İNEK SÜTÜNDE BULUNAN MİR-191'İN DOLAŞIMDA TESPİTİ VE FONKSİYONUNUN İNCELENMESİ

Fatih Atilla BAĞCI

T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İNEK SÜTÜNDE BULUNAN MİR-191'İN DOLAŞIMDA TESPİTİ VE FONKSİYONUNUN İNCELENMESİ

Fatih Atilla BAĞCI
0009-0003-5158-1757

Doç. Dr. Dilek PİRİM
(Danışman)

YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

BURSA – 2025
Her Hakkı Saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

İNEK SÜTÜNDE BULUNAN MİR-191'İN DOLAŞIMDA TESPİTİ VE FONKSİYONUNUN İNCELENMESİ

Fatih Atilla BAĞCI

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

Danışman: Doç. Dr. Dilek PİRİM

Küçük kodlama yapmayan RNA'lar (miRNA'lar), gen ekspresyonunu düzenleyerek biyolojik süreçlerde yer alan RNA türleridir. Son yıllarda yapılan araştırmalarda bitkisel ve hayvansal gıdalarda bol miktarda miRNA bulunduğu ve bu miRNA'ların beslenme yolu ile farklı organizmaların dokularına geçiş yapabildiği, böylece konak organizmada işlevsel olabileceği gösterilmiştir. Bu sebeple, besinsel miRNA'ların organizmaların dolaşımına geçiş özellikleri son yıllarda araştırmacılar için önemli bir araştırma konusu olmuştur. Bu tez çalışması, süt içeriğindeki miR-191'in memeli dolaşımına geçişini ve fonksiyonel etkisini araştırmayı hedeflemiştir. Tez çalışması kapsamında farklı zaman aralıklarında BALB/c farelere su ve süt besleme çalışması yapılarak beslenme sonrası kan ve beyin dokusu örneklerinin alımı gerçekleştirilmiştir. Kan ve beyin dokusu örneklerinde süt beslenmesi sonrası miR-191-5p'nin ve hedefi olduğu bilinen *Setd1b* ve *Bdnf*'nin ekspresyonları RT-qPCR metodu ile incelenmiştir. Analizler sonucunda süt içen farelerde 3. saatte miR-191-5p ekspresyonun arttığı tespit edilmiştir. Beyin dokusunda ise su grubunda 3. saatte miR-191-5p ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlemlenmezken, süt grubunda istatistiksel olarak anlamlı (p=0,0118) bir artış olduğu gözlemlenmiştir. Dolaşımda *Setd1b*'nin ekspresyonu incelendiğinde süt içirilen farelerde 12. saatte istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu görülmüştür (p=0,0122). Beyin dokusunda ise *Setd1b* geninin su ve süt içen gruplar arasında anlamlı bir farklılığının olduğuna dair sonuçlar elde edilmiştir (p=0,0062). Özetle, sonuçlarımız süt içerisindeki miR-191'in fare dolaşımına/beyin dokusuna geçme ve fonksiyonel etki gösterme potansiyeli olduğuna dair veriler sunmaktadır. İleriki çalışmalarda süt içeriğindeki miR-191'in ve diğer miRNA'ların dolaşıma geçişi daha detaylı olarak incelenmesi ve böylelikle bu geçişin daha iyi anlaşılabilmesi amacıyla daha kapsamlı çalışmaların yapılması literatürdeki önemli bir boşluğu kapatılması için gereklidir.

Anahtar Kelimeler: Besinsel miRNA, Besinsel Epigenetik, mikroRNA, mir-191, İnek Sütü

ABSTRACT

MSc Thesis

IDENTIFICATION OF THE MILK DERIVED MIR-191 IN THE CIRCULATION

Fatih Atilla BAĞCI

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

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Dilek PİRİM

Small non-coding RNAs, particularly microRNAs (miRNAs), play a crucial role in regulating gene expression and participate in various biological processes. Recent research has revealed that plant- and animal-derived foods contain high concentrations of miRNAs, which can enter the tissues or circulation of other organisms through dietary intake and potentially exert regulatory effects in the host. Consequently, the dietary transfer of miRNAs has become an important focus of molecular biology studies. This thesis investigates the transfer of milk-derived miR-191 into the mammalian circulatory system and its functional effects. BALB/c mice were subjected to water and milk feeding at different time intervals, after which blood and brain tissues were collected. The expression levels of miR-191-5p and its known targets, *Setd1b* and *Bdnf*, were analyzed using RT-qPCR. Results indicated that circulating miR-191-5p levels significantly increased three hours after milk feeding, while no significant change was detected in the water-fed group. In brain tissue, a considerable increase in miR-191-5p expression was observed in the milk-fed group (p=0.0118). Additionally, *Setd1b* expression decreased significantly in circulation at 12 hours (p=0.0122), and a significant difference in *Setd1b* expression between water- and milk-fed groups was also found in brain tissue (p=0.0062). Overall, these findings suggest that milk-derived miR-191 can be transferred into the bloodstream and brain tissue of mice, potentially exerting functional regulatory effects. Further research is warranted to elucidate the mechanisms underlying the transfer of miR-191 and other milk-derived miRNAs into circulation. More comprehensive studies will be essential to deepen our understanding of this process and to address the existing gaps in the literature.

Key words: Dietary miRNA, Dietary Epigenetics, microRNA, miR-191, Bovine Milk

TEŞEKKÜR

Lisans eğitim sürecinde tanışma fırsatı bulduğum ve ilk staja başladığım günden itibaren bana sabırla yaklaşan, elindeki tüm imkanları düşünmeden laboratuvarındaki tüm öğrencilerine sunan, en kötü olaylarda bile iyi tarafından bakabilen, bu bakmayı öğreten, her zaman güler yüzlü, enerjik, pozitif olan ve hiçbir zaman desteğinin eksik etmeyen, tez danışmanım, idolüm; Doç. Dr. Dilek PİRİM'e beni kanatlarının altına aldığı için en içten teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışmasının gerçekleşmesinde önemli role sahip olan ve hayvan deneyleri süreci boyunca her anlamda yardımda bulunan Bursa Uludağ Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi, Patoloji anabilim dalında görev alan Prof. Dr. Özgür Musa ÖZTÜRK ve Arş. Gör. Mehmet Emre TOPÇU'ya, Demiroğlu Bilim Üniversitesi, Biyofizik anabilim dalında görev alan Dr. Öğr. Üyesi Servet TUNOĞLU'na, Bursa Uludağ Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi, Genetik anabilim dalında görev alan Prof. Dr. Özden ÇOBANOĞLU ve Bursa Uludağ Üniversitesi Deney Hayvanları Yetiştirme ve Araştırma Biriminde görev alan Veteriner Hekim Faruk KÜÇÜKYILDIZ'a teşekkürlerimi sunarım.

TUBİTAK 2210-A Yurt İçi Genel Yüksek Lisans Burs Programı ile yüksek lisans eğitimim süresince bana destek veren TUBİTAK kurumuna teşekkürlerimi sunarım.

Bursa Uludağ Üniversitesi Rektörlüğü, Bursa Uludağ Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi ve Türkiye Sağlık Enstitüleri Başkanlığı'na bu çalışmayı gerçekleştirebilmemiz için gerekli olan maddi kaynağı sağladıkları için teşekkürlerimi sunarım.

Bursa Uludağ Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Omik Analiz ve Araştırma Laboratuvarı ekibinde şu ana kadar birlikte çalışmış olduğum sevgili arkadaşlarım Ceren GÜMÜŞ, Metehan YAMAN, Esra BOZTEPE, Ecem KURU, İrem Nur GÖZÜDOK ve Hasan Faruk NİŞ'e tüm yardım ve dostlukları için teşekkürlerimi sunarım.

Bu dünyada benim için en iyi fırsatları bana sağlayan, her zaman koşulsuz şartsız beni dinleyip seven, ağladığımda gözyaşlarımı silen, her zaman zoru kovalamam için beni yüreklendiren, sevgili annem Fatma KAHRAM'a, güler yüzü ve sevgisiyle her zaman yanımda olan değerli kardeşim Kerem BAĞCI'ya teşekkürlerimi sunarım. Son olarak, süreç boyunca benim dertlerimi dinleyip anlayış gösteren, destek olan sevgili arkadaşlarım Mehmet Can KARAKOYUN, İpek ÖZTÜRK ve Hatice AYDIN'a teşekkürlerimi sunarım.

Fatih Atilla BAĞCI
…/…/…….

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET....viii
ABSTRACT....ix
TEŞEKKÜR....x
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ....xii
ŞEKİLLER DİZİNİ....xiv
ÇİZELGELER DİZİNİ....xvi
1. GİRİŞ…...……..1
2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ARAŞTIRMASI....3
2.1. mikroRNA'lar: Tanımı ve Önemi....3
2.2. Besinsel mikroRNA'lar....7
2.2.1. Süt Kaynaklı miRNA'lar....18
2.3. miRNA'ların Gen ekspresyonu Üzerine Etkileri....21
3. MATERYAL ve YÖNTEM....23
3.1. Deney Hayvanları....23
3.1.1. Süt Numunelerinin Hazırlanması ve Fare Besleme Protokolü....23
3.1.2 Kan ve Doku Örneklerinin Toplanması....24
3.2. Biyolojik Materyallerden RNA İzolasyonu....25
3.3. RT-qPCR Yöntemi ile mikroRNA Ekspresyon Analizi....27
3.4. RT-qPCR Yöntemi ile Hedef Genlerin Ekspresyon Analizi....28
3.5. Biyoinformatik ve İstatistiksel Analizler....30
4. BULGULAR....31
4.1. RT-qPCR Yöntemi ile mikroRNA Ekspresyon Analizi....31
4.2. RT-qPCR Yöntemi ile Hedef Genlerin Ekspresyon Analizi....37
4.2.1. *Setd1b* Ekspresyon Analizi....37
4.2.2 *Bdnf* Ekspresyon Analizi....44
5. TARTIŞMA VE SONUÇ....49
KAYNAKLAR....54
ÖZGEÇMİŞ....67

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler	**Açıklama**
µl	Mikrolitre
mL	Mililitre
>	Büyüktür
≥	Büyük eşittir
<	Küçüktür
≤	Küçük eşittir
-	Kısa Çizgi
α	Alfa
Δ	Delta
β	Beta
+	Artı
%	Yüzde
°C	Celsius
±	Artı Eksi
P	Probability
=	Eşittir

Kısaltmalar	**Açıklama**
ACTB	Beta-aktin
AGO2	Argonaute 2
ANOVA	Analysis of variance
AUC	Area under the curve
BDNF	Brain derived neurotrophic factor
bta	Bos taurus
cDNA	Komplementer deoksinükleotid
CoA	Koenzim A
CT	Cycling Threshold
DALRD3	DALR anticodon binding domain containing 3
DGCR8	DiGeorge sendromu kritik bölge 8
DICER	Double-stranded RNA endoribonuclease
ERH	ERH mRNA splicing and mitosis factor
FADS2	Fatty Acid Desaturase *2*
GPAT4	Glycerol-3-Phosphate Acyltransferase 4
HEN1	HEN methyltransferase 1
HIV-1	Human immunodeficiency virus
hsa	Homo sapiens
HSP70/HSP90	Heat shock protein70/Heat shock protein90
kb	kilobaz
KBB	Kan beyin bariyeri
kDa	Kilodalton
let	Lethal
M.Ö	Milattan önce
miR	miRNA
miRISC	miRNA ile indüklenen susturma kompleksi

miRNA	Mikro ribonükleik asit
mmu	Mus musculus
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NUP50	Nucleoporin 50
pre-miRNA	Öncül miRNA
pri-miRNA	Birincil miRNA
ROC	Receiver operating characteristic
RT-qPCR	Real-time quantitative polymerase chain reaction
RUNX2	RUNX family transcription factor 2
SAFB2	Scaffold Attachment Factor B2
SETD1B	SET domain containing 1b,
SIDT1	SID1 transmembrane family member 1
snRNA U6	U6 small nuclear RNA
TCF7	Transcription factor 7
TRBP	Transactive response binding protein
UTR	Çevirilmemiş bölge
XPO5	Exportin-5

ŞEKİLLER DİZİNİ

		Sayfa
Şekil 2.1.	miRNA biyogenez yolakları (O'Brien vd., 2018)	3
Şekil 2.2.	Birincil (primary) miRNA yapısı (O'Brien vd., 2018)	4
Şekil 2.3.	HSP70/HSP90 şaperon komplesinin küçük RNA'ları AGO2'ye transfer süreci (Iwakawa ve Tomari, 2022)	6
Şekil 2.4.	Farklı kaynaklardan köken alan besinsel miRNA'lar ve fonksiyonel etkileri (Martino vd., 2024)	8
Şekil 2.5.	Besinsel miRNA'ların mideden dolaşıma transferi (Chen vd., 2021)	11
Şekil 2.6.	Bitki ve hayvanlar aleminde miRNA biyogenez süreçleri (Li vd., 2018)	13
Şekil 2.7.	Anne sütünün içeriğinde bulunan moleküller (A) ve bu moleküllerin dağılımında rol oynayan faktörler (B) (Hatmal vd., 2022)	14
Şekil 2.8.	İnek sütünün moleküler içeriği (Alothman vd., 2019)	18
Şekil 2.9.	Çiğ ve pastörize inek ve keçi sütünün farklı fraksiyonlarının miRNA profilleri (Golan-Gerstl vd., 2017)	19
Şekil 2.10.	Çiğ, pastörize ve ultra yüksek sıcaklıkta işlenmiş sütte en bol bulunan 20 miRNA (Zhang vd., 2022)	20
Şekil 2.11.	Olgun miRNA'nın yapısı (A) ve bağlanma bölgeleri (B) (Iwakawa ve Tomari, 2022)	21
Şekil 3.1.	Kaynatılmış çiğ sütün hazırlanması	23
Şekil 3.2.	Farelere su/süt beslemesi ve gruplandırma	24
Şekil 3.3.	Tez çalışmasının iş akışı	24
Şekil 3.4.	Çalışmada kullanılan RNA örnekleri	26
Şekil 4.1.	miR-191-5p'nin farklı saat noktalarında kan örneklerinde süt (A) ve su (B) gruplarında relatif ekspresyonları	31
Şekil 4.2.	miR-191-5p'in farklı saat noktalarında kan örneklerindeki ekspresyonlarının iki yönlü ANOVA sonuçları	32
Şekil 4.3.	Kan örneklerinde miR-191-5'nin ROC analiz sonuçları	33
Şekil 4.4.	Beyin dokusunda miR-191-5p'nin farklı saat noktalarında süt (A) ve su (B) gruplarında relatif ekspresyonları	34
Şekil 4.5.	miR-191-5p'in farklı saat noktalarında beyin dokusu örneklerindeki ekspresyonlarının iki yönlü ANOVA sonuçları	35
Şekil 4.6.	Beyin dokusu örneklerinde miR-191-5p'nin ROC analiz sonuçları	35
Şekil 4.7.	miR-191-5p'nin kan ve beyin dokusu örneklerindeki lineer regresyonu (A) Su grubunda, (B) Süt grubunda ve (C) Tüm grup	36
Şekil 4.8.	*Setd1b*'nin kan örneklerinde farklı saat noktalarında süt (A) ve su (B) gruplarında ekspresyonu	38
Şekil 4.9.	*Setd1b*'nin farklı saat noktalarında kan örneklerindeki ekspresyonlarının iki yönlü ANOVA sonuçları	39
Şekil 4.10.	Kan örneklerinde *Setd1b*'nin ROC analiz sonuçları	39

Şekil 4.11.	Kan örneklerinde miR-191-5p'nin ve *Setd1b* lineer regresyonu (A) Su grubunda, (B) Süt grubunda ve (C) Tüm grup	40
Şekil 4.12.	Beyin dokusunda *Setd1b*'nin farklı saat noktalarında süt (A) ve su (B) gruplarında relatif ekspresyonları	41
Şekil 4.13.	*Setd1b*'nin farklı saat noktalarında beyin dokusu örneklerindeki ekspresyonlarının iki yönlü ANOVA sonuçları	42
Şekil 4.14.	Beyin dokusu örneklerinde *Setd1b*'nin ROC analiz sonuçları	42
Şekil 4.15.	Beyin dokusunda miR-191-5p'nin ve *Setd1b* lineer regresyonu (A) Su grubunda, (B) Süt grubunda ve (C) Tüm grup	43
Şekil 4.16.	Beyin dokusunda *Bdnf*'nin farklı saat noktalarında su (A) ve süt (B) gruplarında relatif ekspresyonları	45
Şekil 4.17.	*Bdnf*'nin farklı saat noktalarında beyin dokusu örneklerindeki ekspresyonlarının iki yönlü ANOVA sonuçları	46
Şekil 4.18.	Beyin dokusu örneklerinde *Bdnf*'nin ROC analiz sonuçları	46
Şekil 4.19.	Beyin dokusunda miR-191-5p'nin ve *Bdnf*'nin lineer regresyonu (A) Su grubunda, (B) Süt grubunda ve (C) Tüm grup	47

ÇİZELGELER DİZİNİ

			Sayfa
Çizelge	2.1.	Bitkisel ve hayvansal kökenli besinsel miRNA'ların fonksiyonel çalışmaları (Pasculli vd., 2024 ve Tao ve Guo, 2024'den uyarlanmıştır.)	10
Çizelge	2.2.	Anne sütünde bol bulunan miRNA'lar ve fonksiyonel önemleri (Leroux vd., 2021'den uyarlanmıştır.)	15
Çizelge	2.3.	Farklı memeli sütlerinin içerikleri (Roy vd., 2020'den uyarlanmıştır.)	19
Çizelge	3.1.	miRNA analizleri için cDNA sentezi için gerçekleştirilen şartlar	27
Çizelge	3.2.	miRNA analizleri için cDNA sentezi için kullanılan reaktifler ve miktarları	28
Çizelge	3.3.	miRNA ekspresyon analizleri için kullanılan RT-qPCR şartları	28
Çizelge	3.4.	miRNA ekspresyon analizleri için kullanılan reaktifler ve miktarları	28
Çizelge	3.5.	miR-191-5p'nin fare, inek ve insandaki sekansları	28
Çizelge	3.6.	Hedef gen ekspresyonu için cDNA sentez şartları	39
Çizelge	3.7.	Hedef gen ekspresyonu için kullanılan primerlerin sekansları	39
Çizelge	3.8.	Hedef gen ekspresyon analizleri için kullanılan reaktifler ve miktarları	30
Çizelge	3.9.	Hedef gen ekspresyon analizleri için kullanılan RT-qPCR şartları	30
Çizelge	4.1.	Su veya süt ile beslenen farelerde, miR-191-5p'nin kan ve beyin dokularındaki relatif ekspresyon seviyelerinin 0., 3., 6. ve 12. saatlerdeki karşılaştırılması	37
Çizelge	4.2.	Su veya süt ile beslenen farelerde, *Setd1b*'nin kan ve beyin dokularındaki relatif ekspresyon seviyelerinin 0., 3., 6. ve 12. saatlerdeki karşılaştırılması	44
Çizelge	4.3.	Su veya süt ile beslenen farelerde, *Bdnf*'nin kan ve beyin dokularındaki relatif ekspresyon seviyelerinin 0., 3., 6. ve 12. saatlerdeki karşılaştırılması	48

1. GİRİŞ

İlk kez C. *elegans*'da 1993 yılında keşfedilmiş olan mikroRNA'lar (miRNA) literatürde önemli bir çalışma konusu olmuştur (Lee vd., 1993). miRNA'lar hayvanlar aleminde 18-22 nükleotit uzunluğundayken, bitkilerde 20-24 nükleotit uzunluğundadırlar (Dong vd., 2022; O'Brien vd., 2018). MiRNA'lar endojen ve eksojen miRNA'lar olarak basitçe ikiye ayrılabilir. Eksojen miRNA'ların, özellikle bitki ve virüs kökenli olanlar, konuk organizmanın transkriptomunu regüle edebildikleri literatürde raporlanmıştır. İnsanda en iyi çalışılmış eksojen miRNA kaynağı, anne sütüdür. Anne sütünü içerisinde bulunan miRNA'ların bebek gelişiminde önemli olan lipid metabolizması, glikoz metabolizması, bağırsak olgunlaşması, nörogenez ve bağışıklık gibi önemli süreçlerde görevlerinin olduğu bilinmektedir (Leroux vd., 2021).

Besinsel miRNA'lar, ilk kez Zhang vd. (2012) tarafından bitki kaynaklı miRNA'ların insan serumunda keşfedilmesi ile ortaya konmuştur. Zhang vd. (2012) tarafından gerçekleştirilmiş olan bu çalışma, literatürde büyük bir ilgi ile karşılanmış ve farklı kaynaklardan köken alan miRNA'ların diğer canlılara geçiş yapabilme potansiyellerine dair çalışmalar gerçekleştirilmiştir (Martino vd. 2024). İnek sütü içerdiği miRNA profili açısından oldukça zengin bir besindir. Literatürde yapılan çalışmalar ile süt içerisinde bulunan miRNA'ların sıcaklık ve sindirim koşullarından stabil kaldıklarına dair kanıtlar sunulmuştur (Melnik ve Schmitz, 2019; Bağcı ve Pirim, 2024; Pirim vd., 2025).

Bu tez çalışmasında, süt içeriğinde bolca bulunduğu ve ısıl işlem sonrası stabil kaldığı raporlanmış olan miR-191'in fare dolaşıma ve beyin dokusuna geçişi incelenmiştir. Geçişin ve fonksiyonel etkisinin incelenmesi için Bursa Uludağ Üniversitesi Deney Hayvanları Yetiştirme ve Araştırma Biriminden 32 adet BALB/c fare temin edilmiştir. Fareler, gruplara ayrılarak süt veya kontrol olarak su beslemesi gavaj yardımıyla gerçekleştirilmiştir. Besleme sonrası 0. 3. 6. ve 12. saat aralıklarında fareler sevofluran yardımıyla uyutulmuş ve farelerden kardiyak punksiyon yöntemi ile EDTA'lı kan tüplerine yaklaşık 2 ml kan alımı gerçekleştirilmiştir. Kan alımı sonrası farelerin beyin dokuları da alınmıştır. Kan ve beyin dokusundaki miR-191-5p ve miR-191-5p'nin hedefi olan genlerin (*Setd1b* ve *Bdnf*) seviyeleri RT-qPCR tekniği ile incelenmiştir. Bu tez çalışması süt içeriğindeki miR-191'in dolaşıma geçişinin ve fonksiyonun incelendiği

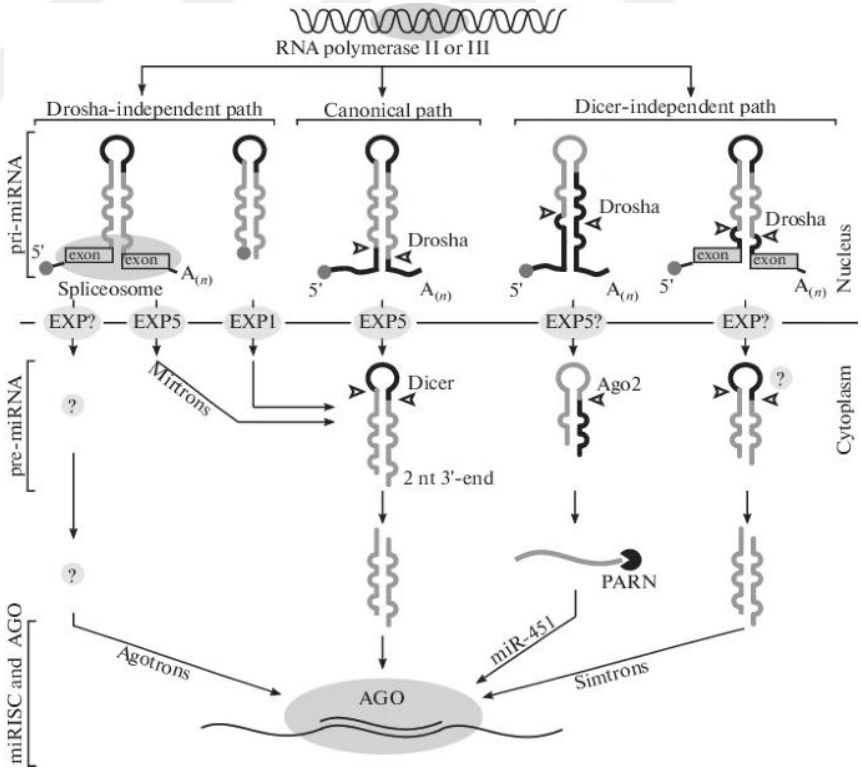
literatürdeki ilk çalışmadır. Bu çalışmanın çıktıları, besinsel miRNA'ların dolaşıma geçişi alanında ileride gerçekleştirilecek olan çalışmalar için ön veri olma niteliğine sahiptir.

2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. mikroRNA'lar: Tanımı ve Önemi

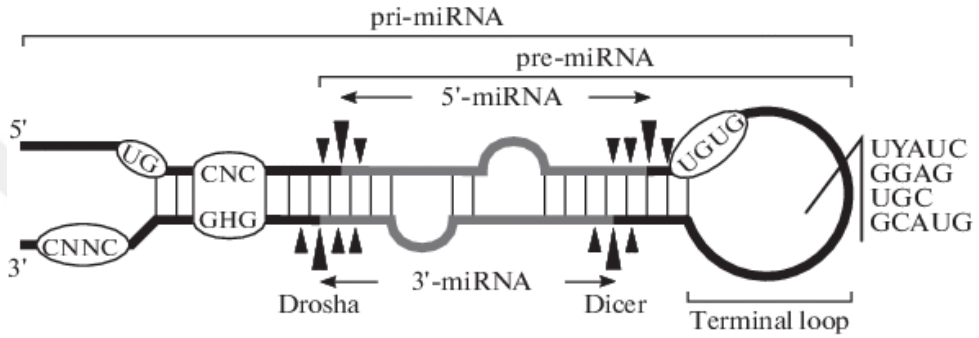
Lee vd., (1993) tarafından ilk kez C. *elegans*'da keşfedilmiş olan mikroRNA'lar (miRNA), keşiflerinden bu yana literatürde çok önemli bir çalışma alanı olmuştur. miRNA'lar hayvanlar aleminde 18-22 nükleotit uzunluğundayken bitkilerde 20-24 nükleotit uzunluğundadırlar (Dong vd., 2022; O'Brien vd., 2018). miRNA'ların neredeyse her biyolojik süreçte regülatör etkileri bulunmaktadır. Bu etkilerini, hedef mRNA moleküllerinin 3'UTR (untranslated region) bölgesine bağlanıp RNA degradasyonunu sağlayarak gerçekleştirmektedirler.

miRNA'lar, hayvanlar alemindeki canlılarda 3 farklı yolak ile sentezlenmektedirler. Bu yolaklardan miRNA'ların yüksek çoğunluğunun sentezlendiği yolak, Kanonik yolaktır (**Şeki 2.1**).



Şekil 2.1. miRNA biyogenez yolakları (O'Brien vd., 2018)

MiRNA’lar kanonik yolakta hedef genlerinden genellikle RNA Polimeraz II tarafından sentezlenir. Kanonik yolda sentezlenmiş olan birincil (primary) miRNA (pri-miRNA) 3’ poli A kuyruk ve 5’ şapka yapısına sahiptir ve 3-4 kb boyundadır. Sentezlenmiş olan pri-miRNA, RNA bağlama proteini DiGeorge sendromu kritik bölge 8 (DGCR8) ve ribonükleaz III enzimi olan Drosha proteinlerini içeren mikroişlemci kompleksi tarafından tanınır. Mikroişlemci kompleksi, pri-miRNA’yı 3’ kısmında 2 nükleotitlik çıkıntı bulunan öncül (precursor) miRNA (pre-miRNA) molekülüne dönüşmektedir (O'Brien vd., 2018; Monteys vd., 2010; Han vd., 2004) (**Şekil 2.2**).



