
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Gazi
1926

*PICHIA KUDRIAVZEVII'*DEN ELDE EDİLEN EKZOPOLİSAKKARİTİN *IN VITRO* İNSAN LENFOSİTLERİNDE GENOTOKSİK, ANTİGENOTOKSİK VE EPİGENETİK DEĞİŞİKLER ÜZERİNE ETKİLERİ

Sultan YILDIRIM

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

NİSAN 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.

Sultan YILDIRIM

18/04/2025

Pichia kudriavzevii'DEN ELDE EDİLEN EKZOPOLİSAKKARİTİN *IN VITRO* İNSAN LENFOSİTLERİNDE GENOTOKSİK, ANTİGENOTOKSİK VE EPİGENETİK DEĞİŞİKLER ÜZERİNE ETKİLERİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Sultan YILDIRIM

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Nisan 2025

ÖZET

Fonksiyonel gıdalar; probiyotik, prebiyotik ve postbiyotik içerikleri sayesinde sadece besleyici olmakla kalmayıp aynı zamanda sağlık üzerinde olumlu etkiler gösterebilen biyoaktif bileşenler içermektedir. Bu bileşenler, prokaryot ve ökaryotlar tarafından sentezlenmektedir. *Pichia kudriavzevii*, stres koşullarına karşı yüksek toleransa sahip, ekzopolisakkarit ve çeşitli biyoaktif bileşenleri üretebilen, gıda, biyoteknoloji ve sağlık alanlarında kullanım potansiyeli bulunan maya türlerinden biridir. Bu çalışma, *Pichia kudriavzevii*'den elde edilen ekzopolisakkarit (EPS_{JD2})'in genotoksik, antigenotoksik ve epigenetik etkilerinin insan periferik lenfositleri kullanılarak *in vitro* olarak değerlendirildiği ilk çalışmadır. Kromozomal anormallik testi sonuçlarına göre, EPS_{JD2}'nin tek başına uygulandığı 24 ve 48 saatlik gruplarda genotoksik etkisine dair anlamlı bir artış gözlenmemiştir. Mitomisin-C (MMC) ile eş zamanlı uygulamalarda, bazı konsantrasyonlarda kromozomal anormallik oranları ve anormal hücre yüzdesi üzerinden koruyucu etki belirginleşmiştir. Mikronükleus testi bulguları, EPS_{JD2}'nin genetik materyalde mikronükleus oluşumuna neden olmadığını ve negatif kontrole (distile su) yakın değerler sergilediğini göstermiştir. Komet testi sonuçlarında ise, EPS_{JD2} tek başına ve H_2O_2 ile birlikte uygulandığında DNA hasarını anlamlı olarak düşürdüğü gözlenmiştir. Bulgular, EPS_{JD2}'nin genotoksik olmadığı ve uygun konsantrasyon aralığında DNA hasarına karşı koruyucu potansiyel sergileyebilen bir biyoaktif madde olabileceğini ortaya koymakta; bu yönüyle fonksiyonel gıda bileşeni olarak değerlendirilme potansiyelini desteklemektedir. EPS_{JD2}'nin epigenetik düzenleyici genler üzerindeki etkilerini belirlemek amacıyla RT-PZR analizi gerçekleştirilmiştir. *DNMT1, DNMT3A, DNMT3B* ve *HDAC1* gen ekspresyonlarına ait bulgular, EPS_{JD2}'nin bu genler üzerinde hem indükleyici hem de baskılayıcı etkiler gösterebildiğini ortaya koymuştur. Özellikle *DNMT3B*'nin belirgin şekilde indüklenmesi ve *HDAC1* geninin yüksek dozda baskılanması, EPS_{JD2}'nin epigenetik mekanizmalar üzerinde doz bağımlı çift yönlü düzenleyici bir etki yaratabileceğini düşündürmektedir. Bu bulgular, EPS_{JD2}'nin yalnızca DNA hasarına karşı koruyucu bir ajan değil, aynı zamanda gen ekspresyonu düzeyinde epigenetik dengeyi etkileyebilecek potansiyele sahip olduğunu göstermektedir.

Bilim Kodu	:	20316
Anahtar Kelimeler	:	*Pichia kudriavzevii*, ekzopolisakkarit, genotoksisite, antigenotoksisite
Sayfa Adedi	:	91
Danışman	:	Prof. Dr. Deniz YÜZBAŞIOĞLU

EFFECTS OF EXOPOLYSACCHARIDE FROM *PICHIA KUDRIAVZEVII* ON GENOTOXIC, ANTIGENOTOXIC AND EPIGENETIC CHANGES IN HUMAN LYMPHOCYTES *IN VITRO*

(M. Sc. Thesis)

Sultan YILDIRIM

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

April 2025

ABSTRACT

Functional foods contain bioactive components that are not only nutritious but can also have positive effects on health thanks to their probiotic, prebiotic and postbiotic content. These components are synthesized by prokaryotes and eukaryotes. *Pichia kudriavzevii* is one of the yeast species that has high tolerance to stress conditions, can produce exopolysaccharides and various bioactive components, and has potential for use in food, biotechnology and health fields. This is the first study to evaluate the genotoxic, antigenotoxic and epigenetic effects of exopolysaccharide (EPS_{JD2}) from *Pichia kudriavzevii in vitro* using human peripheral lymphocytes. According to the results of the chromosomal aberration test, no significant increase in the genotoxic effect of EPS_{JD2} was observed in the 24 and 48 hour groups where EPS_{JD2} was administered alone. In co-treatment with mitomycin-C (MMC), the protective effect on chromosomal aberration rates and percentage of abnormal cells was evident at some concentrations. Micronucleus test results showed that EPS_{JD2} did not cause micronucleus formation in genetic material and exhibited values close to the negative control (distilled water). Comet assay results, showed that EPS_{JD2} treatment alone and in co-treatment with H_2O_2, significantly reduce DNA damage. The findings suggest that EPS_{JD2} is not genotoxic and may be a bioactive substance that can exhibit protective potential against DNA damage in the appropriate dose range; in this respect, it supports its potential to be evaluated as a functional food component. RT-PZR analysis was performed to determine the effects of EPS_{JD2} on epigenetic regulatory genes. The findings of *DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B* and *HDAC1* gene expressions revealed that EPS_{JD2}can show both inducing and repressive effects on these genes. In particular, *DNMT3B* was significantly induced and *HDAC1* gene was repressed at high doses, suggesting that EPS_{JD2} may exert a dose-dependent bidirectional regulatory effect on epigenetic mechanisms. These findings suggest that EPS_{JD2} is not only a protective agent against DNA damage, but also has the potential to influence epigenetic balance at the level of gene expression.

Science Code	:	90628
Key Words	:	*Pichia kudriavzevii*, exopolysaccharides, genotoxicity, antigenotoxicity
Page Number	:	91
Supervisor	:	Prof. Dr. Deniz YÜZBAŞIOĞLU

TEŞEKKÜR

Çalışma ve yüksek lisans dönemim boyunca bilgisiyle yolumu aydınlattığı, insani ve bilim insanı yönüyle daima örnek alacağım, desteğini her zaman hissettiğim ve iyi ki karşılaştım dediğim, bu yüzden kendimi her zaman şanslı hissedeceğim değerli hocam Sayın Prof. Dr. Deniz YÜZBAŞIOĞLU'na, teşekkürlerimi sunarım.

Lisansüstü eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerinden her zaman faydalandığım saygıdeğer hocam Prof. Dr. Fatma ÜNAL'a ve tez çalışmam sırasında destek ve yardımlarını esirgemeyen saygıdeğer hocam Sayın Doç. Dr. Ece AVULOĞLU YILMAZ'a teşekkür ederim. Tez çalışmamda kullanılan ekzopolisakkarit örneğini koleksiyonundan sağlayarak ve moleküler analizler için yardımcı olarak araştırmama katkıda bulunan sayın Prof. Dr. Zehranur YÜKSEKDAĞ'a teşekkürlerimi sunarım. Laboratuvar çalışmalarım sırasında ilgi ve yardımını hiçbir zaman esirgemeyen Arş. Gör. Ece AKBAŞ'a, Dr. Fatma OKUŞ'a ve sevgili arkadaşlarım Büşra GÜNEŞ ve Hasan Berk DEMİREL ve diğer tüm lisansüstü öğrencisi arkadaşlarıma çok teşekkür ederim. Ayrıca, her konuda destekçim olan, desteklerini her şekilde bana ulaştıran hayatıma katkı sağlayan tüm dostlarıma teşekkürü borç bilirim.

Her şeyden önce hayatım boyunca çok büyük destek gördüğüm, maddi ve manevi desteklerini yanımda hissettiğim tüm kararlarımda yanımda olan kıymetli aileme sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım. Tez yazım süreci boyunca desteğini benden esirgemeyen ve her durumda yanımda olan sevgili arkadaşlarım Nazmiye İLERİ ve Mertcan KOÇ'a teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez FYL2023-8838 proje kodu ile Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir. Katkılarından dolayı Gazi Üniversitesi Rektörlüğü BAP Birimi'ne teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET iv

ABSTRACT v

TEŞEKKÜR vi

İÇİNDEKİLER vii

ÇİZELGELERİN LİSTESİ ix

ŞEKİLLERİN LİSTESİ x

RESİMLERİN LİSTESİ xi

SİMGELER VE KISALTMALAR xii

1. GİRİŞ 1

2. GENEL BİLGİLER 3

2.1. Fonksiyonel Gıdalar 3

2.2. Probiyotik-Prebiyotik-Postbiyotik 3

2.3. Ekzopolisakkaritler 5

2.3.1. Yapı ve fonksiyonları 5

2.4. Mantarlar 7

2.4.1. *Pichia kudriavzevii* ve hücresel özellikleri 7

2.5. Genotoksisite ve Antigenotoksisite Kavramları 9

2.6. Genotoksisite Testleri ve Epigenetik Değişikliklerin Belirlenmesi 11

2.6.1. Kromozomal Anormallik (KA) testi 12

2.6.2. Mikronükleus (MN) testi 13

2.6.3. Komet testi (Kuyruklu Yıldız testi) 14

2.6.4. Epigenetik değişiklikler ve RT-PZR analizi 15

2.7. Epigenetik Mekanizmalar 17

2.7.1. DNA metilasyonu 18

Sayfa

2.7.2. Histon modifikasyonları 19
2.7.3. Kodlamayan RNA'lar 20
2.7.4. Ekzopolisakkaritlerin biyolojik etkileri üzerine yapılan çalışmalar 20
3. MATERYAL VE METOT 25
3.1. Çalışma Materyali 25
3.1.1. Çalışmada kullanılan diğer kimyasallar 25
3.2. Metod 27
3.2.1. EPS_{JD2} konsantrasyonlarının belirlenmesi 27
3.2.2. Kromozom anormallikleri (KA) testi prosedürü 27
3.2.3. Mikronükleus (MN) testi prosedürü 29
3.2.4. Komet testi prosedürü 31
3.2.5. Real time-polimeraz zincir reaksiyonu analizi 33
3.2.6. İstatistiki Analizler 36
4. ARAŞTIRMA BULGULARI 37
4.1. Kromozomal Anormallik Sonuçları 37
4.2. Sitokinez Blokajı ile Mikronükleus Analizi Sonuçları 44
4.3. Komet Sonuçları 47
4.5. RT-PZR Analizi 50
5. TARTIŞMA 53
6. SONUÇ VE ÖNERİLER 67
KAYNAKLAR 69
ÖZGEÇMİŞ 91

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge **Sayfa**

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler 26

Çizelge 3.2. Kit içeriği 33

Çizelge 3.3. RT-PZR analizinde kullanılan primer dizileri 35

Çizelge 4.1. EPS_{JD2}'nin 24 ve 48 saatlik uygulamalarının insan periferal lenfositlerinde oluşturdukları kromozomal anormallik türleri, anormal hücre yüzdeleri, hücre başına düşen anormallik oranı ve mitotik indeks değerleri..... 38

Çizelge 4.2. EPS_{JD2}+MMC'nin 24 ve 48 saatlik uygulamalarının insan periferal lenfositlerinde oluşturdukları kromozomal anormallik türleri, anormal hücre yüzdeleri, hücre başına düşen anormallik oranı ve mitotik indeks hesaplamaları 42

Çizelge 4.3. EPS_{JD2}, EPS_{JD2} +MMC'nin insan lenfositlerinde mikronükleus, nükleer tomurcuk, nükleoplazmik köprü frekansları ve nükleer bölünme indeksi üzerine etkisi..... 45

Çizelge 4.4. İnsan izole lenfositleri üzerinde EPS_{JD2} ve EPS_{JD2}'nin H_2O_2 ile eş zamanlı uygulanması sonucu genotoksik ve antigenotoksik etkileri..... 48

Çizelge 4.5. RT-PZR sonuçlarının ΔΔCt ve RQ değerleri 50

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil **Sayfa**

Şekil 4.1. EPS_{JD2}'nin 24 ve 48 saatlik uygulamalarının insan periferal lenfositlerinde oluşturdukları anormal hücre yüzdeleri 39

Şekil 4.2. EPS_{JD2}'nin 24 ve 48 saatlik uygulamalarının insan periferal lenfositlerinde oluşturdukları hücre başına anormallik yüzdeleri..... 39

Şekil 4.3. EPS_{JD2}'nin 24 ve 48 saatlik uygulamalarının insan periferal lenfositleri üzerindeki mitotik indeks (Mİ) değerleri..... 40

Şekil 4.4. EPS_{JD2}+MMC'nin 24 ve 48 saatlik uygulamalarının insan periferal lenfositlerinde oluşturdukları anormal hücre yüzdeleri 43

Şekil 4.5. EPS_{JD2}+MMC'nin 24 ve 48 saatlik uygulamalarının insan periferal lenfositlerinde oluşturdukları hücre başına anormallik yüzdeleri..... 43

Şekil 4.6. EPS_{JD2}+MMC'nin 24 ve 48 saatlik uygulamalarının insan periferal lenfositlerinde oluşturdukları mitotik indeks (Mİ) değerleri 44

Şekil 4.7. EPS_{JD2}, EPS_{JD2}+MMC'nin insan lenfositlerinde mikronükleus oluşumu..... 46

Şekil 4.8. EPS_{JD2}, EPS_{JD2} +MMC'nin insan lenfositlerinde nükleer bölünme indeksi üzerine etkisi..... 46

Şekil 4.9. EPS_{JD2} ve EPS_{JD2} + H_2O_2'nin izole lenfositler üzerindeki kuyruk yoğunluğundaki değişimler..... 48

Şekil 4.10. EPS_{JD2} ve EPS_{JD2} + H_2O_2'nin izole lenfositler üzerindeki kuyruk momenti üzerindeki değişimler..... 49

Şekil 4.11. EPS_{JD2} uygulamasının gen ekspresyonu üzerine etkisi 52

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim **Sayfa**

Resim 4.1. EPS_{JD2}, EPS_{JD2}+ MMC uygulamalarında insan periferal lenfositleri üzerinde gözlenen kromozomal anormallikleri a) kromatid değişimi b) endoreduplikasyon c) fragment d) poliploidi e) kromozom kırığı 41

Resim 4.2. EPS_{JD2}, EPS_{JD2}+ MMC uygulamalarında insan periferal lenfositleri üzerinde tespit edilen mikronükleus içeren binükleat hücre örnekleri: a) bir mikronükleus içeren binükleat hücre, b) çift mikronükleus içeren binükleat hücre..... 47

Resim 4.3. EPS_{JD2}'nin izole lenfositleri üzerindeki komet görüntüleri..... 49

Resim 4.4. EPS_{JD2} + H_2O_2'nin izole lenfositleri üzerindeki komet görüntüleri..... 49

SİMGELER VE KISALTMALAR

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

Simgeler	**Açıklamalar**
%	Yüzde
°C	Derece Celsius
LD50	%50 Letal doz
M	Molar
mA	Miliamper
mL	Mililitre
rpm	1 dakikadaki devir sayısı
V	Volt
µg/mL	mikrogram/mililitre
µM	Mikromolar

Kısaltmalar	**Açıklamalar**
CAS	ABD Kimyasal Özetler Servisi
CBMN	Sitokinez-blok Mikronükleus
Cyt-B	Sitokalasin-B
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DNMT1	DNA Metil Transferaz 1
DNMT2	DNA Metil Transferaz 2
DNMT3	DNA Metil Transferaz 3
EPS	Ekzopolisakkarit
EPS_{JD2}	*P. kudriavzevii* JD2'den elde edilen EPS
EtBr	Etidyum bromür
FAO	Gıda ve Tarım Örgütü
FDA	ABD Gıda ve İlaç Dairesi
H_2O_2	Hidrojen peroksit
HDAC	Histon deasetilaz

Kısaltmalar	Açıklamalar
ISAPP	Uluslararası Probiyotik ve Prebiyotik Bilimsel Derneği
KA	Kromozomal anormallik
KA/hücre	Hücre başına düşen kromozomal anormallik
KCL	Potasyum klorür
Mİ	Mitotik İndeks
MMC	Mitomisin-C
MN	Mikronükleus
NBI	Nükleer bölünme indeksi
RNA	Ribonükeik asit
RT-PZR	Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
WHO	Dünya Sağlık Örgütü

1. GİRİŞ

Günümüzdeki ilerlemeler doğrultusunda, insan sağlığı üzerinde umut verici etkileri olabilecek doğal ürünlerin tanımlanması ve arkalarındaki biyolojik anlamın anlaşılması yönünde büyük adımlar atılmıştır. Ekzopolisakkaritler, antimikrobiyal, antioksidan, anti-inflamatuar ve antikanser özellikleri de dahil olmak üzere çeşitli aktiviteleri nedeniyle büyük ilgi gören mikrobiyal kaynaklı biyolojik bileşik gruplarıdır. Bu bileşikler esas olarak probiyotik mikroorganizmalar tarafından üretilir ve hem mikroorganizmaların hayatta kalma mekanizmaları hem de insan sağlığı için olası faydalar sağlamak için gereklidir (Yıldıran ve diğerleri, 2019; Wang ve diğerleri, 2025; Chen ve diğerleri, 2016; Saadat ve diğerleri, 2020). Ekzopolisakkaritlerin genotoksisite ve antigenotoksisite profillerinin yanı sıra epigenetik mekanizmalar üzerindeki potansiyel etkileri de bilim insanlarının dikkatini çekmektedir. Ancak bu konu hâlâ yeterince araştırılmamış ve bilimsel olarak tam anlamıyla aydınlatılamamıştır.

Pichia kudriavzevii, geleneksel fermantasyon süreçlerinin yanı sıra modern biyoteknolojik yeniliklerde de uygulamaları olan bir maya türüdür (Chu ve diğerleri, 2023). Bu mikroorganizma tarafından üretilen ekzopolisakkaritlerin diğer mikrobiyal maddelere kıyasla farklı yapısal ve işlevsel özelliklere sahip olması beklenebilir (Wang ve diğerleri, 2019; Saadat ve diğerleri, 2021). Bununla birlikte bu tür ekzopolisakkaritlerin genetik materyal üzerindeki genotoksik/antigenotoksik aktivitesini keşfetmek için araştırmalar yapılması gerekmektedir. Aynı zamanda, rollerinin altında yatan moleküler mekanizmaları anlamak için ekzopolisakkaritlerin DNA metiltransferaz ve histondeasetilaz enzimleri (*DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B* ve *HDAC1*) de dahil olmak üzere epigenetik düzenleyiciler üzerindeki etkisini araştırmak önemlidir.

Bağırsak mikrobiyotasının sağlıktaki rolünün anlaşılmasında önemli ilerlemeler kaydedilmiş olsa da mikrobiyal metabolitlerin epigenetik düzenleyici mekanizmalardaki rolü halen araştırılması gereken bir alandır (Chen ve diğerleri, 2016; Saadat ve diğerleri, 2020; Seveiri ve diğerleri, 2019; Ma ve diğerleri, 2018). Bu bağlamda ekzopolisakkaritlerin genetik ve epigenetik süreçler üzerindeki etkisine ilişkin çalışmalar, biyotıp alanında yeni terapötik yaklaşımların ortaya çıkmasına yardımcı olabilir. Ayrıca ekzopolisakkaritlerin genotoksik ve antigenotoksik aktivitelerinin anlaşılması, bu tür bileşiklerin güvenliğinin değerlendirilmesi ve biyomedikal alanlardaki olası uygulamalarının desteklenmesi için

önemlidir (Chu ve diğerleri, 2023). Bu çalışmanın amacı, *Pichia kudriavzevii* JD2 maya suşu tarafından üretilen ekzopolisakkaritin (EPS_{JD2}) insan lenfositleri üzerindeki genotoksik, antigenotoksik ve epigenetik etkilerini *in vitro* olarak değerlendirmektir. Genotoksisite ve antigenotoksisite, kromozomal aberasyon testi, mikronükleus testi ve komet testi yapılarak değerlendirilmiştir. Genotoksik etkilerini belirlemek için EPS_{JD2} insan lenfosit hücrelerine tek başına uygulanırken; Mitomisin-C (MMC) ve Hidrojen Peroksit (H_2O_2) ile birlikte muamele edilerek EPS_{JD2}'nin olası koruyucu/iyileştirici etkileri araştırılmıştır. Epigenetik değişiklikleri *DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B* ve *HDAC1* genlerinin ifade seviyeleri RT-PZR yöntemiyle değerlendirilmiştir.

Bu tez çalışmasında, EPS_{JD2}'nin genotoksik, antigenotoksik ve epigenetik değişiklikler üzerine etkileri ilk kez incelenmiştir. Bu çalışma, ekzopolisakkaritlerin moleküler biyolojik işlevleri hakkındaki bilgileri artırarak ve EPS_{JD2}'nin terapötik potansiyelini değerlendirerek literatüre ve gelecekteki terapötik yaklaşımlara yön verebilecektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Fonksiyonel Gıdalar

Modern yaşamın hızlı temposu ve küresel besin endüstrisindeki dönüşüm, beslenme alışkanlıklarımızın da değişimini beraberinde getirmiştir (Kantor ve diğerleri, 2016). Tarih boyunca insan sağlığının temel yapı taşlarından biri olan beslenme, bugün yalnızca temel ihtiyaçları karşılamaktan öteye geçmiş, sağlığın korunması, sürdürülebilirlik ve hastalıkların önlenmesi gibi çok boyutlu bir görev üstlenmiştir (Birch ve Bonwick, 2019). Artık sağlıklı beslenme alışkanlıkları geliştirme, bireyler için giderek daha karmaşık hale gelmiştir. Gıdanın yalnızca fiziksel değil, bilişsel ve genetik boyutlarıyla da ele alınması gerektiği, beslenmenin bir alışkanlık değil, bilinçli bir tercih haline geldiğini göstermektedir (Chen ve diğerleri, 2022).

Beslenme biliminin dönüşen ve yenilenen alanlarından biri de fonksiyonel gıdaların keşfi ve günlük kullanımının yaygınlaşmasıdır. Fonksiyonel gıda terimi ilk olarak 1984 yılında kullanılmaya başlanmış ancak halen kapsamlı ve ortak bir tanım kabul edilmemiştir. Günümüzde yaygın olarak 'beslenmenin ötesinde, belirli bir sağlık yararı sağlayan ürünler' olarak tanımlanmaktadır (Alongi ve Anese, 2021). Fonksiyonel gıdalar içerisinde probiyotik gıda ürünleri sınıflandırılmakta ve bunun önemli bir kısmını temsil etmektedir (Tripathi ve Giri, 2014).

2.2. Probiyotik-Prebiyotik-Postbiyotik

Yunanca kökenli probiyotik terimi "yaşam için" anlamına gelmektedir. İlk olarak 1965 yılında Lilly ve Stillwell (1965) tarafından "bir mikroorganizmanın salgıladığı ve diğer mikrooganizmanın büyümesini teşvik eden maddeleri" tanımlamak için kullanmıştır. Güncel olarak kabul gören tanım olan Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization; WHO) ve Gıda ve Tarım Örgütü (Food and Agriculture Organization; FAO) tarafından probiyotik terimi "yeteri kadar uygulandığında veya alındığında konakçının sağlığı açısından iyi gelen canlı mikroorganizmalar" şeklindedir (FAO/WHO 2001). Prebiyotikler ise konakçı mikroorganizma tarafından kullanılan ve sağlığa yararlı olan substratlar olarak tanımlanmaktadır (Gibson ve diğerleri, 2017). Sinbiyotik ürünler, probiyotik ve prebiyotik bileşenlerin birlikte formüle edildiği fonksiyonel gıdalardır; dolayısıyla tek başına

probiyotik ve prebiyotik içeren ürünlere kıyasla sağlık üzerinde daha fazla olumlu etki potansiyeline sahiptir (Balthazar ve diğerleri, 2022).

Probiyotik kavramının literatürde kabul edilen tanımı, inaktif veya ölü hücreleri içermemektedir. Bu nedenle, probiyotik mikroorganizmaların yaşayabilirliğinin ötesinde yararlı etkiler gösterebildiği durumlar için paraprobiyotikler ve postbiyotikler terimleri ortaya atılmıştır. Paraprobiyotikler olarak bilinen inaktif veya ısıyla öldürülmüş probiyotiklerdir. Paraprobiyotiklerin immünomodülasyon gibi çeşitli etkileri bilinmektedir (Batista ve diğerleri, 2022; Salminen ve diğerleri, 2021; Stanciuc ve diğerleri, 2024; Mehta, Sahoo, Ayakar ve Singhal, 2025). Postbiyotikler ise proteinler, lipitler, kısa zincirli yağ asitleri, vitaminler, bakteriyosinler ve diğer bileşikler de dahil olmak üzere probiyotik mikroorganizmaların metabolik aktiviteleri sonucunda oluşan metabolitler olarak üretilen biyoaktif moleküllerdir (Martin ve Langella, 2019). Postbiyotikler ayrıca lipopolisakkarit, peptidoglikan, hücre dışı veziküller vb. gibi hücre bileşenlerini de içermektedir.

Her iki tanım da canlı olmayan probiyotik kaynaklı ürünleri içerse de paraprobiyotikler inaktive edilmiş hücreleri tanımlarken, postbiyotikler ise bu hücrelerin ürettiği metabolitleri veya diğer biyomolekülleri tanımlamaktadır.

Postbiyotik terimi için Uluslararası Bilimsel Probiyotikler ve Prebiyotikler Derneği (ISAPP) tarafından 2021 yılında bir bildirge ile “konakçıya sağlık açısından fayda sağlayan cansız mikroorganizmalar ve/veya bileşenleri” tanımı kabul edilmiştir (Salminen ve diğerleri, 2021). Bu tanım probiyotik teriminin tam karşılayamadığı sınırlı kaldığı durumlar nedeniyle paraprobiyotik, cansız probiyotik, tindalize probiyotik ve postbiyotik gibi farklı tanımlamalar kullanılmıştır (Piqué, Berlanga ve Miñana-Galbis, 2019; Wang, 2025). Bu kapsamda mikrobiyal kaynaklı probiyotik ve diğer biyotikler arasında ekzopoliskkaritler önemli bir kısmını oluşturmaktadır. Probiyotik EPS’ler, postbiyotik özellikler gösterme potansiyeline sahip olabileceği bu yönden avantajlı oldukları belirtilmiştir. Ancak EPS üretiminde pH, sıcaklık ve seçilecek olan suş gibi çeşitli faktörler bu potansiyelin belirleyicisi olacaktır (Pourjafar, Ansari, Sadeghi, Samakkhah ve Jafari, 2023).

2.3. Ekzopolisakkaritler

2.3.1. Yapı ve fonksiyonları

Probiyotik mikroorganizmaların ürettiği biyoaktif moleküller olan ekzopolisakkaritler (EPS) potansiyel biyolojik etkileri nedeniyle önem kazanmaktadır. Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği (International Union of Pure and Applied Chemistry) ve Uluslararası Biyokimya Birliği (International Union of Biochemistry, IUPAC-IUB)'ne göre polisakkaritler glikozidik bağlarla birbirine bağlanan ve en az 10 monosakkarit birimi içeren polimer yapıdaki karbonhidratlardır. Hücre dışına sentezlenen bu polimerler glikoz yapıda olmaları durumunda ekzopolisakkarit (EPS) olarak adlandırılır (Pavlova, Panchev, Krachanova ve Gocheva, 2009; Gientka ve diğerleri, 2015). Bakteriler ve mantarlar, EPS sentezleme yetenekleriyle tanınırlar. Ekzopolisakkaritlerin hücreyi ozmotik strese veya dehidrasyona karşı koruyucu olduğu bilinmektedir.

Günümüzde mayalar, bakterilere kıyasla kültür ortamından kolayca ayrılabilen yüksek EPS üretmeleri nedeniyle büyük ilgi görmektedir. EPS'lerin *Bullera*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Lipomyces*, *Pichia*, *Pseudozyma, Rhodotorula* ve *Sporobolomyces* cinsleri gibi birçok maya türü tarafından sentezlendiği bilinmektedir (Hamidi ve diğerleri, 2020; Ragavan ve Das, 2019; Yıldıran ve diğerleri, 2019; Wang ve diğerleri, 2025). Farklı taksonomik gruplar tarafından sentezlenen EPS'lerin bileşimi, yapısı ve fiziksel özellikleri sayesinde EPS'ler, gıda endüstrisinde, kozmetik, tekstil, ekoloji ve tıp alanlarında kullanım potansiyeli mevcuttur (Andrew ve Jayaraman, 2020; Moscovici, 2015; Saadat ve diğerleri, 2019; Madasamy, Natarajan, Ravi ve Somasundaram, 2025).

Maya kökenli ekzopolisakkaritler, bakteriyel olanlara kıyasla daha az bilinen bir metabolit grubudur (Saadat ve diğerleri, 2021). Sürdürülebilir ve işlevsel polisakkarit kaynaklarına yönelik devam eden arayışlar, düşük verimliliklerine rağmen mayaların cazip bir kaynak olabileceğini göstermiştir. Mayalar genellikle güvenli kabul edilen mikroorganizmalardır (Xu ve diğerleri, 2019). Nadiren fırsatçı enfeksiyonlara neden olurlar ve tüketicilerde endişe yaratmazlar. Ayrıca fizyolojileri, biyokimyasal ve genetik özellikleri endüstriyel yararlarını desteklemektedir (Zaghloul ve diğerleri, 2024). EPS'lerin biyolojik potansiyeli, probiyotik mikroorganizmaların yetiştirilmesinde kullanılan fermantasyon koşullarına bağlı olarak etkilenen kimyasal yapılarından etkilenmektedir (Zannini ve diğerleri, 2016). Farklı

organizmalardan elde edilen EPS'lerin, spesifik konformasyonu, zincir uzunluğu, moleküler ağırlığı, monosakarit bileşimi, glikoz bağları, kimyasal modifikasyonlardan etkilenmektedir (Wang ve diğerleri, 2019).

Mikrobiyal kaynaklı ekzopolisakkaritlerin sağlık alanındaki önemi, hücresel ve moleküler süreçler üzerindeki etkilerini de içerecek şekilde doğrudan biyolojik rollerinin ötesine uzanmaktadır. Ekzopolisakkaritlerin sağlık üzerindeki olumlu etkilerini anlamak bireylerin yalnızca biyolojik ihtiyaçlarına değil, aynı zamanda moleküler düzeyde oluşturdukları etkilerinin açıklanmasında yenilikçi bir yaklaşımı temsil etmektedir. Bu çalışmada, fonksiyonel gıdalar ve probiyotiklerin doğal yan ürünlerinden olan ekzopolisakkaritin (EPS) genetik ve epigenetik düzeydeki etkileri incelenmiştir. Bu maddelerin genotoksik etkilerinin araştırılması, insan hücrelerinde genetik hasara yol açma potansiyellerinin ortaya çıkarılması açısından önemlidir.

Genotoksisite, hücrelerin DNA bütünlüğüne zarar verdiği için kanser de dahil olmak üzere ciddi sağlık sonuçlarına neden olduğu kabul edilen risk faktörlerinden biridir (Basu ve Nohmi, 2018). Bu nedenle, ekzopolisakkaritlerin genotoksisite testleriyle değerlendirilmesi, bu maddelere maruz kalmanın insanlar üzerindeki olası zararlıetkilerinin anlaşılmasında güvenlik açısından incelenmesi bakımından önemlidir.

Antigenotoksisite çalışmaları ise bu maddelerin genetik materyali nasıl koruduğunu veya onarıcı bir şekilde nasıl etkisinin olduğunu açıklanmasını sağlar. Ekzopolisakkaritlerin güçlü genotoksik ajanlarla eş zamanlı olarak verildiğinde DNA hasarını azaltma veya engelleme yeteneğini kullanabileceği varsayımsal olarak öne sürülmektedir. EPS'ler düşük sitotoksisiteleri nedeniyle umut verici alternatif kemopreventif ilaçlar olarak tanımlanmıştır (Wu ve diğerleri, 2021; Li ve diğerleri, 2022). Mayalar tarafından üretilen EPS, antimikrobiyal, immünomodülatör, anti-inflamatuar, antioksidan, anti-tümör, anti-viral, anti-diyabetik, anti-ülser ve kolesterol düşürücü aktiviteler gibi terapötik uygulamalarda oldukça önem kazanmıştır (Gientka ve diğerleri, 2015; Gientka ve diğerleri, 2016; Shamekhi ve diğerleri, 2019; Han ve diğerleri, 2024; Nurkanto ve diğerleri, 2025). Bu özellikler, ekzopolisakkaritlerin farmasötik ve terapötik alanlardaki potansiyel kullanımlarını artırmaktadır. Ayrıca genotoksisite ve antigenotoksisite arasındaki denge, bu bileşiklerin hem risklerini hem de faydalarını karşılaştırmalı olarak değerlendirmek için önem taşımaktadır.

Ekzopolisakkaritlerin genetik düzeydeki etkilerinin yanı sıra epigenetik süreçlerdeki rollerinin incelenmesi de önemli bir adımdır. Epigenetik mekanizmalar genellikle çevresel etkilerin veya daha genel olarak herhangi bir dış sinyalin neden olduğu gen ifadesinin modülasyon süreci olarak adlandırılır. Bu düzenleyici mekanizmaların kritik unsurları arasında DNA metiltransferaz (DNMT) ve histondeasetilaz enzimleri (HDAC) yer almaktadır (Gu ve diğerleri, 2024). *DNMT1*, *DNMT2*, *DNMT3A*, *DNMT3B* ve *HDAC* genlerinin ifade düzeyi, hücresel farklılaşma süreçlerinde genetik kararlılık ve kontrolün belirlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır. EPS'lerin bu bağlamda incelenmesi gen ifadesinin kontrolüne yönelik potansiyel mekanizmaların anlaşılmasında da önemli katkılar sunacaktır.

2.4. Mantarlar

Mantarlar, ekolojik açıdan önemli rollerinin yanı sıra günümüzde endüstriyel, biyoteknolojik, farmakolojik ve tıp alanlarında da önemli bir konuma sahiptirler. Tek hücreli mantarlar olan mayalar özellikle fermantasyon süreçlerinde geniş kullanımı ile tanınmış olsa da son yıllarda bu mikroorganizmalardan elde edilen biyoaktif bileşikler araştırmaların başrolü olmaktadır. Yapılan çalışmaların özellikle *Saccharomyces cerevisiae* ile yürütülmesinin nedeni bu alandaki çokça çalışma sayesinde fizyolojik ve metabolik özelliğinin iyi bir şekilde tanımlanmış olmasıdır. Ancak çeşitli karbon kaynaklarını metabolize etme yeteneği, stres durumlarındaki tolerans yeteneği gibi özellikleri nedeniyle farklı maya türleri üzerinde çalışmalar artmakta ve gelişmektedir (Salimi ve diğerleri, 2023; Oztekin, Dikmetas ve Karbancıoglu-Guler, 2023; Pessôa ve diğerleri, 2024).

