

Biyolojide Güncel Yaklaşımlar

Editor
Özlem ÖNEN ÇELEBİ



BİDGE Yayınları

Biyolojide Güncel Yaklaşımlar

Editör: Dr. Öğretim üyesi (Asst.Prof.Dr.) Özlem ÖNEN ÇELEBİ

ISBN: 978-625-372-356-9

1. Baskı

Sayfa Düzeni: Gözde YÜCEL

Yayınlama Tarihi: 25.12.2024

BİDGE Yayınları

Bu eserin bütün hakları saklıdır. Kaynak gösterilerek tanıtım için yapılacak kısa alıntılar dışında yayıncının ve editörün yazılı izni olmaksızın hiçbir yolla çoğaltılamaz.

Sertifika No: 71374

Yayın hakları © BİDGE Yayınları

www.bidgeyayinlari.com.tr - bidgeyayinlari@gmail.com

Krc Bilişim Ticaret ve Organizasyon Ltd. Şti.

Güzeltepe Mahallesi Abidin Daver Sokak Sefer Apartmanı No: 7/9 Çankaya /
Ankara



Content

The Effects of Toxins on Some Vertebrates	4
ÖZLEM ÖNEN ÇELEBİ	4
Mitomisin C'nin Genotoksik ve Sitotoksik Etkileri	34
Şafak SANDAYUK.....	34
Pınar AKSU KILIÇLE	34
Antropojenik Gürültünün Sucul Organizmalar Üzerine Etkileri ...	76
Duygu TANRIKULU	76
Abiyotik Bitki Stresinde Mikro RNA'lar	101
Doğan İLHAN	101
Ümmü Gülsüm KOÇ	101
Mitokondriyal DNA ve Yeni Nesil Sekanslama (NGS)	
Teknolojileri.....	136
Doğan İLHAN	136
Muhsin Muhammet KARAÇAR	136

BÖLÜM I

The Effects of Toxins on Some Vertebrates

ÖZLEM ÖNEN ÇELEBİ¹

Introduction

In all places and situations, there are numerous matters that have an impact on organisms in some materials. Paracelsus, the pioneer of modern toxicology, famously stated, "All substances are poisonous; none are non-toxic. It is the dose that differentiates a poison from a remedy," highlighting this concept most effectively (Figure 1; EC, 2003). The dosage is arguably the most critical concept for toxicologists, as their primary focus of research is to establish the safety thresholds of various substances.

Regrettably, some substances may not exhibit toxic effects even when consumed in large quantities, whereas others can pose a life-threatening risk to organisms even in minimal concentrations. In

¹ Asst. Prof. Dr. Özlem ÖNEN ÇELEBİ, Kafkas University, Science and Art Faculty, Biology Department, Kars/Türkiye, Orcid: 0000-0002-9103-1720, onenozlem@gmail.com

this regard, toxins have garnered interest throughout all eras (Hunter, 2008; Michaelas et al., 2021).



Philippus Theophrastus Aureolus
Bombastus von Hohenheim
PARACELSUS
(Einsiedeln, Zürich, 1493 -
Salzburg, 1541)

Figure 1. All substance are poisons; it is the dose that makes the poison

(EC, 2003).

The diverse biological activities or the presence of various toxins naturally found in living organisms within ecosystems are significant in influencing the health and quality of life of other organisms. With regard to the biological impacts of toxins on vertebrate animals have been evaluated and interpreted by examining recent studies as a clear sign of the impact of toxins.

In nature, certain organisms have the capacity to generate biological compounds that can harm or infect other organisms. Lately, numerous biologically derived metabolites have been determined in organisms. While some are beneficial to living organisms, many are toxic to a broad range of species. It is widely recognized that toxins cause illness and mortality not only in

domestic and wild animals but also in humans (Bérdy, 2005; Al-Khayri et al., 2023).

Toxins are naturally derived poisons that consist of some of the most hazardous substances known (Bissette, 2014). Numerous organisms generate toxins, which are compounds that have detrimental effects on other living beings. Toxins have also been linked to public health concerns and agricultural issues, particularly in the context of food contamination, including bacterial and fungal toxins (FDA, 2024). Toxins in nature serve two fundamental roles: predation and defense. Predation refers to the process of neutralizing a potential prey organism, as observed in species such as spiders, jellyfish, wasps, and sea anemones (HAB, 2024a). Defense mechanisms in organisms aim to deter potential predators. For instance, species like honey bees, ants, and monarch butterflies, along with certain plants like broccoli, produce toxic compounds as a strategy to discourage herbivory by insects [Rojas & Burdfield-Steel, 2018].

Toxins; it refers to the toxic material or recombinant molecule of microorganisms, poisonous plants, animals, viruses, fungi or infectious substances. They are toxic chemicals, usually protein in nature, that are produced by living organisms and have specific biological properties, including immunogenicity (WHO, 2004; Pham et al., 2019).

Toxins' Main Groups

Toxins can be categorized into two primary classes: exotoxins and endotoxins. Exotoxins are secreted by organisms, while endotoxins are considered integral components of the bacterial cell structure. The content of toxins can cause degeneration in organisms when they come into contact with living tissues or are absorbed by living tissues (Kamber et al., 2017; Önen & Aksu

Kılıçlı, 2017; Önen et al., 2017; Popoff, 2018; Hadad et al., 2024; UA, 2024).

From a biological perspective, toxins can be categorized as follows:

- **bacterial toxins** (*Bacillus thuringiensis*, Botulinum, Cholera, Cyanobacteria, *Corynebacterium diphtheriae* toxins, endotoxins, *Pseudomonas aeruginosa*, Shiga toxins, streptolysins produced by streptococci, tetanus toxin produced by bacterial spores called *Clostridium tetani*, virulence factors, Bordetella),
- **enterotoxins** (Cholera and Shiga toxins),
- **exotoxins** (*Pseudomonas aeruginosa* Exotoxin A, Streptolysins),
- **marine toxins** (amphidinols produced by marine polychaetes, ciguatoxins produced by dinoflagellates, Cnidarian venoms, fish poisons, Holothurin, Lyngbya toxins, mollusk poisons, okadaic acid, polyether toxins, saxitoxin produced by dinoflagellates, tetrodotoxin, a poison found in the liver and ovaries of fish from the order Tetraodontiformes),
- **mycotoxins** (aflatoxins, citrinin, cytochalasins, fumonisins, gliotoxin, ibotenic acid, yeast, patulin and penicillic acid, a mycotoxin synthesized by some *Aspergillus sp.* and *Penicillium sp.*, amanitin and phalloidin produced by *Amanita phalloides*, sporidesmins produced by *Sporidesmium bakeri*, some *Aspergillus* species and sterigmatocystin produced by an unidentified *Bipolaris* species, tenuazonic acid produced by *Alternaria tenuis*, trichothecenes produced by *Fusaria*, *Stachybotrys*, *Trichoderma* and some other fungi and some higher plants,

zearalenone produced by *Gibberella zeae*), phytoalexins produced by some plants under stress, Picrotoxin,

- **uremic toxins**, expressed as biodegradable substances retained and accumulated due to renal failure,
- **venoms** (amphibian, arthropod, Cnidarian, Exenatide, fish, mollusc and snake venoms),
- **virulence factors** (*Pseudomonas aeruginosa*) exotoxin-A, Transcription Activator-Like Effectors, Virulence Factors, Bordetella) [NCBI, 2024].

Furthermore, toxins may be categorized based on the specific organ or system of the body where their impacts are most pronounced. These categories include hemotoxins, phototoxins, necrotoxins, and neurotoxins.

Hemotoxins, which are present in certain species of snakes, scorpions, and spiders, exert their harmful effects by damaging erythrocytes and inducing generalized tissue degradation. Phototoxins, like the alpha-terthienyl compound present in marigold plants, may trigger allergic responses in individuals who are particularly sensitive.

A plant-derived toxin that induces an allergic response upon contact or ingestion by a sensitive individual or animal, particularly when subjected to sunlight thereafter. Heracleum plant species can be problematic for mammalia as its sap contains a phototoxin which can cause severe burns on the skin and eyes. Necrotoxins, such as those responsible for necrotizing fasciitis caused by *Streptococcus pyogenes*, destroy the cells they come across and lead to widespread tissue damage. Neurotoxins, including tetrodotoxin present in pufferfish (Familia: Tetraodontidae) and some grey side-gilled sea slugs, disrupt the normal functioning of the nervous system in organisms (Harms et al., 2018; SBS, 2020; SLH, 2024).

In this review, toxins are broadly categorized according to their sources into bacterial, protozoan-origin, fungal, plant-origin, and animal-origin groups:

Bacterial toxins:

Botulinum toxin is recognized as one of the most critical and impactful bacterial toxins globally. Foodborne botulism represents a severe and potentially fatal condition that can occur under certain circumstances. By chance, it occurs infrequently and does not propagate among organisms. Poisoning primarily occurs due to the consumption of potential neurotoxins present in polluting nutriment sources. Botulinum toxins are introduced into the system through improperly processed foods in which the bacteria and spores persist, subsequently proliferating and producing toxins. While botulism is most commonly associated with foodborne toxicity, it can also arise from intestinal infections in infants, wound infections, and through inhalation (Lindström & Korkeala, 2006; Rawson et al., 2023).

Conversely, Botox, a therapeutic substance mainly used for clinical and aesthetic treatments, is produced by the same bacterium (*Clostridium botulinum*). The concentrated and notably adjusted botulinum neurotoxin type A is utilized in Botox treatments. The procedure is administered in a clinical environment, customized according to the patient's requirements, and usually results in minimal adverse reactions, with it being well accepted by most patients (Münchau, & Bhatia, 2000; Nigam & Nigam, 2010; Taşkın & Akpınar, 2024).

Shiga toxin, a distinct and important bacterial toxin, is secreted by *Escherichia coli* and may result in severe food-transmitted diseases (Hunt, 2010; Smith et al., 2014; Terajima et al., 2017; Ekici & Dümen, 2019).

Cyanotoxins are a different group of toxins. Although cyanotoxins have been detected in water resources, they appear to pose a greater threat to terrestrial organisms than to aquatic biota.

Cyanobacteria generate a range of unique metabolites. While some of these Physiological responses may coincidentally exhibit other biological effects, their intrinsic role remains poorly understood.

Marine toxins, including domoic acid, saxitoxin, and brevetoxin, gather in fish and shellfish, thereby entering the food chain.

The impact of certain noxious aquatic plants attributed to toxin synthesis, also encompassing decreased dissolved oxygen in the water due to their growth, demise and decomposition, and nocturnal oxygen consumption. Further damaging outcomes encompass blocking sunlight due to increased algae abundance and damage to the respiratory organs (gills) of fish via some forms of aquatic plants. Marine biotoxins, both lipophilic and hydrophilic, may exhibit varied molecular configurations, toxicological properties, and mechanisms of impact (Kimm-Brinson, & Ramsdell, 2001; Naar et al., 2007; Visciano et al., 2016; Cembella et al., 2023; Hallegraeff et al., 2023; Yuan et al., 2024).

It is known that cyanotoxins can potentially produce cytotoxic, genotoxic, embryological and/or morphological effects in teleosts and amphibians from lower vertebrates. Cyanotoxins can produce free radicals in the organism and suppress markers of reactive oxygen species scavengers (SOD, CAT, GSH, GPx, etc.) associated with free radical damage. This oxidative stress may cause genetic damage, cell toxicity, and eventually cell death in fish (Ferrão-Filho & Kozlowsky-Suzuki, 2011; Nur et al., 2018a,b; Zhong et al., 2020).

Protozoan-origin toxins:

Saxitoxin, produced by some species of dinoflagellates, has been implicated in human illness and death from consumption of toxic oysters (Fig. 2). One study found that domoic acid and saxitoxin accumulate in small fish, like sardines and anchovies, and are then consumed excessively as food through aquatic mammals, such as sea lions, seals, walruses, otters, and whales. Domoic acid

harms the brain and heart, resulting in convulsions and cardiac arrest. If not treated, it can frequently lead to irreversible brain damage.

The toxin is gradually removed from a beast's body over time, but mammals that are repeatedly exposed to it endure more prolonged and intense effects (Figure 2; Watters et al., 1992; Lefebvre et al., 2012; Cusick & Sayler, 2013; Vilariño et al., 2018).

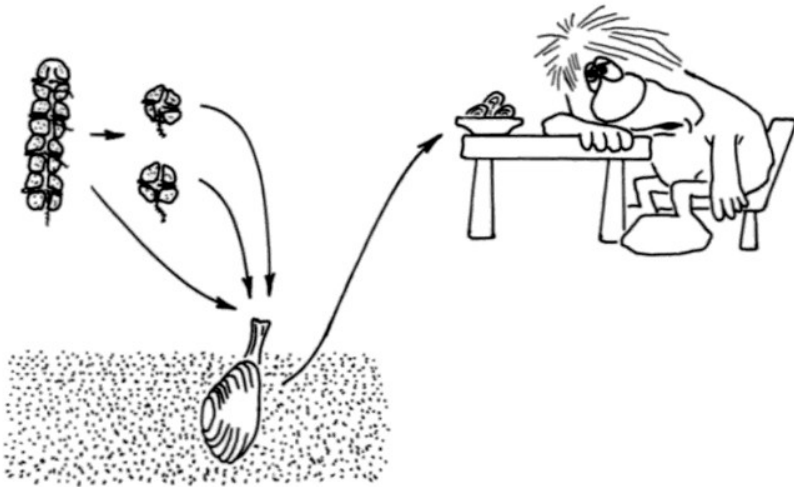


Fig. 2. Shellfish consuming dinoflagellates can accumulate toxins, which may then be transmitted to humans who consume them

(Watters et al., 1992).

Ciguatoxins, another product produced by dinoflagellates, are thought to play a role in the decreasing population of severely at risk of extinction Hawaiian monk seals in the northwestern Hawaiian Islands. These toxins have also been detected in the hematic fluid and tissue structures of stranded deceased seals, at concentrations high enough to cause toxic response in laboratory rodents.

The significant levels of exposure to ciguatoxins in the food chain and the transfer between layers of the food chain suggest that aforementioned toxins must be taken into account in studies of the vitality or mortality among marine mammals in regions affected by ciguatera (Roué et al., 2016; Rhodes et al., 2017; Clausen et al., 2023).

Fungal toxins:

Various fungal species synthesize toxins that have a considerable influence on agriculture, public health, and economic sectors. Species from *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, and *Alternaria* genera account for most agricultural mycotoxin contamination incidents. These fungi are widely recognized as prevalent constituents of the microbial communities associated with diverse cultivated crops, including maize, peanuts, tree nuts, grapes, coffee, cotton, wheat, barley, and other cereal grains.

Mycotoxins, which are major fungal toxins. Mycotoxins are hazardous substances synthesized by fungi like *Aspergillus*, *Penicillium*, and *Fusarium*, which taint numerous consumables and significantly threaten public health. Certain *Aspergillus* species serve as primary sources of aflatoxins, whereas *F. verticillioides* and *F. proliferatum* are accountable for the synthesis of fumonisins. The impacts of these mycotoxin classes on both human and animal health have been extensively researched investigated and well-documented in the scientific literature.

As a result, these mycotoxins represent a significant risk to food safety, prompting regulatory measures that restrict the movement of agricultural products intended for human consumption and livestock feed (Logrieco et al., 2003; Greeff-Laubscher et al., 2019; Pandey et al., 2023; Mafe & Büsselberg, 2024).

Plant-origin toxins:

Plant-derived toxins, often referred to be allelochemicals or secondary metabolites, are hypothesized to have evolved for the purpose of protective adaptations against herbivores, including entomological species and mammalian organisms. Plant-derived toxins may occasionally be unappealing, yet they are not inherently harmful, or they can exhibit acute toxicity to a broad spectrum of organisms (Daly et al., 2005). Various classes of plant-derived toxic substances exist, such as sulfur-based chemicals, lipids, phenolic substances, alkaloids, and glycosidic agents (Önen et al., 2017).

Plant-derived toxins encompass certain substances commonly associated with misuse, including cocaine, caffeine, nicotine, morphine, and cannabinoids. The toxic substances present in plants may be incorporated into human diets.

Examples include the carcinogenic safrole found in peppers, the cholinesterase inhibitors found in potatoes, and the potential teratogens solanine and chaconine. Quinones and phenols are common toxins found in foods. Alkaloids are nitrogen-containing organic compounds primarily synthesized by dicot species. These compounds, often exhibiting significant pharmacological properties, constitute the core of various therapeutic agents. Numerous studies have indicated that these substances can be toxic through both respiratory and digestive pathways. Lipids and phenols are also identified as key plant-derived toxins. Furthermore, lipids and phenols are acknowledged as significant plant-derived toxins (Norton, 2008; Gilbert, 2011; Hodgson, 2012).

Vegetation like azaleas, laurels, and rhododendrons contain grayanotoxins, known to disrupt the function of sodium channels in the body. Consumption of the plants in question may lead to gastrointestinal symptoms and possible potential impairment to cardiac function. The ingestion of yew can lead to cardiovascular toxicity due to the presence of taxine compounds. Unfortunately, an effective antidote has yet to be discovered to these toxins and the

management is restricted to supportive measures, so these types of plants are known to harm amphibians, reptiles, avian species and mammalian organisms. (Jansen et al., 2012; Anderson et al., 2021; CONTAM et al., 2023).

Animal-origin toxin:

Venomous organisms are capable of synthesizing venom within specialized exocrine glands or cellular clusters, and administering their toxic substances through biting or injecting venom.

Envenomed animals have no mechanism or structure for delivering their venom, and poisoning generally results from the ingestion of toxic substances.

Animals competent of producing venom are widely distributed throughout the animal kingdom, from a single-celled protist (*Gonyaulax sp.*) to some mammals and even the platypus. Over 400 species of snakes are regarded as posing a significant threat to human health.

A vast number of venomous arthropods exist, they are present in almost all marine environments, including seas and oceans (Gomez et al., 1999; Utkin, 2015).

Based on the reviewed information, it was concluded that toxin-induced toxicity can vary in severity, contingent upon the affected organism group and the method of exposure. It was further determined that toxicity escalates in proportion to both the quantity of toxin exposure and the length of time of the exposure. It is also thought that the responses may differ based on the kind of toxin. Accordingly, the evaluated investigation findings were deemed to align closely with one another (Kularatne & Senanayake, 2014).

Toxins produced by livings have two main functions: defense and hunting. Predation is the killing of creatures that have the

potential to become food (e.g. anemones, insects and jellyfish). Defense is an action taken to dissuade a predator (for example, some plants produce a toxin so that insects do not eat them) (SLH, 2012; Kimura et al., 2013; Dunbar et al., 2019; Watkins, 2023).

Comparative Assessments

Fish are considered one of the important components of aquatic ecosystems as they are sensitive to toxins in water. Especially cyanotoxins have important effects on the aquatic ecosystem (Briand et al., 2003; Christensen & Khan, 2020; Banerjee et al., 2021; Falfushynska et al., 2023).

In a study investigating the effects of gambiertoxin/ciguatoxin, a fat-soluble compound produced by *Gambierdiscus* individuals from dinoflagellates and extracted by organic solvents, and tetrodotoxin produced by some fish, on fish, it was stated that these toxins caused sensitivity in the nerves of fish (Flowers, 1989; Lehane & Lewis, 2000).

On the other hand, it has been stated that chronic toxicity resulting from aflatoxins causes significant carcinomas and immune responses due to immunotoxicity in fish (Rodríguez-Cervantes et al., 2010).

In research involving frogs of the genus *Bufo*, certain species were found to produce and retain a range of compounds identified as steroidal bufadienolides (Daly et al., 2005; Goel & Ram, 2009). These compounds belong to the class of cardiac glycosides and act by inhibiting nerve function in the heart, leading to arrhythmias, bradycardia, tachycardia, or potentially cardiac arrest in predators. Leptodactylid frogs, encompassing numerous species native to the neotropics, possess phenolic amine compounds present in their epidermis, which exhibit toxicity toward vertebrate predators (Carrillo et al., 2024).

Tetrodotoxins (TTX), a distinct category of amphibian toxins, were initially identified in salamanders belonging to the family Salamandridae, with particular emphasis on the genus *Taricha*. The *Taricha granulosa* salamander, native to North America, is considered the most toxic species of salamander in this region and is believed to pose a potential threat to human health (Figure 3) [Mahoney et al., 2023; ADFG, 2024]. This species, European Triturus salamanders, contains tetrodotoxin, a sodium channel blocker, in their skin that is a potent neurotoxin. This implies that it blocks the generation of action potentials in neurons, thereby disrupting the transmission of signals within the nervous system and inhibiting the contraction of muscles (Geffeney & Ruben, P. 2006). Among the most extensively studied frog species possessing skin toxins are the poison dart frogs native to South America. In contrast to Bufo frogs and salamanders, which produce their endogenous toxins, poison dart frogs acquire lipophilic alkaloid toxins from their diet, which typically includes small arthropods like mites, ants, springtails, and flies (Daly, 1998; Marks & Doyle, 2024).



Figure. 3. Roughskin Newt (Taricha granulosa)

[ADFG, 2024].

It is known that cyanotoxins can potentially produce cytotoxic, genotoxic, embryological and/or morphological effects in teleosts and amphibians from lower vertebrates. Cyanotoxins can produce free radicals in the organism and downregulate bioindicators (SOD, CAT, GSH, GPx, etc.) indicators of antioxidant defense related to oxidative stress. This oxidative stress may result in genotoxic effects, cellular toxicity, and ultimately apoptosis in fish (Oberem et al., 1999; Chen et al., 2013; Banerjee et al., 2021).

Most amphibians also breathe through their skin, making them particularly vulnerable to any chemicals found in the water. The problems observed in amphibians arise from the fact that their skin is more permeable than other vertebrates. Some amphibians do not have lungs completely and can only breathe through the skin. Therefore, any chemicals found in water can be directly toxic to amphibians. This may be one of the reasons why we monitor them as indicators of environmental health (Moore, 2023).

On the other side, feeding on insects is common for some reptiles, but no reptile should ever eat fireflies. Lightning bugs produce a toxin known as lucibufagin, which induces intense queasiness, potentially leading to cardiac damage and often resulting in death within hours. Pogona lizards are particularly susceptible to firefly poisoning due to their irregular diet, but all species of reptiles and amphibians are susceptible to toxic exposure from this insect. In addition to fireflies, other insects including monarch butterflies (*Donaus plexippus*), queen butterflies (*D. gilippus*) and large milkweed bug (*Oncopeltus fasciatus*) have been reported to cause similar adverse effects in reptiles (ASPCA, 2022; WEPC, 2024).

Avocado has been reported to be lethal to birds due to the presence of persin in its peel and fruit. Persin can cause heart damage and even death in birds if ingested (ASPCA, 2022).

In another source where the botulism effect is mentioned, it is reported that the neuroparalytic toxin produced by the *Clostridium botulinum* bacteria is ingested by waterfowl. A botulism epidemic

begins when waterfowl ingest invertebrates containing toxins. As more birds die from the botulism effect, the cycle accelerates as more toxin-carrying invertebrates reproduce and more birds ingest toxin-containing invertebrates. Mycotoxins are produced by some fungi. Mycotoxicosis occurs when toxins produced in contaminated food are ingested. Red-tide events, defined as phytoplankton blooms, have been reported to be associated with sudden waterfowl deaths. Toxins produced by another cyanobacterium, the *Anabaena* species, have also been reported to cause waterfowl deaths (WEPC, 2024).

Domoic acid is synthesized during an algal proliferation, which is defined as an overgrowth of the species *Pseudo-nitzschia australis*. Similarly, saxitoxin, generated by dinoflagellates such as *Alexandrium*, *Gymnodinium*, and *Pyrodinium*, has been implicated in human illness and death from the consumption of toxic oysters. A study has shown that domoic acid and saxitoxin accumulate in diminutive fish like sardines and anchovies, and these small fish are then consumed in large quantities as food by some marine mammals such as sea lions, seals, walruses, otters and whales. Domoic acid affects the central nervous system and cardiovascular system, leading to convulsions and cardiac arrest. If not addressed, it frequently results in irreversible cerebral injury. The toxin is gradually cleared from the animal's physiological processes in the course of time, but mammals subjected to the toxin repeatedly experience more persistent and intense outcomes (Lefebvre et al., 2016; Broadwater et al., 2018; HAB, 2024b; MMC, 2024a,b).

References

- ADFG (Alaska Department Fish and Game) [2024]. Roughskin Newt (*Taricha granulosa*). https://www.adfg.alaska.gov/index.cfm?adfg=roughskinnewt.photo_gallery Access date: 04.10.2024
- Al-Khayri, J. M., Rashmi, R., Toppo, V., Chole, P. B., Banadka, A., Sudheer, W. N., Nagella, P., Shehata, W. F., Al-Mssallem, M. Q., Alessa, F. M., Almaghasla, M. I., & Rezk, A. A. (2023). Plant Secondary Metabolites: The Weapons for Biotic Stress Management. *Metabolites*, 13(6), 716. <https://doi.org/10.3390/metabo13060716>
- Anderson, D. M., Fensin, E., Gobler, C. J., Hoeglund, A. E., Hubbard, K. A., Kulis, D. M., ... & Trainer, V. L. (2021). Marine harmful algal blooms (HABs) in the United States: History, current status and future trends. *Harmful Algae*, 102, 101975.
- ASPCA (American Society for the Prevention of Cruelty to Animals) (2022). Toxic Substances to Be Wary of Around Your Birds, Reptiles and Amphibians. <https://www.asPCA.org/news/toxic-substances-be-wary-around-your-birds-reptiles-and-amphibians> Access date: 31.05.2024
- Banerjee, S., Maity, S., Guchhait, R., Chatterjee, A., Biswas, C., Adhikari, M., & Pramanick, K. (2021). Toxic effects of cyanotoxins in teleost fish: a comprehensive review. *Aquatic Toxicology*, 240, 105971. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2021.105971>

Berdy, J. (2005). Bioactive microbial metabolites. *The Journal of antibiotics*, 58(1), 1–26. <https://doi.org/10.1038/ja.2005.1>

Bissette, A., (2014). The five most poisonous substances: from polonium to mercury. <https://theconversation.com/the-five-most-poisonous-substances-from-polonium-to-mercury-29619>
Access date: 05.06.2024

Briand, J. F., Jacquet, S., Bernard, C., & Humbert, J. F. (2003). Health hazards for terrestrial vertebrates from toxic cyanobacteria in surface water ecosystems. *Veterinary research*, 34(4), 361–377. <https://doi.org/10.1051/vetres:2003019>

Broadwater, M. H., Van Dolah, F. M., & Fire, S. E. (2018). Vulnerabilities of marine mammals to harmful algal blooms. *Harmful algal blooms: a compendium desk reference*, 191–222. <https://doi.org/10.1002/9781118994672.ch5>

Carrillo, J. F. C., Boaretto, A. G., Santana, D. J., & Silva, D. B. (2024). Skin secretions of Leptodactylidae (Anura) and their potential applications. *The journal of venomous animals and toxins including tropical diseases*, 30, e20230042. <https://doi.org/10.1590/1678-9199-JVATITD-2023-0042>

Cembella, A. D., Espinosa, O., Guzman, L., Krock, B., Lim, P. T., & Place, A. R. (2023). Fish-Killing Marine Algal Blooms: Causative Organisms, Ichthyotoxic Mechanisms, Impacts and Mitigation. <http://dx.doi.org/10.25607/OBP-1964>

Chen, L., Zhang, X., Zhou, W., Qiao, Q., Liang, H., Li, G., Wang, J. & Cai, F. (2013). The interactive effects of cytoskeleton disruption and mitochondria dysfunction lead to reproductive

toxicity induced by microcystin-LR. *PLoS One*, 8(1), e53949.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053949>

Christensen, V. G., & Khan, E. (2020). Freshwater neurotoxins and concerns for human, animal, and ecosystem health: A review of anatoxin-a and saxitoxin. *Science of the Total Environment*, 736, 139515.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139515>

Clausing, R. J., Ben Gharbia, H., Sdiri, K., Sibat, M., Rañada-Mestizo, M. L., Lavenue, L., Hess, P., Chinain, M., & Bottein, M. D. (2023). Tissue Distribution and Metabolization of Ciguatoxins in an Herbivorous Fish following Experimental Dietary Exposure to *Gambierdiscus polynesiensis*. *Marine drugs*, 22(1), 14.
<https://doi.org/10.3390/md22010014>

CONTAM (EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain), Schrenk, D., Bignami, M., Bodin, L., Chipman, J. K., Del Mazo, J., Grasl-Kraupp, B., Hogstrand, C., Hoogenboom, L. R., Leblanc, J. C., Nebbia, C. S., Nielsen, E., Ntzani, E., Petersen, A., Sand, S., Schwerdtle, T., Vleminckx, C., Dusemund, B., Hart, A., Mulder, P., Viviani, B., Anastassiadou, M., Cascio, C., Riolo, F. & Wallace, H. (2023). Risks for human health related to the presence of grayanotoxins in certain honey. *EFSA journal. European Food Safety Authority*, 21(3), e07866.
<https://doi.org/10.2903/j.efsa.2023.7866>

Cusick, K. D., & Sayler, G. S. (2013). An overview on the marine neurotoxin, saxitoxin: genetics, molecular targets, methods of detection and ecological functions. *Marine drugs*, 11(4), 991–1018. <https://doi.org/10.3390/md11040991>

Daly, J. W. (1998). Thirty years of discovering arthropod alkaloids in amphibian skin. *Journal of natural products*, 61(1), 162–172. <https://doi.org/10.1021/np970460e>

Daly, J. W., Spande, T. F., & Garraffo, H. M. (2005). Alkaloids from amphibian skin: a tabulation of over eight-hundred compounds. *Journal of natural products*, 68(10), 1556–1575. <https://doi.org/10.1021/np0580560>

Dunbar, J. P., Sulpice, R., & Dugon, M. M. (2019). The kiss of (cell) death: can venom-induced immune response contribute to dermal necrosis following arthropod envenomations? *Clinical toxicology (Philadelphia, Pa.)*, 57(8), 677–685. <https://doi.org/10.1080/15563650.2019.1578367>

EC (European Commission) (2003). Introduction to Toxicology. https://ec.europa.eu/health/ph_projects/2003/action3/docs/2003_3_09_a21_en.pdf Access Date: 07.08.2024

Ekici, G., & Dümen, E. (2019). *Escherichia coli* and food safety. In *The universe of Escherichia coli*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.82375>

Falfushynska, H., Kasianchuk, N., Siemens, E., Henao, E., & Rzymiski, P. (2023). A review of common cyanotoxins and their effects on fish. *Toxics*, 11(2), 118. <https://doi.org/10.3390/toxics11020118>

FDA (Food and Drug Administration) (2024). Natural Toxins in Food. <https://www.fda.gov/food/chemical-contaminants-pesticides/natural-toxins-food> Access date: 29.09.2024

Ferrão-Filho, A. d. S., & Kozlowsky-Suzuki, B. (2011). Cyanotoxins: Bioaccumulation and Effects on Aquatic Animals. *Marine drugs*, 9(12), 2729–2772. <https://doi.org/10.3390/md9122729>

Flowers, A. E. (1989). *The effects of ciguatoxin on teleost nerves* (Doctoral dissertation, Queensland University of Technology).

Geffeney, S. L., & Ruben, P. C. (2006). The structural basis and functional consequences of interactions between tetrodotoxin and voltage-gated sodium channels. *Marine drugs*, 4(3), 143–156. <https://doi.org/10.3390/md403143>

Gilbert S.G. (2011). Health Effects of Plant. Toxins. Chapter: 17. In: A Small Dose Toxicology. Second edit. Maria M. Williams (Ed.). p. 19. Healthy World Press; ISBN: 978-0-9833378-3-6

Goel, A., & Ram, V. J. (2009). Natural and synthetic 2H-pyran-2-ones and their versatility in organic synthesis. *Tetrahedron*, 65(38), 7865–7913. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2009.06.031>

Gomez, H. F., Miller, M. J., Desai, A., & Warren, J. S. (1999). Loxosceles spider venom induces the production of alpha and beta chemokines: implications for the pathogenesis of dermonecrotic arachnidism. *Inflammation*, 23(3), 207–215. <https://doi.org/10.1023/a:1020217818245>

Greeff-Laubscher, M. R., Beukes, I., Marais, G. J., & Jacobs, K. (2019). Mycotoxin production by three different toxigenic fungi genera on formulated abalone feed and the effect of an aquatic

environment on fumonisins. *Mycology*, 11(2), 105–117.
<https://doi.org/10.1080/21501203.2019.1604575>

HAB (U.S. National Office for Harmful Algal Blooms),
2024a. Poisons and toxins.
<https://www.sciencelearn.org.nz/resources/364-poisons-and-toxins>
Access Date: 05.07.2024.

HAB (U.S. National Office for Harmful Algal Blooms),
2024b. Impacts of HABs on Marine Mammals.
<https://hab.whoi.edu/impacts/impacts-wildlife/marine-mammals/>
Access date: 15.05.2024

Hadad, A. M. A., ELHag, G. A., Abu Zeid, I. M., & Sulieman, A. M. E. (2024). Endotoxin and External Bacteria Toxins. In: *Microbial Toxins in Food Systems: Causes, Mechanisms, Complications, and Metabolism* (pp. 221–233). Cham: Springer Nature Switzerland.

Hallegraeff, G. M., Anderson, D. M., Davidson, K., Gianella, F., Hansen, P. J., Hegaret, H., Iwataki, M., Larsen, T. O., Mardones, J., MacKenzie, L., ... & Rensel, J. E. (2023). Fish-Killing Marine Algal Blooms: Causative Organisms, Ichthyotoxic Mechanisms, Impacts and Mitigation. <https://doi.org/10.25607/OBP-1964>

Harms, A., Brodersen, D. E., Mitarai, N., & Gerdes, K. (2018). Toxins, targets, and triggers: an overview of toxin-antitoxin biology. *Molecular cell*, 70(5), 768–784.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.01.003>

Hodgson E. (2012). Toxins and Venoms. Chapter: 14. In: *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 112, 373-

415. David B. Teplow (Ed.). Elsevier Inc. ISSN: 1877–1173.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415813-9.00014-3>

Hunt, J. M. (2010). Shiga toxin–producing *Escherichia coli* (STEC). *Clinics in laboratory medicine*, 30(1), 21–45.
<https://doi.org/10.1016/j.cll.2009.11.001>

Hunter P. (2008). A toxic brew we cannot live without. Micronutrients give insights into the interplay between geochemistry and evolutionary biology. *EMBO reports*, 9(1), 15–18.
<https://doi.org/10.1038/sj.embor.7401148>

Jansen, S. A., Kleerekooper, I., Hofman, Z. L., Kappen, I. F., Stary-Weinzinger, A., & van der Heyden, M. A. (2012). Grayanotoxin poisoning: 'mad honey disease' and beyond. *Cardiovascular toxicology*, 12(3), 208–215.
<https://doi.org/10.1007/s12012-012-9162-2>

Kamber, U., Gülbaz, G., Aksu, P., & Doğan, A. (2017). Detoxification of aflatoxin B1 in red pepper (*Capsicum annuum* L.) by ozone treatment and its effect on microbiological and sensory quality. *Journal of Food Processing and Preservation*, 41(5), e13102. <https://doi.org/10.1111/jfpp.13102>

Kimm-Brinson, K. L., & Ramsdell, J. S. (2001). The red tide toxin, brevetoxin, induces embryo toxicity and developmental abnormalities. *Environmental Health Perspectives*, 109(4), 377–381. <https://doi.org/10.1289/ehp.0110937>

Kimura, L. F., Prezotto-Neto, J. P., Távora, B. de C., Antoniazzi, M. M., Knysak, I., Gióia Guizze, S. P., Santoro, M. L., & Barbaro, K. C. (2013). Local inflammatory reaction induced by *Scolopendra viridicornis* centipede venom in mice. *Toxicon: official*

journal of the International Society on Toxinology, 76, 239–246.
<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.10.017>

Kularatne, S. A., & Senanayake, N. (2014). Venomous snake bites, scorpions, and spiders. *Handbook of clinical neurology*, 120, 987–1001. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-4087-0.00066-8>

Lefebvre, K. A., Frame, E. R., & Kendrick, P. S. (2012). Domoic acid and fish behavior: A review. *Harmful Algae*, 13, 126–130. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2011.09.011>

Lefebvre, K. A., Quakenbush, L., Frame, E., Huntington, K. B., Sheffield, G., Stimmelmayer, R., Bryan, A., Kendrick, P., Ziel, H., Goldstein, T., Snyder, J.A., Gelatt, T., Gulland, F., Dickerson, B. & Gill, V. (2016). Prevalence of algal toxins in Alaskan marine mammals foraging in a changing arctic and subarctic environment. *Harmful algae*, 55, 13–24.

Lehane, L., & Lewis, R. J. (2000). Ciguatera: recent advances but the risk remains. *International journal of food microbiology*, 61(2-3), 91–125. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00382-2](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00382-2)

Lindström, M., & Korkeala, H. (2006). Laboratory diagnostics of botulism. *Clinical microbiology reviews*, 19(2), 298–314. <https://doi.org/10.1128/CMR.19.2.298-314.2006>

Logrieco, A., Bottalico, A., Mulé, G., Moretti, A., & Perrone, G. (2003). Epidemiology of toxigenic fungi and their associated mycotoxins for some Mediterranean crops. *Epidemiology of Mycotoxin Producing Fungi: Under the aegis of COST Action 835 'Agriculturally Important Toxigenic Fungi 1998–2003', EU project (QLK 1-CT-1998-01380)*, 645–667.

Mafe, A. N., & Büsselberg, D. (2024). Mycotoxins in Food: Cancer Risks and Strategies for Control. *Foods*, 13(21), 3502. <https://doi.org/10.3390/foods13213502>

Mahoney, M. J., , Gin, K., Chang, A. T., Michelle S. Koo, M. S. (2023). *Taricha granulosa*: Rough-skinned newt. <https://amphibiaweb.org/species/4288> Access date: 18.11.2023

Marks, S.B. & Doyle, D. (2024). *Taricha granulosa* (Skilton, 1849) Rough-skinned Newt, Roughskin Newt, Northern Rough Skin Newt, Crater Lake Newt. https://amphibiaweb.org/cgi/amphib_query?where-genus=Taricha&where-species=granulosa&account=lannoo Access date: 25.10.2024

Michaleas, S. N., Laios, K., Tsoucalas, G., & Androutsos, G. (2021). Theophrastus Bombastus von Hohenheim (Paracelsus) (1493–1541): The eminent physician and pioneer of toxicology. *Toxicology Reports*, 8, 411–414.

