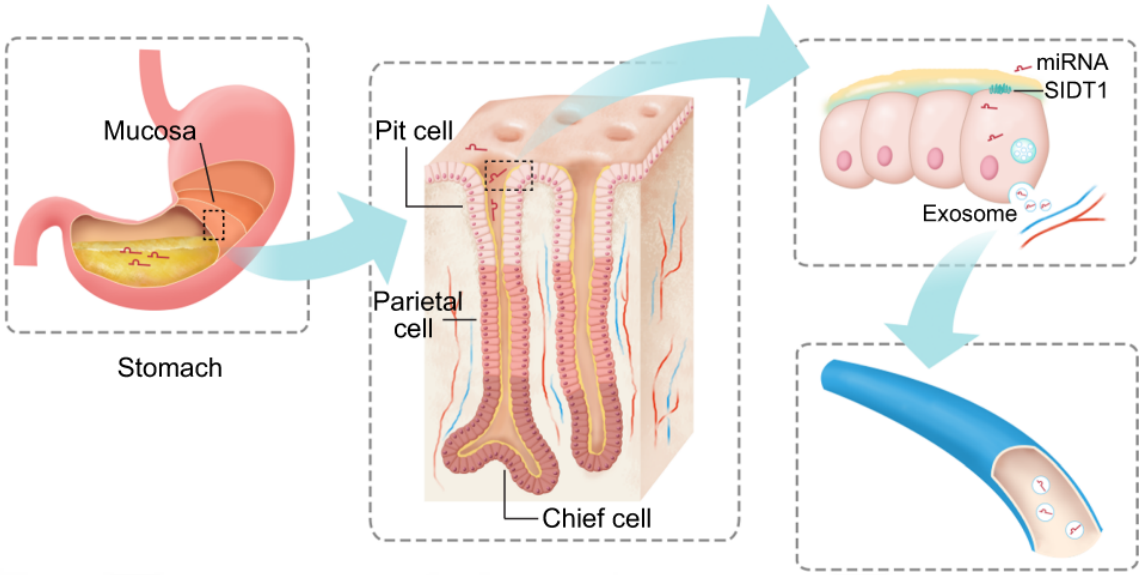
2.6. Besinsel MiRNA'lar

Besinsel miRNA'lar, besin alımı ve metabolizma gibi biyolojik süreçlerde önemli rol oynayan kısa RNA moleküllerdir. Besinsel miRNA'lar, besinlerin hücre içindeki

metabolik yollarını düzenleyerek enerji homeostazını korumaya yardımcı olurlar. Ayrıca, besinsel miRNA'lar obezite, diyabet ve kardiyovasküler hastalıklar gibi sağlık sorunlarıyla ilişkilendirilmiştir (Mendes-Silva vd., 2021). Birçok besinsel miRNA, gıdalarla birlikte alınan mikro besin maddeleri ve diğer bileşenler tarafından düzenlenir. Şekil 2.6'da midede besinsel miRNA'ların alımı ve salınımı gösterilmiştir. Örneğin, bazı miRNA'lar omega-3 yağ asitleri gibi yağlı asitlerin varlığına bağlıdır (Pahlavani vd., 2021). Besin alımı, hücre içinde miRNA ekspresyonunu değiştiren bir dizi moleküler mekanizmaya neden olur. Örneğin, besinler, hücre içindeki sinyal yolaklarını aktive ederek miRNA ekspresyonunu değiştirebilir (Chen vd., 2015). Besinsel miRNA'lar ayrıca, yiyeceklerin sindirilmesi ve emilimiyle ilgili süreçleri de düzenler. Bu miRNA'ların hücre içindeki taşıyıcı moleküller ve gen ekspresyonu üzerindeki etkileri sindirim sistemi sağlığı için kritiktir (Preethi vd., 2021).

Yapılan araştırmalar, süt eksozomlarındaki miRNA'ların önemli bir biyoaktif besin içeriği olduğunu ve insan gen regülasyonunu potansiyel olarak etkileyebileceklerini ortaya koymuştur. Bu çalışma, süt miRNA'larının beslenme yoluyla türler arası transferi ve biyoaktif olma potansiyellerini ilk kez gösteren bir çalışmadır. İmmün sistemle ilişkili süt miRNA'larının, inek sütü tüketimine bağlı olarak insan genlerini hedefleyerek ekspresyon seviyelerini değiştirerek bağışıklık sisteminde rol oynayabilecekleri öne sürülmüştür (Baier vd., 2014). Ayrıca, çalışmalar süt eksozomlarının kolon kanseri hücrelerine, bağırsak hücrelerine, böbrek hücrelerine, makrofajlara ve insan periferal kan mononükleer hücrelerine transfer edilebildiğini bildirmiştir. (Benmoussa vd., 2020; Rani vd., 2017; Izumi vd., 2015; Izumi vd., 2012).

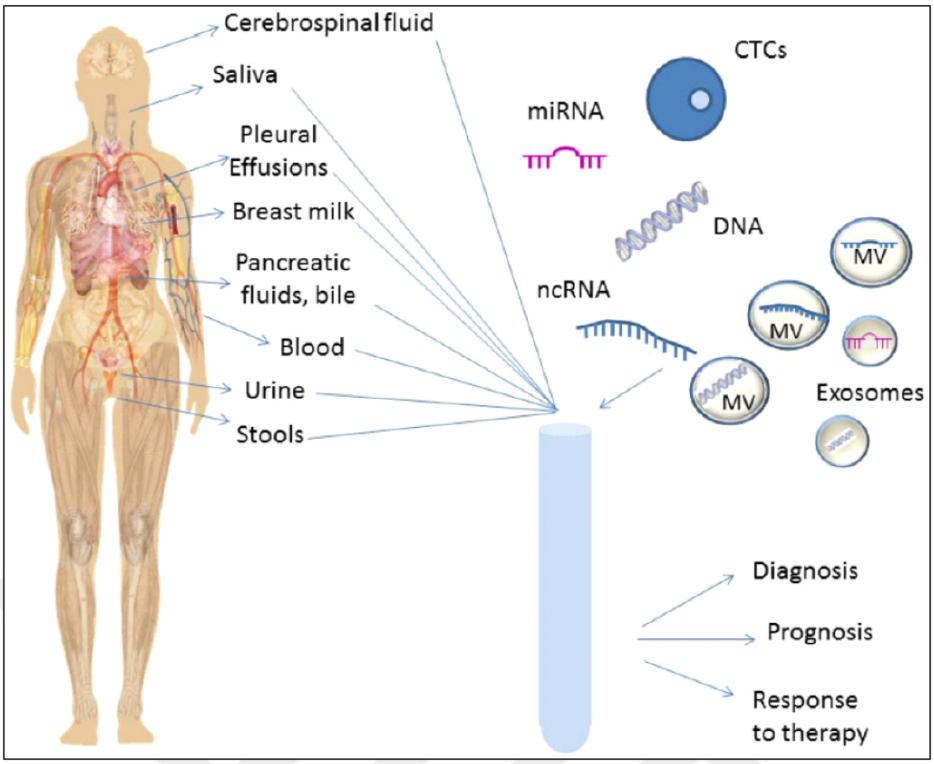
Sonuç olarak, besinsel miRNA'lar besin alımı ve metabolizma süreçlerinde önemli bir rol oynarlar ve sağlık için önemlidirler. Yiyeceklerin miRNA ekspresyonunu değiştirebileceği bilgisi, beslenme alışkanlıklarının düzenlenmesi için yeni bir strateji sunmaktadır (Mendes-Silva vd., 2021; Preethi vd., 2021). Bununla birlikte, fizyolojik stabilitelerini ve biyoaktif potansiyellerini keşfetmek için ise daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.



Şekil 2.6. Besinsel miRNA'lar (Chen vd., 2021)

2.7. Vücut Sıvılarındaki MiRNA'lar

miRNA'lar, vücut sıvıları gibi dolaşımdaki biyolojik sıvılarda da yaygın olarak bulunurlar (Cortez vd., 2011). Dolaşımdaki miRNA'lar, hücrelerden salınarak, hedef hücrelerde gen ekspresyonunu düzenleyebilirler ve bu nedenle potansiyel bir diyagnostik ve terapötik araç olarak kullanılabilirler (Wang vd., 2014). Bazı çalışmalar, belirli kanser türleri için dolaşımdaki miRNA'ların birer biyobelirteç olarak kullanılabileceğini göstermiştir (Schwarzenbach vd., 2014). Dolaşımdaki miRNA'ların bir diğer önemli özelliği ise, beyin kan-beyin bariyerini geçebilme yetenekleridir. Bu nedenle, beyin hastalıklarının tanısı ve tedavisinde potansiyel bir kullanım alanı olarak da görülebilirler (Wahid vd., 2018). Sonuç olarak, dolaşımdaki miRNA'ların biyolojik sıvılardaki varlığı, çeşitli hastalıkların tanısı ve tedavisi için umut vaat eden bir alan olarak görülmektedir (Wang vd, 2014). Şekil 2.7'de vücut sıvılarındaki miRNA'lar şematik olarak gösterilmiştir.

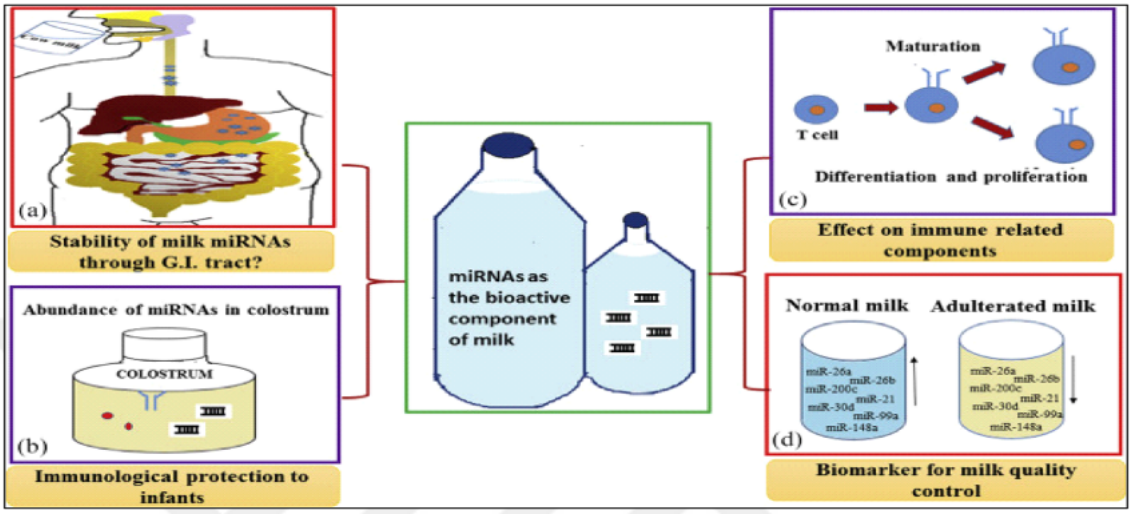


Şekil 2.7. Vücut sıvılarındaki miRNA'lar (Yu vd., 2021)

2.8. Süt MiRNA'ları

Süt miRNA'ları, sütte bulunan küçük non-kodlayıcı RNA'lar (sncRNA'lar) sınıfındadır ve sütün biyolojik aktivitesine katkıda bulunurlar. Süt miRNA'ları, memeli sütü ve diğer sütlerde bulunur ve hem anne hem de yavru sağlığı için önemlidir (Le Doare ve ark., 2018). Süt miRNA'ları, sütteki hücreler tarafından salgılanır ve sütün biyolojik işlevlerinde önemli bir rol oynarlar. Süt miRNA'ları, hücre farklılaşması, büyüme ve bağışıklık fonksiyonları gibi süreçlere katkıda bulunabilirler. Ayrıca, süt miRNA'ları, besin emilimi ve bağırsak sağlığına da katkıda bulunabilirler (Chen vd., 2020). Süt miRNA'ları, insanlar tarafından tüketildiğinde biyolojik aktivite gösterebilirler. Örneğin, süt miRNA'ları, bağırsak mikrobiyotasında bazı değişikliklere neden olabilirler ve metabolik fonksiyonları etkileyebilirler (Baier vd., 2021). Süt miRNA'ları, yavru gelişimi ve sağlığı için de önemlidir. Örneğin, anne sütünde bulunan miRNA'ların, yavru bağışıklık sistemi gelişimine yardımcı olduğu ve enfeksiyonlardan korunmaya yardımcı olduğu düşünülmektedir (Chen vd., 2010).

Sonuç olarak, süt miRNA'ları, sütün biyolojik işlevlerinde önemli bir rol oynarlar ve hem anne hem de yavru sağlığı için faydalıdırlar. Ayrıca, süt miRNA'ları insanlar tarafından tüketildiğinde biyolojik aktivite gösterebilirler ve metabolik fonksiyonları etkileyebilirler (Le Doare ve ark., 2021; Chen vd., 2010; Baier vd., 2021).