Pichia, farklı alanlarda çalışmalar yürütülen mayalardan biridir ve doğal olarak ortamlarda bulunmaktadır (Chu ve diğerleri, 2023). Bazı çalışmalarda biyofilm oluşumuna neden olduğu belirtilse de sık olarak probiyotik özellik gösterdiği ve lezzet iyileştirici etkilere sahip olduğu kanıtlanmıştır (Kahve, 2023; Jin ve diğerleri, 2018; Xu ve diğerleri, 2024).

2.4.1. *Pichia kudriavzevii* ve hücresel özellikleri

- Alem : Eukaryota
- Şube : Ascomycota
- Sınıf : Saccharomycetes

- Takım : Saccharomycetales
- Familya : Pichiaceae
- Cins : *Pichia*

Pichia kudriavzevii mayası, *Candida krusei* mayasının bir teleomorfudur. Yani *P. kudriavzevii, C. krusei* mayasının hayat döngüsündeki eşeyli olarak üreyebildiği dönemi temsil etmektedir (Fomina, Filipishena ve Polishchuk, 2022).

P. kudriavzevii hücrelerinin şekli, oval veya elipsoidal yapıda olabilmektedir (Oberoi ve diğerleri, 2012). Doğada oldukça fazla bulunmaktadır. Özellikle toprakta, meyvelerin kabuklarında ve fermente içeceklerde bulunmaktadırlar. *P. kudriavzevii*, 45°C'ye kadar olan yüksek sıcaklıklara ve düşük pH'lı ortamlarda (pH=2-3'lerde bile) metabolik olarak aktif kalabilmektedir. Ayrıca biyoyakıt endüstrisi için büyük yararı bulunan etanolün yüksek verimde üretilmesine olanak sağlayan önemli bir mikroorganizmadır (Oberoi ve diğerleri, 2012). Çoğu maya gibi *P. kudriavzevii* de şarap ve biranın fermantasyonunda önemli ölçüde yer almaktadır; bununla birlikte kakao çekirdeği fermentasyonunda da çok değerlidir ve kakao çekirdekleri için daha fazla lezzet ile aroma oluşturur. *P. kudriavzevii* mayasının patojenik etki gösterdiği yalnızca birkaç rapor bulunmaktadır (Nagarathnamma ve diğerleri, 2017; Nguyen ve diğerleri, 2024; Oberoi ve diğerleri, 2012). Farklı bir çalışmada ise *Pichia* türleri de dahil olmak üzere farklı maya suşlarının probiyotik ve postbiyotik etkileri incelenmiştir. Çalışmanın sonucunda maya suşlarının immünomodülatör ve antiinflamatuar etki sergiledikleri görülmüştür (Cerdán-Alduán ve diğerleri, 2025).

P. kudriavzevii mayasında bulunan fitaz enzimi, fitik asidi parçalayarak insan vücudu tarafından kullanılabilir hale getirilmesinde önemli bir rol oynar. Fosfatazlar ise organik fosfat bileşiklerinde yer alan monofosfoester bağlarının kırılmasını sağlayan katalizörlerdir. Ancak bu enzimler, fitik asidin içerisindeki monofosfoester bağlarını parçalayamazlar. Fitik asidi hidrolize edebilen fitaz enzimleri ise çevre koruma, insan sağlığı ve beslenme gibi çeşitli alanlarda büyük öneme sahiptir (Berikten ve Kıvanç, 2018; Rizwanuddin ve diğerleri, 2023; Sharma, Mittal, Gupta ve Aggarwal, 2024). Çoğu memeli fitik asidi sindiremez; ancak *P. kudriavzevii* mayasının bu maddeyi hidrolize etme yeteneği, onu diğer maya türlerinden ayıran belirgin bir özellik olarak öne çıkar (Rizwanuddin ve diğerleri, 2023). *P. kudriavzevii* mayasının çok sayıda probiyotik özelliğe sahip olması gıdaların folat içeriğini arttırmasından kaynaklanmaktadır (Greppi ve diğerleri, 2017; Qvirist, Vorontsov, Veide ve Andlid, 2017;

Liu ve diğerleri, 2022). Yapılan çalışmalar, yaygın probiyotik mayaların farklı kanser tipleri üzerindeki yararlı etkilerini doğrulamaktadır (Saber ve diğerleri, 2016; Saadat ve diğerleri, 2020; Abbasi ve diğerleri, 2023). Bununla birlikte, *P. kudriavzevii* gibi diğer bilinmeyen probiyotik mayalar ve bunların salgı metabolitleri gibi bileşenlerin kanser tedavisi üzerindeki çalışma mekanizmaları net değildir (Saber ve diğerleri, 2017; Yen ve diğerleri, 2024).

2.5. Genotoksisite ve Antigenotoksisite Kavramları

Her geçen gün değişen dünyamızda tüm canlılar nanomalzemeler, kozmetik ürünler, pestisitler, ilaçlar, sigara, alkol gibi birçok kimyasala maruz kalmaktadır. Bunlara ek olarak X-ışınları, γ ışınları, UV ışınları ve elektromanyetik alanlar gibi fiziksel ajanlara maruziyet artmaktadır. Fiziksel ve kimyasal ajanlarla birlikte viral enfeksiyonlar, antibiyotikler gibi doğal toksinler de tüm canlıları etkilemektedir. İlerleyen teknoloji ile endüstriyel gelişme beraberinde fiziksel ve kimyasal ajanların sayısı ve çeşitliliğini de artırmaktadır. Tüm bu etmenler canlılar üzerinde genotoksik etkiye sahip olduğu bilinmektedir (Nakamura, 2012; Kodym ve Afza, 2003). Genotoksisite, fiziksel ve kimyasal ajanlar tarafından canlı hücrelerde genetik materyal üzerinde hasar oluşturma potansiyeli olarak tanımlanmaktadır (Li ve diğerleri, 2017; Kaya, 2022: 413,444). Mutajenlerin neden olduğu DNA hasarı sonucu oluşan mutasyonlar, başta kanser olmak üzere doku hasarı, yaşlanma, infertilite problemleri ve çeşitli genetik ve multifaktöriyel hastalıklara neden olabilmektedir. Bu etkinin büyüklüğü genotoksik ajanın dozu, maruziyet süresi, canlının bu hasarı onarabilme yeteneği ile değişkenlik göstermektedir (Rencüzoğulları ve diğerleri, 2019; Dhakal ve diğerleri, 2021). Ayrıca bu etkinin canlıda doğrudan etki göstermeyip sonraki nesillerde ortaya çıkma olasılığı da unutulmamalıdır. Bu nedenle canlıların ve sonraki nesillerin daha sağlıklı olması açısından mutajenlere olan maruziyetten kaçınılması veya karsinojenez oluşumunun engellenmesi/durdurulması gerekmektedir.

Antigenotoksisite, maruz kalınan fiziksel ve kimyasal ajanların oluşturduğu DNA hasarını ve bu hasar sonucunda oluşabilecek mutagenez ve kanserogenez oluşumuna karşı farklı mekanizmalar doğrultusunda bu etkileri önleme, azaltma veya onarma yeteneği olarak tanımlanmaktadır (Erikel ve Yılmaz, 2022: 445, 475). Antimutajenlerin, mutajenlerin genetik materyal üzerindeki etkilerini azaltığı ya da etkisiz hale getirdiği bilinmektedir (Scolastici ve diğerleri, 2008). Bu grup hem doğal hem de sentetik bileşikleri içerir.

Antimutajen ve antigenotoksisite kavramları, hücreleri genetik hasara karşı koruma mekanizmaları açısından birbiriyle yakından ilişkilidir. İkisinin de amacı, genetik materyali korumak ve DNA'ya zarar veren etkileri önlemektir, ancak odaklandıkları süreçler farklıdır. Bu ilişkiyi şu şekilde açıklayabiliriz: Hem antimutajenler hem de antigenotoksik maddeler, DNA'nın korunmasına ve genetik stabilitenin sağlanmasına odaklanır. Her iki mekanizma da kanser ve genetik hastalıklara karşı koruyucu olabilir. Antimutajenler, mutasyon sürecine odaklanarak DNA'da kalıcı değişikliklerin oluşmasını engellerken, antigenotoksik maddeler DNA'ya verilen hasarı önlemekle ilgilenir (Słoczyńska, Powroźnik, Pękala ve Waszkielewicz, 2014). Antigenotoksik maddeler, DNA'daki genetik değişimlerin gerçekleşmesini daha erken aşamada durdurabilir, bu da genotoksik etkiyi tamamen engelleyebilir. Bu iki mekanizma, hücrelerin genetik hasara karşı korunmasında birlikte çalışarak DNA'nın bütünlüğünü sağlar (Al-Naqeb ve diğerleri, 2024).

Fiziksel ve kimyasal ajanların mutajenik etkilerini azaltan veya tersine çevirebilen bileşikler antimutajen olarak adlandırılmaktadır (Erikel ve Yılmaz, 2022: 451,464). Antimutajenler arasında etki mekanizmalarına göre desmutajenler ve biyoantimutajenler olarak ikiye ayrılmaktadır (Słoczyńska, Powroźnik, Pękala ve Waszkielewicz, 2014). Hücre dışında işlev gören desmutajenler, mutajenik ajanları DNA'ya ulaşmadan önce inaktif hale getirebilir. Etki mekanizmaları mutajenin DNA ile etkileşimini engellemeye dayanmaktadır. Desmutajen ortamdaki mutajen ile etkileşime girer ve kimyasal yapısında bozunmaya uğratarak onu inaktifleştirir. İnaktif hale gelen mutajen DNA'ya ulaşamadığı için genetik hasar oluşturma potansiyeli ortadan kalkar (Mushtaq, Tayyeb, Ali ve Bareen, 2023).

Öte yandan biyoantimutajenler hücre içinde etki eder ve mutajenlerle doğrudan reaksiyona girmeden mutajenik etkileri ortadan kaldırırlar (Erikel ve Yılmaz, 2022: 451, 464). Bu ajanlar DNA onarımını sağlayabilir veya DNA'nın replikasyonunda etki gösterebilir ya da hücre metabolzimasını düzenleyerek etki gösterirler (Kada ve Shimoi, 1987; De Flora, 1998). Desmutajen ve biyoantimutajenlerin arasındaki bu fark antimutajenik süreçlerin anlaşılması açısından büyük önem taşımaktadır.

Mutajenlerin aktivasyonunu engelleyen bileşikler; blokaj ajanları ve ayrıca çeşitli etki biçimleriyle karakterize edilen bileşikler antimutajen olarak işlev görmektedirler. Daha önce, birkaç antitümör bileşiğinin antimutajenik mekanizma yoluyla etki ettiği rapor edilmiştir (Tsai ve diğerleri, 1996; Ikken ve diğerleri, 1999; Bouyahya ve diğerleri, 2024).

Bu mekanizma DNA hasarına neden olmadan önce bir antimutajenik bileşik ile bir mutajen arasındaki doğrudan kimyasal etkileşimle ilgilidir. Bloke edici ajanlar ayrıca mutajenik bileşiklerin hedef bölgelere ulaşmasını önleyebilir. Blokaj edici ajanların yanı sıra çeşitli antimutajenik ajanlar çeşitli mutajenlere karşı koruma sağlamak için birden fazla mekanizma aracılığıyla etki eder (Malik ve diğerleri, 2022).

Birçok mutajen reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimi yoluyla etki ettiğinden reaktif moleküllerin uzaklaştırılması antimutajenez sürecinde önemli bir stratejiyi temsil eder (Poetsch, 2020). Antioksidanlar, serbest radikalleri nötralize ederek bunların oluşturduğu hasarı engelleyici ya da onarıcı maddeler olarak tanımlanmaktadır (Erikel ve Yılmaz, 2022: 449). Antioksidan özelliklere sahip bileşiklerin, DNA ile reaksiyona girmeden önce ROS türlerini etkisiz hale getirerek mutasyon riskini azaltabileceğine dair kanıtlar artmaktadır (Lee ve diğerleri, 2011; Poetsch, 2020).

Mutajenlerin etkinliğini azaltan antimutajenler, promutajenlerin mutajenik etkisini engelleyebilir. Promutajenlerin mutajenik hale gelmesi, genellikle faz I metabolik enzimleri, özellikle de sitokrom P450 ailesi tarafından gerçekleştirilen metabolik aktivasyon süreçlerine bağlıdır. Bazı antimutajenler, bu mutajenik bileşiklerin biyotransformasyonunu sağlayan enzimleri baskılayarak, promutajenlerin aktif hale gelmesini önleyebilir (Słoczyńska ve diğerleri, 2014).

Bileşiklerin mutajenleri aynı anda birkaç farklı şekilde etkileme yeteneğinin antimutajenik etkinliği önemli ölçüde artırdığı dikkate değerdir. Bu nedenle antimutajenik bileşiklerin araştırılması, kanser araştırmalarının hızla genişleyen bir alanını temsil etmektedir (Heo, Sohn ve Au, 2001; El-Sayed ve Hussin, 2013; El-Sayed, Hussin, Al-Faiyz ve Ismail, 2013; Masfria, Dalimunthe, Suci, ve Syahputra, 2024; Dadgar-Zankbar ve diğerleri, 2025). Özetle, birden fazla etki mekanizması gösteren antimutajenik maddelere olan ilginin artması, yeni antimutajenik bileşiklerin araştırılması ve geliştirilmesinde önemli bir göstergedir (AbdelHakem ve Abdelhafez, 2021: 3).

2.6. Genotoksisite Testleri ve Epigenetik Değişikliklerin Belirlenmesi

Mutasyona neden olan genotoksik ajanların belirlenebilmesi ve genetik materyal üzerinde oluşturduğu hasarların tespiti için genotoksisite testleri yapılmaktadır. Bu testler aynı

zamanda antigenotoksik ajanları ve bu ajanların işleyiş mekanizmalarının da belirlenmesini sağlamaktadır. Bu testlerden en sık tercih edilenler Kromozomal anormallik (KA), Mikronukleus (MN) ve Komet testleridir.

2.6.1. Kromozomal Anormallik (KA) testi

Kromozomal anormallikler (KA), DNA'nın çift zincir kırılmaları (DSB'ler) ve ardından homolog olmayan rekombinasyon nedeniyle oluşur ve genom instabilitesine neden olur (Obe ve Durante, 2010). Genom instabilitesi, genetik bilginin bütünlüğünü tehdit eden mutasyonlar, kromozomal anormallikler ve replikasyon hataları nedeniyle ortaya çıkan bir durumdur. Bu instabilite DNA'ya zarar veren endojen ve eksojen faktörlerin etkisiyle oluşabilir bununla birlikte hücresel onarım mekanizmaları bu durumu dengelemektedir (Terabayashi ve Hanada, 2018). Ancak hücresel onarım mekanizmlarındaki genetik kusurlar, genom bütünlüğünün bozulmasına neden olarak, gen aktivitesinin bozulması, insanlarda hızlı yaşlanma, dejeneratif hastalıklar, kanser veya diğer birçok hastalığın oluşmasına sebep olur (Farkas ve diğerleri, 2016; Minina ve diğerleri, 2018; Avuloglu-Yilmaz, Yuzbasioglu ve Unal, 2020; Montazerinezhad, Emamjomeh ve Hajieghrari, 2020). Kanserin, genetik instabilite ve kromozomal anormallikler nedeniyle oluşmasından dolayı karsinogenez sürecinde oluşan anomalilerin tespit edilmesi oldukça önemlidir (Baudoin ve Bloomfield, 2021). Kromozomal anormallik testi Ekonomik Kalkınma ve İşbirliği Örgütü (OECD) 'Test Yönergesi 473' (*in vitro*) olarak 1997 yılında klavuzlarına eklemiştir. Kromozomal anormallik testi, endojen veya eksojen faktörlerin mutajenik/antimutajenik etkilerini belirlemede önemli bir araçtır (Venkatesan, Natarajan ve Hande, 2015).

Kromozomal anormallikler yapısal ve sayısal olarak iki başlık altında incelenmektedir. Yapısal anormallikler delesyon, duplikasyon, insersiyon, inversiyon, izokromozom oluşumu, enine inversiyon ve translokasyon olmak üzere yedi farklı şekilde oluşmaktadır. Sayısal anormallikler ise euploidi ve aneuploidi olarak kendi içerisinde ikiye ayrılmaktadır. Euploidi, Poliploidi ve monoploidi; aneuploidi ise hipoploidi ve hiperploidi olarak ayrılmaktadır (Vodicka ve diğerleri, 2018; İla ve Hüsunet, 2022: 153,184).

Bu anomaliler *in vitro* veya *in vivo* koşullarda memeli hücreleri üzerinde tespit edilebilir. Genetik hasarın birikimini değerlendirmek amacıyla kromozomal anormallik testinde yaygın olarak lenfositler kullanılır. Çünkü kültürlenmesi kolaydır, canlı kalma yetenekleri

oldukça iyi ve vücut içerisinde dolaşım esnasında genetik hasar birikimi oldukça yüksektir. Kromozomal anormallik testi kapsamında hücre döngüsünün metafaz evresinde durdurulan ve boyanan kültüre alınmış periferik kan lenfositleri üzerinde kromozomal bozukluklar değerlendirilmektedir (Suspiro ve Prista, 2011; Li ve diğerleri, 2013; Hemminki ve diğerleri, 2015).

2.6.2. Mikronükleus (MN) testi

Kromzomal instabilitenin, gelişimsel kusurlar, kanser oluşumu ve yaşlanma üzerindeki etkileri bilinmektedir. Bu nedenle genetik instabilitenin güvenilir bir şekilde analiz edilmesi gerekmektedir. Kromzomal instabilite, metafaz analizi ile doğrudan incelenebildiği gibi nükleer DNA içeriği ve morfolojisindeki anormallikleri incelenmesini sağlayan sitogenetik teknikler aracılığıyla da değerlendirilebilir. Bu tekniklerden biri mikronükleus testidir (Fenech, 2020).

MN testi, Evans ve arkadaşları tarafından, anafazın ileri aşamalarında ana çekirdekten atılan asentrik kromozom parçalarıyla ilişkili olduğu 1959'da tanımlanmıştır. Daha sonra 1970'te Boller ve Schimid tarafından sitogenetik analizlerde kullanılması için önerilmiştir. İlk olarak kemik iliğinin polikromatik eritrositlerinde ve lenfositlerde kullanılan MN analizi, günümüzde epitel dokular üzerinde de uygulandığı bilinmektedir (Boller ve Schmid, 1970; Fenech ve diğerleri, 2024). MN testi, genotoksik ajanlara maruz kalan popülasyonlarda moleküler epidemiyoloji ve sitogenetik hasarlarda yaygın olarak kullanılan önemli bir *in vivo* ve *in vitro* biyobelirteçtir (Degen, Gerber, Obrecht-Pflumio ve Dirheimer, 1997; Bonassi ve diğerleri, 2007; Terradas Martín, Tusell ve Genescà 2010; Samanta ve Dey, 2012; Araldi ve diğerleri, 2013). Karyotip analizine ihtiyaç duymadan herhangi bir ökaryotik hücreye uygulanabilir olması açısından da avantajlı olduğu belirtilmiştir (Fenech ve diğerleri, 1985; Kirsch-Volders ve diğerleri, 2003; Miller ve diğerleri, 1997). *In vitro* mikronükleus testinin, OECD ‘Test Kılavuzu 487 kapsamında yer aldığı ve genotoksisite çalışmalarında kullanılmak için onaylandığı bilinmektedir (Whitwell ve diğerleri, 2019).

Sitokinez Blok Mikronükleus Testi (CBMN), lenfositlerde oluşan mikronükleusları analiz etmek için en güvenilir yöntemlerden biridir. MN analizi için proliferasyon geçirmeyen hücrelerin sayılması yanıltıcı sonuca neden olacağı için sitokinezi bloklanmış mikronükleus testi geliştirilmiştir (Udroiu, 2025). CBMN testinde periferik kan lenfositleri,

fitohemaglütinin kullanılarak mitotik bölünmeye uyarılır ve bölünen binükleat hücreler, sitokalasin-B (Cyt-B) ile sitokinez inhibe edilir (Fenech ve diğerleri, 2021). Cyt-B hem aktin polimerizasyon hızını hem de aktin etkileşimini inhibe eden mantar *Drechslera dematioidea'dan* elde edilen bir metabolittir ve DNA hasarına neden olmadan sitokinezi bloke eder. Cyt-B'nin kullanımı nükleoplazmatik köprülerin ve tomurcukların varlığını değerlendirmeye izin verir (Kirsch-Volders ve diğerleri, 2003). Bu köprüler, iki sentromerin hücrenin zıt kutuplarına çekildiği disentrik kromozomlardan kaynaklanır ve kromozomal yeniden düzenlemelerin göstergesi olarak değerlendirilir (Fenech, 2000). CBMN için, hücre kültürü süresi 72 saati geçmemelidir. Preperat başına toplam 1000 hücre analiz edilebilir (Kirsch-Volders ve diğerleri, 2003).

MN'ler iki mekanizma yoluyla oluşabilir: kromozomal kırıklar (klastogenez) veya anöjenez yani mitoz sırasında doğru kromozom ayrımından sorumlu mekanizmanın bozulması (Bonassi ve diğerleri, 2007; Samanta ve Dey, 2012). MN'ler genellikle kromozomal hasarın bir göstergesi olsa da DNA amplifikasyonu gibi genomik dengesizliklerin göstergesi olabileceğini de yansıtmaktadır (Ji ve diğerleri, 2014). Bir hücredeki MN oluşumu, bölünme sonucunda oluşan yeni hücrelere aktarılan hasarın göstergesidir. Meydana gelen hasarların; mitoz esnasında kontrol noktalarındaki meydana gelen bozulmalar, DNA onarım mekanizmalarının çalışmaması, fiziksel veya kimyasal mutajenlere maruziyet, oksidatif stres veya yetersiz beslenme nedeniyle oluşan endojen genotoksinler nedeniyle oluştuğu bilinmektedir (Yüzbaşıoğlu ve Yılmaz, 2022: 219-241).

2.6.3. Komet testi (Kuyruklu Yıldız testi)

Komet testi, tek hücreli jel elektroforezi (SCGE) veya mikrojel elektroforezi olarak da bilinir. Radyasyonun neden olduğu DNA hasarlarını tespit etmek için Ostling ve Johanson tarafından tanıtılmıştır (Ostling, 1984) geliştirilmesinden bu yana, çeşitli metodolojik değişiklikler önerilmiştir (Hartmann ve diğerleri, 2003). Ancak, Singh ve arkadaşları tarafından 1988 yılında geliştirilen ve DNA denatürasyonunun yanı sıra alkali etiketli bölgelerin tespitine izin veren alkali yöntem, DNA hasarının geniş spektrumlu tespiti nedeniyle en çok kullanılan ve önerilen yöntem haline gelmiştir (Hartmann ve diğerleri, 2003; Collins ve diğerleri, 2023; Fairbairn, Olive ve O'Neill, 1995; Anderson, Yu ve McGregor, 1998; Collins ve diğerleri, 2008).

Günümüzdeki çalışmalar çok yönlülüğüne işaret ettiğinden, komet testi genotoksisite çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır (Araldi ve diğerleri, 2014; Valdiglesias, Laffon, Pásaro ve Méndez, 2011; Hobbs ve diğerleri, 2012; Lent, Crouse, Quinn Jr ve Wallace, 2012; Kara, Yuzbasioglu, Avuloglu-Yilmaz ve Unal, 2025).

Komet testi ile elde edilen sonuçların olası genotoksik riskleri tahmin etmedeki önemine dayanarak analiz ilk olarak Uluslararası Harmonizasyon Topluluğu (ICH) tarafından önerilmiş; FDA ve EMA tarafından ilaçların mutajenik etkilerinin değerlendirilmesinde önerilmiştir (Hartmann ve diğerleri, 2003; Burlinson ve diğerleri, 2007; Hobbs ve diğerleri, 2012; OECD. 2016. Test No. 489).

Komet testi serbest DNA segmentlerinin artan göçüyle görselleştirilebilen DNA zincirlerindeki kırıkları tespit etmeye olanak tanır ve kuyruklu yıldızlara benzer görüntülerle sonuçlanır. Test adını bu görüntüden almaktadır (Godschalk ve diğerleri, 2013; Azqueta ve Collins, 2013). Komet protokolü 24 saatten daha kısa sürede yürütülebilmesi nedeniyle basitlik, düşük maliyet ve zaman gibi avantajlar sunmaktadır (Klaude, Eriksson, Nygren ve Ahnström, 1996; Azqueta ve Collins, 2013; Al-Salmani ve diğerleri, 2011). Komet testi, test edilen maddeyle doğrudan temas halinde olan veya emilim, metabolize etme veya atılımın meydana geldiği belirli dokulardaki genotoksisiteyi analiz etmeyi ve klastojeniteyi yerinde tespit etmeyi sağlar (Hartmann ve diğerleri, 2003; Hartmann ve diğerleri, 2004).

2.6.4. Epigenetik değişiklikler ve RT-PZR analizi

Epigenetik değişiklikler, genetik ifadeyi değiştirmeden gen ekspresyonunu düzenleyen kalıtsal biyokimyasal modifikasyonlardır yani DNA’nın nükleotid dizisinde değişiklik oluşturmadan hücresel işleyişin farklılaşmasını sağlarlar (Minarovits, Banati, Szenthe ve Niller, 2016). Epigenetik düzenlemeler, organizmaların çevresel etkilere adaptasyonunu sağlamakta ve çeşitli hastalık süreçlerinde önemli rol oynamaktadır (Stephens, Miaskowski, Levine, Pullinger ve Aouizerat, 2013). Bu değişiklikler başlıca DNA metilasyonu, histon modifikasyonları ve kodlamayan RNA'lar (ncRNA) aracılığıyla gerçekleşmektedir (Dhar, Saha, Mitra ve Nag Chaudhuri, 2021; Neganova, Klochkov, Aleksandrova ve Aliev, 2022; Bure, Nemtsova ve Kuznetsova, 2022). Epigenetik araştırmalar, son yıllarda gelişen teknolojilerle birlikte daha hassas ve kapsamlı hale gelmiştir (Li, 2021).

Epigenetik değişikliklerin belirlenmesi için çeşitli teknikler kullanılmaktadır. DNA metilasyon analizleri için yaygın olarak kullanılan yöntemlerden biri bisülfit dizileme yöntemi, DNA metilasyon profillerini yüksek çözünürlükte analiz etmeye olanak sağlamaktadır (Gong ve diğerleri, 2022). Ayrıca, hedefe yönelik epigenetik düzenlemelerin incelenmesi için metilasyon spesifik PZR (MSP) ve restriksiyon endonükleazlarına dayalı analizler de kullanılmaktadır (Pajares ve diğerleri, 2021). Histon modifikasyonlarını belirlemek amacıyla kromatin immünopresipitasyonu (ChIP) ve kütle spektrometrisi gibi teknikler genetik regülasyon süreçlerini anlamak için kullanılmaktadır (Northrup ve Zhao, 2011; Khan, Shahid ve Asif, 2021; Tretyakova, Villalta ve Kotapati, 2013). RNA tabanlı epigenetik analizlerde kullanılan RNA dizileme (RNA-Seq) ve mikroRNA ekspresyon profilleme tekniklerinin biyomedikal araştırmalarda giderek daha fazla kullanılmaktadır (Travaglini ve diğerleri, 2020; Xie, Jiang, Mora ve Li, 2021).

Kodlamayan RNA’lar da epigenetik mekanizmalarda kritik bir rol oynar. MikroRNA’lar (miRNA) ve uzun kodlamayan RNA’lar (lncRNA), gen ekspresyonunun post-transkripsiyonel seviyede düzenlenmesini sağlar (Yao, Chen ve Zhou, 2019). Bu moleküllerin analizi için RNA dizileme (RNA-Seq) ve kantitatif PZR (qPZR) gibi ileri teknikler kullanılmaktadır. Epigenetik değişikliklerin belirlenmesi, başta kanser olmak üzere birçok hastalığın tanı ve tedavi süreçlerinde önemli bir yere sahiptir.

RT-PZR tekniği

Ters transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PZR), RNA'dan tamamlayıcı DNA (cDNA) sentezlenerek PZR ile çoğaltılmasına dayanan bir tekniktir (Wong ve Medrano, 2005). RT-PZR, özellikle gen ekspresyon analizleri, viral ve bakteriyel patojenlerin tespiti ve moleküler genetik çalışmalar için yaygın olarak kullanılmaktadır (Gheytanchi ve diğerleri, 2021; Pérez-Rodríguez, Cherpillod, Thomasson, Vetter ve Schibler, 2024; Özdemir, Yurt, Pektaş ve Berk, 2025).

RT-PZR iki ana aşamadan oluşmaktadır: ters transkripsiyon ve PZR amplifikasyonu. İlk aşamada, RNA örneği ters transkriptaz enzimi ile tek sarmallı cDNA'ya çevrilir. Daha sonra, elde edilen cDNA, PZR aşamasında belirli gen bölgelerini çoğaltmak için DNA polimeraz enzimi yardımıyla amplifiye edilir. Fluoresan işaretleme sistemleri ile birleştirildiğinde, kantitatif RT-PZR (qRT-PZR) olarak adlandırılan teknik kullanılarak gen ekspresyon

seviyeleri hassas bir şekilde ölçülebilir. Bu yöntem, mutasyon analizi ve genetik hastalıkların tanısında da yaygın olarak uygulanmaktadır (Huggett, Dheda, Bustin ve Zumla, 2005; Jozefczuk ve Adjaye, 2011).

RT-PZR tekniği, yüksek duyarlılığı ve özgüllüğü nedeniyle kanser araştırmalarında, belirli onkogenlerin veya tümör baskılayıcı genlerin ekspresyon düzeylerini analiz etmek için kullanılmakta, enfeksiyon hastalıklarının teşhisinde ise patojenlerin RNA bazlı tespitini sağlamaktadır (Hazan ve diğerleri, 2024; Jeyakumar, Ambujam, Suganya ve Arunagiri, 2022). Hızlı ve güvenilir olması nedeniyle modern tıp ve biyoteknoloji araştırmalarında kritik bir yere sahiptir.

2.7. Epigenetik Mekanizmalar

1942 yılında İngiliz biyolog Conrad Hal Waddington, genotipin fenotipi oluşturma süreçlerine yönelik “epigenetik” terimini önermiştir (Waddington, 1942). 1957'de ise, hücresel farklılaşmanın genetik kalıtımdan çok “epigenetik düzen” üzerindeki değişimlerle düzenlenebileceğini öne süren önemli bir “epigenetik manzara” modelini yayımlamıştır (Waddington, 1957). Holliday ve arkadaşları ise, özellikle 5-metilsitozin (5mC) aracılığıyla DNA metilasyonunun gen düzenlemesinde önemli bir rol oynadığını ortaya koymuşlardır (Holliday ve Pugh, 1975). 1964 yılında histon modifikasyonları, özellikle asetilasyon, ilk kez tanımlanmış ve bunların RNA sentezine olan etkisi incelenmiştir. 1974'te, kromatinin nükleozomal organizasyonu üzerine güncel bir model önerilmiş ve bu model, kromatinin temel biriminin dört histon ile etrafında sarılmış 147 baz çifti DNA'dan oluşan nükleozom parçacığı olduğunu ortaya koymuştur (Kornberg, 1974; Allfrey, Faulkner ve Mirsky, 1964). Razin ve ekibi (1980), DNA metilasyonunun gen fonksiyonunu ve farklılaşmayı engellediğini bulmuşlardır.

Genom bilgiyi genetik ve epigenetik olmak üzere iki şekilde taşır. Genetik canlıların tüm hayati proteinlerinin üretimi için gerekli bilgiyi yani genleri taşırken; epigenetik bu süreçlerin ne zaman, nerede ve nasıl kullanılacağına dair bilgiyi taşır. Gen bölgelerinin açık olması veya kapalı halde tutulması epigenetik mekanizmalar ile kontrol edilir (Jones, 2012; Kaymak, 2012; Wang ve diğerleri, 2017; Yaykaşlı ve diğerleri, 2012). Epigenetik mekanizmalar, gen ekspresyonunu DNA dizisinde herhangi bir değişiklik meydana gelmeksizin düzenleyen biyokimyasal modifikasyonları içermektedir. Yapılan çalışmalar

sonucunda epigenetik mekanizmaların keşfedilmesiyle birlikte DNA dizilimi kadar gen ifadesinde ve kalıtımda epigenetik mekanizmaların önemli bir role sahip olduğu anlaşılmıştır.

Son yıllarda, ekzopolisakkaritlerin gen ifadesi üzerindeki etkileri bir araştırma alanı yaratmıştır. Ancak, ekzopolisakkaritlerin epigenetik mekanizmalar üzerindeki etkileri henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Yapılan bazı çalışmalar, EPS'lerin DNA metilasyonu ve histon modifikasyonları gibi epigenetik yolları etkileyerek gen ekspresyonunu değiştirebileceğini göstermektedir (Forsberg ve diğerleri, 2020; Huoman ve diğerleri, 2021).

2.7.1. DNA metilasyonu

DNA metilasyonu, DNA molekülüne metil gruplarının eklendiği yaygın bir kimyasal modifikasyondur (Wu ve diğerleri, 2023). Genellikle bir guaninin yanında bir sitozin içeren sitozin fosfat guanin (CpG) adalarında gerçekleşir (Ma, 2019). CpG adacıkları, "temel genler" olarak bilinen genlerde ve doku tipine özgü genlerin genellikle 5' promotör gölgelerinde yer almakla birlikte genlerin ekzonlarında da bulunmaktadırlar. Sitozin bazında gerçekleşen bu modifikasyon DNA replikasyonundan sonra meydana gelir ve bu olay DNA metiltransferaz (MTaz) enzimi tarafından katalizlenir. DNA metiltransferazlar (DNMT'ler) DNA metilasyonundan sorumludur ve bir metil grubunu S-adenozilmetiyoninden (SAM) DNA'daki sitozin halkasının 5′ bölgesine aktarır. İnsan genomunda *DNMT1*, *DNMT2*, *DNMT3A*, *DNMT3B* ve *DNMT3L* olmak üzere beş *DNMT* tanımlanmıştır (Wu ve diğerleri, 2023).

DNMT2 ve *DNMT3L*, diğer üç *DNMT* ile dizilim benzerliği gösterse de katalitik aktivite göstermezler (Lyko, 2018). DNMT'ler iki gruba ayrılabilir: *de novo DNMT*'ler ve koruyucu *DNMT*'ler (Wu ve diğerleri, 2023). Sadece *DNMT1* koruyucu *DNMT*'dir ve bu enzim, mevcut DNA metilasyon işaretlerinin korunmasında rol oynar. *DNMT3A* ve *DNMT3B* ise *de novo DNMT*'lerdir ve daha önce metillenmemiş bölgelerde yeni bir DNA metilasyon modeli oluşturma işlevine sahiptir. *DNMT3L* metiltransferaz aktivitesi göstermez ancak *DNMT3A* ve *DNMT3B* enzimlerinin aktivitesini düzenleyerek *de novo* metilasyonu katalizler. *DNMT3L* gametogenez sırasında eksprese edilir ve maternal genomik imprintlenmede rolü bulunmaktadır (Behluli ve diğerleri, 2023; Onay, 2006; Yaykaşlı ve diğerleri, 2012).

DNA metilasyonu, esas olarak telomerler, sentromerler, tekrar dizileri ve inaktif X-kromozomlarında gözlemlenir. Bu süreç hem ökaryotlarda hem de prokaryotlarda, genomik baskı, gen ifadesinin düzenlenmesi, genom stabilitesi ve transpozon susturma gibi çeşitli biyolojik işlevlerde önemli bir rol oynamaktadır (Lienert ve diğerleri, 2011; Eestor, 2000). Ayrıca DNA metilasyonu, asetilasyon, metilasyon, ubiquitinasyon ve fosforilasyon gibi dinamik histon modifikasyonları ile hedef genlerin ifadelenmelerinin düzenlenmesinde iş birliği içerisinde hareket ettiği görülmektedir (Esteller, 2007; Yen ve diğerleri, 2016).

