
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Gazi
1926

KLUYVEROMYCES MARXIANUS M59 SUŞUNDAN İZOLE EDİLEN EKZOPOLİSAKKARİTİN *IN VITRO* İNSAN LENFOSİTLERİNDE GENOTOKSİK, ANTİGENOTOKSİK VE EPİGENETİK DEĞİŞİKLİKLER ÜZERİNE ETKİLERİ

Hasan Berk DEMİREL

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ŞUBAT 2025

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmasında yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Hasan Berk DEMİREL

27/02/2025

KLUYVEROMYCES MARXIANUS M59 SUŞUNDAN İZOLE EDİLEN EKZOPOLİSAKKARİTİN *IN VITRO* İNSAN LENFOSİTLERİNDE GENOTOKSİK, ANTİGENOTOKSİK VE EPİGENETİK DEĞİŞİKLİKLER ÜZERİNE ETKİLERİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Hasan Berk DEMİREL

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Şubat 2025

ÖZET

Mikroorganizmaların çeşitli çevresel koşullarda sentezlediği biyopolimerler olan ekzopolisakkaritler (EPS'ler) birçok alanda kullanılmaktadır. Bu çalışma kapsamında *Kluyveromyces marxianus* M59 maya suşundan izole edilen EPS'nin (EPS_{M59}) suda çözünebilmesi ve biyolojik aktivitesini daha etkili göstermesi için kimyasal modifikasyonlardan olan karboksimetilasyon işlemine tabi tutulmuştur. Ayrıca EPS_{M59}'un moleküler ağırlığı, elementel içeriği, yüzey morfolojisi ve fonksiyonel grupları analiz edilerek karakterizasyonu yapılmıştır. Bu çalışmada genotoksik ve antigenotoksik etkilerinin değerlendirilmesi amacıyla EPS_{M59}'un 40; 80; 160; 320 ve 640 µg/mL konsantrasyonları *in vitro* insan lenfositlerine uygulanmıştır. Bu amaçla EPS_{M59} tek başına uygulanarak genotoksik potansiyeli araştırılmıştır. Antigenotoksik etkisinin belirlenmesi için ise insan lenfositlerinde mitomisin-C (MMC; 0,20 µg/mL), metil metansülfonat (MMS; 6,60 µg/mL) ve hidrojen peroksit (H_2O_2; 100 µM) ile eş zamanlı muamelesi yapılmıştır. Çalışmada Kromozomal anormallikleri (KA) testi, Sitokinez blok mikronükleus sitom testi (CBMN-Cyt) ve comet testi kullanılmıştır. EPS_{M59} uygulamasıyla KA, CBMN-Cyt ve comet testlerinde anlamlı bir genotoksik etkisi tespit edilmezken EPS_{M59}'un sadece 48 saatlik uygulamada 80 µg/mL konsantrasyonunda mitotik indeksi (Mİ) anlamlı olarak azalttığı gözlenmiştir. Bununla birlikte EPS_{M59}'un KA ve CBMN-Cyt testlerinde MMS ve MMC tarafından ve Comet testinde H_2O_2 tarafından oluşturulan hasarı azalttığı tespit edilmiştir. Epigenetik değişikler üzerine yapılan çalışmalarda ise 160 µg/mL konsantrasyonunda DNMT1 ve DNMT3A; 320 µg/mL konsantrasyonunda DNMT1 ve DNMT3B genlerinin ekspresyon seviyelerinde azalma meydana geldiği, DNMT1, DNMT3A ve DNMT3B'nin diğer tüm konsantrasyonlarında ve tüm HDAC1 gen ekspresyon seviyelerinde artış olduğu tespit edilmiştir. Bu bağlamda EPS_{M59}'un antimutajenik/antigenotoksik/kemopreventif etki gösterdiği ve epigenetik değişikliklere yol açabileceği tespit edilmiştir.

Bilim Kodu : 20316
Anahtar Kelimeler : *Kluyveromyces marxianus,* ekzopolisakkarit, karakterizasyon, genotoksisite, antigenotoksisite, epigenetik değişiklikler
Sayfa Adedi : 155
Danışman : Prof. Dr. Deniz YÜZBAŞIOĞLU

EFFECTS OF EXOPOLYSACCHARIDE ISOLATED FROM *KLUYVEROMYCES MARXIANUS* M59 STRAIN ON GENOTOXIC, ANTIGENOTOXIC AND EPIGENETIC CHANGES IN HUMAN LYMPHOCYTES *IN VITRO*

(M. Sc. Thesis)

Hasan Berk DEMİREL

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

February 2025

ABSTRACT

Exopolysaccharides (EPSs), which are biopolymers synthesized by microorganisms under various environmental conditions, are used in many fields. Within the scope of this study, EPS (EPS_{M59}) isolated from Kluyveromyces marxianus M59 yeast strain was subjected to carboxymethylation, which is one of the chemical modifications, in order to be soluble in water and to show its biological activity more effectively. In addition, EPS_{M59} was characterized by analyzing its molecular weight, elemental content, surface morphology and functional groups. In this study, 40, 80, 160, 320, and 640 µg/mL concentrations of EPS_{M59} were treated to *in vitro* human lymphocytes to evaluate its genotoxic and antigenotoxic effects. For this purpose, EPS_{M59} was applied alone and its genotoxic potential was investigated. To determine its antigenotoxic effect, simultaneous treatment with mitomycin-C (MMC; 0.20 µg/mL), methyl methanesulfonate (MMS; 6.60 µg/mL) and hydrogen peroxide (H_2O_2; 100 µM) in human lymphocytes was performed. Chromosomal abnormalities (CA) test, Cytokinesis block micronucleus cytome test (CBMN-Cyt) and comet test were used in the study. While no significant genotoxic effect was detected in KA, CBMN-Cyt and comet assays with EPS_{M59} treatment, only 48 hours of treatment significantly decreased mitotic index (MI) at a concentration of 80 µg/mL. However, EPS_{M59} was found to reduce the damage caused by MMS and MMC in KA and CBMN-Cyt assays and by H_2O_2 in comet assay. In studies on epigenetic changes, it was determined that there was a decrease in the expression levels of DNMT1 and DNMT3A at a concentration of 160 µg/mL; DNMT1 and DNMT3B genes at a concentration of 320 µg/mL, and an increase in all other concentrations of DNMT1, DNMT3A and DNMT3B and all HDAC1 gene expression levels. In this context, it has been determined that EPS_{M59} shows antimutagenic/antigenotoxic/chemopreventive effects and may lead to epigenetic changes.

Science Code : 20316
Key Words : *Kluyveromyces marxianus*, exopolysaccharide, characterization, genotoxicity, antigenotoxicity, epigenetic changes
Page Number : 155
Supervisor : Prof. Dr. Deniz YÜZBAŞIOĞLU

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca tecrübesi, hoşgörüsü, sabrı ve anlayışıyla her konuda beni destekleyen, akademik hayatım boyunca örnek alacağım saygıdeğer hocam Prof. Dr. Deniz YÜZBAŞIOĞLU'na, bilgi ve görüşlerinden her zaman yararlandığım Prof. Dr. Fatma ÜNAL'a, tezimde kullanmış olduğum ekzopolisakkaritin hazırlama ve karakterizasyon aşamalarına katkıda bulunan, güler yüzüyle her zaman görüş ve önerilerinden yararlandığım değerli hocam Prof. Dr. Zehranur YÜKSEKDAĞ'a teşekkürlerimi sunarım.

Kendilerinden çok şey öğrendiğim, sorularıma sabırla cevap veren, yardımlarını desteklerini esirgemeyen hocalarım Araş. Gör. Ece AKBAŞ'a ve Dr. Fatma OKUŞ'a ve yardım/desteklerini hep hissettiğim Genetik Laboratuvarındaki bütün arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Her zaman yanımda olan, motive eden, bana inanan, bu günlere gelmemi sağlayan ve varlıklarından güç aldığım canım annem Çiğdem DEMİREL'e ve canım babam Hakan DEMİREL'e sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışmasını FYL-2024-9366 numaralı projeyle destekleyen Gazi Üniversitesi Rektörlüğü, Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimine teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET iv
ABSTRACT v
TEŞEKKÜR vi
İÇİNDEKİLER vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ xi
ŞEKİLLERİN LİSTESİ xiii
RESİMLERİN LİSTESİ xvi
SİMGELER VE KISALTMALAR xvii
1. GİRİŞ 1
2. GENEL BİLGİLER 7
2.1. Nutrasötikler, Fonksiyonel Gıdalar ve Sağlık Üzerine Etkileri 7
2.2. Mikrobiyota 8
2.3. Probiyotikler ve Prebiyotikler 11
2.3.1. Probiyotikler 11
2.3.2. Prebiyotikler 13
2.4. Kluyveromyces marxianus 16
2.5. Ekzopolisakkarit 20
2.5.1. EPS Modifikasyonu ve karakterizasyonu 22
2.6. Kemoprevensiyon 24
2.7. Genotoksisite ve Antigenotoksisite 25
2.8. Mutajenler 26
2.8.1. Mitomisin-C (MMC) 28
2.8.2. Metil metansülfonat (MMS) 28
2.8.3. Serbest radikaller, reaktif oksijen türleri ve hidrojen peroksit 29

Sayfa

2.9. Genotoksisite testleri 30

2.9.1. Kromozomal anormallikleri testi 31

2.9.2. Sitokinez blok mikronükleus (CBMN-Cyt) sitom testi 32

2.9.3. Comet testi 32

2.10. Epigenetik Değişiklikler 33

2.10.1. DNA metilasyonu 34

2.10.2. Histon modifikasyonları 35

2.10.3. Kodlamayan RNA'lar (ncRNA'lar) 37

2.11. Real Time PCR (RT-qPCR) 39

2.12. EPS'ler ile Gerçekleştirilmiş Genotoksisite, Antigenotoksisite ve Gen Ekspresyon Düzeylerine Etkileri ile İlgili Çalışmalar 40

3. MATERYAL VE METOT 43

3.1. Materyal 43

3.1.1. Test materyalleri 43

3.2. Metot 45

3.2.1. Kluyveromyces marxianus'dan EPS izolasyonu 46

3.2.2. EPS_{M59}'un karboksimetilasyonu 47

3.2.3. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopi (FT-IR) Analizi 48

3.2.4. Taramalı Elektron Mikroskop (SEM) Analizi 48

3.2.5. EPS_{M59}'un çalışılmalarda kullanılacak konsantrasyonlarının tespit edilmesi 48

3.2.6. Kültüre edilmiş periferal insan lenfositlerinde kromozomal anormallik testi 49

3.2.7. Kültüre edilmiş periferal insan lenfositlerinde sitokinez blok mikronükleus sitom testi 51

3.2.8. Preparatların boyanması 54

3.2.9. Mikroskobik inceleme ve sonuçların değerlendirilmesi 54

3.2.10. Comet testi 55

Sayfa

3.2.11. İstatistiksel analizler 57

3.2.12. Real-Time PCR (RT-qPCR) testi 58

3.2.13. Real-Time PCR (RT-qPCR) testi istatistiksel analizi 62

4. ARAŞTIRMA BULGULARI 63

4.1. EPS_{M59}'un Karakterizasyonu 63

4.1.1. Taramalı elektron mikroskobu-enerji dağıtıcı X-ray (SEM-EDX) analizi 63

4.1.2. Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopi (FI-TR) analizi 64

4.2. EPS_{M59}'un Genotoksik Etkilerinin Değerlendirmesi 66

4.2.1. Kromozomal anormallikler ve mitotik indeks üzerine etkileri 66

4.2.2. EPS_{M59}'un sitokinez blok mikronükleus sitom test bulguları 71

4.2.3. EPS_{M59}'un comet testinde kuyruk yoğunluğu, kuyruk uzunluğu ve kuyruk momenti üzerine etkileri 72

4.3. EPS_{M59}'un Antigenotoksik Etkilerinin Değerlendirmesi 75

4.3.1. EPS_{M59}'un mitomisin-C tarafından oluşan hasara karşı antigenotoksik etkisinin kromozomal anormallikler ve mitotik indeks üzerinden değerlendirilmesi 75

4.3.2. EPS_{M59}'un mitomisin-C tarafından oluşturulan hasara karşı antigenotoksik etkisinin sitokinez blok mikronükleus sitom ve nükleer bölünme indeksi üzerinden değerlendirilmesi 79

4.3.3. EPS_{M59}'un metil metansülfonat tarafından oluşan hasara karşı antigenotoksik etkisinin kromozomal anormallikler ve mitotik indeks üzerinden değerlendirilmesi 81

4.3.4. EPS_{M59}'un metil metansülfonat tarafından oluşturulan hasara karşı antigenotoksik etkisinin sitokinez blok mikronükleus sitom ve nükleer bölünme indeksi üzerinden değerlendirilmesi 84

4.4. EPS_{M59}'un Hidrojen Peroksit (H_2O_2) Tarafından Oluşturulmuş Hasara Karşı Antigenotoksik Etkileri 86

4.4.1. Comet kuyruk yoğunluğu, kuyruk uzunluğu ve kuyruk momenti parametreleri üzerine etkileri 86

4.5. EPS_{M59}'un RT-qPCR Yöntemiyle Epigenetik Değişiklikler Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi 88

Sayfa

4.5.1. EPS_{M59}'un DNA metiltransferaz 1 (DNMT1), DNA metiltransferaz 3A (DNMT3A), DNA metiltransferaz 3B (DNMT3B) ve histon deasetilaz 1 (HDAC1) genlerinin ekspresyon düzeyleri üzerine etkisi 88

5. TARTIŞMA..... 95

6. SONUÇ VE ÖNERİLER 121

KAYNAKLAR..... 123

ÖZGEÇMİŞ 155

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge **Sayfa**

Çizelge 2.1. *Kluyveromyces marxianus* mayasının sınıflandırılması 17

Çizelge 2.2. EPS'lerin genotoksisite, antigenotoksisite ve antikanser çalışmaları 41

Çizelge 3.1. RT-qPCR testinde kullanılan primerler ve primerlere özgü sekanslar 60

Çizelge 3.2. RT-qPCR reaksiyon bileşenleri 61

Çizelge 3.3. RT-qPCR reaksiyon koşulları 61

Çizelge 4.1. EPS_{M59}'un SEM-EDX analizi yüzde element sonuçları (%) 63

Çizelge 4.2. EPS_{M59}'un 24 ve 48 saatlik muamelelerinin periferal insan lenfositlerinde oluşturdukları kromozom anormallikleri, anormal hücre yüzdeleri, hücre başına düşen anormallik ve mitotik indeks frekansları 67

Çizelge 4.3. EPS_{M59}'un periferal insan lenfositlerinde mikronükleus, nükleer tomurcuk, nükleoplazmik köprü ve nükleer bölünme indeksi üzerine etkisi 71

Çizelge 4.4. EPS_{M59} muamelesinin izole lenfositlerde kuyruk yoğunluğu (%), kuyruk uzunluğu (µm) ve kuyruk momenti parametreleri üzerine etkileri 73

Çizelge 4.5. EPS_{M59} + MMC'nin 24 ve 48 saatlik muamelelerinin periferal insan lenfositlerinde meydana getirdikleri kromozomal anormallik tipleri, anormal hücre yüzdeleri, hücre başına düşen anormallik frekansı ve mitotik indeks değerleri 77

Çizelge 4.6. EPS_{M59} + MMC'nin 48 saatlik muamelelerinin periferal insan lenfositlerinde mikronükleus, nükleer tomurcuk, nükleoplazmik köprü frekansları ve nükleer bölünme indeksi üzerine etkileri 80

Çizelge 4.7. EPS_{M59} + MMS'nin 24 ve 48 saatlik muamelelerinin periferal insan lenfositlerinde kromozomal anormallik tipleri, anormal hücre yüzdeleri, hücre başına düşen anormallik frekansı ve mitotik indeks değerleri 82

Çizelge 4.8. EPS_{M59} + MMS'nin 48 saatlik muamelelerinin periferal insan lenfositlerinde meydana getirdikleri mikronükleus, nükleer tomurcuk, nükleoplazmik köprü frekansları ve nükleer bölünme indeksi üzerine etkileri 85

Çizelge 4.9. EPS_{M59} + H_2O_2 eş zamanlı muamelesinin izole lenfositlerde kuyruk yoğunluğu (%), kuyruk uzunluğu (µm) ve kuyruk momenti parametreleri üzerine etkileri 86

Çizelge 4.10. DNMT1 DNMT3A, DNMT3B ve HDAC1 genlerinin ΔΔCt, RQ değerleri, mRNA ekspresyon düzeyleri 89

Çizelge **Sayfa**

Çizelge 4.11. EPS_{M59}, EPS_{M59}+MMC ve EPS_{M59}+MMS uygulamaları KA ve CBMN-Cyt testlerinin sonuçları 92

Çizelge 4.12. Comet test sonuçları 93

Çizelge 4.13. RT-qPCR sonuçları 93

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil **Sayfa**

Şekil 2.1. Antimutajenlerin etki mekanizması 26

Şekil 3.1. Mitomisin-C yapısal formülü 44

Şekil 3.2. Metil metansüfonat yapısal formülü 45

Şekil 3.3. Hidrojen peroksit'in (H_2O_2) yapısal formülü 45

Şekil 3.4. Kültürün başlangıç ve inkübasyon süreci 50

Şekil 3.5. Kültür süresinde gerçekleştirilen muameleler 50

Şekil 3.6. Kültürün sonlandırma işlemleri 51

Şekil 3.7. Kültürün başlangıç ve inkübasyon süreci 52

Şekil 3.8. Kültür süresinde yapılan muameleler 53

Şekil 3.9. Kültürün sonlandırma işlemleri 53

Şekil 3.10. Comet testindeki uygulamaları 56

Şekil 3.11. Comet analiz programı 57

Şekil 3.12. RT-qPCR testi için kültür ve inkübasyon aşamaları 58

Şekil 3.13. RNA izolasyonu 59

Şekil 3.14. cDNA sentezi 60

Şekil 3.14. RT-qPCR analizi 61

Şekil 4.1. EPS_{M59}'un taramalı elektron mikroskop (SEM) görüntüleri (A) 5000X, (B) 20000x. 63

Şekil 4.2 EPS_{M59}'un SEM-EDX analizi 64

Şekil 4.3 EPS_{M59}'un FT-IR sprektrumları 65

Şekil 4.4 $CMEPS_{M59}$'un FT-IR sprektrumları 65

Şekil 4.5. EPS_{M59}'un 24 ve 48 saatlik muameleleri sonucu periferal insan lenfositlerinde anormal hücre yüzdesi üzerine etkisi 68

Şekil 4.6. EPS_{M59}'un 24 ve 48 saatlik muameleleri sonucu periferal insan lenfositlerinde hücre başına düşen anormallik frekansları üzerine etkisi 68

Şekil **Sayfa**

Şekil 4.7. EPS_{M59}'un 24 ve 49 saatlik muamelelerinin periferal insan lenfositlerinde oluşturduğu mitotik indeks değerleri 69

Şekil 4.8. EPS_{M59}'un periferal insan lenfositlerinde mikronükleus, nükleer tomurcuk, nükleoplazmik köprü frekansları üzerine etkisi 71

Şekil 4.9. EPS_{M59}'un muamelesinin izole insan lenfositlerinde kuyruk yoğunluğu üzerine etkisi 73

Şekil 4.10. EPS_{M59}'un muamelesinin izole insan lenfositlerinde kuyruk uzunluğu üzerine etkisi 74

Şekil 4.11. EPS_{M59}'un muamelesinin izole insan lenfositlerinde kuyruk momenti üzerine etkileri..... 74

Şekil 4.12. EPS_{M59} + MMC'nin eş zamanlı 24 ve 48 saatlik muamelesinin periferal insan lenfositlerinde anormal hücre yüzdeleri üzerine etkileri 78

Şekil 4.13. EPS_{M59} + MMC'nin eş zamanlı 24 ve 48 saatlik muamelesinin periferal insan lenfositlerinde hücre başına düşen anormallik frekansı üzerine etkileri 78

Şekil 4.14. EPS_{M59} + MMC'nin eş zamanlı 24 ve 48 saatlik muamelesinin periferal insan lenfositlerinde mitotik indeks değerleri üzerine etkileri..... 79

Şekil 4.15. EPS_{M59} + MMC'nin 48 saatlik eş zamanlı muameleleri sonucu periferal insan lenfositlerinde mikronükleus, nükleer tomurcuk ve nükleoplazmik köprü frekansı üzerine etkileri 80

Şekil 4.16. EPS_{M59} + MMS'nin eş zamanlı 24 ve 48 saatlik muamelesinin periferal insan lenfositlerinde anormal hücre yüzdeleri üzerine etkileri 83

Şekil 4.17. EPS_{M59} + MMS'nin eş zamanlı 24 ve 48 saatlik muamelesinin periferal insan lenfositlerinde hücre başına düşen anormallik frekansı üzerine etkileri 83

Şekil 4.18. EPS_{M59} + MMS'nin eş zamanlı 24 ve 48 saatlik muamelesinin periferal insan lenfositlerinde mitotik indeks değerleri üzerine etkileri..... 84

Şekil 4.19. EPS_{M59} + MMS'nin 48 saatlik eş zamanlı muameleleri sonucu periferal insan lenfositlerinde oluşturdukları mikronükleus, nükleer tomurcuk ve nükleoplazmik köprü frekansları 85

Şekil 4.20. EPS_{M59} + H_2O_2 eş zamanlı muamelesinin izole insan lenfositlerinde kuyruk yoğunluğu üzerine etkisi..... 87

Şekil 4.21. EPS_{M59} + H_2O_2 eş zamanlı muamelesinin izole insan lenfositlerinde kuyruk uzunluğu üzerine etkisi..... 87

Şekil **Sayfa**

Şekil 4.22. EPS_{M59} + H_2O_2 eş zamanlı muamelesinin izole insan lenfositlerinde kuyruk momenti üzerine etkisi 88

Şekil 4.23. EPS_{M59} uygulamasının DNMT1 geni RQ değeri, mRNA ekspresyonu düzeyi üzerine etkileri 90

Şekil 4.24. EPS_{M59} uygulamasının DNMT3A geni RQ değeri, mRNA ekspresyonu düzeyi üzerine etkileri 90

Şekil 4.25. EPS_{M59} uygulamasının DNMT3B geni RQ değeri, mRNA ekspresyonu düzeyi üzerine etkileri 91

Şekil 4.26. EPS_{M59} uygulamasının HDAC1 geni RQ değeri, mRNA ekspresyonu düzeyi üzerine etkileri 91

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim **Sayfa**

Resim 3.1. Liyafilizatör cihazı 47

Resim 3.2. EPS'lerin liyofilizasyon sonrası görüntüsü 47

Resim 4.1. $EPS_{M59,}$ EPS_{M59}+MMC ve EPS_{M59}+MMS muameleleri sonucu periferal insan lenfositlerinde gözlenen kromozom anormallikleri 70

Resim 4.2. EPS_{M59}, EPS_{M59} + MMC ve EPS_{M59} + MMS uygulamaları sonucu periferal insan lenfositlerinde gözlenen mikronükleus, nükleer tomurcuk ve nükleoplazmik köprü içeren hücreler 72

Resim 4.3. EPS_{M59} ve EPS_{M59} + H_2O_2 muamele gruplarında izole insan lenfositlerinde gözlenen DNA hasarlarına ait resimler 75

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	**Açıklamalar**
%	Yüzde
°C	Santigrat Derece
µL	Mikrolitre
IC_{50}	İnhibitör konsantrasyonu 50
M	Molar
mL	Mililitre
Mn	Sayısal ortalama moleküler ağırlığı
Mw	Moleküler ağırlık
Mz	Boyut ortalama moleküler ağırlığı
nm	Nanometre
rpm	Devir sayısı
µM	Mikromolar
µg/mL	Mikrogram/Ml
pH	Asitlik Bazlık Birimi

Kısaltmalar	**Açıklamalar**
BN	Binükleat
CBMN-Cyt	Sitokinez blok mikronükleus sitom
Ct	Eşik döngüsü
DNA	Deoksiribonükleik asit
DNMT	DNA metiltransferaz
EDX	Enerji Dağıtıcı X-ray
EFSA	Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi
EPS	Ekzopolisakkarit
ETbr	Etidyum bromür
FDA	Avrupa ilaç dairesi

Kısaltmalar	Açıklamalar
FT-IR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
GPC	Jel Permeasyon Kromatografisi
GRAS	Genel Olarak Güvenli Kabul Edilen
H_2O_2	Hidrojen peroksit
HDAC	Histon deasetilaz
KA	Kromozomal anormallik
MMC	Mitomisin-C
MMS	Metil metansülfonat
MN	Mikronükleus
NPK	Nükleoplazmik köprü
NT	Nükleer tomurcuk
OECD	Ekonomik İş birliği ve Kalkınma Örgütü
QPS	Nitelikli Güvenlik Karinesi
ROT	Reaktif oksijen türevleri
RQ	Göreceli kantifikasyon
RT-qPCR	Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
SEC	Boyut Dışlama Kromatografisi
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
SH	Standart hata

1. GİRİŞ

Son zamanlarda sağlıklı beslenme ve gıdalara olan ilgi giderek artmaktadır. Gıdalardan beklenti, sadece yaşamı idame ettirmek için değil, aynı zamanda sağlıklı yaşam için hastalıklara ve çeşitli çevresel faktörlere karşı koruyucu, önleyici ve iyileştirici etkileri olması yönündedir. Fonksiyonel gıdalar sadece yaşamı idame ettirmek için gerekli besin ögelerini içermekle kalmaz, ayrıca hastalık riskini azaltır ve yaşam kalitesinin artmasını da sağlarlar (Domínguez Díaz, Fernández-Ruiz ve Cámara, 2020). Probiyotikler ve prebiyotikler bağırsak mikrobiyotasını değiştirme, insan sağlığına faydalı etkileri ve hastalık faktörleri üzerine etkilerinden dolayı son yıllarda ilgi görmektedirler. Spesifik olarak yararlı mikroorganizmaların büyümelerini ve aktif olmalarını sağlayan sindirilmeyen fiberler olan prebiyotikler ve makul miktarda tüketildiği zaman sağlığa faydası bulunan canlı mikroorganizmalar olan probiyotikler, bağırsak mikrobiyotası ve işlevinin düzenlenmesinde son derece umut vericidir (Obayomi, Olaniran ve Owa, 2024; Yüksekdağ ve diğerleri, 2021). Bağırsak mikrobiyotasını düzenleyen ve bağışıklığı güçlendiren prebiyotiklerin hastalıklar üzerine etkilerinin araştırıldığı, nörolojik ve psikiyatrik hastalıklar, obezite, diyabet, kolorektal kanser, bağışıklık sistemi bozuklukları, metabolik sendrom ve bağırsak hastalıkları ile yapılan çalışmalar artarak devam etmektedir (Bevilacqua ve diğerleri, 2024; Wang ve diğerleri, 2025).

Tek hücreli, ökaryotik mikroorganizma olan mayalar, eski uygarlıkların doğuşundan günümüze kadar biyoteknoloji, tıp, endüstri ve çevre alanında çeşitli uygulamalara ve dikkate değer etkilere sahip olmuştur. Mayalar ve mantarlar sağlıklı insan bağırsak mikrobiyotasının bir kısmını oluşturmaktadır. Bağırsak içeriğinde bulunan mikrobiyomun *Candida albicans, Saccharomyces cerevisiae ve Kluyveromyces lactis* gibi mayaları da içerdiği tespit edilmiştir. Beklendiği üzere bu mayalar fermente yiyecek ve içeceklerde yaygın olarak bulunmaktadırlar. Bu durum bağırsak mikrobiyomumuzun büyük ölçüde tükettiğimiz gıdalar tarafından oluşturulduğunu göstermektedir. Tanımlanan maya türlerinin sayısı her geçen gün daha da artmakla beraber, araştırmacıların ve endüstrinin de ilgisini çekmektedir. Mayalardan *Saccharomyces* çok bilinen ve çalışılan cins olmasına karşın son zamanlarda *Kluyveromyces, Debaromyces, Pichia, Yarrowia, Meyerozma* vb. cinslere ait mayalar da faydalı ve potansiyel probiyotik özellikleri nedeniyle ilgi görmeye başlamışlardır. Probiyotik mayalar umut verici antimikrobiyal, immünomodilatör, kolesterol asimilasyonu, antikanser ve antioksidan etkileri ile biyoterapötik olarak da kullanılabilir (

Karim, Gerliani ve Aïder, 2020; Kunyeit, Rao ve Anu-Appaiah, 2024; Liu ve diğerleri, 2022; Schulze ve Sonnenborn, 2009).

Kluyveromyces marxianus çiğ ve pastörize sütte yaygın bulunan tür olmakla beraber fermente süt ürünleri, kefir, sisal yaprakları ve bitkiler gibi çeşitli habitatlardan izole edilebilen son yıllarda ön plana çıkan geleneksel olmayan gıda sınıfı bir mayadır (Bilal ve diğerleri, 2022; Coloretti ve diğerleri, 2017).

Ekzopolisakkaritler (EPS), mayalar, mantarlar, farklı bakteriler, algler vb. tarafından üretilmekte olan ve hücre dışına salgılanan polisakkaritlerdir. EPS'ler genellikle benzer (homopolisakkarit) veya farklı (heteropolisakkarit) karbonhidratlar ihtiva eden, dallı veya dalsız kompleks yapıdadırlar. Ayrıca EPS'lerin sağlık üzerine antioksidan, antibiyofilm, antikanser, antiülser, antipatojenik, antidiyabetik ve immünomodülatör etkileri bulunmaktadır (Angelin ve Kavitha, 2020; Pourjafar ve diğerleri, 2023). Ayrıca aşılarda adjuvan olarak kullanımının yanı sıra farmasötik ve tıbbi alanlarda çeşitli uygulama alanları bulunan EPS'lere olan ilgi giderek artmaktadır (Paul, Parvez, Goswami ve Banik, 2024). Gıda endüstrisinde EPS'ler stabilize edici, emülsifiye edici, jelleştirici ve homojenleştirici özellikleri nedeniyle dikkat çekmektedir. EPS'ler fermente içecekler, yoğurt, peynir gibi fermente süt ürünlerinde kıvamın korunması ve yapısal homojenliğin sağlanması amacıyla kullanılmaktadır (Jurášková ve diğerleri, 2024).

Bu çalışmada EPS'nin karakterizasyonunda kullanılmış olan SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu) ile birlikte kullanılan EDX (Enerji Dağıtıcı X-ray) analizinde SEM kısmı, incelenecek örneğin yüzeyinin üç boyutlu morfolojisinin, boyut ve şeklinin yüksek büyütmede görselleştirilmesi ve analiz edilmesi amacıyla kullanılmaktadır. EDX kısmında ise incelenen numuneye çarpan elektron ışınları karakteristik X-ışınları üretmesi sonucunda elementlerin atomik ağırlık yüzdesi (aw%) hakkında bilgi vermesinin yanı sıra elemental bileşim ve miktarlarının göreceli oranlarının değerlendirilmesine olanak tanımaktadır. Bu bağlamda EDX spektrumu, incelenen numunedeki elementlerin varlığına dair yarı kalitatif bilgiler ile bu elementlerin yaklaşık oranlarına dair yarı kantitatif bilgiler sağlamaktadır. (Chhabra, 2024: 340-341; Gupta, 2024; Zhou ve diğerleri, 2021).

Kullanılan bir diğer analiz olan Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FT-IR) analizinde temel prensip incelenen örneğin moleküler bağlarının titreşimlerinin

incelenmesinde kızılötesi ışığın kullanılmasıdır. FT-IR özellikle numunelerin kimyasal yapılarındaki fonksiyonel grupların belirlenmesinde etkili bir yöntemdir. Ancak FT-IR tek başına kullanılabilecek birincil karakterizasyon yöntemi olmayıp diğer analiz yöntemlerindeki sonuçları destekleyici niteliktedir. FT-IR'ın başlıca avantajları arasında hız, hassasiyet, mekanik basitlik ve numunelerin dahili kalibrasyonu yer almaktadır (Chhabra, 2024: 289-290; Gupta, 2024; Pehlivan, Yabaş ve Özer, 2023).

Genetik toksikoloji, genetik ve toksikolojinin bir araya geldiği önemli bir noktadadır. Dış kaynaklı ajanlar ile genetik yapı arasındaki etkileşimleri açıklayarak, dış etmenlerin genomik yapı ve işlevi nasıl etkileyebileceğinin anlaşılmasını sağlamaktadır. Başka bir deyişle hücrenin DNA'sına ve kromozomlarına olası zararlı ajanların veya maddelerin incelendiği bilim dalıdır. Çoğunlukla genotoksisite ile mutajenite karıştırıldığı gözlemlenmektedir. Her mutajen genotoksik etki gösterse de genotoksik maddelerin tamamı mutajenik değildir. Genotoksisite ise genetikte, hücrenin genetik materyali üzerine hasar verici etkisi olan, dolayısıyla hücrenin bütünlüğünü etkileyen bir maddeye veya farklı çevresel etkilere maruz kalma sonucu genetik materyalde hasara ve mutasyona sebep olma potansiyelini açıklar. Genotoksinler DNA veya kromozomal materyalde hasar meydana getirerek mutasyona sebep olan mutajenlerdir. Genotoksik özelliğe sahip olan maddeler genotoksin olarak adlandırılır. Genotoksisite testleri, genetik değişikliklere neden olan kimyasalları tespit etmek için kullanılan teknikler olup mutajenite ve DNA hasarı testlerini kapsamaktadır. Mutajenite ise bir maddenin DNA ve kromozom sayı veya yapısındaki değişikliklerin sonraki hücre nesillerine aktarılabildiği geri dönüşü olmayan mutasyonlara sebep olma kapasitesini ifade etmektedir (Banoon, Salih ve Ghasemian, 2022; Fasiku ve diğerleri, 2025; Luan ve Honma, 2022; Ng ve Hande, 2024; Saks, Upreti, Sv ve Dang, 2017).

Antimutajenler, spontan ve indüklenmiş mutasyonların etkilerini azaltabilirler. Antimutajenler iki temel gruba ayrılmaktadır. Bunlardan ilki olan desmutajenler, mutajenleri etkisiz hale getirerek DNA'ya zarar vermelerini engeller. İkincisi Biyoantimutajenler ise hücrelerin DNA hasarını onarma mekanizmalarını destekleyerek mutasyon sıklığında azalma meydana getirirler (Saks ve diğerleri, 2017). Genotoksisite testleri antigenotoksisitenin belirlenmesi amacıyla da kullanılmaktadır. Önce genetik yapıda mutajenler kullanılarak hasar oluşturulmakta sonra uygulanan kimyasalın bu zararı önleyen ya da iyileştiren bir etkiye sahip olup olmadığı belirlenebilmektedir. Antigenotoksisite testlerinde mutajen olarak çoğunlukla mitomisin-C (MMC), metil metan sülfonat (MMS) ve

Hidrojen peroksit (H_2O_2) kullanılmaktadır. Kemoterapi ajanı ve klinikte çeşitli kullanım alanları olan MMC ve kimya alanında kullanımlarının yanı sıra kemoterapi ajanı olarak da kullanılabilen MMS alkilleyici ajanlar olmakla birlikte DNA'nın yapısal bütünlüğünü değiştirerek DNA replikasyon ve transkripsiyonunu durdururlar. Hidrojen peroksitin ise reaktif oksijen türevleri (ROT) düzeylerinde artışa yol açarak oksidatif hasara neden olduğu bilinmektedir (Chen ve diğerleri, 2021; Crespo, Rapuano ve Syed, 2023; Mustafa ve diğerleri, 2024).

Genetiğin temel yapı taşlarını oluşturan Gregor Mendel'in 1865'teki ilkeleri ardından 1869 yılında DNA molekülünün izolasyonu ve yaklaşık bir asır sonra 1953'te DNA çift sarmal yapısının belirlenmesi, genetik bilimi ve kalıtımın evrensel prensiplerinin oluşmasını sağlamıştır. Daha sonra Conrad H. Waddington 1940'ların başında yapmış olduğu epigenetik tanımı, kelimenin ilk haliyle bir genotipin belirli bir fenotipe giden süreçte kendini nasıl ifade ettiğini etkileyen tüm moleküler yolları kapsadığını ve epigenetiğin genotip ile fenotip arasında bir arayüz görevi gördüğünü belirtmektedir. Daha sonra ise David Nanney, çevresel etkilerle şekillenen epigenetik mekanizmaların gen ifadesini regüle ettiğini ve bunların hücre bölünmeleri boyunca korunduğunu öne sürmüştür. Epigenetiğin tanımı ise DNA dizisinde herhangi bir değişiklik meydana gelmeksizin gen ekspresyonunda meydana gelen değişikliklerdir. Epigenetik değişiklikler/modifikasyonlar 3 temel sınıfa ayrılmaktadır. Bunlar, DNA metilasyonu, histon modifikasyonları ve kodlama yapmayan RNA'lardır (ncRNA'lar) (Chakrabarti ve Chattopadhyay, 2024; Li, 2021; Ospelt, 2022; Peixoto, Cartron, Serandour ve Hervouet, 2020).

Bu tez çalışması kapsamında probiyotik maya olan *Kluyveromyces marxianus* M59 suşundan izole edilen prebiyotik ekzopolisakkaritin (EPS_{M59}) *in vitro* genotoksik etkileri ve mitomisin-C (MMC), metil metan sülfonat (MMS) ve hidrojen peroksitin (H_2O_2) oluşturduğu hasarlara karşı koruyucu/iyileştirici antigenotoksik etkileri araştırılmıştır. SEM-EDX (Taramalı Elektron Mikroskobu-Enerji Dağıtıcı X-ray) analizi ile EPS_{M59}'un yüzey morfolojileri ve elementel içeriği tespit edilmiştir. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FT-IR) analizi ile EPS_{M59}'un yapısındaki temel işlevsel gruplar belirlenmiştir. Genotoksik ve antigenotoksik etkilerin belirlenmesinde kromozomal anormallikler (KA), Sitokinez blok mikronükleus sitom testi (CBMN-Cyt) ve comet testi gerçekleştirilmiştir. Ayrıca EPS_{M59}'un RT-qPCR analizi ile DNA metiltransferazlardaki (DNMT'lerdeki) ve Histon deasetilaz 1'deki (HDAC1'deki) gen ekspresyon düzeyleri

üzerine etkileri incelenerek, epigenetik değişiklikler araştırılmıştır. Bu yüksek lisans tez çalışması EPS_{M59}'un karakterizasyonu, genotoksik, antigenotoksik ve epigenetik değişiklikler üzerine etkilerinin, incelendiği ilk çalışma niteliğindedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Nutrasötikler, Fonksiyonel Gıdalar ve Sağlık Üzerine Etkileri

Hipokrat "gıdalar ilacınız olsun" derken aslında gıdaların sağlık açısından ne kadar önemli olduğunu vurgulamıştır. Daha sonra önde gelen hekimlerden Galen, işlevsel gıdaların sağlık için önemini en üst düzeyde vurgulamıştır. Çok farklı olmamakla beraber, daha organik bakış açısıyla, Orta Çağ tıbbı da sağlığın korunması için gıdaların önemli olduğunu bildirmiştir. Bunun en iyi örneği, gıdaların etkileri ve hastalıklarla ilişkilerini araştıran hekim/bilim insanı İbni Sina'dır (Nimrouzi ve Zare, 2014; Patel, 2021; Serafini ve Peluso, 2016; Varrassi, 2024).

Hareketsiz bir yaşam biçimi ve yetersiz/dengesiz beslenme, obezite, anksiyete, diyabet, kardiyovasküler hastalıklar, yüksek tansiyon, kanser ve bağışıklık sisteminin zayıflaması gibi kronik sağlık sorunlarının artmasına neden olmaktadır. Tüm bu sorunların üstesinden gelmek için tüketiciler sadece açlık ihtiyaçlarını gidermekle kalmayacak, bunun yanı sıra hastalıkları önleyecek ve hem fiziksel hem de zihinsel olarak sağlıklı yaşam sürdürülmesini sağlayacak gıdalar talep etmektedir. Günümüzde tüketiciler, insan mikrobiyotasında disbiyozun ve dolayısıyla buna bağlı hastalıkların önüne geçecek fonksiyonel gıdaları tercih etmeye yönelmektedir. Özellikle COVID-19 pandemisiyle birlikte gıda takviyeleri, probiyotikler, nutrasötikler ve fonksiyonel gıdalar son zamanlarda tüketicilerin daha fazla ilgisini çekmekte ve toplumun her kesiminden insanlar tarafından rağbet görmektedir. Nutrasötikler ve fonksiyonel gıdalar terimleri sıklıkla birebirlerinin yerine kullanılmakla birlikte bazı temel farklılıklar mevcuttur. "Fonksiyonel gıdalar" kavramı 1980'lerde Japonya'da literatüre girmiştir. Bu kavram "besleyiciliğinin yanı sıra belirli vücut fonksiyonlarına da yardımcı olan bileşenler içeren işlenmiş gıdalar" anlamına gelmektedir. Nutrasötikler ise ilk başta, "bir gıda veya gıdanın bir bileşeni olarak kabul edilen ve hastalıkların önlenmesi ve tedavisi de dahil olmak üzere tıbbi ve/veya sağlık yararları sağlayan herhangi bir madde" olarak tanımlanmıştır. Bu tanım, vitaminler, bitkisel ürünler, mineraller, gibi biyoaktif diyet takviyelerinin yanı sıra diğer besinler açısından zengin kaynakları da kapsamaktadır. Nutrasötiklerin, oksidatif stres ve kronik enflamasyonun kompleks etkileşimleriyle karakterize edilen metabolik bozukluklara karşı, ciddi ve çok çeşitli sağlık sorunlarına karşı faydalı/iyileştirici olduğu düşünülmektedir. Devam eden araştırmalar nutrasötiklerin farmasötik tedavilerin yanı sıra önleme ve koruma açısından da

gelecek vaat ettiğini bildirmektedir. Nutrasötikler ve fonksiyonel gıdaların kapsamına giren kategoriler arasında, probiyotik ve prebiyotikler, antioksidanlar, vitamin ve mineraller, omega-3 yağ asitleri, fitokimyasallar, biyoaktif peptitler ve proteinler yer almaktadır (Dama ve diğerleri, 2024; Sharma ve diğerleri, 2024; Jadhav ve diğerleri, 2023).

2.2. Mikrobiyota

İnsan vücudunun bağırsak, akciğer, deri, ağız boşluğu gibi çok çeşitli bölgelerinde bakteriler, mayalar ve virüsler de dahil olmak üzere birçok farklı türden mikroorganizmaların birlikte bulunduğu bilinmektedir. Ayrıca insan mikrobiyotası gizli organ olarak da bilinmekle beraber insan genomunun tamamından 150 kat daha fazla genetik bilgi içermektedir. Mikrobiyota ve mikrobiyom birbirleri yerine kullanılsa da aralarında bazı farklılıklar bulunmaktadır. Mikrobiyota ağız ve bağırsak mikrobiyotası gibi belirli ortamda bulunan canlı mikroorganizmaları tanımlarken, mikrobiyom ise ortamda bulunan tüm mikroorganizmaların genomlarının toplamını ifade etmekle beraber yalnızca mikroorganizma topluluğuyla kalmayıp, aynı zamanda mikrobiyal yapısal unsurlarla beraber metabolitleri ve çevresel koşulları da içermektedir. Bütün bu bilgiler dahilinde mikrobiyom, mikrobiyotaya kıyasla daha geniş bir kapsamı ifade etmektedir (Berg ve diğerleri, 2020; Hou ve diğerleri, 2022; Grice ve Segre, 2012).

İnsan bağırsak mikrobiyotasının kompozisyonunun ve fonksiyonunun büyük ölçüde diyetten etkilendiği düşünülmektedir (Fang ve diğerleri, 2019). Glikozidik bağlarla birbirine bağlanan monosakkaritlerden oluşan polisakkaritler, çok sayıda biyolojik aktiviteye sahiptir. Nişasta gibi polisakkaritlerin bir kısmı insan mide ve ince bağırsağında sindirilip emilebilmesine karşın, mide ve ince bağırsakta parçalanamayan çok sayıda özel yapıya sahip polisakkarit vardır. Konakçılar tarafından sindirilemeyen polisakkaritler kolonda, bağırsak mikrobiyotasıyla etkileşime girebilir ve bu sayede faydalı/yararlı etikiler gösterebilir. Çeşitli polisakkaritler bağırsak mikrobiyotasının fermentasyonu yoluyla farklı düzeylerde kısa zincirli yağ asitleri (SCFA) üretebilirler. Bu SCFA'lar bağırsaktaki patojenik mikropların inhibe edilmesi, pH'ın düşmesi, hastalıkların hafiflemesi ve bağırsak bariyerinin bütünlüğünün korunması için elzemdir. Ayrıca SCFA'lar T hücrelerinin metabolik durumunu düzenleyerek epigenetik modifikasyonlar ve T hücrelerinin işlevleri üzerinde etkili olmaktadır. SCFA'lar, önemli besin bileşenleri olmasının yanı sıra bağışıklık sistemiyle uyumlu bir şekilde B hücresi aktivasyonunu güçlendirebilirler. Bu çerçevede

diyetle alınan polisakkaritler, bağırsak mikrobiyotası için hayati bir enerji kaynağı olmakla birlikte sağlık açısından da birçok yarar sağlamaktadır (Cockburn ve Koropatkin, 2016; Da Silva ve diğerleri, 2021; Kim ve diğerleri, 2016; Shang ve diğerleri, 2018; Wang ve diğerleri, 2025; Zhang ve diğerleri, 2022).

Sağlıklı uzun yaşam için sadece genetik değil, birçok çevre koşuluyla birlikte özellikle de bağırsak mikrobiyotası önem teşkil etmektedir. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda sağlıklı uzun ömür ile bağırsak mikrobiyotası arasında ilişki bulunduğu tespit edilmiştir (Luo ve diğerleri, 2024). Mikrobiyota, enerji toplanması, bağırsak bütünlüğünü desteklenmesi, bağırsak epitelinin şekillendirilmesi, patojenlerden korunmak ve konakçı bağışıklık sisteminin düzenlenmesi gibi birçok fizyolojik fonksiyonları ile konağa fayda sağlamaktadır (Thursby ve Juge, 2017). Bağırsak mikrobiyotasının, sindirim, metabolizma, bağışıklık, enflamasyon ve davranış üzerine birçok hayati fonksiyonu bulunmaktadır. Ayrıca beyin, karaciğer yağ dokusu gibi vücuttaki birçok organ veya sistemlerle etkileşerek konakçı fizyolojisi ve homeostazını etkilemektedir (Sharma ve diğerleri, 2024). Nutrasötikler ve/veya fonksiyonel gıdalar bağırsak mikrobiyotasının çeşitli geçici sağlık sorunlarının önlenmesi ve bazı hastalıkların da hafifletilmesinde etkili olmaktadır. Ayrıca bağırsak mikrobiyomunun prebiyotik takviyelerin alımı ve probiyotiklere dayalı fonksiyonel gıda tüketimi yoluyla iyileştirebildiği bilinmektedir (Dahiya ve Nigam, 2022). Dört farklı ekzopolisakkarit (EPS) ile yapılan bir çalışmada EPS bileşenlerinin bağırsak mikrobiyotası tarafından parçalandığı ve etkili bir şekilde kullanıldığı gösterilmiştir. Prebiyotik özellikte çeşitli EPS bileşenlerinin insan sağlığını iyileştirecek ve aynı zamanda sağlıklı bağırsak mikrobiyotasını teşvik ederek hastalıkları önleyebilecek, fonksiyonel gıdalar için etkili bileşenler olarak kullanılma potansiyeline sahip olduğu bildirilmektedir (Zhu ve diğerleri, 2021). Son dönemde yapılan çalışmalarda Tip 2 diyabet ile bağırsak mikrobiyomu arasında ilişki olduğu bildirilmiştir. Bağırsak mikrobiyotasında mikroorganizmaların çeşitliliğinin değişikliği, önemli bakteri ve mikroorganizma türlerinin kaybı veya aşırı çoğalmasıyla Tip 2 diyabet hastalığı arasında ilişki bulunmaktadır. Bağırsak mikrobiyotasını değiştirebilen probiyotikler, prebiyotikler ve diyet değişiklikleri Tip 2 diyabetin yönetiminde potansiyel stratejiler olarak değerlendirilmektedir. Ek olarak prebiyotik maya ß-glukanının Tip 1 diyabet başlangıcını geciktirebileceği ve Tip 1 diyabet'den korunmada önemli etken olan bağırsak mikrobiyotasının çeşitliliğini ve işlevlerini düzenleyebileceği bildirilmiştir (Baars ve diğerleri, 2024; Chong ve diğerleri, 2025; Taylor ve Vasu, 2021).

Kanser-mikrobiyota arasındaki ilişki üzerine son yıllarda yapılan çalışmalar önem arz etmektedir. Birçok kanser tedavisi, tümör hücrelerine karşı bağışıklık sistemini harekete geçirerek etki göstermektedir. Ancak normal dokular da etkilenerek bağışıklıkla ilişkili yan etkilere sebebiyet verebilmektedir. Mikrobiyotanın, birçok onaylanmış ve yeni geliştirilen immünoterapilerin ve geleneksel kanser tedavilerinin immünotoksisitesini modüle edebildiği bulunmuştur (Gebrayel ve diğerleri, 2022). Bir hastanın kanser tedavisine yanıtı ve potansiyel olarak uzun vadeli sağlığını etkileyen konakçı ve mikrobiyota ilişkileri hakkında halen bilinmeyen birçok konu olmasına rağmen kanserde mikrobiyota manipülasyonu üzerine çalışmalar yapılmaktadır. Kanserli hastalarda mikrobiyota hedefli uygulamalar geniş bir araştırma alanıdır (Blake ve diğerleri, 2024). Aslında Hipokrat 24 asır önce "bütün hastalıklar bağırsakta başlar" sözüyle bağırsak mikrobiyotasının önemine vurgu yapmaktadır. Son zamanlarda "ikinci beyin" olarak da nitelendirilebilen bağırsak mikrobiyotası hem sağlık hem de hastalık durumlarında bağırsak, mikrobiyota ve beyin ilişkilerinden dolayı beyin aktivitesini de etkileyebileceği için son derece önemli olduğu bilinmektedir (Chaudhry ve diğerleri, 2023; Fried ve diğerleri, 2021; Lederer ve diğerleri, 2025). Ayrıca epigenetik ve bağırsak mikrobiyotası arasında güçlü bir iletişim mevcuttur. Epigenetik regülasyon ve bağırsak mikrobiyotası arasındaki etkileşim iki taraflıdır. Bağırsak mikrobiyotasındaki değişikliklerin epigenetik değişikliklere yol açabileceği gibi epigenetik değişikliklerin de bağırsak mikrobiyotasının kompozisyon ve çeşitliliğini etkileyebileceği manasını taşımaktadır (Ferenc ve diğerleri, 2024).

Mikrobiyom halen yoğun bir şekilde çalışmalar yapılan bir alandır. Sentetik biyoloji araçları geliştikçe, karmaşık mikrobiyotanın dinamikleri daha iyi anlaşılmakla birlikte sentetik mikroorganizma toplulukları geliştirmesi ve mikrobiyota mühendisliğinin *in situ* şekilde tasarlanması planlanmaktadır. Ayrıca çeşitli mikroorganizmalardan oluşan topluluklarda hedeflenen spesifik türlerin 'nakavt' edilmesi, çeşitli CRISPR araçları ile lipozomal bazlı DNA taşıma yöntemleriyle başarılmıştır (Rottinghaus ve diğerleri, 2023). Genomik, gen nakavt araçlarını kullanmak suretiyle silinen genin işlevini anlamak için ilerleme kaydettiğinden bu tür hedefli suş eleme araçlarıyla ortamdaki mikroorganizmaların hem rolünü hem de işlevlerini anlamaya yardımcı olmasıyla birlikte potansiyel *in situ* mikrobiyota mühendisliğini olanaklı hâle getirecektir (Moon, 2024; Venturelli ve diğerleri, 2018).

2.3. Probiyotikler ve Prebiyotikler

2.3.1. Probiyotikler

Probiyotik kavramı ilk olarak 1908 yılında Nobel Tıp Ödülü kazanan Elie Metchnikoff tarafından yapılmıştır. Fermente gıdaların insan sağlığı üzerinde uzun/sağlıklı ömrü teşvik eden faydalı etkileri olduğunu söylemiştir. Ardından probiyotikler, fermente süt ürünlerinin yanı sıra hastalıkların iyileştirilmesinde de kullanılmaya başlanmıştır. Metchnikoff'un ilk bulgularından sonra, çeşitli çalışmalar probiyotiklerin konakçının sağlık durumundaki faydalı/iyileştirici etkilerini doğrulamıştır. Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü ve Dünya Sağlık Örgütü (FAO/WHO) kılavuzlarına ve güncel tanımlara göre "probiyotikler, yeterli miktarda uygulandıklarında konakçıya sağlık açısından fayda sağlayan mikroorganizmalardır" şeklinde tanımlanmaktadır (Ballini ve diğerleri, 2023; Pineiro ve diğerleri, 2008; Yüksekdağ ve diğerleri, 2014). Böylece probiyotikler disbiyozu (bağırsak mikrobiyotasındaki denge bozukluğu) önlemek suretiyle hastaya fayda sağlarlar ve bağırsak mikrobiyotasının eubiyozuna (bağırsak mikrobiyotasının sağlıklı ve dengeli durumu) yol açarlar. Probiyotikler, pankreas, safra ve mide salgılarına karşı toleranslı, epitel hücrelerine tutunan ve insan bağırsağında kolonize olan mikroorganizmalar olarak da tanımlanmaktadır. Bağırsak epitelinde immobilize olmaları, antibiyotik maddelere karşı dirençli olmaları ve patojenik mikroorganizmalara karşı rekabetçi etki göstermeleri önemlidir (Zendeboodi ve diğerleri, 2020). Probiyotikler başlıca mayalar, laktik asit ve laktik asit olmayan bakteri türleri olarak gruplandırılmaktadırlar. *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii, Kluyveromyces, Candida, Pichia, Debaromyces, Metschnikowia* ve *Hanseniaspora* potansiyel probiyotik mayalardır (Saber ve diğerleri, 2017). *Lactobacillus, Lactococcus, Bifidobacterium* ve *Enterococcus* en bilinen bakteriyel probiyotiklerdir. Diğer potansiyel probiyotikler *Clostridiales, Bacteroidales, Bacillus* spp., *Enterococcus, Weissella* spp. ve *Escherichia coli*'dir (O'Toole ve diğerleri, 2017).

Antimikrobiyal peptitlerin üretimini uyaran probiyotikler, ayrıca T lenfositler, makrofajlar ve dentritik hücreler gibi bazı immün hücrelerin aktivitesini desteklemektedir. Ayrıca bazı probiyotiklerin immün cevapların koordinasyonu için son derece önemli olan sitokinlerin üretimini arttırdığı bilinmektedir. Bu durum, immün homeostazının korunmasına yardımcı olur ve doku hasarına sebep olacak aşırı aktif inflamatuar yanıtları önler. Probiyotikler, toksinlere ve patojenlere karşı koruma için son derece önemli olan mukozal bariyer işlevinin

geliştirilmesine katkı sağlamaktadır (Olatunji ve diğerleri, 2024; Gou ve diğerleri, 2022). Bazı probiyotik suşlar ile yapılan çalışmalarda ishalin süresini ve şiddetini azaltmakta etkili oldukları belirlenmiştir. Antibiyotiklerin yan etkilerinden olan ishalin önlenmesinde probiyotiklerin etkili olduğu tespit edilmiştir. Probiyotiklerin kolesterol seviyelerini düşürerek kardiyovasküler hastalıkları önlemesinin yanı sıra hepatik lipid sistemi ve sistemik glikoz metabolizmasını iyileştirerek hafiflettiği gösterilmiştir (Jia ve diğerleri, 2023; Lin ve diğerleri, 2024; Rodrigues ve diğerleri, 2021).

Probiyotikler, bağırsak-beyin ilişkisiyle bilişsel işlevi arttırabilir ve Alzheimer hastalığı riskini azaltabilirler. Ayrıca beyinde c-Fos, 5-hidroksitriptamin (5-HT), dopamin (DA), GABA ve nörotrofik faktörler gibi biyokimyasalları değiştirerek merkezi sinir sistemi biyokimyasını modüle ederler (Khatoon ve diğerleri, 2023). Bağırsak mikrobiyomu, bağırsak fonksiyonlarını dolaylı olarak etkileyen kısa zincirli yağ asitleri (SCFA'lar) ve ekzopolisakkaritler (EPS'ler) gibi metabolitleri düzenlemektedir. Bağırsak mikrobiyomu genel sağlığı etkilemek için endokrin ve sinir sistemiyle birlikte çalışmaktadır. Ayrıca probiyotiklerin antienflamatuar ve antioksidan etkileri Huntington hastalığının ilerlemesini yavaşlatabilir (Yadav ve diğerleri, 2022). Probiyotikler, kronik böbrek yetmezliği tedavisinde umut verici bir yaklaşım olmasının yanı sıra, miR-29a ve miR-29b ekspresyon seviyelerini artırarak, beslenme bozukluklarını düzeltmesiyle birlikte tümör nekroz faktörü-α (TNF-α) seviyelerini düşürerek hastalığın seyrini iyileştirebilir. Probiyotiklerin, pnömonili çocuklarda doğal öldürücü T hücrelerini (NKT hücreleri) ve enflamatuar etkileri azaltmadaki etkisine, uzun vadede akciğer fonksiyonları üzerine koruyucu etkisi eşlik etmektedir. Ayrıca interlökin (IL)-4 ve IL-10, interferon-γ ve immünoglobulin E seviyeleri gibi enflamatuar faktörleri önemli ölçüde azaltmakla birlikte kandaki NKT hücrelerinin oranını arttırarak plasebodan daha olumlu etkiye neden oldukları bildirilmiştir (Morales-Torres ve diğerleri, 2023; Pyo ve diğerleri, 2024; Sasso ve diğerleri, 2024).

Probiyotikler, kalsiyum, çinko, B12 vitamini, folat ve demir emiliminde artış sağlamaktadır. Ayrıca antikanser özellikleri sayesinde kanser sinyallerini kontrol altına alabilir. Bu durum, apoptozun indüklenmesi, tümör baskılayıcıların aktive edilmesi, mutajenez aktivitesinin inhibisyonu, otofajinin indüklenmesi, kinazların inhibisyonu, onkogenlerin aşağı regülasyonu ve/veya onkogenlerin aşağı regülasyonunu içeren mekanizmalardan kaynaklanabilir. Probiyotik mikroorganizmalar, onkogenlerin düzenlenmesi, obezite, artrit ve bağışıklık sistemi hastalıklarının önlenmesi/tedavisinde etkilidirler. Ancak probiyotikler,

prebiyotiklerle beraber kullanıldıklarında, farklı kanserlerin önlenmesi/tedavisinde tek başına probiyotiklerden daha etkilidirler (Barkhidarian ve diğerleri, 2021; Legesse Bedada ve diğerleri, 2020; Kushwaha ve Maurya, 2024). Probiyotiklerin aşırı kilolu ve obez kadınlarda epigenetik markırlar üzerindeki etkileri araştırılan bir çalışmada, probiyotik muamelesinin obez kadın katılımcılarda vücut ağırlığının azalmasına veya lipid durumunu düzenlenmesiyle birlikte, inflamasyon ve adipogenezin düzenlenmesinde önemli rolleri olan belirli miRNA'ların (miR-155-5p, miR-125b-5p, miR24-3p) ve mRNA'ların (TNF- α) ekspresyonunun düzenlenmesinde olumlu etkiler gösterdiği bildirilmiştir (Okuka ve diğerleri, 2023). Probiyotikler bağırsak mikrobiyotasını düzenlemesinin yanı sıra epigenetik modifikasyonlar/değişiklikler ile gen ekspresyonlarının düzenlenmesine ek olarak sağlık üzerinde faydalı/iyileştirici etkilere sahiptirler (Morovic ve Budinoff, 2021).

2.3.2. Prebiyotikler

Gibson ve Roberfroid 1995 yılında prebiyotikleri "konakçı sağlığını iyileştirmek için kolondaki bir veya sınırlı sayıda bakterinin büyümesini ve/veya aktivitesini seçici olarak uyararak konağı faydalı bir şekilde etkileyen sindirilemeyen gıda bileşenleri" olarak tanımlamışlardır. Daha sonra Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) prebiyotikleri "mikrobiyolojik modülasyonla ilişkili olarak konakçının sağlığına fayda sağlayan hayati olmayan bir gıda bileşeni" olarak tanımlamıştır. Son zamanlarda, prebiyotik tanımı Uluslararası Bilimsel Probiyotik ve Prebiyotik Birliği (ISAPP) uzman kurulu tarafından gözden geçirilerek tanımı daha geniş bir perspektifte "konak mikroorganizmalar tarafından seçici olarak kullanılan ve sağlık açısından fayda sağlayan bir substrat" olarak güncellenmiştir. Prebiyotik kavramını genişleten bu son tanımla birlikte, aslında karbonhidrat olmayan maddeleri, gastrointestinal sistem dışındaki vücut bölgelerine uygulamaları ve gıda dışındaki çok çeşitli kategorileri de kapsayacak şekilde genişletilmiştir. (Cremon ve diğerleri, 2018; Yadav ve diğerleri, 2022).

Prebiyotikler, sindirilemeyen oligosakkaritler, polifenoller ve/veya peptitler olarak sınıflandırılır ve sindirim sisteminde bulunan faydalı mikroorganizmaların çoğalmasını yenilenmesi/geri kazanılmasını kolaylaştırmaktadır. Birçok çalışma polisakkarit, bitki menşeli peptid ve biyoaktif metabolitlerin iyileştirici etkilerini destekler niteliktedir. En yaygın kullanılan prebiyotikler, inülin türevleri, galaktooligosakkaritler (GOS) ve fruktooligosakkaritler (FOS) olarak sınıflandırılmaktadır. Laktozdan türetilen GOS'lar insan

sütünde ve bazı aşılar içinde bulunmasıyla birlikte tahıllar ve süt ürünleri gibi çeşitli gıdalarda katkı maddesi olarak da kullanılabilmektedir. GOS'lar konakçının sağlığı için önemli mikroorganizmaların çoğalmasını teşvik etmektedir. FOS'lar az sayıda fruktoz monomerinden oluşan ve inülinin hidroliz sonucu oluşan fruktanlarıdır. Bu bileşenler, buğday, soğan, enginar ve kuşkonmaz gibi bitkisel gıdalarda bolca bulunmaktadır. Prebiyotikler patojen mikroorganizmaların enfeksiyon oluşturmasını engelleyebilir; çünkü yapısal olarak bağlanma bölgelerini taklit etmesi sonucu patojenlerin epitel hücrelerine yapışmalarını önler. Bu kapsamda, sindirilmeyen karbonhidratlar prebiyotik olarak işlev görebilir. Ayrıca konakçının sağlığına katkı sağlayan bazı türlerin gelişimini de desteklemektedirler (Wang ve diğerleri, 2025; Lakshmanan ve diğerleri, 2024; Thorman ve diğerleri, 2024; Ballini ve diğerleri, 2023).

Yapılan birçok çalışma, prebiyotiklerin interlökin-6 (IL-6), insülin direnci ve kandaki glukoz seviyeleri gibi metabolik ve bağışıklık faktörleri üzerinde etkili olduğunu göstermektedir. Bir çalışmada prebiyotiklerin etkisi bir grup obez ve/veya aşırı kilolu çocuk üzerinde incelenmiştir. İki deney grubu oluşturularak bir kısım çocuğa prebiyotik, oligofruktoz ile zenginleştirilmiş inülin, diğer çocuklara da kontrol grubu niteliğinde maltodekstrin plasebo verilmiştir. Prebiyotik muamelesi yapılan grupta, plasebo grubuna göre inflamatuar sitokinler olan IL-6 ve C-reaktif protein (CRP) seviyelerinde azalma olmuştur. CRP ve IL-6 seviyelerinin azalması inflamasyonun azalması, bağışıklık sisteminin normale dönmesi ve hastalığın iyileşmesi anlamına gelmektedir (Da Silva ve diğerleri, 2021; Nicolucci ve diğerleri, 2017). Ayrıca, polifenoller, ksilooligosakkaritler, laktuloz, dirençli nişasta ve galaktooligosakkaritler gibi prebiyotiklerin obezite, inflamatuar bağırsak hastalığı ve ruh sağlığı üzerinde iyileştirici etkileri olduğu ortaya konmuştur (Yoo ve diğerleri, 2024). Bazı probiyotiklerden elde edilen prebiyotik EPS'lerin kanser hücre hatları üzerinde antioksidan ve antiproliferatif etkileriyle birlikte SCFA üretimini teşvik ettiği gösterilmiştir. Başka bir çalışmada ise EPS'lerin antioksidan potansiyeli ve ACE (anjiyotensin dönüştürücü enzim) inhibisyonu sayesinde kan basıncını düşürerek, damarların genişlemesine sebep olarak kardiyovasküler sağlık üzerine olumlu etkiler göstermiştir (Tarique ve diğerleri, 2023; Tarique ve diğerleri, 2024). Probiyotik bir maya olan *K. marxianus*'un üç farklı suşundan izole edilen prebiyotik özelliklerdeki hücre duvarı polisakkariti olan α-mannan'ın (MPS) bağırsak mikrobiyotası üzerindeki etkileri incelendiğinde üç MPS'nin de bağırsak mikrobiyotasının düzenlenmesini, özellikle de faydalı/yararlı bakterilerin çoğalmasını teşvik ettiği gösterilmiştir. Metabolizma bağlamında değerlendirildiğinde MPS'ler, kofaktörleri,

aminoasit metabolizmasını, vitaminleri ve bakterilerin glikan biyosentezi ve metabolizmasını teşvik edebileceği sonucuna varılmıştır. Üç MPS'nin insan bağırsak mikrobiyotasını düzenleyerek bağırsak mikrobiyotası için hayati öneme sahip olan SCFA seviyesini arttırabildiği, amino asit ve glikan üzerindeki bakteri metabolizmalarını teşvik etmesinin yanı sıra bağırsak sağlığı üzerinde iyileştirici etkilere sahip olduğu ortaya konulmuştur (Tang ve diğerleri, 2023).