Şekil 2.2. Birincil (primary) miRNA yapısı (O’Brien vd., 2018)

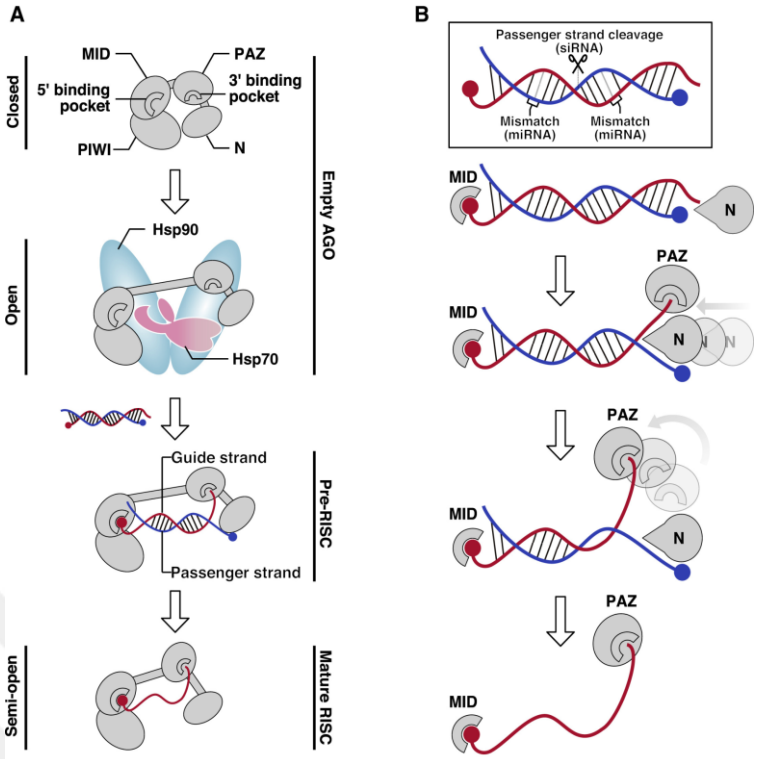
Mikroişlemci kompleksinin alt birimleri olan DGCR8, pri-miRNA yapısında bulunan N6-metiladenilasyonlu GGAC motifini ve diğer miRNA’ya özgü motifleri tanır ve mikroişlemci kompleksine bağlar. Drosha ise pri-miRNA yapısında bulunan saç tokası yapısının yakınından kesme işlemini gerçekleştirmektedir (Alarcón vd., 2015). Süreçte ana işlevleri DGCR8 ve Drosha gerçekleştirse de mikroişlemci kompleksinde enhancer of rudimentary homolog (ERH) ve scaffold attachment factor B2 (SAFB2) gibi kofaktörlerin de önemli görevlerinin olduğu ve kompleksin yapısına katıldıkları bilinmektedir (Kwon vd., 2020; Hutter vd., 2020). ERH, mikroişlemci kompleksinde pri-miRNA’nın yardımcı saç tokası yapısına bağlanarak kusurlu saç tokasının, kompleks tarafından tanınmasını sağlamaktadır (Shang vd., 2020). SAFB2 ise miR-16-1 bağımlı, miR-15 işlenmesinde rol oynayan önemli bir kofaktördür (Hutter vd 2020).

Pre-miRNA oluşumu sonrası, pre-miRNA nükleustan sitoplazmaya exportin-5 (XPO5)/RanGTP kompleksi tarafından taşınır (Denli vd., 2004; Okada vd., 2009). XPO5 proteini nükleositoplazmik taşıma faktörleri olan karyoferin ailesinin bir üyesidir. XOP5

mini helix içeren RNA moleküllerine bağlanarak RNA moleküllerinin nükleustan sitoplazmaya taşınmasında görev alır (Brownawell ve Macara, 2002; Wang vd., 2020). XPO5 tarafından taşınan RNA molekülleri arasında pre-miRNA'lar ile birlikte bazı tRNA'lar ve virüs kaynaklı RNA molekülleri yer almaktadır (Wang vd., 2020).

Sitoplazmaya taşınmış olan pre-miRNA, RNaz III endonükleaz olan Dicer enzimi tarafından olgun miRNA-miRNA dubleks yapısını oluşturur (Denli vd., 2004; Okada vd., 2009). Dicer'ın pre-miRNA molekülünü tanımasında pre-miRNA yapısında bulunan 2 nükleotitlik çıkıntının, 5' terminal fosfat grubunun ve 3'-OH'ın büyük etkisi bulunmaktadır (Bofill-De Ros ve Vang Ørom , 2024). Bu kesim, 2 nükleotitlik çıkıntıdan 21-25 nükleotid sonra gerçekleşir (bkz. **Şekil 2.2**). Dicer'ın pre-miRNA'ya bağlanması, transactive response binding protein (TRBP) tarafından kontrol edilmektedir (Wilson vd., 2015). TRBP'nin knock-out edildiği durumda, miRNA biyogenezinin gerçekleşmediği veya yanlış kesilmiş miRNA'ların oluştuğu gözlemlenmiştir (Wilson vd., 2015; Chendrimada vd., 2005).

miRNA-miRNA dubleks yapısının oluşumu sonrasında, Heat shock protein70/Heat shock protein90 (HSP70/HSP90) şaperon kompleksi ve yardımcı şaperonlar (RPAP3, UNC45 vb.) ile Dicer kompleksinden, argonaute 2 (AGO2) proteinine aktarılması gerçekleşmektedir (Schopp vd., 2017) (**Şekil 2.3**).



Şekil 2.3. HSP70/HSP90 şaperon komplesinin küçük RNA'ları AGO2'ye transfer süreci (Iwakawa ve Tomari, 2022)

miRNA-miRNA dubleksi, AGO2 ve 5 şaperon (HSP90 HSP70 Hop Dnaja2 p23) miRNA ile indüklenen susturma kompleksi (miRISC) yapısında bulunmaktadır (Naruse vd., 2018). miRNA-miRNA dubleks yapısının, miRISC kompleksine bağlanma sürecinin başlaması için ATPaz enzimi olan Hsp70'in, kapalı formda bulunan, bkz. **Şekil 2.2 A**, boş AGO2 proteinini açık forma geçirmesi gerekmektedir. Açık forma geçen AGO2 HSP70 kompleksine, HSP90 dahil olarak AGO2'nin açık konformasyonunu stabilize eder. Sonrasında miRNA-miRNA dubleks yapısı, bu komplekse dahil olur ve kompleks yarı açık bir konformasyona geçer (Tsuboyama vd., 2018). Komplekse miRNA-miRNA dubleks yapısının yüklenmesi sırasında yapının yönü, hangi zincirin rehber zincir olacağını belirler (Iwakawa ve Tomari, 2022). Bu seçim sırasında zincirlerin termodinamik kararlılığı, 5' kısımlarında yer alan son nükleotit gibi faktörler tarafından etkilenmektedir (Frank vd., 2010; Schwarz vd., 2003).

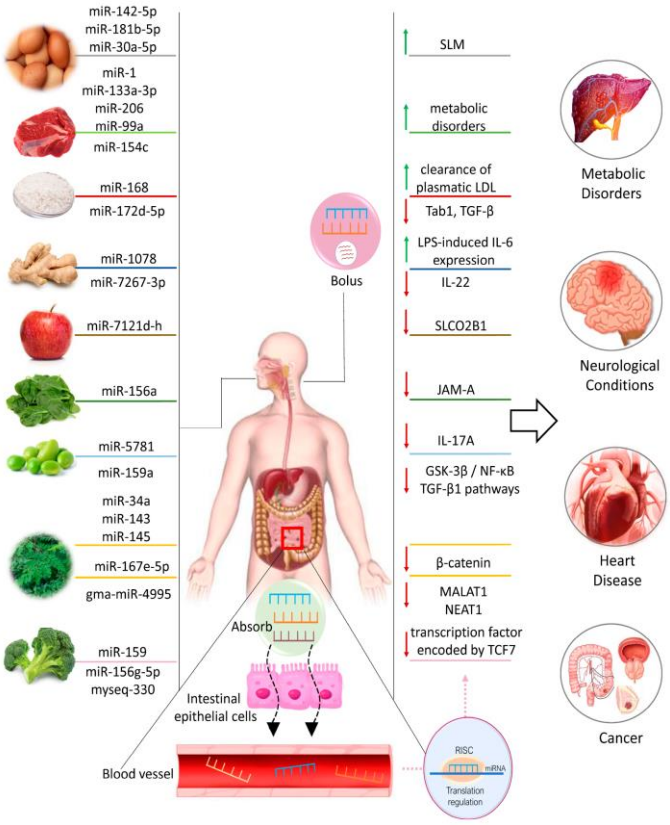
AGO proteinin N domaini, baz eşleşmesini bozarak zincirlerin ayrılmasını başlatır (Wang vd., 2009). Açılma başladıktan sonra rehber zincirin 3' bölgesine bağlı PAZ domaini, N

domain tarafından açılmış zincirin ekseninde dönme gerçekleştirerek dubleks yapının tamamen ayrılmasını sağlar (bkz. **Şekil 2.3 B**) (Iwakawa ve Tomari, 2022). Seçim sonrası yolcu zincir kompleksten atılır ve degrade olur (Medley vd., 2021). Ayrılma sonrası yolcu zincir ya AGO proteini hedef zincire göre 10 ve 11'inci nükleotitlerden kesim gerçekleştirerek ya da g2-g8 ve g12-g15 bölgelerinde bulunan yanlış eşleşme ile indüklenerek kompleksten uzaklaştırılır (Matranga vd., 2005; Yoda vd., 2010).

2.2. Besinsel MikroRNA'lar

MiRNA'lar köken aldıkları kaynaklara göre organizmanın kendisi tarafından sentezlenen miRNA'lar (endojen miRNA'lar) ve dışarıdan başka organizmalar tarafından sentezlenen miRNA'lar (eksojen miRNA'lar) olarak basitçe ikiye ayrılabilir. Eksojen miRNA'ların, özelikle bitki ve virüs kökenli olanlar, konuk organizmanın transkriptomunu regüle edebildikleri bilinmektedir (Zhan vd., 2020; Pasculli vd., 2024). Eksojen miRNA kaynakları arasında diyet ile alınan besin kaynaklı miRNA'lar besinsel miRNA'lar olarak tanımlanmaktadır.

Besinsel miRNA'lar, ilk kez Zhang vd. (2012) tarafından bitki kaynaklı miRNA'ların yetişkin insan serumunda keşfetmeleri ile ortaya çıkmıştır. Zhang vd. (2012) tarafından gerçekleştirilmiş olan bu çalışma, literatürde büyük bir ilgi ile karşılanmış ve farklı kaynaklardan köken alan miRNA'ların diğer canlılara geçiş yapabileceklerine dair çalışmalar gerçekleştirilmiştir (**Şekil 2.4**).



Şekil 2.4. Farklı kaynaklardan köken alan besinsel miRNA'lar ve fonksiyonel etkileri (Martino vd., 2024)

Besinsel miRNA'lar hakkında yapılan çalışmalarda, köken olarak farklı bitkisel (pirinç, elma, zencefil, brokoli, ıspanak vb.) ve hayvansal (inek eti, domuz eti, tavuk eti, yumurta, inek sütü vb.) besinler yer almaktadır (bkz. **Şekil 2.4** ve **Çizelge 2.1**).

Çizelge 2.1. Bitkisel ve hayvansal kökenli besinsel miRNA'ların fonksiyonel çalışmaları (Pasculli vd., 2024 ve Tao ve Guo, 2024'den uyarlanmıştır.)

miRNA Kökeni	miRNA	Sonuç	Referans
		In-vivo	
Bitki: Pirinç	miR-168a	Sağlıklı Çinli kadın ve erkeklerin serumlarında ekzojenik miR-168a varlığı gözlemlenmiş. 12 saat sonra pirinçle zenginleştirilmiş diyetle beslenen farelerin serum ve karaciğerlerinde ekzojen miR168a tespit edilmiştir. LDLRAP1 ekspresyonunun, eksojen miR-168a aracılığıyla in-vitro ve in-vivo olarak azaldığı görülmüştür.	Zhang vd., 2012
Bitki: yaygın olarak tüketilen meyve ve sebzeler	miR-168a miR-156a miR-166a miR-172a miR-167a	Farklı beslenme alışkanlıklarına sahip gönüllülerin anne sütünde ekzojen miRNA'ların varlığı gözlemlenmiş. Anne sütünden elde edilen ekzozom fraksiyonunda miR-156a ve miR-168a fazlaca bulunduğu görülmüştür.	Lukasik vd., 2017
Bitki: meyve karışımı ve karpuz suyu	miR-156a miR-177a miİR-162a miR-390a miR-168a	Meyve karışımı veya karpuz suyu tüketiminden 3 saat sonra sağlıklı gönüllülerin serumlarında miRNA'ların en yüksek seviyeye ulaştığı görülmüştür	Liang vd., 2015
Bitki: Arabidopsis thaliana, soya fasulyesi, brokoli	miR-159	miR-159, farklı evrelerdeki meme kanseri hastalarıyla karşılaştırıldığında sağlıklı kadınların serumlarında farklı miktarlarda bulunduğu görülmüştür. miR-159 uygulaması ile ksenograft fare modellerinde in vitro ve in vivo olarak tümör büyümesinde azalma gözlemlenmiştir. Meme kanserinde artan TCF7 ekspresyonunun miR-159 uygulaması sonra azaldığı gözlemlenmiştir	Chin vd., 2015
Bitki: hanımeli	miR-2911	Hanımeli suda kaynatıldığında miR-2911'in stabil kaldığı görülmüştür. İnfluenza A ve SARS-CoV-2 virüslerinin replikasyonunda rol oynayan genler, miR-2911 için hedef olarak öngörülmüştür. miR-2911 uygulamasından sonra Influenza A virüsü enfeksiyonu olan farelerin ölüm oranında azalma gözlemlenmiştir. miR-2911 ek tedavisi sonrası COVID-19 hastalarında negatif dönüşümün teşvik ettiği görülmüştür.	Zhou vd., 2015 Zhou vd., 2020
Hayvan: Bos Taurous	miR-148a	DNMT1'i hedefleyerek epigenetik modifikasyonları düzenlediği görülmüştür. Th17-Trg homeostazisini koruduğu gözlemlenmiştir.	Melnik vd., 2017

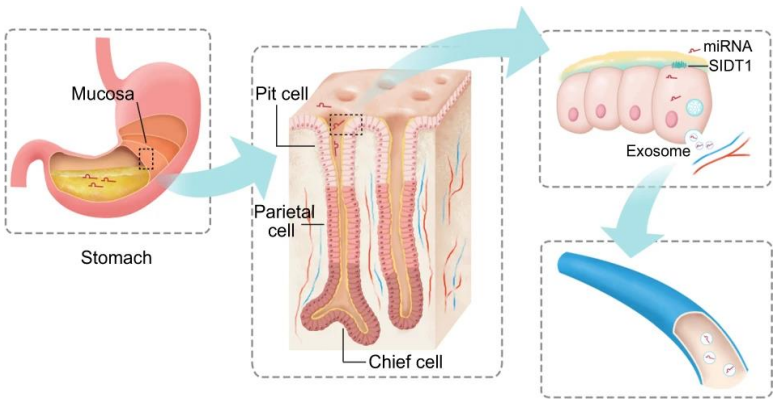
Çizelge 2.1. Bitkisel ve hayvansal kökenli besinsel miRNA'ların fonksiyonel çalışmaları (Pasculli vd., 2024 ve Tao ve Guo, 2024'den uyarlanmıştır.) (Devam)

miRNA Kökeni	miRNA	Sonuç	Referans
Bitki: Çilek, Lahana, Pirinç	miR-148a miR-2911 miR-168 miR-156	Fare ve insanda bitki miRNA'larının *TLR3*'ün ekspresyonunu düzenkleyerek inflamasyon cevabını bastırdığı görülmüştür.	Cavalieri vd., 2016
Bitki: yeşil sebzeler (lahana, ıspanak ve marul)	miR-156a	miR-156a, sağlıklı donörlerin ve kardiyovasküler hastalık (KVD) hastalarının serumlarında farklı miktarda bulunduğu görülmüştür. Gap junction JAM-A'nın miR-156a için bir hedef olarak tanımlanmıştır. miR-156a transfeksiyonu yoluyla in-vitro aterosklerotik plak oluşumunda azalma olduğu görülmüştür.	Hou vd., 2018
Bitki: Kuruyemiş	miR-159a miR-156c	Fare'de uygulama sonrası inflamasyonda azalma ve glukoz alımında artma olduğu görülmüştür.	Aquilano vd., 2019
Hayvan: Tavuk ve Domuz	miR-451	miR-451'in Foxo3'ü regüle ederek eritrositleri oksidatif stresten koruduğu raporlanmıştır. Yabanıl tip farelerin kanı nakavt farelere içirildiğinde miR-451'in dolaşıma geçtiği görülmüştür. miR-451 üretemeyen nakavt farelere çiğ ve pişirilmiş domuz ve tavuk kanı içirildiğinde miR-451'in dolaşıma geçtiği görülmüştür.	Wang vd., 2017
Bitki: hanımeli	miR-2911	Hanımeli çayında bol miktarda miR-2911 olduğu ve 3 saat kaynatma durumunda bile anlamlı bir azalma olmadığı raporlanmıştır. Hanımeli çayı verilen farelerde kolon kanseri boyutunda küçülme olduğu ve sağ kalımın arttığı görülmüştür. miR-2911'in TGF-β 1'i hedefleterek T lenfosit farklılaşmasını arttırdığı görülmüştür.	Liu vd., 2021
Bitki: Soya fasülyesi	miR-159a	GSK-3β'yı regüle ederek karaciğer fibrozlanmasını azlattığı görülmüştür.	Yu vd., 2021
		İn-vitro	
Bitki: Moringa oleifera	miR-858b	HIV ile enfekte olmuş PBMC'lerin canlılığı, VAV1'in aşağı regüle olması ile azaldığı görülmüştür. miR-858b transfeksiyonu sonrası CD4 T hücresi aktivasyonu ve farklılaşmasında azalma gözlemlenmiştir.	Minutolo vd., 2020
Bitki: Moringa oleifera	mikrovezikül kaynaklı miRNA'lar	Mol-miRNA'ların tümör hücre hatlarında apoptozu teşvik edici rolü olduğu görülmüştür. B-hücreli lenfoma 2 (BCL-2) geninin ekzojen miRNA'lar için hedef olduğu öngörülmüştür. BCL-2 ekspresyonunun azalması mitokondriyal membranda değişiklik ve mol-miRNA transfeksiyonu sonrası apoptozda artış gözlemlenmiştir.	Potestà vd., 2020
Bitki: Moringa oleifera, soya fasulyesi, buğday, mısır	miR-167e-5p	miR-167e-5p aracılığıyla bağırsak hücre hatlarının proliferasyonunun azaldığı görülmüştür. miR-167e-5p bağlanmasıyla β-katenin ekspresyonunun azaldığı gözlemlenmiştir.	Li vd., 2019

Çizelge 2.1. Bitkisel ve hayvansal kökenli besinsel miRNA'ların fonksiyonel çalışmaları (Pasculli vd., 2024 ve Tao ve Guo, 2024'den uyarlanmıştır.) (Devam)

miRNA Kökeni	miRNA	Sonuç	Referans
Bitki: Olea europaea	miR-27 miR-34	O.europaea miRNA'larının in silico tanımlanmış ve hsa-miR-34a-5p ile benzer olduğu görülmüştür oeu-miRNA'lar ve has-miR-34a-5p hedef anotasyonu yapılmıştır. İnsan hücre hatlarında oeu-miRNA'ların tümör oluşumundaki rolü gösterilmiştir.	Minutolo vd., 2018
Bitki: Soya fasülyesi	miR-4995	İnsan hücre hattında miR-4995'in MALAT1 ve NEAT1'in ekspresyonunu regüle ederek kanser hücrelerinin farklılaşmasını düşürdüğü gözlemlenmiştir.	Marzano vd., 2020
Bitki: Hanımeli	miR-2911	İnsan hücre hattlarında Varicella-zoster virüsü (Suçiçeği) replikasyonunu engelleği görülmüştür.	Huang vd., 2019
Bitki: Hanımeli	miR-2911	İnsan hücre hattlarında Enterovirüs 71 (El ayak ağız hastalığı) replikasyonunu engelleği görülmüştür.	Li vd., 2018

Uzun süre oral yol ile alınan miRNA'ların, mide pH'sı, ortamda bulunan enzimler vb. sebepler ile degrade olup biyoyararlanımının çok düşük olacağı düşünülmüştür (Tao ve Guo, 2024). Yapılan çalışmalar ile miRNA'ların sindirim sürecinden işlevsel bir şekilde çıkabildiği görülmüştür. Besinsel miRNA'lar, sindirim sırasında ağırlıklı olarak mide epitelindeki çukur hücrelerinde bulunan SID-1 transmembrane family member 1 (SIDT1) tarafından dolaşıma alınmaktadır (**Şekil 2.5**). SIDT1'in çalışmasında ortamın pH'sının büyük bir önemi bulunmaktadır (Chen vd., 2021).



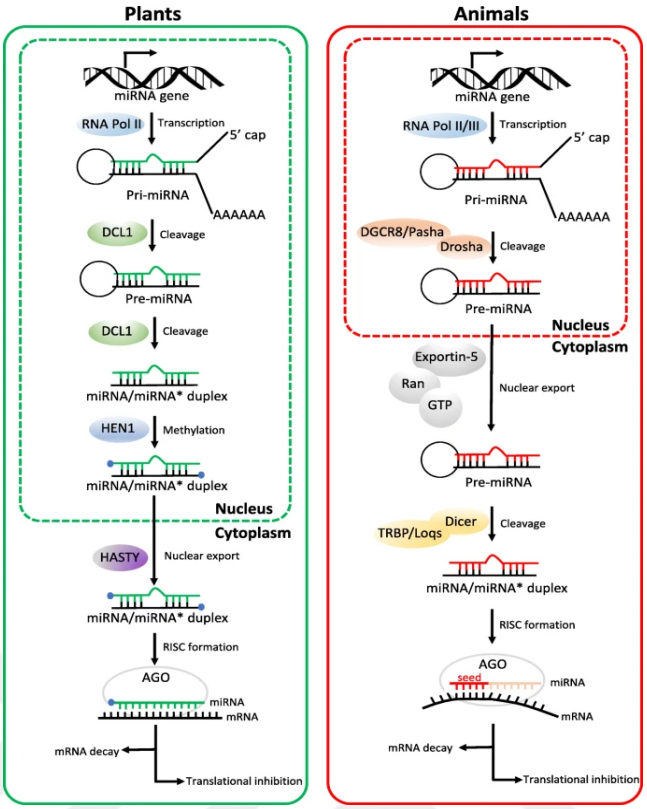
Şekil 2.5. Besinsel miRNA'ların mideden dolaşıma transferi (Chen vd., 2021)

SIDT1, çift zincirli RNA moleküllerinin, hücre dışı ortamdan sitoplazmaya taşınmasında görev alan önemli bir membran proteinidir (Chen vd., 2021). SIDT1 nakavt farelerde yapılan çalışmalarda, SIDT1 açısından normal farelere kıyasla nakavt farelerde çok daha

düşük seviyelerde besin kaynaklı miRNA'nın dolaşıma geçtiği görülmüştür (Chen vd., 2021).

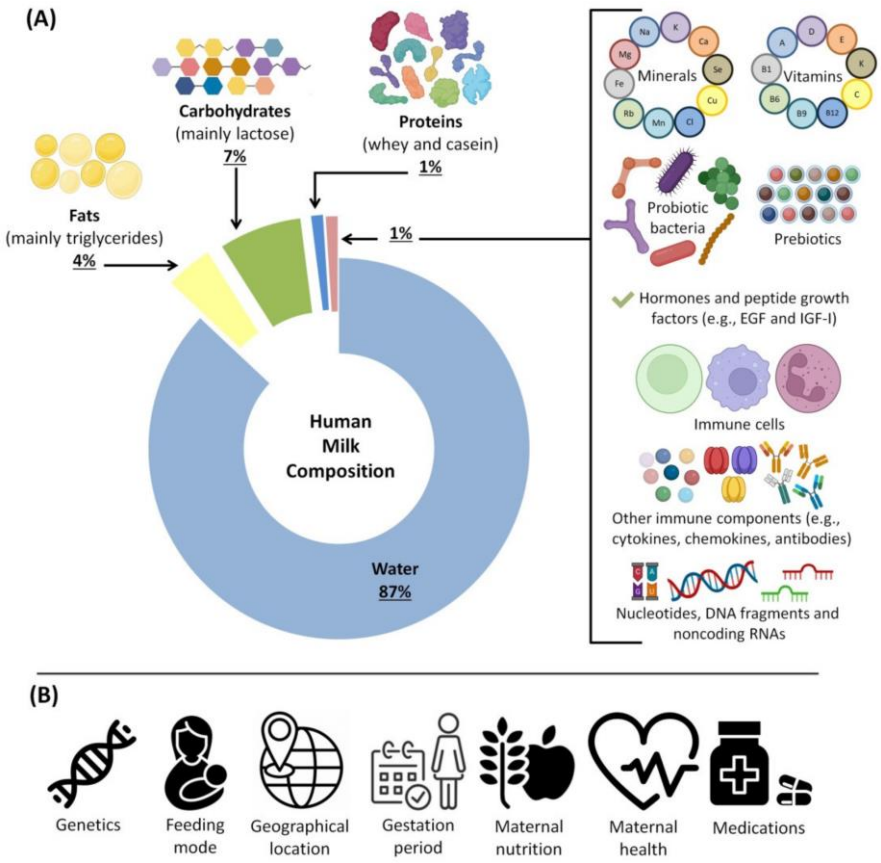
miRNA'lar, düşük ve yüksek pH durumlarında, diğer RNA moleküllerine göre çok daha stabillerdir. Yapılan çalışmalar miRNA'ların düşük veya yüksek pH'da oluşan degredasyonun miRNA'ya özgü olduğunu göstermiştir (Chen vd., 2008). Chen vd. (2008) tarafından gerçekleştirilen çalışmada, insan serumundan izole edilmiş olan RNA örnekleri on kez dondur çöz döngüsü, DNaz I uygulaması (3 saat ve bir gece), düşük pH ve yüksek pH ortamlarında, RT-qPCR metodu ile tespit edilebilir miktarda kaldıkları görülmüştür. Gerçekleştirilen başka çalışmalarda ise farklı işlemler uygulanan (Homojenizasyon, kaynatma, pastörizasyon, UHT vb.) süt örneklerinden izole edilmiş RNA örneklerinde, farklı miRNA'ların stabil kaldıkları görülmüştür (Bağcı ve Pirim, 2024; Pirim vd., 2025).

Bitki ve hayvanlarda miRNA biyogenezi ve fonksiyonu arasında bazı önemli farklar bulunmaktadır (**Şekil 2.6**). Sürecin ilk adımı olan pri-miRNA'nın sentezlenmesi, iki alemde de benzer şekilde gerçekleşmektedir (Li vd., 2018). Sentez sonrası pri-miRNA'nın pre-miRNA'ya işlenme sürecinde hayvanlarda Drosha enzimi görev alırken bitkilerde DCL1 enzimi bu görevi üstlenmektedir (Li vd., 2018). pre-miRNA'nın miRNA-miRNA dubleks yapısına dönüşümü, hayvanlarda sitoplazmada gerçekleşirken bitkilerde nükleusta gerçekleşmektedir ve bu işle görevli enzim pre-miRNA'yı oluşturan DCL1'dir. Bitkilerde sentez sonrası HEN1 tarafından dubleks yapı metillenmektedir. Bu metilasyon miRNA'nın stabilitesini artırmaktadır. Hayvanlarda, pre-miRNA nükleustan sitoplazmaya EXO5 tarafından taşınmaktadır. Bitkilerde ise miRNA-miRNA dubleks yapısı, HASTY tarafından sitoplazmaya taşınmaktadır (Li vd., 2018).