2.7.2. Histon modifikasyonları

Histonlar, kromatinlerin başlıca protein komponentleridir. Ökaryotlarda, her bir nükleozom yapısı, Histon 2A (H2A), Histon 2B (H2B), Histon 3 ve Histon 4 (H4)'den oluşan ve herbirinden iki kopya içeren kor histon oktomeri ile bunu çevreyen 147 bç uzunluğundaki DNA'dan oluşmaktadır (Kanwal ve diğerleri, 2012; Liu, Zhang ve Zhang, 2024).

Histon modifikasyonları, kromatin yapısını değiştiren ve transkripsiyon gibi DNA ile ilgili tüm işlemler üzerinde önemli etkileri olan bir post-translasyonel modifikasyon (PTM) grubudur (Munshi, Shafi, Aliya ve Jyothy, 2009). Bu modifikasyonlar genellikle histonların N-terminal kuyruklarında bulunur ve nükleozom stabilitesini düzenler. Şimdiye kadar asetilasyon, metilasyon ve fosforilasyon gibi en az 16 farklı histon PTM'si tanımlanmıştır. Histon modifikasyonları, “yazıcılar”, “okuyucular” ve “siliciler” olarak bilinen proteinler tarafından dinamik olarak düzenlenir (Yang ve diğerleri, 2023). Bu modifikasyonlar, genlerin transkripsiyonel aktivitesini, DNA replikasyonunu ve rekombinasyonunu etkiler, bu da hücre homeostazını bozabilir ve tümör oluşumu üzerinde kontrol edici bir rol oynayabilir (Lennartsson ve Ekwall, 2009). Anormal histon modifikasyonları bu süreçlerin hepsini etkileyebilir (Karczmarski ve diğerleri, 2014). Histon modifikasyonları, histonlara asetil gruplarının eklenmesiyle asetilasyon; metil gruplarının eklenmesiyle metilasyon; serin, treonin veya tirozine fosfat gruplarının eklenmesiyle fosforilasyon; lizine ubikuitinlerin eklenmesi ile de ubikuitinasyon olarak dört farklı şekilde incelense de çok nadir görülen sumoilasyon ve ADP-ribozilasyon gibi modifikasyonlar da bulunmaktadır (Arnaudo ve Garcia, 2013; Izzo ve Schneider, 2016; Martin ve Zhang, 2005; Weake ve Workman, 2008). Tüm bu kimyasal farklılaşma kromatin yapısını ve gen ifadesini önemli ölçüde etkilemektedir.

2.7.3. Kodlamayan RNA'lar

Epigenetik mekanizmalar arasında kodlanmayan RNA'lar (ncRNA) önemli bir rol oynamaktadır. Yüksek organizasyonlu canlılarda genetik materyal DNA'dır ve DNA'daki bilgi RNA'ya transkripe edildikten sonra RNA bu şifreyi proteine çevirir. Dizileme teknolojisindeki belirgin ilerlemenin bir sonucu olarak çok sayıda non-coding RNA (ncRNA) keşfedilmiştir. İnsan genomunun yalnızca yaklaşık %2'si proteinlere çevrilebilmekte, geri kalanı ise farklı boyut ve işlevlere sahip ncRNA'lara transkribe edilmektedir (Zhou, Hu ve Lai, 2010; Coan, Haefliger, Ounzain ve Johnson, 2024). Uzunluklarına göre ncRNA'lar temel olarak küçük ncRNA'lar (sncRNA'lar, 18∼200 nükleotid), lncRNA'lar (>200 nükleotid) ve circRNA'lar olarak sınıflandırılmaktadır. Ayrıca, sncRNA'lar miRNA'lar, küçük nükleer RNA'lar (snRNA'lar), küçük interferans RNA (siRNA) ve piwi-etkileşen RNA'lar (piRNA'lar) olarak da ayrılabilir (Ali Zaidi ve diğerleri, 2023; Nemeth, Bayraktar, Ferracin ve Calin, 2024). ncRNA'lar apoptoz, otofaji ve hücresel proliferasyon gibi birçok biyolojik süreçten sorumludur (Engreitz ve diğerleri, 2013; Kazimierczyk ve Wrzesinski, 2021; Rinn ve Chang, 2020). ncRNA'lar, DNA metilasyonu, histon modifikasyonları ve kromatinin yeniden şekillenmesinde rol oynamaktadır (Kawasaki ve Taira, 2004; Morris, Chan, Jacobsen ve Looney, 2004; Zhou, Wang, Man, Zhang ve Xu, 2015). Ayrıca, ncRNA'lar metabolik hastalıklar da dahil olmak üzere çeşitli hastalıklarda iyi tanısal ve prognostik biyobelirteçlerdir (Kuo ve diğerleri, 2022; Zhou, Wang, Man, Zhang ve Xu, 2015). LncRNA'lar ise kromatin düzenleyici komplekslerle etkileşime girerek gen bölgelerinin hem aktivasyonunda hem de susturulmasında rol almaktadır (Núñez-Martínez ve Recillas-Targa, 2022).

2.7.4. Ekzopolisakkaritlerin biyolojik etkileri üzerine yapılan çalışmalar

Maya ekzopolisakkaritleri ile ilgili, bakteriyel EPS'lere kıyasla daha az çalışma mevcuttur. Bu nedenle etki mekanizmaları çok iyi bilinmemektedir. Şu ana dek yapılan çalışmalarda, immünomodülatör ve antioksidan aktivite göstermeleri gibi birçok özelliğe sahip oldukları bildirilmiştir (Gientka ve diğerleri, 2015; Madhuri ve Prabhakar, 2014; Mahapatra ve Banerjee, 2013). Mayalardan izole edilen EPS'lerin antigenotoksik, antimutajenik, antiklastojenik ve antioksidan özelliklerinin incelendiği sınırlı sayıda çalışmalar mevcuttur. Bunun yanında *P. kudriavzevii* cinsine ait suşlardan elde edilen EPS'nin genotoksik,

antigenotoksik etkilerinin ve epigenetik değişiklikler üzerine etkilerinin incelendiği herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Saber ve arkadaşlarının (2017) yürüttüğü bir araştırmada *P. kudriavzevii* AS-12 salgı metabolitlerinin yani EPS'nin insan kolorektal kanser hücre hatlarına (HT-29 ve Caco-2) karşı antikanser aktiviteye sahip olup olmadığı HT-29 ve Caco-2 hücre hatları ile incelenmiş ve apoptoz mekanizmalarına odaklanarak, normal epitel hücreler (KDR/293) ile karşılaştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar *P. kudriavzevii* AS-12 metabolitinin, insan kolon kanseri hücrelerinde proapoptotik genlerin (HT-29 ve $CaCO_2$) ekspresyon seviyesini değiştirerek proliferasyonu önemli ölçüde inhibe edip apoptozu indüklediğini göstermektedir. Ayrıca *P. kudriavzevii* AS-12'den elde edilen EPS ve bir kemoterapi ilacı olan florourasilin (5-FU) metanolik ekstraktı ile muamele edilmemiş kontrol grubu ile karşılaştırıldığında kanser hücrelerinde proapoptotik genler *BAD, CASP-3, CASP-8, CASP-9* ve *Fas-R*'nin ekspresyon seviyesi önemli ölçüde artarken antiapoptotik *Bcl-2* geninin ekspresyon seviyesinin azaldığı görülmüştür. Bu nedenle *P. kudriavzevii*'nin AS-12'den elde edilen EPS'sinin, insan kolorektal kanser hücre hatlarına (HT-29 ve Caco-2) karşı antikanser aktiviteye sahip olduğu sonucuna varılmıştır (Saber ve diğerleri, 2017a). Saber ve arkadaşlarının yaptığı bir diğer çalışmada, süt ürünlerinden farklı türlerdeki (*Pichia, Candida, Saccharomyces, Kluyveromyces*) mayaların izole edilerek salgıladıkları metabolitlerin insan epitel kanser hücreleri ve normal hücre hatları üzerindeki proapoptotik etkileri araştırılmıştır. Tanımlanan tüm mayalar arasında *K. marxianus* AS41, AGS mide kanseri hücrelerinde en yüksek antikanser etkisi (%53,8 ölüm oranı) göstermiştir. Ayrıca düşük pH (%71 oranında canlılık gösterdiği) ve yüksek safra tuzuna karşı (%83 oranında canlı kalma yeteneği) yüksek direnç göstermiştir. Bu nedenle diğer tüm testler bu maya ile gerçekleştirilmiştir. *K. marxianus* AS41'in patojen etkisinin düşük olduğu ayrıca yaygın olarak kullanılan antifungal ilaçlara karşı oldukça duyarlılık gösterdiği belirtilmiştir. *K. marxianus* AS4'ten elde edilen metabolitler, AGS kanser hücrelerinde *Bcl-2* gen ifadesini düşürmüş ve *BAD* ve *CASP9* gen ifadesini ise arttırmıştır. Ayrıca tüm epitel kanser hücrelerinde *Fas-R, CSAP8* ve kaspazların ifade düzeylerinin artması ekstrinsik apoptoz yolunun malign hücrelerin apoptoza gitmesindeki temel neden olduğu belirtilmiştir. Sonuç olarak, süt ürünlerinden izole edilen *K. marxianus AS41* probiyotik olarak tanıtılabileceği belirtilmiştir. Epitel kanser hücreleri üzerinde proapoptotik aktivite gösterirken sağlıklı hücreler üzerinde negatif bir etki göstermemiştir (Saber, Alipour, Faghfoori ve Khosroushahi, 2017b).

Ogunremi ve arkadaşları (2015) tarafından *P. kudriavzevii* OG32'den elde edilen EPS ile fermente edilmiş tahıl karışımının, kolesterol bakımından zengin diyetle beslenen sıçanlarda plazma antioksidan belirteç seviyeleri araştırılmıştır. İlk periyotta kolesterol bakımından zengin diyetle beslenen sıçanlar, farklı konsantrasyonlarda *P. kudriavzevii* OG32 ile hazırlanan tahıl bazlı probiyotik gıda ile 8 hafta beslenmiştir. Bu sürenin sonunda karaciğer fonksiyonları (glukoz, bilirubin, üre), plazma biyokimyasal parametrelerine göre normal olduğu için sıçanlarda iyi tolere edildiği tespit edilmiştir. *P. kudriavzevii* OG32 içeren tahıl bazlı substratın, kolesterol içeren diyetlerle beslenen sıçan gruplarında plazma antioksidan aktivitesini ve serum lipid seviyelerini olumlu yönde etkilediği gözlenmiştir. Polisakkaritler, normal hücreler üzerinde herhangi bir inhibitör etki yaratmadığından gıda katkı maddesi olarak ve/veya diğer terapötik uygulamalarda kullanılacak gıda güvenliği önlemleri dikkate alındığında güvenli olarak kabul edilebilir olduğu vurgulanmaktadır.

Li ve arkadaşlarının (2023) yaptığı bir çalışmada, protein açısından zengin maya ekstraktlarının *C. elegans* üzerindeki antioksidan ve yaşlanma karşıtı etkileri değerlendirilmiştir. RT-PZR ile mRNA ekspresyon seviyelerinin analizi yapılmıştır. Çalışmanın sonucunda maya ekstraktlarının, *daf-16, skn-1* ve *sod-3* genlerinin mRNA düzeylerinde anlamlı bir artış sağladığı görülmüştür. Bu doğrultuda maya ekstraktlarının *C. elegans* üzerinde bu enzimlerin üretimini artırarak antioksidan ve anti-stres etkilerini azaltabileceği gösterilmiştir (Li ve diğerleri, 2023).

Yapılan bir araştırmada, *R. mucilaginosa* sp. GUMS16'dan elde edilen EPS'nin, K562 hücre hattı üzerinde hücre çoğalmasını engelleyici ve büyümeyi durdurucu etkileri incelenmiştir. EPS ile muamele edilen hücrelerde, hücre döngüsünün G1 fazında durduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca, EPS'nin apoptozu tetikleme mekanizmasının kaspaz bağımlı olduğu tespit edilmiştir. p53 proteininin ekspresyonunun eş zamanlı olarak artması, EPS'nin hem intrinsik hem de ekstrinsik apoptoz yollarını aktive edebileceği bildirilmiştir (Kheyrandish ve diğerleri, 2022).

Sağlık açısından etkileri araştırıldığında çeşitliliği ve işlevleri bakıldığında mikrobiyal EPS'lerin kanser önlenmesinde ve tedavisinde kullanılması uygun görünmektedir. Ayrıca biyoyararlılığı yüksek ürünler ve güvenilir teknolojiye duyulan istek her geçen gün artmaktadır. Böylelikle yenilenebilir kaynaklardan elde edilen biyomoleküllerin kullanımı da şüphesiz ki gelecekte artacaktır. Modifikasyon yöntemleriyle çeşitli özelliklerin

kazandırılması ve uygulama alanlarının genişletilmesi de mümkündür. Daha önce *P. kudriavzevii*'den elde edilmiş EPS'lerin etkilerinin araştırıldığı ve fonksiyonel gıda olarak kullanılmasının uygun olduğunu bildiren çalışmalar bulunmaktadır (Fai, Simiqueli, Ghiselli ve Pastore, 2015; Greppi ve diğerleri, 2017; Han ve Lee, 2017; Ogunremi, Sanni ve Agrawal, 2015). JD2 suşundan elde edilen EPS'nin de benzer etki göstermesinin yanında antigenotoksisite ve epigenetik düzenlemede olumlu sonuçlar elde edileceği düşünülmektedir. İlk defa elde edilmiş olan bu EPS'nin etkilerinin araştırılması literatüre katkısı açısında da oldukça önemlidir.

3. MATERYAL VE METOT

Bu çalışmada *Pichia kudriavzevii* JD2 maya suşundan elde edilen ekzopolisakkaritin (EPS_{JD2}) *in vitro* olarak genotoksik etkileri değerlendirilmiştir. Bunun yanı sıra mutajenik bir ajan olan, hücrelerde genetik materyali hasara uğrattığı bilinen, mitomisin-C'ye karşı antigenotoksik etkisi insan periferal lenfosit kültüründe ve hidrojen peroksite (H_2O_2) karşı antigenotoksik etkisi ise izole lenfositlerde incelenmiştir. Genotoksik etkisini tespit etmek için EPS_{JD2}'nin dört farklı konsantrasyonu (40, 80, 120 ve 160 µg/µL) uygulanmıştır. Antigenotoksik etkinin tespitinde ise mitomisin-C veya hidrojen peroksit ile EPS_{JD2} eş zamanlı olarak uygulanmıştır. Çalışma için bir erkek ve iki kadın donör olmak üzere toplam üç donörden gerekli olan kan örnekleri temin edilmiştir. Çalışmanın sonuçlarında sapma olmaması adına bazı koşulları yerine getiren donörler seçilmiştir. Bu koşullar;

- Bağımlılık yaratan madde (sigara, alkol) kullanmıyor olması
- Kronik veya geçici bir rahatsızlığı olmaması
- 18-30 yaş aralığında olması
- Son altı ay içerisinde genotoksik bir ajana maruz kalmaması ve ilaç kullanmamış olması

Bu çalışma Gazi Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 16.11.2022 tarihli ve 026 sayılı izni ile gerçekleştirilmiştir.

3.1. Çalışma Materyali

Bu tez çalışmasına konu olan *P. kudriavzevii* JD2 maya suşundan elde edilen EPS_{JD2} Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Biyoteknoloji Anabilim Dalından Prof. Dr. Zehranur YÜKSEKDAĞ'ın kültür koleksiyonundan temin edilmiştir. EPS'ye karboksimetilasyon işlemi uygulanarak suda çözünürlüğü artırılmıştır. Liyofilizasyon işlemi ile toz haline getirilmiş ve korumalı cam şişede tarafımıza verilmiştir.

3.1.1. Çalışmada kullanılan diğer kimyasallar

Araştırma insan periferal lenfositlerinde kromozom anormallikleri (KA), sitokinez blok mikronükleus (CBMN-Cyt) sitom testi, komet testi ve RT-PZR analizi gerçekleştirilmiştir.

Araştırmada kullanılan tüm kimyasallar Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler

Kimyasaslın Adı	CAS No	Temin edilen yer
LymphoPlus besiyeri	CY100-100	Cegrogen (Germany)
Mitomisin C	200-008-6	AppliChem (Germany)
Sitokalasin B	14930-96-2	AppliChem (Germany)
Kolkisin	64-86-8	Sigma-Aldrich (USA)
Entellan	10102-40-6	Sigma-Aldrich (Germany)
%100 saflıkta etanoik asit	64-17-5	Sigma-Aldrich (Germany)
Formaldehit	50-00-0	Merck (Germany)
Metanol	67-56-1	Isolab (Germany)
Potasyum klorür (KCl)	7447-40-7	Merck (Germany)
Giemsa Azur Eosin Metilen Mavisi	HX90351204	Merck (Germany)
Sodyum klorür (NaCl)	7647-14-5	Sigma (USA)
Etilendiamintetraasetik asit	6381-92-6	Sigma-Aldrich (Germany)
Sodyum hidroksit (NaOH)	1310-73-2	Merck (Germany)
Tris	77-86-1	Merck (Germany)
Triton X-100	9036-19-5	Merck (Germany)
Dimetilsülfoksit (DMSO)	67-68-5	Merck (Germany)
Low-Melting Agar	9012-36-6	AppliChem (Germany)
Normal-Melting Agar	9012-36-6	AppliChem (Germany)
Hidrojen peroksit (H_2O_2)	22-84-1	AppliChem (Germany)
Dulbecco'nun Fosfat Tamponlu Salini (DPBS)	H0500-540	Cegrogen-Biotech (Germany)
Etidyum bromür	1239-48-8	AppliChem (Germany)
RNA izolasyon kiti	ER701-01L31103K040	Transgen Biotech (China)
LightCycler 480 SYBR Green Master	PB20.17-05	PCRBIOSYSTEMS (London-UK)
cDNA sentez kiti	PB30.11-10	PCRBIOSYSTEMS (London-UK)

3.2. Metod

3.2.1. EPS_{JD2} konsantrasyonlarının belirlenmesi

Bu araştırmada EPS_{JD2}'nin konsantrasyonlarının belirlenmesi amacıyla iki donörden ön deneme çalışması gerçekleştirilmiştir. Kan örnekleri steril koşullarda (heparinize edilmiş) enjektörler ile alınmıştır. 0,2 mL periferik kan fitohemaglütinin içeren 2,5 mL besi ortamı bulunan tüplere ilave edilmiş ve 37°C'deki etüvde 72 saat inkübe edilmiştir. Bu amaçla kültüre edilmiş insan periferal lenfositlerine 5, 10, 20, 40, 80, 120, 160, 320 ve 640 µg/mL konsantrasyonları uygulanmıştır.

Mitotik indeks incelemesi sonucunda 5, 10, 20, 320 ve 640 µg/mL konsantrasyonları, hücre proliferasyonunu anlamlı bir değişiklik oluşturmamış ve bu nedenle elenmiştir. Çalışma konsantrasyonları 40, 80, 120 ve 160 µg/mL olacak şekilde seçilmiş ve toplam üç donörde çalışılmıştır

3.2.2. Kromozom anormallikleri (KA) testi prosedürü

Bu test kimyasalların genotoksisite araştırmalarında Ekonomik Kalkınma ve İşbirliği Örgütü (OECD) tarafından kabul görmüş (Test no:473) bir yöntemdir (İla ve Hüsunet, 2022: 153,184).

Çalışma örneklerinin hazırlanması

Üç donörden heparinize edilen enjektör ile periferik kan örnekleri alınmıştır. 0,2 mL'si içerisinde 2,5 mL LymphoPlus besi ortamı bulunan tüplere ekilmiştir. Bu tüpler 37ºC'lik etüvde 72 saat süre ile inkübe edilmiştir.

Kültür aşaması ve metafaz blokajı

Bu çalışmada *Pichia kudriavzevii* JD2 maya suşundan elde edilen EPS_{JD2}'nin genotoksik ve antigenotoksik etkilerini incelemek için iki deney protokolü oluşturulmuştur. Birinci deney protokolünde EPS_{JD2}'nin olası genotoksik etkisi incelenmiştir. Bu amaçla EPS_{JD2}'nin seçilmiş konsantrasyonları (40, 80, 120 ve 160 µg/mL) tek başına uygulanmıştır. İkinci deney protokolünde ise EPS_{JD2}'nin olası antigenotoksik etkileri incelenmiştir. EPS_{JD2}'nin

aynı konsantrasyonları, ikinci grupta 0,20 μg/mL mitomisin-C (MMC) ile birlikte eş zamanlı olarak hücrelere uygulanmıştır. Kromozom anormalliği (KA) testi için iki deney protokolünde de 24 saat ve 48 saatlik muamele süreleri uygulanmıştır. Ayrıca iki uygulama grubuna da negatif (distile su) ve pozitif kontrol grupları (0,20 μg/mL MMC) eklenmiştir. Hücre bölünmesini metafaz safhasında durdurmak için inkübasyonun 70. saatinde her tüpe 0,06 μg/mL kolkisin çözeltisi eklenmiştir. Hücreler 37ºC'deki etüvde 2 saat boyunca kolkisin ile muamele edilmiştir. KA testi OECD'nin 473 numaralı yönergesinde açıklanmış olan yöntem Avuloglu-Yılmaz ve arkadaşlarının (2020) kullandığı modifikasyonlarla uygulanmıştır.

Hipotonik uygulaması ve hücrelerin fiksasyonu

İnkübasyon süresinin 72. saatinde inkübasyon tüpleri etüvden alınarak 1100 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiş ve oluşan heterojen yapının üst fazı uzaklaştırılmıştır. Ardından inkübasyon tüplerine hipotonik (0,075M KCl, potasyum klorür) çözeltiden 5 mL ilave edilmiş ve kültür tüpleri 37ºC'de 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Sonrasında 1100 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırılmıştır. 3:1 oranında metanol:asetik asit ile hazırlanan fiksatif solüsyonu lenfositlerin zarar görmemesi için gerekli hassasiyet ile tüplere eklenmiştir. Ardından tüpler santrifüj edilmiş ve süpernatant uzaklaştırılmıştır. Bu işlem iki kez daha tekrarlanmış ve fiksasyon işlemi tamamlanmıştır.

Preparasyon ve boyama

Tüpün dibinde kalan süspansiyon pipetaj yapılarak homojen hale getirilmiştir. Bu süspansiyon daha önceden temizlenmiş soğuk lamlar üzerine farklı alanlara gelecek şekilde damlatılmış ve kurumaya bırakılmıştır.

Kromozom anormalliklerin (KA) Mikroskobik İncelemesi

Kromozomal anormalliklerin belirlenmesi için her bir uygulama grubunda, her bir konsantrasyonda, her üç donör için hazırlanan ve daimî hale getirilen preparatların incelemesi gerçekleştirilmiştir. Donörlere ait preparatların her birinde kromozomları iyi dağılmış olan 100'er metafaz (her bir konsantrasyon için toplam 300 metafaz) incelenerek

veriler elde edilmiştir. Toplam hücre sayısı içindeki anormal hücrelerin yüzdesi (% anormal hücre) ile hücre başına düşen kromozom anormalliği (KA/hücre) sayısı belirlenmiştir.

Mitotik indeks (Mİ) değerlerinin belirlenmesi

Mitotik indekslerin belirlenmesi için her bir uygulama grubunda, her bir konsantrasyonda, her üç donör için de hazırlanan ve daimî hale getirilen preparatlar incelenmiştir. Bölünen hücre sayısının toplam hücre sayısına oranının yüzde cinsinden hesaplanması ile mitotik indeks (Mİ) bulunmuştur. Bu amaçla tüm uygulamalar için hazırlanan preparatlardan 1000'er hücre (bir konsantrasyon için toplam 3000 hücre) değerlendirilmiştir.

3.2.3. Mikronükleus (MN) testi prosedürü

Çalışmada EPS_{JD2}'nin insan periferal lenfosit kültüründe kromozom kırıklarına, bütün bir kromozom kaybına neden olup olmadığını belirlemek için mikronukleus testi gerçekleştirilerek genotoksik potansiyeli incelenmiştir. Ayrıca MMC'nin oluşturduğu kromozomal hasara karşı EPS_{JD2}'nin etkinliğinin incelenmesi amacıyla EPS_{JD2}, MMC ile eş zamanlı muamelesi de gerçekleştirilmiş ve MN testi uygulanmıştır.

Çalışma örneklerinin hazırlanması

OECD'nin 487. Kılavuzunda açıklanan Mikronükleus (MN) yöntemi Fenech ve arkadaşlarının (2020) metodu ile Mamur ve arkadaşlarının (2021) ve Yüzbaşıoğlu ve Avuloğlu-Yılmaz'ın (2022) kullandığı modifikasyonlarla uygulanmıştır. Kan örnekleri steril koşullarda üç donörden (heparinize edilmiş) enjektörler ile alınmıştır. 0,2 mL periferik kan fitohemaglütinin içeren 2,5 mL besi ortamı bulunan tüplere ilave edilmiş ve 37°C'deki etüvde 72 saat inkübe edilmiştir.

Kültür aşaması

İnkübasyonun 24. saatinde araştırma grubuna EPS_{JD2}'nin farklı konsantrasyonları (40, 80, 120 ve 160 µg/mL) tek başına uygulanmıştır. İkinci gruba EPS_{JD2}'nin aynı konsantrasyonları 0,20 µg/mL mitomisin-C (MMC) ile birlikte eş zamanlı olarak uygulanmıştır. Mikronükleus (MN) testi için çalışmanın tamamında 48 saatlik muamele süresi baz alınmıştır. Çalışmaya negatif (distile su) ve pozitif (0,20 µg/mL) kontrol grupları eklenmiştir.

Sitokinez blokajı

Hücrelerin bir kez bölündükten sonra verilerin en doğru şekilde hesaplanması için sitokinez (sitoplazma bölünmesi) blokajı yapılmıştır. Bunun için inkübasyonun 44. saatinde sitokalasin-B (Cyt-B) ilave edilmiştir. Sitokalasin-B hücrelerin sitoplazma bölünmesini durdurmamaktadır. Böylece hücreler tek (1N), çift (2N), üç (3N) ve dört (4N) veya daha fazla çekirdekli olarak görülmüştür.

Hipotonik uygulaması ve hücrelerin fiksasyonu

İnkübasyonun 72. saatinde, hücreler kültür ortamında çıkarılarak 1000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiş ve süspansiyonun üst fazı yani süpernatant kısmı atılmıştır. Her bir tüp içerisine soğuk hipotonik (0,075M KCl, potasyum klorür) çözeltisi ilave edilmiştir. +4ºC'de 5 dakika muamele edilmiştir. Ardından tüpler, 1000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiş ve süspansiyonun üst fazı atılmıştır. Hücrelerin morfolojisini korumak ve oluşan mikronükleusların görünür hale gelmesi için fiksatif solüsyonu (3/1 oranında metanol: asetik asit) hazırlanmıştır. Her bir tüpe -20ºC'de bekletilen soğuk fiksatif solüsyonu eklenmiştir. Ardından tüpler tekrardan santrifüj edilmiş ve süpernatantları uzaklaştırılmıştır. Bu işlem toplamda üç defa tekrarlanmıştır. Son fiksasyon uygulamasında konsantrasyonu %1 olacak şekilde formaldehit ilave edilmiştir. Formaldehit hücre içindeki proteinlerle çapraz bağlar oluşturarak proteinlerin yapısının korunmasını sağlar. Yani oluşan mikronükleusların çekirdekten bağımsız olarak net bir şekilde görünmesini ve boyanmasını sağlamaktadır. Bu işlemlerin ardından elde edilen süspansiyon pipetaj yapılarak homojen hale getirilmiştir. Bu süspansiyon daha önceden temizlenmiş ve -20ºC'de bekletilen lamların üzerine damlatılmış ve kurumaya bırakılmıştır.

Preparatların boyanması ve daimî hale getirilmesi

Hücre yayımı yapıldıktan sonra kurumaya bırakılan preparatlar, mikronükleusların incelenmesi amacıyla, %5'lik Giemsa boyası ile (pH=6,8) 5-10 dakika boyanmıştır. 24 saat kurumaya bırakılan preperatlar entellan ile daimî hale getirilmiştir.

Mikronükleus (MN) frekansının belirlenmesi

Mikronükleus (MN), nükleer tomurcuk ve nükleoplazmik köprü frekanslarının belirlenmesi için 'binükleat' hücreler değerlendirilmiştir. Binükleat hücreler, çekirdek bölünmesini tamamlayan, ancak sitoplazma bölünmesinin engellendiği, çift çekirdekli hücrelerdir. Sitokinezi bloke etmek amacıyla, inkübasyonun 44. saatinde sitokalasin-B ilavesi ile elde edilen hücrelerdir. Binükleat hücreler, test edilen materyallerin ilavesinden sonra bölünen hücrelerdir. Binükleat hücrelerin sitoplazması içerisinde mikronükleus içerip içermemesi durumuna göre, üç donöre ait tüm preparatların her birinden 1000 adet hücre sayılarak veriler elde edilmiştir. Hücre başına düşen mikronükleus sayısını hesaplamak için Eşitlik3.1. kullanılmıştır.

$$MN = \frac{[1x\,(1MN)+2x(2MN)+3x(3MN+4MN)]}{N} \quad (3.1)$$

Nükleer bölünme indeks (NBİ) değerlerinin belirlenmesi

Nükleer bölünme indeksi (NBİ) belirlenirken preparatların her birinden 500 hücre (toplam 1500) hücre incelenmiştir. Hücreler 1 çekirdekli (1N), 2 çekirdekli (2N), 3 çekirdekli (3N) ve 4 ve daha fazla çekirdekli (4N) olarak sayılmış, nükleer bölünme indeksi (NBİ) Eşitlik3.2. kullanılarak hesaplanmıştır. Eşitlik 3.2'deki N, incelenen toplam hücre sayısını ifade etmektedir.

$$NB\dot{I} = \frac{[1x(1N)+2x(2N)+3x(3N+4N)]}{N} \quad (3.2)$$

3.2.4. Komet testi prosedürü

EPS_{JD2}'nin izole insan lenfositlerinde DNA hasarı oluşturup oluşturmadığı ve hidrojen peroksit (H_2O_2) mutajeni tarafından oluşturulan DNA hasarına karşı koruyucu-iyileştirici etkisi olup olmadığı komet testi ile belirlenmiştir. Bu test Singh, McCoy, Tice ve Schneider'ın (1988) metodunda bazı modifikasyonlar yapılarak (Ünal, Saygılı ve Akbaş, 2022: 313,341) gerçekleştirilmiştir.

Hücre hazırlığı ve izolasyon

Çalışmaya dahil edilme kriterlerini taşıyan donörlerden alınan periferik kanların 100'er µL'si, soğuk ortamda PBS ile karıştırılmış ve oluşan süspansiyonlardan, lenfositler biocoll çözeltisi kullanılarak soğuk ortamda izole edilmiştir. Hücre canlılığı, izole lenfositlere uygulanan trypan blue ile yapılan canlılık testi sonucu ≥ %98 olarak belirlenmiştir. EPS_{JD2}'nin farklı konsantrasyonları (40, 80, 120 ve 160 µg/mL) tek başına ve H_2O_2 (100 µM) ile eş zamanlı olarak 1 saat, 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Ek olarak bir negatif (distile su) ve bir de pozitif (100 µM H_2O_2) kontrol grupları bulundurulmuştur. Sürenin sonunda, santrifüj işlemi uygulanmış, süpernatantlar uzaklaştırılmış ve PBS ile resüspanse edilmiştir.

Agaroz jelin hazırlanması ve Lizis (Hücre parçalaması) işlemi

Lenfositler düşük erime ısılı agar ile karıştırılmış ve önceden hazırlanan yüksek erime ısılı agar ile kaplanmış lamlar üzerine yayılmıştır. Preparatlar buzdolabında bekletildikten sonra hücre zarının parçalanarak nükleer yapının açığa çıkması ve DNA'nın elektroforezde yürütme sırasında hareket etmesi için lysing solüsyonuna alınmıştır. Bu solüsyon içerisinde 1 saat süre ile +4°C'de inkübasyona bırakılmıştır.

DNA denatürasyonu ve elektroforez

DNA hasarının daha net bir şekilde görülebilmesi için preparatlar elektroforez tamponunda 20 dakika bekletilmiştir. Daha sonra V=25, mA=300 olacak şekilde 20 dakika elektroforez uygulanmıştır.

Nötrolizasyon ve boyama

Elektroforez uygulaması sonrasında preperatlar 0,4 M Tris, pH=7,5 olacak şekilde hazırlanmış nötralizasyon tamponunda bekletilmiştir. Floresan mikroskobunda incelemeye hazır hale getirmek için son olarak etidyum bromür (EtBr) ile boyanmıştır.

Mikroskobik analiz

Etidyum bromürle boyanan preperatlar, 546-590 nm dalga boyu filtresine sahip, Olympus BX51 floresan mikroskop altında incelenmiştir. Burada görülen hasarlı DNA elektroforez uygulaması esnasında katod yönünde hareket etmesiyle oluşmuştur. DNA'nın baş kısmı çekirdekte kalırken hasarlı kısımlar kuyruk bölgesini oluşturmuştur.

Komet testinde kuyruk analizi

Komet Assay IV, Perceptive Instruments Ltd., UK analiz programı kullanılarak her bir konsantrasyonda ve her donör için en az 100 hücrenin 400x büyütmede, kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momenti değerleri kayıt altına alınmıştır.

3.2.5. Real time-polimeraz zincir reaksiyonu analizi

Heparinize edilen enjektör ile periferik kan örneği alınmıştır. 0,2 mL'si içerisinde 2,5 mL LymphoPlus medium besi ortamı bulunan tüplere ekilmiştir. Bu tüpler 37ºC'lik etüvde 72 saat süre ile inkübe edilmiştir. İnkübasyonun 24. saatinde EPS_{JD2}'nin farklı konsantrasyonları (80, 120 ve 160 µg/mL) tek başına uygulanmıştır. Bu konsantrasyonlar diğer testlerde etkili olan konsantrsayonlar olmaları nedeniyle seçilmiştir. RT-PZR analizi için çalışmanın tamamında 48 saatlik muamele süresi baz alınmıştır. Ek olarak çalışmaya negatif (distile su) kontrol grubu eklenmiştir.

