

AHMET ÇELİK	DİCLE ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.	DOKTORA TEZİ	DIYARBAKIR-2023
-------------	------------------------------------	--------------	-----------------



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**FARKLI HAYVAN SÜTLERİNDE İNSAN SAĞLIĞI ÜZERİNE
ETKİLİ BAZI MİKRORNA'LARIN MİKTARININ TESPİTİ VE
FARKLI ISIL İŞLEMLERİN BU MİKRORNA'LARA ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Ahmet ÇELİK
DOKTORA TEZİ

BESİN/GIDA HİJYENİ ve TEKNOLOJİSİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. Aydın VURAL

DİYARBAKIR- 2023



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**FARKLI HAYVAN SÜTLERİNDE İNSAN SAĞLIĞI ÜZERİNE
ETKİLİ BAZI MİKRORNA'LARIN MİKTARININ TESPİTİ VE
FARKLI ISIL İŞLEMLERİN BU MİKRORNA'LARA ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Ahmet ÇELİK
DOKTORA TEZİ

BESİN/GIDA HİJYENİ ve TEKNOLOJİSİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. Aydın VURAL

DİYARBAKIR- 2023



DİCLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ONAY

Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Besin/Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı Doktora öğrencisi Ahmet ÇELİK'in hazırladığı "Farklı hayvan sütlerinde, insan sağlığı üzerine etkili bazı mikroRNA'ların miktarının tespiti ve farklı ısı işlemlerin bu mikroRNA'lara etkisinin araştırılması" başlıklı tez Dicle Üniversitesi Lisansüstü Eğitim - Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca kapsam ve bilimsel kalite yönünden değerlendirilerek **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tarih.../.../2023

Danışman Prof. Dr. Aydın VURAL

Jüri Üyeleri

İmza

Jüri Başkanı

Üye

Üye

Üye

Üye

Bu tez Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun/.../2023 tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

...../...../.....

Prof. Dr. Mahmut BALKAN
Dicle Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarımı ihlal edici bir davranışımın olmadığını ve tezimi Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzu standartlarına uygun bir şekilde hazırladığımı beyan ederim.

.../.../2023

Ahmet ÇELİK
İmza

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimine başladığım günden tez çalışmamın sonuna kadar, engin bilgi ve tecrübelerinden istifade ettiğim, her zaman yanımda olduğunu hissettiğim, yardım ve katkılarını hiçbir zaman esirgemeyen, çok değerli danışman hocam sayın Prof. Dr. Aydın VURAL'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Doktora eğitimim süresince teorik ve pratik bilgilerinden yararlandığım ve sürekli desteklerini gördüğüm Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Besin/Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı öğretim üyeleri Prof. Dr. Mehmet Emin ERKAN'a, Prof. Dr. Hüsnü Şahan GÜRAN'a ve Dr. Öğr. Üyesi Berna DUMAN AYDIN'a teşekkürlerimi sunarım. Laboratuvar çalışmalarında bana destek veren ve yardımcı olan Veteriner Fakültesi Genetik Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. İbrahim Halil YILDIRIM ile Besin/Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı öğretim elemanı Öğr. Gör. Uğur UÇAR'a ve tezimin hazırlanmasında katkısı bulunan Dr. Ramazan ÜZEN'e teşekkürlerimi sunarım.

Tez sürecim boyunca göstermiş olduğu sabır ile maddi ve manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, sevgili eşim Saliha Betül ÇELİK ile kızlarım Meryem, Rabia ve Hatice'ye teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez Dicle Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü (DÜBAP) tarafından Veteriner.20.001 numaralı proje ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

BEYAN.....	I
TEŞEKKÜR.....	II
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	III
KISALTMALAR DİZİNİ.....	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VIII
TABLolar DİZİNİ	X
1.ÖZET	1
1.1. Türkçe Özet	1
1.2. Abstract	3
2. GİRİŞ ve AMAÇ	5
3. GENEL BİLGİLER.....	7
3.1. Süt	7
3.1.1 Genel özellikleri.....	7
3.1.2. Türkiyede çiğ süt üretimi.....	8
3.1.3. Eşek sütü.....	9
3.2. Ekstrasellüler Veziküller (EV).....	9
3.2.1 Mikroveziküller.....	10
3.2.2 Apoptotik cisimler.....	10
3.2.3 Eksozomlar	10
3.2.3.1. Eksozomların biyogenezi.....	11
3.2.3.2 Eksozomların yapısı ve içeriği.....	12
3.2.3.3. Eksozomlar ve miRNA.....	13
3.3. MikroRNA.....	13
3.3.1. Tanımı ve tarihçesi	13
3.3.2. MikroRNA'nın oluşum ve etki mekanizması	14
3.3.2.1. Oluşumu.....	14
3.3.2.2. Etki mekanizması	16
3.3.3. Mikro RNA'ların fonksiyonları	18
3.3.3.1. Sinir sistemi ve miRNA'lar	18
3.3.3.2. Dolaşım sistemi ve miRNA'lar	18
3.3.3.3. Sindirim sistemi ve miRNA'lar	19
3.3.3.4. Üreme sistemi ve miRNA'lar	19
3.3.3.5. Kanser ve miRNA'lar	20
3.3.3.6. Bağışıklık ve miRNA'lar	22
3.3.3.7. Biyobelirteç olarak miRNA'lar	22
3.3.4. Sütte miRNA'lar	23
3.3.5. Bu çalışmada incelenen miRNA'lar	24
3.3.5.1. miRNA 15a	24
3.3.5.2 miRNA 34a	25
3.3.5.3. miRNA 29b.....	26
3.3.5.4. miRNA 223.....	27
4- GEREÇ VE YÖNTEM.....	28
4.1. Gereç	28

4.2. Yöntem.....	29
4.2.1. Somatik hücre sayımı.....	30
4.2.2. Toplam mezofil aerobik bakteri sayımı	30
4.2.3. pH değeri.....	31
4.2.4. Yağ tayini	31
4.2.5. Kuru madde tayini	29
4.2.6. Protein tayini	30
4.2.7. Isı uygulamaları	31
4.2.8 Moleküler analizler	33
4.2.8.1. Süt eksozomlarının izolasyonu	34
4.2.8.2. RNA izolasyonu.....	36
4.2.8.3. Nanodrop ile RNA ölçümü.....	37
4.2.8.4. Komplementer DNA (cDNA) sentezi.....	38
4.2.8.5. Real time PCR analizi	40
4.2.8.5.1. Primer tasarımı.....	40
4.2.8.5.2. Real time PCR protokol	40
4.2.8.5.3. Rölatif teknik ile değerlendirme	42
4.2.9. İstatiksel analizler	43
5- BULGULAR.....	44
5.1. Sütlerin Analiz Sonuçları	44
5.2. Somatik Hücre Sayısı.....	44
5.3. Toplam Mezofilik Aerob Bakteri Sayısı.....	44
5.4. Eksozomların Görüntülenmesi	45
5.5. RNA İzolasyon Sonuçları	45
5.6. Real Time PCR sonuçları ve İstatiksel Değerlendirme	46
6- TARTIŞMA.....	66
6.1. Farklı Hayvan Türlerinin Sütlerinde Bulunan miRNA'ların İncelenmesi.....	66
6.1.1. İnek sütü.....	66
6.1.2. Manda sütü	69
6.1.3. Koyun Sütü.....	70
6.1.4. Keçi sütü.....	72
6.1.5. Eşek Sütü.....	75
6.2. Sütte Araştırması Yapılan miRNA'ların Isıya Bağlı Değişimlerinin İncelenmesi	77
7. SONUÇ.....	81
8- KAYNAKLAR	83
9. ÖZGEÇMİŞ.....	98
10- EKLER	99
10.1. EK-1 Çalışmada incelenen miRNA'lara ait Real-Time PCR analiz grafikleri	99
10.2. EK-2 Doktora için makale.....	101
11- ORJİNALLİK RAPORU	102



KISALTMALAR DİZİNİ

°C	: Santigrat derece
µl	: Mikrolitre
%	: Yüzde
Δ	: Delta
Ago	: Argonaut proteinleri
AGO2	: Argonaut 2
BDNF	: Beyin kaynaklı nörotrofik faktör
cDNA	: Komplementer DNA
CMT	: Kaliforniya mastitis testi
Ct	: Treshold Siklusu
DGRC8	: DiGeorge sendrom kritik gölge geni 8
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DNMT1	: DNA metil transferaz
EGF	: Epitelyal Büyüme Faktörü
EV	: Hücre dışı vezikül
Exp5	: Exportin 5
GMEC	: Keçi Meme Epitel Hücresi
HCC	: Hepatoselüler karsinom
lncRNA	: Non-coding RNA
KLL	: Kronik lenfositik lösemi
LPS	: Lipopolisakkarit
mL	: Mililitre
miRNA	: mikro RNA
mRNA	: mesajcı RNA
MVB	: Multi veziküler cisimcikler

OBL	: Osteoblastogenez
ncRNA	: Kodlayıcı olmayan RNA
nm	: Nanometre
Pre-miRNA	: Prekürsör mikroRNA
Pri-miRNA	: Primer mikroRNA
RISC	: RNA indüklü susturucu kompleks
RNaz	: Ribonükleaz enzimi
RNA Pol II	: RNA polimeraz II
RNA Pol III	: RNA Polimeraz III
RNA	: Ribo nükleik asit
RPM	: Revolutions per minute
SHS	: Somatik hücre sayısı
siRNA	: Small interferring RNA
TAG	: Triaçil Gliserol
tRNA	: Taşıyıcı RNA
TMP	: Transmembran protein
TÜİK	: Türkiye İstatistik Kurumu
qRT-PCR	: Kantitatif gerçek zamanlı PCR
UCP3	: Uncoupling protein 3
UTR	: Çevirisi yapılmayan bölge

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1: Türlerle göre süt üretim grafiği.....	8
Şekil 2: Ekstraselüler veziküllerin farklı üç tipi	11
Şekil 3: Eksozomların oluşumu ve hücre dışına çıkarılması.....	12
Şekil 4: miRNA'nın biyogenezi ve oluşum mekanizması	15
Şekil 5: Gen ekspresyonun şekil üzerinde gösterimi	16
Şekil 6: miRNA'ların hücre dışı ortama salınması	17
Şekil 7: İşletmelerden süt alımı,	28
Şekil 8: Somatik Hücre Sayım Cihazı	29
Şekil 9: Yağ banyosunda ısı uygulamaları	32
Şekil 10: Moleküler analizler çalışma tasarımı	34
Şekil 11: Eksozomların izolasyon aşamaları.....	35
Şekil 12: Çalışmada kullanılan miRNA izolasyon kiti	36
Şekil 13 : Spektrofotometre (Thermo NanoDrop Nd2000).....	38
Şekil 14: Çalışmada kullanılan cDNA sentez kiti	38
Şekil 15: Real-Time PCR için kullanılan Kit	41
Şekil 16: Eksozomların TEM'de görüntüsü.....	45
Şekil 17: Keçi sütlerinde ısı değişimine göre gruplar arasında çalışılan miRNA'lara ait relatif ifade seviyelerindeki kat değişimleri	51
Şekil 18: Koyun sütlerinde ısı değişimine göre gruplar arasında çalışılan miRNA'lara ait relatif ifade seviyelerindeki kat değişimleri	54
Şekil 19: İnek sütlerinde ısı değişimine göre gruplar arasında çalışılan miRNA'lara ait relatif ifade seviyelerindeki kat değişimleri	57
Şekil 20: Manda sütlerinde ısı değişimine göre gruplar arasında çalışılan miRNA'lara ait relatif ifade seviyelerindeki kat değişimleri	60

Şekil 21: Eşek sütlerinde ısı değişimine göre gruplar arasında çalışılan miRNA'lara ait relatif ifade seviyelerindeki kat değişimleri63

Şekil 22: Türlerle göre ortalama Normalizasyon değerlerinin grafik üzerinde görünümü65



TABLolar DİZİNİ

Sayfa No:

Tablo 1: 2022 yılı çiğ süt üretimi	8
Tablo 2: Bazı kanser tiplerinin tanısında kullanılabilecek miRNA'lar.	21
Tablo 3: Sığırlarda mastitisin teşhisinde biyobelirteç olarak kullanılabilecek bazı miRNA'lar	23
Tablo 4: cDNA sentezi 1. aşama için gerekli bileşenler.....	39
Tablo 5: cDNA sentezi 2. aşama için gerekli bileşenler.....	39
Tablo 6: cDNA sentezi için termal döngü cihazında uygulanan prosedür.	39
Tablo 7: Çalışmada kullanılan primerlere ait gen dizilimi	40
Tablo 8: RT-PCR için gerekli olan bileşenler ve hacimleri.....	41
Tablo 9: RT-PCR için termal döngü cihazında uygulanan prosedür	41
Tablo 10: Türlerle ait sütlerin fiziko-kimyasal özellikleri.....	44
Tablo 11: Türlerle ait sütlerin somatik hücre sayıları.....	44
Tablo 12: Türlerle ait sütlerin TMAB sayıları	45
Tablo 13: Sütlerin fizikokimyasal özellikleri ve miRNA'lar arasındaki korelasyon tablosu.....	47
Tablo 14: Keçi sütü örneklerinde Ct ve ΔCt değerleri	49
Tablo 15 : Keçi sütü örneklerinde $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri	50
Tablo 16: Koyun sütü örneklerinde Ct ve ΔCt değerleri	52
Tablo 17: Koyun sütü örneklerinde $2^{\Delta\Delta Ct}$ değerleri.....	53
Tablo 18: İnek sütü örneklerinde Ct ve ΔCt değerler.....	55
Tablo 19: İnek sütü örneklerinde $2^{\Delta\Delta Ct}$ değerleri.....	56
Tablo 20: Manda sütü örneklerinde Ct ve ΔCt değerleri.....	58
Tablo 21: Manda sütü örneklerinde $2^{\Delta\Delta Ct}$ değerleri.....	59

Tablo 22: Eşek sütü örneklerinde Ct ve ΔCt değerleri.....	61
Tablo 23: Eşek sütü örneklerinde $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri	62
Tablo 24: Türlerle göre ortalama Normalizasyon değerleri	64



Farklı Hayvan Sütlerinde, İnsan Sağlığı Üzerine Etkili Bazı Mikrorna'ların Miktarının Tespiti ve Farklı Isıl İşlemlerin bu Mikrorna'lara Etkisinin Araştırılması

Öğrencinin Adı ve Soyadı: Ahmet ÇELİK

Danışmanı: Prof. Dr. Aydın VURAL

Anabilim Dalı: Besin/Gıda Hijyeni ve Teknolojisi

1.ÖZET

1.1. Türkçe Özet

Amaç: Bu tez çalışmasında inek, manda, koyun, keçi ve eşek sütlerinde miRNA 15a, miRNA 29b, miRNA 34a ve miRNA 223'ün varlığı, ekspresyon seviyeleri ve sütlerin kompozisyonları ile olan ilişkileri incelenmiştir. Ayrıca sütlere farklı ısılar uygulanarak bu miRNA'ların değişim seviyeleri araştırılmıştır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmada inek, manda, koyun, keçi ve eşek sütlerinin fizikokimyasal analizleri yapılmıştır. Sütlerin eksozomlarının izolasyonu yapılarak RNA'lar elde edildi. miRNA 15a, miRNA 29b, miRNA 34a ve miRNA 223'ün RT-qPCR cihazında ekspresyon seviyeleri elde edilerek, sütlerin fizikokimyasal verileri ile miRNA'lara ait veriler arasında korelasyon analizi uygulanmıştır. Sütleri yağ banyosunda farklı ısı dereceleri uygulayarak, sütlerde bulunan dört adet miRNA'nın miktarındaki değişimlerin tespiti yapılmıştır.

Bulgular: Yapılan analizlerde tüm sütlerde miRNA 15a, miRNA 29b, miRNA 34a ve miRNA 223'ün ekspresyonlarının olduğunun tespiti yapıldı. İnek sütünde miRNA 34a ile yağ arasında ve koyun sütünde miRNA 34a ile pH ve kuru madde arasında pozitif ve anlamlı ilişki bulunmuştur. Koyun sütünde miRNA 29b ile kuru madde ve yağ arasında negatif ve anlamlı bir ilişki bulunmuştur. Keçi sütünde miRNA 223 ile kuru madde arasında pozitif ve anlamlı bir ilişki bulunmuştur. Eşek sütünde miRNA 29b ile yağ arasında pozitif ve anlamlı bir ilişki bulundu. Ayrıca miRNA'larda ısıya bağlı farklı değişimlerle miRNA'ların ısıdan etkilendiklerinin tespiti yapılmıştır.

Sonuç; İncelenen tüm hayvan türlerinin sütlerinde, araştırılan miRNA’ların ekspresyonlarının olduğu ve sütlerin bileşimi ile anlamlı düzeyde ilişkileri tespit edildi. S tlere ısıı ışlem uygulandığında miRNA’ların farklı tepkiler verdiği gözlemlendi. miRNA’ların sütün sağlığı, hijyeni, bileşimi ve teknolojesi açısından önemli çalışma alanları olduğu ve bu konularda daha spesifik ve detaylı çalışmalar planlanması gerektiği düşünülmektedir.

Anahtar Sözcükler: MikroRNA, Süt, Eşek sütü, Ekstrasellüler veziküller, Eksozom



Determining the Amount of Some Micrornas that are Effective on Human Health in Different Animal Milks and Investigating the Effects of Different Heat Treatments on These Micrornas.

Student's Surname and Name: ÇELİK Ahmet

Adviser of Thesis: Prof. Dr. Aydın VURAL

Department: Food Hygiene and Technology

1.2. Abstract

Aim: In this thesis, the presence of miRNA 15a, miRNA 29b, miRNA 34a and miRNA 223 in cow, buffalo, sheep, goat and donkey milk, their expression levels and their relationship with milk composition were investigated. In addition, the change levels of these miRNAs were examined by applying different temperatures to the milk.

Materials and Methods: In the study, physicochemical analyzes of cow, buffalo, sheep, goat and donkey milk were performed. RNAs were obtained by isolating the exosomes of milk. The expression levels of miRNA 15a, miRNA 29b, miRNA 34a and miRNA 223 were obtained in the RT-qPCR device, and correlation analysis was performed between the physicochemical data of milk and the data of miRNAs. By applying different temperatures to the milk in the oil bath, the changes in the amount of four miRNAs in the milk were determined.

Results: In the analysis, it was determined that miRNA 15a, miRNA 29b, miRNA 34a and miRNA 223 were expressed in all milks. A positive and significant relationship was found between miRNA 34a and fat in cow's milk. A positive and significant relationship was found between miRNA 34a and pH dry matter in sheep milk. A negative and significant relationship was found between miRNA 29b and dry matter and fat in sheep milk. A positive and significant relationship was found between miRNA 223 and dry matter in goat milk. A positive and significant relationship was found between miRNA 29b and fat in donkey milk. In addition, it was determined that miRNAs were affected by heat with different heat-related changes in miRNAs.

Conclusion: In the milk of all examined animal species, the expressions of the investigated miRNAs and their significant relationship with the composition of the milk were determined. It was observed that miRNAs gave different responses when heat treatment was applied to milk. It is thought that miRNAs are important study areas in terms of milk health, hygiene, composition and technology, and more specific and detailed studies should be planned on these issues.

Key Words: MicroRNA, Milk, Donkey milk, Extracellular vesicles, Exosome



2. GİRİŞ ve AMAÇ

Süt, canlıların gelişimi için temel besin öğelerinin tümünü içerdiğinden memeli yaşamının erken döneminde başlıca besin kaynağını oluşturmaktadır. Süt kalsiyum ve fosfor gibi bazı önemli mineraller, protein ve riboflavin gibi bazı B grubu vitaminleri ve içeriğinde bulundurduğu organik ve inorganik besin maddeleri açısından özellikle halk sağlığı için önemli bir besin grubudur. Süt içerisinde yer alan proteinlerin gelişmeye ve büyümeye katkısı olduğu gibi doku farklılaşmalarında da etkinliği bulunmaktadır. Ayrıca bağışıklık sistemine ve kalsiyum emilimi üzerine olumlu etkileri bulunmaktadır. Yine kan basıncını ve kanser riskini azalttığı, vücut ağırlığının kontrolünde etkin olduğu bilinmektedir (1).

MikroRNA (miRNA) 17-25 nükleotid uzunluğunda gen ekspresyonunda görevli olan protein kodlamayan RNA'lardır. miRNA'lar nükleotid diziliminde bir değişiklik olmaksızın gen ekspresyonundaki kalıtsal değişimler olarak adlandırılan epigenetik faktörler arasında yer alır. Son yıllarda aralarında çiftlik hayvanlarının da olduğu pek çok türde birçok miRNA keşfedilmiştir (2). Lee ve ark. (3) yaptıkları bir çalışmada *Caenorhabditis elegans* olarak adlandırılan bir yuvarlak solucanda lin-4 olarak adlandırdıkları genin hiçbir protein kodlamadığını fark etmişler. Bu genin hiç protein kodlamamasına karşın 22 nükleotid uzunluğunda küçük bir RNA transkribe etmesi rapor edilmiştir. Böylece ilk miRNA bulunmuş oldu. Reinhart ve ark. (4) tarafından yine *C.elegans*'da 22 nükleotid uzunluğunda, let-7 olarak adlandırılan, farklı bir miRNA keşfedildi. Daha sonra yapılan araştırmalarda let-4 ve let-7'ye benzer özellik gösteren çok sayıda küçük RNA molekülü, çok hücreli organizmaların birçoğunda tespit edilip mikroRNA (miRNA) olarak adlandırılmıştır (5). Günümüzde transkripsiyon sonrası düzenleyici olarak gen ekspresyonunda görev aldığı düşünülen yeni keşif miRNA'lar; karsinogeneze embriyogeneze kadar pek çok alanda yoğun olarak çalışılmaktadır (6).

Süt, içerisinde birçok organik ve inorganik madde içermesinin yanında hücre dışı veziküller içerisinde RNA ve mikroRNA içeriğine de sahiptir. Süt yavrunun gelişme ve büyümesinin karşılanması için gerekli olan tüm besinsel öğeleri içerisinde bulundurulur. Yavruların zihinsel gelişimlerini olumlu yönde etkiler ve bağışıklık

sistemini geliştirerek enfeksiyonlardan korunmasına katkı sağlar. Ayrıca sahip olduğu miRNA içeriği açısından da oldukça zengindir. Bu miRNA'lar anne sütünde eksozom adı verilen ekstrasellüler veziküller içerisinde paketlenmiştir (7).

MikroRNA'ların sütün içerisinde eksozomlar içerisinde yer alması, ona intestinal sistemden yapısı bozulmadan geçmesini sağlamaktadır. Son yapılan çalışmalarda sütün yapısında bulunan bu miRNA'ların içildikten sonra sindirim sisteminden herhangi bir değişikliğe uğramadan emilebildiğini ve özellikle anne sütünden yavruya bağışıklığın aktarılmasında aktif rol oynadığı belirtilmektedir (8-10).

Bu tez çalışmasında ülkemizde en çok sütü tüketilen inek, manda, koyun, keçi ve halk arasında terapötik etkisine inanılan eşek sütünde bulunan bazı miRNA'lar incelendi. Araştırmada miRNA olarak, insanlarda kanser oluşum mekanizmasında etkili olan, kanser riskini azalttığı belirlenen ve immün sistemin gelişiminde etkisi olan miRNA 15a, miRNA 34a, miRNA 223 ile insanlarda kemik mineralizasyonunu artırarak osteoblast gelişiminde rol oynayan miRNA 29b seçildi.

Çalışmada bu miRNA'ların varlığının ve ekspresyon oranlarının tespit edilmesi amaçlandı. Böylece bu miRNA'ların hayvan türleri arasındaki farkları belirlenmiş oldu. Ayrıca sütlere uygulanacak farklı ısı uygulamaları ile sütlerin içerisinde bulunan miRNA'ların ısı değişimlerine bağlı olarak miktarlarında oluşacak değişimlerin belirlenmesi hedeflendi.

3. GENEL BİLGİLER

3.1. Süt

3.1.1 Genel özellikleri

İnsanlar dünyaya geldiği andan itibaren büyümesini sürdürülebilirlik ve sağlıklı bir şekilde yaşamını devam ettirebilmek için beslenmeye ihtiyaç duyarlar. Organizmanın hayatını devam ettirebilmesi, düzenli bir şekilde kendini yenileyebilmesi ve fonksiyonlarını düzgün bir şekilde yerine getirebilmesi için besin maddelerinin her birinden yeterli ve dengeli miktarlarda vücuda alınması gerekmektedir (11,12).

Memeli canlıların meme bezlerinden salgılanan süt, genel olarak tüm yavruların gelişebilmesi ve büyüebilmesi için gereksinim duyduğu ana besin maddesidir. Süt ve süt ürünleri insanların beslenmesinde gerekli olan makro ve mikro elementlerin neredeyse tamamını içerisinde bulunduran ve her yaştan insanın beslenmesinde kullanılan en temel besin maddelerindendir (13). Süt, içeriğinde bulunan yüksek biyolojik değerli proteinler, yağlar ve karbonhidratların yanında sahip olduğu enzim ve enzim düzenleyici maddeler ile organizmanın büyümesinde ve çeşitli fonksiyonlarında görevli olan hormonlara sahiptir. Yine vücudumuzda önemli fizyolojik görevleri olan immünoglobulinler ve antibakteriyel ajanların yanı sıra vitamin ve mineral yapısıyla insanların yaşam döngüsünde önemli bir yere sahip fonksiyonel bir gıdadır (14,15). Yeni doğanlarda yavrunun gelişme ve büyümesinin karşılanması için gerekli olan tüm besinsel öğeleri içerisinde bulunduran, yavruların zihinsel gelişimlerini olumlu yönde etkileyen ve bağışıklık sistemini geliştirerek enfeksiyonlardan korunmasına katkısı olan süt, miRNA içeriği açısından da çok zengindir. Bu miRNA'lar sütte eksozom adı verilen ekstrasellüler veziküller içerisinde yer almaktadır (16,17).

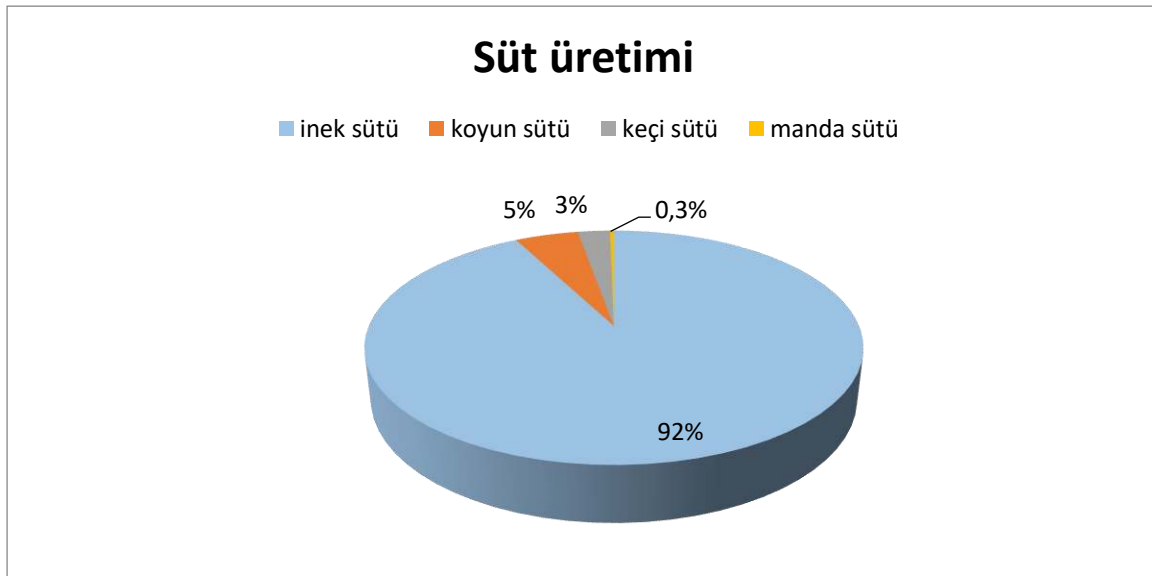
Süt, beslenmedeki öneminin yanında ayrıca insan sağlığı üzerinde de etkileri olan bir gıdadır. Yapılan çalışmalarda sütün; kemik ve diş yapısında önemli bir rol üstlendiği kalsiyum emiliminde, bağışıklık sistemi ile kanser, osteoporoz, hipertansiyon ve kalp hastalıkları gibi kronik hastalıklarında üzerinde olumlu etkisi olduğu belirlenmiştir (18-21).

3.1.2. Türkiye'de çiğ süt üretimi

Memeli canlıların geneli süt salgılamasına karşın ülkemizde üretimi yapılan sütler daha çok dört tür hayvandan sağlanmaktadır. Türk Gıda Kodeksi İçme Sütleri Tebliğine göre de “süt; inek sütü, koyun sütü, keçi sütü ve manda sütü olarak tanımlanmaktadır” (22). Yine Türk Standartları (TS) 1018 çiğ süt standardına göre: “Süt; inek, koyun, keçi ve mandaların meme bezlerinden salgılanan, kendine has tat ve kıvamda olan, içine başka maddeler karıştırılmamış, içinden herhangi bir maddesi alınmamış, beyaz veya krem renkli sıvıdır” şeklinde tanımlanmıştır (23). Türkiye'de 2022 yılında 21 563 492 ton süt üretimi olmuştur. Bunun % 92,3'ünü inek sütü, % 4,9'unu koyun sütü, % 2,5'ini keçi sütü ve % 0,3'ünü manda sütü oluşturmaktadır. (<https://data.tuik.gov.tr/Bulten/Index?p=Cig-Sut-Uretim-Istatistikleri-2022-49699> Erişim Tarihi: 26 Mayıs 2023)

Tablo 1 : 2022 yılı çiğ süt üretimi

Türler	Miktar (Ton)	Oran (%)
İnek Sütü	19 912 135	92,3
Manda sütü	43 589	0,3
Koyun sütü	1 067 342	4,9
Keçi sütü	540 426	2,5
Toplam	21 563 492	100.0



Şekil 1: Türler'e göre süt üretim grafiği (<https://data.tuik.gov.tr/Bulten/Index?p=Cig-Sut-Uretim-Istatistikleri-2022-49699>)

3.1.3. Eşek sütü

Günümüzde bazı fonksiyonel özellikleri ve anne sütü bileşimine benzerliği gibi sebeplerle eşek sütüne ilgi artışı gözlemlenmektedir. Eşek ve insan sütünün bileşimi karşılaştırıldığında, en belirgin farkın eşek sütünde yağ içeriğinin daha düşük olmasıdır. Buna karşın eşek sütünün laktoz, kazein ve peynir altı suyu proteinleri gibi diğer ana bileşenleri insan sütüne çok benzerken, inek sütünden önemli ölçüde farklıdır (24). Bu benzerlik insanların eşek sütüne daha yüksek tolerans göstermesini sağlar. Özellikle son zamanlarda çocuklarda sık rastlanmaya başlanan inek sütü alerjisine neden olmaması ve inek sütüne alternatif olarak kullanılabilmesi eşek sütüne olan ilgiyi arttırmıştır (25).

Eşek sütünün insanlarda tedavi edici ve kozmetik özelliklere sahip olduğu çok eski zamanlardan beri bilinmektedir (26). Eşek sütü, cildi yenileneyerek yaşlanmasını geciktiren ve antioksidan özellikleri olan bazı vitaminler (A, B2, C ve E) açısından zengin bulunmuştur. Düşük yağ içeriğine rağmen içermiş olduğu omega-3 ve omega-6 gibi kozmetikte oldukça değerli olan doymamış yağ asitlerinin varlığı, cildin vitaminleri emmesini, elastik hale gelmesini ve bazı cilt hastalıklarını önlemesini sağlar (24). Yapılan bazı çalışmalarda eşek sütünün böbrekleri yormadığı böylece böbrek sağlığını koruduğu, düşük yağ içeriği ile damar sertliğini önlediği ve bağışıklık sistemini güçlendirdiği bildirilmiştir. Ayrıca akciğer kanserine karşı etkisinin bulunduğu belirtilmiştir (26). Yüksek oranda içerdiği laktoferrin ve lizozim eşek sütünde laktoperoksidaz sisteminin (LPS) güçlü olmasını sağlar. Böylece hem Gram pozitif hem de Gram negatif bakterilere karşı antimikrobiyel etki oluşturarak bakteri yükünün azaltılmasında rol alır (27,28).

3.2. Ekstrasellüler Veziküller (EV)

Ekstrasellüler vezikül tanımı hücre dışına salınımı yapılan tüm membran veziküller için kullanılan genel bir tanım olup bu veziküller, etrafı lipit membran ile kaplanmış ve içerisinde trans membran proteinler, çözünür proteinler ve birçok RNA türü içeren yapılardır (29,30). Özellikle son dönemde yapılan çalışmalarda bu veziküllerin, hücreler arası iletişim de dahil olmak üzere bağışıklığın şekillenmesi, hücrelerin çoğalması ve lipit mekanizması gibi birçok mekanizmada görev aldıkları belirtilmiştir (31,32).

Ekstrasellüler veziküller meydana gelme aşamaları yönünden ve yaptıkları görevlerdeki farklılıklardan dolayı mikroveziküller, apoptotik cisimler ve eksozomlar şeklinde adlandırılırlar (33-35).