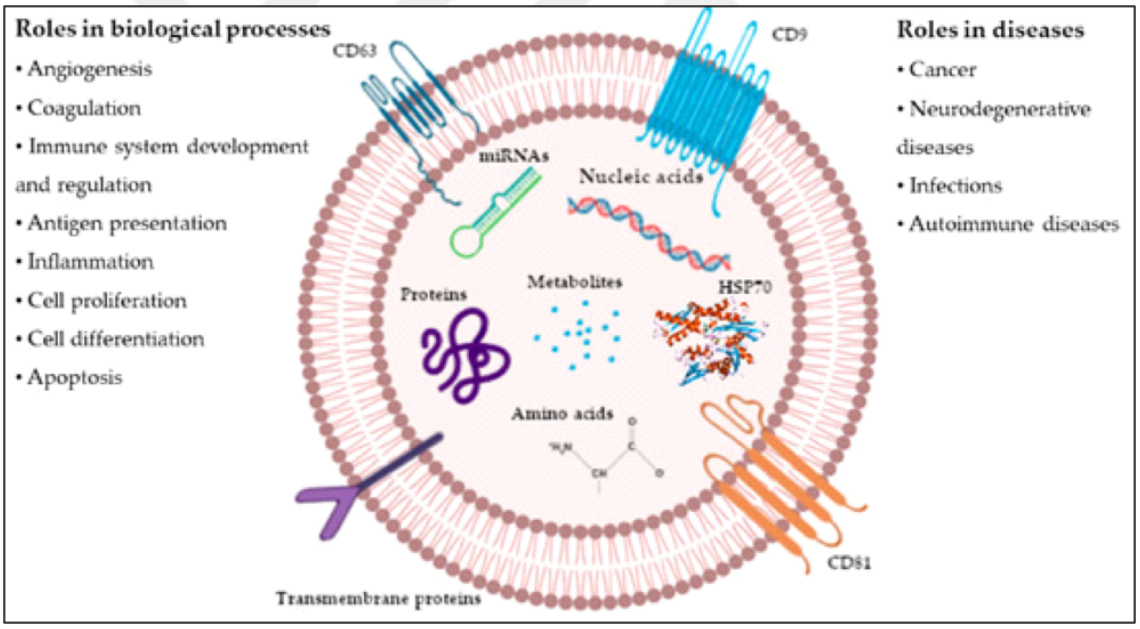


Şekil 2.8. Süt miRNA'larının farklı özelliklerinin şematik gösterimi (Rani vd., 2017)

Şekil 2.8'de süt miRNA'larının farklı özellikleri şematik olarak gösterilmiştir. Süt miRNA'ları sindirim süreçlerine karşı kararlı olabilir ve bağırsak bariyerini geçerek kan dolaşımına ulaşabilir (Şekil 2.8a), bu konu hala tartışılmaktadır. Tüm laktasyon aşamalarında kolostrumda daha bol bulunurlar (Şekil 2.8b). Proliferasyon, farklılaşma gibi önemli hücresel süreçlerin düzenlenmesinde rol oynarlar (Şekil 2.8c). Süt miRNA'larının varlığı süt kalite kontrolü için biyobelirteç olarak kullanılabilir (Şekil 2.8b).

Süt miRNA'larının tanımlanması ve karakterizasyonu, süt ürünleri araştırmalarında gelişmekte olan bir çalışma alanıdır ve bunların sütteki varlığının öneminin anlaşılması gerekmektedir. MiRNA'ları ve beslenmeyi sağlamadaki rollerini araştırmak için birçok çalışma yapılmaktadır. MiRNA'ların biyolojik süreçlerin çoğuna dahil olması, sütün biyoaktif bir bileşeni olarak bu nükleik asit türlerinin araştırılmasına ilgi uyandırmaktadır. Biyoaktif bir bileşen olarak rolleri, hücre dışı miRNA'ların hücreler arası haberci olarak hareket edebilmeleri ve diğer hücrelere girdiklerinde hücresel süreçleri etkileyebilmeleri gerçeğiyle güçlendirilir (Rani vd., 2017).

İnek sütü, memeli sütü içerisinde önemli bir besin kaynağıdır. Son yıllarda yapılan araştırmalar, inek sütünde bulunan eksozomal süt miRNA'ların birçok biyolojik süreçte rol aldığını göstermektedir (Zempleni vd., 2019). Eksozomal süt miRNA'larının, meme bezleri ve süt üreten hücreler tarafından salgılandığı ve sütteki miRNA'ların, hayvanların büyüme, gelişme ve hastalık direnci gibi birçok fizyolojik süreçte rol aldığı belirtilmektedir (Izumi vd., 2015). Eksozomal süt miRNA'larının, inek sütünden alınan makrofajlar ve bağırsak hücreleri üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Bu miRNA'lar, bağırsak hücrelerinin büyümesi, proliferasyonu ve farklılaşması üzerinde etkili olabilir (Xiao vd., 2014). Bazı araştırmalar, eksozomal süt miRNA'larının insanların sağlığına da olumlu katkılar sağlayabileceğini göstermektedir. Örneğin, inek sütündeki miRNA-29b-3p'nin, insanlarda miyokardiyal fibrozisi azaltabileceği düşünülmektedir (Zempleni vd.., 2019).



Şekil 2.9. Eksozomların rollerinin ve içeriklerinin basitleştirilmiş gösterimi (Cintio vd., 2020).

Eksozomlar, hücreler tarafından üretilen ve hücre dışında bulunan nanoveziküllerdir. Bu nanoveziküller, nükleik asitler, proteinler, lipitler ve metabolitler gibi çeşitli bileşenleri taşırlar. Eksozomlar, sağlık ve hastalık durumlarında, hücreler arası iletişimin hem yakın hem de uzak mesafelerdeki bir aracı olarak önemli bir rol oynarlar (Şekil 2.9).

2.9. Süt İşleme Aşamalarının MiRNA'lar Üzerinde Etkisi

Süt işlenme aşamaları, sütün kalitesini artırmak ve tüketiciye daha güvenli bir ürün sunmak için önemlidir. Ancak, bu aşamaların sütteki miRNA'lar üzerindeki etkisi de incelenmektedir (Cai vd., 2018). Sütün işlenmesi sırasında, miRNA'ların yapısı ve aktivitesi değişebilir. Bazı araştırmalar, işlem görmüş sütlerdeki miRNA'ların sayısının ve çeşitliliğinin azaldığını göstermiştir (Howard vd., 2015).

Pastörizasyon, sütün mikroorganizmaları öldürmek ve sağlıklı bir süt ürünü elde etmek için uygulanan bir ısıl işlemdir. Bu işlem, sütün biyolojik, kimyasal ve fiziksel özelliklerini değiştirebilir ve bu nedenle pastörize sütteki miRNA'lar üzerinde de etkisi olabilir (Howard vd., 2015). Bazı araştırmalar, pastörizasyonun sütteki miRNA'ların sayısını ve çeşitliliğini azalttığını göstermektedir. Yapılan bir araştırmada, pastörize sütteki miRNA sayısının, çiğ sütteki miRNA sayısına göre azaldığı bulunmuştur (Howard vd., 2015). Pastörizasyon, miRNA'ların aktivitesini değiştirebilir. Bir çalışmada, pastörize sütteki miRNA'ların hücre büyümesi, proliferasyon ve apoptozis üzerindeki etkilerinin, çiğ sütteki miRNA'larınkine kıyasla daha az olduğu bulunmuştur (Howard vd., 2015). Bununla birlikte, bazı araştırmalar, pastörizasyonun sütteki miRNA'ların aktivitesini etkilemediğini göstermektedir. Bir çalışmada, pastörize ve çiğ sütteki miRNA'ların hedef genler üzerindeki etkilerinin benzer olduğu bulunmuştur (Howard vd., 2015).

Homojenizasyon, sütün yağ fazındaki parçacıkların küçültülmesi işlemidir ve sütün daha kolay karışmasını ve pürüzsüz bir yapı kazanmasını sağlar. Bu işlem, sütün biyolojik, kimyasal ve fiziksel özelliklerini değiştirebilir ve bu nedenle homojenize sütteki miRNA'ların üzerinde de etkisi olabilir (Howard vd., 2015). Bazı araştırmalar, homojenizasyonun sütteki miRNA'ların sayısını ve çeşitliliğini azalttığını göstermektedir. Örneğin, bir çalışmada, homojenize sütteki miRNA sayısının, homojenize edilmemiş sütteki miRNA sayısına göre yaklaşık %50 azaldığı bulunmuştur (Chen vd., 2021). Homojenizasyon, miRNA'ların aktivitesini değiştirebilir. Bir çalışmada, homojenize sütteki miRNA'ların hücre büyümesi, proliferasyon ve apoptozis

üzerindeki etkilerinin, homojenize edilmemiş sütteki miRNA'larınkine kıyasla daha az olduğu bulunmuştur (Howard vd., 2015).

Fermantasyon, sütün bakteriyel aktivite ile işlenmesi sürecidir ve sütün kalitesi, besin bileşimi ve sindirilebilirliği üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Fermantasyon ayrıca miRNA'lar üzerinde de etkilidir. miRNA'lar, gen ekspresyonunu düzenleyen kısa RNA moleküleridir. Sütün fermantasyonu sırasında, bakteriler tarafından üretilen enzimler, sütün miRNA profili üzerinde değişikliklere neden olabilir. Bu değişiklikler, sütün sindirimi ve biyoyararlılığı üzerinde etkili olabilir (Izumi vd., 2012). Araştırmalar, fermantasyonun sütteki miRNA'ların ekspresyon düzeylerinde önemli bir değişikliğe neden olduğunu göstermiştir. Örneğin, sütün Lactobacillus acidophilus ile fermentasyonu, sütteki miR-148a ve miR-200a ekspresyon düzeylerini önemli ölçüde azaltmıştır. Bununla birlikte, sütün Bifidobacterium lactis ile fermentasyonu, miR-148a ve miR-200a'nın ekspresyon düzeylerinde önemli bir değişikliğe neden olmamıştır (Chen vd., 2016). Yapılan farklı çalışmalar ışığında farklı sütlerdeki miRNA stabiliteleri Çizelge 2.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.2. Farklı sütlerdeki miRNA stabiliteleri (Li vd., 2019'dan değiştirilerek alınmıştır)

Kaynak	**miRNA stabilitesi**
İnek Sütü	miR-200c (önemli kayıp yok), miR-29b (↓ %40) (mikrodalga ile 15s ısıtma), miR-223, miR-125b (önemli kayıp yok, 30, 60, 120 dakika boyunca simüle edilmiş gastrointestinal sistem koşulları altında), miR-148a, miR-182, miR-21, miR-25, miR-2478 (önemli kayıp yok, tükürük, gastrik, safra ve pankreas sıvısı ile *in vitro* sindirim)
Bufalo Sütü	miR-21, miR-500 (önemli kayıp yok, 10 dk kaynatma, gün boyunca 4°C)
Yağsız Süt	miR-200c (↓63%), miR-29b (↓%67) (28sn 75,55°C'de pastörizasyon, 145 bar'da 60°C'de homojenizasyon)
İnsan Sütü	miR-22-3p, miR-30-5p, miR-148a-3p, miR-181-5p, miR-182-5p (önemli kayıp yok, 20 dk *in vitro* gastrik sindirim ve 30 dk *in vitro* pankreatik sindirim)

2.10. miR-125b ve Fonksiyonları

miR-125b, memelilerde yaygın olarak bulunan bir miRNA'dır ve çeşitli biyolojik süreçlerde önemli bir rol oynar. miR-125b, hücre proliferasyonu, apoptoz, farklılaşma, immün yanıt ve kanser gibi süreçlerde düzenleyici bir role sahiptir (Wang vd., 2020).
miR-125b, özellikle nörolojik fonksiyonlarda önemli bir rol oynar. Beyinde, miR-125b, nöroblastların farklılaşmasında, nöronların aksiyon potansiyellerinde ve sinaptik plastisitede düzenleyici bir rol oynar. miR-125b ayrıca, Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı, iskemik beyin hasarı ve diğer nörolojik bozuklukların patogenezinde de önemli bir rol oynar (Wang vd., 2020).

miR-125b, kanser hücrelerinde değişen bir ekspresyon paternine sahiptir. Bazı kanserlerde miR-125b'nin ekspresyonu artarken, diğerlerinde azalır. miR-125b'nin kanser hücreleri üzerindeki etkileri, hücre proliferasyonunu, migrasyonu, invazyonu, apoptozu ve kemoterapi direncini düzenlemesiyle açıklanabilir (Jiang vd., 2022).

Sonuç olarak, miR-125b, nörolojik fonksiyonlar, immün yanıt ve kanser gibi çeşitli biyolojik süreçlerde düzenleyici bir role sahiptir. Bu miRNA'nın patolojik durumlarda hedef alınması, çeşitli hastalıkların tedavisinde potansiyel bir yaklaşım olabilir.

2.11. MiR-125b'nin Kolit Hastalığındaki Rolü

miR-125b, bağırsak hücrelerinde ifade edilen bir mikroRNA'dır ve bağırsak sağlığı için önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir (Sukocheva vd., 2022). Son yıllarda yapılan araştırmalar, miR-125b'nin bağırsak hastalıkları patogenezinde etkili olduğunu göstermektedir. Örneğin, Crohn hastalığı gibi inflamatuvar bağırsak hastalıklarında miR-125b düzeylerinde azalma gözlemlenmiştir (Wu vd., 2008). Bir araştırmada miR-125b'nin, bağırsak epitel hücrelerinde apoptozisi azaltarak mukozal bariyer fonksiyonunu koruduğu bulunmuştur (Sukocheva vd., 2022). miR-125b ayrıca bağırsak kanseri ile de ilişkilendirilmiştir. Bir çalışmada miR-125b'nin, kolon kanseri hücrelerinde apoptozisi artırdığı ve tümör büyümesini baskıladığı gösterilmiştir (Zhang vd., 2022).