Şekil 2.6. Bitki ve hayvanlar aleminde miRNA biyogenez süreçleri (Li vd., 2018)

Literatürde insanda en iyi çalışılmış eksojen miRNA kaynağı anne sütüdür (Melnik vd., 2021; Hatmal vd., 2022; Xu vd., 2024). Anne sütü %87 su, %4 yağ, %7 karbonhidratlar, %1 proteinler ve %1 diğer organik ve inorganik moleküllerden oluşmaktadır (**Şekil 2.7 A**). Anne sütünün içeriği genetik, coğrafi konum, anneni sağlığı, tüketilen besinler gibi faktörler sebebiyle değişim gösterebilmektedir (**Şekil 2.7 B**).



Şekil 2.7. Anne sütünün içeriğinde bulunan moleküller (A) ve bu moleküllerin dağılımında rol oynayan faktörler (B) (Hatmal vd., 2022)

Anne sütü miRNA içeriği açısından diğer biyolojik sıvılara kıyasla çok daha zengindir (Xu vd., 2024). İçerisindeki miRNA'ların lipid metabolizması, glikoz metabolizması, bağırsak olgunlaşması, nörogenez ve bağışıklık gibi önemli süreçlerde görevleri olduğu bilinmektedir (**Çizelge 2.2**).

Çizelge 2.2. Anne sütünde bol bulunan miRNA'lar ve fonksiyonel önemleri (Leroux vd., 2021'den uyarlanmıştır.)

Fonksiyon	miRNA'lar	Gözlemler	Referans
Lipid metabolizması	let-7f-5p, miR-148a-3p, miR-148a-5p, miR-22-3p	AGPAT6, insan sütü miRNA'ları tarafından düzenlendiği görülmüştür. AGPAT6, triaçilgliserol ve uzun zincirli açil-CoA sentezi üzerinde etkili önemli bir enzimdir.	Alsaweed vd., 2016
	let-7f-5p	FADS2'yi modüle ederek oleik asit biyosentezinde rol alır.	Alsaweed vd., 2016
	miR-33	miR-33a ve miR-33b, SREBF geninin intronunda bulunana intronik miRNA'lardır. miR-33a ve miR-33b, lipid metabolizmasını konak genlerle birlikte düzenler.	Goedeke vd., 2013
	miR-26a	İnsülin duyarlılığını ve lipid metabolizmasını düzenler.	Fu vd., 2015
Glikoz metabolizması	miR-30a-5p	THEM4'ü kontrol ederek yağ asitlerinin fosforilasyonunu ve sentezini regüle eder.	Alsaweed vd., 2016
	miR-143	Aşırı ekspresyonu insülin aracılı AKT aktivasyonu ve glikoz homeostazını bozar.	Jordan vd., 2011
	miR-33	PCK1 ve G6PC'yi hedefleyerek glikoz metabolizmasını düzenler.	Ramírez vd., 2013
	miR-26a	İnsülin duyarlılığını ve glikoz metabolizmasını düzenler.	Fu vd., 2015
	miR-181b	Endotel fonksiyonunu düzenleyerek glikoz homeostazını ve insülin duyarlılığını artırır.	Sun vd., 2016
Bağırsak olgunlaşması	miR-375, miR-200c	Epitel fonksiyonunu modüle ederek ekzosomal endositozu ve miRNA alımını etkiler.	Alsaweed vd., 2016
	miR-200b	Bağırsak epitel hücrelerinde sıkı bağlantı bozulmasını inhibe eder.	Shen vd., 2017
	miR-21	Bağırsak epitelinde sıkı bağlantı geçirgenliğini düzenler.	Yang vd., 2013
	miR-99b	MFG-E8 gen ifadesini inhibe ederek enterosit migrasyonunu artırır.	Wang vd., 2016
	miR-200 ailesi	Epitel-mezenkimal geçişle bağlantılı epitel durumda kritik öneme sahiptirler.	Pillman vd., 2018
	miR-30 ailesi	Bağırsak epitel hücrelerinin proliferasyonu ve farklılaşmasını kontrol eder.	Peck vd., 2016

Çizelge 2.2. Anne sütünde bol bulunan miRNA'lar ve fonksiyonel önemleri (Leroux vd., 2021'den uyarlanmıştır.) (Devam)

Fonksiyon	miRNA'lar	Gözlemler	Referans
Nörogenez	let-7 ailesi	EC hücrelerinin nöral farklılaşması ile birlikte let-7 öncü molekülün işlenmesinde artışla gerçekleşir.	Wulczyn vd., 2007
	miR-574	Nörogenezi teşvik eder ama nöral progenitör havuzunu azaltır.	Zhang vd., 2014
	miR-15b	Kortikal nöral progenitör hücrelerin çoğalmasını engeller ve hücre döngüsünden çıkışı ve nöronal farklılaşmayı teşvik eder.	Lv vd., 2014
	miR-210	İnhibisyonu, nöronal sağkalımı artırır, inflamasyonu azaltır, proliferasyonu düşürür.	Volobоeva vd., 2017
	miR-29b	Fetal nörogenezde VDAC1'i düzenler.	Roshan vd., 2014
Bağışıklık	miR-223	Granülosit proliferasyonunu aktive eder.	Johnnidis vd., 2008
	miR-146b-5p	Doğuştan gelen bağışıklık yanıtlarının sinyal proteinlerini hedefler.	Taganov vd., 2006
	miR-181a	Monosit ve makrofajlarda inflamasyonu IL-1α'yı baskılayarak düzenler.	Xie vd., 2013
	miR-150	B hücre gelişimini bloke eder.	Zhou vd., 2007
	miR-182-5p	T hücre aracılı bağışıklığı teşvik eder.	Stittrich vd., 2010
	miR-17, miR-92	Monosit gelişimini ve T-B hücre farklılaşmasını düzenler.	Mendell, 2008
	miR-29a-3p	Patojenlere karşı bağışıklığı IFN-γ'yı hedefleyerek baskılar.	Ma vd., 2011
	miR-155	T ve B hücre olgunlaşmasını ve doğuştan gelen bağışıklığı düzenler.	Vigorito vd., 2013

Anne sütü içerisindeki let-7f-5p, miR-148a-3p, miR-148a-5p, miR-22-3p'nin *GPAT4* ekspresyonunu regüle ederek bebekte triaçilgliserol ve uzun zincirli açil-CoA sentezini regüle edebileceği raporlanmıştır (Alsaweed vd., 2016; Leroux vd., 2021). Aynı çalışmada, *FADS2* geninin bilinen miRNA regülatörü olan ve sütte bol miktarda bulunan let-7f-5p'nin, oleik asit sentezini regüle edebileceği gösterilmiştir (Alsaweed vd., 2016; Leroux vd., 2021). Yapılan başka bir çalışmada ise anne sütü içeriğinde bulunan miRNA'ların (miR-7847-3p, miR-4488, miR-3196, miR-423-5p, miR-1249-3p, miR-6090, miR-1908-3p, miR-7847-3p, miR-1249-3p, miR-16-5p, miR-103a-5p, miR-107 and miR-195-5p) farklı nörogelişimsel süreçlerde etkili olabileceği in-siliko metotlar yardımıyla ortaya konmuştur(Freiría-Martínez vd., 2023). Diğer bir çalışmada ise anne

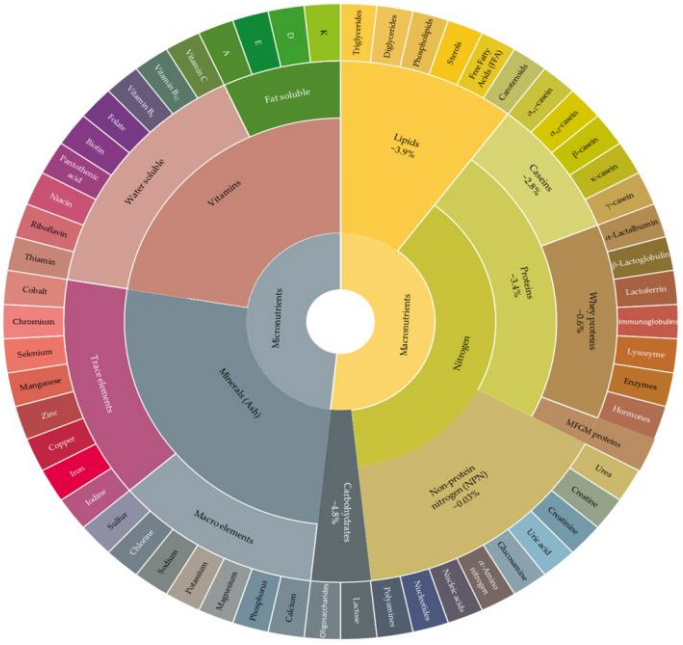
sütünden izole edilen eksozomlar işaretlenerek hücre hattına uygulanmıştır ve uygulama sonrası eksozomların içerisinde bulunan miR-148a-3p'nin ekspresyonun arttığı görülmüştür. miR-148a-3p'nin hedefi olan *DNTM1*'in ise ekspresyonun düştüğü raporlanmıştır (Golan-Gerstl vd., 2017). Çalışma sonucunda anne sütü kaynaklı miRNA-148a'nın, *DNMT1*'i regüle ederek hem *FOXP3* ekspresyonunu hem de bağırsak FOXP3+ Treg hücre farklılaşmasını arttırdığı gösterilmiştir (Melnik vd., 2021).

Eksojen miRNA'ların, insan sağlığı üstündeki etkileri hakkında yapılan bir başka çalışmada ise *Moringa oleifera*'den (Moringa bitkisi) izole edilen miRNA'lar, HepG2 hepatoma hücre hattına uygulanmış ve farelere besleme yoluyla verilmiştir. Düzenli besleme sonrası obez farelerin vücut ağırlığında azalma olduğu raporlanmıştır (Roglia vd., 2022). Chin vd. (2016) gerçekleştirdikleri çalışmada, meme kanseri indüklenmiş farelere, bitki kaynaklı miR-159 beslemesi sonrası tümör dokusunun büyümesinde yavaşlama olduğunu raporlanmışlardır. İnsan meme kanseri hastalarının serumlarındaki ve kanser dokusundaki bitki kaynaklı miR-159 ekspresyonunun, sağlıklı doku ve sağlıklı seruma kıyasla daha yüksek olduğunu göstermişlerdir (Chin vd., 2016). Ayrıca meme kanseri durumunda artan Transkripsiyon Faktör 7 (*TCF7*) ekspresyonunun, bitki kaynaklı miR-159 uygulaması sonrası farelerde ve hücre hattında azaldığı raporlanmıştır (Chin vd., 2016). Gerçekleştirilen başka bir çalışmada ise kolon kanseri modeli oluşturulmuş farelere, hanımeli çayı veya kontrol 8 hafta boyunca her gün içirilmiştir. Hanımeli çayı içen farelerin tümör boyutunun kontrole kıyasla daha düşük olduğu, sağ kalım oranının ise daha yüksek olduğu görülmüştür (Liu vd., 2021). Benzeri sonuçlar hanımeli bitkisinin içinde bolca bulunan miR-2911'în farelere verilmesi sonucunda da gözlemlenmiştir (Liu vd., 2021). Ayrıca hanımeli kaynaklı miR-2911'in influenza ile enfekte farelerde sağkalımı artırdığı, farelerin vücut kütlesinde gerçekleşen azalmayı engellediği ve total virüs miktarını azalttığı raporlanmıştır (Zhou vd., 2015). Bu çalışmada miR-2911'in, influenza virüsünün genomunda bulunana farklı genlerin, RNA ürünlerine bağlanabildiği ve virüs replikasyonunu inhibe ettiği tespit edilmiştir (Zhou vd., 2015). İnek sütü içeriğindeki miRNA'ların insana geçişinin araştırıldığı bir çalışmada, 5 sağlıklı bireye farklı miktarlarda süt içirilerek tüketimden 0, 1, 3, 6, 9 ve 24 saat sonrasında kan örnekleri toplanmıştır (Baier vd., 2014). Alınan kan örneklerinde özellikle 3 saat sonrasında dolaşımdaki miR-29b ve miR200c seviyesinin tepe noktaya ulaştığı raporlanmıştır (Baier

vd., 2014). Alınan örneklerdeki miR-29b'nin hedefi olduğu bilinen *RUNX2* genini ekspresyonu tüketimden 6 saat sonra başlangıca kıyasla %31 oranında yükseldiği raporlanmıştır (Baier vd., 2014).

2.2.1. Süt Kaynaklı miRNA'lar

İnsanlar tarafından süt tüketilmesi, tunç devrinden (3000 M.Ö) itibaren Avrupa ve Asya'da gerçekleştiği düşünülen bir süreçtir (Warinner vd., 2014). Süt, içeriğinde çeşitli makro (yağ, protein ve karbonhidratlar) ve mikro (vitaminler, mineraller) besinler bulunduran yağ ve su içeren bir emülsiyondur (**Şekil 2.8**).



Şekil 2.8. İnek sütünün moleküler içeriği (Alothman vd., 2019)

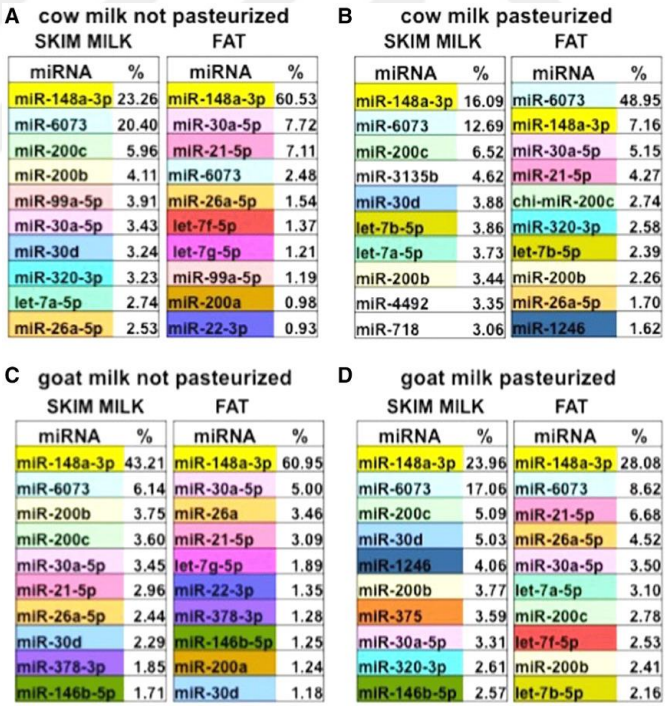
Omurgalıların memeli sınıfına ait canlıların, genellikle dişilerinin (*Dyacopterus spadecius* ve *Pteropus capistrastus* hariç) süt üretme yeteneği bulunur ve sadece bu sınıfa özgüdür (Oftedal vd., 2020; Kunz ve Hosken, 2009). Sütün içeriğinde bulunan bazı proteinler (αs1-, αs2-, β- ve κ-kazeinler, β-laktoglobulin, α-laktalbumin ve peynir altı suyu asidik proteini) yalnızca süt içerisinde bulunmaktadır ve canlılar aleminde başka bir doku veya biyolojik sıvıda rapor/tespit edilmemiştir (Oftedal vd., 2020). Ayrıca farklı

memelilere ait sütlerin, makro/mikro besin profillerinin değişkenlik gösterdiği bilinmektedir (**Çizelge 2.3**).

Çizelge 2.3. Farklı memeli sütlerinin içerikleri (Roy vd., 2020'den uyarlanmıştır.)

Özellikler	Geviş Getiren					Geviş Getirmeyen			İnsan
	İnek	Manda	Keçi	Koyun	Kızıl geyik	Deve	At	Eşek	
Toplam katı madde	11.8–13.0	15.7–17.2	11.9–16.3	18.1–20.0	20.0–30.5	11.9–15.0	9.3–11.6	8.8–11.7	10.7–12.9
Protein	3.0–3.9	2.7–4.7	3.0–5.2	4.5–7.0	5.9–10.6	2.4–4.2	1.4–3.2	1.4–2.0	0.9–1.9
Yağ	3.3–5.4	5.3–9.0	3.0–7.2	5.0–9.0	6.6–19.7	2.0–6.0	0.3–4.2	0.3–1.8	2.1–4.0
Laktoz	4.4–5.6	3.2–4.9	3.2–5.0	4.1–5.9	2.6–6.2	3.5–5.1	5.6–7.2	5.8–7.4	6.3–7.0
Kül	0.7–0.8	0.8–0.9	0.7–0.9	0.8–1.0	1.04–1.18	0.69–0.9	0.3–0.5	0.3–0.5	0.2–0.3
Oligosakkaritler	0.003–0.006	Veri yok	0.025–0.030	0.002–0.004	Veri yok	Veri yok	Veri yok	Veri yok	0.500–0.800

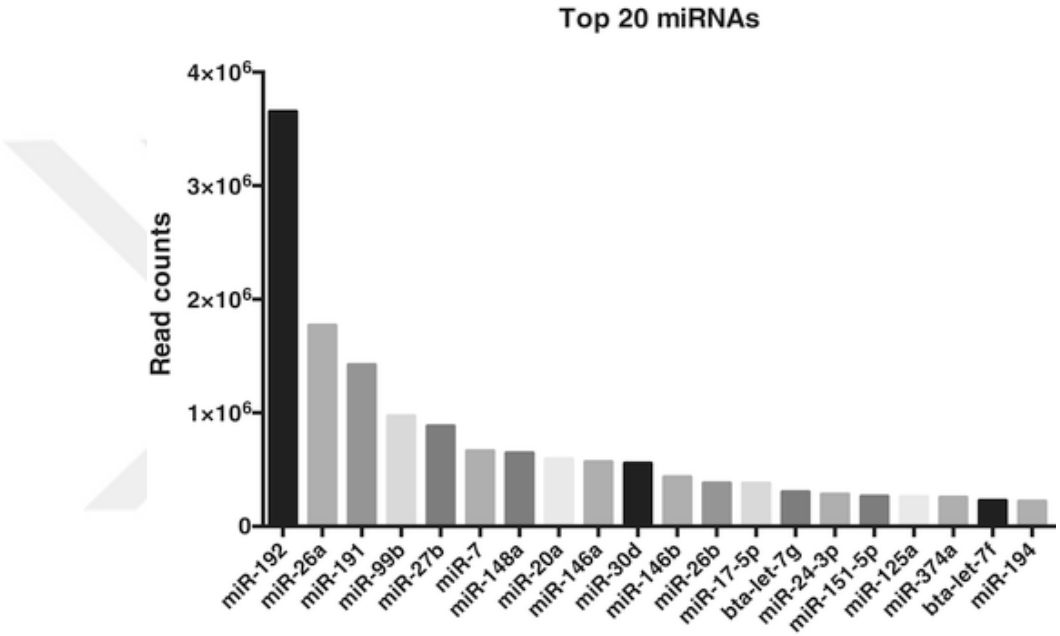
Süt, zengin makro/mikro besin içeriği haricinde, çok sayıda kodlama yapmayan RNA moleküllerini de içermektedir. Bu kodlama yapmayan RNA molekülleri arasında miRNA'lar da yer almaktadır. Farklı memeli sütlerinin miRNA profili farklılık göstermektedir (**Şekil 2.9**).



Şekil 2.9. Çiğ ve pastörize inek ve keçi sütünün farklı fraksiyonlarının miRNA profilleri (Golan-Gerstl vd., 2017)

Literatürde yapılan çalışmalarda, süt içeriğindeki çeşitli miRNA'ların farklı işlemler ve ortamlarda stabil kalabildikleri görülmüştür. Yapılan çalışmalarda, bta-miR-191'in

kaynatma, pastörizasyon ve düşük pH uygulamaları sonrasında da stabil kaldığı görülmüştür (Bağcı ve Pirim, 2024). Ayrıca bta-miR-21 ve bta-miR-125b'nin homojenizasyon, 85C° ve 95C° derecede pastörizasyon ve UHT uygulaması sonrasında da stabil kaldığı rapor edilmiştir (Pirim vd., 2025). Pastörizasyon, UHT uygulaması sonrası süt içeriğinde bulunan miRNA miktarı azalsa da miRNA'ların büyük bir kısmı stabil kalmıştır (Zhang vd., 2022). Bu azalmalar sonrası, sütte en çok bulunan miRNA'lar arasında miR-192, miR-26a ve miR-191 ilk üçte bulunmaktadır (**Şekil 2.10**).

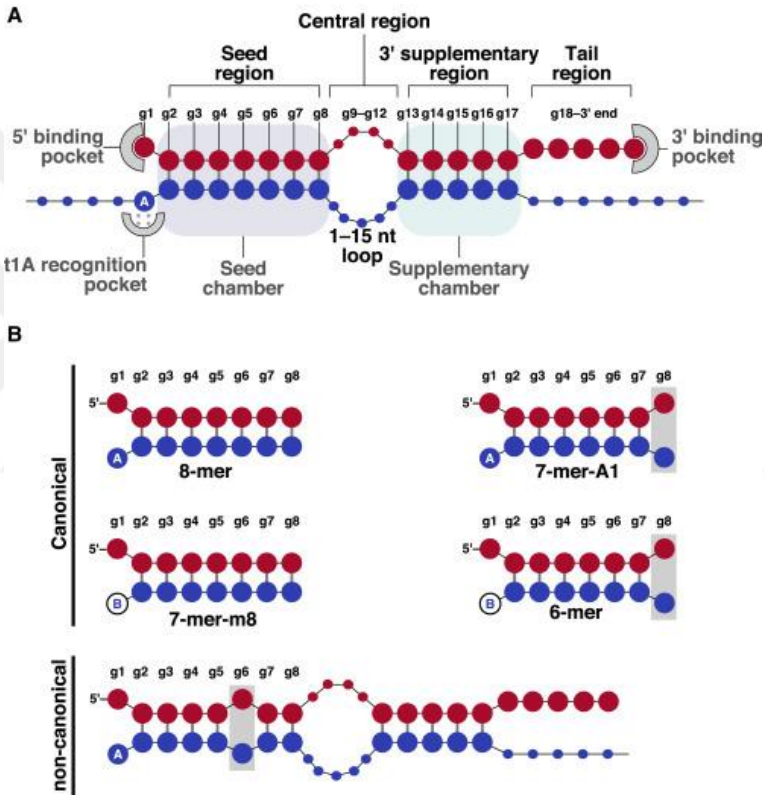


Şekil 2.10. Çiğ, pastörize ve ultra yüksek sıcaklıkta işlenmiş sütte en bol bulunan 20 miRNA (Zhang vd., 2022)

Süt içeriğindeki miRNA'ların stabilitesini, miRNA'ların yüksek çoğunluğunun eksozom ismi verilen ekstraselüler veziküllerinin içerisinde bulunmasından kaynaklanmaktadır. Eksozomlar, küçük boyutları (40–120 nm) ve kütleleri sayesinde dolaşıma karışarak hücrelere içerisinde taşımakta olduğu farklı RNA moleküllerini (mRNA, ncRNA'lar [miRNA, halkasal RNA, uzun kodlama yapmayan RNA'lar vb.]) ve proteinlerini aktarabilmektedir (Melnik ve Schmitz, 2019).

2.3. miRNA'ların Gen Ekspresyonu Üzerine Etkileri

miRISC kompleksi, içinde bulunana olgun miRNA ve mRNA moleküllerinin 3’ ve 5’ UTR bölgelerindeki komplementer dizilere bağlanarak regülasyonu sağlar. Gerçekleşen bu bağlanma hayvanlar alemindeki canlılar için birçok farklı (8-mer, 7-mer-A1, 7-mer-m8, 6-mer, offset 6-mer vb.) yolla gerçekleşebilir. Olgun miRNA’nın, miRISC kompleksinde görev alan dört domain (tohum, merkezi, 3’ yardımcı ve kuyruk bölgeleri) bulunmaktadır (**Şekil 2.11 A**).



Şekil 2.11. Olgun miRNA’nın yapısı (A) ve bağlanma bölgeleri (B) (Iwakawa ve Tomari, 2022)

Bu domainlerden ilki 5’ 2. ve 8. nükleotidi (g2-g8) kapsayan tohum (seed) bölgesidir (Iwakawa ve Tomari, 2022). Tohum bölgesinden sonra merkez bölgesi gelmektedir (g9-g12) ve bu bölge, yolcu zincirin ve hedef RNA molekülünün parçalanması için önemlidir. Merkez bölgesinden sonra (g13-g17) ise hedefe bağlanmayı stabilize eden 3’ yardımcı bölge gelmektedir. Son olarak ise g18-3’ sonu kapsayan ve hedefin turnover süresini, ek yapıların komplekse bağlanmasını etkileyen kuyruk bölgesi yer almaktadır (Iwakawa ve

Tomari, 2022). miRISC kompleksinin hedefe bağlanması, tohum bölgesinin çözücüye erişebilir A-formdan heliks forma geçişi ile başlar. Bu formda, kompleksin bağlanma verimliliği çok daha yüksektir (Chandradoss vd., 2015; Salomon vd., 2015). Sonrasında, g2–g5'de bulunan baz eşleşmesi, insan AGO2 proteinindeki Helix-7'nin hareketini tetikler ve baz çiftlerinin g-8'e uzamasını sağlar. Bu da 3' yardımcı bölgesinin (g13–g17) konumunu değiştirerek A-form'a yakın bir yapıya geçmesini sağlar (Schirle vd., 2014). Bu bağlanmanın en yüksek afinitede gerçekleşmesi için g2-g8'in tam komplementer olması ve t1 bölgesinde adenin nükleotidinin bulunması gerekmektedir (bkz. **Şekil 2.11 A**). G2-g8 arası tam komplement bağlanma ve t1 bölgesinde adenin olması durumunda oluşan bağlanma bölgesi, 8-mer bölgesi olarak adlandırılmaktadır (**Şekil 2.11 B**).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Deney hayvanları

3.1.1. Süt Numunelerinin Hazırlanması ve fare besleme protokolü

Fare besleme deneyleri için gerekli çiğ süt örnekleri, Bursa Uludağ Üniversitesi Hayvan Çiftliğinden elde edilmiştir. Çiftlikten alınan 100 ml süt, Tremonte vd. (2014) protokolüne uygun olarak kaynatılmıştır. Protokolde belirtildiği üzere düşük hızda, manyetik karıştırıcı ile süt köpük oluşumu gözlemlenene kadar (~30 dakika, 100°C) ısıtılmıştır (**Şekil 3.1**). Süt örneklerinin hazırlanması sonrası fare besleme çalışmalarına kadar +4 C°'de, 15 ml'lik falkon tüplerde saklanmıştır.