RNA izolasyonu

Çizelge 3.2. Kit içeriği

Bileşik	Miktar
Binding buffer 4 (BB4)	40 mL
Clean buffer 4 (CB4)	60 mL
Wash buffer 4 (WB4)	12 mL
Proteinase K	1 mL
DNase 1	1500 unites
DNase 1 reaction buffer	4x1 mL
RNase free water	10 mL
RNase-free tube (1,5 mL)	50
RNA spin column with collection tube	50

Lenfositlerin EPS_{JD2} ile muamelesinin ardından Çizelge 3.2.'de Kit içeriği' paylaşılan EasyPure RNA Kit'' saflaştırma kiti kullanılarak RNA saflaştırması yapılmıştır. Kit içeriğindeki protokole bağlı olarak, ilk aşamada kültürün 72. saati sonunda 12000 g'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Oluşan süspansiyonda üst faz atılarak 0,2 mL PBS eklenmiştir. Homojenize edilip RNA free tüpe aktarılmıştır. Her bir tüpe BB4 tamponu eklenip homojen bir şekilde karıştığına emin olduktan sonra filtreli ependorfa alınarak BB4 tamponu eklenmiştir. Herhangi bir çökme olmaması ve eşit bir şekilde karışması için vorteks yapılmıştır. 8000 g'de 15 saniye santrifüj edilmiştir. Süpernatant kısmı atıldıktan sonra genomik DNA'yı uzaklaştırmak amacıyla DNase reaction buffer ve DNase-1 ekleyip 25°C'de 15 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi bittikten sonra her bir tüpe 0,5 mL wash buffer eklenerek 8000 g'de 15 sn santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında yine üst faz atılarak 0,5 mL clean buffer eklenerek 130000 g'de 2 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant kısmını ayırdıktan sonra 1 dakika daha 13000 g'de santrifüj edilerek, her bir tüp ayrı bir filtreli tüpe aktarılmıştır. RNase free water ekleyip 8000 g'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. EasyPure RNA kiti ile lenfositlerden saflaştırılan toplam RNA miktarı NanoDrop cihazı kullanılarak tayin edilmiştir. RNA miktarı ng/µL cinsinden hesaplanmıştır. Bu örnekler komplementer deoksiribonükleik asit (cDNA) sentezinde kullanılmıştır

cDNA sentezi – Ters transkripsiyon

5x cDNA sentez karışımı çözülerek Master Reaction Mix hazırlanmıştır. Her bir tüp içerisindeki son hacim 20 µL olacak şekilde (4 µL cDNA, 1 µL 20x Enzyme mix ve RNA) karıştırılmıştır. Karıştırılan numuneler 42°C'de 30 dk, 85°C'de 10 dk inkübe edilmiş ve son adımda ise cDNA miktarları ölçülmüştür.

Kantitatif analiz (Real time-polimeraz zincir reaksiyonu)

qRT-PZR analizi için Roche Light Cycler 96 gerçek zamanlı PZR cihazı kullanılmıştır. PZR şartları firmanın önerdiği şekilde; birinci denatürasyon 95°C'de, ikinci denatürasyon 95°C'de, bağlanma 60°C'de ve polimerizasyon 72°C'de yapılmıştır. Kullanılan primer dizilimleri ve büyüklükleri Çizelge 2.1'de verilmiştir. Donörden saflaştırılan RNA örnekleri ile elde edilen cDNA'lar *DNMT1, DNMT3A, DNMT3B* ve *HDAC1* genlerine özgü primerler kullanılarak (Çizelge 3.3) RT-PZR yöntemi ile çoğaltılarak gen ifadesindeki değişimler *GAPDH* genine oranla belirlenmiştir.

Çizelge 3.3. RT-PZR analizinde kullanılan primer dizileri

Genler		Primer dizileri	Kaynak
GAPDH	F	5′-CGACCACTTTGTCAAGCTCA-3′	(Jiang ve diğerleri, 2016)
	R	5′-AGGGGTCTACATGGCAACTG-3	
DNMT1	F	5′-TACCTGGACGACCCTGACCTC-3′	(Wu ve diğerleri, 2022)
	R	5′-CGTTGGCATCAAAGATGGACA-3′	
DNMT3A	F	5′-TATTGATGAGCGCACAAGAGAGC-3′	(He ve diğerleri, 2011)
	R	5′-GGGTGTTCCAGGGTAACATTGAG-3′	
DNMT3B	F	5′-GGCAAGTTCTCCGAGGTCTCTG-3′	(Wu ve diğerleri, 2007)
	R	5′-TGGTACATGGCTTTTCGATAGGA-3′	
HDAC1	F	5′-CTGTCCGGTATTTGATGGCT-3′	(Royston, Udayakumar, Lewis, Tollefsbol, 2019)
	R	5′-CACGAACTCCACACACTTGG-3′	

F: forwad (ileri primer), R: reverse (geri primer)

Real-time PZR (RT-qPZR) testi veri analizi

İzole edilen RNA'lar materyal metot da belirtildiği şekilde cDNA'ya dönüştürülmüştür. *DNMT1*, *DNMT3A, DNMT3B* ve *HDAC1* genlerinin ifade seviyeleri Roche Light Cycler 96 Real-Time PZR kullanılarak tekrarlı olarak çalışılmıştır. Referans gen olarak *GAPDH* kullanılmıştır.

Her örnek için hedef gen ve referans genlerin Ct (eşik döngü) değerleri üç teknik tekrar ile elde edilmiş ve ortalamaları alınmıştır. *DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B* ve *HDAC1* genlerinin gen ekspresyon seviyesi, referans gen olan *GAPDH* ekspresyonuna göre göreceli olarak $2^{-\Delta\Delta CT}$ yöntemine göre hesaplanmıştır. Hedef genin ortalama Ct değeri ile referans genin ortalama Ct değerinin farkı alınarak ΔCt hesaplaması (Eşitlik 3.3) yapılmıştır. ΔCt değerlerinin farkı alınarak ΔΔCt değeri (Eşitlik 3.4) hesaplanmıştır. Son olarak rölatif gen ekspresyonu (Eşitlik 3.5) hesaplanarak genler arasındaki kat artışı değerlendirilmiştir. Rölatif gen ekspresyon değeri (Relative Quantification, RQ), hedef genin kontrol grubuna göre ekspresyonundaki artışı veya azalışı göstermektedir.

$$\Delta Ct = Ct(hedef\ gen) - Ct(referans\ gen) \quad (3.3)$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(hedef\ gen) - \Delta Ct(kontrol) \quad (3.4)$$

$$RQ = 2^{-\Delta\Delta ct} \quad (3.5)$$

3.2.6. İstatistiki Analizler

Çalışmada, KA testi, MN testi, Komet testlerinin analizleri olmak üzere üç temel genotoksisite ve antigenotoksisite parametresi değerlendirilmiştir. Her biri üç farklı donörden elde edilen hücreler üzerinde uygulanana, negatif ve pozitif kontrol gruplarıyla birlikte toplam on farklı konsantrasyon istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır. Gruplar arası farkların analizinde, tek yönlü varyans analizi (One-Way ANOVA) kullanılmış ve $p<0,05$ anlamlılıklar değeri baz alınarak hesaplanmıştır. İstatiksel analizler kapsamında, negatif kontrol (distile su) ile yalnızca EPS_{JD2}'nin uygulandığı gruplar karşılaştırılmış; poztif kontrol (MMC) ile EPS_{JD2}+MMC grupları kıyaslanmıştır. Uygulamalardan elde edilen veriler, kontrol grupları ile karşılaştırılmıştır. Anlamlı anlamlı fark gösteren bulgularda, farkın hangi uygulamadan kaynaklandığını belirlemek amacıyla Tukey post-hoc testi ile gruplar arası karşılaştırma yapılmıştır. Elde edilen çalışma sonuçları, ortalama±standart hata olarak ifade edilmiştir. Ayrıca, anlamlılık gösteren parametreler için regresyon analizi yapılmış; negatif kontrol ile sadece EPS_{JD2} uygulamaları ve pozitif kontrol ile EPS_{JD2}+MMC uygulamaları karşılaştırılarak dozlara bağlı değişim istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

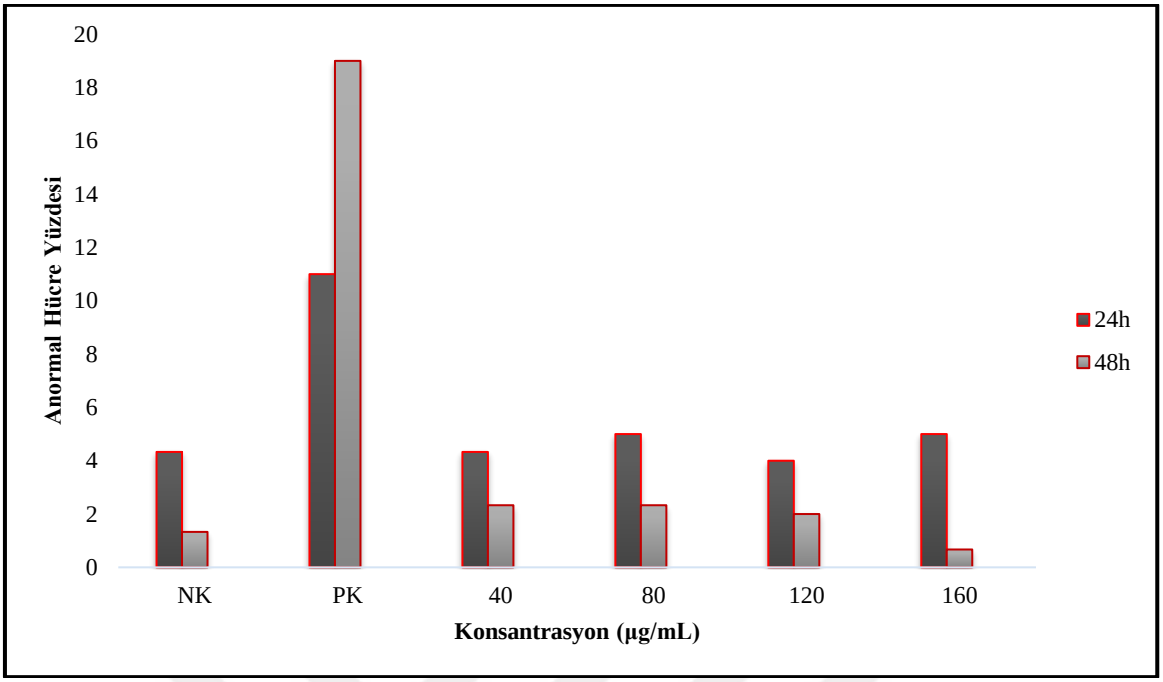
4.1. Kromozomal Anormallik Sonuçları

Üç farklı donörden alınan kan numunelerine kültür şartlarında, belirlenen konsantrasyonlarda 24 ve 48 saat EPS_{JD2} uygulaması sonucu insan periferal lenfositlerinde meydana gelen kromozomal anormallik tipleri ve sıklıkları şu şekildedir (Çizelge 4.1, Resim 4.1); Fragment %60, kromatid kırığı %13,75, kardeş kromatidlerde birleşme %10, kromozom kırığı %5 ve disentrik kromozom %2,5 şeklinde yapısal anormallikler belirlenmiştir. Sayısal anormalliklerden ise poliploidi (%6,25) ve endoreduplikasyon (%2,5) görülmüştür.

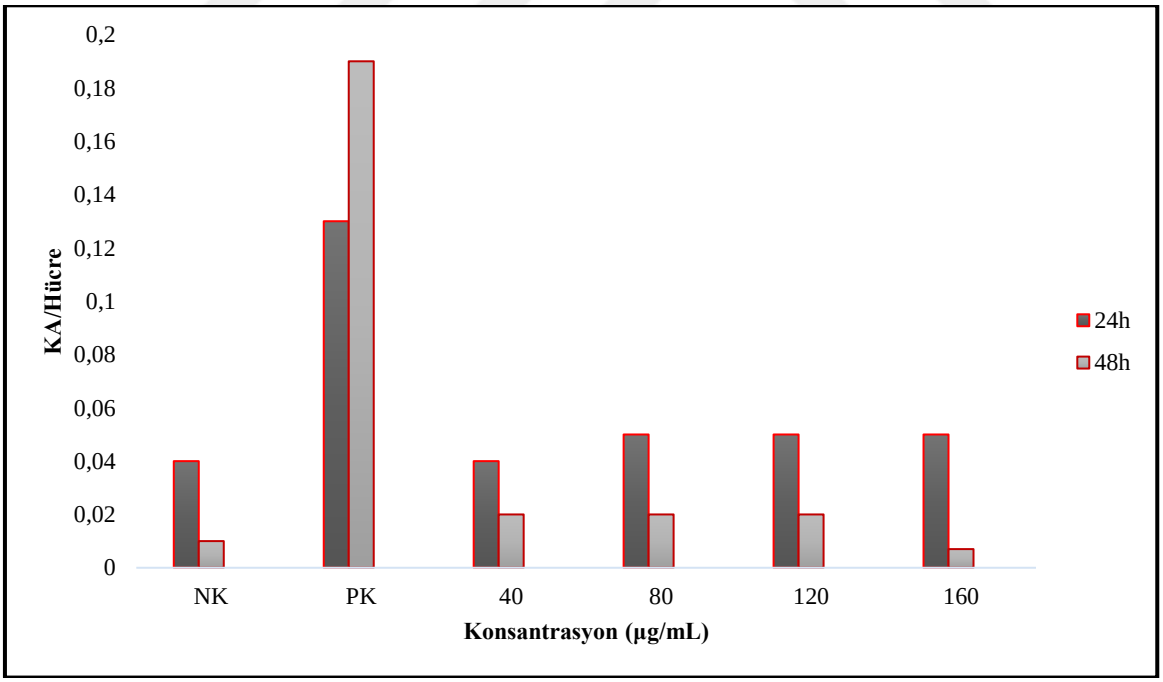
24 ve 48 saatlik EPS_{JD2} uygulamaları, anormallik yüzdesi ve hücre başına düşen anormallik sayısında artışa yol açmamış, mitotik indekste anlamlı bir değişiklik oluşturmamış ve genotoksik etki göstermemiştir (Şekil 4.1, 4.2 ve 4.3). Bu durum, EPS'nin potansiyel bir fonksiyonel gıda bileşeni veya postbiyotik ajan olarak değerlendirilebileceğini ortaya koymaktadır.

Çizelge 4.1. EPS_{JD2}'nin 24 ve 48 saatlik uygulamalarının insan periferal lenfositlerinde oluşturdukları kromozomal anormallik türleri, anormal hücre yüzdeleri, hücre başına düşen anormallik oranı ve mitotik indeks değerleri

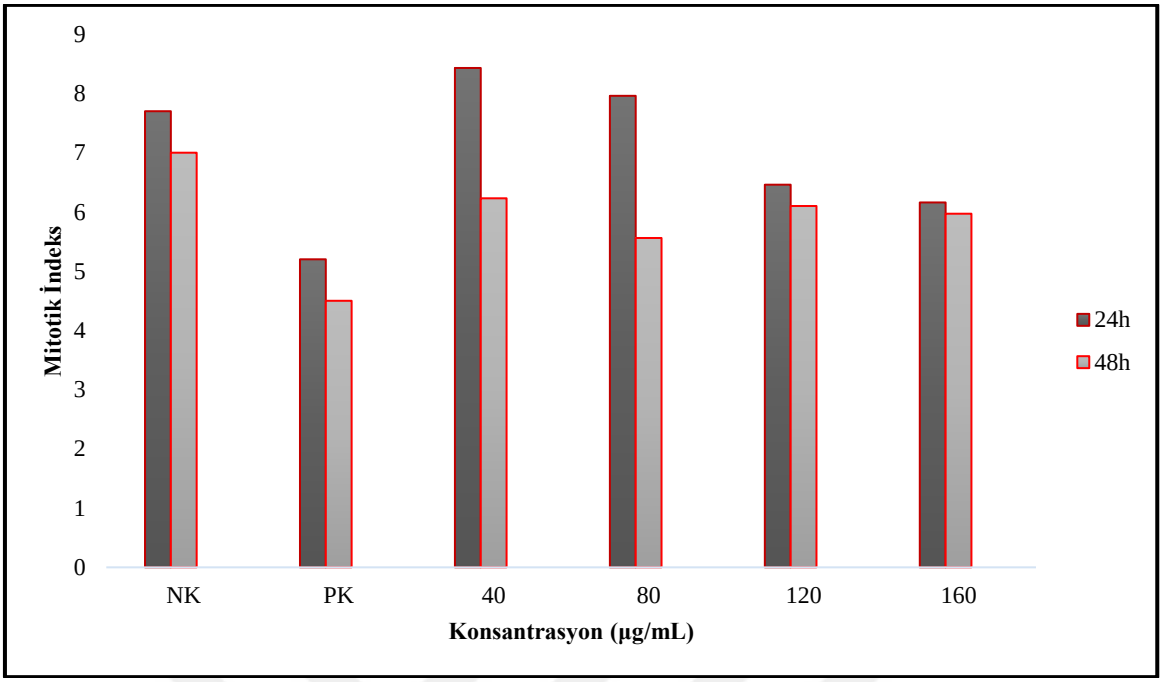
Test Maddesi	Uygulama		Yapısal Anormallikler						Sayısal Anormallikler		Anormal Hücre ± SD (%)	KA/Hücre ± SD	Mİ ± SD
	Süre	Konsantrasyon (pg/mL)	ktk	kzk	f	kkb	ds	h	p	er			
N.K.	24s	0	5	0	5	0	2	0	1	0	4,33±1,20	0,04±0,01	7,70±0,05
P.K.		0,20	17	4	12	2	0	0	0	3	11,00±2,51	0,13±0,02	5,2±0,04
EPSJD2		40	0	0	7	1	1	0	4	0	4,33±0,66	0.04±0,01	8,43±0,12
		80	2	0	11	2	0	0	0	0	5,00±1,00	0,05±0,01	7,96±0,05
		120	0	1	11	1	1	0	0	0	4,00±1,00	0,05±0,01	6,46±0,06
		160	5	1	9	1	0	0	0	0	5,00±1,15	0,05±0,01	6,16*0,02
N. K.	48s	0	3	0	0	1	0	0	0	0	1,33±0,88	0,01±0,008	7,00±0,05
P. K.		0,20	22	5	18	9	0	1	2	1	19,00±2,00	0,19±0,02	4,5±0,03
EPSJD2		40	0	0	6	0	0	0	0	1	2,33±1,33	0,02±0,01	6,23±0,08
		80	2	2	2	1	0	0	0	0	2,33±0,88	0,02±0,008	5,56±0,08
		120	1	0	2	1	0	0	1	1	2,00±1,53	0,02±0,01	6,10±0,09
		160	1	0	0	1	0	0	0	0	0,67±0,33	0,007±0,003	5,97±0,02
Kromozomal anormallik yüzdesi			13,75	5,0	60,0	10,0	2,5		6,25	2,5			



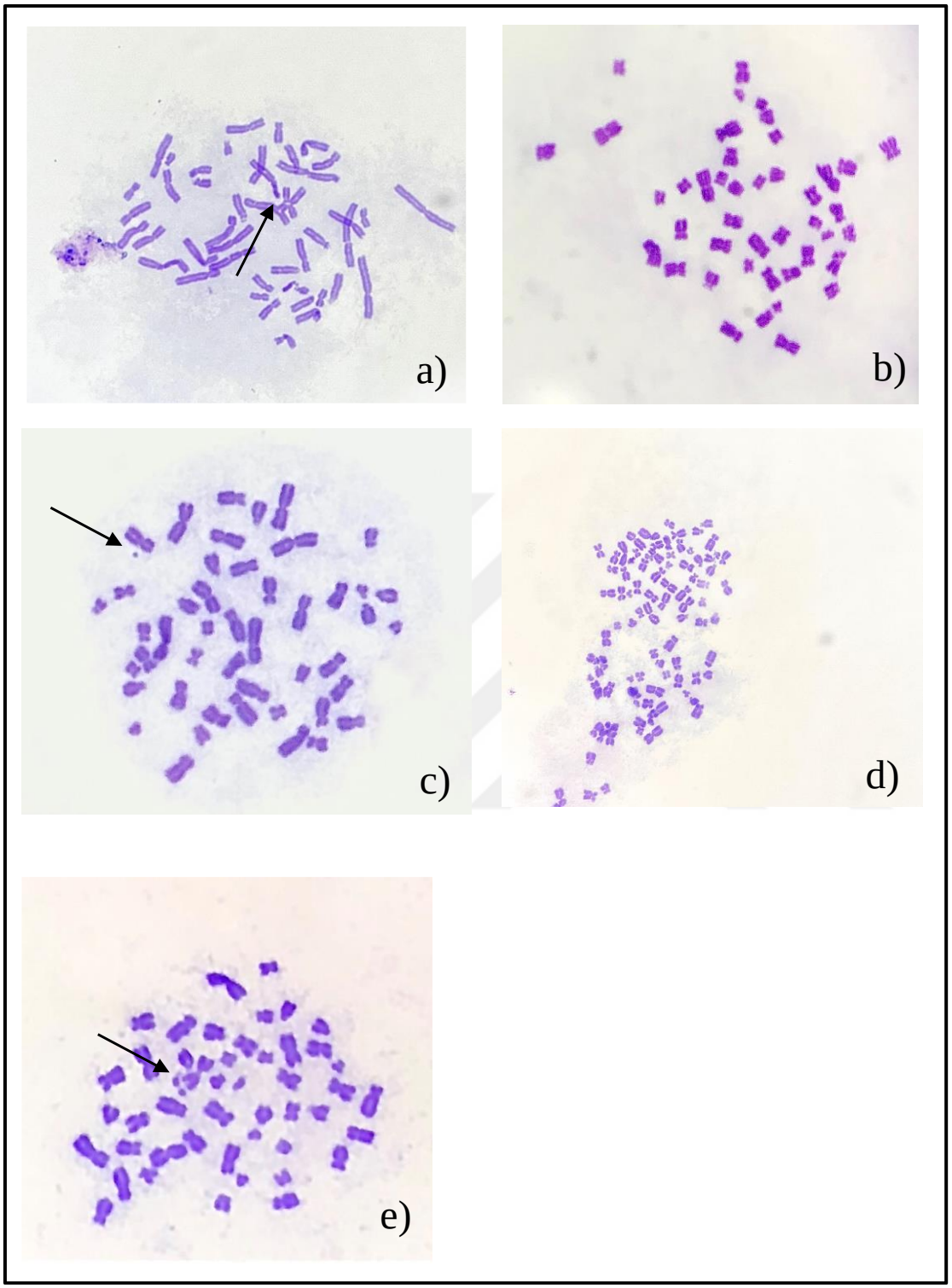
Şekil 4.1. EPS_{JD2}'nin 24 ve 48 saatlik uygulamalarının insan periferal lenfositlerinde oluşturdukları anormal hücre yüzdeleri (P. K.: Pozitif kontrol, N. K.: Negatif Kontrol)



Şekil 4.2. EPS_{JD2}'nin 24 ve 48 saatlik uygulamalarının insan periferal lenfositlerinde oluşturdukları hücre başına anormallik yüzdeleri (P. K.: Pozitif kontrol, N. K.: Negatif Kontrol)



Şekil 4.3. EPS_{JD2}'nin 24 ve 48 saatlik uygulamalarının insan periferal lenfositleri üzerindeki mitotik indeks (Mİ) değerleri (P. K.: Pozitif kontrol, N. K.: Negatif Kontrol)



Resim 4.1. EPS_{JD2}, EPS_{JD2}+ MMC uygulamalarında insan periferal lenfositleri üzerinde gözlenen kromozomal anormallikleri a) kromatid değişimi b) endoreduplikasyon c) fragment d) poliploidi e) kromozom kırığı

EPS_{JD2}'nin MMC ile eş zamanlı uygulanarak kromozomal anormallik testi ile antigenotoksitik potansiyeli ile ilgili bulgular Çizelge 4.2.'de verilmiştir. Elde edilen bulgular doğrultusunda meydana gelen yapısal kromozomal anormallik tipleri şu şekildedir

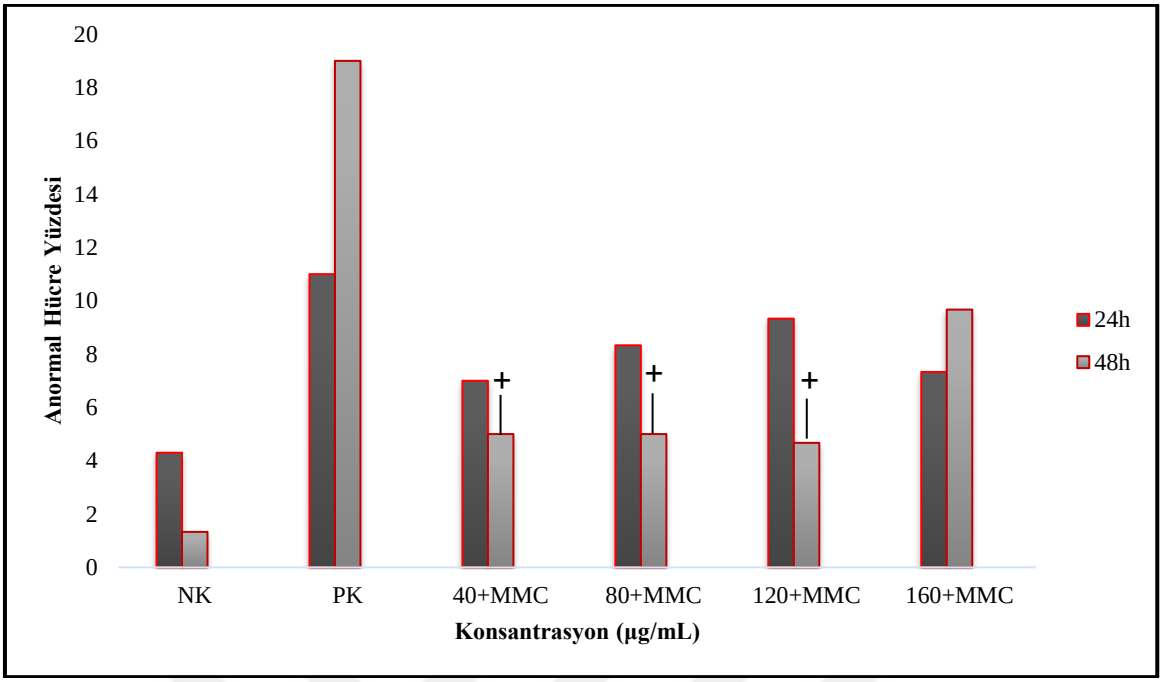
(Çizelge 4.1, Resim 4.1); Fragment %37,1**,** Kromatid kırığı %33,2**,** Kardeş kromatidlerde birleşme %8,6**,** Kromozom kırığı %14,3**,** Disentrik kromozom %2,3**.** Sayısal anormalliklerden ise poliploidi (%3,4) ve endoreduplikasyon (%1,1) görülmüştür.

EPS_{JD2}+ MMC'nin 24 saatlik uygulamasında anormal hücre yüzdesi, KA/Hücre ve Mİ frekansları pozitif kontrol ile kıyaslandığında genel olarak koruyucu etki göstermiştir. Ancak istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir. 48 saatlik uygulamada ise anormal hücre yüzdesi 40+MMC, 80+MMC ve 120+MMC konsantrasyonda anlamlı düzeyde azalmış ve konsantrasyon ile kromozomal anormallik oranı arasında güçlü bir korelasyon (*r* =-0,84) saptanmıştır (Şekil 4.4). KA/hücre oranı ise en yüksek konsantrasyon hariç diğer konsantrasyonlarda azalmıştır (Şekil 4.5). Mitotik indekste anlamlı bir değişim gözlenmemiştir (Şekil 4.6).

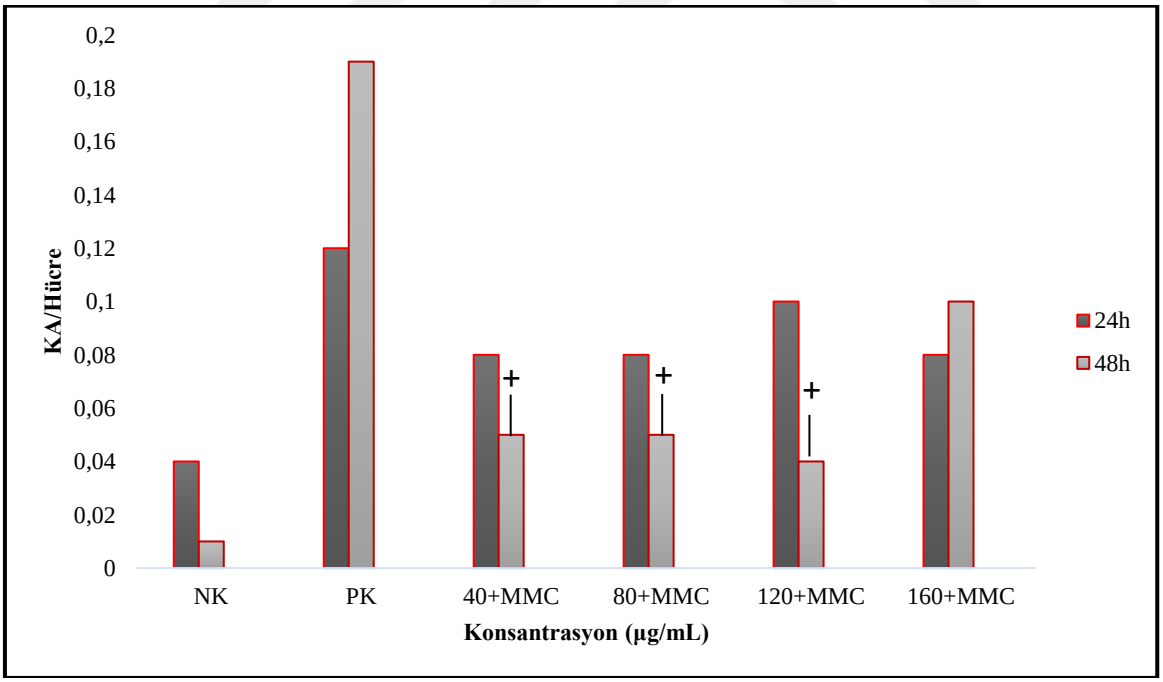
Çizelge 4.2. EPS_{JD2}+MMC'nin 24 ve 48 saatlik uygulamalarının insan periferal lenfositlerinde oluşturdukları kromozomal anormallik türleri, anormal hücre yüzdeleri, hücre başına düşen anormallik oranı ve mitotik indeks hesaplamaları

Test Maddesi	Uygulama		Yapısal Anormallikler						Sayısal Anormallikler		Anormal Hücre ± SD (%)	KA/Hücre ± SD	Mİ ± SD
	Süre	Konsantrasyon (µg/mL)	ktk	kzk	f	kkb	ds	h	p	er			
N.K.		0	8	0	6	0	2	0	1	0	4,33±1,20	0,04±0,01	7,70±0,10
P.K. (MMC)		0,20	17	4	12	2	0	0	0	3	11,00±2,51	0,12±0,02	5,20±0,04
EPS_{JD2}+MMC	24h	40 + MMC	4	5	9	4	1	0	0	0	7,00±1,15	0,08±0,01	5,86±0,02
		80 + MMC	10	3	9	2	1	0	0	0	8,33±2,33	0,08±0,02	5,93±0,02
		120 + MMC	10	4	11	1	0	0	3	0	9,33±2,40	0,10±0,02	6,36±0,02
		160 + MMC	6	3	10	2	0	0	1	1	7,33±0,67	0,08±0,009	5,96±0,06
N. K.		0	3	0	0	1	0	0	0	0	1,33±0,88	0,01±0,008	7,00±0,05
P. K. (MMC)		0,20	22	5	18	9	0	1	2	1	19,00±2,00	0,19±0,02	4,50±0,03
EPS_{JD2}+MMC	48h	40 + MMC	3	3	9	0	0	0	1	0	5,00±2,31+	0,05±0,02^{+}	5,70±0,08
		80 + MMC	5	2	6	2	0	0	0	0	5,00±1,53+	0,05±0,01^{+}	6,16±0,07
		120 + MMC	5	2	4	3	0	0	0	0	4,67±0,88+	0,04±0,008^{+}	5,76±0,04
		160 + MMC	15	3	7	1	2	0	1	1	9,67±5,24	0,10±0,05	5,03±0,12
Kromozomal anormallik yüzdesi			33,2	14,3	37,1	8,6	2,3	-	3,4	1,1			

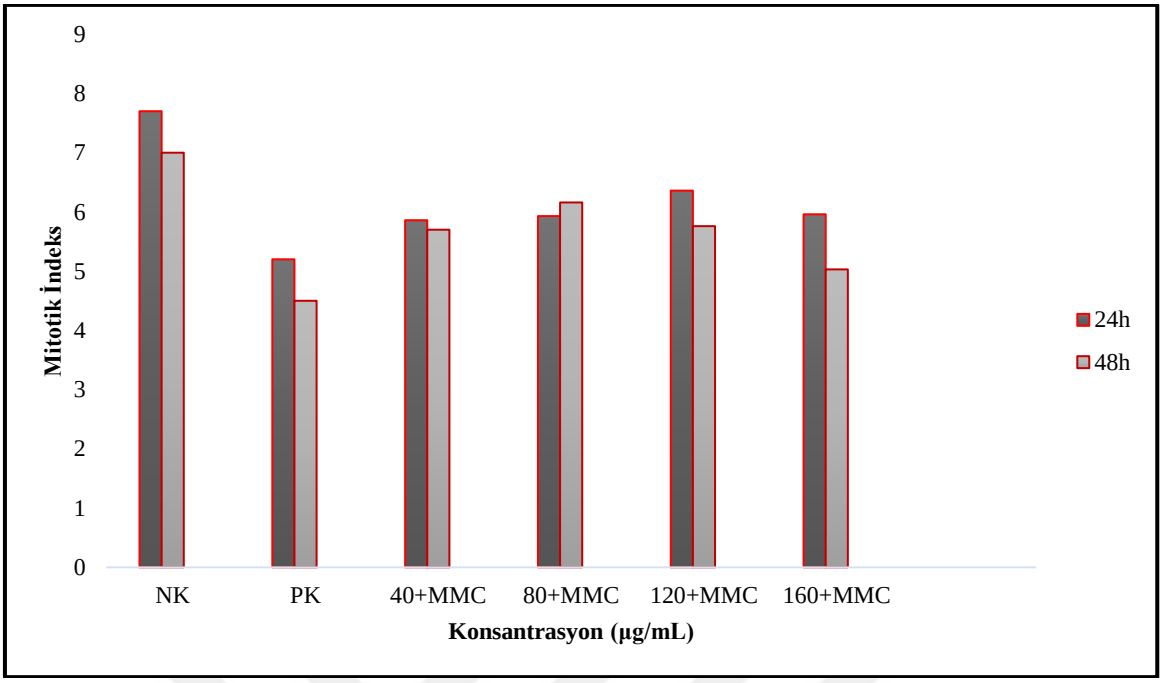
P.K.: Pozitif kontrol N.K.: Negatif Kontrol ktk: kromatid kırığı, kzk: kromozom kırığı, f: fragment, kkb: kardeş kromatid birleşmesi, ds: disentrik kromozom, h: halka kromozom, p: poliploidi, er: endoreduplikasyon +Pozitif Kontrole göre $p<0,05$ düzeyinde anlamlı (One Way ANOVA-Tukey Testi)



Şekil 4.4. EPS_{JD2}+MMC'nin 24 ve 48 saatlik uygulamalarının insan periferal lenfositlerinde oluşturdukları anormal hücre yüzdeleri (P.K.: Pozitif kontrol N.K.: Negatif Kontrol)



Şekil 4.5. EPS_{JD2}+MMC'nin 24 ve 48 saatlik uygulamalarının insan periferal lenfositlerinde oluşturdukları hücre başına anormallik yüzdeleri (P.K.: Pozitif kontrol N.K.: Negatif Kontrol)



Şekil 4.6. EPS_{JD2}+MMC'nin 24 ve 48 saatlik uygulamalarının insan periferal lenfositlerinde oluşturdukları mitotik indeks (Mİ) değerleri (P.K.: Pozitif kontrol N.K.: Negatif Kontrol)

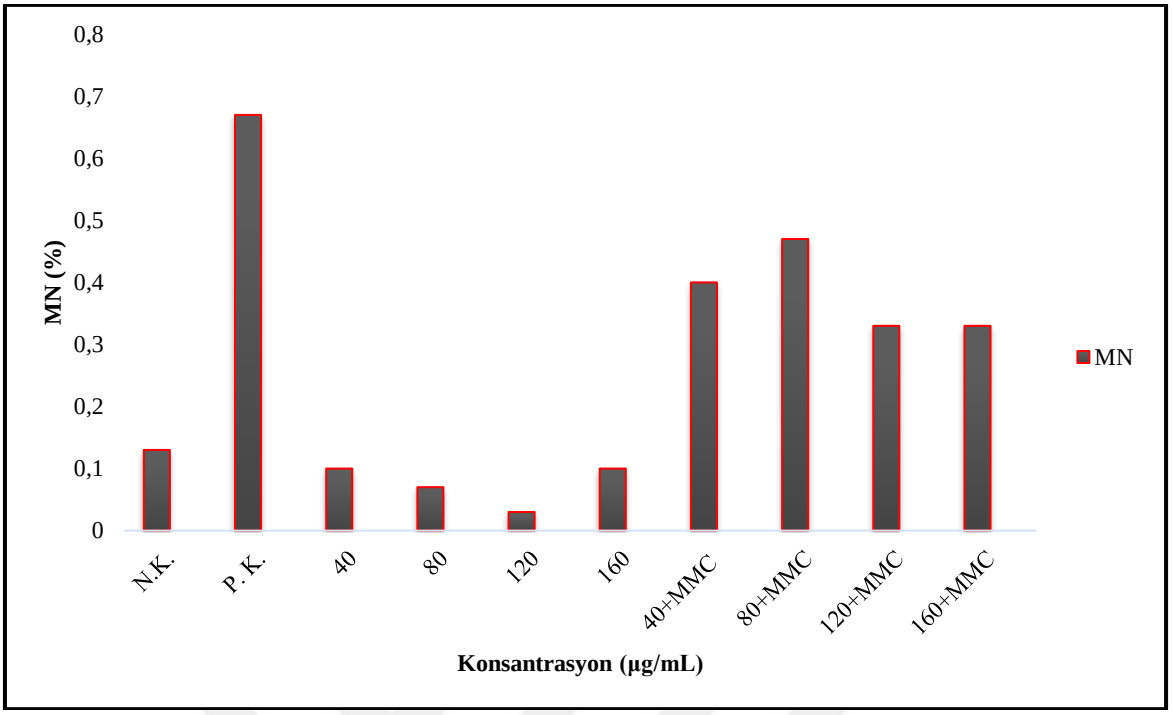
4.2. Sitokinez Blokajı ile Mikronükleus Analizi Sonuçları

Mikronukleus testinde EPS_{JD2}'nin kontrole kıyasla MN frekansında artışa neden olmadığı gözlenmiştir (Çizelge 4.3., Şekil 4.7 ve 4.8; Resim 4.2.). Toplamda sayılan binükleat hücre içerisinde sadece 2 tane iki mikronükleuslu hücreye rastlanmıştır. Nükleer bölünme indeksinin (NBİ) analizi için ise bu preparatlardan 500'er hücre sayılmıştır. Elde edilen tüm bu verilerin analizi sonucunda ise EPS_{JD2}'nin nükleer bölünme indeksinde herhangi bir değişiklik yaratmadığı görülmüştür (Çizelge 4.3). EPS_{JD2} uygulanan konsantrasyonlarda nükleer tomurcuklanma (NT) ve nükleoplazmik köprü (NPK) oluşumuna yol açmamıştır. Bu durum EPS_{JD2}'nin genotoksisiteye sahip olmadığını ve hücre bölünmesi esnasında genom bütünlüğünü bozmadığını göstermektedir. Ayrıca NT ve NPK oluşumunun artmaması, DNA tamir mekanizmalarının bozulmadığını ve anormal çekirdek davranışlarının indüklenmediğini desteklemektedir.

