

T.C.
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ
MERAM TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI



KONYA BÖLGESİNDE YAŞAYAN ANNELERİN
BİYOLOJİK SIVILARINDA BESİN KAYNAKLI
miRNA VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI

DR. NEJLA ÖZER

UZMANLIK TEZİ

KONYA, 2017

T.C.
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ
MERAM TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**KONYA BÖLGESİNDE YAŞAYAN ANNELERİN BİYOLOJİK SIVILARINDA
BESİN KAYNAKLI miRNA VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI**

DR. NEJLA ÖZER

UZMANLIK TEZİ

Danışman: PROF. DR. MEHMET GÜRBİLEK

KONYA, 2017

TEŞEKKÜR

Sonuna gelmiŐ olduğum asistanlık s¼recimde bana her anlamda destek olan, akademik ve sosyal alanda tecr¼be ve bilgi birikimini benimle paylaŐan, yoluma ıŐık tutan, bana yol g¼steren değerli hocam Prof. Dr. Mehmet G¼RB¼LEK'e,

Başta Yrd. Doğ. Dr. İbrahim KILINĐ olmak üzere, ön¼mde olup bana el uzatan, ilerlememi sağlayan saygıdeğer hocalarıma, her zaman yanımda yer alan, yardımına koŐan ve d¼rt yılımı g¼zelleŐtiren asistan arkadaŐlarım ve laboratuvardaki diğer mesai arkadaŐlarıma, arkamda bana her an destek olan, sırtımı g¼venle yaslayabildiğim sevgili aileme, tezimin son haline gelmesinde b¼y¼k emeği olan canım arkadaŐım Dr. S¼meyra KARA'ya,

Hayatımın her anında olduğu gibi asistanlık ve tez s¼recimde de en b¼y¼k destekĐim olan, hayat arkadaŐım M. RaŐit ÖZER'e ve bana umut ve g¼ç veren canım kızlarıma sonsuz teŐekkürlerimi sunuyorum.

ÖZET

KONYA BÖLGESİNDE YAŞAYAN ANNELERİN BİYOLOJİK SIVILARINDA BESİN KAYNAKLI miRNA VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI

DR. NEJLA ÖZER

UZMANLIK TEZİ

KONYA, 2017

Amaç: Bu çalışmada, emziren annelerden eş zamanlı alınmış olan plazma ve anne sütü gibi biyolojik sıvılarda, annelerin günlük diyetlerinde tükettikleri gıdalara ait miRNA varlığı araştırılmıştır.

Yöntem: Laktasyonunun 1-12 aylarındaki, sağlıklı ve gönüllü 11 emziren anne çalışmaya dahil edilmiştir. Annelerden alınan plazma örnekleri ile süt örneklerinin lipid ve lipid altı kısımlarında besinsel miRNA varlığı RT-PCR yöntemi ile araştırılmıştır. Ardından varlığı tespit edilen miRNA'ların insanda etki edebileceği mRNA ve yolaklar veri tabanlarından araştırılmıştır.

Bulgular: Mdm-miR171i, mdm-miR7121d, sly-miR169c, sly-miR156a, osa-miR168a-5p, tae-miR167a, gma-miR1520d ve gma-miR156b için hem plazma, hem de süt örneklerinde anlamlı ekspresyon tespit edilmiştir. Sly-miR169b, osa-miR168a-3p, osa-miR156a ve tae-miR159b için plazmada anlamlı miktarda ekspresyon tespit edilirken, süt örneklerinde anlamlı ekspresyon gözlenmemiştir. Mdm-miR858, mdm-miR399a, tae-miR167b ve tae-miR159a için hiçbir örnekte anlamlı ekspresyon gözlenmemiştir. Veri tabanlarında yapılan karşılaştırma sonucu, plazmada tespit edilen besinsel miRNA'ların bazı insan mRNA'larının 3' UTR bölgesi ile yüksek oranda baz eşleşmesi gösterdiği tespit edilmiştir.

Sonuç: Besinsel miRNA'nın insan plazması ve anne sütüne geçtiği, ancak bu geçişin miRNA'ların bazıları için gerçekleşmediği tespit edilmiştir. Yine bu miRNA'ların insanda pek çok yolak üzerine etkili olabileceği tespit edilmiştir. Öte yandan miRNA'ların geçiş mekanizmalarının tespiti ve insan metabolizmasındaki rollerinin kesin olarak gösterilebilmesi için çok daha kapsamlı çalışmalar yapılması gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler: miRNA, anne sütü, diyet

ABSTRACT

INVESTIGATION OF DIETARY miRNA PRESENCE IN BIOLOGICAL FLUIDS OF MOTHERS LIVING IN KONYA REGION

NEJLA ÖZER, MD

THESIS OF SPECIALTY

KONYA, 2017

Aim: In this study, the presence of food-borne miRNAs that mothers consume on their daily diet has been investigated in biological fluids such as plasma and milk which are taken simultaneously.

Material and Method: Healthy and voluntary 11 lactating mothers from 1-12 months of lactation were included in the study. The presence of nutritional miRNAs in plasma and milk (milk lipid and skim milk fractions) samples was investigated by RT-PCR. Then, mRNAs and pathways in which the presence of miRNAs that have been identified can act in the human body were searched from databases.

Results: Significant expression was detected in both plasma and milk samples for mdm-miR171i, mdm-miR7121d, sly-miR169c, sly-miR156a, osa-miR168a-5p, tae-miR167a, gma-miR1520d and gma-miR156b. Significant amounts of expression were detected in the plasma for sly-miR169b, osa-miR168a-3p, osa-miR156a and tae-miR159b, but no significant expression was observed in milk samples. No significant expression was observed in any of the samples for mdm-miR858, mdm-miR399a, tae-miR167b and tae-miR159a. As a comparison with the databases, it was determined that the nutritional miRNAs detected in the plasma showed high base matching with the 3'UTR region of some human mRNAs.

Conclusion: It has been determined that nutritional miRNA passes to human plasma and breast milk, but this transition does not occur for some miRNAs. It has also been found that these miRNAs can be effective on many pathways in humans. On the other hand, much more comprehensive studies needs to be done in order to detection of miRNA transition mechanisms and to clearly demonstrate their role in human metabolism.

Keywords: miRNA, breast milk, diet

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
İÇ KAPAK	ii
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER	vi
TABLolar DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
KISALTMALAR	xix
1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Mikro RNA'lar.....	3
2.1.1. Mikro RNA'ların Tanımı ve Tarihçesi.....	3
2.1.2. MiRNA'ları Genomik Organizasyonu.....	3
2.1.3. miRNA Biyogenezisi.....	5
2.1.3.1. Standart Yolak.....	5
2.1.3.2. Standart Dışı miRNA'lar.....	7
2.1.4. miRNA'ların Etki Mekanizmaları.....	9
2.1.4.1. Translasyon İnhibisyonu.....	9
2.1.4.2. Translasyon Aktivasyonu.....	10
2.1.5. miRNA'ların Fonksiyonları.....	10
2.1.6. miRNA Ekspresyonunun Düzenlenmesi.....	11
2.1.7. miRNA Ekspresyon Disregülasyonu.....	11
2.1.8. Ekstraselüler miRNA'lar	13
2.2. miRNA ve Anne Sütü.....	14

2.3. Kodlamayan RNA'lar ve RNA İnterferansı.....	16
2.3.1. Uzun kodlamayan RNA'lar (long non-coding RNA; lncRNA).....	18
2.3.2. Küçük Nükleer / Spliseozomal RNA'lar.....	18
2.3.3. Küçük Nükleolar RNA'lar.....	18
2.3.4. Piwi ilişkili RNA'lar.....	18
2.3.5. Küçük İnterfere Edici RNA'lar.....	19
2.4. Bitkisel miRNA'lar.....	19
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	21
3.1. Gereç.....	21
3.1.1. Hastaların Seçimi.....	21
3.1.2. Plazma ve Süt Numunelerinin Eldesi.....	22
3.1.3. Kullanılan Cihazlar.....	22
3.1.4. Kullanılan Malzemeler.....	22
3.2. Yöntem.....	22
3.2.1 miRNA İzolasyonu.....	23
3.2.2 Primer Dizaynı.....	24
3.2.3 cDNA Sentezi.....	26
3.2.4 Real Time PCR Protokol.....	27
3.3 RT-PCR Verilerinin Rölatif Ölçüm Tekniği ile Değerlendirilmesi ($2^{-\Delta\Delta CT}$ Yöntemi)...28	
3.4. İstatistiksel Değerlendirme.....	29
3.5 Çalışılan miRNA'ların İnsanlarda Eşleştiği mRNA'ların ve Etki Edebileceği Yolakların Tespiti.....	29
4.BULGULAR.....	30
4.1. Hastaların Demografik Özellikleri.....	30
4.2. Analiz Sonuçları ve İstatistiksel Değerlendirme.....	32
5. TARTIŞMA.....	72

6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	79
7. KAYNAKLAR.....	80



TABLULAR DİZİNİ

Tablo 2.1. Kodlamayan RNA'ların bazı örnekleri.....	17
Tablo 3.1. miRNA'ların RT,Forward ve Reverse primer baz dizilimleri.....	24
Tablo 3.2. cDNA sentezi için gerekli bileşenler.....	26
Tablo 3.3. cDNA sentezi için gerekli bileşenler (2. aşama).....	26
Tablo 3.4. cDNA sentezi için termal döngü cihazında uygulanan prosedür.....	26
Tablo 3.5. RT-PCR için gerekli olan bileşenler ve hacimleri.....	27
Tablo 3.6. RT-PCR için termal döngü cihazında uygulanan prosedür.....	27
Tablo 3.7. Örneklerin plate üzerindeki yerleşimi.....	28
Tablo 4.1. Hastaların besinleri son tüketim saati.....	30
Tablo 4.2. Hastaların besinleri tüketme sıklık ve miktarları.....	31
Tablo 4.3: Plazma, süt lipid altı ve süt lipid örneklerinde sly-miR169c ve referans U6 genlerinin CT, Δ CT ve $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri.....	32
Tablo 4.4. Sly-miR169c'nin plazma, süt lipid altı ve süt lipid örneklerinde $2^{-\Delta\Delta CT}$ ortanca, alt çeyrek ve üst çeyrek değerleri.....	33
Tablo 4.5. Plazma, süt lipid altı ve süt lipid örneklerinde sly-miR156a ve referans U6 genlerinin CT, Δ CT ve $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri	35
Tablo 4.6. Sly-miR156a'nın plazma, süt lipid altı ve süt lipid örneklerinde $2^{-\Delta\Delta CT}$ ortanca, alt çeyrek ve üst çeyrek değerleri.....	36
Tablo 4.7. Plazma, süt lipid altı ve süt lipid örneklerinde sly-miR169b ve referans U6 genlerinin CT, Δ CT ve $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri	38
Tablo 4.8. Sly-miR169b'nin plazma, süt lipid altı ve süt lipid örneklerinde $2^{-\Delta\Delta CT}$ ortanca, alt çeyrek ve üst çeyrek değerleri.....	39
Tablo 4.9. Plazma, süt lipid altı ve süt lipid örneklerinde mdm-miR399a ve referans U6 genlerinin CT, Δ CT ve $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri.....	41
Tablo 4.10. Plazma, süt lipid altı ve süt lipid örneklerinde mdm-miR858 ve referans U6 genlerinin CT, Δ CT ve $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri.....	42

Tablo 4.11. Plazma, süt lipid altı ve süt lipid örneklerinde mdm-miR7121d ve referans U6 genlerinin CT, Δ CT ve $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri.....	43
Tablo 4.12. Mdm-miR7121d'nin plazma, süt lipid altı ve süt lipid örneklerinde $2^{-\Delta\Delta CT}$ ortanca, alt çeyrek ve üst çeyrek değerleri.....	44
Tablo 4.13. Plazma, süt lipid altı ve süt lipid örneklerinde mdm-miR171i ve referans U6 genlerinin CT, Δ CT ve $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri.....	46
Tablo 4.14. Mdm-miR171i'nin plazma, süt lipid altı ve süt lipid örneklerinde $2^{-\Delta\Delta CT}$ ortanca, alt çeyrek ve üst çeyrek değerleri.....	47
Tablo 4.15. Plazma, süt lipid altı ve süt lipid örneklerinde osa-miR168a-3p ve referans U6 genlerinin CT, Δ CT ve $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri.....	49
Tablo 4.16. Osa-miR168a-3p 'nin plazma, süt lipid altı ve süt lipid örneklerinde $2^{-\Delta\Delta CT}$ ortanca, alt çeyrek ve üst çeyrek değerleri.....	50
Tablo 4.17. Plazma, süt lipid altı ve süt lipid örneklerinde osa-miR168a-5p ve referans U6 genlerinin CT, Δ CT ve $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri.....	52
Tablo 4.18. Osa-miR168a-5p 'nin plazma, süt lipid altı ve süt lipid örneklerinde $2^{-\Delta\Delta CT}$ ortanca, alt çeyrek ve üst çeyrek değerleri.....	53
Tablo 4.19. Plazma, süt lipid altı ve süt lipid örneklerinde osa-miR156a ve referans U6 genlerinin CT, Δ CT ve $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri.....	55
Tablo 4.20. Osa-miR156a 'nın plazma, süt lipid altı ve süt lipid örneklerinde $2^{-\Delta\Delta CT}$ ortanca, alt çeyrek ve üst çeyrek değerleri.....	56
Tablo 4.21. Plazma, süt lipid altı ve süt lipid örneklerinde tae-miR167a ve referans U6 genlerinin CT, Δ CT ve $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri.....	58
Tablo 4.22. Tae-miR167a'nın plazma, süt lipid altı ve süt lipid örneklerinde $2^{-\Delta\Delta CT}$ ortanca, alt çeyrek ve üst çeyrek değerleri.....	59
Tablo 4.23. Plazma, süt lipid altı ve süt lipid örneklerinde tae-miR167b ve referans U6 genlerinin CT, Δ CT ve $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri.....	61
Tablo 4.24. Plazma, süt lipid altı ve süt lipid örneklerinde tae-miR159a ve referans U6 genlerinin CT, Δ CT ve $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri.....	62
Tablo 4.25. Plazma, süt lipid altı ve süt lipid örneklerinde tae-miR159b ve referans U6 genlerinin CT, Δ CT ve $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri.....	63

Tablo 4.26. Tae-miR159b'nin plazma, süt lipid altı ve süt lipid örneklerinde $2^{-\Delta\Delta CT}$ ortanca, alt çeyrek ve üst çeyrek değerleri.....	64
Tablo 4.27. Plazma, süt lipid altı ve süt lipid örneklerinde gma-miR1520d ve referans U6 genlerinin CT, ΔCT ve $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri.....	66
Tablo 4.28. Gma-miR1520d 'nin plazma, süt lipid altı ve süt lipid örneklerinde $2^{-\Delta\Delta CT}$ ortanca, alt çeyrek ve üst çeyrek değerleri.....	67
Tablo 4.29. Plazma, süt lipid altı ve süt lipid örneklerinde gma-miR156b ve referans U6 genlerinin CT, ΔCT ve $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri.....	69
Tablo 4.30. Gma-miR156b 'nin plazma, süt lipid altı ve süt lipid örneklerinde $2^{-\Delta\Delta CT}$ ortanca, alt çeyrek ve üst çeyrek değerleri.....	70



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. MiRNA'ların genomik organizasyonu	4
Şekil 2.2. Standart miRNA biyosentez yolağı	7
Şekil 2.3. Mirtron yolağı	8
Şekil 2.4. tRNaz Z- bağımlı yolak	9
Şekil 2.5. Dolaşımdaki miRNA'ların tahmini kaynakları.....	14
Şekil 2.6. Bebeğin eksojen mikroRNA kaynaklarını ve bebeğin gastrointestinal (GI) sistemindeki alımını gösteren tahmini senaryo.....	16
Şekil 4.1. Plazma, süt lipid altı ve süt lipid örneklerindeki sly-miR169c $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerlerinin dağılımı.....	33
Şekil 4.2. Her bir vakaya ait plazma, süt lipid altı ve süt lipid sly-miR169c $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerlerinin karşılaştırılması.....	34
Şekil 4.3. Plazma, süt lipid altı ve süt lipid örneklerindeki sly-miR156a $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerlerinin dağılımı.....	36
Şekil 4.4. Her bir vakaya ait plazma, süt lipid altı ve süt lipid sly-miR156a $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerlerinin karşılaştırılması.....	37
Şekil 4.5. Plazma, süt lipid altı ve süt lipid örneklerindeki sly-miR169b $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerlerinin dağılımı.....	39
Şekil 4.6. Her bir vakaya ait plazma, süt lipid altı ve süt lipid sly-miR169b $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerlerinin karşılaştırılması.....	40
Şekil 4.7. Plazma, süt lipid altı ve süt lipid örneklerindeki mdm-miR7121d $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerlerinin dağılımı.....	44
Şekil 4.8. Her bir vakaya ait plazma, süt lipid altı ve süt lipid mdm-miR7121d $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerlerinin karşılaştırılması.....	45
Şekil 4.9. Plazma, süt lipid altı ve süt lipid örneklerindeki mdm-miR171i $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerlerinin dağılımı	47
Şekil 4.10. Her bir vakaya ait plazma, süt lipid altı ve süt lipid mdm-miR171i $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerlerinin karşılaştırılması.....	48

Şekil 4.11. Plazma, süt lipid altı ve süt lipid örneklerindeki osa-miR168a-3p $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerlerinin dağılımı.....	50
Şekil 4.12. Her bir vakaya ait plazma, süt lipid altı ve süt lipid osa-miR168a-3p $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerlerinin karşılaştırılması.....	51
Şekil 4.13. Plazma, süt lipid altı ve süt lipid örneklerindeki osa-miR168a-5p $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerlerinin dağılımı.....	53
Şekil 4.14. Her bir vakaya ait plazma, süt lipid altı ve süt lipid osa-miR168a-5p $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerlerinin karşılaştırılması.....	54
Şekil 4.15. Plazma, süt lipid altı ve süt lipid örneklerindeki osa-miR156a $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerlerinin dağılımı.....	56
Şekil 4.16. Her bir vakaya ait plazma, süt lipid altı ve süt lipid osa-miR168a-5p $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerlerinin karşılaştırılması.....	57
Şekil 4.17. Plazma, süt lipid altı ve süt lipid örneklerindeki tae-miR167a $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerlerinin dağılımı.....	59
Şekil 4.18. Her bir vakaya ait plazma, süt lipid altı ve süt lipid tae-miR167a $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerlerinin karşılaştırılması.....	60
Şekil 4.19. Plazma, süt lipid altı ve süt lipid örneklerindeki tae-miR159b $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerlerinin dağılımı.....	64
Şekil 4.20. Her bir vakaya ait plazma, süt lipid altı ve süt lipid tae-miR159b $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerlerinin karşılaştırılması.....	65
Şekil 4.21. Plazma, süt lipid altı ve süt lipid örneklerindeki gma-miR1520d $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerlerinin dağılımı.....	67
Şekil 4.22. Her bir vakaya ait plazma, süt lipid altı ve süt lipid gma-miR1520d $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerlerinin karşılaştırılması.....	68
Şekil 4.23. Plazma, süt lipid altı ve süt lipid örneklerindeki gma-miR156b $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerlerinin dağılımı.....	70
Şekil 4.24. Her bir vakaya ait plazma, süt lipid altı ve süt lipid gma-miR156b $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerlerinin karşılaştırılması.....	71

SİMGELER VE KISALTMALAR

Δ	: Delta
Ago	: Argonaut proteinleri
AGO2	: Argonaut 2
CT	: Cycle treshold
DGCR8	: DiGeorge syndrome critical region gene 8
DPY19L1	: Dpy-19 like 1
dsRBD	: Double-stranded RNA-binding domain
dsRNA	: Çift zincirli RNA (double stranded RNA)
GDO	: Genetiği değiştirilmiş organizmalardır
HDL	: Yüksek dansiteli lipoprotein (High density lipoprotein)
KC	: Karaciğer
KC	: Karaciğer
KOAH	: Kronik obstruktif akciğer hastalığı
LDL	: Düşük dansiteli lipoprotein (Low Density Lipoprotein)
LDLRAP1	: Düşük dansiteli lipoprotein reseptör adaptör protein 1
lncRNA	: Uzun kodlamayan RNA (long non-coding RNA)
miRNA	: MikroRNA
MREG	: Melanoregulin
MSANTD2	: Myb/SANT DNA binding domain containing 2
ncRNA	: Kodlamayan (non-coding) RNA
nt	: Nükleotid
piRNA	: Piwi ilişkili RNA
PREX2	: Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfat bağımlı Rac değişim faktörü 2
PRLR	: Prolaktin reseptör
RGAG4	: Retrotransposon gag domain containing 4

RISC	: RNA ile indüklenmiş susturma kompleksi (RNA-induced silencing complex)
RNAi	: RNA interferansı
RT-PCR	: Real-Time Polymerase Chain Reaction
RUNX2	: Runt-related transcription factor 2
SEPT2	: Septin2
shRNA	: Small hairpin RNA
siRNA	: Small interfering RNA
snoRNA	: Small nücleolar RNA
snRNA	: Small nuclear RNA
TRBP	: Trans-aktivatör RNA (tar)- bağlayıcı protein
XPO5	: Eksportin 5
ZNF446	: Zinc finger protein 446

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Beslenme yaşamın her döneminde sağlığın temelini oluşturur. Sağlıklı beslenme deyiminden de sağlığın korunması, geliştirilmesi ve kronik hastalık riskini azaltmaya yönelik beslenme biçimi anlaşılır (Baysal 1998). Tüketilen besinlerin miktarına bağlı gelişen sorunlar besinin ihtiyaç duyulandan fazla ya da az alınmasından kaynaklanabilir (Rudolph 2013, Kliegman 2010, Pekcan 2008). Vücut doku, organ ve sistem fonksiyonlarının devamlılığı için gerekli olan makro (proteinler, karbonhidratlar, yağlar) ve mikro (vitaminler, mineraller ve eser elementler) besinlerin yetersiz, dengesiz ya da aşırı alımı, dokularda yapısal eksikliklerin, organlarda fonksiyon bozukluklarının görüldüğü kompleks durum olan malnütrisyonu kadar gidebilmektedir. (Hasanoğlu 2010, Neyzi 2010, Rudolph 2013, Çavuşoğlu 2013, Selçuk 2012).

Anne sütü; yenidoğanda yeterli büyüme ve gelişme için gerekli olan tüm sıvı, kalori ve besinsel öğeleri içeren, bebeklerin zihinsel gelişimlerini olumlu yönde etkileyen ve enfeksiyonlardan korunmalarına yardımcı olan çok özel bir besindir. Buna ek olarak anne sütünün sindirimi çok kolaydır (http://www.un.org/womenwatch/daw/beijing/pdf/Beijing_full_report_E.pdf). Anne sütü ile emzirmenin hem bebek hem de anne açısından, sağlık, bağışıklık, sosyoekonomik ve psikolojik gelişim yönünden pek çok faydası olduğunu gösteren birçok bulgu bulunmaktadır (Samur 2008). Doğumdan itibaren ilk altı ay bebeklerin yalnızca anne sütü ile beslenmesi önerilmektedir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ve Birleşmiş Milletler Çocuklara Yardım Fonu (UNICEF) çocuk sağlığı için anne sütü ile beslenmenin anahtar bir rolü olduğunu vurgulamaktadır. (<http://www.who.int/nutrition/publications/codeenglish.pdf>). Anne sütünün içeriği; laktasyon süresince annelerin biyokimyasal farklılıklarına, yedikleri öğünlerin içeriğine ve aldıkları besinlerin farklılığına göre değişebilmektedir. Bu nedenle anne sütünün makro ve mikro besin öğesi miktarları birbirinden farklılık göstermektedir (Samur 2008).

mikroRNA'lar (miRNA) ~22nt uzunluğundaki endojen RNA'lardır. Son yıllarda yapılan ve metabolizma üzerine etkilerinin araştırıldığı çalışmalarla miRNA'ların önemi gittikçe anlaşılmaktadır. Söz konusu endojen RNA'lar bitki ve hayvanlarda önemli düzenleyici role sahip olup bu düzenlemeyi mRNA yıkımına neden olarak ya da translasyonu baskılayarak gerçekleştirirler (Bartel 2004). miRNA'ların insan anne sütünde eksozomlar içinde paketlenmiş olabileceği bazı çalışmalarda ortaya konmuştur (Zhou 2012).

Yapılan araştırmalarda insan protein kodlayıcı genlerinin %60'ından fazlasının miRNA'lar için bağlanma bölgesine sahip olduğu gsterilmiştir (Friedman 2009).

miRNA'lar hayvanlarda gelişim sırasındaki çok sayıda hücresel olayda, hücresel akıbeti tespiti, proliferasyon ve hücresel ölümü gibi pek çok kilit sürecin regülasyonu ve zamanlamasında önemli role sahiptir (Stefani 2008). Bu görevleri dolayısıyla miRNA ekspresyonunun düzenlenmesi de sıkı kontrol altında bulunmakta olup deregülasyonu insanlarda kanser gibi hastalıklarla ilişkilendirilmektedir (Jiang 2009).

Zhou ve ark (2012) çalışmalarında iyi karakterize edilmiş 87 immünite ilişkili pre-miRNA'dan 59 tanesini (%67.82) meme sütü eksozomlarında tespit etmiştir. Çalışmada bu miRNA'ların süt içerisinde bebeğe aktararak immünitesine katkıda bulunduğu bildirilmiştir.

Süt bezlerinde immünite ilişkili fonksiyona sahip ve ekspresyon paterni laktasyon süresince farklılıklar gösteren miRNA'lar tespit edilmiştir. Mastitte, Streptococcus uberis'in neden olduğu inflamatuvar yanıt, muhtemelen doğal bağışıklığı düzenleyen miRNA'ların ekspresyonunu değiştirmektedir (Gigli 2013).

miRNA'ların türler arası geçişi ve etkisi son yıllarda birçok çalışmada araştırma konusu olmuştur. Memeli hücrelerinde bitkisel miRNA'ların da memeli miRNA'ları ile benzer fonksiyona sahip olduğu düşünölmektedir (Witzany 2012).

Diyet kaynaklı bitkisel miRNA'ların insan serumunda tespit edildiği şaşırtıcı çalışmalar bulunmakla birlikte insan kanındaki bitkisel miRNA'ların hangi metabolik yolağı etkilediği veya biyolojik fonksiyonları henüz tam olarak bilinmemektedir. Bu çalışmada emziren annelerin plazma ve anne sütü gibi biyolojik sıvılarında annelerin günlük diyetlerinde tükettikleri gıdalara ait miRNA varlığının araştırılması amaçlanmıştır. Bu kapsamda çalışmaya ilişkin yapılan girişin ardından çalışmanın ikinci bölümünde miRNA'ların yapısı, biyogenezi, etki mekanizmaları ve fonksiyonlarına ilişkin genel bilgilere değinilmiştir. Bunların yanı sıra ikinci bölümde miRNA disregülasyonu-hastalık ilişkisi ve ekstraselüler miRNA'lar hakkında da kısa bir bilgilendirme yer almaktadır. Çalışmanın üçüncü bölümünde ise insan kanındaki bitkisel miRNA'ların etkilediği metabolik yolağın araştırılmasına ilişkin yapılan çalışma ve detayları sunulmuştur. Çalışmanın son bölümünde ise elde edilen bulgulara ve tartışmaya yönelik bilgi verilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

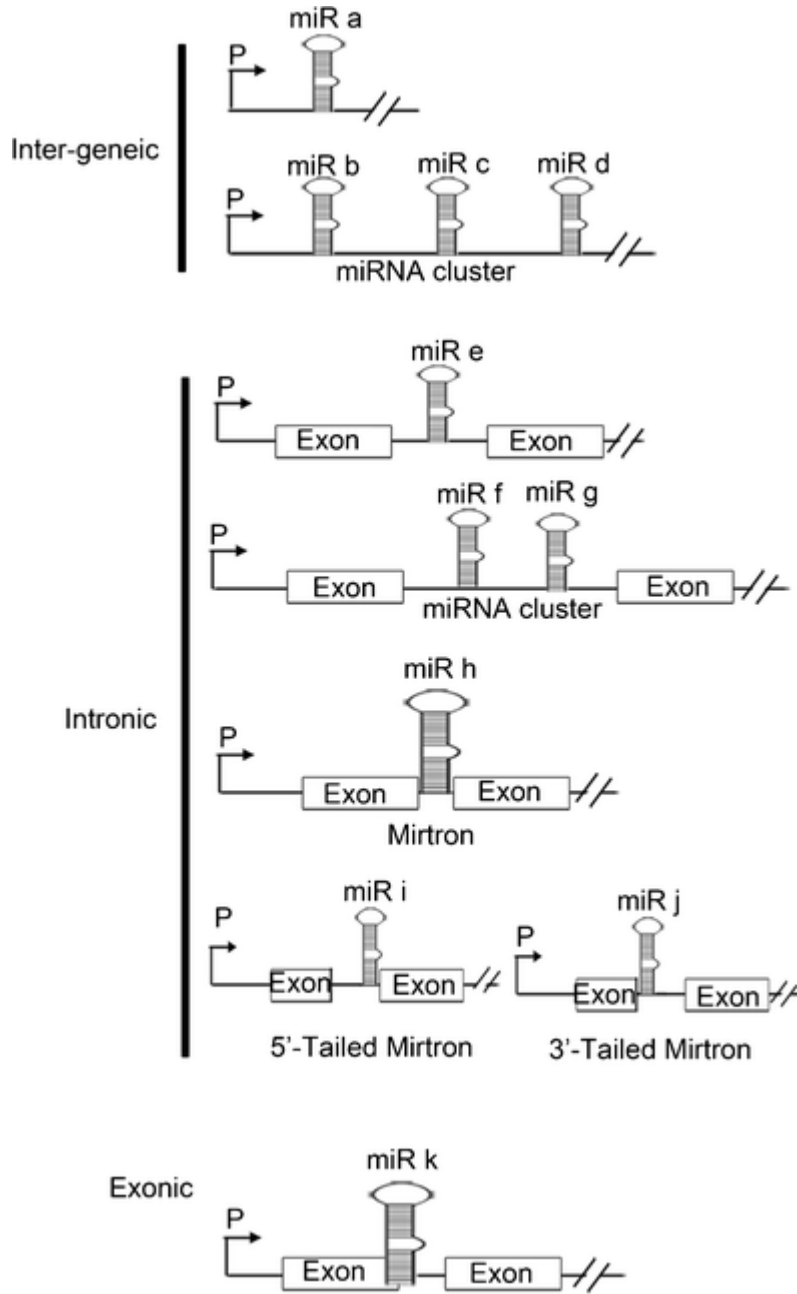
2.1. Mikro RNA'lar

2.1.1. Mikro RNA'ların Tanımı ve Tarihçesi

miRNA'lar küçük (~22 nt uzunluğunda), tek zincirli, kodlamayan RNA sınıfı üyeleridir. Hayvan, bitki ve tek hücreli ökaryotlarda gen ekspresyonunun posttranskripsiyonel düzenlenmesini kontrol ederler. miRNA geni (lin-4) ilk kez 1993 yılında Victor Ambros ve ark. tarafından larval gelişim defekti olan *Caenorhabditis elegans*ta yapılan genetik araştırmalarda tespit edilmiştir. Ardından 2000 yılında Reinhart ve ark. 22-nt uzunluğundaki RNA'nın (let-7) *C. elegans*'ın gelişimsel sürecine katıldığını keşfetmişlerdir. Çalışmalarda lin-4 ve let-7'nin her ikisinin de mRNA translasyonunu baskıladığı ortaya çıkmıştır. Let-7 geninin insan dahil diğer hayvanlarda da tespiti ve RNA interferansının aynı yıllarda keşfedilmesi ile miRNA'lar literatürde önem kazanmışlardır. Günümüzde miRNA veri tabanında 110'dan fazla organizmada toplam 28 binden fazla miRNA tanımlanmıştır (<http://www.mirbase.org/>). Bu küçük RNA'lar memelilerde tüm protein kodlayan genlerin ~% 60'ını posttranskripsiyonel olarak kontrol etmektedir. miRNA'lar hücrede gelişme, diferansiasyon (farklılaşma), proliferasyon (çoğalma) ve apoptoz (programlı hücre ölümü) gibi neredeyse tüm hücrel olayların düzenlenmesine katılmaktadırlar (Melo 2014).

2.1.2. MiRNA'ları Genomik Organizasyonu

MiRNA'lar Y kromozomu hariç tüm kromozomlarda haritalandırılmış olup genomik yerleşimlerine göre intergenik, intronik ve eksonik olmak üzere üç grupta incelenirler (Şekil 2.1)(Rodriguez 2004).



Şekil 2.1. MiRNA'ların genomik organizasyonu (Hussain 2012).

İntergenik miRNA'lar bilinen fonksiyonel transkripsiyon ünitelerinin dışında yer alırlar. Kendi promotor ve diğer düzenleyici faktörlerine sahiptirler. Bu miRNA'lar monosistronik olabildiği gibi polisistronik de olabilmektedir (Lagos-Quintana 2003).

İntronik miRNA'lar protein kodlayan ya da kodlamayan genlerin intronlarında yer alırlar. Bu miRNA'lar kendi promotorlarına sahip olabilir ya da ev sahipliği yapan gen ile birlikte transkribe edilip pre-mRNA'dan elde edilebilirler (Lagos-Quintana 2003). Bazı

durumlarda protein kodlayan genin intronunun tamamı tam olarak pre-miRNA görevi görür. Bu gibi intronlar **mirtron** olarak isimlendirilir (Okamura 2007).

Eksonik miRNA'lar çok nadir görülmekte olup ev sahipliği yapan genin promotörü ile transkribe edildiği düşünülmektedir (Rodriguez 2004).

2.1.3. miRNA Biyogenezi

2.1.3.1. Standart Yolak

miRNA sentezi çoğunlukla RNA polimeraz II tarafından, **primer miRNA (pri-miRNA)** olarak adlandırılan uzun transkriptin sentezi ile başlar. Transkripsiyon sonucunda 5'cap ve poli-A kuyruğu taşıyan bir veya daha çok firkete (hairpin) yapısı ortaya çıkar.

Oluşan pri-miRNA'lar ardından yine nükleusta mikropressör kompleks olarak adlandırılan bir multiprotein kompleksi tarafından ~70 nt uzunluğundaki **pre-miRNA**'lara kırpılırlar.

Mikropressör kompleks esas olarak **Drosha** (RNaz III enzimi) ve **DGCR8** (DiGeorge syndrome critical region gene 8: çift zincirli RNA-bağlayıcı domen; double-stranded RNA-binding domain; dsRBD) protein yapılarını içermektedir. DGCR8 proteini firkete yapısının sap kısmı ile komşu tek zincirli RNA (single-stranded RNA;ssRNA) kısmını tanıyarak; Drosha'nın, sap-ssRNA kesişim bölgesinden ~11 nt'lik kısmı kesip uzaklaştırmasını sağlar. Neticede oluşan yapı pre-miRNA'dır. Pre-miRNA, RNaz III endonükleaz ürünlerinin karakteristiği olan 2 nt'lik 3' çıkıntısına sahiptir.

RNaz III enzimleri (örn. Drosha) bir çift zincirli ribonükleaz ailesi olup tüm canlı hücrelerden eksprese edilirler.

DGCR8 proteini iki dsRNA bağlama bölgesi içermektedir. Pri-miRNA'nın tanınması ve mikropressör kompleksin bağlanmasında önemli role sahiptir. DGCR8 geni 22. kromozomda lokalizedir. Genin monoallelik delesyonunda Di George sendromu ortaya çıkar.

Mikropressör kompleksin fonksiyonunda önemli role sahip olan diğer kofaktörler; DEAD box RNA helikaz p68 (DDX5), p72 (DDX17), ve heterojen ribonükleoproteinlerdir (hnRNP).