3.2.1 Mikroveziküller

Bu veziküller plazma membranında meydana gelen bir tomurcuklanma ile oluşurlar. Boyutları 200 ile 1000 nm arasında değişmektedir. Mikroveziküllerin meydana geldiği hücre plazmasının özelliklerini taşıdığı, hücre içi haberleşme ve iletişimde, tümörlü hücrelerin metastazında, büyümesinde ve anjiyogeneizde rol oynadıkları belirtilmiştir (36,37).

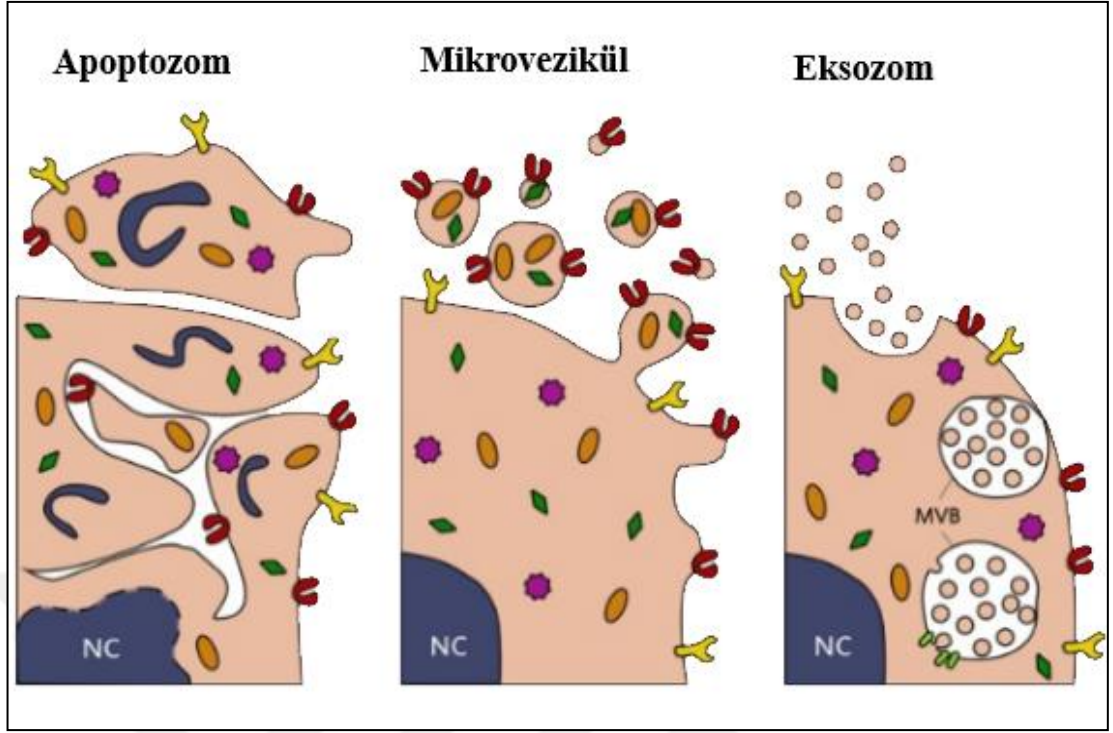
3.2.2 Apoptotik cisimler

Hücre ölüm mekanizmalarından biri olan apoptoz sırasında oluşabilecek bazı toksik maddelerin zarar vermesini engellemek amacıyla daha küçük yapılar oluştururlar (38). Bu cisimler birkaç aşamada hücre dışına salınırlar. Öncelikle hücre zarları kasılır sitoplazmada ve nükleer kromatinde yoğunlaşmalar meydana gelir hücreler küçülür ve zarın geçirgenliği artarak yapısı bozulur. Meydana gelen vezikül karakterdeki bu küçük yapılara apoptotik cisimler adı verilir. Bu veziküllerin boyutları 1000 ile 5000 nm arasında değişmektedir (39).

3.2.3 Eksozomlar

Eksozomlar ilk zamanlarda hücrelerin işe yaramayan ve hücre tarafından toksik olarak kabul edilen ürünleri dışarı atmak için kullandığı bir mekanizma olarak kabul edilmekte iken son çalışmalarla eksozomların içerdikleri yapılarla eşsiz bir biyolojik yapıya sahip oldukları tespit edilmiş ve yoğun olarak çalışılan bir konu haline gelmiştir (40-43).

Eksozomlar hücre dışına salınan en küçük ekstrasellüler doğal kesecikler olup boyutları 30 ile 100 nm arasında değişmektedir. Nükleik asitler, nükleik asit türevleri, proteinler ve lipitleri içerisinde bulunduran bu keseciklerin etrafı çift katlı fosfolipit yapıda bir zarla kaplanmıştır (44).



Şekil 2 : Ekstraselüler veziküllerin farklı üç tipi (45).

3.2.3.1. Eksozomların biyogenezi

Eksozomların oluşması temel olarak iki adımda şekillenir.

İlk olarak endositoz olarak adlandırılan olayda hücre zarının bir kısmı kendi içerisine kıvrılır ve intraluminal bir kesecik meydana gelir. Oluşan bu küçük kesenin içinde çok sayıda küçük keseciği bulunduran bir yapı oluşturulur. Meydana gelen bu keseciğe multiveziküler kese (MVB) adı verilir. Multiveziküler keseciğin kolesterol miktarı düşük ise parçalanarak lizozom adı verilen organelin yapısına katılır ve yapısını kaybeder. Eğer multiveziküler kese yüksek bir kolesterol miktarına sahip ise hücre zarıyla birleşir ve dışarıya atılır. Dışarıya atılan bu multiveziküler içeriğe eksozom adı verilir (46-48).

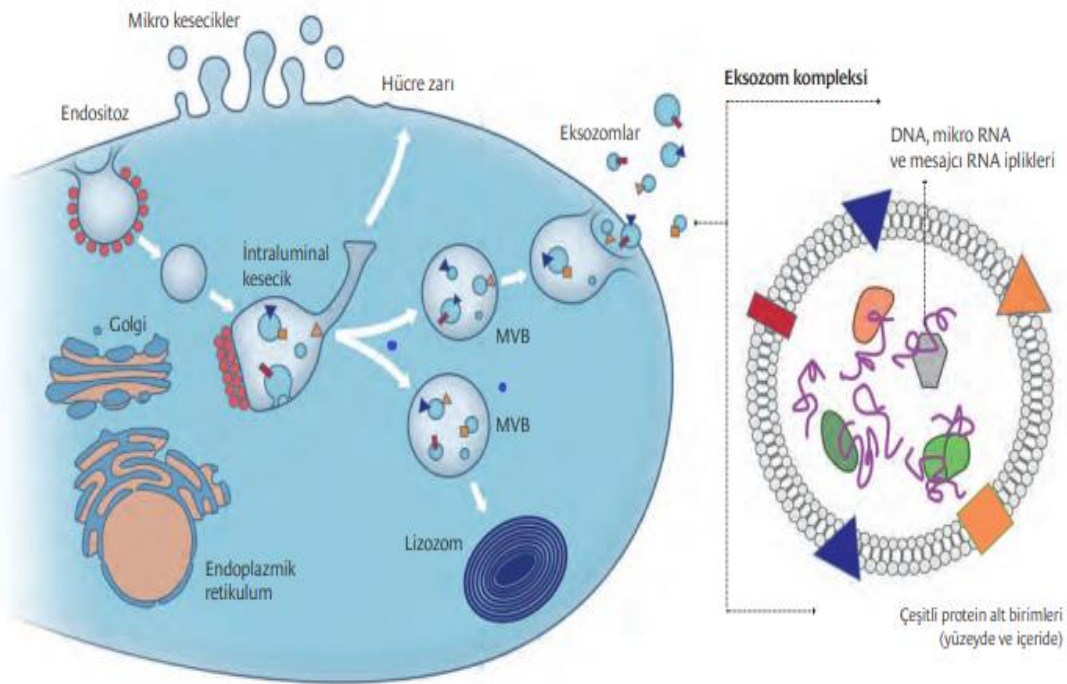
Hücre dışına bırakılarak ortama salınan bu eksozomlar 3 farklı yol ile hedef hücreye alınabilirler.

1- Eksozomların üzerinde bulunan ligand adı verilen oluşumlar hedefteki hücrenin reseptörüne bağlanırlar ve hücre içerisine girerler. Bu sistem hedef hücrenin zarında bulunan reseptörler ile eksozomların plazma zarında bulunan ve membran

proteinlerin bir alt türü olan transmembran proteinlerin (TMP) birebir etkileşimleri ile gerçekleşir (49).

2- Eksozomlar içlerinde bulundurdıkları yapıları hedef hücre membranı ile eksozom zarı arasında gerçekleşen füzyon sonucunda hücrenin sitoplazmasının içine bırakırlar (49).

3- Hedef hücre eksozomların etrafını sarar ve oluşturduğu yalancı ayaklar ile eksozomu hücre içine alır (49).



Şekil 3 : Eksozomların oluşumu ve hücre dışına çıkarılması

<https://services.tubitak.gov.tr/edergi/yazi.pdf?dergiKodu=4&cilt=52&sayi=1031>
Erişim Tarihi 17.07.2022

3.2.3.2 Eksozomların yapısı ve içeriği

Eksozomlar, içerisinde proteinler, lipitler ve nükleik asit türevlerinin olduğu karmaşık bir yapıya sahiptirler (50). Yapılarında endoplazmik retikulum ve golgi aygıtı gibi hücre organellerine ait proteinleri içermezler, özel yapıda dizilmiş sitozolik proteinler, zar ve eksozom biyogenezinde izlediği yola ait spesifik protein

dizilimlerini ve önemli hücre yüzey proteinleri ile membran füzyonu proteinlerini bulundururlar (51).

Eksozomların yapısında bulunan lipidler, proteinlerde olduğu gibi daha çok eksozomların biyogenezinde yer alan hücrelere özgü lipidlerdir. Ayrıca hedef hücrelere yapılarında bulundurdıkları biyoaktif lipidlerin taşınmasında da görev almaktadırlar. Çift katlı fosfolipit yapısındaki membranında bulunan lipid içeriği eksozomların hücre zarının membranından farklı olmasını sağlar. Bu farklılık eksozomlara hem hücre tarafından salınmasında hem de stabilitesinin korunmasında faydalar sağlar (52).

Eksozomların içerisinde lipidler ve proteinlerden başka çeşitli mRNA'lar, miRNA'lar ve non-coding olarak adlandırılan kodlayıcı olmayan RNA (ncRNA)'lar gibi nükleik asitlerin varlığı tespit edilmiştir (53).

3.2.3.3. Eksozomlar ve miRNA

Eksozomların yapısında bulunan miRNA'ların varlığı ilk olarak Lötvali ve ark. (54) tarafından yapılan bir çalışmada ortaya konulmuştur. Daha sonra yapılan çalışmalarda eksozomların içerisinde binlerce miRNA türü tespit edilmiştir (55).

Hücre farklılaşması hücre proliferasyonu gibi sahip oldukları birçok fonksiyonel özellikleri sayesinde miRNA'lar eksozomları çok önemli ekstra vesiküller haline getirmiştir. Özellikle eksozomların taşınabilirliği düşünüldüğünde miRNA'ların eksozomlardaki rolü büyük önem kazanmıştır. Bu sebeple hastalıklarda ve hastalıkların teşhisi başta olmak üzere oldukça geniş bir alanda eksozomlardaki miRNA'ların kullanılabilmesi için çalışmalar yapılmaktadır (56). Yapılan çalışmalarda eksozomların vücut hücreleri tarafından salgılandığı sütte, idrarda, tükürükte, ter, serum ve plazma gibi çok çeşitli vücut sıvılarında bulunduğu belirlenmiştir.

3.3. MikroRNA

3.3.1. Tanımı ve tarihçesi

MikroRNA'lar kısa adıyla miRNA'lar hayvanlar, bitkiler ve tek hücreli ökaryotlarda bulunan 17-25 adet nükleotitten meydana gelen, kodlama özelliği

olmayan küçük RNA'lardır (57,58). Farklı bölgelerde bulunabilmelerine rağmen genel olarak ökaryot hücrelerde genlerin intornik bölgelerinde yer almaktadırlar (59). Gen ifadesinin düzenlenmesinde görev alan miRNA bu görevini mesajcı RNA (mRNA)'nın yıkımlanarak translasyonun sona erdirilmesi ve degradasyonuna yol açacak şekilde post transkripsiyonel olarak sağlar (60).

miRNA'lar ilk olarak Lee ve ark. (3) tarafından *C. elegans* adı verilen bir nematodda larval sürecin gelişmesini kontrol eden genlerden biri olan lin-4 geninin negatif bir düzenleyicisinin varlığını tespit etmişlerdir. Sonraki çalışmalarda lin-4 genini protein kodlamadığı için kodlamayan RNA olarak adlandırılmıştır.

Daha sonra Reinhart ve ark. (4) tarafından yine *C. elegans* adlı nematodun gelişimsel dönemlerini kontrol eden genlerden biri olan let-7 geni bulunmuştur. Sonraki çalışmalarda let-7 geninin birçok farklı türde korunduğu anlaşılmış ve bu kodlanmayan RNA'lar için "mikroRNA" adı kullanılmıştır (61).

Günümüzde farklı türlerde tespiti yapılan binlerce miRNA'dan söz etmek mümkündür. Yapılan araştırmalar sonucu bulunan bulgular miRNA'ların biyogenezinin, fonksiyonlarının ve etki mekanizmasının araştırılmasına yönelik çalışmaları yoğunlaştırmıştır (62,63).

3.3.2. MikroRNA'nın oluşum ve etki mekanizması

3.3.2.1. Oluşumu

miRNA'lar bir biri ardınca sıralanan 3 adımdan oluşurlar.

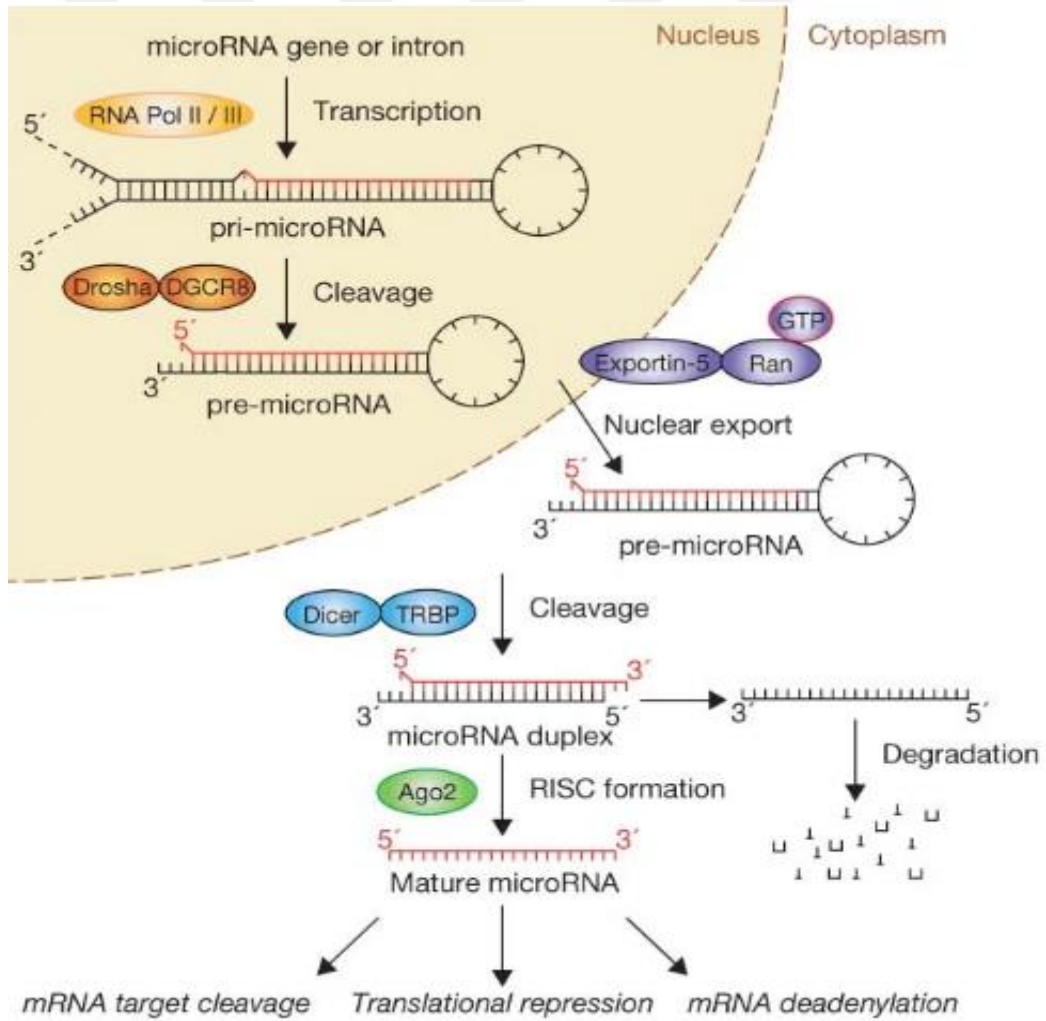
1-miRNA genlerinden primer miRNA (pri-miRNA)'ların transkripsiyonu şekillenir.

2-Pri-miRNA'lar nükleus içerisinde prekürsör miRNA (Pre-miRNA)'lara dönüştürülür.

3-Pre-miRNA'lar sitoplâzma içerisinde olgunlaşmış miRNA'lara dönüştürülür (64,65).

miRNA'lar ilk olarak kromozomlardan RNA polimeraz II enzimi tarafından sentezlenirler. Pri-miRNA adı verilen bu miRNA birkaç kb uzunluğundadır. Cap (şapka) ve Poly (A) kuyruğuna sahip olup Hairpin (saç tokası) şeklindedir (66).

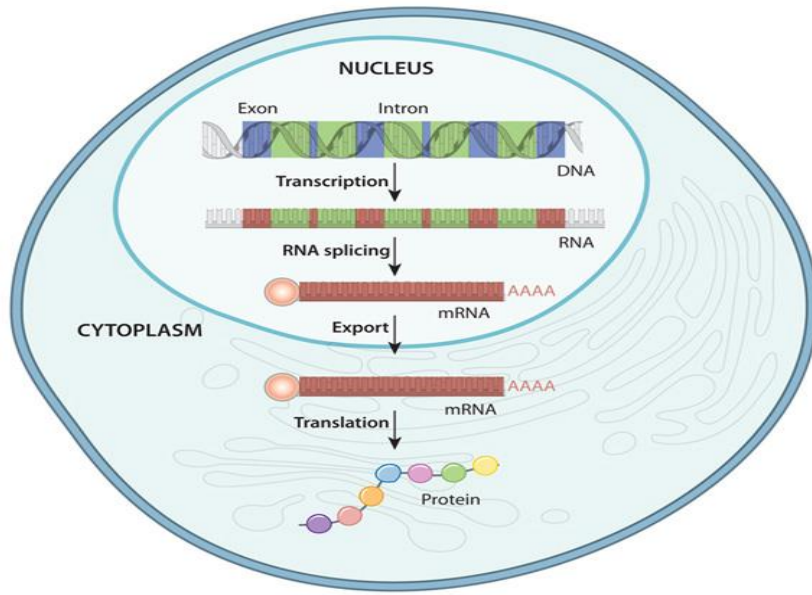
Pri-miRNA'lar nükleusta, microprocessor (mikroişlemci) kompleksi olarak adlandırılan ve bir endonükleaz olan drosha ve bunun kofaktörü olan pasha (DGCR8) tarafından kesime uğrar. Böylece pri-miRNA'nın hairpin yapısındaki iki başı tarafından kesilir ve 60-120 nükleotid uzunluğunda pre-miRNA oluşturulur (67,68). Daha sonrasında bu pre-miRNA sitoplazmaya taşınır. Sitoplazmada RNAaz III enzimlerinden endonükleaz Dicer protein kompleksi ile kesime uğratılır. Bu kesim sonucunda 18-24 nükleotid uzunluğunda çift zincirli miRNA oluşturulur (69). Oluşturulan bu çift iplikli yapı daha sonra helikaz enzimi vasıtası ile açılır ve RNA ile tetiklenmiş susturma kompleksi (RISC) olarak adlandırılan Argonaute 2 (AGO2) ailesi proteinlerinden oluşan kompleks bir yapıya katılır. Sonuç olarak yaklaşık 20 nükleotid uzunluğunda olgunlaşmış miRNAlar oluşturulmuş olur (70,71).



Şekil 4 : miRNA'nın biyogenezi ve oluşum mekanizması (72).

3.3.2.2. Etki mekanizması

DNA üzerinde bulunan genlerin kodlanarak hazır hale gelmiş bilgiyi protein gibi işlevsel mekanizmalara dönüştürmesi gen ifadesi veya gen ekspresyonu olarak adlandırılır. Genel olarak ökaryotik organizmalarda gen ekspresyonunun düzenlenmesi transkripsiyon ve tranlasyon adı verilen iki aşamada gerçekleşir. Transkripsiyon aşamasında DNA’da var olan bilgi RNA mesajlarına dönüştürülür. Translasyon aşamasında ise bu mesajlar işlenerek aktif hale gelir (73).



Şekil 5: Gen ekspresyonun şekil üzerinde gösterimi

<https://www.nature.com/scitable/topicpage/gene-expression-14121669> /Erişim tarihi. 02.06.2023)

Olgunlaşmasını tamamlamış miRNA’lar gen ekspresyonunda iki esas mekanizma ile etkilerini gösterirler;

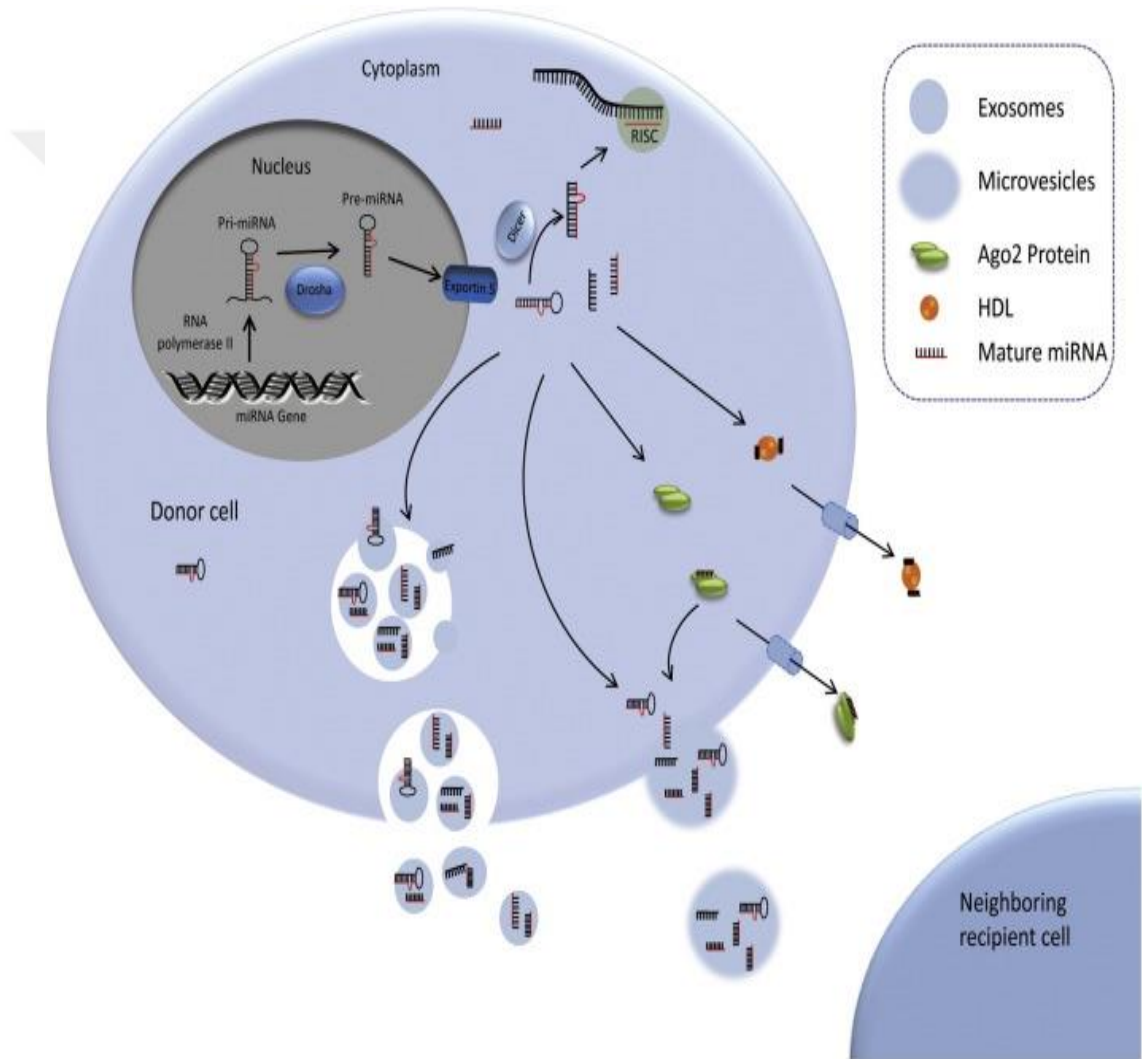
- 1- mRNA’nın yıkımlanması
- 2- Translasyonel baskılama

Olgun miRNA’ya bağlı olan RISC ile hedef seçilen mRNA da tam eşleşme ve bütünleyicilik sağlanıyorsa mRNA’nın poly(A) kuyruğu deadenilasyona uğrar bu da RNA’nın yıkımlanması ile sonuçlanır. RISC ile hedef mRNA arasında tam bir eşleşmenin olmadığı ve komplementerlik durumunun düşük olduğu durumlarda

mRNA'nın şapka yapısının değişmesine bağlı olarak translasyonun başlaması baskılanmış olur (74).

Yine miRNA'da bulunan RISC in bağlanılan mRNA da oluşturduğu etki ile polipeptid zincirleri proteolize uğrayabilir. RISC bağlandığı mRNA'dan ribozomların erken ayrılmasını ve peptid sentezinin yavaşlamasını sağlayabilmektedir (75).

Şekil 6: miRNA'ların hücre dışı ortama salınması (76)



3.3.3. Mikro RNA'ların fonksiyonları

miRNA'ların çoğunluğu hücre içerisinde bulunmaktadırlar. Ancak dolaşımdaki miRNA'lar veya hücre dışı miRNA'lar olarak adlandırılan kan, göz yaşı, tükürük, bos sıvısı ve süt gibi farklı vücut sıvılarında görev alan miRNA'lar da mevcuttur (77). Bu miRNA'lar bazı vücut sıvılarının içeriğinde bulunan ribonükleaz enzimi (RNaz) gibi enzimlerin zararlı etkilerinden korunmak için eksozomlar gibi lipid yapısına sahip mikroveziküllerin içerisinde paketlenmişlerdir. Bazı miRNA'larda bu etkilerden korunmak için HDL gibi lipoproteinlerle birleşerek çeşitli kompleks yapılar oluşturmuştur (78).

miRNA'lar hem gelişimsel dönemde hem de hücresel süreçlerde gen ekspresyon mekanizmasının düzenlenmesinde etkilerini gösterirler. Etkilerini gen ekspresyonunu aktive ederek veya baskılayarak oluşturabilir. Dolayısıyla miRNA'lar hücre proliferasyonu, hücre bölünmeleri, doku gelişimi, apoptozis, DNA onarımı, immun yanıt ve viral enfeksiyonlar gibi geniş bir etki alanı içerisinde fonksiyon gösterirler (79). miRNA'ların etkili olduğu bazı alanlar şunlardır;

3.3.3.1. Sinir sistemi ve miRNA'lar

Lewohl ve ark. (80) miRNA'ların sinir sisteminde oldukça bol sayıda bulunduğunu beynin gelişimi, nöronlardaki diferansiyon, sinaps oluşumu ve nöronlarda ilerleyen kayıplara ve yapısal bozulmalarda neden olan bazı hastalıkların biyolojik fonksiyonlarında önemli rollerinin olduğunu belirtmişlerdir.

Çalışmalar miRNA'ların yalnızca embriyonik kök hücrelerin hayatta kalması ve farklılaşması için gerekli olmadığını, aynı zamanda olgun nöronların hayatta kalmasını ve işlevlerini sürdürmede de önemli bir rol oynadığını göstermiştir (81).

3.3.3.2. Dolaşım sistemi ve miRNA'lar

Scalbert ve ark. (82) miRNA'ların, kardiyovasküler sistemdeki gen ekspresyonunun düzenlenmesinde çok önemli roller oynadığını belirterek, sinyal yollarının kontrolünde ve biyolojik süreçlerinde önemli etkilerinin olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca miRNA'ların hücre büyümesi, kontraktilite ve elektrik iletkenliği ile ilgili genlerin ekspresyonunun düzenlenmesi yoluyla kalpte önemli rollerinin olduğunu bildirmişlerdir.

Shoeibi (83) miRNA'ların, hücre içerisinde kolesterol birikiminde ve ateroskleroza yol açan atardamar yangılarında oldukça önemli fonksiyonlarının olduğunu bildirerek, miRNA'ların, ateroskleroz hastalığının gelişmesinde ve büyümesindeki süreçler üzerinde bilgi edinebilmeyi ve hastalığın tanısında biyobelirteç olarak kullanılabileceğini bildirmiştir.

3.3.3.3. Sindirim sistemi ve miRNA'lar

Saito ve ark. (84) miRNA'ların gastrointestinal tümör oluşumunda ve ilerlemesinde rol oynayabildiğini, bazı miRNA'ların gastrointestinal kanserlerde aşağı regüle edildiğini ve bunların tümör baskılayıcı olarak işlev görebileceğini bildirmişlerdir.

O'hara ve ark. (85) miRNA'ların sindirim sistemi hastalıklarına yaklaşımlarda klinik değere sahip olabileceğini belirterek, hastalıklı dokulardan alınan miRNA profillerinin analizi, primeri bilinmeyen bir tümörün kökenini tanımlamasına veya iyi huylu lezyonların kötü huylu lezyonlardan ayırt edilmesine olanak tanıyarak tanıya yardımcı olabileceğini belirtmişlerdir.

3.3.3.4. Üreme sistemi ve miRNA'lar

Yu ve ark. (86) miRNA'ların oosit olgunlaşması, luteum gelişimi ve erken embriyo gelişimi gibi fizyolojik süreçleri düzenlediğini bildirmişlerdir.

Chakrabarty ve ark. (87) miRNA'ların gebeliğin meydana gelmesi ve sürdürülebilmesi süreçlerinde önemli rol oynadığını, miRNA'ların; uterusda gebelik sürecinde implantasyon dönemlerinin oluşumunda, plasentanın oluşum ve gelişimi sırasında etkin olduklarını belirtmişlerdir.

Duica ve ark. (88) miRNA 125b, miRNA 145, miRNA 21 ve miRNA 155'in jinekolojik kanserlerde ve meme kanserlerinde çok önemli rollere sahip olduğunu belirterek, bu miRNA'ları kanserin oluşum mekanizmasında merkezi oyuncular olarak tanımlamıştır.

3.3.3.5. Kanser ve miRNA'lar

Hastalıklar arasında miRNA ile ilişkisi ilk belirlenen ve en fazla çalışmanın yapıldığı alan kanser olmuştur. Calin ve ark. (89) miRNA'yı kansere bağlayan ilk çalışmayı yapmışlardır. Bu çalışmada kronik lenfositik lösemi'li (KLL) hastalardan alınan kan örneklerinde miRNA 15 ve miRNA 16'nın ekspresyonu analiz edilmiş, bu oran normal doku veya lenfositlerle karşılaştırıldığında her iki miRNA'nında olmadığı veya aşağı regüle edildiğini ortaya koymuşlardır.

Ray (90) yaptığı çalışmada miRNA'ların tümör biyolojisinde anahtar rol oynayarak, onkojenik veya tümör baskılayıcı olarak işlev gördüklerini belirtmiştir. miRNA'ların kanserlerde hücre içi sinyal yollarının ana düzenleyicileri olduğunu onkojenik veya tümör baskılayıcı etkilerini bu sinyal yolları üzerinden sağladığını bildirmişlerdir. Onkojenik olarak etki gösteren miRNA'ların temel işlevi tümör baskılayıcı genlerin mRNA'larının ortadan kaldırılması iken tümör baskılayıcı miRNA'ların işlevinin ise onkojenik etki gösteren genlerin mRNA'larının yıkımlanması olduğunu tespit etmiştir.

Chen ve ark. (91) yaptıkları çalışmada miRNA'ların kanserlerde tümör baskılayıcı veya onkojen olarak etki ettiğini, bunu sinyal yollarını düzenleyerek gerçekleştirdiklerini bildirmişler.

He ve ark. (92) hem tümör baskılayıcı hem de onkojenik olarak işlev görebilen miRNA'ların mide, yumurtalık ve pankreas kanseri ile lenfoma ve melanom gibi birçok kanser vakasında ortaya çıktığını bildirmişlerdir. Bazı kanser tiplerinin tanısında kullanılabilecek miRNA'lar Tablo 2'de verilmiştir.

Tablo 2 : Bazı kanser tiplerinin tanısında kullanılabilecek miRNA'lar (93).