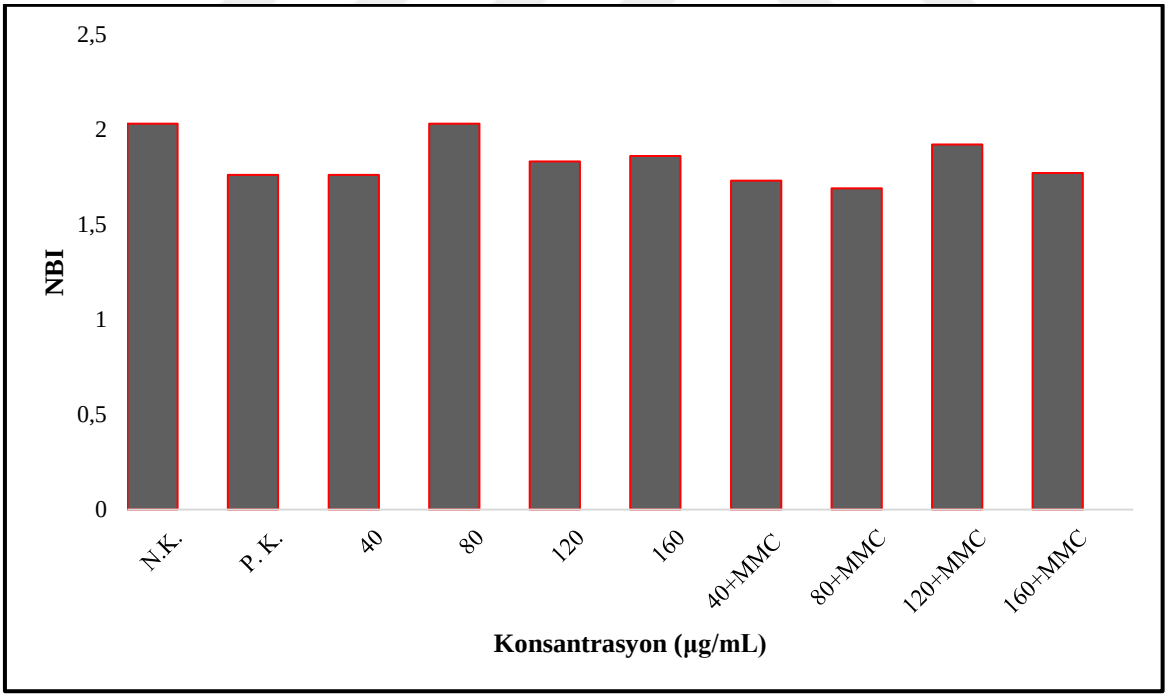
EPS_{JD2}'nin MMC ile birlikte uygulandığı kültürlerde NBI'inde anlamlı bir değişim gözlenmemiştir. Nükleer tomurcuklanma (NT) ve nükleoplazmik köprü (NPK) oluşumunda anlamlı bir artış ya da azalış tespit edilmemiştir. EPS_{JD2}'nin MN testinde antigenotoksik bir etkisi gözlenmemiştir.

Çizelge 4.3. EPS_{JD2}, EPS_{JD2} +MMC'nin insan lenfositlerinde mikronükleus, nükleer tomurcuk, nükleoplazmik köprü frekansları ve nükleer bölünme indeksi üzerine etkisi

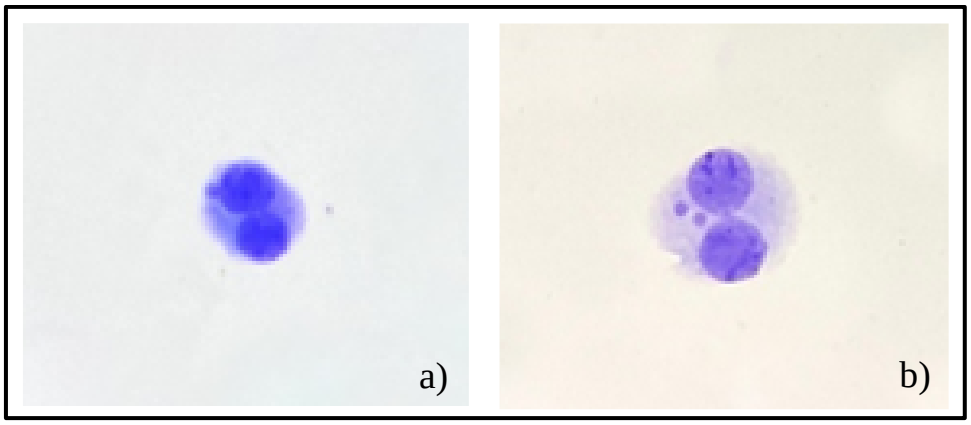
Test Maddesi	Uygulama Süre	Konsantrasyon (µg/mL)	Binükleat hücre sayısı	BN hücreler içinde mikronükleus frekansları (1)	(2)	MN ± SH (%)	Nükleer Bölünme İndeksi (NBI) ± SH	Nükleer Tomurcuk (NBUD)± SH (%)	Nükleoplazmik Köprü ± SH (%)
N.K.	48	0	3000	4	-	0,13±0,03	2,03 ± 0,04	0,00 ± 0,00	0,03±0,05
P.K.	48	0,20	3000	18	1	0,67±0,07	1,76± 0,12	0,03 ± 0,05	0,36±0,35
EPS_{JD2}	48	40	3000	3	-	0,10±0,06	1,76± 0,35	0,00 ± 0,00	0,00±0,00
		80	3000	2	-	0,07±0,03	2,03± 0,01	0,00 ± 0,00	0,00±0,00
		120	3000	1	-	0,03±0,03	1,83± 0,09	0,00 ± 0,00	0,00±0,00
		160	3000	3	-	0,10±0,06	1,86± 0,09	0,00 ± 0,00	0,10±0,17
EPS_{JD2} +MMMC	48	40+MMC	3000	12	-	0,40±0,20	1,73± 0,10	0,03 ± 0,05	0,03±0,05
		80+MMC	3000	17	-	0,47±0,20	1,69±0,07	0,00 ± 0,00	0,10±0,10
		120+MMC	3000	10	-	0,33±0,12	1,92±0,12	0,13 ± 0,23	0,20±0,00
		160+MMC	3000	8	1	0,33±0,24	1,77±0,12	0,06 ± 0,11	0,26±0,05



Şekil 4.7. EPS_{JD2}, EPS_{JD2}+MMC'nin insan lenfositlerinde mikronükleus oluşumu (P.K.: Pozitif kontrol N.K.: Negatif Kontrol)



Şekil 4.8. EPS_{JD2}, EPS_{JD2} +MMC'nin insan lenfositlerinde nükleer bölünme indeksi üzerine etkisi (P.K.: Pozitif kontrol N.K.: Negatif Kontrol)



Resim 4.2. EPS_{JD2}, EPS_{JD2}+ MMC uygulamalarında insan periferal lenfositleri üzerinde tespit edilen mikronükleus içeren binükleat hücre örnekleri: a) bir mikronükleus içeren binükleat hücre, b) çift *mikronükleus* içeren binükleat hücre

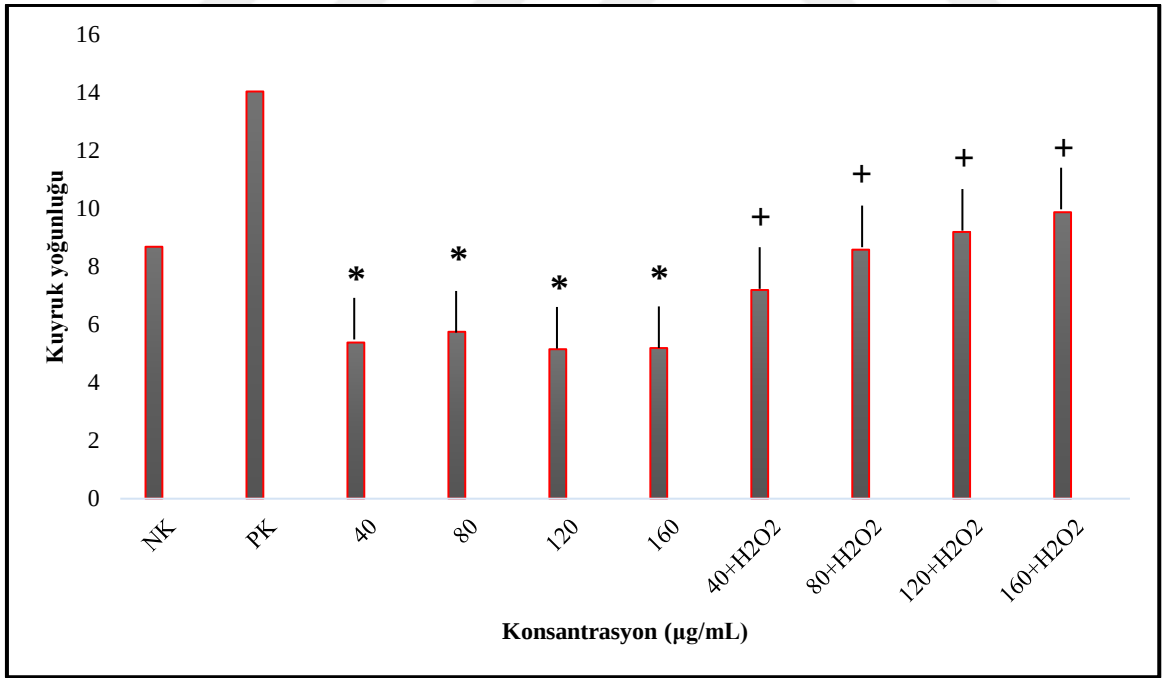
4.3. Komet Sonuçları

EPS_{JD2} ve EPS_{JD2} + H_2O_2'nin izole lenfositler üzerindeki DNA hasarı ve onarımına etkileri Komet testi ile incelenmiştir (Resim 4.3 ve 4.4). Elde edilen veriler doğrultusunda analiz sonuçları Çizelge 4.4'de verilmiştir. EPS_{JD2} 'nin tek başına uygulandığı grupta negatif kontrole göre komet kuyruk yoğunluğunda anlamlı bir azalma görülmüş; konsantrasyon ile kuyruk yoğunluğu arasında zayıf bir korelasyon tespit edilmiştir (r = 0,66). Ancak bu etki kuyruk momentinde istatiksel olarak anlamlı olmadığı gözlenmemiştir. Bu bulgular, EPS_{JD2}'nin DNA hasarını indüklemediğini ve kuyruk yoğunluğunun negatif kontrol ile yakın seviyelerde olduğunu göstermektedir. Diğer yandan H_2O_2'in oluşturduğu DNA hasarını kuyruk yoğunluğu bakımından tüm konsantrasyonlarda anlamlı düzeyde ve konsantrasyona bağlı şekilde azaltmıştır (r =-0,85; Şekil 4.9). Kuyruk momenti incelendiğinde ise EPS_{JD2} DNA hasarını sadece 40+H_2O_2 ve 80+H_2O_2 µg/mL'lik konsantrasyonlarında anlamlı derecede ve konsantrasyona bağlı şekilde (r=-0,91) azalttığı belirlenmiştir (Şekil 4.10).

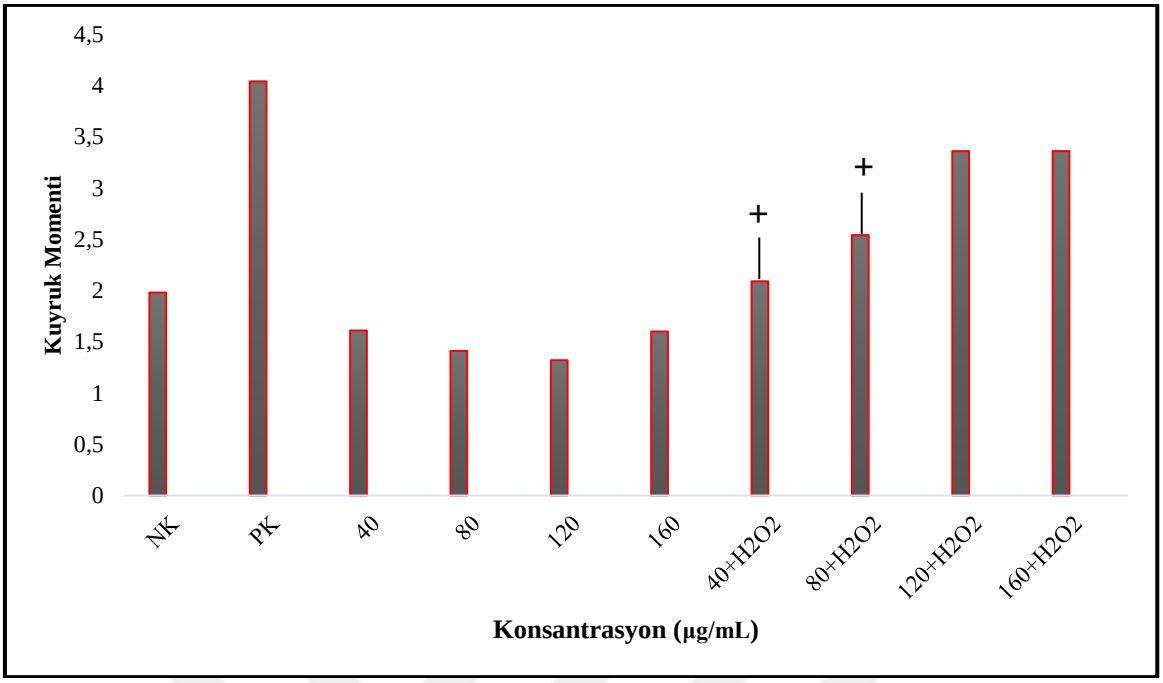
Çizelge 4.4. İnsan izole lenfositleri üzerinde EPS_{JD2} ve EPS_{JD2}'nin H_2O_2 ile eş zamanlı uygulanması sonucu genotoksik ve antigenotoksik etkileri

Test maddesi	Süre(saat)	Uygulama Konsantrasyon(µg/mL)	Kuyruk Yoğunluğu	Kuyruk Momenti
Negatif Kontrol	1s	0	8,68±0,79	1,98±0,16
Pozitif Kontrol (H_2O_2)	1s	100 uM	14,30±1,20	4,04±0051
		40	5,38±0,39*	1,61±0,11
		80	5,75±0,42*	1,41±0,10
EPS_{JD2}	1s	120	5,15±0,39*	1,32±0,09
		160	5,19±0,40*	1,60±0,11
		40+ H_2O_2	7,19±0,51$^+$	2,09±0,15$^+$
EPS_{JD2} + H_2O_2	1s	80+ H_2O_2	8,58±0,55$^+$	2,54±0,16$^+$
		120+ H_2O_2	9,19±0,57$^+$	3,37±0,26
		160+ H_2O_2	9,87±0,58$^+$	3,36±0,21

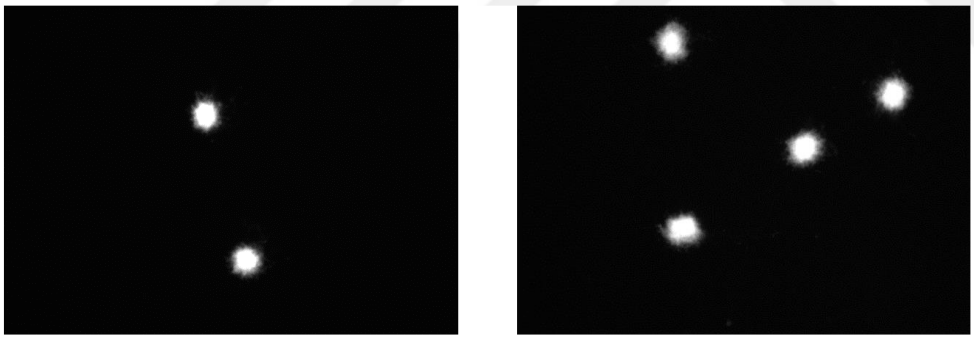
P.K.: Pozitif kontrol N.K.: Negatif Kontrol
*Kontrole göre *p<0,05* düzeyinde anlamlı (One Way ANOVA-Tukey Testi)
+Pozitif Kontrole göre *p<0,05* düzeyinde anlamlı (One Way ANOVA-Tukey Testi)



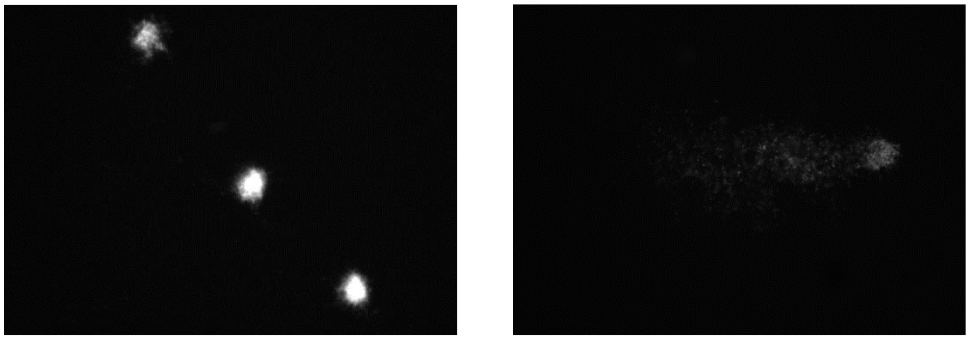
Şekil 4.9. EPS_{JD2} ve EPS_{JD2} + H_2O_2'nin izole lenfositler üzerindeki kuyruk yoğunluğundaki değişimler (P.K.: Pozitif kontrol N.K.: Negatif Kontrol /*Kontrole göre p<0,05 düzeyinde anlamlı (One Way ANOVA-Tukey Testi) /+ Pozitif Kontrole göre p<0,05 düzeyinde anlamlı (One Way ANOVA-Tukey Testi)



Şekil 4.10. EPS_{JD2} ve EPS_{JD2} + H_2O_2'nin izole lenfositler üzerindeki kuyruk momenti üzerindeki değişimler (P.K.: Pozitif kontrol N.K.: Negatif Kontrol /+ Pozitif Kontrole göre $p<0,05$ düzeyinde anlamlı (One Way ANOVA-Tukey Testi)



Resim 4.3. EPS_{JD2}'nin izole lenfositleri üzerindeki komet görüntüleri



Resim 4.4. EPS_{JD2} + H_2O_2'nin izole lenfositleri üzerindeki komet görüntüleri

4.5. RT-PZR Analizi

Bu çalışmada *Pichia kudriavzevii* JD2 maya suşundan elde edilen ekzopolisakkaritin (EPS_{JD2}) epigenetik mekanizmalar üzerindeki etkileri *in vitro* koşullarda değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bu doğrultuda *DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B* ve *HDAC1* genleri üzerindeki mRNA düzeylerinde meydana gelen değişiklikler kantitatif olarak belirlenmiş; gen ifadelerindeki değişikliklerin analizi için referans gen olarak gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz (*GAPDH*) geni kullanılmıştır. RT-PZR analizi için EPS_{JD2}'nin farklı konsantrasyonları (80, 120 ve 160 µg/mL) tek başına uygulanmıştır. Bu konsantrasyonlar diğer testlerde etkili olan konsantrsayonlar olmaları nedeniyle seçilmiş olup ek olarak çalışmaya negatif (distile su) kontrol grubu eklenmiştir. Deney gruplarına ait ΔΔCt ve Rölatif gen ekspresyonu (RQ) değerleri Çizelge 4.5'te sunulmuştur.

EPS_{JD2}'nin *DNMT1* üzerindeki etkisi; 160 µg/mL konsantrasyonda kontrol grubuna göre artış belirlenirken 80 ve 120 µg/mL'lik konsantrasyonlarda kontrole göre azalış gözlenmiştir.

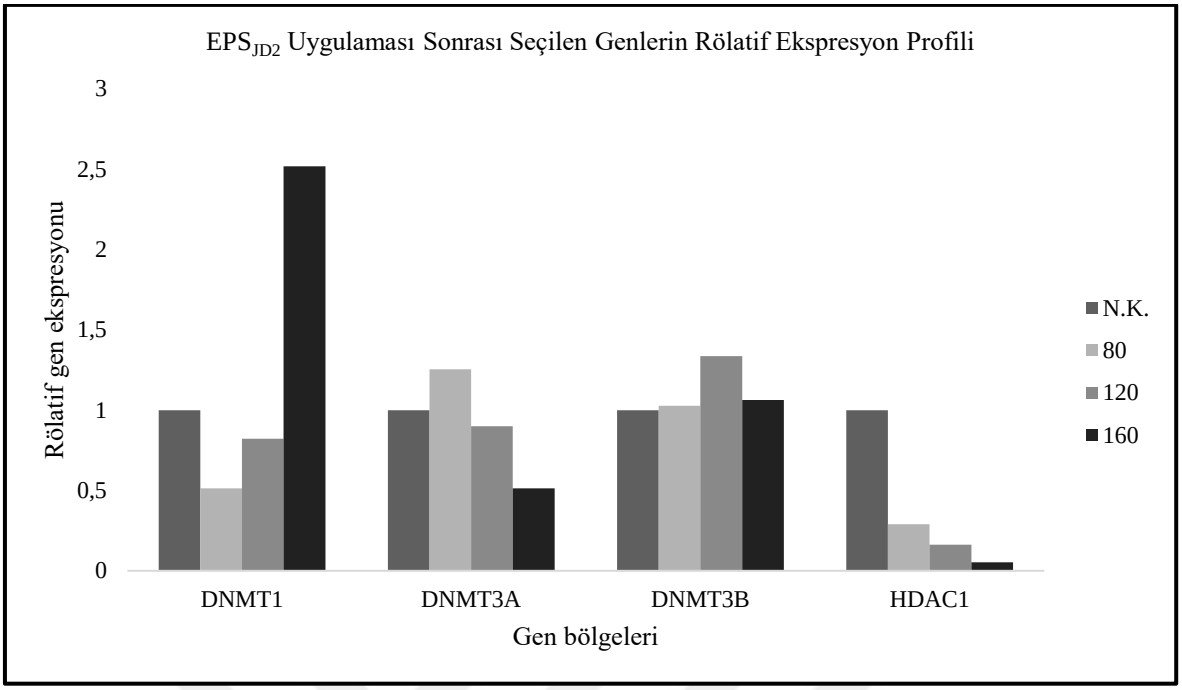
DNMT3A üzerinde ise konsantrasyon arttıkça gen ekspresyonu düşmüş yani baskılanmıştır. *DNMT3B* ifadesine bakıldığında konsantrasyon artmasına rağmen gen ifadesinin daha kontrollü regüle edildiği görülmüştür. Son olarak *HDAC1*'in konsantrasyon artışının gen ifadesini güçlü bir şekilde baskıladığı görülmüştür.

Çizelge 4.5. RT-PZR sonuçlarının ΔΔCt ve RQ değerleri

Dozlar (EPS_{JD2})	Genler	*DNMT1*	*DNMT3A*	*DNMT3B*	*HDAC1*
80ug/ml	ΔΔCt	-0,957	-0,327	-0,04	1,785
120 ug/ml		-0,282	0,152	-0,42	2,615
160 ug/ml		1,332	0,962	-0,09	4,22
80 ug/ml	RQ	0,514	1,254	1,028	0,290
120 ug/ml		0,822	0,899	1,337	0,163
160 ug/ml		2,518	0,513	1,064	0,053

Şekil 4.11'de sunulan RT-PZR analiz sonuçlarının RQ değerleri, EPS_{JD2}'nin farklı konsantrasyonlarının (80, 120 ve 160 µg/mL) *DNMT1, DNMT3A, DNMT3B* ve *HDAC1* gen bölgelerindeki ekspresyon düzeylerine olan etkisini göstermektedir. Elde edilen veriler, EPS_{JD2} uygulamasının bu genler üzerinde konsantrasyon ile ilişkili ve gen spesifik düzenleyici etkilere sahip olduğunu ortaya koymuştur. Özellikle düşük (80 µg/mL) ve orta (120 µg/mL) konsantrasyonlarda, *DNMT1* ve *HDAC1* genlerinin ekspresyon düzeylerinde gözlemlenen azalma, DNA metilasyonunun ve kromatin sıkılığının azalmasına işaret etmektedir. Bu durum, hücresel DNA'nın daha açık bir transkripsiyonel ortama kavuşmasını ve genom stabilitesinin korunmasını destekleyen bir epigenetik mikroçevrenin oluşmasını sağlayabilir. Aynı konsantrasyonlarda *DNMT3A* ve *DNMT3B* gen ekspresyonlarındaki artış, özellikle de *de novo* metilasyon mekanizmalarının aktif hale geldiğini düşündürmektedir. Bu etkiler, EPS_{JD2}'nin DNA hasarını azaltıcı (antigenotoksik) etkileriyle paralellik göstermektedir. Buna karşın, yüksek konsantrasyon (160 µg/mL) uygulamasında *DNMT1* ekspresyonunda bir artış (2,5 kat) dikkat çekmektedir. Bu durum, DNA metilasyonunun artabileceği ve dolayısıyla bazı gen bölgelerinde baskılayıcı etkilerin ortaya çıkabileceği anlamına gelebilir. Ancak bu konsantrasyonda dahi *HDAC1*'in ekspresyonunun neredeyse sıfıra yakın düzeye inmesi, transkripsiyonel baskının sınırlı kalabileceğini düşündürmektedir. Diğer bir deyişle, EPS_{JD2} yüksek konsantrasyonlarda karmaşık ve potansiyel olarak dengeleyici epigenetik etkiler gösterebilir. Özellikle *DNMT1* ve *HDAC1* genlerinin baskılanması, DNA hasarının önlenmesinde ve onarımında önemli rol oynayabilecek epigenetik yeniden programlama mekanizmalarının aktif olabileceğini göstermektedir. Bu bulgular, EPS_{JD2}'nin sadece biyolojik bir koruyucu ajan olarak değil, aynı zamanda epigenetik düzeyde regülatör bir biyomolekül olabileceğine işaret etmektedir.

Genel anlamda EPS_{JD2}, konsantrasyona bağlı olarak DNA metiltransferazlar ve *HDAC1*üzerinde farklı sonuçlar göstermiştir. *DNMT1* ve *DNMT3B* ekspresyonunun artış göstermesi, uyarıcı etki oluşturduğunu ifade etmektedir. *HDAC1* ekspresyonunun tüm dozlarda baskılanması, histon asetilasyonunun artabileceğini dolayısıyla gen ekspresyonunun aktive olabileceğine işaret etmektedir.



Şekil 4.11. EPS_{JD2} uygulamasının gen ekspresyonu üzerine etkisi (RT-PZR Analizi) (N.K.: Negatif Kontrol)

5. TARTIŞMA

Günümüzde sağlık bilincinin artmasıyla birlikte, insan sağlığı üzerindeki olumlu etkilerinden dolayı fonksiyonel gıdalara olan talep artışı görülmektedir. Bir gıda, temel besinsel etkisiyle birlikte genel sağlığı iyileştirmek ve/veya hastalık geliştirme riskini azaltmak gibi bir veya daha fazla fizyolojik işlev üzerinde yararlı bir etkiye sahipse fonksiyonel olarak tanımlanabilir (Ballini ve diğerleri, 2023). Fonksiyonel gıdalar, temel besin öğelerinden ziyade sağlığa fayda sağlayan bileşenler içeren ürünlerdir. İnsan mikrobiyotasının disbiyozunun ve dolayısıyla buna bağlı hastalıkların başlangıcını önleyebilecek fonksiyonel gıdalar tercih edilmektedir (Ballini ve diğerleri, 2023). Fonksiyonel gıda bileşenleri bağırsak florasında büyümeyi ve metabolik aktiviteyi, ayrıca bileşim türlerini ve potansiyel işlevleri etkileyebilir. Belirli metabolik yolların indüklenmesi veya inhibisyonu yoluyla bağırsak metabolizmasını değiştirebilir (Vernocchi, Del Chierico ve Putignani, 2020; Farag ve diğerleri, 2020). Fonksiyonel gıdaların bağırsak mikrobiyotası ile etkileşiminin anahtarı, fonksiyonel gıdaların bileşenlerinin (polifenoller, organik asitler, vb.) mikrobiyal metabolizmada substrat olarak hareket edebilmesidir. Özellikle de prebiyotiklerin ve probiyotiklerin insan sağlığındaki rolüne ilişkin araştırmaların da artışını beraberinde getirmiştir (Hill ve diğerleri, 2014; Sanders, Merenstein, Reid, Gibson ve Rastall, 2019).

Fonksiyonel gıdalar bileşenlerinden probiyotikler, özellikle sindirim sistemi sağlığına katkıda bulunan yararlı mikroorganizmalar olarak bilinirken bu mikroorganizmaların salgıladığı metabolitler de giderek artan bir şekilde dikkat çekmektedir. Probiyotikler diğer mutajenik ve kanserojen faktörler üzerinde etki gösterebilir böylece kanseri engelleyebilir. Hücresel detoksifikasyon sürecinde yer alan bazı enzimlerin aktivitesini değiştirebilir, serbest radikallerin ve kanserojen maddelerin aktivitesini önleyebilirler. Bilimsel literatürde probiyotiklerin antikarsinojenik aktivitesinden esas olarak sorumlu olan mekanizmalar şu şekilde tanımlanmıştır: bağırsak mikrobiyotası kompozisyonunun değiştirilmesi; bağırsak mikrobiyotasının metabolik aktivitesindeki değişiklikler; bağırsak lümeninde bulunan kanserojen bileşiklerin bağlanması ve parçalanması; kısa zincirli yağ asitleri ve konjuge linoleik asit gibi antikarsinojenik aktiviteye sahip bileşiklerin üretimi; immünomodülasyon; bağırsak bariyerinin iyileştirilmesi; konak fizyolojisinde değişiklikler ve kanser hücrelerinde hücre çoğalmasının inhibisyonu ve apoptozisin indüklenmesi (Serban, 2014; Hatakka ve diğerleri, 2008; Nowak, Śliżewska,Błasiak ve

Libudzisz, 2014; Bolognani, Rumney ve Rowland, 1997; Burns ve Rowland, 2004; Chen ve diğerleri, 2013; Irrazábal, Belcheva, Girardin, Martin ve Philpott, 2014; Worthley ve diğerleri, 2009).

Prebiyotikler, konakçının sağlığı üzerinde olumlu bir etkiye sahip olan gıda sindirimi ürünleridir. Bu nedenle amaçları, probiyotik bakterilerin büyümesini desteklemek ve dost olmayan veya istenmeyen mikroorganizmaların büyümesini engellemek için bağırsak mikrobiyotasının bileşimini değiştirmektir (Isacco ve diğerleri, 2021). 2008'de FAO (Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü), prebiyotikleri "mikrobiyolojik modülasyonla ilişkili konakçının sağlığına fayda sağlayan hayati olmayan bir gıda bileşeni" olarak tanımlamıştır (Pineiro ve diğerleri, 2008).

Maya ve bakteriler tarafından üretilen ekzopolisakkaritler (EPS), fonksiyonel özellikleri ve biyolojik aktiviteleri nedeniyle önemli bir yere sahiptir. Maya kaynaklı EPS'ler, antimikrobiyal, antioksidan ve bağışıklık düzenleyici etkileri ile öne çıkmakta, aynı zamanda genotoksik ve antigenotoksik potansiyelleri ile araştırmaların odağı haline gelmektedir.

Pichia kudriavzevii mayası, doğada oldukça yaygın olarak bulunan bir mayadır. Ayrıca fermente içeceklerde bulunmaktadırlar. Bu maya yüksek sıcaklık ve düşük pH'ya dayanıklı olduğundan endüstride kullanıma uygundur. Çoğunlukla patojenik değildir (Oberoi ve diğerleri, 2012). Bu mayanın immünomodülatör ve antiinflamatuar etki sergilediği bilinmektedir (Cerdán-Alduán ve diğerleri, 2025). Potansiyel probiyotik mayaların *in vitro* karakterizasyonu, klinik çalışmalardan önce önemli bir ön adımdır. Mayaların probiyotik kriterlerinin karşılanması, hayvan modelleri ve insan denemeleri için araştırma ve doğrulama yapılmasının ve maya probiyotiklerinin fonksiyonel gıdalarda ve terapötik amaçlarla kullanılmasının önünü açmaktadır (Gut, Vasiljevic, Yeager ve Donkor, 2019).