Son zamanlarda yapılan çalışmalar prebiyotiklerle epigenetik değişiklikler arasında bir ilişki olduğunu göstermektedir. Bu bağlamda prebiyotikler ve metabolitleri doğrudan enzimatik aktiviteleri hedeflemektedir. Ayrıca epigenetik regülasyonda yer alan enzimlerin ekspresyonunu düzenlemekte, sağlık durumu, hastalıklara yatkınlık ve epigenetik değişikliklerin bir bireyin yaşamı boyunca yazılıp yazılmayacağı veya silinip silinmeyeceği üzerinde potansiyel etkileri bulunmaktadır (Gerhauser, 2018; Neri-Numa ve Pastore, 2020). Prebiyotik bileşenlerin fermentasyonu sonucu oluşan metabolitler olan SCFA'ların epigenetik değişikliklerle bağlantısı bulunmaktadır. Obez farelerde yapılan bir çalışmada SCFA'nın yağ dokusu üzerine etkili olan hormonlar, adiponektin ve resistin ekspresyonu üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. Adiponektin ve resistin mRNA seviyelerindeki azalmanın asetat, bütirat ve propiyonat müdahalesi ile tersine çevrildiği gözlenmiştir. Ayrıca SCFA'lar tarafından indüklenen adiponektin ve resistin üzerindeki gen ifadesindeki değişikliklerin, bu genlerin promotörde DNA metilasyonuyla ilişkili olduğu bunun da DNA metil transferaz enzimlerinin (DNMT1, 3A ve 3B) ve metil CpG bağlayıcı kompleks protein 2'nin (MBD2) ifadelerinin azalmasıyla gerçekleştiği belirtilmiştir. Sonuç olarak, bu enzimlerin adiponektin ve resistin promotörlerine bağlanması engellenmiştir (Lu ve diğerleri, 2018). Bir SCFA türü olan bütirat yine epigenetik düzenlemede önemli rolleri olan HDAC'ların aktivitesini inhibe etmektedir. HDAC'ların asetil gruplarının histon proteinlerinden uzaklaştırılmasıyla daha yoğun bir kromatin yapısına dolayısıyla gen ifadesinin baskılanmasına yol açmaktadır. Bu bağlamda SCFA türü olan bütirat ve diğer SCFA'lar HDAC'ları inhibe ederek rahat kromatin yapısını sağlamasıyla antienflamatuar genlerin ifadesinin artmasını sağlayabilir (Woo ve Alenghat, 2022; Marangoni ve diğerleri, 2023).

2.4. Kluyveromyces marxianus

Genellikle tek hücreli ökaryotik bir organizma olarak var olan ökaryotik mantarların heterojen bir grubu olan mayalar, çok eski zamanlardan günümüze kadar gıda, farmasötik, biyoteknolojik ve çevresel alanlar gibi çeşitli uygulamalara sahip olmasıyla dikkat çekmiştir. Mayalar yüksek sekresyon kapasitesi, birçok posttranslasyonel modifikasyon gerçekleştirme yeteneği, organellerdeki reaksiyonları bölümlendirebilme yeteneği ve enfeksiyona yol açan ajanlara karşı doğal direnç gibi avantajlı özelliklere sahiptir. Günümüzde birçok maya türü izole edilip tanımlanmasına karşın, biyoteknolojik ve endüstriyel uygulamalarda genellikle tercih edilen türler; *Kluyveromyces marxianus, Saccharomyces cerevisiae, Pichia pastoris, Candida utilis* ve *Yarrowia lipolytica* olarak bilinmektedir. Bunların arasında *S. cerevisiae* genomu iyi tanımlanmış, yaygın olması, fizyolojik özelliklerini iyi bilinmesi ve genetik manipülasyonlarda kullanılabilirliği sayesinde biyoteknoloji alanında büyük öneme sahiptir. Geleneksel olmayan suşlardan *Kluyveromyces* cinsi özellikle son zamanlarda potansiyel olarak gıda, çevre ve biyoteknoloji alanlarındaki uygulamalarda öne çıkmaktadır (Mamaev ve Zvyagilskaya, 2021; Wagner ve Alper, 2016). Ayrıca mayaların biyoremediasyon süreçlerinde, atık sulardaki ağır metallerin temizlenmesinde önemli rol oynamasının yanı sıra antikanser özellikleri, immünomodülatör etkileri, antimikrobiyal özellikleri, antioksidan etkileri ve kolesterol asimilasyonu gibi sağlık için önemli faydaları/yararları bulunmaktadır (Kunyeit ve diğerleri, 2024).

Fagositik hücreler patojenlere karşı saldırırken, fagositoz sırasında reaktif oksijen türevleri (ROS) üretir. ROS, hücrelere zarar vermektedir. Bazı maya türleri, katil toksinler olarak da bilinen mikosinleri üretmektedir. Bu kapsamda mikosinler ROS üretimini azaltabilir. Başlıca mikosin ve/veya katil toksin üreten maya cinsleri arasında *Saccharomyces, Kluyveromyces, Candida*, *Pichia, Zygosaccharomyces, Debaryomyces* bulunmaktadır. Mikosinlerin ve/veya katil toksinlerin iyi bilinen mekanizmaları, DNA sentezini bloke etmeleriyle birlikte hücre bölünmesini durdurmalarıdır. Ayrıca mikosinlerin ve/veya katil toksinlerin diğer iyi bilinen mekanizması ise hücre duvar sentezinde gerekli ß 1,3-glukan bileşenini de inhibe etmesi olarak sıralanabilir. Bu bağlamda mikosinler/katil toksinler, patojenlere karşı antagnostik etki göstermektedir. Maya hücreleri ve metabolitleri, güçlü antioksidan kapasiteleri sayesinde konakçının oksidatif strese karşı savunmalarını geliştirerek bağırsak mikrobiyotasını olumlu etkilemektedir (Liu ve diğerleri, 2015; Angulo ve diğerleri, 2019; Shruthi ve diğerleri, 2022).

Kluyveromyces marxianus ilk olarak Emil Christian Hansen tarafından 1888 yılında tanımlanırken *Saccharomyces* cinsine ait bir maya olarak *Saccharomyces marxianus* olarak tanımlanmıştır. Daha sonra tür *Kluyveromyces* cinsine aktarılarak güncel olarak kullanılan *Kluyveromyces marxianus* ismini almıştır (Çizelge 2.1). Ayrıca hem *Kluyveromyces* hem de *Saccharomyces,* Saccharomycetes'in bir alt grubu olan Saccharomyces kompleksinin bir üyesi olarak kabul edilirdirler. Bu bağlamda *Kluyveromyces ve Saccharomyces* genetik ve morfolojik açıdan birbirine benzer özelliklere sahiptirler. Ancak tüm genom duplikasyonu gibi olaylar nedeniyle aralarında bazı temel farklılıklar da bulunmaktadır. Genel olarak birbirleriyle benzerlik göstermelerine rağmen genetik geçmişleri nedeniyle farklılaşmışlardır. Ayrıca bu maya türüne Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından "Genel Olarak Güvenli Olarak Tanınan" (GRAS) statüsü verilmiş ve Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA) tarafından "nitelikli güvenlik karinesi" (QPS) verilmiştir (EFSA, 2013; Karim ve diğerleri, 2020; Tang ve diğerleri, 2023).

Kluyveromyces marxianus mayasının sınıflandırılması Çizelge 2.1'de verilmiştir.

Çizelge 2.1. *Kluyveromyces marxianus* mayasının sınıflandırılması (Karim ve diğerleri, 2020)

Alem	Eukaryota
Şube	Ascomycota
Sınıf	Saccharomycetes
Familya	Saccharomycetales
Ordo	Saccharomycetaceae
Cins	*Kluyveromyces*
Tür	*Kluyveromyces marxianus*

<u>*K. marxianus*'un gıda, sağlık ve biyoteknoloji alanlarındaki kullanımı</u>

K. marxianus, genellikle fermente edilmiş geleneksel süt ürünleri, kefir, sisal yaprakları ve bitkiler gibi geniş kapsamlı alanlardan izole edilen yaygın olarak kullanılan konvansiyonel olmayan mayalardandır. Peynir, kefir ve kımızdaki lezzet ve kıvamın gelişmesine yardımcı olmaktadır. Bu mayayı gıda endüstrisinde ve biyoteknolojideki uygulamalarda cazip kılan hızlı büyüme ve termotolerans özelliğidir. Ayrıca hem lezzet hem de koku ürettiğinden içecek endüstrisi için ilgi çekici hale gelmektedir. *K. marxianus* kakao fermantasyonu gerçekleştirdiği için çikolatanın duyusal niteliklerini geliştirmektedir. Ek olarak, bu maya sitronellol, linalool ve geraniol gibi diğer önemli aroma ve lezzet maddeleri üretebilmektedir

(Coloretti ve diğerleri, 2017; Crafack ve diğerleri, 2013; Homayouni-Rad ve diğerleri, 2020; Karim ve diğerleri, 2020).

K. marxianus mayası *S. cerevisiae*'den iki kat daha hızlı büyüme kapasitesine sahiptir. *S. cerevisiae* laktoz ve ksiloz gibi bol miktarda hammaddelerde bulunan şekerleri asimile edememektedir. Ayrıca yüksek sıcaklıklarda büyüyemez, bu durum selülozik etanol üretimi için uygulamasını sınırlamaktadır. Diğer taraftan *K. marxianus* 42 ila 48°C aralığında değişen sıcaklıklarda şekerleri fermente edebilme kapasitesine sahip termotoleranslı bir maya türüdür. Ayrıca *S. cerevisiae*'nin aksine *K. marxianus* suşlarının çoğunluğu Crabtree-negafif veya aerobik solunum özelliğine sahip olduğu için aerobik alkolik fermantasyona uğramazlar. Bu bağlamda aerobik koşullarda toksik veya istenmeyen yan ürünler olarak etanol oluşumundan kaçınılabileceğinden, titresi biyokütle oluşumuna bağlı bileşiklerin endüstriyel üretimi için faydalı olabilir (Bassett ve Da Silva, 2024; Ferreira ve Silveira, 2024).

Fermente yiyecek ve içeceklerden elde edilen mayalar, ekzopolisakkaritler (EPS'ler), folatlar, γ aminobütirik asit (GABA) ve Anjiyotensin I-dönüştürücü enzim (ACE) inhibitör peptitler üretmektedir. Söz konusu biyomoleküller ise belirli kanser türlerini, nörolojik bozuklukları tedavi etmek ve/veya önlenmesine yardımcı olmak ve kalp sağlığını iyileştirmek suretiyle biyoterapötik uygulama potansiyeline sahiptir. *K. marxianus* ve *P. kudriavzevii*'den izole edilen EPS'lerin kolon kanseri hücrelerinde apoptozu indükledikleri rapor edilmiştir. (Kunyeit ve diğerleri, 2024; Saadat ve diğerleri, 2020). *K. marxianus*, *P. kudriavzevii* ve *S. cerevisiae* mayaları peynir fermantasyonunda GABA üretmektedir. *K. marxianus* fermentasyon sırasında en yüksek oranda GABA ürettiği bildirilmiştir. GABA'nın insan sağlığı üzerinde kan basıncını düşürmesiyle birlikte beyin fonksiyonlarını iyileştirerek stresi azalttığı bilinmektedir. Düşük GABA seviyeleri ise anksiyete, kronik ağrı, epilepsi ve depresyon ile ilişkilidir. Mayalar ayrıca ACE aktivitesini inhibe ederek kan basıncını düşüren peptit olan ACE inhibitörü üretmektedir. Bu ACE inhibitör aktivitesi, SARS-CoV2 enfeksiyonunu hedeflemek için potansiyel bir terapötik yaklaşım olabileceği varsayılmıştır, çünkü ACE ve ACE2 reseptörleri SARS-CoV2'nin akciğer hücrelerine girmesi ve tehlike oluşturmasında geçit görevi görmektedir (Kasti ve diğerleri, 2021; Kunyeit ve diğerleri, 2024; Li ve diğerleri, 2021).

K. marxianus maya hücrelerinde insan ferritin ağır zincirinin (rhFTH) yüksek verimli üretimi ve bu nanoparçacıkların fonksiyonel gıdalarda potansiyel kullanımı mümkündür. Ferritin nanoparçacıkları ise fonksiyonel gıda uygulamalarında, beslenme sağlığı açısından demir eksikliği tedavisinde önemli bir alternatif sunmaktadır. Bu bağlamda *K. marxianus* maya hücreleri rhFTH'nin yüksek verimli üretimini sağlamasından dolayı fonksiyonel gıdalar ve gıda takviyeleri için potansiyel biyoteknolojik bir kaynaktır (Lu ve diğerleri, 2024). *K. marxianus*'un fazla yağlı diyet ile erkek farelerde oluşturulan böbrek hasarı üzerine etkilerinin incelendiği bir çalışmada *K. marxianus* ile muamele edilen gruplarda bağırsak mikrobiyotasındaki faydalı bakteri türlerinin arıtışı ve mikrobiyotanın iyileştiği bildirilmiştir. Tool benzeri reseptörü 4 (TLR4) aktive olduğunda, nükleer faktör kappa B (NK-κB) da aktive olur ve çeşitli enfeksiyon ve iltihaplanmalara neden olmaktadır. Bu mayanın TLR4/ NK-κB yolağını modüle ederek böbrek hasarını iyileştirici potansiyele sahip terapötik ilaç olarak kullanılabileceğini göstermektedir (Li ve diğerleri, 2023).

Broiler tavuklarına *K. marxianus* takviyesi sonucunda, tavuklarda bağışıklık yanıtında artış ve bazı bağışıklık hücrelerinin sayısında artış belirlenmiştir. Bağırsak sağlığını olumlu etkileyen bağırsak villuslarının uzunluğunu ve yüzey alanını iyileştirdiği tespit edilmiştir. Bu durum besin emilimini iyileştirmektedir. Ayrıca bağırsak mikrobiyotasının çeşitliliğini artırarak, sağlıklı bakteri popülasyonunun artışını sağlamıştır. Bu bağlamda *K. marxianus* takviyesinin tavuklarda bağışıklığı güçlendirdiği, bağırsak yapısını iyileştirdiği ve sağlıklı mikrobiyota dengesini desteklediği rapor edilmiştir. Bu mayanın tavuk besiciliğinde potansiyel probiyotik takviye olarak kullanılabileceği bildirilmiştir (Wang ve diğerleri, 2017). *K. marxianus* ile hayvanlar için hazırlanmış takviye/kapsüllerin büyümeyi arttırdığı, daha iyi besin verimliliği sağladığı, bağışıklık sisteminin güçlenmesiyle genel sağlık durumun iyileştiği ve bağırsak mikrobiyotasındaki sağlıklı bakteri sayısını arttırdığı ve *K. marxianus* suşlarının bakterilere karşı güçlü bir antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu rapor edilmiştir (Díaz-Vergara ve diğerleri, 2017).

K. marxianus enzim üretme kabiliyetine sahiptir. Bu maya, fruktozu inüline dönüştürmek için bir inülinaz üreticisi olarak kullanılmaktadır (Hoshida ve diğerleri, 2018). Gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılan biyokatalizörlerden biri olan ve genellikle laktaz olarak bilinen ß-Galaktosidazlar, laktozu hidrolize ederek galaktoz ve glukoz karışımı üretir. Bu enzim, birçok *Kluyveromyces* suşu tarafından da üretilebilmektedir (Karim ve diğerleri, 2020; Singh ve diğerleri, 2016). Lipazlar/triaçilgliserol açil hidrolazlar, genel olarak

lipidlerin (triaçilgliserol) biyodönüşümü için ön koşul olan açilgliseridlerin parçalanmasını kataliz etmektedirler. *K. marxianus* yüksek lipaz sentezleme kapasitesine sahip bir mayadır (Sarmah ve diğerleri, 2018). Genellikle pektinazlar olarak adlandırılan endo-poligalakturonazlar, bitki hücre duvarının ana yapısal bileşenini oluşturan heteroolisakkarit pektinlerin hidrolizini katalize eder. Bu maya pektinaz enzimleri üreterek pektinleri parçalayabilen mayalar arasındadır (Alimardani-Theuil ve diğerleri, 2011; Karim ve diğerleri, 2020). Biyoproteinler, protein özütleri veya biyokütleleri karışık veya saf bakteri kültürlerinden, maya, mantar veya mikroalglerden elde edilen besleyici tek hücreli mikroorganizmalardır. Bu mikroorganizmalar gıda bileşenleri, gıda takviyeleri, hayvan veya insan tüketimi için yüksek proteinli gıda sınıfı olarak kullanılabilmektedir. *K. Marxianus* biyoprotein üretimi için önemli potansiyele sahiptir (Bilal ve diğerleri, 2022; Ritala ve diğerleri, 2017).

K. marxianus aşı alanında viral proteinlerin ve virüs benzeri parçacık (VLP) üretiminde kullanılır. Yüksek verimle biyoetanol üretimi yapabilen bu maya, aşıların üretiminde maliyeti düşük ve hızlı alternatif sunmaktadır. Özellikle *Porcine circovirus* ve *Porcine parvovirus* gibi virüslerin aşılarında etkili IgG antikorları üretimini teşvik etmektedir (Bilal ve diğerleri, 2022; Yang ve diğerleri, 2021). *K. marxianus* CRISPR-Cas9 teknolojisi kullanılarak gen düzenleme ve biyosentetik yolların entegrasyonu için önemli model organizma olmaya başlamıştır. CRISPR-Cas9 ile yapılan düzenlemeler *K. marxianus*'un sentetik biyoloji uygulamalarında kullanılmasını sağlamaktadır (Rajkumar ve diğerleri, 2019; Wang ve diğerleri, 2024).

K. marxianus, sodyum dodesil süfat (SDS) ile birlikte Cu (II) iyonlarının biyolojik giderimindeki etkinliğini arttırmaktadır. SDS mayanın hücre zarını etkileyerek Cu (II) iyonlarının daha iyi bağlanmasını sağlamaktadır. Dolayısıyla *K. marxianus* ağır metal temizliği için biyoremediasyon alanında potansiyel bir biyoteknolojik çözüm olduğu bildirilmektedir (Kabadayı ve diğerleri, 2024).

2.5. Ekzopolisakkarit

Ekzopolisakkaritler (EPS'ler), bakteriler, mayalar, mantarlar ve algler gibi çok çeşitli mikroorganizma grubu tarafından üretilebilmektedir (Yıldıran ve diğerleri, 2019). EPS'ler mikroorganizmaların tuzluluk, ışık oranı, pH, sıcaklık gibi çevresel koşulların etkisiyle

sentezlenen ve çeşitlilik gösteren bir biyopolimer sınıfıdır (Mouro ve diğerleri, 2024). Hücre dışı polimerik maddeler olarak da bilinen bu biyopolimerler (EPS'ler) yaşam koşullarında mikroorganizmaların korunmasını, adezyonunu ve biyofilm oluşumunu etkileyerek çoğaldığı ortama adapte olmasına ve hayatta kalmasına yardımcı olmaktadır (Cázares-Vásquez ve diğerleri, 2021). Bu yüksek moleküler ağırlığı olan biyopolimerler en temelde monosakkaritler, proteinler, hümik asitler, glikoproteinler, nükleik asitler, fosfolipitler, astat ve süksinat gibi bazı karbonhidrat olmayan sübstitüentlerden oluşur (Silambarasan ve diğerleri, 2019). Mikroorganizmalar tarafından yapısal olarak iki tür EPS üretilebilir. Bunlardan ilki bir tür monosakkaritin tekrar eden birimlerinden oluşan homopolisakkaritlerdir. İkincisi birden fazla monosakkaritin tekrar eden birimlerinde oluşan heteropolisakkaritlerdir (Ayyash ve diğerleri, 2020; Tarique ve diğerleri, 2024). Ek olarak mannan, glukuronoksilomannan, galaktomannan, glukan, glukomannan ve fosfomannan gibi polisakkaritler, çeşitli EPS türleri olarak da kabul görmektedir (Hamidi ve diğerleri, 2020).

Laktik asit bakterileri (LAB) tarafından üretilen EPS'lerin birçok kullanım alanının yanı sıra faydalı/yararlı özellikleri bulunmakta ve bunlar üzerine yaygın olarak araştırmalar yapılmaktadır (Cázares-Vásquez ve diğerleri, 2021). Son zamanlarda maya EPS'leriyle yapılan bazı çalışmalar olmasına rağmen maya EPS'leri iyi bilinen bir metabolit grubu değildir. Ancak mayalar tarafından üretilen EPS'lerin izolasyon prosedürü bakteriyel EPS'lerden daha kolay ve hızlıdır. Dolayısıyla maya EPS'lerinin üretimi avantajlıdır (Mirzaei Seveiri ve diğerleri, 2020). Maya EPS'leri çeşitli biyoaktiviteleri, kozmetik, gıda ve ilaç endüstrilerindeki çok çeşitli olası uygulamaları nedeniyle ilgi görmeye başlamıştır. Ancak bazı patojenik mikroorganizmaların ürettiği EPS'ler endotoksinlerle kontaminasyon riski altında olabilir. Gıda ve ilaç endüstrilerinde kullanıldıklarında toksik yan etki gösterebilirler. Bu nedenle gıdalarda EPS üretebilen mikroorganizmaların değerlendirilmesi/incelenmesi gereklidir (Yang ve diğerleri, 2022). EPS'ler birçok endüstriyel uygulamalara sahip olmasıyla birlikte gıda endüstrisinde kıvam arttırıcı, biyosorbent, stabilizatör, emülgatör olarak kullanılmaktadır. Ayrıca kozmetik sektöründe jelleştirici olarak da kullanılmaktadır. Ek olarak biyoremediasyon alanında ağır metal giderimi amaçlı kullanım alanı bulunmaktadır (Mohammed ve diğerleri, 2021). Maya EPS'leri genellikle negatif yüklü olmasından dolayı çoğu metal katyonu ile birleştiğinde ağır metalleri absorbe edebildiği ortaya konulmuştur (Hao ve diğerleri, 2020; Liu ve diğerleri, 2022).

Maya EPS'lerinin immünomodulatör, antioksidan özellikler, antimutajen, antiviral, antikanser, antikoagülan özellikleri bulunmakladır. EPS'nin monosakkarit bileşimi, fonksiyonel özellikleri, fonksiyonel gruplar ve moleküler ağırlık gibi fizikokimyasal özellikleriyle bağlantılıdır (Liao ve diğerleri, 2022). Bazı yararlı/faydalı EPS'ler mutajenlere bağlanıp mutajenlerin aktivitesini inhibe etmesiyle antimutajenik aktivite sergilemektedirler. Ayrıca nutrasötikler ve fonksiyonel gıdaların üretiminde potansiyel olarak kullanılabilecek EPS'ler kolesterol düşürücü etkisiyle birlikte antioksidan ve biyosürfektan aktivite sergilerler (Saadat ve diğerleri, 2021). Prebiyotik özellikteki EPS'lerin bağırsak sağlığının düzenlenmesinde önemli rolü bulunmaktadır. Ayrıca EPS'ler konağın enerji metabolizmasında, bağırsak bariyeri işlevinde, bağışıklık düzenlenmesinde önemli metabolitler olan kısa zincirli yağ asitlerinin üretimini etkileyerek bağırsak mikrobiyom bileşimini ve işlevini modüle edebilirler (Tarique ve diğerleri, 2023).

2.5.1. EPS Modifikasyonu ve karakterizasyonu

Son zamanlarda EPS'lerin geniş alanlardaki uygulamaları, fizikokimyasal özelliklerinin işlevsel olarak geliştirilmesine yönelik çalışmalara odaklanmıştır. EPS'lerin fizyolojik işlevlerini geliştirmek ve faydalı/etkili EPS'lerin araştırılması önemli araştırma alanı olmakla birlikte etkili fizikokimyasal özellikleri ve biyoaktivitelerinin belirlenmesi, terapötik ajanların keşfedilmesinde ve biyoteknolojik uygulamalarda kullanılabilirliğinin arttırılması açısından önemlidir. Bu bağlamda, faydalı/etkili biyoaktivitelere veya avantajlı niteliklere sahip EPS'lerin geliştirilmesi son derece önemlidir (Liu ve diğerleri, 2021; Xu ve diğerleri, 2019).

Polisakkaritlerin kimyasal yapılarındaki moleküler modifikasyonlar önemli bir çalışma alanı olarak kabul edilmektedir. Kimyasal modifikasyonlar, daha zayıf biyolojik aktiviteye sahip olan polisakkaritlerin biyoaktivitelerinin arttırılmasında, güçlendirilmesinde veya geliştirilmesinde önemli bir role sahiptir (Shah ve diğerleri, 2024). Modifikasyon yöntemleri başlıca fiziksel, biyolojik ve kimyasal modifikasyonlardan oluşmaktadır. Bu modifikasyonlar polisakkaritlerin yapılarını, moleküler ağırlıklarını ve fonksiyonel gruplarını değiştirerek biyolojik aktivitelerini de değiştirebilmektedir. Kimyasal modifikasyonlar polisakkarit sübstitüentini değiştirebilirken, biyolojik ve fiziksel modifikasyonlar ise sadece polisakkaritlerin moleküler ağırlığını değiştirmektedir (Nachtigall ve diğerleri, 2021; Shah ve diğerleri, 2024).

Kimyasal modifikasyon polisakkaritlere çözünürlük, uyumluluk ve adsorpsiyon dahil olmak üzere faydalı/yararlı özellikler kazandırabilir. Bu modifikasyon polisakkaritlerin daha etkili antibakteriyel aktivitesine yol açmaktadır. Ayrıca Karboksimetilasyon, asetilasyon, fosforilasyon, sülfatlama, selenasyon, aminasyon ve diğer kimyasal modifikasyonlar polisakkaritlerin suda çözünürlüklerini sağlamakla birlikte biyoaktivitelerini de arttırmaktadır (Wang ve diğerleri, 2024). Özellikle karboksimetilasyon ve oksitleme gibi kimyasal modifikasyonlar polisakkaritlerin sudaki çözünürlüğünü arttırmak için yaygın olarak kullanılmaktadır. Karboksimetilasyonun polisakkaritlerdeki antioksidan aktiviteyi büyük ölçüde arttırdığı bildirilmiştir (Gao ve diğerleri, 2024). Ayrıca karboksimetillenmiş polisakkaritlerden bazıları yenilebilir, biyouyumlu ve bozunabilir yapıda olmalarından dolayı çeşitli gıda uygulamalarında yaygın olarak kullanılmaktadır (Xie ve diğerleri, 2021).

Karboksimetilasyon metoduyla modifikasyon, EPS omurgasının hidroksil gruplarına karboksimetil rezidülerinin eklenmesidir. Bu durum birbirini takip eden konformasyonel değişikliklere yol açarak çözünürlüğü arttırır ve nihayetinde EPS'lerin biyoaktivitelerini etkilemektedir (Soumya ve Nampoothiri, 2023). Karboksimetil gruplarının eklenmesi, elektronegatifliğin artmasına ve antikanser, hipoglisemik ve antioksidan potansiyellerinin artışına yol açmaktadır. Bu bağlamda karboksimetilasyon EPS'ler için son derece önemlidir. Ayrıca Karboksimetilasyon modifikasyonunun başarılı olup olmadığı FT-IR ve NMR (Nükleer Manyetik Rezonans) analizleriyle doğrulanabilir (Fujiike ve diğerleri, 2022; Liu ve Huang, 2019).

Yapısal özellikler itibariyle EPS'ler glikozidik bağlarla birbirine bağlanmış tekrar eden şeker birimlerinden oluşmaktadır. Moleküler yapıdaki hidroksil grupları, moleküller arası ve molekül içi hidrojen bağına katılabilirler, bu da EPS zincirlerinin kendiliğinden hiyerarşik bir konformasyon oluşturmasını sağlar. Bu yapı EPS'nin potansiyel işlevlerini anlamaya yardımcı olabilir. Polisakkaritlerin konformasyonlarını analiz etmek amacıyla NMR ve FT-IR gibi spektroskopik yöntemler kullanılmaktadır (El Halmouch ve diğerleri, 2023). Bağların karakteristik frekanslarda titreşmesi prensibine göre çalışan FT-IR, fonksiyonel grupların türünü tespit etmek ve EPS yapısında bulunan fonksiyonel grupların karakterizasyonunu belirlemek amacıyla kullanılmaktadır (Rana ve Upadhyay, 2020). SEM analizi EPS'lerin yüzey mikro yapısını ortaya çıkararak morfolojik özelliklerin belirlenmesini sağlamasıyla birlikte EPS'lerin fiziksel özelliklerini ve biyolojik aktivitelerini araştırmak için temel sağlamaktadır. SEM ile birlikte yapılan EDX analizi, EPS'lerin

elementel haritalandırılmasını sağlamaktadır (Kowsalya ve diğerleri, 2023; Liu ve diğerleri, 2022). Boyut Dışlama Kromatografisi (SEC) aynı zamanda Jel Permeasyon Kromatografisi (GPC) olarak da bilinmektedir. Farklı polimer türlerini moleküler boyutlarına ayırmak için güçlü yöntemlerden olan GPC, ekzopolisakkaritlerin ortalama moleküler ağırlığı (Mw), sayısal ortalama moleküler ağırlığı (Mn) ve boyut ortalama moleküler ağırlığını (Mz) tespit edilmesinde kullanılan yöntemdir (Berekaa ve Ezzeldin, 2018; Ismail ve Nampoothiri, 2014; Lubomirsky ve diğerleri, 2021). Ekzopolisakkaritlerin moleküler ağırlık (MW) değerini tespit etmek için yaygın olarak kullanılan SEC analizi, hassasiyet, basitlik, hız ve tekrarlanabilirlik gibi birçok avantaja sahiptir. Çalışmalarda çeşitli kaynaklardan ve büyüklüklerden ekzopolisakkaritlerin Mw'sini belirlemek için bu yöntem kullanılmaktadır (Buksa ve diğerleri, 2021; Chen ve diğerleri, 2024).

2.6. Kemoprevensiyon

Kemoprevensiyon, kanser gelişimini engellemek ya da invazyon ve/veya metastaz başlamadan önce bunu tersine çevirmek için farmasötik yöntemlerin ve gıda takviyeleri gibi maddelerin kullanılmasını ifade etmektedir. Özellikle de sentetik, doğal bileşiklerin ve biyoaktif bileşiklerin kanser kemoprevensiyonunda önemli rolleri bulunmaktadır. Kemopreventif engelleyici ve/veya baskılayıcı ajanlar, reaktif oksijen türlerinin neden olduğu DNA hasarı, NF-kß'nin artan sinyal iletimi, epigenomik deregülasyon ve metastatik ilerleme gibi karsinogenezi yönlendiren moleküler mekanizmaları inhibe ederek kanser gelişimini önler (Aborziza ve diğerleri, 2024; Gu ve Li, 2020; Landis-Piwowar ve Iyer, 2014).

Kemoprevensiyon alanında birincil, ikincil ve üçüncül kemoprevensiyon yaklaşımları bulunmaktadır. Birincil yaklaşımda, sağlıklı bireylerin belirli kanser türlerine karşı genetik gibi yüksek risk faktörlerinin hedef alınarak hastalık gelişimini önlemeye yönelik stratejileri içermektedir. İkincil yaklaşımda ise premalign tümörlerin tedavisiyle kanserin ilerlemesini engellemek amaçlanmaktadır. Üçüncül yaklaşımda ise daha önce kanser geçirmiş bireylerin desteklenerek hastalığın tekrar nüksetmesini veya yeni primer tümörlerin ortaya çıkmasını önlemeye yöneliktir. Birincil kemoprevensiyon tipinde kanser oluşumu önlenirken, ikincil tipte spesifik metabolik kanserojen aktivasyon yolaklarını engelleyerek kanserojen kaynaklı mutasyonları önlemekle birlikte spesifik reaktif oksijen türevlerini engelleyerek detoksifikasyon sürecini geliştirmektedir. Son olarak üçüncü tipte ise hücre çoğalmasını ve

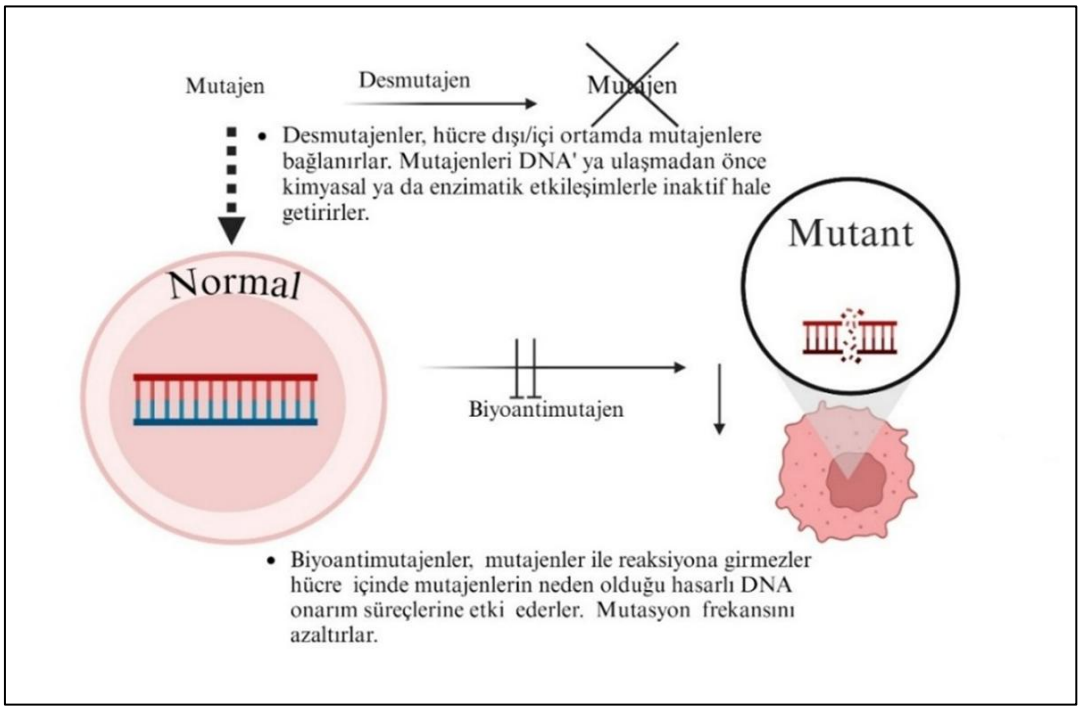
farklılaşmasını durdurarak apoptoz, otofaji ve nekrozu indüklemek suretiyle tümör ilerlemesi engellenmektedir. Kemopreventif bileşiklerin aynı zamanda geleneksel kemoterapötik ilaçların etkinliğini arttırdığı da bildirilmiştir. Bu bağlamda kanser kemoprevensiyonunun amacı, kanserin erken evre riskini azaltmakla birlikte tümörlerin ikincil yayılımlarını engellemektir (George ve diğerleri, 2021; Marrero ve diğerleri, 2022).

2.7. Genotoksisite ve Antigenotoksisite

Genetik toksikoloji, genetik ve toksikoloji bilimlerinin bir araya geldiği, çeşitli ajanların hücrenin DNA ve/veya kromozomlar üzerindeki potansiyel zararlı etkilerini ve etki mekanizmalarını inceleyen bilim dalıdır (Ng ve Hande, 2024). Genetik materyal endojen ve eksojen olmak üzere çeşitli genotoksik ajanlara maruz kalmaktadır. Genotoksinler, ortaya çıkan DNA/RNA hasarı, gen mutasyonları, kromozomal hasarlar ve birçok farklı anormalliklere sebep olabilirler. Genotoksik hasar sonucu DNA' da meydana gelen hasarlar sayısız sağlık komplikasyonunun oluşumunu tetikleyebilir. Genotoksinler, genomik kararsızlığı tetiklemekte ve metabolik sendromlar, erken yaşlanma, infertilite, kardiyovasküler hastalık, kök hücre disfonksiyonu, kanser, Parkinson, Alzheimer ve Huntington hastalıklarıyla beraber ataksiler gibi nörodejeneratif bozukluklar da dahil olmak üzere çok sayıda hastalıklarda rol oynayan daha fazla kümülatif DNA hasarına sebep olmaktadır. Bu kapsamda, bu gibi etkileri en aza indirgeyebilmek için sağlıklı hücrelerin DNA hasarına karşı korunması gerekmektedir. Bu nedenle, genotoksinlere karşı antigenotoksik ajanların araştırılması/incelenmesi/geliştirilmesi önemlidir (Bhandare, 2024; Yadav ve diğerleri, 2024).

Mutajenler, genellikle birden fazla DNA eklentisi oluşturmakla beraber bazı eklentiler biyolojik olarak diğer eklentilerden daha önemlidir. Bu bağlamda bazı mutasyonlar kansere sebep olurken diğerleri daha az önemli ve/veya zararsız olabilmektedir. İnsanlardaki birçok genetik hastalıklar spesifik genetik mutasyonların sonucunda ortaya çıkmaktadır (Basu, 2018). Antimutajenler, indüklenmiş ve spontan mutasyon çeşitlerinin etkilerini azaltan ajanlardır. Ayrıca antimutajenler, karsinogenez sürecinin bir veya daha fazla aşamasını inhibe edebilir ve kanser oluşumunu önleyebilir ve/veya geciktirebilir. Antimutajenik ajanlar, biyoantimutajenler ve desmutajenler olmak üzere iki ayrı sınıfa ayrılır (Okuno ve diğerleri, 2019; Saks ve diğerleri, 2017). Etki mekanizması Şekil 2.1'de gösterilmiştir.

Biyoantimutajenik ajanlar/maddeler, DNA'nın replikasyonunu ve onarımını uyarırlar. Ayrıca replikasyonun doğruluğunu ve hatasız şekilde onarım süreçlerini desteklemektedir. Bu bağlamda, hücresel düzeyde etki ederek DNA hasarının etkilerini azaltmanın yanı sıra mutasyon frekansını da azaltırlar. Desmutajenik ajanlar/maddeler, mutajenleri inaktif/etkisiz hale getirir ve bu sayede DNA ya zarar vermezler. Böylece, mutajenik ajanları ya doğrudan ya da türevleri aracılığıyla inaktive ederek hücre dışı ve/veya içi ortamda kimyasal olarak etkisiz hale getirmiş olur (Dos Santos Freire ve diğerleri, 2020; Khatab ve diğerleri, 2024).



Şekil 2.1. Antimutajenlerin etki mekanizması (Biorender kullanılarak oluşturulmuştur).

2.8. Mutajenler

Kanser riskini arttırmada mutajenlerin iki temel yolu/mekanizması bulunmaktadır. İlk mekanizmada mutajen, doğrudan DNA'ya hasar vererek DNA'nın her replike olduğunda daha fazla hata yapılmasına neden olabilir. İkinci mekanizmada mutajen, DNA replikasyonunun sayısını arttırabilir, kritik genlerde kritik hataların meydana gelmesi için daha fazla olanak sağlayarak kanser gelişimine neden olabilir. Bu bağlamda toksisite veya hücre proliferasyonu üzerindeki etkiler ya doğrudan ya da dolaylı olabilir ve genellikle bir maddenin/kimyasalın metabolik aktivasyonunu gerektirmektedir (Basu, 2018; Cohen, 2024). Mutajenlerde doğrudan etkileyenlere, alkilleyici ajanlar, ultraviyole (UV) ışınımı, X-ışınları, gama ışınları ve bazı virüsler örnek verilebilir. Dolaylı etkileyenlere ise

aflatoksinler, reaktif oksijen türevleri ve mikotoksinler örnek verilebilir (Malik ve diğerleri, 2022).

İlk keşfedilen antikanser ilaçlar arasında olan alkilleyici ajanlar, kemopterapide yaygın olarak kullanılmaya devam etmektedir. Alkilasyon ajanları, DNA bazlarının halka nitrojen ve ekstrasiklik oksijen atomlarıyla reaksiyona girerek DNA da bazı değişiklikler meydana getiren kovalent eklentiler oluşturan elektrofilik bileşiklerdir. Bu ajanlar DNA ipliğinde kırılmalara, DNA replikasyonundaki bozulmalara, hücre döngüsünün durmasına ve apoptoza neden olmaktadırlar. Bu sebeplerle birçok kanser türlerinin (glioma, lösemi, akciğer, lenfoma, over ve mesane neoplazmaları) tedavilerinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Lang ve diğerleri, 2024; Li, 2024; Saville ve diğerleri, 2024; Chiorcea-Paquim ve Oliveira-Brett, 2023).

Alkilleyici bir ajanın oluşturduğu DNA lezyonlarının türü, kimyasal reaktivitesine (S_N1 veya S_N2 tipi nükleofilik sübstitasyon), reaktif bölgelerinin sayısına (monofonksiyonel ve bifonksiyonel alkilleyici ajan), alkil grubu ekleme tipine (metil, kloroetil vb.) ve DNA hasar tipine (çift iplikli veya tek iplikli) bağlıdır. Bifonksiyonel alkilleyici ajanlar iki reaktif grup içerir, her iki DNA zinciri üzerinde yer alan iki atomla etkileşime girerek sarmal arası çapraz bağlar oluşturur. Yapılarında sadece bir reaktif grup bulunan monofonksiyonel alkilleyici ajanlar, DNA'nın çift sarmalının sadece bir zinciriyle etkileşime girerek kimyasal bağlar oluşturular. S_N2 reaksiyonu veren alkilleyici ajanlar DNA'daki halka azot atomlarına bağlanırken, S_N1 reaksiyonu veren alkilleyici ajanlar hem halka azotlarına hem de halka dışındaki oksijen atomlarına bağlanırlar. Bu bağlamda Metil Metansüfonat (MMS), monofonksiyonel S_N1 tipi alkilasyon ajanıyken, Mitomisin-C (MMC) ise bifonksiyonel alkilasyon ajanı olmasının yanı sıra genellikle S_N1 tipi alkilasyon ajanı olarak gruplandırılmakta ancak yapısındaki reaktif gruplar nedeniyle hem S_N1 hem de S_N2 tipi mekanizmalarla etkileşime girebilmektedir (Chiorcea-Paquim ve Oliveira-Brett, 2023; Fu ve diğerleri, 2012; Puyo ve diğerleri, 2014).

DNA alkilleyici ajanlar, hematopoetik toksisite, gastrointestinal toksisite, gonadal ve merkezi sinir sistemi (MSS) toksisiteleri gibi karakteristik yan etkilere sahip olmalarına rağmen, ilacın reaktivitesi, metabolizması ve dağılımına bağlı olarak her bir ajanın kendine özgü toksisiteleri bulunur. Bu toksisitelerine karşın, kanser tedavilerinde DNA alkilleyici ajanlar vazgeçilmez bir yere sahiptir. İlk antikanser ilaçlar arasında yer alan alkilleyici

ajanlar günümüzde hala kemoterapide yaygın olarak kullanılmaktadır (Andrés ve diğerleri, 2024; Li, 2024).

2.8.1. Mitomisin-C (MMC)

MMC, Gram pozitif-aktinobakeri *Streptomyces caespitosus*'tan izole edilen antibiyotik ve antitümör özellikte alkilleyici bir kemoterapi ajanıdır. Bifonksiyonel alkilleyici ajan olan MMC, DNA sentezini G1/S fazında inhibe ederek hücre proliferasyonunda ve migrasyonunda azalma meydana getirir (Crespo ve diğerleri, 2023; Mearza ve Aslanides, 2007). Memeli hücrelerinde DNA hasarını indükleyerek replikasyon ve transkripsiyonun durması sonucu apoptoza yol açmaktadır. MMC, DNA'nın 5'-CpG-3' dizisinde yer alan minör oluğundaki 7-N-guanin nükleotid rezidüleriyle N-alkilasyon yoluyla reaksiyona girerek DNA çapraz bağlanmasına neden olur. Ayrıca MMC göz cerrahisinde ve antifibrotik ilaç olarak da kullanılmaktadır (Erikel ve diğerleri, 2023; Sinitsky ve diğerleri, 2020). Göz alanında özellikle korneal epitelyal, stromal ve endotelyal hücrelerle birlikte tenon kapsülü fibroblastları ve göz tümörü epitel hücrelerinde apoptozu tetiklediği düşünülmektedir. Ayrıca, kolorektal, mide, servikal, pankreas, prostat ve mesane gibi çeşitli tümörler üzerinde terapötik etkiye sahiptir. Suda iyi çözünmesi ve kararlı sitogenetik aktivitesinden dolayı MMC *in vitro* çalışmalarda model mutajen olarak kullanılır (Zhang ve diğerleri, 2024; Crespo ve diğerleri, 2023).

2.8.2. Metil metansülfonat (MMS)

Alkilleyici ajanlardan olan Metil Metansülfonat (MMS) deneysel çalışmalarda ve kemoterapi tedavilerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. MMS, DNA ile reaksiyona girmek suretiyle DNA molekülüne bir metil grubu (-CH3) aktarmaktadır. Bu bağlamda DNA'nın MMS ile alkilasyonu, metil grubunun DNA molekülüne kovalent olarak bağlandığı metillenmiş DNA eklentilerinin oluşumuna yol açmaktadır. Dolayısıyla bu eklentiler DNA çift sarmalının yapısal bütünlüğünde değişikliklere neden olarak DNA'nın replikasyon ve transkripsiyonunu engelleyebilmektedir. Ayrıca bu değişiklikler DNA replikasyonu esnasında nükleotid uyumsuzluklarına yol açarak DNA dizisinde mutasyonlara yol açmaktadır. MMS genellikle guanin bazlarının O6 pozisyonunu hedef alır, aynı zamanda guaninin N7'sini ve adeninin N3'ünü de alkilleyebilir. MMS'nin ayrıca DNA'da konformasyonel değişiklik ve riboz şeker modifikasyonlarından da sorumlu olduğu

bildirilmiştir. MMS tarafından oluşturulan metilasyonun varlığı ve DNA eklentileri, hücrelerdeki DNA onarım süreçlerini tetikleyerek baz eksizyon onarımı (BER) yolunu devreye sokar. MMS genotoksisitesi kanıtlanmış, deneysel çalışmalarda DNA hasarına neden olan model mutajen olarak tercih edilmektedir. Hücre kültürü koşullarına bağlı olarak, MMS'nin sitotoksisitesinin DNA lezyonlarına bağlı olmadığı ve oksidasyon nedeniyle oluştuğu belirtilmektedir (Mustafa ve diğerleri, 2022; Mustafa ve diğerleri, 2024; Ovejero ve diğerleri, 2021).

2.8.3. Serbest radikaller, reaktif oksijen türleri ve hidrojen peroksit

Serbest radikallerin, dış orbitallerinde bir veya daha fazla eşlenmemiş elektron bulunmasına ek olarak genellikle kararsız ve çok reaktif moleküllerdir. Oksidasyon süreçleriyle birlikte normal fizyolojik ve patolojik koşullarda meydana gelen kimyasal reaksiyonların yan ürünleri olarak ortaya çıkmaktadır. Serbest radikaller endojen ve eksojen kaynaklardan meydana gelebilir. Eksojenlere örnek olarak, ultraviyole radyasyon, çevresel kirleticiler, gama radyasyonu, ksenobiyotikler ve sigara dumanı serbest radikal reaksiyonların kaynakları/başlatıcıları arasında yer alırken, endojen serbest radikal üretiminin önemli kaynakları arasında aerobik oksidasyon, oksidatif patlama, enzim reaksiyonları ve oto-oksidasyon reaksiyonlarının yan ürünleri bulunmaktadır (Akınosun ve diğerleri, 2024; Rasheed ve Al-Rubayee, 2012). Serbest radikal örnekleri, süperoksit, nitrik oksit, nitrojen dioksit, hidroksil, alkoksi ve peroksil radikalleridir. Oksidatif stres, serbest radikallerin üretiminin antioksidan savunma sistemini aştığı durumda meydana gelir. Hidroksil radikali (OH^-), süperoksit anyon radikali (O_2^{-}) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi türler elektron eksikliklerini dengeleyebilmeleri için hücresel bileşenlere zarar veren son derece reaktif moleküllerdir (Wróblewski ve diğerleri, 2024; Akınosun ve diğerleri, 2024). Reaktif oksijen türleri (ROT) tarafından üretilen serbest radikaller, istenmeyen değişikliklere yol açmasıyla, lipid peroksidasyonu, hücre ölümü, DNA parçalanması, DNA hasarı, membran hasarı ve protein modifikasyonu gibi durumlara neden olur. Oksidatif stres, sadece ksenobiyotiklerin toksisitesinde bulunmakla kalmaz, aynı zamanda organ disfonksiyonu, diyabetik retinopati, kanser, iskemi reperfüzyon hasarı, inflamasyon, vasküler endotel hasarı, katarakt ve kalp hastalığı gibi çeşitli hastalıkların patofizyolojisinde önemli rolü bulunmaktadır (Chaudhary ve diğerleri, 2023; Stephenson ve diğerleri, 2014). Ayrıca ROT'ların nörodejeneratif hastalıklar ile ilişkili etkileri Huntington hastalığı, multipl skleroz, Alzheimer hastalığı, amiyotrofik lateral skleroz, Parkinson ve Friedreich ataksisinde oldukça iyi bilinmektedir.

ROT'ların genlerin mutasyonlarına neden olduğu ve epigenetik değişikliklere sebep olduğu bilinmektedir. Birçok hastalık, epigenomda anormal değişikliklere neden olabilen ve kronik hastalıklarda DNA metilasyonunu yeniden düzenleyebilen ROT'lar tarafından ortaya çıkarılabilmektedir (Anik ve diğerleri, 2022; Houldsworth, 2023).

Hücresel metabolizma yoluyla üretilebilen H_2O_2'in, bağışıklık yanıtları ve hücresel sinyal iletiminde rolleri bulunmaktadır. Ancak, yüksek konsantrasyonlardaki H_2O_2 oksidatif strese yol açması sonucu hücre hasarına neden olabilir (Yu ve diğerleri, 2022). H_2O_2 bir sinyal molekülü gibi işlev görerek oksidatif strese yol açması sonucu protein ve DNA hasarına neden olabilir (Nishan ve diğerleri, 2021). Ayrıca DNA'da hem tek zincir kırıkları hem de çift zincir kırıkları meydana getirebilir (Jose ve diğerleri, 2024). H_2O_2'in yol açtığı DNA hasarı, onkojenik dönüşümü teşvik ederek hücrelerdeki mutasyon seviyelerini arttırmaktadır. H_2O_2, tümörü başlatmanın yanı sıra hücresel proliferasyonu ve metastazı etkileyerek ayrıca tümör gelişimine katkıda bulunan transdüksiyon sinyal yolaklarını spesifik olarak etkinleştirebilmektedir (Costa ve diğerleri, 2023; Lisanti ve diğerleri, 2011; Reuter ve diğerleri, 2010). Gıda alanında birçok kullanım alanı olan H_2O_2, gıdaların saklama süresi ve raf ömrünü uzatmak için kullanılmaktadır. Ayrıca birçok hayvansal ve bitkisel yağları beyazlatmak/ağartmak için kullanımın yanı sıra şeker pancarının rafine edilmesinde tercih edilmektedir. Gıda alanında kullanımında önemli husus uygun konsantrasyon ve yöntemlerle uygulanmasıdır. Endüstriyel alanda birçok kullanım alanının yanı sıra, sterilizasyon ve kağıt beyazlatma/ağartma gibi işlemlerde önemli yere sahiptir (Pirsa ve Purghorbani, 2024).

2.9. Genotoksisite testleri

Genotoksisite testleri, bir kimyasalın/maddenin/ajanın DNA ve/veya kromozom üzerinde doğrudan ve dolaylı etki potansiyelini belirlemek amacıyla yapılan testlerdir. Bu testler, kimyasalların/maddelerin mutajenik veya klastojenik potansiyellerinin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadırlar. İlaçlar, kimyasallar, gıda katkı maddeleri, gıda takviyeleri, kozmetik maddeleri ve nanopartiküller gibi çok çeşitli alanlarda kullanılan maddelerin güvenliklerinin değerlendirilmesinde genotoksisite testleri önemli yere sahiptir. Kromozomal anormallikler (KA) testi, sitokinez blok mikronükleus testi (CBMN-Cyt) ve comet testi yaygın olarak kullanılan genotoksisite testleridir (Elespuru ve diğerleri, 2022; Hendriks ve diğerleri, 2024; Seo ve diğerleri, 2024).

Yeni kimyasalların, maddelerin ve ajanların günlük yaşama dahil olmasıyla birlikte, genotoksisite testleriyle değerlendirilmesi giderek daha büyük bir önem kazanmaktadır. Bu amaç doğrultusunda hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak uygulanan çeşitli genotoksisite test yöntemleri kullanılmaktadır. Genotoksisite testlerinin standartlarını ve yöntemlerini belirleyen Ekonomik Kalkınma ve İş Birliği Örgütü (OECD) test kılavuzlarında, *in vitro* memeli kromozom anormallikleri testi (OECD 473), *in vitro* memeli hücreleri mikronükleus testi (487) ve comet testi (*in vivo* comet testi OECD 489) OECD kılavuzlarında yer alan ve sıklıkla kullanılan genotoksisite testleridir (OECD, 2016a, 2016b, 2023; Luan ve Honma, 2022).

2.9.1. Kromozomal anormallikleri testi

İlk olarak 1956 yılında Ford ve Hamerton kromozomal anormalliklerin tanımlamasına katkı sağlamıştır. Daha sonra 1960 yılında Moorhead ve London kromozomal anormallikleri gözlemleyebilmek için *in vitro* hücre kültürlerinde çalışmışlardır. Metafaz evresinde kromozomlar çok daha belirgin olduğu için, metafaz hazırlama yöntemiyle kromozomal anormalliklerin tespiti amacıyla periferik kan örneklerinden kısa zamanlı lenfosit kültürü geliştirerek kromozomal anormallik (KA) testini teknik olarak kullanılabilir hale getirmişlerdir. KA testi, herhangi bir fiziksel/kimyasal ajan tarafından indüklenen kromozomlardaki sayısal ve yapısal anormalliklerin tespit edilmesini sağlamaktadır. Ajanların etki mekanizmalarına göre, kromatit tipi kırık, kromozom tipi kırık, kromozom tipi fragment, disentrik kromozom, kromatit değişimi, kardeş kromatit birleşmesi ve halka kromozom yapısal anormallikler olarak sınıflandırılırken, poliploidi ve endoreduplikasyon sayısal anormallik olarak sınıflandırılmaktadır. KA'lar metafazda başlıca birkaç mekanizma nedeniyle gözlemlenir: Replikasyon sırasında meydana gelen hatalar veya DNA lezyonları sebebiyle oluşan çift sarmal DNA hasarı, kovalent bağlanma, interkalasyon veya DNA replikasyonu ya da DNA tamirine müdahale sonucu oluşan genom hasarı ve bazı ajanlar tarafından DNA sentezinin inhibisyonu ile birlikte DNA çapraz bağlarının oluşumudur (Yadav ve diğerleri, 2024; İla ve Hüsunet, 2022: 153, 184).

Yüksek KA frekansı ile kanser riski arasında bir bağlantı bulunmaktadır. İnsan lenfosit kültürüyle yapılan çalışmalarda yapısal ve sayısal kromozom anormallikleri ile kanser riski arasında bir ilişki olduğu doğrulanmıştır (Hemminki ve diğerleri, 2024). Çeşitli ajanlar veya kanserojen kimyasallar genotoksik potansiyelleri nedeniyle KA'lara yol açabilirler. Spontan

KA'lar ise doğrudan klinik öneme sahip olmasa da genomik instabilite potansiyeli ve hastalığa yatkınlık/kanser riski konusunda değerli fikirler sağlayabilmektedir (Haverić ve diğerleri, 2023; Nakamura ve diğerleri, 2024).

2.9.2. Sitokinez blok mikronükleus (CBMN-Cyt) sitom testi

En yaygın kullanılan genotoksisite testlerinden olan CBMN-Cyt testi hem mutajenik hem de anöjenik etkilerin tespit edilmesinde kullanılan, hızlı sonuç alınan ve güvenilir bir yöntem olarak kabul edilmektedir. Bu test farklı hücre tiplerinde gerçekleştirilebilmesiyle birlikte *in vitro* ve *in vivo* olarak uygulanabilir. Bu test ile mikronükleus (MN), nükleoplazmik köprüler (NPK) ve nükleer tomurcuklar (NT) değerlendirilir. Ayrıca belirli morfolojik özelliklere dayanarak sitotoksisite değerlendirilir. Nükleer bölünme indeksi (NBİ) veya sitokinez-blok proliferasyon indeksi (CBPI) parametreleri kullanılarak, proliferasyon kinetiği tespit edilir. MN, anafaz esnasında DNA kırıklarının yanlış onarımı veya onarılmamış DNA kırıkları ve mitotik iğ hasarının neden olduğu yoğunlaşmış asentrik kromozom veya tüm kromozomlardan oluşan küçük oval cisimlerdir. Disentrik kromozomlardan kaynaklanan NPK'lar DNA kırıklarının yanlış onarımının yanı sıra telomer ucu füzyonları veya dekatenasyon başarısızlığının göstergesidir. NT'ler çoğaltılmış DNA veya DNA onarım komplekslerinin ekarte edilmesinden kaynaklanmaktadır. İnsan hücrelerinde MN analizi, kromozom instabilitesini, ayrıca çevresel ve endojen genotoksinlerin DNA'ya zarar veren etkilerini belirlemek amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca yüksek MN frekansı ile kanser riski arasında bir ilişki bulunmaktadır (Fenech ve diğerleri, 2024; Gajski ve diğerleri, 2024; Yüzbaşıoğlu ve Avuloğlu-Yılmaz, 2022: 219-249).

2.9.3. Comet testi

Literatürde tek hücre jel elektroforez (SCGE) testi olarak da bilinebilen Comet (kuyruklu yıldız) testi, bir fiziksel etmenin ve/veya kimyasal maddenin/ajanın genetik açıdan zararlı olup olmadığını veya risk taşıma potansiyelini belirlemek amacıyla DNA düzeyindeki değişiklikleri ve bunların onarım düzeylerini ortaya çıkarmak amacıyla *in vitro* ve *in vivo* koşullarda uygulanabilmektedir. Comet testinin temel ilkesi; hasar görmüş kısa ve moleküler ağırlığı az olan negatif yüklü DNA kırıkları/parçaları, erime ısısı düşük agarozda, elektroforez ortamında, hasar görmemiş DNA'yı içeren nükleoidden ayrılarak artı kutba göç etmesidir. Böylece belli bir baş bölgesi ve kuyruk kısmını bulunduran, bu teste adını veren

kuyruklu yıldız'a benzer görüntü oluşturur. Bu bağlamda, baş kısmında serbest kalan ve göçen DNA miktarı, DNA hasarının derecesini göstermektedir. Ayrıca oksidatif olarak üretilen nükleobaz hasarı, diğer DNA lezyonları ve onarım sürecindeki değişiklikler (baz eksizyon onarımı ve nükleotid eksizyon onarımı) hakkında bilgi sağlayan modifiye yöntemler bulunmaktadır (Mišík ve diğerleri, 2023; Ünal, Saygılı ve Akbaş, 2022: 313, 340).

Comet testinin görüntü analizi, kuyruk uzunluğunun (µm) ve kuyruklu yıldız kuyruğundaki DNA yüzdesinin (%DNA) parametreleri doğrudan elde edilen sonuçları kapsarken, kuyruk momenti (kuyruk uzunluğu ve kuyruktaki DNA yüzdesinin çarpımı) parametresi hesaplama sonucu elde edilir. OECD 489 numaralı test kılavuzunda *in vivo* comet testinde kuyruktaki DNA yüzdesi (%DNA) parametresinin kullanılması tavsiye etmektedir. DNA hasarı meydana gelen hücrede baş ve kuyruk olmak üzere iki bölümden meydana gelir. DNA hasarı/kırığı meydana gelen DNA, nükleoid dışına göç ederek kuyruk oluşumuna yol açmaktadır. Comet testi analizinde mikroskopla eş zamanlı olarak çalışan tam otomatik analiz programları kullanılabildiği gibi, görsel olarak da DNA hasar derecesine göre sınıflandırılıp manuel olarak analiz yapılabilmektedir (Møller ve diğerleri, 2023; Ünal, Saygılı ve Akbaş, 2022: 313, 340; OECD, 2016b).

2.10. Epigenetik Değişiklikler

Epigenetik tarihte ilk olarak 1942 yılında Conrad Waddington tarafından "fenotipi meydana getiren genler ve ürünleri arasındaki nedensel etkileşimleri inceleyen biyoloji dalı" şeklinde tanımlamıştır. Bu tanım daha sonra epigenetiği, çevresel faktörlerle veya yaşam tarzı deneyimlerine cevaben genin diziliminde (DNA dizisinde) değişiklik olmaksızın gen ifadesinde ve işlevinde meydana gelen değişiklikler olarak geliştirilmiştir. Genom yaşam boyunca stabil olmasına karşın epigenom yaşam tarzı ve çevresel faktörlere maruz kalmaya cevaben sürekli değişime uğramaktadır. Epigenetik değişiklikler temelde, doğrudan etkileyen mekanizmalar olan DNA metilasyonu ve histon modifikasyonlarından ve de dolaylı yoldan etkileyen mekanizma olan kodlanmayan RNA'lardan (ncRNA) oluşmaktadır. Bu mekanizmalar epigenetik işaretlerin "yazıcıları" veya "silicileri" olarak bilinen enzimlerin aktiviteleri aracılığıyla gerçekleşmektedir. Epigenetik mekanizmalar tersine çevrilebilir olması nedeniyle bu mekanizmaların bileşenleri potansiyel ilaç kaynakları haline geldiği anlamını taşımaktadır. Zaman içerisinde epigenetik değişikliklerin birikmesi, bireyin

sağlık durumunu olumlu ya da olumsuz olarak etkileyebilmektedir (Bekdash, 2024; Chakrabarti ve Chattopadhyay, 2024; Wang ve diğerleri, 2025; Yu ve diğerleri, 2024).

2.10.1. DNA metilasyonu

Epigenetik mekanizmalar arasında en çok çalışılan ve iyi şekilde bilinen mekanizma olan DNA metilasyonu doğrudan DNA düzeyinde gerçekleşmesiyle birlikte gen susturmada gerekli proteinleri devreye sokarak veya DNA ile transkripsiyon faktörleri arasındaki etkileşimi engellemek suretiyle gen ifadesini düzenlemede rol oynamaktadır (La Torre ve diğerleri, 2023; Nikolac Perkovic ve diğerleri, 2021). Ayrıca DNA metilasyonu X kromozomu inaktivasyonunda, genomik damgalamada, transpozon susturmada, alternatif splicing ve dokuya özgü gen ifadesinin regülasyon süreçlerinde rol oynamaktadır (La Torre ve diğerleri, 2023; Wu ve diğerleri, 2023). DNA metilasyonunda DNA bazlarından biri olan sitozinin 5. karbon konumunda enzimatik olarak metillendiği biyokimyasal bir süreç gerçekleşmektedir. Metil grubu normal şartlarda bir guanini izleyen sitozin üzerine eklenir ve bu bölgelere CpG (sitozin-fosfat-guanin) bölgesi/adası denilir. Sitozinin 5-metilsitozine (5mc) dönüşümü DNA metil transferazlar (DNMT) aracılığıyla katalize edilmektedir (Bhootra ve diğerleri, 2023; Castro-Muñoz ve diğerleri, 2023). DNA metilasyonu sırasında, metil grubu taşıyan S-adenozilmetiyonin (SAM), metil grubunun ($-CH_3$) 5’ sitozin pozisyonuna transfer edilmesini sağlamaktadır (Jan ve diğerleri, 2024; Wu ve diğerleri, 2023).

İnsan genomunda/memelilerde, DNMT1, DNMT2, DNMT3A, DNMT3B ve DNMT3-like (DNMT-3L) olmak üzere DNMT ailesinin toplam beş üyesi tanımlanmıştır. DNMT2 ve DNMT3L diğerlerine göre az bilinmesiyle birlikte diğer üç DNMT ile sekans benzerliğine sahip olmasına rağmen, bu DNMT’ler katalitik aktiviteye sahip değildir (Chen ve Zhang, 2020; Lyko, 2018; Wu ve diğerleri, 2023). Her ne kadar mekanizma belirsizliğini korusa da DNMT3L, diğer DNMT’lerin özellikle de DNMT3A ve RNA metiltransferazlar olarak görev yapan DNMT2’nin aktivitesini modüle etmektedir. Bu bağlamda DNMT1, DNMT3A ve DNMT3B DNA metilasyonu için katalitik aktivite sergilemektedir (Castro-Muñoz ve diğerleri, 2023). DNMT’ler *de novo* DNMT’ler ve bakım DNMT’leri olmak üzere iki guruba ayrılmaktadır. Bakım yapan DNMT olan DNMT1 önceden var olan hemimetillenmiş DNA’yı metilleyen ve DNA replikasyonu esnasında DNA metilasyonunun korunmasını sağlayan bir housekeeping metiltransferazdır. *De novo* metiltransferazlar DNMT3A ve

DNMT3B embriyonik gelişim sırasında, daha önce metillenmemiş bölgelerde yeni bir DNA metilasyonu oluşturmada görev alırlar (Bhootra ve diğerleri, 2023; Zhang ve diğerleri, 2020).

DNA metilasyonu, kanser türlerinde düzensizleşir ve bunun sonucunda CpG adacığı ile ilişkili gen promotörlerinin lokalize hipermetilasyonu ve buna bağlı olarak transkripsiyonel baskılanma meydana gelmektedir (Jan ve diğerleri, 2024; Anwar ve Lehmann, 2014). DNMT1 birçok kanser türünde, örneğin meme kanseri ve akut miyeloid lösemi gibi hastalıklarda aşırı ifade edilmektedir. Bu durum hücresel dönüşümle alakalıdır, oysa DNMT1'in daha düşük ekspresyonu koruyucu bir etki yapmaktadır (Wong, 2021). DNMT3A ve DNMT3B'nin aşırı ekspresyonu, triple negatif meme kanseri ve akut miyeloid lösemi gibi kanser dokularında tespit edilmiştir. Ayrıca, DNMT3A birçok kanserde DNMT'lerin transkripsiyonel aktivitesi ile ilişkilendirilmiştir (Wong ve diğerleri, 2019). DNMT'leri hedef almak, epigenetik değişikliklerin tersine çevrilebilir olması nedeniyle kanser tedavilerinde umut vericidir. Bu amaçla birkaç DNMT inhibitörü örneğin, desitabin (DAC) ve azastidin (AZA), hematolojik malignitenin tedavisinde terapötik etkinliği kanıtlanmış geleneksel DNA hipometilasyon ajanlarıdır (Jan ve diğerleri, 2024; Laranjeira ve diğerleri, 2023).

