



Sütün kaynatılmasının süt miR-191 düzeyine etkisinin araştırılması

Investigation of the effect of boiling on the level of milk miR-191

Fatih Atilla BAĞCI¹ , Dilek PİRİM^{1,2,3*} 

¹ Bursa Uludağ Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Bursa, Türkiye

² Bursa Uludağ Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Translasyonel Tıp Anabilim Dalı, Bursa, Türkiye

³ Bursa Uludağ Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Bursa, Türkiye

¹<https://orcid.org/0009-0003-5158-1757>; ²<https://orcid.org/0000-0002-0522-9432>

To cite this article:

Bağcı, F. & Pirim, D. (2024). Sütün kaynatılmasının süt miR-191 düzeyine etkisinin araştırılması. Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi, 28(3): 480-488

DOI: 10.29050/harranziraat.1409969

*Address for Correspondence:

Dilek Pirim

e-mail:

dilekpirim@uludag.edu.tr

Received Date:

25.12.2023

Accepted Date:

18.06.2024

© Copyright 2018 by Harran University
Faculty of Agriculture. Available on-line
at www.dergipark.gov.tr/harranziraat



This work is licensed under a Creative
Commons Attribution-Non
Commercial 4.0 International License.

ÖZ

MikroRNA'lar (miRNA'lar), gen anlatımının düzenlenmesinde etkin rol oynayan ~22 bp uzunluğunda küçük, kodlanmayan RNA dizileridir. Son yıllarda yapılan araştırmalarda inek sütünde bol miktarda miRNA bulunduğu tespit edilmiş ve inek sütü miRNA'larının gıda kalitesinde biyobelirteç olarak kullanım potansiyellerine yönelik bulgular elde edilmiştir. Ayrıca, güncel araştırmalar beslenme yoluyla inek sütü miRNA'larının insana transfer olarak önemli bir biyoaktif besin bileşeni olabileceğini göstermektedir. Süt ve süt ürünlerinde üretim aşamalarında bozunmadan kalan inek sütü miRNA'larının insanların dolaşım sistemine geçerek farklı insan hastalıkları ile ilişkili önemli yollara etki edebileceği düşünülmektedir. Bu sebepten süt ve süt ürünlerinin miRNA içeriklerinin belirlenmesi önemlidir ve bu konuda güncel literatürde önemli bir boşluk olduğu gözlenmektedir. Bu çalışmada, literatürden insan homolog sekansına sahip ve inek sütünde bol miktarda bulunan miR-191'in kaynatma aşaması sonrası içme sütündeki miktarındaki değişiklik araştırılmıştır. Bu kapsamda süt örnekleri (çiğ süt ve pastörize süt) 100°C'de kaynatılarak örneklerden total RNA izolasyonu gerçekleştirilmiş ve elde edilen RNA'lardaki miR-191 miktarı RT-qPCR yöntemi ile analiz edilmiştir. Literatürde içme sütünün üretiminde kullanılan homojenizasyon ve pastörizasyon işlemlerinin miRNA spesifik farklı etkilere sebep olduğu gözlenmiştir. Gerçekleştirilen işlemler sonucunda literatüre uyumlu biçimde miR-191 miktarında kaynatılmış çiğ sütte %95.8 oranında ($p<0.0001$) ve kaynatılmış pastörize sütte %66.4 oranında ($p=0.001$) azalma gözlemlenmiştir. Bunun yanında çiğ süt ve pastörize sütte analiz edilen miR-191 için elde edilen CT değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olduğu gözlenmiştir ($p<0.0001$). Çalışmamızın sonucu, sütün kaynatılmasının süt miRNA içeriği üzerindeki etkilerine ilişkin ön veriler ortaya koyarak işleme adımlarının süt miRNA bileşimi üzerine miRNA spesifik etkisinin olduğunu önemle vurgulamaktadır.

Anahtar Kelimeler: miRNA, çiğ süt, pastörize süt, kaynamış süt, RT-qPCR, miR-191

ABSTRACT

MicroRNAs (miRNAs) are small non-coding RNA sequences ~22 bp in length that play an active role in cellular processes. Recent studies have identified miRNA abundance in cow's milk, highlighting their nutritional impact and their potential utilization as biomarkers of food quality. However, current research suggests that dietary intake of cow's milk miRNAs may transfer to humans and have nutritional relevance for human health by entering human circulation and affecting important pathways associated with human diseases. Therefore, it is crucial to determine the miRNA content in milk and dairy products. The miR-191 has a similar sequence in cows and humans, and it has been previously shown to abundantly exist in cow milk. Here, we aimed to investigate the effects of boiling to the miR-191 levels in milk. Total RNA was isolated from raw and milk

boiled at 100°C, and miR-191 levels in raw and boiled milk were analyzed by RT-qPCR method. Previous research reported that homogenization and pasteurization processes used in milk production stages have miRNA-specific distinct effects. After heat treatments, the amount of miR-191 was reduced by 95.8% ($p<0.0001$) in boiled raw milk and 66.4% ($p=0.001$) in boiled pasteurized milk compared to pasteurized milk. Meanwhile, we observed a statistically significant difference ($p<0.0001$) in the CT values obtained by quantification of miR-191 in raw and pasteurized milk. The results of our study present preliminary data for the effects of boiling milk on the milk miRNA content and point out the significance of miRNA-specific effects of milk processing steps on milk miRNA composition.