Genetik stabilitenin korunması, hücre homeostazının sürdürülebilirliği için kritik bir öneme sahiptir. Çevresel toksinler, radyasyon ve kimyasal ajanlar gibi genotoksik faktörler, DNA hasarı oluşturarak mutasyonlar yaratabilir (Li, Guan, Chen, Yang ve Cheng, 2021). MMC gibi güçlü alkilleyici ajanlar, DNA zincir kırıkları oluşturarak genetik bütünlüğü tehdit etmektedir (Palom ve diğerleri, 2002). Ancak bazı doğal bileşiklerin DNA hasarını onarma, oksidatif stresi azaltma ve genetik stabiliteyi sağlama yönünde etkili olduğu bilinmektedir

(Goulas ve Georgiou, 2019; Liu ve diğerleri, 2022). Ekzopolisakkaritlerin, bu anlamda etkili olabileceği düşünülmektedir.

Genetik toksikoloji, DNA ve kromozomlarda kimyasal veya fiziksel olarak indüklenen değişikliklerin incelenmesini ifade eder ve genotoksisitenin değerlendirilmesi, potansiyel kanserojen riski değerlendirmek için gereklidir. Genotoksisite, mutasyonlar, kromozomal sapmalar ve kromozom sayısındaki değişiklikler dahil olmak üzere çeşitli şekillerde ortaya çıkabilir ve bunların hepsi genomik instabiliteyi artırarak kanserojenezi indükleyebilir (Sieber, Heinimann ve Tomlinson, 2003). DNA hasarının ortaya çıkabileceği karmaşık yapı ve çoklu mekanizmalar, karsinojenik potansiyelin değerlendirilmesi için önerilen bir dizi testin geliştirilmesine yol açmıştır (Wilson ve diğerleri, 2021).

Bu çalışma, *Pichia kudriavzevii* JD2 kaynaklı ekzopolisakkaritin (EPS_{JD2}) insan periferik lenfositlerinde genotoksik, antigenotoksik ve epigenetik etkilerini çok yönlü olarak değerlendiren literatürdeki ilk araştırmadır. EPS_{JD2}'nin genotoksik etki gösterme potansiyelinin düşük olduğunu; MMC ve H_2O_2 kaynaklı genotoksik stres karşısında DNA üzerinde iyileştirici/koruyucu etkiler gösterdiğini ortaya koymuştur. RT-PZR analizi gen ifadelerine olan etkisi değerlendirilmiş ve epigenetik regülasyon mekanizmalarıyla ilişkisi araştırılmıştır. Elde edilen veriler, EPS_{JD2}'nin genetik stabiliteyi koruyucu etkilerinin yanı sıra gen ekspresyon düzeyinde epigenetik düzenlemelere aracılık edebileceğini göstermektedir. Bu yönüyle çalışma, EPS_{JD2}'nin postbiyotik özellik taşıyan potansiyel bir biyoaktif bileşen olarak değerlendirilmesine bilimsel zemin oluşturarak literatüre özgün ve kapsamlı bir katkı sunmaktadır.

EPS_{JD2}'nin genotoksik ve antigenotoksik etkilerini tespit etmek için mitotik indeks, hücre başına düşen anormallik oranı, anormal hücre oranları kromozomal anormallik testi ile belirlenmiştir. EPS_{JD2}'nin tek başına 24 ve 48 saatlik uygulamalarının insan periferal lenfositlerinde KA oranında artışa neden olmadığı belirlenmiştir. EPS_{JD2} uygulamaları sonucunda düşük KA/hücre değerleri elde edilmiş olup konsantrasyon artışı ile anlamlı bir artma veya azalma gözlemlenmemiştir.

EPS_{JD2} uygulamalarında negatif kontrole kıyaslandığında mitotik indeks genellikle kontrol grubuna yakın seyretmiştir. Ancak konsantrasyon artışıyla bir miktar azalma görülse de anlamlılık bulunmamıştır. En sık rastlanan yapısal anormallikler arasında kromatid kırığı

(ktk) ve fragment (f) görülmüştür. EPS_{JD2} uygulamaları sonucunda yapısal ve sayısal anormalliklerde anlamlı bir artış gözlenmemiştir. Genel olarak bakıldığında ise EPS_{JD2} uygulamalarında belirgin bir genotoksik etki gözlenmemiş olup, mitotik indeks ve kromozomal anormallikler bakımından negatif kontrole yakın değerler elde edilmiştir.

EPS_{JD2} +MMC'nin eş zamanlı uygulamasında Anormal Hücre Yüzdesine bakıldığında, 24 saatlik uygulamalarda istatiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamaktadır. 48 saatlik uygulamalarda 40+MMC, 80+MMC ve 120 + MMC konsantrasyonlarında MMC'nin toksik etkisini anlamlı bir şekilde azaltmış ve en düşük oran (%4,67) 120 + MMC uygulamasında görülmüştür. Bu durum, çalışmada kullanılan EPS_{JD2}'nin DNA hasarını baskılayıcı ve hücresel genetik bütünlüğü koruyucu bir etki göstermiş olabileceğini ortaya koymaktadır. Bu bulgu, EPS_{JD2}'nin MMC kaynaklı kromozomal hasarı baskılayarak antigenotoksik bir etki gösterebildiğini desteklemektedir. EPS'nin genetik hasarlara karşı koruyucu bir ajan olarak değerlendirilebileceğini ve özellikle fonksiyonel gıda bileşeni veya postbiyotik olarak kullanım potansiyelini güçlendirmektedir.

Mitotik indeks (Mİ), hücrelerin proliferasyon kapasitesini değerlendirmek için kullanılan önemli bir biyomarker olup MMC gibi genotoksik ajanlar tarafından baskılanabilmektedir (Ha, Choi, Lee ve Park, 2016). EPS_{JD2} + MMC uygulamalarında: 24 saatlik muamelede mitotik indeks değerleri kontrol grubuna göre düşük kalmış, ancak 120 + MMC uygulaması en yüksek değeri göstermiştir. 48 saatlik uygulamada ise mitotik indeksin özellikle 160 + MMC grubunda en düşük seviyeye indiği görülmektedir.

Kromozomal anormallikler, hücresel genetik bütünlük açısından kritik bir gösterge olup, genotoksik ajanlara maruziyetin bir sonucu olarak ortaya çıkmaktadır. Çalışmada, EPS_{JD2}'nin belirli konsantrasyonlarda MMC kaynaklı anormallikleri azaltabildiği görülmüştür. Bu durum, ekzopolisakkaritin olası bir antigenotoksik etkiye sahip olabileceğini göstermektedir. Benzer şekilde, bakteriyel kökenli EPS'lerle yapılan çalışmalar da bu bileşiklerin genotoksik ajanlara karşı koruyucu etkiler gösterebildiğini ortaya koymaktadır. Örneğin *Ligilactobacillus salivarius* KC27L suşundan izole edilen bir ekzopolisakkarit (EPS_{KC27L}) ile yürütülen bir çalışmada, bu bileşiğin antioksidan özelliklerinin yanı sıra genotoksisiteye karşı koruyucu etkileri araştırılmıştır. Söz konusu çalışmada, EPS_{KC27L}'nin insan periferik lenfositlerinde kromozom anormalliği (KA), kardeş kromatid değişimi (KKD), mikronükleus (MN) ve komet analizleriyle genotoksik etkileri

incelenmiştir. Ayrıca MMC, MMS ve H_2O_2 gibi DNA hasarı indükleyen ajanlara karşı antigenotoksik potansiyeli değerlendirilmiştir. EPS_{KC27L}, uygulanan konsantrasyonlarda tek başına anlamlı bir genotoksik etki oluşturmazken genotoksik ajanlarla birlikte uygulandığında, KA, KKD, MN ve DNA hasarı düzeylerinde anlamlı azalmalar sağlamıştır. Bu bulgular, çalışmamızda EPS_{KC27L}'nin MMC kaynaklı DNA hasarını bazı konsantrasyonlarda azaltarak antigenotoksik etki göstermesiyle uyumlu olup EPS bileşiklerinin genetik materyali koruma potansiyelini destekler niteliktedir. Özellikle antioksidan kapasitenin, bu koruyucu etkilerin altında yatan olası mekanizmalardan biri olabileceği düşünülmektedir (Yıldız ve diğerleri, 2023).

Benzer şekilde *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* BLI-02, *Lactobacillus paracasei* ET-66, *Lactobacillus plantarum* LPL28 ve *L. acidophilus* TYCA06 gibi farklı kaynaklardan (anne sütü, miso ve sağlıklı insan bağırsak mikrobiyotası) izole edilen probiyotik suşlarla yapılan çalışmalarda da genotoksik etki gözlenmemiştir. Söz konusu çalışmada, bu suşlara ait liyofilize toz formülasyonların en yüksek konsantrasyonda (10 g/kg BW) rodent spermatogonia hücrelerinde mikronükleus ve kromozomal anormallik testlerinde genotoksik aktivite göstermediği bildirilmiştir. Aynı zamanda Ames testinde de mutajenik potansiyele rastlanmamıştır. Probiyotik grubunda negatif kontrol ile karşılaştırıldığında anlamlı fark olmaması (p>0,05), bu suşların genetik stabilite açısından güvenli olduğunu desteklemektedir (Chen ve diğerleri, 2023). Bu bulgular, çalışmamızda *P. kudriavzevii*'den elde edilen ekzopolisakkaritlerin insan lenfositlerinde genotoksik bir etki göstermemesi ile paralellik göstermektedir. Her iki çalışmada da hücresel düzeyde DNA'ya zarar vermediği gösterilen bu mikrobiyal kaynaklı bileşikler, genotoksik güvenlik profili açısından umut vericidir. Ayrıca bu sonuçlar, ekzopolisakkaritlerin ve probiyotiklerin antigenotoksik potansiyel taşıyabileceğini ve bu bağlamda fonksiyonel gıda bileşeni olarak değerlendirilmesinin bilimsel temelini güçlendirmektedir.

Mikronükleus testi, kromozomal hasarın değerlendirilmesi için önerilen sitogenetik testlerden biridir. Mikronükleus testi (MN), kromozomal hasarın kantitatif olarak belirlenmesi açısından oldukça önemli bir biyobelirteçtir. Mikronükleuslar, mitoz sırasında ana çekirdekten ayrılan ve bu nedenle standart mikroskopi teknikleri ve görüntü analiz yazılımı kullanılarak kolayca test edilebilen, DNA içeren küçük, zarla çevrili nükleer yapılardır (Diaz ve diğerleri, 2007; Mondal ve diğerleri, 2010; Sun ve diğerleri, 2013). Mikronükleuslar hem kromozom parçalarının hücre bölünmesi esnasında ana çekirdekten

kopması (klastojenik mekanizmalar) hem de tüm kromozomların iğ ipliklerine düzgün bağlanamaması sonucu (anöjenik mekanizmalar) sitoplazmada serbest kalmasıyla oluşabilir. Bu durum genellikle DNA hasarının onarılamaması, mitotik sistemdeki bozukluklar veya hücre döngüsü kontrol noktalarındaki aksaklıklardan kaynaklanmaktadır (Fenech, 2000; Fenech ve diğerleri, 2020).

Bu çalışmada proliferasyon indeksi, mikronükleus oluşumu, nükleer tomurcuk ve nükleoplazmik köprü oluşumları mikronükleus testi ile incelenmiştir. EPS_{JD2} uygulamasında MN oranı kontrol grubuna yakın seviyede kalmıştır. Bu durum, EPS_{JD2}'nin tek başına uygulanmasında genotoksik olmadığını düşündürmektedir. EPS_{JD2}+MMC grubunda da anlamlı bir değişik oluşmadığından antigenotoksisite yönünde bir bulguya ulaşılamamıştır.

Tez çalışmasında hem genotoksisite hem de antigenotoksisite değerlendirmesinde Nükleer Bölünme İndeksi (NBI)'inde anlamlı bir değişiklik belirlenmemiştir. Genel olarak değerlendirildiğinde ise EPS_{JD2} tek başına uygulandığında genotoksik olmadığı ve hücresel proliferasyonu anlamlı bir şekilde etkilemediği görülmüştür. EPS_{JD2} + MMC kombinasyonunda bazı konsantrasyonlarda MMC'nin genotoksik etkisini azalttığı görülse de konsantrasyona bağlı bir etki mekanizmasının olabileceği düşünülmektedir.

Literatürde yapılan bazı çalışmalar, elde edilen sonuçlara paralel olarak EPS'lerin antigenotoksik özellikler gösterebildiğini ortaya koymuştur. Yüzbaşıoğlu ve arkadaşları (2021) tarafından yapılan bir çalışmada *Aureobasidium pullulans* mantarının birincil suşları tarafından üretilen bir ekzopolisakkarit olan Pullulan'ın etkileri araştırılmıştır. Mikronükleus (MN), mikronükleus-FISH (MN-FISH), rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA (RAPD-PZR) ve komet testleri ile genotoksik ve antigenotoksik etkileri araştırılmıştır. Pullulan'ın farklı konsantrasyonlarıyla muamele edilen insan lenfositlerinde kontrole kıyasla MN oranlarında önemli bir değişiklik bulunmamış olup; pullulan ve MMC'nin birlikte muamelesi, MMC'ye kıyasla hemen hemen tüm konsantrasyonlarda ve sürelerinde MN sıklığını azaltmıştır (Yüzbaşıoğlu ve diğerleri, 2021).

Oliveira ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, Çin hamsteri overinden türetilmiş bir epitelyal hücre hattı olan CHO-k1 ve DNA onarımı kusurlu CHO-xrs5 hücre hatları üzerinde *Saccharomyces cerevisiae*'den elde edilen β-glukanın etkileri araştırılmıştır. Mikronükleus testi kapsamında, hücreler iki hücre döngüsü boyunca kültüre edilmiş; ardından β-glukan

(β_1–β_4) ve genotoksik ajan olan MMS, farklı zamanlarda muamele protokolleri uygulanmıştır (ön işlem, eş zamanlı işlem, ön inkübasyon sonrası eş zamanlı ve işlem sonrası). En etkili uygulama ön inkübasyonla eş zamanlı muamele olarak belirlenmiştir. Geç zamanlı protokolde yalnızca en düşük doz etkisiz bulunmuş, diğer dozlar ise mikronükleus sıklığında %31,6–%37,6 arasında değişen azalma sağlamıştır. Bununla birlikte bu protokol genel olarak en düşük kemopreventif etkiyi gösteren yaklaşım olmuştur. İstatistiksel analizler, β-glukanın test edilen dört dozunun da kendi başına klastojenik bir etki oluşturmadığını ve mikronükleus sıklığının kontrol grubuna benzer seviyede kaldığını ortaya koymuştur. Tüm bu bulgular, uygulanan protokollerin hiçbirinde net bir doz-cevap ilişkisi olmadığını; ancak β-glukanın kemopreventif etkinliğinin muamele şekline göre anlamlı düzeyde farklılık gösterdiğini ortaya koymuştur. Bu veriler, β-glukanın hücrelere verilme zamanlaması ve uygulama şeklinin, antiklastojenik etkinliği üzerinde belirleyici bir rol oynadığını göstermektedir. Ayrıca β-glukanın DNA koruyucu etkisinin desmutajenik (zararlı ajanları bağlayarak etkisizleştiren) bir mekanizma ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Bu çıkarım, DNA onarım yeteneği olmayan CHO-xrs5 hücre hattında uygulanan protokollerde β-glukanın anlamlı koruyuculuk göstermemesiyle desteklenmiştir. Bu durum, β-glukanın etkisinin büyük oranda hücre dışı düzeyde MMS'yi etkisiz hale getirmesine dayandığını ve biyoantimutajenik mekanizmanın sınırlı katkı sağladığını düşündürmektedir. Sonuçlar, β-glukanın antimutajenik potansiyelinin altını çizerken aynı zamanda bu bileşiğin gelecekte antikarsinojenik ajan olarak değerlendirilmesinde önemli bir biyolojik temel sunduğunu göstermektedir (Oliveira ve diğerleri, 2007).

Farklı bir çalışmada, Wistar sıçanlarına *S. cerevisiae*'den elde edilen β-glukan, tek başına ve siklofosfamid ile birlikte uygulanmış ve MN testi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar, β-glukanın mutajenik aktivite göstermediğini ve deney gruplarında mikronükleusların bazal frekansını azaltabildiğini göstermektedir. Siklofosfamid ile eş zamanlı muamelesinde, oluşan hasara karşı yüksek bir kemopreventif etkinlik göstermiştir. Ancak doz artışı ile kemopreventif etki arasında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır (Oliveira ve diğerleri, 2013).

Genotoksisite değerlendirmesinde yaygın olarak kullanılan komet testi, DNA hasarını tespit etmek ve potansiyel antigenotoksik ajanları belirlemek açısından önemli bir yöntemdir. Bu çalışmada EPS_{JD2}'nin tek başına ve hidrojen peroksit (H_2O_2) ile birlikte uygulanmasının izole lenfositler ile muamele edilerek komet test prosedürü uygulanmıştır. Bu test kapsamında kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momenti araştırılmıştır. Bu parametreler genel

olarak değerlendirildiğinde, EPS_{JD2}'nin tek başına uygulandığı belirli dozlarda (80, 120 ve 160 μg/ml) kontrole kıyasla anlamlı düzeyde düşük olduğu görülmüştür. H_2O_2 ile birlikte uygulamasında, genel olarak DNA hasarına karşı yeterli antigenotoksik koruma sağladığı görülmektedir. Özellikle komet kuyruk yoğunluğunda tüm konsantrasyonlarda hidrojen peroksite karşı iyileştirici etkiler belirlenmiştir. Bu bulgular, genetik materyali oksidatif strese karşı koruyabildiğini ve potansiyel antigenotoksik etkilere sahip olduğunu ortaya koymaktadır. Ayrıca ekzopolisakkaritlerin fonksiyonel gıda bileşeni olarak kullanım potansiyelini desteklemekte ancak optimal dozajın belirlenmesi gerektiğini ortaya koymaktadır. Literatürde, polimer yapılı ekzopolisakkaritlerin antioksidan özellikler taşıdığı ve serbest radikalleri temizleme kapasitesine sahip olduğu bildirilmiştir. Ancak *P. kudriavzevii*'den elde edilen EPS_{JD2} ile farklı genotoksisite testleri kullanılarak ve epigenetik değişiklikler üzerindeki etkisinin değerlendirildiği bir araştırmaya ulaşılamamıştır.

Botryosphaeria rhodina MAMB-05'ten elde edilen bir (1 → 3) (1 → 6)-β-D-glukan olan mantar ekzopolisakkariti normal ve tümör (Jurkat hücreleri) insan T lenfositi üzerindeki etkilerinin incelendiği bir çalışmada, EPS tek başına ve metil metansülfonat (MMS) ile birlikte uygulanmış ve komet testi gerçekleştirilmiştir. Genotoksik etkisinin olmamasının yanı sıra EPS, MMS'nin neden olduğu genotoksik hasara karşı koruyucu bir etki gösterdiği sonucuna varılmıştır (Kerche-Silva ve diğerleri, 2017).

Oliveira ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, Çin hamsteri overinden türetilmiş bir epitelyal hücre hattı olan CHO-k1 ve DNA onarımı kusurlu CHO-xrs5 hücre hatları üzerinde *Saccharomyces cerevisiae*'den elde edilen β-glukanın etkileri araştırılmıştır. Hücreler 24 saatlik kültür sürecinin ardından, MMS ve β-glukanın farklı konsantrasyonlarıyla iki farklı protokolde (basit eş zamanlı ve ön inkübasyon sonrası eş zamanlı) muamele edilmiştir. Komet testi sonuçlarına göre, incelenen dört farklı β-glukan konsantrasyonu herhangi bir genotoksik aktivite göstermemiştir. Ancak aynı β-glukan dozları DNA hasarına neden olan MMS maddesiyle birleştirildiğinde, antigenotoksik etkiye neden olmamışlardır (Oliveira ve diğerleri, 2007).

Farklı bir çalışmada, *S. cerevisiae*'den elde edilen β-glukan, Wistar sıçanlarına tek başına ve siklofosfamid ile birlikte verilmiş ve komet testi gerçekleştirilmiştir. Mikronükleus ve komet analizleri, β-glukan kısa süreli muamelelerde belirgin düzeyde antimutajenik ve antigenotoksik etki göstermiştir. Ancak bu etkinin muamele süresinin uzamasıyla birlikte

azaldığı gözlemlenmiş; özellikle uzun süreli uygulamalarda antigenotoksik etkinin kaybolduğu belirlenmiştir. Bu durum, β-glukanın DNA hasarına karşı koruyucu etkisinin zamanla zayıfladığını ve kemoterapötik ajanlarla birlikte kullanımının dikkatle ele alınması gerektiğini göstermektedir (Madrigal-Santillán ve diğerleri, 2019).

Çalışmaların bir diğerinde *B. rhodina* MAMB-05'ten elde edilen Botryosphaeran'ın genotoksisite ve antigenotoksisitesi insan lenfositleri üzerinde değerlendirilmiştir. Komet analizi sonuçlarında, Botryosphaeran'ın 7.5, 30 ve 100 µg/mL konsantrasyonlarında tek başına uygulandığında, kontrole kıyasla genotoksik bir etki göstermediği belirlenmiştir. Botryosphaeran'ın MMS ile eş zamanlı (SIM) uygulanması sonucunda ise DNA hasar düzeylerinde doza bağımlı bir azalma gözlemlenmiştir. Özellikle 100 µg/mL dozunda Botryosphaeran ile yapılan eş zamanlı muamele, DNA hasarını belirgin biçimde azaltmış ve antimutajenik etkinin anlamlı olduğunu göstermiştir. Muamele sonrası (POST) protokolde ise MMS uygulamasını takiben Botryosphaeran verilmesiyle genotoksisite üzerinde daha güçlü bir koruyucu etki elde edilmiştir. En yüksek dozda (100 µg/mL) yapılan POST uygulama sonucunda DNA hasarı, pozitif kontrole kıyasla büyük ölçüde azalmıştır. Bu veriler, Botryosphaeran'ın yalnızca güvenli bir bileşik olduğunu değil aynı zamanda MMS kaynaklı DNA hasarını azaltmada etkili bir antigenotoksik ajan olarak işlev görebileceğini göstermiştir. Özellikle muamele sonrası uygulamalarda daha belirgin bir koruyuculuk sergilemesi, Botryosphaeran'ın DNA onarım mekanizmalarını destekleyebileceği ya da hasarlı hücrelerde apoptozun indüklenmesine katkı sağlayabileceği yönünde yorumlanmıştır (Malini ve diğerleri, 2016).

Yüzbaşıoğlu ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada *Aureobasidium pullulans* mantarının birincil suşları tarafından üretilen bir ekzopolisakkarit olan Pullulan'ın etkileri araştırılmıştır. Komet testinde, pullulan negatif kontrole kıyasla kuyruk yoğunluğunu etkilememiş aksine, pullulan H_2O_2 ile kombinasyon halinde, pozitif kontrole kıyasla hemen hemen tüm konsantrasyonlarda kuyruk yoğunluğunu önemli ölçüde azaltmıştır. Bu sonuçlar, Pullulan'ın genotoksik olmadığını ve H_2O_2 kaynaklı genotoksisiteye karşı koruyucu bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir (Yuzbasioglu ve diğerleri, 2021).

Karsinogenez, onkogenlerin aktivasyonunu ve/veya tümör baskılama genlerinin deaktivasyonunu izleyen kontrolsüz hücre büyümesini içerir. Histon modifikasyonları, DNA metilasyonu ve DNA hidroksimetilasyonu dahil olmak üzere epigenetik değişiklikler bu

özellikleri değiştirebilir. Epigenetik düzenleyici mekanizmaların tanımlanması, potansiyel terapötik yollar oluşturulmasını sağlayabilir. Bu nedenle epigenetik değişikliklerin belirlenmesinin kanser oluşumunu önlemek ve iyileştirmek için gerekli bir adım olduğu belirtilmiştir (Sarkar ve diğerleri, 2013).

DNA metilasyonu ve histon modifikasyonları, epigenetik düzenlemenin temel mekanizmaları arasında yer alır. Bu mekanizmalar, DNA dizisinde herhangi bir değişiklik olmaksızın gen ifadesinin düzenlenmesini sağlar. DNA metiltransferazlar (DNMT'ler) ve histon deasetilazlar (HDAC'ler) gibi epigenetik enzimler, bu süreçlerin yürütülmesinde önemli rol oynamaktadır (Pan, Lang, Yao, Wang ve Li, 2019). DNA metilasyonundaki değişikliklerin tanı, prognoz ve tedavi yanıtının belirlenmesi için yararlı biyobelirteçler olduğu öne sürülmüştür (Müller ve Győrffy, 2022).

DNA metilasyonu, epigenetik bir mekanizma olarak, DNA metiltransferazlar tarafından sitozinlerin 5. pozisyonuna bir metil grubunun eklenmesiyle oluşur ve hücresel işlevde özellikle embriyonik ve yetişkin kök hücrelerinin transkripsiyonel düzenlenmesinde temel rollere sahiptir. Hipometilasyon ve hipermetilasyon, genlerin ekspresyonuna veya inhibisyonuna neden olur ve normal hücresel aktivitede genlerin aktivasyonu veya baskılanmasının düzenlenmesi arasında sıkı bir denge vardır. Metilasyon düzeyindeki değişimler, kanser gelişimi ve ilerlemesinin iyi bilinen bir özelliğidir (Mazloumi ve diğerleri, 2022). Normal fizyolojik koşullar altında DNA hipermetilasyonu, başta *DNMT1, DNMT3A* ve *DNMT3B* olmak üzere DNMT ailesi üyeleri tarafından gerçekleştirilir. Bu enzimler; gen ekspresyonunun kontrolü, genomik baskılama, X kromozomu inaktivasyonu ve tümör oluşumu gibi birçok biyolojik süreçte görev alır (Smith ve Meissner, 2013). *DNMT1*, metilasyonun korunmasından sorumlu olup replikasyon sırasında kalıp DNA ipliğindeki metilasyon desenini, komplementer iplik üzerine yeniden kopyalar. Öte yandan, *DNMT3A* ve *DNMT3B* embriyonik gelişim sırasında *de novo* metilasyon desenlerini oluşturur ve germ hücrelerinde genomik izlenimlerin kurulmasını sağlar (Li ve Zhang, 2014). *DNMT3A*, doğum sonrası dönemde belirli gen bölgelerinde metilasyon sağlarken; *DNMT3B*, erken embriyogenezde daha geniş genomik bölgelerde etkilidir (Smith ve Meissner, 2013; Hamidi, Singh ve Chen, 2015).

Histon deasetilazlar (HDAC'ler), histon proteinlerinden asetil gruplarını uzaklaştırarak kromatin yapısını sıkılaştırır ve böylece gen ekspresyonunun baskılanmasına yol açar.

Ayrıca, HDAC'lar non-histon proteinlerin de deasetilasyonunu gerçekleştirerek çeşitli hücresel işlevleri düzenler (Seto ve Yoshida, 2014). Bu enzimler, asetil gruplarını lizinden uzaklaştırmak suretiyle translasyon sonrası modifikasyonları (örneğin ubikitinasyon) dolaylı yoldan etkileyebilir (Seto ve Yoshida, 2014).

İnsanlarda 18 farklı HDAC tanımlanmış olup yapısal ve fonksiyonel özelliklerine göre dört ana sınıfa ayrılmışlardır (Curcio, Rocca, Alcaro ve Artese, 2024). Bunlar; Sınıf I (*HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC8*), Sınıf IIa (*HDAC4, HDAC5, HDAC7, HDAC9*) Sınıf IIb (*HDAC6, HDAC10*) Sınıf III (Sirtuin ailesi: *SIRT1–SIRT7*), Sınıf IV (*HDAC11*) şeklinde sınıflandırılmıştır (Li, Tian ve Zhu, 2020).

HDAC izoformlarının enzimatik aktiviteleri; hücre çoğalması, apoptoz, nörogenez ve genel epigenetik düzenleme gibi birçok fizyolojik sürecin sağlıklı ilerleyişi açısından kritiktir (Falkenberg ve Johnstone, 2014; Yoon ve Eom, 2016). Histon asetilasyonu ve deasetilasyonu arasındaki dengenin bozulması; nörodejeneratif hastalıklar, kardiyovasküler bozukluklar, otoimmünite, metabolik hastalıklar, diyabet ve kanser gibi pek çok patolojiyle ilişkilendirilmiştir. Bu bağlamda, HDAC inhibitörleri özellikle kanser tedavisinde umut vadeden epigenetik ajanlar olarak değerlendirilmektedir. Bu inhibitörler, histon hiperasetilasyonunu teşvik ederek kromatin yapısını gevşetmekte ve tümör baskılayıcı genlerin ekspresyonunu artırabilmektedir (Seto ve Yoshida, 2014).

EPS_{JD2}'nin DNA'da meydana getirdiği epigenetik değişiklikler üzerindeki etkileri RT-PZR analizi yapılarak *DNMT1, DNMT2* ve *DNMT3* gen ifadeleri üzerinden araştırılmıştır. *DNMT1, DNMT3A, DNMT3B* ve *HDAC1* gen ekspresyonlarının EPS'ye farklı tepkiler verdiği açıkça görülmektedir.

80 ve 120 µg/mL konsantrasyonlarda, *DNMT1* gen ekspresyon düzeyinde gözlemlenen azalma, DNA metilasyonunun ve kromatin sıkılığının azalmasına işaret etmektedir. Bu durum, hücresel DNA'nın daha açık bir transkripsiyonel ortama kavuşmasını ve genom stabilitesinin korunmasını destekleyen bir epigenetik mikroçevrenin oluşmasını sağlayabilir. En yüksek konsantrasyon (160 µg/mL) uygulamasında *DNMT1* ekspresyonunda bir artış (2,5 kat) dikkat çekmektedir. Bu durum, DNA metilasyonunun artabileceği ve dolayısıyla bazı gen bölgelerinde baskılayıcı etkilerin ortaya çıkabileceği anlamına gelebilir.

DNMT3A geninde EPS_{JD2} uygulamasına bağlı olarak belirgin uyarıcı etkiler görülmüştür. 80 ve 120 µg/mL konsantrasyonlarda *DNMT3A* ekspresyonunda artış saptanmıştır. Bu artış *de novo* metilasyon mekanimalarının aktive olabileceğini ve epigenetik yeniden programlamada *DNMT3A*'nın önemli bir rol üstleneceğini düşündürmektedir. *DNMT3B* gen ekspresyonu EPS_{JD2} uygulamasına yanıt olarak artış göstermiştir. Bu artış *DNMT3A* ile birlikte hücrelerin DNA hasarına karşı geliştirdiği koruyucu epigenetik yanıtların bir parçası olarak değerlendirilebilir.

Histon deasetilazlar (HDAC'ler), kromatin yapısının sıkılaşmasında ve buna bağlı olarak gen ekspresyonunun baskılanmasında rol oynayan enzimlerdir (Peng, Sun, Kuang ve Chen, 2020). Bu nedenle *HDAC1*'in ekspresyonunun azalması, özellikle tümör baskılayıcı genlerin yeniden aktive edilmesine katkı sağlayabilir. Bu bağlamda elde edilen veriler, ekzopolisakkaritin potansiyel bir epigenetik modülatör olarak değerlendirilebileceğini ve kemopreventif ya da kemoterapötik destekleyici ajan olarak kullanım potansiyelini desteklemektedir. Bu bulgular, EPS_{JD2}'nin sadece biyolojik bir koruyucu ajan olarak değil aynı zamanda epigenetik düzeyde regülatör bir biyomolekül olabileceğin ve gen ekspresyonunu yeniden programlayarak antigenotoksik etkilerinin epigenetik arka planını destekleyebileceğine işaret etmektedir.

Streptomyce sp.'den elde edilen EPS ile yapılan bir çalışmada, EPS'nin oksidatif stres, apoptoz, inflamatuar faktörler, antioksidan enzimlerin aktivasyonu yoluyla 5-FU kaynaklı mukoziti inhibe ettiği ileri sürülmektedir. EPS'nin klinik uygulaması kemoterapi kaynaklı intestinal disfonksiyonu iyileştirebilir ve dolayısıyla kemoterapinin klinik etkinliğini artırabilir. Ek olarak, EPS uygulamasının hücresel bütünlüğün kaybı ve villus ve kript bozulması gibi 5-FU kaynaklı histopatolojik uyumsuzlukları azalttığı görülmüştür (Mahmoud ve diğerleri, 2020).

Yapılan başka bir çalışmada denizel kaynaklı bakterilerden izole edilen ekzopolisakkaritlerin (EPS), HepG2 karaciğer kanseri hücreleri üzerindeki antitümör etkileri araştırılmıştır. Çalışmada, EPS'lerin apoptozisle ilişkili genler (*BCL-2, CASP8, TP53, TNF-α, FAS/Apo1*) ve Toll-like reseptörler (*TLR2, TLR9*) üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. Önceki sitotoksisite testleri sonucunda en etkili beş EPS (MSA1, E4, MGA2, SGA3, NRC7) seçilerek bu moleküllerin apoptoz ve immün yanıtla ilişkili genlerin ekspresyon düzeylerine etkileri kantitatif RT-PZR yöntemiyle analiz edilmiştir. Sonuçlar, bu EPS'lerin apoptotik

yanıtları düzenlemede olumlu bir rol üstlendiğini ve farklı mekanizmalarla TLR'ların ekspresyonunu artırdığını göstermiştir. En dikkat çekici bulgu, MSA1 isimli EPS'nin hem gen hem de protein düzeyinde belirgin pro-apoptotik etkiler göstermesi olmuştur. Bu EPS uygulamaları sonucunda *BCL-2* gen ekspresyonu anlamlı düzeyde azalırken, *CASP8* ve *TP53* ekspresyonu ise belirgin şekilde artmıştır. *TP53* genindeki bu artış hem ekstrinsik hem de intrinsik apoptotik yollardaki düzenleyici rolüyle ilişkilendirilmiştir. Ayrıca, *TNF-α* ve *FAS/Apo1* gibi pro-apoptotik faktörlerde de artış saptanmış; bu da EPS uygulamasının hücre ölümünü tetikleyici sinyalleri aktive edebileceğini göstermiştir. Bununla birlikte, EPS uygulamaları *TLR2* ve *TLR9* ekspresyon düzeylerini de artırmış, bu da sadece apoptoz değil, aynı zamanda kanser hücrelerine karşı immün yanıtın güçlendirilmesinde de potansiyel etkiler gösterebileceğini düşündürmüştür. Bu bulgular, bakteriyel kaynaklı EPS'lerin sadece genotoksik ve antitümör değil, aynı zamanda immünomodülatör etkiler gösterebilecek biyolojik ajanlar olarak değerlendirilebileceğini ortaya koymaktadır (Yahya, Abdelnasser, Hamed, El Sayed ve Asker, 2019).

Benzer şekilde, bakteriyel kökenli ekzopolisakkaritlerin gen ekspresyonu düzeyindeki düzenleyici etkileri başka bir çalışmada da ortaya konmuştur. *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* DSM 20081T suşundan elde edilen EPS5'in, antioksidan ve antitümör etkilerinin yanı sıra, epigenetik ve apoptozla ilişkili genlerin ekspresyon düzeylerini anlamlı şekilde değiştirdiği bildirilmiştir. MCF7, CaCo2 ve HepG2 hücre hatlarında gerçekleştirilen çalışmada, EPS5'in IC_{50} değerlerinde uygulanması, özellikle CaCo2 hücrelerinde *BAX, CASP3, CASP8* ve *TP53* genlerinin anlamlı düzeyde artan ekspresyonuna, buna karşılık *BCL2, MCL1* ve *VIM* genlerinin ise baskılanmasına yol açmıştır. Aynı şekilde, MCF7 ve HepG2 hücrelerinde de benzer bir gen ekspresyon profili gözlenmiş, apoptotik süreçlerin düzenlenmesinde görev alan genlerin yukarı regüle edildiği, anti-apoptotik genlerin ise aşağı regüle edildiği rapor edilmiştir (Khalil ve diğerleri, 2022). Bu bulgular, EPS kaynaklı bileşiklerin yalnızca hücre canlılığı ve DNA hasarı üzerine etkileriyle sınırlı kalmadığını; aynı zamanda hücre döngüsü ve apoptozda rol oynayan gen bölgeleri üzerinden epigenetik düzenleyici etkilere de sahip olabileceğini göstermektedir. Bu yönüyle bu tez çalışması, maya kökenli EPS_{JD2}'nin *HDAC1* gen bölgesinde gözlenen baskılanma ve *DNMT* ailesindeki uyarılma ile benzer bir düzenleyici potansiyelin, farklı mikroorganizmalardan elde edilen EPS bileşikleri için de geçerli olabileceğini düşündürmektedir.