Çeşitli çalışmalar, miR-125b'nin kolonun inflamatuvar durumuna katkıda bulunduğunu göstermiştir (Liu vd., 2017). miR-125b, kolit hastalarında düşük seviyelerde bulunur.

Bununla birlikte, miR-125b seviyelerini arttırmak, kolit belirtilerini hafifletmek için potansiyel bir yaklaşım olabilir (Chen vd., 2022). miR-125b, kolonun inflamatuvar yanıtını düzenleyen çeşitli hedeflere yönelik olarak etki gösterir. Örneğin, miR-125b, TLR4, TLR9 ve IL-6R gibi inflamatuvar sinyal moleküllerinin ekspresyonunu düzenleyerek inflamasyonu azaltır (Liu vd., 2017; Chen vd., 2022). Ayrıca, miR-125b, kolit hastalarında artan intestinal permeabiliteyi de azaltabilir. Bir çalışmada, miR-125b'nin arttırılması, kolit modelindeki farelerde intestinal permeabiliteyi azalttı ve böylece inflamasyonu azalttı (Yue vd., 2022).

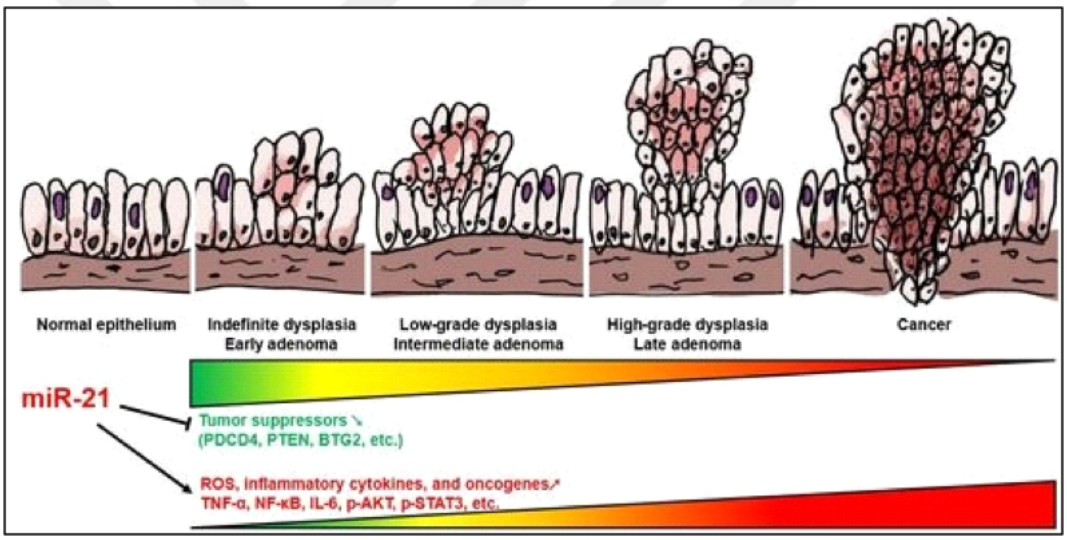
Sonuç olarak, miR-125b'nin inflamatuar bağırsak hastalıkları, özellikle kolit patogenezinde önemli bir rolü vardır. miR-125b'nin inflamasyonu azaltıcı etkileri, hedef aldığı çeşitli moleküller ve mekanizmalar aracılığıyla gerçekleştirilir.

2.12. MiR-21 ve Fonksiyonları

miR-21, bir mikroRNA molekülüdür ve insanlarda birçok hücre tipinde bulunur. Bu RNA molekülü, hücrelerin büyümesi, proliferasyonu ve apoptozu gibi biyolojik süreçlerinin düzenlenmesinde önemli bir rol oynar (Cheng vd., 2015). miR-21, kanser hücrelerinde aşırı derecede ifade edilir ve kanser hücrelerinin yayılmasına ve invazyonuna katkıda bulunur (Jenike vd., 2021). Ayrıca, miR-21, kardiyovasküler hastalıklar, nörolojik bozukluklar ve bağışıklık sistemi hastalıkları gibi diğer birçok hastalıkta da rol oynar (Asangani et al., 2016). miR-21, bazı hedef genlere bağlanarak onların ekspresyonunu düzenler. miR-21'in hedef genleri arasında *PTEN, PDCD4, TPM1, RECK, SPRY2* ve maspin bulunur. Bu hedef genlerin çoğu, tümör süpresörleri veya metastaz inhibitörleridir (Buscaglia vd., 2011). miR-21, hücrelerin kanserli hücrelerden normal hücrelere dönüşmesini önleyen bir sinyal yolunu da inhibe eder. Bu nedenle, miR-21, kanserin başlangıcında bir rol oynayabilir (Asangani vd., 2016). miR-21'in birçok hastalıkta rol oynayan çoklu hedef genlere sahip olması, onu bir terapötik hedef haline getirir. miR-21'in inhibisyonu, kanser hücrelerinin büyümesini ve metastazını inhibe etmek için kullanılabilecek bir stratejidir (Jenike vd., 2021).

2.13. MiR-21'in Kolit Hastalığındaki Rolü

miR-21'in kolit hastalığında artmış bir düzeyde ifade edildiği ve kolit patogenezinde önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir (Zhu vd., 2018). miR-21'in artmış ekspresyonu, inflamasyonu inhibe eden ve bağırsak epitelyumunun bütünlüğünü koruyan faktörlerin azalmasına neden olur (Wu vd., 2016). miR-21, TLR4/NF-κB yolunu inhibe ederek kolit hastalığının gelişimine karşı koruyucu bir rol oynar (Zhu vd., 2018). miR-21'in inhibisyonu, kolit hastalığının şiddetini azaltabilir ve bağırsak hasarını önleyebilir (Wu vd., 2016). Ayrıca, miR-21'in kolit hastalığında bağırsak mikrobiyotası üzerinde de etkili olduğu gösterilmiştir. miR-21'in artmış ekspresyonu, bağırsak mikrobiyotasındaki patojenik bakterilerin artmasına neden olur ve bu da kolit hastalığının gelişimini tetikleyebilir (Sun vd., 2017).



Şekil 2.10. MikroRNA-21, zebra balığındaki PI3K/AKT, STAT3 ve PDCD4/TNF-α sinyal yolakları aracılığıyla kolite bağlı karsinom ve kolorektal kanserdeki rolü (Lai vd. 2021)

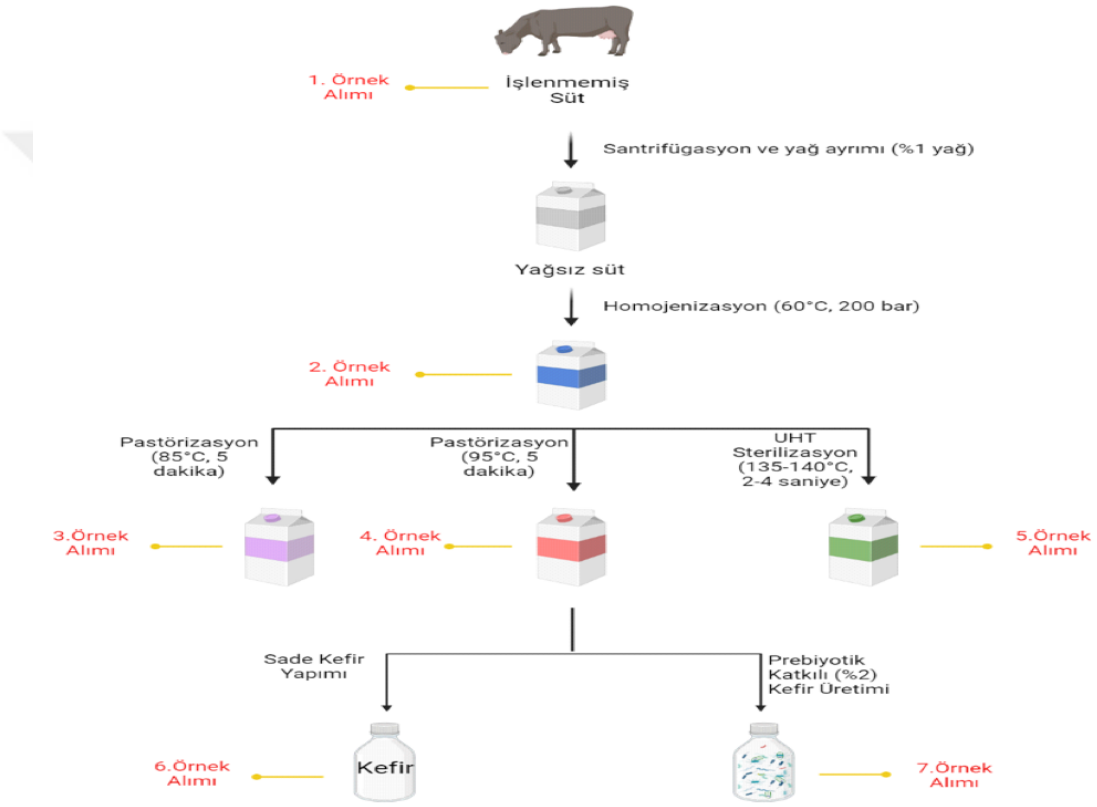
Yapılan bir çalışmada, bağırsakta miR-21'in indüklenebilir aşırı ekspresyonu ile bir zebra balığı modeli (ImiR-21) üretilmiştir. Sonuçlar, miR-21'in, PI3K/AKT, PDCD4/TNF-a ve IL-6/STAT3 sinyal yolağı aracılığıyla miR-21'de kolorektal kanser veya kolit ile ilişkili kanseri indükleyebileceğini göstermektedir. miR-21, PI3K/AKT ve NF-κB sinyal yolaklarını aktive ederek ilk iltihaplanmaya yol açmıştır; daha sonra miR-21 ve TNF-a, PDCD4'ü ve bunun tümör baskılama aktivitesini bastırmıştır. Sonunda, aktif STAT3,

güçlü bir inflamatuvar yanıtı uyarmış ve tümör hücrelerinin istila/metastaz sürecini etkinleştirmiştir (Şekil 2.10) (Lai vd., 2021).

Sonuç olarak, miR-21, kolit hastalığının gelişiminde önemli bir rol oynar ve miR-21'in inhibisyonu, kolit hastalığının tedavisinde potansiyel bir strateji olabilir (Wu vd., 2016).

3.MATERYAL VE YÖNTEM

Bu tez çalışmasında Sütaş Süt San. AŞ.'den temin edilmiş yaklaşık %3,8 yağ ve %3,5 protein oranına sahip Holstein ırkı ineklerden elde edilmiş süt örnekleri kullanılmıştır. miRNA analizinde kullanılmak üzere 7 farklı aşamadan süt ve üretilecek kefir örneklerinden her örnek için 50 mL nuclease free santrifüj tüplerine alınarak RNA analizi gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.1.).



Şekil 3.1. Süt ve süt ürünleri eldesinin şematik gösterimi

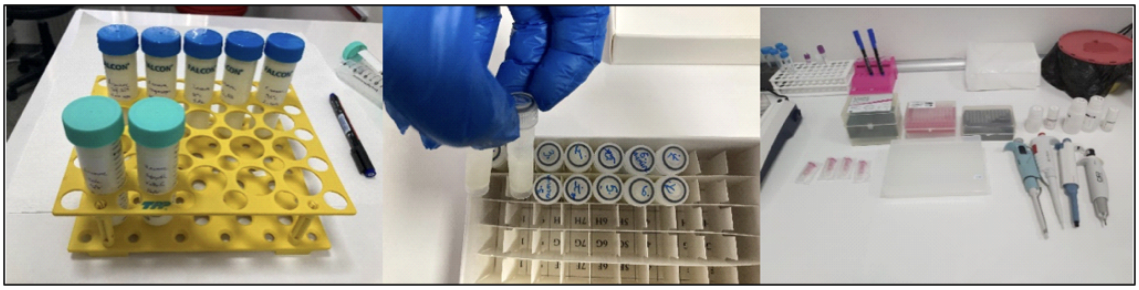
3.1. Numunelerden Total RNA İzolasyonu

Tez çalışmamızda ilk olarak yapılan santrifüjleme işleminde, sütün farklı yoğunluklardaki bileşenlerini ayrıştırarak serum fazını elde edildi. Santrifüjleme işleminde önce 1200g'de 4°C'de 10 dakika santrifüj yapıldı. Ardından bu işlem tekrarlandı. Oluşan pellet ve süpernatant içeren bileşenden üstte kalan süpernatant ayrıştırılıp 20.000g 4°C'de 30 dakika santrifüj işlemi tekrar yapıldı. En sonda kalan süpernatant 2mL'lik mililitrelik cryo tüplere ayrıştırıldı.

Tez çalışmamızda işlenmemiş süt, içme sütü ve kefir ürünlerinden elde edilmiş 7 farklı örnekten total RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İnek sütü miRNA'larının sütün serum fazında eksozomlarda korunarak bol miktarda bulundukları bilinmektedir. Süt serum fazından total RNA izolasyonu için literatüre uyumlu olarak miRNeasy Serum/Plasma Advanced Kiti (Qiagen mi) kullanılmıştır. İnek sütü miRNA araştırmalarında belirli bir endojen small RNA kontrolü bulunmamaktadır. Bu sebeple RNA izolasyon protokolünün teknik normalizasyonu ve kalite kontrolü amacıyla kit prosedüründe belirtildiği şekilde ve literatürde önerildiği üzere sentetik Caenorhabditis elegans cel-miR-39-3p (10 fmol) kullanılmıştır. Protokole uygun olarak total RNA izolasyonu temel basamakları aşağıda verilmiştir.