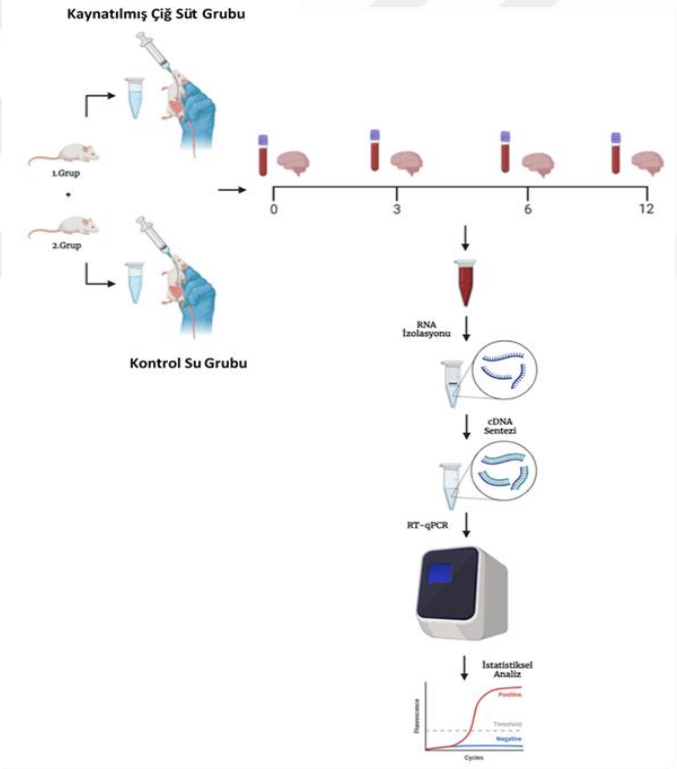
Şekil 3.1. Kaynatılmış çiğ sütün hazırlanması

Fare besleme deneyleri, Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Deney Hayvanları Yetiştirme ve Araştırma Biriminde gerçekleştirilmiştir. Hayvan deneyleri için Bursa Uludağ Üniversitesi Yerel Hayvan Deneyleri Etik Kurulundan (Etik kurul karar numarası= 2024-08/05) onay alınmıştır. İlgili birimden 32 adet dişi BALB/c fare teslim alınmıştır. fareler süt ve su besleme çalışmaları için 2 gruba ayrılmıştır. Süt ve su besleme çalışmaları 4 saat diliminde (0. saat, 3. saat, 6. saat ve 12. saat) 18 gauge'lik yuvarlak uçlu plastik gavaj iğnesi yardımıyla farelere 10 ml/kg olacak şekilde besleme işlemi gerçekleştirilmiştir. (**Şekil 3.2**).



Şekil 3.2. Farelere su/süt beslemesi ve gruplandırma

Tez çalışmasının genel iş akışı **Şekil 3.3**'te verilmiştir.



Şekil 3.3. Tez çalışmasının iş akışı

3.1.2. Kan ve Doku Örneklerinin Toplanması

Besleme işlemlerinden sonra belirlenmiş olan zaman aralıklarında (0. saat, 3. saat, 6. saat ve 12. saat) her gruptan 4 fare sevofluran yardımıyla uyutulmuştur. Uyutulan farelerden

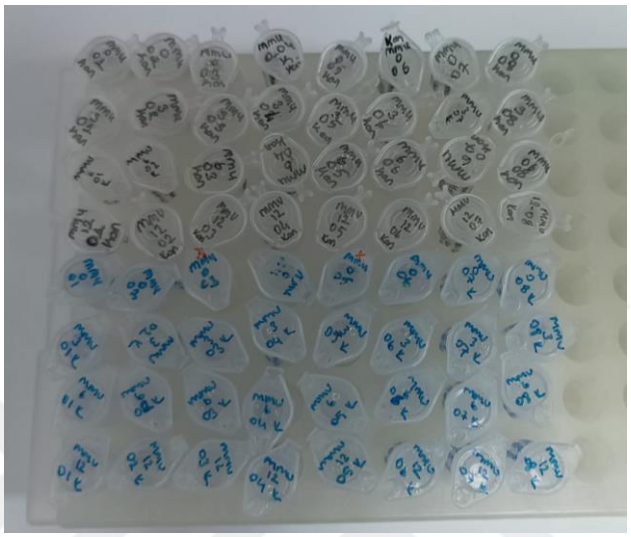
kardiyak punksiyon yöntemi ile EDTA'lı kan tüplerine yaklaşık 2 ml kan alımı gerçekleştirilmiştir. Kan örnekleri tüplere aktarıldıktan sonra tüpler 2-3 defa alt üst edilerek karıştırılmış ve -20 C°'ye kaldırılmıştır.

Kan alımı gerçekleştikten ve farenin kalp atışı durduktan sonra hızlıca farenin kranial kemiği, kranial sütürler boyunca kesi yapılarak açılmıştır. Ardından kranial segmentler, küt uçlu cerrahi makas yardımıyla kaldırılmış ve beyin, çevresindeki bağ dokudan nazikçe ayrılmıştır. Beynin ayrılması sonrası soğuk izotonik serum ile yıkanıp doku üzerindeki kan ve kıllar uzaklaştırılmıştır. Temizlenmiş beyin, yaklaşık 400 µl RNAprotect Tissue Reagent (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) içeren 15 ml'lik falkon tüplere aktarılmıştır. Elde edilen örnekler, kit protokolünde belirtildiği üzere +4 C°'de, 24 saat bekletildikten sonra ileri işlemlere kadar -20 C°'de saklanmıştır.

3.2. Biyolojik Materyallerden RNA izolasyonu

Kan örneklerinden total RNA izolasyonu, miRNeasy Serum/Plazma Advance kiti (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kit protokolü üretici firmanın belirttiği üzere gerçekleştirilmiştir. Başlangıç materyali olarak 200 µl fare kanının üstüne 60 µl RPL buffer eklenip 3 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Ardından örneğin üstüne 20 µL RPP buffer eklenip vortekslendikten sonra tekrardan 3 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Sonrasında örnekler 12000 g'de 3 dakika santrifüjlenmiş ve süpernatant yeni mikrosantrifüj tüpüne alınmıştır. Yeni tüpteki örneğin üzerine, örnek hacmi kadar izopropanol eklenmiş ve vortekslenmiştir. Sonrasıda örnekler, RNeasy UCP MinElute kolonuna aktarılmış ve 8000 g'de 15 saniye santrifüjlenmiştir. Toplama tüpü boşaltılmış ve yıkama aşamalarına geçilmiştir. Önce 700 µL Buffer RWT ile sonra 500 µL Buffer RPE ile yıkama gerçekleştirilmiştir. Yıkamalar sonrası, %80'lik etanol kolonlara eklenmiş ve 8000 g de 2 dakika santrifüjlenmiştir. Sonrasında kolona, 20 µL RNase-DNase Free su eklenmiş ve örnekler elüe edilmiştir. İzolasyon sonrası örneklere, DNA-free DNA Removal Kit (Invitrogen; Thermo Fisher, Darmstadt, Almanya) kullanılarak gDNA temizleme işlemi gerçekleştirilmiştir. gDNA parçalama işlemi için 10 µL RNA örneğinin içine 1 µL rDNase I ve DNase I Buffer eklenmiştir. Sonrasında 37C°'de, 30 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası reaksiyon içine 2 µL DNase İnaktivasyon reaktifi eklenmiş ve 2 dakika oda sıcaklığında sık sık

vorteksleyerek inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası 10000 g'de 1,5 dakika santifüjlenmiştir. Santrifüjleme sonrası dibe çöken DNase inaktivasyon reaktifi kaldırılmadan süpernatant yeni bir 1.5 ml mikrosantrifüj tüpüne aktarılmıştır. Sonrasında örnekler, ileri işlemlere kadar -50 C°'de saklanmıştır **(Şekil 3.4)**.



Şekil 3.4. Çalışmada kullanılan RNA örnekleri

Fare beyin dokusu örneklerinden RNA izolasyonu, miRNeasy Tissue/Cells Advanced Mini (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) kiti kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İşlem öncesi beyin örnekleri, RNAprotect Tissue Reagent (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) solüsyonunda steril pipet uçları yardımıyla çıkarılmış ve solüsyonun fazlası peçete ile silinerek steril 2 ml mikrosantrifüj tüplerine aktarılmıştır. Beyin dokusunun tamamı, 450 µL Buffer RLT içerisinde Tissuelyser II (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) cihazında, 5 dakika boyunca 25 Hz'de, 3 mm boyutunda tungsten karbür boncuklar kullanılarak homojenizasyon gerçekleştirilmiştir. Homojenizasyon sonrası örnekler -20C°'de saklanmıştır. -20C°'den çıkarılan örnekler, 37 C° ısı bloğunda tamamen çözülene kadar inkübe edilmiştir. Homojenize lizat örneklerinden 25 mg tartılarak üstüne 450 µL Buffer RLT eklenmiş ve iyi bir şekilde vortekslenmiştir. Ardından lizat örnekleri maks hızda (15000 g), 3 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüjleme sonrası örnekler yeni tüplere aktarılıp 140 µL Buffer AL eklenmiş ve oda sıcaklığında 3 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası örnekler, gDNA Eliminator kolonlarına aktarılmış ve 8000 g'de 30 saniye santrifüjlenmiştir. Toplama tüpüne geçen örnek, yeni bir 2 ml mikrosantrifüj

tüpüne aktarılmış ve 20 µL Buffer RPP eklenmiş ve oda sıcaklığında 3 dakika inkübe edilmiştir. Sonrasında örnekler 12000 g'de, 3 dakika santrifüjlenmiş ve süpernatant yeni mikrosantrifüj tüpüne alınmıştır. Yeni tüpteki örneğin üzerine, örnek hacmi kadar izopropanol eklenmiş ve vortekslenmiştir. Sonrasıda örnekler, RNeasy UCP MinElute kolonuna aktarılmış ve 8000 g'de, 15 saniye santrifüjlenmiştir. Toplama tüpü boşaltılmış ve yıkama aşamalarına geçilmiştir. Önce 700 µL Buffer RWT ile sonra 500 µL Buffer RPE ile yıkama gerçekleştirilmiştir. Yıkamalar sonrası %80'lik etanol kolonlara eklenmiş ve 8000 g de 2 dakika santrifüjlenmiştir. Sonrasında kolona 30 µL RNase-DNase Free su eklenmiş ve örnekler elüe edilmiştir.

İzole edilen RNA örneklerinin spektrofotometrik analizleri (OD260/280, OD260/230 ve konsantrasyon değerleri) Nanodrop 2000 Spektrofotometre (Thermofisher Scientific, Darmstadt, Germany) cihazı ile gerçekleştirildi. Ayrıca, RNA örnekelerin konsantrasyonları florometrik yöntemle Qubit 4.0 (Thermo Fisher, Darmstadt, Almanya) cihazında, Qubit Broad Range RNA assay kullanılarak ölçülmüştür. Ölçüm sonrası örnekler ileri işlemlere kadar -50 C°'de saklanmıştır.

3.3. RT-qPCR yöntemi ile mikroRNA ekspresyon analizi

Beyin ve kan örneklerinden elde edilen total RNA örnekleri ile miRCURY LNA RT (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) kit kullanılarak cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. cDNA sentezi, **Çizelge 3.1** ve **3.2**'de verilen şartlarda SimpliAmp Thermal Cycler (Thermo Fisher, Darmstadt, Almanya) cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. cDNA sentezi sonrası elde edilen cDNA örnekleri -20C°'de saklanmıştır.

Çizelge 3.1. miRNA analizleri için cDNA sentezi için gerçekleştirilen şartlar

Adım	Süre	Sıcaklık
Ters Transkripsyon	60 dk	42°C
İnaktivasyon	5dk	95°C
Bekleme	Sonsuz	4°C

Çizelge 3.2. miRNA analizleri için cDNA sentezi için kullanılan reaktifler ve miktarları

Reaktif	Miktar
5× miRCURY RT Reaction Buffer	2 µL
Su	5 µL
10x miRCURY RT Enzyme Mix	1 µL
Template RNA (5 ng/µl)	2 µL
Total Volüm	10 µL

miRNA ekspresyonlarının örneklerde belirlenmesi miRCURY LNA SYBR Green PCR kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) ve miRCURY LNA PCR assay'leri (hsa-miR-191-5p ve snRNA U6) kullanılarak RotorGene-Q cihazında (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) **Çizelge 3.3** ve **Çizelge 3.4**'te belirtilen şartlarda gerçekleştirilmiştir. Tez çalışmasında seçilen miR-191-5p, insan, inek ve farede %100 sekans homoloji göstermektedir. miR-191-5p'nin sekansı **Çizelge 3.5**'te verilmiştir.

Çizelge 3.3. miRNA ekspresyon analizleri için kullanılan RT-qPCR şartları

Adım	Süre	Sıcaklık	Siklus
Aktivasyon	2 dk	95°C	
2-adımlı Döngü			
Denaturation	5 sn	95°C	40
Combined annealing/extension	60 sn	56°C	
Melting curve analysis		60–95°C	1

Çizelge 3.4. miRNA ekspresyon analizleri için kullanılan reaktifler ve miktarları

Reaktifler	Miktar
2x miRCURY SYBR Green Master Mix	5 µL
Primer Assay	1 µL
cDNA	3 µL
Su	1 µL
Total Volüm	10 µL

Çizelge 3.5. miR-191-5p'nin fare, inek ve insandaki sekansları

miRNA Adı	miRBASE Accession ID	Sekans
mmu-miR-191-5p	MIMAT0000221	CAACGGAAUCCCAAAAGCAGCUG
hsa-miR-191-5p	MIMAT0000440	CAACGGAAUCCCAAAAGCAGCUG
bta-miR-191	MI0005034	CAACGGAAUCCCAAAAGCAGCUG

3.4. RT-qPCR Yöntemi ile Hedef Genlerin Ekspresyon Analizi

Hedef gen ekspresyon analizlerinde kullanılmak üzere beyin ve kan örneklerinden elde edilen Total RNA örnekleri, RevertAid First Strand cDNA Synthesis (Thermo Fisher, Darmstadt, Almanya) kiti kullanılarak cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. cDNA sentezi, **Çizelge 3.6**'da belirtilen reaktiflerin 0,2 mL'lik PCR tüplerinde karıştırılmasının ardından, 25 °C'de 5 dakika, 42 °C'de, 60 dakika inkübasyon ve son olarak 70 °C'de, 5 dakikalık enzim inaktivasyonu ile SimpliAmp Thermal Cycler (Thermo Fisher, Darmstadt, Almanya) cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. cDNA sentezi sonrası elde edilen cDNA örnekleri -20C°'de saklanmıştır.

Çizelge 3.6. Hedef gen ekspresyonu için cDNA sentez şartları

Reaktif	**Miktar**
RNA	2 µL
Primer (Random Hexamer)	1 µL
Su	9 µL
5X Reaction Buffer	4 µL
RiboLock RNase Inhibitor (20 U/µL)	1 µL
10 mM dNTP Mix	2 µL
RevertAid M-MuLV RT (200 U/µL)	1 µL
Toplam	20 µL

Hedef genlerin kan ve beyin dokusundaki ekspresyonlarının belirlenmesi için QuantiNova SYBR Green Master mix ve **Çizelge 3.7**'de verilmiş olan gen ekspresyon primerleri kullanılmıştır. Primerlerinin *in-siliko* kontrolleri, NCBI Blast (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/doc/blast-help/references.html#references) ve UCSC *in-silico* PCR araçları kullanılarak test edilmiştir. Fare beyin dokusunda *Bdnf, Setd1b* ve *Actb* genlerinin ekspresyonları incelenmiştir. Fare beyin örnekleri için optimize qPCR şartları **Çizelge 3.8** ve **Çizelge 3.9**'da verilmiştir .

Çizelge 3.7. Hedef gen ekspresyonu için kullanılan primerlerin sekansları

Gen	**İleri Primer**	**Geri Primer**
Actb	GATTACTGCTCTGGCTCCTAGC	GACTCATCGTACTCCTGCTTGC
Setd1b	TCCTCAAGCTCCGACAAGGAT	CGTCGATGTCTGAATCAATCTGG
Bdnf	TCATACTTCGGTTGCATGAAGG	AGACCTCTCGAACCTGCCC

Çizelge 3.8. Hedef gen ekspresyon analizleri için kullanılan reaktifler ve miktarları

Reaktifler	Miktar
2x QuantiNova SYBR Green Master Mix	5 µL
İleri Primer	0,7 µL
Geri Primer	0,7 µL
cDNA	1 µL
Su	2.6 µL
Total Volüm	10 µL

Çizelge 3.9. Hedef gen ekspresyon analizleri için kullanılan RT-qPCR şartları

Adım	Süre	Sıcaklık	Siklus
Aktivasyon	2 dk	95°C	
2-adımlı Döngü			
Denaturation	5 sn	95°C	40
Combined annealing/extension	30 sn	56°C	
Melting curve analysis		60–95°C	1

Kan örnekleri için ise *Setd1b* ve *Actb* genlerinin ekspresyonları incelenmiştir. Fare kan örnekleri için optimize edilen RT-qPCR şartları ile beyin örnekleri için kullanılan şartlar aynıdır (bkz. **Çizelge 3.8** ve **Çizelge 3.9**).

3.5. Biyoinformatik ve İstatistiksel Analizler

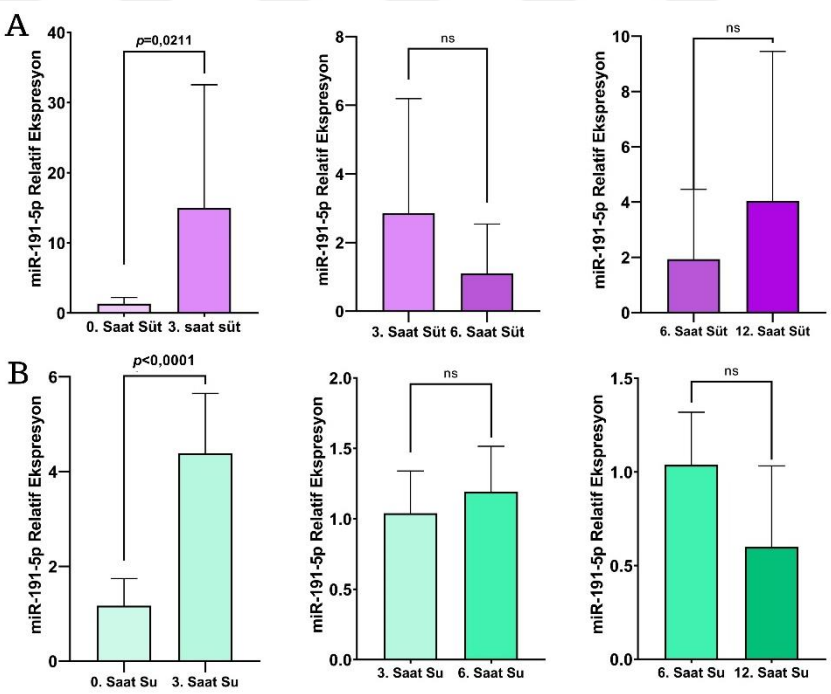
İstatistiksel analizler GraphPad Prism 8 kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İkili kıyaslamalarda, küçük saat aralığı kontrol grubu sayılarak Kat değişimi hesaplanmıştır. Kat değişimi hesabı $2^{-\Delta\Delta CT}$ formülü kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Livak ve Schmittgen, 2001; Schmittgen ve Livak, 2008). İkili kıyaslamaların analizleri, verinin normal dağılım göstermesi/göstermemesine göre t-testi veya Mann-whitney U testi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Sürenin ve verilen sıvının birlikte etkisinin incelendiği analizlerde, ΔCT (Cycle threshold) veya -ΔCT değerleri kullanılarak iki yönlü ANOVA (Analysis of variance) yapılmıştır. miRNA seviyelerinin gen ekspresyonuna etkisi için ΔCT veya - ΔCT değerleri kullanılarak linear regresyon analizi gerçekleştirilmiştir. Su ve süt besleme gruplarındaki uygulamanın genel etkisinin incelenmesi için ΔCT değerleri kullanarak ROC (Receiver-operating characteristic curve) analizi gerçekleştirilmiştir. miR-191-5p'in hedefleri ve bağlanma şekilleri TargetScan aracı kullanılarak incelenmiştir (McGeary vd., 2019). Dizi bilgileri, miRBASE ve NCBI Gene veri bankaları kullanılarak elde edilmiştir (Kozomara vd., 2019).

4. BULGULAR

4.1. RT-qPCR yöntemi ile mikroRNA ekspresyon analizi

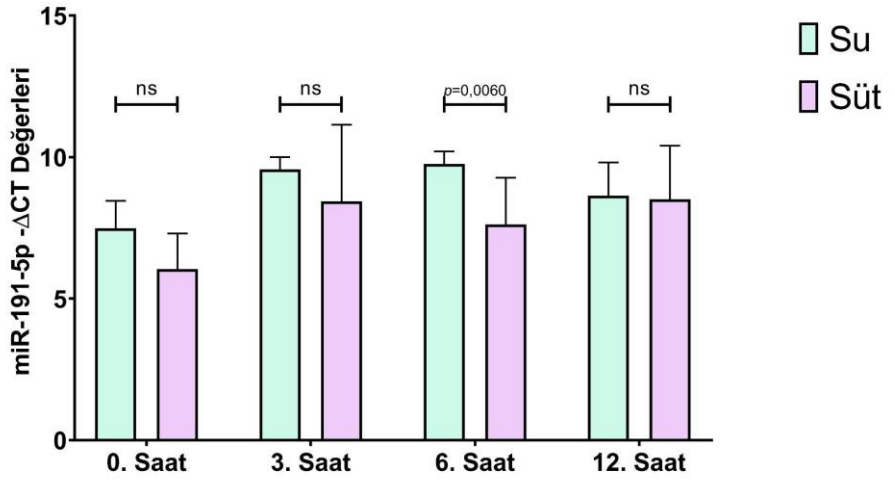
Bu tez çalışmasında, fare kan ve beyin dokusu örneklerinde miR-191-5p ekspresyon düzeyleri, süt ve su ile beslenen gruplarda, farklı zaman noktalarında (0, 3, 6 ve 12) incelenmiştir.

Kan örneklerinde gerçekleştirdiğimiz analizlerde, süt grubunda 0. saat ile 3. saat karşılaştırıldığında miR-191-5p ekspresyonunda, 3. saatte istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlemlenmemiştir (p=0,0211). Ancak 3. saat ile 6. saat ve 6. saat ile 12. saat arasındaki karşılaştırmalarda istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmemiştir (p>0,05). Su grubunda ise 0. saat ile 3. saat karşılaştırıldığında miR-191-5p ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edilmiştir (p<0,0001). Bununla birlikte su grubunda da 3. saat ile 6. saat ve 6. saat ile 12. saat arasındaki karşılaştırmalarda anlamlı bir farklılık gözlemlenmemiştir (p>0,05) (**Şekil 4.1**).



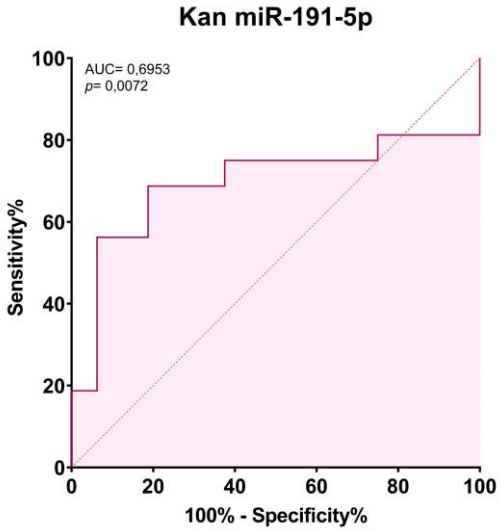
Şekil 4.1. miR-191-5p'nin farklı saat noktalarında kan örneklerinde süt (A) ve su (B) gruplarında relatif ekspresyonları

Gerçekleştirilen iki yönlü ANOVA analizi sonucunda, miR-191-5p ekspresyon düzeyleri üzerinde hem süre hem de beslenen sıvı faktörlerinin istatistiksel olarak anlamlı etkiler gösterdiği belirlenmiştir. Analiz sonucuna göre süre faktörü toplam varyansın %23,78'ini açıklamakta olup istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p=0,0003). Benzer şekilde, beslenen sıvı faktörü de toplam varyansın %11,32'sini açıklamış ve istatistiksel olarak anlamlı bir etkiye sahip olduğu görülmüştür (p=0,0021). Buna karşılık, süre ile beslenen sıvı arasındaki etkileşim anlamlı bulunmamış (p=0,3020) ve toplam varyansın yalnızca %4,06'unu açıklamıştır. Fisher's LSD çoklu karşılaştırma testi sonucunda, 0. saatte su ve süt grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmemiştir (p=0,0590). Benzer şekilde, 3. saat karşılaştırmasında da anlamlı bir fark gözlemlenmemiştir (p=0,1385). Ancak, 6. saatte su grubunun süt grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı (p=0,0060) derecede daha yüksek ekspresyon düzeyine sahip olduğu bulunmuştur (**Şekil 4.2**). 12. saatte yapılan karşılaştırmada ise gruplar arasında anlamlı bir farklılık gözlemlenmemiştir (p=0,8654).



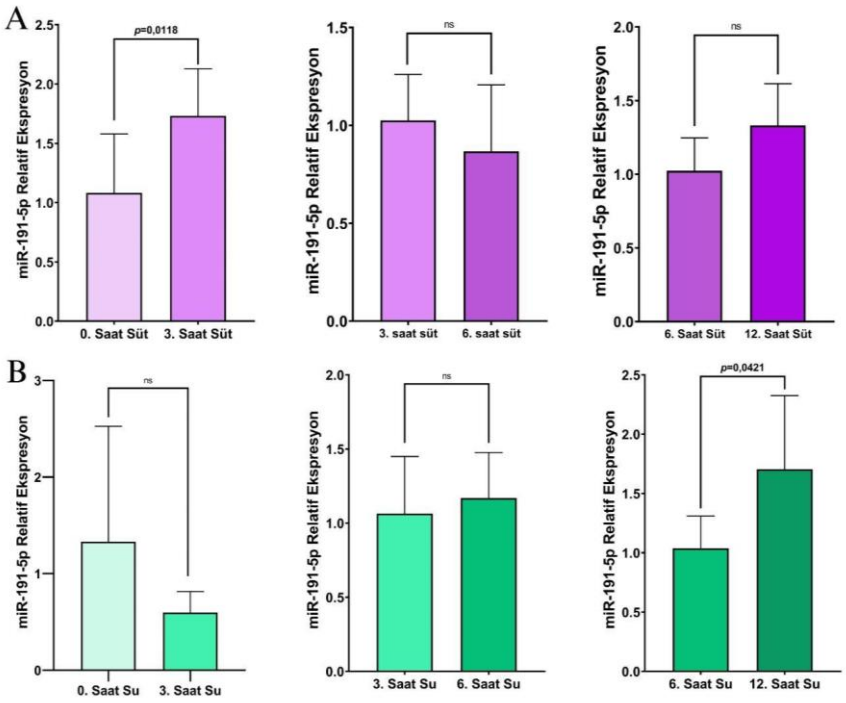
Şekil 4.2. miR-191-5p'in farklı saat noktalarında kan örneklerindeki ekspresyonlarının iki yönlü ANOVA sonuçları

Bu farklılığın yönünü ve farklı başlangıç seviyelerini daha iyi değerlendirmek amacıyla ROC analizi gerçekleştirilmiştir (**Şekil 4.3**). ROC analizi sonucunda, -ΔCT değerine göre süt grubunu ayırt etme gücünün anlamlı olduğu belirlenmiştir (AUC=0,6953, p=0,0072. Analiz sonucuna göre -ΔCT değerinin artmasıyla birlikte örneklerin süt grubuna ait olma olasılığının arttığını göstermektedir.