Oluşan pre-miRNA'ların 2nt 3'çıkıntısı **ekspörtin 5** tarafından tanınır ve Ran-GTP bağımlı mekanizma ile stoplazmaya taşınır.

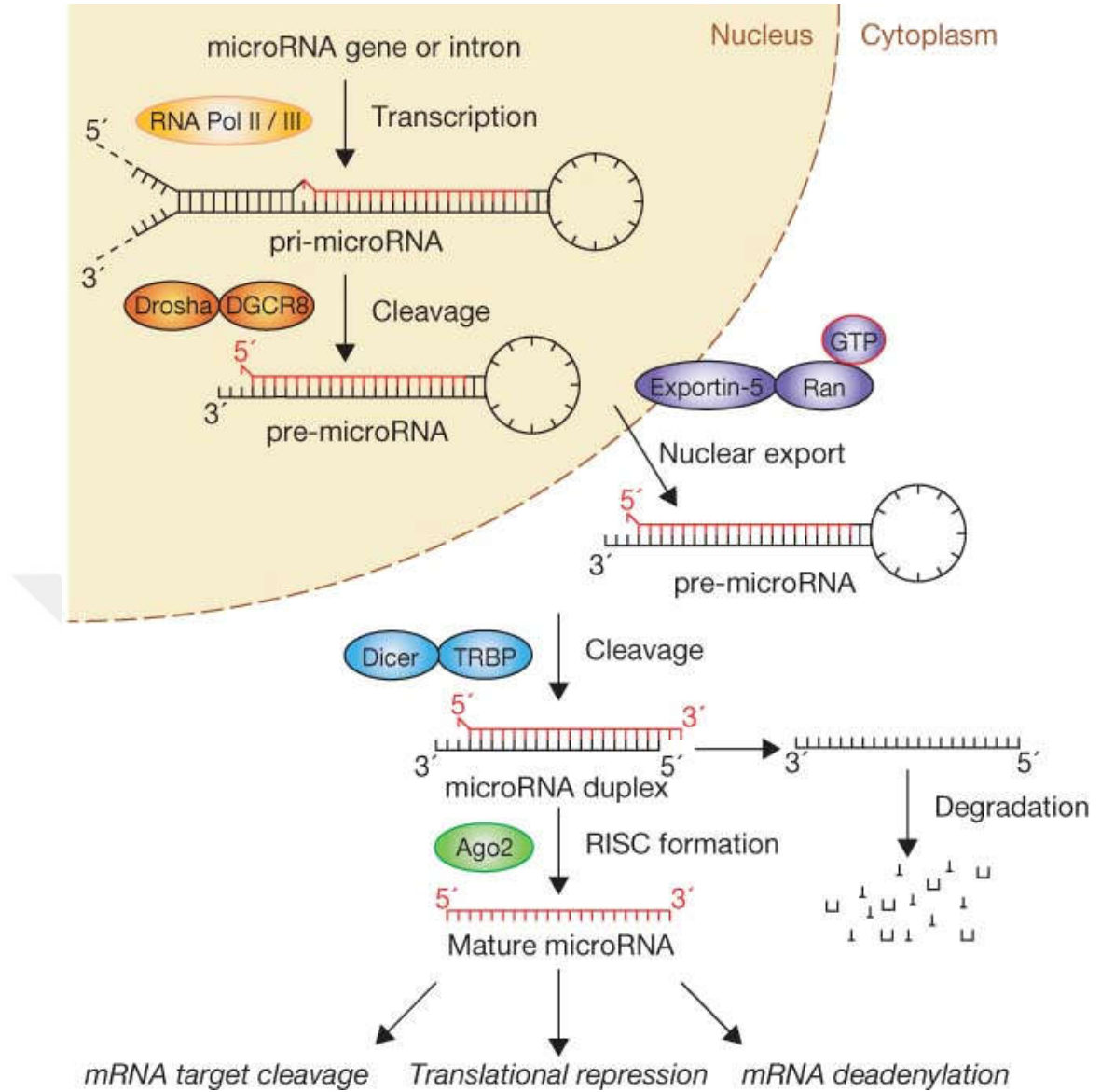
Ekspörtin 5 (XPO5), nükleositoloplazmik transport faktörlerinden karyoferin ailesinin bir üyesidir. Fonksiyonu için bir GTPaz olan kofaktörü Ran'a ihtiyacı vardır. XPO5 nükleusta pre-miRNA'ya ve GTP bağılı Ran'a kooperatif olarak bağlanır ve ardından stoplazmada GTP'nin hidrolizi ile pre-miRNA'yı serbest bırakır. XPO5'in knockdown deneylerinde pre-miRNA ekspresyonunda fazla bir değişme gözlenmezken, matür miRNA ekspresyon seviyelerinde belirgin azalma ve nükleusta pre-miRNA birikimi görülmüştür.

Pre-miRNA'lar stoplazmaya geçişinin ardından stoplazmik RNaz III enzimi olan **Dicer** ve Trans-aktivatör RNA (tar)- bağlayıcı protein (TRBP) tarafından ~22nt uzunluğundaki 2-nt 3' çıkıntısına sahip miRNA dublekslerine kırılır.

Dicer, miRNA dubleksindeki her bir miRNA zincirini birbirinden bağımsız olarak keserek 2-nt 3' çıkıntı oluşturan 2 adet RNaz domeni içerir. Kesimin ardından dubleksin iki zinciri Dicer tarafından ayrılır ve 5' ucu daha instabil olan zincir matür miRNA olarak kalır. (Memeli hücreleri tek bir Dicer proteini içerir. Dicer bir ATPaz/RNA helikaz domeni, bir DUF domeni (farklı bir dsRBD), bir PAZ domeni (nükleik asit bağlayıcı domeni), iki RNaz III domeni ve bir dsRBD içerir).

Dicer, TRBP ve Argonaut (Ago) ailesi gibi birçok farklı proteinle ilişkilidir. TRBP Dicer'a bağlanır ve konformasyonel düzenleme ile onu aktifleştirir. Dicer/ TRBP kesiminin ardından, ~22nt RNA dublexi efektör kompleks olan RISC'i oluşturmak üzere Argonaut (Ago) proteinlerine bağlanır (Melo 2014).

RISC (RNA ile indüklenmiş susturma kompleksi) esas olarak Ago, PACT (protein kinaz R-aktive edici protein), TRBP ve siRNA/miRNA'dan oluşmaktadır. miRNA dubleksine bağılı Ago kompleksi pre-RISC olarak adlandırılırken, tek zincir uzaklaştırıldıktan sonra kılavuz zinciri içeren kompleks matür RISC olarak adlandırılır (Kawamata 2010). Matür RISC yapısındaki miRNA zinciri rastgele seçilmemektedir. miRNA dubleksinde, 5' ucunda daha düşük termodinamik stabiliteye sahip zincir kılavuz zincir olarak kalırken diğer zincir yıkılmaktadır (Khvorova 2003). RISC kompleksi kılavuz zincir aracılığıyla hedef mRNA'ya bağlanarak mRNA yıkımına ya da translasyon baskılanmasına neden olur. Bu bağlanmada eğer miRNA ile mRNA arasında tam komplementer eşleşme olursa mRNA yıkılırken kısmi bir eşleşme olursa mRNA'nın translasyonu baskılanmaktadır (Cannell 2008). Standart miRNA yolağı şekilde gösterilmektedir (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Standart miRNA biyosentez yolağı (Winter 2009)

2.1.3.2. Standart Dışı miRNA'lar

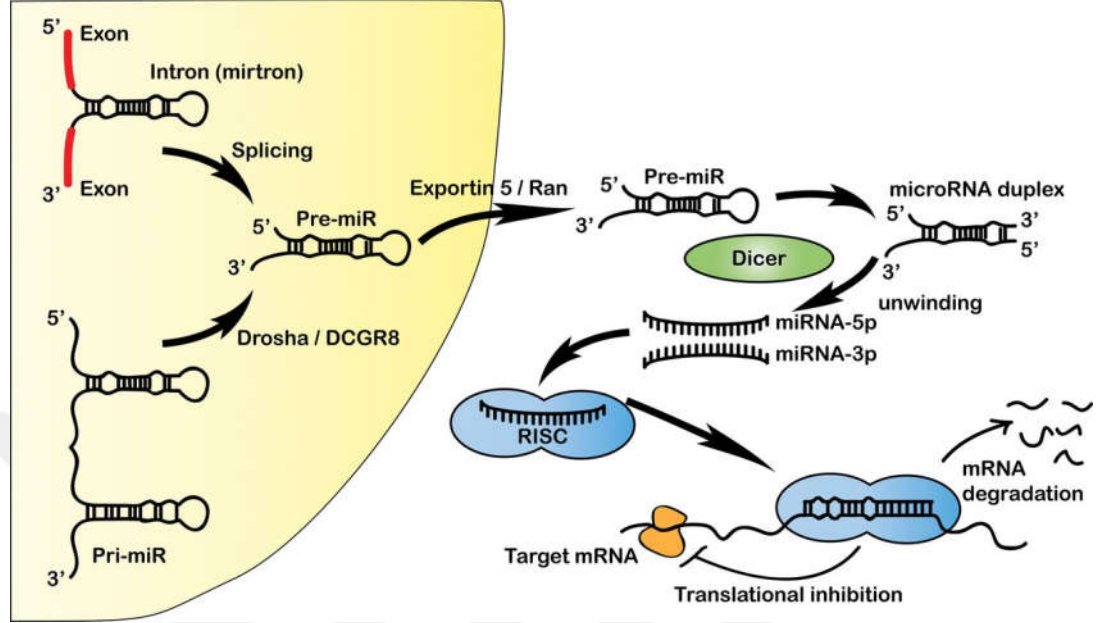
Standart dışı miRNA'lar yapısal ve fonksiyonel olarak standart miRNA'lara benzeyen, ancak matürasyonu sırasında standart miRNA sentez yolağındaki bir veya daha fazla basamağı atlayan miRNA'lardır. İntron, snoRNA (small nücleolar RNA), endojen shRNA (small hairpin RNA) ve tRNA'lardan üretilebilirler (Abdelfattah 2014).

Drosha/DGCR8 Bağımsız Yolak

Bu yolakla intron (mirtron), snoRNA, endojen shRNA ve tRNA'lardan miRNA üretilebilir.

Mirtronlar pre-miRNA boyutundaki küçük intronlardır. Splisozom ve debranching enzimlerle çekirdekte işlenerek direkt Dicer kesimine uygun miRNA firkete yapısı

oluşturarak Exportin 5 ile stoplazmaya taşınırlar. Sonraki işlemler standart yolakla aynıdır (Okamura 2007). Mirtron yolağı aşağıdaki şekilde sunulmaktadır (Şekil 3.3).

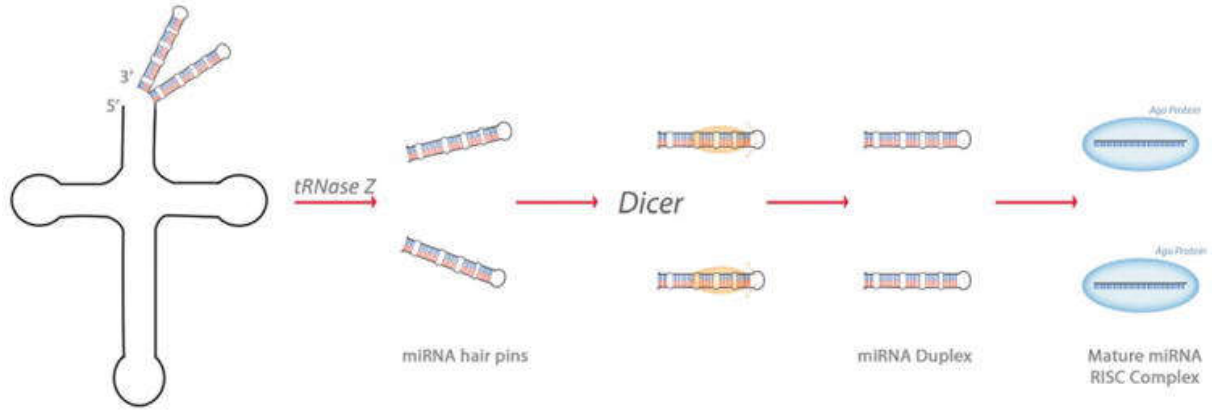


Şekil 2.3. Mirtron yolağı (Goljanek-Whysall 2012)

SnoRNA kaynaklı miRNA'lar standart dışı miRNA'ların bir diğer kaynağıdır. Yapılan çalışmalarda insan snoRNA'sı ACA45 ve Giardia lamblia snoRNA'sı GlsR172'nin Droscha/DGRC8 bağımsız, Dicer bağımlı bir şekilde miRNA ürettiği görülmüştür (Ender 2008, Saraiya 2008).

Endojen kısa firkete RNA (small-hairpin RNA; shRNA) kaynaklı miRNA'lar için mir-320 ve mir 484 örnek olarak verilebilir. Bu miRNA'ların transkriptleri firkete yapısı oluşturdukları için bu şekilde isimlendirilmişlerdir. Standart miRNA'larda pre-miRNA firkete yapısına komşu pozisyondaki dizi mikropressör kompleks tarafından tanınırken, shRNA kaynaklı miRNA'lar mikropressör kompleksin bağlanacağı bu diziden yoksundur. Bu durum shRNA'yı Dicer kesimine uygun hale getiren ek mekanizmaların varlığını akla getirmektedir (Babiarz 2008).

tRNA kaynaklı miRNA'ların tRNA matürasyon yolağında oluşan yan ürünler olduğu düşünülmekte olup tipik memeli miRNA'larından farklı olan bu ürünlerin RNA susturulmasındaki fonksiyonu tam olarak aydınlatılamamıştır (Abdelfattah 2014). tRNaz Z- bağımlı yolak aşağıdaki şekilde sunulmaktadır (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. tRNAse Z- bağımlı yolak (Abdelfattah 2014)

Dicer Bağımsız Yolak

Diğer miRNA'ların aksine yapılan çalışmalarda miR-451'in mikropressör kompleks tarafından, Dicer'in etki edemeyeceği kadar kısa (~18 nt uzunluğunda) kesilerek Dicer'dan bağımsız olarak sentezlendiği gösterilmiştir. Bu kesimin ardından miR-451 ya direkt Ago1'e bağlanabilmekte, ya da bilinmeyen bir endonükleaz ile kırıldıktan sonra Ago2'ye bağlanarak RISC kompleksine katılmaktadır (Cifuentes 2010).

İnsan mirtronlarından miR-1225 ve miR-1228'in splicing-bağımsız mirtron benzeri miRNA (splicing-independent mirtron-like miRNA; simtron) olduğu bulunmuştur. Simtronların Drosha bağımlı, DGCR8, Dicer, Exportin-5 veya Ago bağımsız olarak sentezlendiği görülmüştür (Havens 2012).

2.1.4. miRNA'ların Etki Mekanizmaları

miRNA'lar hedef mRNA'nın 3' translasyona uğramayan kısmındaki (3' UTR) tamamlayıcı bölgesine bağlanarak translasyonel düzeyde gen ifadesini düzenlerler (Lagos-Quintana 2001).

2.1.4.1. Translasyon İnhibisyonu

Başlangıç Evresinde Translasyon İnhibisyonu

miRNA'lar translasyon başlangıcında mRNA'nın 5' cap yapısının tanınmasına etki edip matür ribozomal kompleks oluşumunu inhibe ederek ya da 60 S ve 40 S ribozomal alt

ünitelerinin birleşmesini engelleyerek translasyonu inhibe edebilirler (Thermann 2007, Mathonnet 2007).

Başlangıç Sonrası Evrede Translasyon İnhibisyonu

Bu aşamada miRNA'lar translasyon elongasyonunu inhibe edebildiği gibi oluşmakta olan polipeptidin translasyonla eşzamanlı olarak yıkılmasına neden olabilir ya da ribozomların hedef mRNA'dan prematür ayrışmasını indükleyebilirler (Maroney 2006, Nottrott 2006, Petersen 2006).

Hedef mRNA'nın Deadenilasyonu ve/veya Yıkımı ile Translasyon İnhibisyonu

miRNA'ların hedef mRNA ile tam komplementer eşleşmesi direkt olarak mRNA'nın endonükleolitik yıkımı ile sonuçlanırken parsiyel eşleşme hedef mRNA'nın direkt yıkımına neden olmaz. Bu durumda miRNA susturma mekanizması hedef mRNA'yı deadenilasyon ve ardından dekapetaj ile hücrel bozulma yolağına yönlendirir (Bagga 2005, Eulalio 2009).

2.1.4.2. Translasyon Aktivasyonu

Son yıllarda yapılan çalışmalarda miRNA'ların translasyonu aktive ederek gen ifadesini arttırdığı gözlemlenmiştir (Vasudevan 2007).

Bu mekanizmalar dışında miRNA'ların promotor bölgelere bağlanmak suretiyle transkripsiyonel düzeyde de gen ifadesini etkilediğini tespit eden çalışmalar bulunmaktadır (Place 2008).

2.1.5. miRNA'ların Fonksiyonları

miRNA'lar hayvanlarda gelişim süresince hücre kaderinin belirlenmesi, proliferasyon ve hücre ölümü gibi birçok hayati süreçte düzenleyici olarak rol almaktadır. Bunların yanı sıra miRNA'lar immün yanıt, insülin sekresyonu, nörotransmitter sentezi, sirkadiyen ritim ve viral replikasyon gibi birçok fonksiyonda görev almaktadır.

miRNA'lar zaman (örn. let-7) ve doku (örn. beyin spesifik miR-134) spesifik ekspresyon paterni gösterir. Beyin spesifik MiR-134 sinaptik gelişim ve plastisite için gerekli iken, miR-1 kardiyogenez için gereklidir. MiR-203 deri farklılaşması, miR-155 normal immün fonsiyon, miR-150 B-hücre farklılaşması, miR-375 insülin sekresyonu için gerekli miRNA'lardır (Melo 2014). Bu örnekler miRNA fonksiyonlarının yalnızca küçük bir kısmını oluşturmaktadır.

2.1.6. miRNA Ekspresyonunun Düzenlenmesi

miRNA ekspresyonu, genin transkripsiyon aşamasından başlayarak matürasyon sürecinin her aşamasında çeşitli faktörler tarafından düzenlenmektedir. miRNA'lar direkt olarak kendi biyogenezi veya fonksiyonuna katılan proteinleri kodlayan mRNA'ları da hedef aldıkları için, kendi regülasyonunu düzenleyen geri-besleme (feedback) mekanizmalarını da oluşturmaktadır.

Transkripsiyon basamağında miRNA ekspresyonunun düzenlenmesi: miRNA gen promotorları birçok yönden protein kodlayıcı gen promotorlarına benzemektedir (CpG adalarının varlığı, TATA kutusu, TFIIB tanınması, başlatıcı elementler ve histon modifikasyonları gibi) ve aynı ekspresyon kontrol mekanizmaları her ikisi için de geçerlidir. miRNA genleri RNA polimeraz I ve II tarafından transkribe edilebilir. Her iki polimeraz da birbirinden farklı şekilde regüle edilir, kendilerine spesifik promotor ve sonlandırıcı elementleri tanırlar. Birçok miRNA genomda kümeler halinde kodlanmıştır. Bunlar uzun polisistronik primer transkript olarak ya da birbirinden bağımsız şekilde transkribe edilip düzenlenebilirler.

miRNA genleri ayrıca p53, c-myc gibi transkripsiyon faktörleri ile düzenlenen DNA-bağlama faktörleri içerir. Tümör süpresör p53 miRNA-34 ailesini aktive ederken, onkojenik protein c-myc, hücre siklusu ve apoptoza katılan bir dizi miRNA'yı transaktive veya represe eder.

Epigenetik kontrol de miRNA gen promotorlarındaki CpG adalarının metilasyonu aracılığıyla miRNA transkripsiyonunu susturarak regülasyonuna katkıda bulunur. miRNA promotorları ayrıca histon modifikasyonları ile de regüle edilir (Melo 2014).

2.1.7. miRNA Ekspresyon Disregülasyonu

miRNA biyosentezinin disregülasyonu başta kanser olmak üzere birçok patolojik durumla ilişkili bulunmuştur. Bu konuda yapılan çalışmalara verilebilecek bazı örnekler şu şekildedir;

miRNA- kanser ilişkisi: Kanser gelişimi ve prognozunda miRNA'lar birçok basamakta rol almaktadır. Örneğin let-7 ailesi; apoptoz (Tsang 2008), RAS genleri (Johnson 2005), c-Myc (Kim 2009) üzerindeki düzenleyici fonksiyonlarla kanser gelişiminde önemlidir. Let-7 ailesi üyelerinin akciğer kanseri (Dou 2015), over (Langhe 2015), mide (Liu 2015) kanseri dahil daha bir çok kanser türü ile ilişkili olduğu

gösterilmiştir. MiR-16'nın; pituiter tümörde miR-132 ve miR-15a ile birlikte Sox-5'i hedef olarak hücre proliferasyonu, invazyon ve migrasyonu bloke ettiği gösterilmiştir (Renjie 2015) Ayrıca hepato-selüler karsinomda (HCC) (El-Tawdi 2016), oral kanser veya yüksek dereceli lezyonlarda (MacLellan 2012), meme kanserinde (Hu 2012) ve osteosarkom (Li 2015) hastalarında kontrol grubu ile kıyaslandığında ekspresyonunun belirgin şekilde farklı olduğu bulunmuştur. MiR-125 ailesi; transkripsiyon faktörleri (Liu 2011), matriks metalloproteazları (Xu 2012) gibi kanser oluşumunda etkili bazı genleri hedef almaktadırlar. Over (Guan 2011), HCC (Jia 2012), osteosarkom (Liu 2011) ve diğer bazı kanserlerde tümör süpresör etkileri gösterilmiştir. Bu örnekler dışında miR-210, miR-221, miR- 375 ve daha pek çok miRNA'nın ekspresyon seviyesi ile çeşitli kanser türleri arasındaki bağlantıları gösteren çok sayıda çalışma mevcuttur (Larrea 2016).

miRNA- osteoporoz ilişkisi: Cao ve ark. (2014) yaptığı çalışmada, MiR-422a'yı düşük kemik mineral dansiteli hastalarda up-regüle bulmuştur. MiR-21 östrojen yetersizliğine bağlı gelişen osteoporozda down-regüle olarak bulunmuştur (Yang 2013). Osteoporotik kalça kırığı olan post-menopozal kadınlarda yapılan bir diğer çalışmada da miR-122-5p, miR-125b- 5p, ve miR-21-5p seviyeleri kontrol grubuna göre belirgin şekilde up-regüle bulunmuştur (Panach 2015).

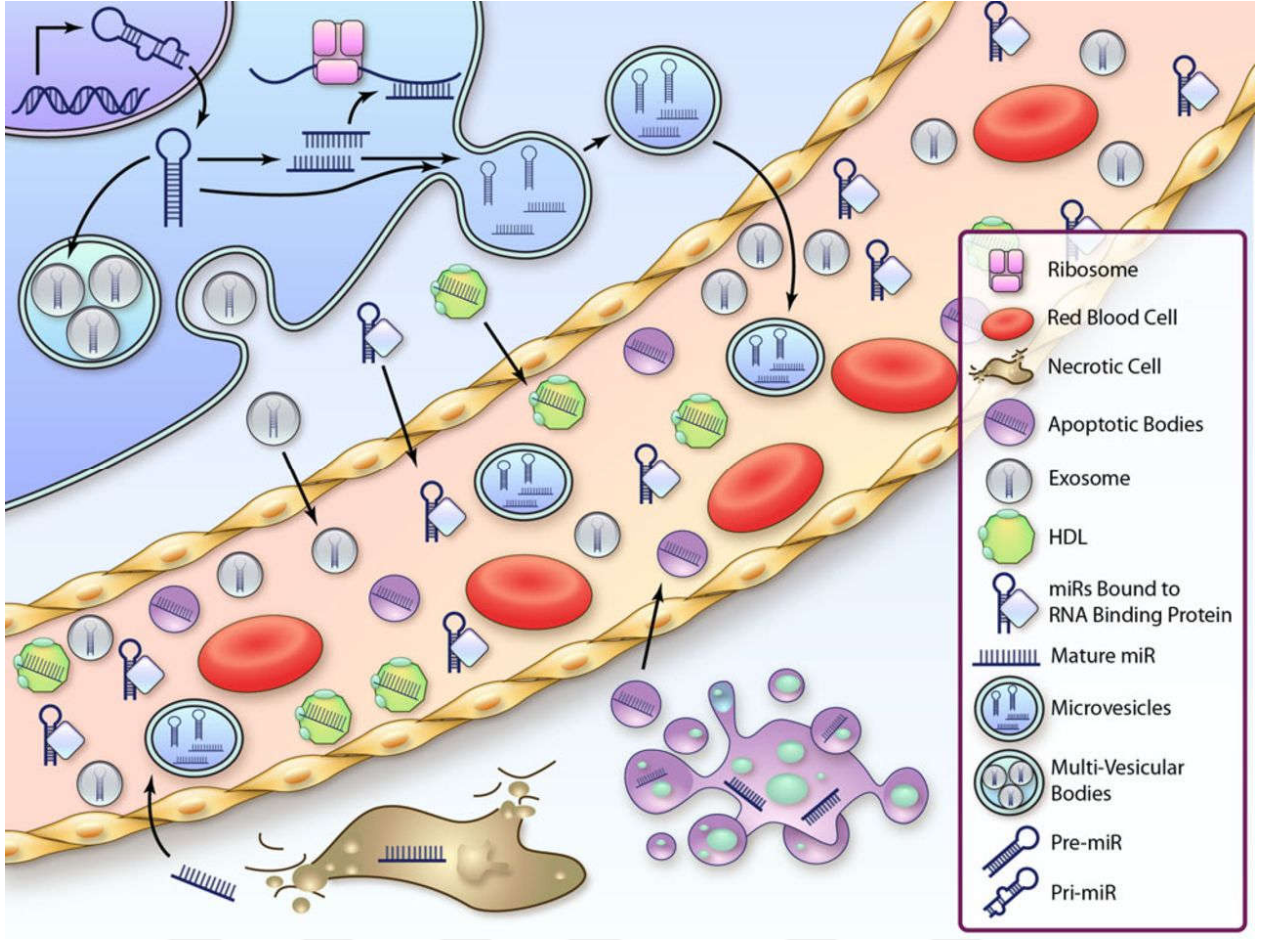
miRNA- nörodejeneratif hastalık ilişkisi: Yapılan çalışmalarda miRNA'ların Parkinson, Alzheimer ve Huntington hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıklardaki ekspresyon seviyeleri araştırılmıştır. **Parkinson hastalığında;** Ding ve ark. (2016) yaptığı çalışmada miR-195 ekspresyonunun kontrol grubuna göre up-regüle, miR-185, miR-15b, miR-181a ve miR-221 seviyelerinin ise kontrol grubuna göre down-regüle olduğunu bulmuştur. Gui ve ark (2015) yaptıkları çalışmada da miR-153, miR-409-3p, miR-10a-5p, ve let-7g-3p'nin parkinson hastalarının serebrospinal sıvı eksozomlarında aşırı derecede eksprese edildiği tespit edilmiştir. **Alzheimer hastalığında;** miR-223 ekspresyonunun kontrol grubuna göre belirgin şekilde düşük olduğu ve mini mental durum değerlendirmesi (MMSE) skoru ile güçlü pozitif korelasyon gösterdiği bulunmuştur (Jia 2016). Sørensen ve ark. (2016) yaptıkları çalışmada da Alzheimer hastalarının serebrospinal sıvısında let-7i-5p ve miR-15a-5p kontrol grubuna göre belirgin ölçüde arttığı, miR-29c-3p'nin ise azaldığı; kan örneklerinde miR-590-5p ve miR-142-5p artarken, miR-194-5p'nin belirgin şekilde azaldığı gösterilmiştir. **Huntington hastalığında;** plazma miR-34-p seviyesinin mutant HTT taşıyıcılarında semptomlar başlamadan önce belirgin derecede yükseldiği gösterilmiştir (Gaughwin 2011).

miRNA- kardiyovasküler hastalık ilişkisi: MiR-208'in stres bağımlı kardiyomiyosit büyümesi ve gen ekspresyonunu düzenlediği gösterilmiştir (Van Rooij 2007). Esas olarak vasküler düz kas hücrelerinden eksprese edilen miR-145'in de esansiyel hipertansiyon (Kontaraki 2014), ateroskleroz (Zhang 2016) ve koroner arter hastalığı (Fichtlscherer 2010) gibi birçok patolojik süreç ile ilişkili olduğu gösterilmiştir.

2.1.8. Ekstraselüler miRNA'lar

Son yıllarda yapılan çalışmalarda ekstraselüler miRNA'ların hücreler arası iletişimdeki önemi gösterilmiştir (Hu 2010, Kosaka 2010a, Bala 2012) Ayrıca genetik bilginin hücreler arası aktarımındaki rolü sorgulanmaktadır. miRNA'ların hücre dışına çıkışı ve dolaşımında RNaz yıkımından kurtulup stabil kalabilmesi ile ilişkili çeşitli mekanizmalar gösterilmiştir. miRNA'lar eksozom ve mikroveziküller gibi ekstraselüler veziküller aracılığıyla membranla çevrili olarak hücreden sekrete edilebilir, argonaut 2 (AGO2) gibi RNA-bağlayıcı proteinlerle, yüksek dansiteli lipoprotein (HDL) ve düşük dansiteli lipoprotein (LDL) gibi lipoproteinlerle kompleks oluşturarak hücreden aktif olarak salınabilir ya da apoptotik/nekrotik hücrelerden pasif olarak salınabilirler (Valadi 2007, Zernecke 2009, Arroyo 2011, Vickers 2011).

miRNA'lar dolaşım sisteminin yanı sıra tükürük, serebrospinal sıvı, idrar, gözyaşı, seminal sıvı ve anne sütü gibi diğer biyolojik sıvılarda da tespit edilmiştir (Weber 2010). Dolaşımdaki miRNA'ların tahmini kaynakları şekil 2.5'te şematize edilmiştir (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Dolaşımdaki miRNA'ların tahmini kaynakları (Kumarswamy 2013)

2.2. miRNA ve Anne Sütü

Yenidoğanda yeterli büyüme ve gelişme için gerekli olan tüm sıvı, kalori ve besinsel öğeleri içeren, bebeklerin zihinsel gelişimlerini olumlu yönde etkileyen ve enfeksiyonlardan korunmasına yardımcı olan anne sütü, miRNA içeriği açısından çok zengindir. Bu miRNA'lar insan anne sütünün içinde eksozomlar içinde paketlenmiştir. (Fourth World Conference on Women 1995, Zhou 2012).

Anne sütünün içeriği laktasyon süresince değişiklik gösterir. Emzirme, erken doğum, laktasyon evresi, bebeğin cinsiyeti, maternal vücut kitle indeksi, parite ve anne ile bebeğin sağlık durumu gibi faktörler süt içeriğini etkilemektedir (Molinari 2013, Mitoulas 2002, Hassiotou 2013a, Hassiotou 2013b, Powe 2010, Bachour 2012, Bauer 2011). Benzer şekilde anne sütünün miRNA içeriğinin de parite, erken doğum, bebeğin özellikleri veya anne beslenmesi gibi faktörlere bağlı olarak değişiklik gösterdiği çeşitli araştırmalarla ortaya konmuştur (Kosaka 2010b, Zhang 2012, Baier 2014, Alsaweed 2015c).

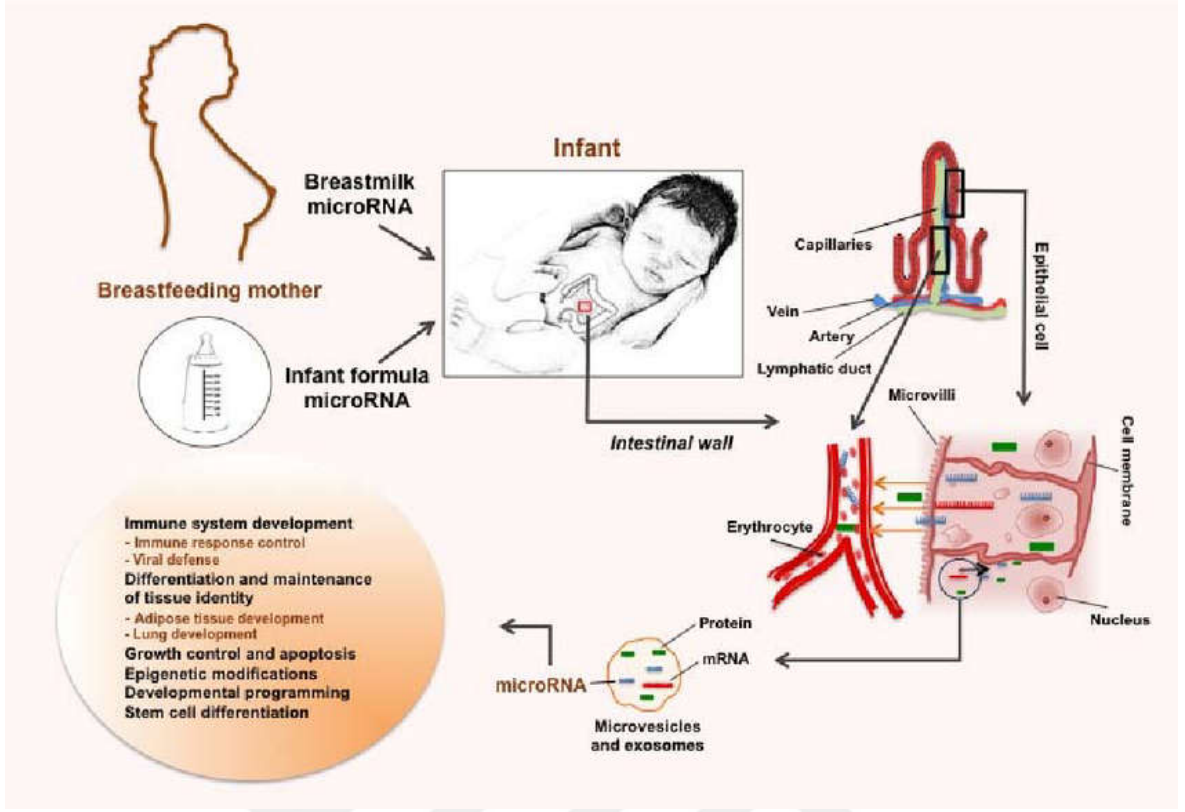
Süt santrifüj ile fraksiyonlarına ayrıldığında en üstte yer alan lipid kısım, süt plazması olarak da adlandırılan lipid altı kısım ve en altta yer alan hücresel kısımlarının her üçü de miRNA içermektedir. Literatürde lipid altı kısmının lipid ve hücresel kısma göre daha düşük miktarda miRNA içerdiği belirtilmektedir (Alsaweed 2015b).

Süt veren ve vermeyen ineklerin meme bezindeki miRNA'ların incelendiği hayvan deneylerinde, miRNA tiplerinin ve ekspresyon seviyelerinin farklılık gösterdiği tespit edilmiştir (Li 2012). Fareler üzerinde yapılan bir araştırmada ise miRNA'ların meme bezlerinin gelişmesinde rol aldığı gösterilmiştir (Avril-Sassen 2009). Süt miRNA'larının da temel olarak süt bezleri tarafından sekrete edildiği, az bir kısmınınsa maternal dolaşımdan geçiş yaptığı düşünülmektedir (Alsaweed 2016). Bu nedenle laktasyon sırasında memenin sağlık durumunun tespiti veya meme kanseri gibi patolojilerin erken saptanabilmesi için süt miRNA'larının biyomarker olarak kullanılabilceği düşünülmektedir.

Süt bezlerinde immünite ilişkili fonksiyona sahip ve ekspresyon paterni laktasyon süresince farklılıklar gösteren miRNA'lar tespit edilmiştir. Mastitte, streptococcus uberis'in neden olduğu inflamatuvar yanıt, muhtemelen doğal bağışıklığı düzenleyen miRNA'ların ekspresyonunu değiştirmektedir (Naeem 2012, Lawless 2013).