Kanser tipi	miRNA	Örnek	Seviye
Akciğer kanseri	miR-21, miR-205, miR-30d, miR-24	Serum	Artar
	miR-155, miR-197, miR-182	Serum	Artar
	Let-7f, miR-30e-3p,	Plazma	Azalı
	miR-361-3p, miR-625	Plazma	Azalı
	miR-1254, miR-574-5p	Serum	Artar
	miR-21, miR-126, miR-210, miR-486-5p	Serum	Artar
	miR142-3p, miR-29b	Serum	Artar
Meme kanseri	Let-7b, Let-7g, miR-18b	Plazma	Artar
	miR-122	Serum	Artar
	miR-155	Serum	Artar
	miR-21	Serum	Artar
	miR-125b	Serum	Artar
	miR-10b,miR-17,miR-34a,miR-93,miR155	Serum	Artar
	miR-10b, miR-373, miR-214	Plazma	Artar
	miR-210	Plazma	Artar
Prostat kanseri	miR-141	Serum	Artar
	miR-1290	Serum	Artar
	miR-375, miR-141	Serum	Artar
	miR-221	Serum	Artar
	miR-375, miR-378, miR-141 miR-409-3p	Serum	Artar
Kolorektal kanseri	miR-29a, miR-92	Plazma	Artar
	miR-601, miR-760	Plazma	Azalı
	miR-200c	Serum	Artar
	miR-18a, miR-29a	Serum	Artar
	miR-141	Plazma	Artar
	miR-20a, miR-130, miR-145, miR-372	Serum	Artar

3.3.3.6. Bağışıklık ve miRNA'lar

O'Connel ve ark. (94) miRNA'ların hem doğal bağışıklık hem de sonradan kazanılmış bağışıklık sistemlerinin hücrelerinde benzersiz ifade profillerine sahip olduğunu, hücre gelişimi ve işlevinin düzenlenmesinde çok önemli rollere sahip olduğunu belirtmişlerdir.

Xiao ve ark. (95) miRNA'ların, memelilerin bağışıklık sisteminde kritik bir düzenleyici olarak bulunduğunu ve bağışıklık mekanizmasında miRNA'ların kaybı veya genetik olarak kaybolmasının bağışıklık gelişimini ciddi bir şekilde tehlikeye atacağını, otoimmünite ve kanser gibi bağışıklık bozukluklarına yol açabileceğini bildirmişlerdir.

3.3.3.7. Biyobelirteç olarak miRNA'lar

miRNA'ların bu önemli fonksiyonları onların birçok alanda araştırma konusu olmasına neden olmuştur. Özellikle miRNA'ların normal olmayan miktarları birçok hastalığın tanısında ve patogenezinde önem arz eder. Kardiyovasküler hastalıklardan kanserin patogenezin ve daha birçok sayılamayan hastalıkta miRNA'lar biyobelirteç olarakta kullanılabilirler (96).

miRNA'ların biyobelirteç olarak kullanımları ilk defa Lawrie ve ark. (97) tarafından kan serumunda yapılan bir çalışmada ortaya konulmuştur. Daha sonraları özellikle süt, tükürük ve diğer vücut sıvılarında bulunan miRNA'ların tespitleri yapılmıştır (98).

miRNA'ların kan, idrar, süt ve diğer vücut sıvılarından alınan sıvı biyopsiler aracılığıyla kolaylıkla ekstrakte edilebilmesi, bu yüzden kolayca erişilebilir olması, hastalığın ilerlemesine göre değişmesi ve bu değişikliği gösterecek şekilde hassas olması, kanser evrelerinin farklılaşmasında kullanılabilir olması gibi özellikleri nedeniyle ideal bir biyobelirteç olarak kullanılmasını sağlamaktadır (99).

miRNA'ların insanlarda çeşitli amaçlarla kullanımlarının yanı sıra hayvanlarda özellikle çiftlik hayvanlarında verim yönünden değerli bazı özelliklerin tespitinde ve ilaçların etkilerinin araştırılmasında da kullanıldığı bilinmektedir (100). Sığırlarda mastitisin teşhisinde kullanılabilen bazı miRNA'lar Tablo 3'te verilmiştir.

Tablo 3: Sığırlarda mastitisin teşhisinde biyobelirteç olarak kullanılabilecek bazı miRNA'lar (112).

Hastalık	Patojen	Örnek Doku	Potansiyel miRNA Biyobelirteçleri
Mastitis	<i>Streptococcus uberis</i>	Meme Epitel Dokusu	miR-200c, miR-210, miR-193a, miR-29b-2, miR-130a, miR-98, let-7b, miR-24-2, miR-128-2, let-7d, miR-128-1, let-7e, miR-185, miR-652, miR-494, miR-2342, miR-29c, miR-29e, miR-29b-2, miR-100, miR-130
		Meme Epitel Dokusu	miR-181a, miR-16 and miR-31
		Süt	miR-27b, miR-152, miR-194, miR-200b, miR-222, miR-379 and miR-18397
	<i>Staphylococcus aureus</i>	Meme Epitel Dokusu	miR-2339, miR-21-3p, miR-423-5p, miR-499, miR-92a, miR-193a-3p, miR-23a, miR-99b, miR-21-3p, miR-193a-3p, miR-365-3p, miR-30c, and miR-30b-5p
	<i>Escherichia coli</i>	Meme Epitel Dokusu	miR-184, miR-24-3p, miR-148, miR-486, ve let-7a-5p
	<i>Escherichia coli</i>	Meme Epitel Dokusu	miR-223, miR-16, miR-136, miR-136, miR-3660, miR-335 ve miR-378
	<i>Escherichia coli</i> ve <i>Staphylococcus aureus</i>	Meme Epitel Dokusu	miR-144, miR-451 and miR-7863
	<i>Streptococcus agalactiae</i>	Süt	miR-21, miR-146a, miR-155, miR-222, ve miR-383

3.3.4. Sütte miRNA'lar

Süt tüm memeli yavrular için en uygun beslenme, koruma ve gelişimsel devamlılık sağlayan tek besin kaynağıdır. Yavrular için oldukça zengin bir besin kaynağının olmasının yanında aynı zamanda fonksiyonel bir gıdadır (101,102). İçerisinde biyolojik olarak aktif bileşikler, büyüme faktörlerini, organizma için gerekli protein ve lipitleri, bağışıklık hücreleri gibi birçok maddeyi yapısında içerir (103,104).

miRNA'ların farklı türlerin sütlerinde varlığının tespit edilmesi ile birlikte süt miRNA'larının incelenmesi önemli bir konu haline gelmiştir. Özellikle sütün yoğun bir şekilde miRNA içermesi bu miRNA'ların fonksiyonel açıdan veya tanısal olarak tespit edilmesinin ve araştırılmasının önünü açmıştır (105).

Serum ve sütte bulunan miRNA'ların incelemesiyle süt içerisinde yer alan miRNA'ların önemli bir miktarının süte kan dolaşımından geçmediği bulunmuştur (106). Sütte bulunan bu miRNA'ların daha çok süt bezleri tarafından salgılandığı ve küçük bir miktarının ise dolaşımdan geçtiği kanısına varılmıştır (107). Yapılan çalışmalar sütte bulunan miRNA'ların en fazla meme dokusunda bulunduğunu ve bu miRNA'ların epitel kökenli olduğunu doğrulamıştır (108).

Son dönemde yapılan çalışmalarda, süt miRNA'larının büyük bir kısmının ekstrasellüler veziküllerde özellikle eksozomlar içerisinde bulunduğu ortaya konulmuştur (109).

Sütte bulunan miRNA'lar hastalıkların değerlendirmesinde ve teşhisinde kullanılabilmeleri nedeniyle özellikle önemlidir. miRNA'ların mastitis, stafilokok enfeksiyonları ve tüberküloz gibi bazı hastalıklarda biyobelirteç olarak kullanılabilecekleri yapılan çalışmalarla ortaya konulmuştur (110,111).

Yapılan çalışmalara bağlı olarak miRNA'ların biyolojik işlevlerinin yetişkin tüketicilerdeki önemi ve süt miRNA'larının sağlık ve hastalık üzerindeki etkisine olan ilgi her geçen gün istikrarlı bir şekilde artarak araştırılmaktadır.

3.3.5. Bu çalışmada incelenen miRNA'lar

Çalışmamızda insanlarda immun sistemin gelişmesinde, kemik mineralizasyonunda ve kanser oluşum mekanizmasında aktif rol oynayan aynı zamanda kanser riskini azalttığı belirlenen sağlık üzerine çeşitli etkileri belirlenmiş 4 adet miRNA seçilmiştir.

3.3.5.1. miRNA 15a

miRNA'ların kanserin biyogenezinde etkisinin olduğu ilk olarak 2001 yılında miRNA 15a'nın keşfedilmesi ile belirtilmiştir (113). Cimmino ve ark. (114) Kronik Lenfositik Lösemili (KLL) hastalarda yaptıkları bir çalışmada, bu miRNA'nın kanserleşme sürecine etki mekanizması ortaya konulmuştur. Çalışmada hasta bireylerin KLL hücrelerinde miR-15a'nın ekspresyon seviyesinin lenfoma proteini olan Bcl-2'nin üretimi ile ters bir orantıya sahip olduğu tespit edilmiş, böylece bu miRNA'nın tümör baskılayıcı etkisinin olduğu sonucuna varılmıştır.

Aqelian ve ark. (115) tarafından yapılan çalışmada bu miRNA'nın ifadesinin KLL, hipofiz adenomu ve prostat karsinomunda hücre çoğalmasını durdurarak kanser hücrelerini apoptoza götürdüğünü ve tümör oluşumunu baskıladığı belirtilmiştir. Farklı olarak KLL ve solid tümör vakalarında yapılmış olan çalışmada miRNA 15a'nın kanser hücrelerinde ekspresyon seviyesinin azaldığı veya silindiği belirtilmiştir. Bu da bu miRNA'nın tümör hücrelerinin değişiminde etkin bölge olabileceğini desteklemektedir (116).

Long ve ark. (117) yaptıkları bir araştırmada insanlarda karaciğer hücreleri hepatositlerden kaynaklanan ve primer bir tümör olarak adlandırılan hepatoselüler karsinomda (HCC), miRNA15a-5p'nin ekspresyon modelini ve fonksiyonel rollerini incelemişlerdir. Çalışmada klinik HCC numunelerinde miR-15a-5p'nin anormal ekspresyonunu araştırmak için kantitatif gerçek zamanlı PCR (qRT-PCR) kullanmışlardır. Çalışma sonucu olarak miRNA-15a-5p'nin HCC'de bir tümör baskılayıcı olduğunu ve düzenlenmesinin HCC'de beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF) aracılığıyla olduğunu belirtmişlerdir (117).

3.3.5.2 miRNA 34a

miRNA 34 ailesi özellikle p53 proteini ile olan bağlantısı nedeni ile önemli bir miRNA dır. P53 birçok hücresel olayda görev alarak tümör baskılamada çok önemli bir role sahiptir. Yapılan çalışmada miRNA 34 ailesinin p53 tarafından düzenlendiğini ve p53'ün görev aldığı hücresel yolların miRNA 34 yardımıyla düzenlendiğini belirtmişlerdir (118).

miRNA 34a hedef aldığı bazı genlerin translasyonlarını düzenleyerek bu genlerin tümör oluşumundaki etkilerini düzenler ve bu nedenle tümör supresör olarak adlandırılır (119).

Kolon kanserli dokularda yapılan çalışmada miRNA 34a'nın ifadesinin azaldığını ve dışarıdan miRNA 34a'nın hücreye verilmesinin tümör süpresör etkisi olduğunu belirtmişlerdir (120).

Slabakova ve ark. (121) yaptıkları çalışmada miRNA 34a'nın tümör baskılamasına katkıda bulunarak, tümör baskılamasının ana düzenleyicisi olarak kabul edildiğini belirtmişlerdir.

Lodygin ve ark. (122) miRNA 34a'ya yanıt veren genlerin hücre döngüsü ilelemesini, apoptozu, DNA onarımını ve anjiyogenezi düzenlemede rol oynadığını belirterek miRNA 34a'nın birden fazla kanser mekanizmasında tümör baskılayıcı olarak görev yaptığını bildirmişlerdir.

Halimi ve ark. (123) radyasyona maruz kalma oranı ile serum miRNA 34a düzeyinin miktarına dair yapmış oldukları çalışmada; çeşitli nedenlerle radyasyona maruz kalmanın büyük bir halk sağlığı sorunu olduğunu ve bunu hızlı bir şekilde ortaya çıkarabilmenin önemli olduğunu belirtmişlerdir. Çalışmalarında serum miRNA 34a düzeyinin bir gösterge olarak kullanılabileceğini ifade etmişlerdir.

3.3.5.3. miRNA 29b

Rossi ve ark. (124) miRNA 29b'nin insanlarda kemik mineralizasyonunun önemli bir düzenleyicisi olarak görev yaptığını, miRNA 29b'nin Multi-Miyelom (MM) ilişkili kemik hastalıklarının tedavisinde osteoklastik (OCL) hücre farklılaşmasını ve fonksiyonunu düzenlediğini belirtmişlerdir.

Kapinas ve ark. (125) yaptıkları çalışmada miRNA 29'un ifadesinin osteoblastogenez (OBL) sırasında yoğun bir şekilde düzenlendiğini ve geç mineralizasyon fazlarına kadar göreceli bir şekilde artış gösterdiğini belirtmişlerdir. Başka bir çalışmada miRNA 29b'nin OBL'yi durdurmakta görevli bazı proteinlerin salgılanmasını baskıladığını ortaya koymuşlardır (126).

Sriok ve ark. (127) sığırlarda mastitis hastalığının tespitinde miRNA'ların etkileri ve biyobelirteç olarak kullanılmalarını araştırdıkları çalışmada, miRNA 29b-2'nin mastitiste biyobelirteç olarak kullanılmasının umut verici niteliklere sahip olduğunu özellikle California Mastitis Testi (CMT) ile birlikte kullanıldığında hastalığın tespitinde kullanılabileceğini belirtmişlerdir.

Li ve ark. (128) miRNA'ların kas enerjisi ve protein metabolizmasının düzenlenmesinde etkilerinin olduğunu, miRNA 29b'nin kas atrofisinin patogenezinde önemli bir rol oynadığını belirterek, miRNA 29b'nin aşırı ekspresyonunun kas atrofisini artırırken miRNA 29b'yi azaltmanın kas atrofisini azalttığını bildirmişlerdir. Sonuç olarak, miRNA 29b'nin ekspresyonunu düzenlemenin kas atrofisi tedavisinde kullanılabileceğini belirtmişlerdir.

3.3.5.4. miRNA 223

miRNA 223 en fazla kemik iliğinde myeloid hücrelerde ifade edilmektedir. miRNA 223'ün birden fazla kanser çeşidinde bağışıklık sistemi ile ilgili hastalıklarda ve diğer birçok patolojik süreçte etkisinin olduğu belirtilmiştir (129).

Jeffries ve ark. (130) yaptıkları çalışmada; miRNA 223'ün omurgalılarda yüksek oranda korunan bir miRNA olduğunu, bazı hastalıklarda aktif rol oynayarak nötrofil olgunlaşmasının negatif düzenleyicisi olarak görev yaptıklarını, nötrofil ve makrofajlarda inflamasyonu baskıladıklarını belirtmişlerdir.

Zhang ve ark. (131) koroner kalp rahatsızlığı üzerine yaptıkları bir çalışmada, hastalık sırasında miRNA 223'ün plazmadaki seviyesinin değiştiğini belirterek bu miRNA'nın trombosit fonksiyonları ile ilişkili olduğunu bildirmişlerdir.

Li ve ark. (132) mide kanseri ile ilgili yapmış oldukları bir çalışmada kanserli dokuda miRNA 223'ün ekspresyonunda bir artmanın olduğu ve bu miRNA'nın metastatik olmayan kanserlerde invazyonu stimüle ettiğinitespit etmişlerdir.

Johnidis ve ark. (133) miRNA 223'ün granülosit üretiminde ve enflamatuvar yanıtta çok önemli rollerinin olduğunu belirterek miRNA 223'ün granülositlerin oluşumunu ve aktivasyonunu kontrol ettiğini bildirmişlerdir.

4- GEREÇ VE YÖNTEM

4.1. Gereç

Çalışmada incelenecek süt örnekleri için; inek (Holstein), manda (Anadolu), koyun (Zom koyunu), keçi (Kıl keçisi), ve eşek (Anadolu) türlerinden beşer adet süt numunesi olmak üzere toplamda 25 adet süt numunesi toplandı. Her bir hayvan türü için farklı çiftlikler seçildi ve ayrı ayrı tarihlerde gidilerek sütler toplandı. Genel olarak aynı ırka mensup benzer yaşlarda ve aynı rasyonla beslenen hayvanlar, sağlık kontrolleri yapılarak seçildi. Sütü alınacak hayvanların memelerinin temizliği ve dezenfeksiyonu yapıldıktan sonra hijyenik sağım kurallarına uyularak sağımları yapıldı. Sağımı yapılan hayvanların sütleri önceden sterilizasyonu yapılmış bir litrelik cam şişelere konuldu.

Sütler etrafı buz aküleri ile desteklenmiş termoboksa konularak soğuk zincir altında Veteriner Fakültesi Besin/Gıda Hijyeni Anabilim dalına ait laboratuvara getirildi.

Şekil 7: a-İşletmelerden süt alımı, b- Sütlerin termoboks çanta da shot şişelerde taşınması



a



b

4.2. Yöntem

Çalışmaya alınan sütlerde, süt kalite göstergesi olarak somatik hücre sayısı ve toplam mezofilik aerobik bakteri sayısı tespit edildi. miRNA'lar ile sütün bileşimi arasındaki korelasyon analizi için pH değeri, protein, yağ ve kuru madde tayini yapıldı.

4.2.1. Somatik hücre sayımı

Somatik hücre sayısı, çiğ sütün kalitesinin ve hijyenik özelliklerinin belirlenmesinde kullanılan bir parametredir. Ayrıca SHS meme sağlığının belirlenmesinde ve sağlıklı olarak kabul edilmesinde kullanılan bir belirteçtir (134).

Veteriner Fakültesi Zootečni Anabilim dalına ait laboratuvarında bulunan Milkana Somatic Scan (Mayasan, Türkiye) cihazı kullanılarak somatik hücre sayımları gerçekleştirilmiştir. Ölçüm öncesi öncelikle cihazın kalibrasyonu yapıldı. Daha sonra ölçüm için kullanılacak solüsyon hazırlandı. Bunun için 3,5 g milkoprim toz tartılarak üzerine 30-35 santigrat derecede ısıtılmış distile sudan 100 mL eklenerek solüsyon hazır hale getirildi. Hazırlanan solüsyondan 5 mL alındı ve üzerine homojenize edilmiş ve oda ısısına getirilmiş süt numunelerinden 10 mL eklenerek cihaza konuldu ve ölçümler yapılarak somatik hücre sayıları tespit edildi (135).

Şekil 8 : Somatik Hücre Sayım Cihazı (Mayasan, Türkiye)



4.2.2 Toplam mezofil aerobik bakteri sayımı

Süt örneklerinden aseptik koşullarda 1 mL alındı ve içerisinde 9 mL %0,1'lik peptonlu su bulunan steril tüplere eklendi. Böylece örneğin 1/10'luk dilüsyonu hazırlandı. Bu dilüsyondan 10^7 'ye kadar desimal dilüsyonlar yapıldı. Toplam Mezofilik aerobik bakteri (TMAB) sayısını tespit etmek için dökme plak yöntemi ile Plate Count Agar (Merck, Almanya) besi yerine ekim yapıldı. 30 °C'de 72 saat inkübasyon işlemi uygulandıktan sonra üreme gösteren koloniler sayılarak TMAB sayısı tespit edildi (136).

4.2.3. pH tayini

Sütlerin pH ölçümleri laboratuvarımızda bulunan pH metre ölçüm cihazı (İnolab WTW730, Germany) ile yapıldı. Üretici firmanın kullanım talimatlarına uyularak ölçümler gerçekleştirildi. İlk olarak, standart pH solüsyonları (pH: 4 ve pH: 7) kullanılarak pH metrenin kalibrasyonu yapıldı. Kalibrasyon sonrası pH metrenin elektrotları saf su ile yıkanarak temizlendi. Ölçüm için 10 mL süt numunesi alınarak homojen hale getirildi ve elektrotlar bu numunelere daldırılarak ekranda sabit bir değer oluşuncaya kadar beklenilerek ölçümler yapıldı. Her bir ölçümde elektrotlar saf su ile yıkandı, kurutuldu ve diğer numunelerin pH ölçümleri yapıldı (137).

4.2.4. Yağ tayini

Sütlerin yağ tayini TS ISO 2446'ya göre Gerber metodu kullanılarak yapılmıştır. İlk olarak bütirometreye 10 mL H_2SO_4 (Sülfirik Asit) herhangi bir hava kabarcığı oluşturmayacak şekilde eklendi. Oda ısısına getirilen ve karıştırılarak homojenize edilmiş süttten 11 mL alınarak bütirometreye yavaş ve dikkatlice koyu renk oluşturmayacak şekilde konuldu. Daha sonra bütirometreye 1 mL amil alkol eklenerek bütirometrenin ağzı tıpa ile kapatıldı. Bütirometre ortamdaki pıhtılaşma kaybolana kadar çalkalamadan hafif dönme hareketleriyle karıştırıldı. Aynı süttten ikinci bir tekrar numune hazırlanarak iki bütirometre 1200 devirde 5 dakika Gerber Santrifüjüne (Funke-Gerber, Germany) konularak çalıştırıldı. Yağ miktarı bütirometre skalasından okunarak tespit edildi (138).

4.2.5. Kuru madde tayini

Sütlerde kuru madde tayini refraktometre kullanılarak gerçekleştirildi. Refraktometre, süt ve benzeri akışkanlarda ışığın kırılma indisinden faydalanarak suda çözünen kuru maddeyi ölçebilen bir cihazdır. İlk olarak üzerindeki prizma kapağı açıldı ve birkaç damla saf su konularak ışığa doğru tutuldu ve saf suyun ölçümü yapıldı. Refraktometre de okunan değer sıfır ise aletin kalibrasyonu doğrudur, değil ise sıfıra getirilerek kalibre edildi. Daha sonra kalibrasyonu tamamlanmış cihaza birkaç damla süt konuldu ve ışığa doğru tutularak sütün kuru madde miktarı okunarak tespit edildi (139).

4.2.6. Protein tayini

Sütlerin protein miktarlarının ölçümü Süt Anaiz Cihazında (Funke Gerber Lactostar 3510, Germany) gerçekleştirildi. Ölçüme hazır hale getirilmiş cihaza, oda ısısına getirilmiş ve karıştırılarak homojenize edilmiş yaklaşık 15 mL süt numunesi yerleştirildi. Numune bir pompa aracılığı ile emilir ve ölçüm hücrelerine gönderilir. Protein oranı kombine impedans sensör teknolojisi ile ölçümü yapılarak tespit edildi (140).

4.2.7. Isı uygulamaları

Çalışmamız da sütlerle farklı ısı dereceleri uygulayarak, sütlerde bulunan miRNA miktarındaki değişimleri ortaya çıkarmak amaçlanmıştır. Sütlerin pastörizasyon ve sterilizasyonu için Joseph ve ark. (141)'nin uygulamış oldukları metot modifiye edilerek kullanıldı ve sütler yağ banyosu cihazı (Memmert One-10, Germany) kullanılarak yağ banyosunda ısı işleme tabi tutuldu.

Bu amaçla sütlerle 3 farklı derecede ısı uygulandı.

- 63 °C'de 30 dakika (Düşük sıcaklıkta uzun süre, Pastörizasyon 1)
- 90 °C'de 10 dakika (Yüksek sıcaklıkta, Pastörizasyon 2)
- 135 °C'de 1-3 saniye (Çok Yüksek Sıcaklıkta (UHT), Sterilizasyon)

Laboratuara getirilen sütlerin her birinden 40 mL alındı. Önceden sterilizasyonu yapılmış 500 mL'lik shot şişelere konularak laboratuarda bulunan yağ banyosunda

öncelikle 63 °C derecede 30 dakika bekletilmek suretiyle pastörizasyon işlemi yapıldı. Bu işlem sonrası uygulama numuneleri “P1” olarak adlandırıldı.

2. grup numuneler için her bir hayvana ait süttten 40 mL alınarak 500 mL’lik shot şişelere konulmuş ve yağ banyosunda 90 °C derecede 10 dakika bekletilmek suretiyle pastörizasyon işlemi yapıldı. Bu işlem sonrası uygulama numuneleri “P2” olarak adlandırıldı.

3. grup numuneler için her bir hayvana ait süttten 40 mL alınarak 500 mL’lik shot şişelere konulmuş ve yağ banyosunda 135 °C derecede birkaç saniye bekletilmek suretiyle sterilizasyon işlemi yapıldı. Bu işlem sonrası uygulama numuneleri “S” olarak adlandırıldı.

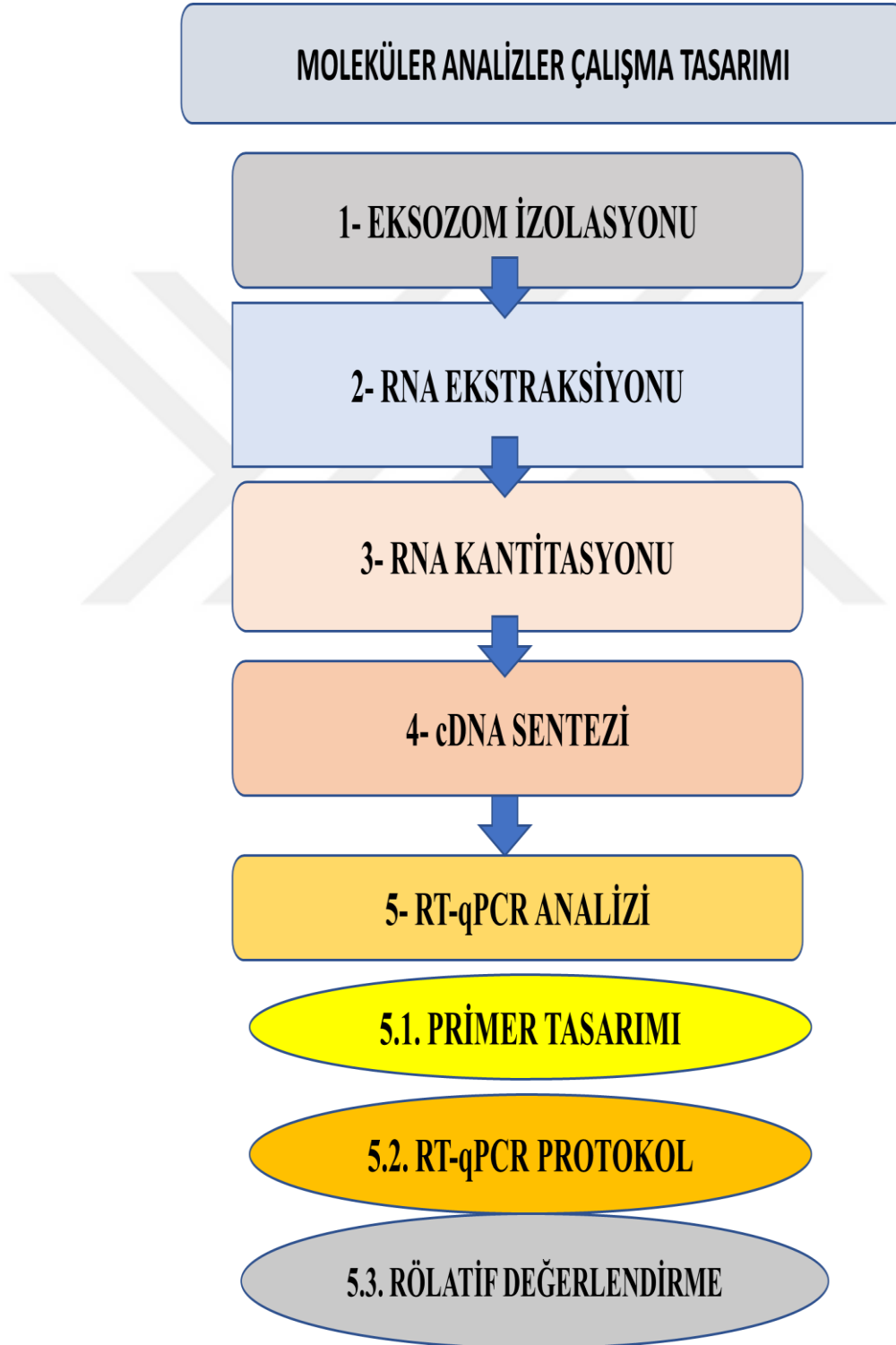
Ölçümler yapılırken sıcaklık ve zaman kontrolleri hassasiyetle takip edildi. Ölçümler dijital termometre ve infrared termometre (Optris MS series, Germany) kullanılarak yapıldı.



Şekil 9: Yağ banyosunda ısı uygulamaları

Ölçümler yapıldıktan sonra sütler 50 mL’lik steril falkon tüplere konularak Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji laboratuvarında bulunan derin dondurucuda –80 °C’de muhafaza edildi.

4.2.8 Moleküler analizler



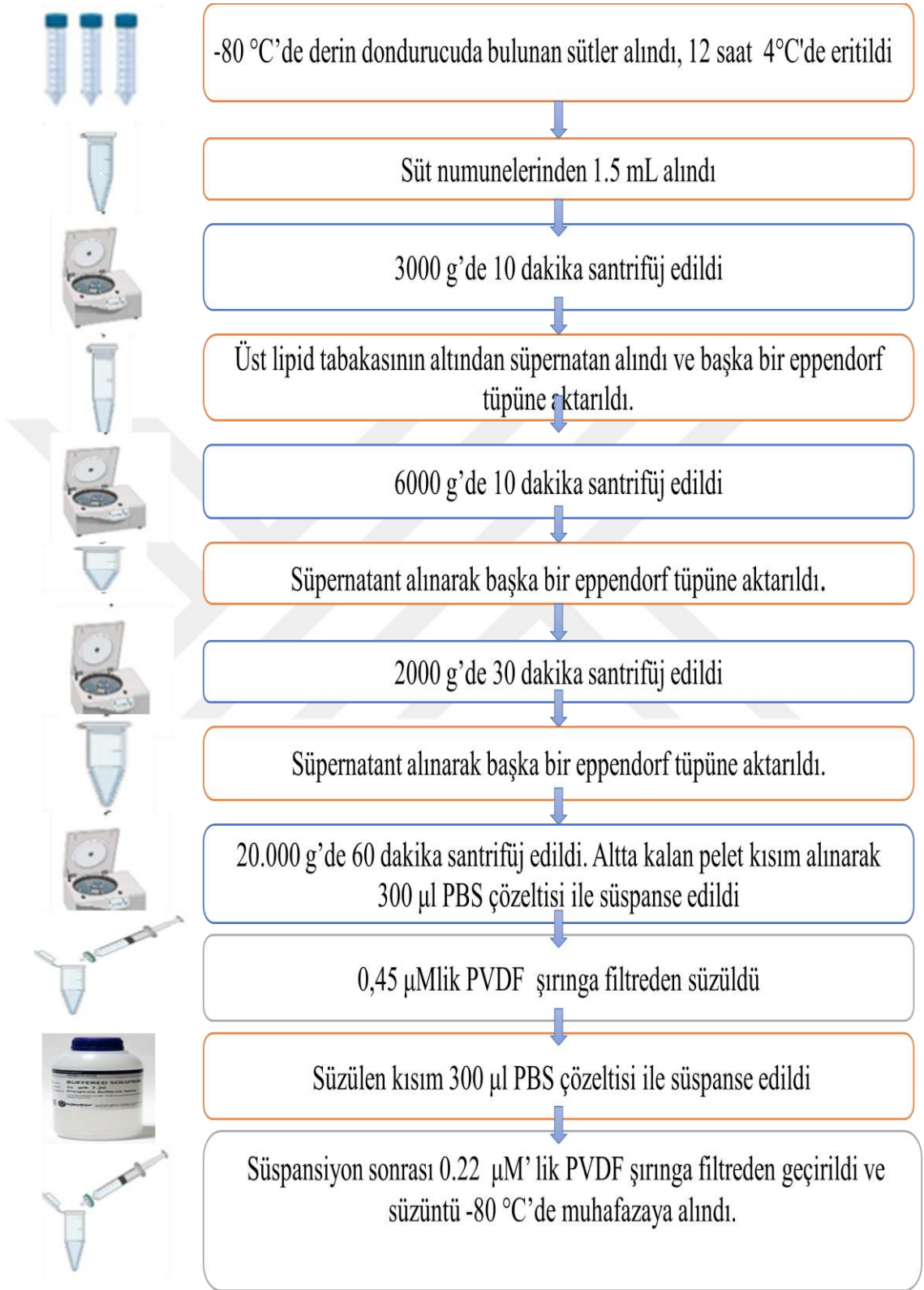
Şekil 10: Moleküler analizler çalışma tasarımının şematik gösterimi

4.2.8.1. Süt eksozomlarının izolasyonu

Süt polidispers bir yapıda olduğu için içerisinde birçok madde içermektedir. Sütün bu yapısı içerisinde eksozomları izole edebilmek için Hata ve ark. (142)'nin uygulamış oldukları eksozom izolasyon metodu modifiye edilerek kullanıldı. Bir dizi santrifüj işlemi ve filtrasyon işlemi birlikte kullanılarak bir izolasyon metodu geliştirildi.