Şekil 4.3. Kan örneklerinde miR-191-5'nin ROC analiz sonuçları

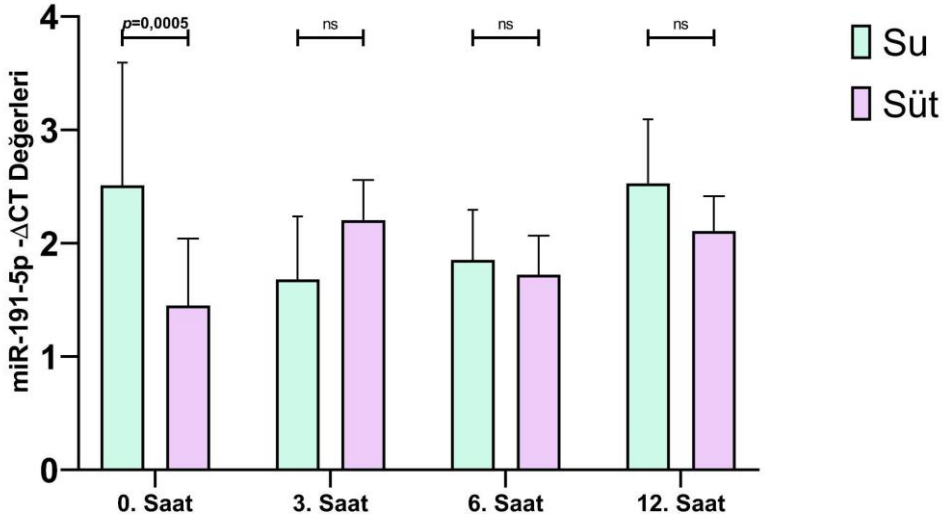
Beyin dokusunda ise süt grubunda 0. saat ile 3. saat karşılaştırıldığında miR-191-5p ekspresyonunda anlamlı bir artış gözlemlenmiştir (p=0,0118). Diğer zaman noktalarında (3. saat ile 6. saat ve 6. saat ile 12. saat) süt grubunda ekspresyon seviyeleri arasında anlamlı (p>0,05) bir fark görülmemiştir (**Şekil 4.4**). Su grubunda ise yapılan analizler sonucunda hem 0. saat ile 3. saat arasında hem de 3. saat ile 6. saat arasında ekspresyon düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlenmemiştir(p>0,05). 6. saat ile 12. saat karşılaştırıldığında ise su grubunda miR-191-5p ekspresyonunda anlamlı bir artış gözlemlenmiştir (p=0,0421). Bununla birlikte, 6. saat ile 12. saat karşılaştırıldığında su grubunda miR-191-5p ekspresyonunda anlamlı bir artış gözlemlenmiştir (p=0,0421).



Şekil 4.4. Beyin dokusunda miR-191-5p'nin farklı saat noktalarında süt (A) ve su (B) gruplarında relatif ekspresyonları

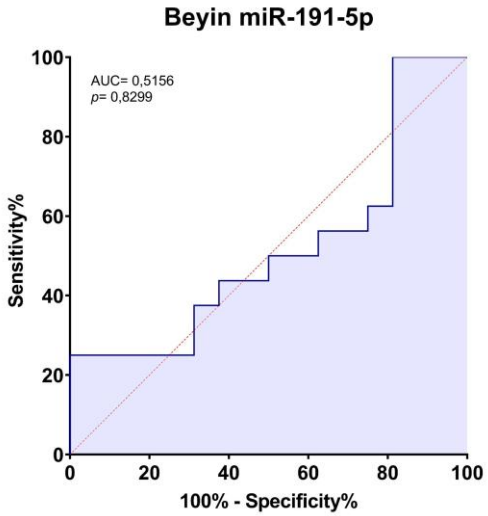
Beyin dokusunda miR-191-5p ekspresyon düzeyleri üzerine gerçekleştirilen iki yönlü ANOVA analizinde, süre ve beslenen sıvı faktörlerinin etkileşiminin istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür (p=0,0032). Bu sonuç, toplam varyansın %18,89'unu açıklamaktadır. Ancak, süre faktörü tek başına istatistiksel olarak anlamlı bulunmamış (p=0,0787) ve toplam varyansın %8,71'unu açıklamıştır. Benzer şekilde, beslenen sıvı faktörünün de tek başına anlamlı etkisi gözlemlenmemiştir (p=0,0658) ve bu faktör toplam varyansın %4,28'sini açıklamıştır.

Gruplar arası ortalama değerler incelendiğinde, su grubunun ortalama -ΔCT değeri 2,143, süt grubunun ise 1,871 olarak hesaplanmıştır. İki grup arasındaki ortalama fark 0,2717 olup bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p>0,05). Çoklu karşılaştırma testi sonuçlarına göre, yalnızca 0. saat noktasında su grubunun -ΔCT değeri süt grubuna göre anlamlı düzeyde daha yüksek bulunmuştur (p=0,0005). Diğer zaman noktalarında (3., 6. ve 12. saat), gruplar arasında anlamlı (p>0,05) bir farklılık görülmemiştir (**Şekil 4.5**) .



Şekil 4.5. miR-191-5p'in farklı saat noktalarında beyin dokusu örneklerindeki ekspresyonlarının iki yönlü ANOVA sonuçları

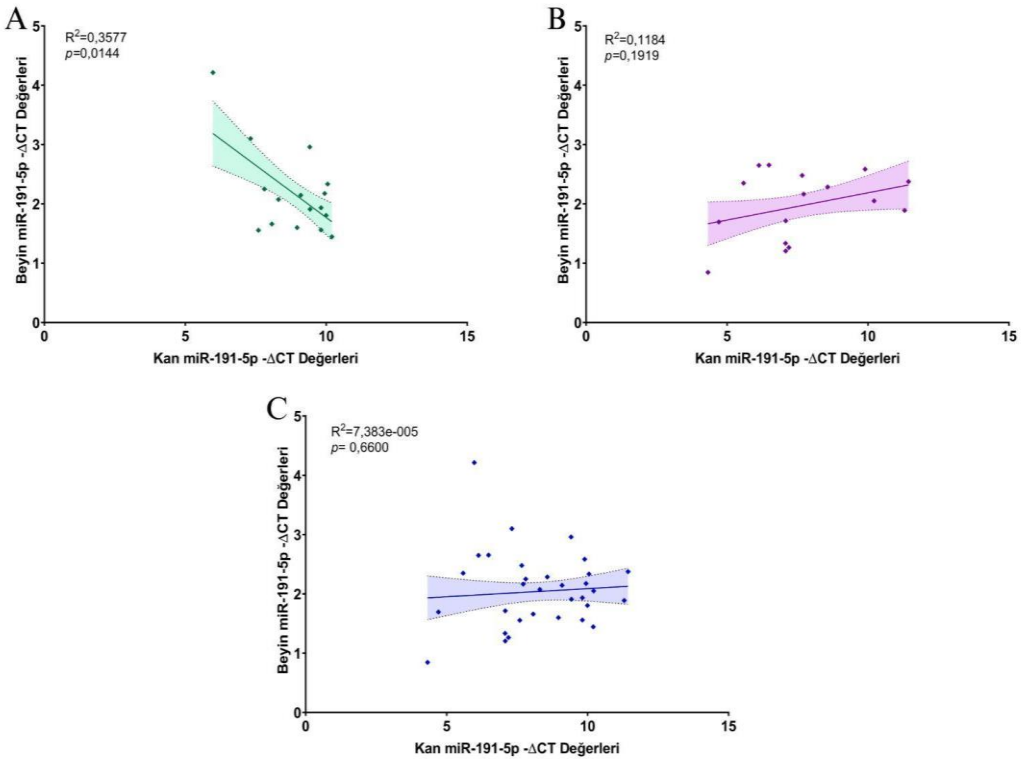
Beyin dokusundaki miR-191-5p ekspresyonunu incelemek için yapılan ROC analizi sonucunda (**Şekil 4.6**), miR-191-5p ekspresyonuna ait -ΔCT değerlerinin su ve süt grubunu ayırt etme gücünün istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlenmiştir (*p*>0,05).



Şekil 4.6. Beyin dokusu örneklerinde miR-191-5p'nin ROC analiz sonuçları

Lineer regresyon analizi ile kan ve beyin dokusundaki miR-191-5p'nin -ΔCT değerleri arasındaki ilişki incelenmiştir. Su grubunda, -ΔCT değerleri arasında negatif yönde orta düzeyde, istatistiksel olarak anlamlı (R^2=0,3577, *p*=0,0144) bir ilişki görülmüştür (**Şekil**

4.7 A). Süt grubunda ise pozitif yönde bir eğilim gözlemlenmiş ancak bu ilişki istatistiksel olarak anlamlılık (R^2=0,1184, *p*=0,1919) göstermemiştir (**Şekil 4.7 B**). Tüm gruplar birlikte değerlendirildiğinde kan ve beyin dokusuna ait -ΔCT değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı (R^2=0,0007, *p*=0,6600) bir korelasyon tespit edilmemiştir (**Şekil 4.7 C**).



Şekil 4.7. miR-191-5p'nin kan ve beyin dokusu örneklerindeki lineer regresyonu (A) Su grubunda, (B) Süt grubunda ve (C) Tüm grup

İki gruptaki miR-191-5p'nin ekspresyon artış oranlarına bakıldığında kan örneklerinde su içen grupta 0. saatten (1,17 ± 0,57) 3. saatte (4,39 ± 1,26) %275,2'lik bir artış gerçekleşmişken, süt grubunda 0. saatten (1,39 ± 1,77), 3. saate (8,80 ± 33,96) %533 artış gerçekleşmiştir **(Çizelge 4.1).** Kan örneklerinde diğer saatlerde anlamlı bir değişim gözlemlenmemiştir. Beyin örneklerinde ise süt grubunda 0. saatten (0,90 ± 0,92), 3. saate (1,77 ± 0,82) %96,7'lik bir artış görülmüştür.

Çizelge 4.1. Su veya süt ile beslenen farelerde, miR-191-5p'nin kan ve beyin dokularındaki relatif ekspresyon seviyelerinin 0., 3., 6. ve 12. saatlerdeki karşılaştırılması

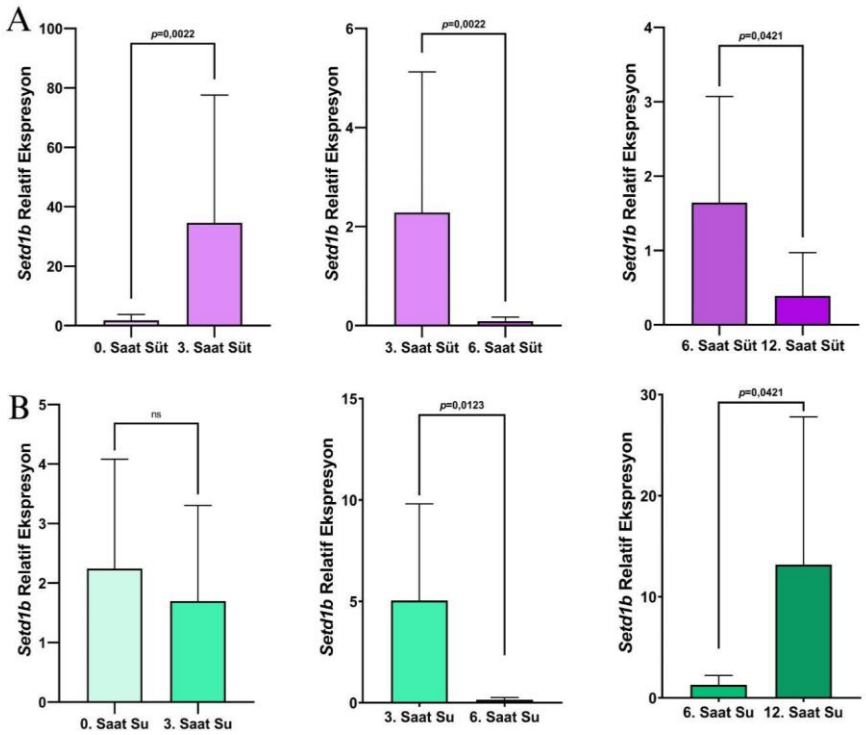
miR-191-5p Relatif Ekspresyon		**0. Saat Kontrol**			**3. Saat Kontrol**			**6. Saat Kontrol**		
		0. Saat	3. Saat	*p*-değeri	3. Saat	6. Saat	*p*-değeri	6. Saat	12. Saat	*p*-değeri
Kan	Su	1,17 ± 0,57	4,39 ± 1,26	**<0,0001***	1,04 ± 0,30	1,19 ± 0,32	0,3438*	1,09 ± 0,57	0,52 ± 0,88	0,1144
	Süt	1,39 ± 1,77	8,80 ± 33,96	**0,0211**	1,67 ± 6,46	0,39 ± 2,42	0,2171	0,68 ± 4,25	1,48 ± 9,45	0,1169
Beyin	Su	0,77 ± 2,07	0,59 ± 0,45	0,2525	1,05 ± 0.62	1,29 ± 0.31	0,4699	1,14 ± 0,41	1,73 ± 1,12	**0,0421**
	Süt	0,90 ± 0,92	1,77 ± 0,82	**0,0059**	1,05 ± 0,49	0,81 ± 0,69	0,4699	1,07 ± 0,46	1,30 ± 0,58	0,1144

*T-test gerçekleştirilmiştir ve değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. Diğer sonuçlar Mann-Whitney testi kullanılarak elde edilmiş ve medyan ± IQR olarak verilmiştir.

4.2. RT-qPCR Yöntemi ile Hedef Genlerin Ekspresyon Analizi

4.2.1. *Setd1b* Ekspresyon Analizi

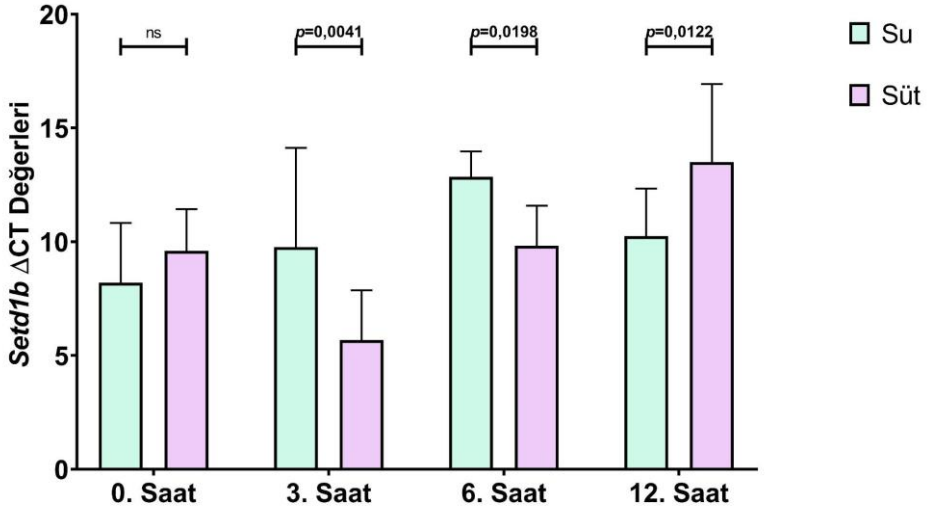
Kan örneklerinde *Setd1b* gen ekspresyon seviyeleri, zamana bağlı olarak değerlendirildiğinde, **Şekil 4.8**, süt grubunda başlangıç noktası olan 0. saat ile 3. saat arasında istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlemlenmiştir (p=0,0022). 3. saat ile 6. saat karşılaştırıldığında ekspresyon düzeylerinde anlamlı bir azalma gözlemlenmiştir (p=0,0022). Benzer şekilde, 6. saat ile 12. saat karşılaştırıldığında da ekspresyonda istatistiksel olarak anlamlı bir azalma belirlenmiştir (p=0,0421). Su grubunda ise 0. saat ile 3. saat arasında anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir (p>0,05). Bununla birlikte, 3. saat ile 6. saat arasında *Setd1b* gen ekspresyon seviyelerinde anlamlı bir azalma görülmüştür (p=0,0123). Ayrıca, 6. saat ile 12. saat arasında değerlendirildiğinde ekspresyon seviyelerinde anlamlı bir artış olduğu gözlemlenmiştir (p=0,0421).



Şekil 4.8. *Setd1b*'nin kan örneklerinde farklı saat noktalarında süt (A) ve su (B) gruplarında ekspresyonu

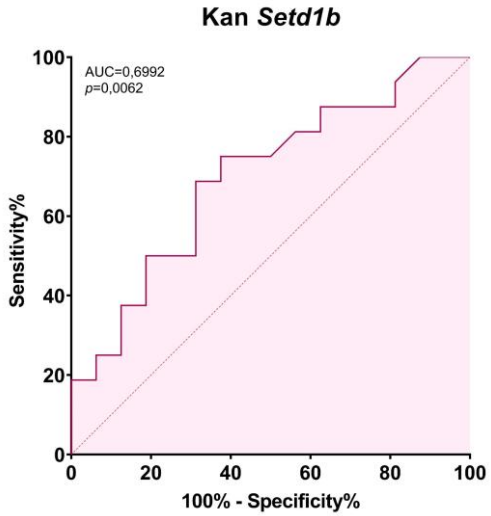
Kan örneklerinde *Setd1b* gen ekspresyon düzeyleri üzerine gerçekleştirilen iki yönlü ANOVA analizinde, süre ve beslenen sıvı faktörlerinin etkileşiminin istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür (p=0,0004). Sonuçlar, toplam varyansın %20,91'ini açıklamaktadır. Süre faktörü tek başına da istatistiksel olarak anlamlı bulunmuş (p<0,0001) ve toplam varyansın %25,90'ını açıklamıştır. Buna karşın, beslenen sıvı faktörü tek başına anlamlılık göstermemiş ve (p=0,3555) toplam varyansın %0,83'ünü açıklamıştır.

Gruplar arasındaki çoklu karşılaştırmalar incelendiğinde, **Şekil 4.9**, 0. saatte su ve süt grupları arasında anlamlı bir farklılık gözlemlenmemiştir (p=0,3070). Üçüncü saatte ΔCT değerleri su grubunda süt grubuna kıyasla anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur (p=0,0041). Altıncı saatte de su grubunda ΔCT değerleri süt grubuna göre anlamlı düzeyde daha yüksek olarak belirlenmiştir (p=0,0198). 12. saatte ise ΔCT değerleri süt grubunda su grubuna kıyasla anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur (p=0,0122).



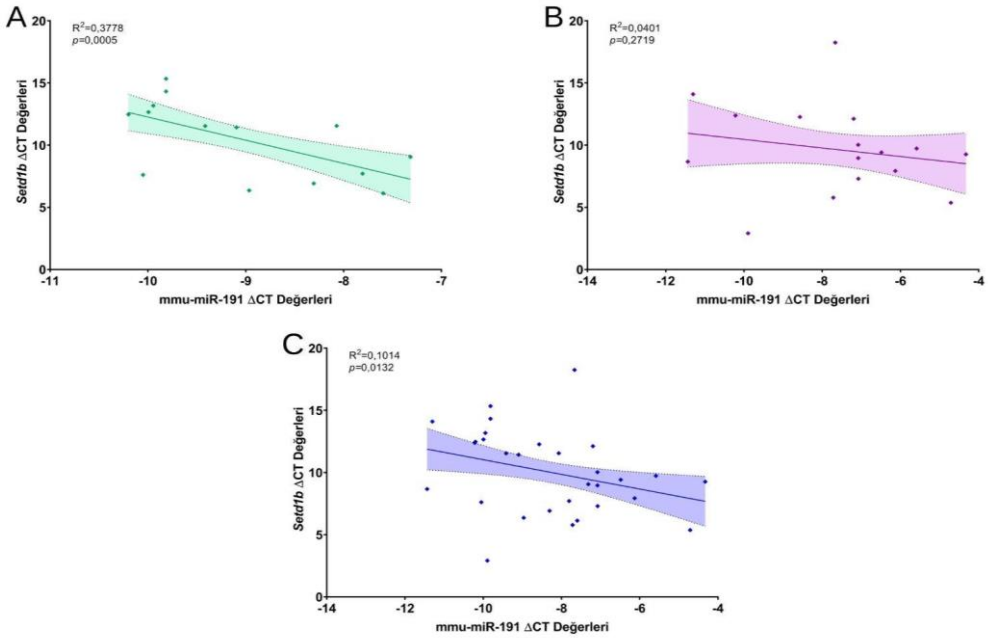
Şekil 4.9. *Setd1b*'nin farklı saat noktalarında kan örneklerindeki ekspresyonlarının iki yönlü ANOVA sonuçları

Kan örneklerinde *Setd1b* genine ait ΔCT değerleri ile gerçekleştirilen ROC analizi sonucunda, süt grubunu ayırt etme gücünün istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir (AUC=0,6992, *p*=0,0062) (**Şekil 4.10**). Analiz sonucuna göre, ΔCT değerinin artmasıyla birlikte örneklerin süt grubuna ait olma olasılığının arttığı görülmüştür.



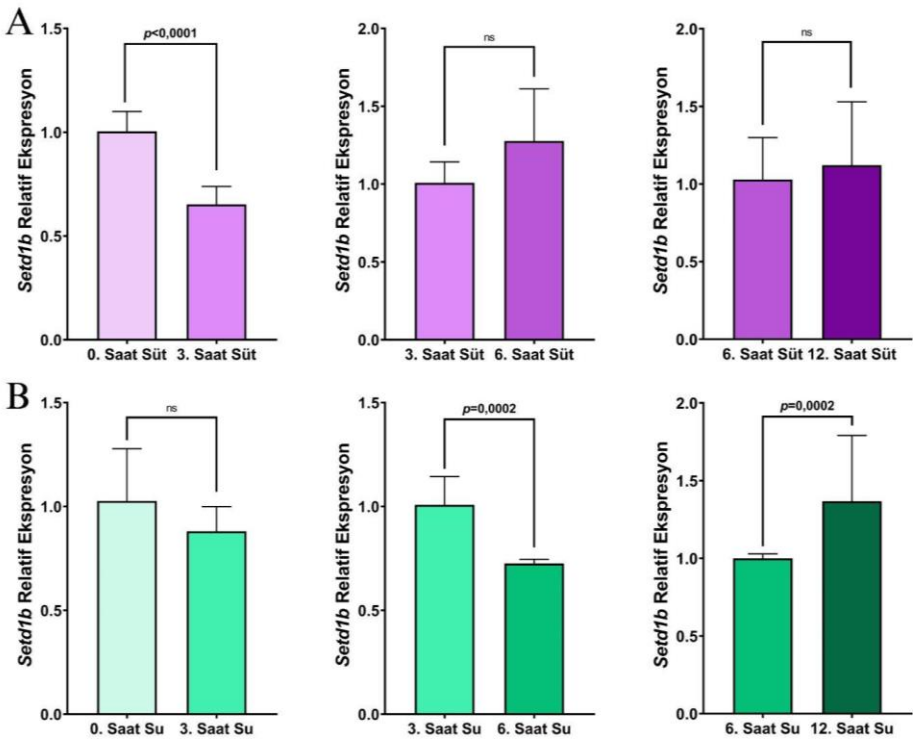
Şekil 4.10. Kan örneklerinde *Setd1b*'nin ROC analiz sonuçları

Kan örneklerinde miR-191-5p ve *Setd1b*'nin arasındaki ilişki lineer regresyon analizi ile değerlendirilmiştir. Su grubunda, ΔCT değerleri arasında negatif yönde ve istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki görülmüştür (**Şekil 4.11 A**). Süt grubunda ise ΔCT değerleri arasındaki eğim, negatif yönde olmakla birlikte istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (**Şekil 4.11 B**). İki grup birlikte değerlendirildiğinde, ΔCT değerleri arasında negatif yönde ve istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki gözlemlenmiştir (**Şekil 4.11 C**).



Şekil 4.11. Kan örneklerinde miR-191-5p'nin ve *Setd1b* lineer regresyonu (A) Su grubunda, (B) Süt grubunda ve (C) Tüm grup

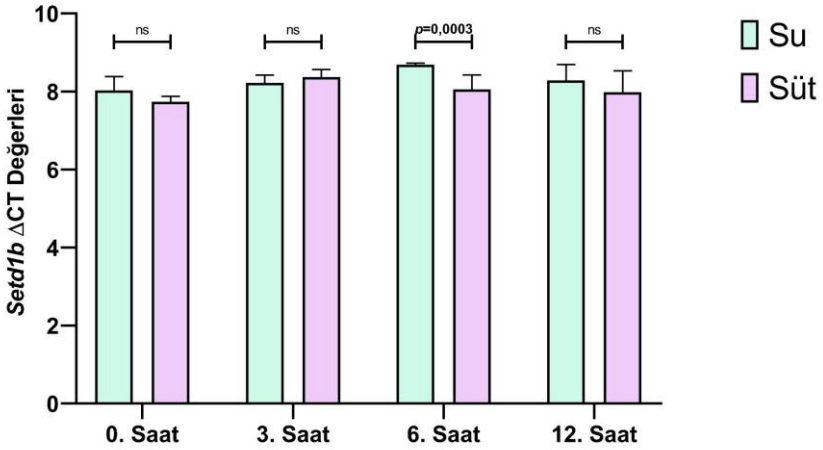
Beyin dokusunda *Setd1b* gen ekspresyon düzeyleri incelendiğinde, **şekil 4.12**, süt grubunda 0. saat ile 3. saat arasında gen ekspresyonunda anlamlı bir azalma gözlemlenmiştir (p<0,0001). Buna karşılık, 3. saat ile 6. saat ve 6. saat ile 12. saat arasındaki değişimler, istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p>0,05). Su grubunda ise 0. saat ile 3. saat arasında anlamlı bir farklılık görülmemiştir (p>0,05). Ancak, 3. saat ile 6. saat (p=0,0002) istatistiksel olarak anlamlı bir artma ve 6. saat ile 12. saat (p=0,0002) karşılaştırmalarında anlamlı bir azalma görülmüştür.



Şekil 4.12. Beyin dokusunda *Setd1b*'nin farklı saat noktalarında süt (A) ve su (B) gruplarında relatif ekspresyonları

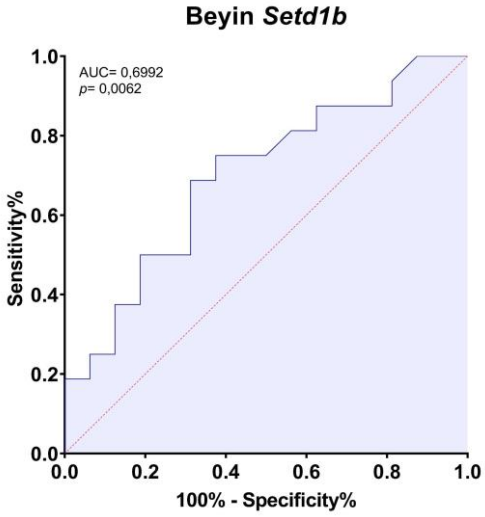
Beyin örneklerinde *Setd1b* ΔCT değerleri kullanılarak gerçekleştirilen iki yönlü ANOVA analizinde, süre ve beslenen sıvı faktörlerinin etkileşiminin istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür (p=0,0133) ve toplam varyansın %11,66'sını açıklamaktadır. Süre (toplam varyansın %21,47'si, p=0,0004) ve beslenen sıvı (toplam varyansın %11,12'si, p=0,0015) faktörleri tek başına da istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür.

Gruplar arasındaki çoklu karşılaştırmalar incelendiğinde, **Şekil 4.13**, 0., 3. ve 12. saat aralıklarında istatistiksel olarak anlamlı bir değişim görülmemiştir. 6. saatte ΔCT değerleri su grubunda süt grubuna kıyasla anlamlı olarak daha yüksek olduğu görülmüştür (p=0,0003).