Key Words: miRNA, raw milk, boiled milk, pasteurized milk, RT-qPCR, miR-191

Giriş

MikroRNA'lar (miRNA), gen ekspresyonunu düzenleyerek çeşitli biyolojik süreçlerde yer alan, yaklaşık 18-22 nükleotid uzunluğunda kodlama yapmayan RNA türleridir. Son yıllarda yapılan araştırmalarda inek sütünden elde edilen eksozomal miRNA'ların süt ve süt ürünleri endüstrisinde biyobelirteç olarak kullanılabilmesinin yanında önemli bir biyoaktif besin içeriği olma ve insan hastalıklarına etki etme potansiyelleri önemli bir araştırma konusu olmuştur (Baier ve ark., 2014; Melnik ve ark., 2017; Sadri ve ark., 2020; Rani ve ark., 2017; Abou el qassim ve ark., 2022; Abou el qassim ve ark., 2023). Süt miRNA'larından immün sistemdeki genleri hedefleyenlerinin, inek sütü tüketimine bağlı olarak bağışıklık sisteminde rol oynayabilecekleri ortaya atılmıştır (Baier ve ark., 2014). Ek olarak, çalışmalar süt eksozomlarının çok farklı türde (kolon kanseri hücrelerine, bağırsak hücrelerine, böbrek hücrelerine, makrofajlara ve insan periferik kan mononükleer) hücrelere transfer olabildiğini bildirmiştir (Benmoussa ve ark., 2020; Rani ve ark., 2017; Izumi ve ark., 2015; Izumi ve ark., 2012). İnek sütünde bol miktarda miRNA bulunur ve süt işleme aşamalarının süt ve süt ürünlerindeki miRNA içeriğine etkisi olduğu bilinmektedir (Rani ve ark., 2017; Abou el qassim ve ark., 2023; Howard ve ark., 2015). Fakat, bu miRNA'ların fizyolojik stabilitelelerini ve biyoaktif potansiyellerini ortaya çıkarmak için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır (Rani ve ark., 2017). Toplumumuzda yapılan anket araştırmalarında çiğ sütün daha lezzetli olması, katkı maddesi içermediği düşüncesi, besin içeriğinin diğer sütlere kıyasla daha yüksek olduğunun düşünülmesi gibi sebeplerden dolayı toplumun farklı kesimlerinden insanların farklı kaynaklardan çiğ süt aldığı ve çiğ sütü ev ortamında kaynatıp yoğurt, tatlı ve süt olarak tükettikleri gözlemlenmiştir (Arslan ve ark., 2020; Sevim ve ark., 2021). Normal şartlarda sütün ev ortamında

kaynatılması durumunda süt kaynama noktası olan 100°C'ye kadar çıkmakta ve yaklaşık bu sıcaklıklarda değişken sürelerde tutulmaktadır. Marketten satın alınan pastörize süt ise pastörizasyon aşamasında en az 72°C'de 15 saniye veya 63°C de 30 dakika işlem görmektedir (Türk Gıda Kodeksi İçme Sütleri Tebliğ No: 2019/12, <https://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2019/02/20190227-5.htm>). Literatürde bu sıcaklık ve süre aralıklarında işlenmiş sütte işlevsel ve sağlam miRNA'ların eksozomlar ve benzeri mikroveziküller sayesinde korundukları raporlanmıştır (Kirchner ve ark., 2016). Bu korunan mikroveziküllerin sindirim boşluğunda zarar görmeden kana karıştığı ve yapıları sayesinde içlerinde bulunan molekülleri etkili bir biçimde hücrelere ilettikleri gözlenmiştir (Melnik ve ark., 2017). Sıcaklığın miRNA'ların degradasyonları üstündeki etkileri konusunda literatürde Melnik ve ark., (2014) tarafından yapılan çalışmada, miRNA miktarının sıcaklıkla azaldığı raporlanmıştır. miRNA benzeri kompleks ikincil ve üçüncül yapıya sahip ve sütte bulunan proteinlerin, kaynatma işlemi sonrasında önemli ölçüde azaldığı bilinmektedir (Tremonte ve ark., 2014). Oh ve arkadaşlarının (2014) çalışmasında immün sistemle ilişkili miRNA'ların ısıya dirençleri araştırılmış ve miRNA'ların kısa süreli yüksek sıcaklık uygulamasına (75°C/15 sn) uzun süreli düşük sıcaklık uygulamasına (63°C/30 dk) göre daha fazla direnç gösterdiği gözlenmiştir. Isı işlemlerinin süt miRNA'larına etkisinin araştırıldığı güncel bir araştırmada da, işlenmemiş süte pastörizasyon (85°C/15 sn) ve ultra yüksek sıcaklık işlemi (135°C/15 sn) uygulanmış, süt miRNA'larının bu işlemlere miRNA spesifik olarak farklı cevaplar verdiği gözlenmiştir (Zhang ve ark., 2022). Yakın tarihte Li (2022) tarafından yapılan çalışmada sütte yüksek miktarda bta-miR-191'e rastlanmıştır. Yaptığımız biyoinformatik analizlerde bta-miR-191'in insan miRNA'sı olan hsa-miR-191-5p ile yüksek homoloji gösterdiği saptanmıştır (Çizelge 1).

Çizelge 1. miR-191'in insan ve inekteki sekansları.

Table 1. Sequences of miR-191 in human and cow.

miRNA <i>miRNA</i>	miRbase ID <i>miRbase ID</i>	Sekans <i>Sequence</i>
hsa-mir-191-5p	MIMAT0000440	CAACGGAAUCCCAAAAAGCAGCUG
bta-mir-191	MIMAT0003819	CAACGGAAUCCCAAAAAGCAGCUG

Hsa-miR-191-5p'nin farklı ekspresyon durumları literatürde insanlarda birçok kanser türü ile ilişkilendirildiği görülmüştür (Ashirbekov ve ark., 2020; Zhang ve ark., 2014; Tian ve ark., 2019; Polioudakis ve ark., 2015). Literatürde miR-191-5p sadece kanserle ilişkilendirilmemiş, farelerin nöronlarında *BDNF*'i hedefleyerek nörotoksisteye karşı koruduğu, nöral hücre ölümünü tetiklediği ve farklı kardiyovasküler durumlarla ilişkilendiği de raporlanmıştır (Li ve ark., 2021; Wang ve ark., 2022; Yu ve ark., 2022; Licholai ve ark., 2021).