Zhou ve ark.(2012) yaptığı çalışmada iyi karakterize edilmiş 87 immünite ilişkili pre-miRNA'dan 59 tanesi (%67.82) anne sütündeki eksozomlarda tespit edilmiştir. Çalışmada bu miRNA'ların süt içerisinde bebeğe aktararak immünitesine katkıda bulunduğu belirtilmektedir.

Baier ve ark. (2014) yaptıkları çalışmada inek sütü tüketen 5 yetişkin insanda, inek sütünde yer alan miRNA'ların (miR-29b ve miR-200c) kan seviyelerinin süt tüketimi sonrası arttığı buna ek olarak miR-29b'nin hedefi olan RUNX2 (Runt-related transkripsiyon faktörü 2) ekspresyonunun kan mononükleer hücrelerinde yine süt tüketiminden sonra arttığı gösterilmiştir.



Şekil 2.6. Bebeğin eksojen mikroRNA kaynaklarını ve bebeğin gastrointestinal (GI) sistemindeki alımını gösteren tahmini senaryo (Alsaweed 2015a)

Anne sütü mikroRNA'ları yağsız sütte serbest moleküller olarak veya süt hücreleri, ekzozomlar ve diğer süt mikroveziküllerinin alınması yoluyla bebeğe aktarılabilir. Bağırsak epitel hücreleri tarafından emilen süt miRNA'larının etki edeceği doku ve organlara kan dolaşımı ile taşındığı düşünülmektedir (Alsaweed 2015a).

2.3. Kodlamayan RNA'lar ve RNA İnterferansı

Kodlamayan (non-coding) RNA'lar (ncRNA) proteine çevrilmeyen RNA molekülleridir. 200 nükleotidden uzun olan ncRNA'lar uzun kodlamayan RNA (long non-coding RNA; lncRNA) olarak sınıflandırılırken, 200 nükleotidden kısa olan ncRNA'lar ise kısa/küçük kodlamayan RNA (small/short non-coding RNA) olarak kabul edilmektedir. Uzun ve kısa kodlamayan RNA'ların çeşitli subtipleri bulunmaktadır (Tablo 1). Bunların çoğu gen ekspresyonunun regülasyonunda yer almakta olup, genomik orijinleri ve biyogenetik süreçlerine göre daha ileri sınıflara ayrılabilirler (Peschansky 2014).

Tablo 2.1. Kodlamayan RNA'ların bazı örnekleri

Kodlamayan RNA	Uzunluk (nt)	Türler	Fonksiyon
Ribozomal RNA (rRNA)	120-4700	Tüm canlılar	Translasyon
Transfer RNA (tRNA)	70-100	Tüm canlılar	Translasyon
Küçük nüklear RNA (snRNA)	70-350	Ökaryot	Uç birleştirme (splicing), mRNA işlenmesi
Küçük nükleolar RNA (snoRNA)	70-300	Ökaryot, arkea	RNA modifikasyonu, rRNA işlenmesi
miRNA	21-25	Ökaryot	Translasyonel regülasyon
siRNA	Küçük ncRNA 21-25	Ökaryot	Tekrarlayan enfeksiyonlara karşı koruma
piRNA	24-30	Ökaryot	Genom stabilizasyonu
Uzun kodlamayan RNA	Birkaç yüz- birkaç yüzbin	Ökaryot	Transkripsiyon, uçbirleştirme, transport regülasyonu

Kaynak: <http://ruo.mbl.co.jp/bio/e/product/epigenetics/RNAworld.html>.

RNA interferansı (RNAi), posttranskripsiyonel gen susturulması olarak da bilinen çift zincirli RNA'ya (double stranded RNA; dsRNA) karşı korunmuş biyolojik yanıttır. RNAi protein kodlayıcı genlerin ekspresyonunu düzenler. RNAi ayrıca gen ekspresyonunu deneysel olarak değiştirmek ve gen fonksiyonlarını araştırmak için kullanılmıştır (Hannon 2002). RNAi birçok deneysel organizmada spesifik genlerinin ekspresyonunun kontrolü için kullanılmıştır. Ayrıca problemlili gen ekspresyonunu azaltmak için tedavide kullanılma potansiyeli vardır (Mello 2004).

1998 yılında bir solucan (nematod) olan *C. elegans* dsRNA'ya karşı gelişmiş sekans spesifik gen susturulması gösterilmesiyle (Fire 1998) RNAi araştırmaları hız kazanmıştır. RNAi, dsRNA'nın *C. elegans* gonadı içine direkt enjeksiyonu ya da dsRNA'nın kendisinin veya dsRNA'yı eksprese etmek üzere geliştirilmiş bakterinin yenilmesi ile provake edilebilmektedir (Timmons 1998). Bazı organizmalarda, RNAi sinyalleri hücreler arasında horizontal olarak ya da bir jenerasyondan diğerine vertikal olarak aktarılabilir (Mello 2004).

LncRNA, miRNA, siRNA, piRNA, snoRNA ve snRNA'lar RNA interferansına katılan moleküllerden bazılarıdır.

2.3.1. Uzun kodlamayan RNA'lar (long non-coding RNA; lncRNA)

LncRNA'lar protein kodlamayan, 200 nükleotidden uzun RNA molekülleridir (Mercer 2009). Bazı lncRNA'lar hücrelerin genel veya diferansiyasyon-spesifik biyolojik süreçlerinde rol oynarlar. Örneğin: 7S RNA, protein eksportuna katılan tanıma partikülünün temel bileşenidir (Walter 1982); nükleer-lokale MALAT-1, alternatif uçbirleştirme (splicing) ve hücre siklusunun ilerlemesini düzenler (Tripathi 2013); Gomafu, purkinje hücrelerinin nükleuslarında bipolar yapılarla ilişkili tam olarak bilinmeyen fonksiyonları bulunmakta olup (Mercer 2008) son zamanlarda şizofreni ile ilişkilendirilmiştir (Barry 2014).

2.3.2. Küçük Nükleer / Spliseozomal RNA'lar

Küçük nükleer RNA'lar (small nuclear RNA; snRNA) nükleusta ribonükleoprotein komplekslerinde yer alırlar ve RNA uç birleştirmesinde merkezi role sahiptirler (Butcher 2005). Bu nedenle spliseozomal RNA olarak tanımlanmışlardır.

2.3.3. Küçük Nükleolar RNA'lar

Küçük nükleolar RNA'lar (small nucleolar RNA; snoRNA) birçok organizmanın nükleolusunda Ago ile bağlı şekilde bulunmakta olup mRNA stabilizasyonu ve translasyon aşamalarında gen ekspresyonunu interfere edebilmektedir (Matera 2007).

SnoRNA'lar C/D box ya da H/ACA box alt-motiflerinin varlığına göre iki alt gruba ayrılmaktadır. C/D box snoRNA'lar 2'-O-metilasyondan sorumlu iken H/ACA box snoRNA'lar rRNA hedeflerinin psödoüridilasyonundan sorumludurlar (Matera 2007).

2.3.4. Piwi ilişkili RNA'lar

Piwi ilişkili RNA'lar (piRNA), ~24-32 nt uzunluğunda, Argonaute protein ailesinin bir üyesi olan PIWI alt grubu ile ilişkili RNA molekülleridir (Ishizu 2012).

PiRNA'lar germ hücrelerinde epigenetik ve post-transkripsiyonel olarak transpozon susturulmasında etkilidirler (Aravin 2007) PiRNA fonksiyon kaybı hayvanlarda gametogenez defekti ve steriliteye neden olmuştur. PiRNA'lar daha önceleri germline-spesifik olarak kabul edilirken, son çalışmalarda non-gonadal hücrelerde de çok önemli rollere sahip oldukları gösterilmiştir (Ishizu 2012).

2.3.5. Küçük İnterfere Edici RNA'lar

Küçük interfere edici RNA'lar (small interfering RNA; siRNA) endojen veya eksojen kaynaklı uzun dsDNA'nın Dicer tarafından stoplazmada 21-23 nükleotid uzunluğunda çift zincirli RNA birimlerine kırılması ile oluşmaktadır. SiRNA, RISC ile etkileşerek onu aktive eder. RISC kompleksinde yer alan Argonaute (AGO2) siRNA'nın yolcu (passenger) zincirini uzaklaştırırken kılavuz (guide) zinciri RISC ile etkileşimde kalır ve kompleksi hedef mRNA'ya yönlendirir. SiRNA hedef mRNA'ya tam komplementer olarak bağlanarak RISC tarafından spesifik olarak susturulmasını sağlar (Agrawal 2003, Pecot 2011, Lam 2015).

2.4. Bitkisel miRNA'lar

Çalışmamızda plazma ve anne sütünde varlığını araştırdığımız besinsel miRNA'lara ilişkin bilgiye bu bölümde yer verilmiştir;

Sly-miR156a domatesin gelişimi, sinyalizasyon ve metabolizmasını düzenleyen transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonunu modüle ettiği tespit edilmiştir (Valiollahi 2014).

miR-156'nin aşırı eksprese edildiği transgenik domateslerde bitki boyunun kısaldığı, meyve boyutunun küçüldüğü ve yaprak sayısının artarken yaprak boyutunun küçüldüğü görülmüştür (Zhang 2011a).

Sly-miR169 domatesin kuraklığa karşı direncinde etkilidir. Kuraklık durumunda ekspresyon miktarı artış gösterir. Sly-miR169c'nin aşırı eksprese edildiği transgenik domateslerin kuraklığa karşı daha dayanıklı olduğu gösterilmiştir (Zhang 2011b).

Gma-miR156b ve **gma-miR1520d** ekspresyon seviyelerinin farklı durumlarda stabil kaldığı tespit edilmiştir. Bu miRNA'lar soya miRNA analizleri için referans olarak kullanılabilir (Kulcheski 2010).

Tae-miR167'nin buğdayda auxin-sinyal yolağının düzenlenmesinde ve soğuğa karşı gelişimsel cevapta (erkek kısırlığı) görevli olduğu gösterilmiştir (Tang 2012).

Tae-miR159 buğday anter gelişiminin düzenlenmesine katılmaktadır (Bai 2017).

Pirinç osa-miR168a ve **osa-miR156a** Zhang ve ark.(2012) yaptığı çalışmada insan serumunda tespit edilmiştir. Ayrıca yapılan in vitro ve in vivo çalışmalarda, osa-miR

168a'nın insan/fare düşük dansiteli lipoprotein reseptör adaptör protein 1(LDLRAP1) mRNA'sına bağlanarak, karaciğerde LDLRAP1 ekspresyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir.

Mdm-miR858, mdm-miR 171i, mdm-miR7121ve mdm-miR399a elmada yüksek oranda eksprese edilmektedir (Shao 2014).

Son yıllarda miRNA'ların türler arası geçişi ve etkisine ilişkin araştırmalar yapılmaktadır. Memeli hücrelerinde bitkisel miRNA'ların da memeli miRNA'ları ile benzer fonksiyona sahip olduğu düşünülmektedir (Witzany 2012).

Yapılan in vitro ve in vivo çalışmalarda, pirinç kaynaklı MIR 168a'nın insan/fare LDLRAP1 mRNA'sına bağlanabildiği, karaciğerde LDLRAP1 ekspresyonunu inhibe ederek fare plazmasından LDL'nin uzaklaştırılmasını azalttığı gösterilmiştir (Zhang 2012).

Yapılan bir diğer çalışmada ise insan sütü örneklerinin yüksek seviyelerde ath-miR166a, pab-miR951, ptc-miR472a ve bdi-miR168 içerdiği, domuz meme sütü eksozomlarının da yüksek miktarda zma-miR168a, zma-miR156a ve ath-miR166a içerdiği tespit edilmiştir. Zhang ve ark. (2012) yaptıkları, insan serumunda besinsel miRNA çalışmasıyla uyumlu olarak; anne sütünde de MIR166a, MIR168a, MIR167d ve MIR156a benzer şekilde yüksek tespit edilmiştir (Lukasik 2014).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

Çalışma Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi İlaç ve Tıbbi Cihazlar Dışı Araştırmalar Etik Kurulu'nun 06.11.2015 tarihli ve 2015/342 sayılı kararınca onaylanmıştır.

3.1.1. Hastaların seçimi

Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Hastanesi Jinekoloji polikliniğine kontrol amacı ile başvurmuş, laktasyonunun 1- 12 ayları arasında olan ve günlük diyetlerinde buğday, pirinç, soya, domates ve elmadan bir veya birkaçını tüketen 18 yaş üstü 12 gönüllü ve sağlıklı anne çalışmaya dahil edilmiş ancak 11 hasta üzerinde çalışma gerçekleştirilmiştir (10 numaralı hasta numunelerin yetersiz olması nedeni ile çalışmadan çıkarılmıştır). Çalışmaya katılan tüm anneler çalışma hakkında bilgilendirilerek yazılı onayları alınmıştır. Çalışma için demografik bilgileri içeren bir anket hazırlanmıştır. Annelerin yaşı, boyu, kilosu, gebelik sayısı, laktasyon haftası, bahsi geçen besinleri ne sıklıkta tükettikleri ve en son kaç saat önce tükettikleri hazırlanan anket ile belirlenmiştir. Çalışmada, anneler bilgilendirilip onayları alındıktan sonra rutin analizler için verdikleri venöz kandan artan numune ve anne sütü kullanılmıştır.

Araştırmaya dahil edilme kriterleri;

- 18 yaş ve üzeri olan anneler
- Laktasyonun 1-12 ayları arasında olan anneler
- Herhangi bilinen sağlık problemi olmayan anneler
- Günlük diyetlerinde buğday, pirinç, elma, domates ve soyadan en az birini tüketen anneler

Araştırmadan dışlanma kriterleri;

- Laktasyonun 1. ayından önce veya 12. ayından sonra olan anneler
- Bilinen sağlık problemi olan anneler
- Belirtilen besinleri tüketmeyen anneler

3.1.2. Plazma ve Süt Numunelerinin Eldesi

Alınan kan numuneleri 2000 g'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Üstte kalan süpernatant kısımdan 1ml alınarak yeni bir tüpe aktarılmıştır. Alınan bu kısım tekrar 2000g'de 10 dakika santrifüj edilerek süpernatant kısımdan alınan numune kapaklı ependorf tüplere konularak çalışmaya kadar -80 derecede saklanmıştır. Süt örnekleri 2000 g'de 10 dakika santrifüj edilerek üstte kalan lipid içeriği yüksek kısım ependorf tüpe aktarılmıştır. Lipid kısmın altında kalan süt lipid altı kısmı da ayrı bir ependorf tüpe alınarak bu kısım tekrar 2000g'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası lipid altı kısmı ayrı bir ependorf tüpe aktarılmıştır. Süt lipid ve lipid altı kısımları da çalışmaya kadar -80 derecede saklanmıştır. Alınan numunelerden RT-PCR yöntemi ile domates (*Solanum lycopersicum-sly*), elma (*Malus domestica-mdm*), pirinç (*Oryza sativa-osa*), soya (*Glycine max-gma*) ve buğday (*Triticum aestivum-tae*) kaynaklı miRNA (osa-miR168a-3p/168a-5p/156a, gma-miR156b/1520d, tae-miR167a/167b/159a/159b, sly-miR156a/169b/169c, mdm-miR171i/7121d/858/399a) analizi yapılmıştır.

3.1.3. Kullanılan Cihazlar:

- New Brunswick U570 marka -80 °C' lik derin dondurucu
- Eppendorf marka santrifüj cihazı
- Axygen marka ayarlanabilir otomatik pipetler
- Applied Biosystems StepOnePlus RT-PCRcihazı

3.1.4. Kullanılan Malzemeler:

- GeneAll, Hybrid-R miRNA izolasyon kiti (Cat no:325-150, Lot no: 32515L09024)
- HyperScript First strand synthesis Kit , Cat no:601-005
- 2X SYBR GREEN MASTER MIX (Cat No:801-520, Lot no:QP116G25001)

3.2 Yöntem

Çalışmada 11 plazma, 11 süt lipid kısmı ve 11 süt lipid altı kısmı olmak üzere toplam 33 numunde miRNA analizi gerçekleştirilmiştir.

Özet:

- Örnekler miRNA'ya özgü bir kit kullanılarak izole edilmiştir.
- Örnekler izole edildikten sonra -80°C de saklanmıştır.
- 16 adet miRNA ve kontrol primeri (U6) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.
- Stem-loop primerleri kullanılarak cDNA sentezi yapılmıştır(Bu miRNA'lara özgün stem-loop primerleri dizayn edilmiştir. Bu primerler ; miRNA'dan → cDNA sentezi yaparken miRNA dizisi ile spesifik bağlandığı için en güvenilir yöntem olarak kabul edilmektedir. Elde edilen miRNA'lardan her bir miRNA'ya özgü primerler kullanılarak cDNA sentezi yapılmıştır. Elde edilen cDNA lardan SYBR Green temelli Real Time PCR kurulmuştur.
- Örnekler 2 tekrarlı olarak çalışılmıştır.

3.2.1 miRNA izolasyonu

GeneAll, Hybrid-R miRNA (Cat no:325-150, Lot no: 32515L09024) kullanılarak miRNA izolasyonu yapılmıştır.

Protokol

1. 200µL serum+ 500µL RiboEx pipetaj yaparak eklendi(RiboEx içerdiği fenol ve guanidin tuzu ile hücreyi hızla parçalar ve nükleazları inaktive eder).
2. 5 dk oda ısısında inkübe edildi.
3. 1,5ml lik tüp üzerine 100µl kloroform eklendi. Kloroform RiboEx ve serum örneğine karışması için alt üst yapılarak 2 dk oda ısısında bekletildi.(Kloroform ile elde ettiğimiz lizat sulu ve organik faza kolayca ayrılır).
4. 12.000g de dk 4°C de santrifüj yapılarak sulu faz başka bir eppendorfa aktarıldı (DNA ve protein ara fazda ve organik fazda kalırken, total RNA sulu fazda bulunur).
5. Alınan sulu faz kadar üzerine %50 ethanol eklenir. Pipetaj yapılır. Vorteks yapılmaz bu aşamada.
6. Elde edilen mix type B (kırmızı kapaklı olan) kolona aktarılır. 700µL olacak şekilde aktarılır (Burada büyük RNA membrana bağlanırken , küçük RNA lar kolondan aşağı doğru iner).
7. 11.000rpm de 1 dk oda ısısında santrifüj edilir.
8. Altta kalan tüpün üzerine kalan sıvının hacmi kadar %100 ethanol eklenir. Pipetaj yapılır. Vorteks yapılmaz.

9. Bu karışım (yaklaşık 650µL) type W kolona aktarılır(Bu kolon küçük RNA ların bağlanmasını sağlar).
10. 11.000rpm de 1 dk oda ısısında santrifüj edilir.
11. Not : Geriye kalan örnek varsa 9-10.basamaklar tekrarlanır.
12. Collection tüp yenisi ile değiştirilir ve üzerine 500µL RBW Buffer eklenir (Bu basamakta deterjan içeriğinde bulunan yıkama basamağı gerçekleştirilir. Böylece membrana bağlanmış olan küçük RNA dışındaki artıklar uzaklaştırılır).
13. 11.000rpm de 1 dk oda ısısında santrifüj edilir.
14. Collection tüp yenisi ile değiştirilir ve üzerine 500µL RNW Buffer eklenir.
15. 11.000rpm de 1 dk oda ısısında santrifüj edilir.
16. Collection tüp yenisi ile değiştirilir ve üzerine 500µL RNW Buffer eklenir.
17. 11.000rpm de 1 dk oda ısısında santrifüj edilir.
18. Collection tüp yenisi ile değiştirilir ve üzerine hiçbirşey eklenmeden 11.000rpm de 2 dk santrifüj edilir (Herhangi bir yıkama buffer kalmasına karşı böyle bir önlem alınır).
19. Daha sonra membranın tam merkezine gelecek şekilde 50µL RNase-free su eklenir. 2dk oda sıcaklığında bekletilir.
20. 11.000rpm de 2 dk santrifüj edilir.
21. Elde edilen örnek -20°C ye aktarılır.

3.2.2 Primer Dizaynı

Kontrol olarak U6 gen bölgesine ait diziler kullanılmıştır.

Belirtilen diziler internetten bulunmuştur. Varkonyi-Gasic E. ve ark (2011) makalesi kaynak alınarak RT, Forward ve Reverse primerleri dizayn edilmiştir. Diziler aşağıdaki tabloda belirtilmiştir (Tablo 3.1).

Tablo 3.1: miRNA'ların RT, Forward ve Reverse primer baz dizilimleri

osa-miR168a-3p-RT	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACATTCAC
osa-miR168a-3p-F	ATTGAGATCCCCGCCTTGCA
osa-miR168a-3p-R	AGTGCAGGGTCCGAGG
osa-miR168a-3p-RT	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACGTCCCG
osa-miR168a-5p-F	ATTGCTCGCTTGGTGCAGA
osa-miR156a-RT	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACGTGCTC
osa-miR156a-F	AGCCTGACTGACAGAAGAGA

gma-miR156b-RT	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACTGTGCT
gma-miR156b-F	TCCAGCTGACAGAAGAGAGA
gma-miR1520D-RT	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACTTGCA
gma-miR1520D-F	GTCAGCATCAGAACATGACAC
tae-miR-167a-RT	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACTAGATC
tae-miR-167a-F	ATCATGAAGCTGCCAGCA
tae-miR-167b-RT	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACTAGATC
tae-miR-167b-F	AGTCATGAAGCTGACAGCA
tae-miR-159a-RT	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACCAGAGC
tae-miR-159a-F	TCAGCTTTGGATTGAAGGGA
tae-miR-159b-RT	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACCAGAGC
tae-miR-159b-F	TCAGCTTTGGATTGAAGGGA
sly-miR156a-RT	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACGTGCTC
sly-miR156a-F	GTCAGCTTGACAGAAGATAG
sly-miR169b-RT	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACCAGGCA
sly-miR169b-F	CATTGTAGCCAAGGATGAC
sly-miR169c-RT	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACTCGGCA
sly-miR169c-F	ATTGCAGCCAAGGATGACT
mdm-miR171i-RT	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACGAGTGA
mdm-miR171i-F	CGATGAGCCGAACCAATATC
mdm-miR7121d-RT	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACGCAGGG
mdm-miR7121d-F	GATTGCTCCTCTTGGTGA
mdm-miR858-RT	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACTCAGGT
mdm-miR858-F	GACAGTTTCGTTGTCTGTTC
mdm-miR399a-RT	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACCAGGGC
mdm-miR399a-F	TGACTGCCAAAGGAGAATTG

3.2.3 cDNA Sentezi

Elde edilen miRNA ile complemter DNA (cDNA)sentezi yapılmıştır. Çalışmada HyperScript First strand synthesis Kit (Cat no:601-005) kullanılmıştır.

Tablo 3.2. cDNA sentezi için gerekli bileşenler

Bileşenler	
NF Water	8 µl
Stem-loop primer	1 µl
10mMdNTP	1 µl
miRNA	4 µl
Total	14 µl

1. 65°C’de 5 dakika bekletilerek primer denatürasyonu sağlanmıştır.
2. Hemen buz üzerine alınmıştır.

Tablo 3.3. cDNA sentezi için gerekli bileşenler (2. aşama)

Bileşenler	
10X First S.Buffer	2 µl
0,1M DTT	2 µl
Enzim	1 µl
RNaz İnhibitor(40U/ µl)	1 µl

3. Hazırlanan mix 6 µl olarak her bir örnek üzerine dağıtılmıştır.

Tablo 3.4. cDNA sentezi için termal döngü cihazında uygulanan prosedür

16°C	30dakika	60X
30°C	30 saniye	
42°C	30 saniye	
50°C	1 saniye	
85°C	5 dakika	

NOT: Her örneğin kendi stem-loop primeri ile cDNA sı yapılmıştır.

3.2.4 Real Time PCR Protokol

Tablo 3.5. RT-PCR için gerekli olan bileşenler ve hacimleri

PCR Bileşenleri	1X
2X SYBR GREEN MASTER MIX (Cat No:801-520, Lot no:QP116G25001)	10µL
F(10pm)	1µL
R(10pm)	1µL
ROX	1,5µL
cDNA	5µL
WATER	1,5µL
Total	20µL

Tablo 3.6. RT-PCR için termal döngü cihazında uygulanan prosedür

PCR KOŞULLARI		
95°C	10 dakika	X40
95°C	15saniye	
60°C	1 dakika	

Çalışma; Applied Biosystems StepOnePlus cihazı ile yapılmıştır.

Plate Dizaynı

Tablo 3.7. Örneklerin plate üzerindeki yerleşimi

	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>4</u>	<u>5</u>	<u>6</u>	<u>7</u>	<u>8</u>	<u>9</u>	<u>10</u>	<u>11</u>	<u>12</u>
<u>A</u>	<u>P1</u>	<u>P1</u>	<u>P9</u>	<u>P9</u>	<u>S6</u>	<u>S6</u>	<u>L3</u>	<u>L3</u>	<u>L12</u>	<u>L12</u>		
<u>B</u>	<u>P2</u>	<u>P2</u>	<u>P11</u>	<u>P11</u>	<u>S7</u>	<u>S7</u>	<u>L4</u>	<u>L4</u>	<u>NK</u>	<u>NK</u>		
<u>C</u>	<u>P3</u>	<u>P3</u>	<u>P12</u>	<u>P12</u>	<u>S8</u>	<u>S8</u>	<u>L5</u>	<u>L5</u>				
<u>D</u>	<u>P4</u>	<u>P4</u>	<u>S1</u>	<u>S1</u>	<u>S9</u>	<u>S9</u>	<u>L6</u>	<u>L6</u>				
<u>E</u>	<u>P5</u>	<u>P5</u>	<u>S2</u>	<u>S2</u>	<u>S11</u>	<u>S11</u>	<u>L7</u>	<u>L7</u>				
<u>F</u>	<u>P6</u>	<u>P6</u>	<u>S3</u>	<u>S3</u>	<u>S12</u>	<u>S12</u>	<u>L8</u>	<u>L8</u>				
<u>G</u>	<u>P7</u>	<u>P7</u>	<u>S4</u>	<u>S4</u>	<u>L1</u>	<u>L1</u>	<u>L9</u>	<u>L9</u>				
<u>H</u>	<u>P8</u>	<u>P8</u>	<u>S5</u>	<u>S5</u>	<u>L2</u>	<u>L2</u>	<u>L11</u>	<u>L11</u>				

3.3 RT-PCR Verilerinin Rölatif Ölçüm Tekniği ile Değerlendirilmesi ($2^{-\Delta\Delta CT}$ Yöntemi)

RT-PCR sonrası veriler iki şekilde değerlendirilebilmektedir. İlki mutlak ölçüm diye tanımlanan ve PCR sinyalini bir referans materyale ait standart eğriyle karşılaştırarak transkripte olan genetik materyalin kopya sayısını veren yöntemdir. İkincisi ise rölatif ölçümdür. Rölatif değerlendirmede hedef genetik materyalde meydana gelen değişimi ortaya koymak için aynı reaksiyon içerisinde kontrol grubu kullanılır. Karşılaştırılmalı durumlarda tam kopya sayısını bilmek gerekli değildir. (Livak 2001).

Bu çalışmada rölatif ölçüm tekniğini kullanılmıştır. miRNA'sı çalışılan besinleri tüketmeyen kişilerde miRNA saptanamayacağı için kontrol grubunun eşik değerleri (cycle treshold-CT) 0 olarak kabul edilmiş ve hesaplamalar buna göre yapılmıştır. Ayrıca her bir hastaya ait plazma, süt lipid ve lipid altı fraksiyonları kendi içlerinde karşılaştırılarak miRNA içerikleri kıyaslanmıştır. Tüm bu değerlendirmelerde 1.5 kat ve üzeri olan artışlar anlamlı olarak kabul edilmiştir.

miRNA seviyelerinin rölatif kantitasyonu için referans olarak small nuclear RNA ailesinin bir üyesi olan U6 kullanılmıştır. U6, mRNA seviyesinin insan vücudundaki çoğu sistemde nispeten sabit düzeyde kaldığı, tümör enfeksiyon gibi çeşitli durumlardan etkilenmediği gösterilmiş olup referans gen olarak yapılan çalışmalarda sık kullanılan genetik materyallerden biridir (Schaefer 2010, Sanders 2012).

3.4. İstatistiksel Değerlendirme

Verilerin istatistiksel değerlendirmesinde $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri Kruskal Wallis testi kullanılarak karşılaştırılmıştır. Bu değerler ortanca, alt çeyrek ve üst çeyrek olarak verilmiştir. Ortanca değerleri 1.5 kat ve üzerinde olan sonuçları anlamlı kabul edilmiştir.

Yaş, kilo, boy ve laktasyon süresi değerlerinin ortalama ve standart sapmalarını hesaplanılmıştır. Gebelik sayısı ve doğum haftaları gibi değerler ise frekans ve yüzde olarak verilmiştir.

3.5 Çalışılan miRNA'ların İnsanlarda Eşleştiği mRNA'ların ve Etki Edebileceği Yolakların Tespiti

Çalışılan besinsel miRNA'ların baz dizimleri miRNA veri tabanından (www.mirbase.org) belirlenmiştir. mRNA veri tabanında (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) bu miRNA'ların insanlarda yüksek oranda komplementerlik gösterdiği mRNA'lar belirlenerek komplementerliğin mRNA'nın hangi bölgesini kapsadığı analiz edilmiştir. Ardından 5'UTR (UTR: translasyona uğramayan bölge) veya 3'UTR kısımları besinsel miRNA'lar ile komplementerlik gösteren mRNA'lar seçilerek, yer aldığı yolaklar KEGG (www.genome.jp/kegg/pathway.html) ve DAVID (<https://david.ncifcrf.gov>) yolak veri tabanlarında analiz edilmiştir.

4.BULGULAR

4.1. Hastaların Demografik Özellikleri

Çalışmaya laktasyonunun 1-12 aylarında olan 11 sağlıklı anne dahil edilmiştir. Annelerin ortalama yaşlarının 30,4 (± 4.6 SD) yıl, kiloları 65,6 kg (± 9.2 SD), boyları 163,6cm (± 4.1 SD) olduğu ve laktasyonunun ortalama 7,5 ayında (± 2.1 SD) olduğu görülmüştür. Annelerin 5 tanesinin (%45.45) 1., 5 tanesinin (%45.45) 2., ve 1 tanesinin (%9.1) 3. gebeliği olduğu ve 9'unun (%81.8) 37-40 haftaları arasında, 2 tanesinin (%18.18) ise 37 hafta öncesinde doğum yaptığı belirlenmiştir.

Hastaların besinleri son tüketim saati (Tablo 4.1) ve tüketim sıklıkları (Tablo 4.2) verilmiştir.