2.10.2. Histon modifikasyonları

Histonlar birçok şekilde modifiye edilebilmektedir. Bunlar arasında en yaygın olanları, asetilasyon, metilasyon, fosforilasyon ve ubiquitinasyondur. Ek olarak 2019 yılında keşfedilen, histon laktilasyonu son zamanlarda araştırma konusu olan yeni bir modifikasyon türüdür (Nadal ve diğerleri, 2018; Zhang ve diğerleri, 2019). Bu modifikasyonlar aktive (ökromatin) veya deaktive (heterokromatin) kromatinin yapısal oluşumu ile ilişkilidir. Posttranslasyonel modifikasyonların çoğu tersine çevrilebilir olduğundan, proteomun fonksiyonu gen ifadesini tanımlamak için hücre tipine spesifik şekilde düzenlenebilmektedir. Histon H3 ve H4, nükleozom çekirdeğinden çıkıntı yapan, lizin ve arjinince zengin uzun kuyruklara sahiptir ve bu kuyruklar kovalent modifikasyonla değişikliğe uğrar. Histon H2A ve H2B'nin çekirdek bölgeleri de modifikasyona uğramaktadır. Histonların amino terminal bölgesindeki çeşitli modifikasyonlara, genetik kodu çeşitlendirmesi sebebiyle "histon kodu" denilmektedir (Gu ve diğerleri, 2024; Liu ve diğerleri, 2023; Persaud ve Cates, 2023).

Histon asetilasyonu, histon asetil transferaz (HAT) ve deasetilasyon, histon deasetilaz (HDAC) tarafından düzenlenen geri dönüşümlü dinamik bir denge sürecidir. Asetilasyon, histonların amino terminalindeki spesifik lizin rezidülerinde meydana gelmesiyle birlikte, histonların pozitif yükünü nötralize ederek DNA'ya olan afinitelerini azaltır. Histon asetilasyon seviyesi ile aktif kromozomal transkripsiyon arasında pozitif korelasyon bulunmaktadır (An ve diğerleri, 2023; Barnes ve diğerleri, 2019). Asetilasyon, HAT'lar CREB bağlanma proteini, genel kontrol nondepresif 5 (GCN5), polimeraz II enhansır aktivitör 300 (P300) ve P300/CBP ilişkili faktör (PCAF) tarafından katalize edilir. HDAC'lar tarafından asetilasyon tersine çevrilerek transkripsiyon sürecinin baskılanmasıyla sonuçlanan kapalı bir kromatinin varlığını teşvik edilmektedir. Memeli HDAC'ları dört grupta sınıflandırılmaktadır. HDAC 1,2,3 ve 8'i içeren sınıf 1; HDAC 4,5,6,7,9,10'u içeren sınıf 2; sirtuin ailesini içeren (SIRT 1'den SIRT 7'ye kadar) sınıf 3 ve HDAC 11'i içeren sınıf 4'ten oluşmaktadır (Gu ve diğerleri, 2024; La Torre ve diğerleri, 2023).

Kanserde HDAC'ların aşırı ekspresyonu gözlenmektedir. Epigenetik süreçlerin tersine çevrilir mekanizması daha iyi anlaşıldıkça, HDAC aktivasyonunu inhibe eden kanser gelişimini önleyen ilaçların geliştirilmesi sağlanmıştır. Farklı hücresel süreçleri etkileyen ve FDA tarafından onay alan HDAC inhibitörleri vorinostat, belinostat, romidepsin ve panobinostat insan maligniteleri için tedavi seçenekleri olarak sunulmaktadır (Castro-Muñoz ve diğerleri, 2023; Shirbhate ve diğerleri, 2024).

Histon modifikasyonlarından en fazla araştırılan modifikasyon olan asetilasyonun yanı sıra farklı modifikasyonlarda bulunmaktadır. Metilasyon da bunlardan biridir. Histon metiltransferazlar (HMT'ler) ve histon demetilazlar (HDM'ler) tarafından düzenlenen histon metilasyonu, genellikle lizin (K) veya arjinin (R) rezidülerindeki H3 ve H4'ün amino terminalinde meydana gelmektedir. Bazı metilasyonlar transkripsiyonel aktiviteye işaret ederken, bazı metilasyonlar ise transkripsiyonel baskılanmayla/gen susturulmasıyla ilişkilidir. H3 histonunda lizin 4,36,79 (H3K4, H3K36, H3K79) ve arjinin 17 (H3R17) transkripsiyonel aktiviteyle ilişkiliyken H3K9/27 veya H4/K20'deki metilasyonlar transkripsiyonel baskılanmayla/gen susturulmasıyla ilişkilidir (Hatanaka ve diğerleri, 2017; Hayashi-Takanaka ve diğerleri, 2021; Wu ve diğerleri, 2023). Histon metilasyonundaki düzensizlik, birden fazla onkogenin transkripsiyonel aktivasyonuna neden olabilir, bu da kanser hücresi sinyalizasyonunu ve interregülasyonunu teşvik ederek aktif kanser hücresi

proliferasyonu ve malign transformasyonu desteklemektedir (An ve diğerleri, 2023; Song ve diğerleri, 2021).

Histon fosforilasyonunda modifikasyon bölgeleri hidroksil grubu ile serin, treonin ve lizindir. Histon fosforilasyon süreci, histon ve DNA arasındaki afinitenin azalmasına yol açmaktadır. Gevşek kromatin yapısı, transkripsiyon faktörlerinin DNA'ya bağlanması sonucunda gen aktivasyonu ile ilişkilidir (Chakrabarti ve Chattopadhyay, 2024; Liu ve diğerleri, 2023). Örnek olarak H3 üzerindeki serin (ser) 10 ve 28'in ayrıca H2B üzerindeki serin 32'nin fosforilasyonu, epidermal büyüme faktörü'nün (EGF) aracılık ettiği gen transkripsiyonunun aktivasyonu ile ilişkilendirilmiştir (La Torre ve diğerleri, 2023).

Histon ubiquitinasyonu, ubiquitin adlı 76 aminoasitten oluşan bir proteinin kovalent bağlanmasıyla gerçekleşir ve bu süreç ubiquitinasyon enzimleri (ubikitin aktivaörenzim E1, ubikitin bağlayıcı enzim estradiol E2 ve ubikitin-protein ligaz E3) ile deubiquitinasyon enzimleri (DUB'ler) tarafından düzenlenir. Bu durum diğer histon modifikasyonlarından histon ubiquitinasyonunu ayırmaktadır. Histon ubiquitinasyonu, H1, H2A, H2B, H3 ve H4'te gerçekleşir ve bu süreç genotoksik stres, DNA hasar yanıtı ve transkripsiyonel düzenleme ile ilişkilidir (Liu ve diğerleri, 2023; Wu ve diğerleri, 2023).

2.10.3. Kodlamayan RNA'lar (ncRNA'lar)

İnsan genomunun yalnızca %2'lik kısmı proteinlere çevrilebilir, geri kalan kısmı ise farklı boyutlar ve işlevlere sahip kodlanmayan RNA (ncRNA)'lara transkribe edilebilir. DNA metilasyonu ve histon modifikasyonlarına ek olarak ncRNA'lar da epigenetik kontrolde önemli rol oynamaktadır. ncRNA'lar düzenleyici rollerine göre iki kategoriye ayrılabilir; başlıca genel hücresel işlevleri düzenleyen ribozomal RNA (rRNA) ve transfer RNA (tRNA) gibi housekeeping ncRNA'lar ve moleküler ve hücresel süreçler sırasında gen ekspresyonuna aktif olarak aracılık eden düzenleyici RNA'lar. En önemli düzenleyici ncRNA'lar ise miRNA (mikro RNA), siRNA (küçük müdahale eden RNA), piRNA (PIWI ile etkileşen RNA) ve lncRNA'lardır (uzun kodlamayan RNA'lardır) (Castro-Muñoz ve diğerleri, 2023; Chakrabarti ve Chattopadhyay, 2024; Li, 2021). Ayrıca küçük ncRNA'lar (sncRNA'lar, 18~200 nükleotid) miRNA, siRNA ve piRNA, uzun kodlamayan RNA'lar (lncRNA'lar) ve dairesel RNA'lar (circRNA'lar) insan sağlığı ve hastalık gelişiminde önemli role sahiptirler (Wu ve diğerleri, 2023). Her ne kadar ncRNA'ların rolleri iyi

tanımlanmamış olsa da hücresel aktiviteyi düzenlemedeki kilit işlevleri ve kanser araştırmalarında yeni biyobelirteçler ve/veya tedaviler olarak potansiyellerini ortaya koymuşlardır. Belirli bir ncRNA'nın ifadesindeki değişiklikler, diğer ncRNA'ların ifadesini etkileyebilir ve gen ekspresyonu, RNA splaysı, düzenleme, hücre içi taşıma ve translasyon dahil birçok hücresel süreci değiştirebilir (Fabbri ve diğerleri, 2019; Nemeth ve diğerleri, 2024).

siRNA'lar ve miRNA'ların oluşumu çift sarmallı RNA'ları (dsRNA'ları) kesen bir RNaz III enzimi Dicer'a dayanmaktadır. Başlık ve poliadenilatlı bir RNA, hairpin yapısı ile Drosha tarafından kesilerek kodlanmış öncül miRNA'lar (pre-miRNA) oluşturur. miRNA genleri hücre çekirdeğinde RNA polimeraz II tarafından transkribe edilerek birincil miRNA'lar (pri-miRNA'lar) oluşturulur. Pre-miRNA'lar ve dsRNA'lar, RNA kaynaklı susturma kompleksi (RISC) ile birleşir. siRNA veya miRNA dizisi RISC'i hedef mRNA'ya yönlendirir. Hedefine baz eşleşmesiyle bağlandıktan sonra, RISC kompleksinin parçası olan argonaute 2 endonükleazı mRNA'yı keser ve bu da gen susturulmasına yol açar (Castro-Muñoz ve diğerleri, 2023; Paturi ve Deshmukh, 2021). miRNA'lar belirli dokularda ifade edilir ve RISC çoklu protein kompleksine bağlanarak bu mekanizmayı mRNA'lara (haberci RNA'lara) yönlendirmesi sonucu proteinlerin ifadesini baskılarlar. Bu bakımdan miRNA'lar hücrenin proteomunu şekillendirme yetenekleri açısından transkripsiyon faktörlerine benzemektedir (Dayal ve diğerleri, 2024; Gerbatin ve diğerleri, 2022). Dicer'e bağımlı şekilde işlenen dsRNA'ların sınıfı olan siRNA'lar, miRNA'ya benzer şekilde mRNA'nın 3' UTR'sine bağlı RISC oluştururken RNA interferans (RNAi) süreçleri yoluyla transkripsiyon sonrası gen susturulmasına aracılık etmektedir (Holoch ve Moazed, 2015; Li, 2021). Hem siRNA'lar hem de miRNA'lar RNAi adı verilen mRNA degradasyonu yoluyla gen susturulmasını sağlayan posttranslasyonel bir düzenleme mekanizmasıdır (Castro-Muñoz ve diğerleri, 2023; Lam ve diğerleri, 2015).

Protein kodlayan genlere kıyasla farklı konumları nedeniyle, lncRNA'lar beş sınıfta gruplandırılmaktadır; Uzun intergenik kodlamayan RNA'lar (lincRNA'lar), antisens RNA, sense overlapping RNA, sense intronic RNA ve işlenmiş transkript ncRNA. lncRNA'lar sinyal, scaffold, enhansır, kılavuz ve sünger görevi görerek enzimatik aktivitenin regüle edilmesi, kromozom yapısının şekillendirilmesi ve X kromozomu inaktivasyonu gibi önemli süreçlere katılmaktadır. lncRNA'lar DNA metilasyonuna aracılık etmekte ve histonların

modüler iskeleleri olarak hareket etmektedir (Chakrabarti ve Chattopadhyay, 2024; Wu ve diğerleri, 2023).

piRNA'lar piRNA gen dizisinde kodlanan ve gonadal dokularda yüksek oranda ifade edilen miRNA'lara benzer şekilde, germ hattındaki transpozonları düzenlemek için görev alırlar. Pre-piRNA'lar, RNA polimeaz II tarafından transkribe edilir. Yeni transkribe edile RNA çekirdekten çıktıktan sonra Pre-piRNA'lar, germ hattına özgü alt gruptan veya PIWI denilen argonot proteinleriyle etkileşime girerler. Pre-piRNA'lar oositler yoluyla maternal kalıtım ile yavru fenotipini etkileyebilir ve bunun nesiller boyunca birçok hücresel sürece katkıda bulunabileceği düşünülmektedir (Castro-Muñoz ve diğerleri, 2023; Guo ve diğerleri, 2020).

2.11. Real Time PCR (RT-qPCR)

1992 yılında Higuchi ve arkadaşları tarafından geliştirilen gerçek zamanlı PCR (RT-qPCR), yüksek hassasiyeti, hızı, özgüllüğü ve doğruluğu nedeniyle farklı organizma gruplarında fonksiyonel gen transkripsiyonu ve ekspresyon seviyelerinin analizi için yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir (Jiang ve diğerleri, 2023; Zhao ve diğerleri, 2022). RT-qPCR komplementer DNA (cDNA) konsantrasyonu, primerlerin amplifikasyon verimliliği, PCR verimliliği ve RNA izolasyonunun verimliliğiyle saflığı gibi çeşitli faktörlerden etkilenebileceği için referans/kontrol genleri kullanılarak normalize edilmelidir. Özellikle uygun referans/kontrol genin seçimi doğru ve güvenilir sonuçlar için önemlidir. Hücrenin hayatta kalması için elzem olan, farklı koşullarda nispeten sürekli eksprese edilen housekeeping genler, referans/kontrol genleri olarak kullanılırlar (Chen ve diğerleri, 2024; Jiang ve diğerleri, 2023). RT-qPCR çalışmalarında ß aktin (ACTB), gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz (GAPDH) ve bazı ribozomal proteinler yaygın olarak kullanılan, referans/kontrol genleridir (Ahlawat ve diğerleri, 2024). RT-qPCR, floresan boyalar kullanan gen ekspresyonu kuantifikasyonu için oldukça hassas olan bir teknik olmakla beraber, amplifikasyon sırasında salınan floresan sinyali miktarı amplifiye edilen DNA miktarı ile doğru orantılıdır. Taqman, florojenik 5'-3' eksonükleaz aktivitesini kullanan bir yöntem ve DNA'ya bağlanan floresan bir molekül olan SYBR Green boyası olmak üzere iki ana kimyasal kullanılmaktadır (Mohammadiha ve diğerleri, 2017; Teimouri ve diğerleri, 2018). SYBR Green, çift sarmallı DNA'nın spesifik olmayan PCR amplifikasyonunu tamamen engelleyemez. Ancak SYBR Green basit/kolay kullanımı, düşük maliyeti ve diziye özgü prob kullanımına gerek olmaması nedeniyle sıklıkla tercih edilmektedir. Taqman ise

diziye özgü prob kullanarak daha stabil sonuçlar elde edilmesini sağlamakla birlikte aynı anda birden fazla hedefi tespit etme imkânı sunmaktadır (Ding ve diğerleri, 2024). Her döngüde floresans kaydedilir ve ilk tespit edilen sinyalin ortaya çıktığı döngü, 'döngü eşiği' (CT değeri) olarak adlandırılmaktadır. PCR ürünün kantitatif değerlendirilmesi, bir standart eğri kullanılarak belirlenen CT değerinden elde edilmektedir (Chen ve diğerleri, 2022; Ramezani, 2021).

RT-qPCR kullanılarak yapılan relatif gen ekspresyonu kuantifikasyonu için farklı yöntemler bulunmaktadır. Bunlardan en önemlileri; $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ve Pfaffl yöntemleridir. Pfaffl yönteminde, hedef ve kontrol genlerinin amplifikasyon verimliliği farklarını dikkate alarak hedef ve kontrol genleri ayrı ayrı hesaplanmaktadır. Bu bağlamda amplifikasyon verimliliği hedef gen ve kontrol genlerinde farklıysa, hedef gen ifadesini normalize etmek için Pfaffl yöntemi kullanılır. $2^{-\Delta\Delta Ct}$ yönteminde ise hem hedef hem de kontrol genlerinin amplifikasyonları eşit olduğu kabul edilerek hesaplama yapılmaktadır. Bu bağlamda $2^{-\Delta\Delta Ct}$ yönteminde hedef ve kontrol genlerinin amplifikasyonu aynı çalışma grubunda, aynı annealing sıcaklığında ve aynı reaksiyon malzemeleri ile gerçekleştirilmesi nedeniyle verimliliğin eşit kabul edilerek hesaplanmasına dayanan basit ve hızlı gen ekspresyonunun hesaplanmasında kullanılan bir yöntemdir (Jiang ve diğerleri, 2023; Ramezani, 2021).

2.12. EPS'ler ile Gerçekleştirilmiş Genotoksisite, Antigenotoksisite ve Gen Ekspresyon Düzeylerine Etkileri ile İlgili Çalışmalar

EPS'lerin genotoksik, antigenotoksik ve gen ekspresyonu üzerine etkilerinin araştırıldığı çalışma sayısı son derece azdır. Bazı EPS'lerin genotoksisite, antigenotoksisite, gen ekspresyonu ve antikanser özelliklerinin incelendiği çalışmalar Çizelge 2.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.2. EPS'lerin genotoksisite, antigenotoksisite ve antikanser çalışmaları

EPS'nin izole edildiği kaynak	Testler	Doz	Çalışılan organizma	Sonuç	Kaynak
Botryosphaeria rhodina MAMB-05	MN Comet MTT Ames	MTT testinde, 7,5; 15; 30; 60; 100; 150; 200; 300; 450 ve 600 µg/mL MN ve comet testlerinde, 7,5; 30 ve 100 µg/mL Ames testinde, 75; 150; 300; 450 ve 600 µg/mL	MN, Comet ve MTT testlerinde, Çin hamster akciğer fibroblastları (V79) ve *Rattus norvegicus hepatokarsinomu* (HTC) Comet testi, normal ve tümör (jurkat) insan T lenfosit kültürü Ames testinde *Salmonella typhimurium*'un TA98, TA100, TA102, TA97a suşları	Genotoksik, sitotoksik ve mutajenik etki göstermemiştir. Antioksidan ve antimutajenik etki göstermiştir.	(Malini ve diğerleri, 2016) (Kerche-Silva ve diğerleri, 2017)
Aureobasidium pullulans mantarından üretilen EPS Pullulan	MTT MN MN-FISH Comet RAPD-PCR	MTT testinde, 15,6; 31,25; 62,5; 125; 250; 500; 1000; 1500 ve 2000 µg/mL MN ve Comet testlerinde, 250; 500; 1000; 1500 ve 2000 µg/mL MN-FISH testinde, 1000 ve 2000 µg/mL RAPD-PCR'da 1000 ve 2000 µg/mL	MN, MN-FISH, RAPD-PCR ve Comet testlerinde *in vitro* insan lenfositleri MTT testinde, insan meme kanseri (MCF-7) hücre hattı	Genotoksik ve mutajenik etki göstermemiştir. Antigenotoksik ve antimutajenik etki göstermiştir	(Yüzbaşıoğlu ve diğerleri, 2021)
Lactobacillus salivarius'dan izole edilen EPS	KA MN KKD Comet	KA, MN, KKD ve Comet testlerinde 12,5; 25; 50 ve 100 µg/mL	Periferal İnsan lenfositleri	Genotoksik etki/aktivite göstermemiştir. Antigenotoksik, Antimutajenik/desmutajenik aktivite sergilemiştir.	(Yıldız ve diğerleri, 2023)
Kluyveromyces marxianus ve *Pichia kudriavzevii*'den izole edilen EPS'ler	DAPI, Annexin V/PI, MTS ve RT-qPCR	MTS testinde, 5-80 µg/mL. DAPI 40 µg/mL.	Kolon kanseri hücre hatları (SW-480, HT-29, HCT-116) ve normal hücre hattı (KDR/293). Pro-apoptotik genler (BAX, kaspaz-3, kaspaz-8) ve anti-apoptotik gen (Bcl-2) AKT-1, JAK-1 ve mTOR	EPS'ler antikanser etki göstermiştir. Pro-apoptotik genler; BAX, kaspaz-3, ve kaspaz-8 gen ifadelerinde artış meydana gelirken, anti-apoptotik gen Bcl-2 ekspresyonunda azalma meydana gelmiştir. AKT-1, JAK-1 ve mTORgen ekspresyonlarında azalma meydana gelmiştir.	(Saadat ve diğerleri, 2021)
Alcaligenes faecalis'ten izole edilen EPS	MTT DPPH, FRAP	MTT testinde, 31,26-1000 µg/mL İmmünfloresans boyamada, 1000 µg/mL	HepG2, A549, CaSki, HeLa ve C33A hücre hatları	Antioksidan ve antikanser özellik sergilemiştir.	(Aullybux ve diğerleri, 2022)
Weissella cibaria MED17'den izole edilen EPS	MTT Comet, ve *In vitro* yara iyileşme (scratch) testi	MTT testinde 0,125; 0,25; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0 ve 8,0 mg/mL. Comet testi ve *In vitro* yara iyileşme (scratch) testlerinde 15 mg/mL.	HT-29 kolon hücre hattı	Genotoksik etki/aktivite göstermemiştir. Antigenotoksik/iyileştirici ve antikanser etki göstermiştir. Yara iyileşmesi sürecinde etkili olmuştur.	(Kahraman-Ilıkkan ve diğerleri, 2024)

Botryosphaeria rhoodina MAMB-05 mantarından izole edilen Botryosphaera ekzopolisakkatiritiyle (BOT), *Aureobasidium pullulans* mantarından üretilen Pullulan, *Lactobacillus salivarius*, *Kluyveromyces marxianus, Pichia kudriavzevii*, *Alcaligenes faecalis* ve *Weissella cibaria*'dan izole edilen EPS'lerin genotoksik etkilerinin olmadığı antigenotoksik, antimutajenik, desmutajenik, biyoantimutajenik, antikanser ve yara iyileştirici özelliklerinin olduğu gösterilmiştir (Çizelge 2.2).

Bu yüksek lisans tez çalışması probiyotik bir maya olan *Kluyveromyces marxianus* M59 suşundan izole edilen prebiyotik özellikteki EPS_{M59}'un *in vitro* insan periferal lenfositlerinde genotoksik etkisi ve bifonksiyonel alkilleyici ajan mitomisin-C (MMC), monofonksiyonel alkilleyici ajan metil metansülfonat (MMS) ile hidrojen peroksit (H_2O_2) mutajenleri tarafından oluşturulan hasarlara karşı antigenotoksik etkileri ve epigenetik değişiklikler üzerine etkilerinin incelendiği ilk çalışmadır. Bu çalışmada kromozomal anormallikleri (KA), Sitokinez blok mikronükleus (CBMN-Cyt) sitom testi, comet testi ve RT-qPCR analizleri gerçekleştirilmiştir. Ayrıca EPS_{M59}'un karakterizasyonu için SEM-EDX (Taramalı Elektron Mikroskobu-Enerji Dağıtıcı X-ray) analizi ve Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FT-IR) analizi gerçekleştirilmiştir.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

Bu yüksek lisans tez çalışması kapsamında araştırması yapılan EPS'nin izole edildiği maya *Kluyveromyces marxianus* M59 suşu Gazi Üniversite Fen Fakültesi Biyoteknoloji Laboratuvarı Stok Kültür Koleksiyonundan temin edilmiştir. Ekzopolisakkarit (EPS) *K. marxianus* M59 suşundan izole edildikten sonra karakterizasyonu yapılarak *in vitro* periferal insan lenfositlerinde genotoksik, antigenotoksik ve epigenetik değişiklikler üzerine etkileri incelenmiştir. Genotoksik etkinin belirlenmesi için insan lenfositleri EPS_{M59}'un farklı konsantrasyonlarıyla tek başına muamele edilmiştir. Antigenotoksik etkilerinin belirlenmesinde ise EPS_{M59}'un mitomisin-C, metil metansülfonat ve hidrojen peroksit mutajenleri ile eş zamanlı muameleleri sonucu hasara karşı koruyucu/iyileştirici etkisi incelenmiştir. Bu amaçlarla periferik kan örnekleri bir erkek ve bir kadın olmak üzere toplam iki donörden elde edilmiştir. Çalışmaya dahil edilecek donörlerde aranılan kriterler;

a) Sigara, elektronik sigara ve tütün ürünleri kullanmıyor olmak
b) Herhangi bir kronik rahatsızlığı bulunmaması
c) Son 6 aylık zaman zarfında herhangi düzenli ilaç kullanımının olmaması
d) 18-27 yaş aralığında olmak

Bu yüksek lisans tez çalışması Gazi Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 27.11.2023 tarih ve 906 sayılı kararıyla gerçekleştirilmiştir.

3.1.1. Test materyalleri

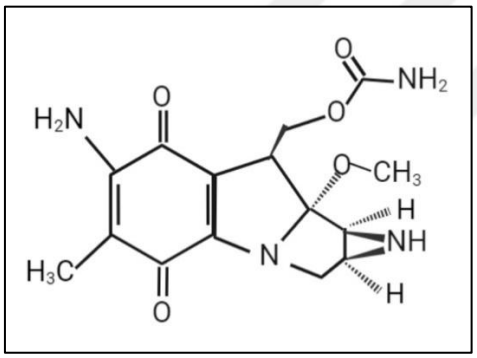
Kluyveromyces marxianus M59 suşundan elde edilen ekzopolisakkarit (EPS_{M59})

K. marxianus M59 suşundan izole edilen EPS (EPS_{M59})'nin liyofilizasyon işlemi ve suda çözünür hale gelmesi için karboksimetilasyon yöntemi uygulandıktan sonra viyale aktarılmıştır.

EPS_{M59} daha önceden otoklavlanmış distile suda 640 µg/mL ilk konsantrasyon olarak hazırlanmış suda çözdürüldükten sonra 40,00; 80,00; 160,00 ve 320,00 µg/mL'lik konsantrasyonlara dilüe edilmiştir.

Mitomisin-C (MMC)

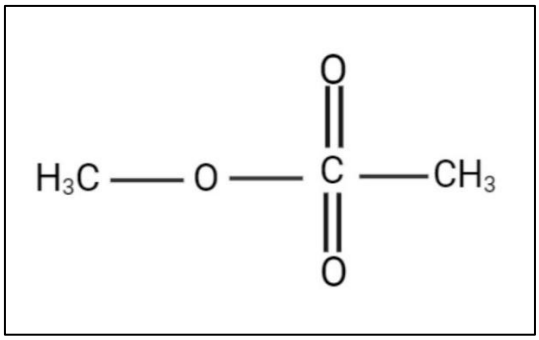
- Molekül formülü: $C_{15}H_{18}N_4O_5$
- CAS NO: 50-07-7
- Molekül ağırlığı: 334,33 g/mol
- Diğer adlandırmalar: 6-amino-4,7-diokso-8-metoksi-5-metil-1,1,2,8,8,8-hekzahidroazirin [2,3] pirolo [1,2] indol-8-metilkarbamat
- Kullanım/Etki: Alkilleyici ve kemoterapi ilacı, göz ameliyatları, anti-fibrotik ilaç
- İzole edilen kaynak: Gram-pozitif aktinobakteri *Streptomyces caespitosus*
- Saflık: %98



Şekil 3.1. Mitomisin-C yapısal formülü (Şekil BioRender kullanılarak oluşturulmuştur).

Metil metansülfonat (MMS)

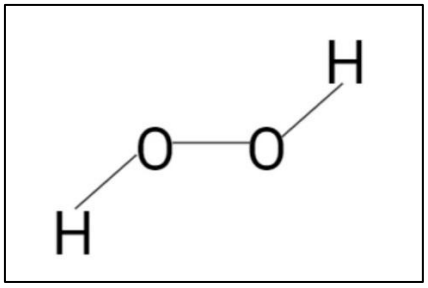
- Molekül formülü: $C_2H_6O_3S$
- CAS NO:66-27-3
- Molekül ağırlığı: 110,13 g/mol
- Diğer adlandırmalar: Metil mesilat, Metansülfonik asit metil ester
- Kullanım/Etki: Alkilleyici kemoterapötik ajan
- Saflık: %99



Şekil 3.2. Metil metansüfonat yapısal formülü (Şekil BioRender kullanılarak oluşturulmuştur).

Hidrojen peroksit (H_2O_2)

- Molekül formülü: H_2O_2
- CAS NO: 7722-84-1
- Moleküler ağırlık: 34,015 g/mol
- Diğer adlandırmalar: oxydol, perhydrol, ınterox
- Kullanım/Etki: Kozmetik, ilaç, antimikrobiyal ajan, dişçilik alanı, zirai kimyasal, oksitleyici ajan, DNA hasarı.
- Saflık: %35



Şekil 3.3. Hidrojen peroksit'in (H_2O_2) yapısal formülü (Şekil BioRender kullanılarak oluşturulmuştur).

3.2. Metot

Tez çalışması kapsamında *K. marxianus* M59 suşundan EPS izole edildikten sonra genotoksisite ve antigenotoksisite üzerine etkilerini değerlendirmek amacıyla üç farklı genotoksisite testi ile çalışma yapılmıştır. Çalışma yapılan testler sırasıyla Kromozomal Anormallik, Sitokinez Blok Mikronükleus Sitom ve comet testi'dir. Ayrıca EPS_{M59}'un

epigenetik değişiklikler üzerine etkilerinin değerlendirilmesi amacıyla RT-qPCR yöntemi kullanılmıştır.

3.2.1. Kluyveromyces marxianus'dan EPS izolasyonu

Bu tez çalışmasında *K. marxianus* M59 suşundan EPS izole/elde edilmesi Prof. Dr. Zehranur Yüksekdağ gözetimde gerçekleştirilmiştir. Aşağıdaki yöntem uygulanmıştır.

- *K. marxianus* M59 suşu 5 mL YPD broth besiyerine (20 g D-Glikoz; 10 g Maya Ekstratı; 20 g Pepton, pH 6,5) %2'lik ekim yapılarak 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir.
- Aktif kültürden %2 oranında 800 mL'lik YDP sıvı besiyerine ekim yapılarak aynı sıcaklık ve sürede inkübasyona bırakılmıştır.
- Örnek 80°C'de 10 dk sıcak su banyosundan sonra oda sıcaklığında soğumaya bırakılmıştır. Ardından %4 Trikloroasetik asit (TCA, Merck) eklenerek manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. TCA çözündükten sonra örnekler 4000 rpm'de 25 dk santrifüj (SIGMA Model 2-16KC) edilerek süpernatant toplanmıştır. Süpernatanta 1:2 oranında %96'lık alkol eklenmiş ve + 4°C'de 1 gece bekletilmiştir.
- 4000 rpm'de 25 dk santrifüjlendikten sonra süpernatant atılarak kalan alkol uçurulmuştur. Elde edile pellet 2 mL distile su kullanılarak çözülmüş ve viyallere dağıtılarak -80°C'de 1 gece bekletilmiştir. Christ alpha 2-4 LDplus (Resim 3.1) cihazında liyofilize edilmiştir (Resim 3.2) (Kanmani ve diğerleri, 2011; Shi ve diğerleri, 2014; Yi ve diğerleri, 2008).



Resim 3.1. Liyafilizatör cihazı



Resim 3.2. EPS'lerin liyofilizasyon sonrası görüntüsü

3.2.2. EPS_{M59}'un karboksimetilasyonu

EPS_{M59}'u suda çözünür hale getirmek için kimyasal bir modifikasyon yöntemi olan karboksimetilasyon uygulanmıştır. EPS_{M59}'un 90 mg 5,4 mL 2-propanol (Sigma) eklenerek 15-30 dakika boyunca karıştırıcıda karıştırılmıştır. Karıştırma işlemi devam ederken 10 mL %30'luk NaOH (Merck) çözeltisi yavaş yavaş eklenmiş ve 50°C de 30 dakika karıştırılmıştır. 3 mL distile suda çözülen 1,1 g monokloroasetik asit (MCA) (Carlo Erba) karışıma eklenerek 8 saat 50°C'de bekletilmiştir. Oda sıcaklığında soğutulan karışımın pH'ı

7 olana kadar 0,5 M HCI (Merck) çözeltisi ilave edilmiştir. Daha sonra 1:1 oranında %96'lık alkol (Teksol) ile nötralize edilerek 0,45 µm çaplı filtre ile filtrelenmiştir. Karışımdan alkol evaporatör ile uzaklaştırılmıştır. Son olarak örnek distile suda çözdürülerek liyofilize edilmiştir (Kagimura ve diğerleri, 2015; Wang ve diğerleri, 2012).

3.2.3. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopi (FT-IR) Analizi

EPS_{M59} ve karboksimetillenmiş EPS_{M59}'un ($CMEPS_{M59}$'un) FT-IR (Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopi) ile yapılarındaki temel işlevsel grupların belirlenmesi amacıyla Perkin Elmer Spectrum 100 FT-IR spektroskopisinde ATR örnekleme probu kullanılarak 400 cm^{-1}- 4000 cm^{-1} frekans aralığında tarama Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü'nde çekilmiştir. Bu analiz ilk kez bu tez çalışması kapsamında yapılmıştır.

3.2.4. Taramalı Elektron Mikroskop (SEM) Analizi

EPS_{M59}'un yüzey morfolojilerinin yüksek çözünürlükte görüntülenmesi amacıyla SEM analizi yapılmıştır. 5 mg EPS_{M59} kaplama cihazıyla (Cressington sputter coated 108 Auto, TED PELLA, INC.) 10 nm kalınlığında Au/Pd tabakası ile kaplanmıştır. EPS_{M59} FEI Quanta FEG 250 SEM'de 5 kV'de incelenmiş olup, farklı büyütmelerde (100X, 500X, 1000X, 2500X, 5000X, 10.000X) görüntüleri çekilmiştir. Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Merkez Laboratuvarında hizmet alımı şeklinde yapılmıştır. EPS_{M59}'un yüzeyi vakum altında altın ile kaplanmış ve elementel içeriği SEM-EDX (Taramalı Elektron Mikroskobu-Enerji Dağıtıcı X-ray) ile incelenmiştir (FEI-Quanta FEG 250). Bu analiz ilk kez bu tez çalışması kapsamında gerçekleştirilmiştir.

3.2.5. EPS_{M59}'un çalışılmalarda kullanılacak konsantrasyonlarının tespit edilmesi

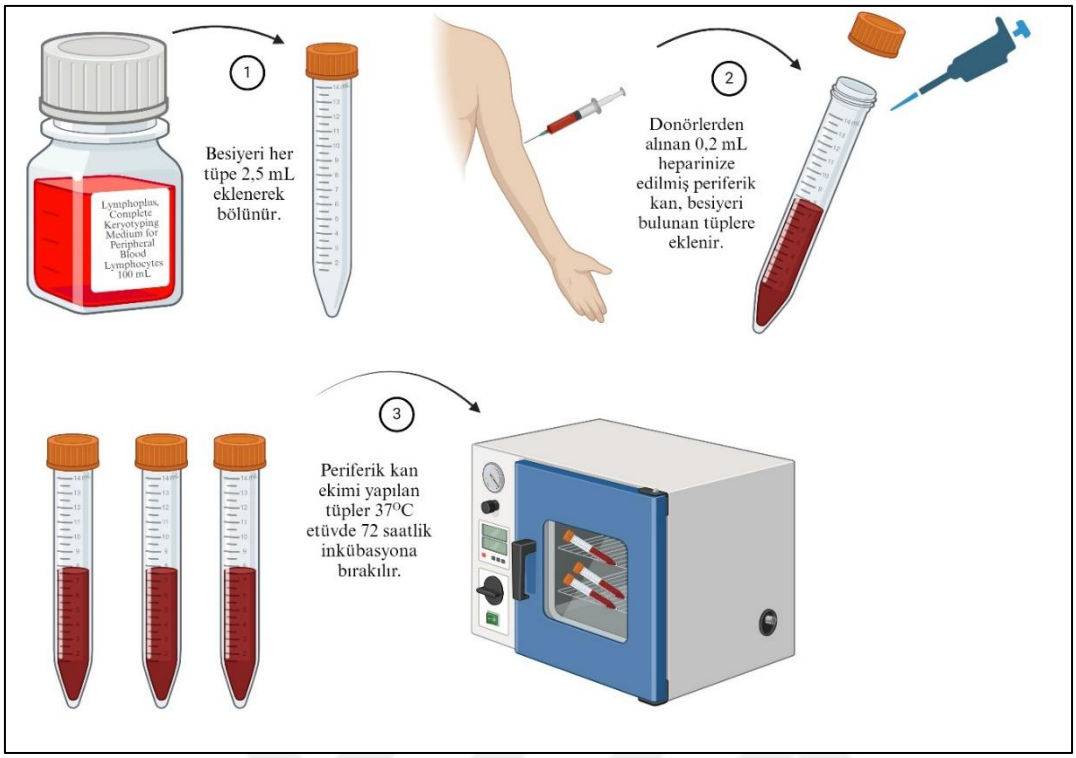
Tez çalışması kapsamında çalışılacak konsantrasyonları belirlemek için kültüre edilen periferal insan lenfositlerinde 2,50; 5,00; 10,00; 20,00; 40,00; 80,00; 160,00; 320,00 ve 640,00 µg/mL konsantrasyonlarında ön deneme çalışmaları gerçekleştirilmiştir. 48 saatlik muamele sonucu ortaya çıkan mitotik indeks (Mİ) sonuçlarına göre 40,00; 80,00; 160,00; 320,00 ve 640,00 µg/mL konsantrasyonlarında hücre proliferasyonu diğer konsantrasyonlara kıyasla daha yüksek olmasından dolayı çalışmada kullanılacak konsantrasyonlar olarak kararlaştırılmıştır.

3.2.6. Kültüre edilmiş periferal insan lenfositlerinde kromozomal anormallik testi

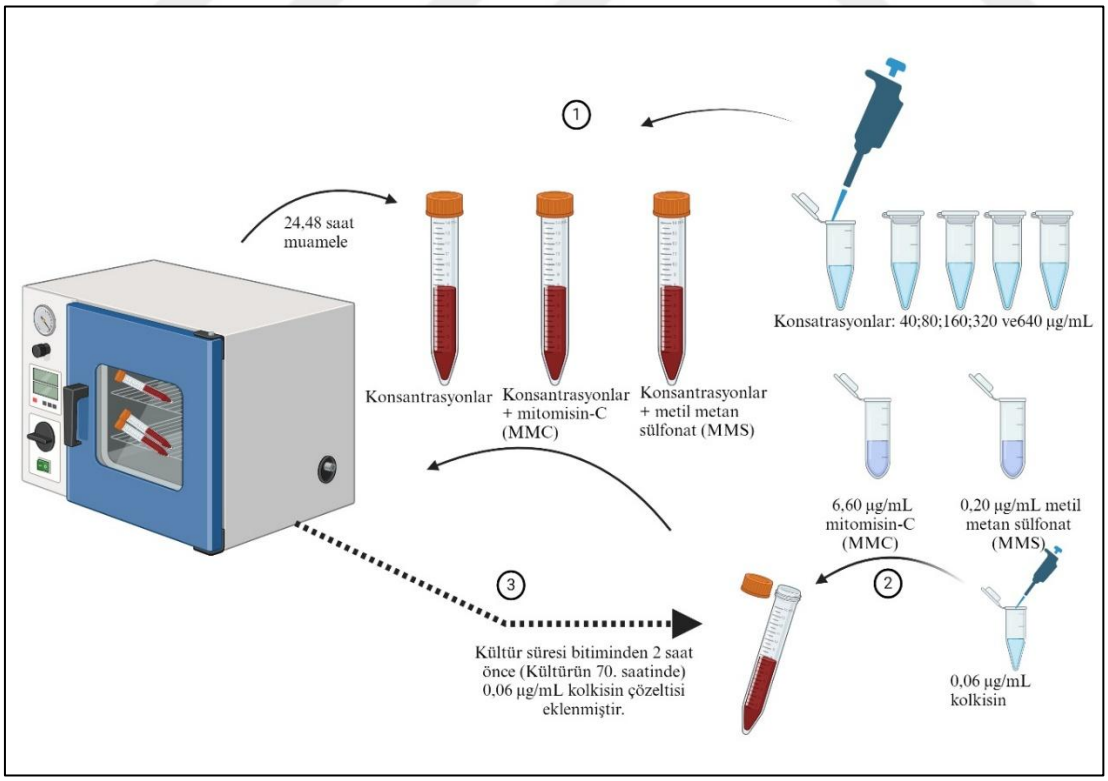
Periferal insan lenfositlerinde kromozomal anormallik testi (Evans, 1984: 405-424) yöntemine göre bazı modifikasyonlarla (Yüzbaşıoğlu ve diğerleri, 2023; İla ve Hüsunet, 2022: 153, 184) gerçekleştirilmiştir.

Tez çalışması kapasımda *Kluyveromyces marxianus* M59 suşundan izole edilen ekzopolisakkaritin (EPS_{M59}) periferal insan lenfositlerinde genotoksik ve antigenotoksik etkilerinin incelenmesi amacıyla 3 farklı deney grubu oluşturulmuştur. Birinci deney grubunda EPS_{M59}'un genotoksik etkilerinin değerlendirilmesi amacıyla beş farklı konsantrasyonu (40,00; 80,00; 160,00; 320,00 ve 640,00) tek başına uygulanmıştır. İkinci deney grubunda EPS_{M59}'un belirtilen beş farklı konsantrasyonuyla 0,20 µg/mL mitomisin-C ile, üçüncü deney grubunda ise 6,60 µg/mL metil metansüfonat ile eş zamanlı muamele yapılmıştır. Deney gruplarına ek olarak uygulama gruplarına negatif kontrol (distile su) ve pozitif kontrol (0,20 µg/mL MMC veya 6,60 µg/mL MMS) grupları eklenmiştir. Kromozomal Anormallik testi kapsamında deney gruplarına 24 ve 48 saatlik muamele yapılmıştır.

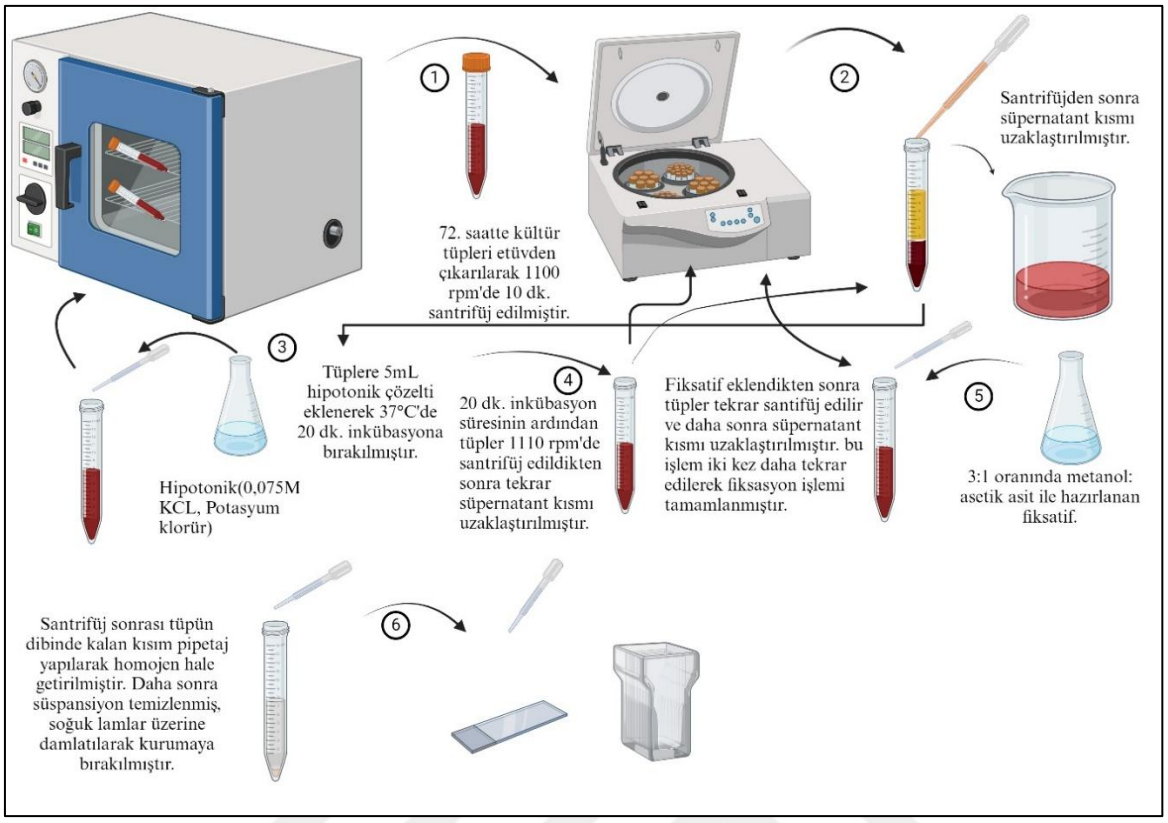
Kültürün başlangıç ve inkübasyon süreci Şekil 3.4'teki gibi gerçekleştirilmiştir. Kültür süresinde yapılan muameleler ve kültürün sonlandırma işlemleri Şekil 3.5 ve Şekil 3.6'da gösterilmiştir.



Şekil 3.4. Kültürün başlangıç ve inkübasyon süreci (BioRender aracılığıyla oluşturulmuştur).



Şekil 3.5. Kültür süresinde gerçekleştirilen muameleler (BioRender kullanılarak oluşturulmuştur).



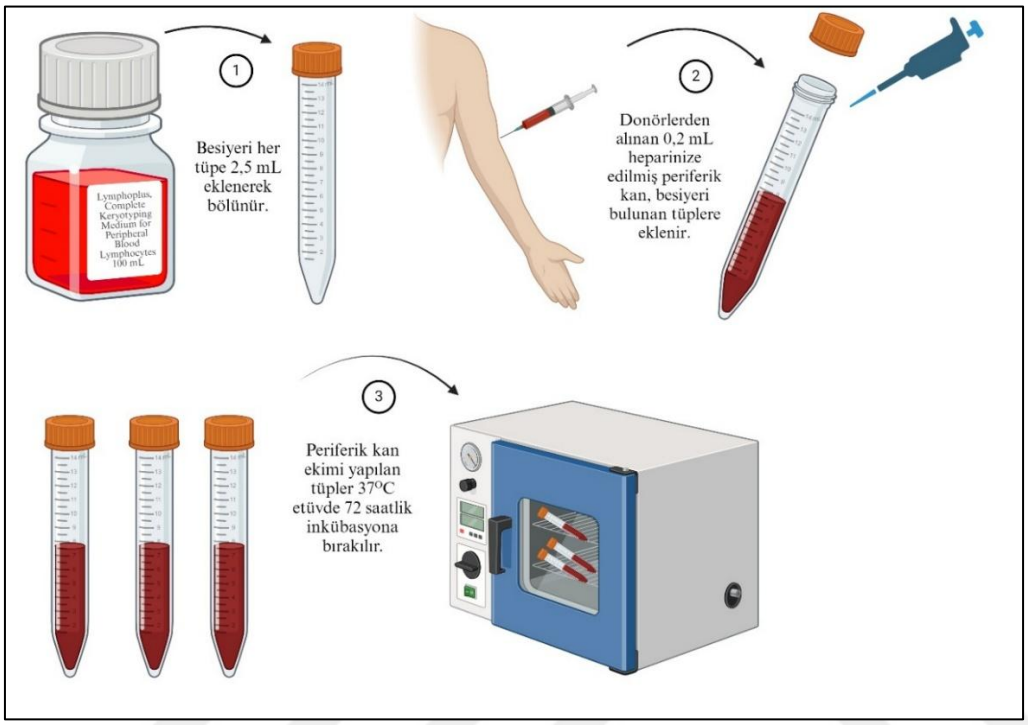
Şekil 3.6. Kültürün sonlandırma işlemleri (BioRender kullanılarak oluşturulmuştur).

3.2.7. Kültüre edilmiş periferal insan lenfositlerinde sitokinez blok mikronükleus sitom testi

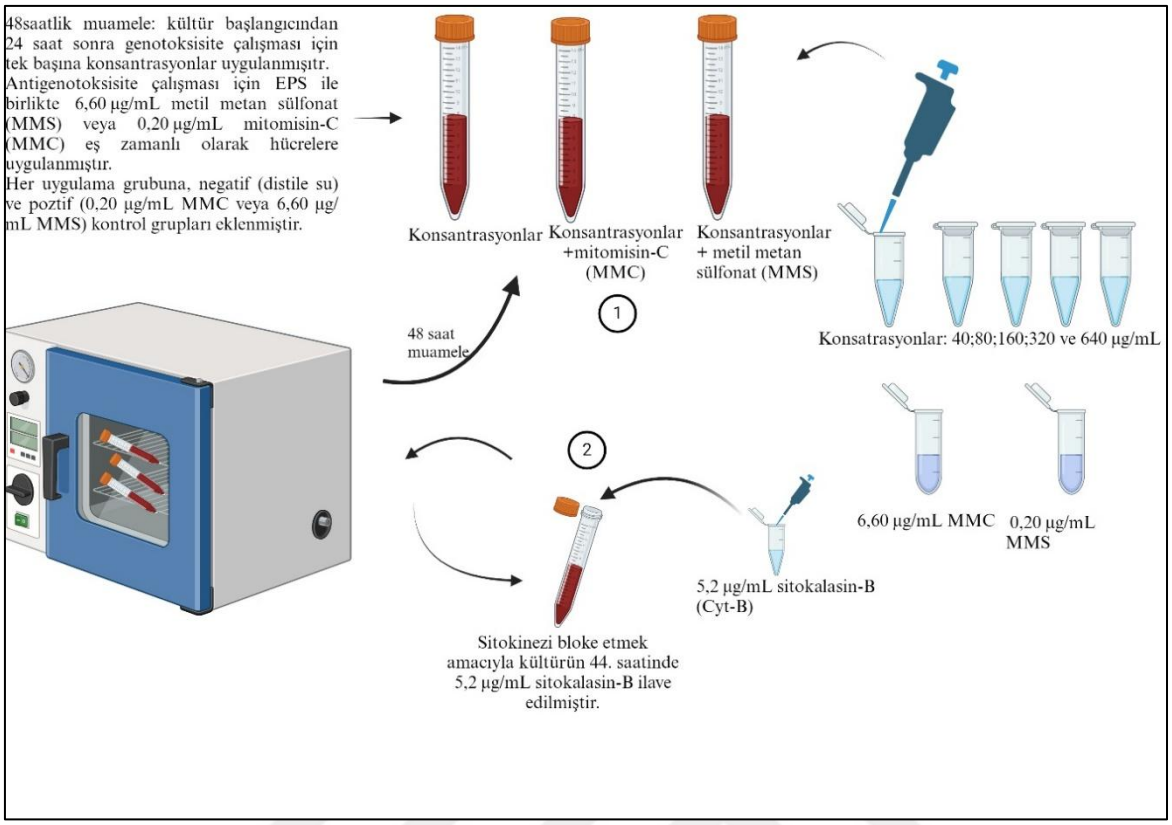
Sitokinez blok mikronükleus sitom testi uygulaması Fenech (2007)'in metodunda bazı modifikasyonlarla (Avuloğlu Yılmaz ve diğerleri, 2023; Yüzbaşıoğlu ve diğerleri, 2023; Yüzbaşıoğlu ve Avuloğlu-Yılmaz, 2022: 219, 249) gerçekleştirilmiştir.

Tez çalışması kapasımda *Kluyveromyces marxianus* M59 suşundan izole edilen ekzopolisakkaritin (EPS_{M59}) periferal insan lenfositlerinde genotoksik ve antigenotoksik etkilerinin incelenmesi amacıyla KA testinde açıklanan 3 farklı deney grubu oluşturulmuştur. Deney gruplarına ek olarak uygulama gruplarına negatif kontrol (distile su) ve pozitif kontrol (0,20 µg/mL MMC veya 6,60 µg/mL MMS) grupları eklenmiştir. Sitokinez blok mikronükleus sitom testi (CBMN-Cyt) kapsamında deney gruplarına 48 saatlik muamele yapılmıştır.

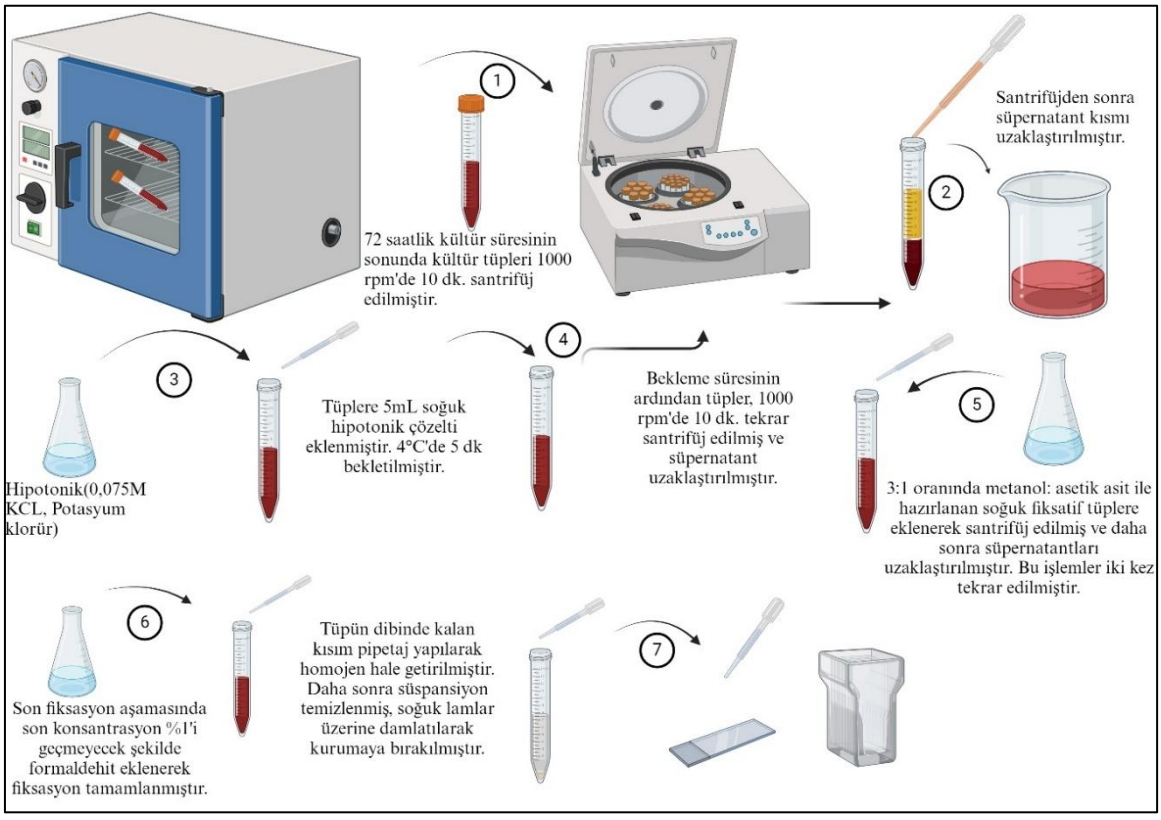
Kültürün başlangıç ve inkübasyon süreci Şekil 3.7'deki gibi gerçekleştirilmiştir. Kültür süresinde yapılan muameleler ve kültürün sonlandırma işlemleri Şekil 3.8 ve Şekil 3.9'da gösterilmiştir.



Şekil 3.7. Kültürün başlangıç ve inkübasyon süreci (BioRender tarafından oluşturulmuştur).



Şekil 3.8. Kültür süresinde yapılan muameleler (BioRender kullanılarak oluşturulmuştur).



Şekil 3.9. Kültürün sonlandırma işlemleri (Biorender kullanılarak oluşturulmuştur).

3.2.8. Preparatların boyanması

Kromozomal anormallik ve Sitokinez blok mikronükleus sitom testi testleri için yayımları yapılan ve kuruma süreleri tamamlanmış preparatlar %5'lik Giemsa boyası ile (pH=6,8) 5-10 dakika (preparatların boyanması süresi muamele grubu ve donörlere göre farklılık göstermektedir) boyanmıştır. Distile/saf suda yıkama işlemi yapılan preparatlar oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Preparatlar kuruduktan sonra mikroskobik inceleme yapılabilmesi amacıyla entellan ile daimî hale getirilmiştir.

3.2.9. Mikroskobik inceleme ve sonuçların değerlendirilmesi

Kromozomal anormallikler ve mitotik indeksin belirlenmesi

Kromozomal anormalliklerin belirlenmesi amacıyla kontrol grupları ve her muamele grubundan kromozom dağılımları iyi olacak şekilde seçilen preparatlardan her bir donörden (bir erkek ve bir kadın donörün her birisinden) 100 metafaz olmak üzere toplamda 200 metafaz değerlendirilmiştir. Muamele ve kontrol grupları için toplam hücre sayısı içindeki anormal hücre yüzdesi (% anormal hücre) ve hücre başına düşen kromozom anormalliği (KA/hücre) sayısı tespit edilmiştir. Mitotik indeksin (Mİ) belirlenmesi amacıyla her muamele ve kontrol gruplarına ait preparatlardan her donörden 1000'er hücre, bir erkek ve bir kadın donörden toplamda 2000 metafaz hücreleri değerlendirilmiştir. Mitotik indeksin belirlenmesinde bölünen hücre sayısı toplam hücre sayısına oranlarak yüzdesi belirlenmiştir.

Mikronükleus (MN), nükleer tomurcuk (NT), nükleoplazmik köprü (NPK) frekansları ve nükleer bölünme indeksinin saptanması (NBI)

Mikronükleus, nükleer tomurcuk, nükleoplazmik köprü frekansları, binükleat hücrelerin incelenmesiyle değerlendirilmiştir. Binükleat hücreler, çekirdek bölünmesini tamamlayan ancak inkübasyonun 44. saatinde eklenen Sitokalasin-B ile sitoplazmik bölünmesi engellenmiş hücrelerdir. Binükleat hücreler genotoksisitesi belirlenecek maddenin ilavesinden sonra bölünmektedir. Sonuç olarak binükleat hücrelerde gözlenecek anormallikler çalışılan madde tarafından meydana geldiği tespit edilecektir.

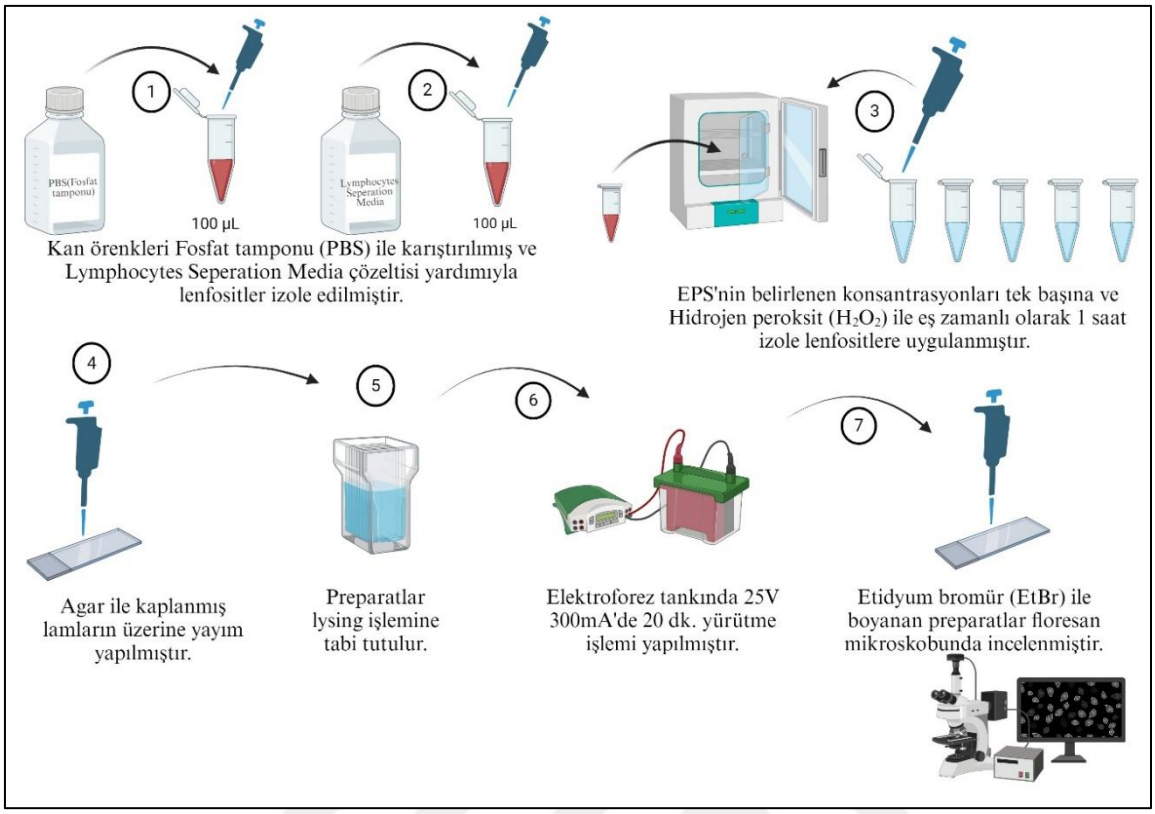
MN frekansının belirlenmesi için muamele grubuna ait her donörden 1000 tane binükleat, bir erkek ve bir kadın donörden toplam 2000 tane binükleat hücre içindeki 1, 2 ve 3

mikronükleuslu olmak üzere incelenmiştir. Hücre başına düşen mikronükleus sayısı [1X(1MN)+2X(2MN)+3X(3MN+4MN)]/N (N incelenen toplam hücre sayısı) formülü kullanılarak hesaplanmıştır. Ayrıca NT ve NPK içeren binükleat hücre yüzdeleri hesaplanmıştır. Nükleer bölünme indeksi (NBI) için her muamele grubundan, her bir donörden 500 hücre olmak üzere bir erkek ve bir kadın donörden toplamda 1000 hücre değerlendirilmiştir. Nükleer bölünme indeksi sayımı yapılırken hücreler 1 çekirdekli (1N), 2 çekirdekli (2N), 3 çekirdekli (3N) ve 4 çekirdekli (4N) şeklinde sayılmış ve [1X(1N)+2X(2N)+3X(3N+4N)]/n (n incelenen toplam hücre sayısı) formülüyle hesaplanmıştır.

3.2.10. Comet testi

Tez çalışması kapsamında *Kluyveromyces marxianus* M59 suşundan izole edilen ekzopolisakkarit (EPS_{M59}) izole insan lenfositlerine uygulanmıştır. Periferal insan lenfositlerinde DNA hasarı oluşturup oluşturmadığı ve mutajen hidrojen peroksit (H_2O_2) tarafından meydana gelen DNA hasarına karşı koruyucu/iyileştirici etkisi olup olmadığı comet testi ile araştırılmıştır.

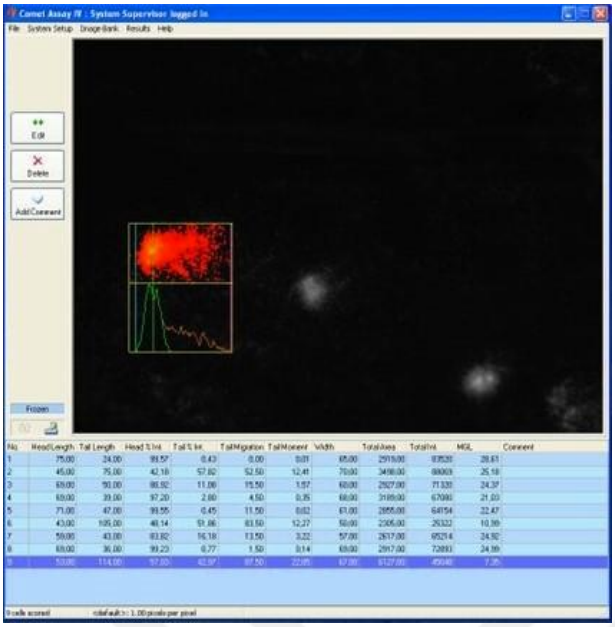
Comet testi veya tek hücreli jel elektroforezi tekniği Singh ve diğerlerinin (1988) metoduna göre bazı modifikasyonlarla (Yüzbaşıoğlu ve diğerleri, 2023; Akbaş ve diğerleri, 2022; Ünal, Saygılı ve Akbaş, 2022: 313, 340) gerçekleştirilmiştir. İzole lenfositlere EPS_{M59}'un beş farklı konsantrasyonu hem tek başına (40,00; 80,00; 160,00; 320,00 ve 640,00) hem de H_2O_2 (100 µM) ile eş zamanlı olarak 37°C'de, 1 saat muamele edilmiştir. Uygulamalarda bir negatif kontrol (distile su) ve bir de pozitif kontrol (100 µM H_2O_2) bulundurulmuştur. Comet testindeki tüm uygulamalar Şekil 3.10'da gösterilmiştir.



Şekil 3.10. Comet testindeki uygulamaları (BioRender kullanılarak oluşturulmuştur)

Comet test sonuçlarının değerlendirilmesi

Comet testinin değerlendirilmesinde her muamele grubunda bir donör için en az 100 hücre, bir erkek ve bir kadın olmak üzere iki donörden toplamda 200 hücre incelenmiştir. İnceleme floresan mikroskopta (Olympus BX51) "Comet Assay IV", Perceptive Instruments Ltd., analiz sistemi kullanılarak (Resim 3.3) gerçekleştirilmiştir. DNA hasar dereceleri kuyruk uzunluğu (µm), % kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momenti cinsinden değerlendirilmiştir.



Şekil 3.11. Comet analiz programı

3.2.11. İstatistiksel analizler

Tez çalışması kapsamında kromozom anormallikleri ve sitokinez blok mikronükleus sitom testlerinde elde edilen veriler bu testlere özgü hazırlanan veri takip çizelgeleri kullanılarak kayıt altına alınmıştır. Comet testine ait veriler ise "Comet Assay IV" (Perceptive Instruments Ltd., UK) programı ile kayıt altına alınmıştır.