MMC (The Marine Mammal Center) (2024a). Red Tides and Domoic Acid Toxicity. <https://www.marinemammalcenter.org/science-conservation/research-library/domoic-acid-toxicosis#:~:text=Domoic%20acid%20is%20produced%20during,sea%20lions%20in%20large%20quantities.> Access date: 19.05.2024)

MMC (The Marine Mammal Center) (2024b). Algal Toxins in Alaskan Marine Mammals Foraging in a Changing Environment. <https://www.marinemammalcenter.org/publications/algal-toxins-in->

alaskan-marine-mammals-foraging-in-a-changing-environment

Access date: 20.05.2024)

Moore, A. (2023). What Amphibians Can Tell Us About Water Quality. Forestry and Environmental Resources Research, <https://cnr.ncsu.edu/news/2023/04/amphibians-water-quality/#:~:text=Most%20amphibians%20also%20breathe%20through,more%20permeable%20than%20other%20vertebrates>. Access date: 12.05.2024

Münchau, A., & Bhatia, K. P. (2000). Uses of botulinum toxin injection in medicine today. *BMJ (Clinical research ed.)*, 320(7228), 161–165. <https://doi.org/10.1136/bmj.320.7228.161>

Naar, J. P., Flewelling, L. J., Lenzi, A., Abbott, J. P., Granholm, A., Jacocks, H. M., ... & Landsberg, J. H. (2007). Brevetoxins, like ciguatoxins, are potent ichthyotoxic neurotoxins that accumulate in fish. *Toxicon*, 50(5), 707–723. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2007.06.005>

NCBI (National Center for Biotechnology Information) 2024. Toxin, Biological. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh?Db=mesh&Cmd=DetailsSearch&Term=%22Toxins,+Biological%22%5BMeSH+Terms%5D> Access date: 01.06.2024

Nigam, P. K., & Nigam, A. (2010). Botulinum toxin. *Indian journal of dermatology*, 55(1), 8–14. <https://doi.org/10.4103/0019-5154.60343>

Norton S. (2008). Toxic Effects of Plants. Chapter: 26. *In: Casarett and Doull's Toxicology*. 7th ed. Klaassen C.D. (Ed.) pp. 1103–1115. New York, NY: McGraw-Hill.

Nur, G., Husunet, M. T., Guler, I., Deveci, A., Koc, E., Nur, O., & Kilicle, P. A. (2018a). The effect of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on hepatic histopathology and oxidative stress in rats treated with malathion. *Med. Sci*, 7, 604–609. <https://doi.org/10.5455/medscience.2018.07.8833>

Nur, G., Güven, A., & Kılıçle, P. A. (2018b). The effects of CAPE on oxidative stress and histopathological values in rats treated with subacute dichlorvos. *Journal of Cellular Neuroscience and Oxidative Stress*, 10(1), 647–655. <https://doi.org/10.37212/jcnos.418660>

Oberemm, A., Becker, J., Codd, G. A., & Steinberg, C. (1999). Effects of cyanobacterial toxins and aqueous crude extracts of cyanobacteria on the development of fish and amphibians. *Environmental Toxicology: An International Journal*, 14(1), 77–88. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1522-7278\(199902\)14:1<77::AID-TOX11>3.0.CO;2-F](https://doi.org/10.1002/(SICI)1522-7278(199902)14:1<77::AID-TOX11>3.0.CO;2-F)

Önen, Ö., Kılıçle, P. A., & Doğan, A. N. C. (2017). Baharat olarak kullanılan bazı bitki ekstraktlarının memeliler üzerindeki genotoksik-antigenotoksik etkileri. *Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 10(2), 103–115.

Önen, Ö., & Aksu Kılıçle, P. (2017). Some Effects of Toxins on Mammalia. *Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 10(2), 192–205.

Pandey, A. K., Samota, M. K., Kumar, A., Silva, A. S., & Dubey, N. K. (2023). Fungal mycotoxins in food commodities: present status and future concerns. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 7, 1162595.

Pham, J. V., Yilma, M. A., Feliz, A., Majid, M. T., Maffetone, N., Walker, J. R., ... & Yoon, Y. J. (2019). A review of the microbial production of bioactive natural products and biologics. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1404. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01404>

Popoff M. R. (2018). "Bacterial Toxins" Section in the Journal Toxins: A Fantastic Multidisciplinary Interplay between Bacterial Pathogenicity Mechanisms, Physiological Processes, Genomic Evolution, and Subsequent Development of Identification Methods, Efficient Treatment, and Prevention of Toxigenic Bacteria. *Toxins*, 10(1), 44. <https://doi.org/10.3390/toxins10010044>

Rawson, A. M., Dempster, A. W., Humphreys, C. M., & Minton, N. P. (2023). Pathogenicity and virulence of *Clostridium botulinum*. *Virulence*, 14(1), 2205251. <https://doi.org/10.1080/21505594.2023.2205251>

Rhodes, L. L., Smith, K. F., Murray, S., Harwood, D. T., Trnski, T., & Munday, R. (2017). The Epiphytic Genus *Gambierdiscus* (Dinophyceae) in the Kermadec Islands and Zealandia Regions of the Southwestern Pacific and the Associated Risk of Ciguatera Fish Poisoning. *Marine drugs*, 15(7), 219. <https://doi.org/10.3390/md15070219>

Rodríguez-Cervantes, C., Girón-Pérez, M., Robledo-Marengo, M., Marín, S., Velázquez-Fernández, J., Medina-Díaz, I.,

Rojas-Garcis, A. & Ramos, A. J. W. M. J. (2010). Aflatoxin B1 and its toxic effects on immune response of teleost fishes: a review. *World Mycotoxin Journal*, 3(2), 193–199. <https://doi.org/10.3920/WMJ2009.1202>

Rojas, B., Burdfield-Steel, E. (2018). Predator Defense. In: Vonk, J., Shackelford, T. (eds) *Encyclopedia of Animal Cognition and Behavior*. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-47829-6_708-1

Roué, M., Darius, H. T., Picot, S., Ung, A., Viallon, J., Gaertner-Mazouni, N., Sibat, M., Amzil, Z., & Chinain, M. (2016). Evidence of the bioaccumulation of ciguatoxins in giant clams (*Tridacna maxima*) exposed to *Gambierdiscus* spp. cells. *Harmful algae*, 57(Pt A), 78–87. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2016.05.007>

SBS (School of Biomedical Sciences) (2020). Toxin pathologies. <https://biomedicalsciences.unimelb.edu.au/departments/department-of-biochemistry-and-pharmacology/engage/avru/blog/toxin-pathologies> Access date: 08.11.2024

SLH (Science Learning Hub) (2024). Poisons and Toxins. <https://www.sciencelearn.org.nz/resources/364-poisons-and-toxins> Access date: 04.07.2024

Smith, J. L., Fratomico, P. M., & Gunther IV, N. W. (2014). Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Advances in Applied Microbiology*, 86, 145–197. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800262-9.00003-2>

Taşkın, Ö., & Akpınar, A. A. (2024). The enemy at the gate: Botulism. *Turkish Journal of Emergency Medicine*, 24(3), 127–132. http://doi.org/10.4103/tjem.tjem_80_24

Terajima, J., Izumiya, H., Hara-Kudo, Y., & Ohnishi, M. (2017). Shiga Toxin (Verotoxin)-producing *Escherichia coli* and Foodborne Disease: A Review. *Food Safety*, 5(2), 35–53. <https://doi.org/10.14252/foodsafetyfscj.2016029>

UA (Unacademy) (2024). Endotoxins and Exotoxins. <https://unacademy.com/content/neet-ug/study-material/biology/endotoxins-and-exotoxins/> Access date: 09.11.2024

Utkin Y. N. (2015). Animal venom studies: Current benefits and future developments. *World Journal of Biological Chemistry*, 6(2), 28–33. <https://doi.org/10.4331/wjbc.v6.i2.28>

Vilariño, N., Louzao, M. C., Abal, P., Cagide, E., Carrera, C., Vieytes, M. R., & Botana, L. M. (2018). Human Poisoning from Marine Toxins: Unknowns for Optimal Consumer Protection. *Toxins*, 10(8), 324. <https://doi.org/10.3390/toxins10080324>

Visciano, P., Schirone, M., Berti, M., Milandri, A., Tofalo, R., & Suzzi, G. (2016). Marine biotoxins: occurrence, toxicity, regulatory limits and reference methods. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1051. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01051>

Watkins III, J. B. (2023). Toxic Effects of Terrestrial Animal Venoms and Poisons: Introduction.

Watters, D., Pearn, J., Maguire, D., & Lavin, M. (1992). *Toxins and Targets*. Routledge. <https://doi.org/10.4324/9781315076911>

WEPC (Wildlife and Exotics Poisoning Concerns), 2024. Toxin Trends. <https://www.petpoisonhelpline.com/uncategorized/wildlife-exotics-poisoning-concerns/> Access date: 25.05.2024

WHO (World Health Organization) (2004). *Public health response to biological and chemical weapons* – WHO guidance. Annex-2: Toxins. 214–228 pp.

Yuan, K. -K., Li, H. -Y., & Yang, W. -D. (2024). Marine Algal Toxins and Public Health: Insights from Shellfish and Fish, the Main Biological Vectors. *Marine Drugs*, 22(11), 510. <https://doi.org/10.3390/md22110510>

Zhong, Y., Shen, L., Ye, X., Zhou, D., He, Y., Li, Y., Ding, Y., Zhu, W., Ding, J. & Zhang, H. (2020). Neurotoxic anatoxin-a can also exert immunotoxicity by the induction of apoptosis on *Carassius auratus* lymphocytes in vitro when exposed to environmentally relevant concentrations. *Frontiers in Physiology*, 11, 316. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00316>

BÖLÜM II

Mitomisin C'nin Genotoksik ve Sitotoksik Etkileri

Şafak SANDAYUK¹
Pınar AKSU KILIÇLE²

1. Giriş

Genotoksisite ve sitotoksisite, hücresel düzeyde meydana gelen zararlı etkileri tanımlamak için kullanılan iki önemli terimdir. Genotoksisite, genetik materyalin, yani DNA'nın yapısında meydana gelen değişiklikler olarak tanımlanmaktadır. Bu değişiklikler, kimyasal maddeler, radyasyon veya biyolojik etmenler gibi çeşitli faktörler tarafından tetiklenebilir. Genotoksik etkenler, DNA'nın yapısını bozarak mutasyonlara, kanser gibi genetik hastalıklara ve doğumsal anomalilere yol açabilir. Bu bağlamda, genotoksisite, bireylerin sağlık durumunu ciddi şekilde tehdit eden bir durumdur. Örneğin, bazı çalışmalar, çeşitli kimyasalların genotoksik etkilerinin, hücrelerin normal işlevlerini bozarak kanser gelişimini tetikleyebileceğini ortaya koymaktadır (Bin & ark., 2012; Yıldız & Önen, 2016;). Sitotoksisite ise hücrelerin canlılığını tehdit eden ve

¹ Doktora Öğrencisi, Kafkas Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Bölümü, Kars/Türkiye, Orcid: 0000-0002-0247-6462, safak.kars@hotmail.com

² Doç. Dr., Kafkas Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Kars/Türkiye, Orcid: 0000-0002-3567-5775, pinar-aksu@hotmail.com

hücre ölümüne yol açabilen etmenleri ifade etmektedir. Sitotoksik etkenler, genellikle kanser tedavisinde kullanılan bazı ilaçlar gibi, hedef hücreleri öldürmek yada büyümelerini inhibe etmek amacıyla tasarlanmış maddelerdir (İşkey & ark., 2023). Bununla birlikte, bazı doğal bileşikler ve kimyasallar da sitotoksik özellikler gösterebilir. Örneğin, bitkisel kaynaklı bazı bileşiklerin, kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri araştırılmış ve bu bileşiklerin belirli konsantrasyonlarda hücre ölümüne neden olabileceği bulunmuştur (Thaweboon & ark., 2014).

Genotoksik maddelerin çevresel, mesleki veya tedavi amaçlı maruziyeti, insan sağlığı açısından önemli bir risk taşır. Örneğin, sigara dumanı, petrol, radyasyon, ağır metaller ve bazı pestisitler genotoksik etkiler gösterebilir (Önen & İşisağ-Üçüncü, 2015; Sertçelik, Akbaba & Öztürkkan, 2021).

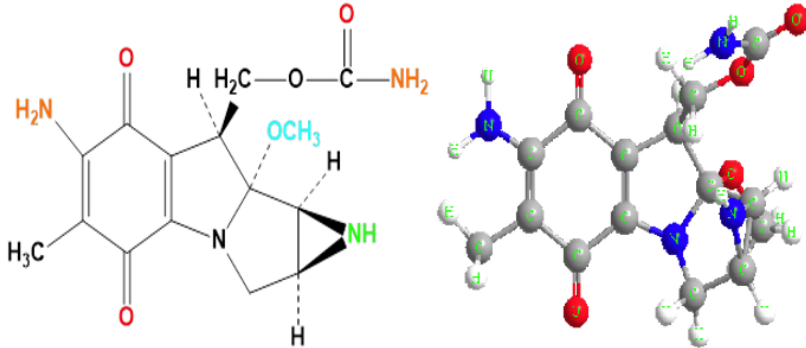
Sonuç olarak, genotoksisite ve sitotoksisite, insan sağlığı açısından ciddi tehditler oluşturan iki önemli kavramdır. Genotoksisite, genetik materyalin yapısında ortaya çıkan değişiklikler ile ilişkiliyken, sitotoksisite hücrelerin canlılığını tehdit eden etmenleri ifade etmektedir. Bu iki olay arasındaki etkileşim, sağlık sorunlarının anlaşılması ve önlenmesi açısından büyük öneme sahiptir. Genotoksik ve sitotoksik etkilerin belirlenmesi, sağlık politikalarının ve buna yönelik antigenotoksik, antisitotoksik olarak koruyucu ürünlerin geliştirilmesi, ayrıca bu etkilerden bireylerin korunması için önemli bir adımdır (Graham-Evans & ark., 2003).

1.1. Mitomisin C (MMC) Genel Özellikleri

Mitomisin C, *Streptomyces caespitosus* adlı mikroorganizmanın fermentasyon kültürlerinde keşfedilmiş bir azridin ve bir pirol indol halkası içeren doğal bir antitümör antibiyotikidir (Danshiitsoodol & ark., 2006). 1974 yılında FDA (Food and Drug Administration) tarafından pankreas ve gastrik kanserlerin tedavisinde diğer ilaçlarla beraber kombinasyon halinde kullanımı onaylanmıştır. Geniş spektrumlu antitümör etkinliği nedeniyle MMC, günümüzde gastrik, servikal, pankreas, kolon ve

baş boyun kanserlerinin kemoterapisinde kullanılmaktadır. MMC'nin süperfisyel mesane kanserlerinde tek başına standart tedavi olabileceği kabul edilmektedir. Ayrıca birçok cerrahi kliniğinde antifibrotik yardımcı ajan olarak da kullanılmaktadır (Bradner, 2001; Bolenz & ark., 2006; Obied & ark., 2012).

MMC mavi mor kristal toz şeklinde bir görünüme sahiptir. Molekül ağırlığı $334.33 \text{ g mol}^{-1}$ ve kapalı kimyasal formülü $\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_5$ şeklindedir (Beijnen & ark., 1987). Açık kimyasal formülü Şekil'1. deki gibidir. Yapısında kinon, azridin ve karbamat denilen üç potansiyel aktif grup yer almaktadır. Erime noktası 300°C 'den fazladır. Su ve organik çözücülerde çözülebilir bir yapıdadır (Crooke & Bradner, 1976).



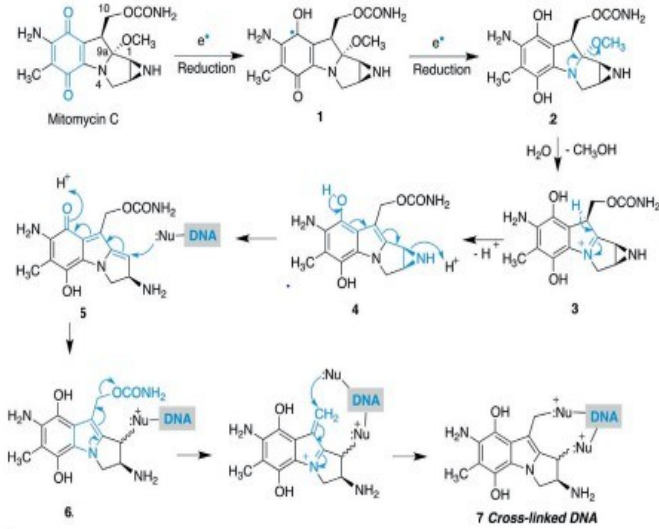
Şekil 1: Mitomycin-C'nin Kimyasal Yapısı ve Üç Boyutlu Görüntüsü

(Uluman, 2019).

1.2. Mitomisin C'nin Aktivasyon Mekanizması

Mitomisin C, biyoredüktif alkilleyici ajanlar sınıfının prototipi olup bu grup antitümoral ilaçların makromolekülleri alkilleyebilmesi için metabolik olarak indirgenmesi gerekmektedir (Kennedy & ark., 1982). MMC'nin indirgenmiş aktivasyon mekanizması oksidoredüktaz enzimleri ve kimyasal indirgenler üzerine yapılan çalışmalarla aydınlatılmıştır. Bu bileşikteki en

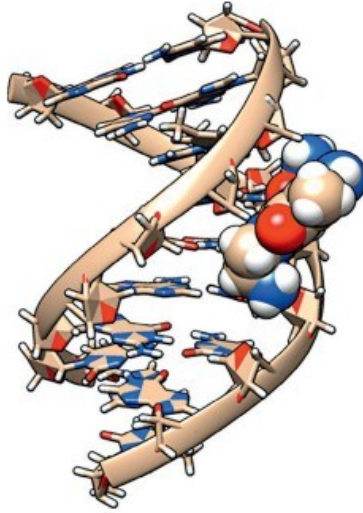
önemli yapı redüktazların substratlarına benzer indirgenme potansiyeline sahip kinondur. Bu bileşikler hipoksik tümörlerin tedavisinde özellikle fayda sağlamaktadır. Çünkü bu ortamlarda hidrokinonların biyolojik indirgenmesi oksijen tarafından tersine çevirilemez. MMC aktivasyonunun ilk aşaması onu bis-alkilleyici ajana dönüştüren kinon (Şekil 2, 1) halkasının hidrokinon formuna (Şekil 2, 2) indirgenmesidir (Siegel & ark., 1990). Oluşan hidrokinon yapısının N-4'deki vinil-amid konjugasyonunun serbest kalması ile hemiaminal gruptan metinolün uzaklaşması ile iminyum türevi bir ara ürün (Şekil 2, 3) oluşur. Bu ara ürünün deprotonasyonu ile yapısında azridin ve karbamat grubu taşıyan bir indol türevi yapı (Şekil 2, 4) oluşur. Azridin azotunun protonlanması ve azridin halkasının C1 ve C9 arasındaki oluşumu nedeniyle açılarak kinon metidin (Şekil 2, 5) oluşur. Kinon metidin hem elektrofilik hem de nükleofilik özelliğe sahiptir. Bu ara ürün DNA üzerindeki nükleofilik gruplarla Michael tipi bir reaksiyon ile, reaksiyona girebilen kararsız yapıda bir ara ürün oluşturur (Şekil 2, 6). Bu reaksiyonda guanin N-2 amino grubunu veya N-7 grubunu nükleofiller olarak kullanır. Mitomisin nedeniyle oluşan alkilasyon olayı genellikle monoalkilasyondur Ancak bazı durumlarda karbamat grubunun uzaklaştırılması sonucunda elektrofilik nitelikte iminyum bileşiğini oluşturmaktadır. Bu bileşiğin C10 pozisyonunun bir DNA guanin N-2 pozisyonuna bağlanması ile ikinci bir alkilasyona uğrayarak DNA çapraz bağlarının oluşmasına neden olur (Şekil 2, 7) (Tomasz & Palom, 1997; Avendo & ark., 2015).



Şekil 2: Mitomisin C ile DNA'nın biyoreduktif alkilenmesi

(Avendo & ark., 2015)

Mitomisinle DNA arasında hem interstrand (zincir içi) hem de intrastrand (zincirler arası) çapraz bağlanma görülebilmektedir. Bu bağlanmalar sırasıyla küçük oluktaki 5'-CG ve 5' -GG dizilerine özgüdür. Bu seçiciliğin ilk alkilasyon olayından kaynaklandığı düşünülmektedir. Erken moleküller modelleme çalışmaları, DNA'yı hedef alan çoğu doğal antibiyotik gibi MMC'ninde mono-addüktlerdeki ve çapraz bağlı adüktlerdeki küçük bir olukta bulunduğunu ve dubleks DNA'nın yapısını bozmadığını göstermiştir (Şekil 3) (Tomasz, 1995).



Şekil 3: Monoalkillenmiş mitomisin C DNA kompleksinin yapısı

(Avendo & ark., 2015)

İki sarmal arasında meydana gelen çapraz bağlanma mitoz evreleri sırasında (özellikle G1 ve S fazlarında) DNA'nın çift sarmal yapısının çözülmesini engelleyerek mitozun gerçekleşmesini önler. MMC'nin ayrıca hipoksik koşullarda hem RNA hemde protein sentezini inhibe edebileceği gösterilmiştir. (Mladenov, Tsaneva & Anachkova, 2007; Arranz-Marquez & ark., 2019)

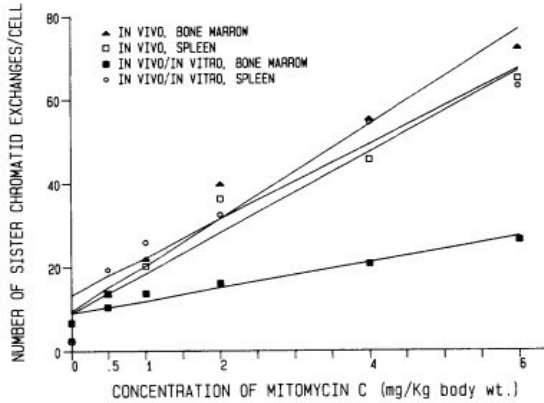
MMCnin genotoksik etkileri özellikle kemoterapi sırasında normal hücelere verdiği zarar nedeniyle önemli bir araştırma konusu olmuştur. MMC'nin genetik materyali nasıl etkilediğini ve potansiyel olarak kanserojenik bir etkiye sahip olup olmadığını belirlemek amacıyla literatürde yapılmış birçok in vivo ve in vitro çalışmalar mevcuttur.

1.3. Mitomisin C'nin in vivo Genotoksik ve Sitotoksik Etkileri

Mohn, (1984) fareleri intraperitonel mitomisin C (kg vücut ağırlığı başına 0-2.0 mg) ile tedavi ettiği çalışmada, test edilen tüm

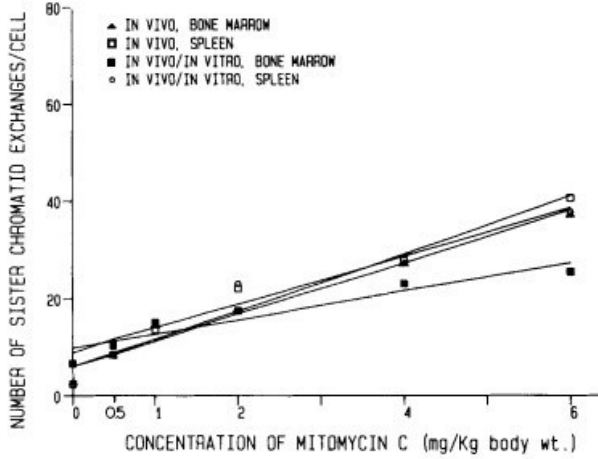
organlarda bulunan bakteri hücrelerinde doza bağlı olarak DNA hasar aktivitesi oluştuğunu ve bu hasarın böbrek ve akciğerlerde en düşük, karaciğer ve kanda ise en yüksek olduğunu bildirmiştir (Mohn, 1984).

Krishna ve arkadaşları (1987) fare ve Çin hamsterlarına farklı konsantrasyonlarda enjekte ettikleri mitomisin C'nin etkilerini in vivo ve invitro koşullar altında yaptıkları kardeş kromatit değişimi testi (SCE) ile analiz ettiler. Çalışma sonuçları türlere, dokulara ve deney koşullarına göre değişen doza bağlı SCE tepkisi olduğunu gösterdi. Çalışmada fare hücrelerinin Çin hamster hücrelerine kıyasla MMC'ye karşı daha duyarlı olduğu ileri sürülmüştür. İn vivo koşullarda elde edilen SCE frekanslarının in vitro koşullara göre daha yüksek olduğu belirtilmiştir. Yine yapılan bu çalışmada dalak hücrelerinin her iki türde in vivo ve in vitro koşullar altında kemik iliği hücrelerine göre daha yüksek SCE değerine sahip olduğu sonucuna varılmıştır (Krishna, Nath & Ong, 1987).



Şekil 4: Mitomisin C'nin, in vivo ve in vivo/in vitro koşullar altında farelerin kemik iliği ve dalak hücrelerinde indüklediği SCE'ler için genel doğrusal regresyon doğruları

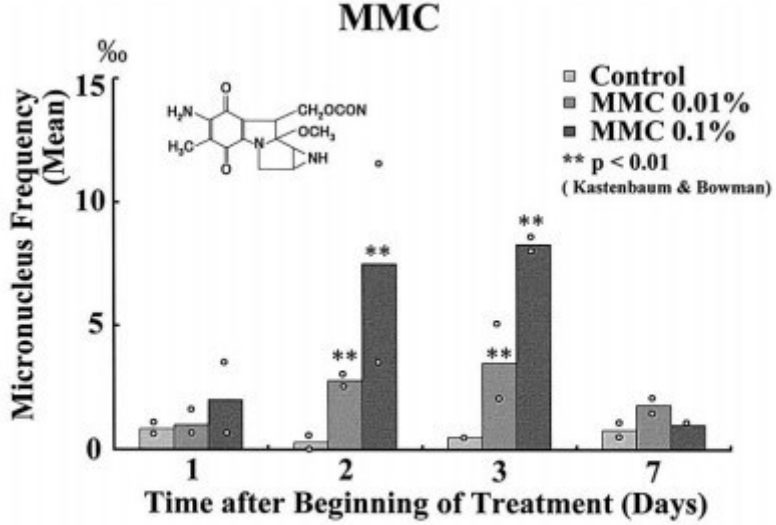
(Krishna, Nath & Ong, 1987)



Şekil 5: Mitomisin C'nin, in vivo ve in vivo/in vitro koşullar altında Çin hamster kemik iliği ve dalak hücrelerinde indüklediği SCE'ler için genel doğrusal regresyon doğruları

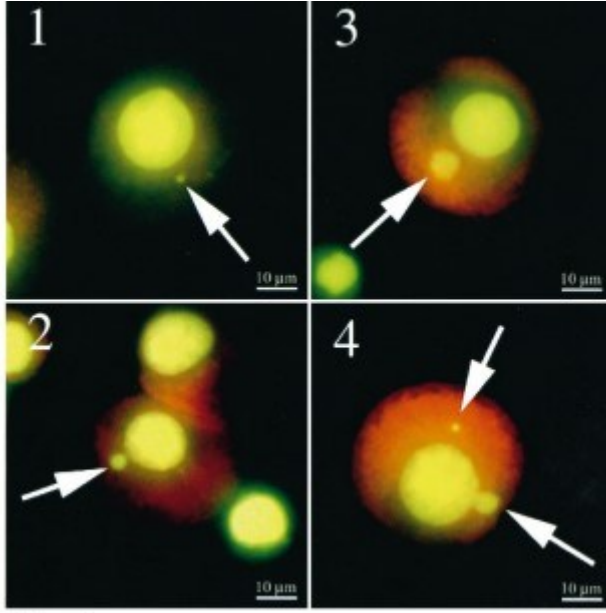
(Krishna, Nath & Ong, 1987)

Nishikawa ve arkadaşları (1999), rat derisini kullanarak yaptıkları invivo çalışmada model klastojen olarak MMC ve MMS (Metil metan sulfonat) seçerek her iki kimyasalın tek ve tekrarlanan uygulamalarda pozitif yanıtlar verdiğini ileri sürmüşlerdir (Şekil 6, 7). Yaptıkları çalışma topikal uygulanan MMC ile MN indüksiyonunun ilk raporudur ve bu çalışmada MMC pozitif kontrol olarak önerilmiştir (Nishikawa & ark., 1999).



Şekil 6: Tek seferlik MMC uygulaması ile indüklenen ortalama mikronükleus frekansları, çeşitli örnekleme zamanlarında gösterilmiştir. Noktalar, bireysel sıçanlar için frekansları temsil etmektedir.

(Nishikawa & ark., 1999)



Şekil 7: Tipik mikronükleuslar: 1. Çok küçük bir mikronükleus, 2. Küçük bir mikronükleus; 3. Büyük bir mikronükleus; 4. Bir hücre, birden fazla mikronükleus içeriyor

(Nishikawa & ark., 1999)

Siddique ve Afzal (2009), mitomisin C'nin fare kemik iliği hücrelerinde oluşturduğu genotoksik hasara karşı apigeninin koruyucu etkisini kromozomal aberasyon (CA) ve kardeş kromatit değişimi testleri aracılığıyla incelemiştir. Çalışmada MMC tedavisi (2 mg/kg), normale karşılaştırıldığında hücre başına anlamlı derecede yüksek sister kromatid değişimlerini ve anormal metafazı indüklediği ve apigenin ile MMC birlikte verildiğinde, hücre başına SCE'lerde ve anormal metafaz sayısında doza bağlı olarak anlamlı azalma olduğu rapor edilmiştir (Tablo 1, 2). Araştırma sonuçları apigeninin MMC tarafından indüklenen genotoksisiteye karşı koruyucu rolü olduğu yönündedir (Siddique & Afzal, 2009).

Tablo 1: Fare kemik iliği hücrelerinde sister kromatid değişimlerinin (SCE) sıklığı.

Treatment	Number of metaphases analysed	Mean $\pm$ SCEs/metaphase
Apigenin (mg/kg b.w.)		
10	300	2.20 $\pm$ 0.19
20	300	2.24 $\pm$ 0.22
40	300	2.36 $\pm$ 0.24
Negative control	300	1.10 $\pm$ 0.12
Apigenin (mg/kg b.w.) + MMC (mg/kg b.w.)		
10+2	300	8.42 $\pm$ 0.94 ^{b,d}
20+2	300	7.34 $\pm$ 0.84 ^{b,d}
40+2	300	6.24 $\pm$ 0.72 ^{b,d}
MMC (mg/kg b.w.)		
2	300	12.82 $\pm$ 1.78 ^{a,c}
BrdU (1.6 g/kg b.w.)	300	1.79 $\pm$ 0.14
DMSO (0.1 ml/animal)	300	1.94 $\pm$ 0.16

BrdU: 5-Bromo-2-deoxyuridine; SE: Standard error.

^a Significant from the negative control ($P < 0.01$).

^b Significant from mitomycin C treatment ($P < 0.01$).

^c Significant with respect negative control ($P < 0.0005$) ANOVA.

^d Significant with respect mitomycin treatment ($P < 0.0005$) ANOVA.

(Siddique & Afzal, 2009)

Tablo 2: Fare kemik iliği hücrelerinde kromozomal aberrasyonların ortalama yüzdesi

Treatment	Abnormal metaphases without gaps				Chromosome aberrations			
	Number	Mean $\pm$ SE	Gaps		Fragments and or breaks		Polyploidy	
			Number	%	Number	%	Number	%
Apigenin (mg/kg b.w.)								
10	10	2.0 $\pm$ 0.62	8	1.6	8	1.6	2	0.4
20	12	2.4 $\pm$ 0.68	9	1.8	9	1.8	3	0.6
40	13	2.6 $\pm$ 0.71	9	1.8	10	2.0	3	0.6
Negative control	7	1.4 $\pm$ 0.52	4	0.8				
Apigenin (mg/kg b.w.) + MMC (mg/kg b.w.)								
10 + 2	102	20.4 $\pm$ 1.80 ^b	26	5.2	84	16.8	18	3.6
20 + 2	92	18.4 $\pm$ 1.73 ^b	17	3.4	80	1.6	12	2.4
40 + 2	84	16.8 $\pm$ 1.67 ^b	15	3.0	76	15.2	8	1.6
MMC (mg/kg b.w.)								
2	140	28.0 $\pm$ 2.00 ^a	42	8.4	117	23.4	23	4.6
DMSO (0.1 ml/animal)	8	1.6 $\pm$ 0.56	4	0.8	5	1.0	3	0.6

One hundred cells were analyzed per animal for a total of 500 cells per treatment. MMC: Mitomycin C; DMSO: Dimethylsulphoxide; SE: Standard error.

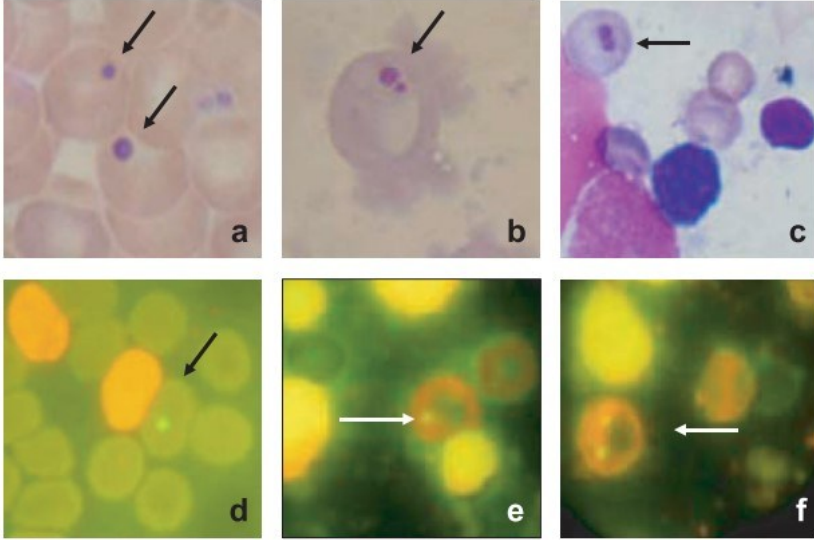
^a Significant from the normal ($P < 0.01$).

^b Significant from mitomycin C treatment ($P < 0.01$).

(Siddique & Afzal, 2009)

Ortega-Gutiérrez ve arkadaşları (2009), ratların periferik kanında mitomisin C tarafından indüklenen genotoksisiteye karşı melatoninin koruyucu etkisini incelemişlerdir. Çalışmada melatonin ve MMC 10 mg/kg ve 2mg/kg olacak şekilde intraperitonel olarak verilmiştir. Periferik kan örnekleri tedaviden 0, 24, 48, 72, ve 96 saat sonra toplanmıştır. 1000 polikromatik eritrosit başına mikronükleuslu polikromatik eritrosit sayısı (MN-PCE), genotoksisite göstergesi olarak kullanılmıştır. Çalışma sonuçlarında MMC'nin 24, 48, 72 ve 96. saatlerde MN-PCE'lerde önemli bir artış gösterdiği ve bu artışın melatonin ile birlikte tedavi edilen gruplarda önemli bir düşüş gösterdiği tespit edilmiştir. Sonuçlar MMC'nin indüklediği genotoksisitenin melatonin ile azalabileceği yönündedir (Ortega-Gutiérrez & ark., 2009).

Pawar ve arkadaşları (2007), Amerikan ginsengi (*Panax quinquefolium*) özütünün farelerde mitomisin C kaynaklı genotoksisitesine karşı koruyucu rolünü mikronukleus test yöntemiyle araştırmışlardır. Bu çalışmada MMC'nin fare kemik iliği hücrelerinde mikronükleus sıklığını artırdığı gözlemlenmiştir. MMC tedavisinin genetik hasarı ve kromozomal anormallikleri tetikleyerek mikronükleusların sıklığını önemli derecede yükselttiği bildirilmiştir (Şekil 8). Mevcut çalışma sonuçlarına göre araştırmacılar, Amerikan ginseng özütünün farelerde MMC tarafından indüklenen kromozomal sapmayı baskılayabildiği kanısına varmışlardır (Pawar & ark., 2007).



Şekil 8: MMC tarafından indüklenen mikronükleusları göstermektedir: (a) Giemsa boyası ile boyanmış farklı boyutlardaki periferik kan mikronükleusları (MN), (b) Giemsa ve May-Gruenwald boyası ile boyanmış kemik iliği polikromatik eritrositlerinde (PCE) birbirinden ayrılmış küçük ve büyük MN, (c) Giemsa ve May-Gruenwald boyası ile boyanmış kemik iliği PCE'lerinde birleşmiş iki MN, (d) Akridin turuncusu ile boyanmış periferik kan retikülositlerinde MN, (e) Akridin turuncusu ile boyanmış kemik iliği PCE'sinde tek bir MN, (f) Akridin turuncusu ile boyanmış tek bir kemik iliği PCE'sinde birbirinden ayrılmış iki eş boyutlu MN

(Pawar & ark., 2007)

Podder ve arkadaşları (2008), MMC tedavisi ile oluşan in vivo klastojenik etkileri, 30 gün boyunca içme sularında NaF/L'ye maruz bırakılan Swiss albino farelerinin kemik iliği hücrelerini kullanarak incelemiştir. Çalışmada 4 mg/kg MMC uygulanmasının tüm gruplarda mitotik indekslerin (MI) yüzdesini kontrol grubuna kıyasla anlamlı şekilde düşürdüğü görülmüştür. Çalışma sonuçları,

iki kimyasalın sinerjik bir etkisi olmadığını, aksine MMC'nin klastojenik etkisinin belirgin şekilde baskılandığını göstermiştir. Bu bulgular NaF varlığında görülen baskılayıcı etkinin hücresel DNA'da görülen daha düşük alkilasyon oranının görülmesine dair kanıtları desteklemektedir (Podder, Chattopadhyay & Bhattacharya, 2008).