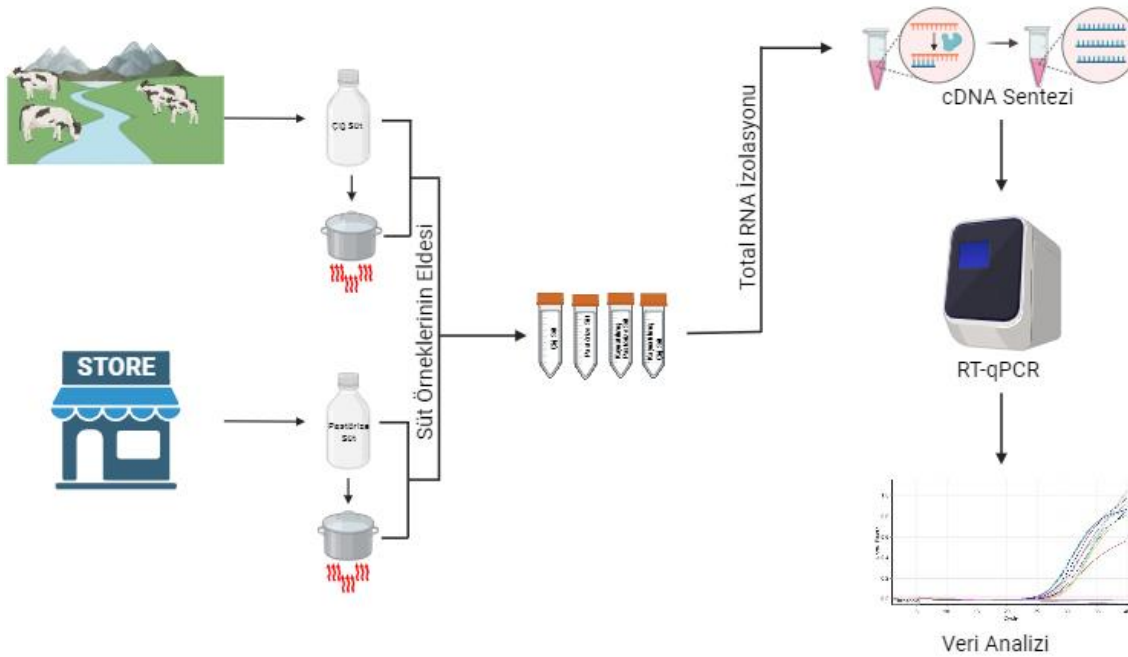
Bu sebeplerden dolayı süt ve süt ürünlerinin miRNA içeriklerinin öğrenilmesi ve bu miRNA'ların işleme basamakları sonrasındaki miktarlarının tahmin edilmesi önemlidir. Bu çalışmada, toplum tarafından sık tercih edilen kaynaklardan elde edilmiş (çiftlik, seyyar satıcı, bakkal, market vb.) çiğ ve pastörize sütteki ve bu sütlerin en sık tüketilme şekli olan kaynatma sonrası sütte bol miktarda olduğu bilinen ve insan ile homolog olan miR-191'in miktarındaki değişim

kantitatif olarak analiz edilmiştir. Literatür taramamızda sütün kaynatılması sonrası miR-191 seviyesinin incelendiği benzeri başka bir çalışma bulunmamıştır.

Materyal ve Metot

Süt örneklerinin eldesi

Çiftlikten ve marketten elde edilmiş çiğ süt ve pastörize sütün bir kısmı ($\cong 50$ ml) izolasyon işlemi için ayrılmıştır. Tremonte ve ark., (2014) tarafından kullanılan ev ortamında süt işlenmesi protokolüne göre süt ürünlerinin bir kısmı temizlenmiş behere aktarılarak düşük hızda manyetik karıştırıcı ısıtıcı da köpük oluşumu gözlemlenen kadar (~ 30 dakika, 100°C) ısıtılmıştır. Isıtılmış sütün tekrardan oda sıcaklığına düşmesi beklenmiştir ve örnekler steril tüplere ($\cong 50$ ml) aktarılarak örneklerden Total RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir (Şekil 1).



Şekil 1. Çalışma iş akışı.

Figure 1. Workflow of the study.

Total RNA izolasyonu

Süt örneklerinden RNA izolasyonu için miRNeasy Serum/Plasma Advanced Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Almanya) kullanılmıştır. Başlangıç

materyali olan 200 μl tam süt kullanılmış ve üretici firmanın protokolü takip edilmiştir. İzolasyon sonrası RNA saflığı ve miktar değerlendirilmesi için Nanodrop 2000

Spektrofotometre (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, ABD), Qubit 4.0 (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, ABD) cihazları kullanılmıştır.

qRT-PCR yöntemi ile miRNA anlatım analizi

cDNA sentezi Sensiscript RT kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Almanya) kullanılarak Thermal Cycler cihazında üretici firmanın protokolüne uyularak gerçekleştirilmiştir (Çizelge 2a). cDNA sentezi sonrası qRT-PCR yöntemi için LNA (Locked

Nucleic Acid) ile geliştirilmiş, SYBR Green içeren miRCURY LNA miRNA kit ve miRCURY LNA miRNA PCR primerleri (QIAGEN GmbH, Hilden, Almanya) kullanılarak qPCR ve melting curve analizi gerçekleştirilmiştir. Tüm işlemler üretici firmanın protokolleri takip edilerek gerçekleştirilmiştir (Çizelge 2b).