Tablo 4.1. Hastaların besinleri son tüketim saati (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12 hasta numaraları)

	1 saat önce	3 saat önce	6 saat önce	12 saat önce	24 saat önce
Domates	12	3, 5, 6, 8, 9	2, 11	11, 4	7
Elma		2, 5, 6, 8, 9, 12		1, 3	4
Pirinç		1, 6		4, 12	2, 3, 7, 8, 9
Buğday	4	2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 12	1	11	
Soya		5, 6		3, 11	8, 12

Tablo 4.2. Hastaların besinleri tüketme sıklık ve miktarları

Hasta no:	Domates	Elma	Pirinç	Buğday	Soya
1	Haftada 3 kez 1 porsiyon	Haftada 3 kez 1 porsiyon	Haftada 1 kez 1 porsiyon	Her gün Günde 3 porsiyon	Belirtilmemiş
2	Her gün Günde 2 porsiyon	Haftada 3 kez 1 porsiyon	Haftada 3 kez 1 porsiyon	Her gün Günde 3 porsiyon	Belirtilmemiş
3	Haftada 3 kez 1 porsiyon	Haftada 3 kez 1 porsiyon	Haftada 1 kez 1 porsiyon	Her gün Günde 3 porsiyon	Haftada 1 kez 1 porsiyon
4	Her gün Günde 1 porsiyon	Haftada 1 kez 1 porsiyon	Haftada 1 kez 1 porsiyon	Her gün Günde 3 porsiyon	Haftada 1 kez 1 porsiyon
5	Haftada 3 kez 1 porsiyon	Her gün Günde 1 porsiyon	Haftada 1 kez 1 porsiyon	Haftada 3 kez 1 porsiyon	Haftada 1 kez 1 porsiyon
6	Haftada 3 kez 1 porsiyon	Haftada 3 kez 1 porsiyon	Haftada 1 kez 1 porsiyon	Haftada 3 kez 1 porsiyon	Haftada 1 kez 1 porsiyon
7	Her gün Günde 1 porsiyon	Haftada 3 kez 1 porsiyon	Haftada 3 kez 1 porsiyon	Her gün 1 porsiyon	Haftada 1 kez 1 porsiyon
8	Haftada 3 kez 1 porsiyon	Haftada 1 kez 1 porsiyon	2 haftada 1 1 porsiyon	Haftada 2 kez 1 porsiyon	2 haftada 1 1 porsiyon
9	Her gün Günde 1 porsiyon	Haftada 3 kez 1 porsiyon	Haftada 3 kez 1 porsiyon	Her gün Günde 3 porsiyon	Belirtilmemiş
11	Her gün Günde 1 porsiyon	Belirtilmemiş	Belirtilmemiş	Her gün 1 porsiyon	Haftada 1 kez 1 porsiyon
12	Her gün Günde 2 porsiyon	Her gün Günde 2 porsiyon	Haftada 3 kez 1 porsiyon	Her gün Günde 2 porsiyon	Haftada 1 kez 1 porsiyon

4.2. Analiz Sonuçları ve İstatistiksel Değerlendirme

Sly-miR169c (Domates)

Tablo 4.3: Plazma, süt lipid altı ve süt lipid örneklerinde sly-miR169c ve referans U6 genlerinin CT, Δ CT ve $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri (P: plazma, S: süt lipid altı, L: süt lipid)

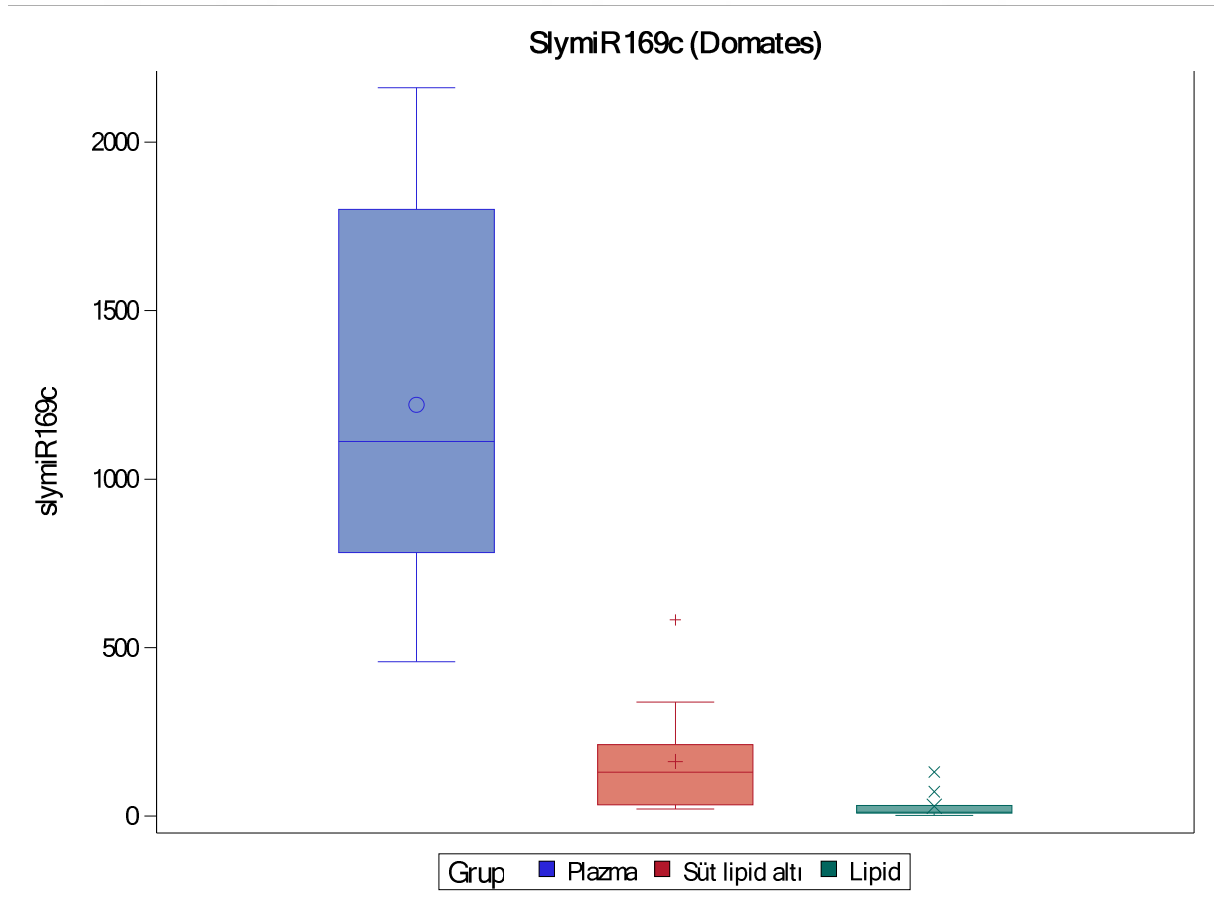
Sly-miR169c (Domates)												
Hasta No	P-CT	P-U6-CT	S-CT	S-U6-CT	L-CT	L-U6-CT	P- Δ CT	S- Δ CT	L- Δ CT	P- $2^{-\Delta\Delta CT}$	S- $2^{-\Delta\Delta CT}$	L- $2^{-\Delta\Delta CT}$
1	21,84	31,53	22,19	26,56	22,38	25,91	-9,69	-4,37	-3,54	823,69	20,63	11,61
2	21,00	31,05	20,26	27,99	21,40	28,43	-10,05	-7,73	-7,03	1057,45	211,89	130,94
3	20,97	31,17	20,41	27,44	22,61	25,84	-10,20	-7,03	-3,23	1177,52	130,61	9,39
4	20,63	31,44	21,27	29,67	22,92	27,35	-10,81	-8,40	-4,43	1800,17	338,19	21,57
5	21,21	30,82	21,84	31,03	21,62	27,79	-9,61	-9,19	-6,18	782,37	582,16	72,30
6	21,91	31,40	20,74	28,24	23,46	24,20	-9,49	-7,50	-0,74	716,93	181,20	1,67
7	20,36	30,86	20,85	28,09	22,72	27,72	-10,50	-7,24	-4,99	1452,93	150,83	31,87
8	21,68	30,52	22,88	27,96	22,56	24,52	-8,84	-5,08	-1,96	458,45	33,76	3,90
9	20,91	31,03	22,20	27,93	22,21	25,28	-10,12	-5,73	-3,07	1111,41	52,92	8,42
10	19,90	30,98	23,34	28,16	23,07	26,56	-11,08	-4,82	-3,49	2161,07	28,22	11,20
11	20,15	31,03	21,96	27,66	22,86	26,71	-10,88	-5,70	-3,85	1884,96	52,04	14,44

Tablo 4.4: Sly-miR169c'nin plazma, süt lipid altı ve süt lipid örneklerinde $2^{-\Delta\Delta CT}$ ortanca, alt çeyrek ve üst çeyrek değerleri

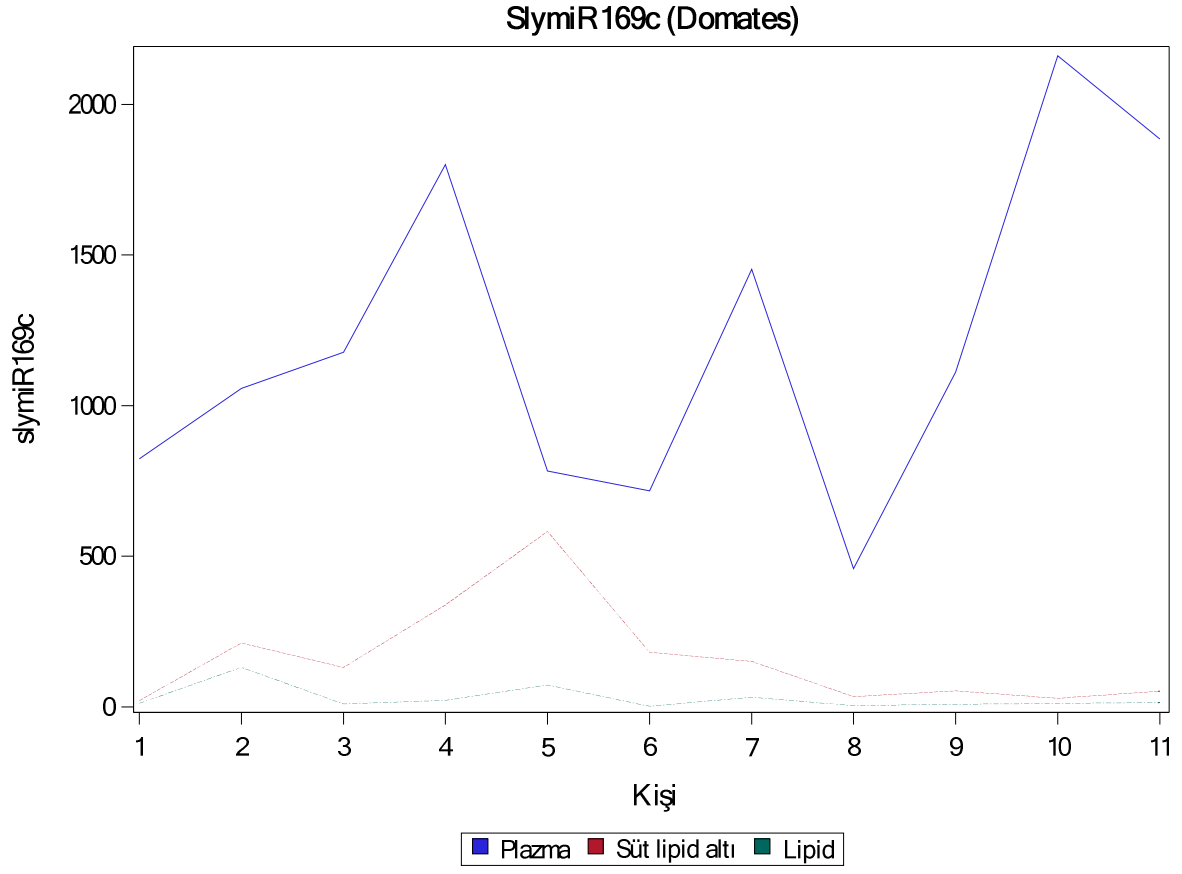
Sly-miR169c (Domates) n=33		Ortanca	Alt çeyrek	Üst Çeyrek
	Plazma (n=11)		1111.4	782.4
Süt lipid altı (n=11)		130.6	33.8	211.9
Süt lipid (n=11)		11.6	8.4	31.9

p<0.001

Sly-miRN169c'nin plazma, süt lipid altı ve süt lipid örneklerinde $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri 1.5 katın üzerinde olması nedeniyle anlamlı kabul edilmiş olup, varyans analizi ile bu üç gruba ait farklılık anlamlı bulunmuştur (p<0.001).



Şekil 4.1. Plazma, süt lipid altı ve süt lipid örneklerindeki sly-miR169c $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerlerinin dağılımı



Şekil 4.2. Her bir vakaya ait plazma, süt lipid altı ve süt lipid sly-miR169c $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerlerinin karşılaştırılması

Sly-miR156a (Domates)

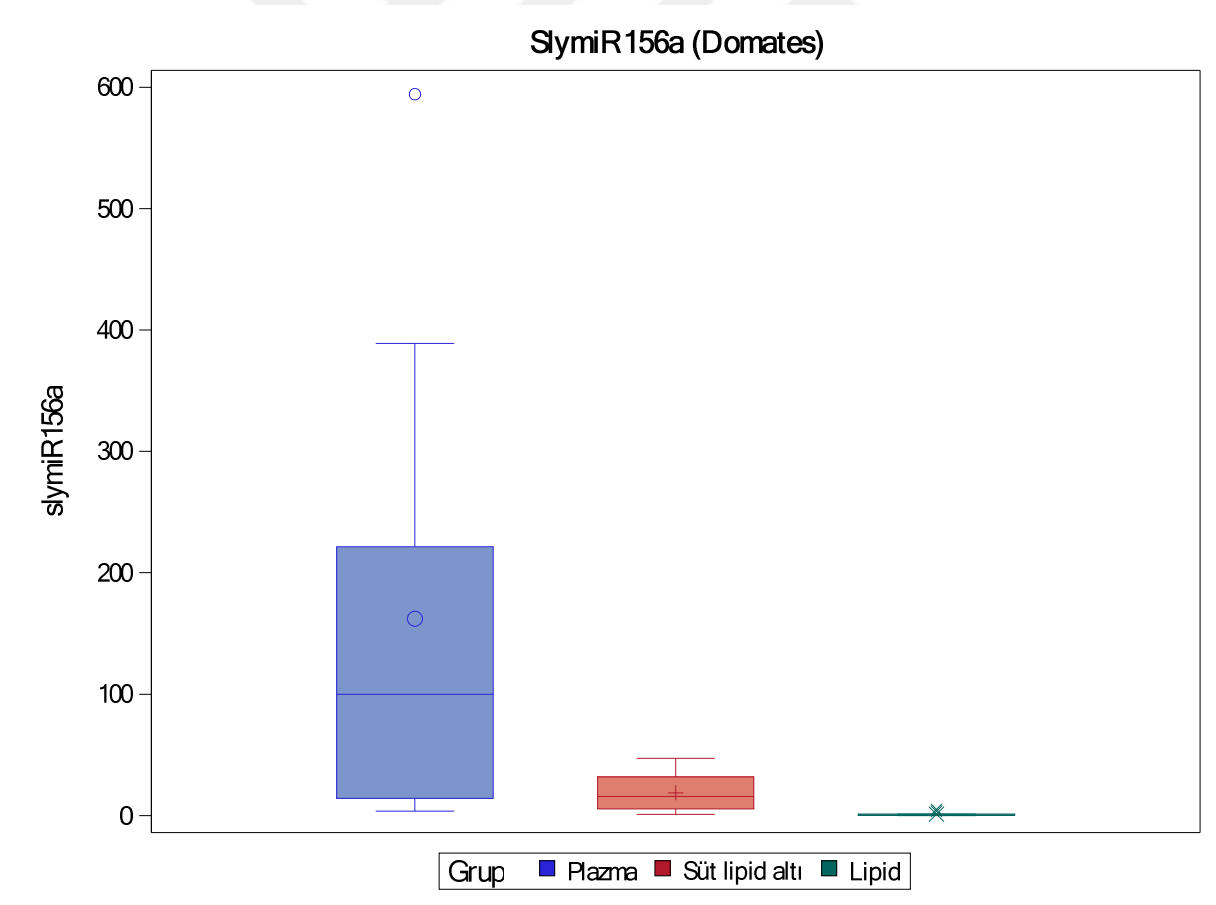
Tablo 4.5. Plazma, süt lipid altı ve süt lipid örneklerinde sly-miR156a ve referans U6 genlerinin CT, Δ CT ve $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri (P: plazma, S: süt lipid altı, L: süt lipid)

Sly-miR156a (Domates)												
Hasta No:	P-CT	P-U6-CT	S-CT	S-U6-CT	L-CT	L-U6-CT	P- Δ CT	S- Δ CT	L- Δ CT	P- $2^{-\Delta\Delta CT}$	S- $2^{-\Delta\Delta CT}$	L- $2^{-\Delta\Delta CT}$
1	26,50	31,53	26,74	26,56	25,48	25,91	-5,03	0,19	-0,43	32,71	0,88	1,35
2	22,44	31,05	25,54	27,99	26,07	28,43	-8,60	-2,45	-2,36	388,93	5,47	5,15
3	21,95	31,17	26,48	27,44	28,83	25,84	-9,22	-0,96	2,99	594,29	1,94	0,13
4	24,80	31,44	24,25	29,67	28,98	27,35	-6,64	-5,42	1,63	100,02	42,82	0,32
5	23,24	30,82	26,04	31,03	26,00	27,79	-7,58	-4,99	-1,79	191,41	31,72	3,47
6	23,61	31,40	24,26	28,24	29,65	24,20	-7,79	-3,98	5,45	221,37	15,80	0,02
7	23,61	30,86	22,53	28,09	27,88	27,72	-7,25	-5,56	0,17	152,51	47,04	0,89
8	24,23	30,52	25,05	27,96	28,36	24,52	-6,29	-2,91	3,84	78,13	7,50	0,07
9	27,21	31,03	24,93	27,93	27,94	25,28	-3,82	-2,99	2,66	14,13	7,96	0,16
10	28,29	30,98	23,43	28,16	27,16	26,56	-2,69	-4,73	0,61	6,44	26,58	0,66
11	29,21	31,03	23,43	27,66	28,70	26,71	-1,82	-4,23	1,99	3,54	18,77	0,25

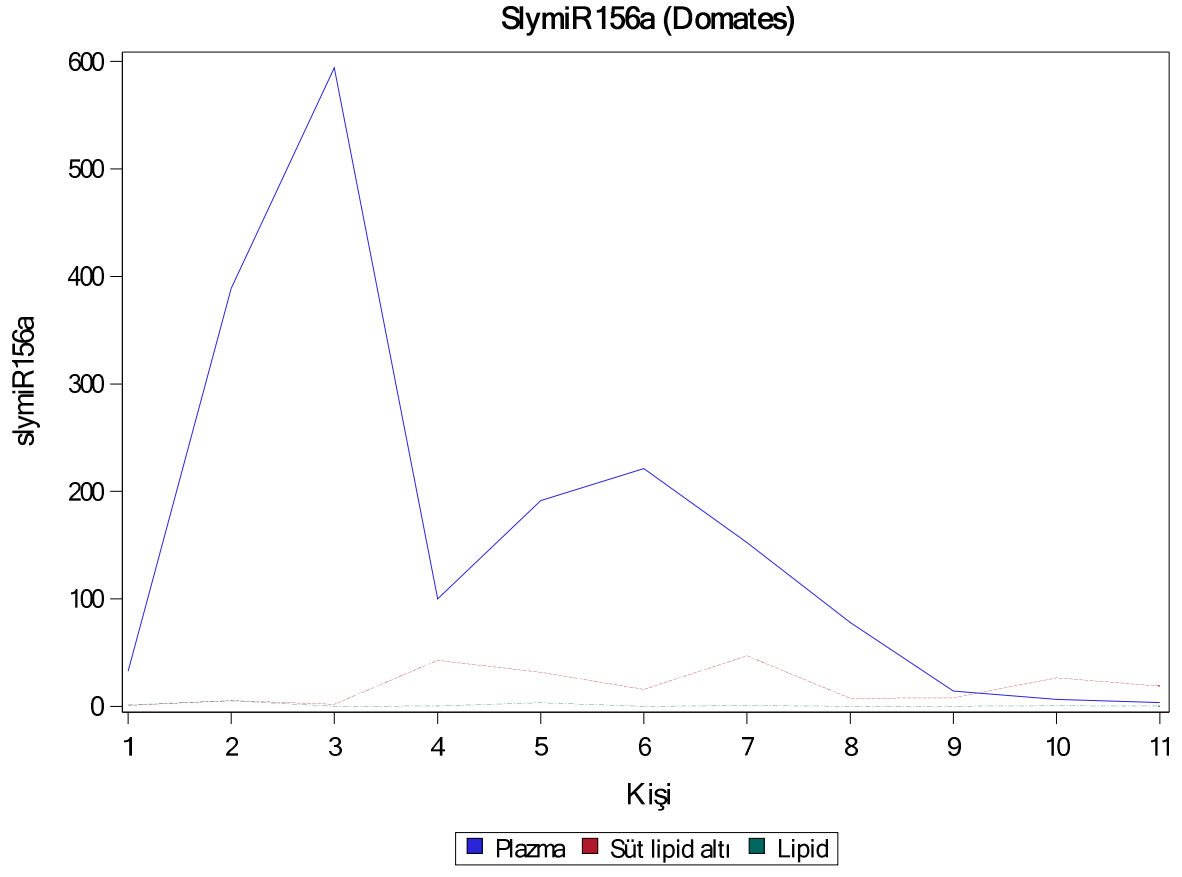
Tablo 4.6. Sly-miR156a'nın plazma, süt lipid altı ve süt lipid örneklerinde $2^{-\Delta\Delta CT}$ ortanca, alt çeyrek ve üst çeyrek değerleri

Sly-miR156a (Domates) n=33		Ortanca	Alt çeyrek	Üst Çeyrek
	Plazma (n=11)	100.0	14.1	221.4
	Süt lipid altı (n=11)	15.8	5.5	31.7
	Süt lipid (n=11)	0.3	0.1	1.4
p<0.001				

Sly-miR156a'nın plazma ve süt lipid altı örneklerinde $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri 1.5 katın üzerinde olması nedeniyle anlamlı kabul edilmiş olup, süt lipid kısmında $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri 1.5 katın altında bulunmuştur. Sly miR156a'nın süt lipid kısmında bulunmadığı kabul edilmiştir. CT değerleri housekeeping ile karşılaştırıldığında anlamlı bir ekspresyon değeri bulunmamıştır. Varyans analizi ile yapılan karşılaştırmada gruplar arasındaki fark anlamlı bulunmuştur (p<0.001).



Şekil 4.3. Plazma, süt lipid altı ve süt lipid örneklerindeki sly-miR156a $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerlerinin dağılımı



Şekil 4.4. Her bir vakaya ait plazma, süt lipid altı ve süt lipid sly-miR156a $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerlerinin karşılaştırılması

Sly-miR169b (Domates)

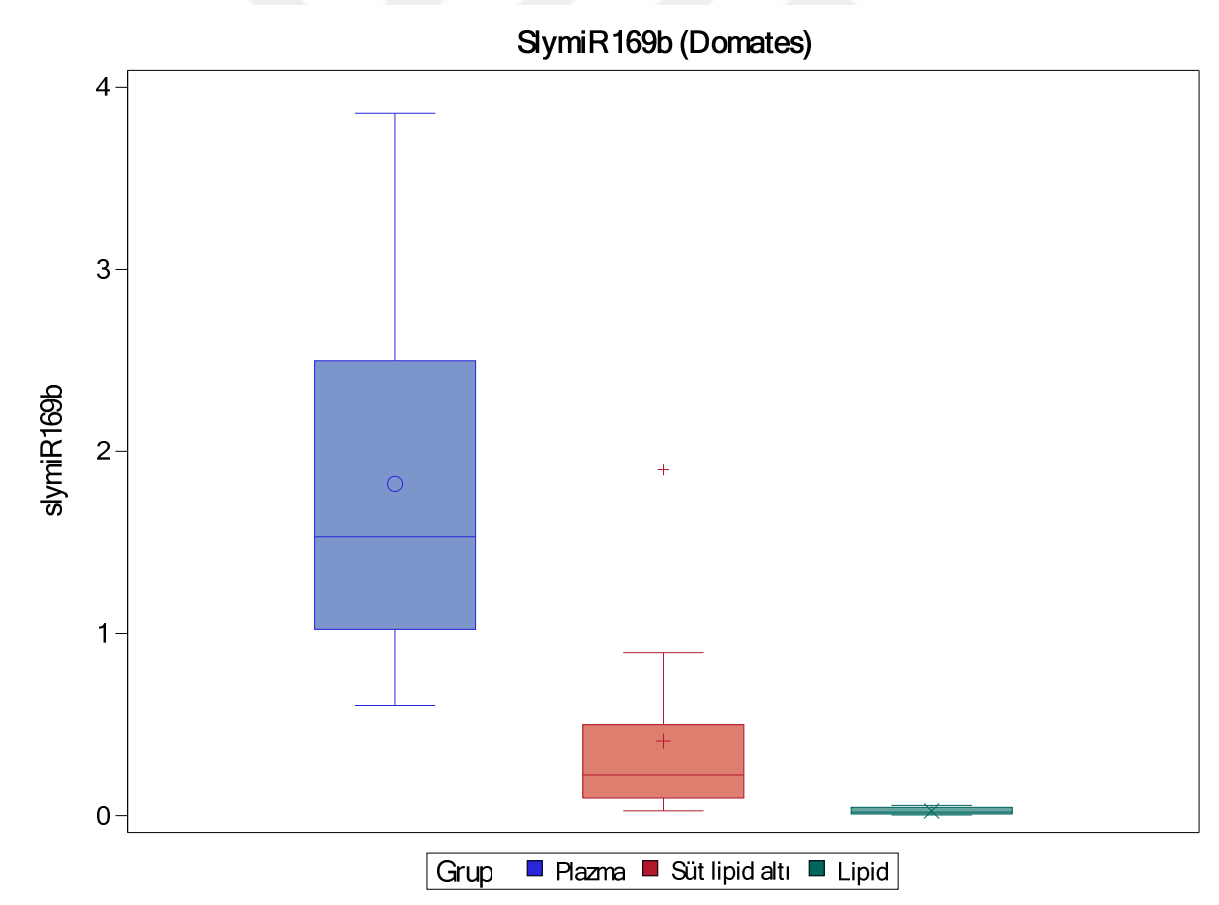
Tablo 4.7. Plazma, süt lipid altı ve süt lipid örneklerinde sly-miR169b ve referans U6 genlerinin CT, Δ CT ve $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri (P: plazma, S: süt lipid altı, L: süt lipid)

Sly-miR169b (Domates)												
Hasta No	P-CT	P-U6-CT	S-CT	S-U6-CT	L-CT	L-U6-CT	P- Δ CT	S- Δ CT	L- Δ CT	P- $2^{-\Delta\Delta CT}$	S- $2^{-\Delta\Delta CT}$	L- $2^{-\Delta\Delta CT}$
1	32,25	31,53	31,37	26,56	31,65	25,91	0,73	4,81	5,73	0,60	0,04	0,02
2	30,43	31,05	31,27	27,99	32,58	28,43	-0,61	3,28	4,15	1,53	0,10	0,06
3	30,03	31,17	32,67	27,44	34,44	25,84	-1,14	5,24	8,60	2,20	0,03	0,00
4	29,49	31,44	30,67	29,67	34,27	27,35	-1,95	1,00	6,91	3,86	0,50	0,01
5	30,56	30,82	30,10	31,03	33,38	27,79	-0,26	-0,93	5,58	1,20	1,90	0,02
6	30,13	31,40	30,18	28,24	28,67	24,20	-1,27	1,93	4,47	2,42	0,26	0,04
7	29,36	30,86	30,09	28,09	31,90	27,72	-1,51	2,00	4,18	2,84	0,25	0,06
8	30,78	30,52	30,13	27,96	32,40	24,52	0,26	2,17	7,88	0,84	0,22	0,00
9	30,98	31,03	30,19	27,93	29,83	25,28	-0,05	2,27	4,54	1,04	0,21	0,04
10	30,95	30,98	28,32	28,16	32,29	26,56	-0,03	0,16	5,73	1,02	0,89	0,02
11	29,71	31,03	31,04	27,66	33,47	26,71	-1,32	3,38	6,76	2,50	0,10	0,01

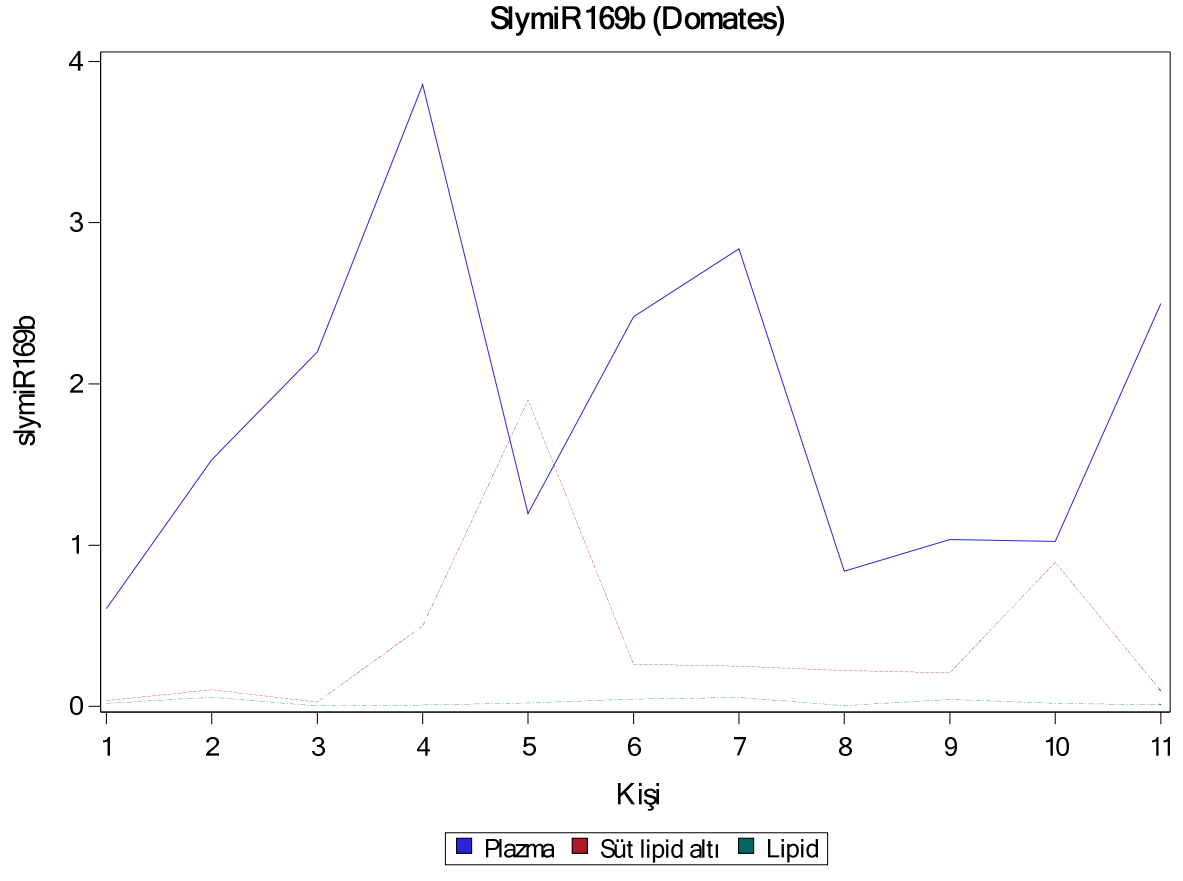
Tablo 4.8. Sly-miR169b'nin plazma, süt lipid altı ve süt lipid örneklerinde $2^{-\Delta\Delta CT}$ ortanca, alt çeyrek ve üst çeyrek değerleri

Sly-miR169b (Domates) n=33		Ortanca	Alt çeyrek	Üst Çeyrek
	Plazma (n=11)	1.5	1.02	2.5
	Süt lipid altı (n=11)	0.2	0.1	0.5
	Süt lipid (n=11)	0.01	0.008	0.04
p<0.001				

Sly-miR169b'nin plazma örneklerinde $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri 1.5 katın üzerinde olması nedeniyle anlamlı kabul edilmiş olup, süt lipid altı ve süt lipid kısmında $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri 1.5 katın altında bulunmuştur. Sly miR169b'nin sütte bulunmadığı kabul edilmiştir. Süt örneklerinde CT değerleri housekeeping ile karşılaştırıldığında anlamlı bir ekspresyon değeri bulunmamıştır. Varyans analizi ile yapılan karşılaştırmada gruplar arasındaki fark anlamlı bulunmuştur (p<0.001).



Şekil 4.5. Plazma, süt lipid altı ve süt lipid örneklerindeki sly-miR169b $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerlerinin dağılımı



Şekil 4.6. Her bir vakaya ait plazma, süt lipid altı ve süt lipid sly-miR169b $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerlerinin karşılaştırılması

Mdm-miR399a (Elma)

Tablo 4.9. Plazma, süt lipid altı ve süt lipid örneklerinde mdm-miR399a ve referans U6 genlerinin CT, Δ CT ve $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri (P: plazma, S: süt lipid altı, L: süt lipid)

Mdm-miR-399a (Elma)												
Hasta no	P-CT	P-U6-CT	S-CT	S-U6-CT	L-CT	L-U6-CT	P- Δ CT	S- Δ CT	L- Δ CT	P- $2^{-\Delta\Delta CT}$	S- $2^{-\Delta\Delta CT}$	L- $2^{-\Delta\Delta CT}$
1	31,45	31,53	32,03	26,56	31,74	25,91	-0,08	5,48	5,83	1,06	0,02	0,02
2	32,62	31,05	31,71	27,99	31,67	28,43	1,57	3,72	3,24	0,34	0,08	0,11
3	32,04	31,17	31,27	27,44	32,52	25,84	0,87	3,83	6,68	0,55	0,07	0,01
4	32,16	31,44	31,70	29,67	32,45	27,35	0,72	2,03	5,10	0,61	0,25	0,03
5	31,45	30,82	31,21	31,03	31,58	27,79	0,63	0,18	3,79	0,65	0,88	0,07
6	32,01	31,40	31,50	28,24	32,74	24,20	0,61	3,25	8,54	0,66	0,10	0,00
7	32,36	30,86	31,42	28,09	31,59	27,72	1,50	3,34	3,87	0,35	0,10	0,07
8	32,85	30,52	31,15	27,96	31,57	24,52	2,33	3,19	7,05	0,20	0,11	0,01
9	32,40	31,03	31,13	27,93	31,68	25,28	1,37	3,20	6,39	0,39	0,11	0,01
10	33,11	30,98	31,75	28,16	32,44	26,56	2,13	3,59	5,88	0,23	0,08	0,02
11	30,94	31,03	30,85	27,66	33,47	26,71	-0,09	3,19	6,76	1,07	0,11	0,01

Mdm-miR399a'nın plazma, süt lipid altı ve süt lipid örneklerinde $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri 1.5 katın altında olması nedeniyle anlamsız kabul edilmiştir. CT değerleri housekeeping ile karşılaştırıldığında anlamlı bir ekspresyon değeri bulunmamıştır.

Mdm-miR858 (Elma)

Tablo 4.10. Plazma, süt lipid altı ve süt lipid örneklerinde mdm-miR858 ve referans U6 genlerinin CT, Δ CT ve $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri (P: plazma, S: süt lipid altı, L: süt lipid)

Mdm-miR858 (Elma)												
Hasta no	P-CT	P-U6-CT	S-CT	S-U6-CT	L-CT	L-U6-CT	P- Δ CT	S- Δ CT	L- Δ CT	P- $2^{-\Delta\Delta CT}$	S- $2^{-\Delta\Delta CT}$	L- $2^{-\Delta\Delta CT}$
1	35,43	31,53	33,39	26,56	31,68	25,91	3,90	6,83	5,76	0,07	0,01	0,02
2	34,99	31,05	33,64	27,99	34,93	28,43	3,94	5,65	6,49	0,07	0,02	0,01
3	34,39	31,17	34,33	27,44	34,11	25,84	3,22	6,89	8,27	0,11	0,01	0,00
4	34,24	31,44	33,81	29,67	34,51	27,35	2,80	4,14	7,16	0,14	0,06	0,01
5	33,72	30,82	33,88	31,03	35,21	27,79	2,90	2,85	7,41	0,13	0,14	0,01
6	34,67	31,40	34,33	28,24	32,52	24,20	3,27	6,08	8,32	0,10	0,01	0,00
7	34,45	30,86	34,06	28,09	34,69	27,72	3,59	5,97	6,97	0,08	0,02	0,01
8	33,54	30,52	34,40	27,96	34,67	24,52	3,02	6,44	10,15	0,12	0,01	0,00
9	34,43	31,03	33,70	27,93	31,64	25,28	3,40	5,78	6,36	0,09	0,02	0,01
10	33,94	30,98	34,46	28,16	34,47	26,56	2,96	6,30	7,91	0,13	0,01	0,00
11	34,03	31,03	34,46	27,66	34,82	26,71	3,00	6,80	8,11	0,13	0,01	0,00

Mdm-miR858'in plazma, süt lipid altı ve süt lipid örneklerinde $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri 1.5 katın altında olması nedeniyle anlamsız kabul edilmiştir. CT değerleri housekeeping ile karşılaştırıldığında anlamlı bir ekspresyon değeri bulunmamıştır.