Saccharomyces boulardii'nin 24 saatlik hücre kültürü sonrasında santrifüj ve filtrasyon işlemleriyle elde edilen, hücre dışı metabolitler ve muhtemel EPS'leri içeren kültür süzüntüsü (SBS), MCF-7 ve MCF-7/MX meme kanseri hücre hatlarında gen ekspresyonu düzeyinde anlamlı etkiler gösterdiği rapor edilmiştir. Real-time PZR analizlerine göre, SBS uygulaması sonucunda *survivin* geninin ekspresyonu MCF-7 hücrelerinde 24, 48 ve 72 saatlik sürelerde anlamlı düzeyde azalmıştır (p<0,05). MCF-7/MX hücrelerinde ise bu baskılanma 24 ve 48 saatlik sürelerle sınırlı kalmış ve genel olarak MCF-7 hücrelerine kıyasla daha düşük düzeyde gerçekleşmiştir. Bu bulgular, *survivin* (*BIRC5*) geninin baskılanması yoluyla apoptozun aktive edilmesinin, SBS'nin antikanser mekanizmalarından biri olduğunu ortaya koymaktadır. Çalışmamızda ise, *P. kudriavzevii* kaynaklı ekzopolisakkaritin insan periferik lenfositlerinde RT-PZR analizi ile belirlenen gen ekspresyon değişimleri, özellikle genotoksik stres altındaki hücrelerde koruyucu ve düzenleyici etki potansiyeline işaret etmektedir. Probiyotik mayalardan türetilen bileşiklerin survivin gibi apoptozla ilişkili genlerin ekspresyonu üzerinde baskılayıcı etkileri, epigenetik düzeyde bir müdahale mekanizmasını düşündürmekte ve bu tür doğal kaynaklı ajanların kanser tedavisinde tamamlayıcı bir yaklaşım olarak değerlendirilmesini desteklemektedir. Bu paralellik, ekzopolisakkaritlerin yalnızca genotoksisiteye karşı koruyucu değil, aynı zamanda hücresel stres altında gen regülasyonuna müdahil olabilecek biyolojik aktiviteye sahip olduklarını göstermektedir (Pakbin ve diğerleri, 2022).

Bu bulgular, EPS kaynaklı bileşiklerin yalnızca hücre canlılığı ve DNA hasarı üzerine etkileriyle sınırlı kalmadığını; aynı zamanda hücre döngüsü ve apoptozda rol oynayan gen bölgeleri üzerinden epigenetik düzenleyici etkilere de sahip olabileceğini göstermektedir. Bu yönüyle bu çalışma, maya kökenli EPS_{JD2}'nin *HDAC1* gen bölgesinde gözlenen baskılanma ve *DNMT* ailesindeki uyarılma ile benzer bir düzenleyici potansiyelin, farklı mikroorganizmalardan elde edilen EPS bileşikleri için de geçerli olabileceğini düşündürmektedir.

Bu bağlamda, *P. kudriavzevii* JD_2 maya suşundan elde edilen EPS_{JD2}'nin insan sağlığı üzerindeki etkilerinin incelenmesi hem gıda endüstrisi hem de sağlık alanında yeni perspektifler sunabilecektir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Mikrobiyal EPS'lerdeki ilerlemelerin gözden geçirilmesi, kaynak ve kimyasal yapılarındaki yüksek çeşitliliğin yanı sıra bu tür biyopolimerlerin sağlık açısından olumlu etkileri ve çoklu işlevleri nedeniyle günümüzde önemli bir çalışma alanı sağlamaktadır (Waoo ve diğerleri, 2023). Bakteriyel, mantar, maya ve mikroalg EPS'leri farmasötik ve biyomedikal alanlarda biyomalzemeler (örn. biyo-yapay organların doku mühendisliği), biyo-terapötik ajanlar (örn. antiviral, antioksidan ve antikanser aktiviteler) ve ilaç formülasyonları için biyo-eksipiyanlar veya "biyo-içerikler" (örn. kıvam arttırıcılar, emülgatörler ve stabilizatörler) olarak çok sayıda uygulama alanı bulmaktadır (Kheyrandish ve diğerleri 2022; Liu ve diğerleri 2022; Zhao ve diğerleri, 2024; Gientka ve diğerleri, 2015; Gientka ve diğerleri, 2016; Shamekhi ve diğerleri, 2019; Han ve diğerleri, 2024; Nurkanto ve diğerleri, 2025). Mikrobiyal kaynaklı EPS'lerin farmasötik ve biyomedikal alanlarda geniş bir kullanım potansiyeline sahip olduğu görülmektedir. Özellikle, antimikrobiyal aşıların geliştirilmesi, immünobiyotik adjuvanlar gibi uygulamalarda, bu bileşiklerin, biyolojik aktivite düzeylerinin yüksek olması dikkat çekicidir (Huang, 2022; Mohd Nadzir, Nurhayati, Idris ve Nguyen, 2021). Bu özellikleri sayesinde EPS'ler, yüksek katma değerli biyolojik ürünler olarak ön plana çıkmakta ve bu alandaki ihtiyacı giderme potansiyeline sahiptirler. EPS'lerin gelecek vaat eden bir diğer uygulama alanı ise hem teşhis hem de tedavi stratejilerinin (teranostik) birleştirilebildiği akıllı ilaç dağıtım sistemleridir (Huang ve diğerleri, 2018; Palumbo, Federico, Pitarresi, Fiorica ve Giammona, 2020). Mikrobiyal EPS'ler bu anlamda, çeşitli ve büyüyen uygulamalara sahip olabileceği düşünülmektedir.

Bu tez çalışmasında, *P. kudriavzevii* kaynaklı EPS_{JD2}'nin genotoksik ve antigenotoksik etkileri, kromozomal anormallik, mikronükleus ve komet testleri gibi sitogenetik analizler aracılığıyla değerlendirilmiştir. Buna ek olarak *DNMT1, DNMT3A, DNMT3B* ve *HDAC1* gen ekspresyonları RT-PZR analizi ile EPS_{JD2}'nin epigenetik düzeydeki olası etkileri araştırılmıştır. Elde edilen bulgular, EPS_{JD2}'nin DNA hasarına karşı koruyucu bir potansiyele sahip olabileceğini ve gen ekspresyonu düzeyinde de değişiklikler oluşturabileceğini göstermektedir. Ancak bu etkilerin daha derinlemesine anlaşılabilmesi ve moleküler düzeyde desteklenebilmesi için bazı ileri analiz yöntemlerinin uygulanması önerilmektedir.

EPS_{JD2}'nin antigenotoksik etkilerini daha detaylı incelemek ve kromozomal anormallikleri yüksek çözünürlükle değerlendirmek amacıyla FISH sitogenetik ve immünohistokimyasal

yöntemlerin kullanımı uygun olabilir. Bu yöntem, sayısal ve yapısal kromozomal bozuklukların yüksek çözünürlükle değerlendirilmesini sağlayarak sitogenetik bulgulara derinlik kazandırabilir.

DNA hasarının moleküler düzeyde doğrulanması için Western blot, ELISA ve RT-qPZR tekniklerinin birlikte uygulanması, elde edilen verilerin çok katmanlı analizine olanak sağlayacaktır. Bu sayede EPS_{JD2}'nin genotoksisite üzerindeki etkileri daha bütüncül bir şekilde ortaya konabilir.

Epigenetik düzenleyiciler karmaşık şekillerde çalışır ve kanserleşme sürecinde bazı kilit hedef genlerin ifadesini korumak için bunlara ihtiyaç duyulabilir. Bu düzenleyici mekanizmalar evrensel olarak hedef alınabilirse, hücresel felakete neden olacak kadar denge bozulabilir. Epigenetik modifikasyon bölgelerinin hassas bir şekilde hedeflenmesi, hedef dışı etkileri ve diğer yan etkileri büyük ölçüde azaltır. Bu nedenle, epigenetik modifikasyonların mekanizmalarını anlamak ve bunları kontrol etmeyi öğrenmek için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır.

EPS'lerin sağlık alanında sunduğu geniş uygulama potansiyeli, mevcut tedavi ve teşhis yaklaşımlarına önemli katkılar sağlamaktadır. Özellikle epigenetik düzenleyicilerin karmaşık mekanizmalarının derinlemesine anlaşılması ve bu mekanizmaların hassas bir şekilde hedeflenmesi, kanser tedavisinde daha etkili ve güvenilir stratejilerin geliştirilmesi açısından kritik bir öneme sahiptir. Epigenetik modifikasyonların kontrol altına alınması, hücresel homeostazın yeniden sağlanmasına ve kanserleşme süreçlerinin önlenmesine yönelik yenilikçi çözümler sunabilir. Mikrobiyal EPS'lerin epigenetik faktörlere yönelik antitümör terapilerde kullanımına ilişkin araştırmalar, gelişmelere olanak tanıyabileceği gibi, hedefe yönelik ve yan etkileri minimize edilmiş tedavilerin geliştirilmesine de öncülük edebilir. Dolayısıyla, bu alanda yürütülecek kapsamlı çalışmalar hem temel bilimlere hem de uygulamalı tıp alanlarına önemli katkılar sunacaktır.

KAYNAKLAR

Abbasi, A., Rad, A. H., Maleki, L. A., Kafil, H. S. ve 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.

Ali Zaidi, S. S., Fatima, F., Ali Zaidi, S. A., Zhou, D., Deng, W. ve Liu, S. (2023). Engineering siRNA therapeutics: challenges and strategies. *Journal of Nanobiotechnology*, 21(1), 381.

Allfrey, V. G., Faulkner, R. ve Mirsky, A. E. (1964). Acetylation and methylation of histones and their possible role in the regulation of RNA synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 51, 786-794.

Al-Naqeb, G., Kalmpourtzidou, A., Giampieri, F., De Giuseppe, R. ve Cena, H. (2024). Genotoxic and antigenotoxic medicinal plant extracts and their main phytochemicals: A review. *Frontiers in Pharmacology*, 15, 1448731.

Alongi, M. ve Anese, M. (2021). Re-thinking functional food development through a holistic approach. *Journal of Functional Foods*, 81, 104466.

Al-Salmani, K., Abbas, H. H., Schulpen, S., Karbaschi, M., Abdalla, I., Bowman, K. J., So, K. K., Evans, M. D., Jones, G. D. D., Godschalk, R. W. ve Cooke, M. S. (2011). Simplified method for the collection, storage, and comet assay analysis of DNA damage in whole blood. *Free Radical Biology and Medicine*, 51(3), 719-725.

Anderson, D., Yu, T. W. ve McGregor, D. B. (1998). Comet assay responses as indicators of carcinogen exposure. *Mutagenesis*, 13(6), 539-555.

Andrew, M. ve Jayaraman, G. (2020). Structural features of microbial exopolysaccharides in relation to their antioxidant activity. *Carbohydrate Research*, 487, 107881.

Araldi, R. P., Oliveira, D. G. D., Silva, D. F. D., Mendes, T. B. ve Souza, E. B. D. (2013). Análise do potencial mutagênico dos esteroides anabólicos androgênicos (EAA) e da l-carnitina mediante o teste do micronúcleo em eritrócitos policromáticos. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*, 19, 448-451.

Araldi, R. P., Rechiutti, B. M., Mendes, T. B., Ito, E. T. ve Souza, E. B. D. (2014). Mutagenic potential of Cordia ecalyculata alone and in association with Spirulina maxima for their evaluation as candidate anti-obesity drugs. *Genetics and Molecular Research*, 13(3), 5207-5220.

Arévalo-Villena, M., Fernandez-Pacheco, P., Castillo, N., Bevilacqua, A. ve Pérez, A. B. (2018). Probiotic capability in yeasts: Set-up of a screening method. *Lwt*, 89, 657-665.

Arnaudo, A. M. ve Garcia, B. A. (2013). Proteomic characterization of novel histone post-translational modifications. *Epigenetics & Chromatin*, 6, 1-7.

Avuloglu-Yilmaz, E., Yuzbasioglu, D. ve Unal, F. (2020). In vitro genotoxicity assessment of monopotassium glutamate and magnesium diglutamate. *Toxicology in Vitro*, 65, 104780.

Avuloglu-Yılmaz, E., Yuzbasıoglu, D. ve Unal, F. (2022). Investigating in vitro genotoxic effects of sweetener xylitol.

Azqueta, A. ve Collins, A. R. (2013). The essential comet assay: a comprehensive guide to measuring DNA damage and repair. *Archives of Toxicology*, 87, 949-968.

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

Balthazar, C. F., Guimarães, J. F., Coutinho, N. M., Pimentel, T. C., Ranadheera, C. S., Santillo, A., Albenzio, M., Cruz, A. G. ve Sant'Ana, A. S. (2022). The future of functional food: Emerging technologies application on prebiotics, probiotics and postbiotics. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 21(3), 2560-2586.

Basu, A. K. ve Nohmi, T. (2018). Chemically-induced DNA damage, mutagenesis, and cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(6), 1767.

Batista, V. L., De Jesus, L. C. L., Tavares, L. M., Barroso, F. L. A., Fernandes, L. J. D. S., Freitas, A. D. S., Americo, M. F., Drumond, M. M., Mancha-Agresti, P., Ferreira, E., Laguna, J. G., Alcantara, L. C. J. ve Azevedo, V. (2022). Paraprobiotics and postbiotics of Lactobacillus delbrueckii CIDCA 133 mitigate 5-FU-induced intestinal inflammation. *Microorganisms*, 10(7), 1418.

Baudoin, N. C. ve Bloomfield, M. (2021). Karyotype aberrations in action: the evolution of cancer genomes and the tumor microenvironment. *Genes*, 12(4), 558.

Berikten, D. ve Kıvanç, M. (2018). Fitazlar: Çevreye Etkisi, Beslenme ve Biyoteknolojideki Önemi. *Akademik Gıda*, *16*(1), 109-119.

Birch, C. S. ve Bonwick, G. A. (2019). Ensuring the future of functional foods. *International Journal of Food Science and Technology*, 54(5), 1467-1485.

Boller, K. ve Schmid, W. (1970). Chemische mutagenese beim Säuger. Das knochenmark des Chinesischen hamsters als in vivo-Testsystem. Hämatologische befunde nach behandlung mit trenimon. *Human Genetics*, 11(1), 35-54.

Bolognani, F., Rumney, C. J. ve Rowland, I. R. (1997). Influence of carcinogen binding by lactic acid-producing bacteria on tissue distribution and in vivo mutagenicity of dietary carcinogens. *Food and Chemical Toxicology*, 35(6), 535-545.

Bonassi, S., Znaor, A., Ceppi, M., Lando, C., Chang, W. P., Holland, N., Kirsch-Volders, M., Zeiger, E., Ban, S., Barale, R., Bigatti, M. P., Bolognesi, C., Cebulska-Wasilewska, A., Fabianova, E., Fucic, A., Hagmar, L., Joksic, G., Martelli, A., Migliore, L., Mirkova, E., Scarfi, M. R., Zijno, A., Norppa, H. ve Fenech, M. (2007). An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. *Carcinogenesis*, 28(3), 625-631.

Bouyahya, A., Bakrim, S., Chamkhi, I., Taha, D., El Omari, N., El Mneyiy, N., El Hachlafi, N., El-Shazly, M., Khalid, A. Abdalla, A. N., Goh K. W., Ming, L. C., Goh, B. H. ve Aanniz, T. (2024). Bioactive substances of cyanobacteria and microalgae: sources, metabolism, and anticancer mechanism insights. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 170, 115989.

Bure, I. V., Nemtsova, M. V. ve Kuznetsova, E. B. (2022). Histone modifications and non-coding RNAs: mutual epigenetic regulation and role in pathogenesis. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(10), 5801.

Burlinson, B., Tice, R. R., Speit, G., Agurell, E., Brendler-Schwaab, S. Y., Collins, A. R., Escobar, P., Honma, M., Kumaravel, T. S., Nakajima, M., Sasaki, Y. F., Thybaud, V., Uno, Y., Vasquez, M. ve Hartmann, A. (2007). Fourth International Workgroup on Genotoxicity testing: results of the in vivo Comet assay workgroup. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 627(1), 31-35.

Burns, A. J. ve Rowland, I. R. (2004). Antigenotoxicity of probiotics and prebiotics on faecal water-induced DNA damage in human colon adenocarcinoma cells. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 551(1-2), 233-243.

Cerdán-Alduán, M., Salvador-Erro, J., Villegas-Remírez, A., García-Yoldi, D., Ceniceros, A., Pastor, Y. ve Gamazo, C. (2025). Yeast Strains as Probiotic and Postbiotic Agents for the Agglutination of Enteric Pathogens: A Preventive Approach. *Pathogens*, 14(2), 113.

Chen, H. M., Yu, Y. N., Wang, J. L., Lin, Y. W., Kong, X., Yang, C. Q., Yang, L., Liu, Z. J., Yuan, Y. Z., Liu, F., Wu, J. Z., Zhong, L., Fang, D. C., Zou, W. ve Fang, J. Y. (2013). Decreased dietary fiber intake and structural alteration of gut microbiota in patients with advanced colorectal adenoma. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 97(5), 1044-1052.

Chen, J. F., Hsia, K. C., Kuo, Y. W., Chen, S. H., Huang, Y. Y., Li, C. M., Hsu, Y. C., Tsai, S. Y ve Ho, H. H. (2023). Safety Assessment and Probiotic Potential Comparison of Bifidobacterium longum subsp. infantis BLI-02, Lactobacillus plantarum LPL28, Lactobacillus acidophilus TYCA06, and Lactobacillus paracasei ET-66. *Nutrients*, 16(1), 126.

Chen, L., Zhernakova, D. V., Kurilshikov, A., Andreu-Sánchez, S., Wang, D., Augustijn, H. E., Vila, V. A., Study, C. L., Weersma, K. R., Medema, H. M., Netea, G. M., Kuipers, F., Wijmenga, C., Zehernakova, A. ve Fu, J. (2022). Influence of the microbiome, diet and genetics on inter-individual variation in the human plasma metabolome. *Nature Medicine*, 28(11), 2333-2343.

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

Chen, Z., Shi, J., Yang, X., Liu, Y., Nan, B. ve Wang, Z. (2016). Isolation of exopolysaccharide-producing bacteria and yeasts from Tibetan kefir and characterisation of the exopolysaccharides. *International Journal of Dairy Technology*, 69(3), 410-417.

Chu, Y., Li, M., Jin, J., Dong, X., Xu, K., Jin, L. ve Ji, H. (2023). Advances in the application of the non-conventional yeast Pichia kudriavzevii in food and biotechnology industries. *Journal of Fungi*, 9(2), 170.

Coan, M., Haefliger, S., Ounzain, S. ve Johnson, R. (2024). Targeting and engineering long non-coding RNAs for cancer therapy. *Nature Reviews Genetics*, 25(8), 578-595.

Collins, A. R., Oscoz, A. A., Brunborg, G., Gaivao, I., Giovannelli, L., Kruszewski, M., Kruszewski, M. ve Štětina, R. (2008). The comet assay: topical issues. *Mutagenesis*, 23(3), 143-151.

Collins, A., Møller, P., Gajski, G., Vodenková, S., Abdulwahed, A., Anderson, D., Bankoglu, E. E., Bonassi, S., Boutet-Robinet, E., Brunborg, G., Chao, C., Cooke, M. S., Coksta, C., Costa, S., Dhawan, A., de Lapuente, J., Bo, C. D., Dubus, J., Dusinska, M., Duthie, S. J., Yamani, N. E., Engelward, B. and Gaivao, I. (2023). Measuring DNA modifications with the comet assay: a compendium of protocols. *Nature Protocols*, 18(3), 929-989.

Curcio, A., Rocca, R., Alcaro, S. ve Artese, A. (2024). The histone deacetylase family: structural features and application of combined computational methods. *Pharmaceuticals*, 17(5), 620.

Dadgar-Zankbar, L., Mokhtaryan, M., Bafandeh, E., Javanmard, Z., Asadollahi, P., Darbandi, T., Afifirad, R., Dashtbin, S., Darbandi, A. ve Ghanavati, R. (2025). Microbiome and bladder cancer: the role of probiotics in treatment. *Future Microbiology*, 20(1), 73-90.

De Flora, S. (1998). Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 402(1-2), 151-158.

Degen, G. H., Gerber, M. M., Obrecht-Pflumio, S. ve Dirheimer, G. (1997). Induction of micronuclei with ochratoxin A in ovine seminal vesicle cell cultures. *Archives of Toxicology*, 71, 365-371.

Dhar, G. A., Saha, S., Mitra, P. ve Nag Chaudhuri, R. (2021). DNA methylation and regulation of gene expression: Guardian of our health. *The Nucleus*, 64(3), 259-270.

Dhakal, R., Yosofvand, M., Yavari, M., Abdulrahman, R., Schurr, R., Moustaid-Moussa, N. ve Moussa, H. (2021). Review of biological effects of acute and chronic radiation exposure on Caenorhabditis elegans. *Cells*, *10*(8), 1966.

Diaz, D., Scott, A., Carmichael, P., Shi, W. ve Costales, C. (2007). Evaluation of an automated in vitro micronucleus assay in CHO-K1 cells. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 630(1-2), 1-13.

El-Sayed, W. M. ve Hussin, W. A. (2013). Antimutagenic and antioxidant activity of novel 4-substituted phenyl-2, 2′-bichalcophenes and aza-analogs. *Drug Design, Development and Therapy*, 4, 73-81.

El-Sayed, W. M., Hussin, W. A., Al-Faiyz, Y. S. ve Ismail, M. A. (2013). The position of imidazopyridine and metabolic activation are pivotal factors in the antimutagenic activity of novel imidazo [1, 2-a] pyridine derivatives. *European Journal of Pharmacology*, 715(1-3), 212-218.

Engreitz, J. M., Pandya-Jones, A., McDonel, P., Shishkin, A., Sirokman, K., Surka, C., Kadri, S., Xing, J., Gören, A., Lander, E. S., Plath, K. ve Guttman, M. (2013). The Xist lncRNA exploits three-dimensional genome architecture to spread across the X chromosome. *Science*, 341(6147), 1237973.

Erikel, E. ve Avuloğlu-Yılmaz, E. (2022). (Ünal, F., ve Yüzbaşıoğlu, D. Editörler). *Genetik Toksikoloji*, Ankara: Noel Yayınevi, 445, 475

Eroğlu, D. E. (2008). *Bazı flavonoidlerin drosophila melanogasterde antigenotoksik aktivitesi ve antioksidan etkilerinin araştırılması.* Doktora Tezi, İnönü Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Malatya, 4-36.

Fai, A. E. C., Simiqueli, A. P. R., Ghiselli, G. ve Pastore, G. M. (2015). Sequential optimization approach for prebiotic galactooligosaccharides synthesis by Pseudozyma tsukubaensis and Pichia kluyveri. *LWT-Food Science and Technology*, 63(2), 1214-1219.

Fairbairn, D. W., Olive, P. L. ve O'Neill, K. L. (1995). The comet assay: a comprehensive review. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, 339(1), 37-59.

Falkenberg, K. J. ve Johnstone, R. W. (2014). Histone deacetylases and their inhibitors in cancer, neurological diseases and immune disorders. *Nature Reviews Drug Discovery*, 13(9), 673-691.

Farag, M. A., Abdelwareth, A., Sallam, I. E., El Shorbagi, M., Jehmlich, N., Fritz-Wallace, K., Schape, S., S., Rolle-Kampczyk, U., Ehrlich, A., Wessjohann, L. A. ve von Bergen, M. (2020). Metabolomics reveals impact of seven functional foods on metabolic pathways in a gut microbiota model. *Journal of Advanced Research*, 23, 47-59.

Farkas, G., Jurányi, Z., Székely, G., Kocsis, Z. S. ve Gundy, S. (2016). Relationship between spontaneous frequency of aneuploidy and cancer risk in 2145 healthy Hungarian subjects. *Mutagenesis*, 31(5), 583-588.

Fenech, M. (2000). The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 455(1-2), 81-95.

Fenech, M. (2020). Cytokinesis-block micronucleus cytome assay evolution into a more comprehensive method to measure chromosomal instability. *Genes*, 11(10), 1203.

Fenech, M., Knasmueller, S., Bolognesi, C., Bonassi, S., Holland, N., Migliore, L., Palitti, F., Natarajan, A. T. ve Kirsch-Volders, M. (2016). Molecular mechanisms by which in vivo exposure to exogenous chemical genotoxic agents can lead to micronucleus formation in lymphocytes in vivo and ex vivo in humans. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 770, 12-25.

Fenech, M., Knasmueller, S., Knudsen, L. E., Kirsch-Volders, M., Deo, P., Franzke, B., Stopper, H., Andreassi, M. G., Bolognesi, C., Dhillon, S. V., Laffon, B., Wagner, K. H. ve Bonassi, S. (2021). "Micronuclei and Disease" special issue: Aims, scope, and synthesis of outcomes. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 788, 108384.

Fenech, M., Knasmueller, S., Nersesyan, A., Bolognesi, C., Wultsch, G., Schunck, C. Colpi, E. ve 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.

Fomina, M. O., Filipishena, O. Y. ve Polishchuk, L. V. (2022). Molecular genetic identification of yeast isolate MF22_1. *Фізіологія рослин і генетика*, 54(6), 516-527.

Forsberg, A., Huoman, J., Söderholm, S., Bhai Mehta, R., Nilsson, L., Abrahamsson, T. R., Ernderudh, J., Gustafsson, M ve Jenmalm, M. C. (2020). Pre-and postnatal Lactobacillus reuteri treatment alters DNA methylation of infant T helper cells. *Pediatric Allergy and Immunology*, 31(5), 544-553.

Ganapathiwar, S. ve Bhukya, B. (2023). In vitro assessment for the probiotic potential of Pichia kudriavzevii. *Bioinformation*, 19(4), 441.

Gheytanchi, E., Naseri, M., Karimi-Busheri, F., Atyabi, F., Mirsharif, E. S., Bozorgmehr, M., Ghods, R. ve Madjd, Z. (2021). Morphological and molecular characteristics of spheroid formation in HT-29 and Caco-2 colorectal cancer cell lines. *Cancer Cell İnternational*, 21, 1-16.

Gibson, G. R., Hutkins, R., Sanders, M. E., Prescott, S. L., Reimer, R. A., Salminen, S. J., Scott, K., Stanton, C., Swanson, K. S., Canii, P. D., Verbeke, K. ve Reid, G. (2017). Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nature reviews Gastroenterology & Hepatology*, 14(8), 491-502.

Godschalk, R. W., Ersson, C., Riso, P., Porrini, M., Langie, S. A., van Schooten, F. J., Azqueta, A., Collins, A. R., Jones, G. D. D., Kwok, R. W. L., Phillips, D. H., Sozeri, O., Allione, A., Matullo, G., Möller, L., Forchhammer, L., Loft, S. ve Møller, P. (2013). DNA-repair measurements by use of the modified comet assay: an inter-laboratory comparison within the European Comet Assay Validation Group (ECVAG). *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 757(1), 60-67.

Gong, F. ve Miller, K. M. (2019). Histone methylation and the DNA damage response. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*, 780, 37-47.

Gong, T., Borgard, H., Zhang, Z., Chen, S., Gao, Z. ve Deng, Y. (2022). Analysis and performance assessment of the whole genome bisulfite sequencing data workflow: currently available tools and a practical guide to advance DNA methylation studies. *Small Methods*, 6(3), 2101251.

Goulas, V. ve Georgiou, E. (2019). Utilization of carob fruit as sources of phenolic compounds with antioxidant potential: Extraction optimization and application in food models. *Foods*, 9(1), 20.

Greppi, A., Saubade, F., Botta, C., Humblot, C., Guyot, J. P. ve Cocolin, L. (2017). Potential probiotic Pichia kudriavzevii strains and their ability to enhance folate content of traditional cereal-based African fermented food. *Food Microbiology*, 62, 169-177.

Gu, M., Ren, B., Fang, Y., Ren, J., Liu, X., Wang, X., Zahou, F., Xiazo, R., Luo, X., You, L. ve Zhao, Y. (2024). Epigenetic regulation in cancer. *MedComm*, 5(2), e495.

Gut, A. M., Vasiljevic, T., Yeager, T. ve Donkor, O. N. (2019). Characterization of yeasts isolated from traditional kefir grains for potential probiotic properties. *Journal of Functional Foods*, 58, 56-66.

Ha, S. Y., Choi, M., Lee, T. ve Park, C. K. (2016). The prognostic role of mitotic index in hepatocellular carcinoma patients after curative hepatectomy. *Cancer Research and Treatment: Official Journal of Korean Cancer Association*, 48(1), 180-189.

Hamidi, M., Gholipour, A. R., Delattre, C., Sesdighi, F., Seveiri, R. M., Pasdaran, A., Kheirandish, S., Pierre, G., Kozani, P. S., Kozani, P. S. ve 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, T., Singh, A. K. ve Chen, T. (2015). Genetic alterations of DNA methylation machinery in human diseases. *Epigenomics*, 7(2), 247-265.

Han, J., Xia, W., Wang, D., Wang, Y., Liu, Z. ve Wu, Z. (2024). Characterization of an exopolysaccharide synthesized by Lacticaseibacillus rhamnosus B6 and its immunomodulatory activity in vitro. *International Journal of Biological Macromolecules*, 264, 130576.

Han, S. M. ve Lee, J. S. (2017). Production and its anti-hyperglycemic effects of γ-aminobutyric acid from the wild yeast strain Pichia silvicola UL6-1 and Sporobolomyces carnicolor 402-JB-1. *Mycobiology*, 45(3), 199-203.

Hartmann, A., Agurell, E., Beevers, C., Brendler-Schwaab, S., Burlinson, B., Clay, P., Collins, A., Smith, A., Speit, G., Thybaud, V. ve Tice, R. R. (2003). Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. *Mutagenesis*, 18(1), 45-51.

Hartmann, A., Schumacher, M., Plappert-Helbig, U., Lowe, P., Suter, W. ve Mueller, L. (2004). Use of the alkaline in vivo Comet assay for mechanistic genotoxicity investigations. *Mutagenesis*, 19(1), 51-59.

Hatakka, K., Holma, R., El-Nezami, H., Suomalainen, T., Kuisma, M., Saxelin, M. ve and Korpela, R. (2008). The influence of Lactobacillus rhamnosus LC705 together with Propionibacterium freudenreichii ssp. shermanii JS on potentially carcinogenic bacterial activity in human colon. *International Journal of Food Microbiology*, 128(2), 406-410.

Hazan, G., Goldstein, Y., Greenberg, D., Khalde, F., Mahajna, R., Keren-Naos, A., Hershkovitz, E., Faingelernt, Y., Lavi-Givon, N. ve Danino, D. (2024). Comparing single versus multiple virus detection in pediatric acute gastroenteritis postimplementation of routine multiplex RT-PCR diagnostic testing. *Journal of Medical Virology*, 96(1), e29344.

He, S., Wang, F., Yang, L., Guo, C., Wan, R., Ke, A., & Wang, X. (2011). Expression of DNMT1 and DNMT3a are regulated by GLI1 in human pancreatic cancer. *PloS one*, *6*(11), e27684.

Hemminki, K., Sivaramakrishna, R., Ludovit, M., Veronika, V., Erika, H., Asta, F. Ludmila, V., Janka, B., Pavel, V. ve Rajiv, K. (2015). Telomere length in circulating lymphocytes: Association with chromosomal aberrations. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 54(3), 194-196.

Heo, M. Y., Sohn, S. J. ve Au, W. W. (2001). Anti-genotoxicity of galangin as a cancer chemopreventive agent candidate. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 488(2), 135-150.

Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B. ve Sanders, M. E. (2014). The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 11(8), 506-514.

Hobbs, C. A., Swartz, C., Maronpot, R., Davis, J., Recio, L. ve Hayashi, S. M. (2012). Evaluation of the genotoxicity of the food additive, gum ghatti. *Food and Chemical Toxicology*, 50(3-4), 854-860.

Holliday, R. ve Pugh, J. E. (1975). DNA modification mechanisms and gene activity during development. *Science*, 187, 226-232.

Huang, L., Chaurasiya, B., Wu, D., Wang, H., Du, Y., Tu, J. ve Sun, C. (2018). Versatile redox-sensitive pullulan nanoparticles for enhanced liver targeting and efficient cancer therapy. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 14(3), 1005-1017.

Huang, L., Wang, Y., Zhong, K., Jiang, Z., Jia, H., Chen, S., Zhao, Z. ve Chen, X. (2024). In Vitro Characterization and Identification of Potential Probiotic Yeasts Isolated from Zaopocu, a Traditional Fermented Dregs Vinegar from Hainan Island. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 4, 1-15.

Huang, Y. Y., Wu, J. M., Wu, W. T., Lin, J. W., Liang, Y. T., Hong, Z. Z. ve Liu, D. M. (2022). Structural, antioxidant, and immunomodulatory activities of an acidic exopolysaccharide from Lactiplantibacillus plantarum DMDL 9010. *Frontiers in Nutrition*, 9, 1073071.

Huggett, J., Dheda, K., Bustin, S. ve Zumla, A. (2005). Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes & Immunity*, 6(4), 279-284.

Huoman, J., Martínez-Enguita, D., Olsson, E., Ernerudh, J., Nilsson, L., Duchén, K., Gustafsson, M. ve Jenmalm, M. C. (2021). Combined prenatal Lactobacillus reuteri and ω-3 supplementation synergistically modulates DNA methylation in neonatal T helper cells. *Clinical Epigenetics*, 13(1), 135.

Ikken, Y., Morales, P., Martínez, A., Marín, M. L., Haza, A. I. ve Cambero, M. I. (1999). Antimutagenic effect of fruit and vegetable ethanolic extracts against N-nitrosamines evaluated by the Ames test. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(8), 3257-3264.

Irrazábal, T., Belcheva, A., Girardin, S. E., Martin, A. ve Philpott, D. J. (2014). The multifaceted role of the intestinal microbiota in colon cancer. *Molecular Cell*, 54(2), 309-320.

Isacco, C. G., Ballini, A., De Vito, D., Nguyen, K. C., Cantore, S., Bottalico, L., O., Boccellino, M., Di Domenico, M., Sanacroce, L., Arigoni, R., Dipalma, G., Inchingolo, F. (2021). Rebalancing the oral microbiota as an efficient tool in endocrine, metabolic ve immune disorders. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Immune, Endocrine & Metabolic Disorders)*, 21(5), 777-784.

Izzo, A. and Schneider, R. (2016). The role of linker histone H1 modifications in the regulation of gene expression and chromatin dynamics. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 1859(3), 486-495.

İla, H., Hüsunet, E., Ünal F. ve Yüzbaşıoğlu D. (2022). *Genetik toksikoloji.* (Birinci Baskı) Ankara, Türkiye: Nobel Yayınevi, 153–184.

Jeyakumar, B., Ambujam, G., Suganya, K. ve Arunagiri, R. (2022). BRCA-1 mediated activation of NF-κβ and its pro-inflammatory network drives tumorigenesis in benign breast disease patients. *Human Gene*, 33, 201060.