Çizelge 2. cDNA sentezi (a) ve RT-qPCR (b) PCR şartları.

Table 2. PCR conditions for cDNA synthesis (a) and RT qPCR (b).

a)	Sıcaklık Temperature	Süre Time	b)	Sıcaklık Temperature	Süre Time
Ters Transkripsyon <i>Reverse</i> <i>Transcription</i>	42 °C	60 dk <i>min</i>	Başlangıç Aktivasyonu <i>Initial Activation</i>	95 °C	2 dk <i>min</i>
İnaktivasyon <i>Inactivation</i>	95 °C	5 dk <i>min</i>	Denatürasyon <i>Denaturation</i>	95 °C	10 sn <i>sec</i>
Tut <i>Hold</i>	4 °C	∞	Bağlanma/Uzama <i>Annealing/Extension</i>	56 °C	60 sn <i>sec</i>
			Erime Eğrisi <i>Melt Curve</i>	60-95 °C	40 Siklus <i>Cycle</i>

Veri analizi ve yorumlanması

qRT-PCR analizi sonucunda elde edilen miRNA ekspresyon değerleri $2^{-\Delta\Delta CT}$ yöntemi ile normalize edilerek mir-191'e ait kat değişimi (Fold Change, FC) hesaplamaları yapılmıştır. CT değerlerinin normalizasyonu için sentetik cel-miR-39-3p CT değerleri referans alınmıştır. Analiz edilen miR-191 CT verileri paired ve unpaired t-test ile değerlendirilerek p-değerleri hesaplanmıştır. İstatistiksel analizler için SPSS programı (version 20.0) kullanılmıştır. P-değeri <0.05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

Araştırma Bulguları ve Tartışma

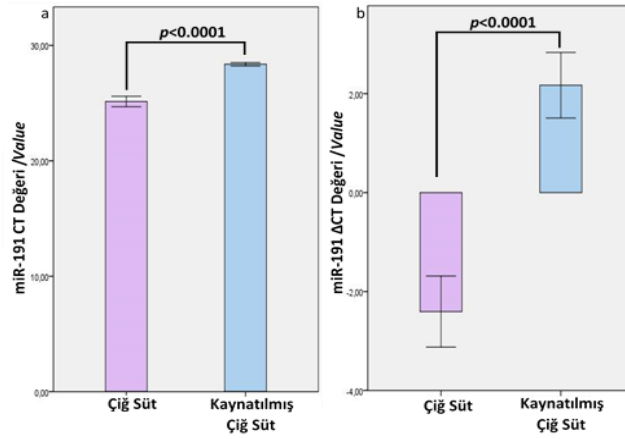
Kaynatma işleminin RNA miktarında yarattığı değişim

Farklı süt örneklerinin izolasyonu sonrası total RNA örnekleri Qubit HS (High Sensitivity) RNA assayı kullanılarak ölçülmüştür. Elde edilen total RNA miktarları, çiğ süt için $1.01 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$,

kaynatılmış çiğ süt için $0.758 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$, pastörize süt için $0.42 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$ ve kaynatılmış pastörize süt için $0.582 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$ olarak gözlemlenmiştir. Daha önceki çalışmalarla kıyaslandığında kaynatılmış pastörize süt harici diğer örnekler literatürle uyumlu bulunmuştur.

Kaynatma işleminin miR-191 üstündeki etkisi

SPSS programında gerçekleştirilen analizler ile çiğ sütün kaynatılması sonrasında CT değerinde anlamlı bir artış ($p < 0.0001$) gözlemlenmiştir (Şekil 2a). Çiğ süt ve kaynatılmış çiğ süt için cel-miR-39'un CT değerleri ile gerçekleştirilen normalizasyon sonrasında elde edilen ΔCT değerleri iki örnek arasında CT değerleriyle benzer anlamlı bir farklılık ($p < 0.0001$) gözlemlenmiştir (Şekil 2b).



Şekil 2. miR-191 için çiğ süt ve kaynatılmış çiğ sütte tespit edilen Ct değerleri (a) ve Δ Ct değerlerinin (b) karşılaştırılması.

Figure 2. Comparison of Ct values and Δ Ct values detected in raw milk and boiled raw milk for miR-191.

$2^{-\Delta\Delta CT}$ yöntemi ile hesaplanmış kat değişimi sonucu kaynatılmış çiğ sütte, çiğ süte kıyasla miR-191 miktarında %95.8 oranında ($p < 0.0001$)

anamlı bir azalma olduğu hesaplanmıştır (Çizelge 3).

Çizelge 3. Süt örnekleri için ortalama CT değeri ve miR-191 için gözlemlenen yüzdelik azalma.
Table 3. Average CT values for milk samples and decrease percentages observed for miR-191.