Tablo 3: Mitomisin-C'nin (MMC) (mg/kg bw) tek başına veya NaF (mg/L) ile kombinasyonunun fare kemik iliği hücrelerinde mitotik indeksler (MI) ve kromozom anormallikleri üzerindeki etkileri

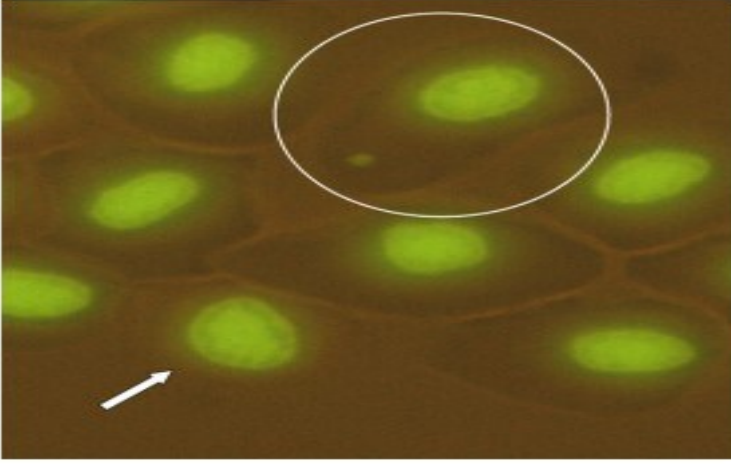
Group (n = 4)	TM ^a	MI (%) ^b	Ab M (%) ^c	Ctd Br (%) ^d	Iso Ctd Br (%) ^e	Exch (%) ^f
Control	612	2.12±0.06	1.5±0.29	1.5±0.29	0.00	0.00
MMC-4	595	1.04±0.14*	38±1.08*	48.75±2.06*	0.25±0.25	1.25±0.48*
NaF-7.5	482	2.35±0.26	7.5±0.5*	7.75±0.25*	0.00	0.00
NaF-7.5+MMC-4	411	0.79±0.13*	35±3.03*	49.25±6.39*	0.25±0.25	1±0.71
NaF15	570	1.78±0.39	9.25±0.63*	9.5±0.65*	0.00	1.25±1.25
NaF-15+MMC-4	594	0.99±0.22*	36.25±1.11*	44.75±1.49*	0.5±0.29	0.75±0.48
NaF-30	611	1.85±0.28	8.25±0.85*	8.5±1.19*	0.00	0.00
NaF-30+MMC-4	546	1.48±0.07*	32.25±2.50*	38±4.308*	0.5±0.29	1.5±0.96

*p < 0.05, significantly different from control group.

^aTotal metaphases; ^bMitotic index; ^cAberrant metaphases; ^dChromatid breaks; ^eIsochromatid breaks; ^fExchanges (end-joining of two nonsister chromatids)

(Podder, Chattopadhyay & Bhattacharya, 2008)

Winter ve arkadaşları (2007), mitomisin C ve siklofosfamid ile akut tedaviden sonra *Pimephales promelas* eritrositlerinde mikronükleus oluşumunu incelemişlerdir. Çalışmada 10mg/kg dozunda MMC'nin 8. ve 14. günlerde dalaktan alınan eritrositlerde mikronükleus oluşumunu önemli ölçüde indüklerken periferik kan örneklerinde indüklediği belirtilmiştir (Şekil 9). Mitomisin C'nin aksine 400 mg/kg siklofosfamid tedavisi, kullanılan dokuların eritrositlerinin hiçbirinde mikronükleus indüklemesinin olmadığı ileri sürülmüştür (Winter ve ark., 2007).

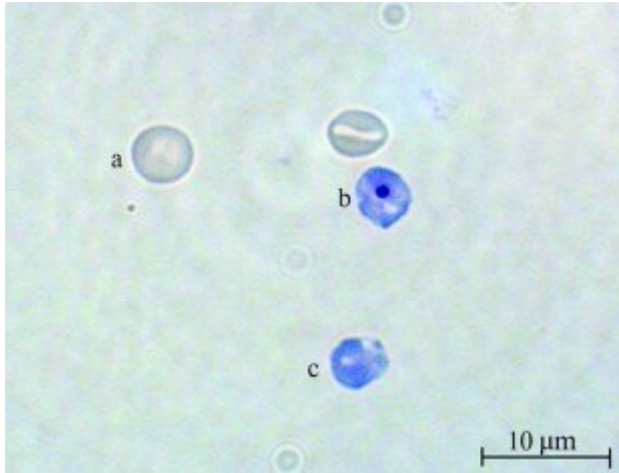


Şekil 9: Mitomisin C ile (10 mg/kg) tedavi edilen FHM'nin (fare hemoglobin mutan) periferik kanından alınmış, mikronükleus içeren (daire içine alınmış) olgun bir eritrosit. Hücreler, akridin turuncusu ile boyanmış ve yeşil filtre üzerinden 1000 kat büyütme ile floresan mikroskop altında incelenmiştir. Ayrıca, bir ok ile işaretlenmiş, karakteristik olarak toplam hücre alanına kıyasla daha büyük bir çekirdeğe ve sitoplazmik RNA kalıntıları nedeniyle hafif kırmızı turuncu boyanmaya sahip bir olgunlaşmamış eritrosit de gösterilmektedir

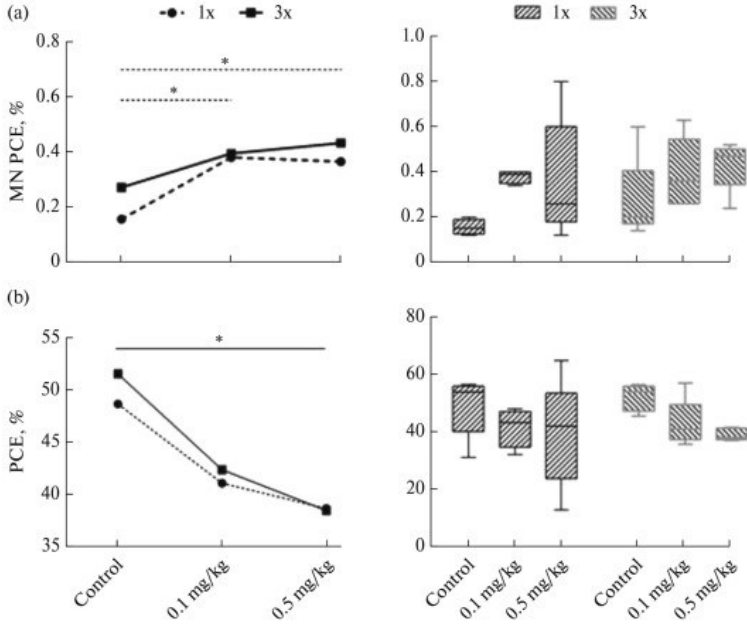
(Winter, Ellis & Hutchinson, 2007)

Mitomisin C, DNA iplikleri arasında çapraz bağlar oluşturan alkilleyici bir mutajenik ajandır ve deneylerde, özellikle fare eritrositlerinde kromozomal genotoksisiteyi değerlendirmek amacıyla yaygın olarak kullanılır. Çoğu mevcut çalışma, yüksek doz mutajenlerin neden olduğu akut genotoksik strese odaklanmıştır. Kronik mutajenik maruziyetleri açıklayan çok az çalışma mevcuttur. Bu çalışmalardan biri de apolipoprotein E geni knockout fareleri (ApoE^{-/-}) üzerinde, bu ajana kronik maruziyet sırasında kromozomal açıdan genotoksik, ancak sitotoksik olmayan bir etkiyi

indükleyecek MMC konsantrasyonunu belirlemek amacıyla Asanov ve arkadaşları (2023) tarafından yapılmıştır. Çalışmada 0.1 ve 0.5 mg/kg dozlarında MMC'nin etkisi test edilmiştir. Genotoksisiteyi değerlendirmek amacıyla çalışmada, her bir hayvanın femoral kemik iliğinden 1000 PCE izole edilmiş, mikronükleus içeren hücreler tanımlanmış ve retikülositlerin yüzdesi hesaplanmıştır (Şekil 10). Çalışma sonucunda 0.5 mg/kg'lık dozundaki MMC, eritropoezdeki bozulma (retikülosit yüzdesinde azalma) ile kendini gösteren belirgin bir sitotoksik etki gösterdiği, 0.1 mg/kg'lık doz MMC'nin ise sitotoksisite eşiğine ulaşmadan belirgin bir genotoksik etkiyi indüklediği ileri sürülmüştür (Şekil 11) (Asanov & ark., 2023).



*Şekil 10: Fare kemik iliği yayması. a)Normokromatik eritrosit
b)MNPCE c)PCE
(Asanov & ark., 2023)*



*Şekil 11: Doz-Tepki Eğrisi (Mitomisin C Genotoksik Etkisi): (a) Mikronükleus içeren polikromatofilik eritrositlerin yüzdesi, (b) 200 hücredeki polikromatofilik eritrositlerin yüzdesi, *Tek bir MMC uygulamasından sonra gruplar arası anlamlı fark, MN—Mikronükleus, PCE—Polikromatofilik eritrosit.*
(Asanov & ark., 2023)

Morales-Ramírez ve arkadaşları [2014], yaptıkları bir derleme çalışmasında, polikromatofilik eritrosit (PCE)+mikronükleus (MN) oluşumunun kinetikleri ve mekanizmaları ile çeşitli antitümör ve genotoksik ajanların sitotoksikite üzerindeki etkilerini, yapılan in vivo çalışmaları kullanarak karşılaştırmışlardır. Çalışmalarında, MMC'nin en düşük dozunun 1.5 $\mu\text{mol/kg}$ olduğunu ve PCE yüzdesinde maksimum azalmayı sağladığını belirtmişlerdir. Ayrıca MMC'nin genotoksik ve sitotoksik etkileri arasında bir korelasyon olduğunu da

göstermişlerdir (Morales-Ramírez, Vallarino-Kelly & Cruz-Vallejo, 2014).

Tablo 4: Farklı antineoplastiklerin ve alkilleyici ajanların dozuna bağlı olarak görülen PCE sıklığında (%) ve etkinlikte maksimum azalma

Agent	Dose ($\mu\text{mol/kg}$)	ABC (MN-PCE) $\bar{x} \pm \text{SD}$	ABC/dose	MF (MN-PCE) $\bar{x} \pm \text{SD}$	MF/dose	ABC/MF	Ref
VNC	0.05	799 $\pm$ 300	14,800	42 $\pm$ 13.1	785	18.9	e
MMC	1.50	654 $\pm$ 197	436	37 $\pm$ 5.5	24.9	17.5	d
COL	1.50	584 $\pm$ 56	389	26 $\pm$ 1.3	18.0	21.6	g
VNB	0.28	94 $\pm$ 17	342	6.6 $\pm$ 1.8	24.0	14.3	e
CisPt ⁺	0.93	267 $\pm$ 51	287	21 $\pm$ 4.9	22.0	13.0	d
Aza-C	20.00	1200 $\pm$ 217	60.0	35 $\pm$ 9.3	1.75	34.3	f
BCNU	35.00	1896 $\pm$ 239	54.2	71 $\pm$ 17.8	2.00	27.1	d
MNU	20.00	654 $\pm$ 135	32.7	38 $\pm$ 6.0	1.90	17.2	c
CP	76.00	439 $\pm$ 238	5.8	20 $\pm$ 9.1	0.26	22.3	a
DMN	108.00	292 $\pm$ 58	2.7	15 $\pm$ 1.3	0.14	19.3	b
ENU	214.00	553 $\pm$ 54	2.6	26 $\pm$ 5.5	0.12	21.7	b
BUS	30.00	70 $\pm$ 23	2.3	3.9 $\pm$ 1.2	0.13	17.7	d

(Morales-Ramírez, Vallarino-Kelly & Cruz-Vallejo, 2014)

Salman ve arkadaşları (2024), farelerde mitomisin C (MMC) tarafından oluşturulan genotoksik ve histopatolojik defektlere karşı *Eucalyptus globulus* esansiyel yağının (EGEO) koruyucu aktivitesini değerlendiren bir çalışma yapmışlardır. Tablo 5 ve Şekil 12 'de görüldüğü gibi, tek doz MMC (1.5 mg/kg, 24 saat süreyle) tedavisi, fare kemik iliği hücrelerinde CAs (kromozomal anormallikler) yüzdesini kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artırmıştır. Değerlendirme sonuçları, MMC ile tedavinin, fare dokularında önemli genotoksik ve histopatolojik lezyonları tetiklediği ve MMC kaynaklı kusurların, test edilen dozlarda EGEO tedavisi ile önemli ölçüde tersine çevrildiği yönündeydi (Salman & ark., 2024).

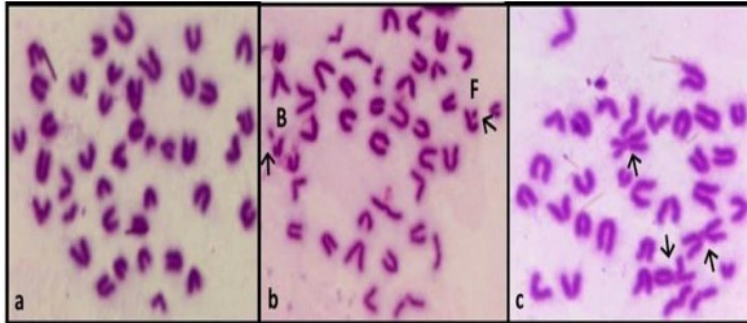
Tablo 5: Fare kemik iliği hücrelerinde EGEO tedavisinin, MMC ile indüklenen kromozomal aberasyonlar üzerindeki etkinliği

Treatment and doses	Total abnormal metaphases		The no and (percentage) of metaphases with various types of chromosome aberrations			
	No.	Mean% $\pm$ S. E	Gap	Fr and/or Br	MA	RT
Negative Control	20	4.00 $\pm$ 0.32 ^a	4(0.80)	16(3.20)	-	-
Plant Control (EGEO, 1.2 mL/kg)	22	4.40 $\pm$ 0.40 ^a	6(1.20)	16(3.20)	-	-
Positive control MMC	208	41.60 $\pm$ 0.94 ^c	3(0.60)	63(12.60)	139(27.80)	3(0.60)
Treatment combination						
MMC (1.5mg/kg) + EGEO (0.8 mL/kg)	173	34.60 $\pm$ 0.51 ^b	4(0.80)	59(11.80)	108(21.60)	2(0.40)
MMC (1.5mg/kg) + EGEO(1mL/kg)	121	24.20 $\pm$ 1.32 ^b	5(1.0)	73(14.60)	43(8.60)	-
MMC (1.5mg/kg) + EGEO(1.2mL/kg)	103	20.60 $\pm$ 1.63 ^b	8(1.60)	65(13.0)	30(6.0)	-

No. of examined cells = 500 cells/ group (100 cells/ mouse).

RT: Robertsonian translocation. Fr and/or Br: Fragment and/or Break. MA: Multiple aberrations.

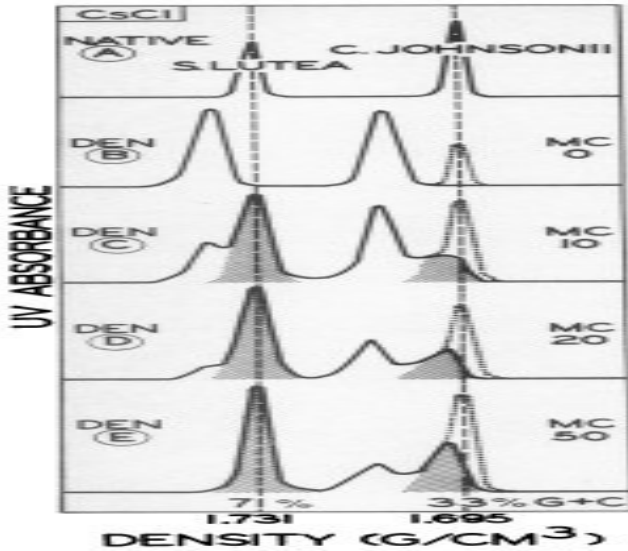
(Salman & ark., 2024)



Şekil 12: Işık mikroskobu fotomikrograflarında, fare kemik iliği hücrelerinde görülen kromozomal anormallikler:(a) Normal: Bu fotomikrograf, herhangi bir anormallik göstermeyen tipik bir kromozomal düzeni gösterir. (b) Parça ve Kırılma: Bu görüntü, bir veya birden fazla kromozomun parçalara ayrıldığı kromozomal anormallikleri sergiler. (c) Robertsonian Translokasyonu (RT): Görüntüde, Robertsonian translokasyonu gösterilmektedir. Tüm fotomikrograflar, fare kemik iliği hücrelerindeki kromozomal anormallikleri ayrıntılı bir şekilde gösteren 1500× büyütme ile alınmıştır.

1. 4. Miomisin C'nin İn vitro Genotoksik ve Sitotoksik Etkileri

Iyer ve Szybalski (1964), yaptıkları bir çalışmada mitomisinler ve porfiromisinlerin kimyasal aktivasyon mekanizmasını detaylı olarak açıklayarak, bu moleküllerin DNA ile nasıl etkileşime geçtiğini ve bu etkileşimlerin terapötik etkilerini ele almışlardır. Yaptıkları bu çalışma ile MC'nin DNA çift sarmalının tamamlayıcı zincirlerini çapraz bağladığını gösterdiler (Şekil 13) [Iyer & Szybalski, 1964].



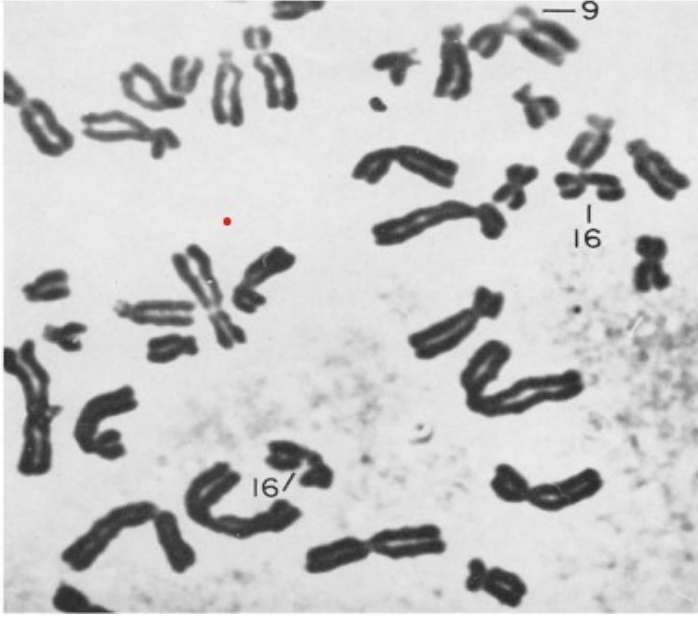
Şekil 13: Mikrodensitometre taraması, 22 saat boyunca CsCl denge yoğunluk-gradianti santrifüjleme (44.770 dev/dak; 25°C) sonrasında elde edilmiştir. A, doğal (native) DNA'yı temsil eder. B-E, denatüre edilmiş (DEN) DNA'yı temsil eder (6 dakika boyunca 100°C'de DSC içinde ısıtılmış ve ardından 0°C'de hızla soğutulmuş) ve sırasıyla 0, 10, 20 ve 50 µg/ml mitomisin C'ye, redüktif koşullar altında (200 µg DNA + 100 µg Na₂S₂O₄/ml, 1

dakika, 20°C) in vitro maruz bırakılmıştır. Bu işlem sonrasında DNA alkol ile çöktürülmüş ve çökelti DSC içinde çözülmüştür. Gölgeleştirilmiş alanlar, yaklaşık olarak kendiliğinden yeniden doğal hale dönebilen (çapraz bağlı) DNA'yı temsil eder. Noktalı zirveler, santrifüj hücrelerine doğrudan 1 µg "yoğunluk işaretleyici" DNA eklenerek santrifüj işleminin tekrarlanmasıyla elde edilen doğal C. johnsonii DNA'sına karşılık gelir.

(Iyer & Szybalski, 1964)

Cohen ve Shaw (1964) MMC'nin insan kromozomlarına olan etkisini inceledikleri çalışmada; MMC'nin mitozu inhibe ettiğini ve kültürlenmiş insan lökosit kromozomlarında kırılmalara neden olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca kırılmaların rastgele olmadığını ve 1, 9 ve 16. kromozomların ikincil konstriksiyon bölgelerinde belirgin bir artış olduğu gözlenmiştir (Şekil 14) (Cohen & Shaw, 1964). Bu çalışmaya benzer bir çalışma da 2024 yılında yapılmıştır. Catalan ve arkadaşları (2024), mitomisin C'nin genotoksik etkilerini incelemek ve özellikle insan kromozomları üzerinde neden olduğu mikronükleus oluşumunu ve kromozomal aberasyonları tespit ederek hangi kromozomun daha fazla etkilendiğini belirlemek amacıyla çalışmayı yapmışlardır. Çalışmada sitogenetik değerlendirme için mikronükleus ve kromozomal aberasyon testi ve oluşan mikronükleus ile kromozomal anormalliklerin hangi kromozoma ait olduğunu belirlemek için de floresan in situ hibridizasyon (FISH) yöntemini kullanmışlardır. Çalışmada MMC'nin insan kromozomları 9, 1 ve 16 üzerinde belirgin genotoksik etki gösterdiği bildirilmiştir. MMC'nin toplam MN sıklığını ve asentrik parçalar içeren MN'yi istatistiksel olarak anlamlı şekilde artırdığı tespit edilmiştir (Tablo 6). Ayrıca MMC'nin, kromatid tipi anormalliklerin yanı sıra toplam CA sayısını istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmasına neden olduğu, ancak kromozom tipi anormalliklerin sayısında bir artış gözlemlenmediği bildirilmiştir. MMC ile tedavi edilen kültürlerdeki çoklu anormal hücre sayısının, kontrol kültürlerine göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmada

en fazla etkilenen kromozomların 9, 1, 16. insan kromozomları olduğu belirtilmiştir (Şekil 15, 16) [Catalán & ark., 2024]. Yapılan her iki çalışma sonucu da benzerdir.



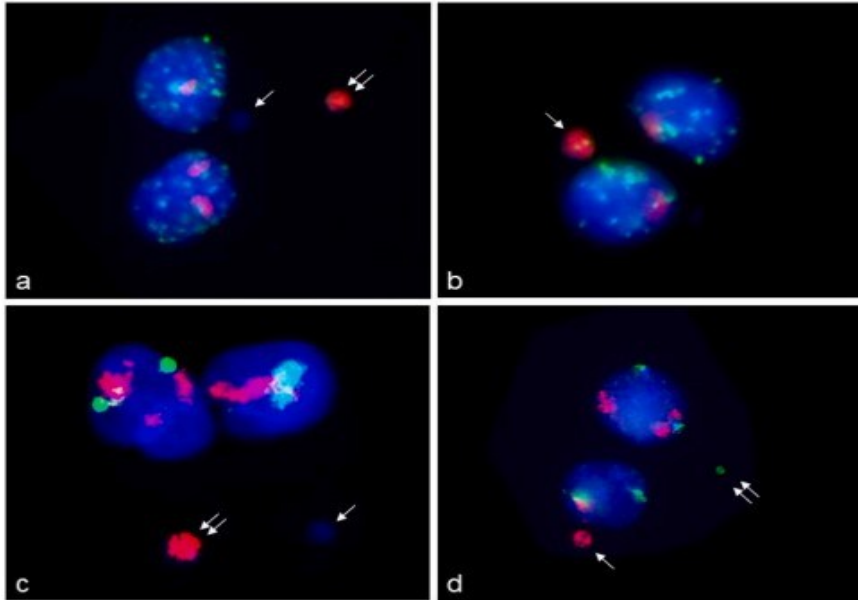
Şekil 14: Kromozom No: 9'da heteropiknotik görünüm, kromozom No:16'ların her ikisinde de kromatid kırığı görünümü

(Cohen & Shaw, 1964)

Tablo 6: Kontrol ve Mitomisin C (MMC) ile muamele edilmiş izole insan lenfosit kültürlerinde (iki erkek bağıışçidan alınmış), sitoklazin B (Cyt-B) ile ya da olmadan kültüre edilen toplam mikronükleus (MN) ve pancentromerik DNA probu ile işaretlenmiş (C+) veya işaretlenmemiş (C-) mikronükleusların (MN) ortalama (SD) sıklığı (her 1000 hücre başına) gösterilmektedir

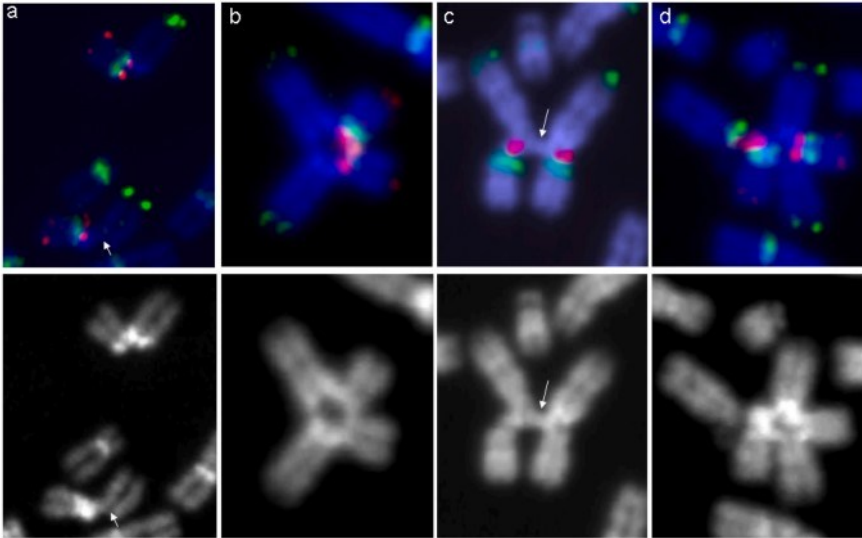
Treatment	Frequency of MN ^b c,d,f	Frequency of C ⁺ MN ^{b,c,d,f}	Frequency of C ⁻ MN ^{b,c,d,f}
<i>Cultures without Cyt-B</i>			
Control	6.31 (0.75)	0.92 (0.31)	5.39 (0.62)
MMC (500 ng/ ml)	50.64 (30.83)	5.56 (3.39)	45.07 (27.52)
<i>Cultures with Cyt-B</i>			
Control	7.69 (0.52)	2.02 (0.58)	5.67 (0.95)
MMC (500 ng/ ml)	42.28 (2.70)	3.17 (0.24)	39.12 (2.62)

(Catalán & ark., 2024)



Şekil 15: Mikronükleuslu binükleer lenfositler, sırasıyla bir pancentromerik DNA probu (yeşil) ve kromozom 9 boyama probu (kırmızı) ile ya da kromozom 1 (kırmızı) ve kromozom 16 (yeşil) boyama probu ile aynı anda hibridize edilmiştir (a ve b ya da c ve d), a) İki mikronükleus içeren bir binükleer hücre, bir mikronükleusta sinyal bulunmaz (ok ile gösterilmiştir) ve diğerinde kromozom 9 acentrik fragmanı bulunmaktadır (çift ok ile gösterilmiştir), b) Bir mikronükleus (ok ile gösterilmiştir) içeren bir binükleer hücre, kromozom 9 sinyalini taşımaktadır, c) İki mikronükleus içeren bir binükleer hücre, bir mikronükleusta sinyal yoktur (ok ile gösterilmiştir) ve diğerinde kromozom 1 sinyali bulunmaktadır (kırmızı; çift ok ile gösterilmiştir), d) Kromozom 1 sinyali (kırmızı; ok ile) ve kromozom 16 sinyali (yeşil; çift ok ile) içeren iki mikronükleus bulunan bir binükleer hücre.

(Catalán & ark., 2024)



Şekil 16: Çalışmada, insan pancentromerik probu (yeşil), kromozom 9 klasik uydu DNA probu (kırmızı), kromozom 9p

telomerik probu (kırmızı) ve kromozom 9q telomerik probu (yeşil) kullanılmıştır. Aberasyonları daha yüksek kontrastla görselleştirmek için DAPI ile karşı boyanmış kromozomların siyah-beyaz görüntüleri de dahil edilmiştir. a) Her iki kromozom 9, dört prob ile boyanmıştır; görüntünün alt kısmındaki kromozom 9'da bir kromatid kırığı bulunmaktadır (ok ile gösterilmiştir). b) Kromozom 9 homologları arasında bir değişim gözlenmiştir; her iki değişim kırılma noktası da kromozom 9 klasik uydu DNA etiketinin (kırmızı) altındadır. c) Kromozom 9 homologları arasında bir değişim, değişim kırılma noktası (ok ile gösterilmiştir) kromozom 9 klasik uydu DNA etiketinin (kırmızı) altındadır. d) Kromozom 9 homologları ile üçüncü bir kromozom arasında bir değişim görülmüştür

(Catalán & ark., 2024)

Smith ve arkadaşları (1994), 5-fluorourasil ve mitomisin C'nin kültürlenmiş kapiller endotel hücreleri ve fibroblastlar üzerindeki etkilerini inceledikleri çalışmada; her iki hücre tipinin de mitomisin C'ye karşı benzer hassasiyet gösterdiklerini ve MMC'nin her iki hücre tipi içinde sitotoksik etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (Smith, D'Amore & Dreyer, 1994).

Van Pellet ve arkadaşları (1991), mitomisin C ve siklofosfamid gibi genotoksik ajanların kültürlenmiş insan keratinositlerinde mikronükleus oluşumunu nasıl etkilediğini inceledikleri çalışmada, direkt etkili bir klastojenik ajan olan mitomisin C'nin kültürlenmiş keratinositlerde mikronükleus oluşumunu önemli ölçüde artırdığı tespit edilmiştir. Kontrol grubuna kıyasla en yüksek dozda (1 µg/ml) uygulamanın mikronükleus oluşumunda 5-20 kat artışa neden olduğu ve MMC'nin genotoksik etkisinin DNA'ya zarar vererek mikronükleus oluşturmaktan kaynaklandığı ileri sürülmüştür (Van Pelt & ark., 1991).

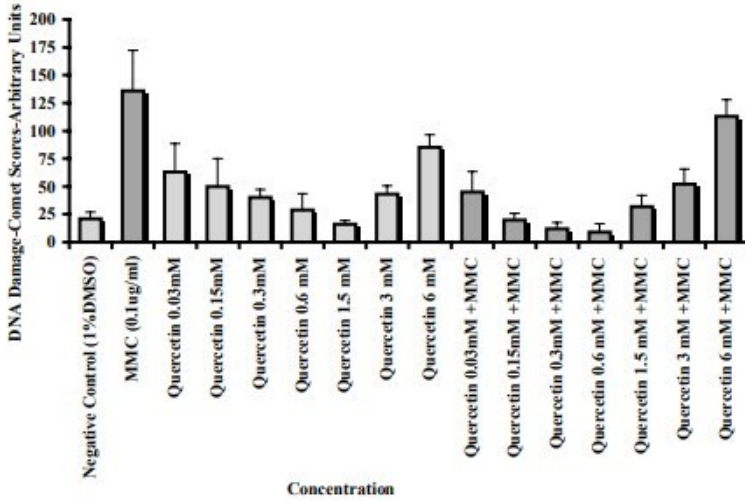
Rudd ve arkadaşları (1991), kolsemid ve mitomisin C gibi genotoksik ajanların mikron kleuslar üzerindeki etkilerini kinetokor analizi kullanarak insan fibroblastlarının iki su unda incelemiştir. Çalışma sonucunda MMC'nin her iki suçta kinetokor-negatif mikronükleusların (kromozom kırılması) frekansını %7.9 artırdığını ve bu durumun MMC'nin klastojenik etkisine kanıt olduğu ileri sürülmüştür. Bununla birlikte kinetokor-pozitif mikronükleus yüzdesinde 4 katlık bir artış oluşturduğu da bildirilmiştir (Rudd & ark., 1991).

Blagoeva ve arkadaşları (1992), tarafından yapılan bir çalışmada mitomisin C ve farmorubisin gibi genotoksik ajanların, polib tilsiyanakoakrilat (PBCA) nanoparçacıkları içine dahil edildiğinde genotoksik etkilerinin nasıl de i ti i Salmonella/mikrozom mutajenite ve mikronukleus test yöntemleri ile araştırılmıştır. Yaptıkları çalışmada her iki ajanında genotoksik etkiye sahip olduğunu ancak PBCA nano parçacıkları ile entegre edildiğinde bu ilaçların genotoksik etkilerinde belirgin bir d     n olduğu ileri sürülmüştür (Blagoeva & ark., 1992).

Krishnaja ve sharma (2003), tarafından gerçekleştirilen çalışmada L-askorbik asidin (AA) MMC kaynaklı kromozom hasarı üzerindeki düzenleyici etkisi, insan periferik kan lenfositlerinde in vitro değerlendirilmiştir. Çalışmada 200 µg/ml L-askorbik asidin, 1 ve 2 saatlik  n tedavi olarak, mitomisin C (0,1 ve 0,2 µg/ml) tarafından oluşturulan biyobelirteçler üzerindeki etkisi MN, SCE'ler ve CA yöntemleri ile incelenmiştir. Çalışmada MMC'nin DNA hasarına neden olduğu görülmüştür. Test edilen dozlarda MMC ve AA sitosoksik etki göstermemiştir. Çalışmada AA  n tedavisi tüm tedavi grupları için MMC kaynaklı MN ve SCE sıklıklarında istatistiksel olarak anlamlı bir artışa neden olduğu, ancak yalnızca MMC tedavisine kıyasla kromozom sapmalarında bir artış göstermediği sonucuna varılmıştır (Krishnaja & Sharma, 2003).

 nde er ve arkadaşları (2004), kuersetin ve rutin'in mitomisin C kaynaklı DNA hasarı üzerindeki düzenleyici etkilerini comet testi kullanarak incelemişlerdir. Çalışmada insan lenfositleri

mitomisin C ile ve mitomisin C'siz farklı konsantrasyonlarda kuersetin ve rutin ile inkübe edilerek DNA hasarı değerlendirilmeye alınmıştır. Yapılan deneysel çalışmada MMC'nin DNA hasar oluşumunu artırdığı tespit edilmiştir (Şekil 17). Sonuç olarak da insan lenfositlerinde kuersetin ve rutin, mitomisin C tarafından indüklenen DNA hasarı üzerinde konsantrasyona bağlı bir şekilde koruyucu etkiler gösterdiğini bildirmişlerdir (Ündeğer & ark., 2004).



Şekil 17: Comet testi ile insan lenfositlerinde quercetin ve quercetin + mitomisin C'nin DNA hasarı üzerindeki etkileri

(Ündeğer & ark., 2004)

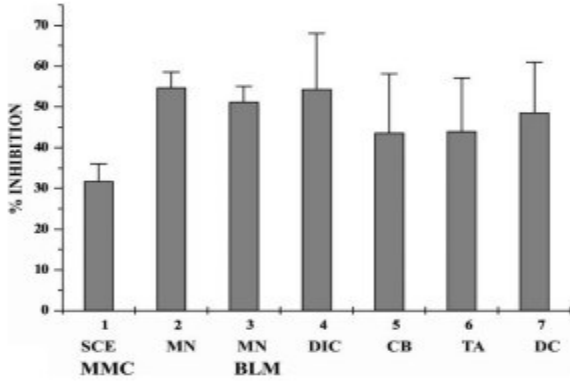
Krishnaja ve Sharma (2008) tarafından kanser tedavisinde kullanılan anti-neoplastik ajanlar olan MMC, bleomisin (BLM) ve kemostirilant tarafından indüklenen adaptif yanıt (AR), farklı donörler ve zamanlama programları kullanılarak incelenmiş ve kromozomal aberasyonlar, kardeş kromatid değişimleri ve mikronükleus (MN) gibi sitogenetik biyomarkerler ile değerlendirilmiştir. Çalışma sonucunda adaptif doz ile beklenen MMC kaynaklı kromozom hasarına kıyasla hem SCE hem de MN frekanslarında belirgin bir azalma gözlenmiştir (Tablo 7). MMC

kaynaklı AR durumunda, MN'nin SCE'ye göre daha duyarlı bir belirteç olduğu bulunmuştur. MMC ile adaptif tedavi, MMC'nin değişen dozlarına(CD) göre SCE frekanslarına (%25-36) kıyasla indüklenen MN'de (%52-62) daha yüksek inhibasyon görülmüştür. Kontrollerle karşılaştırıldığında, MN analizi için CD (Mitomisin C Kromozom Hasarı) tedavisi uygulanan ve adaptif tedavi sonrası CD uygulanan lenfosit kültürlerinde, düşük NDI (Net Bölünme İndeksi) değerlerinde de görüldüğü gibi hücre döngüsü ilerlemesinde bazı gecikmeler gözlenmiştir ($P<0.05$). CD'ye kıyasla adaptif tedavi sonrası CD uygulanan hücrelerde artan NDI değerleri, MMC'nin CD'sinin neden olduğu hücre bölünmesi gecikmelerinin tersine döndüğünü göstermektedir (Şekil 18, 19) (Krishnaja & Sharma, 2008).

Tablo 7: MMC tarafından indülenen AR

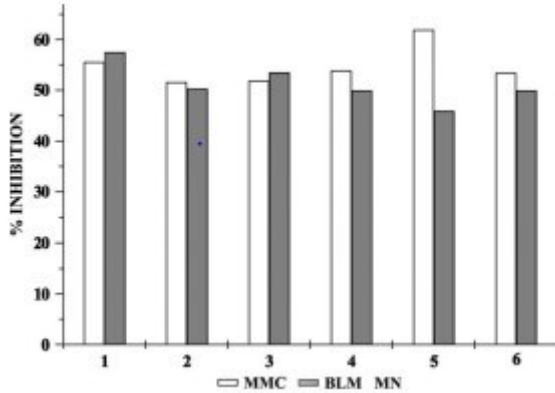
Donor	C		AD		CD		O		E	I
	SCE	Range	SCE ^{a++}	range	SCE	range	SCE ^{b++}	Range	SCE	
1	3.92	0-12	7.10	2-13	27.96	19-37	20.32	10-29	31.14	34.75
2	5.38	0-13	7.82	3-16	26.66	15-33	18.56	11-27	29.10	36.22
3	3.60	0-10	9.84	5-16	58.52	32-93	48.58	18-90	64.76	24.98
4	6.70	0-17	10.66	3-21	38.46	11-68	29.36	9-50	42.42	30.79
5	4.24	0-09	9.70	4-16	56.74	30-90	44.00	10-30	62.20	29.26
6	4.56	0-10	10.76	5-12	37.40	23-55	28.49	15-58	43.60	34.66
Donor	C		AD		CD		O		E	I
	BNMN	MN	BNMN	MN ^{a++}	BNMN	MN	BNMN	MN ^{b++}	MN	
1	13	14	18	19	61	67	30	32	72	55.56
2	8	9	20	22	39	47	26	29	60	51.66
3	7	7	14	16	38	43	24	25	52	51.92
4	6	6	12	12	40	46	24	24	52	53.85
5	8	9	14	14	52	58	22	24	63	61.9
6	6	6	11	11	34	38	16	20	43	53.49

(Krishnaja & Sharma, 2008)



Şekil 18: 6 donerde çalışılan MMC ve BLM ile AR'nin İndüksiyon sonucu(% inhibasyon). MMC—SCE, MN; BLM—MN, DIC, CB, TA, DC.