Şekil 4.13. *Setd1b*'nin farklı saat noktalarında beyin dokusu örneklerindeki ekspresyonlarının iki yönlü ANOVA sonuçları

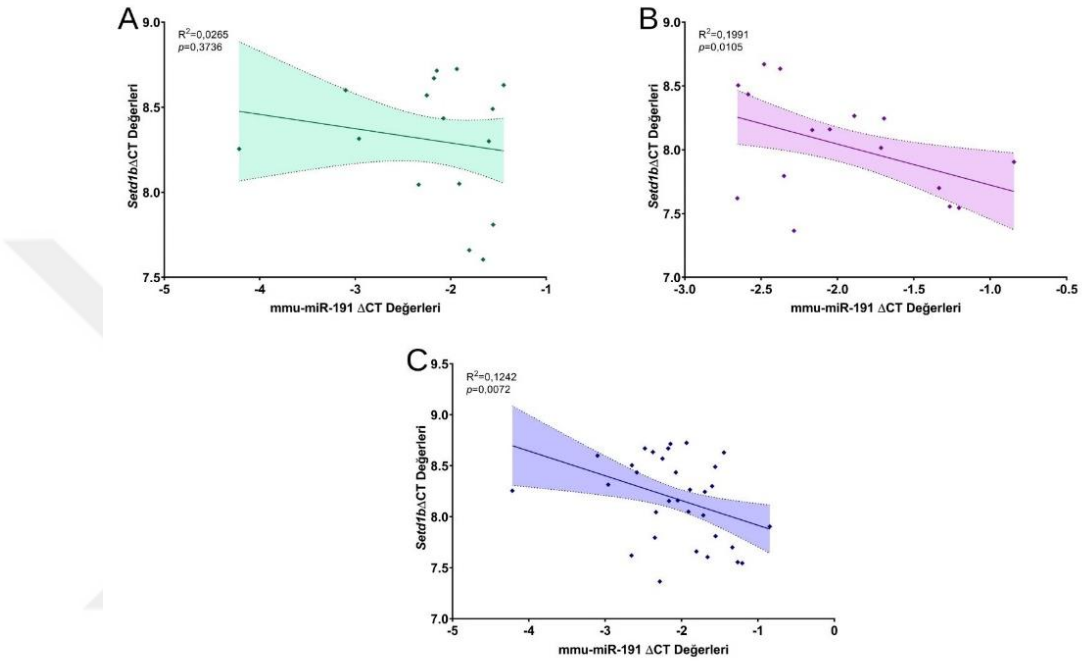
Beyin dokusunda Setd1b genine ait ΔCT değerleri için gerçekleştirilen ROC analizi sonucunda, süt grubunu ayırt etme gücünün istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür (AUC=0,6992, *p*=0,0062). Analiz sonucuna göre, ΔCT değerinin artmasıyla birlikte örneklerin süt grubuna ait olma olasılığının yükseldiği hesaplanmıştır (**Şekil 4.14**).



Şekil 4.14. Beyin dokusu örneklerinde *Setd1b*'nin ROC analiz sonuçları

Beyin dokusunda miR-191 ve *Setd1b* genine ait ΔCT değerleri arasındaki ilişki, lineer regresyon analizi ile incelenmiştir. Su grubunda, regresyon eğimi istatistiksel olarak

anlamlı bulunmamıştır (**Şeki 4.15 A**). Buna karşılık, Süt grubunda regresyon eğiminin istatistiksel olarak anlamlı olduğu (p=0,0105) belirlenmiştir (**Şekil 4.15 B**). Tüm gruplar birlikte değerlendirildiğinde ise eğimin istatistiksel olarak anlamlı (p=0,0072) olmaya devam ettiği görülmüştür (**Şekil 4.15 C**).



Şekil 4.15. Beyin dokusunda miR-191-5p'nin ve *Setd1b* lineer regresyonu (A) Su grubunda, (B) Süt grubunda ve (C) Tüm grup

İki gruptaki *Setd1b* ekspresyon değişim oranlarına bakıldığında, **Çizelge 4.2**, kan örneklerinde su beslenen grupta 3. saatten (5,04 ± 4,77) 6. saate (0,15 ± 0,11) yaklaşık %97,0 oranında azalma görülmüştür (p = 0,0123). Süt grubunda ise 0. saatten (1,09 ± 3,66) 3. saate (16,47 ± 77,3) yaklaşık %1.412,8'lik bir artış ve 3. saatten (1,09 ± 5,11) 6. saate (0,07 ± 0,16) yaklaşık %93,6'lık bir azalma gözlemlenmiştir. 6. saat ile 12. saat arasında kan örneklerinde hem su hem de süt gruplarında anlamlı değişiklikler saptanmıştır. Su grubunda 6. saatten (1,05 ± 1,86) 12. saate (8,16 ± 28,43) yaklaşık %676,2'lik bir artış görülürken, süt grubunda %91'lik bir azalma görülmüştür.

Beyin örneklerinde ise su grubunda 3. saatten (1,04 ± 0,27) 6. saate (0,72 ± 0,04) *Setd1b* ekspresyonu yaklaşık %30,8 oranında azalmış, 6. saatten (0,99 ± 0,06) 12. saate (1,19 ±

0,78) ise yaklaşık %20,2 oranında artış göstermiştir. Süt grubunda 0. saatten (1,01 ± 0,10) 3. saate (0,65 ± 0,09) ise yaklaşık %35,6'lık bir azalma görülmüştür.

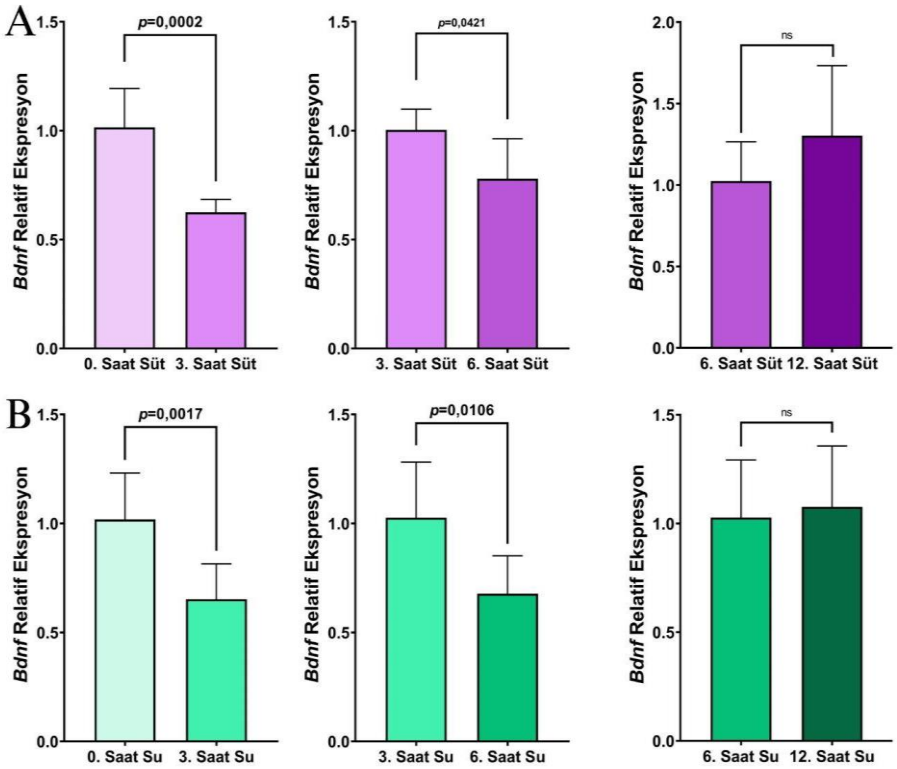
Çizelge 4.2. Su veya süt ile beslenen farelerde, *Setd1b*'nin kan ve beyin dokularındaki relatif ekspresyon seviyelerinin 0., 3., 6. ve 12. saatlerdeki karşılaştırılması

Setd1b Relatif Ekspresyon		**0. Saat Kontrol**			**3. Saat Kontrol**			**6. Saat Kontrol**		
		0. Saat	3. Saat	*p*-değeri	3. Saat	6. Saat	*p*-değeri	6. Saat	12. Saat	*p*-değeri
Kan	Su	2,24 ± 1,84	1,70 ± 1,61	0,5969*	5,04 ± 4,77	0,15 ± 0,11	**0,0123***	1,05 ± 1,86	8,16 ± 28,43	**0,0421**
	Süt	1,09 ± 3,66	16,47 ± 77,3	**0,0022**	1,09 ± 5,11	0,07 ± 0,16	**0,0022**	1,34 ± 2,90	0,12 ± 1,02	**0,0421**
Beyin	Su	1,01 ± 0,52	0,91 ± 0,24	0,2525	1,04 ± 0,27	0,72 ± 0,04	**0,0002**	0,99 ± 0,06	1,19 ± 0,78	**0,0002**
	Süt	1,01 ± 0,10	0,65 ± 0,09	**<0,0001***	1,01 ± 0,13	1,277 ± 0,34	0,0533*	1,03 ± 0,27	1,12 ± 0,41	0,6018*

*T-test gerçekleştirilmiştir ve değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. Diğer sonuçlar Mann-Whitney testi kullanılarak elde edilmiş ve medyan ± IQR olarak verilmiştir.

4.2.2. *Bdnf* ekspresyon analizi

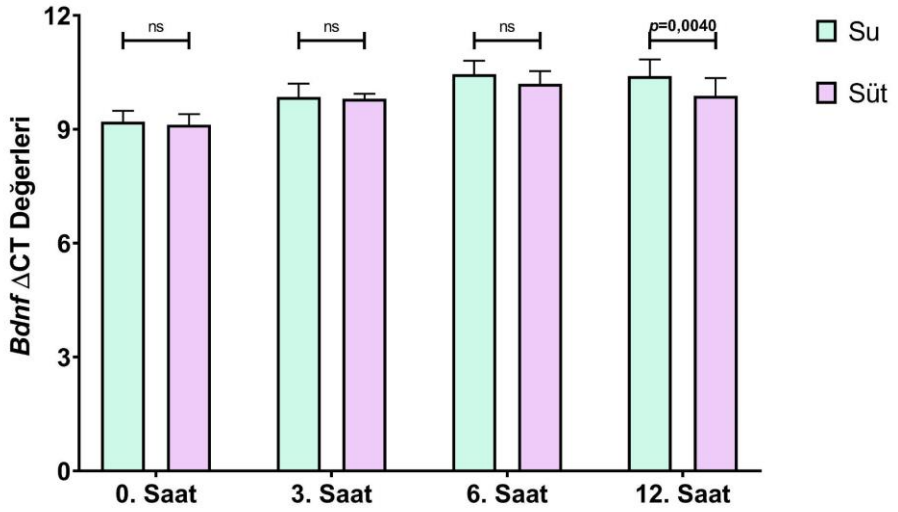
Süt grubunda *Bdnf* relatif ekspresyon düzeyleri zaman noktalarına göre değerlendirilmiştir (**Şekil 4.16 A)**. 0. saat ile 3. saat arasında anlamlı bir azalma gözlemlenmiştir (*p*=0,0002). 3. saat ile 6. saat karşılaştırıldığında da ekspresyon düzeylerinde anlamlı bir azalma saptanmıştır (*p*=0,0421). Ancak, 6. saat ile 12. saat arasındaki değişim istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Su grubunda ise benzer şekilde 0. saat ile 3. saat arasında *Bdnf* relatif ekspresyon düzeylerinde anlamlı bir azalma (*p*=0,0017) belirlenmiştir (**Şekil 4.16 B**). 3. saat ile 6. saat karşılaştırıldığında da anlamlı bir azalma gözlemlenmiştir (*p*=0,0106). 6. saat ile 12. saat arasındaki fark ise istatistiksel olarak anlamlı değildir.



Şekil 4.16. Beyin dokusunda *Bdnf*'nin farklı saat noktalarında su (A) ve süt (B) gruplarında relatif ekspresyonları

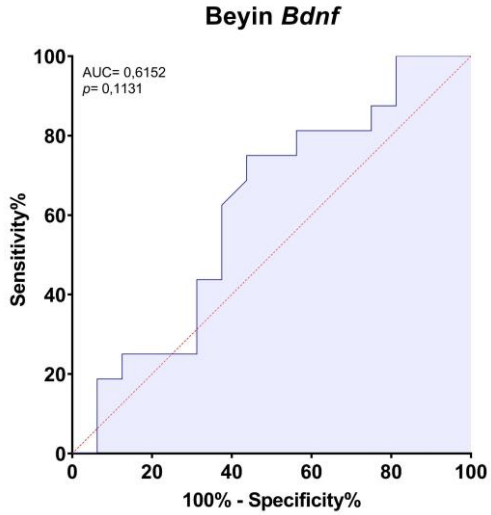
Beyin örneklerinde *Bdnf* ΔCT değerleri kullanılarak gerçekleştirilen iki yönlü ANOVA analizinde, süre faktörü istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p<0,0001) ve toplam varyansın %61,04'ünü açıklamaktadır. Ayrıca, beslenen sıvı türü de anlamlı bir etkene sahip olduğu bulunmuştur (p=0,0116) ve varyansın %3,93'ünü açıklamaktadır. Buna karşılık, süre × beslenen sıvı etkileşimi anlamlı olmadığı (p=0,2091) ve toplam varyansın %2,70'ini açıkladığı görülmüştür.

Gruplar arasındaki çoklu karşılaştırmalar incelendiğinde, **Şekil 4.17**, 0. saat (p=0,6550), 3. saat (p=0,7786) ve 6. saat (p=0,1431) ölçümlerinde gruplar arasında anlamlı bir farklılık saptanmamıştır. 12. saatte su grubunun ortalama ΔCT değeri, süt grubuna kıyasla anlamlı düzeyde daha yüksek bulunmuştur (p=0,0040).



Şekil 4.17. *Bdnf*'nin farklı saat noktalarında beyin dokusu örneklerindeki ekspresyonlarının iki yönlü ANOVA sonuçları

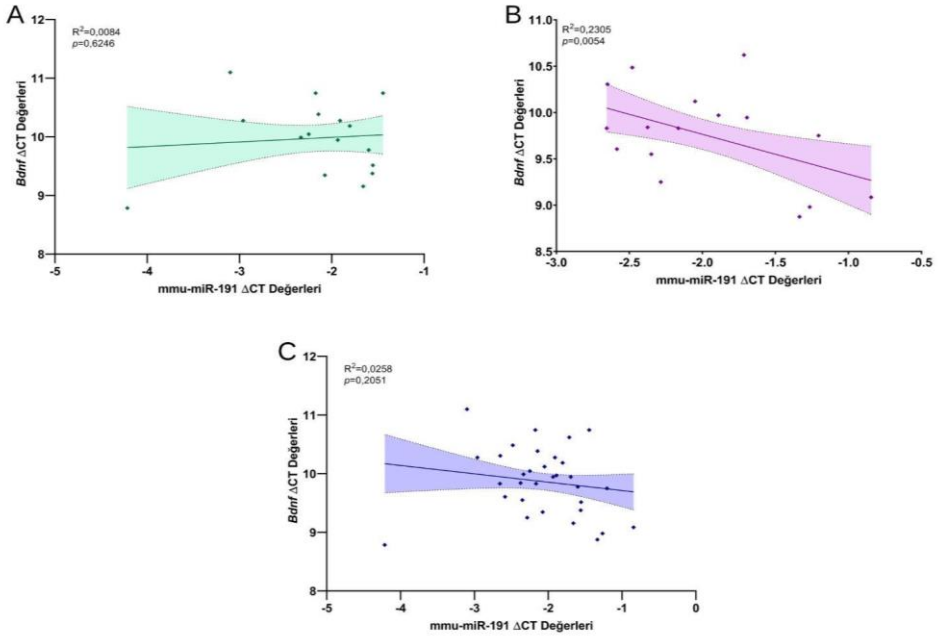
Beyin dokusunda *Bdnf* ΔCT değerleri için gerçekleştirilen ROC analizi sonucunda, AUC değeri 0,6152 olarak bulunmuştur (**Şekil 4.18**). Analiz sonucunda, grupları ayırt etme gücünün düşük düzeyde olduğunu göstermiş ama istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç elde edilmemiştir (*p*=0,1131).



Şekil 4.18. Beyin dokusu örneklerinde *Bdnf*'nin ROC analiz sonuçları

Beyin dokusunda miR-191 ve *Bdnf* genine ait ΔCT değerleri arasındaki ilişki lineer regresyon analizi kullanılarak incelenmiştir (**Şekil 4.19**). Su grubunda regresyon eğiminin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür (*p*=0,6246). Süt grubunda ise regresyon

eğimi istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlemlenmişti (p=0,0054). Tüm gruplar birlikte değerlendirildiğinde ise regresyon eğiminin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür (p=0,2051).



Şekil 4.19. Beyin dokusunda miR-191-5p'nin ve *Bdnf*'nin lineer regresyonu (A) Su grubunda, (B) Süt grubunda ve (C) Tüm grup

İki gruptaki *Bdnf* gen ekspresyon değişimlerine bakıldığında, **Çizelge 4.3**, beyin dokusunda su grubunda *Bdnf* ekspresyonu 0. saatten (1,02 ± 0,21) 3. saate (0,65 ± 0,16) yaklaşık %36,3 oranında azalmış (p=0,0017), ayrıca 3. saatten (0,98 ± 0,52) 6. saate (0,62 ± 0,34) %36,7 oranında azalma göstermiştir (p=0,0106). 6. saat ile 12. saat arasında anlamlı bir değişim gözlenmemiştir.

Süt grubunda ise 0. saatten (1,07 ± 0,35) 3. saate (0,61 ± 0,11) yaklaşık %43,0'lık bir azalma tespit edilmiştir (p = 0,0002). 3. saatten (0,98 ± 0,18) 6. saate (0,98 ± 0,18) yaklaşık %22,4 oranında azalma gözlenmiş olup bu değişim istatistiksel olarak anlamlıdır (p = 0,0421). 6. saat ile 12. saat arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır (p = 0,1308).

Çizelge 4.3. Su veya süt ile beslenen farelerde, *Bdnf*'nin kan ve beyin dokularındaki relatif ekspresyon seviyelerinin 0., 3., 6. ve 12. saatlerdeki karşılaştırılması

Bdnf Relatif Ekspresyon		**0. Saat Kontrol**			**3. Saat Kontrol**			**6. Saat Kontrol**		
		0. Saat	3. Saat	*p*-değeri	3. Saat	6. Saat	*p*-değeri	6. Saat	12. Saat	*p*-değeri
Beyin	Su	1,02 ± 0,21	0,65 ± 0,16	**0,0017***	0,98 ± 0,52	0,62 ± 0,34	**0,0106**	0,93 ± 0,51	1,17 ± 0,54	0,7181
	Süt	1,07 ± 0,35	0,61 ± 0,11	**0,0002**	0,98 ± 0,18	0,76 ± 0,38	**0,0421**	1,02 ± 0,24	1,30 ± 0,43	0,1308*
*T-test gerçekleştirilmiştir ve değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. Diğer sonuçlar Mann-Whitney testi kullanılarak elde edilmiş ve medyan ± IQR olarak verilmiştir.										

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu tez çalışmasında süt içeriğindeki miR-191-5p'nin süt ile beslenen farelerde dolaşıma geçme ve hedef genlerinin (*Setd1b* ve *Bdnf*) ekspresyonu etkileme potansiyeli incelenmiştir. Çalışmamızda süt içeriğindeki miR-191-5p'nün fare dolaşımına geçişi ve fonksiyonel etkisi üzerine ön veriler elde dilmiştir. Süt ile beslenen farelerin dolaşımında ve beyin dokusunda miR-191-5p'nin artışının 3. saat noktasında gerçekleştiğine dair sonuçlar elde edilmiştir. *Setd1b*'nin ekspresyonu dolaşımda incelendiğinde iki yönlü ANOVA analizi sonucunda, süt içen farelerde 12. saatte istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu gözlemlenmiştir. Dolaşımdaki miR-191-5p seviyesi ile *Setd1b* gen ekspresyon seviyesinin ilişkisi incelendiğinde su ve tüm (su ve süt grubu beraber) gruplarında negatif bir ilişki olduğu gözlemlenmiştir. Süt grubunda ise benzer bir sonuca ulaşılamamıştır. Beyin dokusunda yapılan analizler sonucunda süt beslenen farelerde 3. saatte 0. saate göre daha yüksek miR-191-5p ekspresyonu olduğu görülmüştür. Dolaşımdaki miR-191-5p seviyesinin, beyin dokusundaki seviyesi ile ilişkisine bakıldığında ise su ve süt gruplarında ters yönlü bir ilişki gözlenmiştir. Su grubunda beyin ve dolaşımdaki miR-191-5p seviyesinde pozitif yönde istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç varken süt grubunda benzeri bir sonuç gözlemlenmemiştir. Süt grubunda dolaşımdaki miR-191-5p seviyesi ile beyindeki miR-191-5p seviyesinin oluşturduğu grafiğin eğimi negatif yönde olmasına karşın istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç elde edilememiştir. Beyin dokusunda yapılan analizlerde, *Setd1b* gen ekspresyonunun su ve süt içen gruplar arasında anlamlı bir farklılığın olduğu görülmüştür. Dolaşımdaki *Setd1b* ekspresyonu su grubundan 12. saatte 6. saate kıyasla %676,2'lik bir artış gösterirken, süt grubunda %91'lik bir azalma göstermiştir. Sonuçlarımız süt içimi sonrası farelerin dolaşımında miR-191-5p veya süt kaynaklı *Setd1b* ekspresyonunun azaldığına yönelik veri sunmaktadır. Beyin dokusunda ise 3. saatte 0. saate kıyasla %35,6'lık bir azalma görülmüştür. *Bdnf* geninde yapılan analizlerde ise beyin dokusunda süt içen grupta miR-191-5p ile olan ilişkisinin negatif yönde ve istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür.

Literatürde farelerde yapılmış olan besinsel miRNA çalışmalarına bakıldığında, farelere süt harici farklı besinlerle besleme çalışmalarının yapıldığı görülmüştür. Liu vd. (2021) tarafından gerçekleştirilen çalışmada, farelerde 8 haftalık hanımeli beslemesi sonrası

tümör boyunda küçülme gerçekleştiği görülmüştür. Yine aynı çalışmada, farelere gavaj yoluyla miR-2911 beslemesi 8 hafta boyunca yapılmış ve negatif kontrole kıyasla kandaki miR-2911 miktarında artış olduğu gösterilmiştir. Başka bir çalışmada ise fareler hanımeli çayı içirilmiş ve belli saat aralıklarında (0.5, 1, 3, 6 ve 12) farelerin plazmalarında ve akciğer dokularında hanımeli kökenli miR-2911 miktarı incelenmiştir (Zhou vd., 2015). Çalışma sonucunda dolaşımda 6. saatte miR-2911 miktarının arttığı gösterilmiştir (Zhou vd., 2015). Zhang vd. (2012) tarafından yapılan çalışmada ise pirinç yedirilen farelerde kontrollere kıyasla 6. saatte artış olduğu görülmüştür. Yine aynı çalışmada pirinçten izole edilen RNA'nın gavaj yolu ile farelerin beslenmesi sonucunda 3. saatte kontrole kıyasla artış olduğu raporlanmıştır. Literatürde insanda gerçekleştirilen tek insan süt içme çalışmasında 5 insana 3 kere süt içirilip kan örnekleri alınmıştır (Baier vd., 2014). Belirli saat aralıklarında (0., 1., 2., 3., 6., 9., ve 24.) alınan kan örneklerinde hsa-miR-200c-3p ve hsa-miR-29b-3p seviyleri incelenmiştir. Çalışma sonucunda dolaşımdaki miR-200c-3p ve miR-29b-3p'nin 3. saatte tepe noktaya ulaştığı görülmüştür. Gerçekleştirilmiş olan tez çalışmasında gözlemlenen dolaşımdaki miR-191-5p artışının 3. saatte gerçekleşmesi literatür ile uyum göstermektedir. Artışın diğer çalışmalar kadar yüksek oranda gerçekleşmemesi, bitki kaynaklı miRNA'ların metillenmiş olarak bulunması ve daha stabil olmalarından kaynaklanmış olabilir.

Kan örneklerinde görülen bu artışın benzerinin beyin dokusunda da gözlemlenmiş olması literatür ile uyum göstermektedir. Literatürde eksozomların KBB'yi geçebildiklerine dair çalışmalar bulunmaktadır. Bu çalışmalardan birinde, fare femur kemik iliğindeki kök hücrelerinin kültür ortamında farklılaşması sonucu elde edilen makrofajlardan eksozom izolasyonu gerçekleştirilmiş ve izole edilen eksozomlar floresans olarak işaretlendikten sonra tekrar farelere enjekte edilmiştir (Haney vd., 2015). İşlem sonrasında enjekte edilen farelerin beyin dokularında, floresans işaretli eksozomlara rastlanmış ve eksozomların kan-beyin bariyerini geçebileceği raporlanmıştır (Haney vd., 2015). Farklı bir çalışmada ise izole edilen ve radyoaktif işaretlenen insan eksozomları farelere sağ juguler venden enjekte edilmiştir (Banks vd., 2020). Araştırmada farelerin beyin dokularındaki radyoaktif eksozom miktarı ölçülmüş ve işaretli eksojen insan eksozomlarının fare beyin dokusunun farklı bölgelerine geçiş yapabildiği ve kan-beyin bariyerini aşabildikleri

raporlanmıştır (Banks vd., 2020). Literatürde besin kaynaklı miRNA'ların beyin dokusuna geçişini inceleyen bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Hsa-miR-191-5p, *DALRD3* geninin ilk intronunda yer alan miR-191/425 kümesinden sentezlenmektedir (Kiezun vd., 2012). Bu kümede miR-191-5p haricinde 3 farklı miRNA (miR-191-3p, miR-425-3p ve miR-425-5p) daha yer almaktadır. miR-191'in 30 farklı metazoa türünde homolog olduğu bilinmektedir (Kiezun vd., 2012). miR-191-5p'nin ekspresyonunun farklı kanser türlerinde (hepatosellüler karsinom, prostat kanseri, meme kanseri, berrak hücreli over kanseri vb.) arttığı literatürde raporlanmıştır (Nagpal ve Kulshreshtha, 2014; Wu vd., 2019; Pan vd., 2023; Takamizawa vd., 2023; Premnath ve Veerappapillai, 2024; Porcel-Pastrana vd., 2025). Ayrıca, mir-191-5p'nin *BDNF*'yi hedefleyerek nörotoksisiteye karşı koruduğu, nöral hücre ölümünü tetiklediği ve farklı kardiyovasküler durumlarla ilişkilendiği de raporlanmıştır (Lichołai vd., 2021; Li vd., 2021; Wang vd., 2022; Yu vd., 2022). Literatürde ayrıca, otizm, alzheimer hastalığı ve multiple skleroz gibi beyin hastalıklarının patolojisinde de miR-191-5p'nin rol aldığı gösterilmiştir (Vistbakka vd., 2018; Wang vd., 2022). miR-191-5p'nin HIV-1 (İnsan Bağışıklık Yetmezliği Virüsü) genomunda yer alan *NUP50* genini hedefleyerek virüs replikasyonunu inhibe ettiği ve hastalık prognozunda pozitif bir etkiye sahip olduğu da gözlemlenmiştir (Zheng vd., 2021). miR-191-5p (bta-miR-191) literatürde inek sütünde bol miktarda bulunduğu raporlanan miRNA'lar arasında yer almaktadır (Bae ve Kim, 2025). Bol bulunmasıyla birlikte ısıl işlem sonrası stabil kalabildiği literatürde raporlanmıştır (Zhang vd., 2022; Bağcı ve Pirim, 2024). Literatürde, inek sütünde bulunan miR-191'in memeli dolaşımına geçişini inceleyen benzer bir çalışmaya rastlanmamıştır.