- 200 µL örneğe 60 µL Lizis tamponu (Buffer RPL) eklenerek santrifüjlemiştir.
- Spike-in Control ve 20µL tampon (Buffer RPP) ilave edilerek solüsyon 12000g'de 3 dakika santrifüj edilmiştir.
- Elde edilen supernatant yeni bir mikrosantrifüj tüpüne aktarılarak %100 izopropanol eklenip ve vortekslenmiştir.
- Elde edilen örnek kit içeriği ile sağlanan RNeasy UCP MinElute spin kolonlarına transfer edilmiştir ve kısa bir santrifüj işlemi (15s ~8000g) uygulanmıştır.
- Bu işlem sonrası kit içeriğinde bulunan diğer tamponlardan 700µL Buffer RWT ve 500µL Buffer RPE karışıma sırasıyla eklenmiştir ve her tampon ekleme sonrası solüsyon santrifüjlenerek (15s ~8000g) karışım oluşturulmuştur.
- Karışıma 500µL %80 etanol eklenmiştir ve spin kolonlar santrifüjlenerek (15s ~8000g) spin kolon filtresi yıkanmıştır.
- Spin kolon yeni 2mL'lik toplama tüpüne aktarılarak 5 dakika maksimum hızda santrifüj işleminden geçirilerek spin kolonun filtresi kurutulmuştur.
- Spin kolon yeni 1,5mL'lik toplama tüpüne aktarılmış ve spin kolon zarına RNaz içermeyen su eklenerek örnek 1dk inkübe edilmiştir.
- Ardından 1dk en yüksek hızda mikrosantrifüj cihazında örnek santrifüjlenerek RNA izole edilmiştir.
- Elde edilen total örnekleri -80°C'de saklanmıştır.

RNA miktar ve saflığının değerlendirmesi için A260/A280, A260/A230 değerleri Nanodrop Spektrofotometre cihazı kullanılarak hesaplanmıştır. Ayrıca, Qubit 4 (ThermoFisher) ile örneklerdeki DNA miktarları florometrik yöntemlerle de ölçülmüştür.



Şekil 3.2. Numunelerin eldesi ve RNA izolasyonu çalışma ortamı

3.2. cDNA Sentezi

qRT-PCR yöntemi için LNA (Locked Nucleic Acid) ile geliştirilmiş, miRNA'ya özgü ileri PCR primeri ve SYBR Green içeren miRCURY LNA miRNA SYBR Green, miRCURY LNA RT Kit, RNA Spike-In Kit ve miRCURY LNA SYBR Green PCR Kit ve miRCURY LNA miRNA PCR primerleri (Qiagen) kullanılarak tüm prosedürler üretici firmanın önerdiği protokoller takip edilerek gerçekleştirilmiştir.

LNA teknolojisi, riboz halkasının Watson-Crick bağlanması için ideal konformasyonda "kilitlendiği" bir yüksek afiniteli RNA analogları sınıfıdır. LNA oligonükleotidleri, tamamlayıcı bir DNA veya RNA sarmalına hibridize edildiğinde önemli derecede bir termal stabilite sergiler. Dahil edilen her bir LNA monomeri için dupleksin erime sıcaklığı 2-8ºC artar. Ayrıca, LNA oligonükleotidleri, geleneksel DNA ve RNA oligonükleotidlerinden daha kısa oluşturulabilir ve buna rağmen yüksek erime sıcaklığını koruyabilir. Bu durum, oligonükleotidin küçük veya oldukça benzer hedefleri tespit etmesi için oldukça önemlidir.

LNA oligonükleotidleri tipik olarak bir LNA ve DNA veya RNA karışımından oluştuğundan, oligonükleotidin LNA içeriğini değiştirerek duyarlılığı ve özgüllüğü optimize etmek mümkündür. LNA'nın oligonükleotidlere dahil edilmesinin, PCR, mikroarray ve *in situ* hibridizasyon dahil olmak üzere birçok hibridizasyona dayalı teknoloji için duyarlılığı ve özgüllüğü geliştirdiği gösterilmiştir.

Bu aşamada cDNA sentezi için miRCURY LNA RT Kit kullanılmıştır.

- Her template RNA örneği nükleaz içermeyen su kullanarak 5ng/µL'ye seyreltilmiştir.
- Reaksiyonlar Çizelge 3.1'e göre hazırlanmıştır. Vortekslenip buz üzerine koyulmuştur.

Çizelge 3.1. Ters transkripsiyon reaksiyonu protokolü

5x miRCURY SYBR Green RT Reaksiyon Tamponu	**Rnaz içermeyen su**	**10x miRCURY RT Enzim Karışımı**	**RNA spike-in**	**Şablon RNA (5 ng/µl)**	**Toplam Reaksiyon Hacmi**
2 µl	4.5 µl	1 µl	0.5 µl	2 µ	**10 µl***

- Reaksiyonlar 42ºC'de 60 dakika inkübe edilmiştir.
- Ters transkriptazı inaktive etmek için 95ºC'de 5 dakika inkübe edilmiştir.
- Ardından hemen 4°C'de soğutulmuştur.

Çizelge 3.2. Ters transkripsiyon reaksiyon sıcaklığı döngü protokolü

Aşama	**Süre**	**Sıcaklık**
Ters Transkripsiyon (RT) Aşaması (İnkübasyon)	60dk	42°C
İnaktivasyon	5dk	95°C
Soğutma	-	4°C

- Çizelge 3.2'deki protokol kullanılarak cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir.

3.2.3. qRT-PCR Yöntemi ile miRNA Anlatım Analizi

qRT-PCR aşaması için Quantitative, Real-Time PCR Using Individual miRCURY LNA miRNA Syber Green PCR protokolü kullanılmıştır.

- Kullanımdan hemen önce 10µL RT reaksiyonuna 590µL RNaz içermeyen su eklenerek cDNA 1:60 oranında seyreltilmiştir.

- Çizelge 3.3'te bulunan protokole göre her cDNA örneği için reaksiyon karışımı hazırlanmıştır.

Çizelge 3.3. miRCURY LNA miRNA Syber Green PCR protokolü için reaksiyon karışımı protokolü

2x miRCURY SYBR® Green Master Mix	**ROX Reference Dye (yalnızca ABI cihazları)**	**Resuspended PCR primer mix**	**cDNA**	**Rnaz içermeyen su**	**Toplam reaksiyon hacmi**
5µL	0.5µL/0.05 µL*	1µL	3µl (1:30 dilüe)	1 µl*	**10µl**

- Reaksiyonları iyice karıştırılmıştır ve 10µL'lik PCR tüplerine dağıtılmıştır.
- Tüpler oda sıcaklığında kısaca santrifüjlenmiştir.

Çizelge 3.4. miRCURY LNA miRNA PCR Syber Green PCR protokolü

Aşama	**Zaman**	**Sıcaklık**
PCR ilk ısı aktivasyonu	2 dk	95°C
2 adımlı döngü		
Denatürasyon	10s	95°C
Annealing	60s	56°C
Döngü Sayısı	40	
Erime Eğrisi Analizi	60–95°C	

- Çizelge 3.4'teki protokole uygun olarak Rotor Gene (Qiagen) real time PCR cihazında RT-qPCR reaksiyonu gerçekleştirilmiştir.

Ham Cq değerlerini (PCR cihazına bağlı olarak Cp veya CT) elde etmek için gerçek zamanlı PCR cihaz ile Version 2.1.0.9. yazılımı kullanılarak veri analizi gerçekleştirilmiştir.

3.3. Veri Analizi ve Yorumlanması

qRT-PCR analizi sonucunda elde edilen CT değerlerinden ΔCT değerleri (ilgilenilen genin CT değeri – house keeping genin CT değeri) formülü kullanılarak hesaplanmıştır (Livak vd., 2001; Schmittgen vd., 2008). Normalizasyon için sentetik cel-miR-39-3p ekspresyon değerleri referans olarak kullanılmıştır. qRT-PCR ile analiz edilen miRNA'ların CT değerleri t-test ve One-way ANOVA testi ile değerlendirilerek *P*-değerleri hesaplanmıştır. İstatistiksel analizler için Graphpad Prism (Version 9.5.1) programı kullanılmış ve *P*-değeri < 0.05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

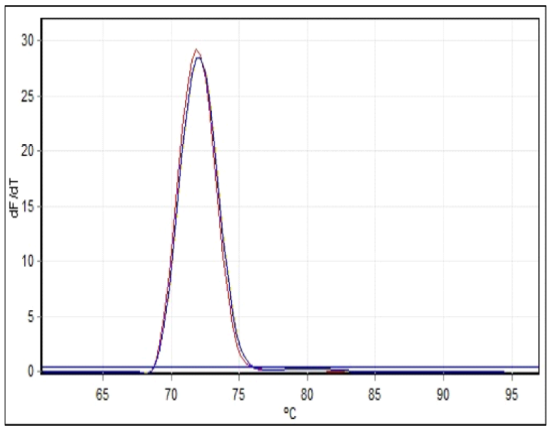
4. BULGULAR

4.1. RNA İzolasyonu Sonuçları

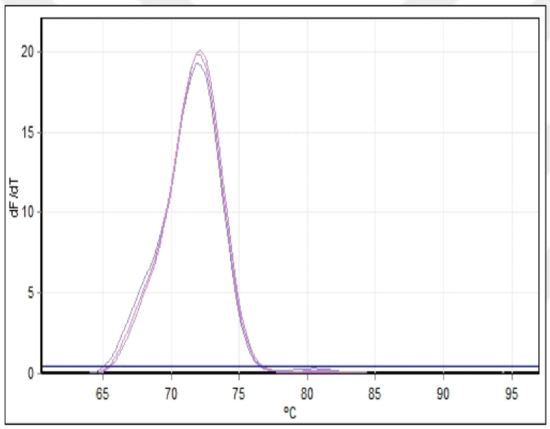
Süt ve kefir ürünlerinden elde edilen numunelerden gerçekleştirilen işlemler sonrası farklı yedi örnekten RNA izolasyonları başarılı ile gerçekleşmiştir. Örneklerin RNA konsantrasyonları 3ng/uL ve 10ng/uL arasında değişmektedir. Tüm örneklerden RNA izolasyonu en az 2 kere gerçekleştirilmiş ve tüm ölçümler iki kere yapılmıştır. Qubit 4 florometre analizinde RNA miktar ölçümünde Qubit RNA HS (High Sensitivity) Assay Kit analizinin hassasiyet dışında ölçüm alındığından sadece 1. Numune (1,40ng/uL) için sonuç alınmıştır.

4.2. RT-qPCR Analizi Sonuçları

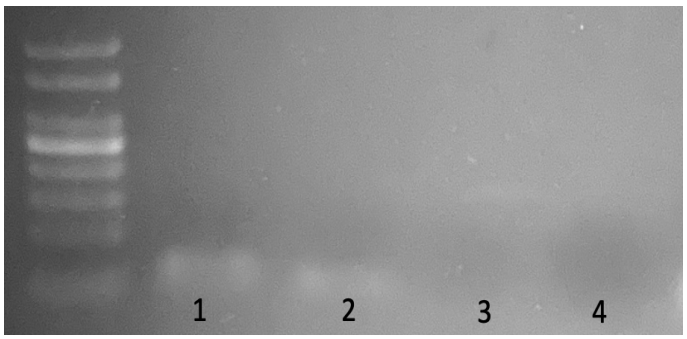
Elde edilen 7 numuneden izole edilen RNA örneklerinde bulunan miR-125b ve miR-21 miktarları RT-qPCR yöntemi ile analiz edilmiştir. Literatürde süt örneklerinde farklı işlemlerde süt içeriğindeki miRNA miktarlarında değişiklikler gözlenmiştir ve farklı miRNA'ların fiziksel ve kimyasal özelliklerinden kaynaklı olarak süt işleme süreçlerinden farklı şekilde etkilendikleri gözlenmiştir (Howard ve ark., 2015). Bu amaçla, kolit ile ilişkili olduğu bilinen miR-125b ve miR-21 ham sütte, farklı işlemlerden geçmiş süt örnekleri ve kefir örneklerindeki kantitatif miktarı RT-qPCR yöntemi ile analiz edilerek her örnek için en az 2 tekrar olmak üzere CT değerleri elde edilerek ortalama CT değerleri ve cel-miR-39 CT değerlerine göre normalize edilmiş ΔCT değerleri hesaplanmıştır. CT eşik değeri 35 üstünde olan örneklerde miRNA tespit edilmemiş olarak kabul edilmiştir. Tekrarlar yapılmasına rağmen sadece 1, 2, 3 ve 4. numunelerinden anlamlı CT değerleri elde edilmiştir. Yalnızca bir kere miR-125b için yapılan RT-qPCR analizi sonucunda 5. numuneden 33,42 CT değeri elde edilmiştir, bu nedenle hesaba katılmamıştır. 1, 2, 3 ve 4. numunelerden elde edilen CT değerleri ise 24 ile 33 arasında değişmektedir. RT- qPCR yöntemi ile analiz edilen miR-125b ve miR-21'in melting curve eğrileri Şekil 4.1. ve Şekil 4.2.'de verilmiştir. Şekil 4.3'te RT-qPCR yöntemi ile analiz edilen miRNA'ların jel elektroforezindeki görüntüleri verilmiştir.