Ji, W., Bian, Z., Yu, Y., Yuan, C., Liu, Y., Yu, L., Chunxiang, L., Zhu, J., Xueyuan, J., Rongwei, G., Zhang, C., Meng, X., Jin, Y., Bai, J., Yu, J., Lee, K. Y., Sun, W. ve Fu, S. (2014). Expulsion of micronuclei containing amplified genes contributes to a decrease in double minute chromosomes from malignant tumor cells. *International journal of cancer*, *134*(6), 1279-1288.

Jones, P. A. (2012). Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nature Reviews Genetics*, 13(7), 484-492.

Jozefczuk, J. ve Adjaye, J. (2011). Quantitative real-time PCR-based analysis of gene expression. In *Methods in enzymology*. Massachusetts: Academic Press, 99-109.

Kada, T. ve Shimoi, K. (1987). Desmutagens and bio-antimutagens–their modes of action. *Bioessays*, 7(3), 113-116.

Kantor, E. D., Rehm, C. D., Du, M., White, E. ve Giovannucci, E. L. (2016). Trends in dietary supplement use among US adults from 1999-2012. *Jama*, 316(14), 1464-1474.

Kanwal, R. ve Gupta, S. (2012). Epigenetic modifications in cancer. *Clinical Genetics*, 81(4), 303-311.

Kara, S. G., Yuzbasioglu, D., Avuloglu-Yilmaz, E. ve Unal, F. (2025). Do the azo food colorings carmoisine and ponceau 4R have a genotoxic potential?. *Toxicology Research*, 14(2), tfaf033.

Karczmarski, J., Rubel, T., Paziewska, A., Mikula, M., Bujko, M., Kober, P. Dadlez, M. ve Ostrowski, J. (2014). Histone H3 lysine 27 acetylation is altered in colon cancer. *Clinical Proteomics*, 11, 1-10.

Kawasaki, H. ve Taira, K. (2004). Induction of DNA methylation and gene silencing by short interfering RNAs in human cells. *Nature*, 431(7005), 211-217.

Kazimierczyk, M. ve Wrzesinski, J. (2021). Long non-coding RNA epigenetics. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(11), 6166.

Kerche-Silva, L. E., Cólus, I. M., Malini, M., Mori, M. P., Dekker, R. F. ve 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.

Khalil, M. A., Sonbol, F. I., Al-Madboly, L. A., Aboshady, T. A., Alqurashi, A. S. ve Ali, S. S. (2022). Exploring the therapeutic potentials of exopolysaccharides derived from lactic acid bacteria and bifidobacteria: antioxidant, antitumor, and periodontal regeneration. *Frontiers in Microbiology*, 13, 803688.

Khan, N., Shahid, S. ve Asif, A. R. (2021). Current analytical strategies in studying chromatin-associated-proteome (Chromatome). *Molecules*, 26(21), 6694.

Kheyrandish, S., Rastgar, A., Hamidi, M., Sajjadi, S. M. ve Sarab, G. A. (2022). Evaluation of anti-tumor effect of the exopolysaccharide from new cold-adapted yeast, *Rhodotorula mucilaginosa* sp. GUMS16 on chronic myeloid leukemia K562 cell line. *International Journal of Biological Macromolecules*, 206, 21-28.

Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Aardema, M., Albertini, S., Eastmond, D., Fenech, M., Ishidate Jr., M., Kirchner, S., Lorge, E., Morita, T., Norppa, H., Surralles, J., Vanhauwaert, A. ve Wakata, A. (2003). Report from the in vitro micronucleus assay working group. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 540(2), 153-163.

Klaude, M., Eriksson, S., Nygren, J. ve Ahnström, G. (1996). The comet assay: mechanisms and technical considerations. *Mutation Research/DNA Repair*, 363(2), 89-96.

Kodym, A. ve Afza, R. (2003). Physical and chemical mutagenesis. *Plant Functional Genomics*, 6, 189-203.

Kogani, G., Pajtinka, M., Babincova, M., Miadokova, E., Rauko, P., Slamenova, D. ve Korolenko, T. A. (2008). Yeast cell wall polysaccharides as antioxidants and antimutagens: Can they fight cancer? Minireview. *Neoplasma*, 55(5), 387.

Kornberg, R. D. (1974). Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA. *Science*, 184, 868-871.

Krishna, G. ve Hayashi, M. (2000). In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 455(1-2), 155-166.

Kuo, F. C. Neville, M. J., Sabaratnam, R., Wesolowska-Anderson, A., Phillips, D., Wittemans, L. B. L., van Dam, A. D., Loh, N. Y., Todorcevic, M., nton, N., Kentistou, K. A., Joshi, P. K., Hristodulidis, K., Langenberg, C., Collas, P., Karpe, F. ve Pinnick, K., E. (2022). HOTAIR interacts with PRC2 complex regulating the regional preadipocyte transcriptome and human fat distribution. *Cell Reports*, 40, 111136.

Lennartsson, A. ve Ekwall, K. (2009). Histone modification patterns and epigenetic codes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1790(9), 863-868.

Lent, E. M., Crouse, L. C., Quinn Jr, M. J. ve Wallace, S. M. (2012). Assessment of the in vivo genotoxicity of isomers of dinitrotoluene using the alkaline Comet and peripheral blood micronucleus assays. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 742(1-2), 54-60.

Li, E. ve Zhang, Y. (2014). DNA methylation in mammals. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 6(5), a019133.

Li, G., Tian, Y. ve Zhu, W. G. (2020). The roles of histone deacetylases and their ınhibitors in cancer therapy. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8, 576946.

Li, L. Y., Guan, Y. D., Chen, X. S., Yang, J. M. ve Cheng, Y. (2021). DNA repair pathways in cancer therapy and resistance. *Frontiers in Pharmacology*, 11, 629266.

Li, Q., Cai, W., Li, N., Su, W., Li, H., Zhang, H., Chen, Z., Gong, S., Xiodong, G. Liu, B ve Zeng, F. (2023). Protein-rich yeast extract (® fermgard) has potential antioxidant and anti-aging activities. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 270, 109656.

Lienert, F., Wirbelauer, C., Som, I., Dean, A., Mohn, F. ve Schübeler, D. (2011). Identification of genetic elements that autonomously determine DNA methylation states. *Nature Genetics*, *43*(11), 1091-1097.

Lilly, D. M. ve Stillwell, R. H. (1965). Probiotics: growth-promoting factors produced by microorganisms. *Science*, 147(3659), 747-748.

Liu, L., Xu, J., Na, R., Du, R., Ping, W., Ge, J. ve 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, P., Yang, F., Zhang, L., Hu, Y., Chen, B., Wang, J., Su, L., Wu, M. ve Chen, W. (2022). Emerging role of different DNA methyltransferases in the pathogenesis of cancer. *Frontiers in Pharmacology*, 13, 958146.

Liu, R., Zhang, L. ve Zhang, K. (2024). Histone modification in psoriasis: Molecular mechanisms and potential therapeutic targets. *Experimental Dermatology*, 33(8), e15151.

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

Ma, X. ve Kang, S. (2019). Functional Implications of DNA Methylation in Adipose Biology. *Diabetes*, 68, 871-878.

Madasamy, J., Natarajan, P., Ravi, A. S. ve Somasundaram, S. (2025). Production of polymeric silver nanocomposites using microbial extracellular polymers for the effective removal of chromium (VI) from water. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 15(2), 3083-3097.

Madhuri, K. V. ve Vidya Prabhakar, K. (2014). Microbial exopolysaccharides: biosynthesis and potential applications. *Oriental Journal of Chemistry*, 30(3), 1401-1410.

Madrigal-Santillán, E., Madrigal-Bujaidar, E., Reyes-Arellano, A., Morales-González, J. A., Álvarez-González, I., Sánchez-Gutiérrez, M., Izquierdo-Vega, J. A., Calzada-Mendoza, C. C., Robledo-Anguiano, L. ve Morales-González, Á. (2019). Supramolecular complex formation, a possible antigenotoxic mechanism of glucomannan against aflatoxin B1. *Toxicological & Environmental Chemistry*, 101(7-8), 369-388.

Mahapatra, S. ve Banerjee, D. (2013). Evaluation of in vitro antioxidant potency of exopolysaccharide from endophytic Fusarium solani SD5. *International Journal of Biological Macromolecules*, 53, 62-66.

Mahmoud, M. G., Selim, M. S., Mohamed, S. S., Hassan, A. I. ve Abdal-Aziz, S. A. (2020). Study of the chemical structure of exopolysaccharide produced from streptomycete and its effect as an attenuate for antineoplastic drug 5-fluorouracil that induced gastrointestinal toxicity in rats. *Animal Biotechnology*, 31(5), 397-412.

Malik, S., Kaur, K., Prasad, S., Jha, N. K. ve 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. ve 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.

Martin, C. ve Zhang, Y. (2005). The diverse functions of histone lysine methylation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6(11), 838-849.

Masfria, Dalimunthe, A., Suci, N. ve Syahputra, H. (2024). Phytochemical constituent analysis of Phyllanthus emblica L. Fruit nanoherbals by LC-HRMS and their antimutagenic activity and teratogenic effects. *Molecules*, 29(7), 1642.

Mattiroli, F. ve Penengo, L. (2021). Histone ubiquitination: An ıntegrative signaling platform in genome stability. *Trends in Genetics*, 37, 566-581.

Mazloumi, Z., Farahzadi, R., Rafat, A., Asl, K. D., Karimipour, M., Montazer, M., Movassaghpour, A. A., Dehnad, A. ve Charoudeh, H. N. (2022). Effect of aberrant DNA methylation on cancer stem cell properties. *Experimental and Molecular Pathology*, 125, 104757.

Mehta, J. P., Sahoo, P., Ayakar, S. ve Singhal, R. S. (2025). Paraprobiotics and postbiotics from the probiotic Streptococcus lutetiensis isolated from Indian fermented food demonstrates immunomodulatory potential. *The Microbe*, 7, 100304.

Minarovits, J., Banati, F., Szenthe, K. and Niller, H. H. (2016). Epigenetic regulation. *Patho-Epigenetics of Infectious Disease*, 4, 1-25.

Minina, V. I., Sinitsky, M. Y., Druzhinin, V. G., Fucic, A., Bakanova, M. L., Ryzhkova, A. V., Savchenko, Y.A., Timofeeva, A. A., Titov, R. A., Voronina, E. N., Volobev, V. P. ve Titov, V. A. (2018). Chromosome aberrations in peripheral blood lymphocytes of lung cancer patients exposed to radon and air pollution. *European Journal of Cancer Prevention*, 27(1), 6-12.

Miller, B., Albertini, S., Locher, F., Thybaud, V. ve Lorge, E. (1997). Comparative evaluation of the in vitro micronucleus test and the in vitro chromosome aberration test: industrial experience. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, *392*(1-2), 45-59.

Mohd Nadzir, M., Nurhayati, R. W., Idris, F. N ve Nguyen, M. H. (2021). Biomedical applications of bacterial exopolysaccharides: A review. *Polymers*, 13(4), 530.

Mondal, M. S., Gabriels, J., McGinnis, C., Magnifico, M., Marsilje, T. H., Urban, L., Collis, E., Bojanic, D., Biller, S. A., Frieauff, W., Martus, H. J., Suter, W. ve Bentley, P. (2010). High-content micronucleus assay in genotoxicity profiling: initial-stage development and some applications in the investigative/lead-finding studies in drug discovery. *Toxicological Sciences*, 118(1), 71-85.

Montazerinezhad, S., Emamjomeh, A. ve Hajieghrari, B. (2020). Chromosomal abnormality, laboratory techniques, tools and databases in molecular Cytogenetics. *Molecular Biology Reports*, 47(11), 9055-9073.

Morris, K. V., Chan, S. W. L., Jacobsen, S. E. ve Looney, D. J. (2004). Small interfering RNA-induced transcriptional gene silencing in human cells. *Science*, 305(5688), 1289-1292.

Moscovici, M. (2015). Present and future medical applications of microbial exopolysaccharides. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1012.

Mushtaq, S., Tayyeb, A., Ali, G. ve Bareen, F. E. (2023). Antimutagenic potential of plants and natural products: a review. *Biotechnologies and Genetics in Plant Mutation Breeding*, 227-247.

Müller, D. ve Győrffy, B. (2022). DNA methylation-based diagnostic, prognostic, and predictive biomarkers in colorectal cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1877(3), 188722.

Nagarathnamma, T., Chunchanur, S. K., Rudramurthy, S. M., Vineetha, K. R., Ramamurthy, K., Joseph, J. ve Ambica, R. (2017). Outbreak of Pichia kudriavzevii fungaemia in a neonatal intensive care unit. *Journal of Medical Microbiology*, 66(12), 1759-1764.

Nakamura, N. (2012). Genetic effects of radiation. *Nihon Rinsho. Japanese Journal of Clinical Medicine*, 70(3), 457-460.

Neganova, M. E., Klochkov, S. G., Aleksandrova, Y. R. ve Aliev, G. (2022). Histone modifications in epigenetic regulation of cancer: Perspectives and achieved progress. *Seminars in Cancer Biology*, 83, 452-471.

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.

Nguyen, T. A., Kim, H. Y., Stocker, S., Kidd, S., Alastruey-Izquierdo, A., Dao, A., Harrison, T., Whanyuningsih, R., Rickerts, V., Perfevt, J., Denning, D. W., Nucci, M., Cassini, A., Beardsley, J., Gigante, V., Sati, H., Morrissey, C. O ve Alffenaar, J. W. (2024). Pichia kudriavzevii (Candida krusei): A systematic review to inform the World Health Organisation priority list of fungal pathogens. *Medical Mycology*, 62(6), 132-135.

Northrup, D. L. ve Zhao, K. (2011). Application of ChIP-Seq and related techniques to the study of immune function. *Immunity*, 34(6), 830-842.

Nowak, A., Śliżewska, K., Błasiak, J. ve Libudzisz, Z. (2014). The influence of Lactobacillus casei DN 114 001 on the activity of faecal enzymes and genotoxicity of faecal water in the presence of heterocyclic aromatic amines. *Anaerobe*, 30, 129-136.

Núñez-Martínez, H. N. ve Recillas-Targa, F. (2022). Emerging functions of lncRNA loci beyond the transcript itself. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(11), 6258.

Nurkanto, A., Fanani, A., Nurcahyanto, D. A., Mamangkey, J., Marissa, S., Pasaribu, K. M., Afiati, F., Agustini, W. S., Ahmad, R. Z., Taufik, M., Irawan, H., Adalina, Y., Kusmiati, M. ve Gangga, E. (2025). Anti-hypercholesterolemia properties of exopolysaccharide from Lactiplantibacillus plantarum MI01: computational and in-vivo approaches. *Case Studies in Chemical and Environmental Engineering*, 6, 101146.

Obe, G. ve Durante, M. (2010). DNA double strand breaks and chromosomal aberrations. *Cytogenetic and genome research*, 128(1-3), 8-16.

Ogunremi, O. R., Sanni, A. I. ve Agrawal, R. (2015). Hypolipidaemic and antioxidant effects of functional cereal-mix produced with probiotic yeast in rats fed high cholesterol diet. *Journal of Functional Foods*, 17, 742-748.

Oliveira, R. J., Matuo, R., Da Silva, A. F., Matiazi, H. J., Mantovani, M. S. ve Ribeiro, L. R. (2007). Protective effect of β-glucan extracted from Saccharomyces cerevisiae, against DNA damage and cytotoxicity in wild-type (k1) and repair-deficient (xrs5) CHO cells. *Toxicology in Vitro*, 21(1), 41-52.

Oliveira, R. J., Salles, M. J. S., Silva, A. F. D., Kanno, T. Y. N., Lourenço, A. C. D. S., Leite, V. D. S., Matiazi, H. J., Pesarini, J. R., Riberio, L. R. ve Mantovani, M. S. (2013). In vivo evaluation of the antimutagenic and antigenotoxic effects of β-glucan extracted from Saccharomyces cerevisiae in acute treatment with multiple doses. *Genetics and Molecular Biology*, 36, 413-424.

Organisation for Economic Cooperation and Development. (2016). *Test no. 489: In vivo mammalian alkaline comet assay*. Brüksel: OECD Publishing, 6-34.

Ostling, O. ve Johanson, K. J. (1984). Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 123(1), 291-298.

Oztekin, S., Dikmetas, D. N. ve Karbancıoglu-Guler, F. (2023). A novel exopolysaccharide from cold-adapted yeast Rhodotorula glutinis, along with structural, rheological, antioxidant, and antibiofilm properties. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 4(3), 1-17.

Özdemir, Ö. Ü., Yurt, K., Pektaş, A. N. ve Berk, Ş. (2025). Evaluation and normalization of a set of reliable reference genes for quantitative sgk-1 gene expression analysis in Caenorhabditis elegans-focused cancer research. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids*, 44(2), 91-110.

Pajares, M. J., Palanca-Ballester, C., Urtasun, R., Alemany-Cosme, E., Lahoz, A. ve Sandoval, J. (2021). Methods for analysis of specific DNA methylation status. *Methods*, 187, 3-12.

Pakbin, B., Dibazar, S. P., Allahyari, S., Javadi, M., Amani, Z., Farasat, A. ve Darzi, S. (2022). Anticancer properties of probiotic Saccharomyces boulardii supernatant on human breast cancer cells. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 14(6), 1130-1138.

Palom, Y., Suresh Kumar, G., Tang, L. Q., Paz, M. M., Musser, S. M., Rockwell, S. ve Tomasz, M. (2002). Relative toxicities of DNA cross-links and monoadducts: new insights from studies of decarbamoyl mitomycin C and mitomycin C. *Chemical Research in Toxicology*, 15(11), 1398-1406.

Palumbo, F. S., Federico, S., Pitarresi, G., Fiorica, C. ve Giammona, G. (2020). Gellan gum-based delivery systems of therapeutic agents and cells. *Carbohydrate Polymers*, 229, 115430.

Pan, H. M., Lang, W. Y., Yao, L. J., Wang, Y. ve Li, X. L. (2019). shRNA-interfering LSD1 inhibits proliferation and invasion of gastric cancer cells via VEGF-C/PI3K/AKT signaling pathway. *World Journal of Gastrointestinal Oncology*, 11(8), 622.

Pavlova, K., Panchev, I., Krachanova, M. ve Gocheva, M. (2009). Production of an exopolysaccharide by Antarctic yeast. *Folia Microbiologica*, 54, 343-348.

Peng, X., Sun, Z., Kuang, P. ve Chen, J. (2020). Recent progress on HDAC inhibitors with dual targeting capabilities for cancer treatment. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 208, 112831.

Pérez-Rodríguez, F. J., Cherpillod, P., Thomasson, V., Vetter, P. ve Schibler, M. (2024). Identification of a measles variant displaying mutations impacting molecular diagnostics, Geneva, Switzerland, 2023. *Eurosurveillance*, 29(5), 2400034.

Pessôa, L. C., Belachqer-El Attar, S., Sánchez-Zurano, A., Ciardi, M., Morillas-España, A., Ruiz-Martínez, C., Fernandez, I., Arrabal-Campos, F. M., Pontes, L. A. M. da Silva, J. B. A., Cardoso, L. G., de Souza C. O., Acien, G. ve de Jesus Assis, D. (2024). Exopolysaccharides as bio-based rheology modifiers from microalgae produced on dairy industry waste: Towards a circular bioeconomy approach. *International Journal of Biological Macromolecules*, 279, 135246.

Pineiro, M., Asp, N. G., Reid, G., Macfarlane, S., Morelli, L., Brunser, O. ve Tuohy, K. (2008). FAO Technical meeting on prebiotics. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 42, S156-S159.

Piqué, N., Berlanga, M. ve Miñana-Galbis, D. (2019). Health benefits of heat-killed (Tyndallized) probiotics: an overview. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(10), 2534.

Poetsch, A. R. (2020). The genomics of oxidative DNA damage, repair, and resulting mutagenesis. *Computational and structural biotechnology journal*, *18*, 207-219.

Pourjafar, H., Ansari, F., Sadeghi, A., Samakkhah, S. A. ve 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.

Qvirist, L., Vorontsov, E., Veide Vilg, J. ve Andlid, T. (2017). Strain improvement of Pichia kudriavzevii TY13 for raised phytase production and reduced phosphate repression. *Microbial biotechnology*, *10*(2), 341-353.

Rafique, N., Jan, S. Y., Dar, A. H., Dash, K. K., Sarkar, A., Shams, R., Oandey, V. K., Khan, S. A., Amin, Q. A. ve Hussain, S. Z. (2023). Promising bioactivities of postbiotics: A comprehensive review. *Journal of Agriculture and Food Research*, 14, 100708.

Ragavan, M. L. ve Das, N. (2017). Isolation and characterization of potential probiotic yeasts from different sources. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 10(4), 451-5.

Razin, A. ve Riggs, A. D. (1980). DNA methylation and gene function. *Science*, 210, 604-610.

Royston, K. J., Udayakumar, N., Lewis, K. ve Tollefsbol, T. O. (2017). A novel combination of withaferin A and sulforaphane inhibits epigenetic machinery, cellular viability and induces apoptosis of breast cancer cells. *International journal of molecular sciences*, *18*(5), 1092.

Rinn, J. L. ve Chang, H. Y. (2020). Long noncoding RNAs: molecular modalities to organismal functions. *Annual Review of Biochemistry*, 89(1), 283-308.

Rizwanuddin, S., Kumar, V., Naik, B., Singh, P., Mishra, S., Rustagi, S. ve Kumar, V. (2023). Microbial phytase: Their sources, production, and role in the enhancement of nutritional aspects of food and feed additives. *Journal of Agriculture and Food Research*, 12, 100559.

Saadat, Y. R., Khosroushahi, A. Y. ve Gargari, B. P. (2019). A comprehensive review of anticancer, immunomodulatory and health beneficial effects of the lactic acid bacteria exopolysaccharides. *Carbohydrate Polymers*, 217, 79-89.

Saadat, Y. R., Khosroushahi, A. Y., Movassaghpour, A. A., Talebi, M. ve Gargari, B. P. (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.

Saber, A., Alipour, B., Faghfoori, Z. ve Khosroushahi, A. Y. (2017b). Secretion metabolites of dairy Kluyveromyces marxianus AS41 isolated as probiotic, induces apoptosis in different human cancer cell lines and exhibit anti-pathogenic effects. *Journal of Functional Foods*, 34, 408-421.

Saber, A., Alipour, B., Faghfoori, Z. ve Khosroushahi, A. Y. (2017a). Secretion metabolites of probiotic yeast, Pichia kudriavzevii AS-12, induces apoptosis pathways in human colorectal cancer cell lines. *Nutrition Research*, 41, 36-46.

Salimi, F. ve Imanparast, S. (2023). Characterization of probiotic Pichia sp. DU2-derived exopolysaccharide with oil-in-water emulsifying and anti-biofilm activities. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 195(5), 3345-3365.

Salminen, S., Collado, M. C., Endo, A., Hill, C., Lebeer, S., Quigley, E. M., Sander, M. E., Shamir, R., Swann, J. R. Szajewska, H. ve Vinderola, G. (2021). The International Scientific Association of Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of postbiotics. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 18(9), 649-667.).

Samanta, S. ve Dey, P. (2012). Micronucleus and its applications. *Diagnostic Cytopathology*, 40(1), 84-90.

Sanders, M. E., Merenstein, D. J., Reid, G., Gibson, G. R. ve Rastall, R. A. (2019). Probiotics and prebiotics in intestinal health and disease: from biology to the clinic. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*, 16(10), 605-616.

Sarkar, S., Horn, G., Moulton, K., Oza, A., Byler, S., Kokolus, S. ve Longacre, M. (2013). Cancer development, progression, and therapy: an epigenetic overview. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(10), 21087-21113.

Scolastici, C., de Lima, R. A., Barbisan, L. F., Ferreira, A. L. D. A., Ribeiro, D. A. ve Salvadori, D. M. F. (2008). Antigenotoxicity and antimutagenicity of lycopene in HepG2 cell line evaluated by the comet assay and micronucleus test. *Toxicology in Vitro*, 22(2), 510-514.

Serban, D. E. (2014). Gastrointestinal cancers: influence of gut microbiota, probiotics and prebiotics. *Cancer Letters*, 345(2), 258-270.

Seto, E. ve Yoshida, M. (2014). Erasers of histone acetylation: the histone deacetylase enzymes. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 6, a018713.

Seveiri, R. M., Hamidi, M., Delattre, C., Rahmani, B., Darzi, S., Pierre, G., Sedighian, H., Brasselet, C., Karimitabar, F., Dibazar, S. P., Ghasemi, D. ve Amani, J. (2019). Characterization of the exopolysaccharides from Rhodotorula minuta IBRC-M 30135 and evaluation of their emulsifying, antioxidant and antiproliferative activities. *Medical Science*, 23(97), 381-389.

Sharma, M., Chandel, D. ve 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, R., Mittal, A., Gupta, V. ve Aggarwal, N. K. (2024). Production, purification and characterization of phytase from Pichia kudriavevii FSMP-Y17and its application in layers feed. *Brazilian Journal of Microbiology*, 13, 1-19.

Sieber, O. M., Heinimann, K. ve Tomlinson, I. P. (2003). Genomic instability—the engine of tumorigenesis. *Nature Reviews cancer*, 3(9), 701-708.

Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R. ve 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.

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

Smith, Z. D. ve Meissner, A. (2013). DNA methylation: roles in mammalian development. *Nature Reviews Genetics*, 14(3), 204-220.

Stănciuc, N., Borda, D., Gurgu-Grigore, L., Cotârleț, M., Vasile, A. M., Nistor, O. V., Dumitraşcu, L., Pihurov, M., Pacularu-Burada, B. ve Bahrim, G. E. (2024). Lactiplantibacillus plantarum MIUG BL21 paraprobiotics: Evidences on inactivation kinetics and their potential as cytocompatible and antitumor alternatives. *Food Chemistry:* X, 21, 101114.

Staniszewski, A. ve Kordowska-Wiater, M. (2021). Probiotic and potentially probiotic yeasts Characteristics and food application. *Foods*, 10(6), 1306.

Stephens, K. E., Miaskowski, C. A., Levine, J. D., Pullinger, C. R. ve Aouizerat, B. E. (2013). Epigenetic regulation and measurement of epigenetic changes. *Biological Research for Nursing*, 15(4), 373-381.

Suspiro, A. ve Prista, J. (2011). Biomarkers of occupational exposure do anticancer agents: a minireview. *Toxicology Letters*, 207(1), 42-52.

Terabayashi, T. ve Hanada, K. (2018). Genome instability syndromes caused by impaired DNA repair and aberrant DNA damage responses. *Cell Biology and Toxicology*, 34, 337-350.

Terradas, M., Martín, M., Tusell, L. ve Genescà, A. (2010). Genetic activities in micronuclei: is the DNA entrapped in micronuclei lost for the cell? *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 705(1), 60-67.

Travaglini, K. J., Nabhan, A. N., Penland, L., Sinha, R., Gillich, A., Sit, R. V., Chang, S., Conley, S. D., Mori, Y., Seita, J., Berry, G. G., Shrager, J. B., Metzger, R. J., Kuo, C. S., Neff, N., Weismman, I. L., Quake, S. R. ve Krasnow, M. A. (2020). A molecular cell atlas of the human lung from single-cell RNA sequencing. *Nature, 587*(7835), 619-625.

Tretyakova, N., Villalta, P. W. ve Kotapati, S. (2013). Mass spectrometry of structurally modified DNA. *Chemical Reviews*, 113(4), 2395-2436.

Tripathi, M. K. ve Giri, S. K. (2014). Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. *Journal of Functional Foods*, 9, 225-241.

Tsai, C. M., Chang, K. T., Chen, J. Y., Chen, Y. M., Chen, M. H. ve Perng, R. P. (1996). Cytotoxic effects of gemcitabine-containing regimens against human non-small cell lung cancer cell lines which express different levels of p185neu. *Cancer Research*, 56(4), 794-801.

Udroiu, I. (2025). A double fluorescent staining method ıncreases the sensitivity of the cytokinesis-block micronucleus assay. *Methods and Protocols*, 8(1), 3.

Ünal, F., Saygılı, Y., Akbaş, E. (2022) Kuyruklu Yıldız/Komet Testi. (Ünal, F. ve Yüzbaşıoğlu, D. Editörler). *Genetik Toksikoloji*, Ankara: Nobel Yayınevi, 313-340.

Valdiglesias, V., Laffon, B., Pásaro, E. ve Méndez, J. (2011). Evaluation of okadaic acid-induced genotoxicity in human cells using the micronucleus test and γH2AX analysis. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 74(15-16), 980-992.

Venkatesan, S., Natarajan, A. T. ve Hande, M. P. (2015). Chromosomal instability—mechanisms and consequences. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 793, 176-184.

Vernocchi, P., Del Chierico, F. ve Putignani, L. (2020). Gut microbiota metabolism and interaction with food components. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(10), 3688.

Vodicka, P., Musak, L., Vodickova, L., Vodenkova, S., Catalano, C., Kroupa, M., Naccarati, A., Polivkova. Z., Vymetalkova, V. Försti, A. ve Hemminki, K. (2018). Genetic variation of acquired structural chromosomal aberrations. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 836, 13-21.

Waddington, C. H. (1942). The epigenotype. *International Journal of Epidemiology*, 41, 10-13.

Waddington, C. H. (1957). *The strategy of the genes: A discussion of some aspects of theoretical biology*. London: George Allen and Unwin, 7-52.

Wang, C., Wang, L., Ding, Y., Lu, X., Zhang, G., Yang, J., Zheng, H., Wang, H., Jiang, Y. ve Xu, L. (2017). LncRNA structural characteristics in epigenetic regulation. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(12), 2659.

Wang, D., Zeng, N., Li, C., Li, C., Wang, Y., Chen, B., Long, J., Zhang, N. ve Li, B. (2025). Integrative analysis of transcriptome and metabolome profiling uncovers underlying mechanisms of the enhancement of the synthesis of biofilm in Sporobolomyces pararoseus NGR under acidic conditions. *Microbial Cell Factories*, 24(1), 1-17.

Wang, S., Wang, P., Wang, D., Shen, S., Wang, S., Li, Y. ve Chen, H. (2025). Postbiotics in inflammatory bowel disease: efficacy, mechanism, and therapeutic implications. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 105(2), 721-734.

Waoo, A. A., Singh, S., Pandey, A., Kant, G., Choure, K., Amesho, K. T. ve Srivastava, S. (2023). Microbial exopolysaccharides in the biomedical and pharmaceutical industries. *Heliyon*, 9(8), 3-51.

Weake, V. M. ve Workman, J. L. (2008). Histone ubiquitination: triggering gene activity. *Molecular Cell*, 29(6), 653-663.

Whitwell, J., Smith, R., Chirom, T., Watters, G., Hargreaves, V., Lloyd, M., Phillips, S. ve Clements, J. (2019). Inclusion of an extended treatment with recovery improves the results for the human peripheral blood lymphocyte micronucleus assay. *Mutagenesis*, 34(3), 217-237.

Wilson, A., Grabowski, P., Elloway, J., Ling, S., Stott, J. ve Doherty, A. (2021). Transforming early pharmaceutical assessment of genotoxicity: applying statistical learning to a high throughput, multi end point in vitro micronucleus assay. *Scientific reports*, 11(1), 2535.

Wong, M. L. vee Medrano, J. F. (2005). Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques*, 39(1), 75-85.

Worthley, D. L., Le Leu, R. K., Whitehall, V. L., Conlon, M., Christophersen, C., Belobrajdic, D. ve Young, G. P. (2009). A human, double-blind, placebo-controlled, crossover trial of prebiotic, probiotic, and synbiotic supplementation: effects on luminal, inflammatory, epigenetic, and epithelial biomarkers of colorectal cancer. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 90(3), 578-586.

Wu, Y., Strawn, E., Basir, Z., Halverson, G. ve Guo, S. W. (2007). Aberrant expression of deoxyribonucleic acid methyltransferases DNMT1, DNMT3A, and DNMT3B in women with endometriosis. *Fertility and sterility*, *87*(1), 24-32.

Xie, B., Jiang, Q., Mora, A. ve Li, X. (2021). Automatic cell type identification methods for single-cell RNA sequencing. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, *19*, 5874-5887.

Yahya, S. M., Abdelnasser, S. M., Hamed, A. R., El Sayed, O. H. ve Asker, M. S. (2019). Newly isolated marine bacterial exopolysaccharides enhance antitumor activity in HepG2 cells via affecting key apoptotic factors and activating toll like receptors. *Molecular Biology Reports*, 46(6), 6231-6241.

Yang, J., Xu, J., Wang, W., Zhang, B., Yu, X. ve Shi, S. (2023). Epigenetic regulation in the tumor microenvironment: molecular mechanisms and therapeutic targets. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 8(1), 210.

Yao, Q., Chen, Y. ve Zhou, X. (2019). The roles of microRNAs in epigenetic regulation. *Current Opinion in Chemical Biology*, 51, 11-17.

Ye, C. J., Sharpe, Z., Alemara, S., Mackenzie, S., Liu, G., Abdallah, B., Horne, S., Regan, S. ve Heng, H. H. (2019). Micronuclei and genome chaos: changing the system inheritance. *Genes*, 10(5), 366.

Yıldıran, H., Başyiğit Kılıç, G. ve Karahan Çakmakçı, A. G. (2019). Characterization and comparison of yeasts from different sources for some probiotic properties and exopolysaccharide production. *Food Science and Technology*, 39, 646-653.

Yıldız, B. M., Yuzbasioglu, D., Yuksekdag, Z., Cetin, D., Unal, F. ve Suludere, Z. (2023). In vitro genotoxic and antigenotoxic effects of an exopolysaccharide isolated from Lactobacillus salivarius KC27L. *Toxicology in Vitro*, 86, 105507.

Yin, Z., Zhang, J., Qin, J., Guo, L., Guo, Q., Kang, W. ve Chen, L. (2024). Anti-inflammatory properties of polysaccharides from edible fungi on health-promotion: a review. *Frontiers in Pharmacology*, 15, 1447677.

Yoon, S. ve Eom, G. H. (2016). HDAC and HDAC inhibitor: from cancer to cardiovascular diseases. *Chonnam Medical Journal*, 52(1), 1-11.

Yüzbaşıoğlu, D., Avuloğlu-Yılmaz, E. (2022). Mikronükleus Testi. (Ünal, F., ve Yüzbaşıoğlu, D. Editörler). *Genetik Toksikoloji*, Ankara: Noel Yayınevi, 219-241.

Yüzbasioglu, 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, 503391.

Zaghloul, E. H., Abdel-Latif, H. H., Elsayis, A. ve Hassan, S. W. (2024). Production and characterization of novel marine black yeast's exopolysaccharide with potential antiradical and anticancer prospects. *Microbial Cell Factories*, 23(1), 60.

Zhao, Y., Han, C., Wu, Y., Sun, Q., Ma, M., Xie, Z. ve Pei, H. (2024). Extraction, structural characterization, and antioxidant activity of polysaccharides from three microalgae. *Science of the Total Environment*, 931, 172567.

Zhao, Z., Sun, W., Guo, Z., Zhang, J., Yu, H. ve Liu, B. (2020). Mechanisms of lncRNA/microRNA interactions in angiogenesis. *Life Sciences*, 254, 116900.

Zhou, H., Hu, H. ve Lai, M. (2010). Non-coding RNAs and their epigenetic regulatory mechanisms. *Biology of the Cell*, 102(12), 645-655.

Zhou, W., Wang, J., Man, W. Y., Zhang, Q. W. ve Xu, W. G. (2015). siRNA silencing EZH2 reverses cisplatin-resistance of human non-small cell lung and gastric cancer cells. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 16(6), 2425-2430.



Gazili olmak ayrıcalıktır