Elde edilen sonuçlar, bazı istatistiksel yöntemlerle değerlendirilmiş ve muamele grupları ile kontrol grupları kıyaslanmıştır.

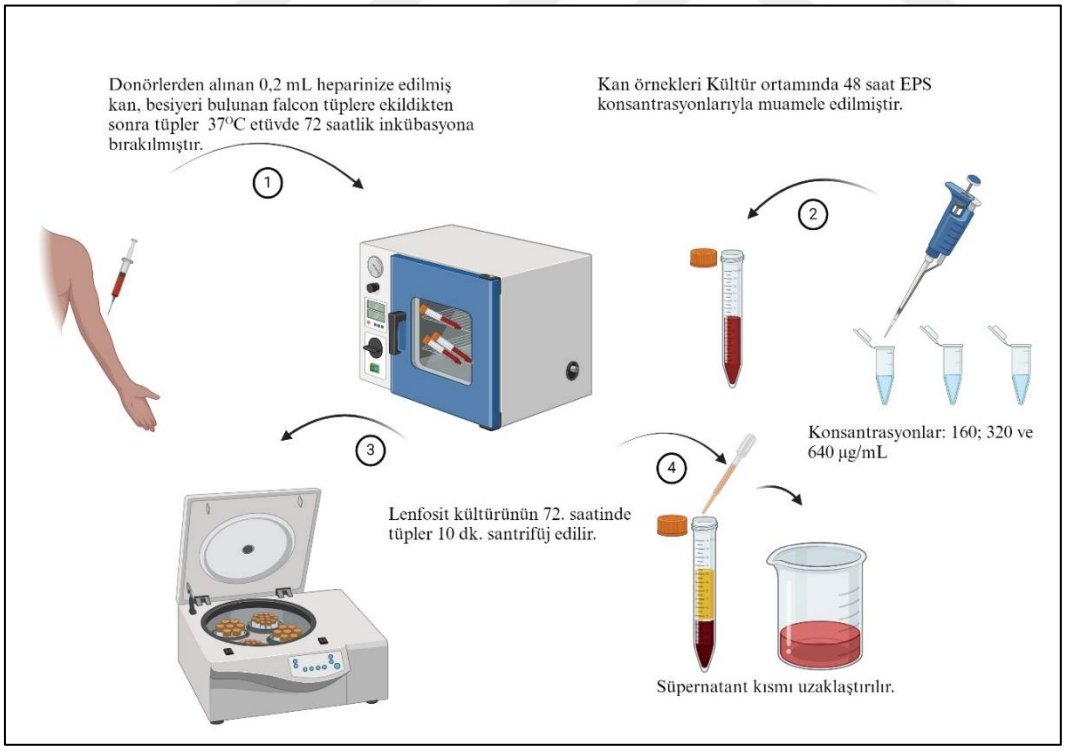
- Kromozomal anormallik testinde; hücre başına düşen kromozom anormalliği ile (KA/hücre) toplam hücre sayısı içindeki anormal hücrelerin yüzdesi (% anormal hücre) sonuçları z testi ile değerlendirilmiştir.
- Mitotik indeks z testi ile değerlendirilmiştir.
- Sitokinez blok mikronükleus sitom testi testinde; hücre başına düşen MN sayısı (MN/hücre), nükleer tomurcuk (NT), nükleoplazmik köprü frekansları (NPK) ve nükleer bölünme indeksi (NBİ) z testi ile değerlendirilmiştir.
- Comet testinde; kuyruk uzunluğu (µm), kuyruk momenti ve kuyruk yoğunluğu (%) parametreleri t testi ile değerlendirilmiştir.

Kontrole göre anlamlı değer veren muamele grupları için konsantrasyon-etki ilişkini ortaya çıkarmak amacıyla SPSS 22.0 programıyla regresyon analizi yapılmıştır.

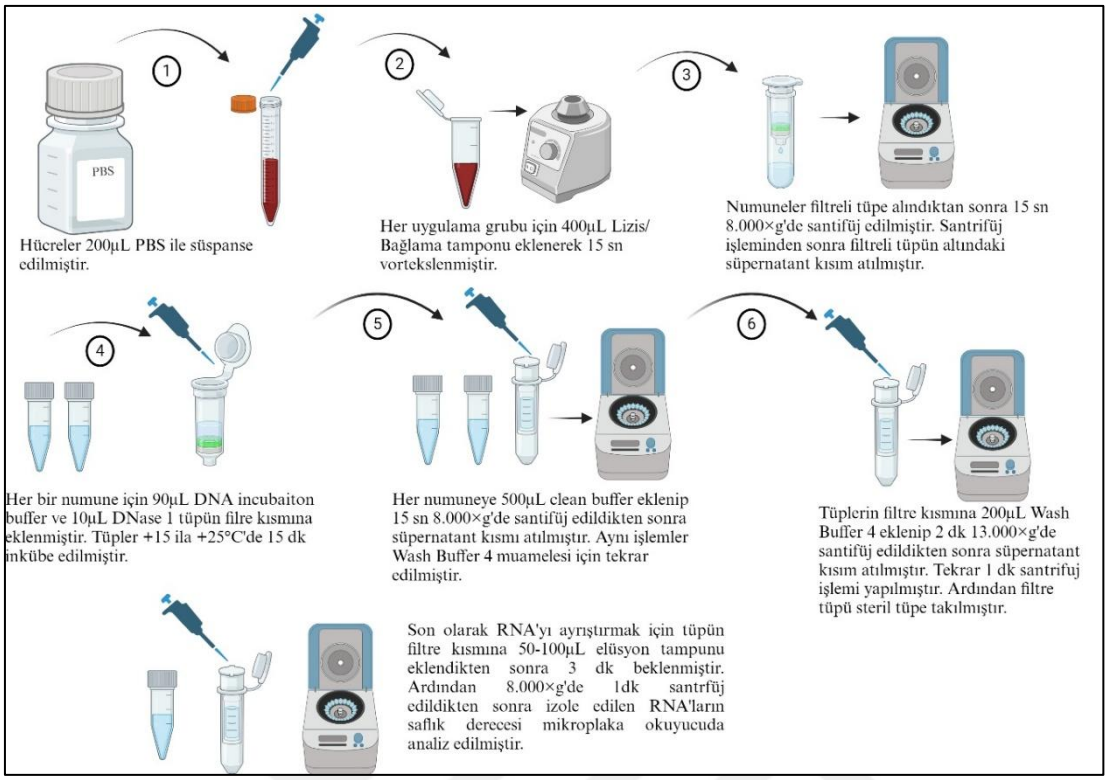
3.2.12. Real-Time PCR (RT-qPCR) testi

Kültür başlangıcı ve RNA izolasyonu

RT-qPCR testi için kromozomal anormallik, Sitokinez blok mikronükleus sitom testi ve mitotik indeks sonuçları değerlendirildikten sonra en etkin üç konsantrasyon (160,00; 320,00 ve 640,00 µg/mL) seçilip çalışılmıştır. Donörlerden alınan kan örneklerine 48 saat boyunca EPS_{M59}'un 160,00; 320,00 ve 640,00 µg/mL konsantrasyonları uygulandıktan sonra RNA izolasyonu üretici firmanın talimatları (Trans Easypure RNA kit) doğrultusunda bazı modifikasyonlarla gerçekleştirilmiştir. RT-qPCR testi için kültür ve inkübasyon aşamaları Şekil 3.12'de anlatılmıştır. Daha sonra RNA izolasyon aşamaları Şekil 3.13'de anlatıldığı gibi yapılmıştır.



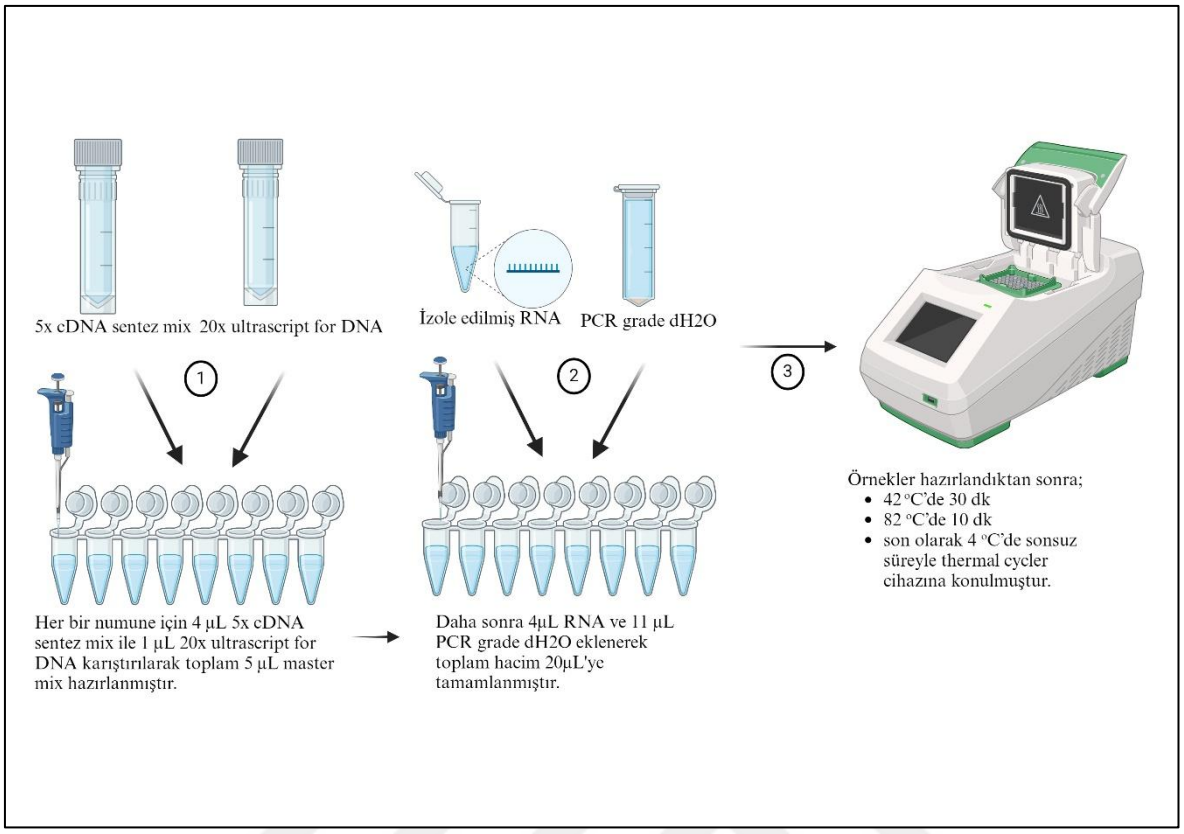
Şekil 3.12. RT-qPCR testi için kültür ve inkübasyon aşamaları (Şekil BioRender kullanılarak oluşturulmuştur).



Şekil 3.13. RNA izolasyonu (BioRender kullanılarak oluşturulmuştur).

cDNA sentezi

Elde edilen RNA örneklerinden üretici firma talimatları doğrultusunda (PCR BIOSYSTEMS Ultrascript cDNA Synthesis Kit) cDNA sentezi Şekil 3.13'te açıklandığı gibi yapılmıştır.



Şekil 3.14. cDNA sentezi (BioRender kullanılarak oluşturulmuştur)

RT-qPCR analizi

Sentez sonucu elde edilen cDNA; qPCRBIO SyGreen Blue Mix Seperate-ROX kiti ve primerler DNA Metiltransferaz-1, DNA Metiltransferaz-3A, DNA Metiltransferaz-3B, Histon deasetilaz-1 (DNMT1, DNMAT3A, DNMT3B ve HDAC1) (Çizelge 3.1) kullanılarak RT-qPCR işlemine tabi tutulmuştur. Kontrol grubu olarak housekeeping gen gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz (GAPDH) kullanılmıştır. RT-qPCR testi sonucunda hedef genlerin mRNA düzeyindeki ekspresyon seviyeleri hesaplanmıştır.

Çizelge 3.1. RT-qPCR testinde kullanılan primerler ve primerlere özgü sekanslar

Primer	Sekans		
	İleri	Geri	Kaynak
GAPDH	5′CGACCACTTTGTCAAGCTCA3′	5′AGGGGTCTACATGGCAACTG3′	(Jiang ve diğerleri, 2016)
DNMT1	5'TACCTGGACGACCCTGACCTC3'	5′CGTTGCATCAAAGATGGACA3′	(Wu ve diğerleri, 2022)
DNMT3A	5′TATTGATGAGCGCACAAGAGAGC3′	5′GGGTGTTCCAGGGTAACATTGAG3′	(Chen ve diğerleri, 2023)
DNMT3B	5′GGCAAGTTCTCCGAGGTCTCTG3′	5′TGGTACATGGCTTTTCGATAGGA3′	(Peng ve diğerleri, 2018)
HDAC1	5′CTGTCCGGTATTTGATGGCT3′	5′CACGAACTCCACACACTTGG3′	(Jiang ve diğerleri, 2019)

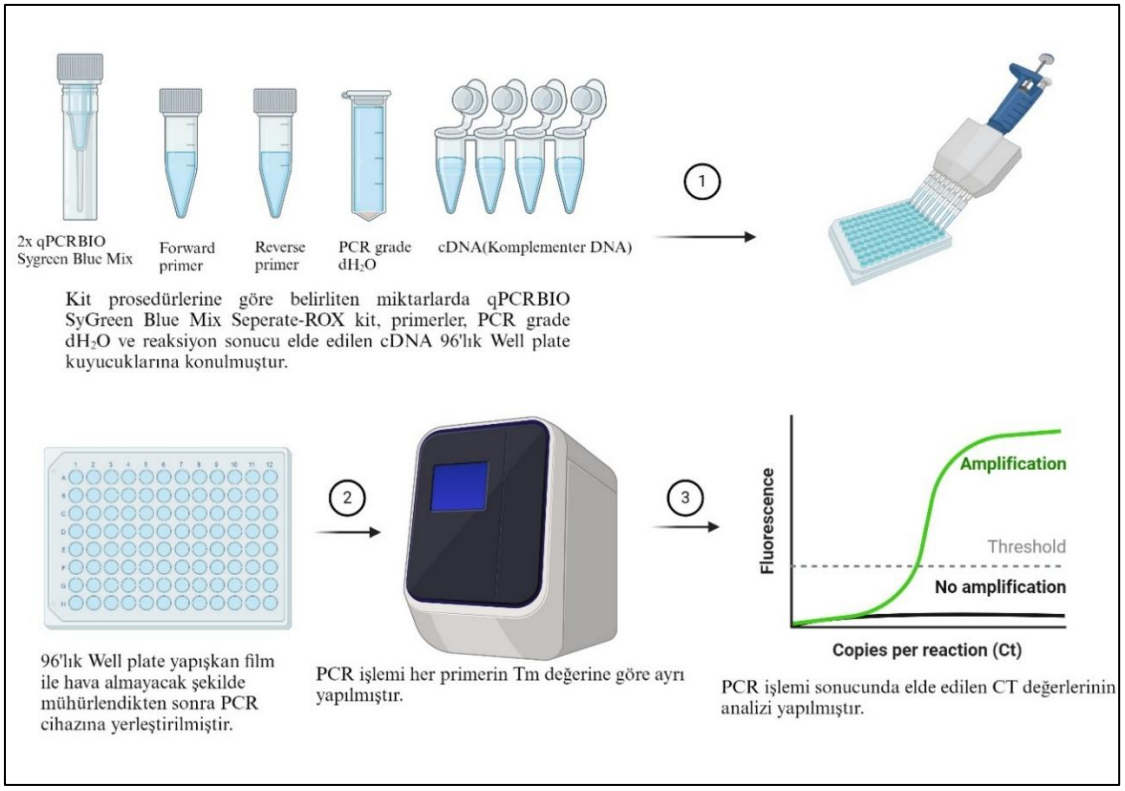
RT-qPCR analizi için 100 µM olan primerler ana stoktan 0,8 µM'a seyreltilmiştir. 96'lik well plate kuyucuklarına örnekler not alınarak Çizelge 3.2'deki hesaplamalara göre muamele grupları eklendikten sonra well plate üzerine şeffaf, yapışkan film ile hava almayacak şekilde mühürlenmiştir. RT-qPCR cihazına yerleştirilmiş ve PCR işlemi primerlerin Tm sıcaklıklarına göre (üretici firmanın talimatları doğrultusunda) gerçekleştirilmiştir. DNMT1 ve DNMT3B 64°C'de, DNMT 3A 62°C'de ve HDAC1 60 °C'de çalışılmıştır (Çizelge 3.3). RT-qPCR analizi için yapılan işlemler Şekil 3.14'te anlatılmıştır.

Çizelge 3.2. RT-qPCR reaksiyon bileşenleri

Reaksiyon bileşenleri	Miktar
2X qPCRBIO SyGreen Blue Mix	10 µL
Forward primer	0,8 µL
Reverse primer	0,8 µL
cDNA	2 µL
ddH_2O	20 µL'ye tamamlanmıştır.

Çizelge 3.3. RT-qPCR reaksiyon koşulları

PCR koşulları	Sıcaklık (°C)	Zaman (saniye)	Döngü
Başlangıç denatürasyonu	95	120	1
Denatürasyon	95	5	40
Annealing	60	30	



Şekil 3.14. RT-qPCR analizi (BioRender kullanılarak oluşturulmuştur).

3.2.13. Real-Time PCR (RT-qPCR) testi istatistiksel analizi

Floresan değerlerinin belirli eşik düzeyini aştığı noktaya döngü eşiği (Ct) denilmektedir. Analizler için karşılaştırmalı döngü eşiği metodu kullanılmıştır. Elde edilen verilerle, çalışılan genin ΔCt değeri ile referans genin ΔCt değeri arasındaki fark hesaplanarak gen ekspresyonundaki değişiklikler (ΔΔCt) belirlenmiştir. ΔΔCt değeri çalışılan deney grubunda, hedef gendeki ekspresyon seviyesinin kontrol grubuna kıyasla değişimini ifade eder ve bu değişim, RQ ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) formülü ile hesaplanır; bu formül, ekspresyon seviyesindeki değişimleri kat cinsinden göstermektedir. Gen ekspresyonu değişiklikleri aşağıda belirtilen formülle hesaplanmıştır:

ΔCt= Ct (Hedef gen)- Ct (Referans gen)

ΔΔCt = Örnek (Ct Hedef gen-Ct İnternal kontrol/Referans gen) – Kontrol (Ct Hedef gen-Ct İnternal kontrol/Referans gen)

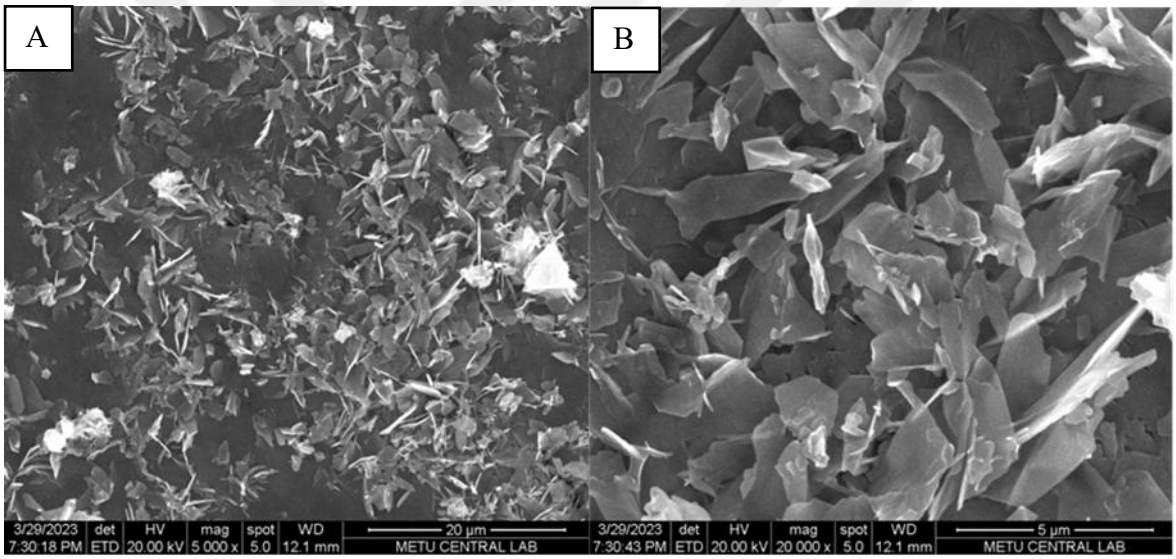
RQ= $2^{-\Delta\Delta Ct}$

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. EPS_{M59}'un Karakterizasyonu

4.1.1. Taramalı elektron mikroskobu-enerji dağıtıcı X-ray (SEM-EDX) analizi

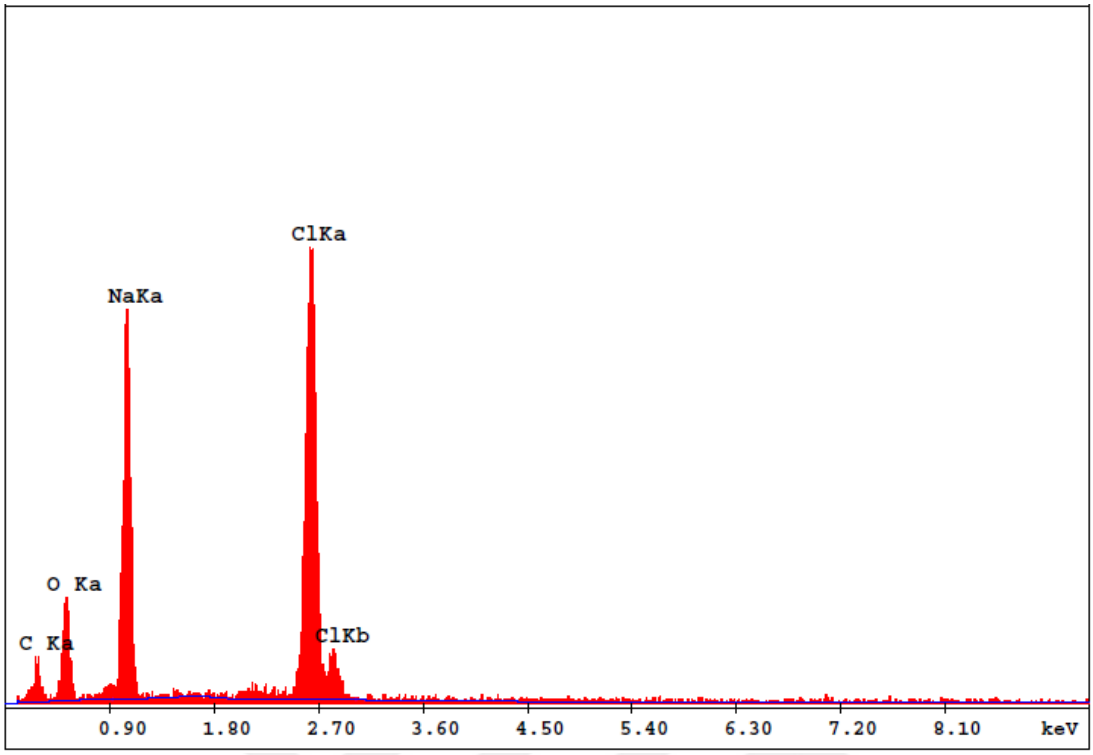
K. marxianus'dan elde edilen EPS_{M59}'un yüzey morfolojisinin pürüzlü ve düz bir yapıya sahip olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.1). SEM-EDX sonuçları EPS_{M59}'un içerdiği C, Na, O ve Cl atomları % olarak Çizelge 4.1 ve Şekil 4.2'de verilmiştir. EPS_{M59} için en yüksek atom yüzdesinin sırayla karbon ve klora ait olduğu belirlenmiştir. EPS polisakkarit temel yapısına uygunluk göstermiştir.



Şekil 4.1. EPS_{M59}'un taramalı elektron mikroskop (SEM) görüntüleri (A) 5000X, (B) 20000x.

Çizelge 4.1. EPS_{M59}'un SEM-EDX analizi yüzde element sonuçları (%)

	C	O	Na	Cl
EPS_{M59}	30,50	19,38	20,20	27,47

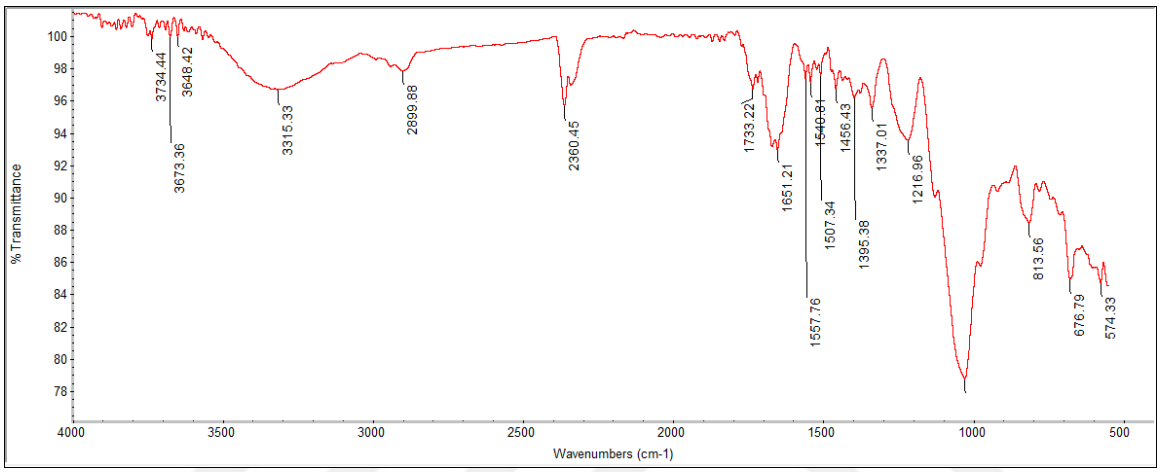


Şekil 4.2 EPS_{M59}'un SEM-EDX analizi

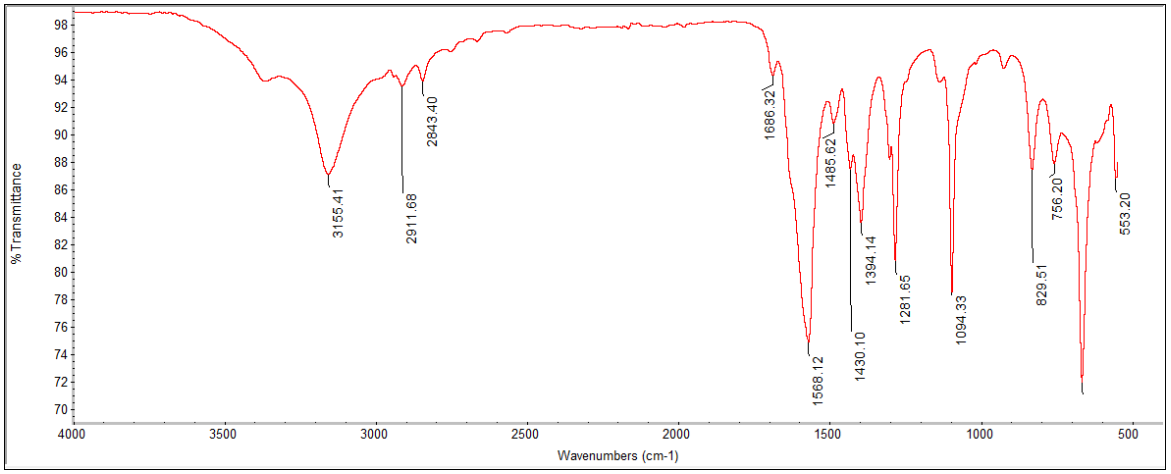
4.1.2. Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopi (FI-TR) analizi

Fourier dönüşümlü kızılötesi (FT-IR) spektroskopisi, polisakkaritlerin yapısal analizinde ve biyopolimerlerdeki yapısal değişikliklerin izlenmesinde yararlı ve güçlü bir tekniktir. EPS_{M59} biyopolimerinin FT-IR analizi sonucunda (Şekil 4.3 ve 4.4) elde edilen pikler 574,33; 676,79; 813,56; 1216,96; 1337,01; 1395,38; 1456,43; 1507,34; 1540,81; 1557,76; 1651,21; 1733,22; 2360,45; 2899,88; 3315,33; 3648,42; 3673,36 ve 3734,44 cm^{-1}'dir. Karboksimetil EPS_{M59} ($CMEPS_{M59}$) biyopolimerinin FT-IR analizi sonucunda elde edilen pikler ise; 553,20; 756,20; 829,51; 1094,33; 1281,65; 1394,14; 1430,10; 1485,62; 1568,12; 1686,32; 2843,40; 2911,68 ve 3155,41 cm^{-1}'dir. EPS_{M59}'un karboksimetilasyon öncesi ve sonrası Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FT-IR) analizleri, kimyasal modifikasyonun başarılı bir şekilde gerçekleştiğini göstermektedir. Modifikasyon öncesi spektrumda, 1733 cm^{-1} ve 1651 cm^{-1} bölgelerinde karbonil (C=O) gerilme titreşimlerine işaret eden belirgin pikler gözlemlenmiştir. Karboksimetilasyon sonrasında ise bu piklerin 1668 cm^{-1} ve 1628 cm^{-1} bölgelerine kaydığı ve yoğunluklarının arttığı tespit edilmiştir. Bu kaymalar, karboksil (-COOH) ve karboksilat ($-COO^-$) gruplarının oluşumunu ve dolayısıyla karboksimetilasyonun başarılı bir şekilde gerçekleştiğini göstermektedir. Ayrıca, modifikasyon sonrası spektrumda 1465 cm^{-1} ve 1394 cm^{-1} bölgelerinde yeni absorpsiyon

bantlarının ortaya çıkması, karboksilat gruplarının asimetrik ve simetrik gerilme titreşimlerine işaret etmektedir. Hidroksil (-OH) gruplarının gerilme titreşimleri, modifikasyon öncesi spektrumda ~3700-3000 cm^{-1} aralığında geniş bir bant oluştururken, karboksimetilasyon sonrasında bu bölgedeki absorpsiyonun azalması, hidroksil gruplarının kısmen karboksimetil gruplarına dönüştüğünü göstermektedir. Bu bulgular, EPS_{M59}'un başarılı bir şekilde karboksimetilasyona uğradığını ve yapısında belirgin kimyasal değişiklikler meydana geldiğini doğrulamaktadır.



Şekil 4.3 EPS_{M59}'un FT-IR sprektrumları



Şekil 4.4 $CMEPS_{M59}$'un FT-IR sprektrumları

4.2. EPS_{M59}'un Genotoksik Etkilerinin Değerlendirmesi

4.2.1. Kromozomal anormallikler ve mitotik indeks üzerine etkileri

EPS_{M59}'un kültüre edilmiş periferal insan lenfositlerinde 24 ve 48 saat uygulanması sonucunda beş tip yapısal ve iki tip sayısal anormallik olmak üzere toplam yedi tip anormallik görülmüştür. Anormallikler, görülme sıklığına göre sırayla kromatid kırığı (%57,69), fragment (%21,15), poliploidi (%7,70), endoreduplikasyon (%7,70), kromozom kırığı (%1,92) ve disentrik kromozom (%1,92) dur. Kromatid değişimine EPS_{M59}'un konsantrasyonlarıyla muamele edilen gruplarda rastlanmazken sadece pozitif kontrolde (0,20 µg/mL MMC) rastlanmıştır (Çizelge 4.2, Resim 4.1).

EPS_{M59}'un 24 ve 48 saatlik muamele sürelerinde anormal hücre yüzdeleri ve hücre başına düşen anormallik (KA/hücre) frekanslarında kontrole göre anlamlı bir değişiklik olmamıştır (Çizelge 4.2, Şekil 4.6).

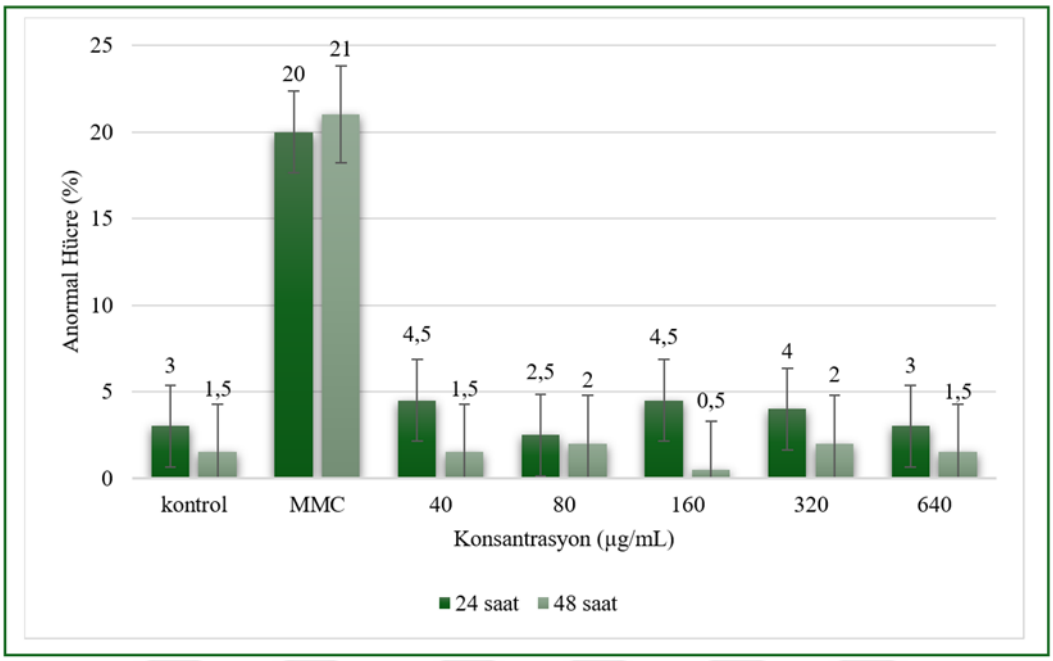
Mitotik indeks sonuçları değerlendirildiğinde, EPS_{M59}'un tek başına 24 ve 48 saatlik muameleleri sonucunda sadece 48 saatlik muamelenin 80 µg/mL konsantrasyonunda kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düşüş göstermiştir. Regresyon analizi sonucunda konsantrasyona bağlı bir düşüş tespit edilmemiştir (Çizelge 4.2, Şekil 4.7).

Çizelge 4.2. EPS_{M59}'un 24 ve 48 saatlik muamelelerinin periferal insan lenfositlerinde oluşturdukları kromozom anormallikleri, anormal hücre yüzdeleri, hücre başına düşen anormallik ve mitotik indeks frekansları

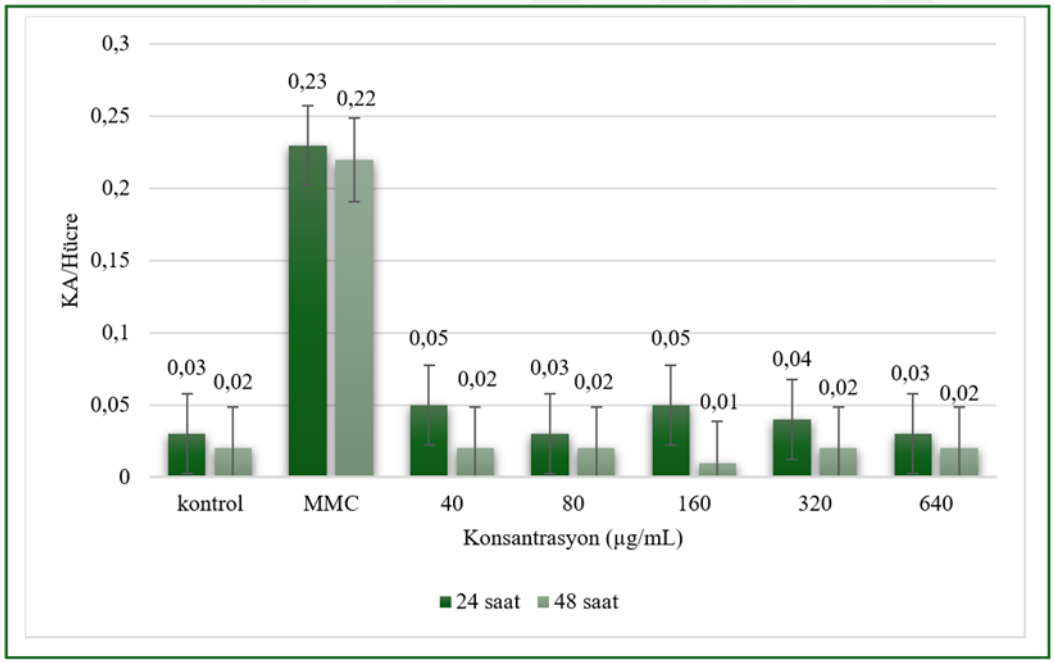
Test maddesi	Uygulama		Anormallikler								Anormal hücre ± SH (%)	KA/Hücre ± SH	Mİ ± SH
			Yapısal						Sayısal				
	Süre (saat)	Konsantrasyon (µg/mL)	ktk	kzk	f	kkb	Ktd	ds	p	er			
Kontrol	24	0,00	3		1				2		3,00±1,20	0,03±0,01	9,30±0,64
MMC	24	0,20	29	2	12		1		1		20,00±2,82	0,23±0,03	6,25±0,54
EPS_{M59}	24	40,00	4		3	1			1		4,50±1,46	0,05±0,01	9,05±0,64
		80,00	4		1						2,50±1,10	0,03±0,01	9,60±0,65
		160,00	4		2				1	2	4,50±1,46	0,05±0,01	9,00±0,63
		320,00	5					1		2	4,00±1,38	0,04±0,0,2	9,90±0,66
		640,00	3	1	2						3,00±1,20	0,03±0,01	9,35±0,65
Kontrol	48	0,00	2						1		1,50±0,85	0,02±0,01	8,85±0,63
MMC	48	0,20	20	4	11	5	2	1	2		21,00±2,88	0,22±0,03	5,2±0,49
EPS_{M59}	48	40,00	2		1						1,50±0,85	0,02±0,01	7,35±0,58
		80,00	2		1				1		2,00±0,98	0,02±0,01	6,8±0,56*
		160,00	1								0,50±0,49	0,01±0,00	7,9±0,60
		320,00	2		1				1		2,00±0,98	0,02±0,01	8,15±0,61
		640,00	3								1,50±0,85	0,02±0,01	9,15±0,64
Kromozomal anormallik yüzdesi			57,69	1,92	21,15	1,92	0,00	1,92	7,70	7,70			

Ktk: kromatid kırığı, kzk: kromozom kırığı, f: fragment, kkb: kardeş kromatidlerde birleşme, ktd: kromatid değişimi, ds: disentrik kromozom, p: poliploidi, er: endoreduplikasyon

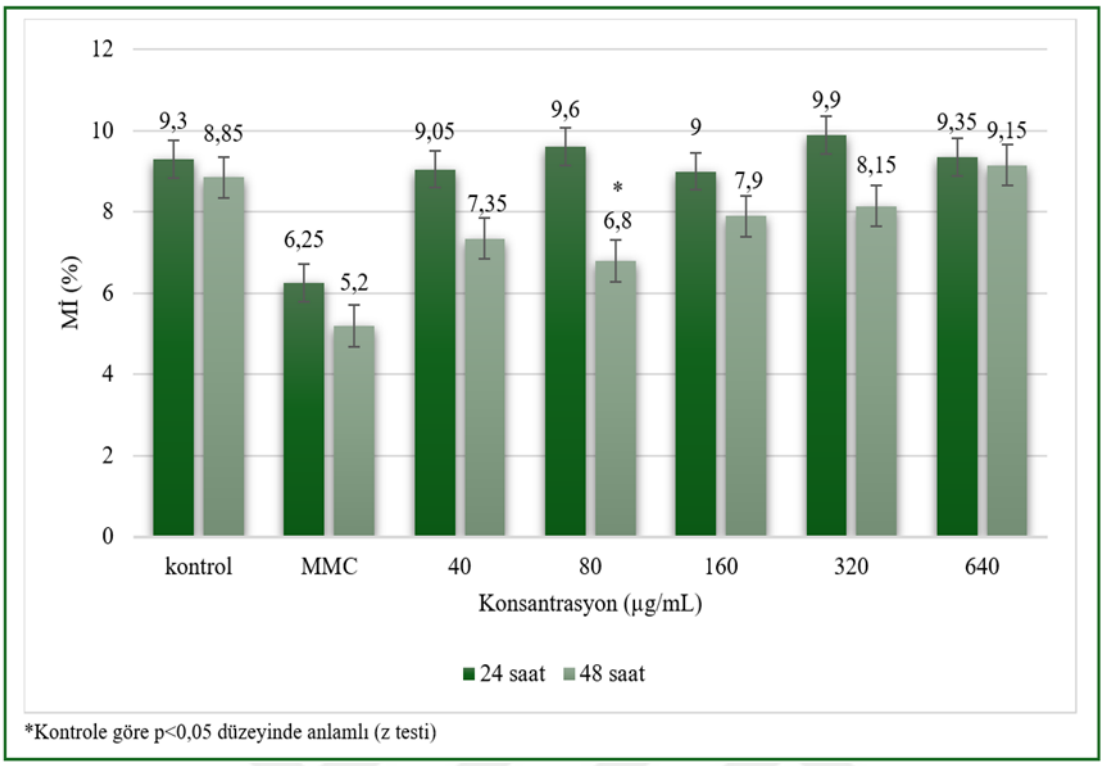
*Kontrole göre $p<0,05$ düzeyinde anlamlı (z testi)



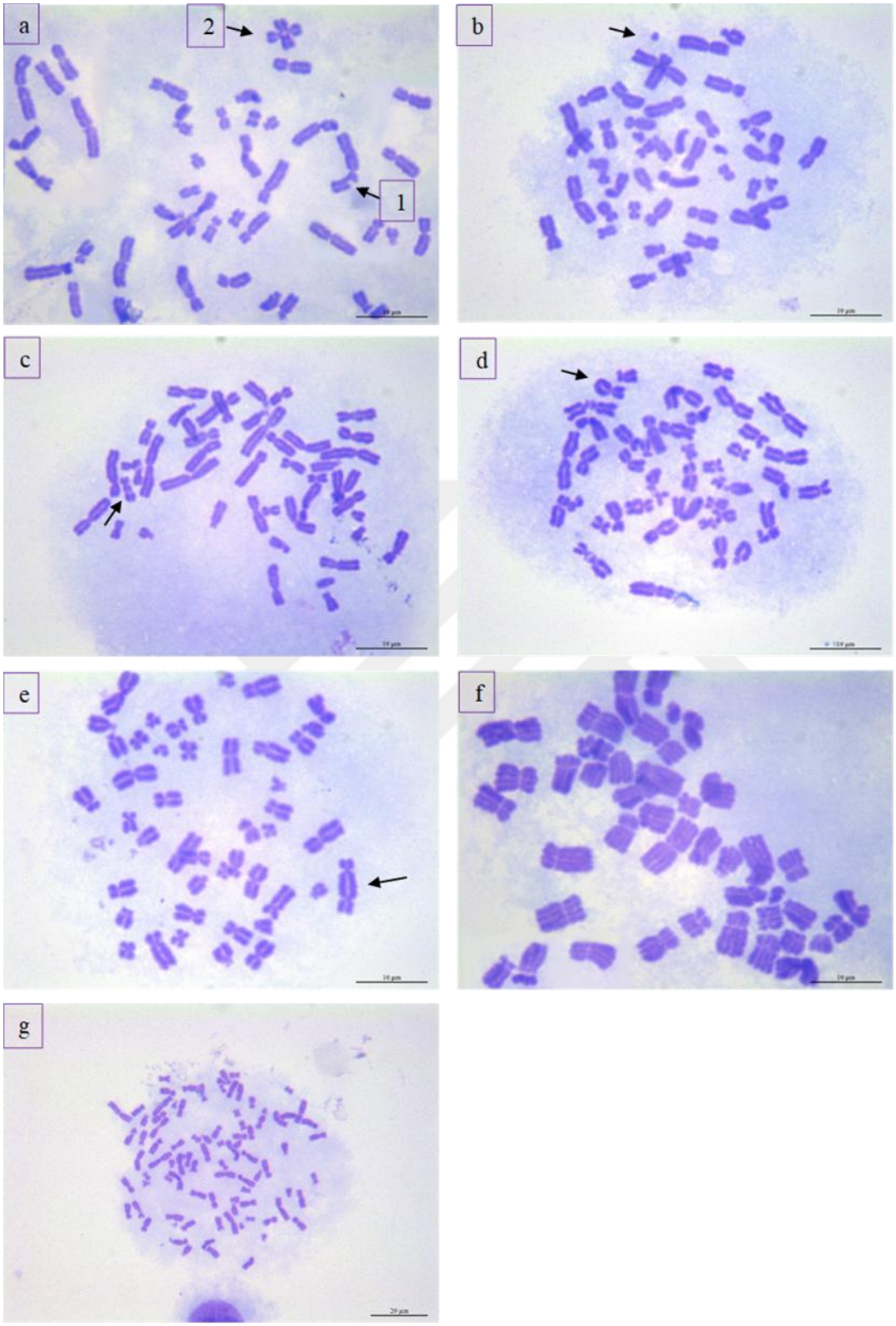
Şekil 4.5. EPS_{M59}'un 24 ve 48 saatlik muameleleri sonucu periferal insan lenfositlerinde anormal hücre yüzdesi üzerine etkisi



Şekil 4.6. EPS_{M59}'un 24 ve 48 saatlik muameleleri sonucu periferal insan lenfositlerinde hücre başına düşen anormallik frekansları üzerine etkisi



Şekil 4.7. EPS_{M59}'un 24 ve 49 saatlik muamelelerinin periferal insan lenfositlerinde oluşturduğu mitotik indeks değerleri



Resim 4.1. $EPS_{M59,}$ EPS_{M59}+MMC ve EPS_{M59}+MMS muameleleri sonucu periferal insan lenfositlerinde gözlenen kromozom anormallikleri: a) 1. Kromatid kırığı, 2. Kromatid değişimi b) fragment c) kromozom kırığı d) kardeş kromatidlerde birleşme e) disentrik kromozom f) endoreduplikasyon g) poliploidi

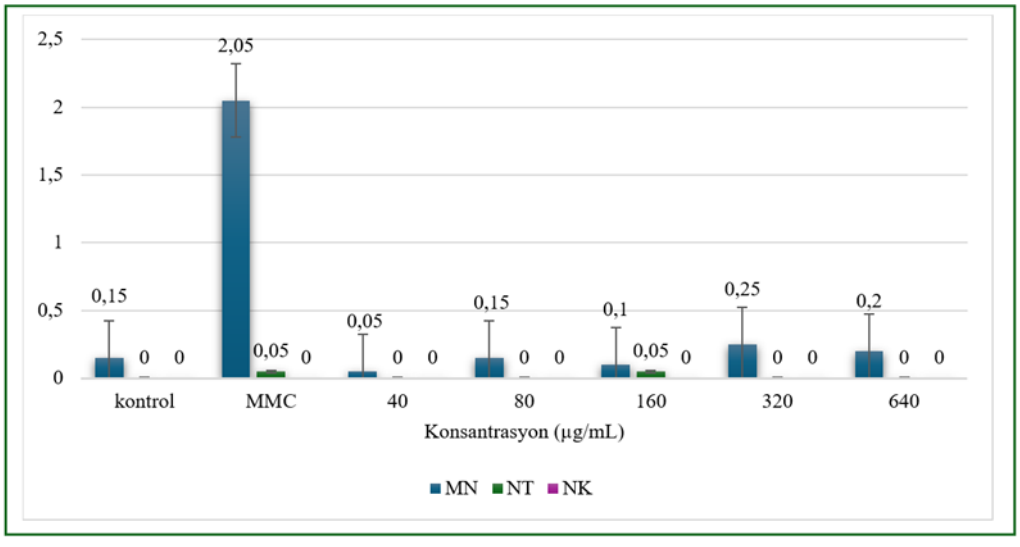
4.2.2. EPS_{M59}'un sitokinez blok mikronükleus sitom test bulguları

48 saat süresince EPS_{M59} ile muamele edilen periferal insan lenfositlerinde gözlenen binükleat hücrelerde mikronükleus, nükleer tomurcuk, nükleoplazmik köprü frekansları ve nükleer bölünme indeksi Çizelge 4.2'de gösterilmiştir.

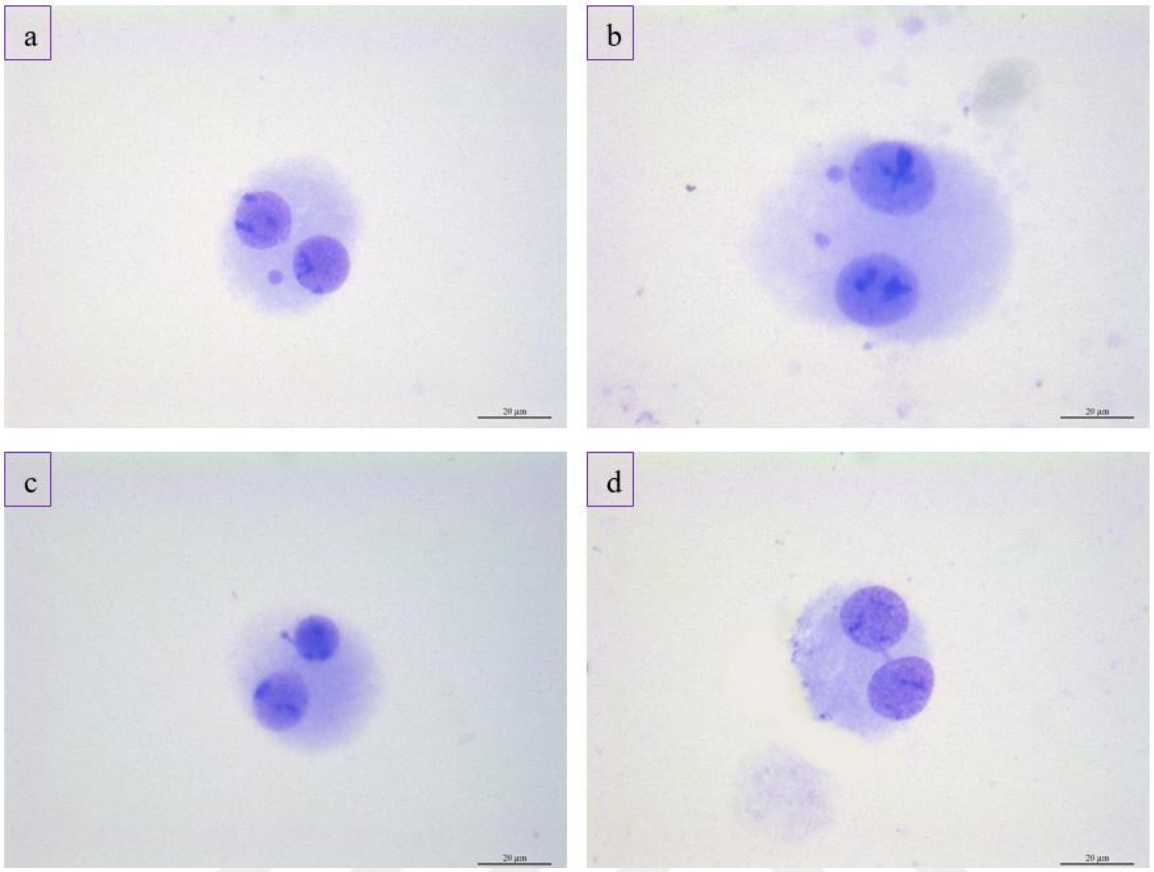
EPS_{M59} ile muamele edilen konsantrasyonlarında bir ve iki mikronükleuslu binükleat hücrelere rastlanırken üç mikronükleuslu binükleat hücrelere sadece pozitif kontrolde (MMC) rastlanmıştır. Ayrıca muamele gruplarında nükleer tomurcuk içeren binükleat hücrelere rastlanırken nükleoplazmik köprü içeren binükleat hücreye sadece pozitif kontrolde (MMC) rastlanmıştır (Çizelge 4.2, Resim 4.2, Şekil 4.8).

Çizelge 4.3. EPS_{M59}'un periferal insan lenfositlerinde mikronükleus, nükleer tomurcuk, nükleoplazmik köprü ve nükleer bölünme indeksi üzerine etkisi

Test Maddesi	Uygulama		Sayılan binükleat hücre sayısı	BN hücreler içinde Mikronükleus Frekansları			MN± SH (%)	NT ± SH (%)	NPK ± SH (%)	NBI ± SH
	Süre (saat)	Konsantrasyon (µg/mL)		(1)	(2)	(3)				
Kontrol	48	0,00	2000	3			0,15±0,09	0,00±0,00	0,00±0,00	2,10±0,45
MMC	48	0,20	2000	35		2	2,05±0,31	0,05±0,05	0,05±0,05	1,76±0,41
EPS_{M59}	48	40,00	2000	1			0,05±0,05	0,00±0,00	0,00±0,00	2,10±0,45
		80,00	2000	1	1		0,15±0,09	0,00±0,00	0,00±0,00	2,08±0,45
		160,00	2000	2			0,10±0,07	0,05±0,05	0,00±0,00	2,09±0,45
		320,00	2000	3	1		0,25±0,11	0,00±0,00	0,00±0,00	2,07±0,45
		640,00	2000	4			0,20±0,10	0,00±0,00	0,00±0,00	2,18±0,46



Şekil 4.8. EPS_{M59}'un periferal insan lenfositlerinde mikronükleus, nükleer tomurcuk, nükleoplazmik köprü frekansları üzerine etkisi



Resim 4.2. EPS_{M59}, EPS_{M59} + MMC ve EPS_{M59} + MMS uygulamaları sonucu periferal insan lenfositlerinde gözlenen mikronükleus, nükleer tomurcuk ve nükleoplazmik köprü içeren hücreler a) bir mikronükleuslu binükleat hücre b) iki mikronükleuslu binükleat hücre c) bir nükleer tomurcuk içeren binükleat hücre c) bir nükleoplazmik köprü içeren binükleat hücre

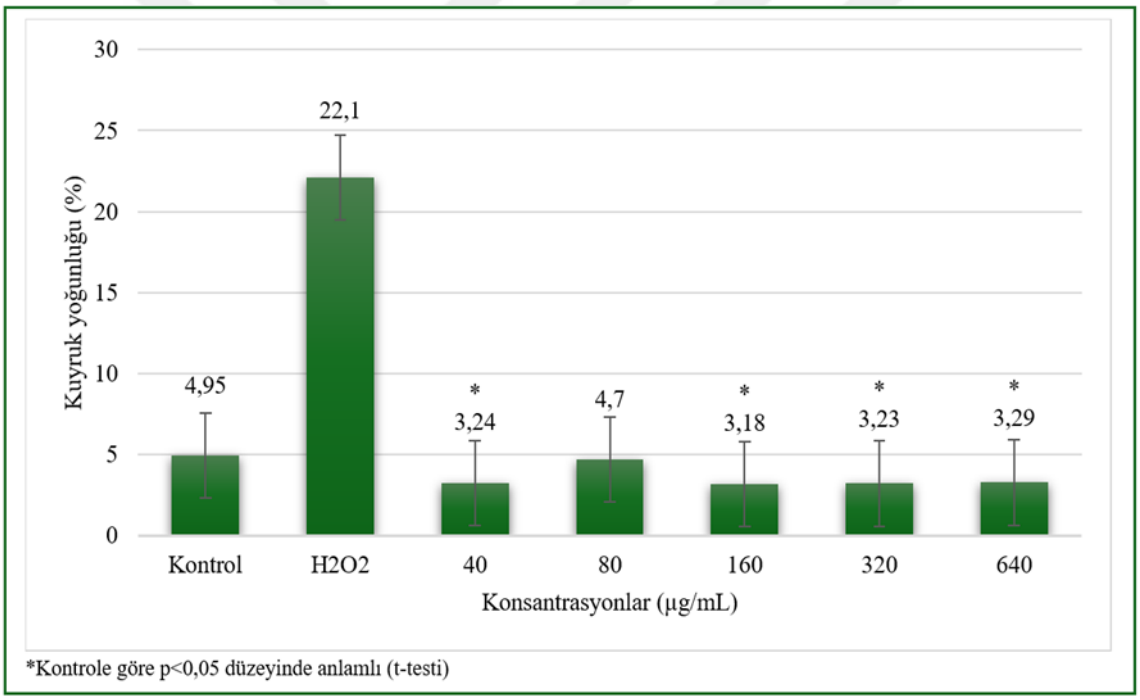
4.2.3. EPS_{M59}'un comet testinde kuyruk yoğunluğu, kuyruk uzunluğu ve kuyruk momenti üzerine etkileri

EPS_{M59} ile yapılan comet testi sonuçlarında sadece EPS_{M59}'un 80 µg/mL konsantrasyonunda kontrole göre kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momenti parametrelerinde azalma meydana gelmesine rağmen bu azalmalar istatistiksel olarak anlamlı değildir. EPS_{M59} diğer tüm konsantrasyonlarda kontrole kıyasla kuyruk yoğunluğu, kuyruk uzunluğu ve kuyruk momenti parametrelerinde istatistiksel anlamlı düşüş görülmüştür. Kuyruk yoğunluğu (r=-0,64) ve kuyruk momenti (r=-0,65) parametrelerindeki azalmalar orta dereceli korelasyonla konsantrasyona bağlı iken kuyruk uzunluğu (r=-0,12) parametresindeki azalmanın konsantrasyona bağlı olmadığı tespit edilmiştir (Çizelge 4.3, Şekil 4.10, Şekil 4.11 Şekil 4.12, Resim 4.3).

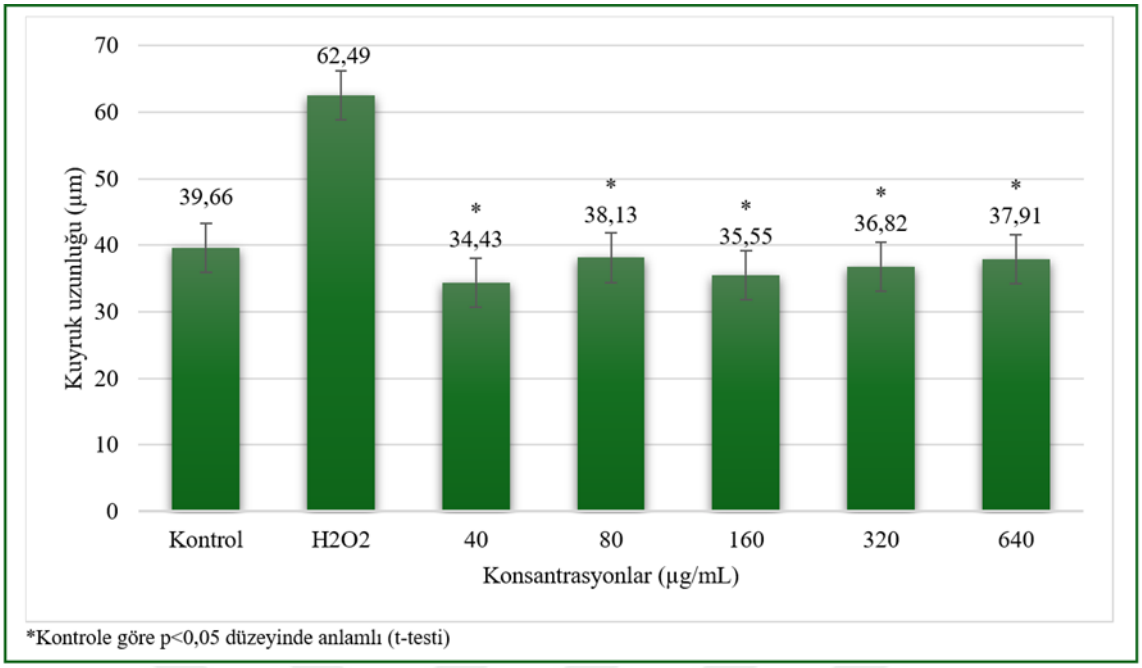
Çizelge 4.4. EPS_{M59} muamelesinin izole lenfositlerde kuyruk yoğunluğu (%), kuyruk uzunluğu (µm) ve kuyruk momenti parametreleri üzerine etkileri

Test Maddesi	Uygulama		Kuyruk Yoğunluğu (%)	Kuyruk Uzunluğu (µm)	Kuyruk Momenti
	Süre (saat)	Konsantrasyon (µg/mL)			
Negatif Kontrol	1	0,00	4,95± 0,48	39,66±0,35	0,95±0,09
Pozitif Kontrol (H_2O_2)	1	100 µM	22,10±1,32	62,49±1,07	5,57±0,35
EPS_{M59}	1	40,00	3,24±0,32*	34,43±0,28*	0,59±0,06*
		80,00	4,70±0,44	38,13±0,40*	0,88±0,08
		160,00	3,18±0,36*	35,55±0,48*	0,57±0,07*
		320,00	3,23±0,35*	36,82±0,40*	0,58±0,07*
		640,00	3,29±0,34*	37,91±0,50*	0,60±0,06*

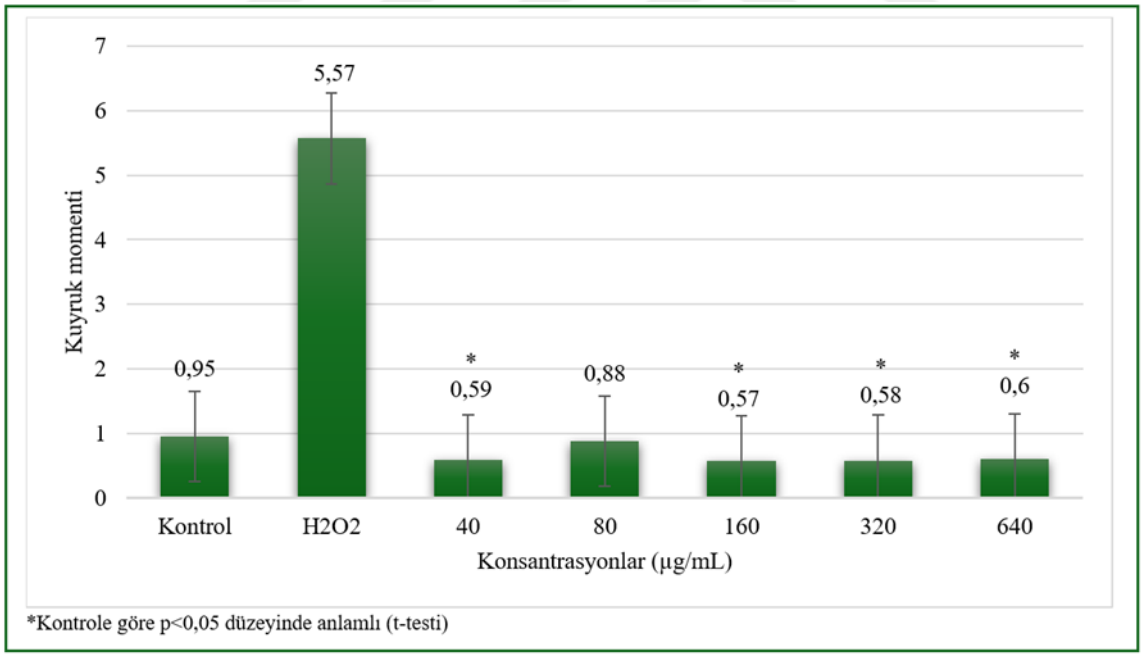
*Kontrole göre p<0,05 düzeyinde anlamlı (t-testi)



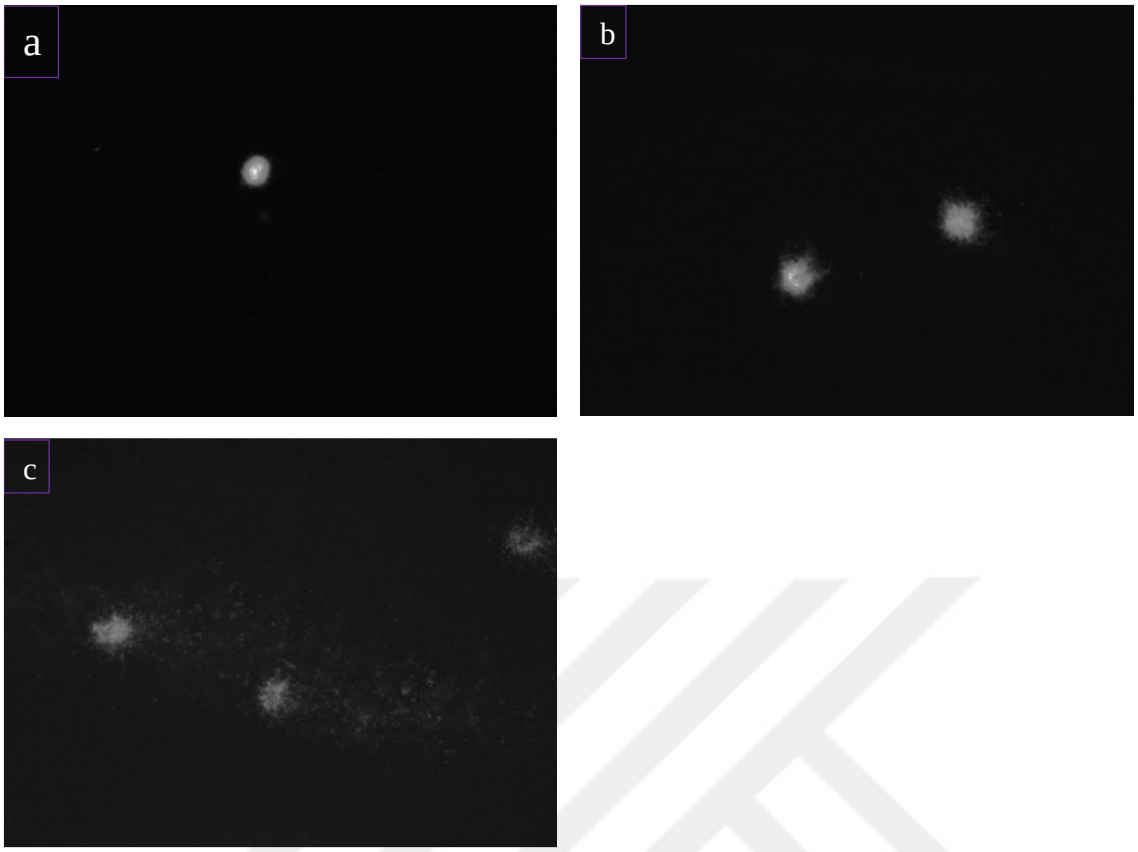
Şekil 4.9. EPS_{M59}'un muamelesinin izole insan lenfositlerinde kuyruk yoğunluğu üzerine etkisi



Şekil 4.10. EPS_{M59}'un muamelesinin izole insan lenfositlerinde kuyruk uzunluğu üzerine etkisi



Şekil 4.11. EPS_{M59}'un muamelesinin izole insan lenfositlerinde kuyruk momenti üzerine etkileri



Resim 4.3. EPS_{M59} ve EPS_{M59} + H_2O_2 muamele gruplarında izole insan lenfositlerinde gözlenen DNA hasarlarına ait resimler: a) hasarsız DNA b) orta hasarlı DNA c) çok hasarlı DNA

4.3. EPS_{M59}'un Antigenotoksik Etkilerinin Değerlendirmesi

4.3.1. EPS_{M59}'un mitomisin-C tarafından oluşan hasara karşı antigenotoksik etkisinin kromozomal anormallikler ve mitotik indeks üzerinden değerlendirilmesi

EPS_{M59}'un MMC ile eş zamanlı 24 ve 48 saatlik muameleleri sonucunda periferal insan lenfositlerinde meydan gelen kromozomal anormallik tipleri, hücre başına düşen anormallik, anormal hücre yüzdeleri ve mitotik indeks değerleri Çizelge 4.4'te verilmiştir.