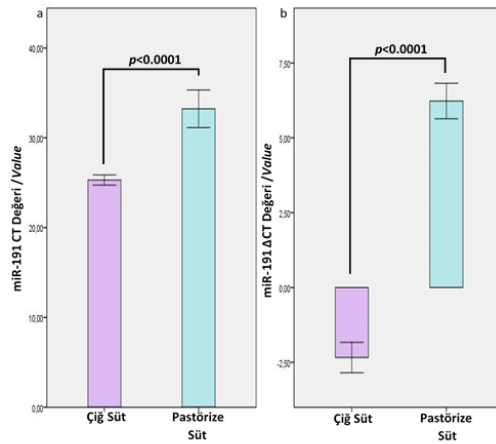
	Ort. CT Avr. CT	Kat Değişimi Fold Change	% Azalma Decrease %	p-değeri p-value
Çiğ Süt	25	1	-	-
Kaynatılmış Süt*	28	0.042	%95.8	$p < 0.0001$
Pastörize Süt*	33	0.0025	%99.75	$p < 0.0001$
Kaynatılmış Pastörize Süt**	31	0.336	%66.4	$P = 0.001$

*Çiğ süt örneği ile kıyaslanmıştır.

** Pastörize süt örneği ile kıyaslanmıştır.

Çiğ süt ve pastörize süt kıyaslandığında CT ve Δ CT değerlerinde anlamlı bir fark olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 3a/b). Kat değişim analizi ile çiğ ve pastörize süt örneklerinin miR-191

içeriğinde %99.75 miktarında anlamlı ($p < 0.0001$) bir azalma bulunmuştur (Çizelge 3).



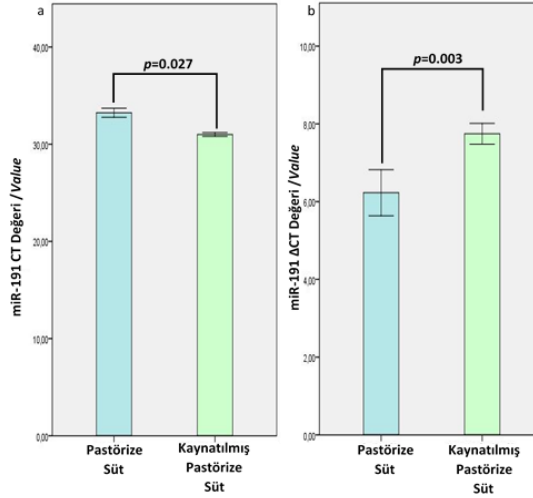
Şekil 3. miR-191 için çiğ süt ve pastörize sütte tespit edilen Ct değerleri (a) ve Δ Ct (b) değerlerinin karşılaştırılması.

Figure 3. Comparison of Ct values and Δ Ct values detected in raw milk and pasteurized milk for miR-191.

Normalizasyon öncesi pastörize süt ve kaynatılmış pastörize süütün CT değerlerinde beklenenin

dışında kaynatılmış pastörize sütün CT değerinde bir azalış gözlemlenmiştir ($p=0.027$) (Şekil 4a). Bu durum cel-miR-39 CT değerleri kullanılarak gerçekleştirilen normalizasyon sonrası elde edilen

Δ CT değerlerinin analiz edilmesi sonrası literatürle uyumlu bir biçimde kaynatılmış pastörize sütte miR-191 içeriğinin düştüğünü göstermektedir (Şekil 4b).



Şekil 4. miR-191 için pastörize süt ve kaynatılmış pastörize sütte tespit edilen Ct değerleri (a) ve Δ Ct (b) değerlerinin karşılaştırılması.

Figure 4. Comparison of Ct values and Δ Ct values detected in pasteurized and boiled pasteurized milk for miR-191.

Pastörize sütü referans olarak gerçekleştirilen kat değişim analizleri sonucunda pastörize süt ile kaynatılmış pastörize süt arasında kaynatma işleminin sebep olduğu %66.4 oranından anlamlı ($p=0.001$) bir azalma gözlemlenmiştir (Çizelge 3). Bu çalışma ve literatürdeki çalışmalar sonucunda miRNA'ların süt işleme süreçleri sonrası stabil kaldıkları görülmüştür. Çalışmamızda gerçekleşen işlemler (Kaynatma, pastörizasyon vb.) ile bağlantılı olarak miRNA miktarında beklenen bir azalma gözlemlenmiştir. Bununla birlikte işlemlerin sonunda kaynatılmış pastörize süt örneğinin dört tekrarının ikisi CT eşliğinin her ne kadar üstünde (>35) olsa dahi diğer iki örneğin RT-qPCR tekniği ile tespit edilebilen miRNA miktarına sahip olduğu görülmüştür.

Süt, süt ürünleri ve diğer gıdalarda bulunan miRNA'ların farklı mekanizmalar yardımıyla insan vücudunda bulunan farklı hücre tiplerine geçiş sağlayabileceği ve farklı patolojik durumlar oluşturabileceği daha önce gerçekleştirilen çalışmalar sonucunda gözlemlenmiştir (Baier ve ark., 2014, Benmoussa ve ark., 2020; Rani ve ark., 2017; Izumi ve ark., 2015; Izumi ve ark., 2012;). Yapılan çalışmalar sonunda süt ve süt ürünlerinin içeriklerinde miRNA'ların gıdalar işlenirken korunması eksozom benzeri partiküller ve Argonaute, Nucleophosmin 1 gibi farklı proteinlerin sayesinde olduğunu göstermektedir. Özellikle Argonaute protein 2'nin (Ago2) bu