Şekil 4.1. RT-qPCR yöntemi ile analiz edilen miR-21'in melting curve analiz eğrisi



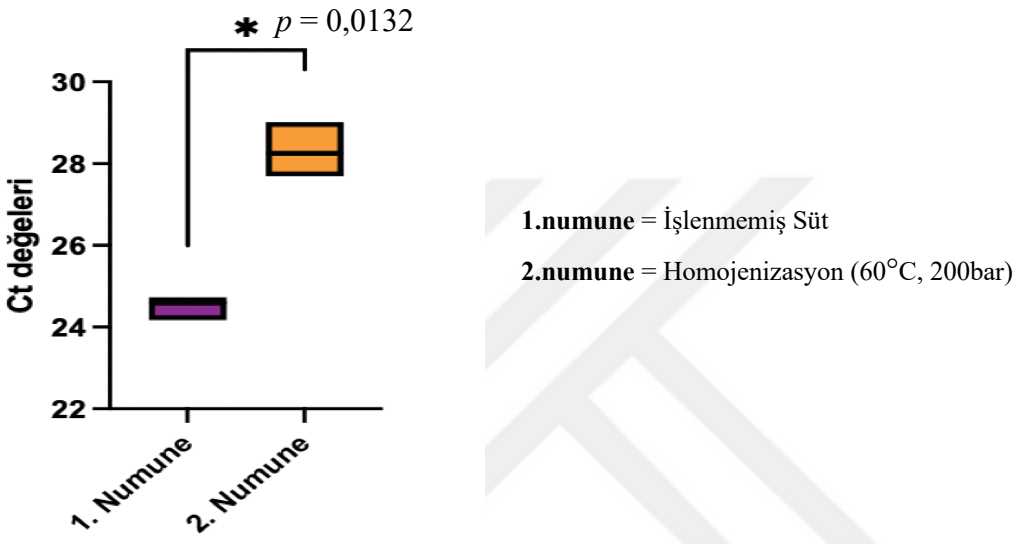
Şekil 4.2. RT-qPCR yöntemi ile analiz edilen miR-125b'nin melting curve analiz eğrisi



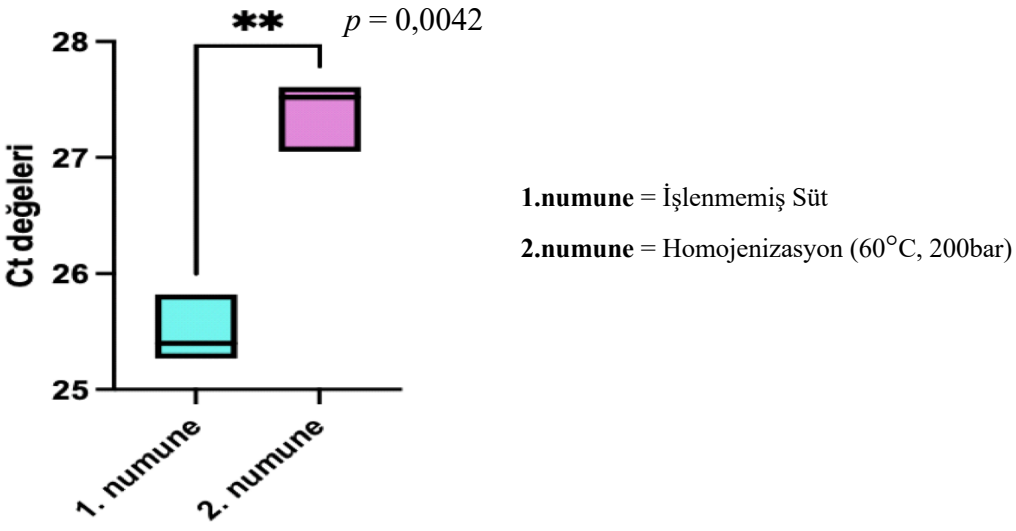
Şekil 4.3. RT-qPCR yöntemi ile analiz edilen miRNA'ların %3'lük jel elektroforezinde görüntülenmesi **1)** miR-21, **2)** miR-125b**, 3)** miR-21 (NTC), **4)** miR-125b (NTC). 50bp DNA ladder kullanılmıştır.

4.3. İstatistiksel Analiz Sonuçları

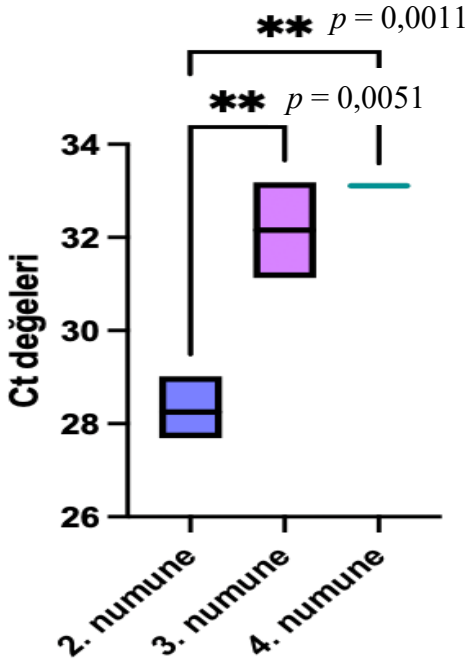
RT-qPCR ile analiz edilen miRNA'ların ekspresyon verileri T-test ve One-way ANOVA testi ile değerlendirilerek *P*-değerleri hesaplanmıştır. İstatistiksel analizler için Graphpad Prism programının Version 9.5.1. yazılımı kullanılmış ve *P*-değeri <0.05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.



Şekil 4.4. miR-125b için 1. ve 2. numunenin CT değerlerinin karşılaştırılması



Şekil 4.5. miR-21 için 1. ve 2. numunenin CT değerlerinin karşılaştırılması

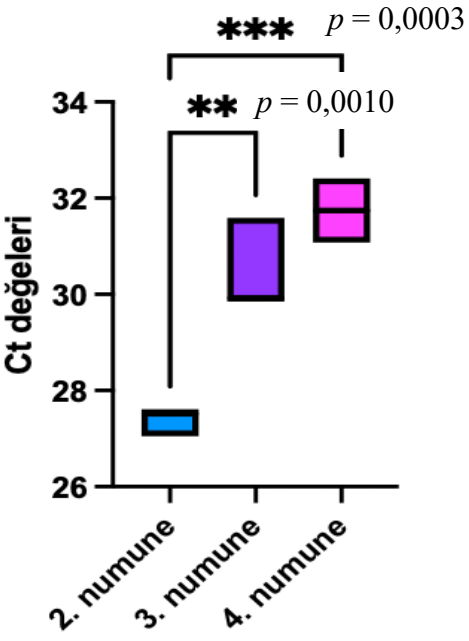


2.numune = Homojenizasyon (60°C, 200bar)

3.numune = Pastörizasyon (85°C, 5dk)

4.numune = Pastörizasyon (95°C, 5dk)

Şekil 4.6. miR-125b için 2, 3 ve 4. numunelerin CT değerlerinin karşılaştırılması



2.numune = Homojenizasyon (60°C, 200bar)

3.numune = Pastörizasyon (85°C, 5dk)

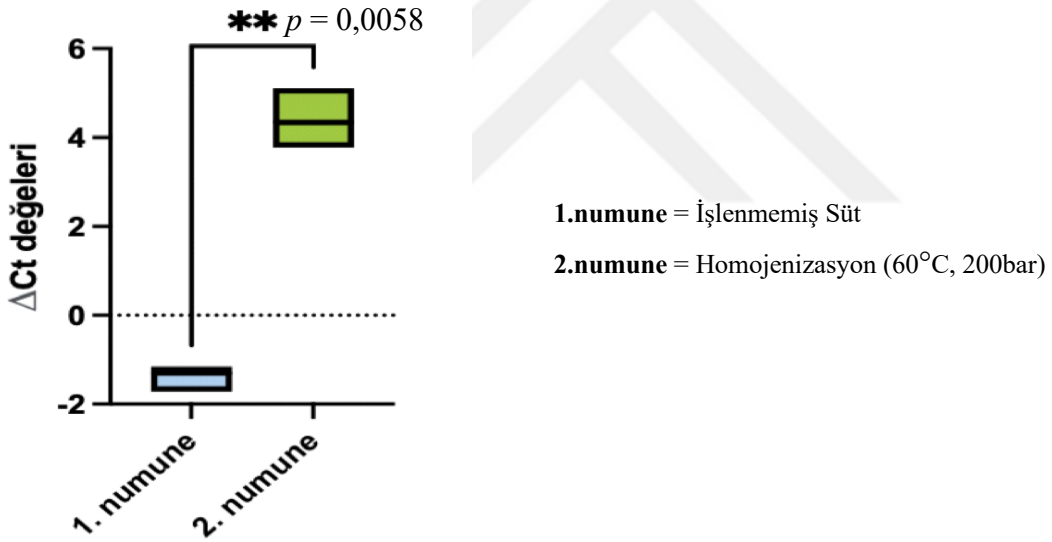
4.numune = Pastörizasyon (95°C, 5dk)

Şekil 4.7. miR-21 için 2, 3 ve 4. numunelerin CT değerlerinin karşılaştırılması

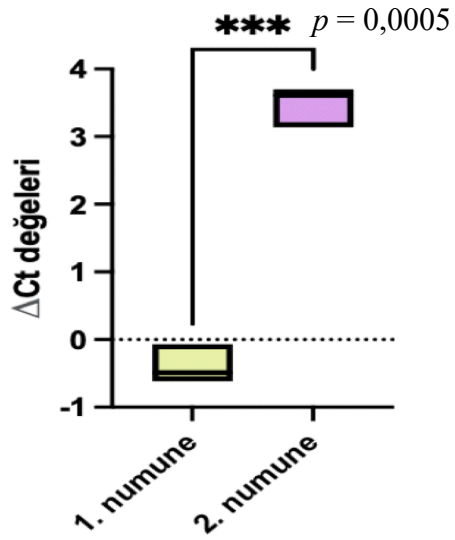
CT değerleri baz alınarak yapılan T-testi sonuçlarına göre iki miRNA'da da 1. ve 2. numuneler arasında *P* değerlerinde anlamlılık gözlenmiştir.

6. ve 7. numunelerde miR-21 için CT değerleri anlamlı bulunmamıştır. miR-125b için ise 7. numunede CT değerleri 25,39 ve 33,7 olarak bulundu fakat 4. numune baz alınarak yapılan t-testinde anlamlılık gözlemlenmemiştir. *P* değeri 0,5502 olarak hesaplanmıştır.

Araştırılmak istenen miRNA'nın CT değeri referans miRNA'nın (cel-39) CT değerlerinden çıkarılarak normalize edilmiş ΔCT değerleri hesaplanmıştır. qRT-PCR ile analiz edilen miRNA'ların ekspresyon verileri normalize edilerek ΔCT değerleri hesaplandıktan sonra T-test ve One-way ANOVA testi ile değerlendirilerek *P*-değerleri hesaplanmıştır. İstatistiksel analizler için Graphpad Prism programı kullanılmış ve *P*-değeri <0.05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.



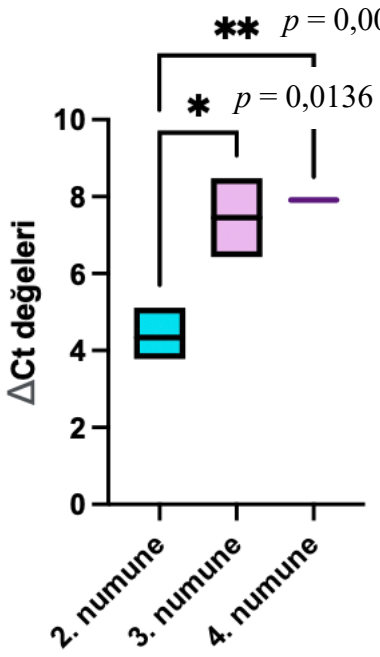
Şekil 4.8. miR-125b için 1. ve 2. numunelerin ΔCT değerlerinin karşılaştırılması



1.numune = İşlenmemiş Süt

2.numune = Homojenizasyon (60°C, 200bar)

Şekil 4.9. miR-21 için 1. ve 2. numunelerin ΔCT değerlerinin karşılaştırılması

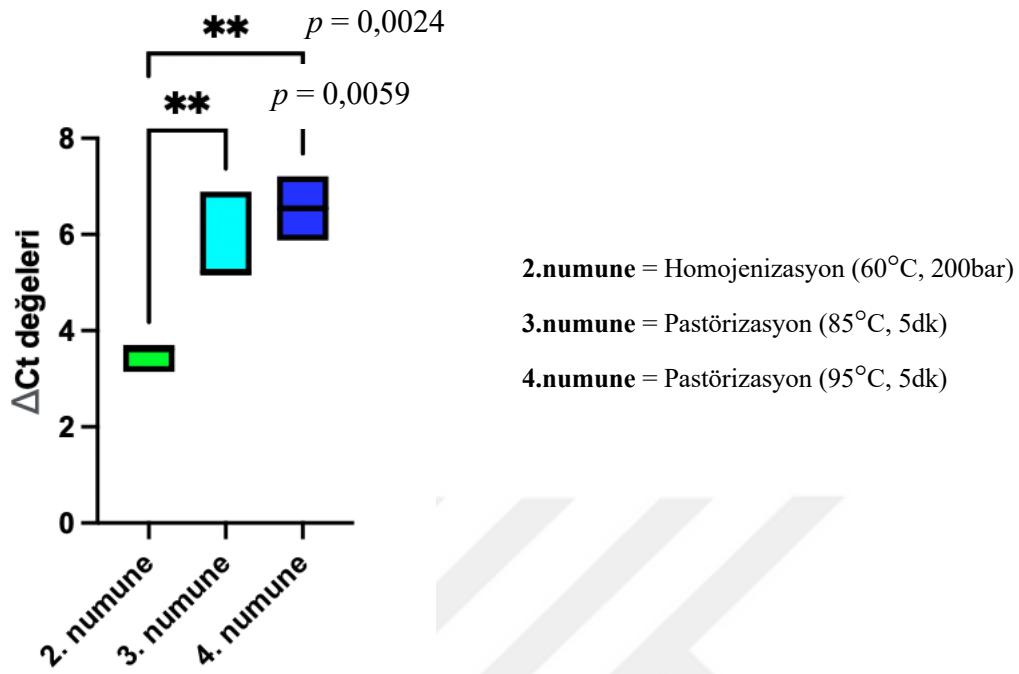


2.numune = Homojenizasyon (60°C, 200bar)

3.numune = Pastörizasyon (85°C, 5dk)

4.numune = Pastörizasyon (95°C, 5dk)

Şekil 4.10. miR-125b için 2, 3 ve 4. numunelerin ΔCT değerlerinin karşılaştırılması



Şekil 4.11. miR-21 için 2, 3 ve 4. numuneler için ΔCT değerlerinin karşılaştırılması

ΔCT değerleri baz alınarak yapılan T-testi sonuçlarına göre iki miRNA'da da 1. ve 2. numuneler arasında *P* değerlerinde anlamlılık gözlenmiştir.