Mdm-miR7121d (Elma)

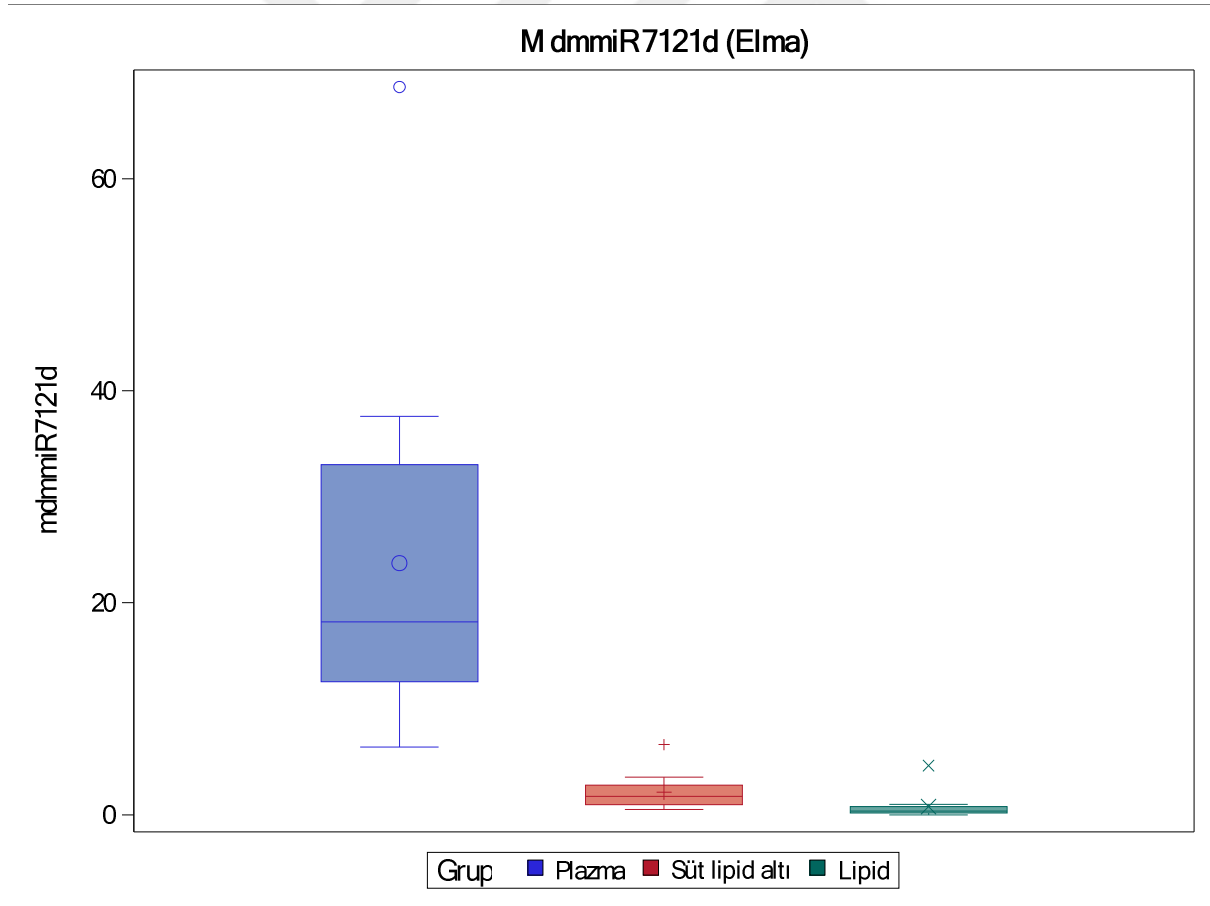
Tablo 4.11. Plazma, süt lipid altı ve süt lipid örneklerinde mdm-miR7121d ve referans U6 genlerinin CT, Δ CT ve $2^{-\Delta\Delta$ CT değerleri (P: plazma, S: süt lipid altı, L: süt lipid)

Mdm-miR7121d (Elma)												
Hasta no	P-CT	P-U6-CT	S-CT	S-U6-CT	L-CT	L-U6-CT	P- Δ CT	S- Δ CT	L- Δ CT	P- $2^{-\Delta\Delta$ CT	S- $2^{-\Delta\Delta$ CT	L- $2^{-\Delta\Delta$ CT
1	27,44	31,53	27,54	26,56	26,65	25,91	-4,09	0,98	0,74	17,00	0,51	0,60
2	26,80	31,05	26,50	27,99	26,22	28,43	-4,24	-1,49	-2,21	18,95	2,81	4,64
3	26,12	31,17	28,03	27,44	28,17	25,84	-5,05	0,60	2,33	33,02	0,66	0,20
4	26,21	31,44	27,84	29,67	27,75	27,35	-5,23	-1,83	0,40	37,59	3,56	0,76
5	26,02	30,82	28,30	31,03	27,81	27,79	-4,80	-2,73	0,02	27,80	6,62	0,99
6	25,30	31,40	28,13	28,24	27,86	24,20	-6,10	-0,11	3,66	68,66	1,08	0,08
7	26,67	30,86	28,15	28,09	28,99	27,72	-4,19	0,06	1,27	18,21	0,96	0,41
8	27,85	30,52	27,54	27,96	40,84	24,52	-2,67	-0,42	16,32	6,38	1,33	0,00
9	27,97	31,03	27,09	27,93	27,85	25,28	-3,06	-0,83	2,57	8,33	1,78	0,17
10	27,32	30,98	26,97	28,16	28,09	26,56	-3,66	-1,19	1,54	12,63	2,29	0,34
11	27,38	31,03	26,86	27,66	28,24	26,71	-3,65	-0,79	1,53	12,56	1,73	0,35

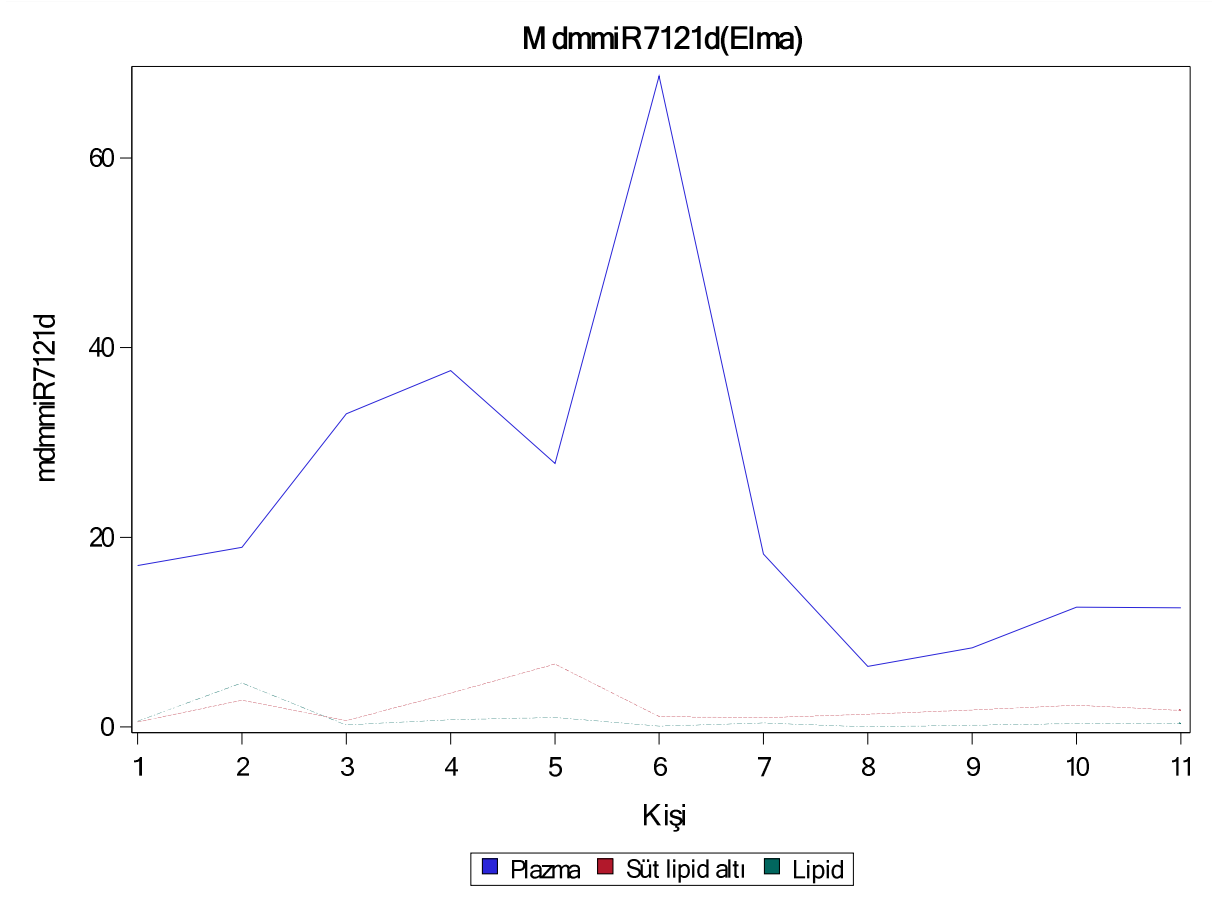
Tablo 4.12. Mdm-miR7121d'nin plazma, süt lipid altı ve süt lipid örneklerinde $2^{-\Delta\Delta CT}$ ortanca, alt çeyrek ve üst çeyrek değerleri

Mdm-miR7121d (Elma) n=33		Ortanca	Alt çeyrek	Üst Çeyrek
	Plazma (n=11)	18.2	12.6	33.0
	Süt lipid altı (n=11)	1.7	0.96	2.8
	Süt lipid (n=11)	0.35	0.17	0.76
p<0.001				

Mdm-miR7121d'nin plazma ve süt lipid altı örneklerinde $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri 1.5 katın üzerinde olması nedeniyle anlamlı kabul edilmiş olup, süt lipid kısmında $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri 1.5 katın altında bulunmuştur. Mdm-miR7121d'nin süt lipid kısmında bulunmadığı kabul edilmiştir. CT değerleri housekeeping ile karşılaştırıldığında anlamlı bir ekspresyon değeri bulunmamıştır. Varyans analizi ile yapılan karşılaştırmada gruplar arasındaki fark anlamlı bulunmuştur (p<0.001).



Şekil 4.7. Plazma, süt lipid altı ve süt lipid örneklerindeki mdm-miR7121d $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerlerinin dağılımı



Şekil 4.8. Her bir vakaya ait plazma, süt lipid altı ve süt lipid mdm-miR7121d $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerlerinin karşılaştırılması

Mdm-miR171i (Elma)

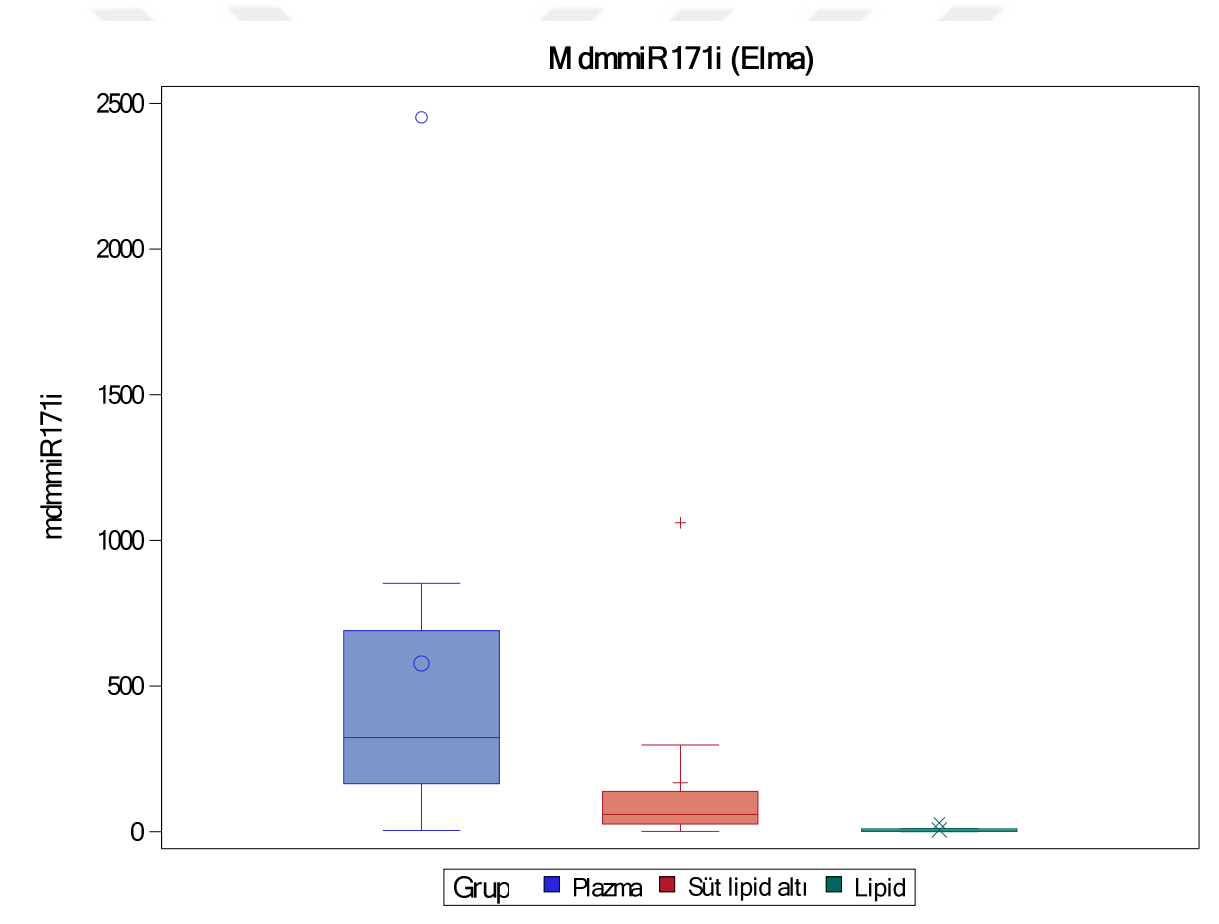
Tablo 4.13. Plazma, süt lipid altı ve süt lipid örneklerinde mdm-miR171i ve referans U6 genlerinin CT, Δ CT ve $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri (P: plazma, S: süt lipid altı, L: süt lipid)

Mdm-miR171i (Elma)												
Hasta no	P-CT	P-U6-CT	S-CT	S-U6-CT	L-CT	L-U6-CT	P- Δ CT	S- Δ CT	L- Δ CT	P- $2^{-\Delta\Delta CT}$	S- $2^{-\Delta\Delta CT}$	L- $2^{-\Delta\Delta CT}$
1	24,86	31,53	23,39	26,56	23,38	25,91	-6,67	-3,16	-2,53	102,02	8,95	5,79
2	21,67	31,05	21,55	27,99	23,53	28,43	-9,38	-6,44	-4,91	665,24	86,83	30,01
3	19,91	31,17	21,56	27,44	27,07	25,84	-11,26	-5,88	1,23	2451,64	58,76	0,42
4	23,32	31,44	23,03	29,67	26,71	27,35	-8,12	-6,64	-0,64	277,63	99,49	1,56
5	21,76	30,82	20,98	31,03	24,36	27,79	-9,06	-10,05	-3,44	532,80	1060,31	10,85
6	23,25	31,40	20,03	28,24	28,66	24,20	-8,15	-8,22	4,46	283,63	297,33	0,05
7	23,50	30,86	20,97	28,09	24,37	27,72	-7,37	-7,11	-3,34	164,97	138,35	10,14
8	21,09	30,52	22,73	27,96	25,17	24,52	-9,43	-5,22	0,65	689,44	37,39	0,64
9	22,69	31,03	27,58	27,93	26,33	25,28	-8,34	-0,34	1,05	323,27	1,27	0,48
10	21,24	30,98	23,44	28,16	24,39	26,56	-9,74	-4,72	-2,17	852,17	26,37	4,50
11	28,86	31,03	22,72	27,66	26,35	26,71	-2,17	-4,94	-0,37	4,50	30,68	1,29

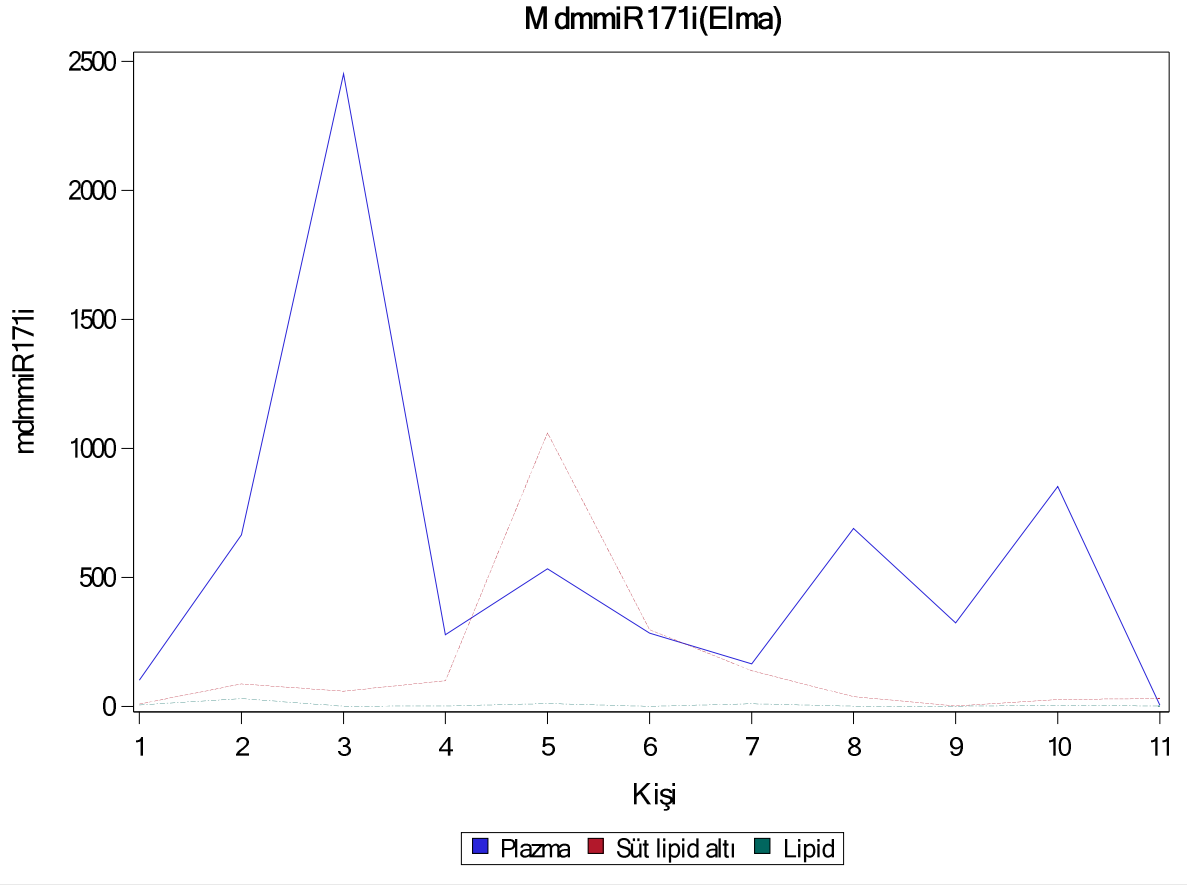
Tablo 4.14. Mdm-miR171i'nin plazma, süt lipid altı ve süt lipid örneklerinde $2^{-\Delta\Delta CT}$ ortanca, alt çeyrek ve üst çeyrek değerleri

Mdm-miR171i (Elma) n=33		Ortanca	Alt çeyrek	Üst Çeyrek
	Plazma (n=11)	323.3	165	689.4
	Süt lipid altı (n=11)	58.8	26.4	138.4
	Süt lipid (n=11)	1.6	0.5	10.1
p<0.001				

Mdm-miR171i'nin plazma, süt lipid altı ve süt lipid örneklerinde $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri 1.5 katın üzerinde olması nedeniyle anlamlı kabul edilmiş olup, varyans analizi ile bu üç gruba ait farklılık anlamlı bulunmuştur (p<0.001).



Şekil 4.9. Plazma, süt lipid altı ve süt lipid örneklerindeki mdm-miR171i $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerlerinin dağılımı



Şekil 4.10. Her bir vakaya ait plazma, süt lipid altı ve süt lipid mdm-miR171i $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerlerinin karşılaştırılması

Osa-miR168a-3p (Pirinç)

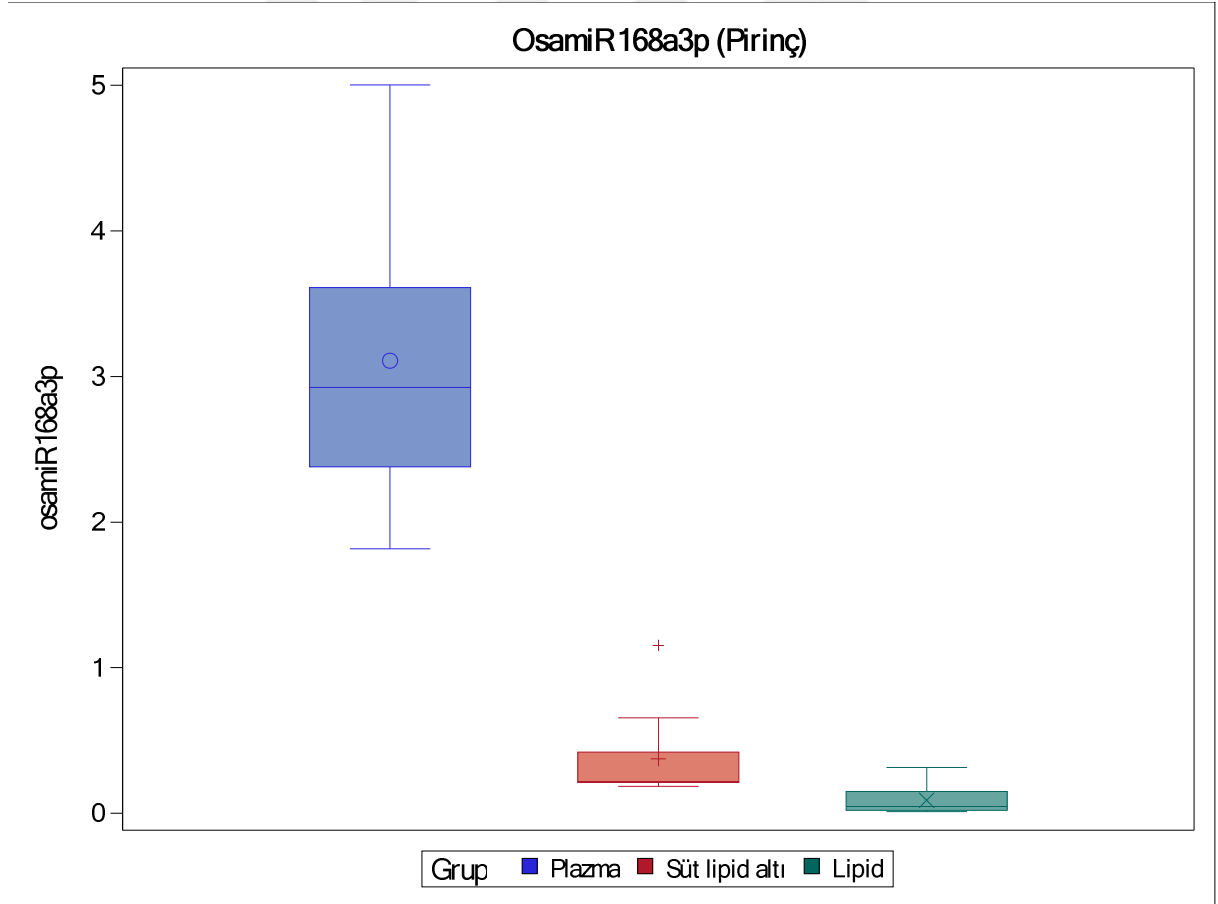
Tablo 4.15. Plazma, süt lipid altı ve süt lipid örneklerinde osa-miR168a-3p ve referans U6 genlerinin CT, Δ CT ve $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri (P: plazma, S: süt lipid altı, L: süt lipid)

Osa-miR168a-3p (Pirinç)												
Hasta no	P-CT	P-U6-CT	S-CT	S-U6-CT	L-CT	L-U6-CT	P- Δ CT	S- Δ CT	L- Δ CT	P- $2^{-\Delta\Delta CT}$	S- $2^{-\Delta\Delta CT}$	L- $2^{-\Delta\Delta CT}$
1	29,75	31,53	28,75	26,56	30,44	25,91	-1,78	2,19	4,52	3,44	0,22	0,04
2	29,50	31,05	30,23	27,99	30,10	28,43	-1,55	2,24	1,66	2,93	0,21	0,32
3	29,72	31,17	29,86	27,44	30,26	25,84	-1,45	2,43	4,42	2,73	0,19	0,05
4	29,67	31,44	30,28	29,67	30,76	27,35	-1,78	0,61	3,40	3,42	0,66	0,09
5	29,57	30,82	30,82	31,03	30,53	27,79	-1,25	-0,21	2,73	2,38	1,15	0,15
6	29,55	31,40	30,48	28,24	30,72	24,20	-1,85	2,23	6,52	3,61	0,21	0,01
7	29,84	30,86	29,74	28,09	30,23	27,72	-1,03	1,66	2,52	2,04	0,32	0,17
8	29,66	30,52	30,16	27,96	30,14	24,52	-0,86	2,20	5,62	1,82	0,22	0,02
9	29,03	31,03	29,55	27,93	30,65	25,28	-2,00	1,63	5,37	3,99	0,32	0,02
10	28,66	30,98	29,41	28,16	32,68	26,56	-2,32	1,25	6,13	5,00	0,42	0,01
11	29,53	31,03	29,97	27,66	30,31	26,71	-1,51	2,31	3,60	2,84	0,20	0,08

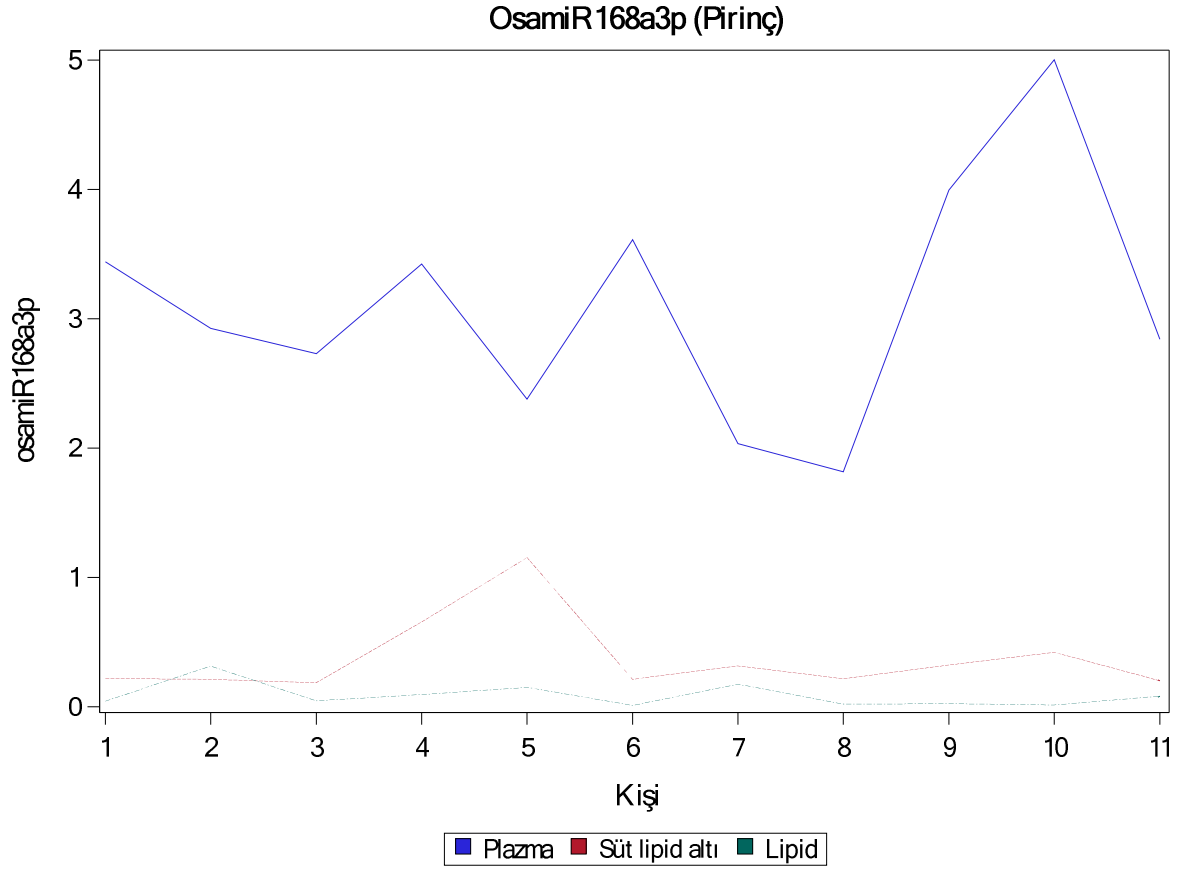
Tablo 4.16. Osa-miR168a-3p 'nin plazma, süt lipid altı ve süt lipid örneklerinde $2^{-\Delta\Delta CT}$ ortanca, alt çeyrek ve üst çeyrek değerleri

Osa-miR168a-3p (Pirinç) n=33		Ortanca	Alt çeyrek	Üst Çeyrek
	Plazma (n=11)	2.9	2.4	3.6
	Süt lipid altı (n=11)	0.22	0.21	0.4
	Süt lipid (n=11)	0.05	0.02	0.15
p<0.001				

Osa-miR168a-3p 'nin plazma örneklerinde $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri 1.5 katın üzerinde olması nedeniyle anlamlı kabul edilmiş olup, süt lipid altı ve süt lipid kısmında $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri 1.5 katın altında bulunmuştur. Osa-miR168a-3p'nin sütte bulunmadığı kabul edilmiştir. Süt örneklerinde CT değerleri housekeeping ile karşılaştırıldığında anlamlı bir ekspresyon değeri bulunmamıştır. Varyans analizi ile yapılan karşılaştırmada gruplar arasındaki fark anlamlı bulunmuştur (p<0.001).



Şekil 4.11. Plazma, süt lipid altı ve süt lipid örneklerindeki osa-miR168a-3p $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerlerinin dağılımı



Şekil 4.12. Her bir vakaya ait plazma, süt lipid altı ve süt lipid osa-miR168a-3p $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerlerinin karşılaştırılması

Osa-miR168a-5p (Pirinç)

Tablo 4.17. Plazma, süt lipid altı ve süt lipid örneklerinde osa-miR168a-5p ve referans U6 genlerinin CT, Δ CT ve $2^{-\Delta\Delta$ CT değerleri (P: plazma, S: süt lipid altı, L: süt lipid)

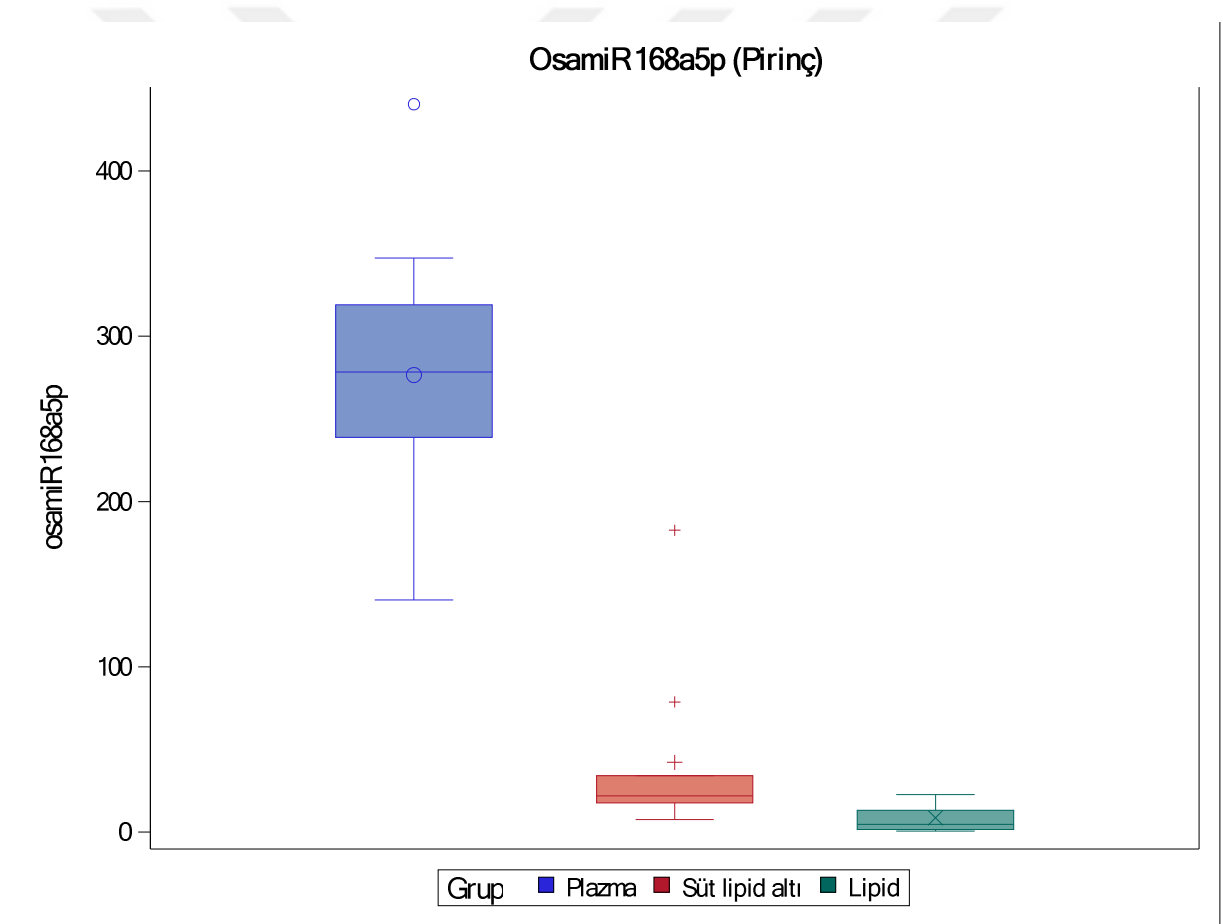
Osa-miR-168a-5p (Pirinç)												
Hasta no	P-CT	P-U6-CT	S-CT	S-U6-CT	L-CT	L-U6-CT	P- Δ CT	S- Δ CT	L- Δ CT	P- $2^{-\Delta\Delta$ CT	S- $2^{-\Delta\Delta$ CT	L- $2^{-\Delta\Delta$ CT
1	24,16	31,53	23,63	26,56	23,68	25,91	-7,37	-2,92	-2,23	165,88	7,59	4,70
2	22,88	31,05	23,00	27,99	24,03	28,43	-8,16	-4,99	-4,40	286,70	31,78	21,19
3	22,88	31,17	23,34	27,44	24,04	25,84	-8,29	-4,10	-1,80	313,96	17,13	3,49
4	22,66	31,44	23,37	29,67	24,24	27,35	-8,78	-6,30	-3,12	440,43	78,74	8,67
5	22,92	30,82	23,51	31,03	23,29	27,79	-7,90	-7,51	-4,50	238,81	182,59	22,62
6	23,08	31,40	24,11	28,24	24,99	24,20	-8,32	-4,14	0,79	319,07	17,61	0,58
7	22,93	30,86	23,00	28,09	24,04	27,72	-7,94	-5,09	-3,68	244,98	33,96	12,81
8	23,39	30,52	23,51	27,96	23,91	24,52	-7,13	-4,45	-0,61	140,38	21,83	1,53
9	22,91	31,03	23,76	27,93	25,12	25,28	-8,12	-4,16	-0,16	278,34	17,94	1,12
10	22,92	30,98	23,07	28,16	22,84	26,56	-8,06	-5,09	-3,72	266,52	34,08	13,18
11	22,59	31,03	23,32	27,66	24,55	26,71	-8,44	-4,34	-2,17	347,35	20,21	4,49

Tablo 4.18. Osa-miR168a-5p 'nin plazma, süt lipid altı ve süt lipid örneklerinde $2^{-\Delta\Delta CT}$ ortanca, alt çeyrek ve üst çeyrek değerleri

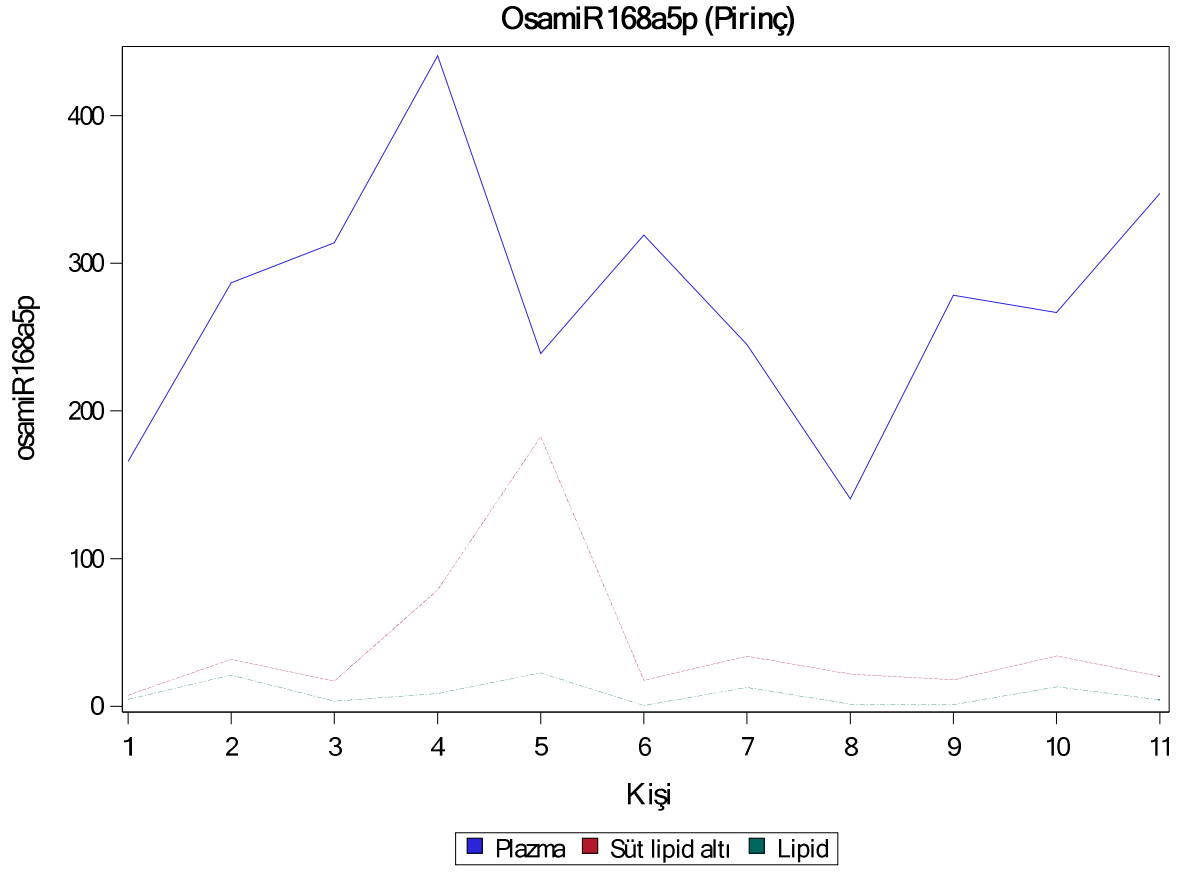
Osa-miR168a-5p (Pirinç) n=33		Ortanca	Alt çeyrek	Üst Çeyrek
	Plazma (n=11)	278.3	238.8	319.1
	Süt lipid altı (n=11)	21.8	17.6	34.1
	Süt lipid (n=11)	4.7	1.5	13.2

p<0.001

Osa-miR168a-5p 'nin plazma, süt lipid altı ve süt lipid örneklerinde $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri 1.5 katın üzerinde olması nedeniyle anlamlı kabul edilmiş olup, varyans analizi ile bu üç gruba ait farklılık anlamlı bulunmuştur (p<0.001).