Bu amaçla ; -80°C 'de derin dondurucuda bulunan sütler alınarak, buzdolabında 4°C 'de 12 saat boyunca eritildi ve söz konusu metot uygulanarak eksozomların izolasyonu yapıldı. İlk olarak çözölmüş ve vorteksenerek homojen hale getirilmiş süt numunelerinden 1,5 mL alınarak 3000 g'de 10 dakika santrifüj edildi. Daha sonra üst lipid tabakasının altından süpernatant alındı ve başka bir eppendorf tüpüne aktarıldı. 6000 g'de 4°C 'de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant alınarak başka bir eppendorf tüpüne aktarıldı. 2000 g'de 4°C 'de 30 dakika tekrar santrifüj edilerek süpernatant alındı ve başka bir eppendorf tüpüne aktarıldı. Tüpler bu defa 20.000 g'de 4°C 'de 60 dakika santrifüj edildi.

Bu kez santrifüj sonrası tüplerde altta kalan pelet kısmı alınarak 300 µl PBS çözeltisi ile süspanse edildi. Daha sonra tüpler 20.000 g'de 60 dakika santrifüj edilerek süpernatant kısmı alındı ve başka bir eppendorf tüpüne aktarıldı. Eppendorf tüplerinden alınan numuneler 0,45 µM'lik PVDF şırınga filtreden süzöldü. Süzöntü PBS ile tekrar süspanse edildi ve süspanسیون sonrası 0,22 µM'lik PVDF şırınga filtreden geçirildi. Elde edilen süzöntü içindeki eksozomlar RNA ekstraksiyonuna kadar -80°C 'de muhafaza altına alındı. Eksozomların izolasyon aşamaları Şekil 11'de gösterilmiştir.



Şekil 11: Eksozomların izolasyon aşamaları

4.2.8.2. RNA izolasyonu

Elde edilen eksozomlardan miRNA'ların elde edilmesi amacıyla RNA izolasyonu yapıldı. RNA izolasyonu için Zymo Research Direct-zol RNA MiniPrep Plus (Cat no: R2072 Lot no: ZRC201547) miRNA izolasyon kiti kullandı (Şekil 12).



Şekil 12: Çalışmada kullanılan miRNA izolasyon kiti

RNA izolasyonu için kullanılan yöntem aşağıdaki gibidir;

1. Süt örneklerinden izole edilen 200 µl eksozomun üzerine 500 µl TRIzol reaktifi eklendi ve pipetaj yapılarak karıştırıldı.
2. Karışım 5 dakika oda ısısında hafif bir şekilde tüpün alt üst edilmesi suretiyle karıştırılarak inkübe edildi.
3. Her bir örneğe 200 µl kloroform eklendi. Kloroformun karışması için tüplerdeki beyaz tortular eriyene kadar tüm örnekler iyice vorteksenerek 10 dakika oda ısısında inkübe edildi.
4. İnkubasyon sonrası örnekler 12.000 g'de 4 °C'de 15 dakika süreyle santrifüj edildi. Santrifüj işlemi sonrasında kloroform sayesinde faz ayrımı sağlanmış oldu. Toplama tüpünde üç ayrı faz oluştu:
 - Üstte RNA'ları bulunduran şeffaf renksiz sıvı faz
 - Ortada DNA'ları bulunduran beyaz renkli ara faz
 - Altta proteinleri bulunduran pembe-kırmızı renkli faz

5. Örnek sayısı kadar 2 mL'lik eppendorf tüpleri hazırlandı. Her bir eppendorf tüpüne 250 µl propanol eklendi.
6. Santrifüj sonrası tüplerde üstte oluşan sulu fazın tamamı alınarak daha önceden propanol konularak hazırlanmış olan eppendorf tüplerine aktarıldı. Pipetaj yapılarak karışımın birbirine iyice karışması sağlandı.
7. Hazırlanan bu karışım izolasyon kitine ait kolona aktarıldı.
8. Kolonlar 12.000 x g'de santrifüj edildi. Kolonların alt kısmında kalan tüpler ters çevrilerek döküldü.
9. Eppendorf tüpündeki örnekten tekrar izolasyon kitine ait kolona aktarıldı ve kolonlar 12.000 x g'de santrifüj edildi. Kolonların alt kısmında kalan tüpler ters çevrilerek döküldü tüm örnek bitinceye kadar 7-8 ve 9. adımlar tekrarlandı. Her seferinde örnekler santrifüje edilerek kolonun altındaki kısım ters çevrilerek döküldü.
10. Daha sonra kolonlara kit içeriğinde bulunan Direct –Zol RNA PreWash'tan 400 µl eklendi ve kolonlar 12.000 x g'de 1 dakika santrifüj edildi. Kolonların alt kısmında kalan tüpler ters çevrilerek döküldü
11. Kolonlara Kit içeriğinde bulunan Direct–Zol RNA Wash Buffer'dan 700 µl eklendi ve kolonlar 12.000 x g'de 1 dakika santrifüj edildi. Kolonların alt kısmında kalan tüpler ters çevrilerek döküldü
12. Kolonlar üzerine 60 µl RNase-free su eklendi, 1 dk oda ısısında bekletildi ve daha sonra 12.000 x g'de 1 dakika santrifüj edildi. Böylece içerisinde miRNA'ları da içeren RNA elde edilmiş oldu.

4.2.8.3. Nanodrop ile RNA ölçümü

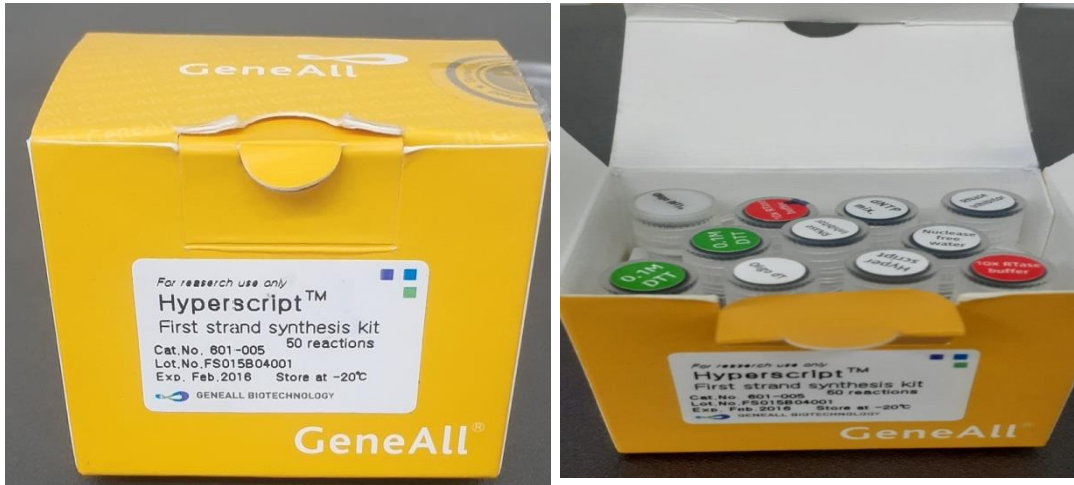
Elde edilen RNA'ların ölçümü Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Genetik Anabilim Dalı Laboratuvarında bulunan spektrofotometri cihazı (Thermo NanoDrop Nd2000) kullanılarak yapıldı. Her bir örnek için elde edilen RNA'lardan 2 µl alınarak cihaza yerleştirildi ve ölçüm yapıldı.



Şekil 13: Spektrofotometre (Thermo NanoDrop Nd2000)

4.2.8.4 Komplementer DNA (cDNA) sentezi

Ekstraksiyon sonrası elde edilen RNA'lar, miRNA'ların degradasyonunu ve bunun sonucu oluşabilecek olumsuz sonuçları önlemek amacıyla miRNA'ya göre daha dayanıklı olan cDNA'ya çevrilmelidir. Bu amaçla tüm örnekler Gene All Hyper Script First Strand Synthesis Kiti (Cat no:601-005) kullanılarak cDNA'ya çevrildi. Bunun için Veteriner Fakültesi Genetik Anabilim Dalı Laboratuvarında bulunan Applied Biosystems Veriti Thermal Cycler cihazı kullanıldı.



Şekil 14: Çalışmada kullanılan cDNA sentez kiti

Çalışma iki aşamada gerçekleştirildi. Birinci aşamada Tablo 4’deki bileşenler hazırlandı.

Tablo 4 : cDNA sentezi 1. aşama için gerekli bileşenler

Kullanılan Bileşen	Miktarı
miRNA(ekstrakte ettiğimiz)	5 µl
Primer	1 µl
dNTP (10 mM)	1 µl
Nucleaz FreeWater	7 µl
Toplam	14 µl

Bileşenler hazırlandıktan sonra 65 °C’de 5 dakika inkubasyona bırakıldı. Daha sonra soğutulmak üzere hemen buz üstüne alındı. İkinci aşama için kullanılan bileşenler Tablo 5’de verildi.

Tablo 5: cDNA sentezi 2. aşama için gerekli bileşenler

Kullanılan Bileşen	Miktarı
Reaksiyon Buffer	2 µl
DTT (0,1 M)	2 µl
Enzim (Hyperscript Rev.Transcriptase)	1 µl
İnhibitör(ZymAll Rnase İnhibitör)	1 µl
Toplam	6 µl

İkinci aşamada hazırlanan toplam 6 µl karışım birinci aşamada hazırlanan her bir örneğin üzerine eklendi. Hazırlanan karışım termal döngü cihazına konuldu. Cihazda uygulanan ısı-zaman prosedürü Tablo 6’da verilmiştir.

Tablo 6: cDNA sentezi için termal döngü cihazında uygulanan prosedür.

Uygulanan Sıcaklık	Süre
16 °C	30 dakika
30 °C	30 saniye
42 °C	30 saniye
50 °C	1 saniye
85 °C	5 dakika

PCR cihazının süresinin sona ermesiyle cDNA’larımız hazırlanmış oldu.

4.2.8.5. Real time PCR analizi

4.2.8.5.1 Primer tasarımı

Çalışmada kullanılan beş hayvan türüne (inek, manda, koyun, keçi, eşek) uyumlu primerler seçildi. Kullanılan miRNA primerleri Tablo 7’de verilmiştir. miRNA seviyelerinin rölatif olarak değerlendirilmesi için daha önce süt ile ilgili yapılan çalışmalarda referans gen olarak kullanılan miRNA 92a geni referans gen olarak seçildi (143).

Tablo 7 : Çalışmada kullanılan primerlere ait gen dizilimi

miRNA	Primer Dizilimi
bta-miR-223 RT primer	5'GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACTGGGGT
bta-miR-223 Forward	AACGGCTGTCAGTTTGTC
chi-miR-15a-5p RT primer	5'GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACCCACAA
chi-miR-15a-5p Forward	AACCGGTAGCAGCACATAATG
bta-miR-34a RTprimer	5'GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACACAACC
bta-miR-34a Forward	AACCGGTGGCAGTGCTTAG
chi-miR-29b-5p RT primer	5'GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACTCTAAG
chi-miR-29b-5p Forward	AACACGCCTGGTTTCACATG

4.2.8.5.2. Real time PCR protokol

Konvansiyonel PCR ile elde edilen cDNA’lar genel olarak floresan boya ile belirlenmiş problemlerin kullanıldığı ve floresanın cihaza yerleştirilen ürün miktarı ile doğru orantılı olarak arttığı ve bunun monitöre yansıtıldığı bir yöntem olan Real-Time PCR için hazırlandı (144).

Bu amaçla Veteriner Fakültesi Besin/ Gıda Hijyeni Anabilim Dalı laboratuvarında bulunan Applied Biosystems 7500 and FAST Real-Time PCR System Cihazı kullanıldı. Çalışma için Promega Go-taq RT - Master mix (Cat no: A6002)

kullanıldı. Kit protokolü çalışma için modifiye edilerek kullanıldı. Kullanılan kite ait resim Şekil 15’te verilmiştir.



Şekil 15 : Real-Time PCR için kullanılan Kit

RT-PCR için gerekli olan bileşenler ve hacimleri Tablo 8'de verilmiştir.

Tablo 8 : RT-PCR için gerekli olan bileşenler ve hacimleri

PCR Bileşenleri	Miktarı
Syber Green Master Mix (2X)	5 µl
Forward Primer (20X)	1 µl
Reverse Primer (20X)	1 µl
cDNA	2 µl
Nucleaz FreeWater	1 µl
Toplam	10 µl

Bileşen miktarları belirlendikten sonra özel PCR plate’lerinde miksler hazırlanarak üstleri jelatin ile kapatıldı ve Real-time PCR cihazına yerleştirildi. Cihazda uygulanan ısı ve zaman döngüsü Tablo 9’da verilmiştir.

Tablo 9 : RT-PCR için termal döngü cihazında uygulanan prosedür

Uygulanan Sıcaklık	Süre	
95°C	2 dakika	
95°C	15 saniye	x40
60°C	1 dakika	

4.2.8.5.3. Rölatif teknik ile değerlendirme

Çalışmanın Real-time PCR veri değerlendirilmesinde rölatif ölçüm tekniği kullanıldı. Bu  l  m metodunda; hedef gende oluşan değişimi ifade edebilmek için kontrol grubu kullanılmaktadır. Kullanılan bu kontrol grubu hedeflenen gen ile aynı reaksiyonda bulunmalıdır (145).

Hayvan türlerinden elde edilen çiğ sütler kontrol grubu olarak kabul edildi. Yapılan değerlendirmelerde de bu esas alındı. Her bir hayvan türüne ait sütlerde uygulanan ısıl işlemler sonucu elde edilen P1, P2 ve S grubu sütlerin miRNA içerikleri kendi aralarında kıyaslandı. RT-PCR'da floresan değerinin eşik değerin üstüne çıktığı nokta cycle threshold (Ct) değeri olarak adlandırılır. Karşılaştırmalarda kullanılmak için öncelikle her bir miRNA için RT-PCR sonucu olarak elde edilmiş olan Ct eşik değerleri kullanıldı. Daha sonra ΔCt değerleri oluşturuldu. Bunun için; Birinci ΔCt değeri için, ilgili genin Ct değerinden referans gen olarak kabul edilen miRNA 92a'ya ait Ct değeri çıkarılarak ilk ΔCt değerleri elde edildi (145).

$$\Delta Ct_1 = Ct_{(hedef\ gen)} - Ct_{(referans\ gen)}$$

 kinci ΔCt değeri için kontrol grubundaki genin Ct değerinden referans gen olarak kabul edilen miRNA 92a'ya ait Ct değeri çıkarılarak ikinci ΔCt değerleri elde edildi (145).

$$\Delta Ct_2 = Ct_{(kontrol)} - Ct_{(referans\ gen)}$$

Birinci ΔCt değerinden  kinci ΔCt  ıkarılarak $\Delta\Delta Ct$ değeri elde edildi.

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_1 - \Delta Ct_2$$

Son olarak $\Delta\Delta Ct$ değerinden formülize edilerek $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri elde edildi. $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri kullanılarak her bir hayvan türüne ait sütlerde uygulanan ısıl işlemler sonucu elde edilen pastörizasyon sütler (P1, P2) ve steril sütler kendi aralarında kıyaslanarak karşılaştırıldı.

4.2.9. İstatiksel analizler

Hayvan türlerine göre sütlerde protein, yağ, kuru madde ve pH oranları ile miRNA (miRNA 15a, miRNA 29b, miRNA 34a ve miRNA 223) değerleri arasındaki korelasyon katsayıları ve önem düzeyleri Spearman korelasyon analizi kullanılarak gerçekleştirildi. Tüm analizler için SPSS 22.0 programı kullanıldı (146).

Ayrıca çalışmada miRNA'ların uygulanan ısı işlemler ile etkileşimleri istatistiksel olarak değerlendirildi. miRNA gen ekspresyonlarında meydana gelen değişiklikler için Ct (thresholdcycle) eşik değeri kullanıldı. Çalışmada miRNA 92a referans gen olarak kabul edildi. Elde edilen Ct eşik değerleri excel programı yardımıyla tüm miRNA'ların $2^{-\Delta\Delta Ct}$ hesaplamaları yapıldı. miRNA örneklerinin istatistiksel analizleri Graph pad Prism 8.0.2 versiyon paket programı kullanılarak anlamlılıkları değerlendirildi. Gruplar arası istatistiksel değerlendirmeler nonparametrik testlerden Mann Whitney-U Testi ile karşılaştırıldı. P değeri <0,05 olduğunda anlamlı olarak kabul edildi.

5- BULGULAR

5.1. Sütlerin Analiz Sonuçları

Yapılan analizlerin fiziko-kimyasal sonuçları Tablo 10’da verildi.

Tablo 10 : Türlerle ait sütlerin fiziko-kimyasal özellikleri(

Tür	Kuru madde	Protein	Yağ	pH
İnek Sütü	11,45 ± 0,49	3,16 ± 0,53	3,28 ± 0,11	6,61 ± 0,10
Manda Sütü	13,4 ± 0,74	5,24 ± 0,63	7,06 ± 1,32	6,7 ± 0,1
Koyun Sütü	15,8 ± 0,67	8,84 ± 0,45	7,12 ± 0,51	6,6 ± 0,18
Keçi Sütü	9,4 ± 1,03	4,05 ± 0,8	4,29 ± 0,1	6,44 ± 0,04
Eşek Sütü	5,86 ± 0,41	0,72 ± 0,43	3,3 ± 0,39	7,46 ± 0,07

5.2 Somatik Hücre Sayısı

Sütte yer alan somatik hücreler; lökositler, eritrositler, epitel hücreler, plazma hücreleri, skuamoz hücreler ve epitel hücrelerin döküntülerinden oluşur. Hayvan türlerine ait somatik hücre sayısı Tablo 11’de verildi.

Tablo 11 : Türlerle ait sütlerin somatik hücre sayıları

SOMATİK HÜCRE SAYISI					
SIRA	İNEK SÜTÜ	KOYUN SÜTÜ	KEÇİ SÜTÜ	MANDA SÜTÜ	EŞEK SÜTÜ
1	2,37x10 ⁵	2,7 x10 ⁵	<9 x10 ⁴	<9 x10 ⁴	<9 x10 ⁴
2	2,03 x10 ⁵	1,78 x10 ⁵	<9 x10 ⁴	1,06 x10 ⁵	<9 x10 ⁴
3	2,12 x10 ⁵	1,7 x10 ⁵	<9 x10 ⁴	1,11 x10 ⁵	<9 x10 ⁴
4	1,98 x10 ⁵	2,83 x10 ⁵	<9 x10 ⁴	1,48 x10 ⁵	<9 x10 ⁴
5	1,87 x10 ⁵	4,6 x10 ⁵	<9 x10 ⁴	<9 x10 ⁴	<9 x10 ⁴

5.3 Toplam Mezofilik Aerob Bakteri Sayısı

Türlerle göre toplam mezofilik aerobik bakteri (TMAB) sayısı Tablo 12’de verilmiştir.

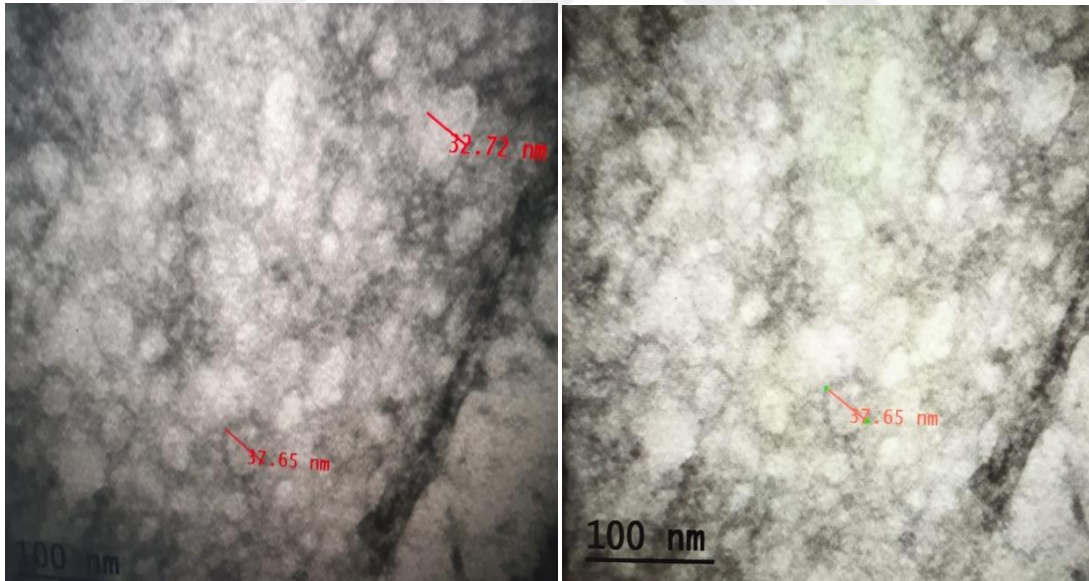
Tablo 12 : Türlerle ait sütlerin TMAB sayıları

SIRA	TMAB (log ₁₀ kob/mL)				
	İNEK SÜTÜ	KOYUN SÜTÜ	KEÇİ SÜTÜ	MANDA SÜTÜ	EŞEK SÜTÜ
1	6,04	5,04	4,90	6,63	4,89
2	5,78	4,60	4,49	6,41	5,32
3	5,63	4,30	4,29	6,49	4,75
4	4,69	5,07	5,32	6,23	5,50
5	5,57	5,64	5,20	6,27	5,44

5.4. Eksozomların Görüntülenmesi

Eksozom ekstraksiyonu sonucu elde edilen eksozomların görüntülenmesi Dicle Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezinde bulunan Transmission Electron Microscope (TEM) cihazı (Jeol jem-1010,USA) kullanılmıştır. Elde edilen bazı eksozomların görüntüsü Şekil 16’da görülmektedir.

Şekil 16 : Eksozomların TEM’de görüntüsü



5.5. RNA İzolasyon Sonuçları

Eksozomlardan miRNA’ların elde edilmesi amacıyla Zymo Research Direct-zol RNA MiniPrep Plus (Cat no: R2072 Lot no: ZRC201547) miRNA izolasyon kiti kullanım protokolü modifiye edilerek hazırlandı. Ölçümler Thermo NanoDrop Nd

2000 spektrofotometri cihazı kullanılarak yapıldı. Ölçümler için RNA'nın saflık derecesini ölçmekte kullanılan 260 nm ve 280 nm dalga boyutundaki absorbans oranı kullanıldı.

5.6. Real Time PCR sonuçları ve İstatiksel Değerlendirme

Hayvan türlerine göre sütlerde protein, yağ, kuru madde ve pH oranları ile miRNA (miRNA 15a, miRNA 29b, miRNA 34a ve miRNA223) değerleri arasındaki korelasyon katsayıları ve önem düzeylerine ait veriler Tablo 13'te verilmiştir.

Çalışmanın ısıya bağlı değişimleri için rölatif değerlendirme metodu kullanıldı. Hayvan türlerine ait Ct, Δ Ct değerleri Tablo 14, 16, 18, 20 ve 22'de verildi. Elde edilen $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerlerine ait veriler Tablo 15, 17, 19, 21 ve 23'te istatistik değerlerine göre yapılan karşılaştırmalar ise Şekil 16, 17, 18, 19 ve 20'de verilmiştir.

Real-time PCR verilerinin değerlendirilmesinde her miRNA için Ct (cycle threshold/eşik değer) değeri elde edildi. Daha sonra miRNA 92a'ya ait Ct değerleri referans gen kabul edilerek normalizasyon için ilgili genin Ct değerinden referans genin Ct değeri çıkarılarak Δ Ct değerleri bulundu. Normalizasyon değerleri Tablo 24'te verildi. Normalizasyona göre oluşturulan grafik Şekil 21'de verilmiştir.

İncelenen miRNA'lara ait gerçek zamanlı PCR grafikleri EK-1'de verilmiştir.

Tablo 13 : Sütlerin fizikokimyasal özellikleri ve miRNA'lar arasındaki korelasyon tablosu

Tür	miRNA	Kuru madde	Yağ	Protein	pH
İnek Sütü	miRNA 34A	-0,2	0,9	-0,7	-0,2
		0,74	0,03	0,18	0,74
	miRNA 29B	-0,15	-0,5	0,5	-0,7
		0,8	0,39	0,47	0,2
	miRNA 15A	-0,13	0,2	-0,6	0,5
		0,7	0,74	0,28	0,39
	miRNA 223	0,15	0,7	-0,5	0,4
Manda Sütü	miRNA 34A	0,8	0,18	0,25	0,5
		-0,41	-0,1	-0,66	0,56
	miRNA 29B	0,49	0,87	0,21	0,32
		-0,35	-0,2	-0,15	0,66
	miRNA 15A	0,55	0,65	0,8	0,21
		0,82	0,5	0,97	-0,6
	miRNA 223	0,08	0,39	0,05	0,2
Koyun Sütü	miRNA 34A	0,2	-0,1	0,15	-0,67
		0,74	0,87	0,8	0,21
	miRNA 29B	-0,94	-0,7	-0,1	0,9
		0,01	0,18	0,87	0,03
	miRNA 15A	-0,9	-0,9	0,05	0,8
		0,01	0,03	0,93	0,1
	miRNA 223	0,1	0,1	-0,7	-0,2
Keçi Sütü	miRNA 34A	0,86	0,87	0,17	0,74
		0,79	0,8	0,2	-0,6
	miRNA 29B	0,11	0,1	0,74	0,28
		0,2	0,3	0	-0,56
	miRNA 15A	0,74	0,61	1	0,32
		0,1	0,2	-0,3	-0,6
	miRNA 223	0,87	0,74	0,62	0,21
Eşek Sütü	miRNA 34A	0,7	0,66	0,9	0,2
		0,18	0,21	0,37	0,74
	miRNA 29B	0,9	0,82	0,7	-0,2
		0,03	0,08	0,18	0,74
	miRNA 15A	0,1	0,2	0,66	-0,1
		0,87	0,74	0,21	0,87
	miRNA 223	-0,66	0,9	-0,51	0,35

İnek sütünde miRNA 34a ile yağ arasında güçlü düzeyde pozitif ($r:0,9$) ve anlamlı bir ilişki görüldü ($P<0,05$).

Manda sütünde miRNA 15a ile kuru madde ($r:0,82$) ve protein ($r:0,97$) arasında her ne kadar güçlü düzeyde pozitif bir ilişki bulunmuş olsa da istatistiksel açıdan bu ilişkilerin önemli olmadığı saptandı ($P>0,05$).

Koyun sütünde miRNA 34a ile pH arasında güçlü düzeyde pozitif ($r: 0,9$) ve anlamlı bir ilişki bulundu ($P<0,05$).

Koyun sütünde miRNA 29b ile kuru madde ($r:0,8$) ve yağ ($r:0,9$) arasında, miRNA 34a ile kuru madde ($r:0,94$) arasında güçlü düzeyde negatif ve anlamlı bir ilişki bulundu ($P<0,05$).

Koyun sütünde miRNA 223 ile kuru madde ($r:0,79$) ve yağ ($r:0,8$) arasında, miRNA 29b ile pH ($r:0,8$) arasında istatistiksel olarak önemli olmayan güçlü düzeyde pozitif bir ilişki bulunmuş olsa da istatistiksel açıdan bu ilişkilerin önemli olmadığı gözlemlendi ($P>0,05$).

Keçi sütünde miRNA 223 ile kuru madde arasında güçlü düzeyde pozitif ($r:0,9$) ve anlamlı bir ilişki bulundu ($P<0,05$).

Keçi sütünde miRNA 223 ile yağ ($r:0,82$) arasında ve miRNA 15a ile protein ($r:0,9$) arasında istatistiksel açıdan önemli olmayan güçlü düzeyde pozitif bir ilişki bulundu ($P>0,05$).

Eşek sütünde miRNA 29b ile yağ arasında güçlü düzeyde pozitif ($r:0,9$) ve anlamlı bir ilişki tespit edildi ($P<0,05$).

Tablo 14: Keçi sütü örneklerinde Ct ve Δ Ct değerleri

KEÇİ SÜTÜ	Ct Değerleri					Δ Ct Değerleri			
	miRNA92a	miRNA 34a	miRNA 29b	miRNA 15a	miRNA 223	miRNA 34a	miRNA 29b	miRNA 15a	miRNA 223
K1Ç	27,85	21,3	20,35	33	32,02	-6,55	-7,5	5,15	4,17
K2Ç	25,06	24,8	19,43	30,63	29,59	-0,26	-5,63	5,57	4,53
K3Ç	26,51	23,2	21,61	35,36	33,93	-3,31	-4,9	8,85	7,42
K4Ç	27	21,6	20,34	34,02	35,89	-5,4	-6,66	7,02	8,89
K5Ç	29,62	20,47	20,45	35,95	36,91	-9,15	-9,17	6,33	7,29
K1P1	28,46	22,7	19,73	28,4	33,57	-5,76	-8,73	-0,06	5,11
K2P1	29	23,4	19,84	26,1	30	-5,6	-9,16	-2,9	1
K3P1	28,23	21,7	19,97	30,3	34,08	-6,53	-8,26	2,07	5,85
K4P1	27,32	20,5	17,81	28,89	35,9	-6,82	-9,51	1,57	8,58
K5P1	26,62	20,57	18,52	31,85	36,85	-6,05	-8,1	5,23	10,23
K1P2	29,97	21,7	22,48	35,17	34,11	-8,27	-7,49	5,2	4,14
K2P2	25,67	24,5	19,84	38,21	33,11	-1,17	-5,83	12,54	7,44
K3P2	28,98	22,6	21,69	37,16	34,44	-6,38	-7,29	8,18	5,46
K4P2	23,41	22,9	20,45	34,02	36,33	-0,51	-2,96	10,61	12,92
K5P2	23,95	21,8	20,94	35,2	36,88	-2,15	-3,01	11,25	12,93
K1S	25,81	22,5	20,29	31,73	31,69	-3,31	-5,52	5,92	5,88
K2S	27,21	24,5	19,98	31,65	29,72	-2,71	-7,23	4,44	2,51
K3S	28,11	22,4	21,54	36,22	33,47	-5,71	-6,57	8,11	5,36
K4S	29,57	23,1	21,06	33,35	35,24	-6,47	-8,51	3,78	5,67
K5S	32,35	20,4	20,19	35	35,89	-11,95	-12,16	2,65	3,54

K: Keçi Ç: Çiğ süt P1: Pastörizasyon 1(65 °C 30 dk.) P2: Pastörizasyon 2 (90 °C 100 dk.) S: Sterilizasyon (135 °C 1-2 Sn)

Tablo 15 : Keçi sütü örneklerinde $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri

$2^{-\Delta\Delta Ct}$ Değerleri				
KEÇİ SÜTÜ	miRNA 34a	miRNA 29b	miRNA 15a	miRNA 223
K1P1	0,37	1,53	24,25	0,34
K2P1	2,63	0,75	23,1	0,75
K3P1	2,82	3,11	33,35	0,9
K4P1	2,14	5,77	35,01	0,99
K5P1	0,93	3,81	17,14	1,04
K1P2	0,75	0,22	0,22	0,23
K2P2	1,23	0,75	0,05	0,08
K3P2	1,51	0,94	0,28	0,7
K4P2	0,4	0,92	1	0,73
K5P2	0,39	0,71	1,68	1,02
K1S	0,43	1,04	2,41	1,25
K2S	1,23	0,68	0,49	0,91
K3S	1,74	1,05	0,55	1,37
K4S	0,35	0,6	1,59	1,56
K5S	1,05	1,19	1,93	2,02

P1: Pastörizasyon 1(65 °C 30 dk.) P2:Pastörizasyon 2 (90 °C 100 dk.) S: Sterilizasyon (135 °C 1-2 Sn)

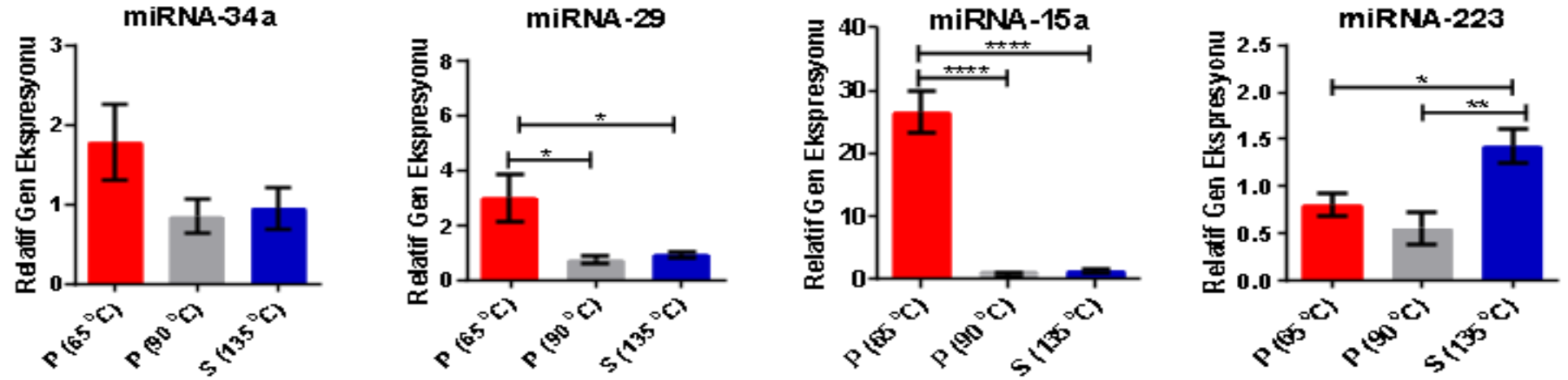
Keçi sütlerinde incelemesi yapılan;

miRNA 34a'nın gruplar arasında $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ifadesinde her ne kadar P1 ile S arasında bir azalma söz konusu olsa bile bu azalma istatistiki olarak bir anlam ifade etmemektedir ($P > 0,05$).

miRNA 29b ve miRNA-15a'nın gruplar arasındaki değerlerinde P1 ile P2 arasında ve P1 ile S arasında $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri istatistiki olarak anlamlı bulundu ($P < 0,05$).

miRNA 223'ün gruplar arasındaki P1 ile S arasında ve P2 ile S arasında $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri istatistiki olarak anlamlıydı ($P < 0,05$).