ΔCT değerleri baz alınarak yapılan One-way ANOVA sonuçlarına göre iki miRNA'da da 2. numune baz alınarak yapılan 3. ve 4. numuneler arasında *P* değerlerinde anlamlılık ($P < 0,05$) gözlemlenmiştir.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışmanın temel amacı sütte oldukça fazla ekspresyonu olduğu bilinen ve kolit hastalığı ile ilişkili olan miR-21 ve miR-125b'nin homojenizasyon, pastörizasyon ve fermantasyon aşamalarından sonra belirlenen miRNA'ların miktarlarının farklılıklarının araştırılmasıdır. Bu amaçla 7 farklı aşamadan geçmiş sütte miR-21 ve miR-125b'nin homojenizasyon, pastörizasyon ve fermantasyon stresleri ardından seviyeleri belirlenmiştir.

Benmoussa vd. tarafından ticari inek sütünden konsantre edilmiş hücre dışı veziküller ile murin kolit modeli üzerindeki etkisi fareler üzerinde gavaj yolu ile beslenme çalışması yapılarak araştırılmıştır. Sonuçlara göre, miR-21 ve miR-125b kolitik kontrollere kıyasla gavaj yoluyla hücre dışı veziküller ile beslenen kolitik farelerde önemli ölçüde azalmıştır (Benmoussa vd., 2019). Özellikle miR-125b, anti-inlamatuvar protein TNFIP3 (A20)'nin translasyonunu engellediği bilinen kolit ile ilişkili bir miRNA'dır. Bu protein NFκB'nin neden olduğu iltihaplanma, hücre birleşimi ve sitokin üretimi/salımının düzenlenmesinde merkezidir (Zaidi vd., 2017; Hymowitz vd., 2010; Catrysse vd., 2013; Hitotsumatsu vd., 2008; Evans vd., 2004).

Homojenizasyon, sütün yağ fazındaki parçacıkların küçültülmesi işlemidir ve sütün daha kolay karışmasını ve pürüzsüz bir yapı kazanmasını sağlar. Homojenizasyon, sütün biyolojik, kimyasal ve fiziksel özelliklerini değiştirebilir ve bu nedenle homojenize sütteki miRNA'ların üzerinde de etkisi olabilir (Izumi vd., 2012). Pastörizasyon, sütteki mikroorganizmaları öldürmek ve sağlıklı bir süt ürünü elde etmek için uygulanan bir ısıl işlemdir. Bazı araştırmalar pastörizasyon işleminin sütteki miR-200c miktarını ve çeşitliliğini azalttığını göstermektedir (Howard vd., 2015). Fermantasyon, sütün bakteriyel aktivite ile işlenmesi sürecidir ve sütün kalitesi, besin bileşimi ve sindirilebilirliği üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Araştırmalar sütün fermantasyon sırasında, bakteriler tarafından üretilen enzimlerin, sütün miRNA profili üzerinde değişikliklere neden olabileceğini göstermektedir (Izumi vd., 2012).

miR-21'in kolit hastalığında artmış bir düzeyde ifade edildiği ve kolit patogenezinde önemli bir rol oynadığı bilinmektedir (Zhu vd., 2018). miR-21'in inhibisyonu, kolit

hastalığının şiddetini azaltabilir ve bağırsak hasarını önleyebileceği düşünülmektedir (Wu vd., 2016). Çalışmamızda işlenmemiş süt olan 1. numunemizde miR-21'in en fazla ekspresyona sahip olduğu gözlemlenmiştir. Ardından homojenizasyon (60°C, 200 bar) aşamasından geçen 2. numunemizde miR-21 ekspresyonunda anlamlı (P = 0,0005) bir kayıp vardır. Daha sonra homojenize olan süt örneğimiz 3 farklı aşamadan tekrar geçirilmiştir. 85°C'de 5 dakika pastörizasyon işlemi gören 3. numune ve 2. numune arasındaki CT değerleri baz alınarak yapılan One-way ANOVA testine göre miR-21 seviyesinde anlamlı (P = 0,0010) bir azalma gözlenmiştir. Aynı şekilde 95°C'de 5 dakika pastörizasyon aşamasından geçen 4. numune de 2. numune ile karşılaştırılan CT ve değerleri ile yapılan One-way ANOVA testinde miR-21 ekspresyon seviyesinde azalma (P = 0,0003) gözlenmiştir. Normalizasyon için bulunan ΔCT değerleri de bu bulguları desteklemektedir (P = 0,0005, P = 0,0059, P = 0,0024).

miR-125b ise kolit hastalarında düşük seviyelerde bulunmaktadır (Chen vd., 2022). Yapılan bir çalışmada miR-125b'nin artırılmasının, kolit modelindeki farelerde intestinal permeabiliteyi azalttığı ve böylece inflamasyonu azalttığı gözlemlenmiştir (Yue vd., 2022). Çalışmamızda 1. numunedeki miR-125b'nin diğer numunelere göre en fazla eksprese olduğu gözlenmiştir. 2. numune ve 1. numune arasında hem CT değerlerine göre yapılan T-testi sonuçları 2. numunede istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde miR-125b'nin ekspresyonunun azaldığı (P = 0,0132) gözlenmiştir. Aynı şekilde ΔCT değerlerine göre yapılan istatistiksel analizde de anlamlı bir şekilde azaldığı gözlenmiştir (P = 0,0058). 2. numune kontrol olarak alınarak yapılan 3. ve 4. numuneler için One-way ANOVA testi sonuçlarında ise 3. ve 4. numuneler için CT değerlerine göre iki numunede de anlamlı bir şekilde (p = 0,0051, p = 0,0011) miRNA miktarında azalma gözlenmiştir. ΔCT değerlerine göre yapılan istatiksel analizlere göre ekspresyonun anlamlı bir şekilde azaldığı gözlenmiştir (P = 0,0136, P = 0,0024).

2. numuneden elde edilen UHT Sterilizasyon (135-140°C, 2-4 saniye) işleminden geçen 5. numunede, 4. numuneden örnek alınarak elde edilen 95°C'de pastörize olmuş sütten elde ettiğimiz kefir olan 6. numunede ve yine 4. numuneden elde edilen prebiyotik katkılı (%2) kefir olan 7. numunede anlamlı bir CT değeri gözlenmemiştir, bu nedenle hesaba katılmamıştır.

Yapılan bazı araştırmalarda homojenizasyonun sütteki miRNA'ların sayısını ve çeşitliliğini azalttığını göstermiştir. Örneğin bir çalışmada homojenize sütteki miRNA sayısının homojenize edilmemiş süte göre yaklaşık %50 azaldığı bulunmuştur (Chen vd., 2021). Araştırmamız bu çalışmayı desteklemektedir. Hem miR-21 hem de miR-125b için yapılan RT-qPCR analizlerine göre homojenize olmuş sütteki miRNA ekspresyonu işlenmemiş süte göre iki miRNA içinde azalmıştır.

Pastörizasyonun bir ısıl işlem olması, sütün biyolojik, kimyasal ve fiziksel özelliklerini değiştirebileceğini ve bu nedenle pastörize sütteki miRNA'lar üzerinde de etkisi olabileceği düşünülmektedir. Bazı araştırmalar, pastörizasyon işleminden sonra sütteki miRNA'ların ekspresyonunun azaldığını göstermektedir. (Howard vd., 2015). Yaptığımız RT-qPCR analizlerine göre iki miRNA içinde pastörize olmuş sütlerde ekspresyonun azaldığı gözlemlenmiştir.

Sütün fermantasyonu sırasında, bakteriler tarafından üretilen enzimler, sütün miRNA profili üzerinde değişikliklere neden olabilir. Bu değişiklikler, sütün sindirimi ve biyoyararlılığı üzerinde etkili olabilir (Benmoussa vd., 2017). Araştırmalar, fermantasyonun sütteki miRNA'ların ekspresyon düzeylerinde önemli bir değişikliğe neden olduğunu göstermiştir. Örneğin, sütün Lactobacillus acidophilus ile fermentasyonu, sütteki miR-148a ve miR-200a ekspresyon düzeylerini önemli ölçüde azaltmıştır (Chen vd., 2016). Tez çalışmamıza göre yapılan RT-qPCR analizleri sonucunda hem kefirin hem de prebiyotikçe zenginleştirilmiş kefir numunelerinde miR-21 ve miR-125b'nin ekspresyonuna (CT > 35) rastlanmamıştır. Bu da fermantasyon işleminin miRNA ekspresyon düzeylerini önemli ölçüde azalttığını göstermekte ve bundan önce yapılan çalışmaları doğrulamaktadır.

Kolit hastalığı, bağırsakların iltihaplanması nedeniyle ortaya çıkan bir hastalıktır. Kolit hastalığı, genellikle bağırsaklarda yüksek miR-21 seviyeleri ile ilişkilendirilmiştir.

Araştırmamızın sonuçlarına göre, miR-21 seviyelerinin azaltılmasının kolit hastalığının seyrini iyi yönde değiştirebileceğini göstermektedir. Bazı araştırmalar, miR-21 seviyelerinin azaltılması ile bağırsak iltihabının azalması arasında doğrudan bir ilişki

olduğunu ortaya koymaktadır (Lai vd., 2021). Bu nedenle, miR-21 seviyelerinin azaltılması, kolit hastalığının tedavisinde yeni bir yaklaşım olabilir.

Tez çalışmamızın neticesinde elde edilen bulgular, gelecekte kolit hastalığı tedavisine yönelik yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine yardımcı olabilir. Örneğin, mirR-21 seviyelerinin azaltılması için tasarlanmış yeni ilaçlar geliştirilebilir. Bu ilaçlar, kolit hastalığının semptomlarını azaltmak ve hastalığın seyrini iyi yönde değiştirmek için kullanılabilir. Ayrıca, bu çalışmalar, miR-21 seviyelerinin diğer hastalıkların tedavisinde de kullanılabileceğini göstermektedir. Ek olarak, bulgularımıza göre farklı aşamalardan geçen süt ve süt ürünlerindeki miR-21 seviyeleri göz önüne alındığında kefir ve prebiyotikçe zenginleştirilmiş kefirin kolit hastalığı seyrini olumlu yönde etkileyeceği düşünülmektedir.

MiR-125b, birçok hücre tipinde bulunan bir RNA molekülüdür ve inflamasyon süreçlerinde önemli bir rol oynamaktadır. Son yıllarda yapılan araştırmalar, miR-125b seviyelerinin artmasının kolit hastalığının seyri için iyileştirici etki ettiğini göstermektedir (Sukocheva vd., 2022).

MiR-125b, bağırsak hücrelerinde üretilen bir moleküldür ve bağırsak epitel hücrelerinin bütünlüğünü korumaya yardımcı olur. Kolit hastalığı gibi inflamasyonlu bağırsak hastalıkları, bağırsak bariyerinin bozulmasına ve bakterilerin bağırsak duvarından geçmesine neden olabilir (Wu vd., 2008, Zhang vd., 2022). MiR-125b'nin artması, bağırsak bariyerinin yeniden oluşmasına ve bakterilerin bağırsak duvarından geçişinin azalmasına yardımcı olabilir.

Ayrıca, miR-125b'nin artması, inflamasyon sürecini de azaltabilir. Mir-125b, bağırsak hücrelerinde üretilen bir anti-inflamatuvar moleküldür ve inflamasyon sürecini baskılayabilir (Rasheed vd., 2019). Bu nedenle, mir-125b seviyelerinin artması, kolit hastalığının semptomlarının azaltılmasına ve hastalığın seyrinin iyi yönde değiştirilmesine yardımcı olabilir.