EPS_{M59}'un MMC ile eş zamanlı 24 ve 48 saatlik süreyle uygulanması sonucu altı tip yapısal ve iki tip sayısal anormallik gözlenmiştir. Anormallikler görülme sıklığına göre kromatid kırığı (%61,11), fragment (%24,44), kromatid değişimi (%6,66), kromozom kırığı (%2,78), poliploidi (%2,78), endoreduplikasyon (%1,11), kardeş kromatidlerde birleşme (%0,56) ve disentrik kromozom (%0,56)'dur. En fazla gözlemlenen anormallik kromatid kırığı iken en az gözlemlenen anormallikler kardeş kromatidlerde birleşme ve disentrik kromozomdur.

EPS_{M59} 24 ve 48 saatlik uygulama gruplarının hepsi de MMC'nin neden olduğu anormal hücre yüzdesi ve hücre başına düşen anormallik frekanslarını istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalmasına neden olmuştur. 24 saatlik uygulamalarda anormal hücre yüzdelerinde (r=-0,50) ve hücre başına düşen anormallik frekansındaki (r=-0,42) azalmaların zayıf korelasyonla konsantrasyona bağlı olduğu tespit edilmiştir. 48 saatlik uygulamalarda ise anormal hücre yüzdelerinde (r=-0,69) ve hücre başına düşen anormallik frekansındaki (r=-0,66) azalmaların orta derece korelasyonla konsantrasyona bağlı olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.5, Şekil 4.12, Şekil 4.13).

Mitotik indeks değerleri incelendiğinde, EPS_{M59} ve MMC'nin eş zamanlı muamelesinin 24 saatlik muamele gruplarında 40, 80, 160 ve 640 µg/mL'lik konsantrasyonlarda MMC'nin düşüşüne neden olduğu mitotik indeksi artırdıkları gözlenmektedir. Bununla birlikte bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildir. Sadece 320 µg/mL konsantrasyonu MMC'nin düşürdüğü mitotik indeks değerini anlamlı olarak arttırmıştır. Ayrıca mitotik indekste meydana gelen bu artışların zayıf korelasyonla konsantrasyona bağlı olduğu tespit edilmiştir (r= 0,49).

MMC'nin neden olduğu mitotik indeks düşüşünü 48 saatlik uygulamada 40, 80, 160 ve 320 µg/mL'lik konsantarsyonlar arttırmıştır. Fakat bu artışlar istatistiksel olarak anlamlı değildir. Sadece en yüksek konsantrasyon olan 640 µg/mL'lik konsantrasyon MMC'nin neden olduğu mitotik indeks değerinin düşüşünü istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttırmıştır. Ayrıca mitotik indekste meydana gelen bu artışların konsantrasyona bağlı olduğu tespit edilmiştir (r=0,76) (Çizelge 4.5, Şekil 4.14).

Çizelge 4.5. EPS_{M59} + MMC'nin 24 ve 48 saatlik muamelelerinin periferal insan lenfositlerinde meydana getirdikleri kromozomal anormallik tipleri, anormal hücre yüzdeleri, hücre başına düşen anormallik frekansı ve mitotik indeks değerleri

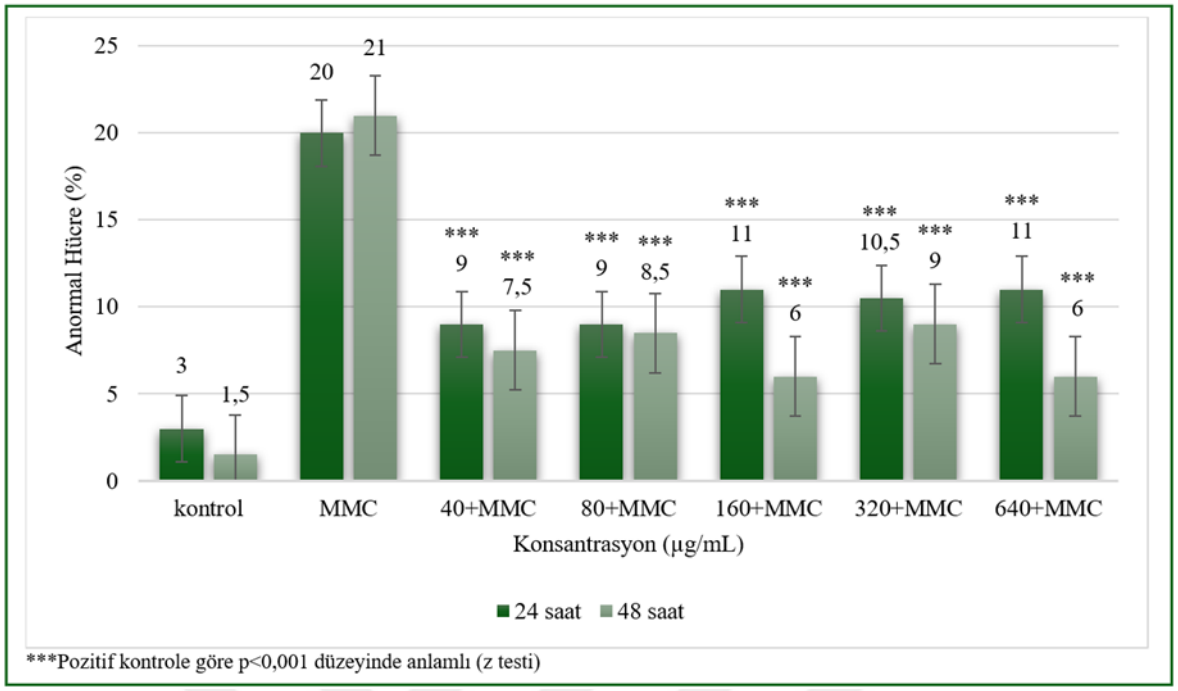
Test maddesi	Uygulama		Anormallikler								Anormal hücre ± SH (%)	KA/Hücre ± SH	Mİ ± SH
			Yapısal						Sayısal				
	Süre (saat)	Konsantrasyon (µg/mL)	ktk	kzk	f	kkb	Ktd	ds	p	er			
Kontrol	24	0,00	3		1				2		3,00±1,20	0,03±0,01	9,30±0,64
MMC	24	0,20	29	2	12		1		1		20,00±2,82	0,23±0,03	6,25±0,54
EPS_{M59} + MMC	24	40,00	12	2	3				1		9.00±2,02***	0,09±0,02***	7,60±0,59
		80,00	12		5	1					9,00±2,02***	0,09±0,02***	7,80±0,59
		160,00	12		7		1		1	1	11,00±2,21***	0,11±0,02**	7,45±0,58
		320,00	14	1	6		1				10,50±2,16***	0,11±0,02**	7,85±0,60*
		640,00	17	1	5		1			1	11,00±2,21***	0,13±0,02**	7,25±0,57
Kontrol	48	0,00	2						1		1,50±0,85	0,02±0,01	8,85±0,63
MMC	48	0,20	20	4	11	5	2	1	2		21,00±2,88	0,22±0,03	5,20±0,49
EPS_{M59} + MMC	48	40,00	10		2		1		2		7,50±1,86***	0,07±0,02***	6,20±0,53
		80,00	10		5		2				8,50±1,97***	0,08±0,02***	5,30±0,50
		160,00	6		3		2	1	1		6,00±1,68***	0,06±0,01***	6,05±0,53
		320,00	12		5		1				9,00±2,02***	0,09±0,02***	6,05±0,53
		640,00	5	1	3		3				6,00±1,68***	0,06± 0,01***	7,15±0,57*
Kromozomal anormallik yüzdesi			61,11	2,78	24,44	0,56	6,66	0,56	2,78	1,11			

Ktk: kromatid kırığı, kzk: kromozom kırığı, f: fragment, kkb: kardeş kromatidlerde birleşme, ktd: kromatid değişimi, ds: disentrik kromozom, p: poliploidi, er: endoreduplikasyon

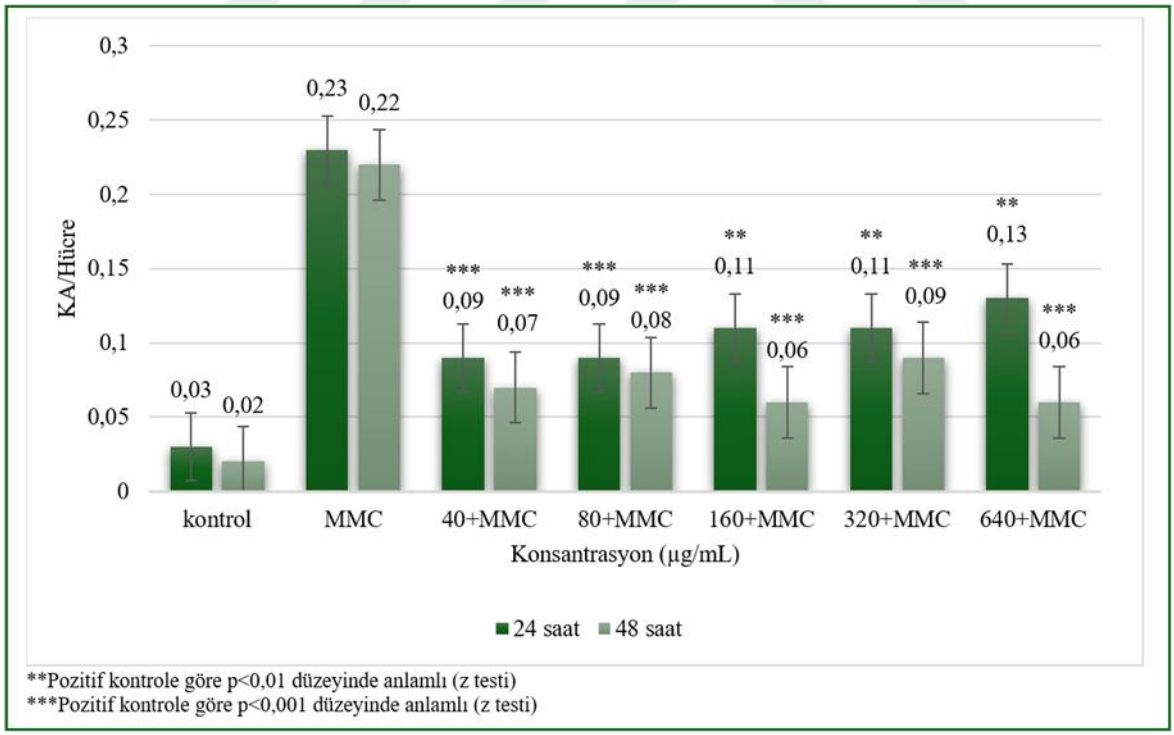
*Pozitif kontrole göre $p<0,05$ düzeyinde anlamlı (z testi)

**Pozitif kontrole göre $p<0,01$ düzeyinde anlamlı (z testi)

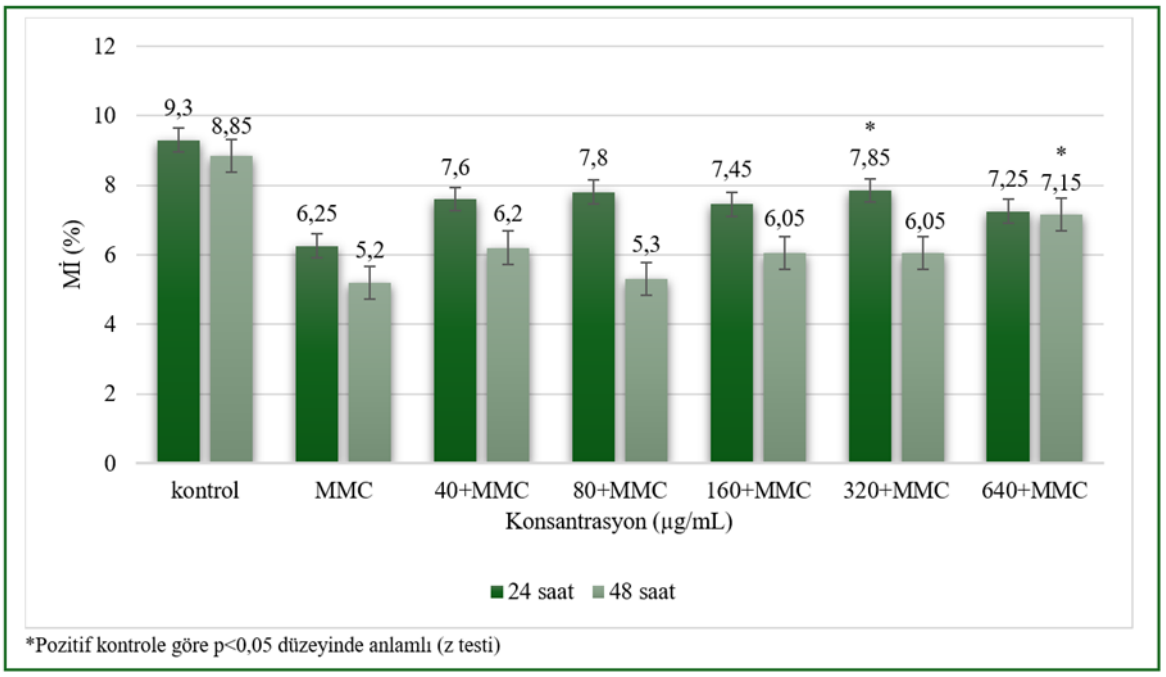
***Pozitif kontrole göre $p<0,001$ düzeyinde anlamlı (z testi)



Şekil 4.12. EPS_{M59} + MMC'nin eş zamanlı 24 ve 48 saatlik muamelesinin periferal insan lenfositlerinde anormal hücre yüzdeleri üzerine etkileri



Şekil 4.13. EPS_{M59} + MMC'nin eş zamanlı 24 ve 48 saatlik muamelesinin periferal insan lenfositlerinde hücre başına düşen anormallik frekansı üzerine etkileri



Şekil 4.14. EPS_{M59} + MMC'nin eş zamanlı 24 ve 48 saatlik muamelesinin periferal insan lenfositlerinde mitotik indeks değerleri üzerine etkileri

4.3.2. EPS_{M59}'un mitomisin-C tarafından oluşturulan hasara karşı antigenotoksik etkisinin sitokinez blok mikronükleus sitom ve nükleer bölünme indeksi üzerinden değerlendirilmesi

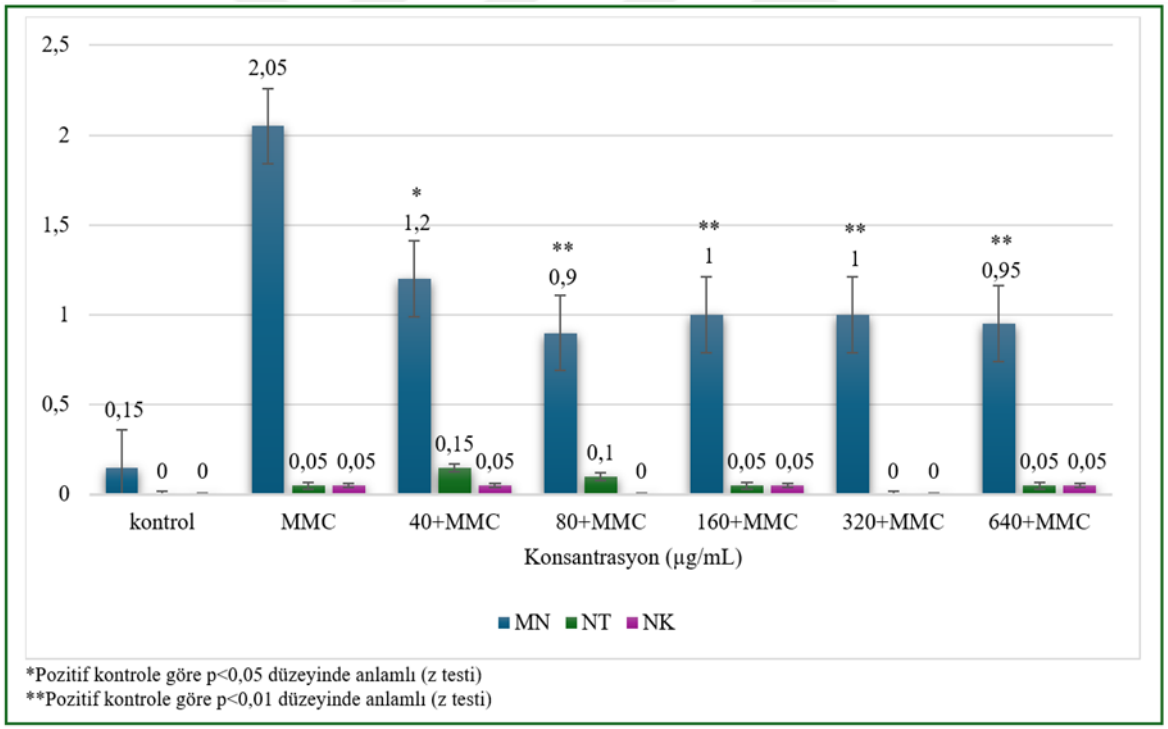
EPS_{M59}'un MMC ile eş zamanlı uygulaması sonucu gözlenen mikronükleus, nükleer tomurcuk, nükleoplazmik köprü ve nükleer bölünme indeksi verileri Çizelge 4.6'da gösterilmiştir.

Pozitif kontrolle (MMC) karşılaştırıldığında EPS_{M59}'un eş zamanlı muamelelerinde mikronükleus frekanslarında istatistiksel olarak anlamlı, yüksek dereceli korelasyonla konsantrasyona bağlı düşüşler tespit edilmiştir (r=-0,73). Nükleoplazmik köprü, nükleer tomurcuk ve nükleer bölünme indeksi frekanslarında istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik tespit edilmemiştir. Muamele gruplarında bir ve iki mikronükleus içeren binükleat hücrelere rastlanırken pozitif kontrolde üç mikronükleuslu binükleat hücrelere rastlanmıştır. Ayrıca nükleoplazmik köprü ve nükleer tomurcuk içeren binükleat hücreler de tespit edilmiştir (Çizelge 4.6, Şekil 4.15, Resim 4.2).

Çizelge 4.6. EPS_{M59} + MMC'nin 48 saatlik muamelelerinin periferal insan lenfositlerinde mikronükleus, nükleer tomurcuk, nükleoplazmik köprü frekansları ve nükleer bölünme indeksi üzerine etkileri

Test Maddesi	Uygulama		Sayılan binükleat hücre sayısı	BN hücreler İçinde Mikronükleus Frekansları			MN± SH (%)	NT ± SH (%)	NPK ± SH (%)	NBİ ± SH
	Süre (saat)	Konsantrasyon (µg/mL)		(1)	(2)	(3)				
Kontrol	48	0,00	2000	3			0,15±0,09	0,00±0,00	0,00±0,00	2,10±0,45
MMC	48	0,20	2000	35		2	2,05±0,31	0,05±0,05	0,05±0,05	1,76±0,41
EPS_{M59} + MMC	48	40,00	2000	16	4		1,20±0,24*	0,15±0,09	0,05±0,05	1,90±0,43
	48	80,00	2000	16	1		0,90±0,21**	0,10±0,07	0,00±0,00	1,89±0,43
	48	160,00	2000	18	1		1,00±0,22**	0,10±0,07	0,05±0,05	1,88±0,43
	48	320,00	2000	18	1		1,00±0,22**	0,00±0,00	0,00±0,00	1,84±0,42
	48	640,00	2000	19			0,95±02**	0,05±0,05	0,05±0,05	1,95±0,44

*Pozitif kontrole göre p<0,05 düzeyinde anlamlı (z testi)
**Pozitif kontrole göre p<0,01 düzeyinde anlamlı (z testi)



*Pozitif kontrole göre p<0,05 düzeyinde anlamlı (z testi)
**Pozitif kontrole göre p<0,01 düzeyinde anlamlı (z testi)

Şekil 4.15. EPS_{M59} + MMC'nin 48 saatlik eş zamanlı muameleleri sonucu periferal insan lenfositlerinde mikronükleus, nükleer tomurcuk ve nükleoplazmik köprü frekansı üzerine etkileri

4.3.3. EPS_{M59}'un metil metansülfonat tarafından oluşan hasara karşı antigenotoksik etkisinin kromozomal anormallikler ve mitotik indeks üzerinden değerlendirilmesi

EPS_{M59}'un MMS ile eş zamanlı 24 ve 48 saat muameleleri sonucunda periferal insan lenfositlerinde meydana gelen kromozomal anormallik tipleri, hücre başına düşen anormallik, anormal hücre yüzdeleri ve mitotik indeks değerleri Çizelge 4.7'de verilmiştir.

EPS_{M59}'un MMS ile eş zamanlı 24 ve 48 saatlik uygulaması sonucu beş tip yapısal ve iki tip sayısal anormallik gözlenmiştir. Anormallikler görülme sıklığına göre kromatid kırığı (%53,66), fragment (%26,83), poliploidi (%8,53), kromozom kırığı (%3,66), kardeş kromatid birleşmesi (%3,05), endoreduplikasyon (%2,44) ve disentrik kromozom (1,83)'dur. Kromatid değişimi anormalliğine hiçbir muamele grubunda rastlanmamıştır (Çizelge 4.7, Resim 4.1).

EPS_{M59}'un 24 saatlik MMS ile eş zamanlı uygulamasında pozitif kontrole (MMS) kıyasla tüm konsantrasyonlarda anormal hücre yüzdeleri ve hücre başına düşen anormallik frekanslarında azalma görülmüştür. Ancak bu azalmalar 320,00 ve 640,00 µg/mL'lik konsantrasyonlarda istatistiksel olarak anlamlıdır (Çizelge 4.7, Şekil 4.16, Şekil 4.17). 24 saatlik uygulamalarda anormal hücre yüzdelerinde (r=-0,92) ve hücre başına düşen anormallik frekansındaki (r=-0,92) azalmaların güçlü korelasyonla konsantrasyona bağlı olduğu tespit edilmiştir. MMS ile 48 saatlik eş zamanlı EPS_{M59} muamelelerinde tüm konsantrasyonlarda pozitif kontrole (MMS) kıyasla anormal hücre yüzdeleri ve hücre başına düşen anormallik frekanslarını istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaltmıştır. Anormal hücre yüzdelerinde (r=-0,74) ve hücre başına düşen anormallik frekansındaki (r=-0,71) azalmaların yüksek dereceli korelasyonla konsantrasyona bağlı olduğu tespit edilmiştir.

Mitotik indeks değerleri incelendiğinde, EPS_{M59} ve MMS'nin 24 saatlik eş zamanlı muamelesinin MMS'nin neden olduğu Mİ'deki düşüşü artırdığı gözlemlenmiştir. Ancak bu artışlardan 320 ve 640 µg/mL konsantrasyonlardaki artışlar istatistiksel olarak anlamlıdır. Ayrıca Mİ artışlarının güçlü korelasyonla konsantrasyona bağlı olduğu tespit edilmiştir (r=0,92). Mitotik indeksteki düşüşü 48 saatlik eş zamanlı muamelenin ise tüm konsantrasyonlarda arttırdığı gözlemlenmiştir. Ancak bu artışlardan 40, 80, 320 ve 640 µg/mL konsantrasyonlardaki artışlar istatistiksel olarak anlamlıdır. Ayrıca bu artışların zayıf

korelasyonla konsantrasyona bağlı olduğu tespit edilmiştir (r=0,46). (Çizelge 4.7, Şekil 4.18).

Çizelge 4.7. EPS_{M59} + MMS'nin 24 ve 48 saatlik muamelelerinin periferal insan lenfositlerinde kromozomal anormallik tipleri, anormal hücre yüzdeleri, hücre başına düşen anormallik frekansı ve mitotik indeks değerleri

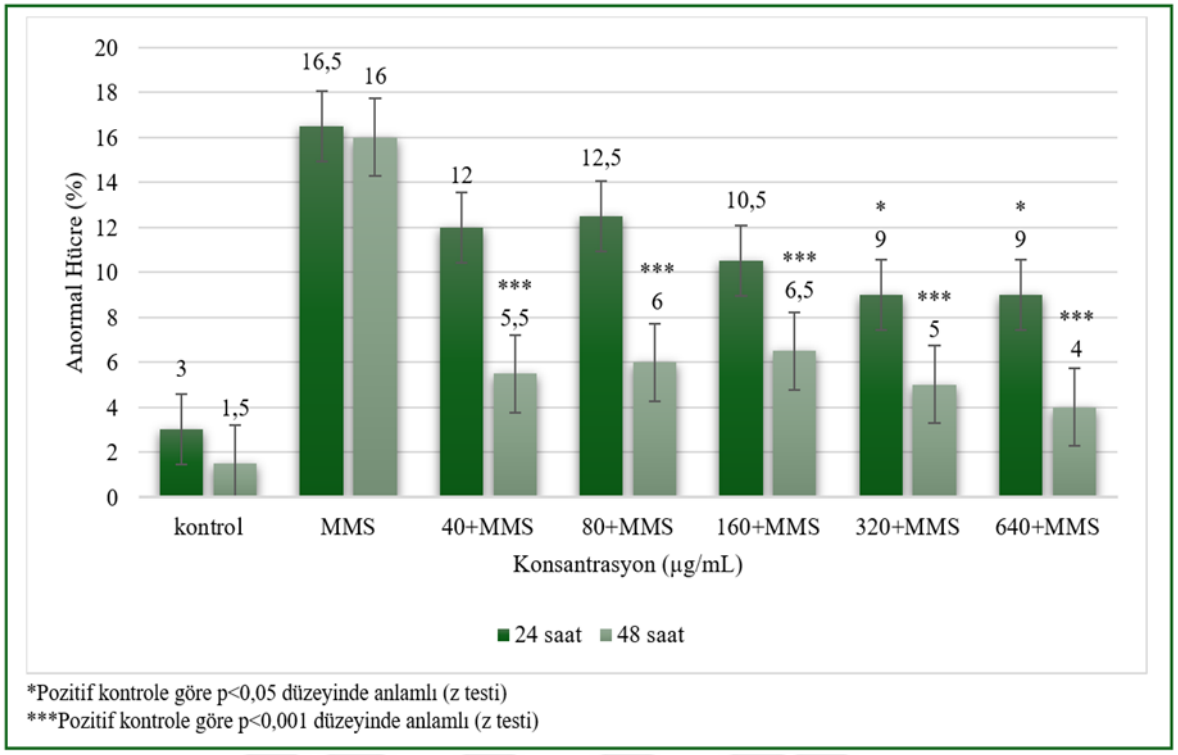
Test maddesi	Uygulama		Anormallikler							Anormal hücre ± SH (%)	KA/Hücre ± SH	Mİ ± SH
			Yapısal					Sayısal				
	Süre (saat)	Konsantrasyon (µg/mL)	ktk	kzk	f	kkb	ds	p	er			
Kontrol	24	0,00	3		1			2		3,00±1,20	0,03±0,01	9,30±0,64
MMS	24	6,60	18	3	7	3		3		16,50±2,62	0,17±0,03	6,55±0,55
EPS_{M59} + MMS	24	40,00	16		6	1		2		12,00±2,30	0,13±0,02	7,95±0,60
		80,00	14	3	7	1		1		12,50±2,30	0,13±0,02	7,85±0,60
		160,00	13		6	1		1		10,50±2,17	0,11±0,02	8,20±0,61
		320,00	9		6	1	1	1		9,00±2,02*	0,09±0,02*	8,55±0,63*
		640,00	12	2	3		1		2	9,00±2,02*	0,10±0,02*	8,90±0,64*
Kontrol	48	0,00	2					1		1,50±0,85	0,02±0,01	8,85±0,63
MMS	48	6,60	17	2	9	1		2	2	16,00±2,59	0,17±0,02	6,20±0,53
EPS_{M59} + MMS	48	40,00	4		3		1	2	1	5,50±1,61***	0,05±0,01***	9,20±0,64***
		80,00	6	1	2	1		2		6,00±1,67***	0,06±0,01***	8,00±0,60*
		160,00	6		5			1	1	6,50±1,74***	0,07±0,02**	7,35±0,58
		320,00	5		3			2		5,00±1,54***	0,05±0,02***	8,65±0,62**
		640,00	3		3			2		4,00±1,38***	0,04±0,01***	8,50±0,62**
Kromozomal anormallik yüzdesi			53,66	3,66	26,83	3,05	1,83	8,53	2,44			

Ktk: kromatid kırığı, kzk: kromozom kırığı, f: fragment, kkb: kardeş kromatidlerde birleşme, ds: disentrik kromozom, p: poliploidi, er: endoreduplikasyon

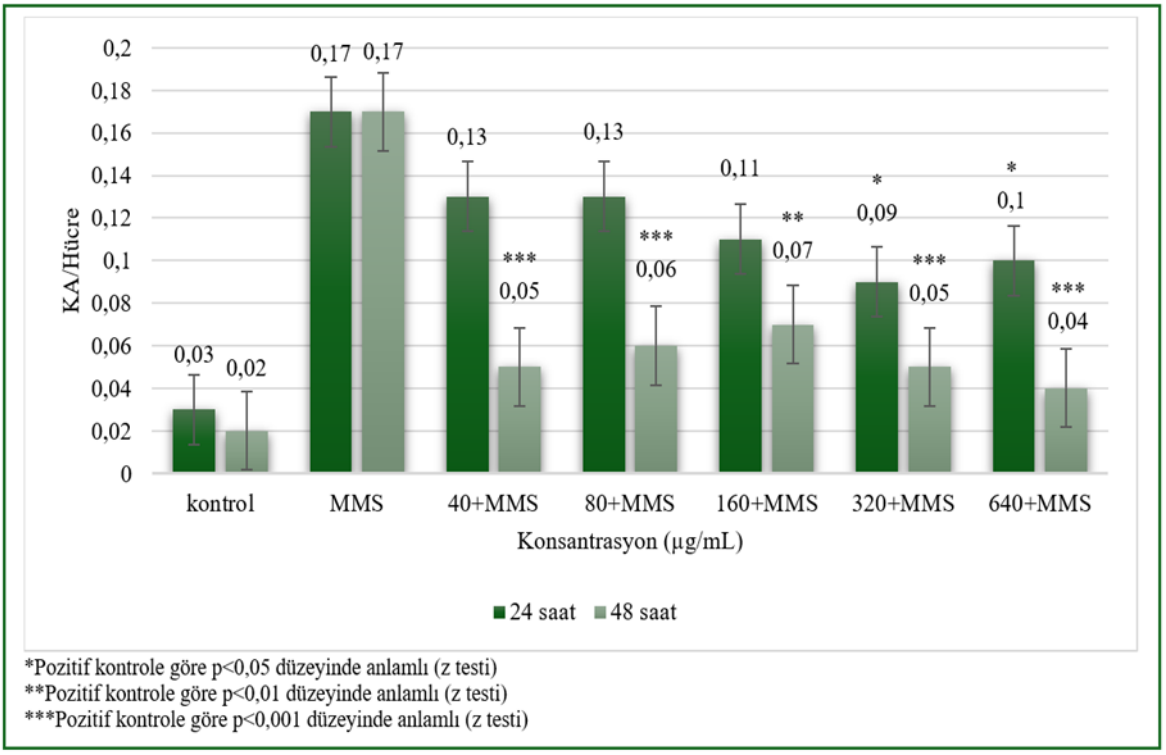
*Pozitif kontrole göre p<0,05 düzeyinde anlamlı (z testi)

**Pozitif kontrole göre p<0,01 düzeyinde anlamlı (z testi)

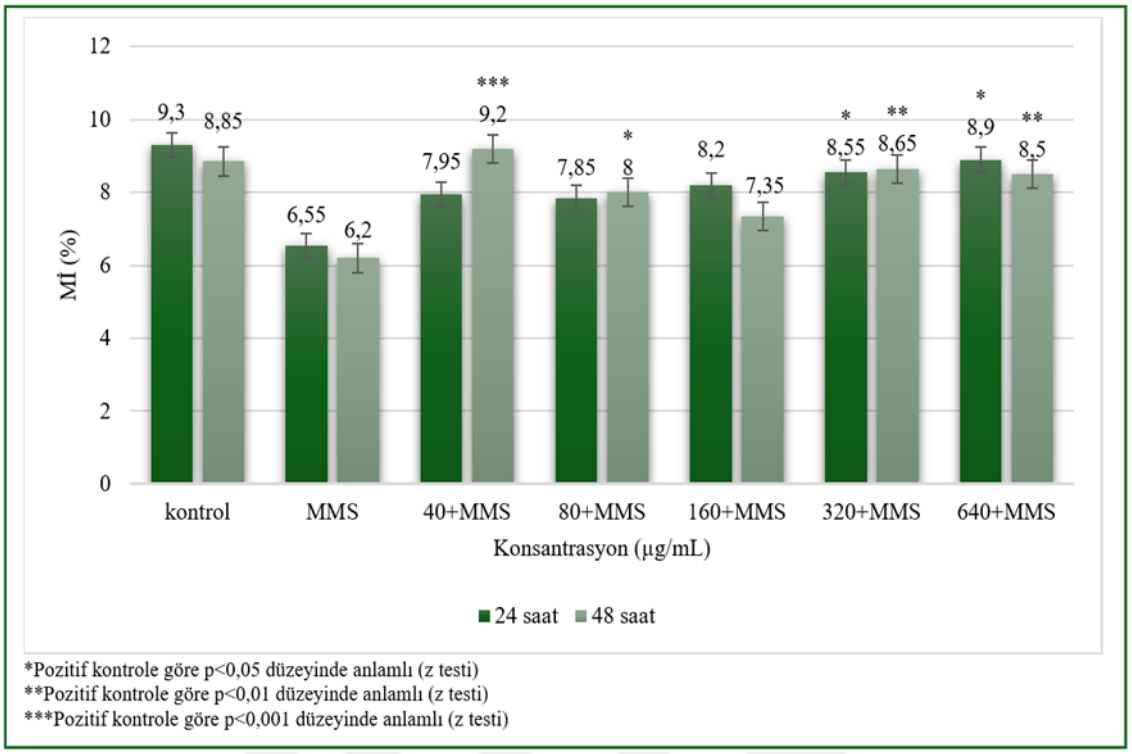
***Pozitif kontrole göre p<0,001 düzeyinde anlamlı (z testi)



Şekil 4.16. EPS_{M59} + MMS'nin eş zamanlı 24 ve 48 saatlik muamelesinin periferal insan lenfositlerinde anormal hücre yüzdeleri üzerine etkileri



Şekil 4.17. EPS_{M59} + MMS'nin eş zamanlı 24 ve 48 saatlik muamelesinin periferal insan lenfositlerinde hücre başına düşen anormallik frekansı üzerine etkileri



Şekil 4.18. EPS_{M59} + MMS'nin eş zamanlı 24 ve 48 saatlik muamelesinin periferal insan lenfositlerinde mitotik indeks değerleri üzerine etkileri

4.3.4. EPS_{M59}'un metil metansülfonat tarafından oluşturulan hasara karşı antigenotoksik etkisinin sitokinez blok mikronükleus sitom ve nükleer bölünme indeksi üzerinden değerlendirilmesi

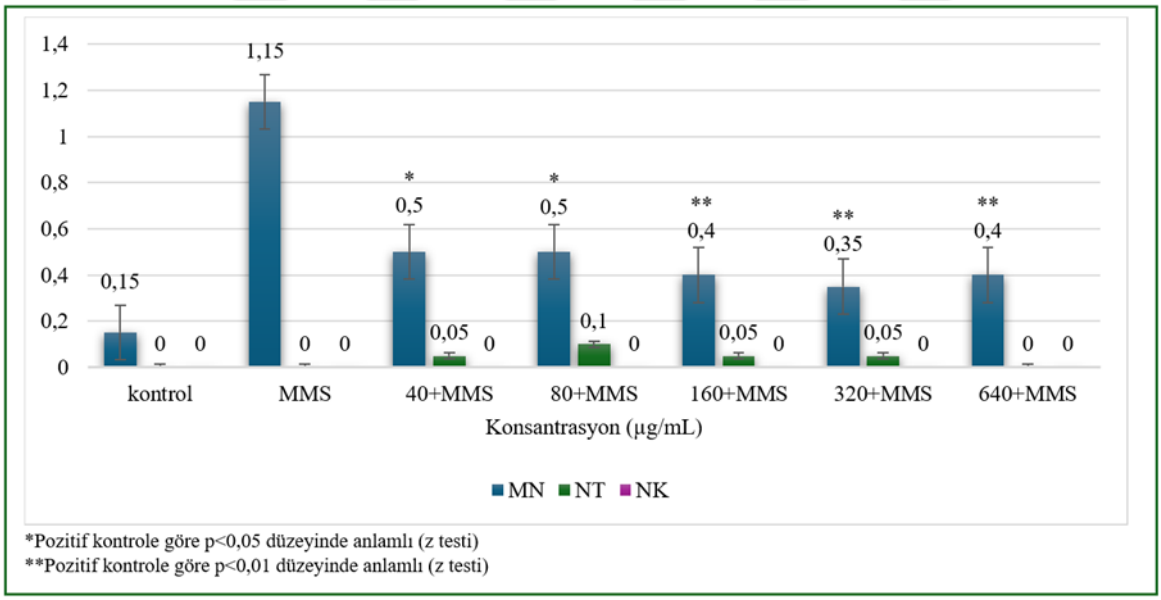
EPS_{M59}'un eş zamanlı olarak MMS ile birlikte uygulaması sonucu gözlenen mikronükleus, nükleer tomurcuk, nükleoplazmik köprü ve nükleer bölünme indeksi verileri Çizelge 4.8'de gösterilmiştir.

Pozitif kontrolle (MMS) karşılaştırıldığında EPS_{M59}'un eş zamanlı muamelesinin mikronükleus frekanslarında istatistiksel olarak anlamlı ve güçlü korelasyonla konsantrasyona bağlı düşüşe neden olduğu tespit edilmiştir (r=-0,77). Ayrıca nükleer tomurcuk, nükleoplazmik köprü ve nükleer bölünme indeksi frekanslarında istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik tespit edilmemiştir. Muamele gruplarında yalnızca bir ve iki nükleus içeren binükleat hücrelere rastlanmıştır. Ayrıca nükleer tomurcuk içeren binükleatlara rastlanırken nükleoplazmik köprü içeren binükleatlara rastlanmamıştır. (Çizelge 4.8, Şekil 4.19, Resim 4.2).

Çizelge 4.8. EPS_{M59} + MMS'nin 48 saatlik muamelelerinin periferal insan lenfositlerinde meydana getirdikleri mikronükleus, nükleer tomurcuk, nükleoplazmik köprü frekansları ve nükleer bölünme indeksi üzerine etkileri

Test Maddesi	Uygulama		Sayılan binükleat hücre sayısı	BN hücreler İçinde Mikronükleus Frekansları			MN± SH (%)	NT ± SH (%)	NPK ± SH (%)	NBI ± SH
	Süre (saat)	Konsantrasyon (µg/mL)		(1)	(2)	(3)				
Kontrol	48	0,00	2000	3			0,15±0,09	0,00±0,00	0,00±0,00	2,10±0,45
MMS	48	6,60	2000	21	1		1,15±0,23	0,00±0,00	0,00±0,00	2,01±0,44
EPS_{M59} + MMS	48	40,00	2000	8	1		0,50±0,16*	0,05±0,05	0,00±0,00	2,00±0,44
	48	80,00	2000	10			0,50±0,16*	0,10±0,07	0,00±0,00	1,98±0,44
	48	160,00	2000	8			0,40±0,14**	0,05±0,05	0,00±0,00	2,13±0,46
	48	320,00	2000	7			0,35±0,13**	0,05±0,05	0,00±0,00	1,95±0,44
	48	640,00	2000	8			0,40±0,14**	0,00±0,00	0,00±0,00	2,08±0,45

*Pozitif kontrole göre p<0,05 düzeyinde anlamlı (z testi)
**Pozitif kontrole göre p<0,01 düzeyinde anlamlı (z testi)



Şekil 4.19. EPS_{M59} + MMS'nin 48 saatlik eş zamanlı muameleleri sonucu periferal insan lenfositlerinde oluşturdukları mikronükleus, nükleer tomurcuk ve nükleoplazmik köprü frekansları

4.4. EPS_{M59}'un Hidrojen Peroksit (H_2O_2) Tarafından Oluşturulmuş Hasara Karşı Antigenotoksik Etkileri

4.4.1. Comet kuyruk yoğunluğu, kuyruk uzunluğu ve kuyruk momenti parametreleri üzerine etkileri

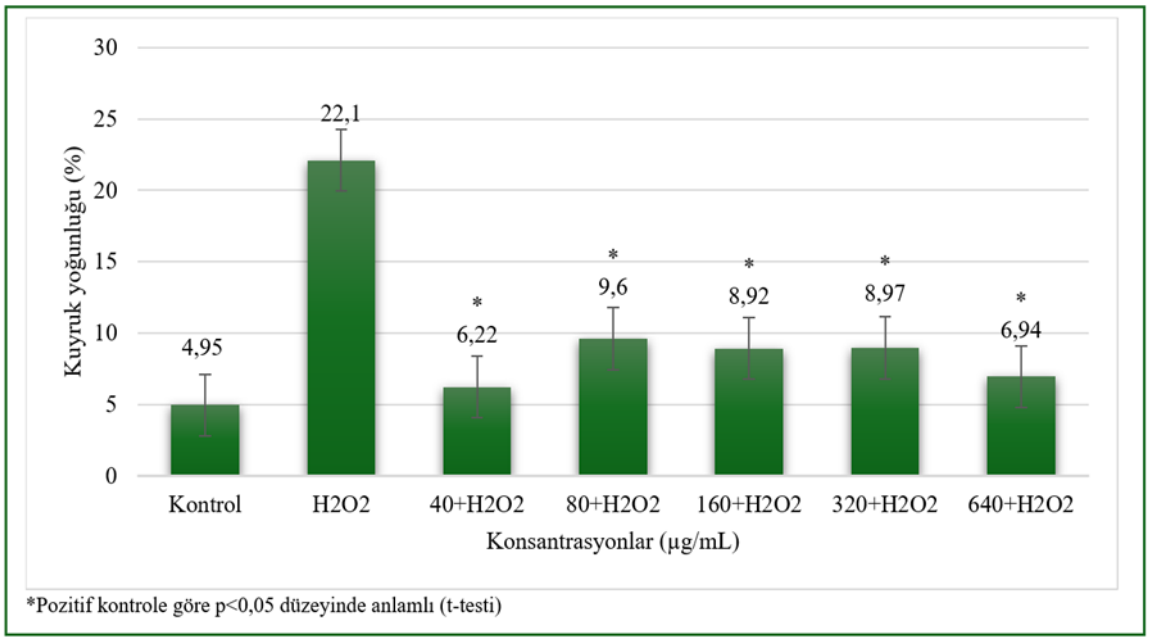
EPS_{M59}'un H_2O_2 tarafından oluşturulmuş DNA hasarına karşı koruyucu/iyileştirici potansiyeli izole insan lenfositlerinde incelenmiştir. Comet testi sonucu elde edilen kuyruk yoğunluğu, kuyruk uzunluğu ve kuyruk momenti parametreleri değerlendirilmiştir (Çizelge 4.9).

EPS_{M59}'un 1 saatlik eş zamanlı H_2O_2 muamelesi sonucu tüm konsantrasyonlarda H_2O_2'nin neden olduğu DNA hasarını azalttığı belirlenmiştir. Pozitif kontrole göre (H_2O_2) kuyruk yoğunluğu (r=-0,62), kuyruk uzunluğu (r=-0,41) ve kuyruk momenti (r=-0,62) parametrelerinde istatistiksel olarak anlamlı, orta (r=-0,62 ve r=-062) ve zayıf (r=-0,41) korelasyonla konsantrasyona bağlı azalmalar tespit edilmiştir (Çizelge 4.9, Şekil 4.20, Şekil 4.21, Şekil 4.22).

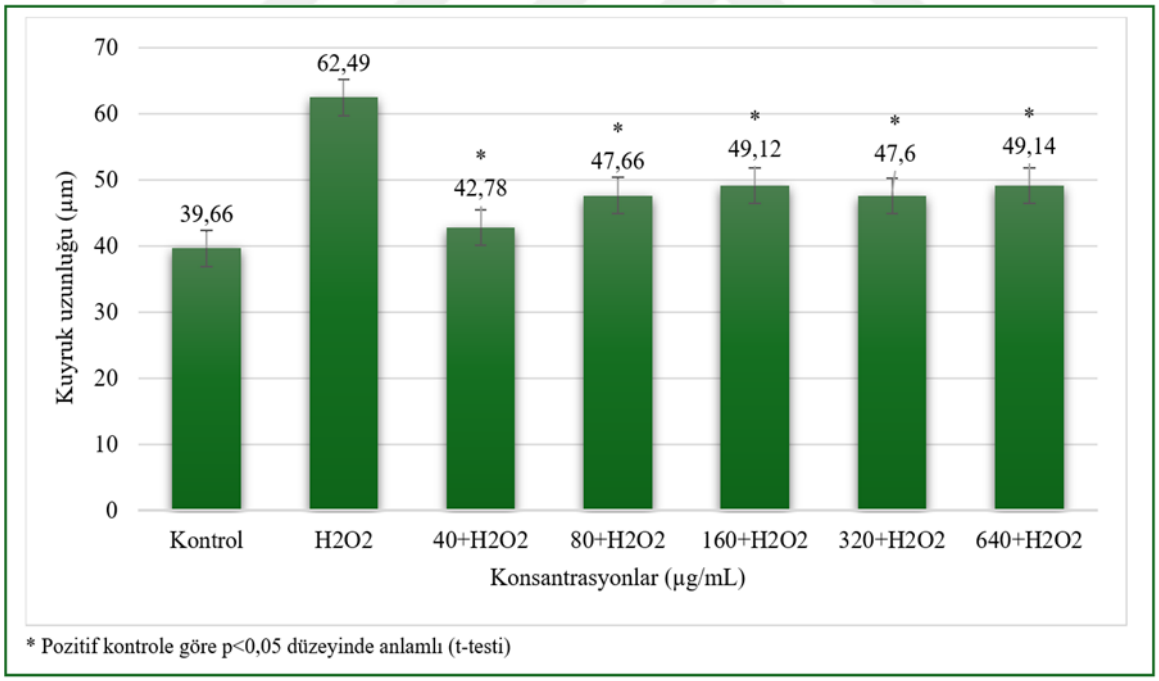
Çizelge 4.9. EPS_{M59} + H_2O_2 eş zamanlı muamelesinin izole lenfositlerde kuyruk yoğunluğu (%), kuyruk uzunluğu (µm) ve kuyruk momenti parametreleri üzerine etkileri

Test Maddesi	Uygulama		Kuyruk Yoğunluğu (%)	Kuyruk Uzunluğu (µm)	Kuyruk Momenti
	Süre (saat)	Konsantrasyon (µg/mL)			
Negatif Kontrol	1	0,00	4,95± 0,48	39,66±0,35	0,95±0,09
Pozitif Kontrol (H_2O_2)	1	100 µM	22,10±1,32	62,49±1,07	5,57±0,35
EPS_{M59} + H_2O_2	1	40,00	6,22±0,66*	42,78±0,61*	1,22±0,14*
		80,00	9,60±0,80*	47,66±0,63*	1,95±0,17*
		160,00	8,92±0,79*	49,12±0,65*	1,93±0,18*
		320,00	8,97±0,77*	47,60±0,62*	1,84±0,16*
		640,00	6,94±0,66*	49,14±0,52*	1,46±0,14*

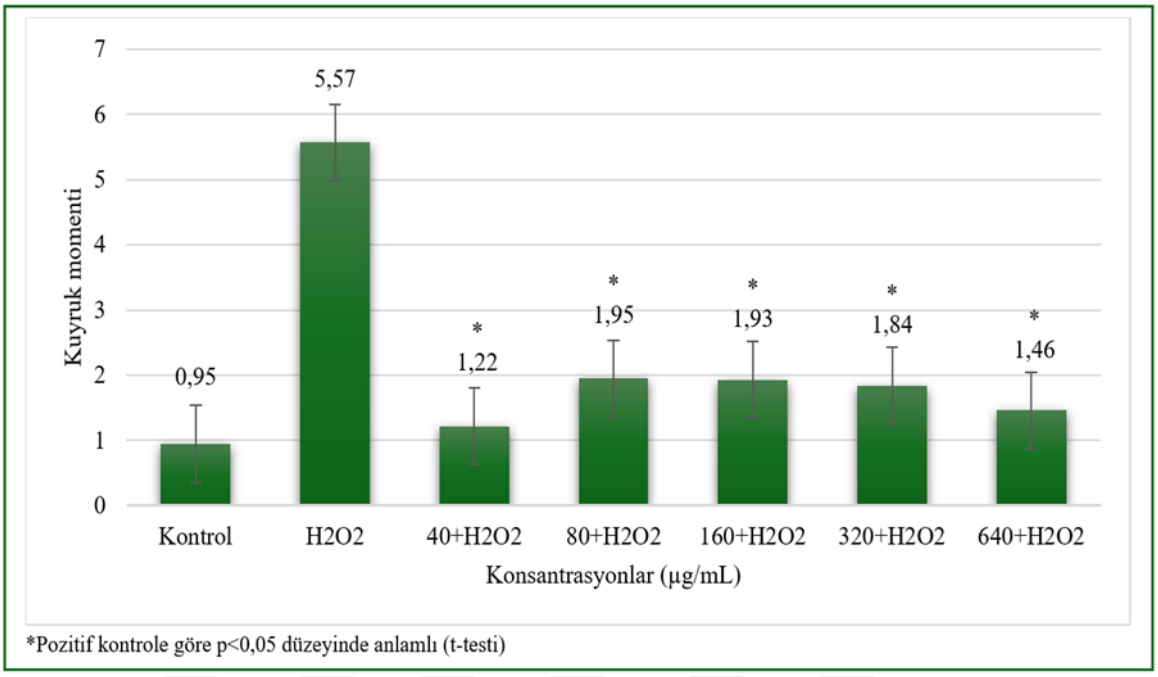
*Pozitif kontrole göre $p<0,05$ düzeyinde anlamlı (t-testi)



Şekil 4.20. EPS_{M59} + H_2O_2 eş zamanlı muamelesinin izole insan lenfositlerinde kuyruk yoğunluğu üzerine etkisi



Şekil 4.21. EPS_{M59} + H_2O_2 eş zamanlı muamelesinin izole insan lenfositlerinde kuyruk uzunluğu üzerine etkisi



Şekil 4.22. EPS_{M59} + H_2O_2 eş zamanlı muamelesinin izole insan lenfositlerinde kuyruk momenti üzerine etkisi

4.5. EPS_{M59}'un RT-qPCR Yöntemiyle Epigenetik Değişiklikler Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi

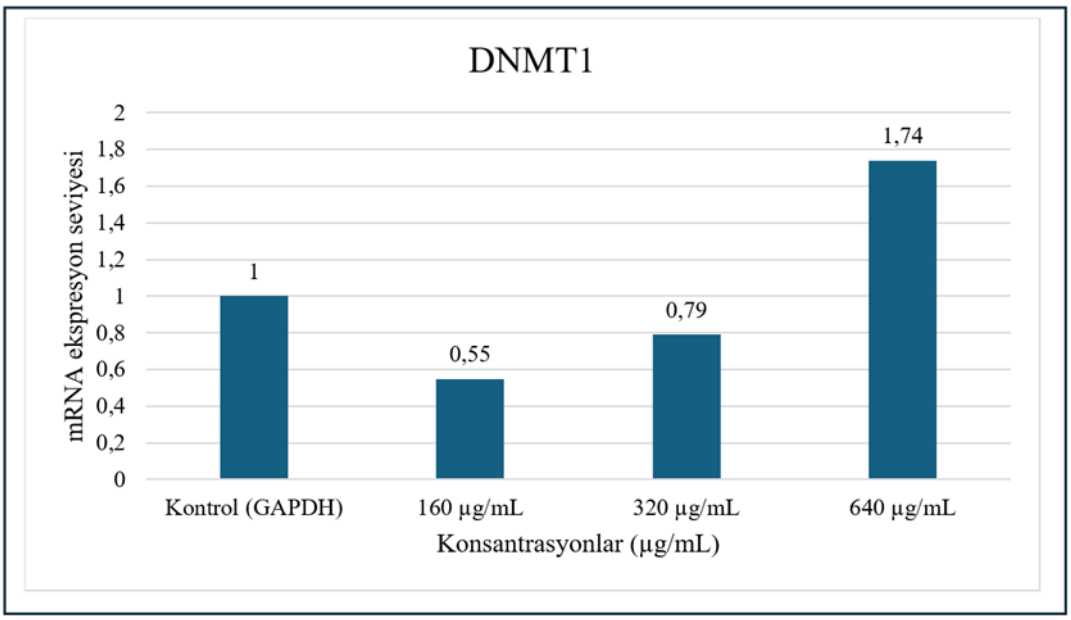
4.5.1. EPS_{M59}'un DNA metiltransferaz 1 (DNMT1), DNA metiltransferaz 3A (DNMT3A), DNA metiltransferaz 3B (DNMT3B) ve histon deasetilaz 1 (HDAC1) genlerinin ekspresyon düzeyleri üzerine etkisi

EPS_{M59}'un kromozomal anormallik (KA), mitotik indeks (Mİ) ve sitokinez blok mikronükleus sitom (CBMN-Cyt) testleri sonuçları değerlendirildiğinde en etkin konsantrasyonların 160, 320 ve 640 µg/mL'lik konsantrasyonlar olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle lenfosit kültürüne bu konsantrasyonlar 48 saatlik süreyle uygulanmış ve daha sonra RT-qPCR analizi için kullanılmıştır. DNMT1, DNMT3A, DNMT3B ve HDAC1 genlerinin ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi için RNA izolasyon kiti ile RNA izolasyonu yapılmıştır ve izole edilen total RNA'dan cDNA sentezi yapılmıştır. Son aşamada RT-qPCR analizi yapıldıktan sonra elde edilen Ct (döngü eşiği) değerleriyle, karşılaştırmalı ΔΔCt metodu ile gen ekspresyonundaki değişiklikler hesaplanmıştır. Elde edilen ΔΔCt değerleriyle gen ekspresyonundaki kat cinsinden değişiklikler ($2^{-\Delta\Delta Ct}$ yöntemiyle) göreli kantitatif değer (RQ) olarak ifade edilmiştir.

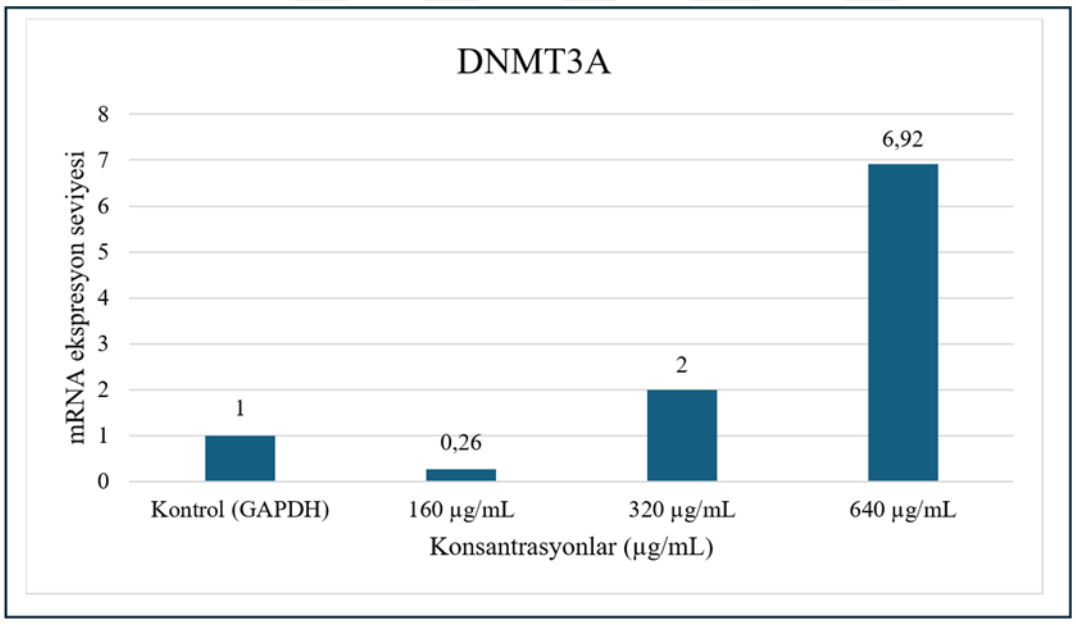
Çalışmada kullanılan EPS_{M59}'un 160, 320 ve 640 µg/mL konsantrasyonlarının 48 saatlik muamelesi sonucu DNMT1, DNMT3A, DNMT3B ve HDAC1 genlerindeki mRNA düzeyindeki değişiklikler Çizelge 4.10, Şekil 4.23, Şekil 4.24, Şekil 4.25, Şekil 4.26'da verilmiştir. Sonuçlar gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz (GAPDH) grubuna göre değerlendirilmiştir. DNMT1 geninin mRNA ekspresyon seviyelerinde kontrole kıyasla 160 ve 320 µg/mL konsantrasyonunda azalma meydana gelirken 640 µg/mL konsantrasyonlarında gen ekspresyon seviyelerinde artış tespit edilmiştir. DNMT3A geninin mRNA ekspresyon seviyelerinde kontrole kıyasla 160 µg/mL konsantrasyonunda azalma meydana gelirken 320 ve 640 µg/mL konsantrasyonlarında gen ekspresyon seviyelerinde artış tespit edilmiştir. DNMT3B geninin mRNA ekspresyon seviyelerinde 320 µg/mL konsantrasyonda mRNA ekspresyonu azalma meydana gelirken, 160 ve 640 µg/mL konsantrasyonlarında mRNA gen ekspresyon seviyelerinde artış tespit edilmiştir. HDAC1 geninin mRNA ekspresyon seviyelerinde ise kontrole kıyasla tüm konsantrasyonlarında (160, 320 ve 640 µg/mL) artış tespit edilmiştir. (Çizelge 4.10, Şekil 4.23, Şekil 4.24, Şekil 4.25, Şekil 4.26). Sonuçlar genel olarak değerlendirildiğinde DNMT1, DNMT3B genleri üzerinde mRNA gen ekspresyonun baskılanmasına neden olan konsantrasyonun 320 µg/mL olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca DNMT1 ve DNMT3A mRNA genlerinin ekspresyonlarının baskılanmasına neden olan konsantrasyonun 160 µg/mL olduğu tespit edilmiştir. 640 µg/mL konsantrasyonunda ise tüm genlerin ekspresyonlarında artış meydana gelmiştir.

Çizelge 4.10. DNMT1 DNMT3A, DNMT3B ve HDAC1 genlerinin ΔΔCt, RQ değerleri, mRNA ekspresyon düzeyleri

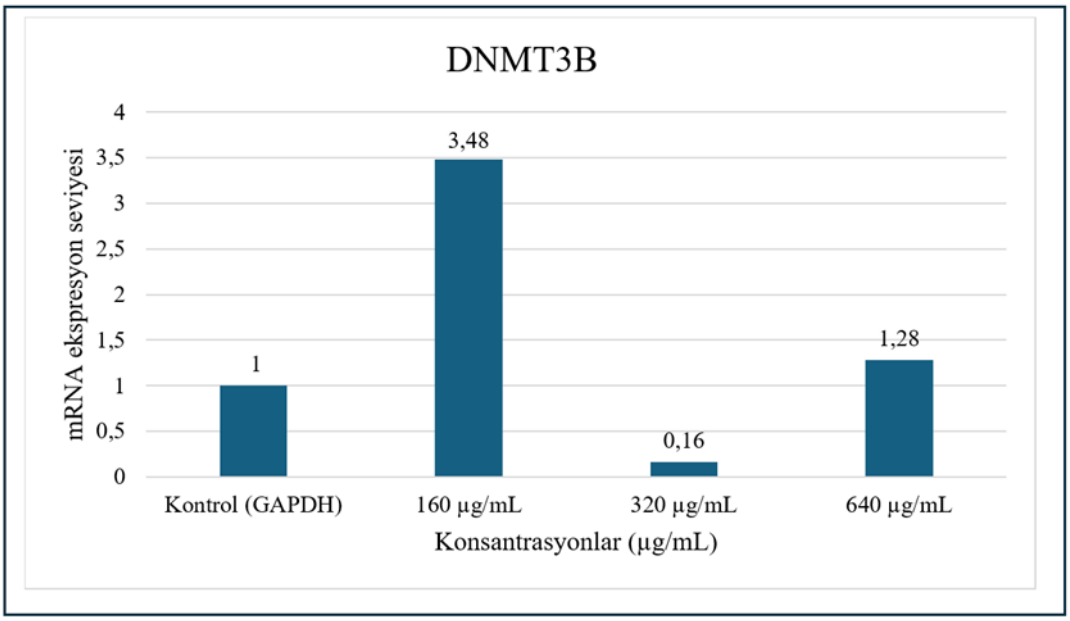
Gen	Konsantrasyon (µg/mL)					
	160,00 (ΔΔCt)	160,00 RQ	320,00(ΔΔCt)	320,00 RQ	640,00 (ΔΔCt)	640,00 RQ
GAPDH		1		1		1
DNMT1	0,84±0,59	0,55	0,33±1,08	0,79	-0,80±1,83	1,74
DNMT3A	1,97±0,05	0,26	-1,0±1,22	2,0	-2,79±1,15	6,92
DNMT3B	-1,81±0,42	3,48	2,61±2,41	0,16	-0,36±1,95	1,28
HDAC1	-1,63±0,41	3,10	-2,03±2,05	4,09	-3,05±0,61	8,36



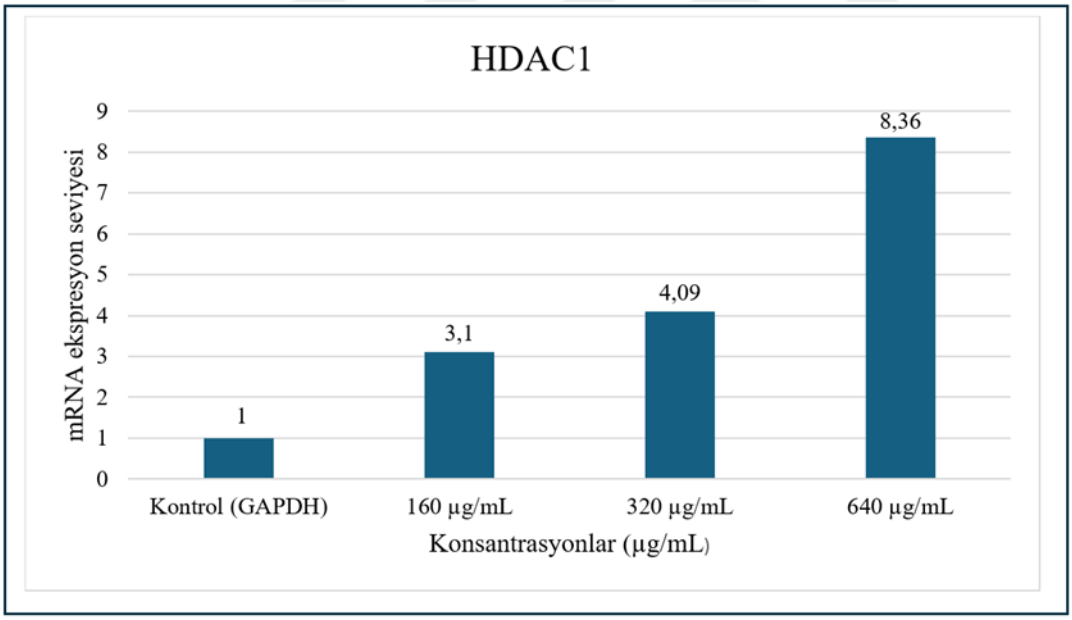
Şekil 4.23. EPS_{M59} uygulamasının DNMT1 geni RQ değeri, mRNA ekspresyonu düzeyi üzerine etkileri



Şekil 4.24. EPS_{M59} uygulamasının DNMT3A geni RQ değeri, mRNA ekspresyonu düzeyi üzerine etkileri



Şekil 4.25. EPS_{M59} uygulamasının DNMT3B geni RQ değeri, mRNA ekspresyonu düzeyi üzerine etkileri



Şekil 4.26. EPS_{M59} uygulamasının HDAC1 geni RQ değeri, mRNA ekspresyonu düzeyi üzerine etkileri

Çizelge 4.11; 4.12 ve 4.13'te tez çalışması kapsamında tüm genotoksisite/antigenotoksisite ve epigenetik değişiklikler ile ilgili olarak elde edilen sonuçlar özetlenmiştir.