Şekil 4.13. Plazma, süt lipid altı ve süt lipid örneklerindeki osa-miR168a-5p $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerlerinin dağılımı



Şekil 4.14. Her bir vakaya ait plazma, süt lipid altı ve süt lipid osa-miR168a-5p $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerlerinin karşılaştırılması

Osa-miR156a (Pirinç)

Tablo 4.19. Plazma, süt lipid altı ve süt lipid örneklerinde osa-miR156a ve referans U6 genlerinin CT, Δ CT ve $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri (P: plazma, S: süt lipid altı, L: süt lipid)

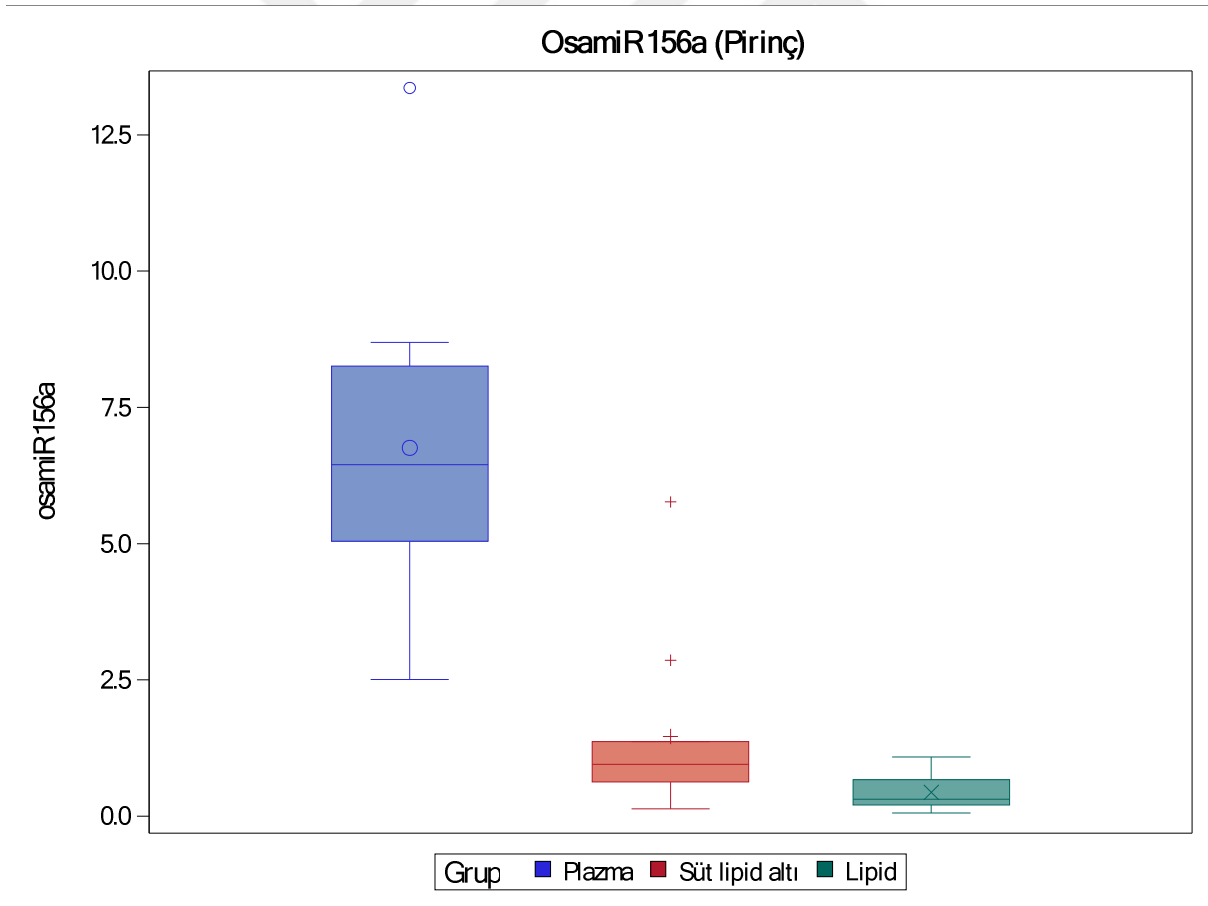
Osa-miR156a (Pirinç)												
Hasta no	P-CT	P-U6-CT	S-CT	S-U6-CT	L-CT	L-U6-CT	P- Δ CT	S- Δ CT	L- Δ CT	P- $2^{-\Delta\Delta CT}$	S- $2^{-\Delta\Delta CT}$	L- $2^{-\Delta\Delta CT}$
1	29,05	31,53	29,45	26,56	27,74	25,91	-2,48	2,90	1,83	5,57	0,13	0,28
2	28,71	31,05	28,92	27,99	28,55	28,43	-2,33	0,93	0,12	5,04	0,52	0,92
3	28,22	31,17	27,84	27,44	25,72	25,84	-2,95	0,40	-0,12	7,70	0,76	1,08
4	30,11	31,44	28,15	29,67	29,03	27,35	-1,33	-1,52	1,68	2,51	2,86	0,31
5	28,22	30,82	28,50	31,03	28,37	27,79	-2,60	-2,53	0,58	6,07	5,77	0,67
6	28,28	31,40	28,92	28,24	25,63	24,20	-3,12	0,68	1,43	8,69	0,63	0,37
7	28,16	30,86	27,69	28,09	28,75	27,72	-2,71	-0,39	1,03	6,52	1,31	0,49
8	28,47	30,52	27,96	27,96	26,80	24,52	-2,06	0,00	2,28	4,16	1,00	0,21
9	27,29	31,03	28,00	27,93	29,32	25,28	-3,74	0,07	4,04	13,36	0,95	0,06
10	28,29	30,98	27,71	28,16	28,32	26,56	-2,69	-0,45	1,76	6,45	1,37	0,30
11	27,99	31,03	27,99	27,66	29,51	26,71	-3,05	0,33	2,80	8,26	0,80	0,14

Tablo 4.20. Osa-miR156a 'nın plazma, süt lipid altı ve süt lipid örneklerinde $2^{-\Delta\Delta CT}$ ortanca, alt çeyrek ve üst çeyrek değerleri

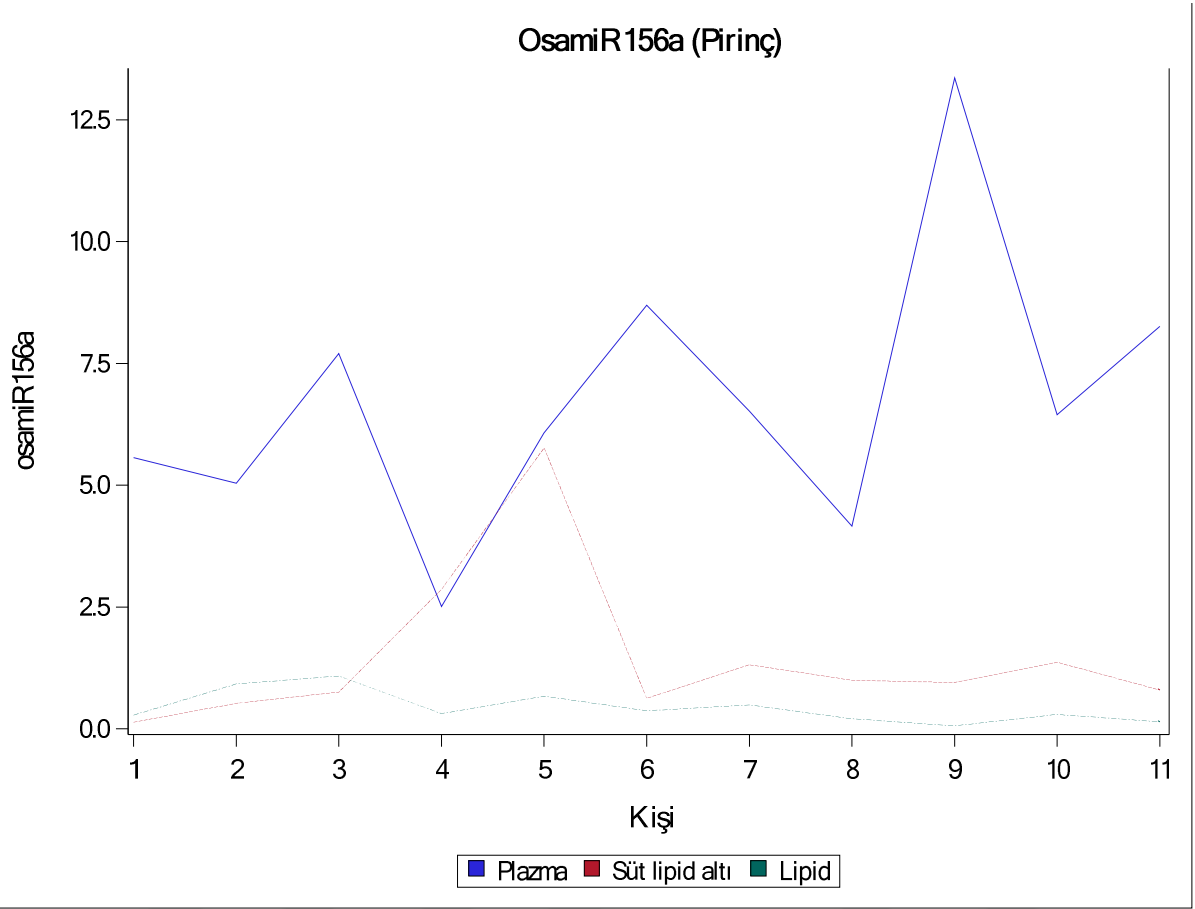
Osa-miR156a (Pirinç) n=33		Ortanca	Alt çeyrek	Üst Çeyrek
	Plazma (n=11)	6.4	5.0	8.3
	Süt lipid altı (n=11)	0.9	0.6	1.4
	Süt lipid (n=11)	0.3	0.2	0.7

p<0.001

Osa-miR156a 'nın plazma örneklerinde $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri 1.5 katın üzerinde olması nedeniyle anlamlı kabul edilmiş olup, süt lipid altı ve süt lipid kısmında $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri 1.5 katın altında bulunmuştur. Osa-miR156a 'nın sütte bulunmadığı kabul edilmiştir. Süt örneklerinde CT değerleri housekeeping ile karşılaştırıldığında anlamlı bir ekspresyon değeri bulunmamıştır. Varyans analizi ile yapılan karşılaştırmada gruplar arasındaki fark anlamlı bulunmuştur (p<0.001).



Şekil 4.15. Plazma, süt lipid altı ve süt lipid örneklerindeki osa-miR156a $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerlerinin dağılımı



Şekil 4.16. Her bir vakaya ait plazma, süt lipid altı ve süt lipid osa-miR168a-5p $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerlerinin karşılaştırılması

Tae-miR167a (Buğday)

Tablo 4.21. Plazma, süt lipid altı ve süt lipid örneklerinde tae-miR167a ve referans U6 genlerinin CT, Δ CT ve $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri (P: plazma, S: süt lipid altı, L: süt lipid)

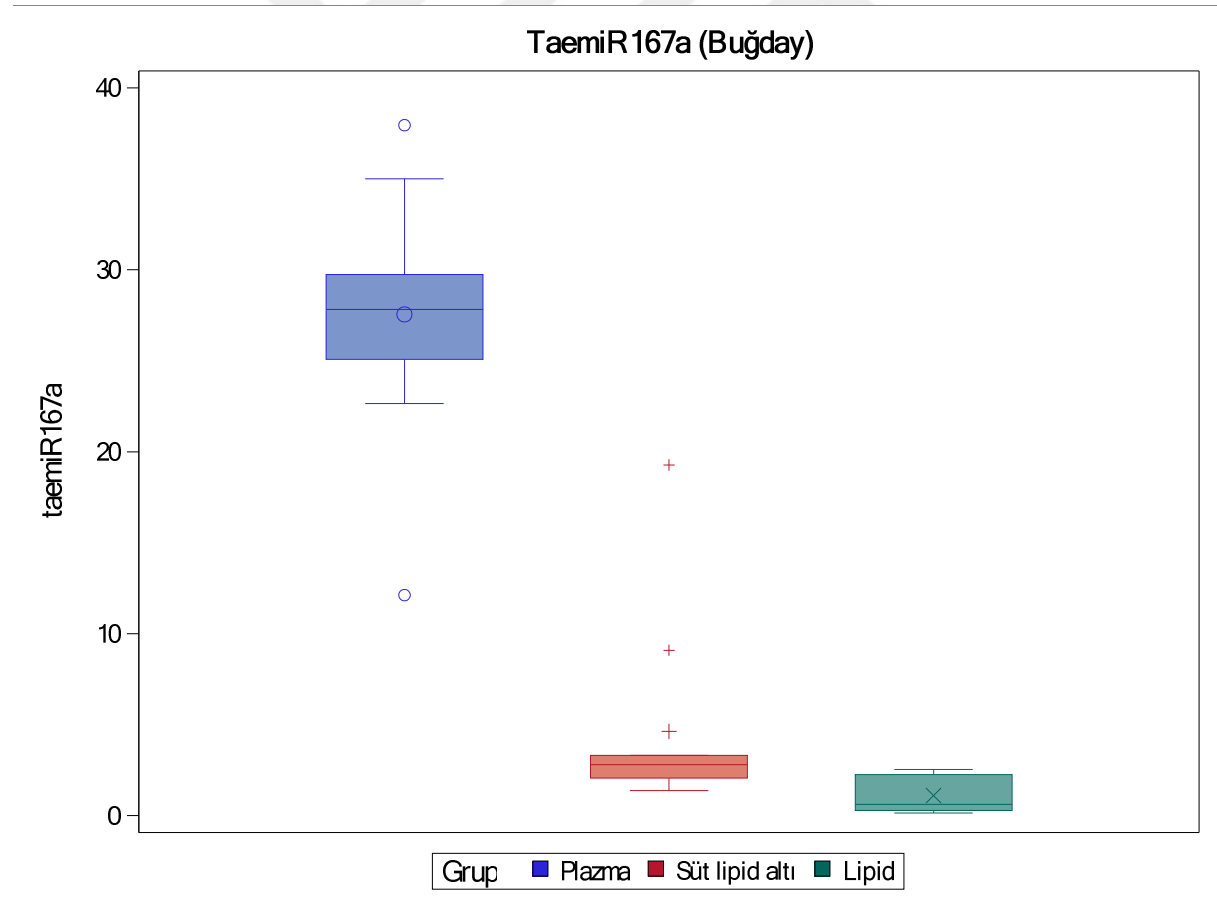
Tae-miR-167a (Buğday)												
Hasta no	P-CT	P-U6-CT	S-CT	S-U6-CT	L-CT	L-U6-CT	P- Δ CT	S- Δ CT	L- Δ CT	P- $2^{-\Delta\Delta CT}$	S- $2^{-\Delta\Delta CT}$	L- $2^{-\Delta\Delta CT}$
1	26,78	31,53	26,09	26,56	26,60	25,91	-4,75	-0,46	0,69	26,93	1,38	0,62
2	26,19	31,05	26,31	27,99	27,09	28,43	-4,86	-1,68	-1,35	28,95	3,21	2,55
3	26,28	31,17	26,57	27,44	26,53	25,84	-4,89	-0,86	0,69	29,73	1,82	0,62
4	26,31	31,44	26,48	29,67	26,58	27,35	-5,13	-3,18	-0,77	35,00	9,09	1,71
5	26,04	30,82	26,76	31,03	26,52	27,79	-4,78	-4,27	-1,28	27,48	19,27	2,42
6	26,15	31,40	26,76	28,24	26,58	24,20	-5,25	-1,49	2,38	37,95	2,80	0,19
7	26,21	30,86	26,68	28,09	26,53	27,72	-4,65	-1,41	-1,18	25,09	2,65	2,27
8	26,92	30,52	26,35	27,96	26,35	24,52	-3,60	-1,61	1,83	12,12	3,05	0,28
9	26,23	31,03	26,20	27,93	26,88	25,28	-4,80	-1,73	1,60	27,83	3,32	0,33
10	26,48	30,98	26,93	28,16	29,35	26,56	-4,50	-1,23	2,79	22,66	2,35	0,14
11	26,16	31,03	26,61	27,66	26,60	26,71	-4,87	-1,05	-0,11	29,34	2,07	1,08

Tablo 4.22. Tae-miR167a'nın plazma, süt lipid altı ve süt lipid örneklerinde $2^{-\Delta\Delta CT}$ ortanca, alt çeyrek ve üst çeyrek değerleri

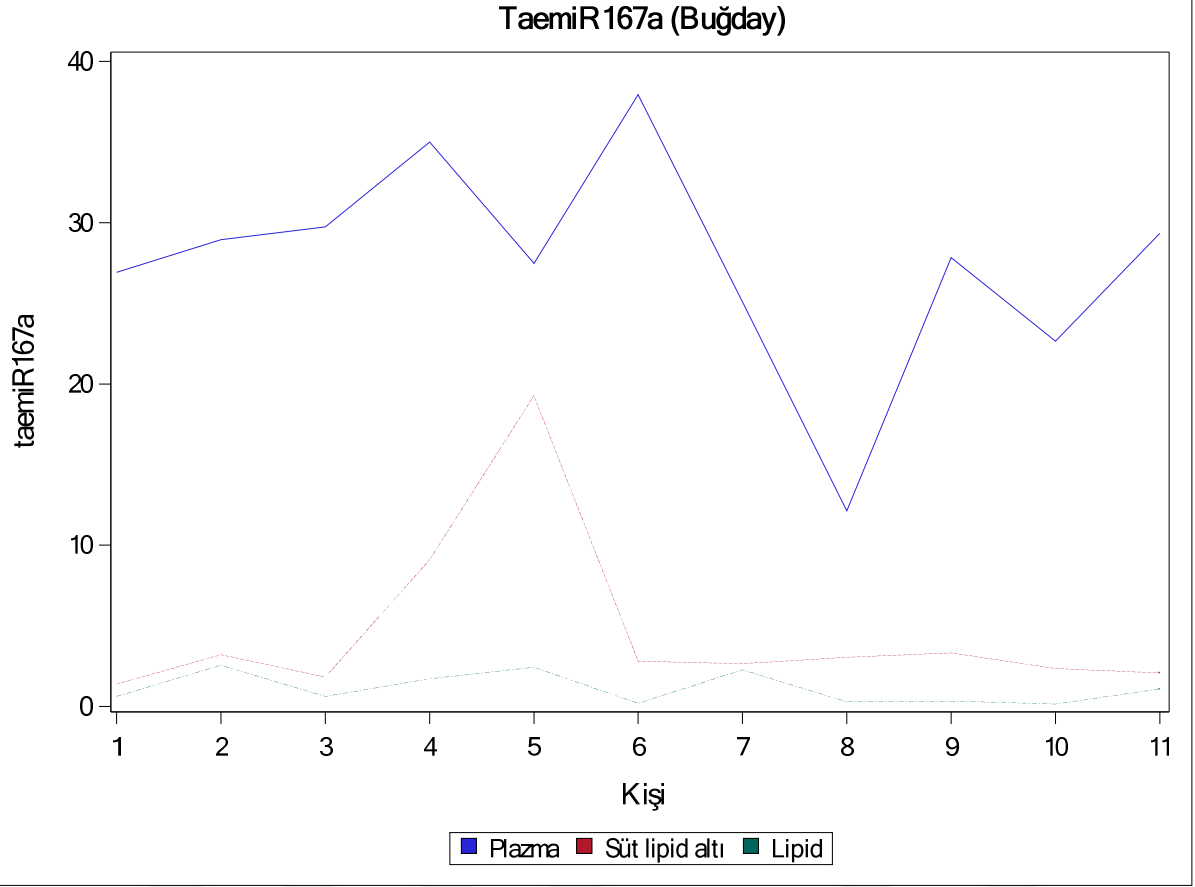
Tae-miR167a (Buğday) n=33		Ortanca	Alt çeyrek	Üst Çeyrek
	Plazma (n=11)	27.8	25.1	29.7
	Süt lipid altı (n=11)	2.8	2.1	3.3
	Süt lipid (n=11)	0.6	0.3	2.3

p<0.001

Tae-miR167a'nın plazma ve süt lipid altı örneklerinde $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri 1.5 katın üzerinde olması nedeniyle anlamlı kabul edilmiş olup, süt lipid kısmında $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri 1.5 katın altında bulunmuştur. Tae-miR167a'nın süt lipid kısmında bulunmadığı kabul edilmiştir. CT değerleri housekeeping ile karşılaştırıldığında anlamlı bir ekspresyon değeri bulunmamıştır. Varyans analizi ile yapılan karşılaştırmada gruplar arasındaki fark anlamlı bulunmuştur (p<0.001).



Şekil 4.17. Plazma, süt lipid altı ve süt lipid örneklerindeki tae-miR167a $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerlerinin dağılımı



Şekil 4.18. Her bir vakaya ait plazma, süt lipid altı ve süt lipid tae-miR167a $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerlerinin karşılaştırılması

Tae-miR167b (Buğday)

Tablo 4.23. Plazma, süt lipid altı ve süt lipid örneklerinde tae-miR167b ve referans U6 genlerinin CT, Δ CT ve $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri (P: plazma, S: süt lipid altı, L: süt lipid)

Tae-miR167b (Buğday)												
Hasta no	P-CT	P-U6-CT	S-CT	S-U6-CT	L-CT	L-U6-CT	P- Δ CT	S- Δ CT	L- Δ CT	P- $2^{-\Delta\Delta CT}$	S- $2^{-\Delta\Delta CT}$	L- $2^{-\Delta\Delta CT}$
1	34,66	31,53	33,81	26,56	33,63	25,91	3,13	7,26	7,72	0,11	0,01	0,00
2	33,60	31,05	33,50	27,99	33,90	28,43	2,55	5,51	5,46	0,17	0,02	0,02
3	33,68	31,17	33,53	27,44	34,39	25,84	2,51	6,09	8,55	0,18	0,01	0,00
4	33,77	31,44	33,89	29,67	34,13	27,35	2,33	4,22	6,78	0,20	0,05	0,01
5	33,74	30,82	33,68	31,03	34,38	27,79	2,92	2,65	6,59	0,13	0,16	0,01
6	34,24	31,40	33,84	28,24	33,95	24,20	2,84	5,59	9,75	0,14	0,02	0,00
7	33,58	30,86	33,86	28,09	33,82	27,72	2,72	5,78	6,10	0,15	0,02	0,01
8	34,04	30,52	33,90	27,96	32,89	24,52	3,51	5,94	8,37	0,09	0,02	0,00
9	33,91	31,03	33,91	27,93	33,87	25,28	2,88	5,99	8,59	0,14	0,02	0,00
10	33,73	30,98	33,87	28,16	33,81	26,56	2,75	5,71	7,26	0,15	0,02	0,01
11	33,62	31,03	33,49	27,66	33,89	26,71	2,59	5,83	7,18	0,17	0,02	0,01

Tae-miR 167b'nin plazma, süt lipid altı ve süt lipid örneklerinde $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri 1.5 katın altında olması nedeniyle anlamsız kabul edilmiştir. CT değerleri housekeeping ile karşılaştırıldığında anlamlı bir ekspresyon değeri bulunmamıştır.

Tae-miR159a (Buğday)

Tablo 4.24. Plazma, süt lipid altı ve süt lipid örneklerinde tae-miR159a ve referans U6 genlerinin CT, Δ CT ve $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri (P: plazma, S: süt lipid altı, L: süt lipid)

Tae-miR159a (Buğday)												
Hasta no	P-CT	P-U6-CT	S-CT	S-U6-CT	L-CT	L-U6-CT	P- Δ CT	S- Δ CT	L- Δ CT	P- $2^{-\Delta\Delta CT}$	S- $2^{-\Delta\Delta CT}$	L- $2^{-\Delta\Delta CT}$
1	34,16	31,53	34,10	26,56	31,19	25,91	2,63	7,54	5,28	0,16	0,01	0,03
2	33,73	31,05	34,35	27,99	34,72	28,43	2,68	6,36	6,28	0,16	0,01	0,01
3	33,79	31,17	34,39	27,44	34,48	25,84	2,62	6,95	8,64	0,16	0,01	0,00
4	34,51	31,44	34,05	29,67	34,63	27,35	3,07	4,38	7,28	0,12	0,05	0,01
5	34,18	30,82	33,41	31,03	35,13	27,79	3,36	2,39	7,33	0,10	0,19	0,01
6	33,85	31,40	34,49	28,24	34,53	24,20	2,45	6,25	10,33	0,18	0,01	0,00
7	33,95	30,86	34,31	28,09	34,75	27,72	3,09	6,22	7,03	0,12	0,01	0,01
8	34,20	30,52	34,48	27,96	34,87	24,52	3,68	6,53	10,35	0,08	0,01	0,00
9	33,92	31,03	33,62	27,93	34,99	25,28	2,89	5,69	9,71	0,13	0,02	0,00
10	34,36	30,98	34,46	28,16	35,05	26,56	3,38	6,30	8,49	0,10	0,01	0,00
11	34,88	31,03	33,41	27,66	34,95	26,71	3,85	5,76	8,23	0,07	0,02	0,00

Tae-miR 159a'nın plazma, süt lipid altı ve süt lipid örneklerinde $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri 1.5 katın altında olması nedeniyle anlamsız kabul edilmiştir. CT değerleri housekeeping ile karşılaştırıldığında anlamlı bir ekspresyon değeri bulunmamıştır.

Tae-miR159b (Buğday)

Tablo 4.25. Plazma, süt lipid altı ve süt lipid örneklerinde tae-miR159b ve referans U6 genlerinin CT, Δ CT ve $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri (P: plazma, S: süt lipid altı, L: süt lipid)

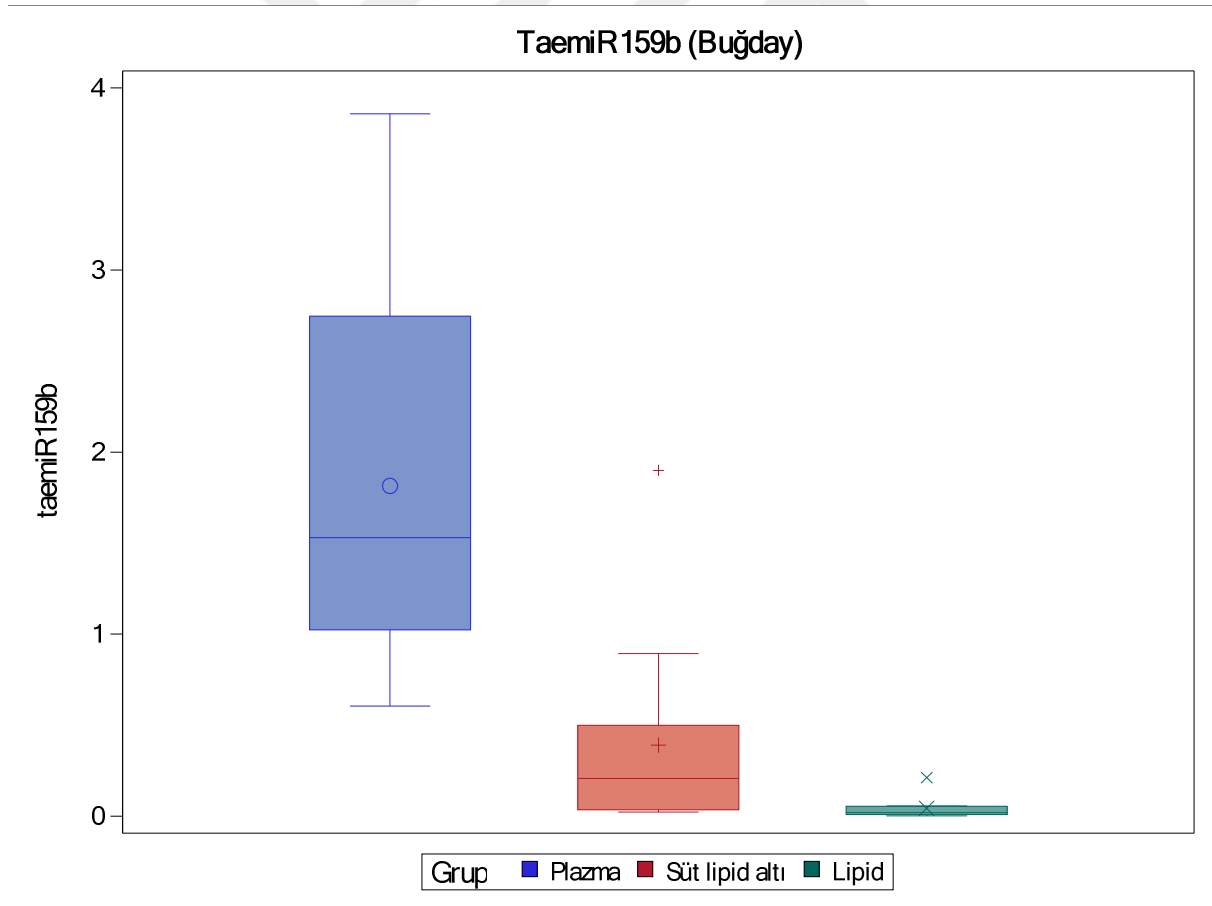
Tae-miR159b (Buğday)												
Hasta no	P-CT	P-U6-CT	S-CT	S-U6-CT	L-CT	L-U6-CT	P- Δ CT	S- Δ CT	L- Δ CT	P- $2^{-\Delta\Delta CT}$	S- $2^{-\Delta\Delta CT}$	L- $2^{-\Delta\Delta CT}$
1	32,25	31,53	31,37	26,56	31,65	25,91	0,73	4,81	5,73	0,60	0,04	0,02
2	30,43	31,05	31,27	27,99	32,58	28,43	-0,61	3,28	4,15	1,53	0,10	0,06
3	29,71	31,17	32,67	27,44	34,44	25,84	-1,46	5,24	8,60	2,75	0,03	0,00
4	29,49	31,44	30,67	29,67	34,27	27,35	-1,95	1,00	6,91	3,86	0,50	0,01
5	30,56	30,82	30,10	31,03	30,03	27,79	-0,26	-0,93	2,24	1,20	1,90	0,21
6	30,13	31,40	30,18	28,24	28,67	24,20	-1,27	1,93	4,47	2,42	0,26	0,04
7	29,36	30,86	30,09	28,09	31,90	27,72	-1,51	2,00	4,18	2,84	0,25	0,06
8	30,78	30,52	33,38	27,96	32,40	24,52	0,26	5,42	7,88	0,84	0,02	0,00
9	30,98	31,03	30,19	27,93	29,83	25,28	-0,05	2,27	4,54	1,04	0,21	0,04
10	30,95	30,98	28,32	28,16	32,29	26,56	-0,03	0,16	5,73	1,02	0,89	0,02
11	30,13	31,03	31,04	27,66	33,47	26,71	-0,90	3,38	6,76	1,87	0,10	0,01

Tablo 4.26. Tae-miR159b'nin plazma, süt lipid altı ve süt lipid örneklerinde $2^{-\Delta\Delta CT}$ ortanca, alt çeyrek ve üst çeyrek değerleri

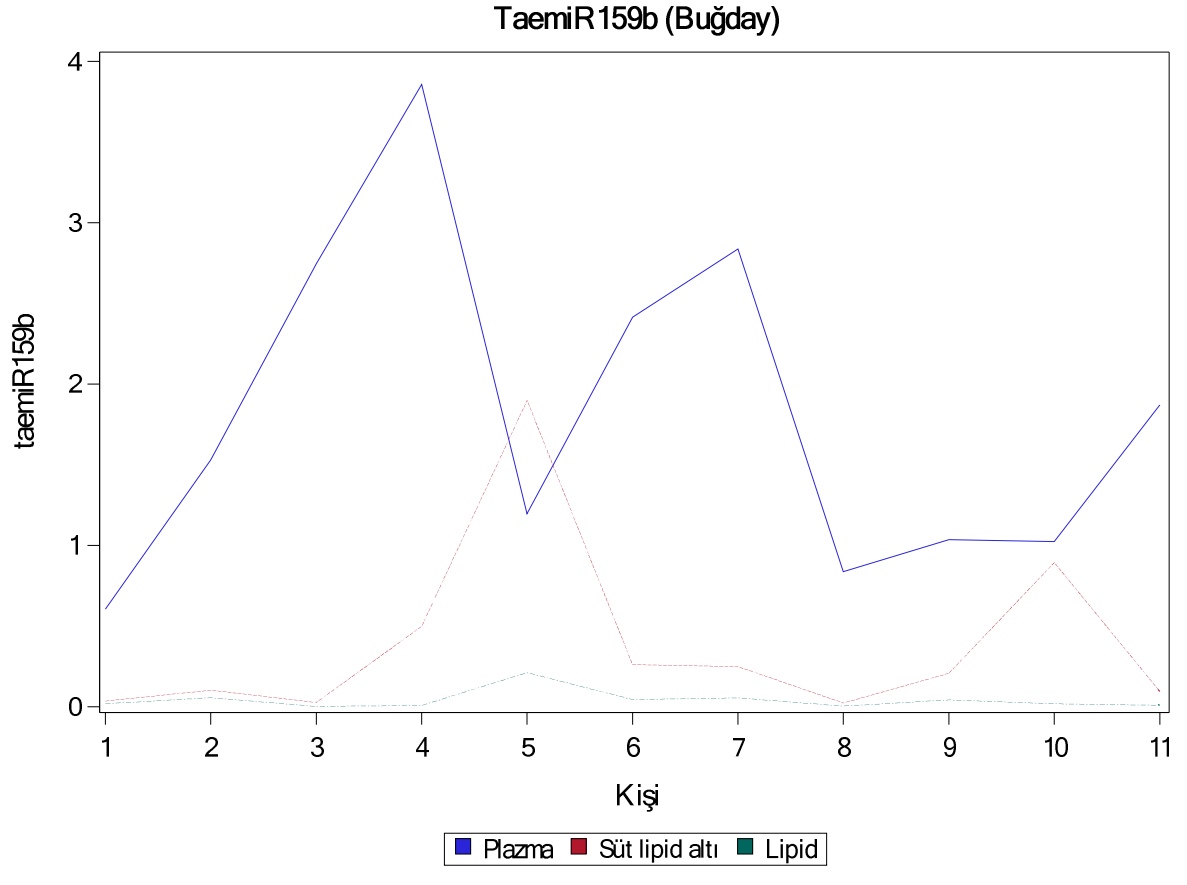
Tae-miR159b (Buğday) n=33		Ortanca	Alt çeyrek	Üst Çeyrek
	Plazma (n=11)	1.5	1.0	2.7
	Süt lipid altı (n=11)	0.2	0.03	0.5
	Süt lipid (n=11)	0.01	0.00	0.05

p<0.001

Tae-miR159b'nin plazma örneklerinde $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri 1.5 katın üzerinde olması nedeniyle anlamlı kabul edilmiş olup, süt lipid altı ve süt lipid kısmında $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri 1.5 katın altında bulunmuştur. Tae-miR159b'nin sütte bulunmadığı kabul edilmiştir. Süt örneklerinde CT değerleri housekeeping ile karşılaştırıldığında anlamlı bir ekspresyon değeri bulunmamıştır. Varyans analizi ile yapılan karşılaştırmada gruplar arasındaki fark anlamlı bulunmuştur (p<0.001).