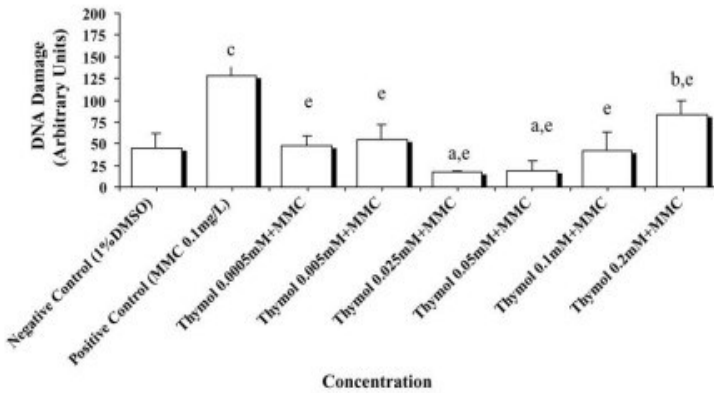
(Krishnaja & Sharma, 2008)



Şekil 19: MMC ve BLM ile İndüklenen AR'nin Mikronükleus (MN) Biyomarkeri ile Karşılaştırılması (% İnhibisyon)

(Krishnaja & Sharma, 2008)

Aydın ve arkadaşları (2005), Thyme uçucu bileşenlerinin (timol, karvakrol ve α -terpinene) MMC ile indüklenen DNA hasarına karşı etkilerini insan lenfositlerinde tek hücre jel elektroforezi ile belirlemişlerdir. Yaptıkları çalışmada pozitif kontrol olarak MMC tercih edilmiştir. Bu çalışmada thyme uçucu bileşenlerinin düşük konsantrasyonlarda MMC kaynaklı genotoksisteye karşı koruyucu özellik gösterdiği ancak yüksek konsantrasyonlarda DNA hasarına yol açabileceğini ileri sürmüşlerdir (Şekil 20) (Aydın, Başaran & Başaran, 2005).

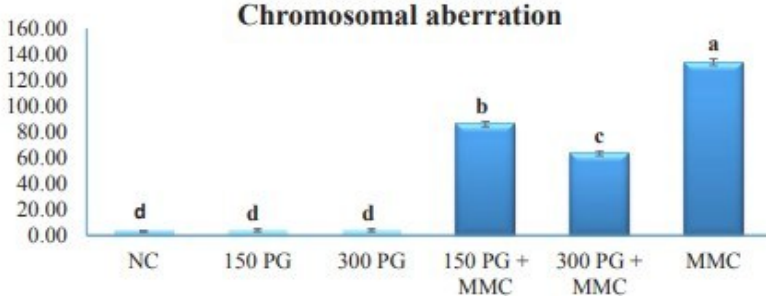


Şekil 20: Timonun, IQ ve MMC tarafından indüklenen DNA hasarı üzerindeki koruyucu etkisi.

(Aydın, Başaran & Başaran, 2005)

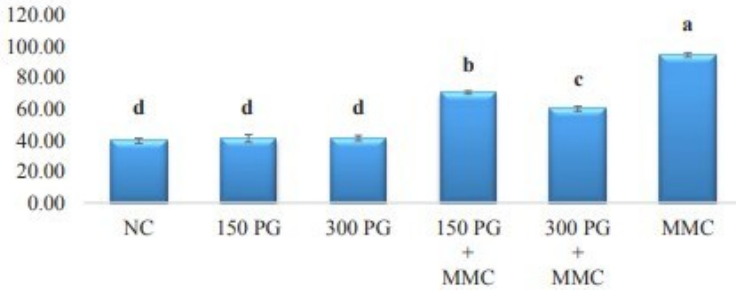
Uluman ve Aksu Kılıçle (2020), nar (*Punica granatum* L.) kabuğu ekstraktının, farelerin kemik iliği hücrelerinde mitomisin-C (MMC) tarafından oluşturulan genotoksik etkilere karşı olası antigenotoksik etkilerini araştırmışlardır. Çalışmanın MMC grubunda kromozomal anormallik oranları ve mikronükleuslu polikromatik eritrosit oranları maksimum düzeyde bulunmuştur. MMC uygulamasının mitotik aktiviteyi ve polikromatik/normokromatik eritrosit oranlarını düşürürken, nar

kabuğu ekstraktının MMC ile birlikte uygulanması, bu oranlarda MMC grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir artış sağladığı rapor edilmiştir (Şekil 21, 22, 23). Belirtilen dozlarda nar kabuğu ekstraktının, farelerin kemik iliği hücrelerinde mitomisin-C'nin neden olduğu genotoksisiteye karşı antijenotoksik etkiler gösterdiği belirtilmiştir (Uluman & Aksu Kiliçle, 2020).



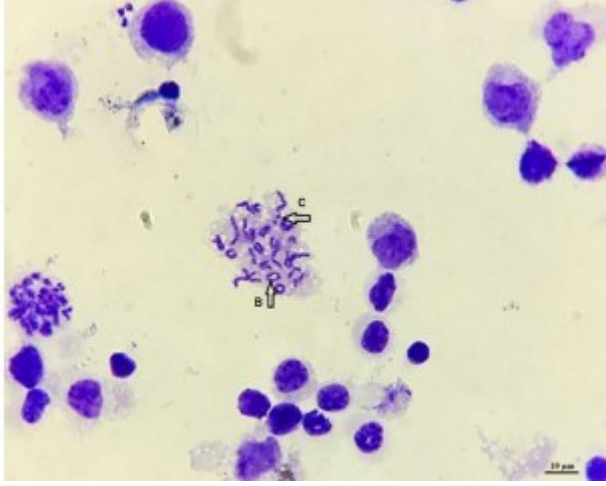
Şekil 21: Uygulama ve kontrol gruplarında kromozomal aerasyon oranları

(Uluman & Aksu Kiliçle, 2020)



Şekil 22: Kontrol ve uygulama gruplarında PCE/NCE oranları

(Uluman & Aksu Kiliçle, 2020)



Şekil 23: Deney grubunun kemik iliği hücrelerinde fragment (C) ve kardeş kromatit birleşimi (B) görüntüsü (1000×)

(Uluman & Aksu Kiliçle, 2020)

Sinitsky ve arkadaşları (2020), yaptıkları bir çalışmada MMC'nin endotel hücrelerinde oluşturduğu genotoksik stresi 500 ng/mL MMC'ye maruz bırakılan birincil insan koroner arter endotel hücrelerinde (HCAEC) ve insan internal torasik arter endotel hücrelerinde (HITAEC) in vitro DNA hasarını, protein salgılanmasını ve IL6 ve IL8 gen ekspresyonunu inceleyerek araştırmışlardır. Çalışmada MMC tarafından indüklenen DNA alkilasyonunun endotel disfonksiyonu ile ilişkili olabileceği ve alkilasyonunun genotoksik strese yol açtığı bildirilmiştir. MMC ile indüklenen genotoksik stresin, proinflamatuvar sitokinler IL6 ve IL8'in farklı salgılanması ve gen ifadesi ile ilişkili olabileceği ileri sürülmüştür (Sinitsky & ark., 2020).

2. Sonuç

Mitomisin C, DNA'ya zarar vererek genotoksik etkilere yol açan bir kemoterapötik ajandır. Yapılan araştırmalar, MMC'nin kromozomal anormallikler, mikronükleus oluşumu ve DNA zincir kırılmaları gibi genetik hasara neden olduğunu göstermiştir. Bu tür

hasarlar, hücre döngüsünü bozarak mutasyonlara ve kanser gibi genetik hastalıklara zemin hazırlayabilir.

MMC'nin genotoksik etkileri, hücrelerdeki mitotik aktivitenin düşmesine ve kromozomal yapının bozulmasına yol açar. Hücreler, DNA hasarına karşı tepki olarak çeşitli onarım mekanizmalarını devreye sokar, ancak bu süreçler her zaman yeterli olmayabilir. Özellikle yüksek dozda MMC uygulamaları, hücrelerin ölümüne veya genetik materyalin kalıcı olarak hasar görmesine yol açabilir.

Yapılan çalışmalarda, bazı doğal bileşiklerin MMC'nin genotoksik etkilerini azaltma potansiyeline sahip olduğu gözlemlenmiştir. Bu bulgular, MMC'nin tedavi amaçlı kullanımı sırasında yan etkilerin minimize edilmesine yönelik alternatif yaklaşımların geliştirilmesine olanak tanıyabilir.

3. Kaynaklar

Arranz-Márquez, E., Katsanos, A., Kozobolis, V. P., Konstas, A. G., & Teus, M. A. (2019). A critical overview of the biological effects of mitomycin C application on the cornea following refractive surgery. *Advances in Therapy*, 36(4), 786–797. <https://doi.org/10.1007/s12325-019-01058-w>

Asanov, M. A., Sinitsky, M. Y., Shishkova, D. K., Sinitskaya, A. V., Khutornaya, M. V., Poddubnyak, A. O., & Ponasenko, A. V. (2023). Dose–response assessment of mitomycin C genotoxic effect on ApoE knockout mice. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*, 59(5), 1693–1699. <https://doi.org/10.1134/S0022093023050198>

Avendaño, C., Menéndez, J. C., Avendaño, C., & Menéndez, J. C. (2015). Anticancer drugs that interact with the DNA minor groove. In *Medicinal Chemistry of Anticancer Drugs* (2nd ed., pp. 243–271). Elsevier.

Aydın, S., Başaran, A. A., & Başaran, N. (2005). The effects of thyme volatiles on the induction of DNA damage by the heterocyclic amine IQ and mitomycin C. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 581(1–2), 43–53. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2004.11.015>

Beijnen, J. H., Bult, A., & Underberg, W. J. (1987). Mitomycin C. In *Analytical Profiles of Drug Substances* (Vol. 16, pp. 361–401). Academic Press.

Bin, C. V., Valera, M. C., Camargo, S. E., Rabelo, S. B., Silva, G. O., Balducci, I., & Camargo, C. H. R. (2012). Cytotoxicity

and genotoxicity of root canal sealers based on mineral trioxide aggregate. *Journal of Endodontics*, 38(4), 495–500. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2011.11.003>

Blagoeva, P. M., Balansky, R. M., Mircheva, T. J., & Simeonova, M. I. (1992). Diminished genotoxicity of mitomycin C and farnorubicin included in polybutylcyanoacrylate nanoparticles. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 268(1), 77–82. [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(92\)90122-F](https://doi.org/10.1016/0027-5107(92)90122-F)

Bolenz, C., Cao, Y., Arancibia, M. F., Trojan, L., Alken, P., & Michel, M. S. (2006). Intravesical mitomycin C for superficial transitional cell carcinoma. *Expert Review of Anticancer Therapy*, 6(8), 1273–1282. <https://doi.org/10.1586/14737140.6.8.1273>

Bradner, W. T. (2001). Mitomycin C: A clinical update. *Cancer Treatment Reviews*, 27(1), 35–50. <https://doi.org/10.1053/ctrv.2000.0193>

Catalán, J., Järventausta, H., Falck, G. C. M., Moreno, C., & Norppa, H. (2024). Chromosome-specific induction of micronuclei and chromosomal aberrations by mitomycin C: Involvement of human chromosomes 9, 1 and 16. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 896, 503753. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2024.503753>

Cohen, M. M., & Shaw, M. W. (1964). Effects of mitomycin C on human chromosomes. *The Journal of Cell Biology*, 23(2), 386–395. <https://doi.org/10.1083/jcb.23.2.386>

Crooke, S. T., & Bradner, W. T. (1976). Mitomycin C: A review. *Cancer Treatment Reviews*, 3(3), 121–139. [https://doi.org/10.1016/0305-7372\(76\)90007-9](https://doi.org/10.1016/0305-7372(76)90007-9)

Danshiitsoodol, N., de Pinho, C. A., Matoba, Y., Kumagai, T., & Sugiyama, M. (2006). The mitomycin C (MMC)-binding protein from MMC-producing microorganisms protects from the lethal effect of bleomycin: Crystallographic analysis to elucidate the binding mode of the antibiotic to the protein. *Journal of Molecular Biology*, 360(2), 398–408. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.05.017>

Graham-Evans, B., Tchounwou, P. B., & Cohly, H. H. (2003). Cytotoxicity and proliferation studies with arsenic in established human cell lines: Keratinocytes, melanocytes, dendritic cells, dermal fibroblasts, microvascular endothelial cells, monocytes, and T-cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 4(1), 13–21. <https://doi.org/10.3390/i4010013>

Iyer, V. N., & Szybalski, W. (1964). Mitomycins and porfiromycin: Chemical mechanism of activation and cross-linking of DNA. *Science*, 145(3627), 55–58. <https://doi.org/10.1126/science.145.3627.55>

İşkey, A., Öztürkkan, F. E., Akbaba, G. B., Sertçelik, M., & Hökelek, T. (2023). Copper 4-chlorobenzoate with isonicotinamide: Synthesis, crystal structure, optical characterization, and anticancer and cytotoxic properties. *Journal of the Iranian Chemical Society*, 20(1), 97–107. <https://doi.org/10.1007/s13738-022-02656-y>

Kennedy, K. A., Sligar, S. G., Polomski, L., & Sartorelli, A. C. (1982). Metabolic activation of mitomycin C by liver microsomes

and nuclei. *Biochemical Pharmacology*, 31(11), 2011–2016.
[https://doi.org/10.1016/0006-2952\(82\)90429-0](https://doi.org/10.1016/0006-2952(82)90429-0)

Krishna, G., Nath, J., & Ong, T. (1987). Mitomycin C-induced sister chromatid exchanges in vivo and in vivo/in vitro in mice and Chinese hamsters. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 10(2), 157–167.
<https://doi.org/10.1002/em.2850100206>

Krishnaja, A. P., & Sharma, N. K. (2003). Ascorbic acid potentiates mitomycin C-induced micronuclei and sister chromatid exchanges in human peripheral blood lymphocytes in vitro. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis*, 23(S1), 99–112.
<https://doi.org/10.1002/tcm.10035>

Krishnaja, A. P., & Sharma, N. K. (2008). Variability in cytogenetic adaptive response of cultured human lymphocytes to mitomycin C, bleomycin, quinacrine dihydrochloride, Co60 γ -rays and hyperthermia. *Mutagenesis*, 23(2), 77–86.
<https://doi.org/10.1093/mutage/gem041>

Mladenov, E., Tsaneva, I., & Anachkova, B. (2007). Activation of the S phase DNA damage checkpoint by mitomycin C. *Journal of Cellular Physiology*, 211(2), 468–476.
<https://doi.org/10.1002/jcp.20979>

Mohn, G. R. (1984). The DNA repair host-mediated assay as a rapid and sensitive in vivo procedure for the determination of genotoxic factors present in various organs of mice: Some preliminary results with mitomycin C. *Archives of Toxicology*, 55(4), 268–271. <https://doi.org/10.1007/BF00341024>

Morales-Ramírez, P., Vallarino-Kelly, T., & Cruz-Vallejo, V. (2014). Kinetics of micronucleus induction and cytotoxicity caused by distinct antineoplastics and alkylating agents in vivo. *Toxicology Letters*, 224(3), 319–325. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2014.01.039>

Nishikawa, T., Haresaku, M., Adachi, K., Masuda, M., & Hayashi, M. (1999). Study of a rat skin in vivo micronucleus test: Data generated by mitomycin C and methyl methanesulfonate. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 444(1), 159–166. [https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(99\)00112-3](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(99)00112-3)

Obied, H. K., Prenzler, P. D., Omar, S. H., Ismael, R., Servili, M., Esposto, S., ... & Urbani, S. (2012). Pharmacology of olive biophenols. In *Advances in molecular toxicology* (Vol. 6, pp. 195–242). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394297-3.00010-3>

Ortega-Gutiérrez, S., López-Vicente, M., Lostalé, F., Fuentes-Broto, L., Martínez-Ballarín, E., & García, J. J. (2009). Protective effect of melatonin against mitomycin C-induced genotoxic damage in peripheral blood of rats. *BioMed Research International*, 2009, Article ID 791432. <https://doi.org/10.1155/2009/791432>

Önen, Ö., & Üçüncü, S. İ. (2015). Ham petrolün suda çözünebilen kısımlarının *Poecilia sphenops*'ta meydana getirdiği genotoksik etkiler. *Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 8(2), 34–43.

Pawar, A. A., Tripathi, D. N., Ramarao, P., & Jena, G. (2007). Protective effects of American ginseng (*Panax*

quinquefolium) against mitomycin C-induced micronuclei in mice. *Phytotherapy Research*, 21(12), 1221–1227. <https://doi.org/10.1002/ptr.2245>

Podder, S., Chattopadhyay, A., & Bhattacharya, S. (2008). In vivo suppression by fluoride of chromosome aberrations induced by mitomycin-C in mouse bone marrow cells. *Fluoride*, 41(1), 40–47.

Rudd, N. L., Williams, S. E., Evans, M., Hennig, U. G. G., & Hoar, D. I. (1991). Kinetochore analysis of micronuclei allows insights into the actions of colcemid and mitomycin C. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 261(1), 57–68. [https://doi.org/10.1016/0165-1218\(91\)90056-Q](https://doi.org/10.1016/0165-1218(91)90056-Q)

Salman, A. S., Diab, K. A., Fahmy, M. A., Hassan, E. M., Hassan, Z. M., Omara, E. A., & Farghaly, A. A. (2024). *Eucalyptus globulus* essential oil modulates genotoxicity and histological alterations induced by mitomycin C in mice. *Egyptian Journal of Chemistry*, 67(11), 207–217. <https://doi.org/10.21608/ejchem.2024.169123>

Sertçelik, M., Akbaba, G. B., & Öztürkkan, F. E. (2021). Kobalt (II) ve çinko (II) 4-florobenzoatın 3-hidroksipiridin komplekslerinin sentezi, spektroskopik ve sitotoksik özellikleri. *Caucasian Journal of Science*, 8(1), 14–26. <https://doi.org/10.48138/cjo>.

Siddique, Y. H., & Afzal, M. (2009). Antigenotoxic effect of apigenin against mitomycin C induced genotoxic damage in mice bone marrow cells. *Food and Chemical Toxicology*, 47(3), 536–539. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2008.12.021>

Siegel, D., Gibson, N. W., Preusch, P. C., & Ross, D. (1990). Metabolism of mitomycin C by DT-diaphorase: Role in mitomycin C-induced DNA damage and cytotoxicity in human colon carcinoma cells. *Cancer Research*, 50(23), 7483–7489.

Sinitsky, M. Y., Kutikhin, A. G., Tsepokina, A. V., Shishkova, D. K., Asanov, M. A., Yuzhalin, A. E., ... & Ponasenko, A. V. (2020). Mitomycin C induced genotoxic stress in endothelial cells is associated with differential expression of proinflammatory cytokines. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 858, 503252. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2020.503252>

Smith, S., D'Amore, P. A., & Dreyer, E. B. (1994). Comparative toxicity of mitomycin C and 5-fluorouracil in vitro. *American Journal of Ophthalmology*, 118(3), 332–337. [https://doi.org/10.1016/S0002-9394\(14\)75783-1](https://doi.org/10.1016/S0002-9394(14)75783-1)

Thaweboon, S., Thaweboon, B., Dechkunakorn, S., Nisalak, P., & Kaypetch, R. (2014). Anticandidal activity of *Cratoxylum formosum* gum and its cytotoxicity. *Advanced Materials Research*, 974, 394–397. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMR.974.394>

Tomasz, M. (1995). Mitomycin C: Small, fast and deadly (but very selective). *Chemistry & Biology*, 2(9), 575–579. [https://doi.org/10.1016/1074-5521\(95\)90121-1](https://doi.org/10.1016/1074-5521(95)90121-1)

Tomasz, M., & Palom, Y. (1997). The mitomycin bio-reductive antitumor agents: Cross-linking and alkylation of DNA as the molecular basis of their activity. *Pharmacology &*

Therapeutics, 76(1–3), 73–87. [https://doi.org/10.1016/S0163-7258\(97\)00032-5](https://doi.org/10.1016/S0163-7258(97)00032-5)

Uluman, E. (2019). Nar (*Punica granatum* L.) kabuk ekstraktının mitomycin-C genotoksisitesi üzerine olası antigenotoksik etkilerinin in vivo olarak araştırılması (Master's thesis). Kafkas Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kars.

Uluman, E., & Aksu Kiliçle, P. (2020). The investigation of the possible antigenotoxic in vivo effects of pomegranate (*Punica granatum* L.) peel extract on mitomycin-C genotoxicity. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*, 44(2), 382–390. <https://doi.org/10.3906/vet-1910-23>

Ündeğer, Ü., Aydın, S., Başaran, A. A., & Başaran, N. (2004). The modulating effects of quercetin and rutin on the mitomycin C induced DNA damage. *Toxicology Letters*, 151(1), 143–149. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2003.12.065>

Van Pelt, F. N., Haring, R., Overkamp, M. J., & Weterings, P. J. (1991). Micronucleus formation in cultured human keratinocytes following exposure to mitomycin C and cyclophosphamide. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 252(1), 45–50. [https://doi.org/10.1016/0165-1161\(91\)90057-G](https://doi.org/10.1016/0165-1161(91)90057-G)

Winter, M. J., Ellis, L. C., & Hutchinson, T. H. (2007). Formation of micronuclei in erythrocytes of the fathead minnow (*Pimephales promelas*) after acute treatment with mitomycin C or cyclophosphamide. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 629(2), 89–99. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2007.01.011>

Yıldız, Y., & Önen, Ö. (2016). Bazı kirleticilerin Teleostlar üzerindeki genotoksik etkileri. Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 9(1), 63-74.

BÖLÜM III

Antropojenik Gürültünün Sucul Organizmalar Üzerine Etkileri

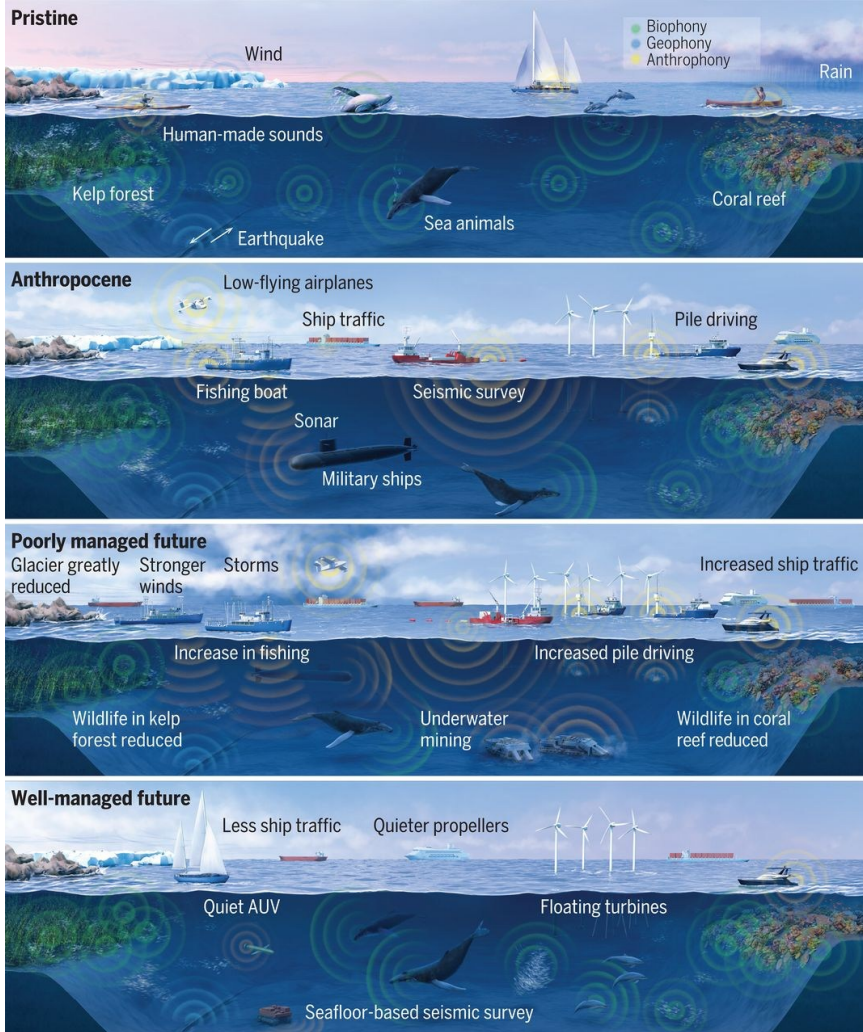
Duygu TANRIKULU¹

Giriş

İnsanlar olarak, çevremizi anlamamıza yardımcı olan ve bizi güvende tutan bir araç olan sese güveniriz. Gürültü, davranışlarımızı birçok şekilde etkiler ve bu gezegenimizi paylaştığımız diğer türler için de farklı değildir. Çoğu deniz memelisi ve balık seslere son derece duyarlıdır. Balinalar ve yunuslar gibi memeliler, okyanuslarda yol bulmak, aile grupları ve yavrularıyla biraraya gelmek ve yırtıcılardan gelen tehlikelerin farkında olmak için seslere güvenirler. Benzer şekilde birçok balık türünün işitme duyusu son derece iyidir. Yiyecek kaynaklarını bulmak, bölgelerini savunmak için ya da yırtıcıların saldırısına maruz kaldıkları anlarda sesler çıkarırlar. Bu nedenle, işitme deniz yaşamında navigasyon, iletişim ve yiyecek temini için kritik bir öneme sahiptir (Sinay, 2021; 2022a, b, c).

¹ Dr. Öğr. Üyesi Duygu TANRIKULU, Kafkas Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Kars/Türkiye, Orcid: 0000-0001-7795-8637, duygu-tanrikulu@hotmail.com

Okyanuslarımız, artan gürültü kirliliğinin deniz memelileri ve balıkların yaşama ve üreme biçimlerini etkilemesiyle birlikte değişmekte ve bu durum su altı ekosistemini tehdit etmektedir (Sinay, 2021).



Şekil 1: Sanayi devriminden önceki okyanus ses manzaraları.

Ulaşım, endüstri, nakliye, sondaj, sonar ve sismik araştırmaları kapsayan inşaat faaliyetleri, müzik ve eğlence amaçlı tekne gezintileri gibi çok çeşitli ses kaynaklarını içeren insan faaliyeti tarafından üretilen her türlü gürültü antropojenik gürültü olarak adlandırılmaktadır.

Antropojenik gürültü önemli bir küresel kirleticisi haline gelmiştir ve çalışmalar gürültünün canlıları etkileyebileceğini ortaya çıkarmıştır. Bu nedenle antropojenik gürültü hem suda hem de karada yaşayan türleri etkilediği için ciddi bir çevresel değişim ve kirlilik biçimi olarak değerlendirilmelidir. Dünyada şu an pek çok tür antropojenik kaynaklı çevresel değişiklikler yaşamaktadır ve akustik ortamda gürültü kirliliğinin neden olduğu değişimler tür ve populasyonların devamlılığını olumsuz yönde etkileyebilmektedir. Gürültü gibi insan kaynaklı çevresel değişikliklerin küresel etkilerini anlamak yönlendirmeli koruma çabalarını mümkün kılması açısından oldukça önemlidir. (Kunc & Schmidt, 2019).

Antropojenik kirlilikler arasında yer alan gürültü, kara ve su ortamlarında en yaygın kirlilik türlerinden biri olarak büyük bir endişe kaynağı haline gelmiştir ve Dünya Sağlık Örgütü'ne göre gürültü, en yaygın kirlilik türlerinden biridir (Gigot & ark., 2024).

Antropojenik Gürültünün Etkileri

Antropojenik kaynaklı çevresel değişiklikler, gezegenimizi şimdiye kadar görülmemiş bir hızla etkilediği için biyolojik çeşitliliğe ve ekosistemlerin işlevine yönelik önemli bir tehdit olarak kabul edilmektedir (Stenseth & ark., 2002; Walther & ark., 2002; Kunc & Schmidt, 2021).

Gürültü kirliliği, denizel organizmaların fizyoloji, davranış ve sağlığı üzerindeki olumsuz etkileri nedeniyle antropojenik bir stres faktörü olarak bilinmektedir (Ferrier-Pages & ark., 2021).

Deniz taşımacılığı, balıkçılık ve turizmin (eğlence amaçlı kullanılan motorlu su taşıtları) son zamanlarda artmasıyla birlikte

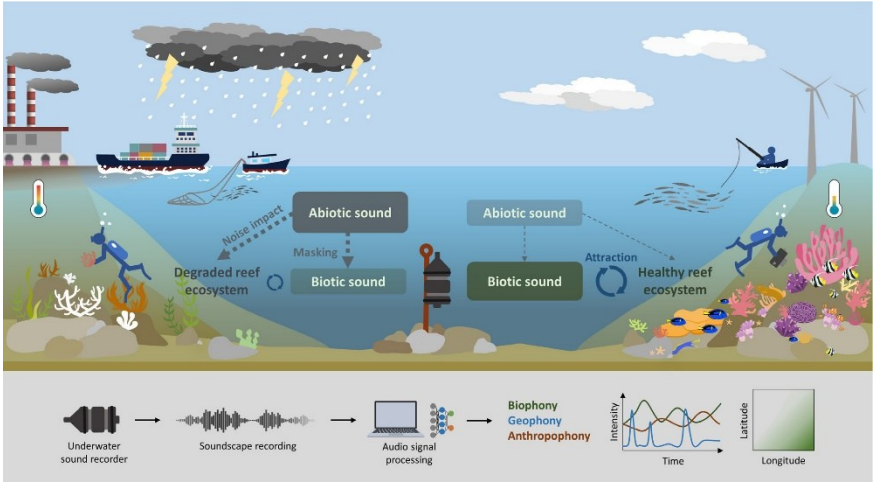
mercan resiflerinde su altı gürültüsü büyük ölçüde artmıştır. Karasal kökenli kirlilik, aşırı avlanma ve iklim değişikliği gibi faktörler, küresel olarak mercan resiflerinin devamlılığını tehdit etmektedir (Hughes, 1994; Graham & ark., 2006; Zaneveld & ark., 2016; Hughes & ark., 2017; Morrison & ark., 2019). Aynı zamanda, deniz gürültüsü kirliliği hızla artmaktadır (Malakoff, 2010; Dinh & ark., 2018). Bu da antropojenik ses kirliliğinin mercan resifi organizmaları üzerindeki etkilerinin neler olduğu ve bununla nasıl başa çıkılacağı sorularını gündeme getirmektedir (Morrison & ark., 2020).

Ses, hava ya da su gibi bir ortamda oluşan mekanik bir bozulmanın (parçacık hareketi) yayılmasıdır ve akustik dalgalar şeklinde ortaya çıkmaktadır (Pijanowski & ark., 2011). Denizel ortamda doğal sesler bulunur ve bu sesler, hem abiyotik kaynaklardan (örneğin yer hareketi, rüzgar ve dalgalar, topluca jeofoni olarak adlandırılır) hem de biyotik kaynaklardan (örneğin balıkların karides gibi yiyeceklerle beslenirken çıkardıkları sesler, topluca biyofoni olarak adlandırılır; kaynaklanır (Pijanowski & ark., 2011; Tricas & Boyle, 2014). Antropojenik sesler çoğunlukla doğal seslere oranla çok daha yüksektir (Ferrier-Pages & ark., 2021).

Belirli bir yerden yayılan doğal ve insan yapımı seslerin birleşerek benzersiz bir akustik desen oluşturmaya ses manzarası denilmektedir. Antropojenik gürültü kirliliği, mercan resiflerinin doğal ses manzarasını önemli şekilde değiştirmiştir (Dinh ve ark., 2018). Bu kirlilik türü esas olarak gemi trafiği ile eğlence ve balıkçı teknelerinden kaynaklansa da patlayıcıyla balık tutma, askeri sonar kullanımı, petrol sondajı, sismik araştırmalar veya tarama çalışmalarından da kaynaklanmaktadır (Ainslie & de Jong, 2016). Gürültü deniz yaşamını fizyolojik, nörolojik, endokrinolojik ve davranışsal olarak çok yönlü etkilemektedir (Ferrier-Pages & ark., 2021). Çoğu zaman, gürültü kirliliği duyuşsal olarak karışıklığa yol açar. Resif organizmaları arasındaki iletişimi maskeleyerek, üreme davranışları, bölgelerini savunma ve yırtıcıları caydırma esnasında çeşitli sesler üreten organizmalar üzerinde olumsuz etkiler yaratır (Myrberg & Fuiman, 2002).

İnsan kaynaklı gürültülerin, deniz memelilerinin ve balıkların da davranışlarını bozduğu, fizyolojilerini ve üremelerini olumsuz yönde etkilediği ve giderek artan ölümlere yol açtığı gözlemlenmiştir (Baker, 2021). Araştırmalar, gürültü kirliliğinin balıkları sağır ettiğini göstermektedir. Bu durum, avlanma oranlarını azaltabilir, balıklarda stres tepkilerine yol açabilir ve uygun deniz habitatlarını aramalarını etkileyebilir (Weilgart, 2008). Sadece memeliler ve balıklar değil, kabuklular gibi omurgasız hayvanlar da gürültü kirliliğine duyarlıdır (Sinay, 2021).

Sağlıklı mercan resiflerinin ses manzaraları, yoğun biyotik seslerle (biyofoni) domine olup, bu sesler mercanlarla ilişkili organizmaları akustik olarak çekebilir. Buna karşın, önemli doğal ve antropojenik bozulmalar, mercan resiflerinin ses manzaralarını önemli ölçüde etkileyen abiyotik sesler (jeofoni ve antropofoni) üretir ve bu sesler, biyotik sesleri maskeleyerek mercan resiflerinin ekosistemlerini doğrudan etkileyip bozulmalarına neden olarak, deniz canlılarının fizyolojisini ve davranışlarını etkileyebilir ve mercan resiflerinin dirençliliğini azaltabilir (Ferrier-Pages & ark., 2021). Hem omurgalı hem omurgasız resif organizmaları, navigasyon, habitat seçimi, yiyecek arama, üreme ve yırtıcıları tespit etme, kaçma gibi aktiviteler için sesi algılar ve kullanır (Fewtrell & McCauley, 2012; Popper ve Hawkins, 2019).



Şekil 2: Mercan resifi sosyal-ekolojik sistemlerini değerlendirmek için su altı ses manzaralarının kullanılması

(Lin & ark., 2023)



Şekil 3: Gürültü kirliliğinin resif organizmaları üzerindeki etkileri

(Ferrier-Pages & ark., 2021)

Son on yılda, insan kaynaklı denizcilik faaliyetleri, özellikle deniz kıyısı alanlarında hızla artarak doğal deniz ses manzarasını önemli ölçüde değiştirmiştir (McKenna & ark., 2012). Bu faaliyetler, küresel su altı ses seviyesini artırarak okyanuslardaki doğal ses imzalarını da derinden değiştirmektedir (Chapman & Price, 2011). Genellikle rüzgar türbinleri, köprü destekleri, petrol ve gaz platformları gibi açık deniz yapılarının kurulumu için kullanılan

metal ya da beton direk çakma işlemleri, deniz altındaki insan yapımı gürültü kaynakları arasında en yüksek ses seviyelerinden birine sahiptir (Robinson & ark., 2013). Deniz üzerinde rüzgar enerjisi santrali kurulumları sırasında işlemler birkaç ay sürebildiği için, bu süreçteki gürültü kirliliği, ilkbaharda bentik yetişkinlerde gametogenezi, yaz aylarında ise larval aşamaları olumsuz etkileyebilmektedir (Gigot & ark., 2024).

Gigot ve arkadaşları (2024) bu gürültülerin sucul bir omurgasız türü olan *Pecten maximus*'u erişkinlikten post-larva aşamasına kadar birden fazla yaşam evresinde etkilediğini, özellikle de gonad büyümesi, yumurta kalitesi ve yağ asidi içeriği üzerindeki olumsuz etkilerini ortaya çıkarmışlardır.

Gürültü kirliliğinin deniz yaşamı üzerindeki potansiyel etkileri büyük bir endişe kaynağıdır ve bu konu Deniz ekolojisinde gelişmekte olan bir araştırma alanıdır (National Research Council, 2003; Weilgart, 2007; Samson & ark., 2016; Popper & Hawkins, 2019). Bazı çalışmalar, gürültünün omurgasızlarda davranışsal tepkileri tetikleyebileceğini (Fewtrell & McCauley, 2012; Charifi & ark., 2017; Williams & ark., 2022), genetik ifade (Peng & ark., 2016), DNA bütünlüğü (Wale & ark., 2016), larval gelişim (de Soto & ark., 2013) ve davranışlar (Wilkens & ark., 2012; Lillis & ark., 2015; Eggleston & ark., 2016; Jolivet & ark., 2016) üzerinde etkili olabileceğini kanıtlamıştır (Gigot & ark., 2024).

İklim değişikliği, tür istilaları, habitat kaybı ve parçalanması (Dukes & Mooney, 1999; Thomas & ark., 2004; Foley & ark., 2005; Butchart & ark., 2010) gibi faktörlerin yanı sıra antropojenik gürültü gibi akustik çevredeki değişiklikler de biyolojik çeşitliliği erozyona uğratmada kritik bir rol oynamaktadır. Hem sucul hem de kara habitatlarında, antropojenik gürültünün başlıca kaynakları, insan nüfusundan daha hızlı büyüyen ulaşım ağlarıyla ilişkilidir (Barber & ark., 2010). Birçok türde akustik iletişim bilgi alışverişi yoluyla sosyal ilişkilerin sürdürülmesinde kritik bir rol oynamaktadır. Buna karşın akustik iletişim kuran türlerin, antropojenik gürültüye uyum sağlama şekillerinin nasıl farklılık gösterdiği hala tam olarak

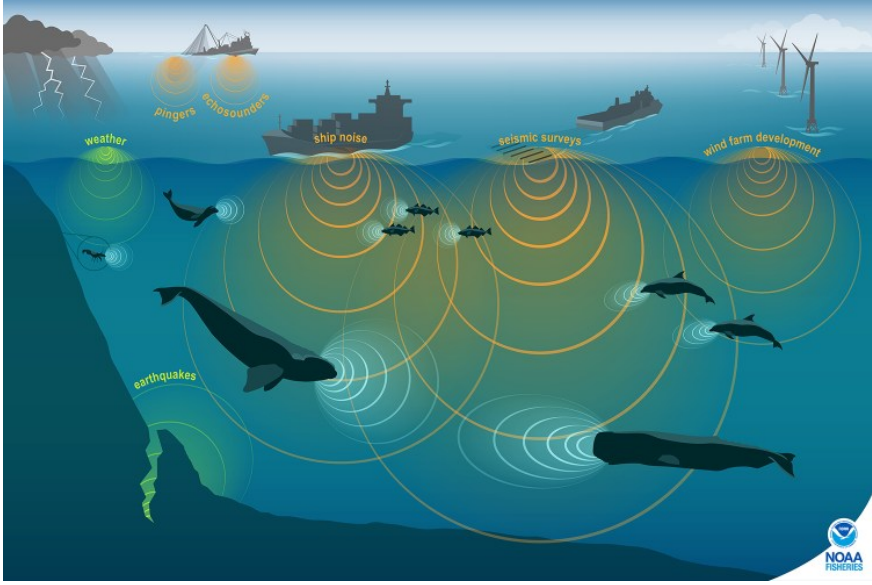
anlaşılamamıştır. Oysaki bu, türlerin insan kaynaklı çevresel değişikliklere nasıl tepki vereceklerini tahmin etme yeteneğimize bağlı olarak, türlerin etkin bir şekilde korunabilmesi için oldukça önemlidir. Antropojenik gürültü, akustik sinyallerle doğrudan etkileşime girerek, akustik sinyallere dayalı iletişim kuran türlerin, artan antropojenik gürültüye karşı özellikle savunmasız hale gelmelerine neden olabilmektedir. Son on yılda, antropojenik gürültünün akustik iletişim üzerindeki etkilerini araştıran çok sayıda çalışma yapılmıştır. Ancak, bu tür tekil çalışmalar gürültünün potansiyel etkilerine dair kapsamlı bir anlayış sunamayacağı gibi, bu yeni çevresel stres faktörüne karşı türlerin potansiyel hassasiyetlerini de çözemez (Kunc & Schmidt, 2021).