Çizelge 4.11. EPS_{M59}, EPS_{M59}+MMC ve EPS_{M59}+MMS uygulamaları KA ve CBMN-Cyt testlerinin sonuçları

Test maddesi	Uygulama		Anormal Hücre Yüzdesi	KA/Hücre	Mİ	MN	NT	NPK	NBİ
	Süre (saat)	Konsantrasyon (µg/mL)							
EPS_{M59}	24	40,00	-	-	-	-	-	-	-
		80,00	-	-	-	-	-	-	-
		160,00	-	-	-	-	-	-	-
		320,00	-	-	-	-	-	-	-
		640,00	-	-	-	-	-	-	-
	48	40,00	-	-	-	-	-	-	-
		80,00	-	-	⇩	-	-	-	-
		160,00	-	-	-	-	-	-	-
		320,00	-	-	-	-	-	-	-
		640,00	-	-	-	-	-	-	-
EPS_{M59}+MMC	24	40,00	⇩	⇩	-				
		80,00	⇩	⇩	-				
		160,00	⇩	⇩	-				
		320,00	⇩	⇩	⇧				
		640,00	⇩	⇩	-				
	48	40,00	⇩	⇩	-	⇩	-	-	-
		80,00	⇩	⇩	-	⇩	-	-	-
		160,00	⇩	⇩	-	⇩	-	-	-
		320,00	⇩	⇩	-	⇩	-	-	-
		640,00	⇩	⇩	⇧	⇩	-	-	-
EPS_{M59}+MMS	24	40,00	-	-	-				
		80,00	-	-	-				
		160,00	-	-	-				
		320,00	⇩	⇩	⇧				
		640,00	⇩	⇩	⇧				
	48	40,00	⇩	⇩	⇧	⇩	-	-	-
		80,00	⇩	⇩	⇧	⇩	-	-	-
		160,00	⇩	⇩	-	⇩	-	-	-
		320,00	⇩	⇩	⇧	⇩	-	-	-
		640,00	⇩	⇩	⇧	⇩	-	-	-

Negatif kontrole göre anlamlı değil –
Negatif kontrole göre anlamlı azalış ⇩

Pozitif kontrole (MMC) göre anlamlı artış ⇧
Pozitif kontrole (MMC) göre anlamlı değil –
Pozitif kontrole (MMC) göre anlamlı azalış ⇩

Pozitif kontrole (MMS) göre anlamlı artış ⇧
Pozitif kontrole (MMS) göre anlamlı değil –
Pozitif kontrole (MMS) göre anlamlı azalış ⇩

Çizelge 4.12. Comet test sonuçları

Test maddesi	Uygulama		Kuyruk yoğunluğu (%)	Kuyruk uzunluğu (µm)	Kuyruk momenti
	Süre (saat)	Konsantrasyon (µg/mL)			
EPS_{M59}	1	40,00	⇓	⇓	⇓
		80,00	-	⇓	-
		160,00	⇓	⇓	⇓
		320,00	⇓	⇓	⇓
		640,00	⇓	⇓	⇓
$EPS_{M59}+H_2O_2$	1	40,0	⇩	⇩	⇩
		80,00	⇩	⇩	⇩
		160,00	⇩	⇩	⇩
		320,00	⇩	⇩	⇩
		640,00	⇩	⇩	⇩
Negatif kontrole göre anlamlı değil –					
Negatif kontrole göre anlamlı azalış ⇓					
Pozitif kontrole göre (H_2O_2) anlamlı azalış ⇩					

Çizelge 4.13. RT-qPCR sonuçları

Genler/RQ değerleri (Gen ekspresyonundaki değişiklikler)				
Konsantrasyon (µg/mL)	DNMT1	DNMT3A	DNMT3B	HDAC1
160,00	⇓ %45	⇓ %74	⇑ %248	⇑ %210
320,00	⇓ %21	⇑ %100	⇓ %84	⇑ %309
640,00	⇑ %74	⇑ %592	⇑ %28	⇑ %736

5. TARTIŞMA

Temel besin değerlerinden ziyade sağlık açısından faydalar sağlayan fonksiyonel gıdalar, son zamanlarda önem kazanmıştır. Fonksiyonel gıda ve nutrasötiklerin bileşimleri incelendiğinde, klasik gıdalardan farklı olarak çok çeşitli biyoaktif bileşikler içermektedirler (Akhtar ve diğerleri, 2024). Birçok fonksiyonel gıdada bol miktarda bulunan antioksidanlar, sağlık açısından zararları olan serbest radikalleri etkisiz hale getirerek oksidatif stres ve enflamasyonu azaltmaktadır. Bazı nutrasötiklerde yaygın bulunan omega-3 yağ asitleri ise lipit seviyelerini düzenleyerek, kalp hastalığı riskini azaltarak kardiyovasküler faydaları bulunmaktadır (Singh ve diğerleri, 2023; Vignesh ve diğerleri, 2024). Hem fonksiyonel gıdalar hem de nutrasötikler hastalıklara karşı biyolojik ve işlevsel faydalar göstermelerinin yanı sıra koruyucu etki gösterirler (Araújo-Rodrigues ve diğerleri, 2024). Proteinler, yağ asitleri, fitosteroller, biyoaktif peptitler, fenolik bileşikler, prebiyotikler ve probiyotikler en yaygın kullanılan fonksiyonel bileşiklerden bazılarıdır (Alu'datt ve diğerleri, 2024; Essa ve diğerleri, 2023).

İnsan sağlık ve hastalığında bağırsak mikrobiyomu son derece önemlidir. Beslenme tarzı ve birçok çevresel faktör tarafından sürekli olarak yeniden şekillendirilebilen bağırsak mikrobiyotası dengesinin bozulması (bağırsak disbiyozu) durumunda çeşitli metabolik, kardiyovasküler hastalıklar, nörolojik, bağırsak hastalıkları ve hatta tümör gelişimini tetikleyebilmektedir. Besin/gıda takviyesi ve/veya yardımcı terapi olarak kullanıldıklarında koruyucu, hafifletici ve hatta iyileştirici etki gösteren probiyotiklerin faydalı ve/veya semptom hafifletici etkileri genellikle bağırsak mikrobiyom ve metabolom değişiklikleriyle birlikte görülmektedir (Kim ve Mills, 2024; Ma ve diğerleri, 2023). Gıdalardaki sindirilemeyen karbonhidrat sınıfı olan prebiyotikler, yararlı bağırsak mikroorganizmalarının büyümesini ve metabolik aktivitesini seçici olarak uyararak konakçıya sağlık açısından fayda sağlarlar (Du ve diğerleri, 2024). Ayrıca son zamanlarda yapılan çalışmalarda prebiyotiklerin, antidepresanların neden olduğu yan etkilere karşı etkili olabileceği bildirilmektedir (Mötteli ve diğerleri, 2024; Ye ve diğerleri, 2025).

Mayalarda hücre duvarı polisakkarit bileşenleri hem yapısal hem de edinilmiş bağışıklığı geliştirmesinin yanı sıra, kandaki kolesterol seviyesini düşürür, antioksidan aktivite sergiler, yara iyileşmesini hızlandırır, patojenlerin bağırsak epitellerine adezyonunu önler ve mikrobiyal toksinleri orta düzeyde absorbe eder (de Araújo ve diğerleri, 2017; Liu ve

diğerleri, 2021). Probiyotik mayalarda biyoterapötik kullanım potansiyeli bulunmakla beraber birçok gıdalardan elde edilen probiyotik mayaların konak ilişkili işlevlerinde, patojenlerle rekabet etme, hücre dışı enzim salgılama ve antimikrobiyal, antioksidan ve anti-inflamatuar aktivite sergileme yeteneklerine sahip olduklarını bildirmiştir. *Kluyveromyces marxianus*'un mayalarda görülen tüm bu özelliklere sahip olan bir tür olduğu *in vitro* çalışmalarda ispatlanmıştır. Ayrıca son zamanlarda birçok maya türü içerisinde *Kluyveromyces marxianus* araştırmalarda ilgi odağı olmuştur (Dong ve diğerleri, 2025; Kunyeit ve diğerleri, 2024).

Mikroorganizmaların zorlu çevresel koşullara (sıcaklık, pH ve antibiyotikler) uyum sağlamak için ürettiği ekzopolisakkaritler (EPS'ler) birçok kullanım alanı ve yararlı özelliklerinin olmasının yanı sıra farmasötiklerde, nutrasötiklerde ve fonksiyonel gıdalarda potansiyel kullanımı insan sağlığını iyileştirebilir, hastalıkların tedavisine yardımcı olabilir ve bağışıklık sistemini destekleyebilir (Kahraman-Ilıkkan ve diğerleri, 2024; Zaghloul ve Ibrahim, 2022; Paulo ve diğerleri, 2012). EPS'lerin sağlık açısından faydaları arasında antioksidan, fotoprotektif, anti-inflamatuar, antimutajenik, nöroprotektif ve immünmodülatör etkileri bulunmasıyla birlikte yapılan *in vitro* çalışmalar proinflamatuar mediatörler olan interlökin-1ß, siklooksijenaz-2, tümör nekroz faktörü-α, IL-6, IL12 ve IL10 gibi anti-inflamatuar sitokinlerin üretimini teşvik ettiğini göstermiştir (Kahraman-Ilıkkan ve diğerleri, 2024; Kwon ve diğerleri, 2020; Wu ve diğerleri, 2021). Maya EPS'leri ile ilgili az bilgi bulunmasına karşın bakteriyel EPS'lere kıyasla yüksek biyosentez verimi ve besi ortamında daha kolay ayrıştırılmaları nedeniyle ayrıca biyolojik aktiviteleri, gıda, ilaç ve kozmetik alanlarındaki uygulamaları nedeniyle giderek daha fazla ilgi görmektedirler (Saadat ve diğerleri, 2021). EPS'lerin kimyasal modifikasyonlarından biri olan karboksimetilasyon sudaki çözünürlüğü arttırmasının yanı sıra biyoaktivitelerini arttırabilir/geliştirebilir (Gao ve diğerleri, 2024; Soumya ve Nampoothiri, 2023).

Daha önce yapılan çalışmalardan *K. marxianus* Y72 suşundan izole edilen EPSY72'nin kolesterol seviyeleri üzerine etkisi değerlendirildiğinde kolesterol adsorpsiyonu (kolesterol seviyesinin düşmesi) tespit edilmiştir. Ayrıca EPSY72'nin konsantrasyonla birlikte artan DPPH radikali süpürme aktivitesi göstermektedir. Dolayısıyla bu EPS'nin antioksidan aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir. EPSY72'nin, *Eschericha coli*, *Salmonella typhi*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus* ve *Staphylococcus aureus* gibi farklı patojenik mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal etki göstermediği bildirilmiştir. Araştırmacılar

mayalardan izole edilen EPS'lerin, bakteriyel EPS'lere kıyasla daha avantajlı olduğunu çünkü antibiyotik direnç genlerini patojenlere aktarma riski taşımadığını belirtmişlerdir. Ayrıca araştırmacılar *K. marxianus*'dan izole edile EPS'nin özellikle prebiyotik geliştirme ve bağırsak mikrobiyomunu iyileştirme gibi biyoteknolojik ve tıbbi uygulamalar için potansiyel bir kaynak olduğunu bildirmişlerdir (Sharma ve diğerleri, 2023). Başka bir *K. marxianus*'dan izole edilen EPS ile yapılan çalışmada, EPS'nin kolon kanseri hücre hatları üzerinde proliferasyonun inhibisyonu, apoptoz indüksiyonu, inflamasyonun baskılanması ve bazı metabolik değişikliklere sebep olarak antikanser etki gösterdiği tespit edilmiştir. Ayrıca araştırmacılar probiyotik mayalardan izole edilen prebiyotik EPS'lerin koruyucu/iyileştirici etkilere sahip olmasının yanı sıra kolorektal kanser ile mücadelede hedefe yönelik terapötik bir potansiyeli olduğunu bildirmişlerdir (Saadat ve diğerleri, 2020).

EPS'ler izole/elde edildiği kaynak, spesifik biyoaktiviteleri, moleküler ağırlık (Mw) ve EPS'nin yapısal özellikleri dahil olmak üzere birçok faktörlerden etkilenebilir. Şeker bileşimi, şeker bağlanma tipleri, zincir uzunluğu, bağ konfigürasyonları ve yan grupların EPS'lerin biyolojik aktivitelerini/özelliklerini belirlediği bildirilmektedir. Bu bağlamda EPS'lerin fizikokimyasal karakterizasyonu, potansiyel uygulamaların belirlenebilmesi için son derece önemlidir (İnanan ve diğerleri, 2024; Tarique ve diğerleri, 2023; Yang ve diğerleri, 2022).

Literatür araştırmaları sonucu karboksimetilasyon ile polisakkaritlerin suda çözünürlüğü ve biyolojik aktivitesini arttırdığı değerlendirilmesi yapılarak EPS_{M59} biyopolimeri karboksimetilasyon işlemine tabii tutulmuştur. EPS_{M59}'un hem modifiye edilmemiş hem de karboksimetillenmiş örneklerinin karakterizasyonu (FT-IR) ve SEM-EDX ile yapılmıştır.

Çalışmada, EPS_{M59}'un yüzey morfolojisinin pürüzlü ve düz bir yapıya sahip olduğu gözlenmiştir. Literatürde EPS'lerin elde edildiği bakteri türü ve suşuna göre yüzey morfolojilerinin değişiklik gösterdiği görülmüştür. Goh vd. (2005)'nin yaptıkları çalışmaya göre *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* suşundan elde edilen EPS'nin yüzey morfolojisinde 3-13,5 nm arasında değişen küresel topaklar ve lifli ağ oluşumu tespit etmiştir (Goh ve diğerleri, 2005). Bir maya türü olan *Hortoea werneckii*'den elde edilen EPS'nin yüzey morfolojisinin düzensiz ve gözenekli bir yapısı ile karakterize düzensiz bir morfoloji ortaya koyduğu görülmüştür (Zaghloul ve diğerleri, 2024). Başka bir çalışmada *S. cerevisae* Y3 suşsundan elde edilen EPS'nin yüzeyinin pürüzsüz, parlak, katmanlı ve sık dokulu bir

morfoloji ortaya koyduğu görülmüştür (Liu ve diğerleri, 2022). *Sporidiobolus pararoseus* PFY-Z1 suşundan izole edilen EPS'nin yüzey morfolojisinin pürüzlü, düzensiz çıkıntıların olduğu ve çok sayıda gözenekli düzensiz yapı morfolojisi ortaya koyduğu görülmüştür (Liu ve diğerleri, 2023). Sonuç olarak EPS'lerin gelişme ortamına, ekstraksiyon koşullarına ve saflığına bağlı olarak yüzey morfolojileri değişmektedir. EPS_{M59} için en yüksek atom yüzdesinin sırayla karbon ve klora ait olduğu belirlenmesiyle birlikte EPS polisakkarit temel yapısına uygunluk göstermektedir.

FT-IR bağların karakteristik frekanslarda titreşmesi/bant vermesi prensibiyle çalışmasıyla birlikte fonksiyonel grupların türünün tespit edilmesi ve bulunan bağların karakterizasyonunu belirlemek için kullanılan bir yöntemdir (Rana ve Upadhyay, 2020). *S. cerevisiae* Y3'ten izole edilen EPS ile yapılan FT-IR analizinde 3411 cm^{-1}'de geniş ve güçlü adsorpsiyon piki, polisakkaritlerin karakteristik piki olan O-H (hidroksil) bağının gerilme titreşiminden kaynaklandığı; 2932,28 cm^{-1}'de zayıf adsorpsiyon pikinin C-H bağının gerilme titreşimine; 1656,30 cm^{-1}'deki hafif güçlü bir pikin C=O bağının gerilme titreşimi olduğu düşünülmüştür. 1539,64 cm^{-1}'deki zayıf pikin $-CH_3$ bağı gerilme titreşimine; 1411,33 cm^{-1}'deki pikin tipik bir karboksil bağı olduğu; 1134,05 ve 1056,96 cm^{-1}'deki absorpsiyon piklerinin C-O bağının gerilme titreşimi olduğu düşünülmüştür (Liu ve diğerleri, 2022). Başka bir maya türü olan *Rhodotorula mucilaginosa* sp. GUMS16'dab izole edilen EPS ile yapılan FT-IR analizinde EPS'nin suda çözünmesinden sorumlu -OH gruplarının gerilme titreşiminden kaynaklanan 3285 cm^{-1}'de; C=O gerilim titreşiminde karakteristik olan 1600 cm^{-1}'de; metilen gruplarının olası varlığını gösteren 1392 cm^{-1}'de; sırasıyla polisakkaritlerin sülfoksit ve eter gruplarına atfedilen S=O veya C-O gerilme titreşimleri nedeniyle 1060 cm^{-1}'de dahil olmak üzere çeşitli tipik polisakkarit yapısına uygun absorpsiyon bantları sergilemiştir (Hamidi ve diğerleri, 2020). *Papiliotrema terrestris* PT22AV mayasından izole edilen EPS'nin FT-IR analizinde ise 3252 cm^{-1}'de gözlenen pik O-H'nin gerilme titreşimiyle; 2928 cm^{-1}'de belirlenen pik ise $-CH_3$ fonksiyonel grubunun varlığını gösteren C-H'nin gerilme titreşiminden kaynaklanmaktadır. 1638 ve1406 cm^{-1}'deki pikler sırasıyla karboksilik ve $-CH_3$ ve/veya CH_2 fonksiyonel gruplarına ait C=O gerilme ve C-H bükülme titreşimlerine atfedilebileceği bildirilmiştir. 1070 ve 599 cm^{-1}'deki keskin pikler sırasıyla C-O-C bağlarının ve glikozidik bağların varlığını gösterdiği bildirilmiştir (Hamidi ve diğerleri, 2023). *S. cerevisiae* mayasının ADT suşundan izole/elde edilen EPS'nin 4000 ile 500 cm^{-1} aralağındaki fonksiyonel grupların belirlendiği FT-IR analizinde; karbonhidratların karakteristik piki olan hidroksil grubunun O-H bağının gerilme

titreşimine tekabül eden 3500 ve 3100 cm^{-1}'de geniş, güçlü absorpsiyon pikleri gözlenmiştir. 2928 cm^{-1}'deki zayıf absorpsiyon piki C-H bağı gerilme titreşimine atfedilmiştir. 1654,92 cm^{-1}' de gözlenen güçlü absorpsiyon bantları ise C=O bağının gerilme titreşimine karşılık gelmektedir. 1533,40 cm^{-1}'deki zayıf pik ise -CH_3 grubunun gerilme titreşimine karşılık gelmektedir. 1411,89 cm^{-1}'deki tipik pikin ise karboksil bağı olduğu bildirilmiştir. 1255,65 cm^{-1} frekansı ise asetil gruplarının varlığını gösterdiği bildirilmiştir. Ayrıca polisakkaritlerin tipik olarak 1000 ile 1200 cm^{-1} arasındaki (1053,13; 1108,85; 1138,00) bantlarının alkol C-OH gruplarından veya ß-1,4-glukozid ve ß-1,4-mannan türlerinden kaynaklı C-O-C gerilme titreşiminden oluşabileceği bildirilmektedir. 908,47 cm^{-1}'deki absorpsiyon piki ise bir ß-glikozidik grubunu varlığını gösteresiyle birlikte, 814,96 cm^{-1}'deki absorpsiyon piki monosakkarit bileşiminin mannozun karakteristik absorpsiyonunu doğrulamakta olup, bu sonucun monosakkarit kompozisyonu ile uyumlu olduğu bildirilmiştir (Yong ve diğerleri, 2025). Bu tez çalışması kapsamında fonksiyonel grupları tespit etmek için gerçekleştirilen FT-IR analizinde, EPS_{M59}'un karboksimetilasyon öncesi ve sonrası FT-IR analizleri, kimyasal modifikasyonun başarılı bir şekilde gerçekleştiğini doğrulamaktadır. Modifikasyon öncesinde 1733 cm^{-1} ve 1651 cm^{-1} bölgelerinde karbonil (C=O) gerilme titreşimlerine ait belirgin pikler tespit edilirken, karboksimetilasyon sonrasında bu piklerin sırasıyla 1668 cm^{-1} ve 1628 cm^{-1} bölgelerine kaydığı ve pik yoğunluklarının arttığı gözlemlenmiştir. Bu kaymalar, karboksil (-COOH) ve karboksilat (-COO^{-}) gruplarının oluşumunu desteklemekte ve karboksimetilasyon işleminin başarıyla tamamlandığını göstermektedir. Ayrıca, modifikasyon sonrası 1465 cm^{-1} ve 1394 cm^{-1} bölgelerinde yeni absorpsiyon bantlarının belirlenmesi, karboksilat gruplarının asimetrik ve simetrik gerilme titreşimlerine işaret etmektedir. Modifikasyon öncesinde ~3700-3000 cm^{-1} aralığında geniş bir bant olarak gözlenen hidroksil (-OH) gerilme titreşimlerinin, karboksimetilasyon sonrası azalma göstermesi, hidroksil gruplarının kısmen karboksimetil gruplarına dönüştüğünü ortaya koymaktadır. Elde edilen bu veriler, EPS_{M59}'un başarılı bir şekilde karboksimetilasyona uğradığını ve yapısında belirgin kimyasal değişikliklerin meydana geldiğini kanıtlamaktadır. Diğer maya EPS'lerindeki FT-IR analizlerinin sonuçları değerlendirildiğinde bu tez çalışmasındaki sonuçlara benzer sonuçlar gözlendiği belirlenmiştir.

Kemoprevensiyon, kanser ile ilişkili komorbiditelerden korunmayı arttırmak ve kanserle ilişkili ölüm sayısını azaltmak amacıyla hastalık sürecinin herhangi bir aşamasında karsinogenezi engellemek, durdurmak veya tersine çevirmek için doğal veya sentetik

kökenli kimyasal ajanların kullanılmasını kapsamaktadır. Hücresel ve moleküler düzeyde kemoprevensiyon, kanser gelişiminin başlama, yayılma ve ilerleme aşamalarının herhangi biri sırasında işlevsel bozukluk gösteren protein aktivitelerini kontrol etmeyi hedeflemektedir (Santibanez ve diğerleri, 2023; Thompson ve Lutsiv, 2023).

Kimyasal mutajenez, alkilasyon ve/veya baz analoğu bileşiklerinin oluşumu gibi mekanizmalarla DNA'da hasar oluşturmak için çeşitli kimyasal maddelerin kullanılmasıdır. Alkilleyici ajanlar, tronia analogları, antibiyotikler, nitroso bileşikleri, baz analogları, hidroksilaminler ve akridin yaygın olarak kullanılan kimyasal mutajenez ajanlarıdır (Gao ve diğerleri, 2024; Zhang ve diğerleri, 2014). Antimutajenlerin fiziksel ve/veya kimyasal mutajenler tarafından indüklenen mutasyon frekansını azalttığı bildirilmiştir (Słoczyńska ve diğerleri, 2014; Tripathi ve diğerleri, 2024). Etki mekanizmalarına göre iki alt kategoriye ayrılan antimutajenlerden biri olan desmutajenler, hücre içi veya dışında mutajenler DNA'ya etki etmeden önce onları bloke/etkisiz hale getirirken; biyoantimutajenler DNA hasarı oluştuktan sonra hücre içi etki mekanizmasıyla DNA onarım ve replikasyonunun regülasyonu/düzenlemesi sonucu mutasyonlarda frekansını azaltırlar (Ramadan, 2023: 583,584; Rasgele ve Altın, 2023).

Son zamanlarda kanser vakalarının görülme sıklığındaki artış antimutajenik potansiyele sahip bileşiklerin araştırılmasını önemli kılmaktadır (Moreno ve diğerleri, 2023). Kanserlerin önlenmesine yardımcı olabilecek en iyi adaylar antimutajenik ve antioksidan potansiyele sahip ürünlerdir. Çoğu kanserin genetik mutasyonların birikiminden kaynaklandığı düşünülmesine rağmen özellikle doğal antimutajenlerin neoplastik indüksiyonu baskılayıcı rolü hala geniş çapta araştırılmamıştır. Antimutajenlerin, fiziksel ve kimyasal mutajenler tarafından indüklenen mutasyon frekansını azalttığı bildirilmektedir (Tripathi ve diğerleri, 2024). Bağırsak bozuklukları ve metabolik sendromlar, disbiyotik mikrobiyota gelişimi ile ilişkilidir ve bu nedenle probiyotik ve prebiyotiklerle mikrobiyal floranın düzenlenmesi önemlidir. Prebiyotiklerin ve probiyotiklerin biyoantimutajenik ve desmutajenik etki göstererek kanser hastalarında malignite tedavisi üzerinde önemli etkisi olduğu bildirilmiştir (Anastasilakis ve diğerleri, 2023).

Antimutajenlerin genel etki mekanizmaları; mutajenlerin doğrudan/direkt inaktivasyonu, Mutajenlerin kimyasal veya metabolik aktivasyonunun deaktivasyonu veya inhibisyonu, Mutajenlerin toksik etkilerine karşı DNA'nın korunması, DNA hasarının onarım ve

replikasyonunun düzenlenmesiyle mutasyon frekansının azaltılması, Hücre döngüsünün modülasyonu ve karaciğer detoksifikasyon sistemiyle etkileşim şeklinde sınıflandırılabilir (Akram ve diğerleri, 2020; Ramadan, 2023: 582,853).

DNA'nın nükleofilik kısımlarıyla reaksiyona girerek alkil grubunu kovalent transfer edebilen elektrofiller olan alkilleyici ajanlar, hücre döngüsünün herhangi bir aşamasında dinlenen veya çoğalan hücrelerle etkileşime girmesine karşın DNA hasarının onarılacak yeterli zaman olmadığı için en çok G1 ve S fazlarının sonunda sitotoksiktir. Alkilleyici ajanın neden olduğu DNA hasarının türü, kimyasal aktivitesine, reaktif bölge sayısına, DNA hasarına (çift iplik veya tek iplik kırığı) ve alkil grubu ekleme tipine bağlıdır. Monofonksiyonel alkilleyici ajanlar tek bir aktif kimyasal kısım içermesiyle birlikte sadece tek DNA ipliği ile etkileşime girerek kovalent eklentiler oluşturmasına karşın bifonksiyonel alkilleyici ajanlar iki reaktif kısım içermesiyle birlikte her iki DNA ipliği üzerinde iki atomla etkileşime girerek iplik içi çapraz bağ oluşturur. Bifonksiyonel alkilleyici ajanlar ise monofonksiyonel alkilleyici ajanlara göre daha sitotoksiktir. S_N1 tipi alkilleyici ajanlar O ve N atomlarını alkillerken, S_N2 tipi ajanlar esas olarak N atomlarını alkillemektedir (Andrés ve diğerleri, 2024; Chiorcea-Paquim ve Oliveira-Brett, 2023; Fahrer ve Christmann, 2023).

N-alkilasyon reaksiyonuyla DNA iplikleri arasında çapraz bağlar oluşturması sonucu replikasyon ve transkripsiyonu durduran, bifonksiyonel alkilleyici ajan olan Mitomisin-C (MMC) doğal bir antitümör antibiyotik ve alkilleyici sitostatik ilaçtır. MMC özellikle geç G1 ve erken S evrelerinde olmak üzere tümör hücreleri üzerinde etkili olan hücre döngüsüne özgü bir ilaçtır. MMC, OECD 487 (*in vitro* memeli hücreleri mikronükleus testi) test kılavuzunda önerilen pozitif kontrollerden birisidir. Sitogenetik çalışmalarda MMC, kromatid tipi anormallikler ve özellikle homolog kromozomlar arasında değişimler de dahil olmak üzere kromatid değişimleri oluşumuna neden olmaktadır. MMC'nin belirgin klastojenik etkilerinin yanı sıra, bazı anojenik aktiviteleri de vardır (Catalán ve diğerleri, 2024; OECD, 2023; Song ve diğerleri, 2023). Birçok kimyasal reaksiyonda çözücü katalizör olarak kullanımının yanı sıra haşere ve böcek kontrolünde, ayrıca kemoterapötik olarak kullanılan monofonksiyonel alkilleyici ajan olan metil metansüfonatın bilimsel araştırmalarda, farklı genetik materyallerde klastojenik ve mutajenik etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Ayrıca fare ve *in vitro* insan lenfositlerinde kromozom kırıklarına neden olduğu bildirilmiştir. Bu monofonksiyonel DNA alkilleyici ajan, neden olduğu genotoksik strese karşı hücre tepkisi mekanizmalarının araştırılmasında kullanılan bir model mutajendir.

MMS, DNA ile reaksiyona girerek DNA molekülüne bir metil grubu (-CH_3) aktarır. MMS esas olarak guanin bazlarının O6 konumunu hedef alır ancak guaninin N7'sini (N7-metilguanin) gibi N-metillenmiş pürin DNA bazlarının ve daha az oranda BER (baz düzeltme onarımı) tarafından uzaklaştırılan adeninin N3'ünü (N3-metiladenin) oluşumunu indükler. MMS'nin DNA alkilasyon sürecinde DNA'ya kovalent olarak bağlanmış metil grupları, metilenmiş DNA eklentileri oluşumuna yol açmaktadır. Bu eklentilerse DNA'nın yapısal bütünlüğünü değiştirerek DNA replikasyon ve transkripsiyonunu engellemektedir. MMC, DNA ile çapraz bağ yapabilirken MMS, DNA'da doğrudan çapraz bağ oluşturmamaktadır. Ayrıca bifonksiyonel alkilleyici ajan MMC'nin, monofonksiyonel alkilleyici ajan MMS'ye oranla daha fazla sitotoksik olduğu ve dolayısıyla daha fazla kromozomal anormalliklere neden olduğu bilinmektedir (Kim ve diğerleri, 2023; Mustafa ve diğerleri, 2024; Pehlivan ve diğerleri, 2023; Svetlova ve diğerleri, 2024).

Hidroksil radikali ($HO^{\cdot}$), süperoksit anyon radikali ($O_2^{\cdot-}$) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi reaktif oksijen türleri (ROT) elektron eksikliklerini tamamlamak için hücresel komponentlere zarar veren oldukça reaktif moleküllerdir. Ancak ROT'lerinin organizmalar için hem toksik hem de faydalı olarak iki farklı rolü bulunur. Düşük konsantrasyonlarda faydalı etkiler gösterip hücresel sinyal yollarını düzenleme, mitojenik yanıtlar, redoks düzenlemesi ve bağışıklık fonksiyonu gibi farklı fizyolojik süreçlere dahil olurken, yüksek seviyelerde nitrozatif ve oksidatif stres oluştururlar. Oksidatif stres makromoleküller üzerinde olumsuz etkilere neden olur. ROT baz eklentileri oluşturarak ve fosfodiester bağlarını kırarak DNA'ya hasar verir. ROT DNA'daki adenin ve guanini (8-oksoA ve 8-oksoG) oksitleyebilir ve/veya doğrudan ya da dolaylı olarak tek iplik veya çift iplik kırıklarına neden olabilir (Chaudhary ve diğerleri, 2023; Choi ve diğerleri, 2024; Wróblewski ve diğerleri, 2024). Ayrıca ROT tarafından indüklenen DNA hasarı, kanser veya diğer hastalıkların ayırt edici özelliği olan genomik kararsızlığa neden olabilecek mutasyon veya epigenetik değişikliklere yol açabilir (Besaratinia ve diğerleri, 2024; Caliri ve diğerleri, 2021). H_2O_2 hücrelerde ikinci bir haberci olarak işlev görerek proliferasyonu, farklılaşma ve yara iyileşmesini destekleyen sinyal yollarını aktive etmektedir. Ancak H_2O_2, demir gibi geçiş metal iyonlarının varlığında fenton reaksiyonuyla hidroksil radikali ($OH^{\cdot}$) oluşması nedeniyle hücreler için toksik özellikte olup DNA hasarına, nükleotidler arasındaki fosfodiester bağlarında kırıklara, lipid peroksidasyonuna ve katlanmamış/toplanmış proteinlerin oluşumuna neden olmasıyla hücre proliferasyonunu engeller ve hücre ölümüne sebep olabilir (Bayhan ve diğerleri, 2024; Jose ve diğerleri, 2024).

Bu tez çalışması kapsamında, tüm bu etkilerden dolayı EPS_{M59}'un antigenotoksik etkilerinin incelendiği çalışma grubunda, kromozomal anormallikleri testi ve sitokinez blok mikronükleus testlerinde bifonksiyonel alkilleyici ajan Mitomisin-C ve monofonksiyonel alkilleyici ajan Metil Metansülfonat kullanılırken, comet testinde hidrojen peroksit kullanılmıştır.

Gıdalar ve katkı maddeleri, endüstriyel kimyasallar, ilaçlar, kozmetik bileşenleri ve aslında her yeni bileşiğin *in vitro* ve/veya *in vivo* genotoksisite testleriyle genotoksik etkilerinin değerlendirilmesi oldukça önemlidir (Hendriks ve diğerleri, 2024). DNA hasarı, kromozomal hasarlar ve gen mutasyonlarının belirlenmesinde kullanılan genotoksisite testleri olası kanserojenler, mutajenler ve genotoksik maddelerin tespit edilmesinin yanı sıra, olası antimutajenik ve/veya antigenotoksik maddelerin toksik olduğu bilinen maddelerin etkilerine karşı koruyucu/iyileştirici potansiyellerinin değerlendirilmesini sağlamaktadır (Birla ve diğerleri, 2024; De Souza ve diğerleri, 2024). Comet ve sitokinez blok mikronükleus sitom testleri hızlı ve güvenilir olmalarından dolayı en çok tercih edilen genotoksisite testleri olmalarına karşın kromozomal anormallikleri testi, kromozomal hasara neden olan toksik maddelerin etkilerinin belirlenmesini sağlayan ancak değerlendirilmesi daha zahmetli ve uzun süre alan bir testtir. CBMN-Cyt testi kimyasalların hem klastojenik hem de anöjenik etkilerini tespit edilmesini sağlamaktadır. Comet testi ise bir kimyasalın neden olduğu ilk DNA hasarının tespit edilmesini sağlamaktadır (Luan ve Honma, 2022). Bu bağlamda yapılan çalışmalarda tek genotoksisite testi kullanmak yerine birbirlerini destekler nitelikte birden fazla genotoksisite testlerinin birlikte kullanımı hem sonuçların birbirleriyle kıyaslanması hem de daha güvenli/geçerli sonuçlar elde edilmesi açısından daha uygun olmaktadır.

Kromozomal anormallikleri testinde, lenfosit kültürlerine deney sonlandırmasına yakın, iğ ipliklerinin oluşumunu inhibe eden, mitozu metafazda durduran kolşisin ilave edilerek kromozomal anormalliklerin en uygun ve doğru şekilde incelenebileceği metafazların mikroskobik incelenmesi yapılmaktadır (İla ve Hüsunet, 2022: 153, 184). KA'lar, yapısal KA'lar ve sayısal KA'lar şeklinde sınıflandırılabilir. Yapısal KA'lar normal dizi bütünlüğünün bozulduğu kromozomal segmentlerin yer değiştirmesi, kaybı veya kazanımı yoluyla yeniden düzenlemeleri içermektedir. Ayrıca yapısal KA'lar yalnızca birkaç nükleotidi veya çok daha büyük segmentleri içerebilir. Mekanizmalarına göre kromozom ve kromatid tipi anormallikler olarak incelenebilir. Kromozom tipi anormallikler, periferik

lenfositlerde G0 (dinlenme fazı) fazındaki çift sarmal kırıkları oluşturan ajanlar/maddeler tarafından oluşturulur. Bu ajanlar arasında iyonlaştırıcı radyasyon ve alkilleyici ajanlar gibi kimyasal klastojenler bulunmaktadır. G0-G1 fazındaki lenfositlerde, kromozomal tipte anormalliklerin esasen çift sarmal kırıklarının nonhomolog DNA uç birleştirme veya homolog rekombinasyon onarımıyla onarılmamasından kaynaklanmaktadır. Kromozom tipi anormallikler, onarılmamış veya eksik onarılmış çift sarmal kırıklarının sonucunda oluşur. Kültüre periferik lenfositlerde DNA replikasyonundan sonra ve kromozomlar duplikasyona uğradığında, daha önce oluşan anormallikler ikiye katlanır ve metafazda kromozom tipi anormallikler (örneğin, halka ve disentrik kromozomlar) gözlenebilir (Hemminki ve diğerleri, 2024; Janssen ve diğerleri, 2011; Urakami ve diğerleri, 2016). Kromatid tipi anormallikler ise bir kromozomun sadece bir kromatitindeki değişimleri gösterir ve S fazına bağlı kimyasal ajanlar tarafından indüklenir. Kromatid tipi anormallikler baz modifikasyonlarından ve enzimatik olarak çift sarmal kırıklarına dönüştürülen tek sarmal kırıklarından ya da eksik veya başarısız DNA onarımından homolog rekombinasyon ile oluşmaktadır (Hemminki ve diğerleri, 2024). İki kırık kromozom birbirlerine yeterince yakın olduklarında, birlikte rekombine olabilir ve bu disentrik kromozom oluşumuyla sonuçlanır (Shen ve diğerleri, 2023). Kromozomda, iki kardeş kromatidde terminal kısımlardaki delesyonlar sebebiyle görülen kırık uçların yeninden birleşmesiyle kardeş kromatidlerde birleşme meydana gelmektedir (Savage, 1976). Kromatid değişimi anormalliğinde ise, kromozomlar arası değişimler sonucu oluşmasının yanı sıra quadriradial ve/veya triradial olarak iki tipte oluşabilmektedir (Satoh ve diğerleri, 2002). Sayısal anormallik kategorisindeki poliploidi, bir hücre fazladan kromozom setleri kazandığında ortaya çıkar ve normal iki set yerine üç veya daha fazla set oluşumuyla sonuçlanır. Kromozom sayısının artması, DNA dizilerinin kaybı ve kazanımı nedeniyle genetik varyasyonlarla birlikte epigenetik değişikliklere de katkıda bulunabilecek bir genom duplikasyonu olayına yol açar. Poliploidi ayrıca kanser, yaşlanma ve diyabet ile de ilişkilidir (Choudhury ve diğerleri, 2024; Ghosh ve diğerleri, 2024; Gjelsvik ve diğerleri, 2019; Song ve Chen, 2015). Diğer bir sayısal anormallik olan endoreduplikasyon, hücrelerde DNA replikasyonunu takiben mitoz gerçekleşmemesi durumunda ortaya çıkan bir anormallik olup poliploidi nedenlerinden biri olduğunu bildirilmiştir. Hücrenin poliploidizasyonuyla sonuçlanan ve birbirlerinden farklı endoreduplikasyon, endomitoz ve politenizasyon olmak üzere üç süreç vardır. Endoreduplikasyon sonucunda ise hücreler M fazını atlayarak tek çekirdekli poliploid hücre durumuna geçer. Ayrıca endoreduplikasyon oluşumunun sebeplerinden bir tanesi DNA çift iplik kırıklarıdır (İla ve Hüsunet, 2022: 153,184).

Genotoksinlere çevresel olarak ya da yaşam tarzı tercihleri dolayı maruz kalan bireylerde KA'lar, somatik hücrelerin normal karyotipinin keşfedilmesi, Philadelphia kromozomunun bulunması ve kromozom bantlamasının keşfedilmesinin ardından geçen yüzyılın ikinci yarısından itibaren kanser biyolojisi alanında kullanılmaktadır. KA'lar mutajenlerin genom üzerindeki etkisini yansıtan biyolojik son noktalardır. Lenfositlerdeki anormallik düzeylerinin, kansere eğilimli dokulardaki anormallik düzeyinin ve bu sebeple kanser riskinin göstergesi olduğu bildirilmektedir. Sonuçta yüksek KA frekansı, yüksek kanser riskinin bir göstergesi olarak kabul edilebilir. Çünkü KA oluşumunun DNA'daki zincir kırıklarının hatalı tamirinden de kaynaklanabileceği bildirilmektedir (Aydın ve Rencüzoğulları, 2019; Hemminki ve diğerleri, 2024; Savage, 1993).

Bu tez çalışması kapsamında, tek başına EPS_{M59} uygulama gruplarında kromatit kırığı, kromozom kırığı, fragment, kardeş kromatitlerde birleşme, disentrik kromozom olmak üzere 5 tip yapısal anormallik görülürken, poliploidi ve endoreduplikasyon olmak üzere 2 tip sayısal anormallik tespit edilmiştir. EPS_{M59}+MMC uygulama gruplarında ise kromatit kırığı, kromozom kırığı, fragment, kardeş kromatitlerde birleşme, kromatit değişimi ve disentrik kromozom olmak üzere 6 tip yapısal anormallik görülürken, poliploidi ve endoreduplikasyon olmak üzere 2 tip sayısal anormallik tespit edilmiştir. EPS_{M59}+MMS uygulama gruplarında ise kromatit kırığı, kromozom kırığı, fragment, kardeş kromatitlerde birleşme ve disentrik kromozom olmak üzere 5 tip yapısal anormallik görülürken, poliploidi ve endoreduplikasyon olmak üzere 2 tip yapısal anormallik tespit edilmiştir. Uygulama gruplarının hiçbirisinde halka kromozom tespit edilmemiştir. Ayrıca EPS_{M59}+ bifonksiyonel alkilleyici ajan MMC uygulama grubunda kromatit değişimi meydana gelirken EPS_{M59}+ monofonksiyonel alkilleyici ajan MMS uygulama grubunda kromatit değişimi meydana gelmemiştir. Bu durum bifonksiyonel alkilleyici ajan MMC'nin, DNA ile çapraz bağ yapabilme kabiliyetinden ve bunun sonucu kromatit değişimi anormalliğine sebep olmasından kaynaklanmaktadır.

Mitoz geçiren hücrelerin oranının tespit edildiği mitotik indekste meydana gelen azalma sitotoksik etkiyi göstermektedir. Mitotik indeksin düşmesinin/azalmasının sebebi mitokondriyal işlev inhibisyonu olduğu bildirilmektedir. Ayrıca mitotik indeksteki düşme/azalma genelde DNA sentezindeki bir inhibisyona veya G2 fazında durmaya atfedilmektedir. Bu bağlamda mitotik indeks özgüllüğü, hassasiyeti ve tekrarlanabilirliği nedeniyle sitotoksisite ve sitostatik etkinin belirlenebilmesi için yaygın olarak kullanılan bir

biyobelirteçtir (Al-Saleh ve diğerleri, 2025; Avuloğlu Yılmaz ve diğerleri, 2022; Chacón ve diğerleri, 2021; Sánchez-Moreiras ve Reigosa, 2018: 231,233).

Sitokinez blok mikronükleus sitom testinde, binükleat hücreleri analiz edebilmek için karyokinezi durdurmaksızın sitoplazma bölünmesinin engelleyen, aktin polimerizasyon inhibitörü Sitokalasin B (cyt-B) kullanılmaktadır. Bu testte hücrelerin test maddesine muamelesinden sonra mitoz gerçekleşmesi son derece önemlidir. Aksi takdirde genotoksisite ve/veya antigenotoksisite sonuçları yanlış yorumlanabilir. Kimyasal maddelerin sitostatik, sitotoksik ve genotoksik etkilerini araştırmak için yaygın olarak kullanılan bu testte binükleat hücrelerde, mikronükleusların (MN'lerin), nükleer tomurcukların (NT'lerin) ve nükleoplazmik köprülerin (NPK'ların) analizleri yapılabilmektedir. Anafaz esnasında hatalı onarımı, onarılmamış DNA kırıkları ve mitotik iğ hasarının neden olduğu yoğunlaşmış asentrik kromozom fragmentlerinden veya tüm kromozomlardan MN'ler oluşmaktadır. Bu bağlamda periferal lenfositlerde artan MN frekansı, kanser insidansı ile ilişkilidir. NPK'lar DNA kırıklarının yanlış onarımının yanı sıra telomer ucu füzyonları veya dekanetasyon başarısızlığıyla beraber disentrik kromozomlardan kaynaklanmaktadır. NT'ler ise DNA onarım genlerinin eliminasyonundan ve amplifiye olmuş genlerden (DNA amplifikasyonundan) kaynaklanmaktadır. CBMN-Cyt testi dahilinde sitostazı yansıtan proliferasyon kinetiğini belirli formüllerle nükleer bölünme indeksi (NBİ) veya sitokinez blok proliferasyon indeksi (CBPİ) kullanılarak değerlendirilmektedir (Amadio ve diğerleri, 2024; Gajski ve diğerleri, 2024; Hadi ve Stopper, 2025; Struys ve diğerleri, 2023; Yüzbaşıoğlu ve Avuloğlu-Yılmaz, 2022: 219, 249).

Bir ajanın neden olduğu ilk DNA hasarının tespit edilmesinde kullanılan comet/kuyruklu yıldız (tek hücre jel elektroforez) testi, DNA'da meydana gelen çift ve/veya tek iplik kırıklarının saptanmasında yaygın olarak kullanılan genotoksisite testidir. Hasara uğramış, negatif yüklü DNA parçalarının elektroforez ortamında hasar görmeyen DNA'yı içeren nükleoidden ayrılmasının ardından artı kutba göçüyle, bir baş ve kuyruk kısmı bulunan, kuyruklu yıldızı andıran görüntü oluşur. Kuyruk uzunluğu ne kadar fazlaysa hasar oranı da o kadar yüksek olduğu anlamına gelmektedir. Comet testi sonuçlarının değerlendirilmesinde yaygın olarak kuyruk yoğunluğu, kuyruk uzunluğu ve kuyruk momenti parametreleri kullanılmaktadır. Alkalin comet testinde yüksek alkali elektroforez tamponu, çift iplikli DNA'nın çözülmesi sonucu tek ipliklere ayrılmasına neden olarak tek iplik DNA kırıklarının da tespit edilmesini sağlar. Bu bağlamda alkalin comet testinde DNA'daki hem çift iplik

hem de tek iplik kırıkları tespit edilirken, nötral comet testinde yalnızca çift iplik kırıkları tespit edilmektedir. Bu sebeple alkalin comet testi, nötral comet testine kıyasla daha yaygın olarak kullanılmaktadır (Luan ve Honma, 2022; Ünal, Saygılı ve Akbaş, 2022: 313, 340).

Epigenetik değişiklikleri doğrudan etkileyen mekanizmalar olan DNA metilasyonunda DNA metiltransferazlar (DNMT'ler), histon modifikasyonlarında ise histon deasetilazlar (HDAC'lar) önemli role sahiptirler. Üzerine en çok çalışmalar yapılan DNA metilasyonu, gen ifadesi, genomik damgalama, kök hücre düzenlenmesi, X kromozomunun inaktivasyonu ve birçok hastalığın patogenezi dahil olmak üzere önemli bir rolü bulunmaktadır. DNA metilasyonunda S-adenozilmetiyonin (SAM) üzerindeki metil grubunu ($-CH_3$) sitozin moleküllerinin pirimidin C5 konumuna ekleyerek 5-metilsitozin (5mC) oluşur. Bu modifikasyon CpG dinükleotidlerinde meydana gelir. DNA metilasyonu, genomik stabiliteyi korur, promotör bölgelerinin metilasyonu yoluyla gen ekspresyonunu düzenler ve transkripsiyon faktörlerinin bağlanmasını engelleyerek genleri susturur. Artan DNA metilasyonu seviyeleri genellikle azalan gen aktivitesine karşılık gelir ve gen ifadesinin baskılanmasına sebep olur (Greenberg ve Bourc'his, 2019; Huang ve Aghaei-Zarch, 2024; Wang ve diğerleri, 2024; Zand ve diğerleri, 2024). HDAC'lar, histonlardan ve diğer protein düzenleyici elementlerden asetil gruplarını kaldıran ve bu sayede kromatin yapısıyla birlikte transkripsiyonel aktiviteyi etkileyen (gen ifadesinin azalmasına yol açan) fizyolojik değişimlere yol açmaktadır. HDAC'ların DNA onarımı, hücre döngüsünün düzenlenmesi, proliferasyon, hücre dayanıklılığı, farklılaşma, protein taşıma ve metabolizma gibi birçok biyolojik süreçte önemli rolleri bulunmaktadır (Milazzo ve diğerleri, 2020; Verza ve diğerleri, 2020; Zand ve diğerleri, 2024).

DNMT3A ve DNMT3B embriyogenez sırasında DNA metilasyon modellerinin oluşumunu denetler ve germ hücrelerinin oluşumu sırasında genomik damgalar oluştururlar. DNMT3A ve DNMT3B erken embriyogenezde bol miktarda ifade edilmesine karşın hücreler farklılaştıkça ifade seviyeleri azalmaktadır (Li ve Zhang, 2014; Zand ve diğerleri, 2024). DNMT3B'nin DNMT3A'ya kıyasla genom metilasyonunda daha güçlü bir etkiye sahip olduğu ve DNMT3B'nin inhibisyonunun yan etkilerinin daha fazla olduğu açıklanmıştır (Chen ve diğerleri, 2024). *De novo* metiltransferazlar olarak bilinen DNMT3A ve DNMT3B, metilasyon işaretlerini metillenmemiş DNA'ya doğrudan ekleyebilir. Bakım metiltransferazı olarak bilinen DNMT1, bu işaretleri, hemimetillenmiş CpG bölgelerini tanıyarak ve onları tamamen metillenmiş duruma geri getirerek sürdürebilir. DNMT işlev bozukluğu, DNA

zinciri boyunca belirli bölgelerde lokalize hipermetilasyona veya genel hipometilasyona neden olarak genomik kararsızlık ve çeşitli epigenetik bozukluklara sebep olabilir (Challen ve diğerleri, 2014; Maleknia ve diğerleri, 2023). Yapılan çalışmalar sonucunda DNMT1'in uzun süreli eksikliğinin ve bunun sonucunda DNA metilasyonundaki kaybın, genom stabilitesini bozabilecek hücresel stres sinyalleri oluşturduğu bildirilmiştir. Bu durumda metilasyon seviyesinin çok düşük seviyelere ulaşmadan hücre proliferasyonunu durdurmak amacıyla p53'e bağımlı p21 aktivasyonu teşvik edilmektedir. DNMT1 kaybı gibi stres faktörü, DNMT1 seviyelerinin geri kazanımıyla tersine çevirilebileceği ve bu sayede hücre proliferasyonunun tekrar başlayabileceği bildirilmiştir (Barra ve diğerleri, 2012; Martino ve diğerleri, 2024) DNMT'lerin aşırı eksprese edilmesi, mutasyona uğraması veya silinmesi kanser gelişimine yol açabilmektedir. Yapılan çalışmalarda DNMT1'in pankreas ve karaciğer kanseri hücrelerinde normal hücrelere kıyasla fazla eksprese edildiğini göstermiştir. Ayrıca DNMT1'in aşırı ekspresyonu mide kanseri, meme kanseri ve rektum kanseri gibi kanserlerin oluşumuyla yakından ilişkilidir (Neves ve diğerleri, 2016; Wang ve diğerleri, 2024). DNMT1, çeşitli kanserlerin gelişimdeki rolünün vurgulandığı araştırmalar nedeniyle kanser tedavisinde önemli bir hedef haline gelmiştir (Chen ve diğerleri, 2024). DNMT1'in hücre ölümü üzerinde düzenleyici etkisi bulunmaktadır. DNMT1'in baskılanmasının DNA metilasyonunun kaybına yol açtığı ve ardından geniş çaplı hücre ölümünü tetiklediği bildirilmiştir. Bunun tersine, DNMT1 birikiminin hücre ölümünü engellediği ve hücre sağkalımını teşvik ettiği bildirilmiştir. Çalışmalar DNMT1'in programlanmış hücre ölümünü düzenleyerek hastalıklar üzerindeki terapötik etkisini göstermiştir (Park ve diğerleri, 2021; Wong, 2020; Yan ve diğerleri, 2023). Ayrıca DNMT1'in aşırı ekspresyonunun şizofreni, epilepsi, bipolar bozukluklarla bağlantılı olabileceği bildirilmiştir (Singh ve diğerleri, 2023). DNMT3A'nın anormal ekspresyonunun ise tümör oluşumuna katkıda bulunacağı ayrıca DNMT3A'daki değişikliklerin papiller tiroid karsinomu gelişiminde önemli faktör olduğu ve bu hastalarda demetilasyon ajanlarının kullanılmasının DNMT3A işlevinin geri kazanılmasına yardımcı olacağı bildirilmektedir (Huang ve Aghaei-Zarch, 2024; Siraj ve diğerleri, 2019). DNMT3A belirli uzun kodlanmayan RNA'larla etkileşime girerek, oral kanser, gırtlak kanseri ve kolon kanseri metastazlarına yol açabilir (Chen ve diğerleri, 2024). Akciğer kanserinde DNMT3A'nın aşırı ekspresyonu tümör hücrelerinin proliferasyonuna ve metastazına yol açabileceği gibi, DNMT3A kaybının da tümör hücrelerinin gelişimini desteklediği tespit edilmiştir (Wang ve diğerleri, 2024; Yan ve diğerleri, 2014). DNMT3B'de meydana gelen mutasyonlar sentromerik instabilite ve yüz anomalileri sendromu gibi çeşitli hastalıklarla

ilişkilendirilmiştir (Aanniz ve diğerleri, 2024). DNMT3B aşırı ekspresyonu hepatoselüler karsinom ve glioma tümörünün proliferasyonu ile bağlantılıdır (Chen ve diğerleri, 2024). Ayrıca mesane kanseri ve akut miyeloid lösemi hücrelerinde önemli ölçüde aşırı eksprese edildiği bildirilmiştir. Ek olarak DNMT3B'nin aşırı ekspresyonu kolon kanseriyle yakından ilişkilidir (Wang ve diğerleri, 2024; Zhang ve diğerleri, 2020). Bu sebeple kanser tedavilerinde DNA metilasyonunun inhibisyonu terapötik bir yaklaşımdır (Patnaik ve diğerleri, 2023).

Histonların amino terminallerindeki lizin rezidülerinin deasetilasyonunu katalize eden HDAC'lar farklılaşma, apoptoz ve hücre döngüsünün duraklamasına neden olan genleri transkripsiyonel olarak inaktif halde tutarak proonkogenik bir etki gösterirler. HDAC'lar çeşitli kanserlerde aşırı eksprese edildikleri için ve tümör baskılayıcı genlerin ifadesinin kontrolündeki kritik rollerinden dolayı antikanser ilaçlar için potansiyel hedef olarak kabul edilir. Anormal HDAC deasetilasyonunu önleyen HDAC inhibitörleri, hücre döngüsünün durmasına, farklılaşma ve apoptoza neden olabilirler (Babacan ve diğerleri, 2023; Chen ve diğerleri, 2023; Slaughter ve diğerleri, 2021). Kolorektal ve pankreas kanserlerinde HDAC1 ekspresyonunda artış olduğu tespit edilmiştir (Shirbhate ve diğerleri, 2024). Çok sayıdaki çalışma Glioblastoma adı verilen agresif beyin tümörü hücrelerinin büyümesi, nüksü ve metastazı sırasında HDAC1'in ekspresyonunun önemli ölçüde arttığını tespit etmiştir (Staberg ve diğerleri, 2017; Zhang ve diğerleri, 2020). Özellikle de akciğer kanseri, mide kanseri ve prostat tümörleri HDAC1'in aşırı ekspresyonu ile ilişkilendirilmiştir (Bharadwaj ve diğerleri, 2024; Cao ve diğerleri, 2017). Farklı kanser türlerinde HDAC1'in aşırı ekspresyonu nedeniyle, HDAC inhibitörleri kanser terapötikleri için önemli bir tedavi seçeneği haline gelmiştir. Ayrıca son zamanlarda kanser terapötikleri olarak bazı HDAC inhibitörlerinin klinikte kullanıldığı bildirilmiştir (Cheng ve diğerleri, 2024).

Probiyotik bir maya olan *K. marxianus* M59 suşundan izole edilen prebiyotik özellikteki EPS_{M59}'un bugüne kadar sitotoksik, genotoksik, antigenotoksik etkilerinin ve epigenetik değişiklikler ile ilişkisinin incelendiği bir çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle tez çalışması bu alanda ilk bilgilerin elde edildiği çalışma olma niteliği taşımaktadır. Bununla birlikte farklı mikroorganizmalardan elde edilmiş EPS'ler ile gerçekleştirilmiş bu kapsamdaki çalışmalar ile sonuçlar kıyaslanmıştır.

Botryosphaeria rhoodina MAMB-05 mantarından izole edilen Botryosphaera ekzopolisakkatiritiyle (BOT) yapılan MTT testinde Çin hamster akciğer fibroblastı (V79) ve *Rattus norvegicus* hepatokarsinomu (HTC) hücre hatlarında 10 farklı konsantrasyonda (7,5 ila 650 µg/mL arası) bu hücre hatlarına karşı sitotoksik etki göstermediği tespit edilmiştir. Ancak HTC hücrelerinde iki konsantrasyonunda hücre proliferasyonunu uyardığı tespit edilmiştir. (300 ve 450 µg/mL). MTT testlerinin sonuçları değerlendirilerek genotoksisite testleri için (MN ve comet) BOT'un farklı konsantrasyonları (7,5; 30 ve 100 µg/mL) çalışılmış ve BOT'un V79 ve HCT hücrelerinde genotoksik etkisine rastlanmamıştır. BOT'un konsantrasyonlarının V79 hücre hattında hidrojen peroksit (H_2O_2; 1,70 µg/mL, 20 dk) ve doksorubisine (DXR; 0,75 µg/mL, 3 s) karşı, HCT hücre hattında ise H_2O_2 (1,70 µg/mL, 20 dk) ve benzo [a] pirene (B[a]P, 20 µg/mL, 24 s) karşı eş ve geç zamanlı muamelelerle antimutajenik etkilerinin değerlendirildiği MN testi yapılmıştır. BOT'un konsantrasyonlarının mutajenik ajanların neden olduğu DNA hasarını azaltmada etkili olduğu tespit edilmiştir (Kerche-Silva ve diğerleri, 2017). BOT ile gerçekleştirilen Ames testinde ise S9 mikrozomal fraksiyonunu varlığında ve yokluğunda EPS'nin (75, 150, 300, 450 ve 650 µg/mL) konsantrasyonlarıyla *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA102 ve TA97A suşlarında mutajenik potansiyeli incelenmiştir. Lenfosit kültüründe BOT'un konsantrasyonlarının (75, 150, 300, 450 ve 650 µg/mL), H_2O_2 (100 µg/mL) vasıtasıyla oluşan reaktif oksijen ve azot türlerinin üretimini engelleme kapasitesi, farklı muamele sürelerinde CM-H_2DCFDA probuyla incelenmiştir. Comet testinde ise normal ve tümör (jurkat hücreleri) insan lenfosit kültürlerine BOT'un 7,5; 30 ve 100 µg/mL konsantrasyonları 24 saat süresince tek başına ve alkilleyici ajan/mutajen metil metan sülfonat (MMS; 10 µM) ile eş ve geç zamanlı olarak uygulanmıştır. BOT'un çalışılan konsantrasyonlarında genotoksik ve mutajenik etkileri olmadığı tespit edilmiştir. Ayrıca MMS'nin indüklediği DNA hasarına karşı koruyucu rolü olduğu ancak H_2O_2 kaynaklı reaktif oksijen türlerinin üretimini azaltmada etkili olmadığı belirlenmiştir. Araştırıcılar bir EPS olan BOT'un potansiyel terapötik ajan olarak kullanımının uygun olabileceğini belirtmişlerdir (Malini ve diğerleri, 2016).

2021 yılında Yüzbaşıoğlu vd.'nin yaptığı çalışmada *Aureobasidium pullulans* mantarının birincil suşları tarafından üretilen suda çözünen ve biyouyumlu bir EPS olan Pullulanın MTT testiyle insan meme kanseri (MCF-7) hücre hattında sitotoksik etkisi değerlendirilmiştir. Ayrıca insan lenfositlerinde Pullulanın tek başına muamelesiyle genotoksik etkileri ve mutajenlere karşı antigenotoksik etkileri değerlendirilmiştir. İnsan meme kanseri (MCF-7)

hücre hattında yapılan MTT testinde dokuz farklı pullulan konsantrasyonu (15,6; 31,25; 62,5; 125; 250; 500; 1000; 1500 ve 2000 µg/mL) çalışılmıştır. İyi bir hücre hücre proliferasyonu ve en uygun konsantrasyon aralığını belirlemek için yapılan ön çalışmalar sonucunda MN ve comet testleri için beş farklı pullulan konsantrasyonu (250; 500; 1000; 1500 ve 2000 µg/mL) belirlenmiştir. Ayrıca 1000 ve 2000 µg/mL konsantrasyonları MN oluşum mekanizmalarının tespiti için MN-FISH testinde incelenmiştir. MTT testinde pullulanın 24 ve 48 saatlik muamelelerinde tüm konsantrasyonlarda hücre canlılığını kontrole kıyasla inhibe ettiği tespit edilirken en yüksek inhibisyonun 1500 ve 2000 µg/mL konsantrasyonlarının olduğu bildirilmiştir. MN test sonuçlarına göre pullulan tek başına MN frekansında artış meydana getirmemiştir. Pullunanın MN ve MN-FISH testinde alkilleyici ajan Mitomisin-C (MMC) ve comet testinde hidrojen peroksite karşı antigenotoksik etkisi araştırılmıştır. MMC ve pullulanın eş zamanlı ve ön muamele gruplarında pozitif kontrole göre tüm konsantrasyonlarda (ön muamele grubunda 1500 µg/mL hariç) MN frekansı azalmıştır. MN-FISH testinde ise pullulanın her iki konsantrasyonu da MN sayısını etkilenmemiştir. MMC ile ön ve eş zamanlı muamele gruplarında her iki konsantrasyonda da MN sayısı azalmıştır. Comet testinde ise pullulan tek başına negatif kontrole kıyasla kuyruk yoğunluğunu etkilememiştir. Pullulan+H_2O_2 ön muamele grubunda ise, pozitif kontrole kıyasla tüm konsantrasyonlarda kuyruk yoğunluğunda azalma meydana gelmiştir. Eş zamanlı olarak pullulan+H_2O_2 muamelesinde ise tüm konsantrasyonlarda (2000 µg/mL hariç) kuyruk yoğunluğunda azalma meydan gelmiştir. RAPD-PCR analizinde ise pullulanın tek başına 2000 µg/mL ve pullulan (1000 ve 2000 µg/mL) +MMC ile yapılan çalışmada dört primer kullanılmış ve sadece A ve C donörlerinde kontrole kıyasla DNA bant profillerinde değişiklikler tespit edilmiştir. Sonuç olarak araştırmacılar pullulanın genotoksik bir etkiye sahip olmadığını hatta antimutajenik ve antigenotoksik etkiye sahip olabileceğini açıklamışlardır (Yüzbaşıoğlu ve diğerleri, 2021).

Lactobacillus salivarius'dan izole edilen EPS ile yapılan çalışmada, kromozomal anormallikler (KA), Kardeş kromatit değişimi (KKD), Mikronükleus (MN), ve comet testleriyle EPS'nin tek başına (12,5; 25; 50 ve 100 µg/mL) genotoksik ve Mitomisin-C (MMC; 0,20 µg/mL), Metil Metansülfonat (MMS; 5,00 µg/mL) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) tarafından indüklenen DNA hasarına karşı antigenotoksik etkileri değerlendirilmiştir. KA testinde EPS'nin 24 ve 48 saatlik tek başına muamelesi sonucu anormal hücre yüzdesi ve hücre başına düşen anormallik önemli ölçüde artmazken, EPS+MMC ve EPS+MMS 24 ve 48 saatlik eş zamanlı uygulamalarında anormal hücre yüzdesi ve hücre başına düşen

anormalliğin pozitif kontrollere kıyasla tüm konsantrasyonlarda anlamlı olarak azaldığı gözlenmiştir. EPS'nin konsantrasyonlarının 24 ve 48 saatlik tek başına muameleleri KKD/hücre frekansını önemli ölçüde arttırmamıştır. Diğer taraftan EPS+MMC ve EPS+MMS 24 ve 48 saatlik eş zamanlı uygulamalarında pozitif kontrollere kıyasla KKD/hücre sayısı anlamlı olarak azalmıştır. EPS'nin konsantrasyonlarının 24 ve 48 saatlik tek başına muameleleri mitotik indeksi 100 µg/mL konsantrasyonunda anlamlı şekilde azaltmıştır. Ayrıca EPS+MMC ve EPS+MMS 24 ve 48 saatlik eş zamanlı uygulamalarında MMC ve MMS'nin düşürdüğü mitotik indeksi pozitif kontrollere kıyasla tüm konsantrasyonlarda anlamlı olarak arttırmıştır. MN testinde ise EPS'nin tek başına muamelesi MN frekansını önemli ölçüde arttırmamıştır. EPS+MMC ve EPS+MMS 24 eş zamanlı uygulamalarında ise pozitif kontrollere kıyasla MN frekansı tüm konsantrasyonlarda anlamlı olarak azalmıştır. Comet testinde ise EPS'nin konsantrasyonlarının tek başına muamelesiyle kuyruk yoğunluğunda artış meydana gelmezken EPS+H_2O_2 eş zamanlı uygulamasının tüm muamele gruplarında pozitif kontrole göre kuyruk yoğunluğunda anlamlı azalma meydana getirmiştir. Sonuç olarak *L. salivarius*'dan izole edilen EPS'nin genotoksik olmadığı antimutajenik, desmutajenik ve antigenotoksik etki gösterdiği tespit edilmiştir (Yıldız ve diğerleri, 2023).