BDNF geni insanda (~67 kb) insanda kromozom 11'de bulunur ve 13.5 kDa'luk dimerik bir protein kodlamaktadır (Kazak ve Yarim, 2015). BDNF, beyinde akson hedeflemesi, nöron büyümesi, gelişim sırasında sinapsların olgunlaşması ve sinaptik plastisite gibi birçok önemli görevi bulunmaktadır (Autry ve Monteggia, 2012; Pisani vd., 2023). Değişen *BDNF* ekspresyonun ve BDNF protein düzeyinin insanda alzheimer, parkinson, huntington, amyotrofik lateral skleroz, multiple skleroz, iskemik inme, anksiyete, major depresif bozukluk, bipolar bozukluk ve şizofreni gibi birçok nörodejeneratif ve

psikiyatrik hastalıkla ilişkili olduğu literatürde detaylı bir şekilde açıklanmaktadır (Autry ve Monteggia, 2012; Di Carlo vd., 2019; Eyileten vd., 2021; Petersen vd., 2021; Gao vd., 2022; Geng vd., 2023; Vacaras vd., 2024).

Literatürde, miR-191-5p'nin *Bdnf*'yi hedefleyerek gen ekspresyonunu inhibe ettiğini gösteren birçok çalışma raporlanmıştır. Bu çalışmalardan biri Wu vd. (2021) tarafından Serebral Enfarktüs hastalığının modellendiği farelerde gerçekleştirilmiştir. Çalışmada farelerde orta serebral arter tıkanıklığı yaratıldıktan sonra farelerin miR-191-5p ekspresyonunun arttığı ve *Bdnf* ekspresyonunun azaldığı görülmüştür. Yine aynı çalışmada lusiferaz raportör assayle miR-191-5p'nin *Bdnf*'yi hedeflediği gösterilmiştir. Başka bir çalışmada ise paradoksal uyku yoksunluğu yaşatılmış farelerin hipokampusunda miR-191-5p ekspresyonu artarken *Bdnf* ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir (Mohammadipoor-Ghasemabad vd., 2019). Son zamanlarda yapılan başka bir çalışmada ise izofluran uygulaması sonrası farelerde miR-191-5p ekspresyonun azaldığı ve *Bdnf* ekspresyonun arttığı raporlanmıştır (Li vd., 2021). Çalışmada gerçekleştirilen lusiferaz raportör assay ve miR-191-5p inhibitörü uygulaması sonrasında miR-191-5p'nin *Bdnf*'yi hedeflediği raporlanmıştır (Li vd., 2021). Bahsedilen çalışmadaki bulgularla benzer şekilde, süt grubunda miR-191-5p ile Bdnf ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki gözlemlenmiştir. Ancak, diğer gruplarda (su ve tüm grup) benzer sonuçlar gözlemlenmemiştir. Bu durumun daha detaylı olarak incelenmesi ve uzun dönem süt tüketiminde yaşanan moleküler değişikliklerin araştırılması gerekmektedir.

SETD1B geni insanda 12. kromozomun q kolunda 24.31 konumunda bulunmaktadır. *SETD1B* geni 130 kDa'luk bir protein kodlamaktadır (Chen vd., 2019). Bu protein, lys4'te trimetillenmiş histon H3 üreten histon metiltransferaz kompleksinin önemli bir bileşenidir ve birçok biyolojik süreçte rol oynadığı literatürde gösterilmiştir (Chen vd., 2019). SETD1B'nin sinaptik plastisitede ve öğrenmede rol oynayan hipokampal uyarıcı nöronal fonksiyonunu düzenlediği, hafıza konsolidasyonunu ve nöronal kimlik genlerinin ifadesini kontrol ettiği literatürde detaylı bir şekilde raporlanmıştır (Michurina vd., 2020; Michurina vd., 2022). Artan *SETD1B* ekspresyonun hepatosellüler karsinomda kötü prognoza sebep olabileceği görülmüştür (Chen vd., 2019). *SETD1B* geninde gözlemlenen

varyasyonların SETD1B ile ilişkili nörogelişimsel bozukluk ismi verilen nörogelişimsel bir hastalığa sebep olduğu bilinmektedir (Weerts vd., 2021; Tiwari vd., 2024). Bu patolojik durumlar dışında SETD1B psikiyatrik hastalıkların tedavisinde kullanılma potansiyeli olan önemli bir moleküldür (Zhu vd., 2020).

Literatürde miR-191-5p'nin *SETD1B'*yi hedefleyerek gen ekspresyonunu inhibe ettiğine dair kanıtlar sunan bir adet çalışma bulunmaktadır. Çalışmada 120 meme kanseri hastasının kanserli dokularında miR-191-5p'nin arttığı ve *SETD1B* ekspresyonunda düştüğü raporlanmıştır (Majed, 2022). Bu çalışma harici birçok miRNA hedef tahmini algoritması tarafından miR-191-5p'nin *SETD1B*'yi hedeflediği literatürde raporlanmıştır (Majed, 2022). Yapılmış olan bu tez çalışmasında süt ve tüm grupta gerçekleştirilen linear regresyon analizi sonucunda beyin dokusunda miR-191-5p ve *Setd1b* ekspresyonu arasında negatif yönde bir ilişki olduğu görülmüştür. Kan örneklerinde ise su ve tüm grupta benzeri anlamlılık görülürken süt grubunda istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar elde edilmemiştir.

Gerçekleştirilmiş olan tez çalışmasının bazı limitasyonları bulunmaktadır. Bu limitasyonlar, miR-191-5p geçişinin inek ve farede homolog olması kaynaklı net kanıtlarla gösterilmemiş olması, miR-191-5p'nin beyin dokusunun hangi kısmına ve nasıl geçiş yaptığının incelenememiş olması ve dolaşımdaki miR-191-5p'nin diğer doku ve organlara geçişinin incelenememiş olmasıdır. İleriki çalışmalarda miR-191-5p'nin biyotin veya floresan boyalar ile işaretlenerek farelere verilmesi ve diğer doku/organlara geçişinin incelenmesi geçiş sürecinin daha iyi anlaşılması için büyük önem taşımaktadır. Bununla beraber çalışmamızda tek seferlik süt tüketiminin etkileri incelenmiştir. İleriki çalışmalarda, düzenli ve uzun süreli süt tüketiminin etkilerinin araştırılması, süt içeriğindeki miR-191'in yaratacağı moleküler etkilerin daha iyi anlaşılmasını sağlayabilir.

Özetle bu tez çalışması kapsamında inek sütü içeriğindeki miR-191'in fare dolaşımına/beyin dokusuna geçebileceğine ve fonksiyonel etki gösterebileceğine dair ön veriler elde edilmiş olup bu sonuçların daha hassas teknikler kullanılarak valide edilmesi gerekmektedir.

KAYNAKLAR

Alarcón, C. R., Lee, H., Goodarzi, H., Halberg, N., & Tavazoie, S. F. (2015). N6-methyladenosine marks primary microRNAs for processing. *Nature*, *519*(7544), 482–485. https://doi.org/10.1038/nature14281

Alothman, M., Hogan, S. A., Hennessy, D., Dillon, P., Kilcawley, K. N., O'Donovan, M., Tobin, J., Fenelon, M. A., & O'Callaghan, T. F. (2019). The "Grass-Fed" Milk Story: Understanding the Impact of Pasture Feeding on the Composition and Quality of Bovine Milk. *Foods (Basel, Switzerland)*, *8*(8), 350. https://doi.org/10.3390/foods8080350

Alsaweed, M., Lai, C., Hartmann, P., Geddes, D., & Kakulas, F. (2016). Human Milk Cells Contain Numerous miRNAs that May Change with Milk Removal and Regulate Multiple Physiological Processes. *International Journal of Molecular Sciences*, *17*(6), 956. https://doi.org/10.3390/ijms17060956

Aquilano, K., Ceci, V., Gismondi, A., De Stefano, S., Iacovelli, F., Faraonio, R., Di Marco, G., Poerio, N., Minutolo, A., Minopoli, G., Marcone, A., Fraziano, M., Tortolici, F., Sennato, S., Casciardi, S., Potestà, M., Bernardini, R., Mattei, M., Falconi, M., Montesano, C., Rufini, S., Canini, A., & Lettieri-Barbato, D. (2019). Adipocyte metabolism is improved by TNF receptor-targeting small RNAs identified from dried nuts. *Communications Biology*, *2*(1), 317. https://doi.org/10.1038/s42003-019-0563-7

Autry, A. E., & Monteggia, L. M. (2012). Brain-Derived Neurotrophic Factor and Neuropsychiatric Disorders. *Pharmacological Reviews*, *64*(2), 238–258. https://doi.org/10.1124/pr.111.005108

Bae, I.-S., & Kim, S. H. (2025). Exosome-Derived miR-11987 in Bovine Milk Inhibits Obesity Through Browning of White Fat. *International Journal of Molecular Sciences*, *26*(13), 6006. https://doi.org/10.3390/ijms26136006

Bağcı, F. A., & Pirim, D. (2024). Sütün kaynatılmasının süt miR-191 düzeyine etkisinin araştırılması. *Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi*, *28*(3), 480–488. https://doi.org/10.29050/harranziraat.1409969

Bağcı, F. A., & Pirim, D., (2023). The Effects of Boiling Treatment on the miR-191-5p Levels in Bovine Milk. 3rd International Congress on Scientific Advances

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

Banks, W. A., Sharma, P., Bullock, K. M., Hansen, K. M., Ludwig, N., & Whiteside, T. L. (2020). Transport of Extracellular Vesicles across the Blood-Brain Barrier: Brain Pharmacokinetics and Effects of Inflammation. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(12), 4407. https://doi.org/10.3390/ijms21124407

Bofill-De Ros, X., & Vang Ørom, U. A. (2024). Recent progress in miRNA biogenesis and decay. *RNA Biology*, *21*(1), 1–8. https://doi.org/10.1080/15476286.2023.2288741

Brownawell, A. M., & Macara, I. G. (2002). Exportin-5, a novel karyopherin, mediates nuclear export of double-stranded RNA binding proteins. *The Journal of Cell Biology*, *156*(1), 53–64. https://doi.org/10.1083/jcb.200110082

Cavalieri, D., Rizzetto, L., Tocci, N., Rivero, D., Asquini, E., Si-Ammour, A., Bonechi, E., Ballerini, C., & Viola, R. (2016). Plant microRNAs as novel immunomodulatory agents. *Scientific Reports*, *6*(1), 25761. https://doi.org/10.1038/srep25761

Chandradoss, S. D., Schirle, N. T., Szczepaniak, M., MacRae, I. J., & Joo, C. (2015). A Dynamic Search Process Underlies MicroRNA Targeting. *Cell*, *162*(1), 96–107. https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.06.032

Chen, D., Li, T., Wang, C., Lei, G., Wang, R., Wang, Z., Yu, L., Yan, J., Zhang, P., Wang, X., Zhang, S., & Yang, P. (2019). High-level SETD1B gene expression is associated with unfavorable prognosis in hepatocellular carcinoma. *Molecular Medicine Reports*. https://doi.org/10.3892/mmr.2019.9832

Chen, Q., Zhang, F., Dong, L., Wu, H., Xu, J., Li, H., Wang, J., Zhou, Z., Liu, C., Wang, Y., Liu, Y., Lu, L., Wang, C., Liu, M., Chen, X., Wang, C., Zhang, C., Li, D., Zen, K., Wang, F., Zhang, Q., & 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

Chen, X., Ba, Y., Ma, L., Cai, X., Yin, Y., Wang, K., Guo, J., Zhang, Y., Chen, J., Guo, X., Li, Q., Li, X., Wang, W., Zhang, Y., Wang, J., Jiang, X., Xiang, Y., Xu, C., Zheng, P., Zhang, J., Li, R., Zhang, H., Shang, X., Gong, T., Ning, G., Wang, J., Zen, K., Zhang, J., & Zhang, C.-Y. (2008). Characterization of microRNAs in serum: A novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Research*, *18*(10), 997–1006. https://doi.org/10.1038/cr.2008.282

Chendrimada, T. P., Gregory, R. I., Kumaraswamy, E., Norman, J., Cooch, N., Nishikura, K., & Shiekhattar, R. (2005). TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature*, *436*(7051), 740–744. https://doi.org/10.1038/nature03868

Chin, A. R., Fong, M. Y., Somlo, G., Wu, J., Swiderski, P., Wu, X., & Wang, S. E. (2016). Cross-kingdom inhibition of breast cancer growth by plant miR159. *Cell Research*, *26*(2), 217–228. https://doi.org/10.1038/cr.2016.13

Denli, A. M., Tops, B. B. J., Plasterk, R. H. A., Ketting, R. F., & Hannon, G. J. (2004). Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature*, *432*(7014), 231–235. https://doi.org/10.1038/nature03049

Di Carlo, P., Punzi, G., & Ursini, G. (2019). Brain-derived neurotrophic factor and schizophrenia. *Psychiatric Genetics*, *29*(5), 200–210. https://doi.org/10.1097/YPG.0000000000000237

Dong, Q., Hu, B., & Zhang, C. (2022). microRNAs and Their Roles in Plant Development. *Frontiers in Plant Science*, *13*, 824240. https://doi.org/10.3389/fpls.2022.824240

Eyileten, C., Sharif, L., Wicik, Z., Jakubik, D., Jarosz-Popek, J., Soplinska, A., Postula, M., Czlonkowska, A., Kaplon-Cieslicka, A., & Mirowska-Guzel, D. (2021). The Relation of the Brain-Derived Neurotrophic Factor with MicroRNAs in Neurodegenerative Diseases and Ischemic Stroke. *Molecular Neurobiology*, *58*(1), 329–347. https://doi.org/10.1007/s12035-020-02101-2

Frank, F., Sonenberg, N., & Nagar, B. (2010). Structural basis for 5'-nucleotide base-specific recognition of guide RNA by human AGO2. *Nature*, *465*(7299), 818–822. https://doi.org/10.1038/nature09039

Freiría-Martínez, L., Iglesias-Martínez-Almeida, M., Rodríguez-Jamardo, C., Rivera-Baltanás, T., Comís-Tuche, M., Rodrígues-Amorím, D., Fernández-Palleiro, P., Blanco-Formoso, M., Diz-Chaves, Y., González-Freiria, N., Suárez-Albo, M., Martín-Forero-Maestre, M., Durán Fernández-Feijoo, C., Fernández-Lorenzo, J. R., Concheiro Guisán, A., & Olivares, J. M., Spuch, C. (2023). Human Breast Milk microRNAs, Potential Players in the Regulation of Nervous System. *Nutrients*, *15*(14), 3284. https://doi.org/10.3390/nu15143284

Fu, X., Dong, B., Tian, Y., Lefebvre, P., Meng, Z., Wang, X., Pattou, F., Han, W., Wang, X., Lou, F., Jove, R., Staels, B., Moore, D. D., & Huang, W. (2015). MicroRNA-26a regulates insulin sensitivity and metabolism of glucose and lipids. *The Journal of Clinical Investigation*, *125*(6), 2497–2509. https://doi.org/10.1172/JCI75438

Gao, L., Zhang, Y., Sterling, K., & Song, W. (2022). Brain-derived neurotrophic factor in Alzheimer's disease and its pharmaceutical potential. *Translational Neurodegeneration*, *11*(1), 4. https://doi.org/10.1186/s40035-022-00279-0

Geng, X., Zou, Y., Li, J., Li, S., Qi, R., Yu, H., & Zhong, L. (2023). BDNF alleviates Parkinson's disease by promoting STAT3 phosphorylation and regulating neuronal autophagy. *Cell and Tissue Research*, *393*(3), 455–470. https://doi.org/10.1007/s00441-023-03806-1

Goedeke, L., Vales-Lara, F. M., Fenstermaker, M., Cirera-Salinas, D., Chamorro-Jorganes, A., Ramírez, C. M., Mattison, J. A., de Cabo, R., Suárez, Y., & Fernández-Hernando, C. (2013). A Regulatory Role for MicroRNA 33* in Controlling Lipid Metabolism Gene Expression. *Molecular and Cellular Biology*, *33*(11), 2339–2352. https://doi.org/10.1128/MCB.01714-12

Golan-Gerstl, R., Elbaum Shiff, Y., Moshayoff, V., Schecter, D., Leshkowitz, D., & Reif, S. (2017). Characterization and biological function of milk-derived miRNAs. *Molecular Nutrition & Food Research*, *61*(10), 1700009. https://doi.org/10.1002/mnfr.201700009

Han, J., Lee, Y., Yeom, K.-H., Kim, Y.-K., Jin, H., & Kim, V. N. (2004). The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes & Development*, *18*(24), 3016–3027. https://doi.org/10.1101/gad.1262504

Haney, M. J., Klyachko, N. L., Zhao, Y., Gupta, R., Plotnikova, E. G., He, Z., Patel, T., Piroyan, A., Sokolsky, M., Kabanov, A. V., & Batrakova, E. V. (2015). Exosomes as drug delivery vehicles for Parkinson's disease therapy. *Journal of Controlled Release*, *207*, 18–30. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.03.033

Hou, D., He, F., Ma, L., Cao, M., Zhou, Z., Wei, Z., Xue, Y., Sang, X., Chong, H., Tian, C., Zheng, S., Li, J., Zen, K., Chen, X., Hong, Z., Zhang, C.-Y. & Jiang, X. (2018). The potential atheroprotective role of plant MIR156a as a repressor of monocyte recruitment on inflamed human endothelial cells. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 57, 197–205. https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2018.03.026

Hatmal, M. M., Al-Hatamleh, M. A. I., Olaimat, A. N., Alshaer, W., Hasan, H., Albakri, K. A., Alkhafaji, E., Issa, N. N., Al-Holy, M. A., Abderrahman, S. M., Abdallah, A. M., & Mohamud, R. (2022). Immunomodulatory Properties of Human Breast Milk: MicroRNA Contents and Potential Epigenetic Effects. *Biomedicines*, *10*(6), 1219. https://doi.org/10.3390/biomedicines10061219

Huang, Y., Liu, H., Sun, X., Ding, M., Tao, G., & Li, X. (2019). Honeysuckle-derived microRNA2911 directly inhibits varicella-zoster virus replication by targeting

IE62 gene. *Journal of Neurovirology*, *25*(4), 457–463. https://doi.org/10.1007/s13365-019-00741-2

Hutter, K., Lohmüller, M., Jukic, A., Eichin, F., Avci, S., Labi, V., Szabo, T. G., Hoser, S. M., Hüttenhofer, A., Villunger, A., & Herzog, S. (2020). SAFB2 Enables the Processing of Suboptimal Stem-Loop Structures in Clustered Primary miRNA Transcripts. *Molecular Cell*, *78*(5), 876-889.e6. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.05.011

Iwakawa, H.-O., & Tomari, Y. (2022). Life of RISC: Formation, action, and degradation of RNA-induced silencing complex. *Molecular Cell*, *82*(1), 30–43. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2021.11.026

Johnnidis, J. B., Harris, M. H., Wheeler, R. T., Stehling-Sun, S., Lam, M. H., Kirak, O., Brummelkamp, T. R., Fleming, M. D., & Camargo, F. D. (2008). Regulation of progenitor cell proliferation and granulocyte function by microRNA-223. *Nature*, *451*(7182), 1125–1129. https://doi.org/10.1038/nature06607

Jordan, S. D., Krüger, M., Willmes, D. M., Redemann, N., Wunderlich, F. T., Brönneke, H. S., Merkwirth, C., Kashkar, H., Olkkonen, V. M., Böttger, T., Braun, T., Seibler, J., & Brüning, J. C. (2011). Obesity-induced overexpression of miRNA-143 inhibits insulin-stimulated AKT activation and impairs glucose metabolism. *Nature Cell Biology*, *13*(4), 434–446. https://doi.org/10.1038/ncb2211

Kiezun, A., Artzi, S., Modai, S., Volk, N., Isakov, O., & Shomron, N. (2012). miRviewer: A multispecies microRNA homologous viewer. *BMC Research Notes*, *5*(1), 92. https://doi.org/10.1186/1756-0500-5-92

Kozomara, A., Birgaoanu, M., & Griffiths-Jones, S. (2019). miRBase: from microRNA sequences to function. *Nucleic Acids Research*, 47(D1), D155–D162. https://doi.org/10.1093/nar/gky1141

Kunz, T. H., & Hosken, D. J. (2009). Male lactation: Why, why not and is it care? *Trends in Ecology & Evolution*, *24*(2), 80–85. https://doi.org/10.1016/j.tree.2008.09.009

Kwon, S. C., Jang, H., Shen, S., Baek, S. C., Kim, K., Yang, J., Kim, J., Kim, J.-S., Wang, S., Shi, Y., Li, F., & Kim, V. N. (2020). ERH facilitates microRNA maturation through the interaction with the N-terminus of DGCR8. *Nucleic Acids Research*, *48*(19), 11097–11112. https://doi.org/10.1093/nar/gkaa827

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

Leroux, C., Chervet, M. L., & German, J. B. (2021). Perspective: Milk microRNAs as Important Players in Infant Physiology and Development. *Advances in Nutrition*, *12*(5), 1625–1635. https://doi.org/10.1093/advances/nmab059

Li, H., Du, M., Xu, W., & Wang, Z. (2021). MiR-191 downregulation protects against isoflurane-induced neurotoxicity through targeting *BDNF*. *Toxicology Mechanisms and Methods*, *31*(5), 367–373. https://doi.org/10.1080/15376516.2021.1886211

Li, M., Chen, T., He, J.-J., Wu, J.-H., Luo, J.-Y., Ye, R.-S., Xie, M.-Y., Zhang, H.-J., Zeng, B., Liu, J., Xi, Q.-Y., Jiang, Q.-Y., Sun, J.-J., & Zhang, Y.-L. (2019). Plant MIR167e-5p Inhibits Enterocyte Proliferation by Targeting β-Catenin. *Cells*, *8*(11), 1385. https://doi.org/10.3390/cells8111385

Li, X., Huang, Y., Sun, M., Ji, H., Dou, H., Hu, J., Yan, Y., Wang, X., & Chen, L. (2018). Honeysuckle-encoded microRNA2911 inhibits Enterovirus 71 replication via

targeting VP1 gene. *Antiviral Research*, *152*, 117–123. https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2018.02.015

Li, Z., Xu, R., & Li, N. (2018). MicroRNAs from plants to animals, do they define a new messenger for communication? *Nutrition & Metabolism*, *15*(1), 68. https://doi.org/10.1186/s12986-018-0305-8

Liang, H., Zhang, S., Fu, Z., Wang, Y., Wang, N., Liu, Y., Zhao, C., Wu, J., Hu, Y., Zhang, J., Chen, X., Zen, K., & Zhang, C.-Y. (2015). Effective detection and quantification of dietetically absorbed plant microRNAs in human plasma. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, *26*(5), 505–512. https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2014.12.002

Lichołai, S., Studzińska, D., Plutecka, H., Gubała, T., Szczeklik, W., & Sanak, M. (2021). MiR-191 as a Key Molecule in Aneurysmal Aortic Remodeling. *Biomolecules*, *11*(11), 1611. https://doi.org/10.3390/biom11111611

Liu, C., Xu, M., Yan, L., Wang, Y., Zhou, Z., Wang, S., Sun, Y., Zhang, J., & Dong, L. (2021). Honeysuckle-derived microRNA2911 inhibits tumor growth by targeting TGF-β1. *Chinese Medicine*, *16*(1), 49. https://doi.org/10.1186/s13020-021-00453-y

Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif.)*, 25(4), 402–408. https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262

Lukasik, A., Brzozowska, I., Zielenkiewicz, U., & Zielenkiewicz, P. (2018). Detection of Plant miRNAs Abundance in Human Breast Milk. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(1), 37. https://doi.org/10.3390/ijms19010037

Lv, X., Jiang, H., Liu, Y., Lei, X., & Jiao, J. (2014). MicroRNA-15b promotes neurogenesis and inhibits neural progenitor proliferation by directly repressing TET3 during early neocortical development. *EMBO Reports*, *15*(12), 1305–1314. https://doi.org/10.15252/embr.201438923

Ma, F., Xu, S., Liu, X., Zhang, Q., Xu, X., Liu, M., Hua, M., Li, N., Yao, H., & Cao, X. (2011). The microRNA miR-29 controls innate and adaptive immune responses to intracellular bacterial infection by targeting interferon-γ. *Nature Immunology*, *12*(9), 861–869. https://doi.org/10.1038/ni.2073

Majed, S. O. (2022). RNA Sequencing-Based Total RNA Profiling; The Oncogenic MiR-191 Identification as a Novel Biomarker for Breast Cancer. *Cellular and Molecular Biology*, *68*(1), 177–191. https://doi.org/10.14715/cmb/2022.68.1.22

Martino, E., D'Onofrio, N., Balestrieri, A., Colloca, A., Anastasio, C., Sardu, C., Marfella, R., Campanile, G., & Balestrieri, M. L. (2024). Dietary Epigenetic Modulators: Unravelling the Still-Controversial Benefits of miRNAs in Nutrition and Disease. *Nutrients*, *16*(1), 160. https://doi.org/10.3390/nu16010160

Marzano, F., Caratozzolo, M. F., Consiglio, A., Licciulli, F., Liuni, S., Sbisà, E., D'Elia, D., Tullo, A., & Catalano, D. (2020). Plant miRNAs Reduce Cancer Cell Proliferation by Targeting MALAT1 and NEAT1: A Beneficial Cross-Kingdom Interaction. *Frontiers in Genetics*, *11*, 552490. https://doi.org/10.3389/fgene.2020.552490

Matranga, C., Tomari, Y., Shin, C., Bartel, D. P., & Zamore, P. D. (2005). Passenger-strand cleavage facilitates assembly of siRNA into Ago2-containing RNAi enzyme complexes. *Cell*, *123*(4), 607–620. https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.08.044

McGeary, S. E., Lin, K. S., Shi, C. Y., Pham, T. M., Bisaria, N., Kelley, G. M., & Bartel, D. P. (2019). The biochemical basis of microRNA targeting efficacy. *Science (New York, N.Y.)*, 366(6472), eaav1741. https://doi.org/10.1126/science.aav1741

Medley, J. C., Panzade, G., & Zinovyeva, A. Y. (2021). microRNA strand selection: Unwinding the rules. *Wiley Interdisciplinary Reviews. RNA*, *12*(3), e1627. https://doi.org/10.1002/wrna.1627

Melnik, B. C., & Schmitz, G. (2017). MicroRNAs: Milk's epigenetic regulators. *Best Practice & Research. Clinical Endocrinology & Metabolism*, *31*(4), 427–442. https://doi.org/10.1016/j.beem.2017.10.003

Melnik, B. C., & Schmitz, G. (2019). Exosomes of pasteurized milk: Potential pathogens of Western diseases. *Journal of Translational Medicine*, *17*(1), 3. https://doi.org/10.1186/s12967-018-1760-8

Melnik, B. C., Stremmel, W., Weiskirchen, R., John, S. M., & Schmitz, G. (2021). Exosome-Derived MicroRNAs of Human Milk and Their Effects on Infant Health and Development. *Biomolecules*, *11*(6), 851. https://doi.org/10.3390/biom11060851

Mendell, J. T. (2008). miRiad Roles for the miR-17-92 Cluster in Development and Disease. *Cell*, *133*(2), 217–222. https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.04.001