Deniz memelileri ve diğer suda yaşayan hayvanlar, milyonlarca yıl boyunca su altı sesini birincil iletişim aracı ve çevrelerini değerlendirme aracı olarak kullanmak üzere evrimleşmişlerdir. Ses, üreme, yiyecek arama, sosyal yapıyı koruma ve yırtıcılardan kaçınma gibi deniz canlıları için kritik faaliyetlerde önemli bir rol oynar. Örneğin, balinalar (balinalar, yunuslar ve domuz balıkları) birbirleriyle iletişim kurmak, suda gezinmek, yiyecek bulmak ve daha fazlası için karmaşık sesler gönderir ve alırlar. Balıklar ve omurgasızlar da bu temel yaşam işlevleri için sesi kullanırlar (NOAA, 2024).

Sanayi devriminin başlangıcından bu yana, insanlar okyanuslara giderek daha fazla ses yaymıştır. Küresel gemi taşımacılığı, petrol ve gaz keşfi, inşaat faaliyetleri ve denizcilik tatbikatları gibi geniş çaplı aktiviteler, okyanus gürültüsüne katkıda bulunmaktadır. Bu antropojenik seslerin potansiyel etkileri, sesin ışıqla kıyasla su altında çok daha iyi ve daha uzak mesafelere yayılabilmesi nedeniyle geniş alan ve zaman dilimlerinde görülebilmektedir (NOAA, 2024).

Ses kaynağına, süresine ve konumuna bağlı olarak antropojenik gürültülerin hayvanlar üzerinde, geçici veya kalıcı işitme kaybı, strese karşı tepki oluşturma, hayvanları yaşam alanlarından uzaklaştırma veya göç yollarından saptırma, beslenme,

üreme/yumurtlama, bakım ve iletişim davranışlarını bozma gibi etkileri olabilir (NOAA, 2024).



Şekil 4: Deniz hayvanları, insanlardan, doğadan ve diğer türlerden gelen birleşik seslerin olduğu gürültülü bir yaşam alanında yaşar

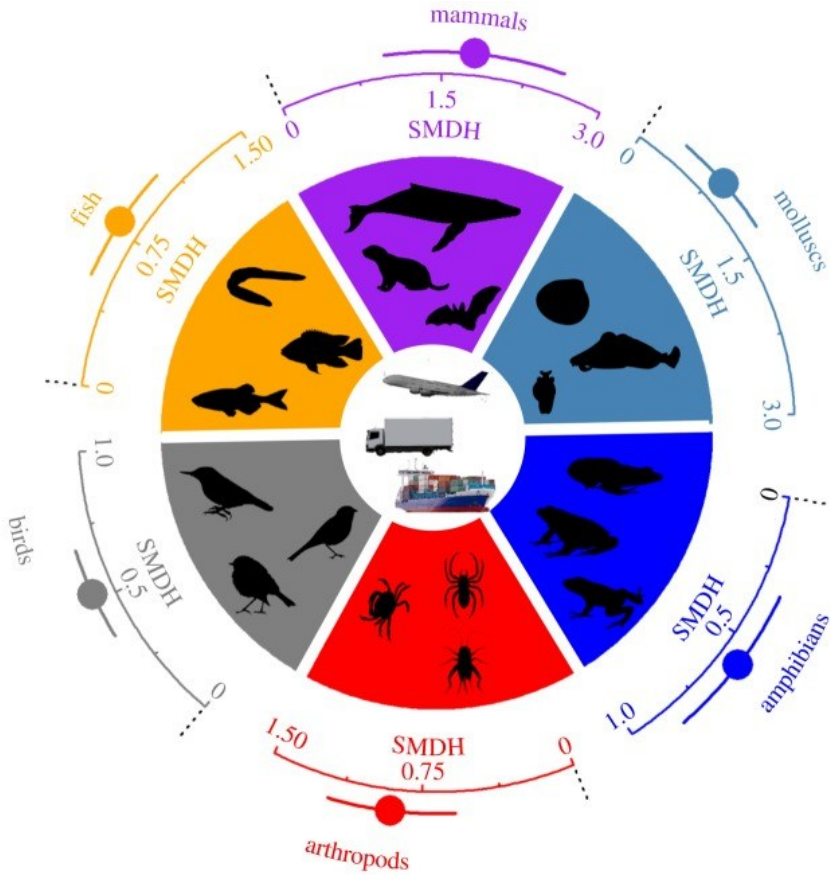
(NOAA, 2024)

Pekçok habitatta, doğal kaynaklardan gelen gürültüler her yerde mevcut olup önemli bir evrimsel seçici güç rolündedir (Wiley, 2015). Buna karşılık, antropojenik gürültü doğal olarak oluşan gürültüden farklıdır çünkü özellik olarak yüksek titreşimli ve düşük perdelidir (Hildebrand, 2009). Bu özellikler, antropojenik gürültüyü çevresel bir stres faktörü olarak algılanabilen yeni bir uyaran haline getirir (Kight & Swaddle, 2011; Shannon & ark., 2016).

Tarihsel olarak, antropojenik gürültü insanları olumsuz etkileyen büyük bir sorun olarak görülmüştür. Basit bir rahatsızlıktan erken ölüme kadar çok çeşitli sağlık sorunlarına yol açabilmektedir ve olumsuz sosyoekonomik etkileri de olabilmektedir. Hayvanların da antropojenik gürültüden etkilendiği

çok daha yakın bir zamanda farkedilmiştir. Antropojenik gürültü gibi insan kaynaklı çevresel değişikliklerin hayvanlar üzerindeki etkilerini anlamak, türlerin bu tür değişikliklere nasıl tepki vereceğini tahmin etmemizi sağladığı için çok önemlidir. Türlerin dışsal bir strese verdiği tepkinin derecesi türün hassasiyetini belirler. Daha duyarlı türler, daha az duyarlı türlere göre daha büyük değişim gösterir. Gürültü, organizmaların iletişimini, dağılımını, beslenmesini ve homeostazını da etkileyebilir (McKenna & ark., 2012; Kunc & Schmidt, 2019).

Kunc ve Schmidt (2019) “The effects of anthropogenic noise on animals: a meta-analysis” adlı çalışmalarında çok katmanlı bir meta-analiz yaklaşımı ile gürültünün birçok amfibi, eklembacaklı, kuş, balık memeli, yumuşakça ve sürüngen türünü etkilediğini ortaya koyarak, antropojenik gürültünün etkilerini yalnızca birkaç türün gürültüye duyarlı olmasından ziyade türlerin çoğunluğunun gürültüye tepki vermesi şeklinde açıklamışlardır. Aynı zamanda antropojenik gürültünün önemli tepkilere neden olduğunu ancak taksonomik grupların gürültüye verdikleri tepkilerin farklı olmadığını bulmuşlardır. Yine bu araştırma ile gürültünün çeşitli farklı taksonomik gruplardan ziyade çeşitli türleri özellikle etkilediğine dair net kanıtlar ortaya koymuşlardır.

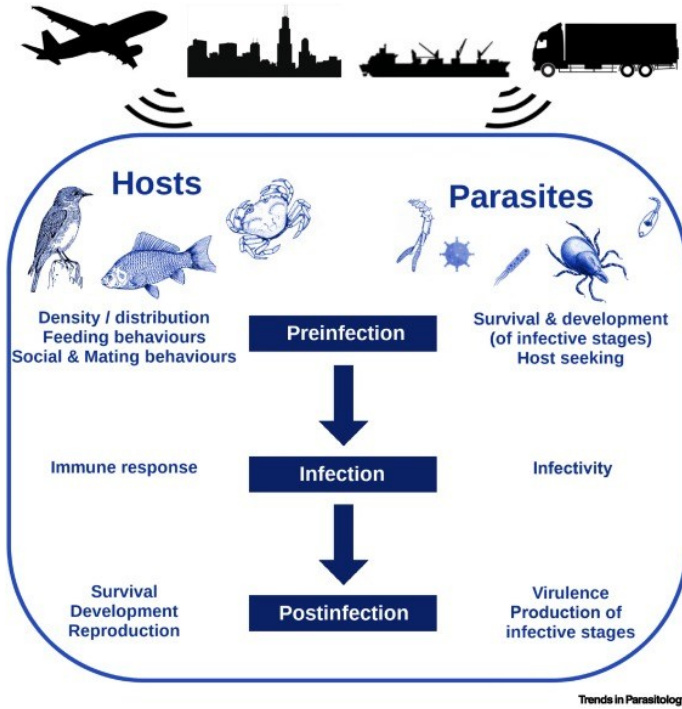


Şekil 5: Çeşitli taksonomik gruplar üzerinde antropojenik gürültünün etkileri

(Kunc & Schmidt, 2019)

Antropojenik gürültü yarasaların avlanma verimliliğini de azaltır (Siemers & Schaub, 2010). Bu nedenle, artan gürültü seviyeleri avcıyı olumsuz etkiler. Bu durum, potansiyel av üzerindeki avlanma baskısının azalmasıyla ilişkilendirilebilir. Böylece potansiyel av antropojenik gürültüden dolayı olarak faydalanmış olur (Kunc & Schmidt, 2019).

Antropojenik gürültü kirliliği, sadece sucul ortamda değil yaban hayatı üzerinde de zararlı etkilere sahiptir, ancak bu etkilerin hastalıklar üzerindeki etkileri büyük ölçüde bilinmemektedir. Gürültü, konak davranışı ve dağılımındaki değişiklikler yoluyla parazitlere maruz kalma olasılığını değiştirebilir. Ayrıca, parazitlerin konak arama davranışları gürültü tarafından bozulabilir. Gürültüye bağlı stres genellikle bağışıklık baskılamasına yol açar. Bu da konağın enfeksiyona karşı duyarlılığını artırabilir. Benzer şekilde, gürültünün parazitler üzerindeki etkileri, onların enfekte etme yeteneklerini azaltabilir (Berkhout & ark., 2023).



Şekil 6: Gürültü kirliliğinin parazit-konak etkileşimlerinin üç aşaması üzerindeki potansiyel etkileri: enfeksiyon öncesi, enfeksiyon esnası ve enfeksiyon sonrası

(Berkhout & ark., 2023)

Sonuç:

Gürültünün potansiyel etkilerini anlamak ve bunu nicel verilere dönüştürmek gürültünün etkileri hakkında bütünsel bir yaklaşım elde etmemizi sağlar. Bu veriler evrimsel ekolojinin türlerin insan kaynaklı çevresel değişikliklere nasıl bir duyarlılık gösterdiğini anlamada da bize bir pencere açar. Gürültüye karşı verilen tepkilerin altında yatan mekanizmaları çözmek için aynı tepki değişkenlerine ve deneysel protokole odaklanan türler arasında daha fazla karşılaştırmalı çalışmaya ihtiyaç vardır (Kunc & Schmidt, 2019).

Antropojenik gürültüye verilen bu tepkilerin altında yatan evrimsel mekanizmayı anlamak da oldukça önemlidir. Değişen çevresel koşullarına uyum sağlama, fenotipik plastisite veya doğal seçilime karşı mikroevrimsel tepki yoluyla meydana gelmektedir (West-Eberhard, 2003). Fenotipik plastisite, bireylerin çevredeki değişikliklere anında uyum sağlamasını sağlarken, mikroevrimsel tepkiler seçimden kaynaklanmaktadır (Pigliucci, 2005). Şu ana kadar, diğer insan kaynaklı çevresel değişikliklere yanıt olarak gözlemlenen çoğu fenotipik değişikliğin fenotipik plastisiteye dayalı olduğu bulunmuştur (Hendry & ark., 2008). Buna dayanarak antropojenik gürültü ile ortaya çıkan değişiklikler için en tutarlı açıklama fenotipik plastisitedir (Kunc & Schmidt, 2019).

Gürültü yalnızca dikkat etmemiz gereken birkaç türü değil, farklı ekosistemlerde yaşayan birçok türü etkilediği için koruma açısından özellikle önemlidir. Bu nedenle, gürültünün ekosistemleri ve içinde yaşayan türleri nasıl etkilediğini tam olarak anlamak için gürültü ile hem abiyotik hem de biyotik faktörler arasındaki olası etkileşimlerin de dikkate alınması gerekmektedir. Ekosistemler, çeşitli temel özellikler açısından farklılık gösterir. Örneğin, karasal ekosistemlerde, bitki örtüsü sayesinde gürültünün etkileri hafifletilebilirken, sucul sistemlerin pelajik bölgeleri gürültüyü azaltma konusunda daha az kapasiteye sahip olabilmektedir. Ayrıca, bu etkilerin artması da muhtemeldir çünkü insan kaynaklı çevresel

değişiklikler genellikle birbirinden bağımsız olarak değil birlikte gerçekleşmektedir (Crain & ark., 2008; Kunc & Schmidt, 2019).

Memeliler ve deniz canlıları, su altında iletişim ve hayatta kalmak için sese bağımlıdır. Ancak sesin kendisi kritik bir sorun değildir. Sorun, sesler "gürültüye" dönüştüğünde ortaya çıkmaktadır. Sorunun derecesi, her türün hassasiyet eşiğine ve üretilen etki türüne bağlıdır. İnsan kaynaklı gürültü kirliliğinin deniz memelileri ve diğer türler üzerindeki etkileri çeşitlidir ve önem ve büyüklükleri artmaktadır. Okyanus gürültüsü bir hayvanın davranışını önemli ölçüde değiştirebilir. Su altı gürültü kirliliği önemli bir sorundur. Yine de gemileri ve diğer taşıma araçlarını tasarlama şeklimizi değiştirerek bu konuda bir şeyler yapabiliriz. İnsanlık olarak hep birlikte okyanuslarımızdaki antropojenik gürültü kirliliğinin hacmini azaltabiliriz (Sinay, 2022a, b, c).



Şekil 7: Su altında yunusların akustik iletişimi

(Sinay, 2022a, b, c).

Sonuç olarak araştırmalar, antropojenik gürültünün ciddi bir çevresel değişim ve kirlilik biçimi olarak değerlendirilmesi gerektiğini göstermektedir. Araştırma sonuçları, yasama organlarına

türleri, giderek artan antropojenik gürültüden etkili bir şekilde korumak için sağlam bir yasal çerçeve geliştirmeleri adına gerekli kanıtları sağlamaktadır.

Okyanustaki akustik seviyeleri ve frekansları bilerek bozmak deniz florasını ve faunasını korumada başarısız olmamıza, aynı zamanda da kıyı bölgelerinde yaşayan insan popülasyonlarında olası sağlık sorunlarını önleyemememize neden olmaktadır. Hem insanlar hem de deniz hayvanları için daha güvenli ve sağlıklı bir çevreyi oluşturma yollarından biri, ekonomide okyanus ve kıyı kaynaklarının sürdürülebilir yönetimi için "Mavi ekonomi" ye yatırım yapmaktır. Daha verimli kara ve okyanus yönetimi ile deniz ekosistemlerinin iyileştirilmesi ve daha düşük sera gazı emisyonu açığa çıkma olasılığı arttırılmış olur. Okyanustaki gürültü kirliliği, hükümetlerin bir araya gelerek yeni düzenlemeler getirmesi ve okyanuslardaki ses seviyelerinin sağlıklı bir şekilde izlenmesi için yollar geliştirmesi ve böylece hepimizin mükemmel dengeli bir ekosistemde gelişebilmesi için ele alınması gereken küresel bir sorundur (McKenna & ark., 2012; Sinay, 2022a, b, c).

Kaynaklar

Ainslie, M. A., & de Jong, C. A. (2016). Sources of underwater sound and their characterization. In *The effects of noise on aquatic life II* (pp. 27–35). Springer.

Baker, A. (2021). Underwater Noise Pollution Is Disrupting Ocean Life — But We Can Fix It. <https://time.com/5936110/underwater-noise-pollution-report/>
Erişim tarihi: 24.11.2024

Barber, J. R., Crooks, K. R., & Fristrup, K. M. (2010). The costs of chronic noise exposure for terrestrial organisms. *Trends in Ecology & Evolution*, 25(3), 180–189. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2009.08.002>

Berkhout, B. W., Budria, A., Thieltges, D. W., & Slabbekoorn, H. (2023). Anthropogenic noise pollution and wildlife diseases. *Trends in Parasitology*, 39(3), 181–190. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2022.12.002>

Butchart, S. H., Walpole, M., Collen, B., Van Strien, A., Scharlemann, J. P., Almond, R. E., Baillie, J. E., Bomhard, B., Brown, C., Bruno, J., & Carpenter, K. E. (2010). Global biodiversity: Indicators of recent declines. *Science*, 328(5982), 1164–1168.

Chapman, N. R., & Price, A. (2011). Low-frequency deep ocean ambient noise trend in the Northeast Pacific Ocean. *Journal of the Acoustical Society of America*, 129, EL161–EL165. <https://doi.org/10.1121/1.3567084>

Charifi, M., Sow, M., Ciret, P., Benomar, S., & Massabuau, J. C. (2017). The sense of hearing in the Pacific oyster, *Magallana*

gigas. *PLOS ONE*, 12, e0185353.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185353>

Crain, C. M., Kroeker, K., & Halpern, B. S. (2008). Interactive and cumulative effects of multiple human stressors in marine systems. *Ecology Letters*, 11, 1304–1315.
<https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2008.01253.x>

de Soto, N. A., Delorme, N., Atkins, J., Howard, S., Williams, J., & Johnson, M. (2013). Anthropogenic noise causes body malformations and delays development in marine larvae. *Scientific Reports*, 3, 2831. <https://doi.org/10.1038/srep02831>

Dinh, J. P., Suca, J. J., Lillis, A., Apprill, A., Llopiz, J. K., & Mooney, T. A. (2018). Multiscale spatio-temporal patterns of boat noise on U.S. Virgin Island coral reefs. *Marine Pollution Bulletin*, 136, 282–290.

Duarte, C. M., Chapuis, L., Collin, S. P., Costa, D. P., Devassy, R. P., Eguiluz, V. M., Erbe, C., Gordon, T. A. C., Halpern, B. S., Harding, H. R., Havlik, M. N., Meekan, M., Merchant, N. D., Miksis-Olds, J. L., Parsons, M., Predragovic, M., Radford, A. N., Radford, C. A., Simpson, S. D., Slabbekoorn, H., Staaterman, E., Van Opzeeland, I. C., Winderen, J., Zhang, X., & Juanes, F. (2021). The soundscape of the Anthropocene ocean. *Science*, 371(6530), eaba4658. <https://doi.org/10.1126/science.aba4658>

Dukes, J. S., & Mooney, H. A. (1999). Does global change increase the success of biological invaders? *Trends in Ecology & Evolution*, 14(4), 135–139.

Eggleston, D. B., Lillis, A., & Bohnenstiehl, D. R. (2016). Soundscapes and larval settlement: Larval bivalve responses to habitat-associated underwater sounds. In A. N. Popper & A. D. Hawkins (Eds.), *The effects of noise on aquatic life II* (pp. 255–263). Springer.

Ferrier-Pagès, C., Leal, M. C., Calado, R., Schmid, D. W., Bertucci, F., Lecchini, D., & Allemand, D. (2021). Noise pollution on coral reefs?—A yet underestimated threat to coral reef communities. *Marine Pollution Bulletin*, 165, 112129. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2021.112129>

Fewtrell, J. L., & McCauley, R. D. (2012). Impact of air gun noise on the behaviour of marine fish and squid. *Marine Pollution Bulletin*, 64, 984–993. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2012.02.009>

Foley, J. A., DeFries, R., Asner, G. P., Barford, C., Bonan, G., Carpenter, S. R., Chapin, F. S., Coe, M. T., Daily, G. C., Gibbs, H. K., & Helkowski, J. H. (2005). Global consequences of land use. *Science*, 309(5734), 570–574.

Gigot, M., Tremblay, R., Bonnel, J., Mathias, D., Meziane, T., Chauvaud, L., & Olivier, F. (2024). Noise pollution causes parental stress on marine invertebrates: The Giant scallop example. *Marine Pollution Bulletin*, 203, 116454. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2024.116454>

Graham, N. A., Wilson, S. K., Jennings, S., Polunin, N. V., Bijoux, J. P., & Robinson, J. (2006). Dynamic fragility of oceanic coral reef ecosystems. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103, 8425–8429.

Hendry, A. P., Farrugia, T. J., & Kinnison, M. T. (2008). Human influences on rates of phenotypic change in wild animal populations. *Molecular Ecology*, 17, 20–29. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2007.03428.x>

Hildebrand, J. A. (2009). Anthropogenic and natural sources of ambient noise in the ocean. *Marine Ecology Progress Series*, 395, 5–20. <https://doi.org/10.3354/meps08353>

Hughes, T. P. (1994). Catastrophes, phase shifts, and large-scale degradation of a Caribbean coral reef. *Science*, 265, 1547–1551.

Hughes, T. P., Barnes, M. L., Bellwood, D. R., Cinner, J. E., Cumming, G. S., Jackson, J. B., Kleypas, J., Van De Leemput, I. A., Lough, J. M., & Morrison, T. H. (2017). Coral reefs in the Anthropocene. *Nature*, 546, 82.

Jolivet, A., Tremblay, R., Olivier, F., Gervaise, C., Sonier, R., Genard, B., & Chauvaud, L. (2016). Validation of trophic and anthropic underwater noise as settlement trigger in blue mussels. *Scientific Reports*, 6, 33829. <https://doi.org/10.1038/srep33829>

Kight, C. R., & Swaddle, J. P. (2011). How and why environmental noise impacts animals: An integrative, mechanistic review. *Ecology Letters*, 14(10), 1052–1061. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2011.01664.x>

Kunc, H. P., & Schmidt, R. (2019). The effects of anthropogenic noise on animals: A meta-analysis. *Biology Letters*, 15, 20190649. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2019.0649>

Kunc, H. P., & Schmidt, R. (2021). Species sensitivities to a global pollutant: A meta-analysis on acoustic signals in response to anthropogenic noise. *Global Change Biology*, 27, 675–688. <https://doi.org/10.1111/gcb.15428>

Lillis, A., Bohnenstiehl, D. R., & Eggleston, D. B. (2015). Soundscape manipulation enhances larval recruitment of a reef-building mollusk. *PeerJ*, 3, e999. <https://doi.org/10.7717/peerj.999>

Lin, T. H., Sinniger, F., Harii, S., & Akamatsu, T. (2023). Using soundscapes to assess changes in coral reef social-ecological systems. *Oceanography*, 36(1), 20-27.

Malakoff, D. (2010). A push for quieter ships. American Association for the Advancement of Science.

McKenna, M. F., Katz, S. L., Wiggins, S. M., Ross, D., & Hildebrand, J. A. (2012). A quieting ocean: Unintended consequence of a fluctuating economy. *Journal of the Acoustical Society of America*, 132, EL169–EL175. <https://doi.org/10.1121/1.4740225>

Morrison, T. H., Hughes, T. P., Adger, W. N., Brown, K., Barnett, J., Lemos, M. C. (2019). Save reefs to rescue all ecosystems. *Nature*, 573, 333–336.

Morrison, T. H., Adger, N., Barnett, J., Brown, K., Possingham, H., & Hughes, T. (2020). Advancing coral reef governance into the Anthropocene. *One Earth*, 2, 64–74.

Myrberg, A.A. & Fuiman, L.A., (2002). The sensory world of coral reef fishes. In: Coral Reef Fishes: Dynamics and Diversity in a Complex Ecosystem. *Academic, San Diego*, pp. 123–148.

National Research Council. (2003). *Ocean noise and marine mammals*. National Academies Press.

NOOA (NOOA Fisheries) [2024].
<https://www.fisheries.noaa.gov/national/science-data/ocean-noise>
Erişim tarihi: 15.12.2024.

Peng, C., Zhao, X., & Liu, S. (2016). Effects of anthropogenic sound on digging behavior, metabolism, $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ ATPase activity, and metabolism-related gene expression of the bivalve *Sinonovacula constricta*. *Scientific Reports*, 6, 24266.
<https://doi.org/10.1038/srep24266>

Pigliucci, M. (2005). Evolution of phenotypic plasticity: Where are we going now? *Trends in Ecology & Evolution*, 20, 481–486. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2005.06.001>

Pijanowski, B. C., Villanueva-Rivera, L. J., Dumyahn, S. L., Farina, A., Krause, B. L., Napoletano, B. M., Gage, S. H., & Pieretti, N. (2011). Soundscape ecology: The science of sound in the landscape. *BioScience*, 61, 203–216.

Popper, A. N., & Hawkins, A. D. (2019). An overview of fish bioacoustics and the impacts of anthropogenic sounds on fishes. *Journal of Fish Biology*, 94, 692–713.
<https://doi.org/10.1111/jfb.13948>

Robinson, S. P., Theobald, P. D., & Lepper, P. A. (2013). Underwater noise generated from marine piling. In *Proceedings of Meetings on Acoustics*, Vol. 17 (No. 1). AIP Publishing.

Samson, J. E., Mooney, T. A., Gussekloo, S. W. S., & Hanlon, R. T. (2016). A brief review of cephalopod behavioral

responses to sound. In *The effects of noise on aquatic life II* (pp. 969–975). Springer.

Shannon, G., McKenna, M. F., Angeloni, L. M., Crooks, K. R., Fristrup, K. M., Brown, E., Warner, K. A., Nelson, M. D., White, C., Briggs, J., McFarland, S., & Wittemyer, G. (2016). A synthesis of two decades of research documenting the effects of noise on wildlife. *Biological Reviews*, 91(4), 982–1005. <https://doi.org/10.1111/brv.12207>

Siemers, B. M., & Schaub, A. (2010). Hunting at the highway: Traffic noise reduces foraging efficiency in acoustic predators. *Proceedings of the Royal Society B*, 278, 1646–1652. <https://doi.org/10.1098/rspb.2010.2262>

Sinay (Sinay Maritime Data Solution) (2021). Underwater Noise Pollution is Threatening our Marine Life: it is Time to Act. <https://sinay.ai/en/underwater-noise-pollution-is-threatening-our-marine-life-it-is-time-to-act/> Erişim tarihi: 15.11.2024.

Sinay (Sinay Maritime Data Solution) (2022a). What are the Effects of Underwater Noise Pollution? <https://sinay.ai/en/effects-of-underwater-noise-pollution/> Erişim tarihi: 15.12.2024.

Sinay (Sinay Maritime Data Solution) (2022b). How can we Detect Underwater Sound? Which Material is Used? <https://sinay.ai/en/how-can-we-detect-underwater-sound-which-material-is-used/> Erişim tarihi: 18.11.2024.

Sinay (Sinay Maritime Data Solution) (2022c). What are 4 Sources of Noise Pollution by Humans in the Ocean?

<https://sinay.ai/en/what-are-4-sources-of-noise-pollution-by-humans-in-the-ocean/> Erişim tarihi: 25.11.2024.

Stenseth, N. C., Mysterud, A., Ottersen, G., Hurrell, J. W., Chan, K. S., & Lima, M. (2002). Ecological effects of climate fluctuations. *Science*, 297(5585), 1292–1296. <https://doi.org/10.1126/science.1071281>

Thomas, C. D., Cameron, A., Green, R. E., Bakkenes, M., Beaumont, L. J., Collingham, Y. C., Erasmus, B. F., De Siqueira, M. F., Grainger, A., Hannah, L., & Hughes, L. (2004). Extinction risk from climate change. *Nature*, 427(6970), 145–148.

Tricas, T. C., & Boyle, K. S. (2014). Acoustic behaviors in Hawaiian coral reef fish communities. *Marine Ecology Progress Series*, 511, 1–16.

Wale, M. A., Briers, R. A., Bryson, D., Hartl, M. G. J., & Diele, K. (2016). The effects of anthropogenic noise playbacks on the blue mussel *Mytilus edulis*. *Proceedings*, 19–21.

Walther, G. R., Post, E., Convey, P., Menzel, A., Parmesan, C., Beebee, T. J., Fromentin, J.-M., Hoegh-Guldberg, O., & Bairlein, F. (2002). Ecological responses to recent climate change. *Nature*, 416(6879), 389. <https://doi.org/10.1038/416389a>

Weilgart, L. S. (2007). A brief review of known effects of noise on marine mammals. *International Journal of Comparative Psychology*, 20, 11.

Weilgart, L. S. (2008). The impact of ocean noise pollution on marine biodiversity. *International Ocean Noise Coalition*, 1-6.

West-Eberhard, M. J. (2003). *Developmental plasticity and evolution*. Oxford University Press.

Wiley, R. H. (2015). *Noise matters*. Harvard University Press.

Wilkens, S. L., Stanley, J. A., & Jeffs, A. G. (2012). Induction of settlement in mussel (*Perna canaliculus*) larvae by vessel noise. *Biofouling*, 28, 65–72. <https://doi.org/10.1080/08927014.2011.651717>

Williams, B. R., McAfee, D., & Connell, S. D. (2022). Oyster larvae swim along gradients of sound. *Journal of Applied Ecology*, 00, 1–10. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.14188>

Zaneveld, J. R., Burkepile, D. E., Shantz, A. A., Pritchard, C. E., McMinds, R., Payet, J. P., Welsh, R., Correa, A. M., Lemoine, N. P., & Rosales, S. (2016). Overfishing and nutrient pollution interact with temperature to disrupt coral reefs down to microbial scales. *Nature Communications*, 7, 1–12.

BÖLÜM IV

Abiyotik Bitki Stresinde Mikro RNA'lar

Doğan İLHAN¹
Ümmü Gülsüm KOÇ²

Giriş

Dış çevre ile sürekli ilişki halinde olan canlılar, olumsuz çevre koşullarıyla karşılaşır. Bu olumsuz çevre koşullarına uyum sağlayamadıklarından dolayı stres meydana gelir (Büyük & ark., 2012). Stres, abiyotik ve biyotik stres olmak üzere iki gruba ayrılır. Biyotik strese, virüs, bakteri, nematod ve yabancı ot gibi canlı organizmalar neden olurken abiyotik stresler fiziksel veya kimyasal olabilirler. Kuraklık (su stresi), aşırı sulama (su tutma), aşırı sıcaklıklar (soğuk, don ve sıcak), tuzluluk ve mineral toksisite abiyotik strese neden olan faktörlerdir. Çevre koşullarındaki ani değişiklikler bitkilerde strese neden olmaktadır. Bitkiler, dünya genelinde mahsul verimliliğini etkileyen abiyotik streslerle karşılaşmaktadır. Bu abiyotik stresler, bitkilerin büyümesini,

¹ Dr. Öğr. Üyesi, Kafkas Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Kars/Türkiye, ORCID: 0000-0003-2805-1638, doganilhan@kafkas.edu.tr,

² Doktora Öğrencisi, Kafkas Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji Programı, Kars/Türkiye, ummu199596@gmail.com

gelişmesini, verimini ve tohum kalitesini olumsuz yönde etkilemektedir. Stresin etkisi kısa, hafif ve geçici ise bitkiler yaralanmalardan kurtulabilirler. Ancak stres şiddetli ise çiçeklenme ve tohum oluşumu önlenir, yaşlanma indüklenir ve bitkinin ölümüne neden olur (Gull & ark., 2019). Bitkinin türüne, adaptasyon ve tolerans kabiliyetine bağlı olarak stres faktörlerinin neden olduğu zararlar değişiklik göstermektedir. Bitkiler, hareketsiz olduklarından dolayı bu stres faktörleriyle başa çıkmak için çeşitli tepki mekanizmaları geliştirmişlerdir (Büyük & ark., 2012). Bitkiler abiyotik ve biyotik streslere dayanıklılık için morfolojik ve fizyolojik stratejiler de geliştirmişlerdir (Eren & ark., 2014).

Stres savunmalarını bazı metabolik salgılarla düzenlerler. Bitkiler moleküler düzeyde stresle ilgili bazı genlerin aktivasyonu ve regülasyonu ile streslere karşı kendilerini savunurlar. Genlerin ürünleri, toksinlerin ve serbest radikallerin temizlenmesinde, hücre zarı ve proteinlerin korunmasında, hücrenin iç ve dış ortamla iletişimde ve genlerin transkripsiyonel kontrolünde görev alırlar (Eren & ark., 2014). Bitkiler ayrıca transkripsiyon sonrası seviyede de strese yanıt verirler (Bakır, 2020). Stres ortamlarında, miRNA'lar kullanılarak hedef genlerin ifadeleri baskılanabilmektedir. MiRNA'lar küçük RNA'lardır ve müdahaleci RNA'ya (RNAi) dayalı gen sessizleştirmede rol oynarlar. MiR genleri, stres şartlarında metabolik salgıların değişmesinde rol oynamaktadır (Eren & ark., 2014).

Abiyotik streslerde miRNA'lar, karmaşık gen ağlarının bileşenlerini düzenleyerek bitki yanıtına katılırlar. Olgun miRNA'lar, argonaute (argonat) proteini içeren RNA kaynaklı susturma kompleksine yüklenir. Daha sonra hedeflenen genlerin mRNA'larına bağlanırlar. MiRNA ve hedef mRNA arasında komplementerlik söz konusudur. MiRNA, ya mRNA'yı degrade eder ya da protein translasyonunu inhibe ederler. Böylece gen ekspresyonu düzenlenir. Bitkilerde miRNA'lar hedeflenen mRNA'lara mükemmel bir şekilde bağlanır. Hedeflenen mRNA'ların çoğu bölünür. Yüksek derecede tamamlayıcılık

sayesinde bitkilerdeki miRNA hedef genlerini tahmin etmek ve doğrulamak mümkün olabilmektedir (Zhang, 2015).

MiRNA'ların fonksiyonlarının anlaşılması için miRNA spesifik durum, doku ya da hücreye göre tanımlama ve kantitatif olarak ölçme metotları kullanılmaktadır. Northern blot tekniği, flow sitometri, klonlama, kantitatif Real Time PCR (qRT-PCR), sekanslama ve mikroarray analizleri kullanılan metotlar arasındadır. Biyoinformatik analizlerle miRNA'lardaki dizi ve yapı korunmuşluğu aranabilir ve homologiler saptanabilir. Bilgisayar tabanlı metotlar kullanılarak birçok miRNA tespit edilebilmektedir. Olgun miRNA'lar korunmuştur, hedeflerine yüksek derecede tamamlayıcıdır. Bu sayede bitkilerdeki aday miRNA'lar tespit edilebilirler (Eren & ark., 2014).

Bu çalışma, abiyotik stresleri, miRNA'larının biyogenizi, etki yöntemi ve abiyotik stres ile miRNA arasındaki ilişkiyi açıklamaktadır.

1. Abiyotik Stresler

1.1. Soğuk

Soğuk stresi, mahsulün kalitesini, hasat sonrası yaşamını etkiler ve tarımsal mahsul verimliliğin düşmesine neden olan başlıca abiyotik stres faktörüdür. Bitkiler hareketsiz olduklarından bu stres faktöründen kurtulmak için sürekli mekanizmalarını değiştirirler. Soğuk stresi bitkilerin hücresel fonksiyonlarını her yönüyle etkilemektedir. Ilıman koşullarda bitkiler soğuma ve donma gibi stres koşullarıyla karşılaşabilirler. Bitkilerin uyum sağlaması için iklimlendirme (alıştırma) denilen bir işleme tabi tutulur ve böylece soğuma ve donmaya tolerans kazanırlar. Birçok mahsul, soğuğa tolerans kazanmada hala yetersiz kalmaktadır (Gull & ark., 2019). Sinyal iletim yollarının birkaç bileşeni aracılığıyla soğuk stres sinyali iletilmektedir. Bu bileşenler Ca^{2+} (kalsiyum), ROS (reaktif oksijen türleri), ABA (absisik asit), protein kinaz, protein fosfataz ve lipid sinyal kaskadlarıdır. Bitkiler soğuk stresini farklı şekillerde tolere edebilirler. Bu, bitkinin fizyolojisini, metabolizmasını ve

büyümesini değiştiren gen ifadesine bağlıdır. Soğuk tepki mekanizması, sinyal iletimi ile ilgili kinazların ekspresyonu, ozmolit birikimi, membran lipid bileşimi gibi çeşitli değişikliklerle ilişkili olabilir (Kumar, 2013).

1.2. Tuz

Toprak tuzluluğu dünya genelinde bir sorundur. Tuzdan etkilenilen bölgelerde mahsulün üretimi azalır. Bu nedenle tarım için küresel bir tehdit oluşturmaktadır. Tuz stresi mahsulün verimini ve büyümesini de azaltmaktadır. Tuz stresi, ozmotik stres ve iyon toksisitesi olmak üzere mahsul bitkileri üzerinde iki temel etkiye neden olur. Bitki hücrelerindeki osmotik basınç normal şartlarda toprak çözeltisinden daha yüksektir. Bu yüksek osmotik basınç sayesinde bitkiler kökler aracılığıyla suyu ve temel mineralleri toprak çözeltisinden alır. Tuz stresi durumunda toprakta daha fazla tuz birikir ve bu nedenle toprak çözeltisindeki ozmotik basınç, bitkilerin osmotik basıncını aşar. Bu durumda bitkilerin su, K^+ ve Ca^{2+} gibi mineralleri alma kabiliyeti sınırlanır. Na^+ ve Cl^- iyonları hücrelere girer ve hücre zarları üzerinde ve sitozoldeki metabolik aktiviteler üzerinde doğrudan toksik etkiler ortaya çıkar. Bu birincil etkiler, asimilat üretimi, azalmış hücre genişlemesi ve membran işlevi gibi bazı ikincil etkilere ve sitozolik metabolizmanın ve ROS üretiminin azalmasına neden olur. Tuz stresi sırasında Na^+ ve Cl^- gibi toksik iyonların sitozol içine azaltılmış alımı ve bu toksik iyonların ya vakuole ya da apoplasta tutulması iyonik strese karşı verilen yanıt mekanizmasıdır (Kumar, 2013).