Şekil 4.19. Plazma, süt lipid altı ve süt lipid örneklerindeki tae-miR159b $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerlerinin dağılımı



Şekil 4.20. Her bir vakaya ait plazma, süt lipid altı ve süt lipid taemiR159b $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerlerinin karşılaştırılması

Gma-miR1520d (Soya)

Tablo 4.27. Plazma, süt lipid altı ve süt lipid örneklerinde gma-miR1520d ve referans U6 genlerinin CT, Δ CT ve $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri (P: plazma, S: süt lipid altı, L: süt lipid)

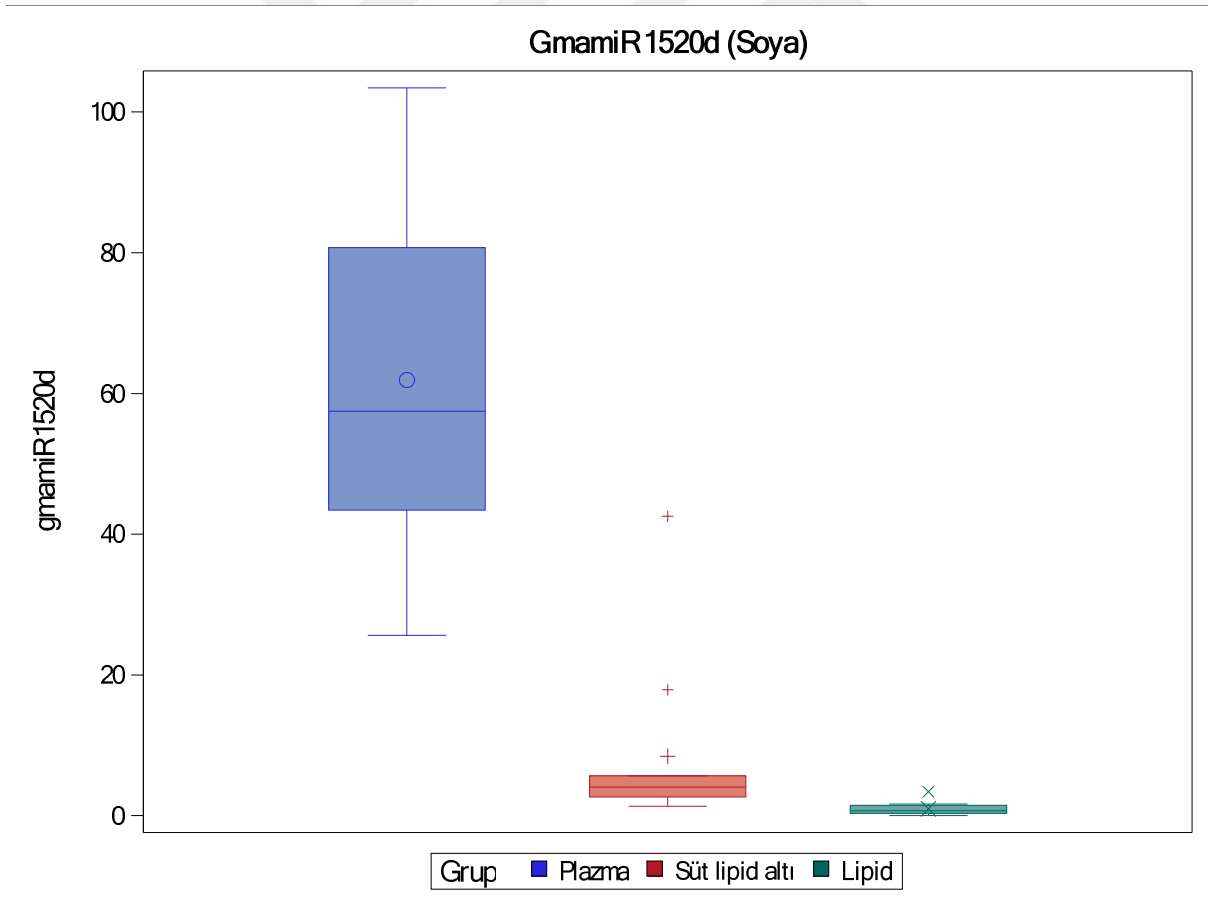
Gma-miR1520d (Soya)												
Hasta no	P-CT	P-U6-CT	S-CT	S-U6-CT	L-CT	L-U6-CT	P- Δ CT	S- Δ CT	L- Δ CT	P- $2^{-\Delta\Delta CT}$	S- $2^{-\Delta\Delta CT}$	L- $2^{-\Delta\Delta CT}$
1	25,38	31,53	25,47	26,56	26,85	25,91	-6,15	-1,09	0,93	71,03	2,12	0,52
2	25,20	31,05	25,58	27,99	26,66	28,43	-5,84	-2,41	-1,77	57,46	5,32	3,42
3	24,83	31,17	26,99	27,44	27,27	25,84	-6,33	-0,44	1,43	80,72	1,36	0,37
4	24,75	31,44	25,51	29,67	27,25	27,35	-6,69	-4,16	-0,10	103,44	17,89	1,07
5	24,76	30,82	25,62	31,03	27,06	27,79	-6,06	-5,41	-0,74	66,94	42,55	1,67
6	24,86	31,40	25,74	28,24	30,06	24,20	-6,54	-2,50	5,86	93,19	5,66	0,02
7	25,42	30,86	26,06	28,09	27,16	27,72	-5,44	-2,02	-0,56	43,40	4,06	1,47
8	25,84	30,52	26,11	27,96	27,11	24,52	-4,68	-1,84	2,59	25,63	3,59	0,17
9	25,36	31,03	26,30	27,93	26,90	25,28	-5,67	-1,63	1,62	50,86	3,09	0,33
10	25,74	30,98	26,00	28,16	26,62	26,56	-5,24	-2,16	0,07	37,88	4,48	0,96
11	25,37	31,03	26,25	27,66	27,21	26,71	-5,66	-1,41	0,50	50,59	2,66	0,71

Tablo 4.28. Gma-miR1520d 'nin plazma, süt lipid altı ve süt lipid örneklerinde $2^{-\Delta\Delta CT}$ ortanca, alt çeyrek ve üst çeyrek değerleri

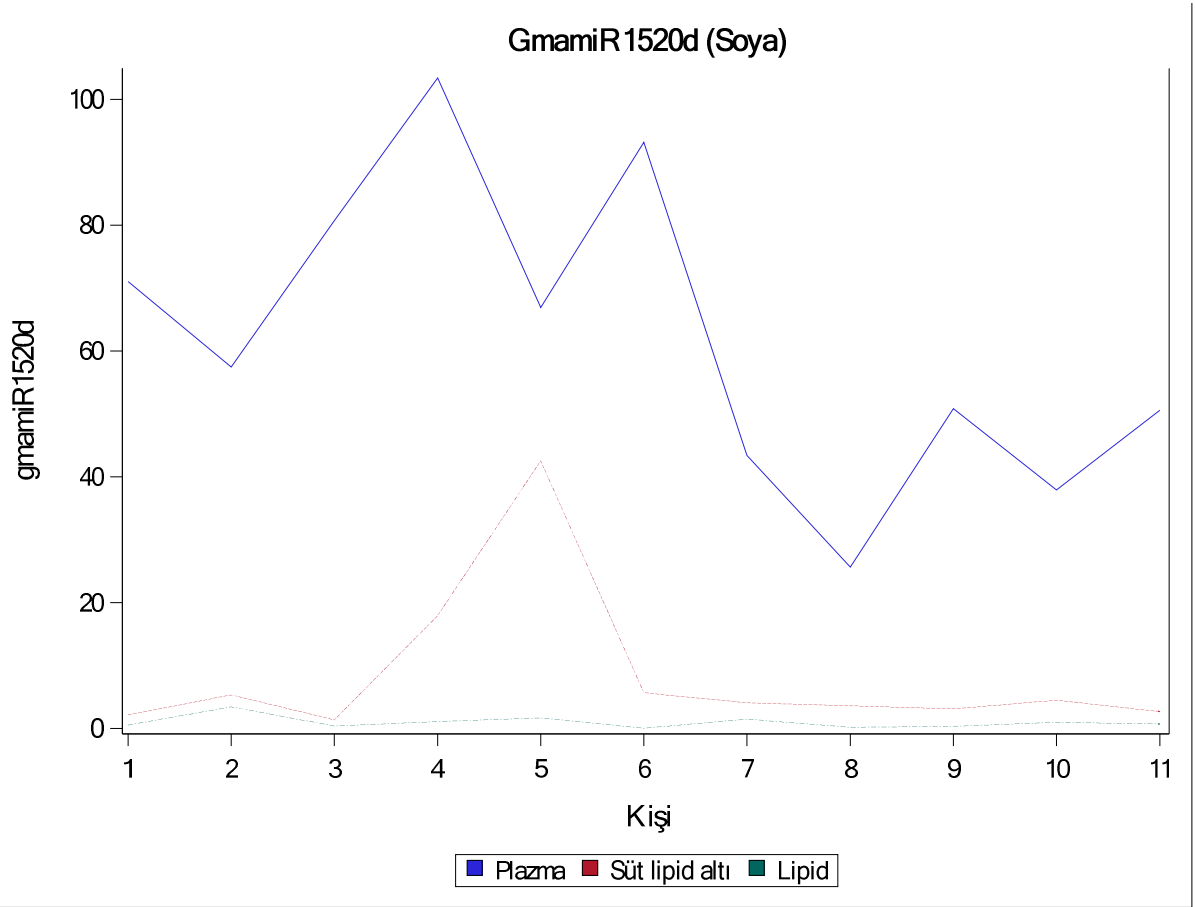
Gma-miR1520d (soya) n=33		Ortanca	Alt çeyrek	Üst Çeyrek
	Plazma (n=11)	57.5	43.4	80.7
	Süt lipid altı (n=11)	4.05	2.65	5.66
	Süt lipid (n=11)	0.7	0.3	1.5

p<0.001

Gma-miR1520d 'nin plazma ve süt lipid altı örneklerinde $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri 1.5 katın üzerinde olması nedeniyle anlamlı kabul edilmiş olup, süt lipid kısmında $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri 1.5 katın altında bulunmuştur. Gma-miR1520d 'nin süt lipid kısmında bulunmadığı kabul edilmiştir. CT değerleri housekeeping ile karşılaştırıldığında anlamlı bir ekspresyon değeri bulunmamıştır. Varyans analizi ile yapılan karşılaştırmada gruplar arasındaki fark anlamlı bulunmuştur (p<0.001).



Şekil 4.21. Plazma, süt lipid altı ve süt lipid örneklerindeki gma-miR1520d $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerlerinin dağılımı



Şekil 4.22. Her bir vakaya ait plazma, süt lipid altı ve süt lipid gma-miR1520d $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerlerinin karşılaştırılması

Gma-miR156b (Soya)

Tablo 4.29. Plazma, süt lipid altı ve süt lipid örneklerinde gma-miR156b ve referans U6 genlerinin CT, Δ CT ve $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri (P: plazma, S: süt lipid altı, L: süt lipid)

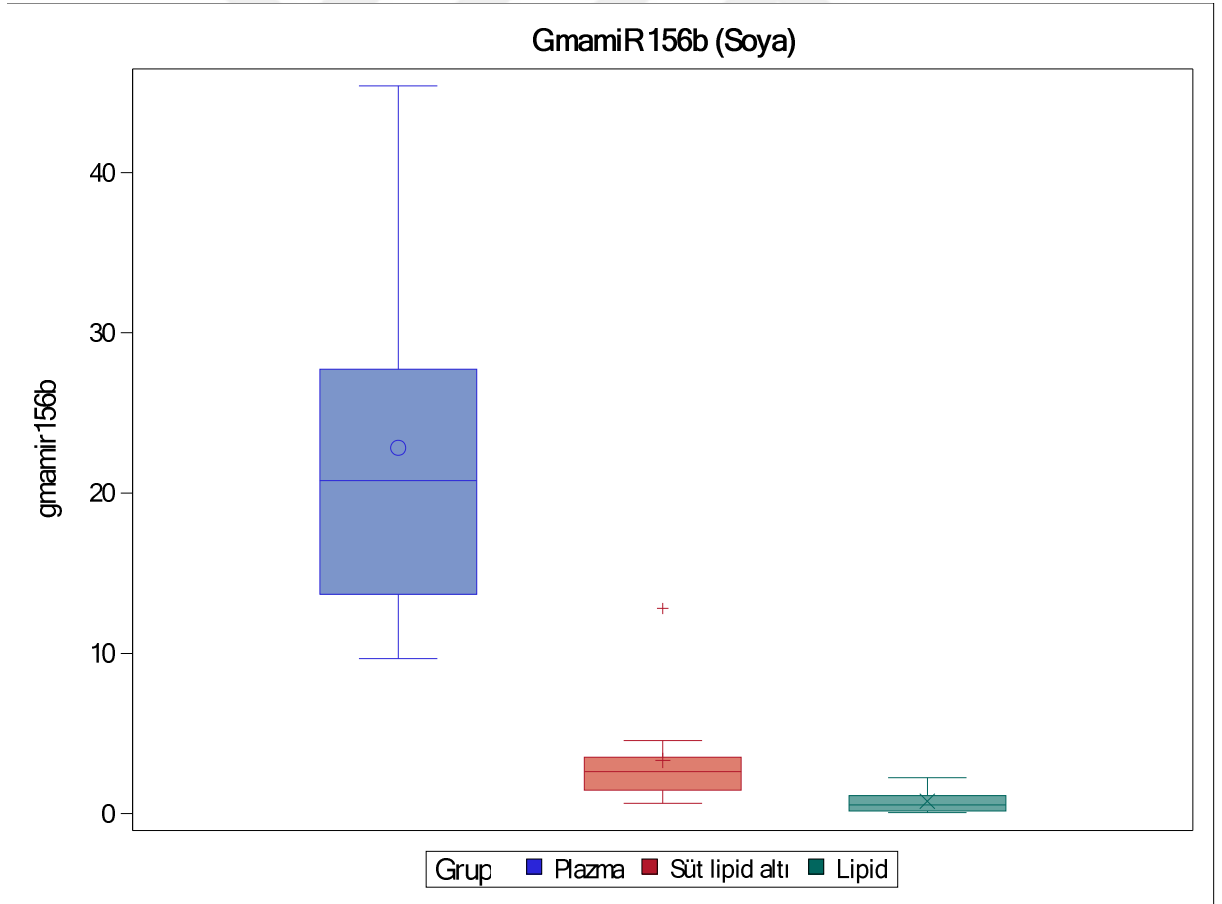
Gma-mir-156b (Soya)												
Hasta no	P-CT	P-U6-CT	S-CT	S-U6-CT	L-CT	L-U6-CT	P- Δ CT	S- Δ CT	L- Δ CT	P- $2^{-\Delta\Delta CT}$	S- $2^{-\Delta\Delta CT}$	L- $2^{-\Delta\Delta CT}$
1	27,75	31,53	27,20	26,56	26,01	25,91	-3,77	0,64	0,10	13,68	0,64	0,94
2	26,56	31,05	27,05	27,99	27,27	28,43	-4,49	-0,94	-1,16	22,42	1,92	2,24
3	26,06	31,17	27,72	27,44	27,45	25,84	-5,11	0,29	1,61	34,44	0,82	0,33
4	27,06	31,44	27,47	29,67	27,36	27,35	-4,38	-2,19	0,00	20,78	4,57	1,00
5	26,07	30,82	27,35	31,03	27,11	27,79	-4,75	-3,68	-0,69	26,93	12,81	1,61
6	25,89	31,40	27,69	28,24	27,92	24,20	-5,50	-0,56	3,72	45,41	1,47	0,08
7	26,07	30,86	26,56	28,09	27,55	27,72	-4,79	-1,53	-0,17	27,73	2,89	1,13
8	26,79	30,52	26,29	27,96	27,40	24,52	-3,73	-1,66	2,88	13,24	3,17	0,14
9	26,75	31,03	26,83	27,93	27,90	25,28	-4,28	-1,10	2,62	19,42	2,14	0,16
10	26,86	30,98	26,34	28,16	27,99	26,56	-4,12	-1,82	1,43	17,33	3,53	0,37
11	27,76	31,03	26,27	27,66	27,57	26,71	-3,27	-1,39	0,86	9,67	2,62	0,55

Tablo 4.30. Gma-miR156b 'nin plazma, süt lipid altı ve süt lipid örneklerinde $2^{-\Delta\Delta CT}$ ortanca, alt çeyrek ve üst çeyrek değerleri

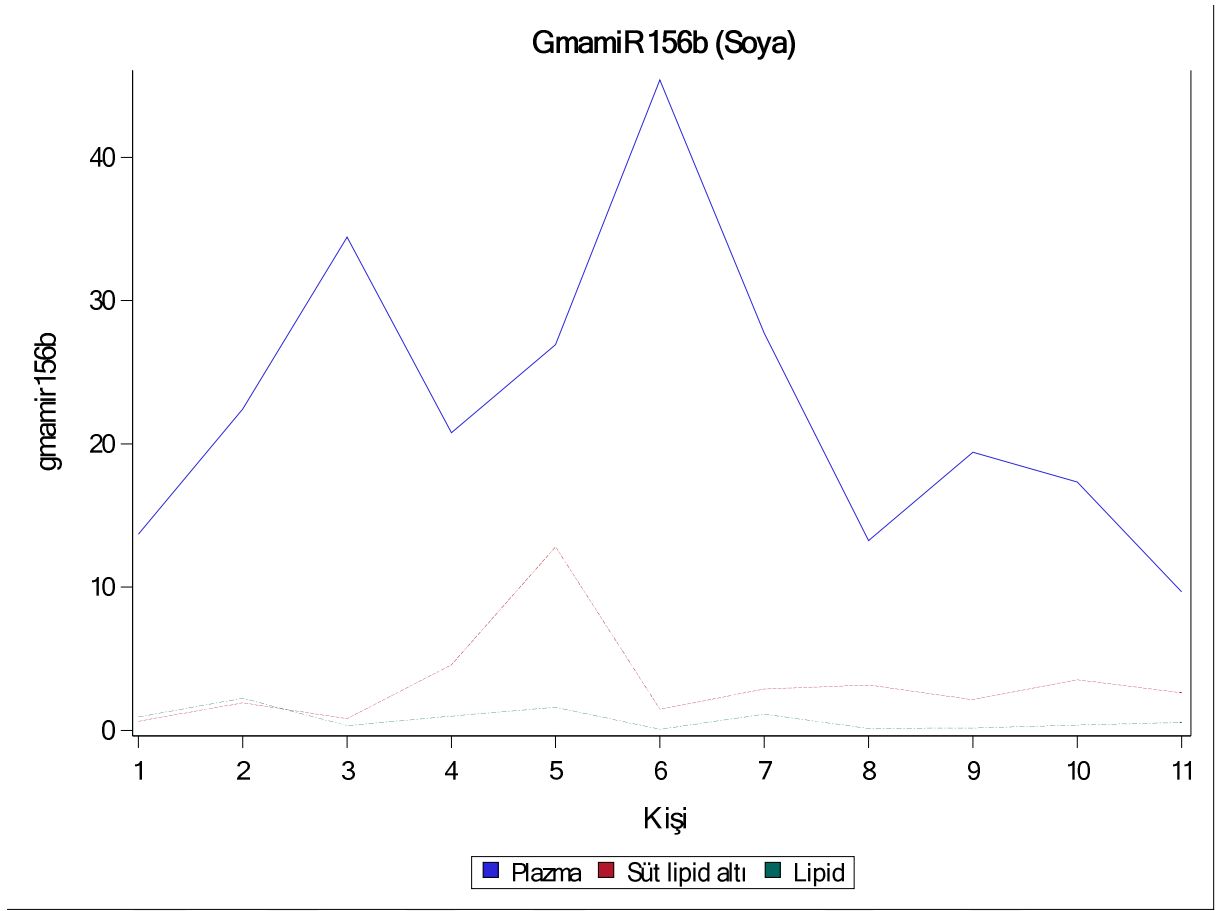
Gma-miR156b (Soya) n=33		Ortanca	Alt çeyrek	Üst Çeyrek
	Plazma (n=11)	20.8	13.7	27.8
	Süt lipid altı (n=11)	2.6	1.5	3.5
	Süt lipid (n=11)	0.6	0.2	1.1

p<0.001

Gma-miR156b 'nin plazma ve süt lipid altı örneklerinde $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri 1.5 katın üzerinde olması nedeniyle anlamlı kabul edilmiş olup, süt lipid kısmında $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri 1.5 katın altında bulunmuştur. Gma-miR156b'nin süt lipid kısmında bulunmadığı kabul edilmiştir. CT değerleri housekeeping ile karşılaştırıldığında anlamlı bir ekspresyon değeri bulunmamıştır. Varyans analizi ile yapılan karşılaştırmada gruplar arasındaki fark anlamlı bulunmuştur (p<0.001).



Şekil 4.23. Plazma, süt lipid altı ve süt lipid örneklerindeki gma-miR156b $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerlerinin dağılımı



Şekil 4.24. Her bir vakaya ait plazma, süt lipid altı ve süt lipid gma-miR156b $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerlerinin karşılaştırılması

5. TARTIŞMA

Beslenme; yaşamın sürdürülebilmesi ve sağlığın korunabilmesi için gerekli olan protein, karbonhidrat, lipit, vitamin, mineral gibi makro ve mikro gıdaların vücuda alınması ve kullanılması olarak tanımlanmaktadır.

Bireyin besin ihtiyacı yaş, cinsiyet, gebelik, emzirme, fiziksel aktivite ve sağlık durumu gibi değişkenlere bağlı olarak kişiden kişiye göre farklılık göstermektedir. Alınan besin öğelerinin her durumun gereksinimlerini karşılaması gerekmektedir. Aksi takdirde klinik tablo besin eksikliğinin ya da fazlalığının kaynağı ve miktarına bağlı olarak hafif yetmezlik bulgularından, dokularda yapısal eksikliklerin, organlarda fonksiyon bozukluklarının görüldüğü malnütrisyon kadar gidebilmektedir.

Besin maddelerinin yetersiz alımı eksikliğin kaynağına göre büyüme gelişme geriliği, anemi, skorbüt, gece körlüğü, osteomalazi gibi klinik tablolara yol açabilmekteyken, fazla tüketimi de yine fazlalığın kaynağına göre obezite, diyabet, serebrovasküler hastalık, ateroskleroz, koroner kalp hastalığı, meme ve kolon kanseri gibi klinik tablolarla ilişkilidir.

Tükettiğimiz gıdaların insan üzerindeki biyokimyasal etkileri halen araştırma konusudur. Son yıllarda üzerinde durulan bir diğer güncel tartışma konusu da; besinlerle alınan genetik materyalin gastrointestinal sistemden (GIS) emilip emilmediği ve organizmada biyokimyasal yollarda etkili olup olmadığıdır.

Bu hipotez üzerine literatürde yapılan çalışmalarda tam bir görüş birliği bulunmamakta olup birbiri ile çelişkili sonuçlar içeren çeşitli çalışmalar bulunmaktadır.

Zhang ve ark. (2012) yaptıkları çalışmada pirinç kaynaklı miR168a'yı insan serumundan tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Ayrıca bu miRNA'nın insan ve farede düşük dansiteli lipoprotein reseptör adaptör proteini (LDLRAP1) seviyelerinde düşüşe neden olduğunu savunmuşlardır. Bu çalışmada bitkisel miRNA'nın GIS'den emilerek dolaşım sistemi ile dokulara ulaştığını açıkça ortaya konulmuştur. Söz konusu çalışma nükleotidlerin fonksiyonel yapısının bozulmadan GIS'ten geçebildiğini ve diğer dokulara ulaşabildiğini gösteren ilk çalışma olarak literatürde yer bulmuştur.

Genel olarak memeli miRNA'ları fonksiyonlarını hedef genin 3'UTR bölgesine bağlanıp translasyonunu bloke ederek ya da mRNA yıkımını tetikleyerek yerine getirmektedir. Memeli miRNA'sının hedef gen eksonuna da bağlandığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır. (Bartel 2004, He 2004, Huang 2010, Qin 2010, Tay 2008).

Bu noktada plazmada tespit edilen bitkisel miRNA'ların fonksiyonu ve önemi daha çok ortaya çıkmaktadır. Çünkü memelilerde endojen miRNA'lar mRNA yıkımı ya da translasyonunun bloke edilmesi üzerinden birçok yolağı etkilemektedir. Bitkisel miRNA'ların da benzer yollar üzerinden memeli mRNA'sını etkileyip etkilemediği araştırılması gereken bir konu olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu durumda cevaplanması gereken en önemli soru şudur; bitkisel miRNA'lar niçin plazmada bulunmaktadırlar?

Zhang ve ark (2012) bulgularına göre bitkisel miRNA168a, memeli miRNA'ları gibi mRNA translasyonunu regüle ederek LDLRAP1 protein seviyesini düşürmektedir. Bu bulgu insan mRNA'sı üzerine bitkisel miRNA'ların etkili olduğunu gösteren önemli bir çalışmadır.

Ancak Dickinson ve ark.(2013) yaptıkları kontrollü fare deneyinde pirinç içeren yem ile beslenen farelerin plazma ve KC incelemelerinde pirinç miRNA'sını tespit edememişler, aynı zamanda pirinç tüketimi sonrası LDL seviyesindeki değişikliklerin beslenme dengesizliğine bağlı olduğunu savunmuşlardır.

Dickinson ve ark (2013) bulgularının aksine Baier ve ark (2014) çalışmalarında hayvansal kaynaklı miRNA'ların plazmada biyolojik fonksiyon gösterdiğini ortaya koymuştur.

Baier ve ark (2014) yaptığı çalışmada brokoli tüketiminden sonra brokoli kaynaklı miR-167a ve miR-824 ekspresyonunda herhangi bir artış plazmada gözlenmezken inek sütü kaynaklı miR-29b ve miR-200c konsantrasyonunun süt tüketimi sonrasında arttığı gösterilmiştir. miR-29b'nin hedefi olan RUNX2 (Runt-related transcription factor 2) ekspresyonunun kan mononükleer hücrelerinde yine süt tüketiminden sonra arttığı gösterilmiştir. İnek sütü miRNA'sının insan bağırsağından emildiğini gösteren ilk çalışma budur. Ayrıca yine bir memeli türüne ait miRNA'nın diğer memeli türleri üzerinde gen ekspresyonunu etkilediğine dair kanıtlar da bu çalışma ile bildirilmiştir. Baier ve ark. (2014) besinsel miRNA'ların gıda ile alınmadığı zaman eksikliğini gördüğünü ve bu eksikliğin endojen olarak sentezlenerek telafi edilemediğini savunmaktadırlar. Dolayısı ile bu sonuçlar besinsel kaynaklı miRNA'ların insan vücudunda metabolik yollarda rol aldığını düşündürmektedir. Plazmada eksojen kaynaklı miRNA konsantrasyonunun süt tüketiminden yaklaşık 3-4 saat sonra pik yapmış olması sebebi ile süt miRNA'larının primer olarak üst bağırsaktan emildiğini ileri sürmüşlerdir.

Bu kapsamda bu çalışmada bitkisel kaynaklı miRNA'lar plazma ve anne sütü lipid ve lipidaltı fraksiyonlarda araştırılmıştır. Çalışma sonucunda plazmada (mdm-miR171i, mdm-miR7121d, sly-miR169b, sly-miR169c, sly-miR156a, osa-miR168a-3p, osa-miR-168a-5p, osa-miR156a, tae-miR167a, tae-miR159b, gma-miR1520d, gma-miR156b), süt lipid altı kısımda (mdm-miR171i, mdm-miR7121d, sly-miR169c, sly-miR156a, osa-miR168a-5p, tae-miR167a, gma-miR1520d, gma-miR156b) ve süt lipid kısmında (mdm-miR171i, sly-miR169c, osa-miR168a-5p) besinsel miRNA varlığı tespit edilmiştir.

miRNA'ların ince bağırsaktan emilim süreçlerinde ve karaciğerde biyolojik aktivitelerinde kayıp olup olmadığı ayrı bir araştırma konusu oluşturmaktadır. Ancak çalışmamızda bitkisel kaynaklı miRNA'ların süt lipid ve lipid altı fraksiyonlarında tespit edilmesi, dolaşımda belli bir miktar aktivite kaybı olsa da biyolojik aktivitelerinin hala devam ettiğini düşündürmektedir. Çalışma sonucu elde ettiğimiz bu bulgular Baier ve ark (2014) ve Zhang ve ark (2012) çalışmaları ile uyumludur. Çalışmamızda, bazı besinsel miRNA'ların besinin tüketimden 24 saat sonra dahi plazma ve süt örneklerinde anlamlı ölçüde yüksek seyrettiği tespit edilmiştir. Bu bulgu besinsel miRNA'ların vücutta hemen metabolize edilmediğini ve uzun süre dolaşımda kalabileceğini göstermektedir. Bu kapsamda dolaşımda yıkılmadan uzun süre bulunan bu miRNA'ların hedef organlara rahatlıkla ulaşarak orada hedef genler üzerinde fonksiyon gösterebileceği düşünülmektedir. Nitekim plazma ve anne sütüne geçtiği tespit edilen bu miRNA'ların, mRNA veri tabanında (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) yapılan baz karşılaştırmamızda bazı insan mRNA'larının 3'UTR bölgesi ile yüksek oranda komplementerlik gösterdiği tespit edilmiştir.

miRNA'lar mRNA'nın 3'UTR bölgesine bağlanarak ve miRNA'ların hedef mRNA ile parsiyel komplementerlik olması halinde ise mRNA deadenilasyonu üzerinden translasyon inhibisyonuna neden olduğu da rapor edilmiştir. Böylece besinsel miRNA'lar insan mRNA'larının 3'UTR bölgesi ile parsiyel bağlanarak translasyon inhibisyonuna neden olabileceği düşüncesini akla getirmektedir.

Eulalio ve ark (2009) yaptıkları çalışma sonucu elde edilen bulgular besinsel miRNA'ların insan mRNA'ları üzerinden fonksiyon gösterebileceği hipotezimizi desteklemektedir. Eulalio ve ark (2009) yaptıkları çalışmada, miRNA'ların hedef mRNA ile tam olmayan, yani parsiyel baz eşleşmesinin, mRNA deadenilasyonu üzerinden translasyon inhibisyonuna neden olduğunu raporlamışlardır.

Bu literatür sonuçları, çalışmamızın sonucunda elde ettiğimiz bulgularımızı besinsel miRNA'ların insan metabolik yollarına etki edebileceği düşüncesi yönünde desteklemiştir.

Bu hipotezimiz doğrultusunda, çalışmamızda plazma ve süt örneklerinde tespit ettiğimiz miRNA'larla yüksek oranda komplementerlik gösteren mRNA'ların yer aldığı yollar veri tabanlarında analiz edilmiştir. Analizde KEGG (www.genome.jp/kegg/pathway.html) ve DAVID (<https://david.ncifcrf.gov>) yolları veri tabanları kullanılmıştır. Sonrasında DAVID veritabanı üzerinden GAD (Genetic Association Database) ve OMIM ([Online Mendelian Inheritance in Man](http://www.omim.org)) veritabanlarında bu miRNA'ların ilişkili olabileceği hastalıklar analiz edilmiştir.

Analiz sonucunda; buğday kaynaklı tae-miR167a'nın PRLR (prolaktin reseptör) mRNA'sının 3'UTR bölgesi ile yüksek oranda komplementerlik gösterdiği tespit edilmiş olup, bu mRNA'nın translasyonunu inhibe ederek, PRLR'nin rol aldığı; nöroaktif ligand-reseptör etkileşimi, sitokin-sitokin reseptör etkileşimi, JAK-STAT sinyalleşme yolağı, prolaktin sinyalleşme yolağı ve PI3K-Akt sinyalleşme yolağı üzerine etki edebileceği ihtimali değerlendirilmektedir. Ayrıca PRLR'nin memenin multipl fibroadenomu ve hiperprolaktinemi gelişimi ile ilişkili olduğu görülmüş olup, tae-miR167a'nın da PRLR üzerinden bu hastalıklarla ilişkili olma ihtimali ortaya çıkmaktadır.

Analiz sonucunda tae-miR159b'nin de RGAG4 (retrotransposon gag domain containing 4) mRNA'sının 3'UTR bölgesi ile yüksek oranda komplementerlik gösterdiği görülmüştür.

Pirinç kaynaklı osa-miR168a3p'nin, 3'UTR bölgeleri ile yüksek oranda komplementerlik gösterdiği SEPT2 (septin2) ve PREX2 (fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfat bağımlı Rac değişim faktörü 2) mRNA'larının translasyonunu inhibe ederek etkili olabileceği düşünülmektedir. Bu genlerin; epitel hücrelerine bakteriyel invazyonda etkili olabileceği, bunun yanı sıra mesane kanseri, akciğer kanseri, kronik obstruktif akciğer hastalığı (KOAH) ve pankreas neoplazma gibi pek çok hastalığın gelişiminde rol alabileceği yapılan veri tabanı taramasında görülmüştür. Dolayısıyla osa-miR168a3p'nin de bahsedilen durumlarda SEPT2 (septin2) ve PREX2 translasyonunu etkileyerek rol oynayabileceği ihtimali değerlendirilmektedir.

Pirinç kaynaklı osa-miR156a'nın MREG (melanoregulin) mRNA'sının 3'UTR bölgesi ile yüksek oranda baz eşleşmesi gösterdiği tespit edilmiştir. Veri tabanından

yapılan analizde ise MREG'in albuminüri ve KOAH gibi klinik durumlarla bağlantılı olduğu görülmüştür. Osa-miR156a'nın da MREG mRNA'sının translasyonunu etkileyebileceği ve bu hastalıkların patogenezinde rol alabileceği ihtimali değerlendirilmektedir.

Soya miRNA'sı olan gma-miR156b'nin MSANTD2 (Myb/SANT DNA binding domain containing 2) mRNA'sının 3'UTR bölgesi ile yüksek oranda komplementerlik gösterdiği tespit edilmiş olup veri tabanında bu mRNA'nın çölyak hastalığı ile ilişkili olduğu görülmüştür. Dolayısıyla gma-miR156b'nin de çölyak hastalığı ile bağlantısının olabileceği ihtimali ortaya çıkmaktadır. Gma-miR156b aynı zamanda ZNF446 (zinc finger protein 446) ve DPY19L1 (dpy-19 like 1 (C. elegans)) mRNA'larının 3'UTR bölgesi ile de büyük oranda komplementerlik göstermektedir.

Literatür ile bütün bu bulgularımızı bir araya getirdiğimizde, besin kaynaklı miRNA'ların insan metabolizması üzerinde etkili olabileceği hipotezi inkar edilememektedir. Fakat bu hipotezimizin kanıtlanması için daha kapsamlı araştırmalar yapılması gerektiği değerlendirilmektedir.

Endojen miRNA'ların anne sütü içinde bebeğe aktarıldığı ve bu miRNA'ların da çoğunlukla meme bezlerinden kaynak aldığı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Alsaweed 2016). Ayrıca literatürde memelilerde eksojen miRNA'ların da süte geçiş yaptığını dair bulgular yer almaktadır.