Michurina, A., Sakib, M. S., Kerimoglu, C., Krüger, D. M., Kaurani, L., Islam, M. R., Joshi, P. D., Schröder, S., Centeno, T. P., Zhou, J., Pradhan, R., Cha, J., Xu, X., Eichele, G., Zeisberg, E. M., Kranz, A., Stewart, A. F., & Fischer, A. (2022). Postnatal expression of the lysine methyltransferase SETD1B is essential for learning and the regulation of neuron-enriched genes. *The EMBO Journal*, *41*(1), e106459. https://doi.org/10.15252/embj.2020106459

Michurina, A., Sakib, S., Kerimoglu, C., Krüger, D. M., Kaurani, L., Islam, R., Centeno, T. P., Cha, J., Xu, X., Zeisberg, E. M., Kranz, A., Stewart, F. A., & Fischer, A. (2020). *SETD1B controls cognitive function via cell type specific regulation of neuronal identity genes*. Neuroscience. https://doi.org/10.1101/2020.08.07.240853

Minutolo, A., Potestà, M., Gismondi, A., Pirrò, S., Cirilli, M., Gattabria, F., Galgani, A., Sessa, L., Mattei, M., Canini, A., Muleo, R., Colizzi, V., & Montesano, C. (2018). Olea europaea small RNA with functional homology to human miR34a in cross-kingdom interaction of anti-tumoral response. *Scientific Reports*, *8*(1), 12413. https://doi.org/10.1038/s41598-018-30718-w

Minutolo, A., Potestà, M., Roglia, V., Cirilli, M., Iacovelli, F., Cerva, C., Fokam, J., Desideri, A., Andreoni, M., Grelli, S., Colizzi, V., Muleo, R., & Montesano, C. (2020). Plant microRNAs from Moringa oleifera Regulate Immune Response and HIV Infection. *Frontiers in Pharmacology*, *11*, 620038. https://doi.org/10.3389/fphar.2020.620038

Mohammadipoor-Ghasemabad, L., Sangtarash, M. H., Sheibani, V., Sasan, H. A., & Esmaeili-Mahani, S. (2019). Hippocampal microRNA-191a-5p Regulates BDNF Expression and Shows Correlation with Cognitive Impairment Induced by Paradoxical Sleep Deprivation. *Neuroscience*, *414*, 49–59. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2019.06.037

Monteys, A. M., Spengler, R. M., Wan, J., Tecedor, L., Lennox, K. A., Xing, Y., & Davidson, B. L. (2010). Structure and activity of putative intronic miRNA

promoters. *RNA (New York, N.Y.)*, *16*(3), 495–505. https://doi.org/10.1261/rna.1731910

Nagpal, N., & Kulshreshtha, R. (2014). miR-191: An emerging player in disease biology. *Frontiers in Genetics*, *5*. https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00099

Naruse, K., Matsuura-Suzuki, E., Watanabe, M., Iwasaki, S., & Tomari, Y. (2018). In vitro reconstitution of chaperone-mediated human RISC assembly. *RNA (New York, N.Y.)*, *24*(1), 6–11. https://doi.org/10.1261/rna.063891.117

O'Brien, J., Hayder, H., Zayed, Y., & Peng, C. (2018). Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Frontiers in Endocrinology*, *9*. https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00402

Oftedal, O. T. (2020). The Evolution of Lactation in Mammalian Species. In P. L. Ogra, W. A. Walker, & B. Lönnerdal (Eds.), *Nestlé Nutrition Institute Workshop Series* (Vol. 94, pp. 1–10). S. Karger AG. https://doi.org/10.1159/000505577

Okada, C., Yamashita, E., Lee, S. J., Shibata, S., Katahira, J., Nakagawa, A., Yoneda, Y., & Tsukihara, T. (2009). A high-resolution structure of the pre-microRNA nuclear export machinery. *Science (New York, N.Y.)*, *326*(5957), 1275–1279. https://doi.org/10.1126/science.1178705

Pan, L., Liu, W., Zhao, H., Chen, B., & Yue, X. (2023). MiR-191-5p inhibits KLF6 to promote epithelial-mesenchymal transition in breast cancer. *Technology and Health Care*, *31*(6), 2251–2265. https://doi.org/10.3233/THC-230217

Pasculli, E., Gadaleta, R. M., Arconzo, M., Cariello, M., & Moschetta, A. (2024). The Role of Exogenous microRNAs on Human Health: The Plant–Human Trans-Kingdom Hypothesis. *Nutrients*, *16*(21), 3658. https://doi.org/10.3390/nu16213658

Peck, B. C. E., Sincavage, J., Feinstein, S., Mah, A. T., Simmons, J. G., Lund, P. K., & Sethupathy, P. (2016). miR-30 Family Controls Proliferation and Differentiation of Intestinal Epithelial Cell Models by Directing a Broad Gene Expression Program That Includes SOX9 and the Ubiquitin Ligase Pathway. *Journal of Biological Chemistry*, *291*(31), 15975–15984. https://doi.org/10.1074/jbc.M116.733733

Petersen, N. A., Nielsen, M. Ø., Coello, K., Stanislaus, S., Melbye, S., Kjærstad, H. L., Sletved, K. S. O., McIntyre, R. S., Frikke-Smith, R., Vinberg, M., & Kessing, L. V. (2021). Brain-derived neurotrophic factor levels in newly diagnosed patients with bipolar disorder, their unaffected first-degree relatives and healthy controls. *BJPsych Open*, *7*(2), e55. https://doi.org/10.1192/bjo.2021.9

Pillman, K. A., Phillips, C. A., Roslan, S., Toubia, J., Dredge, B. K., Bert, A. G., Lumb, R., Neumann, D. P., Li, X., Conn, S. J., Liu, D., Bracken, C. P., Lawrence, D. M., Stylianou, N., Schreiber, A. W., Tilley, W. D., Hollier, B. G., Khew-Goodall, Y., Selth, L. A., Goodall, G. J., & Gregory, P. A. (2018). miR-200/375 control epithelial plasticity-associated alternative splicing by repressing the RNA-binding protein Quaking. *The EMBO Journal*, *37*(13), e99016. https://doi.org/10.15252/embj.201899016

Pirim, D., Gözüdok, İ. N., Çobanoğlu, Ö., Güldaş, M., & Gürbüz, O. (2025). Impacts of milk processing and fermentation on microRNA levels in cow's milk. *Food and Health*, *11*(2), 127–138. https://doi.org/10.3153/FH25010

Pisani, A., Paciello, F., Del Vecchio, V., Malesci, R., De Corso, E., Cantone, E., & Fetoni, A. R. (2023). The Role of BDNF as a Biomarker in Cognitive and Sensory

Neurodegeneration. *Journal of Personalized Medicine*, *13*(4), 652. https://doi.org/10.3390/jpm13040652

Porcel-Pastrana, F., Montero-Hidalgo, A. J., Herrero-Aguayo, V., Sáez-Martínez, P., Perez-Gómez, J. M., Sarmento-Cabral, A., Campos-Hernández, J. P., Rangel-Zuñiga, O. A., Carrasco-Valiente, J., Martínez-Fuentes, A. J., Gahete, M. D., Gómez-Gómez, E., & Luque, R. M. (2025). miR-191–5p: A tumour suppressor miRNA and a personalized biomarker and potential therapeutic tool connecting prostate cancer and obesity. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *189*, 118330. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2025.118330

Potestà, M., Roglia, V., Fanelli, M., Pietrobono, E., Gismondi, A., Vumbaca, S., Nguedia Tsangueu, R. G., Canini, A., Colizzi, V., Grelli, S., Minutolo, A., & Montesano, C. (2020). Effect of microvesicles from Moringa oleifera containing miRNA on proliferation and apoptosis in tumor cell lines. *Cell Death Discovery*, *6*, 43. https://doi.org/10.1038/s41420-020-0271-6

Premnath, V., & Veerappapillai, S. (2024). Unveiling miRNA–Gene Regulatory Axes as Promising Biomarkers for Liver Cirrhosis and Hepatocellular Carcinoma. *ACS Omega*, *9*(44), 44507–44521. https://doi.org/10.1021/acsomega.4c06551

Ramírez, C. M., Goedeke, L., Rotllan, N., Yoon, J.-H., Cirera-Salinas, D., Mattison, J. A., Suárez, Y., de Cabo, R., Gorospe, M., & Fernández-Hernando, C. (2013). MicroRNA 33 Regulates Glucose Metabolism. *Molecular and Cellular Biology*, *33*(15), 2891–2902. https://doi.org/10.1128/MCB.00016-13

Roglia, V., Potestà, M., Minchella, A., Bruno, S. P., Bernardini, R., Lettieri-Barbato, D., Iacovelli, F., Gismondi, A., Aquilano, K., Canini, A., Muleo, R., Colizzi, V., Mattei, M., Minutolo, A., & Montesano, C. (2022). Exogenous miRNAs from Moringa oleifera Lam. Recover a dysregulated lipid metabolism. *Frontiers in Molecular Biosciences*, *9*, 1012359. https://doi.org/10.3389/fmolb.2022.1012359

Roshan, R., Shridhar, S., Sarangdhar, M. A., Banik, A., Chawla, M., Garg, M., Singh, V. P., & Pillai, B. (2014). Brain-specific knockdown of miR-29 results in neuronal cell death and ataxia in mice. *RNA*, *20*(8), 1287–1297. https://doi.org/10.1261/rna.044008.113

Roy, D., Ye, A., Moughan, P. J., & Singh, H. (2020). Composition, Structure, and Digestive Dynamics of Milk From Different Species-A Review. *Frontiers in Nutrition*, *7*, 577759. https://doi.org/10.3389/fnut.2020.577759

Salomon, W. E., Jolly, S. M., Moore, M. J., Zamore, P. D., & Serebrov, V. (2015). Single-Molecule Imaging Reveals that Argonaute Reshapes the Binding Properties of Its Nucleic Acid Guides. *Cell*, *162*(1), 84–95. https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.06.029

Schirle, N. T., Sheu-Gruttadauria, J., & MacRae, I. J. (2014). Structural basis for microRNA targeting. *Science*, *346*(6209), 608–613. https://doi.org/10.1126/science.1258040

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

Schopp, I. M., Amaya Ramirez, C. C., Debeljak, J., Kreibich, E., Skribbe, M., Wild, K., & Béthune, J. (2017). Split-BioID a conditional proteomics approach to monitor the composition of spatiotemporally defined protein complexes. *Nature Communications*, *8*, 15690. https://doi.org/10.1038/ncomms15690

Schwarz, D. S., Hutvágner, G., Du, T., Xu, Z., Aronin, N., & Zamore, P. D. (2003). Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell*, *115*(2), 199–208. https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00759-1

Shang, R., Baek, S. C., Kim, K., Kim, B., Kim, V. N., & Lai, E. C. (2020). Genomic Clustering Facilitates Nuclear Processing of Suboptimal Pri-miRNA Loci. *Molecular Cell*, *78*(2), 303-316.e4. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.02.009

Shen, Y., Zhou, M., Yan, J., Gong, Z., Xiao, Y., Zhang, C., Du, P., & Chen, Y. (2017). miR-200b inhibits TNF-α-induced IL-8 secretion and tight junction disruption of intestinal epithelial cells in vitro. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, *312*(2), G123–G132. https://doi.org/10.1152/ajpgi.00316.2016

Stittrich, A.-B., Haftmann, C., Sgouroudis, E., Kühl, A. A., Hegazy, A. N., Panse, I., Riedel, R., Flossdorf, M., Dong, J., Fuhrmann, F., Heinz, G. A., Fang, Z., Li, N., Bissels, U., Hatam, F., Jahn, A., Hammoud, B., Matz, M., Schulze, F.-M., Baumgrass, R., Bosio, A., Mollenkopf, H.-J., Grün, J., Thiel, A., Chen, W., Höfer, T., Loddenkemper, C., Löhning, M., Chang, H.-D., Rajewsky, N., Radbruch, A., & Mashreghi, M.-F. (2010). The microRNA miR-182 is induced by IL-2 and promotes clonal expansion of activated helper T lymphocytes. *Nature Immunology*, *11*(11), 1057–1062. https://doi.org/10.1038/ni.1945

Sun, X., Lin, J., Zhang, Y., Kang, S., Belkin, N., Wara, A. K., Icli, B., Hamburg, N. M., Li, D., & Feinberg, M. W. (2016). MicroRNA-181b Improves Glucose Homeostasis and Insulin Sensitivity by Regulating Endothelial Function in White Adipose Tissue. *Circulation Research*, *118*(5), 810–821. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.308166

Taganov, K. D., Boldin, M. P., Chang, K.-J., & Baltimore, D. (2006). NF-κB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(33), 12481–12486. https://doi.org/10.1073/pnas.0605298103

Takamizawa, S., Kojima, J., Umezu, T., Kuroda, M., Hayashi, S., Maruta, T., Okamoto, A., & Nishi, H. (2023). miR-146a-5p and miR-191-5p as novel diagnostic marker candidates for ovarian clear cell carcinoma. *Molecular and Clinical Oncology*, *20*(2), 14. https://doi.org/10.3892/mco.2023.2712

Tao, C., & Guo, H. (2024). A decade later: Future perspectives on dietary microRNAs. *ExRNA*, *6*(1), 1–2. https://doi.org/10.55092/exrna20240004

Tiwari, R., Viswanathan, L. G., Chowdary, R. M., Kenchaiah, R., Asranna, A., & Sinha, S. (2024). Phenotypic spectrum of SETD1B-related disorder: Myoclonic absence seizures and concurrent intellectual disability - Insights from two cases. *Seizure: European Journal of Epilepsy*, *114*, 57–60. https://doi.org/10.1016/j.seizure.2023.11.021

Tremonte, P., Tipaldi, L., Succi, M., Pannella, G., Falasca, L., Capilongo, V., Coppola, R. & Sorrentino, E. (2014). Raw milk from vending machines: Effects of boiling, microwave treatment, and refrigeration on microbiological quality. *Journal of Dairy Science*, 97(6), 3314–3320. https://doi.org/10.3168/jds.2013-7744

Tsuboyama, K., Tadakuma, H., & Tomari, Y. (2018). Conformational Activation of Argonaute by Distinct yet Coordinated Actions of the Hsp70 and Hsp90 Chaperone Systems. *Molecular Cell*, *70*(4), 722-729.e4. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.04.010

Vacaras, V., Paraschiv, A.-C., Iluț, S., Vacaras, C., Nistor, C., Marin, G.-E., Schiopu, A. M., Nistor, D.-T., Vesa, Ștefan C., & Mureșanu, D. F. (2024). Brain-Derived Neurotrophic Factor in Multiple Sclerosis Disability: A Prospective Study. *Brain Sciences*, *14*(3), 243. https://doi.org/10.3390/brainsci14030243

Vigorito, E., Kohlhaas, S., Lu, D., & Leyland, R. (2013). miR-155: An ancient regulator of the immune system. *Immunological Reviews*, *253*(1), 146–157. https://doi.org/10.1111/imr.12057

Vistbakka, J., Sumelahti, M.-L., Lehtimäki, T., Elovaara, I., & Hagman, S. (2018). Evaluation of serum miR-191-5p, miR-24-3p, miR-128-3p, and miR-376c-3 in multiple sclerosis patients. *Acta Neurologica Scandinavica*, *138*(2), 130–136. https://doi.org/10.1111/ane.12921

Volobouеva, L. A., Sun, X., Xu, L., Ouyang, Y.-B., & Giffard, R. G. (2017). Distinct Effects of miR-210 Reduction on Neurogenesis: Increased Neuronal Survival of Inflammation But Reduced Proliferation Associated with Mitochondrial Enhancement. *Journal of Neuroscience*, *37*(11), 3072–3084. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1777-16.2017

Wang, J., Lee, J. E., Riemondy, K., Yu, Y., Marquez, S. M., Lai, E. C., & Yi, R. (2020). XPO5 promotes primary miRNA processing independently of RanGTP. *Nature Communications*, *11*(1), 1845. https://doi.org/10.1038/s41467-020-15598-x

Wang, L., Shui, X., Zhang, M., Mei, Y., Xia, Y., Lan, G., Hu, L., Gan, C.-L., Tian, Y., Li, R., Gu, X., Zhang, T., Chen, D., & Lee, T. H. (2022). MiR-191-5p Attenuates Tau Phosphorylation, Aβ Generation, and Neuronal Cell Death by Regulating Death-Associated Protein Kinase 1. *ACS Chemical Neuroscience*, *13*(24), 3554–3566. https://doi.org/10.1021/acschemneuro.2c00423

Wang, W., Hang, C., Zhang, Y., Chen, M., Meng, X., Cao, Q., Song, N., Itkow, J., Shen, F., & Yu, D. (2017). Dietary miR-451 protects erythroid cells from oxidative stress via increasing the activity of Foxo3 pathway. *Oncotarget*, *8*(63), 107109–107124. https://doi.org/10.18632/oncotarget.22346

Wang, X., Hao, L., Bu, H.-F., Scott, A. W., Tian, K., Liu, F., De Plaen, I. G., Liu, Y., Mirkin, C. A., & Tan, X.-D. (2016). Spherical nucleic acid targeting microRNA-99b enhances intestinal MFG-E8 gene expression and restores enterocyte migration in lipopolysaccharide-induced septic mice. *Scientific Reports*, *6*(1), 31687. https://doi.org/10.1038/srep31687

Wang, Y., Juranek, S., Li, H., Sheng, G., Wardle, G. S., Tuschl, T., & Patel, D. J. (2009). Nucleation, propagation and cleavage of target RNAs in Ago silencing complexes. *Nature*, 461(7265), 754–761. https://doi.org/10.1038/nature08434

Wang, Z., Lu, T., Li, X., Jiang, M., Jia, M., Liu, J., Zhang, D., Li, J., & Wang, L. (2022). Altered Expression of Brain-specific Autism-Associated miRNAs in the Han Chinese Population. *Frontiers in Genetics*, *13*, 865881. https://doi.org/10.3389/fgene.2022.865881

Warinner, C., Hendy, J., Speller, C., Cappellini, E., Fischer, R., Trachsel, C., Arneborg, J., Lynnerup, N., Craig, O. E., Swallow, D. M., Fotakis, A., Christensen, R. J., Olsen, J. V., Liebert, A., Montalva, N., Fiddyment, S., Charlton, S., Mackie, M., Canci, A., Bouwman, A., Rühli, F., Gilbert, M. T. P., & Collins, M. J. (2014). Direct evidence of milk consumption from ancient human dental calculus. *Scientific Reports*, *4*(1), 7104. https://doi.org/10.1038/srep07104

Weerts, M. J. A., Lanko, K., Guzmán-Vega, F. J., Jackson, A., Ramakrishnan, R., Cardona-Londoño, K. J., Peña-Guerra, K. A., Van Bever, Y., Van Paassen, B. W., Kievit, A., Van Slegtenhorst, M., Allen, N. M., Kehoe, C. M., Robinson, H. K., Pang, L., Banu, S. H., Zaman, M., Efthymiou, S., Houlden, H., Järvelä, I., Lauronen, L., Määttä, T., Schrauwen, I., Leal, S. M., Ruivenkamp, C. A. L., Barge-Schaapveld, D. Q. C. M., Peeters-Scholte, C. M. P. C. D., Galehdari, H., Mazaheri, N., Sisodiya, S. M., Harrison, V., Sun, A., Thies, J., Pedroza, L. A., Lara-Taranchenko, Y., Chinn, I. K., Lupski, J. R., Garza-Flores, A., McGlothlin, J., Yang, L., Huang, S., Wang, X., Jewett, T., Rosso, G., Lin, X., Mohammed, S., Merritt, J. L., Mirzaa, G. M., Timms, A. E., Scheck, J., Elting, M. W., Polstra, A. M., Schenck, L., Ruzhnikov, M. R. Z., Vetro, A., Montomoli, M., Guerrini, R., Koboldt, D. C., Mosher, T. M., Pastore, M. T., McBride, K. L., Peng, J., Pan, Z., Willemsen, M., Koning, S., Turnpenny, P. D., De Vries, B. B. A., Gilissen, C., Pfundt, R., Lees, M., Braddock, S. R., Klemp, K. C., Vansenne, F., Van Gijn, M. E., Quindipan, C., Deardorff, M. A., Hamm, J. A., Putnam, A. M., Baud, R., Walsh, L., Lynch, S. A., Baptista, J., Person, R. E., Monaghan, K. G., Crunk, A., Keller-Ramey, J., Reich, A., Elloumi, H. Z., Alders, M., Kerkhof, J., McConkey, H., Haghshenas, S., Maroofian, R., Sadikovic, B., Banka, S., Arold, S. T., & Barakat, T. S.(2021). Delineating the molecular and phenotypic spectrum of the SETD1B-related syndrome. *Genetics in Medicine*, *23*(11), 2122–2137. https://doi.org/10.1038/s41436-021-01246-2

Wilson, R. C., Tambe, A., Kidwell, M. A., Noland, C. L., Schneider, C. P., & Doudna, J. A. (2015). Dicer-TRBP complex formation ensures accurate mammalian microRNA biogenesis. *Molecular Cell*, *57*(3), 397–407. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.11.030

Wu, H.-Y., Li, M.-W., Li, Q.-Q., Pang, Y.-Y., Chen, G., Lu, H.-P., & Pan, S.-L. (2019). Elevation of miR-191-5p level and its potential signaling pathways in hepatocellular carcinoma: A study validated by microarray and in-house qRT-PCR with 1,291 clinical samples. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, *12*(4), 1439–1456.

Wu, Y., Yang, S., Zheng, Z., Pan, H., Jiang, Y., Bai, X., Liu, T., Deng, S., Li, Y. (2021). MiR-191-5p Disturbed the Angiogenesis in a Mice Model of Cerebral Infarction by Targeting Inhibition of BDNF. *Neurology India*, *69*(6), 1601–1607. https://doi.org/10.4103/0028-3886.333459

Wulczyn, F. G., Smirnova, L., Rybak, A., Brandt, C., Kwidzinski, E., Ninnemann, O., Strehle, M., Seiler, A., Schumacher, S., & Nitsch, R. (2007). Post-transcriptional regulation of the let-7 microRNA during neural cell specification. *The FASEB Journal*, *21*(2), 415–426. https://doi.org/10.1096/fj.06-6130com

Xie, W., Li, M., Xu, N., Lv, Q., Huang, N., He, J., & Zhang, Y. (2013). miR-181a Regulates Inflammation Responses in Monocytes and Macrophages. *PLOS ONE*, *8*(3), e58639. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058639

Xu, Y.-R., Zhao, J., Huang, H.-Y., Lin, Y.-C.-D., Lee, T.-Y., Huang, H.-D., Yang, Y., & Wang, Y.-F. (2024). Recent insights into breast milk microRNA: Their role as functional regulators. *Frontiers in Nutrition*, *11*, 1366435. https://doi.org/10.3389/fnut.2024.1366435

Yang, Y., Ma, Y., Shi, C., Chen, H., Zhang, H., Chen, N., Zhang, P., Wang, F., Yang, J., Yang, J., Zhu, Q., Liang, Y., Wu, W., Gao, R., Yang, Z., Zou, Y., & Qin, H.

(2013). Overexpression of miR-21 in patients with ulcerative colitis impairs intestinal epithelial barrier function through targeting the Rho GTPase RhoB. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *434*(4), 746–752. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.03.122

Yoda, M., Kawamata, T., Paroo, Z., Ye, X., Iwasaki, S., Liu, Q., & Tomari, Y. (2010). ATP-dependent human RISC assembly pathways. *Nature Structural & Molecular Biology*, *17*(1), 17–23. https://doi.org/10.1038/nsmb.1733

Yu, J., Zhou, A., & Li, Y. (2022). Clinical value of miR-191-5p in predicting the neurological outcome after out-of-hospital cardiac arrest. *Irish Journal of Medical Science (1971 -)*, *191*(4), 1607–1612. https://doi.org/10.1007/s11845-021-02745-6

Yu, W.-Y., Cai, W., Ying, H.-Z., Zhang, W.-Y., Zhang, H.-H., & Yu, C.-H. (2021). Exogenous Plant gma-miR-159a, Identified by miRNA Library Functional Screening, Ameliorated Hepatic Stellate Cell Activation and Inflammation via Inhibiting GSK-3β-Mediated Pathways. *Journal of Inflammation Research*, *14*, 2157–2172. https://doi.org/10.2147/JIR.S304828

Zhan, S., Wang, Y., & Chen, X. (2020). RNA virus-encoded microRNAs: Biogenesis, functions and perspectives on application. *ExRNA*, *2*(1), 15. https://doi.org/10.1186/s41544-020-00056-z

Zhang, L., Hou, D., Chen, X., Li, D., Zhu, L., Zhang, Y., Li, J., Bian, Z., Liang, X., Cai, X., Yin, Y., Wang, C., Zhang, T., Zhu, D., Zhang, D., Xu, J., Chen, Q., Ba, Y., Liu, J., Wang, Q., Chen, J., Wang, J., Wang, M., Zhang, Q., Zhang, J., Zen, K., & Zhang, C.-Y. (2012). Exogenous plant MIR168a specifically targets mammalian LDLRAP1: Evidence of cross-kingdom regulation by microRNA. *Cell Research*, *22*(1), 107–126. https://doi.org/10.1038/cr.2011.158

Zhang, W., Thevapriya, S., Kim, P. J., Yu, W.-P., Shawn Je, H., King Tan, E., & Zeng, L. (2014). Amyloid precursor protein regulates neurogenesis by antagonizing miR-574-5p in the developing cerebral cortex. *Nature Communications*, *5*(1), 3330. https://doi.org/10.1038/ncomms4330

Zhang, Y., Xu, Q., Hou, J., Huang, G., Zhao, S., Zheng, N., & Wang, J. (2022). Loss of bioactive microRNAs in cow's milk by ultra-high-temperature treatment but not by pasteurization treatment. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *102*(7), 2676–2685. https://doi.org/10.1002/jsfa.11607

Zheng, Y., Yang, Z., Jin, C., Chen, C., & Wu, N. (2021). Hsa-miR-191-5p inhibits replication of human immunodeficiency virus type 1 by downregulating the expression of NUP50. *Archives of Virology*, *166*(3), 755–766. https://doi.org/10.1007/s00705-020-04899-7

Zhou, B., Wang, S., Mayr, C., Bartel, D. P., & Lodish, H. F. (2007). miR-150, a microRNA expressed in mature B and T cells, blocks early B cell development when expressed prematurely. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *104*(17), 7080–7085. https://doi.org/10.1073/pnas.0702409104

Zhou, L.-K., Zhou, Z., Jiang, X.-M., Zheng, Y., Chen, X., Fu, Z., Xiao, G., Zhang, C.-Y., Zhang, L.-K., & Yi, Y. (2020). Absorbed plant MIR2911 in honeysuckle decoction inhibits SARS-CoV-2 replication and accelerates the negative conversion of infected patients. *Cell Discovery*, *6*(1), 54. https://doi.org/10.1038/s41421-020-00197-3

Zhou, Z., Li, X., Liu, J., Dong, L., Chen, Q., Liu, J., Kong, H., Zhang, Q., Qi, X., Hou, D., Zhang, L., Zhang, G., Liu, Y., Zhang, Y., Li, J., Wang, J., Chen, X., Wang, H., Zhang, J., Chen, H., Zen, K., & Zhang, C.-Y. (2015). Honeysuckle-encoded atypical microRNA2911 directly targets influenza A viruses. *Cell Research*, *25*(1), 39–49. https://doi.org/10.1038/cr.2014.130

Zhu, Y., Sun, D., Jakovcevski, M., & Jiang, Y. (2020). Epigenetic mechanism of SETDB1 in brain: Implications for neuropsychiatric disorders. *Translational Psychiatry*, *10*(1), 115. https://doi.org/10.1038/s41398-020-0797-7