1.3. Kuraklık

Küresel iklim değişiklikleri, sıcaklık ve atmosferik CO_2 seviyelerinin artmasına ve yağış modellerinde bozulmalara neden olmaktadır. Yağışların dengesizliği kuraklığa neden olmaktadır. Şiddetli kuraklık koşullarında bitkiler için toprak suyu mevcudiyeti azalır ve erken bitki ölümleri görülür. Aralıklı kuraklık koşulları bitki büyümesini ve gelişmesini etkiler ancak ölümcül değildir. Aralıklı koşullarda uzun süre hayatta kalma ve normal fonksiyonu sürdürme yeteneği, hidratlı koşullara göre çok daha düşük verime

neden olur. Bitki kuraklık stresinden kuraklık toleransı ile uzak durmaya çalışır. Kuraklık toleransı sayesinde bitkiler büyür ve yüksek verimleri devam eder. Bir bitkinin kuraklığa alıştığı için, toleransın söz konusu nesille sınırlandırılması gerekir. Nesiller boyunca tolerans devam ederse bitki genotipinin kuraklık koşullarına adapte olduğu söylenebilir. Bitkiler kuraklık stresine maruz kaldıklarında ilk tepki olarak büyümelerini durdururlar. Kuraklık altında sürgün büyümeleri azalır ve bu durum bitkinin metabolik isteklerini azaltır. Koruyucu bileşiklerin sentezlenmesi için metabolitler harekete geçirilir ve ozmotik ayarlamalar yapılır (Kumar, 2013).

1.4. Sıcaklık

Yüksek sıcaklıklar küresel bir sorundur. Bitkilerin ve mahsullerin büyümesini ve üretimini ciddi şekilde etkilemektedir. Gelecekte artan yüksek sıcaklık değişimleri mahsul bitkilerinin savunmasızlığını artıracaktır. Bu nedenle ısı stresine tepki mekanizmasına ve ısıya dayanıklı ırkların yetiştirilmesine çok dikkat edilmelidir. Sıcaklık stresi bitkilerin tohum çimlenme yüzdesini, fotosentetik verimliliğini ve verimini azaltır. Sıcaklık stresi altında reproduktif büyüme döneminde tapetal hücrelerin fonksiyonları kaybolur ve anterler diplastik olur. Sıcaklıkların artması çiçeklenme sırasında polenlerin şişmesini engeller. Polen taneleri zayıf bir şekilde salınır ve anterler kendi kendine açılır. Bitkiler çeşitli moleküler ve fizyolojik mekanizmalar geliştirerek sıcaklık stresinin üstesinden gelmeye çalışırlar (Kumar, 2013).

1.5. Toksin

Tarımdaki kimyasal gübrelere, kanalizasyon atık su sulamasına artan bağımlılık ve hızlı sanayileşme tarım topraklarına toksik metaller ekler. Bunun sonucunda toprak-bitki çevre sistemi üzerinde zararlı etkiler görülür. Kadmiyum metal kirliliğine neden olur. Toprakta uzun yıllar kalabilir ve bu nedenle tarım sistemi için temel bir çevre sorunudur (Kumar, 2013). Ağır metal toksisitesi, bitkinin büyümesini, gelişimini olumsuz yönde etkiler. Fizyolojik ve metabolik süreçleri değiştirir. Ağır metaller, esansiyel olanlar ve

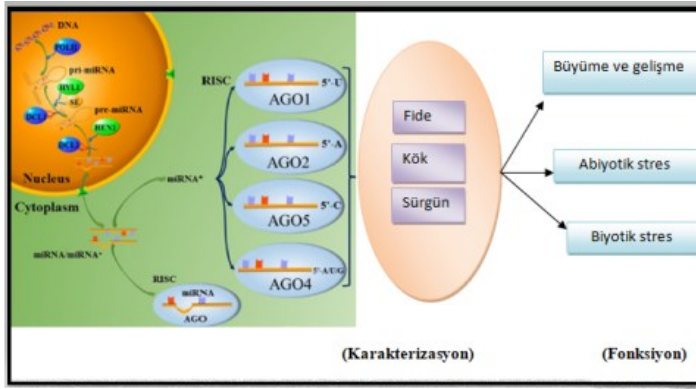
gerekli olmayan şekilde ayrılır. Bakır (Cu), demir (Fe), çinko (Zn) ve manganez (Mn), düşük konsantrasyonlarda bitki hücrelerinin enzimatik ve biyokimyasal reaksiyonlarında rol oynar. Fakat yüksek konsantrasyonlarda toksik etkiler yapar. Kadmiyum (Cd), alüminyum (Al) ve cıva (Hg) esansiyel olmayan metallerdir. Düşük konsantrasyonlarda bile bitkilerde toksik etkiye neden olurlar (Shriram & ark., 2016).

2. Mikro RNA (MiRNA)'lar

Nematodlarla yapılan bir genetik taramada ilk küçük RNA olan lin-4, 1993 yılında bulunmuştur. Aynı yıl içinde lin-4'ün, lin-14'ü düzenleyen RNA'lar olduğu keşfedilmiştir. lin-4 RNA, mikro RNA olarak bilinen küçük bir düzenleyici RNA sınıfının kaynağıdır. MiRNA'ya yönelik gen regülasyonu, aktif çalışma alanlarını oluşturmaktadır. Yüzlerce miRNA, klonlama ve boyut-fraksiyon RNA teknikleriyle keşfedilmiştir. MiRNA'lar üzerindeki araştırmalar, yüksek verimli sekanslama teknolojilerinin ve biyoinformatik tahmin yöntemlerindeki gelişmeler sayesinde büyük ölçüde artmıştır. MiRNA'lar hücre proliferasyonu, hücre ölümü, yağ metabolizması, hematopoietik farklılaşma, bağışıklık, yaprak ve çiçek gelişiminin kontrolü gibi süreçlerde görev almaktadır. Hayvanlarda miRNA'lar, birincil miRNA'lardan (pri-miRNA'lar) iki aşamada sentezlenir. İki RNase III tipi protein görev alır ve çekirdekte Drosha rol oynarken sitoplazmada Dicer enzimi rol oynar. Bitkilerde pri-miRNA'dan olgun miRNA'ya işlenmesi tamamen çekirdekte olur ve RNase III enzimi olan DCL1 (Dicer benzeri 1) görev alır. Olgun miRNA'lar, Argonaute (Ago) alt proteinleri tarafından bağlanır. MiRNA'lar, ilgili mRNA'ları hedeflerler ve transkripsiyon sonrası regülatörler olarak işlev görürler (Wahid & ark., 2010).

MiRNA'lar, 20-24 nükleotid uzunluğunda, gen ekspresyonunu baskılayan endojen küçük RNA'lardan oluşan bir sınıftır. MiRNA'lar, korunmuştur ve kodlanmayan RNA'lardır. Transkripsiyonları yapılır, ancak translasyonları yapılmayan genlerden kodlanırlar (Bakır, 2020). Bitkilerde miRNA'lar,

transkripsiyon faktörlerini, stres yanıt proteinlerini ve bitkilerin gelişimini, büyümesini, fizyolojisini etkileyen genlerin ekspresyonunu kontrol eder. MiRNA'lar üzerinde yapılan araştırmalar, hedef genleri nasıl düzenledikleri ve nasıl yapıldıklarının keşfedilmesini sağlamıştır. Yapılan ilk çalışmalar miRNA işlenmesi, modifikasyonu ve hedef bölünmesinin katalizinden sorumlu proteinlerin belirlenmesini sağlamıştır (Rogers & Chen, 2013) (Şekil 1).



Şekil 1. MiRNA işlenmesi

(Rogers & Chen, 2013)

2.1. MIR Genleri

Bitkilerde 100'den fazla MIR geni (miRNA genleri), genom boyunca genler arası bölgede bulunur. MIR genlerinin çoğu kendi transkripsiyonel birimlere sahiptir. Birden fazla miRNA üreten saç tokası (hairpin) ile polisistronik primer miRNA (pri-miRNA) transkriptleri tespit edilmiştir. RNA polimeraz II (Pol II) aracılığıyla MIR genleri transkribe edilir. Pri-miRNA'ların 5'-ucuna 7-metilguanozin şapkası ve 3'-ucuna poliadelinat kuyruğu eklenir ve stabil hale gelir (Rogers & Chen, 2013).

2.2. MiRNA Biyogenezi

Bitki miRNA'larının biyogenezi ile ilgili bilgiler model bir organizma olan *Arabidopsis thaliana*'da belirlenmiştir (Liu & ark.,

2017). *Arabidopsis sp.*'de küçük bir RNA'nın klonlanmasıyla ilk küçük RNA'lar 2002'de keşfedilmiştir. Klonlanmış küçük RNA'ların bir kısmının miRNA'lara karşılık geldiği tespit edilmiştir. Genetik çalışmalar, doğrudan klonlama ve dizileme, biyoinformatik ve hesaplamalı tahmin yöntemleriyle birçok miRNA'nın *Arabidopsis* ve diğer bitkilerdeki fonksiyonları belirlenmiştir (Wahid & ark., 2010).

Pri-miRNA'lar, tam olmayan eşleşme bölgelerine sahiplerdir ve bu nedenle kendi üzerine geri katlanarak sap ilmik (stem-loop) ve saç tokası (hairpin) yapıları oluştururlar. Saç tokası yapısı, pri-miRNA'ların ikincil yapılarıdır ve 70 ile yüzlerce baz uzunluğunda heterojen bir uzunluğa sahiplerdir (Koptekin, Aktaş & Yıldız, 2013).

Bir bitki miRNA'sının işlenmesi için Dicer like proteinleri gereklidir. Yapılan çalışmalarda *Arabidopsis thaliana* ve diğer bitkilerde Dicer like enzimi olan Dicer like 1 (DCL1)'in miRNA işlenmesi için önemli olduğu ortaya çıkarılmıştır. DCL1, bitkilerdeki olgun miRNA'ların çekirdekte sentezlenebileceğini gösteren nüklear bir proteindir (Aydınoglu & Aktuğ, 2017). DCL1, bir ribonükleazdır (RNase tip III) ve bunlar sadece çift zincirli RNA (dsRNA)'lara bağlanacak şekilde özelleşmişlerdir. DCL1, pri-miRNA ikincil yapısını keser ve öncül miRNA (pre-miRNA) oluşur. Nükleusun Dicing-cisimciği (D-bodies) bölgesinde, pre-miRNA, DCL1 tarafından tekrar kesilir ve 21-22 nükleotid uzunluğunda miRNA/miRNA* dubleks oluşur (Koptekin, Aktaş & Yıldız, 2013).

Yapılan çalışmalarda, pri-miRNA'nın DCL1 tarafından pre-miRNA'ya işlenmesinde başka proteinlerinde görev aldığı bulunmuştur. Bunlar DAWDLE (DDL), HYPONASTICLEAVES1 (HYL1), SERRATE (SE) ve ABH1/CBP80 ve CBP20'dir. DAWDLE (DDL), pri-miRNA'nın DCL1 kesimine kadar stabil kalmasını sağlar ve DCL1 ile etkileşen bir proteindir. HYL1, dsRNA bağlanma proteindir; SE, C₂H₂ çinko parmak proteindir; ABH1/CBP80 ve CBP20 şapka bağlanma kompleksi proteinleridir. HYL1 ve SE proteinleri DCL1'in kesme işleminin etkisini ve

duyarlılığını arttırarak fonksiyon gösterirler (Koptekin, Aktaş & Yıldız, 2013).

HUA ENHANCER1 (HEN1), oluşan miRNA/miRNA* dubleksindeki her bir miRNA zincirini, 3' ucundan metiller ve metillenen dubleks parçalanmaktan korunur. Metillenmiş miRNA/miRNA* dubleksi, exportin-5'in bir bitki homoloğu olan HASTY (HST) aracılığıyla çekirdekten sitoplazmaya taşınır. HST, impotin- β sınıfı bir nükleositoplazmik taşıyıcıdır (Koptekin, Aktaş & Yıldız, 2013).

Sitoplazmaya taşınan metillenmiş miRNA/miRNA* dubleksi, RNA-kaynaklı susturma kompleksini (RISC) oluşturmak için Argonaut (AGO) proteinine yüklenir. AGO ailesi proteinleri, PAZ, MID ve PIWI olmak üzere üç farklı domainden oluşur. PAZ domainleri, RNase H'ye benzer katlanmış bir yapıda RNA ve PIWI domainlerine bağlanır. Böylece miRNA* zinciri degrade olur. Sonuçta olgun bir miRNA ile RISC oluşur. Bu ipliklerin seçilimi termodinamik stabilite ile yapılır (Rogers & Chen, 2013).

Hedef mRNA'lar, RISC kompleksindeki miRNA'lar ile tam ya da tama yakın eşleşme gösterirler ve mRNA'lar algılanır. miRNA hedef mRNA'ya bağlandığında mRNA yıkılır veya translasyonu baskılanır (Koptekin, Aktaş & Yıldız, 2013). Bu mRNA yıkımı ve translasyon baskılanmasına bitkilerde post-transkripsiyonel gen susturulması (PTGS) denir ve bu yolla gen ifadesi düzenlenir (Aydınöğlu & Aktuğ, 2017) (Şekil 2).

adlandırılırlar. PTGS (phasiRNA'lar için) veya TGS (easiRNA'lar için) yoluyla gen ekspresyonunu baskırlar (Wang, Mei & Ren, 2019).

2.3. MiRNA'ların Etki Yöntemi

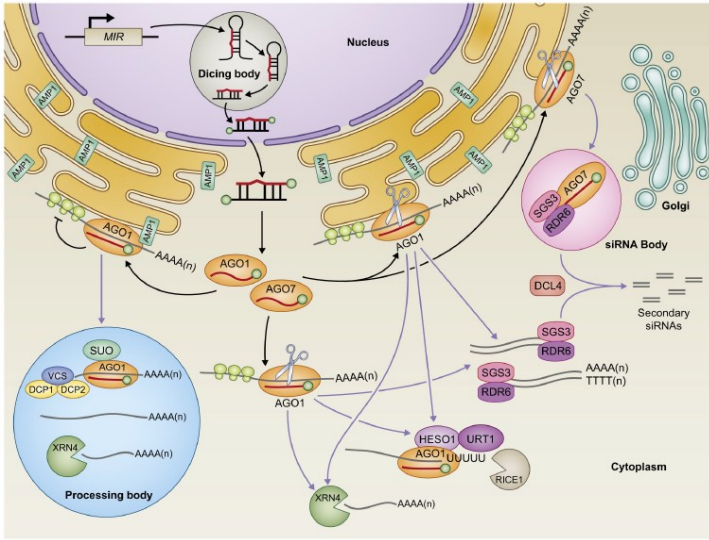
MiRNA'lar, transkriptlerin bölünmesi ve translasyonun baskılanması mekanizmalarıyla hedef genleri post-transkripsiyonel seviyede düzenler. Bitkilerde miRNA ve hedef mRNA'ları mükemmel tamamlayıcılığa sahiptir. Yüksek derecede sekans tamamlayıcılığı RNA bölünmesine neden olur. Endoplazmik retikulum (ER) üzerindeki ribozomlar veya ribozomlara bağlanan miRNA hedef transkript sonuçlarına göre translasyon inhibisyonu daha fazla sayıda miRNA hedefinde meydana gelmektedir (Yu, Jia & Chen, 2017) (Şekil 3).

Transkript bölünmesi: MiRNA rehberliğinde RNA bölünmesi, kesilme (slicing) olarak da bilinir. Bu bölünme hedef mRNA'da kesin bir konumda meydana gelir. RNA'lar 5' monofosfat ile genom çapında tanımlanmıştır ve bu sayede bitki miRNA hedeflerinin transkript bölünmesine maruz kaldığı bulunmuştur. Bölünme AGO proteininin PIWI domaininde gerçekleşir. AGO proteinleri endonükleaz aktivitesi sergilerler ve RNase H benzeri kat oluştururlar. Bu bölünme aktivitesi *Arabidopsis sp.*'de AGO1, AGO2, AGO4, AGO7 ve AGO10 için gösterilmiştir. AGO1 başlıca miRNA efektörüdür. 5' ve 3' bölünme fragmanları daha sonra ekzonükleazlar tarafından degrade olurlar (Yu, Jia & Chen, 2017) (Şekil 3).

Translasyon inhibisyonu: MiRNA aracılı translasyon baskılanması, miRNA'ların hedef gen baskılanması üzerindeki orantısız etkilerini protein ve mRNA seviyesinde anlaşılması için önerilmiştir. Bitkilerde translasyon baskılanması, transkript bölünmesine göre daha az sıklıkta gözlemlenir. miR172 ve miR156/7 tarafından düzenlenen AP2 (APETALA2) ve SPL3 (SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE 3) bitkilerde miRNA aracılı translasyon baskılanmasının ilk örnekleridir. miR172 ve miR156/7'nin anormal bir şekilde

birikmesiyle AP2 ve SPL3'ün protein seviyelerinin değiştiği gözlemlenmiştir. miR398 ve miR165/6'nın sırasıyla hedef genleri CSD2 (COPPER/ZINC SUPEROXIDE DISMUTASE 2) ve PHB'dir ve bu miRNA'lar bu genlerin protein sentezini engellemektedir. MiRNA aracılı transkripsiyon baskılanmasında görevli olan birkaç faktör bulunmaktadır. Bunlar; mikrotübül bağlarını koparan enzim KATANIN 1 (KTN1), işleme gövdesi (P body) bileşeni VARICOSE, GW-tekrar proteini SUO ve ER membran proteini ALTERED MERISTEM PROGRAM 1 (AMP1)'dir (Şekil 3). Bu genlerdeki mutasyonlar seçici olarak protein düzeyinde miRNA rehberliğinde baskılanmaya müdahale ederler. Amp1 mutantlarında, polizom fraksiyonları boyunca miRNA hedef transkriptleri arttığı tespit edilmiştir ve bu sonuçlara bakarak bitki miRNA'ları, transkripsiyonun başlamasını baskıladığı sonucuna varılır. Genom çapında RNA degradasyonunun analizleri, *Arabidopsis sp.*'de 5' monofosfat ile RNA'ların profillemesi yoluyla yapılmıştır. Bu analiz sonuçlarına göre, çok sayıda miRNA hedefi, çoğu gen için birlikte transkripsiyonel mRNA degradasyonunun meydana geldiğini gösterir. MiRNA aracılı transkripsiyon baskılanmasını moleküler mekanizmaları net değildir. Yapılan in vitro analiz ile bitki miRNA'larının transkripsiyonun başlamasını veya ribozomların hareketini önleyebileceği gösterilmiştir (Yu, Jia & Chen, 2017). Olgun miRNA'lar, ARGONAUTE proteinlerine dahil edilir. Bu ARGONAUTE proteinlerindeki olgun miRNA'lar, transkripsiyon bölünmesinde ve transkripsiyon baskılanması yoluyla transkripsiyon sonrası gen susturmayı (PTGS) yönlendirmede veya ikincil küçük interfering RNA'ların (siRNA'lar) biyogenezini tetiklerler. ARGONAUTE 1 (AGO1), miRNA hedef bölünmesine aracılık eder ve daha sonra bölünen fragmanlar degrade olur. Membrana bağlı polizomlarda (MBP'ler), transkripsiyonun baskılanması gerçekleşir ve bu baskılanmanın gerçekleşebilmesi için endoplazmik retikulum (ER) ile lokalize olmuş ALTERED MERISTEM PROGRAM 1 (AMP1) gereklidir. Transkripsiyon baskılanmasına işleme gövdesinin bileşenleri (P-cisimciği) de dahil olur. ARGONAUTE 7 (AGO7), MBP'lerle ilişkili miR390

hedeflerini böler ve cis-Golgi'ye bitişik olan GEN SESSİZLEŞTİRİCİ 3 (SGS3) ve RNA-BAĞIMLI RNA POLİMERAZ 6 (RDR6) ile birlikte siRNA gövdelerini oluşturur. Olaylar renkli çizgilerle sınıflandırılmıştır. MiRNA aracılı etkiler koyu çizgiler ile sonraki işlemler açık mor çizgilerle gösterilmiştir. DCL4 DİCER-LIKE4; HESO1, HEN1 SUPPRESSOR 1; URT1, UTP:RNA ÜRİDİL TRANSFERAZ1; XRN4, EKZORİBONÜKLEAZ4; SUO, bir GW-tekrar proteini; VCS, VARICOSE; DCP1, DECAPPING 1; DCP2, DECAPPING 2; RICE1, RISC-ETKİLEŞİMLİ BÖLÜNME 3'-5' EKZORİBONÜKLEAZ 1 (Yu, Jia & Chen, 2017).



Şekil 3. Bitkilerdeki miRNA etki yöntemlerine genel bakış
(Yu, Jia & Chen, 2017)

3. Abiyotik Streste MiRNA'lar

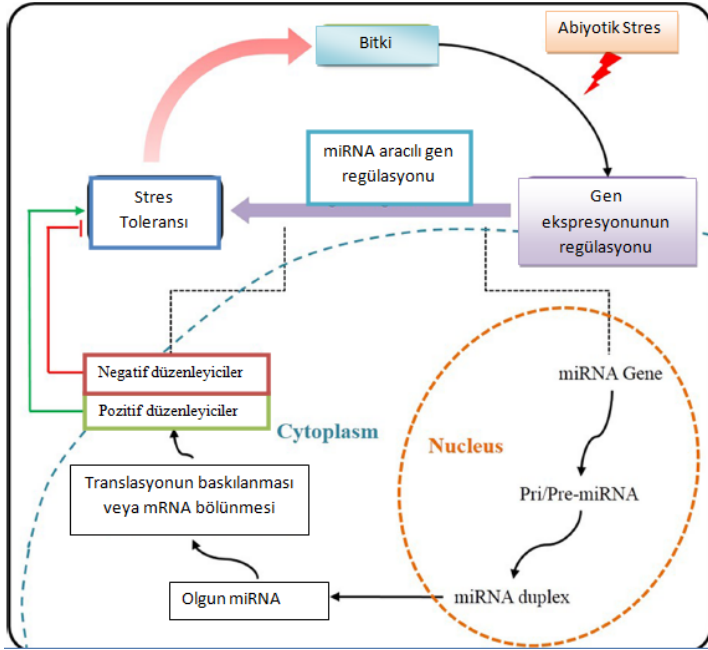
Abiyotik stresler, farklı gelişim aşamalarında gen ekspresyon profillerini önemli ölçüde değiştirmektedir. Gen ekspresyon değişiklikleri, zamanla bitkinin gelişimini düzenler. Birçok gen, abiyotik streslere yanıt olarak kabul edilmiştir (Şekil 4). Bu genlerin

Arabidopsis sp. gibi model bitkilerde ve diğer mahsul bitkilerinde aşırı ekspresyonu, özgün streslere karşı bitki toleransını iyileştirmektedir. Abiyotik streslerle ilişkili yüzlerce protein kodlama geni, mikroarray ve yeni nesil teknolojiler sayesinde keşfedilmiştir (Zhang, 2015).

MiRNA'ların keşfedilmesiyle bu genlerin nasıl düzenlendiği ve abiyotik streslere yanıt vermek için kullanılan gen ağları belirlenmiştir. MiRNA'lar, bitkiler arasında evrimsel olarak korunmuşlardır. Korunmuş miRNA'lar, bitki morfolojisi ve faz değişimi gibi ortak özellikleri düzenlerler. Türe özgü miRNA'lar, özel bitki türlerinde benzersiz ve değişken süreçleri kontrol eder. Bu korunmuş ve türe özgü miRNA'lar, abiyotik streslerde bitkilerin tepkilerinde rol oynarlar (Şekil 4) [Zhang, 2015].

Abiyotik stresler, miRNA'ların anormal ifadelerini indükler. miRNA hedef tahmini, miRNA ifade profilleri çalışmaları ve NCBI ile ifade edilen dizi etiketlerinin (EST'ler) anketlerinden toplanan veriler sayesinde miRNA'ların, abiyotik streslere karşı bitki tepkisinde rol oynadığı tespit edilmiştir. Yapılan bir çalışmada miR395'in, ATP sülfürlazı (APS) hedeflediği bulunmuştur. APS, inorganik sülfat asimilasyonunun ilk aşamasını katalize eden enzimdir ve bitkilerdeki sülfat seviyelerine yanıt verir. miR395'in hücrel sülfat seviyelerine tepkisi de analiz edilmiştir. Normal sülfat koşullarında (2 mM SO₄²⁻) büyüyen bitkiler ile düşük sülfat koşullarında (0.02 mM SO₄²⁻) büyüyen bitkiler karşılaştırılmıştır. Analiz sonucunda düşük sülfat koşullarında büyüyen bitkilerde miRNA395, > 100 kat daha fazla indüklenmiştir. Bu durum miR395'in sülfat alımı ve metabolizmasında rol aldığını gösterir (Jones-Rhoades & Bartel, 2004). Yapılan başka bir çalışmada *Arabidopsis sp.* fide örnekleri, soğuk stresi (0 °C, 24 saat), tuz stresi (300 mM NaCl, 5 saat), kuraklık stresi (10 saat süreyle dehidrasyon) ve hormonlarla (100 µM ABA, 3 saat) muamele edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre miR393'ün, bu dört stres tarafından güçlü bir şekilde indüklendiği bulunmuştur. miR389a.1'in ise bu stres şartlarında inhibe edildiği bulunmuştur. Diğer miRNA'lar çeşitli stres koşullarında farklı tepkiler göstermiştir. Örneğin, miR319,

soğuk stresi ile muamele edildiğinde indüklenmiş, tuzluluk, dehidrasyon ve ABA streslerin ile muamele edildiğinde indüklenmemiştir (Sunkar & Zhu, 2004).



Şekil 4. Abiyotik stres durumunda bitkilerdeki miRNA aracılı düzenleyici yanıtların şeması

(Zhang, 2015)

Şekilde miRNA genlerinden oluşan miRNA oluşum aşamaları ve abiyotik stres durumunda bitkilerde miRNA aracılı gen regülasyonu anlatılmaktadır. MiRNA, pri-miRNA'ya kopyalanır. Pri-miRNA, pre-miRNA denilen sap-ilmik ara ürününe bölünür. MiRNA:miRNA* dupleksi oluşur. Bu dupleks, çekirdekte dicer benzeri enzim ile bölünür ve sitoplazmaya taşınır. Olgun miRNA'lar, çözülür ve tek sarmallı hale gelirler. Olgun miRNA'lar, ribonükleoprotein kompleksine (RNA kaynaklı susturma kompleksi) girerler; ya mRNA bölünür ya da translasyonel baskılanma meydana gelir. Sonuçta miRNA'lar, hedef genleri

negatif veya pozitif bir şekilde regüle ederek bitkinin stres toleransını sağlarlar (Wani & ark., 2020).

3.1. Abiyotik Streslerde Genotipe Bağlı MiRNA Yanıtları

Bitkiler zorlu çevre koşullarıyla başa çıkabilmek ve uyum sağlayabilmek için karmaşık fizyolojik ve genetik mekanizmalar geliştirmişlerdir. Çoğu bitki çok çeşitli çevresel faktörlere karşı bitki tepkisini kontrol eden çekirdek gen ağlarını paylaşırlar. MiRNA'lar, abiyotik strese yanıt mekanizmasına yardımcı olan bir moleküldür. Birçok miRNA belirli stres koşulları altında türden türe ve genotipten genotipe çeşitli ekspresyon seviyeleri gösterir (Zhang, 2015).

MiRNA ekspresyon seviyelerinin analiziyle belirli streslerde çeşitli bitki türleri ve kültivarlar arasında genotipe bağlı bir şekilde abiyotik streste miRNA yanıtları belirlenmiştir. MiRNA ekspresyon profilleri bitki türleri arasında çeşitlilik göstermektedir. MiRNA'lar bitki türene bağlı olarak aynı strese farklı yanıtlar verebilir ya da birçok miRNA aynı strese benzer şekilde yanıt verebilir (Zhang, 2015).

Arabidopsis sp. (Liu & ark., 2008), tütün (Frazier & ark., 2011) ve pirinç (Zhou & ark., 2010) kuraklık stresi ile muamele edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, miR168 ve miR396 ekspresyonu *Arabidopsis sp.* (Liu & ark., 2008), ve tütünde (Frazier & ark., 2011) indüklenirken pirinçte (Zhou & ark., 2010) inhibe edilmiştir. Kuraklık stresinde miR408'in ekspresyonu, pirinç (Zhou & ark., 2010), şeftali (Eldem & ark., 2012) ve pamukta (Xie & ark., 2015) aşağı düzenlenirken (down-regule), *Arabidopsis sp.* (Liu & ark., 2008), *Medicago sp.* (Trindade & ark., 2010) ve arpada (Kantar, Lucas & Budak, 2011) yukarı düzenlenmiştir. Tuzluluk stresinde *Arabidopsis sp.*'de (Liu & ark., 2008), miR156'nın aşırı ekspresyonu indüklenmiş, mısırdaki (Ding & ark., 2009) ise aynı miRNA'nın ekspresyonu inhibe edilmiştir. NaCl ile muamele edilen *Arabidopsis sp.* (Liu & ark., 2008), ve mısırdaki (Ding & ark., 2009) miR396, yüksek oranda ifade edilirken pirinçte (Zhou & ark., 2010) ifade edilmemiştir.

Bir çalışmada kuraklık stresinin iki börölce kültüvarı (kuraklığa toleranslı IT93K503-1 ve kuraklığa duyarlı CB46) üzerindeki etkileri derin sekanslama teknolojisi kullanılarak araştırılmıştır. 20 miRNA'nın bu iki genotipte farklı şekillerde ifade edildiği bulunmuştur. Bir genotipte 11 tane kuraklıkla düzenlenmiş miRNA belirlenmiştir (Barrera & ark., 2011). Başka bir çalışmada tuzluluk stresine farklı direnç gösteren iki pamuk kültüvarının (tuzluluğa yüksek toleranslı SN-011 ve tuzluluğa duyarlı LM-6) miRNA ekspresyon profilleri, mikroarray kullanılarak analiz edilmiştir. 12 miRNA genotip-spesifik bir modelde ifade edilmiştir. LM-6'da, miR156, miR169, miR535 ve miR827 yüksek ekspresyon gösterirken miR167, miR397 ve miR399'un ekspresyonu inhibe edilmiştir (Yin & ark., 2012).

3.2. Abiyotik Streslerde Bitki Dokusuna Bağlı MiRNA Yanıtları

Bitkiler, ihtiyaçlarını karşılamak için yaprak ve kök gibi bitki doku/organlarına farklılaşırlar. Kökler, kuraklık, yüksek tuzluluk ve kirletici maddeler gibi toprak ortamındaki stres faktörlerine daha duyarlıdır. Bu nedenle miRNA'lar, köklerde yapraklara göre stres şartlarında daha fazla indüklenirler (Zhang, 2015). Yapılan bir çalışmada, kuraklık stresine karşı kök ve yaprak tepkisini karşılaştırmak ve genom çapında kuraklığa duyarlı miRNA'ları belirlemek için dört küçük RNA kitaplığı oluşturulmuş ve derin sekanslama yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, kuraklık stresi yapraklarda 262 miRNA'nın (104 up-regüle, 158 down regüle), köklerde 368 miRNA'nın (221 up-regüle, 147 down-regüle) anormal ekspresyonunu indüklemiştir (Eldem & ark., 2012).

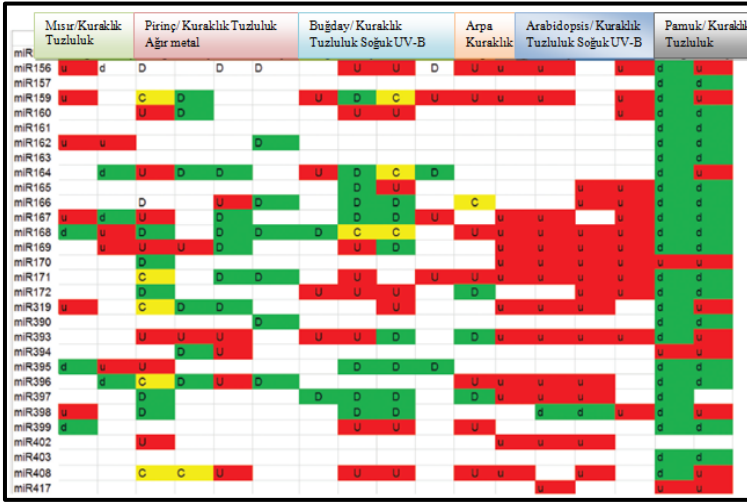
3.3. Abiyotik Streslerde Strese Bağlı MiRNA Yanıtları

Çevresel stres türleri; kuraklık, tuzluluk, yüksek sıcaklık, düşük sıcaklık, UV ışığı, yüksek veya düşük ışık yoğunluğu, hipoksi, ağır metal, nanopartikül ve kirletici maddeye maruz kalma ve gübre eksikliğidir. Bu çevresel stresler, miRNA'ların anormal ifadelerini doza ve strese bağlı bir şekilde indüklemektedir. Bazı miRNA'lar genellikle tüm streslere yanıt verirler. Aynı bitki türünde, belirli miRNA'ların farklı ifadeleri spesifik stres durumuna bağlıdır

(Zhang, 2015). MiR169, *Arabidopsis* 'te kuraklık stresinde inhibe edilirken (Li & ark., 2008), tuzluluk stresinde indüklenmiştir (Xu & ark., 2014). UVB ışığı altında, miR398 *Arabidopsis* 'te indüklenirken, tuzluluk, soğuk ve oksidatif stres altında inhibe edilmiştir (Sunkar, Kapoor & Zhu, 2006; Jia & ark., 2009). Nükleer faktör Y (NF-Y) alt birimi A5 (NFYA5), miR166'nın hedefidir. miR169 inhibe edildiğinde, miR166 kuraklık stresinde güçlü bir şekilde indüklenmiştir (Li & ark., 2008). ABA ve tuzluluk stresi altında miR398'in ekspresyonu inhibe edilirken (Sunkar, Kapoor & Zhu, 2006; Jia & ark., 2009), kuraklık stresi altında *Arabidopsis* 'te indüklenmiştir (Zhou, Wang & Zhang, 2007). Bakır süperoksit dismutaz (CSD) 1 ve 2, miR398'in hedefidir ve bu genler tuzluluk stresinde indüklenir (Sunkar, Kapoor & Zhu, 2006; Jia & ark., 2009).

3.4. Abiyotik Streslerde MiRNA'lara Bağımlı MiRNA Yanıtları

Arabidopsis 'te kuraklık stresi altında, miR156, miR319, miR393, miR397 ve miR408 miRNA'nın ekspresyonunu indükler ve ekspresyon kat değişimi miRNA'dan miRNA'ya farklılık gösterir. miR169, kuraklık stresinde down regüle edilir. Tuzluluk stresi altında *Arabidopsis* 'te, miR159, miR169, miR319, miR393 ve miR397'nin ekspresyonu indüklenirken, miR398'in ekspresyonu inhibe edilmiştir (Liu & ark., 2008). Bu çalışmalar, miRNA'ların ekspresyonunun kuraklık, tuzluluk, yüksek ve düşük sıcaklık ve ozmotik stres şartlarında, *Arabidopsis sp.*, pirinç, mısır, kavak ve diğer bitki türlerinde indüklendiğini göstermiştir (Şekil 5). miR156, miR159, miR165, miR167, miR168, miR169, miR319, miR393, miR395, miR396, miR398, miR399 ve miR402, birkaç farklı bitki türünde kuraklık ve tuzluluk stresleri tarafından indüklenen miRNA'lardır (Zhang, 2015).



Şekil 5. Çevresel abiyotik strese karşı bir miRNA, strese, türe ve miRNA'ya bağlı bir şekilde yanıt verir

(Zhang, 2015)

Çeşitli miRNA'lar, birden fazla bitki türünde farklı abiyotik stres muameleleri altında anormal bir şekilde ifade edilmiştir. Kırmızı renkler, miRNA'ların yukarı regüle edildiğini (u), yeşil renkler aşağı regüle edildiğini (d) göstermektedir. Sarı renk ise miRNA'nın farklı dokular arasında veya farklı gelişim aşamalarında hem yukarı regüle edildiğini hem de aşağı regüle edildiğini göstermektedir. Veriler, *Arabidopsis sp.*, pirinç, buğday, arpa, darı ve pamukla ilgili güncel literatürden elde edilmiştir (Zhang, 2015).

3.5. Kuraklık ve Tuzluluk Stresinde MiRNA'lar

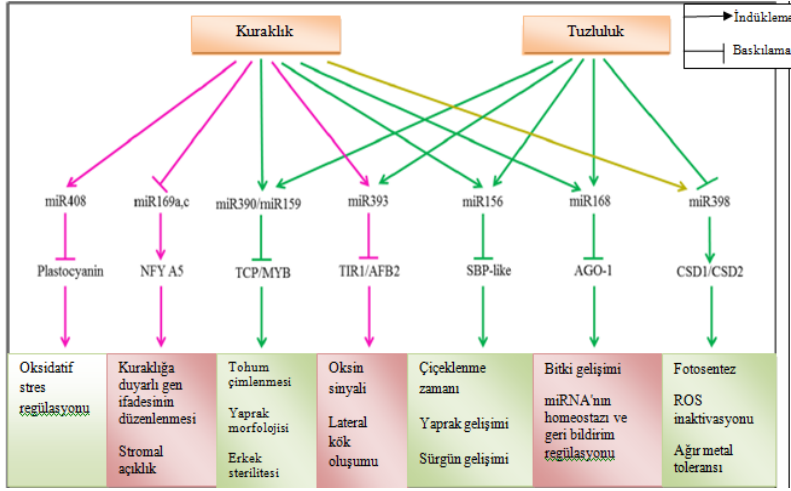
Kuraklık ve tuzluluk stresleri, bitki büyümesi ve verimini etkileyen faktörlerdir. Kuraklığa duyarlı miRNA'lar, *Arabidopsis sp.*, pirinç ve şeker kamışından izole edilen küçük RNA kütüphanesinin taranması yoluyla tanımlanmıştır. Yapılan bir çalışmada *Arabidopsis sp.*'de, stresle indüklenebilen toplam 14 miRNA'nın 10'u NaCl ile, 4'ü kuraklık ile 10'u da soğuk ile düzenlenmiştir. Streslerin hepsine miR168, miR171 ve miR369

yanıt vermiştir (Wahid & ark., 2010). Yapılan başka bir çalışmada pirinçte kuraklık stresinde miR169g güçlü bir şekilde up-regüle edilmiş, miR393'te geçici olarak indüklendiği tespit edilmiştir (Zhao & ark., 2007).

Başka bir çalışmada, kuraklık stresinde kardeşlenmeden çiçeklenme oluşumuna kadar değişen gelişim aşamaları mikroarray yaklaşımı kullanılarak pirinçteki miRNA'lar tanımlanmış ve analiz edilmiştir (Wahid & ark., 2010).