Lukasik ve ark (2014) yaptıkları çalışmada bitkisel miRNA'ları insan ve domuz sütünde tespit etmişlerdir. Bu çalışmada daha önce süt eksozom miRNA'larını tanımlamak için yapılmış ve yayınlanmış olan çalışmalardan elde edilen veriler kullanılmıştır. Domuz ve insana ait toplam 12 adet süt örneğinden elde edilmiş olan gen verileri incelenmiştir. Mevcut genlerden endojen olanlar, okumaları düşük kaliteli olanlar ve insan mikrobiyomlarına ait olma olasılığı yüksek dizeler dışlanmıştır. Ardından geri kalan genleri veri tabanından bitkisel miRNA'larla kıyaslayarak miRNA tanımlamaları yapılmıştır. Çalışma sonucunda insan ve domuz sütlerinin çoğunda bitkisel miRNA tanımlanmıştır. İnsan sütü örneklerinin yüksek seviyelerde ath-miR166a, pab-miR951, ptc-miR472a ve bdi-miR168 içerdiği, domuz meme sütü eksozomlarının da yüksek miktarda zmamiR168a, zma-miR156a ve ath-miR166a içerdiği tespit edilmiştir

Bu çalışmada ise Lukasik ve ark (2014) çalışmasından farklı olarak, geriye yönelik inceleme yapmayıp, günlük diyetle sıkça tüketilen besinlere ait bilinen miRNA'ların

varlığı, bu besinleri tükettiği belirlenmiş olan insanlarda araştırılmıştır. Buna ek olarak, sütün yanı sıra eş zamanlı alınmış olan plazma da incelenmiştir. Bu şekilde kontaminasyon şüphesi de ortadan kaldırılmıştır. Nitekim çalışma sonucunda, aynı kişiden alınan plazma ve süt örneklerinde miRNA'ların birbiri ile uyumlu şekilde ekspresyon gösterdiği tespit edilmiştir.

Çalışma sonucunda, varlığını araştırdığımız toplam 16 adet besinsel miRNA'dan 4 tanesinin (mdm-miR858, mdm-miR399a, tae-miR167b ve tae-miR159a) hiçbir örnekte anlamlı ekspresyonu gözlenmemiştir. Bu sonucun çeşitli nedenlerden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Örneğin besinsel miRNA'ların emilim mekanizması ve RNaz ya da bağırsak asiditesi gibi durumlara direnci net olarak bilinmemektedir. Tespit edilememiş olan miRNA'lar bağırsakta denatüre olmuş olabilir ya da emilimi hiç gerçekleşmemiş boşaltım sistemi ile atılmış olabilir. Ya da miRNA'nın emilimi gerçekleşmiş ancak vücutta yıkıma uğramış olabilir. Sonuçta her bir miRNA'nın plazmada RNaz'lara karşı direnci ya da KC tarafından metabolize edilip edilmediği bilinmemekte olup her miRNA'nın yarı ömrünün farklı olması yadırganacak bir durum değildir. Ancak bu nedenlerin de tam olarak aydınlatılabilmesi için daha kapsamlı çalışmalar yapılması gerekmektedir.

Yine çalışma sonucunda incelediğimiz miRNA'lardan 4 tanesi (sly-miR169b, osa-miR168a-3p, osa-miR156a ve tae-miR159b) plazmada anlamlı miktarda tespit edilirken, süt örneklerinde anlamlı ekspresyonu gözlenmemiştir. Ancak bu miRNA'ların plazma ekspresyon seviyeleri, süt örneklerinde ekspresyonu gözlenen miRNA'ların plazma ekspresyon seviyelerinden daha düşük seyretmiştir. Bu sonuç da bize, miRNA'ların süte geçebilmesi için belli bir plazma seviyesinin olması gerektirdiğini düşündürmüştür.

Süt örnekleri kendi içinde kıyaslandığında, literatüre zıt olarak süt lipid fraksiyonunda lipid altı fraksiyona göre daha az miRNA olduğu tespit edilmiştir. Literatürde lipid altı kısmının lipid ve hücresel kısma göre daha düşük miktarda miRNA içerdiği belirtilmektedir (Alsaweed 2015b). Ancak literatürde yer alan bu çalışmada endojen miRNA dağılımı belirtilmektedir. Bitkisel miRNA'ların süte geçiş ve süt içerisinde taşınma mekanizması bilinmemektedir. Bu bulgumuzun da ileri çalışmalarla desteklenmesi gerektiği değerlendirilmektedir.

miRNA'ların önem arzettiği konulardan biri de genetiği değiştirilmiş organizmalardır (GDO). GDO organizmanın biyotik ya da çevresel stres etmenlerine karşı toleransının artması ve netice olarak ürün miktarının artırılması için günümüz tarımında

sıkça kullanılmaktadır. Bu alanda soya başta olmak üzere buğday, pirinç, mısır gibi günümüzde sık tüketilen ve bu çalışmada da bir kısmının yer aldığı gıdalarda GDO kullanılmaktadır. GDO'lu gıdaların miRNA ekspresyonlarının değişiklik gösterebileceği Wang ve ark (2016) GDO'lu soya üzerinde yaptığı araştırma ile ortaya konmuştur. Genetik modifikasyonla ekspresyon seviyesi değişen miRNA'ların insan metabolizması üzerine ne şekilde etki ettiği şu an için bilinmemektedir. Ancak konunun aydınlatılabilmesi için kapsamlı çalışmalar yapılması gerektiği değerlendirilmektedir.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmada onbir anneden eş zamanlı olarak alınmış plazma ve anne sütü örneklerinde besin kaynaklı miRNA analizi yapılmıştır.

Çalışma sonucunda besinsel miRNA'ların plazma (mdm-miR171i, mdm-miR7121d, sly-miR169b, sly-miR169c, sly-miR156a, osa-miR168a-3p, osa-miR-168a-5p, osa-miR156a, tae-miR167a, tae-miR159b, gma-miR1520d, gma-miR156b), süt lipid altı kısmı (mdm-miR171i, mdm-miR7121d, sly-miR169c, sly-miR156a, osa-miR168a-5p, tae-miR167a, gma-miR1520d, gma-miR156b) ve süt lipid kısmına (mdm-miR171i, sly-miR169c, osa-miR168a-5p) geçişi tespit edildi.

mdm-miR858, mdm-miR399a, tae-miR167b ve tae-miR159a için ise, örneklerde anlamlı ekspresyon gözlenmemiştir. Bu sonucun miRNA emilim mekanizması farklılığı, RNaz'a ve GIS asiditesine karşı direnç farklılığı gibi emilim öncesi ya da KC metabolizasyonu ve plazma RNaz'larına karşı direnç farklılığı gibi emilim sonrası henüz aydınlatılmamış nedenlerden kaynaklanabileceği değerlendirildi.

sly-miR169b, osa-miR168a-3p, osa-miR156a ve tae-miR159b için plazmada anlamlı ekspresyon tespit edilirken, süt örneklerinde tespit edilmemiştir. Ancak bu miRNA'ların plazma ekspresyon seviyeleri, süt örneklerinde ekspresyonu gözlenen miRNA'ların plazma ekspresyon seviyelerinden daha düşük seyretmiştir. Bu sonuç da bize, miRNA'ların süte geçebilmesi için belli bir plazma seviyesinin olması gerektirdiğini düşündürmüştür.

Plazmada tespit edilen bazı bitkisel miRNA'ların insan mRNA'ları ile yüksek oranda komplementerlik gösterdiği tespit edilmiştir. Bitkisel miRNA'ların bu mRNA'lar üzerinden biyokimyasal yollara etki edebileceği ve hatta hastalık tabloları ile bağlantılı olabileceği düşünüldü.

Bütün bu bulgular ışığında, besinsel miRNA'ların insan metabolizması üzerindeki etkilerinin tam olarak aydınlatılması gerektiği ve bunun için miRNA'ların emilim mekanizması, metabolizması ve etki mekanizmaları üzerine kapsamlı çalışmalar yapılması gerektiği kanaatindeyiz

7. KAYNAKLAR

- Abdelfattah AM., Park C, Choi MY. Update on non-canonical microRNAs. *Biomolecular Concepts*, 2014; 5(4): 275-287.
- Agrawal N, Dasaradhi, PVN., Mohammed A, Malhotra P, Bhatnagar RK, Mukherjee SK. RNA interference: biology, mechanism, and applications. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2003; 67(4): 657-685.
- Alsaweed M, Hartmann PE, Geddes D, Kakulas F. MicroRNAs in breastmilk and the lactating breast: potential immunoprotectors and developmental regulators for the infant and the mother. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2015a; 12(11): 13981-14020.
- Alsaweed M, Hepworth AR, Lefèvre C, Hartmann PE, Geddes DT, Hassiotou F. Human milk microRNA and total RNA differ depending on milk fractionation. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2015b; 116(10):2397-2407.
- Alsaweed M, Tat-Lai C, Newnham J, Hartmann PE, Geddes DT, Kakulas F. Small RNA Sequencing of Human Milk Cells reveals Numerous Known and Novel miRNAs that may be affected by Milk Removal; Proceedings of the Combined Biological Sciences Meeting; Perth, Australia. 28 August 2015c
- 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. *Scientific Reports*.2016;, 6:20680.
- Aravin, AA, Hannon, GJ and Brennecke, J. The Piwi-piRNA pathway provides an adaptive defense in the transposon arms race. *Science*, 2007; 318(5851): 761-764.
- Arroyo JD, Chevillet JR, Kroh EM, Ruf IK, Pritchard CC, Gibson DF. et al. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2011; 108(12): 5003-5008.
- Avril-Sassen S, Goldstein LD, Stingl J, Blenkiron C, Le Quesne, J, Spiteri, I, et al. Characterisation of microRNA expression in post-natal mouse mammary gland development. *BMC Genomics*. 2009; 10(1): 548.
- Babiarz JE, Ruby JG, Wang Y, Bartel DP, Blelloch R. Mouse ES. Cells express endogenous shRNAs, siRNAs, and other Microprocessor-independent, Dicer-dependent small RNAs. *Genes Development*. 2008; 22(20): 2773-2785

- Bachour P, Yafawi R, Jaber F, Choueiri E, Abdel-Razzak Z. Effects of smoking, mother's age, body mass index, and parity number on lipid, protein, and secretory immunoglobulin a concentrations of human milk. *Breastfeeding Medicine*. 2012; 7(3): 179-188.
- Bagga S, Bracht J, Hunter S, Massirer K, Holtz J, Eachus R, Pasquinelli AE. Regulation by let-7 and lin-4 miRNAs results in target mRNA degradation. *Cell*. 2005; 122(4): 553-563.
- Bai JF, Wang YK, Wang P, Duan WJ, Yuan SH, Sun H, et.al, Uncovering Male Fertility Transition Responsive miRNA in a Wheat Photo-Thermosensitive Genic Male Sterile Line by Deep Sequencing and Degradome Analysis. *Frontiers in Plant Science*, 2017; 8:1370.
- Baier SR, Nguyen, C, Xie F, Wood JR, Zemleni J. MicroRNAs are absorbed in biologically meaningful amounts from nutritionally relevant doses of cow milk and affect gene expression in peripheral blood mononuclear cells, HEK-293 kidney cell cultures, and mouse livers. *The Journal of nutrition*, 2014;144(10): 1495-1500.
- Bala S, Petrasek, J, Mundkur S, Catalano D, Levin I, Ward J, et al. Circulating microRNAs in exosomes indicate hepatocyte injury and inflammation in alcoholic, drug-induced, and inflammatory liver diseases. *Hepatology*, 2012; 56(5): 1946–1957
- Barry G, Briggs, JA, Vanichkina DP, Poth EM, Beveridge NJ, Ratnu VS, et al. (2014). The long non-coding RNA Gomafu is acutely regulated in response to neuronal activation and involved in schizophrenia-associated alternative splicing. *Molecular psychiatry*, 2014; 19(4): 486-494.
- Bartel DP. MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 2014; 116(2): 281–297
- Bauer J, Gerss J. Longitudinal analysis of macronutrients and minerals in human milk produced by mothers of preterm infants. *Clinical Nutrition*, 2011; 30(2): 215–220.
- Baysal A. Sağlıklı beslenme: Uzmanların önerisi ve tüketici algılaması. *Beslenme ve Diyet Dergisi*. 1998; 27 (2):1-4.
- Butcher SE, Brow DA. Towards understanding the catalytic core structure of the spliceosome. *Biochem Soc Trans*. 2005; 33:447–449.
- Cannell IG, Kong YW and Bushell M. How do microRNAs regulate gene expression? *Biochem Soc Trans*. 2008; 36:1224-1231.
- Cao Z, Moore BT, Wang Y, Peng, XH, Lappe, JM, Recker, RR. and Xiao, P. MiR-422a as a potential cellular microRNA biomarker for postmenopausal osteoporosis. *PLoS One*, 2014; 9(5):e97098.

- Cifuentes D, Xue H, Taylor DW, Patnode H, Mishima Y, Cheloufi S, et al. A novel miRNA processing pathway independent of Dicer requires Argonaute2 catalytic activity. *Science*. 2010; 328(5986):1694-1698.
- Çavuşoğlu, H. Çocuk Sağlığı. Hemşireliği. Ankara: Sistem Ofset Yayınları; 2013.
- Dickinson, B, Zhang, Y, Petrick, JS, Heck, G, Ivashuta, S, Marshall, WS. Lack of detectable oral bioavailability of plant microRNAs after feeding in mice. *Nature Biotechnology*, 2013; 31(11):965-967.
- Ding H, Huang Z, Chen M, Wang C, Chen X, Chen J, Zhang J. Identification of a panel of five miRNAs as a biomarker for Parkinson's disease. *Parkinsonism & related disorders*, 2016; 22:68-73.
- Dou, H, Wang, Y, Su, G, Zhao, S. Decreased plasma let-7c and miR-152 as noninvasive biomarker for non-small-cell lung cancer. *International journal of clinical and experimental medicine*, 2015; 8(6):9291.
- El-Tawdi AHF, Matboli M, Shehata HH, Tash F, El-Khazragy N, Azazy AESM.,and Abdel-Rahman O. Evaluation of Circulatory RNA-Based Biomarker Panel in Hepatocellular Carcinoma. *Molecular diagnosis & therapy*, 2016; 20(3): 265-277.
- Ender C, Krek A, Friedlander MR, Beitzinger M, Weinmann L, Chen W, et al. A human snoRNA with microRNA-like functions. *Molecular cell*, 2008; 32(4):519-528.
- Eulalio A, Huntzinger E, Nishihara T, Rehwinkel J, Fauser M, Izaurralde E. Deadenylation is a widespread effect of miRNA regulation. *RNA*. 2009; 15(1):21–32.
- Fichtlscherer S, De Rosa S, Fox H, Schwietz, T, Fischer, A, Liebetrau, C. et al., “Circulating microRNAs in patients with coronary artery disease,” *Circulation Research*, 2010; 107(5):677-684.
- Fire A, Xu SQ, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello C.C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 1998; 391(6669): 806-811.
- Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Research*. 2009; 19(1): 92–105
- Gaughwin PM, Ciesla M, Lahiri N, Tabrizi SJ, Brundin P, Björkqvist M. Hsa-miR-34b is a plasma-stable microRNA that is elevated in pre-manifest Huntington’s disease. *Human molecular genetics*, 2011; 20(11):2225–2237
- Gigli I, Maizon DO. MicroRNAs and the mammary gland: A new understanding of gene expression. *Genetics and Molecular Biology*. 2013; 36(4):465-474.

- Goljanek-Whysall K, Sweetman D, Münsterberg AE. MicroRNAs in skeletal muscle differentiation and disease. *Clinical Science*. 2012;123(11):611-625.
- Guan Y, Yao H, Zheng Z, Qiu G, Sun K. miR-125b targets BCL3 and suppresses ovarian cancer proliferation. *International Journal of Cancer*, 2011;128(10): 2274-2283.
- Gui Y, Liu H, Zhang L, Lv W, Hu X. Altered microRNA profiles in cerebrospinal fluid exosome in Parkinson and Alzheimer disease. *Oncotarget*. 2015; 6(35):37043-53.
- Hannon G.J, RNA interference. *Nature*. 2002; 418(6894), 244-251.
- Hasanoğlu E, Düşünsel R, Bideci A. *Temel Pediatri. Türkiye Milli Pediatri Derneği. İstanbul: Güneş Tıp Kitabevleri; 2010.*
- Hassiotou F, Hepworth, AR, Metzger P, Lai CT, Trengove N, Hartmann PE, Filgueira L. Maternal and infant infections stimulate a rapid leukocyte response in breastmilk. *Clinical & translational immunology*, 2013a; 2(4):e3.
- Hassiotou F, Hepworth, AR, Williams, TM, Twigger, AJ, Perrella, S, Lai, CT., et al. Breastmilk cell and fat contents respond similarly to removal of breastmilk by the infant. *PloS one*, 2013b; 8(11): e78232.
- Havens MA, Reich AA, Duelli DM, Hastings ML. Biogenesis of mammalian microRNAs by a non-canonical processing pathway. *Nucleic Acids Research*. 2012; 40(10):4626–4640.
- He L, Hannon GJ. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet* 2004; 5(7):522-531.
- <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov> (Haziran, 2017)
- <https://david.ncifcrf.gov> (Ekim, 2017)
- <http://ruo.mbl.co.jp/bio/e/product/epigenetics/RNAworld.html> (Mayıs, 2017)
- <http://www.mirbase.org> (Haziran, 2016)
- [http://www.un.org/womenwatch/daw/beijing/pdf/Beijing_full_report E.pdf](http://www.un.org/womenwatch/daw/beijing/pdf/Beijing_full_report_E.pdf) (Ekim 2017)
- <http://www.who.int/nutrition/publications/codeenglish.pdf> (Ekim, 2017)
- Hu Z, Chen X, Zhao Y, Tian T, Jin G, Shu Y, et al. Serum microRNA signatures identified in a genome-wide serum microRNA expression profiling predict survival of non-small-cell lung cancer. *Journal of clinical oncology*. 2010; 28(10): 1721-1726.
- Hu Z, Dong, J, Wang LE, Ma H, Liu J, Zhao Y, et al. Serum microRNA profiling and breast cancer risk: The use of miR-484/191 as endogenous controls. *Carcinogenesis* 2012; 33(4): 828–834.

- Huang S, Wu S, Ding J, Lin, J, Wei L, Gu, J, et al. MicroRNA-181a modulates gene expression of zinc finger family members by directly targeting their coding regions. *Nucleic Acids Research*. 2010; 38(20):7211-7218.
- Hussain M .Ul. Micro-RNAs (miRNAs): genomic organisation, biogenesis and mode of action. *Cell Tissue Res* (2012) 349:405–413
- Ishizu H, Siomi H, Siomi MC. Biology of PIWI-interacting RNAs: new insights into biogenesis and function inside and outside of germlines. *GENES&Development*. 20112; 26(21):2361–2373.
- Jia LH, Liu YN. Downregulated serum miR-223 servers as biomarker in Alzheimer's disease. *Cell Biochemistry and Function*.2016; 34(4): 233-237.
- Jia HY, Wang YX, Yan WT, Li HY, Tian YZ, Wang SM, Zhao HL. MicroRNA-125b functions as a tumor suppressor in hepatocellular carcinoma cells. *International Journal of Molecular Sciences*. 2012;13(7): 8762-8774.
- Jiang Q, Wang Y, Hao Y, Juan L, Teng M, Zhang X, et al. miR2Disease: a manually curated database for microRNA deregulation in human disease. *Nucleic Acids Res*. 2009;37(Database issue):D98–104.
- Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, Byrom M, Jarvis R, Cheng A, et al. RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell*. 2005; 120(5): 635–647.
- Kawamata T, Tomari Y. Making risc. *Trends in Biochemical Sciences*. 2010;35(7): 368-376.
- Khvorova A, Reynolds A, Jayasena SD. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell*. 2003; 115(2):209-216.
- Kim HH, Kuwano Y, Srikantan S, Lee EK, Martindale JL, Gorospe M. HuR recruits let-7/RISC to repress c-Myc expression. *Genes & Development*. 2009; 23(15):1743-1748.
- Kliegman R, Marcadante K, Jenson H, Behrman R. *Nelson Textbook Of Pediatrics* . London: Elsevier Mosby; 2010.
- Kontaraki JE, Marketou ME, Zacharis EA, Parthenakis FI, Vardas PE, Differential expression of vascular smooth muscle-modulating microRNAs in human peripheral blood mononuclear cells: novel targets in essential hypertension. *Journal of Human Hypertension*. 2014; 28(8), 510-516.
- Kosaka N, Iguchi H, Yoshioka Y, Takeshita F, Matsuki Y, Ochiya T. Secretory mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in living cells. *Journal of Biological Chemistry*. 2010a; 285(23):17442-17452.
- Kosaka N, Izumi H, Sekine K, Ochiya T. microRNA as a new immune-regulatory agent in breast milk. *Silence*. 2010b; 1(1): 7.

- Kulcheski FR, Marcelino-Guimaraes FC, Nepomuceno AL, Abdelnoor RV, Margis R, The use of microRNAs as reference genes for quantitative polymerase chain reaction in soybean. *Analytical Biochemistry*. 2010;406(2):185-192.
- Kumarswamy R, Thum T. Non-coding RNAs in Cardiac Remodeling and Heart Failure , *Circulation Research*. 2013; 113(6): 676-689.
- Lagos-Quintana M, Rauhut,R, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*. 2001;294(5543): 853-858.
- Lagos-Quintana M, Rauhut R, Meyer J, Borkhardt A, Tuschl T. New microRNAs from mouse and human. *RNA*. 2003; 9(2): 175-179.
- Lam, JK, Chow MY, Zhang Y, Leung SW. siRNA versus miRNA as therapeutics for gene silencing. *Molecular Therapy-Nucleic Acids*. 2015; 4: e252.
- Langhe R, Norris L, Saadeh FA, Blackshields G, Varley R, Harrison A, et al. A novel serum microRNA panel to discriminate benign from malignant ovarian disease. *Cancer Letters*. 2015; 356(2):628–636.
- Larrea E, Sole C, Manterola L, Goicoechea I, Armesto M, Arestin M, et al. New Concepts in Cancer Biomarkers: Circulating miRNAs in Liquid Biopsies. *International journal of molecular sciences*. 2016; 17(5):627.
- Lawless N, Foroushani AB, McCabe MS, O’Farrelly C, Lynn DJ. Next generation sequencing reveals the expression of a unique miRNA profile in response to a Gram-positive bacterial infection. *PLoS One*. 2013;8(3):e57543.
- Li H, Zhang K, Liu LH, Ouyang Y, Guo HB, Zhang H, et al. MicroRNA screening identifies circulating microRNAs as potential biomarkers for osteosarcoma. *Oncology Letters*. 2015;10(3):1662–1668.
- Li Z, Liu H, Jin X, Lo L, Liu J. Expression profiles of microRNAs from lactating and non-lactating bovine mammary glands and identification of miRNA related to lactation. *BMC Genomics*. 2012; 13(1):731
- Liu LH, Li H, Li JP, Zhong H, Zhang HC, Chen J, Xiao, T. miR-125b suppresses the proliferation and migration of osteosarcoma cells through down-regulation of STAT3. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2011; 416(1): 31-38.
- Liu WJ, Xu Q, Sun LP, Dong QG, He CY, Yuan Y. Expression of serum let-7c, let-7i, and let-7f microRNA with its target gene, pepsinogen C, in gastric cancer and precancerous disease. *Tumour Biology*. 2015; 36(5): 3337–3343.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real- Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods*. 2001; 25(4):402-408.

- Lukasik A, Zielenkiewicz P. In Silico Identification of Plant miRNAs in Mammalian Breast Milk Exosomes—A Small Step Forward? PLoS One. 2014; 9(6):e99963.
- Maclellan SA, Lawson J, Baik J, Guillaud M, Poh CF, Garnis C. Differential expression of miRNAs in the serum of patients with high-risk oral lesions. Cancer Medicine. 2012; 1(2):268–274.
- Maroney PA, Yu Y, Fisher J, Nilsen TW. Evidence that microRNAs are associated with translating messenger RNAs in human cells. Nat Structural Molecular Biology. 2006; 13(12):1102–1107.
- Matera AG, Terns RM, Terns MP. Non-coding RNAs: lessons from the small nuclear and small nucleolar RNAs. Nature reviews Molecular Cell Biology. 2007; 8(3):209-220.
- Mathonnet G, Fabian MR, Svitkin YV, Parsyan A, Huck L, Murata T, et al. MicroRNA inhibition of translation initiation in vitro by targeting the cap-binding complex eIF4F. Science. 2007; 317:1764–1767.
- Mello CC, Conte D. Revealing the world of RNA interference. Nature. 2004; 431(7006):338-342.
- Melo CA, Melo SA, Biogenesis and Physiology of MicroRNAs in: Fabbri M.(ed.), Non-coding RNAs and Cancer, Springer 2014;p 5-24
- Mercer TR, Dinger ME, Mattick JS. Long non-coding RNAs: insights into functions. Nat Reviews Genetics. 2009; 10(3):155–159.
- Mercer TR, Dinger ME, Sunkin SM, Mehler MF, Mattick JS. Specific expression of long noncoding RNAs in the mouse brain. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2008;105(2): 716-721.
- Mitoulas, LR., Kent, JC, Cox DB, Owens RA, Sherriff JL, Hartmann PE. Variation in fat, lactose and protein in human milk over 24 h and throughout the first year of lactation. British Journal of Nutrition. 2002; 88(1):29-37.
- Molinari CE, Casadio YS, Hartmann BT, Arthur PG, Hartmann PE. Longitudinal analysis of protein glycosylation and beta-casein phosphorylation in term and preterm human milk during the first 2 months of lactation. British Journal of Nutrition. 2013; 110(1):105-115.
- Naeem A, Zhong K, Moisés SJ, Drackley JK, Moyes KM, Loo JJ. Bioinformatics analysis of microRNA and putative target genes in bovine mammary tissue infected with *Streptococcus uberis*. Journal of Dairy Science. 2012; 95(11): 6397-6408.
- Neyzi O. Ertuğrul T. Pediatri. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri;2010.

- Nottrott S, Simard MJ, Richter JD. Human let-7a miRNA blocks protein production on actively translating polyribosomes. *Nature Structural & Molecular Biology*. 2006; 13(12): 1108-1114.
- Okamura K, Hagen JW, Duan H, Tyler DM, Lai E. The mirtron pathway generates microRNA-class regulatory RNAs in *Drosophila*. *Cell*. 2007; 130(1):89–100.
- Panach L, Mifsut D, Tarín JJ, Cano, García-Pérez MA. Serum-circulating MicroRNAs as biomarkers of osteoporotic fracture, *Calcified Tissue International*. 2015; 97(5), 495-505.
- Pecot CV, Calin GA, Coleman RL, Lopez-Berestein G, Sood AK. RNA interference in the clinic: challenges and future directions. *Nature Reviews Cancer*. 2011; 11(1): 59–67.
- Pekcan, G. Beslenme Durumunun Saptanması. Sağlık Bakanlığı Yayın No: 726 Ankara: Klasmat Matbaacılı; 2008.
- Peschansky VJ, Wahlestedt C. Non-coding RNAs as direct and indirect modulators of epigenetic regulation. *Epigenetics*. 2014; 9(1); 3–12.
- Petersen CP, Bordeleau ME, Pelletier J, Sharp PA. Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells. *Molecular Cell*. 2006; 21(4):533–542.
- Place RF, Li LC, Pookot D, Noonan EJ, Dahiya, R. MicroRNA-373 induces expression of genes with complementary promoter sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008;105(5): 1608-1613.
- Powe CE, Knott CD, Conklin-Brittain N. Infant sex predicts breast milk energy content. *American Journal of Human Biology*. 2010; 22(1); 50-54.
- Qin W, Shi Y, Zhao B, Yao C, Jin L, Ma J, Jin, Y. miR-24 regulates apoptosis by targeting the open reading frame (ORF) region of FAF1 in cancer cells. *PLoS One*. 2010; 5(2):e9429.
- Renjie W, Haiqian L. miR-132, miR-15a and miR-16 synergistically inhibit pituitary tumor cell proliferation, invasion and migration by targeting Sox5. *Cancer Letters*. 2015; 356(2): 568–578.
- Rodriguez A, Griffiths-Jones S, Ashurst JL, Bradley A. Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Research*. 2004;14(10a):1902–1910.
- Rudolph MA, Lister RL, First RL, Gershon AA. *Rudolph Pediatri*. (M.Yurdakök, Çev.). Ankara: Güneş Tıp Kitabevleri; 2013.
- Samur G. Anne Sütü. Sağlık Bakanlığı Yayın No:726, 1. Baskı, Ankara: Klasmat Matbaacılık 2008: s.9-17.
- Sanders I, Holdenrieder S, Walgenbach-Brünagel G, von Ruecker A, Kristiansen G, Müller SC, Ellinger J. Evaluation of reference genes for the analysis of serum miRNA in patients with

- prostate cancer, bladder cancer and renal cell carcinoma. *International Journal of Urology*. 2012;19(11): 1017-1025.
- Saraiya AA, Wang CC. snoRNA, a novel precursor of microRNA in *Giardia lamblia*. *PLoS pathogens*. 2008; 4(11):e1000224.
- Schaefer A, Jung M, Miller K, Lein M, Kristiansen G, Erbersdobler A, Jung K. Suitable reference genes for relative quantification of miRNA expression in prostate cancer. *Experimental & Molecular Medicine*. 2010;42(11): 749-758.
- Selçuk H. Malnütrisyon ve Önemi. *Güncel Gastroenteroloji Dergisi*. 2012; 16(2):158-162.
- Shao C, Ma X, Lu G, Meng Y., MicroRNA's in apple (*Malus domestica*): biological implications obtained from high-throughput sequencing data. *Plant Omics*. 2014; 7(5); 308-321.
- Sørensen SS, Nygaard AB, Christensen T. miRNA expression profiles in cerebrospinal fluid and blood of patients with Alzheimer's disease and other types of dementia - an exploratory study. *Translational Neurodegeneration*. 2016; 5(1):6
- Stefani G, Slack FJ. Small non-coding RNAs in animal development. *Nature reviews Molecular Cell Biology*. 2008; 9(3): 219-230.
- Tang Z, Zhang L, Xu C, Yuan S, Zhang F, Zheng Y, Zhao C., Uncovering small RNA-mediated responses to cold stress in a wheat thermosensitive genic male-sterile line by deep sequencing. *Plant Physiology*. 2012;159(2):721-738.
- Tay Y, Zhang J, Thomson AM, Lim B, Rigoutsos I. MicroRNAs to Nanog, Oct4 and Sox2 coding regions modulate embryonic stem cell differentiation. *Nature*. 2008; 455(7216): 1124-1128.
- Thermann R, Hentze MW. *Drosophila* miR2 induces pseudo-polysomes and inhibits translation initiation. *Nature*. 2007; 447(7146):875–878.
- Timmons L, Fire A. Specific interference by ingested dsRNA. *Nature*. 1998; 395(6705): 854-854.
- Tripathi V, Shen ., Chakraborty A, Giri S, Freier SM, Wu X. et al. Long noncoding RNA MALAT1 controls cell cycle progression by regulating the expression of oncogenic transcription factor B-MYB. *PLoS Genetics*. 2013; 9(3):e1003368.
- Tsang, WP, Kwok TT. Let-7a microRNA suppresses therapeutics-induced cancer cell death by targeting caspase-3. *Apoptosis*. 2008; 13(10): 1215–1222.
- Valadi H, Ekstrom K, Bossios A, Sjostrand M, Lee JJ, Lotvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature Cell Biology*. 2007; 9(6): 654–659.
- Valiollahi E, Farsi1 M, Fevereiro P, Kakhki AM. Bioinformatic characterization and expression analysis of miRNAs in *Solanum lycopersicum*, *Plant Omics*. 2014; 7(2): 108-116.

- Van Rooij E, Sutherland LB, Qi X, Richardson JA, Hill J, Olson EN. Control of stress-dependent cardiac growth and gene expression by a microRNA. *Science*. 2007;316:575–579.
- Varkonyi-Gasic E, Hellens RP. Quantitative Stem-Loop RT-PCR for Detection of MicroRNAs in: Kodama H, Komamine A, editors. *RNAi and Plant Gene Function Analysis*; Humana Press 2011. p 145-157
- Vasudevan S, Tong Y, Steitz JA. Switching from repression to activation: microRNAs can upregulate translation. *Science*. 2007; 318:1931–1934
- Vickers KC, Palmisano BT, Shoucri BM, Shamburek RD, Remaley AT. MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by highdensity lipoproteins. *Nat Cell Biology*. 2011; 13(4):423–433.
- Walter P, Blobel G. Signal recognition particle contains a 7S RNA essential for protein translocation across the endoplasmic reticulum. *Nature*. 1982; 299:691–698
- [Wang Y](#), [Lan Q](#), [Zhao X](#), [Xu W](#), [Li F](#), [Wang Q](#), [Chen R](#)., Comparative Profiling of microRNA Expression in Soybean Seeds from Genetically Modified Plants and their Near-Isogenic Parental Lines., [PLoS One](#). 2016; 11(5):e0155896.
- Weber JA, Baxter DH, Zhang S, Huang DY, Huang KH, Lee MJ, et al. The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clin. Chem*. 2010; 56:1733–1741.
- Winter J, Jung S, Keller S, Gregory RI, Diederichs S. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation *Nature Cell Biology*. 2009; 11;228-234.
- Witzany G. Do we eat gene regulators? *Communicative & Integrative Biology*. 2012; 5(3): 230–232.
- www.genome.jp/kegg/pathway.html (Ekim, 2017)
- Xu N, Zhang L, Meisgen F, Harada M, Heilborn J, Homey B, et al. MicroRNA-125b down-regulates matrix metalloproteinase 13 and inhibits cutaneous squamous cell carcinoma cell proliferation, migration, and invasion. *Journal of Biological Chemistry*. 2012; 287(35): 29899-29908.
- Yang N, Wang G, Hu C, Shi Y, Liao L, Shi S, et al. Tumor necrosis factor α suppresses the mesenchymal stem cell osteogenesis promoter miR-21 in estrogen deficiency-induced osteoporosis. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2013;28(3):559–573.
- Zernecke A, Bidzhekov K, Noels H, Shagdarsuren E, Gan L, Denecke B, et al. Delivery of microRNA-126 by apoptotic bodies induces CXCL12- dependent vascular protection. *Sci Signal*. 2009; 2(100):ra81.

- 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.
- Zhang X, Zou Z, Zhang J, Zhang Y, Han Q, Hu T, Xu X, Liu H, Li H, Ye Z. Over-expression of sly-miR156a in tomato results in multiple vegetative and reproductive trait alterations and partial phenocopy of the sft mutant. *FEBS Lett.* 2011a; 585:435–439.
- Zhang X, Zou Z, Gong P, Zhang J, Ziaf K, Li H, Xiao F, Ye Z. Over-expression of microRNA169 confers enhanced drought tolerance to tomato, *Biotechnol Lett.* 2011b; 33:403–409.
- Zhang YN, Xie BD, Sun L, Chen W, Jiang SL, Liu W, et al.. Phenotypic switching of vascular smooth muscle cells in the 'normal region' of aorta from atherosclerosis patients is regulated by miR-145. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2016;20(6):1049-1061.
- Zhang MW, Jin MJ, Yu YX, Zhang SC, Liu B, Jiang X, et al. Associations of lifestyle-related factors, hsa-miR-149 and hsa-miR-605 gene polymorphisms with gastrointestinal cancer risk. *Molecular carcinogenesis*. 2012; 51(S1).
- Zhou Q, Li M, Wang X, Li Q, Wang T, Zhu Q, et al. Immune-related microRNAs are abundant in breast milk exosomes. *International Journal of Biological Sciences*. 2012; 8(1):118-123.