süreçte etkisinin olduğu ve hücre kültürü çalışmaları ile Ago2'nin bulunmadığı hücrelerde miRNA degradasyonun hızlandığı, Ago2'nin yüksek miktarda bulunduğu hücrelerde ise miRNA stabilitesinin arttığı literatürde raporlanmıştır (Cieślak ve ark., 2023; Winter ve Diederichs, 2011). Domuz sütü ile yapılan bir çalışmada, miRNA'lar Ago2 proteinine bağlı olarak bulunduğu immünopresipitasyon assayleri ile gösterilmiştir (Zeng ve ark., 2021). Ago2, benzeri proteinler ve eksozomlar sayesinde gıda ürünlerinde bulunan miRNA'ların, ürünlerin geçtiği süreçlerin (pastörizasyon, homojenizasyon, kaynatma vb.) sonucunda tamamen degrade olmamalarının sebebi olabilir. Yapılan çalışmalar sonucunda miR-191-5p ekspresyonunun meme kanserinde prognozu etkilediği ve *C/EBPβ*'i hedefleyerek hücre döngüsünü bozup tümörogenezi tetiklediği, kolon kanserine sebep olabileceği, miR-191-5p'min *RXRA* ile etkileşerek prostat kanseri hücrelerine radyasyona karşı direnç verdiği ve hastaların tedavi sürecinde negatif etki yaratabileceği raporlanmıştır (Ashirbekov ve ark., 2020; Pan ve ark., 2023; Sharma ve ark., 2017; Zhang ve ark., 2014; Ray ve ark., 2015). miR-191-5p, 16 farklı kanser türünde [meme (kadın), kolon, akciğer, karaciğer, prostat, pankreas, mide, yumurtalık kanseri, hipofiz adenomu, özofagus skuamöz karsinomu, oral skuamöz karsinom, osteosarkom,

B-ALL, mesane, anaplastik büyük hücreli lenfoma ve akut myeloid lösemi (AML)] up regüle ve 6 farklı kanser türünde de (Şiddetli medulloblastom, retinoblastom, tiroid foliküler tümörü, erkek meme kanseri, CALL ve melanom) down regüle olduğu raporlanmıştır (Nagpal ve Kulshreshtha, 2014). Kanser haricinde İnsan Bağışıklık Yetmezliği Virüsü (HIV) ile enfekte kişilerde miR-191-5p'nin *NUP50* geninin ekspresyonu inhibe ederek HIV enfeksiyonun ilerleyişini yavaşlatabileceği gösterilmiştir (Zheng ve ark. 2021). Sütün içinde bol miktarda bulunan miR-191-5p'nin sebep olabileceği veya pozitif/negatif etkileyeceği durumlar söz konusudur. Literatürde gözlemlendiği üzere farklı miRNA'ların aynı işlemlere verdikleri cevaplar farklıdır. Gerçekleştirilmiş olan çalışmada tek bir miRNA'nın miktar analizleri incelenmiş olsa da literatürdeki farklı miRNA'lar ile kıyaslandığında gerçekleştirilen işlemler sonucunda hala ölçülebilecek miktarda miR-191'nin var olduğu gözlemlenmiştir. Analizlerin sonucu miRNA miktarındaki değişikliklerin gerçekleşen işlemler kaynaklı olabileceğini ortaya koymakla beraber analizler için ana örnekten ayrılan süt örneklerinin miRNA içeriklerinin homojen olmama ihtimali ve dış faktörlerin (sütün sağılma zamanı, tutulduğu sıcaklık, taşındığı materyallerin nükleaz içeriği vb.) de sonuçlara etki etme potansiyeli mümkündür.

SONUÇLAR

Sonuç olarak çiğ süt tüketiminin Hastalık Kontrol ve Korunma Merkezleri'ne [Centers for Disease Control and Prevention (CDC)] (<https://www.cdc.gov/>) göre *Campylobacter*, *Cryptosporidium*, *E. coli*, *Listeria*, *Brucella* ve *Salmonella* gibi farklı patojenik mikroorganizmaları bulundurmakla birlikte insana geçmesi durumunda farklı patolojiler ile ilişkili olduğu bilinen miR-191 ve benzeri miRNA'ları bol miktarda da içermektedir. Kaynatma ve benzeri süt işleme yöntemleri ile sütte bulunan miRNA'ların miktarlarının azaldığı hem gerçekleştirmiş olduğumuz çalışmada hem de literatürde farklı miRNA'lar için gözlemlenmiştir. Sonuçlarımız literatürdeki çiğ sütün ev ortamında kaynatılması ve bu durumun farklı miRNA dizilerine etkisi ile ilişkisine yönelik daha çok araştırma yapılması gerektiğini ortaya koymuştur. Elde edilebilecek bulgular ile farklı besinsel miRNA'ların gıdalardaki ve bu gıdaların işlenmesi sonrasındaki miktarlarının aydınlatılması üstünde

oluşturulacak literatür kişiselleştirilmiş tedavi ve tamamlayıcı tıp alanlarında önemli olabileceği öngörülmektedir.

EKLER

Bu çalışma Bursa Uludağ Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon birimi tarafından desteklenmiştir (FLO-2023-1551) ve çalışmanın kısa özeti 3. Uluslararası Bilimsel Gelişmeler kongresinde (20-23 Aralık 2023) sözlü sunum olarak sunulmuştur.

Çıkar Çatışması: Yazarlar arasında herhangi bir çıkar çatışması bulunmadığını beyan ederiz.

Yazar Katkısı: Proje yönetimi, danışmanlık Dilek Pirim; verilerin oluşturulması, işlenmesi, makale yazımı ve düzenlenmesi Fatih Atilla Bağcı ve Dilek Pirim tarafından gerçekleştirilmiştir.

Etik Kurulu Kararı: Bu çalışmada etik kurul onayına ihtiyaç yoktur.