Sonuç olarak, miR-125b seviyelerinin artması, kolit hastalığının seyrini iyi yönde değiştirebilir ve hastalığın semptomlarını azaltabilir. Bu nedenle, miR-125b seviyelerinin

artması, kolit hastalığının tedavisinde yeni bir yaklaşım olabilir. Tez çalışmamızın sonuçlarına göre ham süt, pastörize süt ve homojenize sütte miR-125b seviyeleri dikkate alındığında bu sütlerin kolit hastalığında tüketilmesi hastalığın seyri için olumlu olabilir.

Bulgularımızdan elde ettiğimiz önemli bir bilgi de farklı çalışmalarla desteklendiği takdirde, sütün fermente olup olmadığını miR-21 ve miR-125b'nin seviyeleri ile analiz edebilme durumudur. Sonuçlarımıza göre fermente olmuş sütte yani kefir ve prebiyotikçe zengin kefir içeriğin miR-125b ve miR-21'in anlatımına rastlanmamıştır. Bu nedenle miR-21 ve miR-125b bu amaçla kullanılabilecek biyobelirteç potansiyeline sahiptir.

Çalışmalarımızın bazı limitasyonları mevcuttur. Tez çalışmamız limitli sayıda miRNA ile yapılmıştır. Çalışmamızın devamı için farklı süt miRNA'larında da çalışılması önemlidir. Yaptığımız işlemler Türkiye'de kullanılan süt işlenme aşamalarını içermektedir. Yurtdışında kullanılan aşamalar ardından farklı sonuçlar elde edilebilme olasılığı söz konusudur. Kullandığımız süt Holstein ırkı ineklerden elde edilmiştir. Farklı ırklardan elde edilen sütlerde aynı sonuçlar elde edilmeyebilir.

Sonuç olarak çalışmamız homojenizasyon, pastörizasyon ve fermantasyon gibi süt işlenme aşamalarının sütün içeriğindeki miRNA'ların ekspresyon seviyelerini azalttığını ortaya koymuştur. Fakat bazı çalışmalar homojenizasyon, pastörizasyon ve fermantasyon aşamalarının miRNA'ların anlatım seviyelerini değiştirmediğini göstermektedir. Bu nedenle gerek kolit hastalığı ile gerek kanser ile ilişkili olan miRNA'ların araştırılması önem arz etmektedir. Ayrıca laktik asit fermantasyonu, alkol fermantasyonu ve prepiyonik asit fermentasyonu gibi çeşitli fermantasyonlar sonucunda miRNA'ların ekspresyon seviyelerinin araştırılması bir sonraki çalışmalar için önemlidir.

KAYNAKLAR

Ananthakrishnan, A. N. (2013). Environmental risk factors for inflammatory bowel disease. *Gastroenterology & hepatology*, 9(6), 367. https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2010.06257.x

Ananthakrishnan, A. N. (2015). Epidemiology and risk factors for IBD. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*, 12(4), 205-217. https://doi.org/10.1038/nrgastro.2015.34

Anastasiadou, E., Jacob, L. S., & Slack, F. J. (2018). Non-coding RNA networks in cancer. *Nature Reviews Cancer,* 18(1), 5-18. https://doi.org/10.1038/nrc.2017.99

Baddela, V. S., Nayan, V., Rani, P., Onteru, S. K., & Singh, D. (2016). Physicochemical biomolecular insights into buffalo milk-derived nanovesicles. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 178, 544-557. https://doi.org/10.1007/s12010-015-1893-7

Baier , S. R., Nguyen, C., Xie, F., Wood, J. R., & Zempleni, J. (2014). MicroRNAs are absorbed in biologically meaningful amounts from nutritionally relevant doses of cow milk and affect gene expression in peripheral blood mononuclear cells, HEK-293 kidney cell cultures, and mouse livers. *The Journal of nutrition*, 144(10), 1495-1500. https://doi.org/10.3945/jn.114.196436

Bartel, D. P. (2009). MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *cell,* 136(2), 215-233. https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.002

Baumgart, D. C., & Sandborn, W. J. (2007). Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies. *The Lancet*, 369(9573), 1641-1657. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)60751-X

Bautista-Sanchez, D., Arriaga-Canon, C., Pedroza-Torres, A., De La Rosa-Velázquez, I. A., González-Barrios, R., Contreras-Espinosa, L., Montiel-Manríquez, R., Castro-Hernández, C., Fragoso-Ontiveros, V., Álvarez-Gómez, R., Herrera, L. A. (2020). The promising role of miR-21 as a cancer biomarker and its importance in RNA-based therapeutics. *Molecular Therapy-Nucleic Acids*, 20, 409-420. https://doi.org/10.1016/j.omtn.2020.03.003

Benmoussa, A., Laugier, J., Beauparlant, C. J., Lambert, M., Droit, A., & Provost, P. (2020). Complexity of the microRNA transcriptome of cow milk and milk-derived extracellular vesicles isolated via differential ultracentrifugation. *Journal of dairy science,* 103(1), 16-29. https://doi.org/10.3168/jds.2019-16880

Benmoussa, A., Ly, S., Shan, S. T., Laugier, J., Boilard, E., Gilbert, C., & Provost, P. (2017). A subset of extracellular vesicles carries the bulk of microRNAs in commercial dairy cow's milk. *Journal of extracellular vesicles*, 6(1), 1401897. https://doi.org/10.1080/20013078.2017.1401897

Buscaglia, L. E. B., & Li, Y. (2011). Apoptosis and the target genes of microRNA-21. *Chinese journal of cancer*, 30(6), 371. https://10.0.22.100/cjc.011.10132

Cai, M., He, H., Jia, X., Chen, S., Wang, J., Shi, Y., Liu, B., Xiao, W., Lai, S. (2018). Genome-wide microRNA profiling of bovine milk-derived exosomes infected with Staphylococcus aureus. *Cell Stress and Chaperones,* 23, 663-672. https://doi.org/10.1007/s12192-018-0876-3

Chen, J. (2015). MicroRNAs, signaling pathways and diseases. *Annals of Translational Medicine,* 3(21). https://10.0.15.138/j.issn.2305-5839.2015.12.16

Chen, W. X., Ren, L. H., & Shi, R. H. (2014). Implication of miRNAs for inflammatory bowel disease treatment: Systematic review. *World journal of gastrointestinal pathophysiology*, 5(2), 63. https://doi.org/10.4291/wjgp.v5.i2.63

Chen, X. M., Gao, K. X., Wu, X. D., Liang, H. S., Liu, Z. H., Wang, M. J., Mei, L., Huang, Q., Huang, R. Y. (2022). Chinese Herbal Formula Huayu-Qiangshen-Tongbi Decoction Attenuates Rheumatoid Arthritis through Upregulating miR-125b to Suppress NF-κB-Induced Inflammation by Targeting CK2. *Journal of Immunology Research*, 2022. https://doi.org/10.1155/2022/2836128

Chen, X., Gao, C., Li, H., Huang, L., Sun, Q., Dong, Y., Tian, C., Gao, S., Dong, H., Guan, D., Hu, X., Zhao, S., Li, L., Zhu, L., Yan, Q., Zhang, J., Zen, K., Zhang, C. Y. (2010). Identification and characterization of microRNAs in raw milk during different periods of lactation, commercial fluid, and powdered milk products. *Cell research*, 20(10), 1128-1137. https://doi.org/10.1038/cr.2010.80

Chen, Q., Zhang, F., Dong, L., Wu, H., Xu, J., Li, H., Wang J., Zhou Z., Liu C., Wang Y., Liu Y., Lu L., Whang C., Liu M., Chen X., Wang C., Zhang C., Li D., Zen K., Wang F., Zhang, C. Y. (2021). SIDT1-dependent absorption in the stomach mediates host uptake of dietary and orally administered microRNAs. *Cell research*, *31*(3), 247-258. https://doi.org/10.1038/s41422-020-0389-3

Cintio, M., Polacchini, G., Scarsella, E., Montanari, T., Stefanon, B., & Colitti, M. (2020). Microrna milk exosomes: From cellular regulator to genomic marker. *Animals*, 10(7), 1126. https://doi.org/10.3390/ani10071126

Cortez, M. A., Bueso-Ramos, C., Ferdin, J., Lopez-Berestein, G., Sood, A. K., & Calin, G. A. (2011). MicroRNAs in body fluids—the mix of hormones and biomarkers. *Nature reviews Clinical oncology*, 8(8), 467-477. https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2011.76

Coskun, M., Bjerrum, J. T., Seidelin, J. B., & Nielsen, O. H. (2012). MicroRNAs in inflammatory bowel disease-pathogenesis, diagnostics and therapeutics. *World journal of gastroenterology*: WJG, 18(34), 4629. https://doi.org/10.3748/wjg.v18.i34.4629

Catoire, M.,& Kersten, S. (2015). The search for exercise factors in humans. *The FASEB journal*, 29(5), 1615–1628. https://doi.org/10.1096/fj.14-263699

Catrysse, L., Vereecke, L., Beyaert, R., & van Loo, G. (2014). A20 in inflammation and autoimmunity. Trends in immunology, 35(1), 22-31. https://doi.org/10.1016/j.it.2013.10.005

Evans, P. C., Ovaa, H., Hamon, M., Kilshaw, P. J., Hamm, S., Bauer, S., Ploegh, T., Smith, T. S. (2004). Zinc-finger protein A20, a regulator of inflammation and cell survival, has de-ubiquitinating activity. *Biochemical Journal*, 378(3), 727-734. https://doi.org/10.1042/bj20031377

Hata, T., Murakami, K., Nakatani, H., Yamamoto, Y., Matsuda, T., & Aoki, N. (2010). Isolation of bovine milk-derived microvesicles carrying mRNAs and microRNAs. *Biochemical and biophysical research communications*, 396(2), 528-533. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.04.135

Hausser, J., & Zavolan, M. (2014). Identification and consequences of miRNA–target interactions—beyond repression of gene expression. *Nature Reviews Genetics*, 15(9), 599-612. https://doi.org/10.1038/nrg3765

Hitotsumatsu, O., Ahmad, R. C., Tavares, R., Wang, M., Philpott, D., Turer, E. E., Lee, B., Shiffin, N., Advincula, R., Malynn, B., Werts, C., Ma, A. (2008). The ubiquitin-editing enzyme A20 restricts nucleotide-binding oligomerization

domain containing 2-triggered signals. *Immunity*, 28(3), 381-390. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.02.002

Hou, J. K., Abraham, B., & El-Serag, H. (2011). Dietary intake and risk of developing inflammatory bowel disease: a systematic review of the literature. *Official journal of the American College of Gastroenterology| ACG*, 106(4), 563-573. https://doi.org/10.1038/ajg.2011.44

Howard, K. M., Jati Kusuma, R., Baier, S. R., Friemel, T., Markham, L., Vanamala, J., & Zempleni, J. (2015). Loss of miRNAs during processing and storage of cow's (Bos taurus) milk. *Journal of agricultural and food chemistry*, 63(2), 588-592. https://doi.org/10.1021/jf505526w

Hymowitz, S. G., & Wertz, I. E. (2010). A20: from ubiquitin editing to tumour suppression. *Nature Reviews Cancer*, 10(5), 332-341. https://doi.org/10.1038/nrc2775

Ibuki, F., Mori, T., Matsushita, S., & Hata, T. (1965). Ribonuclease in bovine milk. *Agricultural and Biological Chemistry*, 29(7), 635-640. https://doi.org/10.1080/00021369.1965.10858440

Izumi, H., Kosaka, N., Shimizu, T., Sekine, K., Ochiya, T., & Takase, M. (2012). Bovine milk contains microRNA and messenger RNA that are stable under degradative conditions. *Journal of dairy science*, 95(9), 4831-4841. https://doi.org/10.3168/jds.2012-5489

Izumi, H., Tsuda, M., Sato, Y., Kosaka, N., Ochiya, T., Iwamoto, H., Namba, K., Takeda, Y. (2015). Bovine milk exosomes contain microRNA and mRNA and are taken up by human macrophages. *Journal of dairy science*, 98(5), 2920-2933. https://doi.org/10.3168/jds.2014-9076

Jiang, M., Yang, Y., Niu, L., Li, P., Chen, Y., Liao, P., Wang, Y., Zheng, J., Chen, F., He, H., Li, H., Chen, X. (2022). MiR-125b-5p modulates the function of regulatory T cells in tumor microenvironment by targeting TNFR2. *Journal for Immunotherapy of Cancer*, 10(11), e005241. http://dx.doi.org/10.1136/jitc-2022-005241

Jonas, S., & Izaurralde, E. (2015). Towards a molecular understanding of microRNA-mediated gene silencing. *Nature reviews genetics*, 16(7), 421-433. https://doi.org/10.1038/nrg3965

Jostins, L., Ripke, S., Weersma, R. K., Duerr, R. H., McGovern, D. P., Hui, K. Y., Lee, J., Schumm L., Sharma, Y., Anderson, C., Essers, J., Mitrovic, M., Ning, K., Cleynen, I., Theatre, E., Spain, S., Raychaudhuri, S., Goyette, P., Wei, Z., …&, J., Cho, J. H. (2012). Host–microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. *Nature*, 491(7422), 119-124. https://doi.org/10.1038/nature11582

Kang, W. K., Lee, J. K., Oh, S. T., Lee, S. H., & Jung, C. K. (2015). Stromal expression of miR-21 in T3-4a colorectal cancer is an independent predictor of early tumor relapse. *BMC gastroenterology*, 15(1), 1-10. https://doi.org/10.1186/s12876-015-0227-0

Kaplan, G. G. (2015). The global burden of IBD: from 2015 to 2025. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology,* 12(12), 720-727. https://doi.org/10.1038/nrgastro.2015.150