Başka bir çalışmada *K. marxianus* ve *P. kudriavzevii*'den izole edilen EPS'ler ile yapılan çalışmada farklı kolon kanseri hücre hatları (SW-480, HT-29 ve HCT116) üzerindeki etkileri araştırılmıştır. DAPI (4',6-diamidino-2-fenilidol) ve Annexin V/PI deneyleri ile hücrelerin canlılığı, apoptozda veya nekrotik olup olmadığı tespit edilmiştir. Ayrıca hücre çoğalması, metastaz ve apoptoz ve inflamasyon yolağında yer alan kilit unsurların AKT, mTOR ve JAK1, ferroptoz yolağının önemli bileşenleri Nrf-2 ve CoQ10 ve proapoptotik genler olan BAX, kaspaz-3 ve kaspaz-8 ayrıca antiapoptotik (Bcl-2) genlerin ekspresyon üzerine etkileri RT-qPCR ile analiz edilmiştir. Ferroptoz yolağının moleküler mekanizmalarını değerlendirmek için Nrf-2 ve CoQ10 genleri kullanılmıştır. Kolon kanseri hücre hatlarının (SW-480, HT-29 ve HCT116) ve normal hücre hattının (KDR/293) *K. marxianus* ve *P. kudriavzevii* EPS'leriyle 24 saat muamelesinden sonra canlılık MTS testi ile ölçülmüştür. 24 saatte IC_{50} değeri 40 µg/mL olarak değerlendirilirken hücre canlılığında doza bağlı bir şekilde azalma meydana geldiği tespit edilmiştir. DAPI boyamada ise her iki mayanın EPS'leriyle 24 saat muamele edilen kolon kanseri hücrelerinin çekirdeğindeki kromatinde parçalanma gözlenmiştir. Kolon kanseri hücre hatlarında çekirdeğin parçalanması, apoptotik cisimlerin oluşumu ve apoptoz indüksiyonunun ayırt edici özelliklerinden membran

patlaması da görülmüştür. Annexin V/PI boyamasında *K. marxianus* EPS'leriyle muamelede SW-480, HT-29 ve HCT116 kanser hücrelerinde hücre ölümünün erken/geç apoptoz ve nekroz aşamalarında olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca *P. kudriavzevii* EPS'lerinin SW-480, HT-29 ve HCT116 kanser hücrelerinde aopoptoz ve nekrozu indüklediği tespit edilmiştir. Bu maya EPS'lerinin kanser hücre hatlarının proliferasyonunu inhibe ettiği tespit edilmiştir. RT-qPCR analizinde BAX, kaspaz-3 ve kaspaz-8 proapoptik genlerin ifadesinde artış ve antiapoptik gen Bcl-2 ekspresyonunda önemli bir azalma meydana gelmiştir. Ayrıca EPS'ler ile muamele edilen kanser hücrelerinde AKT, mTOR ve JAK1 genlerinin ekspresyonunda azalma meydana gelmiştir. EPS muameleleri Nrf-2 mRNA ifadesini arttırmış olmasıyla beraber kanser hücre hatlarında EPS'lerin muameleleriyle CoQ10 mRNA ekspresyonunda artış belirlenmiştir. Sonuç olarak bu maya EPS'lerinin antikanser özellikte olduğunu belirten araştırıcılar kolorektal kanser ile mücadelede yeni bir moleküler hedef terapötik seçenek sağlayabileceğini bildirmişlerdir (Saadat ve diğerleri, 2020).

Alcaligenes faecalis'ten izole edilen EPS'nin DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) ve ferrik indirgeme kapasitesi (FRAP) testleri ile antioksidan kapasitesi incelenmiştir. Ayrıca bu EPS'nin HepG2, A549, CaSki, heLa ve C33A olmak üzere beş farklı hücre hattında sitotoksisitesi değerlendirimiş ve MTT ile EPS'nin farklı konsantrasyonlarının hücre canlılığı üzerin etkisi incelenmiştir. Bu EPS'nin düşük ferrik indirgeme kapasitesine sahip olduğu ancak en yüksek konsantrasyonda büyük ölçüde DPPH süpürücü etki ortaya koyduğu tespit edilmiştir. EPS'nin serbest radikal temizleme aktivitesine sahip olduğu ayrıca insan karaciğer HepG2 ve akciğer A549 kanser hücre hatlarının gelişimini önemli ölçüde engelleyebildiği tespit edilmiştir. HepG2 IC_{50} değeri 128,82 µg/mL olarak belirlenirken, A549 hücrelerinin de EPS'ye duyarlı olduğu ancak HepG2'den daha az duyarlı olduğu bulunmuştur. A549 IC_{50} değeri 654,4 µg/mL tespit edilmesi bu durumu kanıtlar niteliktedir. CaSki hücrelerinin HepG2 ve A549 hücrelerine göre EPS'ye karşı daha dirençli olduğu tespit edilirken IC_{50} değeri 1 ila 2 mg/mL olduğu belirtilmektedir. CaSki ve heLa hücre hatları HPV viral genomları taşımaktadır. heLa hücreleri için sadece, pozitif kontrol sisplatin viral protein ifadesini azaltırken, EPS muamelesinde kontrole kıyasla herhangi bir değişiklik tespit edilmemiştir. E6 ve E7 proteinleri yokluğunda C33A, apoptoz (p53) ve tümör baskılanmasından sorumlu (pRb) hücresel proteinlerin ekspresyonu açısından test edilmiştir. Sisplatin her iki proteinin ekspresyonunu negatif kontrole kıyasla arttırırken, EPS ile muamele edilen hücrelerde ise p53 ekspresyonu artmıştır. Bu sebeple, viral proteinlerin EPS'ye karşı artan dirençten sorumlu olabileceği ve bunların (viral genom) bulunmadığı

C33A'nın üç servikal kanser hücre hattından daha yüksek büyüme inhibisyonu gösterdiği tespit edilmiştir. Sonuç olarak bu EPS'nin serbest radikal temizleme aktivitesine sahip olduğu, HepG2 ve A549 kanser hücre hatlarının büyümesini önemli ölçüde inhibe ettiği tespit edilmiştir. Ayrıca araştırmacılar EPS'nin biyomedikal kullanımlar için daha fazla çalışma potansiyeline sahip olduğunu bildirmişlerdir (Aullybux ve diğerleri, 2022).

2024 yılında Kahraman-Ilıkkan vd. yaptığı çalışmada, *Weisella cibaria* MED17'den elde edilen EPS'nin uygulama konsantrasyonunun belirlenmesi için HT-29 kolon hücre hattında EPS_{MED17} muamelesi sonucunda IC_{50} değerlerinin 24 saatlik uygulamada 11,13 mg/mL, 48 saatlik uygulamada 5,8 mg/mL ve 72 saatlik uygulamada 14,1 mg/mL olduğu tespit edilmiştir. Bu bulgulardan yola çıkarak comet ve yara iyileşmesi (scratch testi) testlerinde kullanılacak konsantrasyon 15 mg/mL olarak belirlenmiştir. Comet testinde EPS_{MED17} tek başına, EPS_{MED17}+MMC ve MMC (pozitif kontrol) olmak üzere üç deney grubu oluşturulmuştur. EPS_{MED17}'nin tek başına hücrelerde DNA kırıklarına neden olmadığı ve EPS_{MED17}'nin MMC tarafından oluşturulan DNA hasarını %50 oranında iyileştirdiği tespit edilmiştir. Ayrıca araştırmacılar EPS_{MED17}'nin DNA onarım süreçlerine katkısı olduğunu, indüklenen oksidatif stres ve DNA hasarına karşı koruyucu/iyileştirici rollerini vurgulamaktadır. EPS_{MED17}'nin HT-29 hücreleri üzerinde yara iyileşmesi potansiyelinin incelendiği çalışmada ise tek başına EPS_{MED17}, EPS_{MED17}+MMC ve MMC olmak üzere üç deney grubu oluşturulmuştur. Yara iyileşme alanı boyutları 24 saat aralıklarla 4 gün boyunca izlenerek mikroskop ile eş zamanlı analiz programı ile değerlendirilmiştir. EPS_{MED17}'nin tek başına muamelesi MMC muamelesine kıyasla tüm zaman aralıklarında yara iyileşme üzerine etkisinin daha düşük olduğu tespit edilirken EPS_{MED17}+MMC eş zamanlı muamele grubunda EPS_{MED17}'nin HT-29 hücrelerinin yara iyileşmesini hızlandırdığı tespit edilmiştir. Bu bağlamda EPS_{MED17}'nin yara iyileşmesi potansiyeli, DNA hasarına karşı antigenotoksik/koruyucu/iyileştirici etkileri olduğu bildirilmiştir. Bu sonuçlara ek olarak araştırmacılar EPS_{MED17}'nin bir terapötik ajan veya takviye olarak değerlendirilebilineceğini belirtmişlerdir (Kahraman-Ilıkkan ve diğerleri, 2024).

Bu tez çalışması kapsamında KA testinin sonuçlarına göre, EPS_{M59}'un tek başına 24 ve 48 saatlik uygulamalarında anormal hücre yüzdesi ve hücre başına düşen anormallik sayısında, tüm konsantrasyonlarda, kontrole kıyasla anlamlı bir değişiklik tespit edilmemiştir. Ayrıca EPS_{M59}'un tek başına 24 ve 48 saatlik uygulamalarında sadece 48 saatlik uygulama grubunun 80 µg/mL'lik konsantrasyonunda kontrole kıyasla mitotik indeks frekansından anlamlı

azalma meydana gelmiştir. CBMN-Cyt test sonuçlarına göre EPS_{M59}'un tek başına 48 saatlik uygulamalarında mikronükleus, nükleer tomurcuk, nükleoplazmik köprü ve nükleer bölünme indeksi frekanslarında istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik tespit edilmemiştir. Comet testi sonuçlarına göre, EPS_{M59}'un tek başına 1 saatlik muamelesi sonucu kontrole kıyasla, yalnızca 80 µg/mL'lik konsantrasyonu kuyruk uzunluğunu azaltmıştır. Bununla birlikte diğer tüm konsantrasyonlarda kuyruk yoğunluğu, kuyruk uzunluğu ve kuyruk momenti parametrelerinde anlamlı azalma meydana gelmiştir. Bu sonuçlar dâhilinde *in vitro* koşullarda EPS_{M59}'un genotoksik etkisinin olmadığı tespit edilmiştir.

KA testinin sonuçlarına göre, EPS_{M59} ve MMC'nin 24 ve 48 saatlik eş zamanlı muamelesi sonucunda, MMC'nin arttırdığı anormal hücre yüzdesi ve hücre başına düşen anormallik sayısında, tüm konsantrasyonlarda istatistiksel olarak anlamlı düşüş meydana gelmiştir. Ayrıca EPS_{M59} ve MMC'nin eş zamanlı 24 saatlik muamalesi sadece 320 µg/mL'lik konsantrasyonda MMC'nin düşürdüğü mitotik indeks değerini istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttırmıştır. 48 saatlik uygulamada ise sadece en yüksek konsantrasyon olan 640 µg/mL'lik konsantrasyon MMC'nin neden olduğu mitotik indeks değerinin düşüşünü istatistiksel olarak anlamlı oranda arttırmıştır. CBMN-Cyt testinde EPS_{M59} ve MMC'nin 48 saatlik eş zamanlı muamelesi sonucunda, pozitif kontrole (MMC) kıyasla tüm konsantrasyonlarda istatistiksel olarak anlamlı düşüşler tespit edilmesinin yanı sıra nükleoplazmik köprü, nükleer tomurcuk ve nükleer bölünme indeksi frekanslarında istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik tespit edilmemiştir.

KA testinin sonuçlarına göre, EPS_{M59} ve MMS'nin 24 saatlik eş zamanlı muamelesi sonucunda, pozitif kontrole (MMS) kıyasla tüm konsantrasyonlarda anormal hücre yüzdeleri ve hücre başına düşen anormallik frekanslarında azalma görülmekle birlikte, bu azalmalar 320,00 ve 640,00 µg/mL'lik konsantrasyonlarda istatistiksel olarak anlamlıdır. 48 saatlik EPS_{M59} ve MMS'nin eş zamanlı muamelelerinde tüm konsantrasyonlarda pozitif kontrole (MMS) kıyasla anormal hücre yüzdeleri ve hücre başına düşen anormallik frekansları istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalmıştır. EPS_{M59} ve MMS'nin 24 saatlik eş zamanlı muamelesi sonucu mitotik indeks değerleri incelendiğinde, EPS_{M59}'un, MMS'nin neden olduğu Mİ'deki düşüşü artırdığı gözlemlenmiştir. Ancak bu artışlardan 320 ve 640 µg/mL konsantrasyonlarındaki artışlar istatistiksel olarak anlamlıdır. 48 saatlik eş zamanlı muamelede ise, MMS'nin neden olduğu Mİ'deki düşüşü tüm konsantrasyonlarda arttırdığı gözlemlenmiştir. Ancak bu artışlardan 40, 80, 320 ve 640 µg/mL konsantrasyonlarındaki

artışlar istatistiksel olarak anlamlıdır. CBMN-Cyt testinde EPS_{M59} ve MMS'nin 48 saatlik eş zamanlı muamelesi sonucunda Pozitif kontrolle (MMS) karşılaştırıldığında mikronükleus frekanslarında istatistiksel olarak anlamlı düşüş tespit edilmiştir. Ayrıca nükleer tomurcuk, nükleoplazmik köprü ve nükleer bölünme indeksi frekanslarında istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik tespit edilmemiştir.

Comet testi sonuçlarına göre, EPS_{M59}'un 1 saatlik eş zamanlı H_2O_2 muamelesi sonucu tüm konsantrasyonlarda H_2O_2'nin neden olduğu DNA hasarını azalttığı belirlenmiştir. Ayrıca Pozitif kontrole göre (H_2O_2) kuyruk yoğunluğu, kuyruk uzunluğu ve kuyruk momenti parametrelerinde tüm konsantrasyonlarda istatistiksel olarak anlamlı azalmalar tespit edilmiştir. Bu sonuçlar dâhilinde *in vitro* koşullarda EPS_{M59} bifonksiyonel alkilleyici ajan MMC, monofonksiyonel alkilleyici ajan MMS ve reaktif oksijen türü H_2O_2 mutajenlerine karşı antigenotoksik/antimutajenik etki göstermiştir.

RT-qPCR testi sonuçlarına göre, DNMT1 geninin ekspresyonu EPS_{M59}'un 160 µg/mL'lik konsantrasyonuyla muamelesi sonucunda kontrol genine (GAPDH) oranla %45 oranında azalırken, 320 µg/mL konsantrasyonunda kontrol genine oranla %21'lik azalma meydana gelmiştir. En yüksek konsantrasyon olan 640 µg/mL'de kontrol genine oranla %74'lük bir artış gözlenmiştir. DNMT3A geninin ekspresyonunda ise EPS_{M59}'un 160 µg/mL'lik konsantrasyon muamelesinde kontrol genine oranla %74 azalırken, 320 µg/mL konsantrasyonunda kontrol genine oranla %100'lük yani 2 kat artış meydana gelirken, 640 µg/mL'de kontrol genine oranla %592'lik yani 6,9 kat artış meydana gelmiştir. DNMT3B geninin ekspresyonunda ise EPS_{M59}'un 160 µg/mL'lik konsantrasyonuyla muamelesinde kontrol genine kıyasla %248'lik yani ~3,5 kat artarken, 320 µg/mL konsantrasyonunda kontrol genine oranla %84'lük azalma meydana gelmiştir. 640 µg/mL'de ise kontrol genine oranla %28'lik artış belirlenmiştir. HDAC1 geninin ekspresyonunda ise EPS_{M59}'un 160 µg/mL'lik konsantrasyonu kontrol genine oranla %210'lük yani 3,1 kat artış meydana getirmiştir. 320 µg/mL konsantrasyonunda kontrol genine oranla %309'luk yani 4,1 kat artarken, 640 µg/mL'de kontrol genine kıyasla, %736'lık yani 8,4 kat artış meydana gelmiştir. DNA metilasyonunda görev alan DNMT genlerinin ve Histon modifikasyonlarında görevi olan histon deasetilazların (HDAC1) bazı kanser türlerinde aşırı eksprese edildiği bilinmektedir. Bu bilgiler ışığında, EPS_{M59}'un 160 µg/mL konsantrasyonunda DNMT1 ve DNMT3A genlerinin, 320 µg/mL konsantrasyonunda DNMT1 ve DNMT3B genlerinin ekspresyonlarını inhibe ettiği tespit edilmiştir. Diğer

taraftan EPS_{M59}'un 160 µg/mL konsantrasyonunda DNMT3B ve HDAC1 genlerinin genlerinin ekspresyonlarında ve 320 µg/mL konsantrasyonunda ise DNMT3A ve HDAC1 ekspresyonunda artış görülmüştür. HDAC1 geninde EPS_{M59}'un tüm konsantrasyonlarında gen ekspresyonunda artış tespit edilmiştir. 640 µg/mL'lik konsantrasyonda ise tüm genlerin ekspresyonlarına artış meydana gelmiştir. Bu bağlamda konsantrasyon artışıyla gen ifadesinin artışı arasında bir korelasyon bulunmuştur.

Tümör baskılayıcı genlerin promotör bölgelerindeki hipermetilasyon, epimutasyonun onkogenezde etkili olabileceğini düşündürmektedir. Bu bağlamda DNMT'lerin sentezindeki artış, tümör baskılayıcı genlerin promotör bölgelerindeki CpG adalarında hipermetilasyona yol açmasıyla birlikte bu genlerin susturulmasına ve dolayısıyla kanser gelişimine yol açabilir. HDAC'ların tümör baskılayıcı genlerin promotör bölgelerinde aşırı aktivasyonu kromatini yoğun hale getirmesiyle birlikte bu genlerin ekspresyonunu baskılayarak genleri susturur. Bu bağlamda apoptozun engellenmesine ve kanser gelişimine yol açabilir (Sanaei ve diğerleri, 2018; Wang ve diğerleri, 2025). Tüm bu bilgiler dahilinde EPS_{M59}'un gen ekspresyonunu inhibe ettiği belirtilen konsantrasyonlarının kanser tedavilerinde kullanılan DNMT ve HDAC inhibitörlerine benzer şekilde kullanılma potansiyelinin olabileceği düşünülmektedir. EPS_{M59}'un gen ekspresyonunun arttığı belirtilen konsantrasyonlarının ise kontrol ettikleri genlerin susturulmasıyla sonuçlanır. Bu bağlamda DNMT'lerin gen ifadeleri arttığında, metilasyon onkogenlerin promotör bölgelerinde meydana gelirse, bu genlerin ekspresyonu baskılanabilir ve bunun sonucunda kanser gelişimi engellenir. HDAC'ların histon deasetilasyonuyla kromatini yoğunlaştırması sonucu gen ekspresyonu baskılandığı bilgisi dahilinde, eğer HDAC'lar onkogenlerin promotör bölgelerinde etkinleşirse, bu genlerin susturulmasına ve dolayısıyla kanser gelişiminin engellenmesine neden olabilir. Bu nedenle epigenetik değişikleri incelerken tümör baskılayıcı genler ve onkogen ifadeleri de incelenmelidir.

Bir maddenin olası/potansiyel antigenotoksik ve antimutajenik etkisini, başka bir deyişle, bir maddenin DNA hasarına karşı koruma etkisininin açığa çıkarılması için, örneğin antitümör ve/veya alkilleyici ajanlar gibi (MMC, MMS) genetik materyale hasar verdiği bilinen bir kimyasalın kullanılması gerekmektedir (Mello ve diğerleri, 2017; Serpeloni ve diğerleri, 2010). Prebiyotiklerin, probiyotiklerin ve sinbiyotiklerin karsinojenlerin genotoksisitesini azalttığı ve birçok *in vitro* çalışmada DNA hasarını önledikleri bildirilmiştir (Nowak ve diğerleri, 2015). Mutajenik ajanları DNA'ya ulaşmadan önce,

hücrenin içinde veya dışında etkisiz hale getiren desmutajenler, bu mekanzimalarından dolayı mutajenlerin ön ve eş zamanlı muamelelerinde etkili olmaktadır. Etki mekanizmasını hücre içinde gösteren ve DNA'da hasar meydana geldikten sonra mutasyon baskılanmasında etkili olan biyoantimutajenler ise, bu etki mekanizmasından dolayı geç zamanlı muamelede etkili olmaktadır (De Flora, 1998; Słoczyńska ve diğerleri, 2014). Bu bağlamda ön ve eş zamanlı muamelelerde, antimutajen mekanizması, mutajeni doğrudan inaktive ederek etki gösteren maddenin desmutajen olduğunu göstermektedir (Kour ve diğerleri, 2017). EPS'ler mutajeni doğrudan inaktive eden desmutajenik etkiye sahip olmasının yanı sıra DNA onarım mekanizmaları, apoptoz ve hücre döngüsü genleri üzerinde etkili olabilen biyoantimutajenik etkiye sahiptirler (Isobe ve diğerleri, 1998; Morifuji ve diğerleri, 2017; Ragavan ve Das, 2019; Tsuda ve diğerleri, 2008; Yıldız ve diğerleri, 2023). *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*'den elde edilen hücresiz süpernatant (CFS) postbiyotikleriyle yapılan çalışmada antigenotoksisite değerlendirmesi için HT-29 hücre hatları üzerinde kolorimetrik bakteriyel test SOS kromotesti kullanılmıştır. Ayrıca *S. cerevisiae* var. *boulardii*'den elde edilen CFS'nin antigenotoksik etkisinin olup olmadığının araştırılması için kimyasal karsinojen 1,2-dimetilhidrazin (DMH) kullanılmıştır. SOS kromotestinde tüm muamlele gruplarına *E. coli* PQ37 eklenmiştir. DNA hasarına duyarlı SOS yanıtı veren suş sayesinde, renk değişimi ile birlikte antigenotoksisitenin olup olmadığı tespit edilmiştir. CFS'nin 5 farklı konsantrasyonlarının (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 µL) her birisine 80 µL DMH ilave edildiği, tek başına CFS ve tek başına DMH'dan oluşan muamele grupları oluşturulduktan sonra 2 saat boyunca 37 °C'de inkübe edilmiştir. Alkalin fosfataz ve ß-galaktosidaz aktivitelerinin değerlendirilmesi sonucunda 5, 10, 15, 20, 25, 30,3 5 ve 40 µL konsantrasyonlarının hepsinde CFS'nin antigenotoksik özellik gösterdiği tespit edilmiştir. Bu durum maya suşu tarafından üretilen postbiyotik metabolitlerin doğrudan genotoksinlere bağlanabilen (desmutajen), reaktif oksijen türlerini temizleyerek ya da pH'ı düşürmek gibi ortam modifikasyonları nedeniyle genotoksik bileşenleri etkisiz hale getiren antigenotoksik bileşikler içermesinden kaynaklanmaktadır. Ayrıca bazı araştırmacılar tarafından Laktik asit bakterilerinin (LAB) CFS'lerinin antigenotoksik etkilerinin çoğunlukla, kısa zincirli yağ asitleri (SCFA), peptidogilanlar, ekzopolisakkaritler, ve glikoproteinlerden kaynaklandığını bildirilmiştir. (Abbasi ve diğerleri, 2023). Başka bir çalışmada *Lactobacillus rhamnosus* MD14 suşu ve bazı laktik asit bakterilerinden elde edilen CFS'ler ile yapılan çalışmada yine aynı yöntemler kullanılarak Caco-2 ve HT-29 hücre hatlarında SOS kromotesti ile antigenotoksisite değerlendirmesi yapılmıştır. Bu çalışmada 60 farklı laktik asit bakterilerinden elde edilen CFS'lerden 22 tanesinin antigenotoksik özellik serdilediği

bildirilmiştir. Antigenotoksik etki göstermesinin suş tarafından üretilen metabolitlerin doğrudan genotoksinlere bağlanarak (desmutajen) ve/veya genotoksik maddeleri inaktive ederek, reaktif oksijen türlerini temizleyerek veya pH'ı düşürerek ortam modifikasyonuyla genotoksik bileşenleri etkisiz hale getiren antigenotoksik etki gösterdiği bildirilmiştir (Sharma ve diğerleri, 2020). Tüm yapılan araştırmalar sonucunda, laktik asit bakterileri veya mayalardan elde edilen EPS'lerin antigenotoksisite mekanizmalarını açıklayan kesin bir bilgi bulunmamakta ve EPS'lerin antigenotoksisite mekanizmaları hala tam olarak bilinmemektedir. EPS'lerin antigenotoksisite mekanizmalarının anlaşılabilmesi için daha çok çalışmaya ihtiyaç vardır.

Bu tez çalışması kapsamında EPS_{M59}'un genotoksik etkilerinin olmadığı ayrıca bifonksiyonel alkilleyici ajan MMC, monofonksiyonel alkilleyici ajan MMS ve H_2O_2'nin mutajenik etkilerine karşı antigenotoksik etki gösterdiği tespit edilmiştir. EPS_{M59}'un bifonksiyonel alkilleyici ajan MMC, monofonksiyonel alkilleyici ajan MMS ve H_2O_2 mutajenleriyle eş zamanlı muamelesi sonucunda antigenotoksik etkisi, desmutajenik işlevi olduğunu göstermektedir. Ayrıca EPS_{M59}'un desmutajenik işleviyle birlikte, biyoantimutajenik işlev gösterebileceği de düşünülmektedir. Ancak antigenotoksik etki mekanizması tam olarak bilinmediğinden, mekanizmaların aydınlatılması için ek çalışmalar yapılmalıdır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bir madde ve/veya çevresel ajanın hücrelerdeki genetik materyale zarar verme yeteneğine genotoksik etki denilmektedir. Meydana gelen hasarlar genellikle DNA'da doğrudan hasar, gen ifadesinde değişiklikler ve kromozomal anormallikler şeklinde olabilir. Genotoksik potansiyelin yanı sıra, epigenetik değişikliklerin de kimyasal maddelerle/ajanlarla tetiklenerek kanser oluşumunda önemli rol oynadığı düşünülmektedir. Çok sayıdaki kimyasal ajan genetik, epigenetik ve metabolik değişiklikler de dahil olmak üzere çeşitli mekanizmalar yoluyla kanser oluşumunda rol oynamaktadır. Mutajenler ve kanserojenler olarak bilinen kimyasalların reaksiyonları sonucunda DNA yapısını değiştiren ve/veya yüksek oranda ROS'a neden olan birçok ajan bulunmaktadır. ROS'un aşırı üretimi ise genotoksisite, programlanmış hücre ölümü, doku ölümü, iltihaplanma, anormal hücre büyümesi, hücre genişlemesi ve kanser gelişimi gibi çeşitli patolojik etkilere yol açabilir. DNA bir kez hasar gördüğünde ve bu hasar düzenli onarılmadığı sürece işlevini kaybeder. Hasarın birikmesi genlerde çoklu değişikliklere yol açar ve aksi taktirde kanserin başlamasına neden olabilir. Antimutajenler temel olarak desmutajenler ve biyoantimutajenler olmak üzere ikiye ayrılır. Mutajenlerin etkilerini azaltan/önleyen/etkisiz hale getiren mekanizmalarla etkilerini gösterirler. Mutajen genlere zarar vermeden önce kimyasal etkileşimleri etkisiz hale getiren desmutajenler ve hücrede faaliyet gösteren, DNA hasarı meydana geldikten sonra mutasyonun bastırılmasına katkıda bulunan biyoantimutajenler sayesinde azaltabilir veya önleyebilirler (Choudhuri ve diğerleri, 2021; Sassa ve diğerleri, 2025; Seno, 2025; Tang, 2025; Velumani ve diğerleri, 2025).

GRAS sınıf bir maya olan *K. marxianus* çeşitli faydalı özelliklerinden dolayı biyoteknoloji alanlarında kullanılmaktadır. Genelde laktik asit bakterilerinden izole edilen EPS'lerin daha yaygın kullanım alanları bulunmasına karşın son zamanlarda faydalı özelliklerinden dolayı mayalardan üretilen EPS'ler de ilgi görmeye başlamıştır. Bu yüksek lisans tezi *K. marxianus* M59 suşundan izole edilen EPS'nin karakterizasyonu, genotoksisitesi, antigenotoksisitesi ve epigenetik değişiklikler üzerine etkilerinin araştırıldığı bir ilk çalışma niteliğindedir. Araştırma sonuçlarına göre genotoksik etkisi olmadığı aynı zamanda, bifonksiyonel alkilleyici ajan MMC, monofonksiyonel alkilleyici ajan MMS ve H_2O_2 tarafından oluşturulan hasara karşı koruyucu/iyileştirici/kemopreventif etkilerinin yanı sıra antimutajenik/antigenotoksik etkilerinin olduğu tespit edilmiştir.

Doğrudan etkileyen epigenetik modifikasyonlardan DNA metilasyonunda görev alan DNMT genlerinin ve Histon modifikasyonlarında görevi olan histon deasetilazların (HDAC1) bazı kanser türelerinde/çeşitlerinde aşırı eksprese edildiği bilinmektedir. Bu bağlamda tez çalışması kapsamında EPS_{M59}'un 640 µg/mL'lik yüksek konsantrasyonunda tüm genlerin ekspresyonunda artış meydana gelirken, HDAC1 geninde EPS_{M59}'un bütün konsantrasyonlarında gen ekspresyonunda artış meydana gelmiştir. Ayrıca EPS_{M59}'un 160 µg/mL konsantrasyonunda DNMT1 ve DNMT3A genlerinde; 320 µg/mL konsantrasyonunda ise DNMT1 ve DNMT3B genlerinin ekspresyonlarını inhibe ettiği tespit edilmiştir. EPS_{M59}'un gen ekspresyonunu inhibe eden konsantrasyonlarının kanser tedavilerinde kullanılan DNMT ve HDAC inhibitörlerine benzer şekilde kullanılma potansiyelinin olabileceği düşünülmektedir. Elde edilen sonuçların desteklenebilmesi için ön ve geç zamanlı muamele yapılmasına ve mekanizmaların anlaşılması için de farklı *in vivo* ve *in vitro* çalışmalara ihtiyaç vardır.

EPS_{M59}'un sağlık alanında kemopreventif bir ajan veya kemoterapiye destekleyici olarak sağlıklı hücrelerinin DNA'sının korunması için kullanılabileceği düşünülmektedir. Ayrıca bağırsak mikrobiyotasındaki etkileri detaylı bir şekilde değerlendirildikten sonra, kolorektal kanser riskini azaltan prebiyotik bir ajan olarak kullanılabileceği düşünülmektedir. Gıda sektöründe ise genotoksik olmaması ve antigenotoksik özelliklerinden dolayı gıdalarda koruyucu ve sağlık destekleyici olarak kullanılabilir. Probiyotik yoğurtlarda, fermente süt ürünlerinde ve içeceklerde potansiyel yeni bir prebiyotik ajan olarak kullanılabilir. Düşük kalorili ve sağlıklı gıdalarda doğal stabilizatör ve emülgatör olarak kullanılabilir. Ayrıca genetik hasar riski yüksek olabilen örneğin, radyoterapi hastaları, sanayi çalışanları, radyasyonla çalışan bilim insanları gibi meslek gruplarında DNA koruyucu ajan olarak kullanılabileceği düşünülmektedir. İşlenmiş gıdalarda bulunan mutajenik katkı maddelerinin zararlarını azaltmak için EPS_{M59}'içeren gıdalar geliştirilebilir. Daha kapsamlı çalışmaların yapılmasıyla EPS_{M59}'un antigenotoksisite mekanizması anlaşıldıktan sonra, antigenotoksik özelliklerinden dolayı, yeni nesil biyoaktif bileşenlerin üretilmesinde kullanılabilir. EPS içeren takviye edici gıdalar veya farmasötik bileşenler geliştirilerek ticari hale getirilebileceği düşünülmektedir. Sonuç olarak EPS_{M59}'un desmutajenik etkisinin çeşitli, kapsamlı çalışmalarla desteklenmesi ve büyük olasılıkla biyoantimutajenik potansiyeli de bulunabileceğinden bu mekanizmaların anlaşılabilmesi için daha çok *in vivo* ve *in vitro* çalışmalara ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

Aanniz, T., Bouyahya, A., Balahbib, A., El Kadri, K., Khalid, A., Makeen, H. A., Alhazmi, H. A., El Omari, N., Zaid, Y., Wong, R. S.-Y., Yeo, C. I., Goh, B. H. and Bakrim, S. (2024). Natural bioactive compounds targeting DNA methyltransferase enzymes in cancer: Mechanisms insights and efficiencies. *Chemico-Biological Interactions*, 392, 110907.

Abbasi, A., Rad, A. H., Maleki, L. A., Kafil, H. S. and Baghbanzadeh, A. (2023). Antigenotoxicity and cytotoxic potentials of cell-free supernatants derived from saccharomyces cerevisiae var. boulardii on HT-29 human colon cancer cell lines. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 15(6), 1583-1595.

Aborziza, M., Amalia, R., Zuhrotun, A., Ikram, N. K. K., Novitasari, D. and Muchtaridi, M. (2024). Coffee bean and its chemical constituent caffeine and chlorogenic acid as promising chemoprevention agents: updated biological studies against cancer cells. *Molecules*, 29(14), 3302.

Ahlawat, S., Vasu, M., Choudhary, V., Arora, R., Sharma, R., Mir, M. and Singh, M. K. (2024). Comprehensive evaluation and validation of optimal reference genes for normalization of qPCR data in different caprine tissues. *Molecular Biology Reports*, 51(1), 268.

Akbas, E., Unal, F. and Yuzbasioglu, D. (2022). Genotoxic effects of gadobutrol and gadoversetamide active substances used in magnetic resonance imaging in human peripheral lymphocytes *in vitro*. *Drug and Chemical Toxicology*, 45(6), 2471-2482.

Akhtar, S., Gupta, A. K., Varshney, A., Rawat, M., Choudhary, A., Kandpal, R., Jha, A. K., Mishra, S., Naik, B., Kumar, V., Ranjan, R., Rather, M. A., Rustagi, S. and Preet, M. S. (2024). Comprehensive review of sustainable utilization of *Arenga obtusifolia* Griff. As a food. *Journal of Agriculture and Food Research*, 15, 100945.

Akram, M., Riaz, M., Wadood, A. W. C., Hazrat, A., Mukhtiar, M., Ahmad Zakki, S., Daniyal, M., Shariati, M. A., Said Khan, F. and Zainab, R. (2020). Medicinal plants with anti-mutagenic potential. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 34(1), 309-318.

Alimardani-Theuil, P., Gainvors-Claisse, A. and Duchiron, F. (2011). Yeasts: An attractive source of pectinases—From gene expression to potential applications: A review. *Process Biochemistry*, 46(8), 1525-1537.

Al-Saleh, M. A., Al-Harbi, H. F., Al-Humaid, L. A. and Awad, M. A. (2025). An assessment of the cyto-genotoxicity effects of green-synthesized silver nanoparticles and ATCBRA insecticide on the root system of vicia faba. *Nanomaterials*, 15(1), 77.

Alu'datt, M. H., Rababah, T., Al-ali, S., Tranchant, C. C., Gammoh, S., Alrosan, M., Kubow, S., Tan, T. and Ghatasheh, S. (2024). Current perspectives on fenugreek bioactive compounds and their potential impact on human health: A review of recent insights into functional foods and other high value applications. *Journal of Food Science*, 89(4), 1835-1864.

Amadio, F., Bongiorni, S., Varalda, G. M., Marcon, F. and Meschini, R. (2024). Di(2-ethylexyl) phthalate and chromosomal damage: Insight on aneugenicity from the cytochalasin-block micronucleus assay. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 898, 503791.

An, X., Lan, X., Feng, Z., Li, X. and Su, Q. (2023). Histone modification: Biomarkers and potential therapies in colorectal cancer. *Annals of Human Genetics*, 87(6), 274-284.

Anastasilakis, C., Ioannidis, O., Papaioannou, M., Tatsis, D., Chasampalioti, M., Christidis, P., Symeonidis, S., Bitsianis, S., Anestiadou, E., Botsios, D. and Angelopoulos, S. (2023). Synbiotics (prebiotics and probiotics) in the nutrition of critically ill patients. *Hellenic Journal of Surgery*, 3, 11-29.

Andrés, C. M. C., Pérez De La Lastra, J. M., Munguira, E. B., Andrés Juan, C. and Pérez-Lebeña, E. (2024). Dual-Action Therapeutics: DNA alkylation and antimicrobial peptides for cancer therapy. *Cancers*, 16(18), 3123.

Angelin, J. and Kavitha, M. (2020). Exopolysaccharides from probiotic bacteria and their health potential. *International Journal of Biological Macromolecules*, 162, 853-865.

Angulo, M., Reyes-Becerril, M., Cepeda-Palacios, R., Tovar-Ramírez, D., Esteban, M. Á. and Angulo, C. (2019). Probiotic effects of marine Debaryomyces hansenii CBS 8339 on innate immune and antioxidant parameters in newborn goats. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(5), 2339-2352.

Anik, M. I., Mahmud, N., Masud, A. A., Khan, M. I., Islam, M. N., Uddin, S. and Hossain, M. K. (2022). Role of reactive oxygen species in aging and age-related diseases: a review. *ACS Applied Bio Materials*, 5(9), 4028-4054.

Anwar, S. L. (2014). DNA methylation, microRNAs, and their crosstalk as potential biomarkers in hepatocellular carcinoma. *World Journal of Gastroenterology*, 20(24), 7894.

Araújo-Rodrigues, H., Sousa, A. S., Relvas, J. B., Tavaria, F. K. and Pintado, M. (2024). An overview on mushroom polysaccharides: health-promoting properties, prebiotic and gut microbiota modulation effects and structure-function correlation. *Carbohydrate Polymers*, 333, 121978.

Aullybux, A. A., Puchooa, D., Bahorun, T., Jeewon, R., Wen, X. and Matin, P. (2022). Antioxidant and cytotoxic activities of exopolysaccharides from alcaligenes faecalis species ısolated from the marine environment of mauritius. *Journal of Polymers and the Environment*, 30(4), 1462-1477.

Avuloglu Yilmaz, E., Yuzbasioglu, D. and Unal, F. (2023). Investigation of genotoxic effect of octyl gallate used as an antioxidant food additive in *in vitro* test systems. *Mutagenesis*, 38(3), 151-159.

Avuloğlu-Yılmaz, E. ve Yüzbaşıoğlu D. (2022). Mikronukleus testi. Ünal, F ve Yüzbaşıoğlu, D. (Editörler). *Genetik Toksikoloji* içinde, Ankara: Nobel Yayınları, 218-249.

Avuloğlu Yılmaz, E., Yüzbaşioğlu, D. and Ünal, F. (2022). Investigating ın vitro genotoxic effects of sweetener xylitol. *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tarım ve Doğa Dergisi*, 25(6), 1315-1325.

Aydın, M. and Rencüzoğulları, E. (2019). Genotoxic and mutagenic effects of mycotoxins: a review. *Commagene Journal of Biology*, 3(2), 132-161.

Ayyash, M., Stathopoulos, C., Abu-Jdayil, B., Esposito, G., Baig, M., Turner, M. S., Baba, A. S., Apostolopoulos, V., Al-Nabulsi, A. and Osaili, T. (2020). Exopolysaccharide produced by potential probiotic *Enterococcus faecium* MS79: Characterization, bioactivities and rheological properties influenced by salt and pH. *LWT*, 131, 109741.

Baars, D. P., Fondevila, M. F., Meijnikman, A. S. and Nieuwdorp, M. (2024). The central role of the gut microbiota in the pathophysiology and management of type 2 diabetes. *Cell Host & Microbe*, 32(8), 1280-1300.

Babacan, O., Hasbek, Z., Yilmaz, M., Özer, H. and Ataseven, H. (2023). Relationship between Histone Deacetylase (HDAC) Overexpression and 18F-FDG PET/CT parameters in patients with gastric cancer, and prognostic importance of HDAC overexpression. *UHOD - Uluslararasi Hematoloji-Onkoloji Dergisi*, 33(3), 12-25.

Ballini, A., Charitos, I. A., Cantore, S., Topi, S., Bottalico, L. and Santacroce, L. (2023). About functional foods: the probiotics and prebiotics state of art. *Antibiotics*, 12(4), 635.

Banoon, S. R., Salih, T. S. and Ghasemian, A. (2022). Genetic mutations and major human disorders: a review. *Egyptian Journal of Chemistry*, 65(2), 571-589.

Barkhidarian, B., Roldos, L., Iskandar, M. M., Saedisomeolia, A. and Kubow, S. (2021). Probiotic supplementation and micronutrient status in healthy subjects: a systematic review of clinical trials. *Nutrients*, 13(9), 9-15.

Barnes, C. E., English, D. M. and Cowley, S. M. (2019). Acetylation & Co: An expanding repertoire of histone acylations regulates chromatin and transcription. *Essays in Biochemistry*, 63(1), 97-107.

Barra, V., Schillaci, T., Lentini, L., Costa, G. and Di Leonardo, A. (2012). Bypass of cell cycle arrest induced by transient DNMT1 post-transcriptional silencing triggers aneuploidy in human cells. *Cell Division*, 7(1), 2-6.

Bassett, S. and Da Silva, N. A. (2024). Engineering a carbon source-responsive promoter for improved biosynthesis in the non-conventional yeast Kluyveromyces marxianus. *Metabolic Engineering Communications*, 18, 238-242..

Basu, A. (2018). DNA damage, mutagenesis and cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(4), 970.

Bayhan, H., Dogan, S., Yilmaz Kardas, B., Diken, M. E., Dirmenci, T. and Celikler, S. (2024). Comprehensive antigenotoxic profile of endemic Cirsium steriolepis Petrak extracts against hydrogen peroxide induced toxicity. *Food Science and Biotechnology*, 33(13), 3131-3152.

Bekdash, R. A. (2024). Epigenetics, nutrition, and the brain: improving mental health through diet. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(7), 4036.

Berekaa, M. and Ezzeldin, M. (2018). Exopolysaccharide from Bacillus mojavensis DAS10-1; Production and Characterization. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 12(2), 633-640.

Berg, G., Rybakova, D., Fischer, D., Cernava, T., Vergès, M.-C. C., Charles, T., Chen, X., Cocolin, L., Eversole, K., Corral, G. H., Kazou, M., Kinkel, L., Lange, L., Lima, N., Loy, A., Macklin, J. A., Maguin, E., Mauchline, T., McClure, R. and Schloter, M. (2020). Microbiome definition re-visited: Old concepts and new challenges. *Microbiome*, 8(1), 103.

Besaratinia, A., Caliri, A. W. and Tommasi, S. (2024). The interplay of DNA damage and repair, gene expression, and mutagenesis in mammalian cells during oxidative stress. *Carcinogenesis*, 45(11), 868-879.

Bevilacqua, A., Campaniello, D., Speranza, B., Racioppo, A., Sinigaglia, M. and Corbo, M. R. (2024). An update on prebiotics and on their health effects. *Foods*, 13(3), 446.

Bhandare, S. D. (2024). Deciphering the mechanisms of carcinogens: Unravelling the pathways of cancer initiation and progression: An insight into DNA damage, genotoxicity, and epigenetic changes. *Journal of Toxicological Studies*, 2(1), 1202.

Bharadwaj, K. K., Ahmad, I., Pati, S., Ghosh, A., Rabha, B., Sarkar, T., Bhattacharjya, D., Patel, H. and Baishya, D. (2024). Screening of phytocompounds for identification of prospective histone Deacetylase 1 (HDAC1) inhibitor: an in silico molecular docking, molecular dynamics simulation, and MM-GBSA approach. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 196(7), 3747-3764.

Bhootra, S., Jill, N., Shanmugam, G., Rakshit, S. and Sarkar, K. (2023). DNA methylation and cancer: Transcriptional regulation, prognostic, and therapeutic perspective. *Medical Oncology*, 40(2), 71.

Bilal, M., Ji, L., Xu, Y., Xu, S., Lin, Y., Iqbal, H. M. N. and Cheng, H. (2022). Bioprospecting kluyveromyces marxianus as a robust host for industrial biotechnology. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10, 851768.

Birla, D., Khandale, N., Ravindra Babu, M., Bashir, B., Shahbaz Alam, Md., Vishwas, S., Chaitanya, M., Gupta, G., Kumar Chellappan, D., Chawla, R., Singh, M., Dua, K. and Kumar Singh, S. (2024). An overview of hyphenated techniques used for the identification of genotoxic impurities in pharmaceutical products: Current status and future perspectives. *Microchemical Journal*, 202, 110828.

Blake, S. J., Wolf, Y., Boursi, B. and Lynn, D. J. (2024). Role of the microbiota in response to and recovery from cancer therapy. *Nature Reviews Immunology*, 24(5), 308-325.

Buksa, K., Kowalczyk, M. and Boreczek, J. (2021). Extraction, purification and characterisation of exopolysaccharides produced by newly isolated lactic acid bacteria strains and the examination of their influence on resistant starch formation. *Food Chemistry*, 362, 130221.

Caliri, A. W., Tommasi, S. and Besaratinia, A. (2021). Relationships among smoking, oxidative stress, inflammation, macromolecular damage, and cancer. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 787, 108365.

Cao, L.-L., Song, X., Pei, L., Liu, L., Wang, H. and Jia, M. (2017). Histone deacetylase HDAC1 expression correlates with the progression and prognosis of lung cancer: A meta-analysis. *Medicine*, 96(31), e7663.

Castro-Muñoz, L., Ulloa, E., Sahlgren, C., Lizano, M., De La Cruz-Hernández, E. and Contreras-Paredes, A. (2023). Modulating epigenetic modifications for cancer therapy (Review). *Oncology Reports*, 49(3), 59.

Catalán, J., Järventaus, H., Falck, G. C.-M., Moreno, C. and Norppa, H. (2024). Chromosome-specific induction of micronuclei and chromosomal aberrations by mitomycin C: Involvement of human chromosomes 9, 1 and 16. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 896, 503753.

Cázares-Vásquez, M. L., Rodríguez-Herrera, R., Aguilar-González, C. N., Sáenz-Galindo, A., Solanilla-Duque, J. F., Contreras-Esquivel, J. C. and Flores-Gallegos, A. C. (2021). Microbial exopolysaccharides in traditional mexican fermented beverages. *Fermentation*, 7(4), 249.

Chacón, C. F., López González, E. C. and Poletta, G. L. (2021). Biomarkers of geno- and cytotoxicity in the native broad-snouted caiman (Caiman latirostris): Chromosomal aberrations and mitotic index. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 867, 53-55..

Chakrabarti, S. K. and Chattopadhyay, D. (2024). Expanding role of epigenetics in human health and disease. *Exploratory Research and Hypothesis in Medicine*, 3(1), 102-108.

Challen, G. A., Sun, D., Mayle, A., Jeong, M., Luo, M., Rodriguez, B., Mallaney, C., Celik, H., Yang, L., Xia, Z., Cullen, S., Berg, J., Zheng, Y., Darlington, G. J., Li, W. and Goodell, M. A. (2014). Dnmt3a and Dnmt3b have overlapping and distinct functions in hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell*, 15(3), 350-364.

Chaudhary, P., Janmeda, P., Docea, A. O., Yeskaliyeva, B., Abdull Razis, A. F., Modu, B., Calina, D. and Sharifi-Rad, J. (2023). Oxidative stress, free radicals and antioxidants: Potential crosstalk in the pathophysiology of human diseases. *Frontiers in Chemistry*, 11, 1158198.

Chaudhry, T. S., Senapati, S. G., Gadam, S., Mannam, H. P. S. S., Voruganti, H. V., Abbasi, Z., Abhinav, T., Challa, A. B., Pallipamu, N., Bheemisetty, N. and Arunachalam, S. P. (2023). The impact of microbiota on the gut–brain axis: examining the complex interplay and implications. *Journal of Clinical Medicine*, 12(16), 5231.

Chen, J., Zheng, D., Cai, Z., Zhong, B., Zhang, H., Pan, Z., Ling, X., Han, Y., Meng, J., Li, H., Chen, X., Zhang, H. and Liu, L. (2023). Increased DNMT1 involvement in the activation of lo2 cell death induced by silver nanoparticles via promoting TFEB-dependent autophagy. *Toxics*, 11(9), 751.

Chen, L., Liang, Q., Lai, Z., Cui, H., Xu, Z., Chen, Z., Dong, Z., Wang, Z. and Guo, Y. (2024). Systematic selection of suitable reference genes for quantitative real-time PCR normalization studies of gene expression in Lutjanus erythropterus. *Scientific Reports*, 14(1), 13323.

Chen, S., Sun, Y., Fan, F., Chen, S., Zhang, Y., Zhang, Y., Meng, X. and Lin, J.-M. (2022). Present status of microfluidic PCR chip in nucleic acid detection and future perspective. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 157, 116737.

Chen, T., Mahdadi, S., Vidal, M. and Desbène-Finck, S. (2024). Non-nucleoside inhibitors of DNMT1 and DNMT3 for targeted cancer therapy. *Pharmacological Research*, 207, 107328.

Chen, Y., Zhang, S., Li, Z., Yin, B., Liu, Y. and Zhang, L. (2023). Discovery of a Dual-Target Inhibitor of CDK7 and HDAC1 That induces apoptosis and inhibits migration in colorectal cancer. *ChemMedChem*, 18(23), e202300281.

Chen, Z., Wang, D., Gu, S., Wu, N., Wang, K. and Zhang, Y. (2024). Size exclusion chromatography and asymmetrical flow field-flow fractionation for structural characterization of polysaccharides: A comparative review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 277, 134236.

Chen, Z., Xing, T., Li, J., Zhang, L., Jiang, Y. and Gao, F. (2021). Hydrogen peroxide–induced oxidative stress impairs redox status and damages aerobic metabolism of breast muscle in broilers. *Poultry Science*, 100(2), 918-925.

Chen, Z. and Zhang, Y. (2020). Role of mammalian DNA methyltransferases in development. *Annual Review of Biochemistry*, 89(1), 135-158.

Cheng, B., Pan, W., Xiao, Y., Ding, Z., Zhou, Y., Fei, X., Liu, J., Su, Z., Peng, X. and Chen, J. (2024). HDAC-targeting epigenetic modulators for cancer immunotherapy. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 265, 116129.

Chhabra, P. (with Tripathy, D. B., Gupta, A., Shukla, S., Kumar, R. and Bhati, K.). (2024). *Advances in analytical techniques for forensic investigation* (1st ed). John Wiley & Sons, Incorporated, 289-341.

Chiorcea-Paquim, A.-M. and Oliveira-Brett, A. M. (2023). Electrochemistry of chemotherapeutic alkylating agents and their interaction with DNA. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 222, 115036.

Choi, S., Shin, M. and Kim, W.-Y. (2024). Targeting the DNA damage response (DDR) of cancer cells with natural compounds derived from Panax ginseng and other plants. *Journal of Ginseng Research*, S1226845324000678.

Chong, S., Lin, M., Chong, D., Jensen, S. and Lau, N. S. (2025). A systematic review on gut microbiota in type 2 diabetes mellitus. *Frontiers in Endocrinology*, 15, 45-66.

Choudhuri, S., Kaur, T., Jain, S., Sharma, C. and Asthana, S. (2021). A review on genotoxicity in connection to infertility and cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 345, 109531.

Choudhury, D., Ghosh, D., Mondal, M., Singha, D., Pothuraju, R. and Malakar, P. (2024). Polyploidy and mTOR signaling: A possible molecular link. *Cell Communication and Signaling*, 22(1), 196-200.

Cockburn, D. W. and Koropatkin, N. M. (2016). Polysaccharide degradation by the intestinal microbiota and its influence on human health and disease. *Journal of Molecular Biology*, 428(16), 3230-3252.

Cohen, S. M. (2024). Cell proliferation and carcinogenesis: An approach to screening for potential human carcinogens. *Frontiers in Oncology*, 14, 1394584.

Coloretti, F., Chiavari, C., Luise, D., Tofalo, R., Fasoli, G., Suzzi, G. and Grazia, L. (2017). Detection and identification of yeasts in natural whey starter for Parmigiano Reggiano cheese-making. *International Dairy Journal*, 66, 13-17.

Costa, L. C., Shieh, P., Zafar, H., Thiabaud, G., Bobylev, E. O., Jasanoff, A. and Johnson, J. A. (2023). Hydrogen peroxide-triggered disassembly of boronic ester-cross-linked brush-arm star polymers. *ACS Macro Letters*, 12(8), 1179-1184.

Crafack, M., Mikkelsen, M. B., Saerens, S., Knudsen, M., Blennow, A., Lowor, S., Takrama, J., Swiegers, J. H., Petersen, G. B., Heimdal, H. and Nielsen, D. S. (2013). Influencing cocoa flavour using pichia kluyveri and kluyveromyces marxianus in a defined mixed starter culture for cocoa fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 167(1), 103-116.

Cremon, C., Barbaro, M. R., Ventura, M. and Barbara, G. (2018). Pre- and probiotic overview. *Current Opinion in Pharmacology*, 43, 87-92.

Crespo, M. A., Rapuano, C. J. and Syed, Z. A. (2023). Applications of mitomycin C in cornea and external disease. *Turkish Journal of Ophthalmology*, 53(3), 175-182.

Da Silva, T. F., Casarotti, S. N., De Oliveira, G. L. V. and Penna, A. L. B. (2021). The impact of probiotics, prebiotics, and synbiotics on the biochemical, clinical, and immunological markers, as well as on the gut microbiota of obese hosts. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 61(2), 337-355.

Dahiya, D. and Nigam, P. S. (2022). The gut microbiota influenced by the intake of probiotics and functional foods with prebiotics can sustain wellness and alleviate certain ailments like gut-inflammation and colon-cancer. *Microorganisms*, 10(3), 665.

Dama, A., Shpati, K., Daliu, P., Dumur, S., Gorica, E. and Santini, A. (2024). Targeting metabolic diseases: the role of nutraceuticals in modulating oxidative stress and inflammation. *Nutrients*, 16(4), 507.

Dayal, S., Chaubey, D., Joshi, D. C., Ranmale, S. and Pillai, B. (2024). Noncoding RNAs: Emerging regulators of behavioral complexity. *WIREs RNA*, 15(3), e1847.

de Araújo, T. V., Andrade, E. F., Lobato, R. V., Orlando, D. R., Gomes, N. F., de Sousa, R. V., Zangeronimo, M. G. and Pereira, L. J. (2017). Effects of beta-glucans ingestion (Saccharomyces cerevisiae) on metabolism of rats receiving high-fat diet. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 101(2), 349-358.

De Flora, S. (1998). Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 402(1), 151-158.

De Souza, A. M., Dantas, M. R. D. N., Secundo, E. L., Silva, E. D. C., Silva, P. F., Moreira, S. M. G. and De Medeiros, S. R. B. (2024). Are hydroxyapatite-based biomaterials free of genotoxicity? A systematic review. *Chemosphere*, 352, 141383.

Díaz-Vergara, L., Pereyra, C. M., Montenegro, M., Pena, G. A., Aminahuel, C. A. and Cavaglieri, L. R. (2017). Encapsulated whey–native yeast *Kluyveromyces marxianus* as a feed additive for animal production. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 1-10.

Ding, S., Shen, T., Feng, Z., Diao, S., Yan, Y., Du, Z., Jin, Y., Gu, J., Zhou, J., Liao, M. and Dong, W. (2024). Development of a highly sensitive TaqMan method based on multi-probe strategy: Its application in ASFV detection. *Biology Methods and Protocols*, 9(1), bpae011.

Domínguez Díaz, L., Fernández-Ruiz, V. and Cámara, M. (2020). The frontier between nutrition and pharma: The international regulatory framework of functional foods, food supplements and nutraceuticals. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(10), 1738-1746.

Dong, L., Wu, Y., Li, M., Zhang, C., Cao, J., Ledesma-Amaro, R., Zhao, W. and Kang, D. (2025). Exploring the fermentation potential of kluyveromyces marxianus NS127 for single-cell protein production. *Fermentation*, 11(2), 70.

Dos Santos Freire, J., Dos Santos Fernandes, B. C., Da Silva, J. A. C., Da Silva Araújo, J. R., De Almeida, P. M., Da Costa Júnior, J. S., Da Silva, J. N., De Freitas, S. D. L. and Martins, F. A. (2020). Phytochemical and antioxidant characterization, cytogenotoxicity and antigenotoxicity of the fractions of the ethanolic extract of in *Poincianella bracteosa* (Tul.) L.P. Queiroz. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 83(23-24), 730-747.

Du, X., Chen, J., Hu, T., Xu, Y., Wu, J., Peng, J., Cheng, L., Yu, Y. and Li, L. (2024). Identification and structural characterization of key prebiotic fraction of soluble dietary fiber from grapefruit peel sponge layer and its regulation effect on gut microbiota. *International Journal of Biological Macromolecules*, 259, 129274.

EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). (2013). Scientific opinion on the maintenance of the list of QPS biological agents intentionally added to food and feed (2013 update). *EFSA Journal*, 11(11), 45-52.

El Halmouch, Y., Ibrahim, H. A. H., Dofdaa, N. M., Mabrouk, M. E. M., El-Metwally, M. M., Nehira, T., Ferji, K., Ishihara, Y., Matsuo, K. and Ibrahim, M. I. A. (2023). Complementary spectroscopy studies and potential activities of levan-type fructan produced by Bacillus paralicheniformis ND2. *Carbohydrate Polymers*, 311, 120743.

Elespuru, R. K., Doak, S. H., Collins, A. R., Dusinska, M., Pfuhler, S., Manjanatha, M., Cardoso, R. and Chen, C. L. (2022). Common considerations for genotoxicity assessment of nanomaterials. *Frontiers in Toxicology*, 4, 859122.

Erikel, E., Yuzbaşıoğlu, D. and Unal, F. (2023). A study on Amygdalin's genotoxicological safety and modulatory activity in human peripheral lymphocytes *in vitro*. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 64(5), 291-308.

Essa, M. M., Bishir, M., Bhat, A., Chidambaram, S. B., Al-Balushi, B., Hamdan, H., Govindarajan, N., Freidland, R. P. and Qoronfleh, M. W. (2023). Functional foods and their impact on health. *Journal of Food Science and Technology*, 60(3), 820-834.

Evans, H. J. (1984). Human Peripheral blood lymphocytes for the analysis of chromosome aberrations in mutagen tests. *Handbook of Mutagenicity Test Procedures*, Amsterdam, Elsevier, 405-427

Fabbri, M., Girnita, L., Varani, G. and Calin, G. A. (2019). Decrypting noncoding RNA interactions, structures, and functional networks. *Genome Research*, 29(9), 1377-1388.

Fahrer, J. and Christmann, M. (2023). DNA Alkylation damage by nitrosamines and relevant DNA repair pathways. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(5), 4684.

Fang, Q., Hu, J., Nie, Q. and Nie, S. (2019). Effects of polysaccharides on glycometabolism based on gut microbiota alteration. *Trends in Food Science & Technology*, 92, 65-70.

Fasiku, V., Kyagaba, D., Hlalele, A., Adegoke, A., Erukainure, O. L. and Sekhoacha, M. (2025). A perspective review on factors that influence mutagenicity in medicinal plants and their health implications. *Toxicological Sciences*, kfaf004.

Fenech, M. (2007). Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature Protocols*, 2(5), 1084-1104.

Fenech, M., Knasmueller, S., Nersesyan, A., Bolognesi, C., Wultsch, G., Schunck, C., Volpi, E. and Bonassi, S. (2024). The buccal micronucleus cytome assay: New horizons for its implementation in human studies. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 894, 503724.

Ferenc, K., Sokal-Dembowska, A., Helma, K., Motyka, E., Jarmakiewicz-Czaja, S. and Filip, R. (2024). Modulation of the gut microbiota by nutrition and its relationship to epigenetics. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(2), 1228.

Ferreira, M. A. D. M. and Silveira, W. B. D. (2024). Multi-omics data and model integration reveal the main mechanisms associated with respiro-fermentative metabolism and ethanol stress responses in Kluyveromyces marxianus. *Biochemical Engineering Journal*, 211, 109471.

Fried, S., Wemelle, E., Cani, P. D. and Knauf, C. (2021). Interactions between the microbiota and enteric nervous system during gut-brain disorders. *Neuropharmacology*, 197, 108721.

Fu, D., Calvo, J. A. and Samson, L. D. (2012). Balancing repair and tolerance of DNA damage caused by alkylating agents. *Nature Reviews Cancer*, 12(2), 104-120.

Fujiike, A. Y., Lee, C. Y. A. L., Rodrigues, F. S. T., Oliveira, L. C. B., Barbosa-Dekker, A. M., Dekker, R. F. H., Cólus, I. M. S. and Serpeloni, J. M. (2022). Anticancer effects of carboxymethylated (1→3)(1→6)-β-D-glucan (botryosphaeran) on multicellular tumor spheroids of MCF-7 cells as a model of breast cancer. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 85(13), 521-537.

Gajski, G., Kašuba, V., Milić, M., Gerić, M., Matković, K., Delić, L., Nikolić, M., Pavičić, M., Rozgaj, R., Garaj-Vrhovac, V. and Kopjar, N. (2024). Exploring cytokinesis block micronucleus assay in Croatia: A journey through the past, present, and future in biomonitoring of the general population. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 895, 503749.

Gao, J., Chen, L., Li, T., Wen, J., Hu, R., Li, K. and Yin, H. (2024). Preparation of carboxymethylated curdlan oligosaccharides and application on plant disease control. *European Polymer Journal*, 220, 113493.

Gao, S., Li, L., Wei, Y., Wen, L., Shao, S., Wu, J. and Zong, X. (2024). Research progress of artp mutagenesis technology based on citespace visualization analysis. *Molecular Biotechnology*, 3. 45-52.

Gebrayel, P., Nicco, C., Al Khodor, S., Bilinski, J., Caselli, E., Comelli, E. M., Egert, M., Giaroni, C., Karpinski, T. M., Loniewski, I., Mulak, A., Reygner, J., Samczuk, P., Serino, M., Sikora, M., Terranegra, A., Ufnal, M., Villeger, R., Pichon, C. and Edeas, M. (2022). Microbiota medicine: Towards clinical revolution. *Journal of Translational Medicine*, 20(1), 111.

George, B. P., Chandran, R. and Abrahamse, H. (2021). Role of phytochemicals in cancer chemoprevention: insights. *Antioxidants*, 10(9), 1455.

Gerbatin, R. R., Augusto, J., Morris, G., Campbell, A., Worm, J., Langa, E., Reschke, C. R. and Henshall, D. C. (2022). Investigation of MicroRNA-134 as a target against seizures and SUDEP in a mouse model of dravet syndrome. *eNeuro*, 9(5), 65-78.

Gerhauser, C. (2018). Impact of dietary gut microbial metabolites on the epigenome. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 373(1748), 20170359.

Ghosh, S., Choudhury, D., Ghosh, D., Mondal, M., Singha, D. and Malakar, P. (2024). Characterization of polyploidy in cancer: Current status and future perspectives. *International Journal of Biological Macromolecules*, 268, 131706.

Gjelsvik, K. J., Besen-McNally, R. and Losick, V. P. (2019). Solving the polyploid mystery in health and disease. *Trends in Genetics*, 35(1), 6-14.

Goh, K. K. T., Haisman, D. R. and Singh, H. (2005). Development of an improved procedure for isolation and purification of exopolysaccharides produced by Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus NCFB 2483. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 67(2), 202-208.

Gou, H.-Z., Zhang, Y.-L., Ren, L.-F., Li, Z.-J. and Zhang, L. (2022). How do intestinal probiotics restore the intestinal barrier? *Frontiers in Microbiology*, 13, 78-82.

Greenberg, M. V. C. and Bourc'his, D. (2019). The diverse roles of DNA methylation in mammalian development and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 20(10), 590-607.

Grice, E. A. and Segre, J. A. (2012). The human microbiome: our second genome*. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 13(13), 151-170.

Gu, K. J. and Li, G. (2020). An overview of cancer prevention: chemoprevention and Immunoprevention. *Journal of Cancer Prevention*, 25(3), 127-135.

Gu, M., Ren, B., Fang, Y., Ren, J., Liu, X., Wang, X., Zhou, F., Xiao, R., Luo, X., You, L. and Zhao, Y. (2024). Epigenetic regulation in cancer. *MedComm*, 5(2), 495.

Guo, B., Li, D., Du, L. and Zhu, X. (2020). piRNAs: Biogenesis and their potential roles in cancer. *Cancer and Metastasis Reviews*, 39(2), 567-575.

Gupta, S. (2024). Identification of sources of coarse mode aerosol particles (PM. *Environmental Science and Pollution Research*, 1, 55-68.

Hadi, N. S. A. and Stopper, H. (2025). Micronuclei as genotoxicity endpoint applied in the co-culture of two mammalian cell lines. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 901, 503839.

Hamidi, M., Gholipour, A. R., Delattre, C., Sesdighi, F., Mirzaei Seveiri, R., Pasdaran, A., Kheirandish, S., Pierre, G., Safarzadeh Kozani, P., Safarzadeh Kozani, P. and Karimitabar, F. (2020). Production, characterization and biological activities of exopolysaccharides from a new cold-adapted yeast: Rhodotorula mucilaginosa sp. GUMS16. *International Journal of Biological Macromolecules*, 151, 268-277.

Hamidi, M., Okoro, O. V., Ianiri, G., Jafari, H., Rashidi, K., Ghasemi, S., Castoria, R., Palmieri, D., Delattre, C., Pierre, G., Mirzaei, M., Nie, L., Samadian, H. and Shavandi, A. (2023). Exopolysaccharide from the yeast Papiliotrema terrestris PT22AV for skin wound healing. *Journal of Advanced Research*, 46, 61-74.

Hao, Y., Huang, Y., Chen, J., Li, J., Yuan, Y., Wang, M., Han, L., Xin, X., Wang, H., Lin, D., Peng, F., Yu, F., Zheng, C. and Shen, C. (2020). Exopolysaccharide from *Cryptococcus heimaeyensis* S20 induces autophagic cell death in non-small cell lung cancer cells via ROS/p38 and ROS/ERK signalling. *Cell Proliferation*, 53(8), 128.

Hatanaka, Y., Tsusaka, T., Shimizu, N., Morita, K., Suzuki, T., Machida, S., Satoh, M., Honda, A., Hirose, M., Kamimura, S., Ogonuki, N., Nakamura, T., Inoue, K., Hosoi, Y., Dohmae, N., Nakano, T., Kurumizaka, H., Matsumoto, K., Shinkai, Y. and Ogura, A. (2017). Histone H3 Methylated at Arginine 17 Is Essential for reprogramming the paternal genome in zygotes. *Cell Reports*, 20(12), 2756-2765.

Haverić, S., Hadžić Omanović, M., Ćetković Pećar, T., Durmišević, I., Čaluk Klačar, L. and Haverić, A. (2023). A retrospective analysis of spontaneous chromosomal aberrations in human lymphocyte cultures of individuals from Bosnia and Herzegovina. *Genetics & Applications*, 7(2), 102-108.