Kuraklık stresinde, 30 miRNA'nın farklı ifadeleri indüklenmiştir. 19 yeni miRNA, *Arabidopsis sp.*'de rapor edilmiştir. Kuraklık stresinde 16 miRNA (miR156, miR159, miR168, miR170, miR171, miR172, miR319, miR396, miR397, miR408, miR529, miR896, miR1030 miR1035, miR1050, miR1088 ve miR1126) down-regüle edilirken 14 miRNA (miR159, miR169, miR171, miR319, miR395, miR474, miR845, miR851, miR854, miR896, miR901, miR903, miR1026 ve miR1125)'nın aşırı ekspresyonu indüklenmiştir. MiR171, miR319 ve miR89 hem aşırı ifade edilen grupta hem de down-regüle edilen grupta tanımlanmıştır (Zhou & ark., 2010).

Şeker kamışındaki miRNA'nın ekspresyon modeli, türe, stres tipine, dokuya (fide, yaprak, başakçık ve kök) ve büyüme durumuna (tarla, sera) bağlıdır. MiR396 ve miR171, farklı şekilde ifade edilmiştir (Gentile & ark., 2015). *Arabidopsis sp.*'de, osa-miR393'ün aşırı ekspresyonu tuzluluk toleransında düzenleyici role sahiptir ve artmış tuz toleransına yol açar (Gao & ark., 2011) (Şekil 6).



Şekil 6. *M.truncatula* (nitrojen sabitleme model bitkisi) ve *Arabidopsis sp.*'deki (nitrojen içermeyen sabitleme model bitkisi) kuraklık ve tuz stresi ile ilişkili miRNA'ların düzenleyici ağı

(Gao & ark., 2011)

Yukarıdaki şekilde, kuraklık ve tuzluluk stresine yanıtta fenotipik değişikliklere neden olan moleküler mekanizmalar tanımlanmaktadır. Stres koşullarında miRNA'ların ifadeleri değişir ve hedef transkriptleri susturulur. MiRNA hedefleri genellikle aşağı yönde strese duyarlı genleri düzenleyen transkripsiyon faktörleridir. MiRNA aracılı stres regülasyonu düz çizgilerle gösterilmiştir. Yeşil çizgi, *Arabidopsis sp.* için; Sarı çizgi, *M. truncatula* için; Pembe çizgi, *Arabidopsis sp.* ve *M. truncatula* için (Kumar, 2014).

3.6. Aşırı Sıcaklık Stresinde MiRNA'lar

Bitkiler, mevsimsel değişiklikler ve coğrafi koşullar nedeniyle aşırı sıcaklıklara maruz kalırlar. Aşırı sıcaklıklar, bitkinin büyümesini, üretkenliğini (prodüktif) olumsuz etkiler. Bitkiler aşırı sıcaklıklara karşı yanıt olarak transkripsiyon sonrası seviyelerde gen ekspresyonunu ayarlarlar. Bitkilerde çok sayıda soğuğa ve ısıya toleranslı miRNA bulunmaktadır (Cao & ark., 2014). Buğday fideleri kültivarları, ısı stresine (40 °C) maruz kaldığında, farklı

miRNA ekspresyonu çoğunda artmış, birkaçında miRNA ekspresyonu baskılanmıştır (Xin & ark., 2011). Soğuk stresi (4 °C) altında pirinçte soğuğa duyarlı 18 miRNA'nın down-regüle olduğu bulunmuştur (Lv & ark., 2010). Pirinçlerde soğuk stresi altında üreme fazının başlangıcında, miR812q ekspresyonun da bir artış yaşanmıştır (Jeong & ark., 2011). Soğuk stresi altında indüklenen miR812q, CIPK10'u hedefler. CIPK transkriptleri kalsiyuma bağımlı CBL-CIPK sinyaller yolunda, abiyotik strese toleransta rol oynar (Jeong & Green, 2013).

Yüksek verimli dizileme analizleriyle, soğuk stresinde çay (*Camellia sinensis*) bitkilerindeki 31 miRNA'nın up-regüle olduğu ve 43 miRNA'nın down-regüle olduğu tespit edilmiştir (Zhang & ark., 2014).

3.7. Hipoksi ve Oksidatif Streste MiRNA'lar

Bitkilerin rizosferik ortamlardaki su tutma koşullarından dolayı hipoksi ve düşük oksijen stresi meydana gelir. Oksijen azalır ve mitokondriyel solunum etkilenir (Agarwal & Grover, 2006). Hipoksi sinyal oluşumu için önemlidir ve transkriptomda değişikliklere neden olur. *Arabidopsis sp.* köklerinde, düşük oksijen stresi altında miR156g, miR157d, miR158a, miR159a, miR172a,b, miR391 ve miR775'in ekspresyon seviyelerinin arttığı tespit edilmiştir (Moldovan & ark., 2010). Yapılan bir çalışmada, oksidatif stres altında miR398'in ifadesi baskılanmış ve süperoksit dismutaz (SOD) proteinlerinin ifadesini up-regüle edildiği bulunmuştur (Sunkar, Kapoor & Zhu, 2006). Pirinç fidelerinde, H₂O₂ ile düzenlenen miRNA'lar üzerine yapılan bir çalışmada, oksidatif strese yanıt olarak bazı miRNA'ların ekspresyonu düzenlendiği tespit edilmiştir. H₂O₂ ile muamele edilen ve kontrol numunelerinde miRNA'lar farklı şeklide ifade edilmiş; miR169, miR397, miR827 ve miR1425 up-regüle edilmiş; miR528 ise down-regüle edilmiştir (Li & ark., 2010).

3.8. Ağır Metal Stresinde MiRNA'lar

Son araştırmalar, ağır metal stresine maruz kalan bitkileri incelemiştir. Gen ekspresyonunun miRNA aracılı transkripsiyonel ve transkripsiyon sonrası düzenlemelerini oluşturmuşlardır. MiRNA'lar hedef mRNA'lar ile eşleşir ve gen ekspresyonunu düzenler (Wahid & ark., 2010).

Cd toksisitesi: Bitkilerdeki Cd birikimi, büyümenin azalmasına, hücre ölümüne, bitkinin solmasına ve indüklenen oksidatif strese neden olur (Huang & ark., 2010; Zhao & ark., 2012; Zhou, Song & Yang, 2012). Stresli bitkinin hücre ve dokularında anormal miRNA ekspresyonu olmakta ve bu da miRNA'ların Cd yanıtlarında rol oynadığını göstermektedir.

Yapılan bir çalışmada, kolza tohumunun (*Brassica napus*) tüm dokularında bna-miR164b ve bna-miR394a/b/c Cd stresi altında miR160'ı ile birlikte down regüle olmuş; bna-miR393 yapraklarda, bna-miR156a ve bna-miR167a/c kök ve yapraklarda ifadeleri yükselmiştir (Huang & ark., 2010). Başka bir çalışmada, Cd stresinde, *Brassica napus* köklerinde çok sayıda korunmuş ve korunmamış miRNA'ların farklı ekspresyonlarda indüklendiği tespit edilmiştir. Derin dizileme analizleriyle Cd'nin, miRNA ifadesinin genom çapında düzenlenmesin ve hedeflerinin nasıl düzenlediğini anlaşılmıştır. Cd stresi altında, korunmuş ve korunmamış ailelerde 84 miRNA, sürgünlerde ve köklerde farklı ekspresyon seviyeleri ile tanımlanmıştır (Zhou, Song & Yang, 2012). Pirinç mikrodizi deneyleri kullanılarak pirinç fidelerindeki Cd'ye duyarlı 19 tane miRNA tespit edilmiştir. Bu miRNA'ların hedefleri, transkripsiyon faktörleri ve stresle ilişkili proteinler olduğu tahmin edilmiştir (Ding, Chen & Zhu, 2011).

Hg toksisitesi: Hg, bitkilerde yavaş büyümeye, vasküler anormalliklere, azalmış klorofil içeriğine ve reaktif oksijen türlerinin birikimine neden olmaktadır (Chen & Yang, 2012). Derin sıralama yaklaşımı kullanılan bir çalışmada, Hg stresine maruz kalan barrel-yonca (*Medicago truncatula*) fidelerinde çok sayıda korunmuş ve korunmamış miRNA'ların farklı şekilde ifade edildiği tespit

edilmiştir. Hedef degradom dizilimi kullanılarak korunmuş ve korunmamış 58 miRNA ailesi için 130 hedef ve yeni *Medicago truncatula* spesifik aday miRNA'lar için 37 hedef tanımlanmıştır (Zhou & ark., 2012). Metal kaynaklı oksidatif stres ve antioksidan yanıtlarında miRNA'lar, transkripsiyon sonrası düzenleyiciler olarak rol oynamaktadır. Yoncada, süperoksit dismutaz, Hg ile indüklenir ve aktivitesi artar (Zhou, Wang & Yang, 2008).

Mn toksisitesi: Manganez, inorganik bir katalizör olarak görev görmektedir. Yapılan bir çalışmada, Mn-duyarlı miRNA'ları tanımlamak için ticari fasulyelerde qRT-PCR ile birleştirilmiş miRNA makro-dizi hibridizasyon yaklaşımı kullanılmıştır. Çalışma sonucunda 37 miRNA'nın Mn stresi ve abiyotik stres altında farklı ekspresyon seviyeleri gözlemlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre 11 miRNA indüklenirken 11 miRNA'nın ise inhibe edildiği bulunmuştur. Mn-duyarlı miRNA'lar; miR1508, miR1515, miR1510/2110 ve miR1532'dir. Bu miRNA'lar, kalsiyum bağımlı protein kinaz, ısı şok proteinleri, nükleotid bağlanma bölgesi lösin bakımından zengin tekrar direnci gibi proteinler ve reseptör kinaz proteinini hedefledikleri düşünülmektedir (Valdés-López & ark., 2010).

As toksisitesi: Arsenik, yer kabuğunda yaygın olarak bulunan birinci sınıf bir kanserojendir. Bitki dokularındaki arsenit toksisitesi, düşük fotosentez oranına, bozulmuş karbonhidrat metabolizmasına, ROS oluşumuna ve lipid peroksidasyonuna neden olmaktadır. Pirinçte, As'ye yanıt veren 36 yeni miRNA tanımlanmıştır. Bunlar taşıma, sinyal verme ve metabolizmada gen ekspresyonunu düzenlemeye yardımcı olurlar. Elde edilen bu bulgulara göre, As stresine yanıt olarak jasmonik asit (JA) ve lipid metabolizması aktif hale gelir (Wahid & ark., 2010).

Yapılan bir çalışmada, indica pirinç köklerinde 67 As duyarlı miRNA tespit edilmiştir. Bu miRNA'lardan miR408, miR528 ve miR397b'nin ekspresyonu artarken miR1316 ve miR390'm As stresinde baskılandığı bulunmuştur (Liu & Zhang, 2012).

Al toksisitesi: Alüminyum (Al), kök hücre duvarında buluna COOH (karboksilik asit) ve PO₄ (fosfat) gruplarına bağlanır. Yapısal değişikliklere, hücre duvarının genişlemesinin engellenmesine ve büyümenin azalmasına neden olmaktadır (Wahid & ark., 2010). Yapılan bir çalışmada miRNA'nın yüksek verimli genom dizilimi kullanılarak Al stresine maruz kalan *M.truncatula* fidelerinde 23 miRNA'nın ekspresyonunun değiştiği tespit edilmiştir (Chen & ark., 2012; Zeng & ark., 2012; Wang & ark., 2013). Başka bir çalışmada aynı yöntem kullanılarak Al ile muamele edilmiş soya fasulyesinde 30 miRNA tespit edilmiştir. Çalışma sonuçlarına göre, miR396 ve miR390'nın yukarı regüle edildiği bulunmuştur (Zeng & ark., 2012).

UV ışını: UV-B radyasyonunun yükselen seviyesi ozon tabakasının incelmelerinden kaynaklanmaktadır. Bu yüksek UV-B seviyeleri, ROS aracılı oksidatif patlama yoluyla bitkinin büyümesini ve gelişmesini olumsuz bir şekilde etkilemektedir (Wahid & ark., 2010). Yapılan bir çalışmada, yeni buğday Tae-miR6000 izole edilmiş, UV-B ile muamele edilmiş ve ekspresyon çeşitliliği doğrulanmıştır. MiR156, miR159, miR164, miR167a, miR171 ve miR395 UV-B'ye duyarlı olarak tanımlanan miRNA'lardır. MiR159, miR167a ve miR171 yukarı regüle edilirken miR156, miR164 ve miR395 aşağı regüle edildiği tespit edilmiştir (Wang & ark., 2013).

4. Sonuç

Abiyotik stresler, bitkinin yaşamını önemli ölçüde etkilemektedir. Bitkilerin veriminin düşmesine, büyümesinin ve gelişiminin engellenmesine, ölmesine neden olmaktadır. Bitkiler, stresin olumsuz etkilerinden korunmak için çeşitli mekanizmalar geliştirmişlerdir. Stres koşullarında miRNA'ların farklı seviyede ifadeleri söz konusudur. MiRNA'ların stres koşullarında ifadeleri indüklenebilir ya da inhibe edilebilir. MiRNA'ları belirlemek için klonlama, Northern blot tekniği, flow sitometri, kantitatif Real Time PCR, sekanslama ve mikroarray analizleri kullanılabilir. Bu yöntemler kullanılarak miRNA'ların fonksiyonları kolayca

anlaşılabilmektedir. Bu derlemede anlatılanlar göz önünde alındığında miRNA'ların stres koşullarında fonksiyonlarının anlaşılması sayesinde abiyotik streslere dayanıklı, toleranslı transgenik bitki çeşitlerinin geliştirilmesi mümkün olacaktır. Bu sayede abiyotik stresin vermiş olduğu zararlar azaltılabilecektir.

Kaynaklar

Agarwal, S., & Grover, A. (2006). Molecular biology, biotechnology and genomics of flooding-associated low O₂ stress response in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 25(1), 1–21. <https://doi.org/10.1080/07352680600563833>

Aydinoğlu, F., & Aktuğ, G. (2017). Bitki biyoteknolojisi'nde mikroRNA tabanlı interferans uygulamaları. *Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi*, 21(2), 227-238.

Bakır, Ö. (2020). Triticeae'da abiyotik stresle ilişkili miRNA'lar. *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 51(2), 207-218.

Barrera Figueroa, B., Gao, L., Diop, N., Wu, Z., Ehlers, J., Roberts, P., Close, T., Zhu, J. K., & Liu, R. (2011). Identification and comparative analysis of drought-associated microRNAs in two cowpea genotypes. *BMC Plant Biology*, 11, 127.

Büyük, İ., Soydam, A., Aydın, S., & Aras, S. (2012). Bitkilerin stres koşullarına verdiği moleküler cevaplar. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 69(2), 97-110.

Cao, X., Wu, Z., Jiang, F., Zhou, R., & Yang, Z. (2014). Identification of chilling stress-responsive tomato microRNAs and their target genes by high-throughput sequencing and degradome analysis. *BMC Genomics*, 15, 1130. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-1130>

Chen, J., & Yang, Z. M. (2012). Mercury toxicity, molecular response and tolerance in higher plants. *Biometals*, 25(5), 847–857. <https://doi.org/10.1007/s10534-012-9555-5>

Chen, L., Wang, T., Zhao, M., Tian, Q., & Zhang, W. H. (2012). Identification of aluminum-responsive microRNAs in *Medicago truncatula* by genome-wide high-throughput sequencing. *Planta*, 235(2), 375–386. <https://doi.org/10.1007/s00425-011-1509-y>

Ding, D., Zhang, L. F., Wang, H., Liu, Z. J., Zhang, Z. X., & Zheng, Y. L. (2009). Differential expression of miRNAs in response to salt stress in maize roots. *Annals of Botany*, 103, 29-38.

Ding, Y., Chen, Z., & Zhu, C. (2011). Microarray-based analysis of cadmium responsive microRNAs in rice (*Oryza sativa*). *Journal of Experimental Botany*, 62(11), 3563–3573. <https://doi.org/10.1093/jxb/err046>

Eldem, V., Çelikkol Akçay, U., Ozhuner, E., Bakır, Y., Uranbey, S., & Unver, T. (2012). Genome-wide identification of miRNAs responsive to drought in peach (*Prunus persica*) by high-throughput deep sequencing. *PLoS One*, 7, e50298.

Eren, A. H., İlhan, E., Erdoğan, M., & Erayman, M. (2014). MikroRNA'lar ve stres şartlarındaki işlevleri. *Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 19(1), 25-35.

Frazier, T., Sun, G., Burklew, C., & Zhang, B. (2011). Salt and drought stresses induce the aberrant expression of microRNA genes in tobacco. *Molecular Biotechnology*, 49, 159-165.

Gao, P., Bai, X., Yang, L., Lv, D., Pan, X., Li, Y., Cai, H., Ji, W., Chen, Q., & Zhu, Y. (2011). osa-MIR393: A salinity- and alkaline stress-related microRNA gene. *Molecular Biology Reports*, 38(1), 237–242. <https://doi.org/10.1007/s11033-010-0107-4>

Gentile, A., Dias, L. I., Mattos, R. S., Ferreira, T. H., & Menossi, M. (2015). MicroRNAs and drought responses in sugarcane. *Frontiers in Plant Science*, 6, 58. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00058>

Gull, A., Lone, A. A., & Wani, I. N. (2019). Biotic and abiotic stresses in plants. IntechOpen.

Huang, S. Q., Xiang, A. L., Che, L. L., Chen, S., Li, H., Song, J. B., et al. (2010). A set of miRNAs from *Brassica napus* in response to sulfate deficiency and cadmium stress. *Plant Biotechnology Journal*, 8(7), 887–899. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2010.00518.x>

Jeong, D. H., & Green, P. J. (2013). The role of rice microRNAs in abiotic stress responses. *Journal of Plant Biology*, 56(3), 187–197. <https://doi.org/10.1007/s12374-013-0202-y>

Jeong, D. H., Park, S., Zhai, J., Gurazada, S. G., De Paoli, E., Meyers, B. C., et al. (2011). Massive analysis of rice small RNAs: mechanistic implications of regulated microRNAs and variants for differential target RNA cleavage. *Plant Cell*, 23(12), 4185–4207. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.089045>

Jia, X., Wang, W.-X., Ren, L., Chen, Q.-J., Mendu, V., Willcut, B., Dinkins, R., Tang, X., & Tang, G. (2009). Differential and dynamic regulation of miR398 in response to ABA and salt stress in *Populus tremula* and *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology*, 71, 51–59. <https://doi.org/10.1007/s11103-009-9508-8>

Jones-Rhoades, M. W., & Bartel, D. P. (2004). Computational identification of plant microRNAs and their targets, including a stress-induced miRNA. *Molecular Cell*, 14, 787-799.

Kantar, M., Lucas, S., & Budak, H. (2011). MiRNA expression patterns of *Triticum dicoccoides* in response to shock drought stress. *Planta*, 233, 471-484.

Koptekin, D., & Aktaş Yıldız, L. (2013). Bitki mikroRNA'ları: Biyogenezi, köken ve evrimi. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 6(2), 140-148.

Kumar, M. (2013). Crop plants and abiotic stresses. *Biomolecular Research & Therapeutics*, 3(1).

Kumar, R. (2014). Role of microRNAs in biotic and abiotic stress responses in crop plants. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 174(1), 93–115. <https://doi.org/10.1007/s12010-014-0994-2>

Li, H., Deng, Y., Wu, T., Subramanian, S., & Yu, O. (2010). Misexpression of miR482, miR1512, and miR1515 increases soybean nodulation. *Plant Physiology*, 153(4), 1759–1770. <https://doi.org/10.1104/pp.110.157578>

Li, W., Oono, Y., Zhu, J., He, X., Wu, J., Iida, K., Lu, X., Cui, X., Jin, H., & Zhu, J. (2008). The *Arabidopsis* NFYA5 transcription factor is regulated transcriptionally and posttranscriptionally to promote drought resistance. *The Plant Cell*, 20, 2238-2251.

Liu, H. H., Tian, X., Li, Y. J., Wu, C. A., & Zheng, C. C. (2008). Microarray-based analysis of stress-regulated microRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *RNA*, 14, 836-843.

Liu, Q., & Zhang, H. (2012). Molecular identification and analysis of arsenite stress-responsive miRNAs in rice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(25), 6524–6536. <https://doi.org/10.1021/jf301215n>

Liu, W., Meng, J., Cui, J., & Luan, Y. (2017). *Frontiers in Plant Science*.

LV, D. K., Bai, X., Li, Y., Ding, X. D., Ge, Y., Cai, H., et al. (2010). Profiling of cold-stress-responsive miRNAs in rice by microarrays. *Gene*, 459, 39–47. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2010.03.011>

Moldovan, D., Spriggs, A., Yang, J., Pogson, B. J., Dennis, E. S., & Wilson, I. W. (2010). Hypoxia-responsive microRNAs and trans-acting small interfering RNAs in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*, 61(1), 165–177. <https://doi.org/10.1093/jxb/erp294>

Rogers, K., & Chen, X. (2013). Biogenesis, turnover, and mode of action of plant microRNAs. *The Plant Cell*, 25, 2383-2399.

Shriram, V., Kumar, V., Devarumath, R. M., Khare, T. S., & Wani, H. S. (2016). MicroRNAs as potential targets for abiotic stress tolerance in plants. *Frontiers in Plant Science*.

Sunkar, R., & Zhu, J. (2004). Novel and stress-regulated microRNAs and other small RNAs from *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 16, 2001-2019.

Sunkar, R., Kapoor, A., & Zhu, J. K. (2006). Posttranscriptional induction of two Cu/Zn superoxide dismutase genes in *Arabidopsis* is mediated by downregulation of miR398 and important for oxidative stress tolerance. *The Plant Cell*, 18, 2051-2065.

Trindade, I., Capitão, C., Dalmay, T., Fevereiro, M., & Santos, D. M. (2010). miR398 and miR408 are up-regulated in response to water deficit in *Medicago truncatula*. *Planta*, 231, 705-716.

Valdés-López, O., Yang, S. S., Aparicio-Fabre, R., Graham, P. H., Reyes, J. L., Vance, C. P., et al. (2010). MicroRNA expression profile in common bean (*Phaseolus vulgaris*) under nutrient deficiency stresses and manganese toxicity. *New Phytologist*, 187(4), 805–818. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03300.x>

Wahid, F., Shehzad, A., Khan, T., & Kim, Y. Y. (2010). MicroRNAs: Synthesis, mechanism, function, and recent clinical trials. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1803, 1231-1243.

Wang, B., Sun, Y. F., Song, N., Wang, X. J., Feng, H., & Huang, L. L. (2013). Identification of UV-B-induced microRNAs in wheat. *Genetics and Molecular Research*, 12(4), 4213–4221. <https://doi.org/10.4238/2013.October.31.1>

Wang, J., Mei, J., & Ren, G. (2019). Plant microRNAs: Biogenesis, homeostasis, and degradation. *Frontiers in Plant Science*.

Wani, S. H., Kumar, V., Khare, T., Tripathi, P., Shah, T., Ramarkishna, C., Aglawe, S., & Mangrauthia, K. S. (2020). MiRNA

applications for engineering abiotic stress tolerance in plants. *Biologia*, 75, 1063-1081.

Xie, F., Wang, Q., Sun, R., & Zhang, B. (2015). Deep sequencing reveals important roles of microRNAs in response to drought and salinity stress in cotton. *Journal of Experimental Botany*, 66, 789-804.

Xin, M., Wang, Y., Yao, Y., Song, N., Hu, Z., Qin, D., et al. (2011). Identification and characterization of wheat long non-protein coding RNAs responsive to powdery mildew infection and heat stress by using microarray analysis and SBS sequencing. *BMC Plant Biology*, 11, 61. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-11-61>

Xu, M. Y., Zhang, L., Li, W. W., Hu, X. L., Wang, M. B., Fan, Y. L., Zhang, C. Y., & Wang, L. (2014). Stress-induced early flowering is mediated by miR169 in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*, 65, 89-101.

Yin, Z., Li, Y., Yu, J., Liu, Y., Li, C., Han, X., & Shen, F. (2012). Difference in miRNA expression profiles between two cotton cultivars with distinct salt sensitivity. *Molecular Biology Reports*, 39, 4961-4970.

Yu, Y., Jia, T., & Chen, X. (2017). The ‘how’ and ‘where’ of plant microRNAs. *New Phytologist*, 216(4), 1002-1017.

Zeng, Q. Y., Yang, C. Y., Ma, Q. B., Li, X. P., Dong, W. W., & Nian, H. (2012). Identification of wild soybean miRNAs and their target genes responsive to aluminum stress. *BMC Plant Biology*, 12, 182. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-12-182>

Zhang, B. (2015). MicroRNA: A new target for improving plant tolerance to abiotic stress. *Journal of Experimental Botany*, 66(7), 1749-1761.

Zhang, Y., Zhu, X., Chen, X., Song, C., Zou, Z., Wang, Y., et al. (2014). Identification and characterization of cold-responsive microRNAs in tea plant (*Camellia sinensis*) and their targets using high-throughput sequencing and degradome analysis. *BMC Plant Biology*, 14, 271. <https://doi.org/10.1186/s12870-014-0271-6>

Zhao, B., Liang, R., Ge, L., Li, W., Xiao, H., Lin, H., et al. (2007). Identification of drought-induced microRNAs in rice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 354, 585–590. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.01.022>

Zhao, X., Ding, C., Chen, L., Wang, S., Wang, Q., & Ding, Y. (2012). Comparative proteomic analysis of the effects of nitric oxide on alleviating Cd-induced toxicity in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Omics*, 5(6), 604–614. Retrieved from <https://www.pomics.com>

Zhou, L., Liu, Y., Liu, Z., Kong, D., Duan, M., & Luo, L. (2010). Genome-wide identification and analysis of drought-responsive microRNAs in *Oryza sativa*. *Journal of Experimental Botany*, 61, 4157-4168.

Zhou, X., Wang, G., & Zhang, W. (2007). UV-B responsive microRNA genes in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Systems Biology*, 3, 103–103. <https://doi.org/10.1038/msb4100143>

Zhou, Z. S., Song, J. B., & Yang, Z. M. (2012). Genome-wide identification of *Brassica napus* microRNA and their targets in

response to cadmium. *Journal of Experimental Botany*, 63(12), 4597–4613. <https://doi.org/10.1093/jxb/ers144>

Zhou, Z. S., Wang, S. J., & Yang, Z. M. (2008). Biological detection and analysis of mercury toxicity to alfalfa (*Medicago sativa*) plants. *Chemosphere*, 70(8), 1500–1509. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.08.029>

Zhou, Z. S., Zeng, H. Q., Liu, Z. P., & Yang, Z. M. (2012). Genome-wide identification of *Medicago truncatula* microRNAs and their targets reveals their differential regulation by heavy metal. *Plant, Cell & Environment*, 35(1), 86–99. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2011.02421.x>

BÖLÜM V

Mitokondriyal DNA ve Yeni Nesil Sekanslama (NGS) Teknolojileri

Doğan İLHAN¹
Muhsin Muhammet KARAÇAR²

Giriş

Mitokondriyal DNA (mtDNA), enerji üretiminden sorumlu hücrel organeller olan mitokondrilerde bulunan dairesel, çift sarmallı bir DNA molekülüdür. Tipik olarak yaklaşık 16.500 baz çiftinden oluşur ve mitokondriyal solunum zinciri için gerekli 13 proteinin yanı sıra mitokondri içindeki protein sentezi için gerekli 22 transfer RNA ve 2 ribozomal RNA dahil olmak üzere 37 geni kodlar (Reddy & ark., 2015; Rango & Bresolin, 2018; Rahman & ark., 2023). Nükleer DNA'nın aksine, mtDNA neredeyse yalnızca anneden kalıtılır; bu, mtDNA'daki mutasyonlardan kaynaklanan

¹ Dr. Öğr. Üyesi, Kafkas Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Kars/Türkiye, ORCID: 0000-0003-2805-1638, doganilhan@kafkas.edu.tr,

² Yüksek Lisans Öğrencisi, Kafkas Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji Programı, Kars/Türkiye, ORCID: 0009-0002-8276-2238, 1998muhsin@gmail.com

mitokondriyal hastalıkları anlamak için çok önemli olan maternal kalıtım olarak bilinen bir olgudur (Saxena & ark., 2018; Keaney & ark., 2020).

MtDNA'nın benzersiz kalıtım yapısı, genetik çeşitlilik ve hastalık iletimi için önemli çıkarımlara sahiptir. Örneğin, mtDNA'daki mutasyonlar, genellikle bozulmuş oksidatif fosforilasyon nedeniyle birden fazla organ sistemini etkileyen çeşitli mitokondriyal bozukluklara yol açabilir (Hiruma, 2023; Li, 2024). Ek olarak, son çalışmalar, belirli türlerde mtDNA'nın iki ebeveynli kalıtım potansiyelini araştırmış, katı maternal kalıtımın geleneksel görüşüne meydan okumuş (Pagnamenta & ark., 2021; Burzyński, 2024) ve daha karmaşık bir evrimsel tarih önermiştir (Stewart & ark., 2021; Walt & ark., 2023).

Genel olarak, mtDNA hücresel işlev ve kalıtımda hayati bir rol oynar ve bu da onu genetik ve tıpta kritik bir çalışma alanı haline getirir. Mitokondriyal genomlar, farklı taksonlar arasında boyut, yapı ve gen içeriği açısından dikkate değer çeşitlilik gösterir. Örneğin, Sitka ladininin (*Picea sitchensis*) mitokondriyal genomu, karmaşıklığı ve boyutuyla dikkat çeker ve gimnospermiler arasında bildirilen en büyük genomlardan biridir ve bu türün evrimsel adaptasyonlarını yansıtır (Jackman & ark., 2019; Jackman & ark., 2020). Buna karşılık, *Dunaliella salina* gibi bazı alglerin mitokondriyal genomları, bitki alemindeki mitokondriyal DNA'nın değişkenliğini vurgulayan benzersiz yapısal özellikler sergileyerek farklı bir evrimsel yörünge gösterir (Magdaleno-Moncayo & ark., 2017). Bu değişkenlik bitkilerle sınırlı değildir; hayvan mitokondriyal genomları da, bazı parazitik bitlerin parçalanmış mitokondriyal genomlarında görüldüğü gibi, mini daire tipi genomların tekrarlanan evrimini gösteren önemli farklılıklar gösterir (Sweet & ark., 2019).

Mitokondriyal genomların çeşitliliğini yönlendiren evrimsel mekanizmalar çok yönlüdür. Öne çıkan faktörlerden biri, özellikle bitkilerde kloroplastlar ve mitokondriler arasında organeller arasındaki gen transferi olgusudur. Bu transfer yaygın bir olaydır ve

çeşitli türlerde belgelenmiştir; bu da evrimsel tarih boyunca bu organeller arasında karmaşık bir etkileşim olduğunu göstermektedir (Niu & ark., 2022; Li, 2024). Örneğin, çalışmalar kloroplastlardan mitokondriyal genomlara gen transferinin yaygın olduğunu ve tatlı patates gibi türlerin genom mimarisine katkıda bulunduğunu göstermiştir (li & qiu, 2022; li, 2023). Bu tür organeller arası gen transferleri, doğal seçilime tabi tutulabilen yeni genetik materyal getirebilecekleri için türlerin evrimsel yörüngesini önemli ölçüde etkileyebilir.

Gen transferine ek olarak, mitokondriyal genomlar, nükleer genomlara kıyasla yüksek mutasyon oranlarıyla karakterize edilir ve bu da hızlı evrimsel değişikliklere yol açabilir. Bu, özellikle yüksek bir yeniden düzenleme oranına sahip ancak nispeten düşük bir genel mutasyon oranına sahip olduğu gösterilen bitkilerin mitokondriyal genomlarında belirgindir (Li & O'Conner, 2021; Sun & ark., 2023). Bu özelliklerin etkileri derindir, çünkü türlerin değişen ortamlara hızla adapte olmasını sağlarlar, bu da birçok organizmanın hayatta kalmasında önemli bir faktördür.

Mitokondriyal DNA'nın incelenmesi, dizileme yöntemlerindeki teknolojik yenilikler nedeniyle önemli ölçüde ilerlemiştir. Yüksek verimli dizileme teknolojilerinin ortaya çıkması, araştırmacıların benzeri görülmemiş doğruluk ve verimlilikle eksiksiz mitokondriyal genomları bir araya getirmesini sağlamıştır. Örneğin, mitokondriyal genom birleştirme için uzmanlaşmış biyoenformatik araçlarının geliştirilmesi, süreci basitleştirmiş ve çok çeşitli türlerden mitokondriyal genomların analizine olanak sağlamıştır (Alqahtani & Mandoiu, 2019; Uliano-Silva & ark., 2023). Bu, taksonlar arasındaki evrimsel ilişkileri ve genetik çeşitliliği ortaya çıkaran karşılaştırmalı çalışmaları kolaylaştırmış ve çeşitli grupların filogenetik geçmişine dair içgörüler sağlamıştır.

Dahası, mitokondriyal DNA, insan sağlığını ve hastalıklarını anlamada önemli bir rol oynar. Genellikle mtDNA'daki mutasyonlardan kaynaklanan mitokondriyal bozukluklar, metabolik

sendromlar ve nörodejeneratif hastalıklar dahil olmak üzere bir dizi sağlık sorununa yol açabilir (Chow & ark., 2016; Akesson & ark., 2019). Mitokondriyal DNA'nın maternal kalıtım örüntüsü, onu aynı zamanda soyağacını izleme ve popülasyon genetiğini anlamada değerli bir araç haline getirir. Örneğin, çalışmalar çeşitli popülasyonların genetik çeşitliliğini ve evrimsel geçmişini araştırmak için mtDNA'yı kullanarak insan göç örüntüleri ve evrimsel ilişkiler hakkında ışık tutmuştur (Ridge & ark., 2018).

Mitokondriyal DNA araştırmalarının etkileri biyoteknoloji ve tarım alanına kadar uzanmaktadır. Mitokondriyal genom düzenleme potansiyeli, ürün iyileştirme ve genetik mühendisliği için heyecan verici fırsatlar sunmaktadır. CRISPR gibi teknikler, tarımsal üretkenliği ve dayanıklılığı artırabilecek hassas değişikliklere izin veren mitokondriyal genom düzenlemesi için uyarlanmıştır (Yang & ark., 2021; Lim, 2024). Bu, özellikle mahsullerin yeni çevre koşullarına hızla uyum sağlaması gerekebileceği iklim değişikliği bağlamında önemlidir.

Yeni nesil dizileme (NGS) teknolojileri, mitokondriyal DNA'nın (mtDNA) dizilenmesi ve analizi için benzeri görülmemiş yetenekler sağlayarak genomik alanında devrim yarattı. Bu teknolojilerin ortaya çıkışı, araştırmacıların geleneksel yöntemlere kıyasla daha yüksek hız ve doğrulukla yüksek kaliteli genomik veriler elde etmesini sağladı. NGS, her biri farklı avantajlara ve sınırlamalara sahip, özellikle mitokondriyal genomik bağlamında belirli araştırma ihtiyaçlarına göre uyarlanabilen çeşitli platformları ve yaklaşımları kapsar.

NGS'deki en önemli gelişmelerden biri, Oxford Nanopore ve PacBio tarafından sunulanlar gibi uzun okuma dizileme teknolojilerinin geliştirilmesidir. Bu platformlar, genellikle tekrarlayan diziler ve yapısal varyasyonlar içeren karmaşık mitokondriyal genomların çözülmesi için özellikle yararlı olan daha uzun DNA parçalarının dizilenmesine olanak tanır (Zascavage & ark., 2019; Sawicki, 2024). Uzun okuma dizilemesi, mitokondriyal genomun daha kapsamlı bir görünümünü sağlayarak yapısal

varyantların tanımlanmasını ve filogenetik çalışmalar ve evrimsel biyoloji için çok önemli olan tam mitokondriyal genomların bir araya getirilmesini kolaylaştırabilir (Zascavage & ark., 2019).

Uzun okuma teknolojilerine ek olarak, Illumina gibi kısa okuma dizileme platformları da mitokondriyal genom dizilemesi için yaygın olarak benimsenmiştir. Bu platformlar yüksek verimleri ve maliyet etkinlikleriyle bilinir ve bu da onları büyük ölçekli çalışmalar için uygun hale getirir (Sahoo & ark., 2017; Harvey & ark., 2019). Ancak, kısa okuma dizilemesindeki zorluk, mitokondriyal genomun tekrarlayan bölgelerini doğru bir şekilde bir araya getirmedeki zorluğunda yatmaktadır ve bu da eksik veya parçalanmış birleşimlere yol açabilir (Becher ve Nichols, 2019). Bu sorunu ele almak için araştırmacılar, birleştirme kalitesini ve doğruluğunu iyileştirmek için birden fazla dizileme teknolojisinden gelen verileri entegre eden biyoenformatik hatları geliştirdiler (Jayasekera & ark., 2022; Lee, 2023).

NGS'nin mitokondriyal genomikteki uygulaması, karmaşık biyolojik örneklerden mitokondriyal DNA'yı izole etmeye odaklanan özel zenginleştirme yöntemlerinin geliştirilmesiyle de geliştirildi. PCR amplifikasyonunun getirdiği önyargılar olmadan mitokondriyal DNA'yı zenginleştirmek için Mito-SiPE (Mitokondriyal Diziden Bağımsız PCR'siz Zenginleştirme) gibi teknikler tanıtıldı ve böylece nükleer mitokondriyal DNA'dan (NUMT'ler) kaynaklanan kontaminasyon en aza indirildi (Walsh & ark., 2022). Bu, mtDNA'daki varyasyonların genetik verilerin yorumlanmasını önemli ölçüde etkileyebileceği heteroplazmiyi içeren çalışmalar için özellikle önemlidir (Santibanez-Koref & ark., 2019).

Ayrıca, NGS'nin gelişmiş biyoenformatik araçlarıyla bütünleştirilmesi araştırmacıların mitokondriyal genomların detaylı analizlerini yapmalarını sağlamıştır. Örneğin, varyant çağırma hatları, popülasyon genetiği, evrimsel tarih ve hastalık ilişkileri hakkında içgörüler sağlayabilen mitokondriyal DNA'daki tek nükleotid polimorfizmlerini (SNP'ler) ve diğer genetik varyasyonları

tanımlamak için geliştirilmiştir (Santibanez-Koref & ark., 2019; Jayasekera & ark., 2022; Lee, 2023). Bu araçlar, NGS tarafından oluşturulan büyük veri kümelerinin analizini kolaylaştırarak, geleneksel dizileme yöntemleri kullanılarak ayırt edilmesi zor olan kalıpların ve eğilimlerin tanımlanmasına olanak tanır.