Keçi Sütleri



Şekil 17: Keçi sütlerinde ısı değişimine göre gruplar arasında çalışılan miRNA'lara ait relatif ifade seviyelerindeki kat değişimleri (P değeri <0,05).

Tablo 16: Koyun sütü örneklerinde Ct ve Δ Ct değerleri

KOYUN SÜTÜ	Ct Değerleri					Δ Ct Değerleri			
	miRNA92a	miRNA34a	miRNA29b	miRNA15a	miRNA223	miRNA34a	miRNA 29b	miRNA 15a	miRNA 223
Ko1Ç	28,16	23,24	19,2	29,26	33,15	-4,92	-8,96	1,1	4,99
Ko2Ç	29,1	23,8	18,03	32,1	32,76	-5,3	-11,07	3	3,66
Ko3Ç	31,1	24	18,9	31,99	33,51	-7,1	-12,2	0,89	2,41
Ko4Ç	28,77	22,7	17,63	32,07	30,96	-6,07	-11,14	3,3	2,19
Ko5Ç	29,07	24,6	18,87	30,25	33,56	-4,47	-10,2	1,18	4,49
Ko1P1	27,43	22,5	20,84	32,58	32,37	-4,93	-6,59	5,15	4,94
Ko2P1	27,3	23	19,5	33,29	32,17	-4,3	-7,8	5,99	4,87
Ko3P1	27,16	24,24	20,56	30,63	32,46	-2,92	-6,6	3,47	5,3
Ko4P1	28,04	23,2	19,1	31,03	30,67	-4,84	-8,94	2,99	2,63
Ko5P1	28,97	24,9	21,54	29,28	31,88	-4,07	-7,43	0,31	2,91
Ko1P2	29,06	23,24	19,85	33,67	31,96	-5,82	-9,21	4,61	2,9
Ko2P2	28,67	24,5	20,69	35,32	32,1	-4,17	-7,98	6,65	3,43
Ko3P2	28,56	24,74	19,02	36,28	33,13	-3,82	-9,54	7,72	4,57
Ko4P2	28,39	25,2	17,39	36,51	30,46	-3,19	-11	8,12	2,07
Ko5P2	28,76	27,8	18,94	36,89	33,21	-0,96	-9,82	8,13	4,45
Ko1S	30	22,3	18,91	31,42	34,3	-7,7	-11,09	1,42	4,3
Ko2S	27,26	23,3	20,23	33,43	33,35	-3,96	-7,03	6,17	6,09
Ko3S	27,4	23,74	19,77	32,24	34,64	-3,66	-7,63	4,84	7,24
Ko4S	27,8	21,2	20,52	35	33,9	-6,6	-7,28	7,2	6,1
Ko5S	28,45	24,3	19,1	31,27	34,52	-4,15	-9,35	2,82	6,07

Ko: Koyun Ç: Çiğ süt P1:Pastörizasyon 1(65 °C 30 dk.) P2:Pastörizasyon 2 (90 °C 100 dk.) S: Sterilizasyon (135 °C 1-2 sn.)

Tablo 17: Koyun sütü örneklerinde $2^{-\Delta\Delta C_t}$ değerleri

KOYUN SÜTÜ	$2^{-\Delta\Delta C_t}$ Değerleri			
	miRNA 34a	miRNA 29b	miRNA 15a	miRNA 223
Ko1P1	1,67	0,32	0,10	1,72
Ko2P1	1,74	0,36	0,44	1,51
Ko3P1	0,84	0,32	2,57	2,07
Ko4P1	0,70	0,36	2,06	1,22
Ko5P1	0,81	0,16	1,96	3,20
Ko1P2	1,00	0,64	0,05	2,28
Ko2P2	0,61	0,16	0,11	1,58
Ko3P2	0,59	0,92	0,05	1,30
Ko4P2	0,17	1,18	0,05	1,41
Ko5P2	0,1	0,95	0,01	1,28
Ko1S	1,91	1,22	0,22	0,45
Ko2S	1,41	0,22	0,40	0,66
Ko3S	1,19	0,55	0,84	0,46
Ko4S	2,82	0,14	0,13	0,13
Ko5S	1,23	0,85	0,49	0,51

P1: Pastörizasyon 1 (65 °C 30 dk.) P2:Pastörizasyon 2 (90 °C 100 dk.) S: Sterilizasyon (135 °C 1-2 Sn)

Koyun sütlerinde incelemesi yapılan;

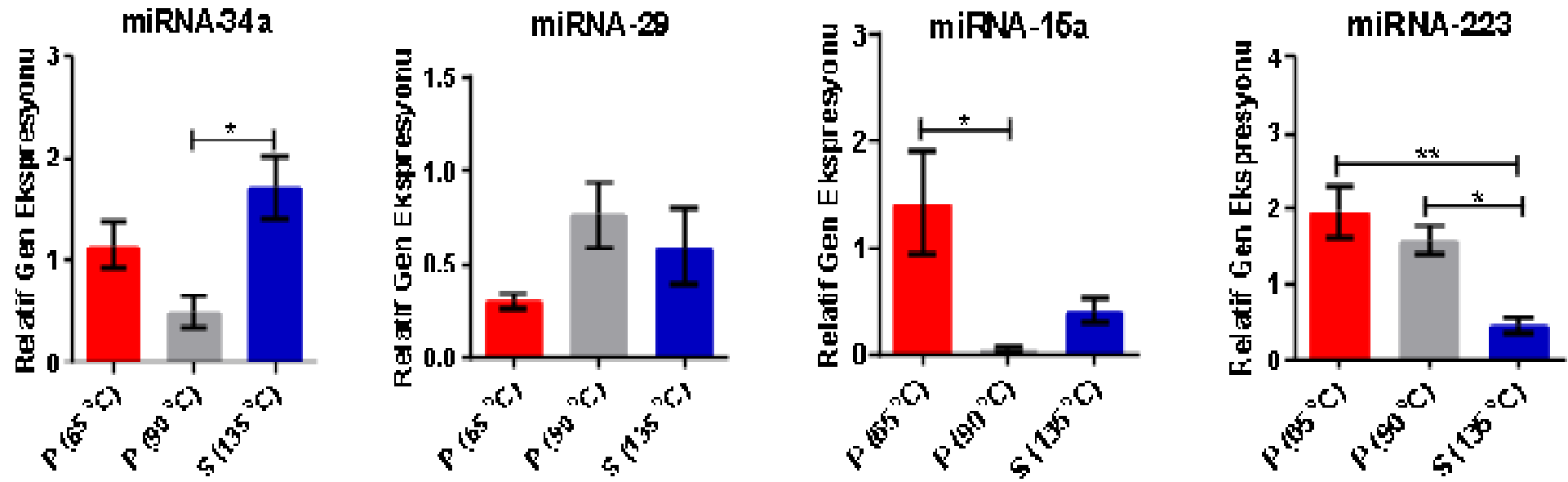
miRNA 34a'nın gruplar arasında $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ifadesinde P2 ile sterilizasyon arasında $2^{-\Delta\Delta C_t}$ değerleri istatistikî olarak anlamlı bulundu ($P<0,05$).

miRNA 29b'nin gruplar arasındaki değerlerinde bulunan değişimler istatistikî olarak anlamlı bulunmadı ($P>0,05$).

miRNA 15a'nın gruplar arasındaki değerlendirmesinde P1 ile P2 arasında $2^{-\Delta\Delta C_t}$ değerleri istatistikî olarak anlamlı olduğu görüldü ($P<0,05$).

miRNA 223'ün gruplar arasındaki P1 ile S arasında ve P2 ile S arasında $2^{-\Delta\Delta C_t}$ değerleri istatistikî olarak anlamlı bulundu ($P<0,05$).

Koyun Sütleri



Şekil 18 : Koyun sütlerinde ısı değişimine göre gruplar arasında çalışılan miRNA'lara ait relatif ifade seviyelerindeki kat değişimleri (P

Tablo 18: İnek sütü örneklerinde Ct ve Δ Ct değerleri

İNEK SÜTÜ	Ct Değerleri					Δ Ct Değerleri			
	miRNA92a	miRNA34a	miRNA29b	miRNA15a	miRNA223	miRNA34a	miRNA 29b	miRNA 15a	miRNA 223
İ1Ç	26,06	19,2	19,74	31,07	31,41	-6,86	-6,32	5,01	5,35
İ2Ç	29,83	23	20,56	33,58	32,4	-6,83	-9,27	3,75	2,57
İ3Ç	26,62	21,5	20,92	32,69	30,47	-5,12	-5,7	6,07	3,85
İ4Ç	29,36	24,7	19,75	34	31,1	-4,66	-9,61	4,64	1,74
İ5Ç	28	23,74	19,2	32,73	31,05	-4,26	-8,8	4,73	3,05
İ1P1	29,02	24,35	17,92	34,98	31,9	-4,67	-11,1	5,96	2,88
İ2P1	28,83	24,19	19,12	34,45	32,55	-4,64	-9,71	5,62	3,72
İ3P1	28,12	24,44	19,21	34,94	31,31	-3,68	-8,91	6,82	3,19
İ4P1	28,76	23,94	19,02	36,19	32,27	-4,82	-9,74	7,43	3,51
İ5P1	29,07	23,24	18,7	36,48	31,18	-5,83	-10,37	7,41	2,11
İ1P2	29,58	21,9	17,85	30,46	32,51	-7,68	-11,73	0,88	2,93
İ2P2	29,35	23,24	19,26	33,72	33,95	-6,11	-10,09	4,37	4,6
İ3P2	29,66	22,3	19,47	32,15	31,59	-7,36	-10,19	2,49	1,93
İ4P2	29,61	24,2	19,66	33,22	31,63	-5,41	-9,95	3,61	2,02
İ5P2	29,95	22,8	18,95	31,28	32,19	-7,15	-11	1,33	2,24
İ1S	29,86	32,54	29,72	34,87	32,34	2,68	-0,14	5,01	2,48
İ2S	29,97	35,8	33,66	34,55	33,19	5,83	3,69	4,58	3,22
İ3S	29,83	35,4	33,02	35,48	35,77	5,57	3,19	5,65	5,94
İ4S	29,3	33,75	33,98	34,83	32,4	4,45	4,68	5,53	3,1
İ5S	29,65	34,12	32,76	34,05	33,37	4,47	3,11	4,4	3,72

İnek Ç: Çiğ süt P1:Pastörizasyon 1(65 °C 30 dk.) P2:Pastörizasyon 2 (90 °C 100 dk.) S: Sterilizasyon (135 °C 1-2 sn.)

Tablo 19: İnek sütü örneklerinde $2^{-\Delta\Delta C_t}$ değerleri

İNEK SÜTÜ	$2^{-\Delta\Delta C_t}$ Değerleri			
	miRNA 34a	miRNA 29b	miRNA 15a	miRNA 223
İ1P1	0,03	3,53	0,07	0,71
İ2P1	0,44	2,71	0,55	0,90
İ3P1	0,13	3,27	0,21	0,56
İ4P1	1,69	1,66	0,22	0,44
İ5P1	1,41	1,41	0,07	0,91
İ1P2	0,15	3,71	1,53	0,47
İ2P2	0,85	2,46	0,91	0,34
İ3P2	0,57	2,73	1,45	0,46
İ4P2	1,41	1,06	1,72	0,69
İ5P2	1,92	1,19	2,73	0,45
İ1S	0,00	0,00	0,07	0,53
İ2S	0,00	0,00	0,51	0,58
İ3S	0,00	0,00	0,15	0,03
İ4S	0,00	0,00	0,56	0,41
İ5S	0,00	0,00	0,40	0,20

P1:Pastörizasyon 1 (65 °C 30 dk.) P2:Pastörizasyon 2 (90 °C 100 dk.) S: Sterilizasyon (135 °C 1-2 sn.)

İnek sütlerinde incelemesi yapılan;

miRNA 34a'nın gruplar arasında $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ifadesinde P1 ile S arasında her ne kadar bir azalma söz konusu olsa bile bu azalma istatistikî olarak bir anlam ifade etmemektedir ($P>0,05$).

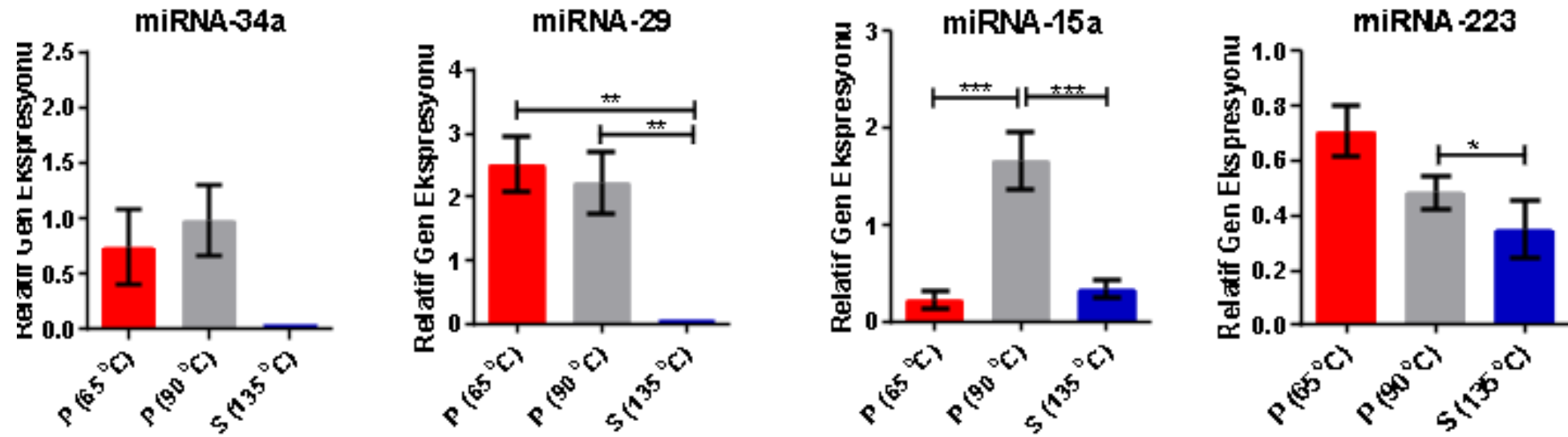
miRNA 29b'nin gruplar arasındaki değerlerinde P1 ile S arasında ve P2 ile S arasında $2^{-\Delta\Delta C_t}$ değerleri istatistiki olarak anlamlı bulundu ($P < 0,05$).

miRNA 15a'nın gruplar arasındaki değerlendirmesinde P1 ile P2 arasında ve P2 ile S arasında $2^{-\Delta\Delta C_t}$ değerleri istatistiki olarak anlamlı bulundu ($P<0,05$).

miRNA 223'ün gruplar arasındaki P2 ile S arasında $2^{-\Delta\Delta C_t}$ değerleri istatistiki olarak anlamlı bulundu ($P<0,05$).



İnek Sütleri



Şekil 19 : İnek sütlerinde ısı değişimine göre gruplar arasında çalışılan miRNA'lara ait relatif ifade seviyelerindeki kat değişimleri (P<0,05)

Tablo 20: Manda sütü örneklerinde Ct ve Δ Ct değerleri

MANDA SÜTÜ	Ct Değerleri					Δ Ct Değerleri			
	miRNA 92a	miRNA 34a	miRNA 29b	miRNA 15a	miRNA 223	miRNA 34a	miRNA 29b	miRNA 15a	miRNA 223
M1Ç	29,25	22	15,84	33,21	34	-7,25	-13,41	3,96	4,75
M2Ç	27,13	21,8	16,97	34	35,29	-5,33	-10,16	6,87	8,16
M3Ç	27,59	21	16,79	35,44	33,9	-6,59	-10,8	7,85	6,31
M4Ç	25,99	21	15,77	34,75	32,75	-4,99	-10,22	8,76	6,76
M5Ç	27,29	20	18,33	34	34,54	-7,29	-8,96	6,71	7,25
M1P1	28,78	27	17,78	32,72	34,48	-1,78	-11	3,94	5,7
M2P1	29,21	29,9	17,17	33,17	35,98	0,69	-12,04	3,96	6,77
M3P1	26,84	25,8	18,96	34,1	36	-1,04	-7,88	7,26	9,16
M4P1	27,13	26,8	18,32	34,21	35,42	-0,33	-8,81	7,08	8,29
M5P1	27,11	22,9	18,66	32,15	34,66	-4,21	-8,45	5,04	7,55
M1P2	24,19	23,24	18,02	32,32	32,54	-0,95	-6,17	8,13	8,35
M2P2	28,12	24	19,31	33,52	34	-4,12	-8,81	5,4	5,88
M3P2	25,35	22	20,39	34,38	33,77	-3,35	-4,96	9,03	8,42
M4P2	26,08	23,14	21,46	34	32,87	-2,94	-4,62	7,92	6,79
M5P2	27,25	22	20,45	33,11	34,01	-5,25	-6,8	5,86	6,76
M1S	25,59	29,2	21,2	36,11	34,08	3,61	-4,39	10,52	8,49
M2S	26,45	30,7	20,32	35,25	33,75	4,25	-6,13	8,8	7,3
M3S	26,07	29,8	21,4	35,45	33,02	3,73	-4,67	9,38	6,95
M4S	29,65	31	20,1	36,91	33,07	1,35	-9,55	7,26	3,42
M5S	24,9	34,5	20,16	34,24	34,53	9,6	-4,74	9,34	9,63

M: Manda Ç: Çiğ süt P1:Pastörizasyon 1(65 °C 30 dk.) P2:Pastörizasyon 2 (90 °C 100 dk.) S: Sterilizasyon (135 °C 1-2 sn.)

Tablo 21: Manda sütü örneklerinde $2^{-\Delta\Delta C_t}$ değerleri

MANDA SÜTÜ	$2^{-\Delta\Delta C_t}$ Değerleri			
	miRNA 34a	miRNA 29b	miRNA 15a	miRNA 223
M1P1	0,03	0,26	1,40	0,72
M2P1	0,00	0,87	1,78	0,62
M3P1	0,04	0,22	2,53	0,23
M4P1	0,02	0,17	1,45	0,16
M5P1	0,13	0,80	3,61	0,92
M1P2	0,42	0,22	1,85	2,75
M2P2	0,22	0,20	1,40	2,45
M3P2	0,50	0,08	2,09	1,09
M4P2	0,23	0,02	1,68	0,92
M5P2	0,25	0,23	1,85	1,44
M1S	0,01	0,02	0,13	0,95
M2S	0,00	0,10	0,42	2,91
M3S	0,00	0,04	0,99	1,84
M4S	0,00	0,05	0,22	0,80
M5S	0,00	0,28	0,85	1,01

P1:Pastörizasyon 1(65 °C 30 dk.) P2:Pastörizasyon 2 (90 °C 100 dk.) S: Sterilizasyon (135 °C 1-2 sn.)

Manda sütlerinde incelemesi yapılan;

miRNA 34a'nın gruplar arasındaki değerlendirmesinde P1 ile P2 arasında ve P2 ile S arasında $2^{-\Delta\Delta C_t}$ değerleri istatistiki olarak anlamlı bulundu ($P<0,05$).

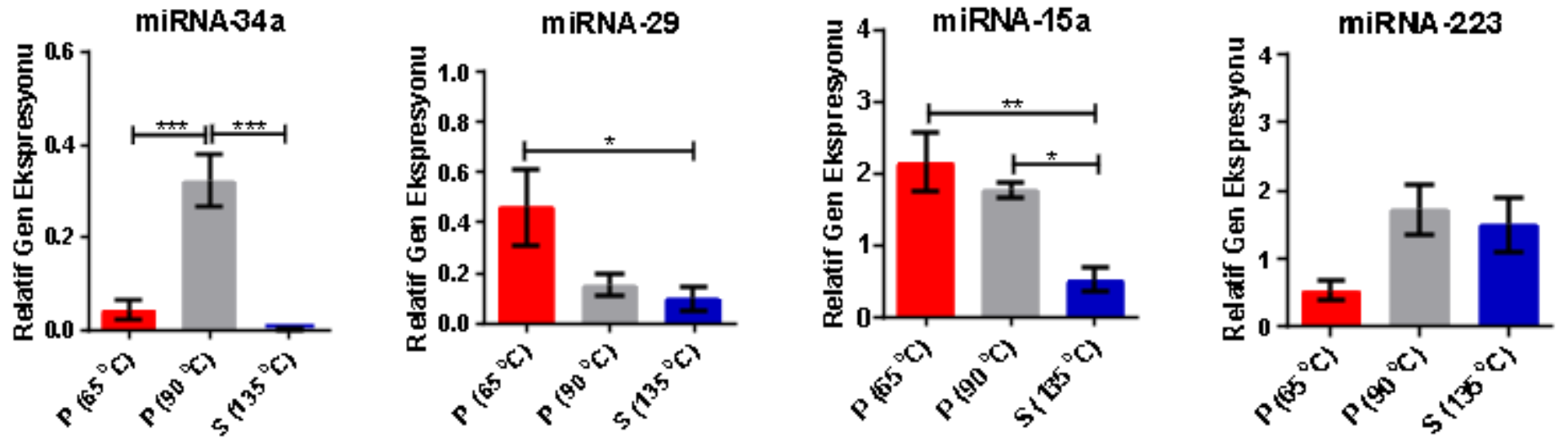
miRNA 29b'nin gruplar arasındaki değerlerinde P1 ile S arasında $2^{-\Delta\Delta C_t}$ değerleri istatistiki olarak anlamlı görüldü ($P<0,05$).

miRNA 15a'nın gruplar arasındaki değerlerinde P1 ile sterilizasyon arasında ve P2 ile S arasında $2^{-\Delta\Delta C_t}$ değerleri istatistiki olarak anlamlı bulundu ($P<0,05$).

miRNA 223'ün gruplar arasındaki değerlerinde bulunan değişimler istatistiki olarak anlamlı bulunmadı ($P>0,05$).



Manda Sütleri



Şekil 20: Manda sütlerinde ısı değişimine göre gruplar arasında çalışılan miRNA'lara ait relatif ifade seviyelerindeki kat değişimleri (P değeri<0.05).

Tablo 22 : Eşek sütü örneklerinde Ct ve Δ Ct değerleri

Ct Değerleri						Δ Ct Değerleri			
EŞEK SÜTÜ	miRNA92a	miRNA34a	miRNA29b	miRNA15a	miRNA223	miRNA34a	miRNA 29b	miRNA 15a	miRNA 223
E1Ç	26,33	24,3	19,08	31,22	31,61	-2,03	-7,25	4,89	5,28
E2Ç	29,25	27,3	18,49	36,08	33	-1,95	-10,76	6,83	3,75
E3Ç	28,8	29,8	19,5	35,98	35	1	-9,3	7,18	6,2
E4Ç	27,65	26	19,93	33,23	36,2	-1,65	-7,72	5,58	8,55
E5Ç	29,91	24,9	19,57	35,3	32,97	-5,01	-10,34	5,39	3,06
E1P1	28,54	23	19,81	37,9	33,96	-5,54	-8,73	9,36	5,42
E2P1	29	26	19,82	37,79	34,94	-3	-9,18	8,79	5,94
E3P1	25,43	27,83	19,64	38,87	35,09	2,4	-5,79	13,44	9,66
E4P1	27,34	26,24	20,9	36,5	36,37	-1,1	-6,44	9,16	9,03
E5P1	29,9	26,5	21,86	38,99	34,26	-3,4	-8,04	9,09	4,36
E1P2	29,88	22,47	21,34	29,27	31,28	-7,41	-8,54	-0,61	1,4
E2P2	28,5	25,24	21,62	33,1	31,91	-3,26	-6,88	4,6	3,41
E3P2	28	27,18	19,89	32,09	34,89	-0,82	-8,11	4,09	6,89
E4P2	28,71	23,74	20,67	31,12	35,26	-4,97	-8,04	2,41	6,55
E5P2	29,54	24,4	21,94	33,19	32,6	-5,14	-7,6	3,65	3,06
E1S	28,37	23,04	20,06	31	33,33	-5,33	-8,31	2,63	4,96
E2S	29,75	24,8	19,42	33,21	34,14	-4,95	-10,33	3,46	4,39
E3S	27,88	27,2	19,51	32,5	35,94	-0,68	-8,37	4,62	8,06
E4S	27,9	25,4	20,09	31,5	36,4	-2,5	-7,81	3,6	8,5
E5S	30	23,5	19,83	33,06	33,54	-6,5	-10,17	3,06	3,54

E: Eşek Ç: Çiğ süt P1: Pastörizasyon 1(65 °C 30 dk.) P2:Pastörizasyon 2 (90 °C 100 dk.) S: Sterilizasyon (135 °C 1-2 sn.)

Tablo 23: Eşek sütü örneklerinde $2^{-\Delta\Delta C_t}$ değerleri

EŞEK SÜTÜ	$2^{-\Delta\Delta C_t}$ Değerleri			
	miRNA 34a	miRNA 29b	miRNA 15a	miRNA 223
E1P1	2,46	0,60	0,01	0,20
E2P1	2,46	0,40	0,31	0,26
E3P1	3,92	0,91	0,14	0,94
E4P1	0,85	0,51	0,10	0,89
E5P1	0,33	0,20	0,08	0,41
E1P2	3,56	0,21	3,86	1,26
E2P2	4,17	0,11	7,89	2,13
E3P2	6,15	0,76	14,83	1,08
E4P2	4,79	0,60	4,32	1,92
E5P2	1,41	0,19	4,32	1,29
E1S	2,40	0,51	1,17	0,30
E2S	5,66	0,53	7,31	0,45
E3S	6,06	0,99	11,16	0,52
E4S	1,52	0,90	3,32	0,87
E5S	2,64	0,84	4,72	0,67

P1: Pastörizasyon 1 (65 °C 30 dk.) P2: Pastörizasyon 2 (90 °C 100 dk.) S: Sterilizasyon (135 °C 1-2 sn.)

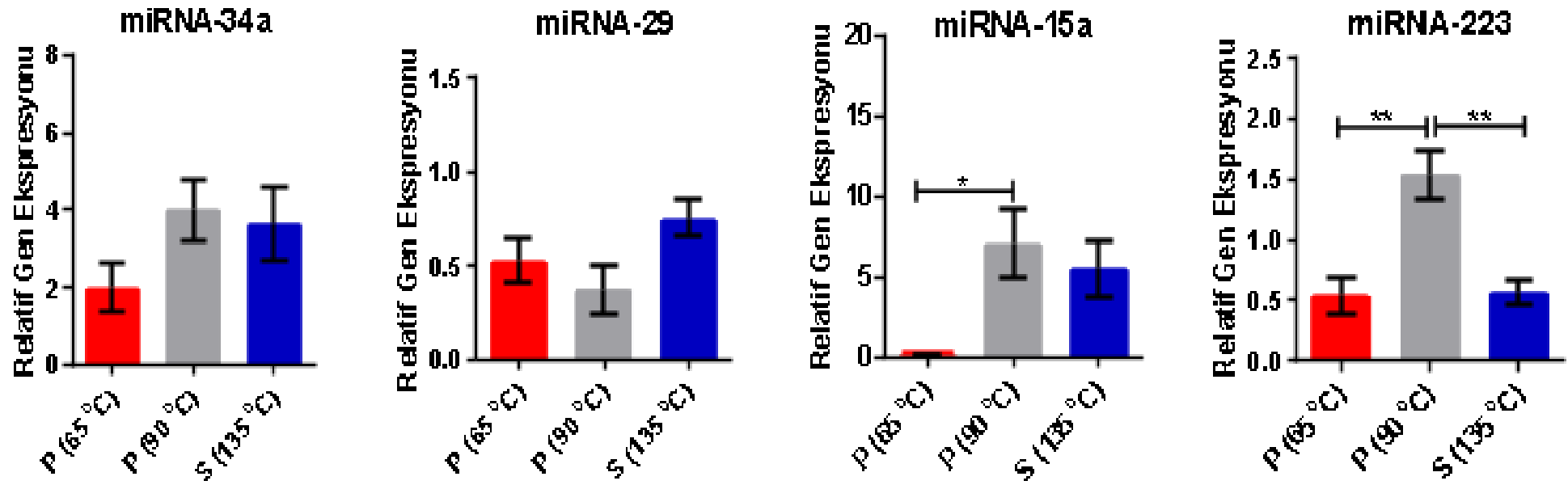
Eşek sütlerinde incelemesi yapılan;

miRNA 34a ve miRNA 29b'nin gruplar arasındaki değerlerinde bulunan değişimler istatistiki olarak anlamlı bulunmadı ($P>0.05$).

miRNA 15a'nın gruplar arasındaki değerlerinde P1 ile P2 arasında $2^{-\Delta\Delta C_t}$ değerleri istatistikî olarak anlamlı bulundu ($P<0.05$).

miRNA 223'ün gruplar arasındaki değerlendirmesinde P1 ile P2 arasında ve P2 ile S arasında $2^{-\Delta\Delta C_t}$ değerleri istatistiki olarak anlamlı bulundu ($P<0.05$).

Eşek Sütleri



Şekil 21: Eşek sütlerinde ısı değişimine göre gruplar arasında çalışılan miRNA'lara ait relatif ifade seviyelerindeki kat değişimleri (P değeri<0.05)

Çalışmamızda koyun, keçi, inek, manda ve eşek türlerine ait çiğ sütlerde kullanılan 4 adet miRNA'nın Ct değerleri miRNA 92a ile normalize edilip Δ Ct değerleri bulunmuştur. Her bir miRNA'nın türler arasındaki Δ Ct değerleri arasındaki farklar karşılaştırılmıştır. DNA miktarı her bir PCR döngüsünde yaklaşık olarak iki katına çıkmaktadır. Bu yüzden Ct değeri logaritmik ölçeklidir ve DNA miktarı ile RNA ters orantılıdır.

Ekspresyon ifadesi olarak değerlendirdiğimizde yüksek Ct değerleri düşük gen ekspresyonunu, düşük Ct değerleri ise yüksek gen ekspresyonunu ifade etmektedir. Aynı durum Δ Ct değerleri için de söz konusudur. Yani yüksek Δ Ct değerleri düşük gen ekspresyonunu düşük Δ Ct değerleri ise yüksek gen ekspresyonunu ifade etmektedir. Farklı hayvan türlerine ait çiğ sütlerdeki miRNA'lara ait Δ Ct değerleri Tablo 24'te verilmektedir.

Tablo 24 : Türler göre ortalama Normalizasyon değerleri

TÜRLER	Δ Ct Değerleri			
	miRNA 34a	miRNA 29b	miRNA 15a	miRNA 223
Koyun Çiğ Süt	-5,57	-10,71	1,89	3,55
Keçi Çiğ Süt	-4,93	-6,77	6,58	6,46
İnek Çiğ Süt	-5,55	-7,94	4,84	3,31
Manda Çiğ Süt	-6,29	-10,71	6,83	6,65
Eşek Çiğ Süt	-1,93	-9,07	5,97	5,37

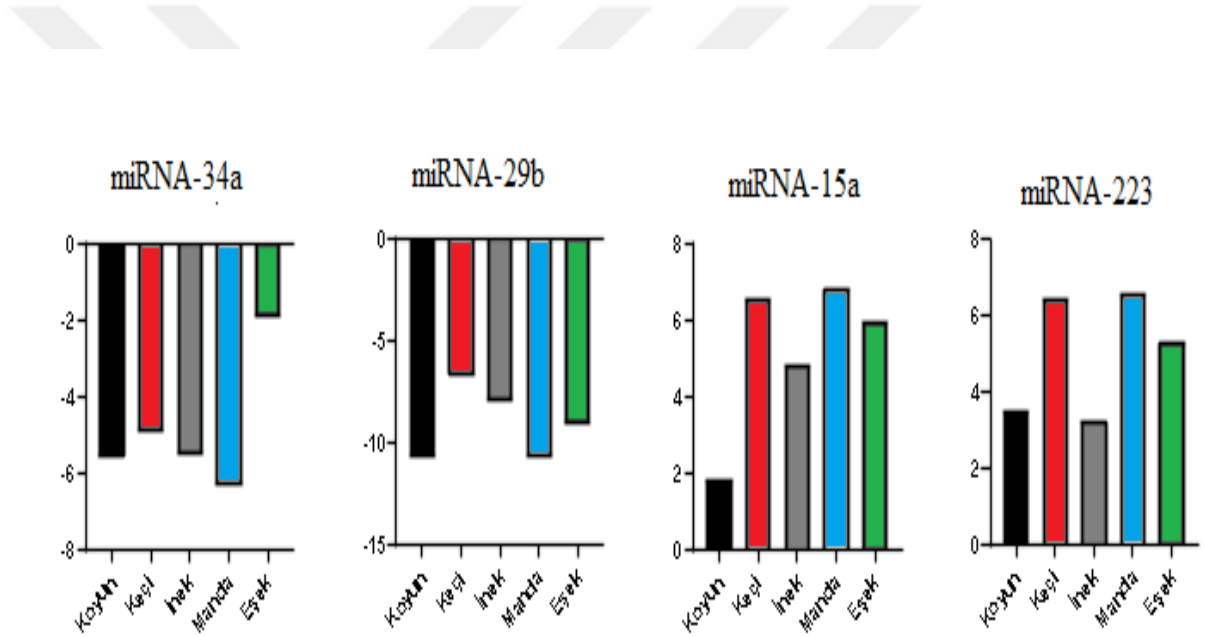
Çalışmada normalizasyon için miRNA 92a kullanılmıştır. Normalizasyon değerleri incelendiğinde incelemesi yapılan miRNA'ların tüm türlerin sütlerinde ekspresyonlarının olduğu anlaşılmıştır.

miRNA 34a'nın Ct değerlerinin housekeeping ile normalizasyonu sonucu elde edilen değerler incelendiğinde inek, koyun, keçi ve manda sütleri arasında anlamlı bir farklılık bulunmadı. Sadece eşek sütlerinde miRNA 34a'nın ekspresyon ifadesinin diğer türlere oranla daha yüksek olduğu anlaşıldı.

miRNA 29b'nin Ct değerlerinin housekeeping ile normalizasyonu sonucu elde edilen değerler incelendiğinde miRNA 29b ifadesinin türler arasında anlamlı bir farklılık bulunmadı.

miRNA 15a'nın Ct değerlerinin housekeeping ile normalizasyonu sonucu elde edilen değerler incelendiğinde inek, manda, keçi eşek sütleri arasında anlamlı bir farklılık bulunmadı. Koyun sütlerinde miRNA 15a'nın ekspresyon ifadesinin diğer türlere oranla daha yüksek olduğu anlaşıldı.

miRNA 223'ün Ct değerlerinin normalizasyonu sonucu elde edilen değerler incelendiğinde koyun ve inek sütlerinin ekspresyon ifadelerinin diğer türlere oranla daha yüksek olduğu anlaşıldı.