Referanslar

- Abou el qassim, L., Le Guillou, S., & Royo, L. J. (2022). Variation of miRNA Content in Cow Raw Milk Depending on the Dairy Production System. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(19), Article 19. DOI:<https://doi.org/10.3390/ijms231911681>
- Abou el qassim, L., Martínez, B., Rodríguez, A., Dávalos, A., López de las Hazas, M.-C., Menéndez Miranda, M., & Royo, L. J. (2023). Effects of Cow's Milk Processing on MicroRNA Levels. *Foods*, 12(15), Article 15. DOI:<https://doi.org/10.3390/foods12152950>
- Arslan, Ö., Sevim, A., Güler, D., & Saner, G. (2020). İzmir İlinde Tüketicilerin Çiğ Süt Satın Alma Kararlarını Etkileyen Faktörlerin Analizi. *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 51(3), Article 3. DOI:<https://doi.org/10.17097/ataunizfd.694829>
- Ashirbekov, Y., Abaildayev, A., Omarbayeva, N., Botbayev, D., Belkozhayev, A., Askandirova, A., Neupokoyeva, A., Utegenova, G., Sharipov, K., & Aitkhozhina, N. (2020). Combination of circulating miR-145-5p/miR-191-5p as biomarker for breast cancer detection. *PeerJ*, 8, e10494. DOI:<https://doi.org/10.7717/peerj.10494>
- Baier, S. R., Nguyen, C., Xie, F., Wood, J. R., & Zemleni, J. (2014). MicroRNAs are absorbed in biologically meaningful amounts from nutritionally relevant doses of cow milk and affect gene expression in peripheral blood mononuclear cells, HEK-293 kidney cell cultures, and mouse livers. *The Journal of Nutrition*, 144(10), 1495–1500. DOI:<https://doi.org/10.3945/jn.114.196436>
- Benmoussa, A., Laugier, J., Beauparlant, C. J., Lambert, M., Droit, A., & Provost, P. (2020). Complexity of the microRNA transcriptome of cow milk and milk-derived

- extracellular vesicles isolated via differential ultracentrifugation. *Journal of Dairy Science*, 103(1), 16–29. DOI:<https://doi.org/10.3168/jds.2019-16880>
- Cieślak, M., Bryniarski, K., Nazimek, K., Cieślak, M., Bryniarski, K., & Nazimek, K. (2023). Dietary and orally-delivered miRNAs: Are they functional and ready to modulate immunity? *AIMS Allergy and Immunology*, 7(1), Article allergy-07-01-008. DOI:<https://doi.org/10.3934/Allergy.2023008>
- Howard, K. M., Jati Kusuma, R., Baier, S. R., Friemel, T., Markham, L., Vanamala, J., & Zemleni, J. (2015). Loss of miRNAs during processing and storage of cow's (*Bos taurus*) milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(2), 588–592. DOI:<https://doi.org/10.1021/jf505526w>
- Izumi, H., Kosaka, N., Shimizu, T., Sekine, K., Ochiya, T., & Takase, M. (2012). Bovine milk contains microRNA and messenger RNA that are stable under degradative conditions. *Journal of Dairy Science*, 95(9), 4831–4841. DOI:<https://doi.org/10.3168/jds.2012-5489>
- Izumi, H., Tsuda, M., Sato, Y., Kosaka, N., Ochiya, T., Iwamoto, H., Namba, K., & Takeda, Y. (2015). Bovine milk exosomes contain microRNA and mRNA and are taken up by human macrophages. *Journal of Dairy Science*, 98(5), 2920–2933. DOI:<https://doi.org/10.3168/jds.2014-9076>
- Kirchner, B., Pfaffl, M. W., Dumpler, J., von Mutius, E., & Ege, M. J. (2016). microRNA in native and processed cow's milk and its implication for the farm milk effect on asthma. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 137(6), 1893–1895.e13. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.jaci.2015.10.028>
- Li, W., Li, W., Wang, X., Zhang, H., Wang, L., & Gao, T. (2022). Comparison of miRNA profiles in milk-derived extracellular vesicles and bovine mammary glands. *International Dairy Journal*, 134, 105444. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2022.105444>
- Li, H., Du, M., Xu, W., & Wang, Z. (2021). MiR-191 downregulation protects against isoflurane-induced neurotoxicity through targeting BDNF. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 31(5), 367–373. DOI:<https://doi.org/10.1080/15376516.2021.1886211>
- Lichołaj, S., Studzińska, D., Plutecka, H., Gubała, T., Szczeklik, W., & Sanak, M. (2021). MiR-191 as a Key Molecule in Aneurysmal Aortic Remodeling. *Biomolecules*, 11(11), 1611. DOI:<https://doi.org/10.3390/biom11111611>
- Melnik, B. C., John, S. M., & Schmitz, G. (2014). Milk: An exosomal microRNA transmitter promoting thymic regulatory T cell maturation preventing the development of atopy? *Journal of Translational Medicine*, 12, 43. DOI:<https://doi.org/10.1186/1479-5876-12-43>
- Melnik, B. C., & Schmitz, G. (2017). MicroRNAs: Milk's epigenetic regulators. *Best Practice & Research. Clinical Endocrinology & Metabolism*, 31(4), 427–442. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.beem.2017.10.003>
- Melnik, B. C., Weiskirchen, R., & Schmitz, G. (2022). Milk exosomal microRNAs: Friend or foe?—a narrative review. *ExRNA*, 4(0). DOI:<https://doi.org/10.21037/exrna-22-5>
- Nagpal, N., & Kulshreshtha, R. (2014). miR-191: An emerging player in disease biology. *Frontiers in Genetics*, 5, 99. DOI:<https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00099>
- Oh, S., Park, M. R., Son, S. J., & Kim, Y. (2015). Comparison of Total RNA Isolation Methods for Analysis of Immune-Related microRNAs in Market Milks. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 35(4), 459–465. DOI:<https://doi.org/10.5851/kosfa.2015.35.4.459>
- Polioudakis, D., Abell, N. S., & Iyer, V. R. (2015). MiR-191 Regulates Primary Human Fibroblast Proliferation and Directly Targets Multiple Oncogenes. *PLOS ONE*, 10(5), e0126535. DOI:<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126535>
- Rani, P., Yenuganti, V. R., Shandilya, S., Onteru, S. K., & Singh, D. (2017). miRNAs: The hidden bioactive component of milk. *Trends in Food Science & Technology*, 65, 94–102. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.05.007>
- Ray, J., Haughey, C., Hoey, C., Jeon, J., Murphy, R., Dura-Perez, L., McCabe, N., Downes, M., Jain, S., Boutros, P. C., Mills, I. G., & Liu, S. K. (2020). miR-191 promotes radiation resistance of prostate cancer through interaction with RXRA. *Cancer Letters*, 473, 107–117. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.canlet.2019.12.025>
- Sadri, M., Shu, J., Kachman, S. D., Cui, J., & Zemleni, J. (2020). Milk exosomes and miRNA cross the placenta and promote embryo survival in mice. *Reproduction (Cambridge, England)*, 160(4), 501–509. DOI:<https://doi.org/10.1530/REP-19-0521>
- Sevim, A., Arslan, Ö., Güler, D., & Saner, G. (2021). Tüketicilerin çiğ süt satın alma eğilimlerinin saptanması: İzmir ili Örneği. *Mediterranean Agricultural Sciences*, 34(1), Article 1. DOI:<https://doi.org/10.29136/mediterranean.655574>
- Tian, F., Yu, C., Wu, M., Wu, X., Wan, L., & Zhu, X. (2019). MicroRNA-191 promotes hepatocellular carcinoma cell proliferation by has_circ_0000204/miR-191/KLF6 axis. *Cell Proliferation*, 52(5), e12635. DOI:<https://doi.org/10.1111/cpr.12635>
- Tremonte, P., Tipaldi, L., Succi, M., Pannella, G., Falasca, L., Capilongo, V., Coppola, R., & Sorrentino, E. (2014). Raw milk from vending machines: Effects of boiling, microwave treatment, and refrigeration on microbiological quality. *Journal of Dairy Science*, 97(6), 3314–3320. DOI:<https://doi.org/10.3168/jds.2013-7744>
- Wang, L., Shui, X., Zhang, M., Mei, Y., Xia, Y., Lan, G., Hu, L., Gan, C.-L., Tian, Y., Li, R., Gu, X., Zhang, T., Chen, D., & Lee, T. H. (2022). MiR-191-5p Attenuates Tau Phosphorylation, A β Generation, and Neuronal Cell Death by Regulating Death-Associated Protein Kinase 1. *ACS Chemical Neuroscience*, 13(24), 3554–3566. DOI:<https://doi.org/10.1021/acscchemneuro.2c00423>
- Winter, J., & Diederichs, S. (2011). Argonaute proteins regulate microRNA stability: Increased microRNA abundance by Argonaute proteins is due to microRNA stabilization. *RNA Biology*, 8(6), 1149–1157. DOI:<https://doi.org/10.4161/rna.8.6.17665>
- Yu, J., Zhou, A., & Li, Y. (2022). Clinical value of miR-191-5p in predicting the neurological outcome after out-of-hospital cardiac arrest. *Irish Journal of Medical Science*, 191(4), 1607–1612. DOI:<https://doi.org/10.1007/s11845-021-02745-6>
- Zeng, B., Chen, T., Luo, J.-Y., Zhang, L., Xi, Q.-Y., Jiang, Q.-Y., Sun, J.-J., & Zhang, Y.-L. (2021). Biological Characteristics and Roles of Noncoding RNAs in Milk-Derived Extracellular Vesicles. *Advances in Nutrition*,