Kappelman, M. D., Rifas–Shiman, S. L., Porter, C. Q., Ollendorf, D. A., Sandler, R. S., Galanko, J. A., & Finkelstein, J. A. (2008). Direct health care costs of Crohn's

disease and ulcerative colitis in US children and adults. *Gastroenterology*, 135(6), 1907-1913. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.09.012

Khor, B., Gardet, A., & Xavier, R. J. (2011). Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature*, 474(7351), 307-317. https://doi.org/10.1038/nature10209

Kim, V. N. (2005). MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nature reviews Molecular cell biology*, 6(5), 376-385. https://doi.org/10.1038/nrm1644

Koppers-Lalic, D., Hackenberg, M., Bijnsdorp, I. V., van Eijndhoven, M. A., Sadek, P., Sie, D., Zini, N., Middeldorp, J. M., Ylstra, B., Menezes, R. X., Würdinger, T., Meijer, G. A., Pegtel, D. M. (2014). Nontemplated nucleotide additions distinguish the small RNA composition in cells from exosomes. *Cell reports*, 8(6), 1649-1658. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.08.027

Kos, B. V. Z. E., Šušković, J., Vuković, S., Šimpraga, M., Frece, J., & Matošić, S. (2003). Adhesion and aggregation ability of probiotic strain Lactobacillus acidophilus M92. *Journal of applied microbiology*, 94(6), 981-987. https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.01915.x

Kosaka, N., Izumi, H., Sekine, K., & Ochiya, T. (2010). microRNA as a new immune-regulatory agent in breast milk. *Silence*, 1(1), 1-8. https://doi.org/10.1186/1758-907X-1-7

Krichevsky, A. M., & Gabriely, G. (2009). miR-21: a small multi-faceted RNA. *Journal of cellular and molecular medicine*, 13(1), 39-53. https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2008.00556.x

Krol, J., Loedige, I., & Filipowicz, W. (2010). The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nature reviews genetics*, 11(9), 597-610. https://doi.org/10.1038/nrg2843

Lai, C. Y., Yeh, K. Y., Liu, B. F., Chang, T. M., Chang, C. H., Liao, Y. F., Liu, Y., Her, G. M. (2021). MicroRNA-21 plays multiple oncometabolic roles in colitis-associated carcinoma and colorectal cancer via the PI3K/AKT, STAT3, and PDCD4/TNF-α signaling pathways in zebrafish. *Cancers*, 13(21), 5565. https://doi.org/10.3390/cancers13215565

Le Doare, K., Holder, B., Bassett, A., & Pannaraj, P. S. (2018). Mother's milk: a purposeful contribution to the development of the infant microbiota and immunity. *Frontiers in immunology*, 9, 361. https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00361

Lee, R. C., Feinbaum, R. L., & Ambros, V. (1993). The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. *cell*, 75(5), 843-854. https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90529-Y

Li, E., & Zhang, Y. (2014). DNA methylation in mammals. *Cold Spring Harbor perspectives in biology,* 6(5), a019133. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a019133

Liu, J. Z., & Anderson, C. A. (2014). Genetic studies of Crohn's disease: past, present and future. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 28(3), 373-386. https://doi.org/10.1016/j.bpg.2014.04.009

Liu, S., Da Cunha, A. P., Rezende, R. M., Cialic, R., Wei, Z., Bry, L., Comstock, L., Gandhi, R., Weiner, H. L. (2016). The host shapes the gut microbiota via fecal microRNA. *Cell host & microbe*, 19(1), 32-43. https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.12.005

Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2− ΔΔCT method. *methods*, 25(4), 402-408. https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262

Markowitz, S. D., & Bertagnolli, M. M. (2009). Molecular basis of colorectal cancer. *New England journal of medicine*, 361(25), 2449-2460. https://doi.org/10.1056/NEJMra0804588

Massart, Q., Li, M., Wang, X., Li, Q., Wang, T., Zhu, Q., Zhou, X., Wang, X., Gao, X., Li, X. (2012). Immune-related microRNAs are abundant in breast milk exosomes. *International journal of biological sciences*, 8(1), 118. https://doi.org/10.7150/ijbs.8.118

Mawdsley, J. E., & Rampton, D. S. (2005). Psychological stress in IBD: new insights into pathogenic and therapeutic implications. *Gut*, 54(10), 1481-1491. http://dx.doi.org/10.1136/gut.2005.064261

Melnik, B. C., Kakulas, F., Geddes, D. T., Hartmann, P. E., John, S. M., Carrera-Bastos, P., Cordain L., Schmitz, G. (2016). Milk miRNAs: simple nutrients or systemic functional regulators?. *Nutrition & Metabolism*, 13, 1-5. https://doi.org/10.1186/s12986-016-0101-2

Ng, S. C., Shi, H. Y., Hamidi, N., Underwood, F. E., Tang, W., Benchimol, E. I., Panaccione, R., Ghosh, S., Wu, J. CY., Chan, F. KL., Sung, J. JY., Wu, J. CY, Chan, FKL, Sung, JJY, & Kaplan, GG (2017). Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: A systematic review of population-based studies. *Lancet*, 390(10114), 2769-2778. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)32448-0

Pahlavani, M., Ramalho, T., Koboziev, I., LeMieux, M. J., Jayarathne, S., Ramalingam, L., Filgueiras, L. R., Moustaid-Moussa, N. (2017). Adipose tissue inflammation in insulin resistance: review of mechanisms mediating anti-inflammatory effects of omega-3 polyunsaturated fatty acids. *Journal of Investigative Medicine*, 65(7), 1021-1027. https://doi.org/10.1136/jim-2017-000535

Pahlavani, M., Ramalho, T., Koboziev, I., LeMieux, M. J., Jayarathne, S., Ramalingam, L., Filgueiras, L. R., Moustaid-Moussa, N. (2017). Adipose tissue inflammation in insulin resistance: review of mechanisms mediating anti-inflammatory effects of omega-3 polyunsaturated fatty acids. *Journal of Investigative Medicine*, 65(7), 1021-1027. https://doi.org/10.1136/jim-2017-000535

Peng, Y., & Croce, C. M. (2016). The role of MicroRNAs in human cancer. *Signal transduction and targeted therapy*, 1(1), 1-9. https://doi.org/10.1038/sigtrans.2015.4

Preethi, K. A., & Sekar, D. (2021). Dietary microRNAs: Current status and perspective in food science. *Journal of Food Biochemistry*, 45(7), e13827. https://doi.org/10.1111/jfbc.13827

Rani, P., Yenuganti, V. R., Shandilya, S., Onteru, S. K., & Singh, D. (2017). miRNAs: The hidden bioactive component of milk. *Trends in Food Science & Technology*, 65, 94-102. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.05.007

Rasheed, Z., Rasheed, N., Abdulmonem, W. A., & Khan, M. I. (2019). MicroRNA-125b-5p regulates IL-1β induced inflammatory genes via targeting TRAF6-mediated MAPKs and NF-κB signaling in human osteoarthritic chondrocytes. *Scientific Reports*, *9*(1), 6882. https://doi.org/10.1038/s41598-019-42601-3

Schmittgen, T. D., & Livak, K. J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature protocols*, 3(6), 1101-1108. https://doi.org/10.1038/nprot.2008.73

Schwarzenbach, H., Hoon, D. S., & Pantel, K. (2011). Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. Nature Reviews Cancer, 11(6), 426-437. https://doi.org/10.1038/nrc3066

Sukocheva, O. A., Liu, J., Neganova, M. E., Beeraka, N. M., Aleksandrova, Y. R., Manogaran, P., Grigorevskikh, E. M., Chubarev, V. N., Fan, R. (2022, May). Perspectives of using microRNA-loaded nanocarriers for epigenetic reprogramming of drug resistant colorectal cancers. In *Seminars in Cancer Biology*. Academic Press. https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2022.05.012

Seminerio, J. L., Koutroubakis, I. E., Ramos-Rivers, C., Hashash, J. G., Dudekula, A., Regueiro, M., Baidoo, L., Barrie, A., Swoger, J., Schwartz, M., Weyant, H., Dunn, M. A., Binion, D. G. (2015). Impact of obesity on the management and clinical course of patients with inflammatory bowel disease. *Inflammatory bowel diseases*, 21(12), 2857-2863. https://doi.org/10.1097/MIB.0000000000000560

Sun, N. N., Yu, C. H., Pan, M. X., Zhang, Y., Zheng, B. J., Yang, Q. J., Zheng, Z., Meng, Y. (2017). Mir-21 mediates the inhibitory effect of Ang (1–7) on AngII-induced NLRP3 inflammasome activation by targeting Spry1 in lung fibroblasts. *Scientific reports*, 7(1), 14369. https://doi.org/10.1038/s41598-017-13305-3

Taku, K., Britta, S., Chen, W. S., Ferrante, M., Shen, B., Bernstein, C. N., Toshifumi, H. (2020). Ulcerative colitis (primer). Nature Reviews: *Disease Primers*, 6(1). https://doi.org/10.1038/s41572-020-0205-x

Torres, J., Mehandru, S., Colombel, J. F., & Peyrin-Biroulet, L. (2017). Crohn's disease. *The Lancet*, *389*(10080), 1741-1755. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31711-1

Treiber, T., Treiber, N., & Meister, G. (2019). Regulation of microRNA biogenesis and its crosstalk with other cellular pathways. *Nature reviews Molecular cell biology*, 20(1), 5-20. https://doi.org/10.1038/s41580-018-0059-1

Ungaro, R., Mehandru, S., Allen, P. B., Peyrin-Biroulet, L., & Colombel, J. F. (2017). Colitis ulcerosa. *Lancet*, *389*(10080), 1756-1770. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)32126-2

Viennois, E., Chassaing, B., Tahsin, A., Pujada, A., Wang, L., Gewirtz, A. T., & Merlin, D. (2019). Host-derived fecal microRNAs can indicate gut microbiota healthiness and ability to induce inflammation. *Theranostics*, 9(15), 4542. https://doi.org/10.7150/thno.35282

Wahid, F., Shehzad, A., Khan, T., & Kim, Y. Y. (2010). MicroRNAs: synthesis, mechanism, function, and recent clinical trials. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1803(11), 1231-1243. https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2010.06.013

Wang, J., Zhang, K. Y., Liu, S. M., & Sen, S. (2014). Tumor-associated circulating microRNAs as biomarkers of cancer. *Molecules*, 19(2), 1912-1938. https://doi.org/10.3390/molecules19021912

Wang, Y., Zeng, G., & Jiang, Y. (2020). The emerging roles of miR-125b in cancers. *Cancer management and research*, 12, 1079. https://doi.org/10.2147/CMAR.S232388

Winter, J., Jung, S., Keller, S., Gregory, R. I., & Diederichs, S. (2009). Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nature cell biology*, 11(3), 228-234. https://doi.org/10.1038/ncb0309-228

Wu, F., Zikusoka, M., Trindade, A., Dassopoulos, T., Harris, M. L., Bayless, T. M., Brant, S. R., Chakravarti, S., Kwon, J. H. (2008). MicroRNAs are differentially expressed in ulcerative colitis and alter expression of macrophage inflammatory peptide-2α. *Gastroenterology*, 135(5), 1624-1635. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.07.068

Xavier, R. J., & Podolsky, D. K. (2007). Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature*, 448(7152), 427-434. https://doi.org/10.1038/nature06005

Xiao, K., Jiao, L., Cao, S., Song, Z., Hu, C., & Han, X. (2016). Whey protein concentrate enhances intestinal integrity and influences transforming growth factor-β1 and mitogen-activated protein kinase signalling pathways in piglets after lipopolysaccharide challenge. *British Journal of Nutrition*, 115(6), 984-993. https://doi.org/10.1017/S0007114515005085

Yu, Y., Zhang, J., Wang, J., & Sun, B. (2021). MicroRNAs: The novel mediators for nutrient-modulating biological functions. *Trends in Food Science & Technology,* 114, 167-175. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.05.028

Zaidi, D., Huynh, H. Q., Carroll, M. W., Baksh, S., & Wine, E. (2018). Tumor necrosis factor α-induced protein 3 (A20) is dysregulated in pediatric Crohn disease. *Clinical and experimental gastroenterology*, 217-231. https://doi.org/10.2147/ceg.s148217

Zempleni, J., Sukreet, S., Zhou, F., Wu, D., & Mutai, E. (2019). Milk-derived exosomes and metabolic regulation. *Annual review of animal biosciences*, 7, 245-262. https://doi.org/10.1146/annurev-animal-020518-115300

Zhou, M., Ala-Jaakkola, R., Laitila, A., & Lehtinen, M. J. (2020). Gut Microbiota, Probiotics and Physical Performance in Athletes and Physically Active Individuals. *Nutrients*, 12(10), 2936. https://doi.org/10.3390/nu12102936

Zhao, Y., Lang, Y., Zhang, M., Liang, S., Zhu, X., & Liu, Z. (2022). miR-125b disrupts mitochondrial dynamics via targeting Mitofusin 1 in cisplatin-induced acute kidney injury. *Kidney Diseases*, 8(2), 137-147. https://doi.org/10.1159/000520140

Zhu, W. D., Xu, J., Zhang, M., Zhu, T. M., Zhang, Y. H., & Sun, K. E. (2018). MicroRNA-21 inhibits lipopolysaccharide-induced acute lung injury by targeting nuclear factor-κB. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 16(6), 4616-4622. https://doi.org/10.3892/etm.2018.6789