Şekil 22: Türler'e göre ortalama Normalizasyon değerlerinin grafik üzerinde görünümü

6- TARTIŞMA

Sütün içerisinde miRNA'ların varlığının tespit edilmesi ile birlikte bu alan oldukça önemli bir konu haline gelmiştir. Sütte bulunan miRNA'ların sağlık ve hastalık üzerine olan etkileri ile bazı hastalıkların değerlendirmesinde biyobelirteç olarak kullanılabilmeleri, süt verimine ve kalitesine yönelik etkileri gibi özellikler bu konu üzerine olan ilgiyi daha da arttırmıştır (146).

Zhang ve ark. (147) yaptıkları bir çalışmada, pirinçte yer alan bitkisel kökenli miRNA 168a'nın diyetle farelere verildiğini ve bu miRNA'nın fare karaciğerinde gen ekspresyonunda etkileri olduğunu belirtmiştir. Bu araştırma çeşitli tartışmalarla neden olmuştur (148). miRNA'ların gıdalarla alınabileceği konusu tartışmalarla birlikte konu ile ilgili çok sayıda araştırmanın yapılmasını sağlamıştır. Özellikle farklı türlere ait sütlerde bulunan miRNA'ların insana aktarılabilmesi konusu araştırmacıların ilgisine neden olmuştur (9,149). Süt içerisinde bulunan miRNA'lar sütte serbest olarak bulunabilirler (150). Ancak yapılan son çalışmalar bu miRNA'ların büyük bir kısmının ekstrasellüler veziküllerde özellikle eksozomlar içerisinde bulunduğunu ortaya koymuştur (151).

Bu çalışmada inek, manda, koyun, keçi ve eşek sütlerinde miRNA 15a, miRNA 34a, miRNA 29b ve miRNA 223'ün varlığı araştırılmıştır. miRNA'ları elde etmek için öncelikle sütlerden eksozomlar izole edilmiş ve bu eksozomlardan bu dört miRNA ekstrakte edilerek ekspresyon seviyeleri belirlenmiştir. Bu çalışmada analiz edilen sütler üç farklı ısı işlem uygulayarak her bir ısı işlem sonucunda dört miRNA'nın ekspresyon seviyeleri incelenmiştir. Böylece dört adet miRNA'nın uygulanan ısı işleme karşı göstermiş oldukları farklılıklar belirlenmiştir.

6.1 Farklı Hayvan Türlerinin Sütlerinde Bulunan miRNA'ların İncelenmesi

6.1.1. İnek sütü

Yapılan literatür incelemesinde, bu çalışmada kullanılan hayvan türleri arasında miRNA'ların en fazla sığırlarda çalışıldığı belirlendi. miRBase verilerine göre ruminantlar arasında en fazla miRNA sayısının sığırlarda tespit edildiği

anlaşılmaktadır. Sığırlarda sütte miRNA çalışması ve süt eksozomlarında miRNA çalışmalarına diğer türlere oranla daha fazla rastlanılmaktadır (152).

İzumi ve ark. (153), ineklerde kolostrum ve laktasyon dönemi sütündeki miRNA farklarını belirlemek amacıyla mikroarray ve kantitatif PCR analizleri kullanarak sığır sütü miRNA'sını araştırdıkları çalışmada, sığır sütünde toplam 102 miRNA tespit etmişlerdir. Özellikle bağışıklık ve gelişim ile ilgili olan miRNA 15b, miRNA 27b, miRNA 29b, miRNA 34a, miRNA 106b, miRNA 130a, miRNA 155 ve miRNA 223'ün kolostrumda süttten önemli ölçüde daha yüksek oranda eksprese edildiğini belirtmişlerdir.

Bu çalışmaya benzer şekilde çalışmamızda inek sütünde miRNA 15a, miRNA 34a, miRNA 29b ve miRNA 223 olmak üzere dört miRNA'nın da ekspresyonunun olduğu gözlemlenmiştir. İzumi ve ark. (153) yaptıkları çalışmada normalizasyon için miRNA 39a'yı kullanmışlardır. Bu çalışmada normalizasyon için miRNA 92a kullanılmıştır. Bu nedenle ekspresyon miktarları açısından tam bir karşılaştırmanın yapılması mümkün değildir ve farklılıklar bu durumdan kaynaklanabilir.

Baier ve ark. (9) tarafından yapılan çalışma, inek sütü içerisinde yer alan miRNA'ların insan bağırsağından emildiğini gösteren ilk çalışmadır. Çalışmada bitkisel gıdalar ve inek sütüne yönelik bir araştırma yapılmıştır. Brokoli yedikten sonra insanda brokoli kökenli miRNA 167a ve miRNA 824 ekspresyonunda kan plazmasında herhangi bir yükselme gözlenmezken inek sütü tüketiminden sonra süt kaynaklı miRNA 29b ve miRNA 200c ekspresyonun kan plazmasında arttığını belirtmişlerdir. İnek sütü tüketiminden sonra miRNA 29b'nin hedefi olan bir genin ekspresyon seviyesinin kan mononükleer hücrelerinde yükseldiği bildirilmiş ve inek sütü kökenli miRNA'ların insanlar tarafından tüketildikten sonra kullanılabilir olduğunu ortaya koyarak sütte bulunan miRNA'ların insan gen regülasyonunda görev aldığını bildirmişlerdir.

Rani ve ark. (154) inek sütünde bulunan eksozomal miRNA'ların biyoaktif nükleik asitler olduğunu belirterek, sindirim süreçlerine karşı stabilite ve hücre fonksiyonlara biyoyararlanımlarının hala tartışmalı olduğunu bildirmişlerdir. Bu amaçla yaptıkları çalışmada, inek sütü eksozomlarında bulunan miRNA'ların bağırsak epitel hücreleri tarafından alımları ile birlikte sindirim süreçlerine karşı

stabilitesini araştırmak için invitro sindirim modeli kullanmışlardır. Süt eksozomal miRNA'larının tükürük, mide, safra ve pankreas enzimleri gibi farklı sindirim sıvılarıyla invitro sindirime karşı dirençli olduğunu bulmuşlardır. Çalışma sonucunda, inek sütü eksozomlarının miRNA'ları zorlu sindirim süreçlerine karşı koruduğunu ve hücreSEL işlev için kan dolaşımına ulaşmak üzere bağırsak bariyerini gecebildiklerini bildirmişlerdir. Genel olarak literatür sonuçları süt eksozomlarının gastrointestinal sistemin koşullarından etkilenmediklerini, eksozomlar içerisinde yer alan miRNA'ların korunduklarını ve insan dolaşım sistemine gecebildiklerini ortaya koymuştur.

Wang ve ark. (155) Holstein ırkı sığırılarda laktasyon sırasında yüksek kaliteli süt üreten inekler ile düşük kaliteli süt üreten ineklerin meme bezlerindeki miRNA 152'nin ekspresyon seviyelerini incelemişler ve miRNA 152 ekspresyonunun yüksek kaliteli süt üreten ineklerde düşük kaliteli süt üreten ineklere kıyasla önemli ölçüde arttığını bulmuşlardır. Sonuç olarak, miRNA 152'nin süt ineklerinin meme bezlerinde gelişim ve laktasyon süreçlerinde önemli rol oynadığını belirtmişlerdir.

Bu çalışmaya benzer olarak Shen ve ark. (156) holstein ırkı sığırılarda miRNA'ların lipit sentezine etkilerini araştırmak amacıyla yüksek ve düşük yağ oranına sahip ineklerin meme bezi dokusunda miRNA varlığını ve ekspresyon seviyelerini incelemişler. Sonuç olarak miRNA 152'nin yağ metabolizmasında görev alan üç gen üzerinde etkisinin olduğunu ve miRNA 152'nin süt yağının düzenlenmesinde rol aldığını belirtmişlerdir.

Melnik ve ark. (105) sığır sütünde en fazla bulunan miRNA'nın miRNA 148 olduğunu belirterek miRNA 148a'nın lipit metabolizmasını düzenleyen birkaç geni kontrol ederek süt yağının üzerinde etkisinin olduğunu belirtmişlerdir.

Chen ve ark. (157) ineklerde laktasyonun farklı zamanlarında miRNA16'nın ekspresyon düzeylerini incelemişlerdir. Çalışmada dört farklı dönemden süt örneklerinde inceleme yapmışlar ve miRNA 16 seviyesinin her dönemde değiştiğini belirterek miRNA16 ile süt yağı arasında negatif bir korelasyon olduğunu belirtmişlerdir.

Bu çalışmada inek sütünün bileşiminde yer alan kuru madde, protein ve yağ içeriği ile pH değerlerinin miRNA 15a, miRNA 34a, miRNA 29b ve miRNA 223 ile ilişki düzeyi incelendi. Gruplar arasında sadece miRNA 34a ile yağ arasında güçlü düzeyde pozitif ($r:0,9$) ve anlamlı bir ilişki bulundu ($P<0,05$). Literatür çalışmaları incelendiğinde inek sütünün bileşiminin düzenlenmesinde miRNA'ların aktif rol oynadığı anlaşılmaktadır. Ancak incelediğimiz miRNA'lardan sadece miRNA 34a ile yağ arasında pozitif bir korelasyon bulundu. Bu miRNA ile yapılan başka bir çalışmaya rastlanılmadı. Bu nedenle elde edilen bu veri inek sütünde yapılan ilk çalışmalardan olması nedeniyle önemli bulundu.

6.1.2 Manda sütü

Mandalarda genel olarak miRNA'lar ile yapılan çalışmalar incelendiğinde miRNA'ların çeşitli amaçlarla kullanıldığı görülmektedir. Guelfi ve ark. (158) mandalarda gebeliğin tespitinde miRNA'ların kullanımına yönelik yaptıkları çalışmada; suni tohumlamadan 40 gün sonra analizini yaptıkları tüm miRNA ların gebe ve gebe olmayan mandalar arasında farklı şekilde ifade edildiğini bulmuşlardır. Çalışmada miRNA'ların mandalarda gebeliğin tespitinde biyobelirteç olarak kullanılabileceği yönünde bir çalışma olabileceğini belirtmişlerdir.

Manda sütünde miRNA ve eksozomal miRNA'ya yönelik olarak son yıllarda yapılmış sınırlı çalışmalar bulunmaktadır. Cai ve ark. (159) manda laktasyon fizyolojisinde miRNA'nın rolünü incelemek üzere mandadan laktasyon dönemi ve kuru dönemde olmak üzere meme bezi dokusu alınarak miRNA profili yüksek verimli sıralama teknolojisi (Illumina-Solexa) kullanılarak araştırmışlardır. Yapılan çalışmada sonuç olarak mandanın miRNA ekspresyon profilini ve bazı önemli miRNA'lar ile bunların hedef genleri arasındaki etkileşime genel bir bakış sağlamışlardır.

Chen ve ark. (160) manda sütünün biyoaktif maddeler açısından zengin olduğunu belirterek manda sütü içerisinde yer alan eksozomal miRNA'ların hücreler arası iletişime aracılık edebileceğini bildirmiş, manda, inek, domuz, panda ve insan sütü kullanarak yaptıkları çalışmada sütler içerisindeki eksozomal miRNA profilini analiz etmişlerdir. Sonuç olarak tüm türlerde 558 farklı miRNA'nın olduğu ve yüksek oranda eksprese edilen ilk 10 miRNA'nın sütü çalışılan tüm türlerde benzer

olduğunu belirtmişlerdir. Bu miRNA'ların hastalık direncini, bağışıklık tepkisini ve temel metabolizma olaylarını modüle etmek için 400 farazi bölgeyi hedeflediğini belirtmişlerdir. Bu nedenle manda sütünden elde edilen eksozom türevi miRNA'lardan kaynaklı manda sütü tüketiminin potansiyel fizyolojik öneminin olduğunu bildirmişlerdir.

Rani ve ark. (161) tarafından manda sütü eksozomlarındaki miRNA'yı tanımlama ve karakterize amacıyla yapılan çalışmada, manda sütü eksozomlarında 351 miRNA ve daha önce açıklanmamış 17 miRNA'yı tanımlamışlardır.

Bu çalışmada incelemiş olduğumuz miRNA 15a, miRNA 29b, miRNA 34a ve miRNA 223'ün manda sütlerinde ekspresyonları bulunmuştur. İncelemesini yaptığımız bu miRNA'lar hem Rani ve ark. (161) hem de Chen ve ark. (160) yaptıkları çalışmada süt eksozomlarında buldukları miRNA'lar arasında yer almaktadır. Fakat gerek normalizasyonda kullanılan miRNA'ların farklı olması gerekse çalışmada kullanılan mandaların beslenme ve yetiştirilme özellikleri gibi farklılıkların bulunmasından dolayı ekspresyon seviyeleri açısından tam bir karşılaştırma yapılamamıştır.

Çalışmamızda manda sütünün bileşiminde yer alan kuru madde, protein ve yağ içeriği ile pH miktarının miRNA 15a, miRNA 34a, miRNA 29b ve miRNA 223 ile ilişki düzeyi incelenmiştir. Manda sütünde miRNA 15a ile kuru madde ve yağ arasında her ne kadar güçlü düzeyde pozitif ($r:0,82$) bir ilişki bulunmuş olsa da istatistiksel açıdan bu ilişkinin önemli olmadığı bulunmuştur ($P>0,05$).

6.1.3 Koyun Sütü

Koyun sütünde miRNA çalışmaları daha çok meme bezi ve meme bezinin gelişimine yönelik olarak yapılmıştır. Galio ve ark. (162) miRNA 21, miRNA 205 ve miRNA 200'ün koyunlarda meme bezindeki varlığını, gebeliğin farklı dönemlerinde ve östrus döneminde incelemişlerdir. Bu miRNA'ların meme bezinde epitel dokunun gelişimine ve süt sekresyonuna etkisinin olduğunu belirtmişlerdir. Wang ve ark. (163) tarafından koyun meme dokusunda sistematik miRNA ekspresyon profillerini bildiren çalışmada koyunların laktasyon döneminde ve kuru dönemde meme bezindeki miRNA'ların ekspresyon profillerini RNA dizilimi kullanarak incelemişler

ve her iki dönemde toplam 147 olgun miRNA'nın ifade edildiğini belirtmişlerdir. Laktasyon dönemi ile karşılaştırıldığında, emzirmeyen koyun meme bezindeki 8 adet miRNA'nın önemli ölçüde yukarı regüle edildiğini, 15 adet miRNA'nın ise aşağı regüle edildiğini bildirmişlerdir.

Koyun sütünde miRNA ve özellikle eksozomal miRNA'lara yönelik çalışmalar oldukça sınırlıdır. Quan ve ark. (164) süt ekstrasellüler vezikülleri (EV) içerisinde bulunan miRNA'ların hücreler arası ve özellikle anne ile yenidoğan arasındaki iletişime aracılık edebileceğini belirterek, koyun sütü ekstrasellüler veziküllerin miRNA profilini karakterize etmiş ve inek sütü ile karşılaştırmasını yapmışlardır. Çalışmada EV'lerin yüksek oranda miRNA içerdiğini belirterek 601 adet yeni miRNA ve koyunlarda daha önce belirlenmiş 84 adet miRNA tespit etmişlerdir. İnek sütünde ve koyun sütünde en çok eksprese edilen miRNA'ları karşılaştırdıklarında 4 adet miRNA'nın ortak olduğunu belirtmişlerdir.

Duman ve ark. (165) Akkaraman koyun ırkında yüksek ve düşük laktasyon verimli gruplar arasında koyun sütündeki laktasyon ile ilişkili bazı önemli miRNA'ların ekspresyon düzeyini belirlemeye yönelik bir çalışma yapmışlardır. Çalışmada deneysel olarak elde edilen miRNA ekspresyon sonuçlarına ek olarak, ilgili biyolojik yolları belirlemek için miRNA hedef genlerini biyoinformatik analizle belirlemişlerdir. Sonuç olarak gruplar arasında ekspresyon düzeyinde anlamlı farklılık gösteren miRNA olarak miR-181a, miR-23a, miR-27a, miR-16b ve miR-374'ü bulmuşlardır. Ayrıca miR-27a ile süt proteini ve laktoz içeriği arasında negatif korelasyon, miR-16b ile yüksek süt verimi grubunda negatif korelasyon gösterdiğini belirtmişlerdir.

Hao ve ark. (166) yaptıkları çalışmada 2 farklı koyunda kuru dönem ile laktasyon döneminde miRNA 432'nin meme bezi dokusundaki ekspresyon seviyelerini incelemişler ve ekspresyon seviyesinin iki dönemde farklı olduğunu ifade etmişlerdir. miRNA 432'nin süt yağı sentezinde görevli 3 gen üzerinde negatif etkiye sahip olduğunu bildirerek miRNA 432 ile süt yağı arasında negatif bir korelasyon olduğunu belirtmişlerdir. Wang ve ark. (167) koyunlarda meme bezi hücrelerinde miRNA 199a-3p'nin süt yağı ile negatif bir ilişkisinin olduğunu bildirmişlerdir.

Mevcut çalışmada koyun sütünde miRNA 15a, miRNA 34a, miRNA 29b ve miRNA 223 olmak üzere dört miRNA'nın da ekspresyonunun olduğu anlaşılmıştır. Özellikle kanser baskılayıcı özelliği bilinen miRNA 15a'nın ekspresyon ifadesinin diğer türlere göre anlamlı derecede daha yüksek olduğu anlaşılmıştır. Bu miRNA'nın koyun sütünde diğer türlerden daha yüksek oranda ifade edilmesi önemli bulunmuştur.

Çalışmada kullanılan miRNA'ların koyun sütünün bileşiminde yer alan kuru madde, protein ve yağ içeriği ile pH miktarı arasındaki ilişki düzeyinin incelenmesinde, miRNA 34a ile kuru madde arasında güçlü düzeyde negatif ($r:0,94$) ve anlamlı bir ilişki bulunmuştur ($P<0,05$). Koyun sütünde miRNA 29b ile kuru madde ve yağ arasında güçlü düzeyde negatif ve anlamlı bir ilişki bulundu ($P<0,05$). Ayrıca miRNA 34a ile pH arasında güçlü düzeyde pozitif ($r: 0,9$) ve anlamlı bir ilişki olduğu görüldü ($P<0,05$).

Literatür çalışmaları incelendiğinde koyun sütünün bileşiminin düzenlenmesinde miRNA'ların aktif rol oynadığı anlaşılmıştır. Sınırlı sayıda da olsa konu ile ilgili bazı çalışmalar mevcuttur. Duman ve ark. (165) Akkaraman koyun ırkında yaptıkları çalışmada miR-27a ile süt proteini ve laktoz içeriği arasında negatif korelasyon, miR-16b ile yüksek süt verimi arasında negatif korelasyon olduğunu belirtmişlerdir. Bu çalışmada incelemesi yapılan miRNA 34a'nın kuru madde ile negatif korelasyonuna ve pH ile pozitif korelasyonuna ve miRNA 29b'nin kuru madde ve yağ ile negatif korelasyonuna dair literatürlerde herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Çalışma miRNA 34a ve miRNA 29b' nin koyun sütü bileşimi ile ilişkisine dair yapılan ilk çalışmalardan biri olması nedeniyle önemlidir. Bu miRNA'lar koyunlarda süt verimi, kuru madde ve yağ oranı ile ilişkileri açısından ileride yapılacak çalışmalara kaynak oluşturabilecekir.

6.1.4. Keçi sütü

Keçilerde genel olarak miRNA ve karakterizasyonu ile ilgili yapılan çalışmalar, keçi sütünde yapılan miRNA çalışmalarına oranla daha fazla bulunmaktadır. Özellikle meme ve meme bezi dokusu ile ilgili çalışmalara yoğunlaşmıştır. Li ve ark. tarafından (168) keçilerin meme bezinde eksprese edilen miRNA'ları

belirleyebilmek ve karşılaştırabilmek amacıyla yapılan bir çalışmada, laktasyonun pik döneminde ve kuru dönemde keçilerin meme bezi dokusu alınarak miRNA profili incelenmiştir. Sonuç olarak 346 bilinen miRNA ve 95 yeni miRNA olmak üzere toplamda 441 miRNA tanımlamışlardır. Araştırmacılar elde edilen bu verilerin miRNA'ların laktasyonun biyolojik süreçlerindeki rolleri, hedef gen ekspresyonu ve regülasyon mekanizmaları hakkında yarar sağlayacağını belirtmişlerdir.

Lin ve ark. (169) yapmış oldukları çalışmada, miRNA 27a'nın süt keçisi meme bezi epitel hücrelerinde trigliserit birikimini baskıladığını ve yağ metabolizması ile ilişkili gen ifadesini etkilediğini belirtmişlerdir. Lin ve ark. tarafından aynı yıl içinde yapılan başka bir çalışmada miRNA 103'ün meme bezi hücrelerinde süt yağ sentezi ile ilişkili genlerin transkripsiyonunu arttırdığını ve bunun trigliserit birikimine sebep olduğunu bildirilmişlerdir (170).

Chen ve ark. (171) yapmış oldukları çalışmada, miRNA183'ün keçi meme epitel hücrelerinde süt yağı metabolizmasını düzenlediğini bildirmişlerdir. Ma ve ark. (172) keçi sütünün yağ metabolizmasında miRNA'ların kritik rolleri olduğunu belirterek, miRNA 25'in lipid metabolizmasında yer alan genlerin ifadelerini azaltarak negatif bir etki yaptıklarını belirtmişlerdir.

Literatür çalışmaları incelendiğinde, keçi sütünün bileşiminin düzenlenmesinde miRNA'ların önemli rol oynadığı, özellikle yağ metabolizmasındaki rollerine ilişkin çalışmaların mevcut olduğu anlaşılmıştır. Yaptığımız çalışmada keçi sütünün bileşiminde yer alan kuru madde, protein ve yağ içeriği ile pH miktarının miRNA 15a, miRNA 34a, miRNA 29b ve miRNA 223 ile ilişki düzeyini inceledik. Gruplar arasında sadece miRNA 223 ile kuru madde arasında güçlü düzeyde pozitif ($r:0,9$) ve anlamlı bir ilişki bulunmuştur ($P<0,05$).

miRNA 223 ile ilgili olarak Lin ve ark. (173) keçilerde meme bezi dokusunda lipid metabolizmasını araştırmak için yaptıkları bir çalışmada, miRNA 223'ün de aralarında bulunduğu 11 adet miRNA'nın ekspresyon seviyelerini incelemişler ve miRNA 223'ün seviyesinde herhangi bir değişimin gözlemlenmediğini bildirmişlerdir.

Son zamanlar da keçi sütünde miRNA ile ilgili daha yoğun çalışmalar yapılmaya başlanmıştır. Na ve ark. (174) anne sütündeki immün bağlantılı miRNA'ların bebeklerde ve genç hayvanlarda immün organ gelişimi ve immün fonksiyonun düzenlenmesi ile ilgili hücre dışı miRNA'lar olduğunu belirtmişlerdir. Bu amaçla keçiler, insanlar ve süt sığırlarında bağışıklıkla ilgili olduğunu belirttikleri miRNA 146, miRNA 155, miRNA-181a, miRNA 150 ve miRNA 223 olmak üzere beş miRNA'nın ekspresyon seviyelerini karşılaştırmışlardır. Çalışmada öncelikle kolostrumdan ve sütlerden ayrı ayrı miRNA'ların ekstraksiyonunu gerçekleştirmişler daha sonra kantitatif RT-PCR kullanarak ekspresyon seviyelerini değerlendirmişlerdir. Keçi sütünde incelemesini yaptıkları miRNA'ların tümünü tespit etmişlerdir. Çalışmada sığır sütünde keçi sütüne oranla daha fazla miRNA 223'ün eksprese edildiğini bildirmişlerdir. Ayrıca miRNA 223'ün keçi kolostrumunda insan kolostrumuna oranla daha fazla eksprese edildiğini belirtmişlerdir.

Na ve ark. (174) yaptıkları çalışmada miRNA 223 ile ilgili olarak elde ettikleri veriler bu çalışma ile kıyaslandığında, mevcut çalışma da miRNA 223'ün hem inekte hem de keçilerde ekspresyonu belirlenmiştir. İlave olarak bu araştırmada miRNA'lar direk süttten değil eksozomların içerisinden ekstrakte edilmiştir ve çalışmada keçilerde miRNA 223'ün ekspresyon seviyesinin ineklere oranla istatistiki olarak bir anlam ifade etmese bile daha yüksek olduğu görülmüştür.

Golan - Gerstl ve ark. (175) insan, inek ve keçi sütünde yeni nesil sekanslama ve real time PCR uygulayarak bir çalışma yapmışlardır. Çalışmada insan sütünde ifade edilen miRNA profilinin yaklaşık %91-92'sinin sığır ve keçi sütünde de ifade edildiğini belirtmişler. Ayrıca, sığır ve keçi sütünde ifade edilen miRNA'ların sırasıyla %89 ve %83'ü insan anne sütünde de bulunduğunu bildirmişlerdir.

Yun ve ark. (176) yaptıkları çalışmada insan, inek ve keçi sütünün eksozomal miRNA'larını hem kolostrum da hem çiğ sütte karşılaştırmalı olarak kıyaslamışlardır. Çalışmada Saanen keçilerinden doğumdan sonraki 3 gün içinde toplanan kolostrum ile doğumdan 1 ay sonra toplanan sütte bulunan miRNA profili için RNA sıralama yöntemi kullanılmıştır. Sonuç olarak insan sütünde yüksek

oranda ifade edilen miRNA'ların türler arasında benzer şekilde korunduğunu belirtmişlerdir.

Keçi sütlerinde yaptığımız çalışmada miRNA 15a, miRNA 223, miRNA 34a, miRNA 29b'nin incelemesi yapılmıştır. Yapılan çalışmada tüm miRNA'ların keçi sütlerinde ekspresyonlarının olduğu anlaşılmıştır. Özellikle insanlarda kemik mineralizasyonunda görevi olduğu bildirilen miRNA 29b'nin keçi sütlerinde diğer türlere oranla daha fazla eksprese edildiği görülmüştür.

6.1.5. Eşek Sütü

Bu araştırmada incelenen türler arasında miRNA ve karakterizasyonu açısından en az çalışmanın yapıldığı türdür. Eşeklerde miRNA alanında genel olarak yapılan çalışmalar incelendiğinde;

Huang ve ark. (177) eşek genomu ve karyotipte epigenetik düzenlemenin rolünü anlamak için yaptıkları bir çalışmada, eşek ve diğer memeli türlerinde diferansiyel olarak genişletilmiş miRNA ailelerini analiz etmişler ve eşek genomunda toplam 1198 miRNA'yı tanımlamışlardır. Eşek genomundaki miRNA sayısının insanlarla (1215) ve farelerle (1497) benzer olduğunu, atlardan (881), köpeklerden (647) ve sığırlardan (494) daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Diğer türlere göre eşek genomunda birkaç miRNA ailesinin genişlediğini ve bu genişletilmiş miRNA ailelerinde önemli ölçüde zenginleştirilmiş hedeflenen genler ile ilişkili olan hücre döngüsü, kanser ve oosit mayozu ile ilişkili olabileceğini bildirmişlerdir.

Unger ve ark. (178) tek tırnaklılarda sarkoid hastalığının teşhisinde miRNA'ların biyobelirteç olarak kullanılabilirliğini araştırdıkları çalışmada at ve eşeklerde serum miRNA 331, miRNA 100 ve miRNA 1 ekspresyon seviyelerini karşılaştırmışlardır. Sonuç olarak miRNA 331'in hastalıklı dokularda daha fazla eksprese edildiğini ve hastalığın teşhisinde bu miRNA'dan faydalanılabileceğini belirtmişlerdir.

Li ve ark. (179) eşeklerde iskelet kasının lif tiplerini belirleyen moleküler mekanizmaların tam olarak anlaşılmadığını belirtmişler ve psoas majör kasını ve biceps femoris kasını seçerek bu kasların mRNA ve miRNA transkriptomlarını RNA-seq yoluyla sistematik olarak karşılaştırmışlardır. Sonuç olarak eşeklerde bilinen 21 eksprese edilmiş miRNA'yı tanımlamışlardır. Ayrıca miRNA'ların,

özellikle miRNA-193a-5p ve miRNA-370'in esas olarak aktin bağlanmasına etki edeceğini ve eşeklerde miyofibril bileşimini düzenleyebileceğini belirtmişlerdir. Bu miRNA'ların eşeklerde et kalitesi özelliklerini geliştirmek için kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Eşeklerde özellikle sütlerde miRNA alanında yapılan çalışmalar oldukça sınırlıdır. Fei ve ark. (180) miRNA'lar ve mRNA'ların eşeklerde süt bileşeni sentezinin ve meme bezi gelişiminin düzenlenmesinde yer aldığını belirtmişlerdir. Ancak laktasyona dâhil olan miRNA ve mRNA'ların düzenleyici profilinin tam olarak açıklanmadığını bildirmişlerdir. Bu amaçla laktasyon döneminde bulunan üç adet eşekten ve kuru dönemdeki üç eşekten meme bezi dokusu alınarak burada bulunan mRNA ve miRNA'ların analizleri yapılmıştır. Emzirmeyen gruba kıyasla emziren grupta 293 adet miRNA tanımlamışlardır. Bu miRNA'ların 231 adeti yukarı regüle edilmiş, 62 adeti de aşağı regüle edilmiş miRNA olarak belirlenmiştir. Sonuç olarak, Özellikle miRNA 874-3p'nin eşeklerde meme bezinde bağışıklık ve sütün lipid, protein ve vitamin metabolizmasında yer alan mRNA'ları hedefleyen anahtar miRNA'lar olduğunu belirterek, miRNA'ların meme bezlerinde biyoaktif süt bileşeni metabolizmasını düzenlediğini ve eşeklerde süt üretimini iyileştirmek için kullanılabılır olduğunu bildirmişlerdir.

Bu çalışmada eşek sütünün bileşiminde yer alan kuru madde, protein ve yağ içeriği ile pH miktarının miRNA 15a, miRNA 34a, miRNA 29b ve miRNA 223 ile ilişki düzeyi incelenmiştir. miRNA 29b ile yağ arasında güçlü düzeyde pozitif ($r:0,9$) ve anlamlı bir ilişki bulunmuştur ($P<0,05$).

Fei ve ark. (180) yapmış olduğu çalışmada incelenen tüm miRNA'lar kontrol edildi ve miRNA 29b ile ilgili herhangi bir veriye rastlanılmadı. Eşek sütü bileşiminde miRNA 29b'nin etkisi ile ilgili yapılan başka bir çalışmaya rastlanılmadı. Bu nedenle elde edilen bu veri eşek sütünde yapılan ilk çalışmalardan olması nedeniyle önemli bulundu.

Mekoci ve ark. (181) sütte bulunan ekstrasellüler veziküllerin sinyal moleküllerini çevreleyen böylece uzak hücreler ve dokular arasında sinyal aracılığı olarak işlev gören, bağışıklık modülasyonu gibi biyolojik etkiler uygulayan yapılar olduğunu belirtmişlerdir. Bu amaçla inek, eşek ve keçi ekstrasellüler veziküllerinin

RNA içeriğini, mRNA ve miRNA kütüphanelerinin transkriptomik analizi yoluyla karakterize etmişlerdir. Tüm türlerde en çok temsil edilen küçük RNA sınıfının miRNA olduğunu belirterek, bağışıklık düzenleyici fonksiyon üzerinde yüksek etkiye sahip 10 adet miRNA'nın inek, keçi ve eşek türünde ortak olarak yüksek düzeyde eksprese edildiğini bildirmişlerdir.