- 12(3), 1006–1019.
DOI:<https://doi.org/10.1093/advances/nmaa124>
- Zhang, X.-F., Li, K., Gao, L., Li, S.-Z., Chen, K., Zhang, J.-B., Wang, D., Tu, R.-F., Zhang, J.-X., Tao, K.-X., Wang, G., & Zhang, X.-D. (2014). miR-191 promotes tumorigenesis of human colorectal cancer through targeting C/EBP β . *Oncotarget*, 6(6), 4144–4158. DOI:<https://doi.org/10.18632/oncotarget.2864>
- Zhang, Y., Xu, Q., Hou, J., Huang, G., Zhao, S., Zheng, N., & Wang, J. (2022). Loss of bioactive microRNAs in cow's milk by ultra-high-temperature treatment but not by pasteurization treatment. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 102(7), 2676–2685. DOI:<https://doi.org/10.1002/jsfa.11607>
- Zheng, Y., Yang, Z., Jin, C., Chen, C., & Wu, N. (2021). Hsa-miR-191-5p inhibits replication of human immunodeficiency virus type 1 by downregulating the expression of NUP50. *Archives of Virology*, 166(3), 755–766. DOI:<https://doi.org/10.1007/s00705-020-04899-7>
- Pan, L., Liu, W., Zhao, H., Chen, B., & Yue, X. (2023). MiR-191-5p inhibits KLF6 to promote epithelial-mesenchymal transition in breast cancer. *Technology and Health Care: Official Journal of the European Society for Engineering and Medicine*, 31(6), 2251–2265. DOI:<https://doi.org/10.3233/THC-230217>
- Sharma, S., Nagpal, N., Ghosh, P. C., & Kulshreshtha, R. (2017). P53-miR-191-SOX4 regulatory loop affects apoptosis in breast cancer. *RNA (New York, N.Y.)*, 23(8), 1237–1246. DOI:<https://doi.org/10.1261/rna.060657.117>