Hayashi-Takanaka, Y., Hayashi, Y., Hirano, Y., Miyawaki-Kuwakado, A., Ohkawa, Y., Obuse, C., Kimura, H., Haraguchi, T. and Hiraoka, Y. (2021). Chromatin loading of MCM hexamers is associated with di-/tri-methylation of histone H4K20 toward S phase entry. *Nucleic Acids Research*, 49(21), 12152-12166.

Hemminki, K., Niazi, Y., Vodickova, L., Vodicka, P. and Försti, A. (2024). Genetic and environmental associations of nonspecific chromosomal aberrations. *Mutagenesis*, 2, 68-78.

Hendriks, G., Adriaens, E., Allemang, A., Clements, J., Cole, G., Derr, R., Engel, M., Hamel, A., Kidd, D., Kellum, S., Kiyota, T., Myhre, A., Naëssens, V., Pfuhler, S., Roy, M., Settivari, R., Schuler, M., Zeller, A., Van Benthem, J. and Kirkland, D. (2024). Interlaboratory validation of the ToxTracker assay: An in vitro reporter assay for mechanistic genotoxicity assessment. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 65(1-2), 4-24.

Holoch, D. and Moazed, D. (2015). RNA-mediated epigenetic regulation of gene expression. *Nature Reviews Genetics*, 16(2), 71-84.

Homayouni-Rad, A., Azizi, A., Oroojzadeh, P. and Pourjafar, H. (2020). Kluyveromyces marxianus as a probiotic yeast: a mini-review. *Current Nutrition & Food Science*, 16(8), 1163-1169.

Hoshida, H., Kidera, K., Takishita, R., Fujioka, N., Fukagawa, T. and Akada, R. (2018). Enhanced production of extracellular inulinase by the yeast Kluyveromyces marxianus in xylose catabolic state. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 125(6), 676-681.

Hou, K., Wu, Z.-X., Chen, X.-Y., Wang, J.-Q., Zhang, D., Xiao, C., Zhu, D., Koya, J. B., Wei, L., Li, J. and Chen, Z.-S. (2022). Microbiota in health and diseases. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 7(1), 135.

Houldsworth, A. (2023). Role of oxidative stress in neurodegenerative disorders: A review of reactive oxygen species and prevention by antioxidants. *Brain Communications*, 6(1), 356-366.

Huang, C. and Aghaei-Zarch, S. M. (2024). From molecular pathogenesis to therapy: Unraveling non-coding RNAs/DNMT3A axis in human cancers. *Biochemical Pharmacology*, 222, 116107.

Isobe, Y., Yokoigawa, K. and Kawai, H. (1998). Suppressive effects of polysaccharide produced by bacillus circulans on chemical mutagens-induced SOS response in salmonella typhimurium. *Food Science and Technology International, Tokyo*, 4(1), 77-79.

İnanan, T., Önal Darilmaz, D., Karaduman Yeşildal, T., Yüksekdağ, Z. and Yavuz, S. (2024). Structural characteristics of Lacticaseibacillus rhamnosus ACS5 exopolysaccharide in association with its antioxidant and antidiabetic activity in vitro. *International Journal of Biological Macromolecules*, 280, 136148.

İla, H. B., Hüsunet, M. T. (2022). Kromozom anormallikleri testi. Ünal, F. ve Yüzbaşıoğlu, D. (Editörler). *Genetik toksikoloji* içinde, Ankara: Nobel Yayınları, 153-184.

Ismail, B. and Nampoothiri, K. M. (2014). Molecular characterization of an exopolysaccharide from a probiotic Lactobacillus plantarum MTCC 9510 and its efficacy to improve the texture of starchy food. *Journal of Food Science and Technology*, 51(12), 4012-4018.

İnternet: OECD. (2016a). *Test No. 473: In Vitro mammalian chromosomal aberration test*. Organisation for Economic Co-operation and Development. URL: https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-473-in-vitro-mammalian-chromosomal-aberration-test_9789264264649-en, Son Erişim Tarihi: 27/08/2024.

İnternet: OECD. (2016b). *Test No. 489: In vivo mammalian alkaline comet assay*. Organisation for Economic Co-operation and Development. URL: https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-489-in-vivo-mammalian-alkaline-comet-assay_9789264264885-en, Son Erişim Tarihi: 27/08/2024.

İnternet: OECD. (2023). *Test No. 487: In vitro mammalian cell micronucleus test*. Organisation for Economic Co-operation and Development. URL: https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-487-in-vitro-mammalian-cell-micronucleus-test_9789264264861-en, Son Erişim Tarihi: 27/08/2024.

Jadhav, H. B., Sablani, S., Gogate, P., Annapure, U., Casanova, F., Nayik, G. A., Alaskar, K., Sarwar, N., Raina, I. A., Ramniwas, S. and Mousavi Khaneghah, A. (2023). Factors governing consumers buying behavior concerning nutraceutical product. *Food Science & Nutrition*, 11(9), 4988-5003.

Jan, Z., Ahmed, W. S., Biswas, K. H. and Jithesh, P. V. (2024). Identification of a potential DNA methyltransferase (DNMT) inhibitor. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 42(9), 4730-4744.

Janssen, A., van der Burg, M., Szuhai, K., Kops, G. J. P. L. and Medema, R. H. (2011). Chromosome segregation errors as a cause of DNA damage and structural chromosome aberrations. *Science*, 333(6051), 1895-1898.

Jia, B., Zou, Y., Han, X., Bae, J.-W. and Jeon, C. O. (2023). Gut microbiome-mediated mechanisms for reducing cholesterol levels: İmplications for ameliorating cardiovascular disease. *Trends in Microbiology*, 31(1), 76-91.

Jiang, B., Li, Q., Zhang, Z., Huang, Y., Wu, Y., Li, X., Huang, M., Huang, Y. and Jian, J. (2023). Selection and evaluation of stable reference genes for quantitative real-time PCR in the head kidney leukocyte of Oreochromis niloticus. *Aquaculture Reports*, 31, 101660.

Jiang, B., Mu, W., Wang, J., Lu, J., Jiang, S., Li, L., Xu, H. and Tian, H. (2016). MicroRNA-138 functions as a tumor suppressor in osteosarcoma by targeting differentiated embryonic chondrocyte gene 2. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 35(1), 69.

Jiang, H., Wu, Y., Valverde, P., Murray, D., Tang, J., Yao, Q., Han, Q., Zhang, J., Zhang, L., Sui, L., Tang, Y., Tu, Q. and Chen, J. (2019). Central adiponectin induces trabecular bone mass partly through epigenetic downregulation of cannabinoid receptor CB1. *Journal of Cellular Physiology*, 234(5), 7062-7069.

Jose, E., March-Steinman, W., Wilson, B. A., Shanks, L., Parkinson, C., Alvarado-Cruz, I., Sweasy, J. B. and Paek, A. L. (2024). Temporal coordination of the transcription factor response to H2O2 stress. *Nature Communications*, 15(1), 3440.

Jurášková, D., Ribeiro, S. C., Bastos, R., Coelho, E., Coimbra, M. A. and Silva, C. C. G. (2024). Exopolysaccharide (EPS) Produced by leuconostoc mesenteroides SJC113: characterization of functional and technological properties and application in fat-free cheese. *Macromol*, 4(3), 680-696.

Kabadayı, H. K., Demiray, E., Ertuğrul Karatay, S. and Dönmez, G. (2024). Enhanced cu (II) bioremoval by newly isolated *Kluyveromyces marxianus* with sodium dodecyl sulphate. *Bioremediation Journal*, 3, 1-7.

Kagimura, F. Y., Da Cunha, M. A. A., Theis, T. V., Malfatti, C. R. M., Dekker, R. F. H., Barbosa, A. M., Teixeira, S. D. and Salomé, K. (2015). Carboxymethylation of (1→6)-β-glucan (lasiodiplodan): Preparation, characterization and antioxidant evaluation. *Carbohydrate Polymers*, 127, 390-399.

Kahraman-Ilıkkan, Ö., Akad Dinçer, S., Bağdat, E. Ş., Çağlar, I., Dertli, E., İspirli, H. and Şahin, F. İ. (2024). The wound healing effect and DNA damage repair of exopolysaccharide extracted from Weissella cibaria MED17. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 31, 100400.

Kanmani, P., Satish Kumar, R., Yuvaraj, N., Paari, K. A., Pattukumar, V. and Arul, V. (2011). Production and purification of a novel exopolysaccharide from lactic acid bacterium Streptococcus phocae PI80 and its functional characteristics activity in vitro. *Bioresource Technology*, 102(7), 4827-4833.

Karim, A., Gerliani, N. and Aïder, M. (2020a). Kluyveromyces marxianus: An emerging yeast cell factory for applications in food and biotechnology. *International Journal of Food Microbiology*, 333, 108818.

Karim, A., Gerliani, N. and Aïder, M. (2020b). Kluyveromyces marxianus: An emerging yeast cell factory for applications in food and biotechnology. *International Journal of Food Microbiology*, 333, 108818.

Kasti, A. N., Synodinou, K. D., Pyrousis, I. A., Nikolaki, M. D. and Triantafyllou, K. D. (2021). Probiotics regulating inflammation via NLRP3 inflammasome modulation: a potential therapeutic approach for COVID-19. *Microorganisms*, 9(11), 2376.

Kerche-Silva, L. E., Cólus, I. M. S., Malini, M., Mori, M. P., Dekker, R. F. H. and Barbosa-Dekker, A. M. (2017). In vitro protective effects of botryosphaeran, a (1 → 3;1 → 6)-β-d-glucan, against mutagens in normal and tumor rodent cells. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 814, 29-36.

Khatab, H., Eissa, S. and S. Elhaddad, N. (2024). Preventive effects of dill oil on potassium bromated-induced oxidative DNA damage in garlic root tips. *Sultan Qaboos University Journal for Science*, 29(2), 45-55.

Khatoon, S., Kalam, N., Rashid, S. and Bano, G. (2023). Effects of gut microbiota on neurodegenerative diseases. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 15, 1145241.

Kim, M., Jang, H.-J., Baek, S.-Y., Choi, K.-J., Han, D.-H. and Sung, J.-S. (2023). Regulation of base excision repair during adipogenesis and osteogenesis of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Scientific Reports*, 13(1), 16384.

Kim, M., Qie, Y., Park, J. and Kim, C. H. (2016). Gut microbial metabolites fuel host antibody responses. *Cell Host & Microbe*, 20(2), 202-214.

Kim, Y.-T. and Mills, D. A. (2024). Exploring the gut microbiome: Probiotics, prebiotics, synbiotics, and postbiotics as key players in human health and disease improvement. *Food Science and Biotechnology*, 33(9), 2065-2080.

Kour, J., Ali, M. N., Ganaie, H. A. and Tabassum, N. (2017). Amelioration of the cyclophosphamide induced genotoxic damage in mice by the ethanolic extract of Equisetum arvense. *Toxicology Reports*, 4, 226-233.

Kowsalya, M., Velmurugan, T., Mythili, R., Kim, W., Sudha, K. G., Ali, S., Kalpana, B., Ramalingam, S. and Prasanna Rajeshkumar, M. (2023). Extraction and characterization of exopolysaccharides from Lactiplantibacillus plantarum strain PRK7 and PRK 11, and evaluation of their antioxidant, emulsion, and antibiofilm activities. *International Journal of Biological Macromolecules*, 242, 124842.

Kunyeit, L., Rao, R. P. and Anu-Appaiah, K. A. (2024a). Yeasts originating from fermented foods, their potential as probiotics and therapeutic implication for human health and disease. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 64(19), 6660-6671.

Kunyeit, L., Rao, R. P. and Anu-Appaiah, K. A. (2024b). Yeasts originating from fermented foods, their potential as probiotics and therapeutic implication for human health and disease. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 64(19), 6660-6671.

Kushwaha, T.N. and Maurya, S. (2024). Probiotics and the physiological & biological aspects of probiotic microorganisms. *Journal of Food Science and Nutrition Therapy*, 10(1), 044-056.

Kwon, M., Lee, J., Park, S., Kwon, O.-H., Seo, J. and Roh, S. (2020). Exopolysaccharide isolated from lactobacillus plantarum L-14 has anti-inflammatory effects via the toll-like receptor 4 pathway in LPS-Induced RAW 264.7 cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(23), 9283.

La Torre, A., Lo Vecchio, F. and Greco, A. (2023). Epigenetic mechanisms of aging and aging-associated diseases. *Cells*, 12(8), 1163.

Lakshmanan, D. K., Ravichandran, G., Elangovan, A., D, A. A. and Thilagar, S. (2024). Mechanisms and intervention of prebiotic foods in musculoskeletal health. *The Journal of Nutrition*, 154(9), 2628-2639.

Lam, J. K. W., Chow, M. Y. T., Zhang, Y. and Leung, S. W. S. (2015). siRNA Versus miRNA as therapeutics for gene silencing. *Molecular Therapy Nucleic Acids*, 4, 85-93.

Landis-Piwowar, K. R. and Iyer, N. R. (2014). Cancer chemoprevention: current state of the art. *Cancer Growth and Metastasis*, 7, 88-112.

Lang, F., Cornwell, J. A., Kaur, K., Elmogazy, O., Zhang, W., Zhang, M., Song, H., Sun, Z., Wu, X., Aladjem, M. I., Aregger, M., Cappell, S. D. and Yang, C. (2024). Abrogation of the G2/M checkpoint as a chemosensitization approach for alkylating agents. *Neuro-Oncology*, 26(6), 1083-1096.

Laranjeira, A. B. A., Hollingshead, M. G., Nguyen, D., Kinders, R. J., Doroshow, J. H. and Yang, S. X. (2023). DNA damage, demethylation and anticancer activity of DNA methyltransferase (DNMT) inhibitors. *Scientific Reports*, 13(1), 5964.

Lederer, A.-K., Görrissen, N., Nguyen, T. T., Kreutz, C., Rasel, H., Bartsch, F., Lang, H. and Endres, K. (2025). Exploring the effects of gut microbiota on cholangiocarcinoma progression by patient-derived organoids. *Journal of Translational Medicine*, 23(1), 34.

Legesse Bedada, T., Feto, T. K., Awoke, K. S., Garedew, A. D., Yifat, F. T. and Birri, D. J. (2020). Probiotics for cancer alternative prevention and treatment. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 129, 110409.

Li, E. and Zhang, Y. (2014). DNA methylation in mammals. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 6(5), 19-33.

Li, N., Zhao, G. and Xu, M. (2023). Kluyveromyces marxianus ameliorates high-fat-diet-ınduced kidney ınjury by affecting gut microbiota and TLR4/NF-κB Pathway in a Mouse Model. *Cellular Microbiology*, 2023(1), 2822094.

Li, S., Zhang, Y., Yin, P., Zhang, K., Liu, Y., Gao, Y., Li, Y., Wang, T., Lu, S. and Li, B. (2021). Probiotic potential of γ-aminobutyric acid (GABA)–producing yeast and its influence on the quality of cheese. *Journal of Dairy Science*, 104(6), 6559-6576.

Li, Y. (2021). Modern epigenetics methods in biological research. *Methods*, 187, 104-113.

Li, Y. (2024). DNA adducts in cancer chemotherapy. *Journal of Medicinal Chemistry*, 67(7), 5113-5143.

Liao, Y., Gao, M., Wang, Y., Liu, X., Zhong, C. and Jia, S. (2022). Structural characterization and immunomodulatory activity of exopolysaccharide from Aureobasidium pullulans CGMCC 23063. *Carbohydrate Polymers*, 288, 119366.

Lin, Q., Si, Y., Zhou, F., Hao, W., Zhang, P., Jiang, P. and Cha, R. (2024). Advances in polysaccharides for probiotic delivery: Properties, methods, and applications. *Carbohydrate Polymers*, 323, 121414.

Lisanti, M. P., Martinez-Outschoorn, U. E., Lin, Z., Pavlides, S., Whitaker-Menezes, D., Pestell, R. G., Howell, A. and Sotgia, F. (2011). Hydrogen peroxide fuels aging, inflammation, cancer metabolism and metastasis: The seed and soil also needs "fertilizer". *Cell Cycle*, 10(15), 2440-2449.

Liu, G.-L., Chi, Z., Wang, G.-Y., Wang, Z.-P., Li, Y. and Chi, Z.-M. (2015). Yeast killer toxins, molecular mechanisms of their action and their applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, 35(2), 222-234.

Liu, J.-S., Zeng, Y.-X., Bi, S.-Y., Zhou, J.-W., Cheng, R., Li, J. and Jia, A.-Q. (2021). Characterization and chemical modification of PLN-1, an exopolysaccharide from Phomopsis liquidambari NJUSTb1. *Carbohydrate Polymers*, 253, 117197.

Liu, L., Xu, J., Na, R., Du, R., Ping, W., Ge, J. and Zhao, D. (2022). Purification, characterization and partial biological activities of exopolysaccharide produced by Saccharomyces cerevisiae Y3. *International Journal of Biological Macromolecules*, 206, 777-787.

Liu, R., Wu, J., Guo, H., Yao, W., Li, S., Lu, Y., Jia, Y., Liang, X., Tang, J. and Zhang, H. (2023). Post-translational modifications of histones: Mechanisms, biological functions, and therapeutic targets. *MedComm*, 4(3), e292.

Liu, Y. and Huang, G. (2019). Extraction and derivatisation of active polysaccharides. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 34(1), 1690-1696.

Liu, Y., Wu, Q., Wu, X., Algharib, S. A., Gong, F., Hu, J., Luo, W., Zhou, M., Pan, Y., Yan, Y. and Wang, Y. (2021). Structure, preparation, modification, and bioactivities of β-glucan and mannan from yeast cell wall: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 173, 445-456.

Lu, X., Liu, L., Zhang, H., Lu, H., Tian, T., Du, B., Li, P., Yu, Y., Zhou, J. and Lu, H. (2024). High-yield expressed human ferritin heavy-chain nanoparticles in k. marxianus for functional food development. *Foods*, 13(18), 2919.

Lu, Y., Fan, C., Liang, A., Fan, X., Wang, R., Li, P. and Qi, K. (2018). Effects of SCFA on the DNA methylation pattern of adiponectin and resistin in high-fat-diet-induced obese male mice. *British Journal of Nutrition*, 120(4), 385-392.

Luan, Y. and Honma, M. (2022). Genotoxicity testing and recent advances. *Genome Instability & Disease*, 3(1), 1-21.

Lubomirsky, E., Khodabandeh, A., Preis, J., Susewind, M., Hofe, T., Hilder, E. F. and Arrua, R. D. (2021). Polymeric stationary phases for size exclusion chromatography: A review. *Analytica Chimica Acta*, 1151, 338244.

Luo, J., Liang, S. and Jin, F. (2024). Gut microbiota and healthy longevity. *Science China Life Sciences*, 2, 1-13.

Lyko, F. (2018). The DNA methyltransferase family: A versatile toolkit for epigenetic regulation. *Nature Reviews Genetics*, 19(2), 81-92.

Ma, T., Shen, X., Shi, X., Sakandar, H. A., Quan, K., Li, Y., Jin, H., Kwok, L.-Y., Zhang, H. and Sun, Z. (2023). Targeting gut microbiota and metabolism as the major probiotic mechanism—An evidence-based review. *Trends in Food Science & Technology*, 138, 178-198.

Maleknia, M., Ahmadirad, N., Golab, F., Katebi, Y. and Haj Mohamad Ebrahim Ketabforoush, A. (2023). DNA methylation in cancer: epigenetic view of dietary and lifestyle factors. *Epigenetics Insights*, 16, 25168657231199893.

Malik, S., Kaur, K., Prasad, S., Jha, N. K. and Kumar, V. (2022). A perspective review on medicinal plant resources for their antimutagenic potentials. *Environmental Science and Pollution Research*, 29(41), 62014-62029.

Malini, M., Camargo, M. S., Hernandes, L. C., Vargas-Rechia, C. G., Varanda, E. A., Barbosa, A. M., Dekker, R. F. H., Matsumoto, S. T., Antunes, L. M. G. and Cólus, I. M. S. (2016). Chemopreventive effect and lack of genotoxicity and mutagenicity of the exopolysaccharide botryosphaeran on human lymphocytes. *Toxicology in Vitro*, 36, 18-25.

Mamaev, D. and Zvyagilskaya, R. (2021). *Yarrowia lipolytica*: A multitalented yeast species of ecological significance. *FEMS Yeast Research*, 21(2), 08-22.

Marangoni, K., Dorneles, G., Da Silva, D. M., Pinto, L. P., Rossoni, C. and Fernandes, S. A. (2023). Diet as an epigenetic factor in inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastroenterology*, 29(41), 5618-5629.

Marrero, A. D., Quesada, A. R., Martínez-Poveda, B. and Medina, M. Á. (2022). Antiangiogenic phytochemicals constituent of diet as promising candidates for chemoprevention of cancer. *Antioxidants*, 11(2), 302.

Martino, S., Gargano, S., Carollo, P. S., Di Leonardo, A. and Barra, V. (2024). DNMT1 prolonged absence is a tunable cellular stress that triggers cell proliferation arrest to protect from major DNA methylation loss. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 82(1), 7.

Mearza, A. A. and Aslanides, I. M. (2007). Uses and complications of mitomycin C in ophthalmology. *Expert Opinion on Drug Safety*, 6(1), 27-32.

Mello, M. B., Machado, C. S., Ribeiro, D. L., Aissa, A. F., Burim, R. V., Alves Da Cunha, M. A., Barcelos, G. R. M., Antunes, L. M. G. and Bianchi, M. L. P. (2017). Protective effects of the exopolysaccharide Lasiodiplodan against DNA damage and inflammation induced by doxorubicin in rats: Cytogenetic and gene expression assays. *Toxicology*, 376, 66-74.

Milazzo, G., Mercatelli, D., Di Muzio, G., Triboli, L., De Rosa, P., Perini, G. and Giorgi, F. M. (2020). Histone Deacetylases (HDACs): Evolution, specificity, role in transcriptional complexes, and pharmacological actionability. *Genes*, 11(5), 556.

Mirzaei Seveiri, R., Hamidi, M., Delattre, C., Sedighian, H., Pierre, G., Rahmani, B., Darzi, S., Brasselet, C., Karimitabar, F., Razaghpoor, A. and Amani, J. (2020). Characterization and prospective applications of the exopolysaccharides produced by rhodosporidium babjevae. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 10(2), 254-263.

Mišík, M., Staudinger, M., Kundi, M., Worel, N., Nersesyan, A., Ferk, F., Dusinska, M., Azqueta, A., Møller, P. and Knasmueller, S. (2023). Use of the single cell gel electrophoresis assay for the detection of DNA-protective dietary factors: Results of human intervention studies. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 791, 108458.

Mohammadiha, A., Dalimi, A., Mahmoodi, M. R., Parian, M., Pirestani, M. and Mohebali, M. (2017). The PCR-RFLP-Based detection and identification of the leishmania species causing human cutaneous leishmaniasis in the khorasan-razavi province, northeast of Iran. *Journal of Arthropod-Borne Diseases*, 11(3), 383.

Mohammed, Y. M. M., Saad, M. M. G. and Abdelgaleil, S. A. M. (2021). Production, characterization and bio-emulsifying application of exopolysaccharides from Rhodotorula mucilaginosa YMM19. *3 Biotech*, 11(7), 349.

Møller, P., Azqueta, A., Sanz-Serrano, J., Bakuradze, T., Richling, E., Eyluel Bankoglu, E., Stopper, H., Claudino Bastos, V., Langie, S. A. S., Jensen, A., Scavone, F., Giovannelli, L., Wojewódzka, M., Kruszewski, M., Valdiglesias, V., Laffon, B., Costa, C., Costa, S., Teixeira, J. P. and Collins, A. (2023). Visual comet scoring revisited: A guide to scoring comet assay slides and obtaining reliable results. *Mutagenesis*, 38(5), 253-263.

Moon, T. S. (2024). Probiotic and microbiota engineering for practical applications. *Current Opinion in Food Science*, 56, 101130.

Morales-Torres, R., Carrasco-Gubernatis, C., Grasso-Cladera, A., Cosmelli, D., Parada, F. J. and Palacios-García, I. (2023). Psychobiotic effects on anxiety are modulated by lifestyle behaviors: a randomized placebo-controlled trial on healthy adults. *Nutrients*, 15(7), 1706.

Moreno, D. A. N., Proença-Assunção, J. D. C., Farias-de-França, A. P., Dos Santos, G. F. and Oshima-Franco, Y. (2023). The antimutagenic potential of vanillin and betulin based on the antimutagenicity of resveratrol. *Contribuciones A Las Ciencias Sociales*, 16(8), 13224-13243.

Morifuji, M., Kitade, M., Fukasawa, T., Yamaji, T. and Ichihashi, M. (2017). Exopolysaccharides isolated from milk fermented with lactic acid bacteria prevent ultraviolet-induced skin damage in hairless mice. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(1), 2-15.

Morovic, W. and Budinoff, C. R. (2021). Epigenetics: a new frontier in probiotic research. *Trends in Microbiology*, 29(2), 117-126.

Mouro, C., Gomes, A. P. and Gouveia, I. C. (2024). Microbial exopolysaccharides: structure, diversity, applications, and future frontiers in sustainable functional materials. *Polysaccharides*, 5(3), 241-287.

Mötteli, S., Vetter, S., Colla, M. and Hotzy, F. (2024). Are probiotics effective in reducing the metabolic side effects of psychiatric medication? A scoping review of evidence from clinical studies. *Translational Psychiatry*, 14(1), 26.

Mustafa, M., Ali, A., Siddiqui, S. A., Mir, A. R., Kausar, T., Nayeem, S. M., Abidi, M. and Habib, S. (2022). Biophysical characterization of structural and conformational changes in methylmethane sulfonate modified DNA leading to the frizzled backbone structure and strand breaks in DNA. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 40(16), 7598-7611.

Mustafa, M., Habib, S., Imtiyaz, K., Tufail, N., Ahmad, R., Hamim, B., Abbas, K., Ahmad, W., Khan, S., Moinuddin, Rizvi, M. M. A., Hassan, M. I. and Siddiqui, S. A. (2024). Characterization of structural, genotoxic, and immunological effects of methyl methanesulfonate (MMS) induced DNA modifications: Implications for inflammation-driven carcinogenesis. *International Journal of Biological Macromolecules*, 268, 131743.

Nachtigall, C., Rohm, H. and Jaros, D. (2021). Degradation of exopolysaccharides from lactic acid bacteria by thermal, chemical, enzymatic and ultrasound stresses. *Foods*, 10(2), 396.

Nadal, S., Raj, R., Mohammed, S. and Davis, B. G. (2018). Synthetic post-translational modification of histones. *Current Opinion in Chemical Biology*, 45, 35-47.

Nakamura, K., Ishii, Y., Takasu, S., Namiki, M., Soma, M., Takimoto, N., Matsushita, K., Shibutani, M. and Ogawa, K. (2024). Chromosome aberrations cause tumorigenesis through chromosomal rearrangements in a hepatocarcinogenesis rat model. *Cancer Science*, 115(11), 3612-3621.

Nemeth, K., Bayraktar, R., Ferracin, M. and Calin, G. A. (2024). Non-coding RNAs in disease: From mechanisms to therapeutics. *Nature Reviews Genetics*, 25(3), 211-232.

Neri-Numa, I. A. and Pastore, G. M. (2020). Novel insights into prebiotic properties on human health: A review. *Food Research International*, 131, 108973.

Neves, M., Ribeiro, J., Medeiros, R. and Sousa, H. (2016). Genetic polymorphism in DNMTs and gastric cancer: A systematic review and meta-analysis. *Porto Biomedical Journal*, 1(5), 164-172.

Ng, G. Y. Q. and Hande, M. P. (2024). Use of peptide nucleic acid probe to determine telomere dynamics in improving chromosome analysis in genetic toxicology studies. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 897, 503773.

Nicolucci, A. C., Hume, M. P., Martínez, I., Mayengbam, S., Walter, J. and Reimer, R. A. (2017). Prebiotics reduce body fat and alter intestinal microbiota in children who are overweight or with obesity. *Gastroenterology*, 153(3), 711-722.

Nikolac Perkovic, M., Videtic Paska, A., Konjevod, M., Kouter, K., Svob Strac, D., Nedic Erjavec, G. and Pivac, N. (2021). Epigenetics of alzheimer's disease. *Biomolecules*, 11(2), 195.

Nimrouzi, M. and Zare, M. (2014). Principles of nutrition in islamic and traditional persian medicine. *Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine*, 19(4), 267-270.

Nishan, U., Niaz, A., Muhammad, N., Asad, M., Shah, A.-H. A., Khan, N., Khan, M., Shujah, S. and Rahim, A. (2021). Non-enzymatic colorimetric biosensor for hydrogen peroxide using lignin-based silver nanoparticles tuned with ionic liquid as a peroxidase mimic. *Arabian Journal of Chemistry*, 14(6), 103164.

Nowak, A., Śliżewska, K. and Otlewska, A. (2015). Antigenotoxic activity of lactic acid bacteria, prebiotics, and products of their fermentation against selected mutagens. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 73(3), 938-946.

Obayomi, O.V., Olaniran, A.F. and Owa, S. O. (2024). Unveiling the role of functional foods with emphasis on prebiotics and probiotics in human health: A review. *Journal of Functional Foods*, 119, 106337.

Okuka, N., Schuh, V., Krammer, U., Polovina, S., Sumarac-Dumanovic, M., Milinkovic, N., Velickovic, K., Djordjevic, B., Haslberger, A. and Ivanovic, N. Dj. (2023). Epigenetic aspects of a new probiotic concept—a pilot study. *Life*, 13(9), 1912.

Okuno, Y., Marumoto, S. and Miyazawa, M. (2019). Antimutagenic activity of flavonoids from Sozuku. *Natural Product Research*, 33(6), 862-865.

Olatunji, A. O., Olaboye, J. A., Maha, C. C., Kolawole, T. O. and Abdul, S. (2024). Harnessing the human microbiome: Probiotic and prebiotic interventions to reduce hospital-acquired infections and enhance immunity. *International Medical Science Research Journal*, 4(7), 771-787.

Olubayo M Akinosun, Olayemi M Mamidu, & Elizabeth B Bolajoko. (2024). Oxidative stress indices in apparently healthy blood donors in Ibadan. *International Journal of Science and Research Archive*, 12(2), 1321-1325.

Ospelt, C. (2022). A brief history of epigenetics. *Immunology Letters*, 249, 1-4.

O'Toole, P. W., Marchesi, J. R. and Hill, C. (2017). Next-generation probiotics: The spectrum from probiotics to live biotherapeutics. *Nature Microbiology*, 2(5), 17057.

Ovejero, S., Soulet, C. and Moriel-Carretero, M. (2021). The Alkylating agent methyl methanesulfonate triggers lipid alterations at the inner nuclear membrane that are independent from Its DNA-damaging ability. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(14), 7461.

Park, J.-W., Sahm, F., Steffl, B., Arrillaga-Romany, I., Cahill, D., Monje, M., Herold-Mende, C., Wick, W. and Turcan, Ş. (2021). TERT and DNMT1 expression predict sensitivity to decitabine in gliomas. *Neuro-Oncology*, 23(1), 76-87.

Patel, N. V. (2021). "Let food be thy medicine": diet and supplements in irritable bowel syndrome. *Clinical and Experimental Gastroenterology*, 14, 377-384.

Patnaik, E., Madu, C. and Lu, Y. (2023). Epigenetic modulators as therapeutic agents in cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(19), 14964.

Paturi, S. and Deshmukh, M. V. (2021). A glimpse of "Dicer Biology" through the structural and functional perspective. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 8, 78-85.

Paul, S., Parvez, S. S., Goswami, A. and Banik, A. (2024). Exopolysaccharides from agriculturally important microorganisms: Conferring soil nutrient status and plant health. *International Journal of Biological Macromolecules*, 262, 129954.

Paulo, E. M., Vasconcelos, M. P., Oliveira, I. S., Affe, H. M. D. J., Nascimento, R., Melo, I. S. D., Roque, M. R. D. A. and Assis, S. A. D. (2012). An alternative method for screening lactic acid bacteria for the production of exopolysaccharides with rapid confirmation. *Food Science and Technology*, 32(4), 710-714.

Pehlivan, E., Yabaş, E. and Özer, A. (2023). A comprehensive archaeometric analysis of a novel special organic finding in a glass unguentarium: NMR, FT-IR, SEM/EDX. *Journal of the Australian Ceramic Society*, 59(4), 811-821.

Pehlivan, Ö. C., Cavuşoğlu, K., Yalçin, E. and Acar, A. (2023). In silico interactions and deep neural network modeling for toxicity profile of methyl methanesulfonate. *Environmental Science and Pollution Research*, 30(55), 117952-117969.

Peixoto, P., Cartron, P.-F., Serandour, A. A. and Hervouet, E. (2020). From 1957 to nowadays: a brief history of epigenetics. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(20), 7571.

Peng, Z., Zhou, W., Zhang, C., Liu, H. and Zhang, Y. (2018). Curcumol controls choriocarcinoma stem-like cells self-renewal via repression of DNA methyltransferase (DNMT)- and histone deacetylase (HDAC)-mediated epigenetic regulation. *Medical Science Monitor*, 24, 461-472.

Persaud, N. S. and Cates, H. M. (2023). The epigenetics of anxiety pathophysiology: a dna methylation and histone modification focused review. *Eneuro*, 10(4), ENEURO.0109-21.2021.

Pineiro, M., Asp, N.-G., Reid, G., Macfarlane, S., Morelli, L., Brunser, O. and Tuohy, K. (2008). FAO technical meeting on prebiotics. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 42, S156.

Pirsa, S. and Purghorbani, F. (2024). An overview of hydrogen peroxide sensors and their applications in food quality control. *Sensor Review*, 44(2), 159-170.

Pourjafar, H., Ansari, F., Sadeghi, A., Samakkhah, S. A. and Jafari, S. M. (2023). Functional and health-promoting properties of probiotics' exopolysaccharides; isolation, characterization, and applications in the food industry. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 63(26), 8194-8225.

Puyo, S., Montaudon, D. and Pourquier, P. (2014). From old alkylating agents to new minor groove binders. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 89(1), 43-61.

Pyo, Y., Kwon, K. H. and Jung, Y. J. (2024). Probiotic functions in fermented foods: anti-viral, immunomodulatory, and anti-cancer benefits. *Foods*, 13(15), 2386.

Ragavan, M. L. and Das, N. (2019). Optimization of exopolysaccharide production by probiotic yeast Lipomyces starkeyi VIT-MN03 using response surface methodology and its applications. *Annals of Microbiology*, 69(5), 515-530.

Rahbar Saadat, Y., Yari Khosroushahi, A., Movassaghpour, A. A., Talebi, M. and Pourghassem Gargari, B. (2020). Modulatory role of exopolysaccharides of Kluyveromyces marxianus and Pichia kudriavzevii as probiotic yeasts from dairy products in human colon cancer cells. *Journal of Functional Foods*, 64, 103675.

Rahbar Saadat, Y., Yari Khosroushahi, A. and Pourghassem Gargari, B. (2021). Yeast exopolysaccharides and their physiological functions. *Folia Microbiologica*, 66(2), 171-182.

Rajkumar, A. S., Varela, J. A., Juergens, H., Daran, J.-M. G. and Morrissey, J. P. (2019). Biological parts for kluyveromyces marxianus synthetic biology. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 7, 97.

Ramadan, M. F. (Ed.). (2023). *Fig (Ficus carica): production, processing, and properties*. New York: Springer International Publishing, 582-853.

Ramezani, A. (2021). CtNorm: Real time PCR cycle of threshold (Ct) normalization algorithm. *Journal of Microbiological Methods*, 187, 106267.

Rana, S. and Upadhyay, L. S. B. (2020). Microbial exopolysaccharides: Synthesis pathways, types and their commercial applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 157, 577-583.

Rasgele, P. and Altin, N. (2023). Characterization of essential oils from medicinal plants and assessment of their antimutagenic effects using ames salmonella/microsomal test. *Proceedings of the Bulgarian Academy of Sciences*, 76(2), 192-202.

Rasheed, O. and Al-Rubayee, W. (2012). Effects of cigarette smoking on lipid peroxidation and antioxidant status in Iraqi Men at Baghdad city. *International Journal of Basic and Applied Sciences*, 2(1), 47-50.

Reuter, S., Gupta, S. C., Chaturvedi, M. M. and Aggarwal, B. B. (2010). Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? *Free Radical Biology and Medicine*, 49(11), 1603-1616.

Ritala, A., Häkkinen, S. T., Toivari, M. and Wiebe, M. G. (2017). Single cell protein—state-of-the-art, industrial landscape and patents 2001–2016. *Frontiers in Microbiology*, 8, 2009.

Rodrigues, R. R., Gurung, M., Li, Z., García-Jaramillo, M., Greer, R., Gaulke, C., Bauchinger, F., You, H., Pederson, J. W., Vasquez-Perez, S., White, K. D., Frink, B., Philmus, B., Jump, D. B., Trinchieri, G., Berry, D., Sharpton, T. J., Dzutsev, A., Morgun, A. and Shulzhenko, N. (2021). Transkingdom interactions between Lactobacilli and hepatic mitochondria attenuate western diet-induced diabetes. *Nature Communications*, 12(1), 101.

Rottinghaus, A. G., Vo, S. and Moon, T. S. (2023). Computational design of CRISPR guide RNAs to enable strain-specific control of microbial consortia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 120(1), 235-245.

Saber, A., Alipour, B., Faghfoori, Z. and Yari Khosroushahi, A. (2017). Cellular and molecular effects of yeast probiotics on cancer. *Critical Reviews in Microbiology*, 43(1), 96-115.

Saks, M., Upreti, S., Sv, R. and Dang, R. (2017). Genotoxicity: Mechanisms, testing guidelines and methods. *Global Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, 1(5), 133-138.

Sanaei, M., Kavoosi, F., Roustazadeh, A. and Golestan, F. (2018). Effect of genistein in comparison with trichostatin a on reactivation of DNMTs genes in hepatocellular carcinoma. *Journal of Clinical and Translational Hepatology*, 6(2), 1-6.

Sánchez-Moreiras, A. M. and Reigosa, M. J. (Ed.). (2018). *Advances in plant ecophysiology techniques*. Springer International Publishing, 231-233.

Santibanez, J. F., Villar, V. H. and Echeverria, C. (2023). Current and future cancer chemoprevention strategies. *Pharmaceutics*, 15(5), 1543.

Sarmah, N., Revathi, D., Sheelu, G., Yamuna Rani, K., Sridhar, S., Mehtab, V. and Sumana, C. (2018). Recent advances on sources and industrial applications of lipases. *Biotechnology Progress*, 34(1), 5-28.

Sasso, C. V., Lhamyani, S., Hevilla, F., Padial, M., Blanca, M., Barril, G., Jiménez-Salcedo, T., Martínez, E. S., Nogueira, Á., Lago-Sampedro, A. M. and Olveira, G. (2024). Modulation of miR-29a and miR-29b Expression and their target genes related to inflammation and renal fibrosis by an oral nutritional supplement with probiotics in malnourished hemodialysis patients. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(2), 1132.

Satoh, T., Hatanaka, M., Yamamoto, K., Kuro-o, M. and Sofuni, T. (2002). Application of mFISH for the analysis of chemically-induced chromosomal aberrations: A model for the formation of triradial chromosomes. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 504(1-2), 57-65.

Savage, J. R. (1976). Classification and relationships of induced chromosomal structual changes. *Journal of Medical Genetics*, 13(2), 103-122.

Savage, J. R. K. (1993). Update on target theory as applied to chromosomal aberrations. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 22(4), 198-207.

Saville, K. M., Al-Rahahleh, R. Q., Siddiqui, A. H., Andrews, M. E., Roos, W. P., Koczor, C. A., Andrews, J. F., Hayat, F., Migaud, M. E. and Sobol, R. W. (2024). Oncometabolite 2-hydroxyglutarate suppresses basal protein levels of DNA polymerase beta that enhances alkylating agent and PARG inhibition induced cytotoxicity. *DNA Repair*, 140, 103700.

Schulze, J. and Sonnenborn, U. (2009). Yeasts in the gut: from commensals to infectious agents. *Deutsches Ärzteblatt International*, 106(51-52), 837.

Seno, M. (2025). A landscape of cancer initiation and cancer stem cells. *Cancers*, 17(2), 3-15.

Seo, H.-S., Kim, J.-S., Park, M.-K., Seong, N.-W., Kang, G.-H., Kim, S.-H., Kim, J.-S., Kim, S.-H., Kim, J.-C. and Moon, C. (2024). Genotoxicity evaluation of collagen peptide derived from skate (Raja kenojei) skin: In vitro and in vivo studies. *Molecular & Cellular Toxicology*, 20(4), 989-1000.

Serafini, M. and Peluso, I. (2016). Functional foods for health: the interrelated antioxidant and anti-inflammatory role of fruits, vegetables, herbs, spices and cocoa in humans. *Current Pharmaceutical Design*, 22(44), 6701-6715.

Serpeloni, J. M., Grotto, D., Mercadante, A. Z., de Lourdes Pires Bianchi, M. and Antunes, L. M. G. (2010). Lutein improves antioxidant defense in vivo and protects against DNA damage and chromosome instability induced by cisplatin. *Archives of Toxicology*, 84(10), 811-822.

Shah, I. A., Kavitake, D., Tiwari, S., Devi, P. B., Reddy, G. B., Jaiswal, K. K., Jaiswal, A. K. and Shetty, P. H. (2024). Chemical modification of bacterial exopolysaccharides: Antioxidant properties and health potentials. *Current Research in Food Science*, 9, 100824.

Shang, Q., Jiang, H., Cai, C., Hao, J., Li, G. and Yu, G. (2018). Gut microbiota fermentation of marine polysaccharides and its effects on intestinal ecology: An overview. *Carbohydrate Polymers*, 179, 173-185.

Sharma, K. B., Tripathi, S. and Savitri. (2023). Evaluation of indigenous kluyveromyces marxianus isolated from western himalayan region of himachal pradesh as a potential source of exopolysaccharide production. *Trends in Carbohydrate Research*, 15(2), 52-67.

Sharma, M., Chandel, D. and Shukla, G. (2020). Antigenotoxicity and cytotoxic potentials of metabiotics extracted from isolated probiotic, *Lactobacillus rhamnosus* MD 14 on Caco-2 and HT-29 human colon cancer cells. *Nutrition and Cancer*, 72(1), 110-119.

Sharma, M., Vidhya C. S., Ojha, K., Yashwanth B. S., Singh, B., Gupta, S. and Pandey, S. K. (2024). The role of functional foods and nutraceuticals in disease prevention and health promotion. *European Journal of Nutrition & Food Safety*, 16(2), 61-83.

Shen, X., Ma, T., Li, C., Wen, Z., Zheng, J. and Zhou, Z. (2023). High-precision automatic identification method for dicentric chromosome images using two-stage convolutional neural network. *Scientific Reports*, 13(1), 2124.

Shi, Y., Davis, K. J., Zhang, F., Duffy, C. J. and Yu, X. (2014). Parameter estimation of a physically based land surface hydrologic model using the ensemble Kalman filter: A synthetic experiment: Parameter estimation using ENKF. *Water Resources Research*, 50(1), 706-724.

Shirbhate, E., Singh, V., Jahoriya, V., Mishra, A., Veerasamy, R., Tiwari, A. K. and Rajak, H. (2024). Dual inhibitors of HDAC and other epigenetic regulators: A novel strategy for cancer treatment. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 263, 115938.

Shruthi, B., Deepa, N., Somashekaraiah, R., Adithi, G., Divyashree, S. and Sreenivasa, M. Y. (2022). Exploring biotechnological and functional characteristics of probiotic yeasts: A review. *Biotechnology Reports*, 34, 71-85.

Silambarasan, S., Logeswari, P., Cornejo, P. and Kannan, V. R. (2019). Evaluation of the production of exopolysaccharide by plant growth promoting yeast Rhodotorula sp. Strain CAH2 under abiotic stress conditions. *International Journal of Biological Macromolecules*, 121, 55-62.

Singh, A. K., Pal, P., Pandey, B., Goksen, G., Sahoo, U. K., Lorenzo, J. M. and Sarangi, P. K. (2023). Development of “Smart Foods” for health by nanoencapsulation: Novel technologies and challenges. *Food Chemistry: X*, 20, 100910.

Singh, M., Saxena, S. and Mohan, K. N. (2023). DNMT1 downregulation as well as its overexpression distinctly affect mostly overlapping genes implicated in schizophrenia, autism spectrum, epilepsy, and bipolar disorders. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 16, 1275697.

Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R. and Schneider, E. L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, 175(1), 184-191.

Singh, R., Kumar, M., Mittal, A. and Mehta, P. K. (2016). Microbial enzymes: Industrial progress in 21st century. *3 Biotech*, 6(2), 174.

Sinitsky, M. Yu., Kutikhin, A. G., Tsepokina, A. V., Shishkova, D. K., Asanov, M. A., Yuzhalin, A. E., Minina, V. I. and Ponasenko, A. V. (2020). Mitomycin C induced genotoxic stress in endothelial cells is associated with differential expression of proinflammatory cytokines. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 8, 858-860.

Siraj, A. K., Pratheeshkumar, P., Parvathareddy, S. K., Bu, R., Masoodi, T., Iqbal, K., Al-Rasheed, M., Al-Dayel, F., Al-Sobhi, S. S., Alzahrani, A. S., Al-Dawish, M. and Al-Kuraya, K. S. (2019). Prognostic significance of *DNMT3A* alterations in Middle Eastern papillary thyroid carcinoma. *European Journal of Cancer*, 117, 133-144.

Slaughter, M. J., Shanle, E. K., Khan, A., Chua, K. F., Hong, T., Boxer, L. D., Allis, C. D., Josefowicz, S. Z., Garcia, B. A., Rothbart, S. B., Strahl, B. D. and Davis, I. J. (2021). HDAC inhibition results in widespread alteration of the histone acetylation landscape and BRD4 targeting to gene bodies. *Cell Reports*, 34(3), 85-105.

Słoczyńska, K., Powroźnik, B., Pękala, E. and Waszkielewicz, A. M. (2014). Antimutagenic compounds and their possible mechanisms of action. *Journal of Applied Genetics*, 55(2), 273-285.

Song, D., Lan, J., Chen, Y., Liu, A., Wu, Q., Zhao, C., Feng, Y., Wang, J., Luo, X., Cao, Z., Cao, X., Hu, J. and Wang, G. (2021). NSD2 promotes tumor angiogenesis through methylating and activating STAT3 protein. *Oncogene*, 40(16), 2952-2967.

Song, Q. and Chen, Z. J. (2015). Epigenetic and developmental regulation in plant polyploids. *Current Opinion in Plant Biology*, 24, 101-109.

Song, Z.-H., Xu, S.-S., Li, G.-Y., Wang, E.-T., Li, Y. and Zhang, C. (2023). Efficacy and safety of the intraoperative application of mitomycin in glaucoma patients with trabeculectomy: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*, 2023, 1-11.

Soumya, M. P. and Nampoothiri, K. M. (2023). Evaluation of improved biological properties of chemically modified exopolysaccharides from Lactobacillus plantarum BR2. *3 Biotech*, 13(9), 308.

Staberg, M., Michaelsen, S. R., Rasmussen, R. D., Villingshøj, M., Poulsen, H. S. and Hamerlik, P. (2017). Inhibition of histone deacetylases sensitizes glioblastoma cells to lomustine. *Cellular Oncology*, 40(1), 21-32.

Stephenson, E., Nathoo, N., Mahjoub, Y., Dunn, J. F. and Yong, V. W. (2014). Iron in multiple sclerosis: Roles in neurodegeneration and repair. *Nature Reviews Neurology*, 10(8), 459-468.

Struys, I., Verscheure, E., Lenaerts, L., Amant, F., Godderis, L. and Ghosh, M. (2023). Characterization of the genotoxic profile of antineoplastic drugs using the cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 97, 104036.

Svetlova, M. P., Solovjeva, L. V., Kulikova, V. A. and Nikiforov, A. A. (2024). Analysis of the Restoration of DNA Integrity in s-phase and non-s-phase cells after the treatment with methyl methanesulfonate by DNA comet assay. *Cell and Tissue Biology*, 18(5), 518-527.

Tang, K. H. D. (2025). Genotoxicity of microplastics on living organisms: effects on chromosomes, DNA and gene expression. *Environments*, 12(1), 12-18.

Tang, N., Zhang, C., Ma, K., Wang, X., Xiao, L., Zhang, X., Rui, X. and Li, W. (2023). Advanced structural characterization and in vitro fermentation prebiotic properties of cell wall polysaccharide from Kluyveromyces marxianus. *International Journal of Biological Macromolecules*, 241, 124420.

Tarique, M., Ali, A. H., Kizhakkayil, J., Gan, R.-Y., Liu, S.-Q., Kamal-Eldin, A. and Ayyash, M. (2023). Investigating the biological activities and prebiotic potential of exopolysaccharides Produced by Lactobacillus delbrueckii and Lacticaseibacillus rhamnosus: Implications for gut microbiota modulation and rheological properties in fermented milk. *Food Hydrocolloids for Health*, 4, 100162.

Tarique, M., Ali, A. H., Kizhakkayil, J., Liu, S.-Q., Oz, F., Dertli, E., Kamal-Eldin, A. and Ayyash, M. (2024). Exopolysaccharides from Enterococcus faecium and Streptococcus thermophilus: Bioactivities, gut microbiome effects, and fermented milk rheology. *Food Chemistry: X*, 21, 101073.

Taylor, H. B. and Vasu, C. (2021). Impact of prebiotic β-glucan treatment at juvenile age on the gut microbiota composition and the eventual type 1 diabetes onset in non-obese Diabetic Mice. *Frontiers in Nutrition*, 8, 105-108.

Teimouri, A., Mohebali, M., Kazemirad, E. and Hajjaran, H. (2018). Molecular identification of agents of human cutaneous leishmaniasis and canine visceral leishmaniasis in different areas of Iran using internal transcribed spacer 1 PCR-RFLP. *Journal of Arthropod-Borne Diseases*, 12(2), 162.

Thompson, H. J. and Lutsiv, T. (2023). Natural products in precision oncology: plant-based small molecule inhibitors of protein kinases for cancer chemoprevention. *Nutrients*, 15(5), 1192.

Thorman, A. W., Morrow, A. L., Groeneveld, A., Nauta, A. and Newburg, D. S. (2024). Validation of collection and anaerobic fermentation techniques for measuring prebiotic impact on gut microbiota. *Pharmacological Research*, 203, 107169.

Thursby, E. and Juge, N. (2017). Introduction to the human gut microbiota. *Biochemical Journal*, 474(11), 1823-1836.

Tripathi, J., Wadhawan, S., Gupta, S. and Gautam, S. (2024). Sustained use of antimutagenic bioactives having affinity with DNA minor groove could prevent in vitro neoplastic induction. *Journal of Herbal Medicine*, 48, 100939.

Tsuda, H., Hara, K. and Miyamoto, T. (2008). Binding of mutagens to exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* Mutant Strain 301102S. *Journal of Dairy Science*, 91(8), 2960-2966.

Urakami, K., Shimoda, Y., Ohshima, K., Nagashima, T., Serizawa, M., Tanabe, T., Saito, J., Usui, T., Watanabe, Y., Naruoka, A., Ohnami, S., Ohnami, S., Mochizuki, T., Kusuhara, M. and Yamaguchi, K. (2016). Next generation sequencing approach for detecting 491 fusion genes from human cancer . *Biomedical Research*, 37(1), 51-62.

Ünal, F., Saygılı, Y. ve Akbaş, E. (2022). Kuyruklu yildiz/komet testi. Ünal, F. ve Yüzbaşıoğlu, D. (Edt.). *Genetik toksikoloji*, Ankara: Nobel Yayınları, 313-340.

Varrassi, G. (2024). Nutraceuticals: drugs called food. *Journal of Nutraceutıcals and Health*, 2(1), 1-2.

Velumani, P., Palani, N., Antalin Casmie, A., Senthilvel, R. and Parthasarthy, V. (2025). Cellular and chromosomal interaction of bio-synthesized copper oxide nanoparticles—Induced nano-cytotoxicity and genotoxicity. *Toxicology in Vitro*, 104, 106000.

Venturelli, O. S., Carr, A. V., Fisher, G., Hsu, R. H., Lau, R., Bowen, B. P., Hromada, S., Northen, T. and Arkin, A. P. (2018). Deciphering microbial interactions in synthetic human gut microbiome communities. *Molecular Systems Biology*, 14(6), e8157.

Verza, F. A., Das, U., Fachin, A. L., Dimmock, J. R. and Marins, M. (2020). Roles of histone deacetylases and inhibitors in anticancer therapy. *Cancers*, 12(6), 1664.

Vignesh, A., Amal, T. C., Sarvalingam, A. and Vasanth, K. (2024). A review on the influence of nutraceuticals and functional foods on health. *Food Chemistry Advances*, 5, 100749.

Wagner, J. M. and Alper, H. S. (2016). Synthetic biology and molecular genetics in non-conventional yeasts: Current tools and future advances. *Fungal Genetics and Biology*, 89, 126-136.

Wang, K., He, Z., Jin, G., Jin, S., Du, Y., Yuan, S. and Zhang, J. (2024). Targeting DNA methyltransferases for cancer therapy. *Bioorganic Chemistry*, 151, 107652.

Wang, Q., Ma, C., Yang, B., Zheng, W., Liu, X. and Jian, G. (2025). Dysregulation of DNA methylation in colorectal cancer: Biomarker, immune regulation, and therapeutic potential. *International Immunopharmacology*, 145, 113766.

Wang, R., Yu, Y. F., Yu, W. R., Sun, S. Y., Lei, Y. M., Li, Y. X., Lu, C. X., Zhai, J. N., Bai, F. R., Ren, F., Huang, J. Q. and Chen, J. (2025). Roles of probiotics, prebiotics, and postbiotics in b-cell-mediated immune regulation. *The Journal of Nutrition*, 155(1), 37-51.

Wang, W., Li, Z., Lv, Z., Zhang, B., Lv, H. and Guo, Y. (2017). Effects of Kluyveromyces marxianus supplementation on immune responses, intestinal structure and microbiota in broiler chickens. *Plos One*, 12(7), 12-22..

Wang, W., Wang, X., Tan, Y., Zhao, S., Zhao, L. and Zhu, Z. (2024). CRISPR-Cas9 mediated genome editing of Kluyveromyces marxianus for iterative, multiplexed gene disruption and pathway integration. *Biotechnology and Bioengineering*, 121(10), 3269-3282.

Wang, Y., Mo, Q., Li, Z., Lai, H., Lou, J., Liu, S. and Mao, J. (2012). Effects of degree of carboxymethylation on physicochemical and biological properties of pachyman. *International Journal of Biological Macromolecules*, 51(5), 1052-1056.

Wang, Z., Zheng, Y., Hu, Y., Yang, L., Liu, X., Zhao, R., Gao, M., Li, Z., Feng, Y., Xu, Y., Li, N., Yang, J., Wang, Q. and An, L. (2024). Improvement of antibacterial activity of polysaccharides via chemical modification: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 269, 132163.

Wong, K. K. (2020). DNMT1 as a therapeutic target in pancreatic cancer: Mechanisms and clinical implications. *Cellular Oncology*, 43(5), 779-792.

Wong, K. K. (2021). DNMT1: A key drug target in triple-negative breast cancer. *Seminars in Cancer Biology*, 72, 198-213.

Wong, K. K., Lawrie, C. H. and Green, T. M. (2019). Oncogenic roles and inhibitors of DNMT1, DNMT3A, and DNMT3B in acute myeloid leukaemia. *Biomarker Insights*, 14, 1177271919846454.

Woo, V. and Alenghat, T. (2022). Epigenetic regulation by gut microbiota. *Gut Microbes*, 14(1), 2022407.

Wróblewski, M., Wróblewska, W. and Sobiesiak, M. (2024). The role of selected elements in oxidative stress protection: key to healthy fertility and reproduction. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(17), 9409.

Wu, J., Zhang, Y., Ye, L. and Wang, C. (2021). The anti-cancer effects and mechanisms of lactic acid bacteria exopolysaccharides *in vitro*: A review. *Carbohydrate Polymers*, 253, 117308.

Wu, T., Kong, M., Xin, X., Liu, R., Wang, H., Song, M., Xu, W., Yuan, Y., Yang, Y. and Xiao, P. (2022). Epigenetic repression of THBD transcription by BRG1 contributes to deep vein thrombosis. *Thrombosis Research*, 219, 121-132.

Wu, Y.-L., Lin, Z.-J., Li, C.-C., Lin, X., Shan, S.-K., Guo, B., Zheng, M.-H., Li, F., Yuan, L.-Q. and Li, Z. (2023). Epigenetic regulation in metabolic diseases: Mechanisms and advances in clinical study. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 8(1), 98.

Xie, L., Shen, M., Wang, Z. and Xie, J. (2021). Structure, function and food applications of carboxymethylated polysaccharides: A comprehensive review. *Trends in Food Science & Technology*, 118, 539-557.

Xu, Y., Cui, Y., Yue, F., Liu, L., Shan, Y., Liu, B., Zhou, Y. and Lü, X. (2019). Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria and Bifidobacteria: Structures, physiochemical functions and applications in the food industry. *Food Hydrocolloids*, 94, 475-499.

Yadav, M. K., Kumari, I., Singh, B., Sharma, K. K. and Tiwari, S. K. (2022). Probiotics, prebiotics and synbiotics: Safe options for next-generation therapeutics. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 106(2), 505-521.

Yadav, V., Fuentes, J. L., Krishnan, A., Singh, N. and Vohora, D. (2024). Guidance for the use and interpretation of assays for monitoring anti-genotoxicity. *Life Sciences*, 337, 122341.

Yamada, H., Odagiri, M., Yamakita, K., Chiba, A., Ukai, A., Yasui, M. and Sassa, A. (2025). Dual-directional epi-genotoxicity assay for assessing chemically induced epigenetic effects utilizing the housekeeping TK gene. *Scientific Reports*, 15(1), 7780.

Yan, F., Shen, N., Pang, J., Xie, D., Deng, B., Molina, J. R., Yang, P. and Liu, S. (2014). Restoration of miR-101 suppresses lung tumorigenesis through inhibition of DNMT3a-dependent DNA methylation. *Cell Death & Disease*, 5(9), 413-415.

Yan, L., Geng, Q., Cao, Z., Liu, B., Li, L., Lu, P., Lin, L., Wei, L., Tan, Y., He, X., Li, L., Zhao, N. and Lu, C. (2023). Insights into DNMT1 and programmed cell death in diseases. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 168, 115753.

Yang, D., Chen, L., Duan, J., Yu, Y., Zhou, J. and Lu, H. (2021). Investigation of Kluyveromyces marxianus as a novel host for large-scale production of porcine parvovirus virus-like particles. *Microbial Cell Factories*, 20(1), 24.

Yang, X., Ren, Y. and Li, L. (2022). The relationship between charge intensity and bioactivities/processing characteristics of exopolysaccharides from lactic acid bacteria. *LWT*, 153, 112345.

Yang, Y., Chen, G., Zhao, X., Cao, X., Wang, L., Mu, J., Qi, F., Liu, L. and Zhang, H. (2022). Structural characterization, antioxidant and antitumor activities of the two novel exopolysaccharides produced by debaryomyces hansenii DH-1. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(1), 335.

Ye, Z., Yu, S., Yang, Y., Li, S., Li, S., Ma, R., Fu, W., Li, X. and Luo, D. (2025). Association of probiotics, prebiotics, synbiotics or yogurt supplement with prevalence and all-cause mortality of depression: NHANES 2005–2016. *Journal of Affective Disorders*, 368, 547-554.

Yıldıran, H., Başyiğit Kiliç, G. and Karahan Çakmakçi, A. G. (2019). Characterization and comparison of yeasts from different sources for some probiotic properties and exopolysaccharide production. *Food Science and Technology*, 39(2), 646-653.

Yıldız, B. M., Yuzbaşıoğlu, D., Yuksekdag, Z., Cetin, D., Unal, F. and Suludere, Z. (2023). In vitro genotoxic and antigenotoxic effects of an exopolysaccharide isolated from Lactobacillus salivarius KC27L. *Toxicology in Vitro*, 86, 105507.

Yi, Y., Huang, W. and Ge, Y. (2008). Exopolysaccharide: A novel important factor in the microbial dissolution of tricalcium phosphate. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(7), 1059-1065.

Yong, Y., Ahmad, H. N., Zhang, H., Gu, Y. and Zhu, J. (2025). Topological structure, rheological characteristics and biological activities of exopolysaccharides produced by Saccharomyces cerevisiae ADT. *International Journal of Biological Macromolecules*, 286, 138297.

Yoo, S., Jung, S.-C., Kwak, K. and Kim, J.-S. (2024). The role of prebiotics in modulating gut microbiota: implications for human health. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(9), 4834.

Yu, G., Wu, L., Su, Q., Ji, X., Zhou, J., Wu, S., Tang, Y. and Li, H. (2024). Neurotoxic effects of heavy metal pollutants in the environment: Focusing on epigenetic mechanisms. *Environmental Pollution*, 345, 123-565..

Yu, Y., Pan, M., Peng, J., Hu, D., Hao, Y. and Qian, Z. (2022). A review on recent advances in hydrogen peroxide electrochemical sensors for applications in cell detection. *Chinese Chemical Letters*, 33(9), 4133-4145.

Yüksekdağ, Z., Ahlatcı, N. S., Hajikhani, R., Darilmaz, D. O. and Beyatli, Y. (2021). Safety and metabolic characteristics of 17 Enterococcus faecium isolates. *Archives of Microbiology*, 203(9), 5683-5694.

Yüksekdağ, Z. N., Onal Darilmaz, D. and Beyatli, Y. (2014). Dairy propionibacterium strains with potential as biopreservatives against foodborne pathogens and their tolerance–resistance properties. *European Food Research and Technology*, 238(1), 17-26.

Yüzbaşıoğlu, D., Dilek, U. K., Erikel, E. and Unal, F. (2023). Antigenotoxic effect of hyperoside against Mitomycin C and hydrogen peroxide-induced genotoxic damage on human lymphocytes. *Toxicology in Vitro*, 90, 105604.

Yüzbaşıoğlu, D., Mamur, S., Avuloglu-Yilmaz, E., Erikel, E., Celebi-Keskin, A. and Unal, F. (2021). Evaluation of the genotoxic and antigenotoxic effects of exopolysaccharide pullulan in human lymphocytes in vitro. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 870-871, 503391.

Zaghloul, E. H., Abdel-Latif, H. H., Elsayis, A. and Hassan, S. W. M. (2024). Production and characterization of novel marine black yeast's exopolysaccharide with potential antiradical and anticancer prospects. *Microbial Cell Factories*, 23(1), 60.

Zaghloul, E. H. and Ibrahim, M. I. A. (2022). Production and characterization of exopolysaccharide from newly isolated marine probiotic lactiplantibacillus plantarum EI6 with in vitro wound healing activity. *Frontiers in Microbiology*, 13, 48-52.

Zand, A., Enkhbilguun, S., Macharia, J. M., Varajti, K., Szabó, I., Gerencsér, G., Tisza, B. B., Raposa, B. L., Gyöngyi, Z. and Varjas, T. (2024). Betanin attenuates epigenetic mechanisms and UV-Induced DNA fragmentation in HaCaT Cells: implications for skin cancer chemoprevention. *Nutrients*, 16(6), 860.

Zendeboodi, F., Khorshidian, N., Mortazavian, A. M. and Da Cruz, A. G. (2020). Probiotic: Conceptualization from a new approach. *Current Opinion in Food Science*, 32, 103-123.

Zhang, D., Liu, J., Cheng, H., Wang, H., Tan, Y., Feng, W. and Peng, C. (2022). Interactions between polysaccharides and gut microbiota: A metabolomic and microbial review. *Food Research International*, 160, 111653.

Zhang, D., Tang, Z., Huang, H., Zhou, G., Cui, C., Weng, Y., Liu, W., Kim, S., Lee, S., Perez-Neut, M., Ding, J., Czyz, D., Hu, R., Ye, Z., He, M., Zheng, Y. G., Shuman, H. A., Dai, L., Ren, B. and Zhao, Y. (2019). Metabolic regulation of gene expression by histone lactylation. *Nature*, 574(7779), 575-580.

Zhang, H., Ying, H. and Wang, X. (2020). Methyltransferase DNMT3B in leukemia. *Leukemia & Lymphoma*, 61(2), 263-273.

Zhang, J., Yang, C., Wu, C., Cui, W. and Wang, L. (2020). DNA methyltransferases in cancer: biology, paradox, aberrations, and targeted therapy. *Cancers*, 12(8), 2123.

Zhang, X., Zhang, X.-F., Li, H.-P., Wang, L.-Y., Zhang, C., Xing, X.-H. and Bao, C.-Y. (2014). Atmospheric and room temperature plasma (ARTP) as a new powerful mutagenesis tool. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(12), 5387-5396.

Zhang, Y., Fu, T., Ren, Y., Li, F., Zheng, G., Hong, J., Yao, X., Xue, W. and Zhu, F. (2020). Selective inhibition of HDAC1 by Macrocyclic polypeptide for the treatment of glioblastoma: a binding mechanistic analysis based on molecular dynamics. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 7.

Zhang, Z., Chen, Y., Bian, Y., Wang, T. T. and Wang, M. (2024). Cellular metabolomics study of the antitumor mechanism of Sijunzi decoction combined with mitomycin C. *Biomedical Chromatography*, 38(9), e5941.

Zhao, X., Geng, Y., Hu, T., Zhao, Y., Yang, S. and Hao, D. (2022). Evaluation of optimal reference genes for qRT-PCR analysis in hyphantria cunea (Drury). *Insects*, 13(1), 97.

Zhou, L., Wang, Y., Lou, Y., Shao, H. and Li, Y. (2021). Effect of aluminum stress on the quality of *Enteromorpha prolifera* based on SEM-EDX and FT-IR. *Food Quality and Safety*, 5, fyaa037.

Zhu, Y., Zhou, J.-M., Liu, W., Pi, X., Zhou, Q., Li, P., Zhou, T. and Gu, Q. (2021). Effects of exopolysaccharide from Lactobacillus rhamnosus on human gut microbiota in in vitro fermentation model. *LWT*, 139, 110524.



Gazili olmak ayrıcalıktır