Mevcut çalışma da incelemesi yapılan miRNA 15a, miRNA 223, miRNA 34a, miRNA 29b'nin eşek sütlerinde ekspresyonlarının olduğu anlaşılmıştır. İncelemesi yapılan miRNA'ların eşek sütlerinde ekspresyonlarına yönelik daha önce araştırılmasının yapılmadığından bu miRNA'ların eşek sütünde varlığının ortaya konulması bu konuyla ilgili daha sonra yapılacak çalışmalar için yol gösterici olacaktır.

6.2. Sütte Araştırması Yapılan miRNA'ların Isıya Bağlı Değişimlerinin İncelenmesi

Chen ve ark. (182) inek sütlerinde farklı laktasyon dönemlerinde çiğ süt, ticari süt ve süt tozu ürünlerinde miRNA'ların tanımlanması ve karakterizasyonuna yönelik yaptıkları çalışmada, ilk kez çiğ inek sütünün büyük miktarlarda miRNA içerdiğini ve süte özgü miRNA'ların benzersiz ifade profilinin çiğ sütün kalite kontrolü için yeni bir gösterge ve olası yeni standart olarak hizmet edebileceğini göstermişlerdir. Çalışmada inek sütünde toplam 245 adet miRNA'nın varlığı tespit edilmiştir. Yine bu miRNA'lar arasından 7 tanesi seçilerek çiğ sütte, ticari sütte ve süt tozunda bu miRNA'ların varlığı ve ekspresyon düzeyleri incelenmiştir. Ticari sütte çiğ süte göre ekspresyon seviyelerinin azaldığı belirtilmiştir. Süt tozunda yaptıkları incelemede bu 7 adet miRNA'nın miktarında ciddi bir azalma olduğunu belirtmişlerdir.

Howard ve ark. (183) inek sütünün işlenmesinin ve depolanmasının miRNA içeriğine olan etkisini araştırmışlardır. Araştırmada miRNA 29b ve miRNA 200c'nin varlığını ve pastörizasyon ve homojenizasyona karşı tepkilerini incelemişlerdir. Bu amaçla 3 adet Holstein ırkı inek sütünü çiğ süt, tam yağlı süt, %2 yağlı süt ve yağsız süt olarak gruplara ayırmışlardır. Çiğ süt dışındaki gruplara 75,55 °C'de 28 saniye pastörizasyon ve 145 bar da 60 °C'de homojenizasyon işlemi uygulanmıştır. Sonuç olarak çiğ sütün pastörizasyon işleminin miR-200c'de tam yağlı sütte % 63'lik bir düşüşle sonuçlandığını ve diğer gruplarda da benzer bir düşüşe neden olduğunu

belirtmişlerdir. Yine miR-29b için pastörizasyonun yağsız sütte % 67'lik bir düşüşe neden olduğunu saptamışlardır. Araştırmacılar sütte uygulanan pastörizasyon ve homojenizasyon işleminin miRNA'larda önemli bir kayba neden olduğu sonucuna varmışlardır.

Kirchner ve ark. (184) çiğ ve işlenmiş inek sütündeki miRNA varlığı ve bunun astım hastalığı üzerindeki etkilerini inceledikleri bir araştırmada; 3 adet inek çiftliğinden sütler alınmış ve bunların miRNA varlıklarının ısı ile etkileşimleri incelenmiştir. Çalışmada çiğ süt, pastörize süt (72 °C'de 20 sn), daha uzun raf ömrü için uygulanan bir yöntem olan Extended Shelf Life (ESL) süt (95 °C'de 20 saniye ön ısıtma, 127 °C'de 5 saniye doğrudan buhar enjeksiyonu) ve UHT süt (93°C'de 23 saniye ön ısıtma, 142 °C'de 5 saniye doğrudan buhar enjeksiyonu) kullanılarak miRNA varlığı ve bu miRNA'lardan seçilmiş olan miRNA 148a'nın varlığı ve miktarı incelenmiştir. Sonuç olarak yüksek ısıl işlem uygulanan (ESL-UHT) sütlerde miRNA varlığında ciddi bir azalma olduğu tespit edilmiştir. Ancak pastörizasyon işlemi uygulanan sütlerde herhangi bir azalmanın olmadığı bildirilmiştir.

Golan-Gerstl ve ark. (175) insan, inek ve keçi sütünde miRNA varlığına yönelik yeni nesil sekanslama ve real time PCR uygulayarak bir çalışma yapmışlardır. Çalışmada anne sütünde ifade edilen miRNA profilinin yaklaşık %91-92'sinin sığır ve keçi sütünde de ifade edildiğini belirtmişlerdir. Ayrıca çalışmalarında bu sütlere uygulanan pastörizasyon işleminin miRNA varlığına etkisini incelemişlerdir. Bu amaçla süütün yağlı ve yağsız katmanından numuneler alarak bunların çiğ süt ve pastörizasyon sonrası miRNA farklılıklarına bakmışlardır. Sonuç olarak, pastörize ve pastörize edilmemiş sığır ve keçi süütünün yağsız ve yağ tabakalarında benzer miRNA profil ekspresyonu bulduklarını belirterek, pastörizasyonun miRNA profil ifadesinin dağılımında küçük bir etkiye sahip olduğunu bildirmişlerdir.

Kleinjan ve ark. (185) inek sütüne uygulanan ısıl işlemlerin süt içerisinde yer alan ekstrasellüler veziküllerin (EV) ve bunların biyoaktif bileşenlerinin sayısı ve bütünlüğü üzerindeki etkisini araştırmışlardır. Çalışmada süt EV'lerine yönelik UHT işlemi ve pastörizasyon işlemi uygulanmıştır. UHT işleminin süt EV'lerinde önemli bir kayba neden olduğunu pastörizasyon işleminin ise EV sayılarını neredeyse hiç etkilemediğini belirtmişlerdir. Yine EV'ler de yer alan miRNA'ların ısıyla

etkileşimlerini incelemek amacıyla 8 adet miRNA seçilmiş ve bunların çiğ sütteki varlıkları ile pastörizasyon işlemi uygulandıktan sonraki miktarlarını analiz etmişlerdir. Test edilen EV ile ilişkili 8 adet miRNA'dan 7'sinin pastörize ve homojenize süttten izole edilen EV'lerde azaldığını, buna karşılık miRNA 223 konsantrasyonunun, pastörizasyon ve homojenizasyon işleminden sonra arttığını belirtmişlerdir.

Zhang ve ark. (186) inek sütünde yer alan miRNA'ların uygulanan ısıl işlemlerle etkileşimlerini araştırmışlardır. Çalışmada bir süt fabrikasına getirilen çiğ sütlerden ve bunlara uygulanan pastörizasyon (85 °C'de 15 saniye) ve UHT sterilizasyon (135 °C'de 15 saniye) işleminden sonra sütlerden alınan örneklerde miRNA'ların varlığı ve miktarı araştırılmıştır. Sonuç olarak UHT işlemiyle miRNA'ların içeriğinin önemli ölçüde kaybolduğunu, ancak pastörizasyonla istatistiksel olarak önemli kayıpların olmadığı sonucuna varmışlardır. Bu sonuçların, pastörize sütlerin patojen bakteri içermeyen ve biyoaktif miRNA'lara sahip olup insan sağlığı için daha fazla fayda gösterebileceğini belirtmişlerdir.

Bu çalışmada insanlarda gelişme, bağışıklık ve kansere karşı antitümoral etkisi kabul edilen 4 adet miRNA'nın ısıl işlemlere karşı vermiş olduğu tepki ve ekspresyon seviyeleri incelenmiştir. Çalışmamız da özellikle ülkemizde sütü en çok tüketilen inek, keçi, koyun ve manda türleri ile bu alanda oldukça az çalışılmış olan eşek türü seçildi.

Elde ettiğimiz veriler mevcut literatür çalışmaları doğrultusunda incelendiğinde bazı farklılıklar olmasına rağmen genel olarak pastörizasyon 1 (P1) olarak adlandırdığımız (63 °C'de 30 dakikalık) ısıtma derecesi ile pastörizasyon 2 (P2) (90 °C'de 10 dk) ve sterilizasyon (135 °C'de 1-2 sn) dereceleri arasında miRNA seviyelerinde değişimler oluşmaktadır. Bu veriler genel olarak literatür çalışmaları ile uyusmaktadır. Isı derecesinin artmasına bağlı olarak miRNA'ların ekspresyon seviyelerinde kayıplar tespit edilmiştir.

Bu değişim miRNA'ların eksozomlar içerisinde yer almasından kaynaklanabilir. Kirchner ve ark. (184)'nın yapmış oldukları çalışmada süte uygulanan yüksek sıcaklıktaki işlemlerin (ESL-UHT) süt eksozomlarında önemli bir kayba neden olduğunu ve sütün daha düşük ısıl işlemin (pastörizasyon) eksozom sayılarını

neredeyse hiç etkilemediğini belirtmişlerdir. P1 ve P2 deki ekspresyon seviyelerinin sterilizasyon grubuna göre daha yüksek olması bu çalışmanın sonuçları ile uyumludur.

İnek ve keçi sütlerinde miRNA'ların ısıtıl işlemlere karşı tepkileri ile ilgili çalışmalar yapılmasına rağmen manda, koyun ve eşek sütlerinde benzer bir çalışmanın olmadığı görülmektedir. Özellikle eşek sütleri incelendiğinde; ısıtmaya bağlı olarak miRNA 34a ve miRNA 29b'nin gruplar arasındaki değişimleri istatistikî olarak anlamlı bulunmamıştır. miRNA 223'ün ise gruplar arasındaki değerlendirmesinde P1 ile P2 arasında ve P2 ile sterilizasyon arasında önemli bir fark tespit edilmiştir. Bu durum daha önce üzerinde durduğumuz ısı artışına bağlı olarak miRNA miktarının azalmasına zıt bir durum olarak gözlemlenmektedir. Ancak Kleinjan ve ark. (185)'nin yapmış oldukları çalışmada incelenen miRNA'lar arasında sadece miRNA-223'ün ısıya bağlı olarak değiştiğini ve artış gösterdiğini bildirmişlerdir. Bu durum, bu tez çalışmasının sonuçları benzerlik göstermektedir. Ayrıca eşek sütlerinde bu konu ile ilgili daha önce çalışmaların yapılmamış olması bu konunun araştırılması gerektiğini ortaya koymuştur.

7. SONUÇ

Bu tez çalışmasında inek, manda, koyun, keçi ve eşek türüne ait sütlerde miRNA 15a, miRNA 29b, miRNA 34a ve miRNA 223'ün varlığı ve miktarları araştırılmıştır. Bu miRNA'ların süt bileşimi ile olan ilişkileri ile bu sütlerle uygulanan farklı ısı işlemlerin bu miRNA'lar üzerindeki etkileri incelenmiştir. Özellikle sütü en fazla tüketilen hayvan türleri ile insanların bağışıklık sistemi üzerine etkili, kemik mineralizasyonunu artırarak osteoblast gelişiminde rol oynayan ve kanser oluşum mekanizmasında rol oynayan miRNA'lar seçilmiştir.

Çalışma sonucunda tüm hayvan türlerinde incelediğimiz miRNA'ların ekspresyonlarının olduğu tespit edilerek çalışılan miRNA'ların süt bileşenleri ile olan ilişki düzeyleri belirlenmiştir. İnek sütünde miRNA 34a ile yağ arasında pozitif bir ilişki bulunmuştur. Koyun sütünde miRNA 34a ile kuru madde arasında negatif, pH arasında pozitif bir ilişki, miRNA 29b ile kuru madde ve yağ arasında negatif bir ilişki tespit edilmiştir. Keçi sütünde miRNA 223 ile kuru madde arasında pozitif bir ilişki bulunmuştur. Eşek sütünde miRNA 29b ile yağ arasında güçlü düzeyde pozitif bir ilişki saptanmıştır. Literatürlerde süt bileşimi ve miRNA'lar arasında yapılan çalışmalarda sütün bileşiminde miRNA'ların etkin rollerinin olduğu belirtilmiştir. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar, miRNA 15a, miRNA 29b, miRNA 34a ve miRNA 223'ün farklı hayvan türlerinin sütlerinde, süt bileşimi ile anlamlı düzeyde ilişkilerinin olduğunu ortaya koymuştur. Bu ilişkinin tam anlamı ile açıklanabilmesi için bu alanda daha fazla çalışmanın yapılmasına ihtiyaç bulunmaktadır. Gelecekte bu konuda yapılacak çalışmalar bu miRNA'ların süt veriminin ve kalitesinin artırılmasında kullanılmasına olanak sağlayabilecektir.

Çalışmada sütlerle ısı işlem uygulandığında miRNA'ların ısıya karşı farklı tepkiler verdiği gözlemlenmiştir. miRNA'lar nükleotid dizilerinde eşsiz bir konfigürasyon sağladıkları için, termodinamik kararlılıklarında farklılıklar göstermektedir. Bu nedenle ısı etkileşimlerinde farklı cevaplar verebilecekleri göz önünde bulundurulmalıdır. Gelişmiş ülkelerin hemen hepsinde süt çiğ olarak tüketilmemekte ve işleme yöntemleri uygulandıktan sonra tüketilmektedir. Bu yüzden miRNA'ların ısıtma derecelerine karşı göstermiş olduğu reaksiyon ve yararlanım miktarı çalışılması gereken önemli bir konudur. miRNA'ların sütün

sağlığı, hijyeni, bileşimi ve teknolojisi açısından önemli çalışma alanları olduğu ve bu konularda daha spesifik ve detaylı çalışmalar planlanması gerektiği düşünülmektedir.



8- KAYNAKLAR

1. Black RE, Williams SM, Jones IE, Goulding A. Children who avoid drinking cow milk have low dietary calcium in takes and poor bone health. *Am J Clin Nutr.* 2002; 76: 675-680.
2. Carrillo-Lozano E, Sebastian-Valles F, Knott-Torcal C. Circulating microRNAs in breast milk and their potential impact on the infant. *Nutr.* 2020; 12(10): 3066.
3. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The C. Elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNA with antisense complementarity to lin-14. *Cell* 1993; 75(5): 843-854.
4. Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, et al. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates development timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature.* 2000; 403(6772): 901-906.
5. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science.* 2001; 294(5543): 853-858.
6. Pieters BC, Arntz OJ, Bennink MB, Broeren MG, Vancaam AP, Koenders MI, et al. Commercial cow milk contain physically stable extracellular vesicles expressing immunoregulatory TGF- β . *Plos One.* 2015; 10: e0121123
7. Zhou Q, Li M, Wang X, Li Q, Wang T, Zhu Q, et al. Immune-related microRNA are abundant in breast milk exosomes. *Int J Biol Sci.* 2012; 8: 118–123.
8. Izumi H, Tsuda M, Sato Y, Kosaka N, Ochiya T, Iwamoto H, et al. Bovine milk exosomes contain microRNA and mRNA and are taken up by human macrophages. *J Dairy Sci.* 2015; 98: 2920–33.
9. Baier SR, Nguyen C, Xie F, Wood JR, Zemleni J. MicroRNAs are absorbed in biological lymeaning ful amounts from nutritional lyrelevant doses of cow's milk and affect gene expression in peripheral blood mono nuclear cells, HEK-293 kidney cell cultures, and Mouse livers. *J. Nutr.* 2014; 144: 1495–1500.
10. Van Herwijnen MJC, Driedonks TAP, Snoek BL, Kroon AMT, Kleinjan M, Jorritsma R. et al. Abundantly present miRNAs in milk-derived extracellular vesicles are conserved between mammals. *Front Nutr.* 2018; 5: 81.
11. Kılıç E, Şanlıer N. Üç kuşak kadının beslenme alışkanlıklarının karşılaştırılması. *Kastomonu Eğitim Dergisi.* 2007; 15(1), s. 31-44.
12. Jaiswal S, Ramesh K, Kapusetti G, Ray AK, Ray B, Misra N. Mangiferin as chain transfer agent: effect on the molecular weight of poly (methyl methacrylate) and polystyrene. *Polymer Bulletin.* 2015; 72: 1407-1416.

13. Adnan M. Kimiadan teknologi pengolahan air susu. Andi Offset, Yogyakarta. 1984
14. Fox PF, McSweeney PLH, Advanced Dairy Chemistry. Volume 1. In Chapter 1: Milk Proteins: General and Historical Aspects. Third Edition. Part A. New York, Springer Verlag Publish; 2003. pp: 1-48
15. Baysal A. Beslenme. 10.baskı. Ankara, Hatiboğlu Yayınları, Bölüm II Besinler, Süt. 2004. s: 268-275.
16. Galley JD, Besner GE. The therapeutic potential of breast milk-derived extracellular vesicles. *Nutrients*. 2020; 12: 745.
17. Sanwlani R, Fonseka P, Chitti SV, Mathivanan S. Milk-Derived extracellular vesicles in Inter-Organism, cross-species communication and drug delivery. *Proteomes*. 2020; 8: 11.
18. Massey LK. Dairy food consumption, blood pressure and stroke. *J Nutr*. 2001; 131(7): 1875-1878.
19. Bus AEM, Worsley A. Consumers' health perceptions of three types of milk: a survey in Australia. *Appetite*. 2003; 40: 93-100.
20. Vaskonen T. Dietary minerals and modification of cardiovascular risk factors. *J Nutr Biochem*. 2003; 14: 492–506.
21. Kalkwarf HJ, Khoury JC, Lanphear BP. Milk intake during childhood and adolescence, adult bone density, and osteoporotic fractures in US women. *Am J Clin Nutr*. 2003; 77: 257-265.
22. Türk Gıda Kodeksi İçme Sütleri Tebliği. Tarım ve Orman Bakanlığı. 2019 (Tebliğ No: 2019/12)
23. Çiğ süt standardı. TSE 1018/T3. TSE, I. Baskı, Ankara. 2002. ICS 67.100.10
24. Guo HY, Pang K, Zhang XY, Zhao L, Chen SW, Ren FZ. Composition, physiochemical properties, nitrogen fraction distribution, and amino acid profile of donkey milk. *J Dairy Sci*. 2007; 90(4): 1635-43.
25. Tesse R, Paglialunga C, Braccio S, Armenio L. Adequacy and tolerance to ass's milk in an Italian cohort of children with cow's milk allergy. *Ital J Pediatr*. 2009; 35: 19.
26. Bidasolo BI, Ramos M, Gomez-Ruiz JA. In Vitro simulated gastrointestinal digestion of donkeys' milk. Peptide characterization by high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Int Dairy J*. 2012; 24, 146-152.

27. Benkerroum N. Antimicrobial activity of lysozyme with special relevance to milk. *African J Biotech.* 2008; 7: 4856–4867.
28. Saric LC, Saric BM, Kravic ST, Plavsic DV, Milovanovic I, Gubic JM. Antibacterial activity of domestic balkan donkey milk toward *listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*. *Food Feed Res.* 2014; 4: 47–54.
29. Gould SJ, Raposo G. As we wait: coping with an imperfect nomenclature for extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles.* 2013; 2: 111-130.
30. Yanez-Mo M, Siljander PR, Andreu Z, Zavec AB, Borrás FE, Buzas EI, et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J Extracell Vesicles.* 2015; 4: 27066.
31. Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol.* 2013; 200(4): 373–383.
32. De Jong OG, Van Balkom BWM, Schiffelers RM, Bouten CVC, Verhaar MC, Extracellular Vesicles: Potential roles in regenerative medicine. *Front Immunol.* 2014; 5: 1-13.
33. Colombo M, Raposo G, Thery C. Biogenesis and secretion intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2014; 30: 255-289.
34. Farooqi AA. Exosome biogenesis, bioactivities and functions as new delivery systems of natural compounds. *Biotechnol Adv.* 2018; 36(1): 328- 334
35. Poliakov A, Spilman M, Dokland T, Amling CL, Mobley JA. Structural heterogeneity and protein composition of exosome-like vesicles (prostasomes) in human semen. *Prostate.* 2009; 69: 15967.
36. Simpson R, Mathivanan S. Extracellular microvesicles: The need for internationally recognised nomenclature and stringent purification criteria. *J. Proteom. Bioinform.* 2012; 5: 1–2.
37. Kalra H, Simpson RJ, Ji H, Aikawa E, Altevogt P, Askenase P, et al. Vesiclepedia: A compendium for extracellular vesicles with continuous community annotation. *Plos Biol.* 2012; 10: e1001450.
38. Elmore S. Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicol. Pathol.* 2007; 35: 495–516.
39. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 1972; 26: 239.
40. Hessvik NP, Llorente A. Current knowledge on exosome biogenesis and release. *Cell Mol Life.* 2018; 75(2): 193-208.

41. Yim N, Ryu SW, Choi K. Exosome engineering for efficient intracellular delivery of soluble proteins using optically reversible protein-protein interaction module. *Nat Commun.* 2016; 7: 12277-86.
42. Subra C, Laulagnier K, Perret B, et al. Exosome lipidomics unravels lipid sorting at the level of multivesicular bodies. *Biochimie.* 2007; 89: 205–212
43. Johnstone RM. Revisiting the road to the discovery of exosomes. *Blood Cells Mol Dis.* 2005; 34(3): 214–219
44. Zhang Y, Liu Y, Liu H, et al. Exosomes: biogenesis, biologic function and clinical potential. *Cell Biosci.* 2019; 9: 19
45. Kooijmans SAA, Vader P, Van Dommelen SM, Van Solinge WW, Schiffelers M. Exosome mimetics: A novel class of drug delivery systems. *Int J Nanomedicine.* 2012; 7: 1525-1541
46. Minciacchi VR, Freeman MR, Di Vizio D. Extracellular vesicles in cancer: exosomes, microvesicles and the emerging role of large oncosomes. *Semin Cell Dev Biol.* 2015; 40: 41–51
47. Sahu R, Kaushik S, Clement CC, Cannizzo ES, Scharf B, Follenzi A, et al. Microautophagy of cytosolic proteins by late endosomes. *Dev Cell.* 2011; 20(1): 131–9.
48. Record M. Intercellular communication by exosomes in placenta: a possible role in cell fusion? *Placenta.* 2014; 35(5): 297–302
49. Kahlert C. Exosomes in tumor microenvironment influence cancer progression and metastasis. *J Mol Med.* 2014; 91(4): 431-437.
50. Keerthikumar S, Chisanga D, Ariyaratne D, Al Saffar H, Anand S, Zhao K, et al. ExoCarta: A Web-based compendium of exosomal cargo. *J Mol Biol.* 2016; 428: 688-692
51. Zaborowski MP, Balaj L, Breakefield XO, Lai CP. Extracellular Vesicles: composition, biological relevance, and methods of study. *Bioscience.* 2015; 65(8): 783-797
52. Rashed MH, Bayraktar E, Helal GK, Abd-Ellah MF, Amero P, Chavez-Reyes A, et al. Exosomes: from garbage bins to promising therapeutic targets. *Int J Mol Sci.* 2017; 18: 1-25
53. Sato-Kuwabara Y, Melo SA, Soares FA, Calin GA. The fusion of two worlds: noncoding RNAs and extracellular vesicles – diagnostic and therapeutic implications (Review). *Int J Oncol.* 2015; 46: 17–27

54. H Valadi, K Ekström, A Bossios, M Sjöstrand, JJ Lee, JO Lötval. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat cell biol.* 2007; 9 (6): 654-659.
55. Hüttenhofer A, Mayer G. Circulating miRNAs as biomarkers of kidney disease. *Clin Kidney J.* 2017; 10(1): 27-29.
56. Hind A, Wilson C. Exosomal miRNAs as cancer biomarkers and therapeutic targets. *J extracell vesicles.* 2016; 5(1): 31292.
57. Pritchard CC, Cheng HH, Tewari M., MicroRNA profiling: approaches and considerations. *Nat Rev Genet.* 2012; 13: 358-369.
58. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell.* 2004; 116: 281– 297.
59. Macfarlane LA, Murphy PR. MicroRNA: Biogenesis, function and role in cancer. *Curr Genomics.* 2010; 11(7): 537-561.
60. Arunachalam G, Upadhyay R, Ding H, Triggle CR. MicroRNA signature and cardiovascular dysfunction. *J cardio pharma.* 2015; 65(5): 419-429.
61. Jha A, Mehra M, Shankar R. The regulatory epicenter of miRNAs. *J Biosci.* 2011; 36(4): 621-638.
62. Rhoads RE. miRNA regulation of the translational machinery. Preface. *Prog Mol Subcell Biol.* Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 2010; 50: 115.
63. Griffiths-Jones S, Saini HK, Van Dongen S, Enright AJ. miRBase: Tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Res.* 2008; 36(1): 154-158.
64. Kwak PB, Iwasaki S, Tomari Y. The microRNA pathway and cancer. *Cancer Sci.* 2010; 101(11): 2309–2315.
65. Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, et al. VN. The nuclear RNase III DROSHA initiates microRNA processing. *Nature.* 2003; 425(6956): 415–419.
66. Yang JS, Lai EC. Alternative miRNA biogenesis pathways and the interpretation of core miRNA pathway mutants. *Mol Cell.* 2011; 43(6): 892-903
67. Han J, Lee Y, Yeom KH, Kim YK, Jin H, Kim VN. The Drosha-DGCR8 complex primary microRNA processing. *Genes Dev.* 2004; 18(24): 3016-3027.
68. Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev.* 2003; 17(24): 3011-6.

69. Zhang H, Kolb FA, Brondani V, Billy E, Filipowicz W. Human DICER preferentially cleaves dsRNAs at their termini without a requirement for ATP. *Embo J*. 2002; 21(21): 5875–85
70. Tsochandaridis M, Nasca L, Toga C, Levy-Mozziconacci A. Circulating MicroRNAs as clinical biomarkers in the predictions of pregnancy complications. *Biomed Res Int*. 2015; 2015: 294954.
71. Gunel T, Hosseini MK, Gumusoglu E, Dolekcap I, Aydinli K. Future perspective of preeclampsia by miRNA. *Pharma Publisher*. 2014; 10: 68-78.
72. Winter J, Jung S, Keller S, Gregory RI, Diederichs S. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat Cell Biol*. 2009; 11: 228-234
73. Parker R, Song H. The enzymes and control of eukaryotic mRNA turnover. *Nat Struct Mol Biol*. 2004; 11(2): 121-7.
74. Bauersachs J, Thum T. Biogenesis and regulation of cardiovascular microRNAs. *Circulation Research*. 2011; 109(3): 334-347
75. Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight. *Nat Rev Genet*. 2008; 9(2): 102– 14.
76. Sohel MH. Extracellular/circulating microRNAs: Release mechanisms, functions and challenges. *Achiev Life Sci*. 2016; 10(2): 175-186
77. Shen J, Stass SA, Jiang F. MicroRNAs as potential biomarkers in human solid tumors. *Cancer Lett*. 2013; 329(2): 125-136.
78. Etheridge A, Lee I, Hood L, Galas D, Wang K. Extracellular microRNA: a new source of biomarkers. *Mutat Res*. 2011; 717: 85-90.
79. Bertoli G, Cava C, Castiglioni I. MicroRNAs: New Biomarkers for diagnosis, prognosis, therapy prediction and therapeutic tools for breast cancer. *Theranostics*. 2015; 5(10): 1122-1143.
80. Lewohl JM, Nunez YO, Dodd PR, Tiwari GR, Harris RA, Mayfield RD. Upregulation of microRNAs in brain of human alcoholics. *Alcohol Clin Exp Res*. 2011; 35(11): 1928–1937.
81. Sempere LF, Freemantle S, Pitha-Rowe I, Moss E, Dmitrovsky E, Ambros V. Expression profiling of mammalian miRNAs uncovers a subset of brain-expressed microRNAs with possible roles in murine and human neuronal differentiation. *Genome Biol*. 2004; 5(3): 13.

82. Scalbert E, Bril A. Implication of microRNAs in the cardiovascular system. *Curr Opin in Pharmacol.* 2008; 8(2): 181-188
83. Shoeibi S. Diagnostic and theranostic microRNAs in the pathogenesis of atherosclerosis. *Acta physiol.* 2020; 228(1): e13353.
84. Saito Y, Suzuki H, Hibi T. The role of microRNAs in gastrointestinal cancers. *J Gastroenterol.* 2009; 44 (Suppl 19): 18–22.
85. O'Hara SP, Mott JL, Splinter PL, Gores GJ, LaRusso NF. MicroRNAs: key modulators of posttranscriptional gene expression. *Gastroenterology.* 2009; 136: 17–25.
86. Yu Z, Raabe T, Hecht N.B. MicroRNA Mirn122a reduces expression of the posttranscriptionally regulated germ cell transition protein 2 (Tnp2) messenger RNA (mRNA) by mRNA Cleavage1. *Biol Reprod.* 2005; 73: 427–433.
87. Chakrabarty A, Tranguch S, Daikoku T, Jensen K, Furneaux H, Dey SK: MicroRNA regulation of cyclooxygenase-2 during embryo implantation. *Proc Natl Acad Sci.* 2007; 104: 15144–15149.
88. Duica F, Condrat CE, Danila CA, Boboc AE, Radu MR, Xiao J, et al .MiRNAs: A Powerful Tool in Deciphering Gynecological Malignancies. *Front oncol.* 2020; 10: 591181.
89. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci.* 2002; 99: 15524–15529
90. Ray SK. Modulation of Expression of miRNAs for therapeutic effects in human malignant neuroblastoma. In: Ray SK. *Neuroblastoma: Molecular mechanisms and therapeutic interventions.* Academic Press. 2019; 299-312.
91. Chen J. MicroRNAs, signaling pathways and diseases. *Ann Transl Med.* 2015; 3(21): 329.
92. He Y, Lin J, Kong D, Huang M, Xu C, Kim TK, et al. Current state of circulating microRNAs cancer biomarkers. *Clin Chem.* 2015; 61(9), 1138-1155.
93. Çınar İ, Dursun HG. miRNA biyogenezi ve kanser patogenezindeki fonksiyonu. *Sakarya Tıp Dergisi.* 2016; 6(2): 64-71.
94. O'Connell R, Rao D, Chaudhuri A. et al. Physiological and pathological roles for microRNAs in the immune system. *Nat Rev Immunol.* 2010; 10: 111–122.
95. Xiao C, Rajewsky K. MicroRNA control in the immune system: basic principles. *Cell.* 2009; 136(1): 26-36.

96. Qian Y, Feldman E, Pennathur S, Kretzler M, Brosius FC. From fibrosis to sclerosis: Mechanisms of glomerulosclerosis in diabetic nephropathy. *Diabetes*. 2008; 57(6): 1439-1445.
97. Lawrie CH. Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Br j haematol*. 2008; 141(5): 672-675.
98. Weber JA, Baxter DH, Zhang S, Huang DY, Huang KH, Lee MJ. The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clin chem*. 2010; 56(11): 1733-1741.
99. Condrat E, Thompson DC, Madalina Barbu G, Bugnar OL, Boboc D, Cretoiu N. et al, miRNAs as biomarkers in disease: Latest findings regarding their role in diagnosis and prognosis. *Cells*. 2020; 9(2): 276.
100. Becker C, Riedmaier I, Reiter M, Tichopad A, Pfaffl MW, Meyer HH. Changes in the miRNA profile under the influence of anabolic steroids in bovine liver. *Analyst*. 2011; 136(6): 1204-9.
101. Andreas NJ, Kampmann B, Mehring Le-Doare K. Human breast milk: A review on its composition and bioactivity. *Early Hum Dev*. 2015; 91(11): 629-635.
102. Alsaweed M, Hartmann PE, Geddes DT, Kakulas F. MicroRNAs in breastmilk and the lactating breast: Potential immunoprotectors and developmental regulators for the infant and the mother. *Int J Environ Res*. 2015; 12(11): 13981-14020.
103. Ballard O, Morrow AL. Human milk composition: Nutrients and bioactive factors. *Pediatr Clin North Am*. 2013; 60(1): 49–74.
104. Ulfman LH, Leusen JHW, Savelkoul HFJ, Warner JO, van Neerven RJJ. Effects of bovine immunoglobulins on immune function, allergy, and infection. *Front Nutr*. 2018; 5: 52.
105. Melnik BC, Schmitz G. MicroRNAs: Milk's epigenetic regulators. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2017; 31(4): 427-442.
106. Alsaweed M, Hepworth AR, Lefèvre C, Hartmann PE, Geddes DT, Hassiotou F. Human milk microRNA and total RNA differ depending on milk fractionation. *J Cell Biochem*. 2015; 116(10): 2397-2407.
107. Alsaweed M, Lai CT, Hartmann PE, Geddes DT, Kakulas F. Human milk miRNAs primarily originate from the mammary gland resulting in unique miRNA profiles of fractionated milk. *Sci Rep*. 2016; 6: 20680.

108. Do DN, Dudemaine PL, Li R, Ibeagha-Awemu EM. Co-expression network and pathway analyses reveal important modules of miRNAs regulating milk yield and component traits. *Int J Mol Sci.* 2017; 18(7): 1560.
109. Benmoussa A, Ly S, Shan ST, Laugier J, Boilard E, Gilbert C, Provost P. A subset of extracellular vesicles carries the bulk of microRNAs in commercial dairy cow's milk. *J Extracel Vesicles.* 2017; 6(1): 1401897.
110. Iannaccone M, Cosenza G, Pauciullo A, Garofalo F, Proroga YT, Capuano F, et al. Milk microRNA-146a as a potential biomarker in bovine tuberculosis. *J Dairy Res.* 2018; 85(2): 178– 180.
111. Cai M, He H, Jia X, Chen S, Wang J, Shi Y. Genome-wide microRNA profiling of bovine milk-derived exosomes infected with *Staphylococcus aureus*. *Cell Stress Chaperones.* 2018; 23(4): 663–672.
112. Do DN, Dudemaine PL, Mathur M, Suravajhala P, Zhao X, Ibeagha-Awemu EM. MiRNA regulatory functions in farm animal diseases, and biomarker potentials for effective therapies. *Int J Mol Sci.* 2021; 22: 3080.
113. Saydam F, Değirmenci İ, Güneş HV. Mikro RNA'lar ve kanser. *Dicle Med J.* 2011; 38(1): 113-120.
114. Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, Iorio MV, Ferracin M, Shimizu M. et al. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci.* 2005; 102(39): 13944-9.
115. Aqeilan RI, Calin GA, Croce CM. miR-15a and miR-16-1 in cancer: discovery, function and future perspectives. *Cell Death Differ.* 2010; 17: 215-220.
116. Calin GA, Croce CM. Genomics of chronic lymphocytic leukemia microRNAs as new players with clinical significance. *Semin Oncol.* 2006; 33: 167-173.
117. Long J, Jiang C, Liu B, Fang S, Kuang M. MicroRNA-15a-5p suppresses cancer proliferation and division in human hepatocellular carcinoma by targeting BDNF. *Tumour Biol.* 2016; 37(5): 5821-8.
118. He L, He X, Lim PL, Stanchina E, Xuan Z, Liang Y, et al. A microRNA component of the p53 tumor suppressor network. *Nature.* 2007; 447: 1130-1135
119. Efstratiadis A, Szabolcs M, Klinakis A. Notch, Myc and breast cancer, *Cell Cycle.* 2007; 6(4): 418-429
120. Tazawa H, Tsuchiya N, Izumiya M, Nakagama H. Tumorsuppressive miR-34a induces senescence-like growth arrest through modulation of the E2F pathway in human colon cancer cells. *Proc Natl Acad Sci.* 2007; 104: 15472 -15477.

121. Slabakova E, Culig Z, Jan Remsíř Karel Soucek. Alternative mechanism of miR-34a regulation in cancer. *Cell Death Dis.* 2017; 8: 3100.
122. Lodygin D, Tarasov V, Epanchintsev A, Berking C, Knyazeva T, Korner H, et al. Inactivation of miR-34a by aberrant CpG methylation in multiple types of cancer. *Cell Cycle.* 2008; 7: 2591–2600.
123. Halimi M, Ahmad S, Moslemi D, Parsian H, Asghari SM, Sariri R, et al. Human serum miR-34a as an indicator of exposure to ionizing radiation. *Radiat Environ Biophys.* 2016; 55(4): 423–429.
124. Rossi M, Pitari MR, Amodio N, Di Martino MT, Conforti F, Leone E, et al. miR-29b negatively regulates human osteoclastic cell differentiation and function: Implications for the treatment of multiple myeloma-related bone disease. *J. Cell. Physiol.* 2013; 228: 1506–1515.
125. Kapinas K, Kessler C, Ricks T, Gronowicz G, Delany AM. miR-29 modulates Wnt signaling in human osteoblasts through a positive feedback loop. *J Biol Chem.* 2010; 285: 25221– 25231
126. Komori T, Nomura S, Yamaguchi A, Sasaki K, Deguchi K, Shimizu Y, et al. Targeted disruption of *Cbfa1* results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell.* 1997; 89: 755–764
127. Srikok S, Patchanee P, Boonyayatra S, Chuammitri P. Potential role of miRNA as a diagnostic tool in the detection of bovine mastitis. *Prev. Vet. Med.* 2020; 182: 105101
128. Li J, Wang L, Hua X, Tang H, Chen R, Das S. CRISPR/Cas9-Mediated miR-29b editing as a treatment of different types of muscle atrophy in mice. *Mol. Ther.* 2020; 28: 1359–1372.
129. Taibi F, Metzinger-Le Meuth V, Massy ZA, Metzinger L. miR-223: an inflammatory oncomiR enters the cardiovascular field. *Biochim Biophys Acta.* 2014; 1842(7): 1001–1009
130. Jefries J, Wenging Z, Alan YH, Qing D. miRNA223 at the crossroad of inflammation and cancer. *Cancer Lett.* 2019; 453: 136–141
131. Zhang Y, Xin Z, Wen-Jie J, Rui S, Rui-Yi L, Jin-Long Y. Decreased circulating microRNA-223 level predicts high on-treatment platelet reactivity in patients with troponin-negative non-ST elevation acute coronary syndrome. *J Thromb Thrombolysis.* 2014; 38: 65–72
132. Li X, Zhang Y, Zhang H, Liu X, Gong T, Li M, et al. microRNA-223 promotes gastric cancer invasion and metastasis by targeting tumor suppressor EPB41L3. *Mol Cancer Res.* 2011; 9(7): 824–33.

133. Johnnidis JB, Harris MH, Wheeler RT, Stehling-Sun S, Lam MH, Kirak O, et al. Regulation of progenitor cell proliferation and granulocyte function by microRNA-223. *Nature*. 2008; 451: 1125–1129
134. Patır B, Yıldız N, İncili G, Gürses M. Keçi sütünde somatik hücre sayısı ile toplam mezofilik aerob bakteri sayısı ve bazı yetiştiricilik özellikleri arasındaki ilişki. *F.Ü. Sağ Bil Vet Derg*. 2012; 26(3): 145-150
135. Aydın BD, Çelik A, Uçar U, Güran HŞ. Diyarbakır bölgesinde üretilen anadolu manda sütlerinde somatik hücre sayısının ve mikrobiyolojik kalitenin araştırılması. *Dicle Üniv. Vet Fak Der*. 2022; 15(2): 93-98.
136. Harrigan WF. *Laboratory Methods in Food Microbiology*. 3th Ed. San Diego, Academic Press.1998; 325-328
137. Case RA, Bradley RL, Williams RR. Chemical and Physical Methods. Chapter 18, In *Standart Methods for the Examination of Dairy Products*. 15th Edition, Washington DC. American Public Health Association, 19.
138. Türk Standardları Enstitüsü. Sütte Yağ Tayini. TS ISO 2446. Türk Standardları Enstitüsü, Ankara, 2015
139. Metin M. Süt Teknolojisi Sütün Bileşimi ve İşlenmesi 4. Baskı, İzmir: Ege Üniversitesi Basımevi; 2001, s:1-483.
140. Hatipoğlu A, Çelik Ş. Diyarbakır örgü peyniri üretiminde kullanılan sütün bazı özellikleri ile peynir üretim prosesinin değerlendirilmesi. *Akademik Ziraat Dergisi*. 2021; 10(1): 185-194
141. Joseph D, Ulrich K. Heat stability of concentrated skim milk as a function of heating time and temperature on a laboratory scale – Improved methodology and kinetic relationship. *Int. Dairy J*. 2015; 49(12): 111-117
142. Hata T, Murakami K, Nakatani H, Yamamoto Y, Matsuda T. Isolation of bovine milk-derived microvesicles carrying mRNAs and microRNAs' *Biochem Biophys Res Commun*. 2010; 396(2): 528-33.
143. Lai YC, Fujikawa T, Ando T, Kitahara G, Koiwa M, Kubota C, et al. Rapid communication: MiR-92a as a housekeeping gene for analysis of bovine mastitis-related microRNA in milk. *J Anim Sci*. 2017; 95(6): 2732-2735.
144. Günel T, Aydın K. Real-Time PCR ve uygulama alanları. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*. 2009; 2(2): 43-45,
145. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001; 25 (4): 402-8.

146. Benmoussa A, Provost P. Milk MicroRNAs in health and disease. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 2019; 18(3): 703–722.
147. Zhang L, Hou D, Chen X, Li D, Zhu L, Zhang Y, et al. Exogenous plant MIR168a specifically targets mammalian LDLRAP1: evidence of cross-kingdom regulation by microRNA. *Cell Research.* 2012; 22(1): 107–126.
148. Dickinson B, Zhang Y, Petrick JS, Heck G, Ivashuta S, Marshall WS. Lack of detectable oral bioavailability of plant microRNAs after feeding in mice. *Nat Biotechnol.* 2013; 31(11): 965-967
149. Wolf T, Baier SR, Zemleni J. The intestinal transport of bovine milk exosomes is mediated by endocytosis in human colon carcinoma Caco-2 cells and rat small intestinal IEC-6 cells. *J Nutr.* 2015; 145(10): 2201–2206
150. Zemleni J, Baier SR, Howard KM, Cui J. Gene regulation by dietary microRNAs. *Can J Physiol Pharmacol.* 2015; 93(12): 1097–1102
151. Zemleni J, Aguilar-Lozano A, Sadri M, Manca S, Wu D, Zhou F, et al. Biological activities of extracellular vesicles and their cargos from bovine and human milk in humans and implications infants. *J Nutr.* 2017; 147(1): 3–10.
152. Dinçel D, Ardıçlı S, Şamlı H, Balcı F. Sığır, keçi, ve koyunlarda MikroRNA’ların meme bezi gelişimi ve süt üretimine etkisi. *Anadolu Çev. Ve Hayv. Dergisi.* 2018; 3(3): 124-130
153. Izumi H, Kosaka N, Shimizu T, Sekine K, Ochiya T, Takase M. Bovine milk contains microRNA and messenger RNA that are stable under degradative conditions. *J Dairy Sci.* 2012; 95(9): 4831–4841
154. Rani P, Vashisht P, Golla N, Shandilya S, Onteru SK, Singh D. Milk miRNAs encapsulated in exosomes are stable to human digestion and permeable to intestinal barrier in vitro. *J Funct Foods.* 2017; 34(2): 431-439
155. Wang J, Bian Y, Wang Z, Li D, Wang C, Li Q, et al. MicroRNA-152 regulates DNA methyltransferase 1 and is involved in the development and lactation of mammary glands in dairy cows. *PLoS One.* 2014; 9(7): e101358.
156. Shen B, Zhang L, Lian C, Lu C, Zhang Y, Pan Q. Deep Sequencing and screening of differentially expressed MicroRNAs related to milk fat metabolism in bovine primary mammary epithelial cells. *Int J Mol Sci.* 2016; 17(2): 200.
157. Chen Z, Chu S, Wang X, Sun Y, Xu T, Mao Y. MiR-16a Regulates Milk fat metabolism by targeting large tumor suppressor kinase 1 (*LATS1*) in bovine mammary epithelial cells. *J Agric Food Chem.* 2019; 67(40): 11167-11178.

158. Guelfi G, Stefanetti V, De Luca S, Giontella A, Barile VL, Barbato O, Serum microRNAs in buffalo cows potential biomarkers of pregnancy. *Res Vet Sci.* 2017; 115: 294–300
159. Cai X, Liu Q, Zhang X, Ren Y, Lei X, Li S, et al. Identification and analysis of the expression of microRNA from lactating and nonlactating mammary glands of the Chinese swamp buffalo. *J Dairy Sci.* 2017; 100(3): 1971-1986.
160. Chen Z, Xie Y, Luo J, Chen T, Xi Q, Zhang Y, Sun J. Milk exosome-derived miRNAs from water buffalo are implicated in immune response and metabolism process. *BMC Vet Res.* 2020; 16(1): 123.
161. Rani P, Onteru SK, Singh D, Genome-wide profiling and analysis of microRNA expression in buffalo milk exosomes. *Food Bioscience.* 2020; 38: 100769,
162. Galio L, Droineau S, Yeboah P, Boudiaf H, Bouet S, Truchet S. MicroRNA in the ovine mammary gland during early pregnancy: spatial and temporal expression of miR-21, miR-205, and miR200. *Physiology Genomics.* 2013; 45(4): 151
163. Wang J, Hao Z, Hu J, Liu X, Li S, Luo J, et al. Small RNA deep sequencing reveals the expressions of microRNAs in ovine mammary gland development at peak-lactation and the non-lactating period. *Genomics.* 2021; 113 (12): 637-646.
164. Quan S, Nan X, Wang K, Jiang L, Yao J, Xiong B. Characterization of Sheep milk extracellular vesicle-miRNA by sequencing and comparison with cow milk. *Animals (Basel).* 2020; 10(2): 331.
165. Duman E, Özmen Ö. *Oar-miR-16b* and *oar-miR-27a*: negatively correlated with milk yield and milk protein in sheep. *Anim Biotechnol.* 2022; 33(7): 1466-1479.
166. Hao Z, Luo Y, Wang J, Hickford JGH, Zhou H, Hu J, et al. MicroRNA-432 inhibits milk fat synthesis by targeting *SCD* and *LPL* in ovine mammary epithelial cells. *Food Funct.* 2021; 12(19): 9432-9442.
167. Wang J, Hao Z, Hu L, Qiao L, Luo Y, Hu J. et al. MicroRNA-199a-3p regulates proliferation and milk fat synthesis of ovine mammary epithelial cells by targeting VLDLR. *Front. Vet. Sci.* 2020; 9: 948873.
168. Li Z, Lan X, Guo W, Sun J, Huang Y, Wang J, et al. Comparative transcriptome profiling of dairy goat microRNAs from dry period and peak lactation mammary gland tissues. *PLoS One.* 2012; 7(12): e52388.

169. Lin X, Luo J, Zhang LP, Wang W, Shi HB, Zhu JJ. MiR-27a suppresses triglyceride accumulation and affects gene mRNA expression associated with fat metabolism in dairy goat mammary gland epithelial cells. *Gene*. 2013; 521(1): 15-23.
170. Lin X, Luo J, Zhang L, Wang W, Gou D. MiR-103 controls milk fat accumulation in goat (*Capra hircus*) mammary gland during lactation. *PLoS One*. 2013; 8(11): e79258.
171. Chen Z, Luo J, Ma L, Wang H, Cao W, Xu H, et al. MiR130b-regulation of PPAR γ coactivator-1 α suppresses fat metabolism in goat mammary epithelial cells. *PLoS One*. 2015; 10(11): e0142809.
172. Ma L, Qiu H, Chen Z, Li L, Zeng Y, Luo J, et al. miR-25 modulates triacylglycerol and lipid accumulation in goat mammary epithelial cells by repressing PGC-1beta. *J Animal Sci Biotechnol*. 2018; 9: 48.
173. Lin X, Luo J, Zhang L, Zhu J. MicroRNAs synergistically regulate milk fat synthesis in mammary gland epithelial cells of dairy goats. *Gene Expr*. 2013; 16(1): 1-13.
174. Na RS, E GX, Sun W, Sun XW, Qiu XY, Chen LP, Huang YF. Expressional analysis of immune-related miRNAs in breast milk. *Genet Mol Res*. 2015; 14(3): 11371-6.
175. Golan-Gerstl R, Elbaum Shiff Y, Moshayoff V, Schecter D, Leshkowitz D, Reif S. Characterization and biological function of milk-derived miRNAs. *Mol Nutr Food Res*. 2017; 61(10).
176. Yun B, Kim Y, Park DJ, Oh S. Comparative analysis of dietary exosome-derived microRNAs from human, bovine and caprine colostrum and 117 mature milk. *J Anim Sci Technol*. 2021; 63(3): 593-602.
177. Huang J, Zhao Y, Bai D, Shiraigol W, Li B, Yang L, et al. Donkey genome and insight into the imprinting of fast karyotype evolution. *Sci Rep*. 2015; 5: 14106.
178. Unger L, Abril C, Gerber V, Jagannathan V, Koch C, Hamza E. Diagnostic potential of three serum microRNAs as biomarkers for equine sarcoid disease in horses and donkeys. *J Vet Intern Med*. 2021; 35(1): 610-619.

179. Li Y, Ma Q, Shi X, Yuan W, Liu G, Wang C. Comparative transcriptome analysis of slow-twitch and fast-twitch muscles in dezhou donkeys. *Genes (Basel)*. 2022; 13(9): 1610.
180. Fei Y, Gai Y, Liao Q, Zhang L, Li Z, Li B, et al. An integrated analysis of lactation-related miRNA and mRNA expression profiles in donkey mammary glands. *Genes (Basel)*. 2022; 13(9): 1637.
181. Mecocci S, Pietrucci D, Milanese M, Pascucci L, Filippi S, Rosato V. Transcriptomic Characterization of cow, donkey and goat milk extracellular vesicles reveals their anti-inflammatory and immunomodulatory potential. *Int J Mol Sci*. 2021; 22(23): 12759.
182. Chen X, Gao C, Li H, Huang L, Sun Q, Dong Y. Identification and characterization of microRNAs in raw milk during different periods of lactation, commercial fluid, and powdered milk products. *Cell Res*. 2010; 20: 1128–1137
183. Howard KM, Kusuma RJ, Baier SR, Friemel T, Markham L, Vanamala J. et al. Loss of miRNAs during processing and storage of cow's (*Bos taurus*) milk. *J. Agric. Food Chem*. 2015; 63: 588–592
184. Kirchner B, Pfaffl MW, Dimpler J, von Mutius E, Ege MJ. microRNA in native and processed cow's milk and its implication for the farm milk effect on asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2016; 137(6): 1893-1895.
185. Kleinjan M, van Herwijnen MJ, Libregts SF, van Neerven RJ, Feitsma AL, Wauben MH. Regular Industrial Processing of bovine milk impacts the integrity and molecular composition of extracellular vesicles. *J Nutr*. 2021; 151(6): 1416-1425.
186. Zhang Y, Xu Q, Hou J, Huang G, Zhao S, Zheng N. et al. Loss of bioactive microRNAs in cow's milk by ultra-high-temperature treatment but not by pasteurization treatment. *J Sci Food Agric*. 2022; 102: 2676-2685.

9. ÖZGEÇMİŞ

Adı		Soyadı	
Doğum Yeri		Doğum Tarihi	
Uyruğu		Tel	
E-posta			

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora/Uzmanlık		
Tezli Yüksek Lisans		
Tezsiz Yüksek Lisans		
Lisans		
Lise		

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre(Yıl - Yıl)
1 Veteriner Hekim		
2 Veteriner Hekim		
3 Veteriner Hekim		
4 Öğretim Görevlisi		

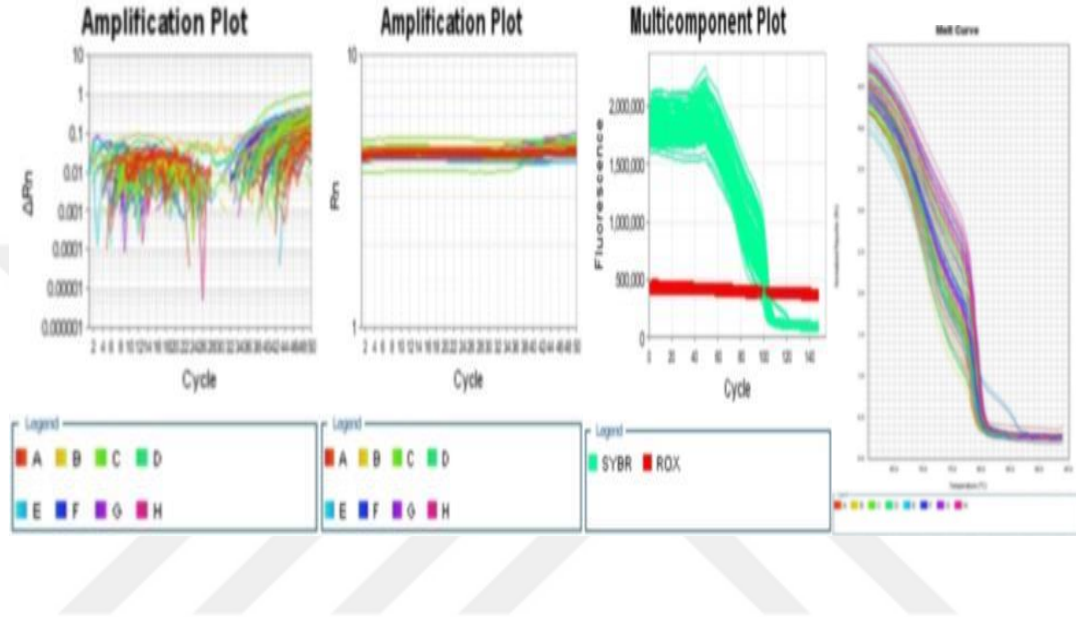
Yabancı Dil Sınav Notu

KPDS/ÜDS/YDS	YÖKDİL	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE
	60							

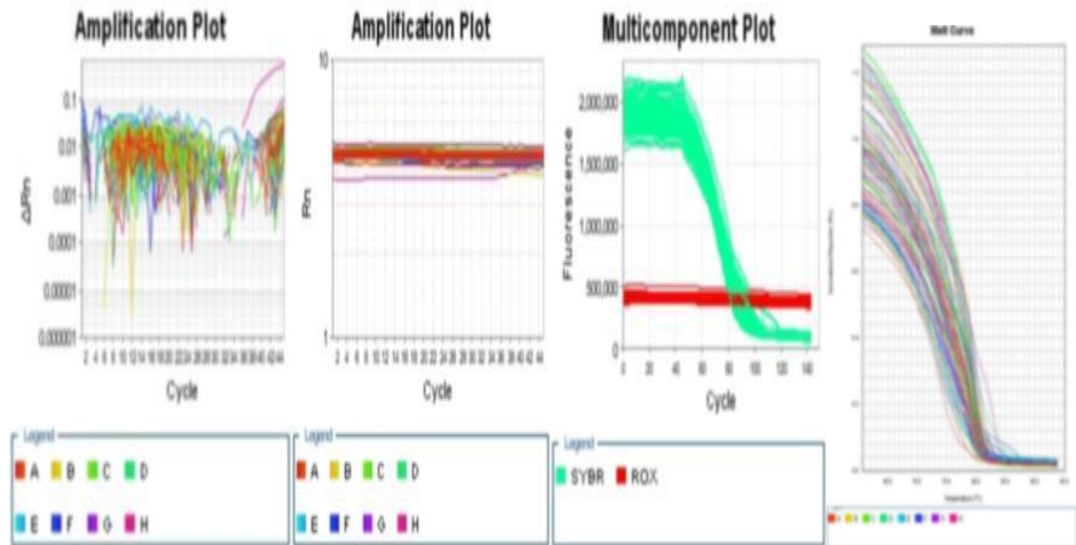
10- EKLER

10.1. EK-1 Çalışmada incelenen miRNA'lara ait Real-Time PCR analiz grafikleri

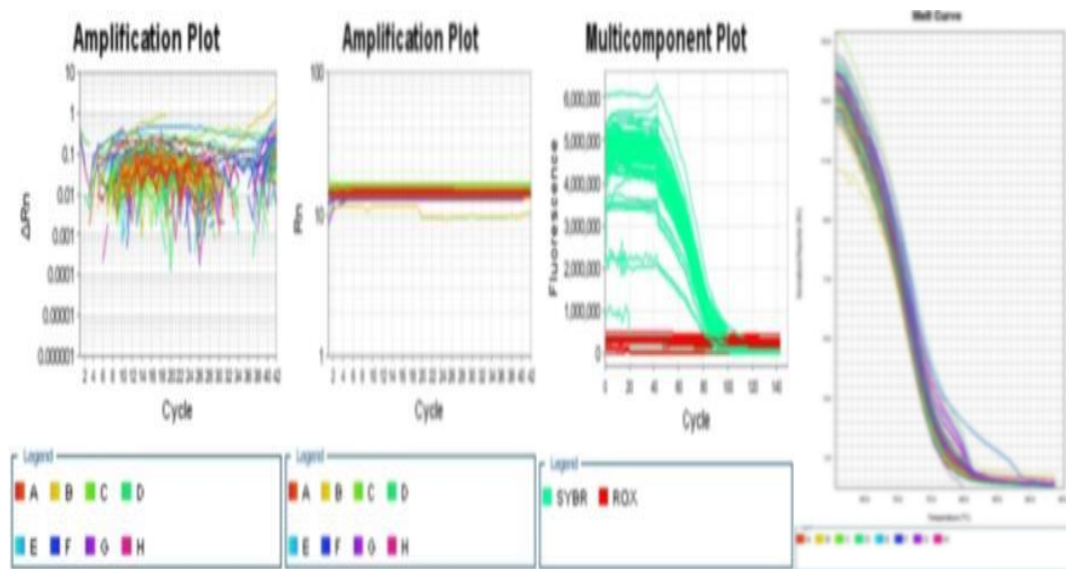
miRNA 15a



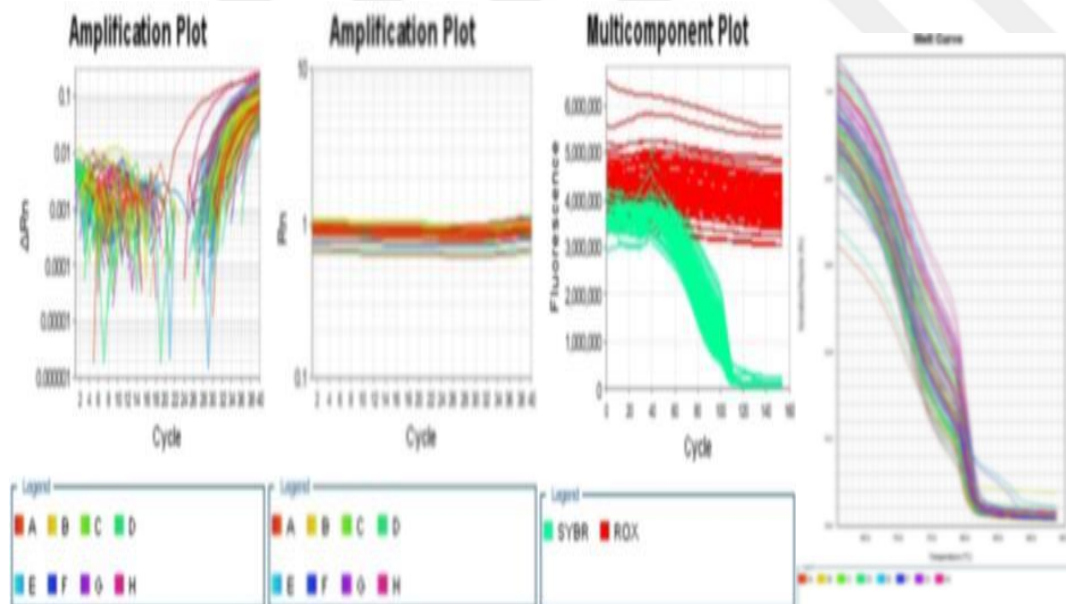
miRNA 29b



miRNA 34a



miRNA 223



10.2. EK-2 Doktora için makale

	Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi https://dergipark.org.tr/tr/pub/duvetfd Araştırma Makalesi/Research Article Dicle Üniv Vet Fak Derg 2022;15(2):93-98 DOI: 10.47027/duvetfd.1188536	
ISSN:1307-9972	e-ISSN:1308-0679	

Dişarbakır Bölgesinde Üretilen Anadolu Manda Sütlerinde Somatik Hücre Sayısının ve Mikrobiyolojik Kalitenin Araştırılması

Berna DUMAN AYDIN^{a,*}, Ahmet ÇELİK^{a,b}, Uğur UÇAR^{a,c}, Hüsnü Şahan GÜRAN^{a,d,e}

^aDicle Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Besin/Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, Dişarbakır/TÜRKİYE
^bDicle Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Besin/Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, Dişarbakır/TÜRKİYE
^cORCID: 0000-0001-8116-3174; ^dORCID: 0000-0001-5934-7170; ^eORCID: 0000-0002-7394-3333; ^fORCID: 0000-0002-8674-3310

Gönderi Tarihi/Received 12.10.2022	Kabul Tarihi/Accepted 13.12.2022	Yayın Tarihi/Published 21.12.2022
---------------------------------------	-------------------------------------	--------------------------------------

Öz

Bu çalışmada Dişarbakır bölgesinde üretilen Anadolu manda sütlerinin somatik hücre sayısı ve mikrobiyolojik kalitesinin belirlenmesi amaçlandı. Üretici düzeyinde toplanan 65 adet manda sütü somatik hücre sayısı (SHS), toplam canlı sayısı (TVC), koliform bakteriler, *E. coli*, maye ve küf sayısı ile *E. coli* O157 varlığı yönünden incelendi. Ayrıca sütlerde pH analizi gerçekleştirildi. Süt örneklerinin tamamında ortalama 135.740 hücre/ml SHS ve 5.35±0.17 log₁₀ kob/ml ile TVC tespit edildi. Örneklerin sırasıyla koliform, *E. coli*, maye ve küf ile ortalama 4.26±0.20, 2.19±0.13, 2.89±0.20, 2.08±0.27 log₁₀ kob/ml düzeyinde kontamine olduğu belirlendi. Ancak örneklerin hiçbirinde *E. coli* O157 saptanmadı. Süt örneklerindeki pH değerlerinin ise 5.55 ile 5.99 arasında değiştiği ve ortalama 5.51±0.20 olduğu belirlendi. Bu çalışmada incelenen örneklerin pH değerlerinin ise 5.55 ile 5.99 arasında değiştiği ve ortalama 5.51±0.20 olduğu belirlendi. Bu çalışmada incelenen örneklerin pH değerlerinin ise 5.55 ile 5.99 arasında değiştiği ve ortalama 5.51±0.20 olduğu belirlendi. Bu çalışmada incelenen örneklerin pH değerlerinin ise 5.55 ile 5.99 arasında değiştiği ve ortalama 5.51±0.20 olduğu belirlendi. Bu çalışmada incelenen örneklerin pH değerlerinin ise 5.55 ile 5.99 arasında değiştiği ve ortalama 5.51±0.20 olduğu belirlendi.

Anahtar Kelimeler: Anadolu mandası, mikrobiyolojik kalite, somatik hücre sayısı, süt, toplam canlı sayısı

Investigation of Somatic Cell Count and Microbiological Quality in Anatolian Buffalo Milk Produced in Dişarbakır Province

Abstract

In this study it was aimed to determine the somatic cell count and microbiological quality of Anatolian buffalo milk produced in Dişarbakır province. Sixty five of buffalo milk collected at the producer level was examined for the presence of somatic cell counts (SHS), total viable counts (TVC), counts of coliform bacteria, *E. coli*, yeast and mold, and presence of *E. coli* O157. In addition, pH analysis was carried out in all milk samples. All of the samples contained SHS and TVC, respectively, with a mean count of 135.740 cells/ml and 5.35±0.17 log₁₀ cfu/ml. The mean coliform, *E. coli*, yeast and mold counts (log₁₀ cfu/ml) of the milk samples, which were 4.26±0.20, 2.19±0.13, 2.89±0.20, and 2.08±0.27, respectively. None of the samples were contaminated with *E. coli* O157. It was determined that the pH values in the milk samples ranged between 5.55 and 5.99, with an average of 5.51±0.20. In the analysed milk samples in this study, international hygiene standards for raw milk were exceeded for TVC (n=54, 82.3%) as well as for SCC (n=4, 6.1%). The fact that the *E. coli* O157 pathogen has not been detected is good for consumer safety. However, the mean counts of some indicator microorganisms determined at high level shows that hygiene and sanitation practices are insufficient in buffalo milk production.

Key Words: Anatolian buffalo, microbiological quality, milk, somatic cell count, total viable count

GİRİŞ

Manda sütü besin içeriği nedeniyle dikkat çeken önemli hayvansal orijinli gıdalar arasında yer alır. Manda sütünün peynir, tereyağı, kaymak, dondurma ve yoğurt gibi farklı süt ürünlerinin üretiminde kullanılmasını yaygınlaştıran faktörlerden biri de inek sütü ile karşılaştırıldığında manda sütünün yağ, ham protein, laktöz, kuru madde, vitamin ve mineral açısından daha yüksek bir içeriğe sahip olmasıdır (1, 2). Manda sütünün yoğun bir aromaya sahip olması içme sütü olarak tüketilmesini sınırlandırmaktadır. Bundan dolayı manda sütü çoğunlukla peynir, yoğurt veya kaymak gibi süt ürünlerinin üretiminde kullanılır (2, 3). Gıda ve Tarım Örgütü (Food and Agriculture Administration-FAO) verilerine göre 2020 yılında dünyada toplam 203.532.944 baş manda bulunmaktadır. Türkiye dünya manda varlığı sıralamasında 19. sırada, Avrupa ülkeleri arasında ise İtalya'dan sonra 2. sırada ve dünya manda sütü üretiminde ise 11. sırada yer almaktadır (4). Türkiye'deki yeni manda ırkı Anadolu mandası olarak bilinmektedir. 2004 yılında ırk tescilli yapılmış olan Anadolu mandası, Akdeniz mandalarından nehir alt grubunda yer alır (5). Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) 2021 verileri Türkiye'de 183.374 baş manda bulunduğunu ve 13.914 baş manda sayısı ile Dişarbakır'ın ikinci sırada yer aldığını göstermektedir (6). 2021 yılında Türkiye'de

11- ORJİNALLİK RAPORU

SÜTLERDE MİRNA

ORJİNALLİK RAPORU

%**4**

BENZERLİK ENDEKSİ

%**5**

İNTERNET KAYNAKLARI

%**0**

YAYINLAR

%**1**

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

TÜM KAYNAKLARI EŞLEŞTİRİ SADECE SEÇİLİ OLAN KAYNAĞI YAZDIĞI

%4

★ acikbilim.yok.gov.tr

İnternet Kaynağı

Alıntılar çıkart

üzerinde

Eşleşmeleri çıkar

< %1

Bibliyografyayı Çıkart

üzerinde