NGS teknolojilerinin mitokondriyal araştırmalarda kullanımı, temel genomik çalışmaların ötesine, klinik ve adli ortamlardaki uygulamalara kadar uzanır. Örneğin, NGS, mtDNA'daki belirli mutasyonların bir dizi sağlık sorununa yol açabildiği mitokondriyal hastalıkları araştırmak için kullanılmıştır. Tüm mitokondriyal genomu dizileme yeteneği, hastalık fenotiplerine katkıda bulunabilecek genetik varyasyonların kapsamlı değerlendirmelerine olanak tanır ve böylece tanı ve tedavi stratejilerine yardımcı olur (Ebihara & ark., 2021; Habbane & ark., 2021). Adli bilimde NGS, bozulmuş veya sınırlı biyolojik örneklerden bireyleri tanımlamak için çok önemli olan mitokondriyal DNA analizinin doğruluğunu artırmıştır (Tezel & ark., 2016).

Dahası, NGS'nin çevresel ve ekolojik çalışmalarda uygulanması, biyolojik çeşitlilik değerlendirmeleri için yeni yollar açmıştır. Araştırmacılar mitokondriyal DNA barkodlamasından yararlanarak türleri genetik bilgilere göre tanımlayabilir ve sınıflandırabilir; bu da özellikle biyolojik çeşitlilik ve koruma çalışmalarında faydalıdır (Othman & ark., 2023). Hücrelerdeki mtDNA'nın yüksek kopya sayısı, çevresel örneklerden kullanılabilir genetik materyal elde etme olasılığını artırdığı için bu tür çalışmalar için ideal bir hedef haline getirir (Abbasi & ark., 2021).

NGS teknolojileri gelişmeye devam ettikçe, mitokondriyal biyoloji ve çeşitli alanlardaki etkilerine ilişkin anlayışımızı daha da geliştirmeleri bekleniyor. Makine öğrenimi ve yapay zekanın biyoenformatik boru hatlarına entegre edilmesi, mitokondriyal genomik verilerin daha karmaşık analizlerine ve yorumlarına yol açarak genetik, evrim ve tıpta yeni keşiflerin önünü açabilir (Harvey & ark., 2019).

Bu çalışmada mtDNA – Yeni Nesil Sekanslama Teknolojileri (NGS) ortak bir perspektif içerisinde açıklanmaya çalışılmıştır.

1. Bitkilerde Mitokondriyal DNA

Bitki mitokondriyal DNA'sının (mtDNA) incelenmesi, benzersiz özellikleri ve evrimsel çıkarımları nedeniyle önemli ilgi görmüştür. Bitki mitokondriyal genomları, hayvanlarınkinden belirgin şekilde daha büyük ve daha karmaşıktır, genellikle kapsamlı kodlamayan bölgeler içerir ve yüksek oranda rekombinasyon ve yatay gen transferi (HGT) gösterir (Donnelly & ark., 2017; Zardoya, 2020). Bu karmaşıklık, bitki mtDNA'sının dinamik doğasına katkıda bulunan hem kloroplast hem de nükleer genomlardan gelen DNA'nın sık sık dahil edilmesiyle daha da karmaşık hale gelir (Feng & ark., 2021; Odahara & ark., 2023). Bu genomları yöneten evrimsel süreçler, bitki biyolojisini, filogenisini ve adaptasyonunu anlamak için kritik öneme sahiptir.

Bitki mitokondriyal genomlarının tanımlayıcı özelliklerinden biri, yaklaşık 200 kb'den 2,5 Mb'ın üzerine kadar değişebilen önemli boyutlarıdır (Palanivelu, 2023). Bu boyut değişkenliği genellikle tekrarlayan dizilerin varlığına ve HGT yoluyla yabancı DNA birikimine atfedilir (L & ark., 2022). Örneğin, alışmalar bitki mitokondrilerinin kloroplastlardan ve hatta diğer mitokondriyal genomlardan gelen diziler de dahil olmak üzere yabancı DNA'yı emebileceğini ve bunun da genetik değişim geçmişini yansıtan mozaik bir yapıya yol açtığını göstermiştir (Park & ark., 2015; Feng & ark., 2021). Bu fenomen özellikle anjiyospermelerde belirgindir; burada kloroplastlardan mitokondrilere gen transferi belgelenmiştir ve bu da bu organel genomları arasında devam eden bir etkileşim olduğunu düşündürmektedir (Odahara & ark., 2023).

Bitki mtDNA'sının replikasyonu ve onarımının altında yatan mekanizmalar da önemli ilgi görmektedir. Genellikle yüksek bir replikasyon doğruluğu sergileyen hayvan mitokondriyal DNA'sının aksine, bitki mtDNA replikasyonu, Arabidopsis'teki AtPolIIA ve

AtPolIB gibi birden fazla DNA polimerazının katılımı nedeniyle hataya açık olabilir (Ayala-García & ark., 2018). Bu polimerazların, evrimsel yörüngeleri ve çevresel streslere uyumu etkileyebilen bitki mitokondriyal genomlarında gözlemlenen nispeten yüksek mutasyon oranlarına katkıda bulunduğu düşünülmektedir (Wu & ark., 2020). Dahası, bitki mitokondrilerinde urasil N-glikozilaz gibi benzersiz onarım mekanizmalarının varlığı, bitkilerde mtDNA bakımının karmaşıklığını vurgular (Yang & ark., 2021).

Bitki mtDNA'sının evrimsel etkileri derindir, çünkü bu genomlar enerji üretimi, metabolik süreçler ve bitkilerin genel zindeliğinde önemli bir rol oynar (Abbas & ark., 2019). Yabancı DNA'nın entegrasyonu ve bunun sonucunda oluşan genomik düzenlemeler, çeşitli ortamlarda hayatta kalmak için gerekli olan yeni özelliklerin ve adaptasyonların ortaya çıkmasına yol açabilir (Feng & ark., 2021; Lü & ark., 2022). Ek olarak, mtDNA çalışması, bitki türleri arasındaki filogenetik ilişkilere dair içgörüler sağlayabilir, çünkü mtDNA dizilerindeki varyasyonlar taksonomik sınıflandırma ve evrimsel çalışmalar için değerli moleküler belirteçler olarak hizmet edebilir (Zhang & ark., 2020).

Dizileme teknolojilerindeki son gelişmeler, özellikle yeni nesil dizileme (NGS) ve nanopore dizileme, mitokondriyal genomik alanında devrim yaratmıştır. Bu teknolojiler, karmaşık mitokondriyal genomların kapsamlı analizini sağlayarak yapısal varyasyonların, gen transferlerinin ve evrimsel kalıpların tanımlanmasını kolaylaştırır (Walsh & ark., 2022; Sawicki, 2024). Örneğin, uzun okuma dizilemesinin kullanımı, genellikle yüksek tekrar içeriği ve düşük gen yoğunluğu ile karakterize edilen bitki mitokondriyal genomlarının karmaşık yapılarını çözmede etkili olduğu kanıtlanmıştır (Lee & ark., 2018). Bu yetenek, bitki mtDNA'sının evrimsel dinamiklerini ve bitki çeşitliliğindeki rolünü anlamak için çok önemlidir.

Dahası, mitokondriyal DNA'nın incelenmesi temel araştırmaların ötesinde çıkarımlara sahiptir; tarımsal uygulamaları ve ürün geliştirme stratejilerini bilgilendirebilir. Transkripsiyon

aktivatörü benzeri efektör nükleazlar (TALEN'ler) gibi teknikler kullanılarak mitokondriyal genomların düzenlenebilmesi, ürünlerde stres toleransını ve enerji verimliliğini artırmak için potansiyel yollar sunar (Yang & ark., 2021). Bu nedenle, bitki mitokondriyal genomlarının karmaşıklıklarını anlamak yalnızca evrimsel biyoloji için değil, aynı zamanda tarım ve çevre yönetimindeki pratik uygulamalar için de önemlidir.

2. NGS'nin Tarihsel Gelişim Süreci

Yeni nesil dizileme (NGS) teknolojilerinin tarihi, genomik ve moleküler biyolojiyi dönüştüren dikkat çekici bir yolculuktur. Dizileme teknolojilerinin evrimi, 1970'lerde geliştirilen ve doğruluğu ve güvenilirliği nedeniyle DNA dizilemesi için altın standart haline gelen Sanger dizileme yöntemiyle başladı. Ancak Sanger dizilemesi, verimi ve maliyetiyle sınırlıydı ve bu da onu büyük ölçekli genomik projeler için pratik olmaktan çıkardı. Sanger dizilemesini kullanan İnsan Genomu Projesi'nin 2003'te tamamlanması, üretilen muazzam miktardaki veriyi işlemek için daha verimli dizileme yöntemlerine olan ihtiyacı vurguladı (Lucan & ark., 2016; Kchouk & ark., 2017).

NGS'deki ilk önemli atılım, 2005 yılında Roche'un 454 dizileme teknolojisinin tanıtılmasıyla gerçekleşti. Bu platform, Sanger dizilemesinden önemli ölçüde daha düşük maliyetle yüksek verimli diziler üretebildi ve NGS döneminin başlangıcını işaret etti (Kchouk & ark., 2017). 454 teknolojisi, milyonlarca DNA parçasının eş zamanlı dizilenmesine olanak tanıyan ve böylece araştırmacıların büyük veri kümelerini hızla üretmesini sağlayan pirosekanslama olarak bilinen bir yöntemi kullandı. Bu yenilik, her biri benzersiz metodolojilere ve uygulamalara sahip çeşitli NGS platformlarının hızla geliştirilmesi için zemin hazırladı.

454 dizilemesinin başarısının ardından, genomikte en yaygın kullanılan platformlardan biri haline gelen Illumina dizilemesi de dahil olmak üzere birkaç başka NGS teknolojisi ortaya çıktı. Illumina'nın dizileme teknolojisi, milyonlarca kısa okumanın paralel olarak üretilmesine olanak tanıyan bir sentez yoluyla dizileme

yaklaşımı kullanır. Bu yöntem, tüm genom dizilimi, hedefli yeniden dizileme ve RNA dizilimi (Luthra & ark., 2015; Slatko & ark., 2018) dahil olmak üzere çok sayıda uygulamada etkili olmuştur. Illumina dizilemesinin ölçeklenebilirliği ve maliyet etkinliği, onu birçok araştırmacı için tercih edilen bir seçenek haline getirmiş ve NGS'nin hem akademik hem de klinik ortamlarda yaygın olarak benimsenmesine katkıda bulunmuştur.

NGS teknolojilerinin ortaya çıkışı, kanser genomikliği için hedefli dizileme panelleri gibi uzmanlaşmış uygulamaların geliştirilmesini de kolaylaştırmıştır. Bu paneller, belirli hastalıklarla ilişkili birden fazla genin eş zamanlı analizine olanak tanıyarak daha verimli ve kapsamlı genetik testler yapılmasını mümkün kılar (Luthra & ark., 2015; Nagahashi & ark., 2018). Tümörlerdeki somatik mutasyonları ve genetik değişiklikleri belirleme yeteneği, kanser teşhisinde ve kişiselleştirilmiş tıpta devrim yaratmış ve klinisyenlere tedavi kararları için değerli bilgiler sağlamıştır (Angione & ark., 2018).

NGS teknolojileri gelişmeye devam ettikçe, biyoenformatikteki gelişmeler üretilen devasa veri kümelerini yönetmek ve analiz etmek için önemli hale geldi. Karmaşık algoritmaların ve yazılım araçlarının geliştirilmesi, araştırmacıların NGS verilerini etkili bir şekilde işlemesini ve yorumlamasını sağlayarak genomik ve moleküler biyolojide önemli keşiflere yol açtı (Tran & Chen, 2016). Makine öğrenimi ve yapay zekanın biyoenformatik boru hatlarına entegre edilmesi, NGS verilerinin analizini daha da geliştirerek daha doğru varyant çağırısı ve genetik varyasyonların yorumlanmasına olanak tanıdı (Slatko & ark., 2018).

Son yıllarda, metagenomik NGS'nin ortaya çıkması, dizileme uygulamalarının kapsamını insan genomikliğinin ötesine genişletti. Metagenomik dizileme, karmaşık mikrobiyal toplulukların doğrudan çevresel örneklerden analiz edilmesini sağlayarak biyolojik çeşitlilik, ekoloji ve mikroorganizmaların sağlık ve hastalıktaki rolü hakkında içgörüler sağlar (Gwinn & ark., 2019; Yu

& ark., 2020). Bu yaklaşım, insan mikrobiyomunu ve çeşitli sağlık koşulları üzerindeki etkisini anlamakta özellikle değerli olmuştur.

NGS'nin klinik uygulamaları da özellikle bulaşıcı hastalık ve farmakogenomik alanlarında önemli ölçüde artmıştır. NGS teknolojileri patojenleri hızlı ve doğru bir şekilde tanımlamak için kullanılmış ve bulaşıcı hastalıkların zamanında teşhis ve tedavisini kolaylaştırmıştır (Gwinn & ark., 2019; Carpenter, 2024). Farmakogenomikte NGS, ilaç metabolizmasını ve yanıtını etkileyen genetik varyantların tanımlanmasını sağlayarak, tedavileri genetik profillerine göre bireysel hastalara göre uyarlayan kişiselleştirilmiş tıp yaklaşımlarının önünü açmıştır (Rabbani & ark., 2016).

NGS'nin sayısız avantajına rağmen, özellikle veri yorumlama ve klinik uygulama konusunda zorluklar devam etmektedir. NGS tarafından üretilen muazzam miktardaki veri, depolama, analiz ve klinik iş akışlarına entegrasyon açısından önemli zorluklar oluşturmaktadır (Slatko & ark., 2018). Ek olarak, genetik varyasyonların, özellikle de belirsiz öneme sahip olanların yorumlanması, yanlış tanı veya uygunsuz tedavi kararlarından kaçınmak için dikkatli değerlendirme ve uzmanlık gerektirir (Findlay & ark., 2015; Lubitz & Ellinor, 2015).

İleriye bakıldığında, doğruluğu artırmayı, maliyetleri düşürmeyi ve uygulamaları genişletmeyi amaçlayan devam eden ilerlemelerle NGS teknolojilerinin geleceği umut verici görünüyor. Tek hücreli dizileme ve uzun okuma dizileme teknolojileri gibi yeniliklerin karmaşık biyolojik sistemler ve hastalıklar hakkındaki anlayışımızı daha da geliştirmesi bekleniyor (Kchouk & ark., 2017; Slatko & ark., 2018). NGS olgunlaşmaya devam ettikçe, rutin klinik uygulamaya entegrasyonunun daha yaygın hale gelmesi ve nihayetinde hasta sonuçlarının iyileştirilmesine ve hassas tıpta ilerlemelere yol açması muhtemeldir.

3. NGS'nin Avantaj ve Dezavantajları

Yeni nesil dizileme (NGS) teknolojileri, genomikte dönüştürücü araçlar olarak ortaya çıkmış olup, çok sayıda avantaj ve

bazı önemli dezavantajlar sunmaktadır. Bu yönleri anlamak, klinik teşhis, kanser genomu ve mikrobiyal çalışmalar dahil olmak üzere çeşitli uygulamalar için NGS'den yararlanmayı amaçlayan araştırmacılar ve klinisyenler için çok önemlidir.

Yeni Nesil Dizileme Teknolojilerinin Avantajları

1. Yüksek Verim: NGS'nin en önemli avantajlarından biri, milyonlarca DNA parçasını aynı anda dizileyebilmesidir. Bu yüksek verim, özellikle büyük ölçekli genomik çalışmalar ve popülasyon genomu için faydalı olan büyük miktarda verinin hızla üretilmesini sağlar (Luthra & ark., 2015; Hou, 2024). Örneğin, NGS, tüm genom dizilemesini (WGS) ve tek bir çalışmada birden fazla genin hedefli dizilemesini kolaylaştırabilir ve Sanger dizilemesi (Th & Saeed, 2015) gibi geleneksel yöntemlere kıyasla dizileme için gereken süreyi önemli ölçüde azaltır.

2. Maliyet Etkinliği: Dizilemenin baş başına maliyeti, NGS teknolojilerinin ortaya çıkmasıyla önemli ölçüde azaldı. Maliyetteki bu azalma, genom dizilemesini daha geniş bir araştırmacı yelpazesi için erişilebilir hale getirdi ve İnsan Genomu Projesi gibi büyük ölçekli projelerin daha ekonomik bir şekilde tamamlanmasını sağladı (Xu & ark., 2018; Hou, 2024). Birden fazla analizi paralel olarak gerçekleştirme yeteneği, NGS'nin maliyet etkinliğini daha da artırır (Luthra & ark., 2015).

3. Kapsamlı Veri Üretimi: NGS teknolojileri, tek nükleotid polimorfizmleri (SNP'ler), eklemeler, silmeler ve yapısal varyasyonlar hakkında bilgi de dahil olmak üzere kapsamlı genom verileri sağlar (Gagan ve Allen, 2015; Luthra & ark., 2015). Bu kapsamlı veriler, genetik çeşitliliği, hastalık mekanizmalarını ve türler arasındaki evrimsel ilişkileri anlamak için paha biçilmezdir (Vega-García & ark., 2020; Wensel & ark., 2022).

4. Çok Yönlülük ve Uygulama Aralığı: NGS, onkoloji, mikrobiyoloji ve kişiselleştirilmiş tıp dahil olmak üzere çeşitli alanlarda uygulanabilir. Örneğin, kanser genomu NGS, hedefli tedavilere rehberlik edebilecek eyleme geçirilebilir mutasyonların

tanımlanmasına olanak tanır (Gagan ve Allen, 2015; Rebollar-Vega & ark., 2018). Mikrobiyolojide NGS, kültürlenemeyen mikropları tespit edebilir ve karmaşık mikrobiyal toplulukları karakterize ederek insan mikrobiyomu ve çevresel ekosistemler hakkında içgörüler sağlayabilir (Besser & ark., 2018; Wensel & ark., 2022).

5. Gelişmiş Hassasiyet ve Özgüllük: NGS teknolojileri son derece hassastır ve düşük frekanslı varyantları tespit edebilir; bu, tümörlerdeki heterojenliğin tedavi kararlarını zorlaştırabileceği kanser teşhisleri gibi uygulamalarda özellikle önemlidir (Gagan & Allen, 2015; Căinap & ark., 2021). Sıvı biyopsiler de dahil olmak üzere çeşitli kaynaklardan küçük miktarlarda DNA analiz etme yeteneği, NGS'nin klinik ortamlardaki kullanışlılığını daha da artırır (Căinap & ark., 2021).

Yeni Nesil Dizileme Teknolojilerinin Dezavantajları

1. Veri Karmaşıklığı ve Yorumlama Zorlukları: NGS tarafından üretilen muazzam miktardaki veri, veri depolama, yönetim ve analiz açısından önemli zorluklar ortaya koymaktadır. Varyantların, özellikle de belirsiz öneme sahip olanların biyolojik önemini yorumlamak, sofistike biyoenformatik araçları ve uzmanlığı gerektirir (Lubitz & Ellinor, 2015; Vestergaard & ark., 2021). Bu karmaşıklık, klinik uygulama ve karar alma süreçlerinde zorluklara yol açabilir (Lubitz & Ellinor, 2015).

2. Hata Oranları ve Kalite Kontrolü: NGS teknolojileri doğruluk açısından gelişmiş olsa da, özellikle homopolimerik bölgelerde ikame hataları ve yanlış montajlar gibi belirli hata türlerine karşı hala hassastırlar (Shin & Park, 2016; Abnizova & ark., 2017). Bu hatalar varyant çağrısını karmaşıklştırabilir ve yanlış pozitif veya negatif sonuçlara yol açabilir, bu da ek yöntemlerle sonuçların dikkatli bir şekilde doğrulanmasını gerektirir (Lubitz & Ellinor, 2015; Vestergaard & ark., 2021).

3. Etik ve Gizlilik Endişeleri: NGS'nin klinik ortamlarda kullanımı, genetik gizlilik ve genetik bilgilere dayalı ayrımcılık potansiyeli konusunda etik endişeler doğurur. Tüm genomları

dizileme yeteneği, hastalıklara yatkınlıklarla ilgili hassas bilgilerin ortaya çıkarılabileceği anlamına gelir ve bu da sigorta ve istihdam için sonuçlar doğurabilir (Lubitz & Ellinor, 2015; Vestergaard & ark., 2021).

4. Sınırlı Standardizasyon: NGS teknolojilerinin hızlı gelişimi, protokollerde ve veri analizi hatlarında standardizasyon eksikliğine yol açmıştır. Bu değişkenlik, farklı laboratuvarlar ve çalışmalar arasında sonuçlarda tutarsızlıklara yol açabilir ve verilerin karşılaştırılmasını ve klinik kılavuzların oluşturulmasını zorlaştırabilir (Luthra & ark., 2015; Vestergaard & ark., 2021; Yang, 2021).

5. Yüksek İlk Yatırım: Dizi başına maliyet azalmış olsa da, dizileme makineleri ve biyoenformatik yetenekleri de dahil olmak üzere NGS altyapısı için gereken ilk yatırım önemli olabilir. Bu engel, özellikle düşük kaynaklı ortamlarda daha küçük laboratuvarlar veya kurumlar için erişimi sınırlayabilir (Luthra & ark., 2015; Vestergaard & ark., 2021).

4. NGS'nin Uygulama Alanları

Yeni nesil dizileme (NGS) teknolojileri, özellikle tıp, genomik ve biyoteknoloji olmak üzere çeşitli alanları önemli ölçüde etkilemiştir. Uygulamaları, kişiselleştirilmiş tıptan bulaşıcı hastalık teşhisine, kanser araştırmalarına ve ötesine kadar çok çeşitli alanları kapsar. Bu sentez, NGS'nin çeşitli uygulama alanlarını inceleyecek ve bilimsel bilgiyi ve klinik uygulamayı ilerletmedeki dönüştürücü rolünü vurgulayacaktır.

1. Kişiselleştirilmiş Tıp: NGS'nin en önemli uygulamalarından biri, genomik bilginin tıbbi tedaviyi bireysel hastalara göre uyarlamak için kullanıldığı kişiselleştirilmiş tıptır. NGS, ilaç yanıtını etkileyen genetik varyantların tanımlanmasını sağlayarak, bir hastanın benzersiz genetik yapısına göre terapilerin özelleştirilmesine olanak tanır (Jamuar & ark., 2016; Morash & ark., 2018; Angerilli & ark., 2021). Örneğin, farmakogenomik, hastaların ilaçları nasıl metabolize ettiğini belirlemek için NGS'yi kullanır ve

bu da daha etkili ve daha güvenli ilaç reçetelerine yol açabilir (Rabbani & ark., 2016; Jakaria & ark., 2019). Bu yaklaşım, hedeflenen tedavilerin bir hastanın tümöründe bulunan spesifik mutasyonlara göre tasarlanabildiği onkolojide özellikle değerlidir (Gulilat & ark., 2019; Tang & ark., 2019).

2. Kanser Genomiği: NGS, tümör genomlarının kapsamlı analizini kolaylaştırarak kanser araştırmalarında devrim yaratmıştır. Kanser ilerlemesini yönlendiren somatik mutasyonların, kopya sayısı varyasyonlarının ve gen füzyonlarının tanımlanmasına olanak tanır (Borm & ark., 2016; López-García & ark., 2019). Kanser Genom Atlası (TCGA) gibi büyük ölçekli projeler, çeşitli kanserlerin mutasyonel manzaralarını kataloglamak için NGS'yi kullanmış ve tümör biyolojisi ve potansiyel terapötik hedefler hakkında içgörüler sağlamıştır (He & ark., 2017; Nagahashi & ark., 2018). Dahası, NGS, tedavi kararlarını yönlendirmek için klinik ortamlarda giderek daha fazla kullanılmakta ve onkologların tümörlerdeki belirli genetik değişiklikleri hedef alan tedavileri seçmesini sağlamaktadır (Caratti & ark., 2015; Nikas & ark., 2022).

3. Bulaşıcı Hastalık Tanıları: NGS teknolojileri, bulaşıcı hastalıkların teşhisinde ve yönetiminde temel araçlar haline gelmiştir. Bakteriler, virüsler ve mantarlar dahil olmak üzere patojenlerin doğrudan klinik örneklerden hızlı ve doğru bir şekilde tanımlanmasını sağlarlar (Koliogeorgi & ark., 2019; Mittal & Pathak, 2022). Örneğin, NGS bakteriyel enfeksiyonlarda antibiyotik direnç genlerini tespit etmek ve uygun tedavi stratejilerine rehberlik etmek için kullanılabilir (Rebollar-Vega & ark., 2018; Dominguez & Wang, 2020). COVID-19 gibi ortaya çıkan bulaşıcı hastalıklar bağlamında, NGS viral mutasyonları izlemede ve bulaşma dinamiklerini anlamada kritik bir rol oynamıştır (Nakagaki & ark., 2018; Cheng & Xiao, 2022).

4. Genetik Bozukluklar ve Nadir Hastalıklar: NGS, geleneksel tanı yöntemlerinin başarısız olabileceği genetik bozuklukları ve nadir hastalıkları teşhis etmede etkilidir. Tüm ekzom dizilemesi (WES) ve tüm genom dizilemesi (WGS), açıklanamayan

klinik sunumları olan hastalarda patojenik varyantların tanımlanmasına olanak tanır (Morash & ark., 2018; Kim & ark., 2023). Bu teknolojiler, yeni hastalığa neden olan mutasyonların keşfedilmesine yol açmış ve kistik fibroz ve Duchenne kas distrofisi gibi durumlar için hedefli tedavilerin geliştirilmesini kolaylaştırmıştır (Rabbani & ark., 2016; Djurišić & ark., 2020).

5. Mikrobiyom Araştırması: NGS'nin mikrobiyom araştırmasında uygulanması, mikrobiyal topluluklar ile insan sağlığı arasındaki karmaşık etkileşimleri anlamak için yeni yollar açmıştır. NGS, mikrobiyomun sağlık ve hastalıktaki rolünü incelemek için çok önemli olan insan bağırsağı da dahil olmak üzere çeşitli ortamlardaki mikrobiyal çeşitliliğin profilini çıkarmayı sağlar (Chaudhary & Sharma, 2016; Rey & Tamargo-Gómez, 2023). Bu araştırmanın, mikrobiyal bileşimin hastalık sonuçlarını etkileyebileceği inflamatuvar bağırsak hastalığı (IBD), obezite ve metabolik bozukluklar gibi durumlar için çıkarımları vardır (Yoon ve Lee, 2021; Pathak & ark., 2023).

6. Veterinerlik Hekimliği: NGS ayrıca, hayvanlarda bulaşıcı hastalıkları teşhis etmek ve çeşitli türlerdeki genetik bozuklukları anlamak için kullanıldığı veterinerlik hekimliğinde de önemli adımlar atmaktadır (Harrer & ark., 2015; Goyal & ark., 2017). Hayvan genomlarını dizileme yeteneğinin üreme programları, koruma çabaları ve hayvanlardan insanlara geçebilen zoonotik hastalıkların incelenmesi için etkileri vardır (Yang & ark., 2020; Cheng & ark., 2023).

7. Adli Bilim: Adli bilimde, NGS teknolojileri genetik analiz için güçlü araçlar olarak ortaya çıkmıştır. Birden fazla genetik belirtinin eş zamanlı analizine olanak sağlayarak biyolojik örneklerden bireyleri tanımlama yeteneğini artırır (Landolt & ark., 2016; Li & ark., 2017). NGS ayrıca, adli soruşturmalarda sıklıkla karşılaşılan bir zorluk olan bozulmuş DNA örneklerini analiz etmek için de kullanılabilir (Schmidt & Hildebrandt, 2021; Shin & ark., 2022). Bu yetenek, geleneksel yöntemlerin yetersiz kalabileceği

soğuk vakalarda ve kitlesel felaket senaryolarında özellikle değerlidir.

8. Tarımsal Genomik: NGS teknolojileri, mahsul ve hayvan yetiştiriciliğini iyileştirmek için tarımsal genomikte giderek daha fazla uygulanmaktadır. NGS, bitki ve hayvan genomlarının hızlı dizilenmesini sağlayarak verim, hastalık direnci ve çevresel uyum ile ilişkili genetik özelliklerin tanımlanmasını kolaylaştırır (Nagahashi & ark., 2018; Haghi & ark., 2020). Bu bilgi, genetiği değiştirilmiş organizmalar (GDO'lar) geliştirmek ve geleneksel yetiştirme programlarını geliştirmek için kullanılabilir ve nihayetinde gıda güvenliğine katkıda bulunur (Sayitoğlu, 2016; Khatami & Tavangar, 2018).

9. Biyoteknoloji ve İlaç Geliştirme: NGS, biyoteknolojide yeni ilaçların keşfi ve geliştirilmesinde önemli bir rol oynar. Araştırmacıların hastalıkların genetik temellerini açıklayarak ve ilgili moleküler mekanizmaları anlayarak potansiyel ilaç hedeflerini belirlemelerine olanak tanır (Chiara & ark., 2018; Asada & ark., 2021). Ek olarak, NGS, hastaların genetik profillerindeki değişiklikleri zaman içinde analiz ederek ilaç tedavilerinin etkinliğini izlemek için kullanılabilir (Doyle-Lindrud, 2022; Ojha, 2024).

10. Klinik Araştırmalar ve Denemeler: NGS, giderek daha fazla klinik araştırma ve denemeye entegre ediliyor ve tedavi yanıtlarını ve hastalık ilerlemesini etkileyen genetik faktörlere ilişkin içgörüler sağlıyor (Liu & ark., 2018; Hamamoto & ark., 2022). Genomik verileri klinik deneme tasarımlarına dahil ederek, araştırmacılar belirli terapilerden yararlanma olasılığı daha yüksek olan hasta popülasyonlarını belirleyebilir ve klinik çalışmaların verimliliğini ve başarı oranlarını artırabilir (Levy & Myers, 2016; Batista & ark., 2021).

5. NGS'nin Eski Nesil Sekanslama ile Karşılaştırılması

Dizileme teknolojilerinin evrimi, genomik ve moleküler biyolojinin manzarasını önemli ölçüde dönüştürdü. Esas olarak

Sanger dizilemesiyle temsil edilen eski nesil dizileme ile yeni nesil dizileme (NGS) teknolojileri arasındaki karşılaştırma, metodoloji, verim, maliyet ve uygulamalarda önemli farklılıklar ortaya koymaktadır. Bu sentez, ilgili literatürle desteklenen bu farklılıklara ilişkin kapsamlı bir genel bakış sağlamayı amaçlamaktadır.

1. Metodoloji: 1970'lerin sonlarında geliştirilen Sanger dizilemesi, zincir sonlandırma yöntemine dayanmaktadır. DNA replikasyonu sırasında zincir sonlandırıcı dideoksinükleotidlerin seçici bir şekilde dahil edilmesini içerir ve bu da kılcal elektroforezle ayrılabilen farklı uzunluklarda parçalarla sonuçlanır (Eren ve ark., 2023). Bu yöntem, tek DNA parçalarını dizilemek için oldukça doğrudur ancak birden fazla örneği aynı anda işleme yeteneği sınırlıdır. Buna karşılık, NGS teknolojileri, milyonlarca DNA parçasının aynı anda dizilenmesine olanak tanıyan büyük ölçüde paralel dizilemeyi kullanır. Bu, sentez yoluyla dizileme (Illumina), pirosekanslama (454) ve ligasyon tabanlı yöntemler (SOLiD) (Th & Saeed, 2015) dahil olmak üzere çeşitli yöntemlerle elde edilir. NGS teknolojileri tek bir çalışmada büyük miktarda veri üretebilir ve bu da onları büyük ölçekli genomik projeler için uygun hale getirir (Xu & ark., 2018).

2. Verim ve Ölçeklenebilirlik: NGS'nin Sanger dizilemesine göre en önemli avantajlarından biri yüksek verimidir. NGS tek bir çalışmada gigabay dizi verisi üretebilirken, Sanger dizilemesi genellikle reaksiyon başına sadece birkaç yüz baz çifti üretir. Örneğin, iki yöntemi karşılaştıran bir çalışma, NGS'nin tek bir Sanger dizileme reaksiyonunu gerçekleştirmek için gereken sürede binlerce dizi üretebileceğini buldu (Tzou & ark., 2018). Bu ölçeklenebilirlik, genomun kapsamlı bir şekilde kapsanmasının gerektiği tüm genom dizilemesi gibi uygulamalar için özellikle faydalıdır.

3. Maliyet Etkinliği: NGS teknolojilerinin ortaya çıkmasıyla dizilemenin baz başına maliyeti önemli ölçüde azaldı. Sanger dizilemesi baz başına yaklaşık 5 ila 10 dolar tutarken, NGS bu maliyeti baz başına 0,01 doların altına düşürebilir (Xu & ark., 2018).

Maliyetteki bu azalma, genom dizilemesini daha geniş bir araştırmacı yelpazesi için erişilebilir hale getirdi ve İnsan Genomu Projesi ve çeşitli kanser genomik girişimleri (Tzou & ark., 2018) gibi büyük ölçekli projeleri kolaylaştırdı.

4. Uygulamalar ve Çok Yönlülük: Sanger dizilemesi, özellikle klinik teşhislerde hedeflenen dizileme ve belirli mutasyonların doğrulanması için altın standart olmuştur (Hwang & ark., 2018). Ancak, verim ve ölçeklenebilirlikteki sınırlamaları onu kapsamlı genomik çalışmalar için daha az uygun hale getirir. Öte yandan NGS, tüm genom dizilemesi, ekzom dizilemesi, RNA dizilemesi ve metagenomik (Tzou & ark., 2018; Isa & ark., 2023) dahil olmak üzere çok çeşitli uygulamalara sahiptir. NGS teknolojileri, kanser genomîği, bulaşıcı hastalık teşhisi ve kalıtsal bozukluklar için genetik testler için klinik ortamlarda giderek daha fazla kullanılmaktadır (Hwang & ark., 2018; Tzou & ark., 2018).

5. Doğruluk ve Hata Oranları: Sanger dizilemesi yüksek doğruluğuyla bilinirken, NGS teknolojileri özellikle homopolimerik bölgelerde ve tekrarlayan dizilerde daha yüksek hata oranları gösterebilir (Paulsen & ark., 2022). İki yöntemi karşılaştıran bir çalışma, NGS'nin Sanger dizilemesinin tespit edebileceği düşük frekanslı varyantları kaçırabileceğini ve her iki yöntemin de belirli bağlamlarda kullanılmasının önemini vurguladığını buldu (Tzou & ark., 2018). Bu zorluklara rağmen, NGS'nin genel hassasiyeti, geleneksel yöntemlerle kaçırılacak varyantların tespit edilmesine olanak tanır (Hwang & ark., 2018; Tzou & ark., 2018;).

6. Veri Analizi ve Biyoenformatik: NGS tarafından üretilen muazzam miktardaki veri, analiz ve yorumlama için karmaşık biyoenformatik araçları gerektirir. Bu, daha küçük veri kümesi nedeniyle veri analizinin nispeten basit olduğu Sanger dizilemesiyle çelişir (Crona & ark., 2015). NGS veri analizinin karmaşıklığı, klinik ortamlarda zorluklar yaratabilir ve doğru varyant çağırma ve yorumlamayı sağlamak için sağlam biyoenformatik boru hatlarının geliştirilmesini gerektirir (Crona & ark., 2015; Isa & ark., 2023).

7. Doğrulama ve Onaylama: NGS ile ilişkili daha yüksek hata oranları nedeniyle, Sanger dizilemesi genellikle NGS aracılığıyla tanımlanan varyantlar için bir doğrulama yöntemi olarak kullanılır. Bu uygulama, Sanger dizilemesinin özellikle klinik teşhislerde NGS sonuçlarının doğruluğunu doğrulamaya hizmet ettiği iki teknolojinin tamamlayıcı doğasını vurgular (Hwang & ark., 2018; Tzou & ark., 2018).

Yeni Nesil Sekanslama (NGS) ve Eski Nesil Sekanslama (ES, Sanger Yöntemi) genetik analizlerde farklı yöntemlerdir. NGS, daha hızlı ve ekonomik bir şekilde büyük miktarda genetik veriyi analiz etmek için geliştirilmişken, Sanger Yöntemi daha sınırlı kapasiteye sahip ancak genetik analizlerin temel taşı olmuştur. Eski nesil sekanslama (Sanger Yöntemi), genetik analizler için temelde doğruluğu yüksek ve küçük ölçekli analizlere uygun bir yöntemken, yeni nesil sekanslama (NGS), büyük veri kümeleriyle çalışan, çok daha hızlı ve ekonomik bir teknolojidir. NGS, yüksek kapasiteli paralel dizileme ve düşük maliyetli analizler ile büyük genom projeleri için ideal bir seçim haline gelmiştir (Mardis, 2008; Goodwin & ark., 2016).

Tablo 1. Yeni ve Eski Sekanslama Teknolojilerine bakış (Mardis, 2008)

Özellik	Eski Nesil Sekanslama (Sanger Yöntemi)	Yeni Nesil Sekanslama (NGS)
Teknoloji	Dizi uzatma reaksiyonu kullanır.	Paralel dizileme kullanır.
Veri Kapasitesi	Sınırlı, tek bir DNA parçasının dizilmesi yapılabilir.	Çok sayıda DNA parçası aynı anda dizilenebilir.
Hız	Daha yavaş, genetik analizler daha uzun zaman alır.	Çok daha hızlı, milyonlarca baz eş zamanlı dizilenebilir.
Maliyet	Yüksek, büyük projeler için pahalıdır.	Daha düşük maliyetli, büyük ölçekli projelerde daha ekonomik
Genetik Veri Büyüklüğü	Genellikle küçük, birkaç yüz baz dizilmesi yapılabilir.	Yüksek verimli, genom çapında veri toplanabilir.
Hata Oranı	Düşük, genellikle doğru sonuçlar verir.	Hata oranı daha yüksektir ancak bu hatalar yazılım aracılığıyla düzeltilir.
Kullanım Alanı	Kısa diziler için, mutasyon analizi ve genetik çeşitlilik çalışmaları için kullanılır.	Tam genom dizileme, transkriptom, epigenom ve metagenom analizlerinde kullanılır.
Örnek Türü	Genellikle tek bir örnek üzerinde çalışılır.	Çoklu örneklerin paralel analizini yapabilir.
Zorluk	Daha az karmaşık, genetik analizler daha basit yapılıdır.	Daha karmaşık, büyük verilerin yönetilmesi gereklidir.
Uygulama Alanları	Klinik genetik testler, küçük çaplı projeler.	İnsan genomu projeleri, metagenomik analizler, bitki ve hayvan genomları gibi geniş çaplı araştırmalar.

6. Sonuç

Mitokondriyal DNA, çok çeşitli biyolojik, evrimsel ve pratik çıkarımları kapsayan hayati bir çalışma alanıdır. Farklı organizmalardaki mitokondriyal genomların çeşitliliği, evrimsel süreçlerin karmaşıklığını ve organeller arası etkileşimlerin önemini vurgular. Dizileme teknolojileri ve biyoenformatikteki ilerlemeler, mitokondriyal DNA'nın evrimsel geçmişi ve işlevsel önemi hakkında daha derin içgörüler sağlayarak araştırma için yeni yollar açmıştır. Araştırmalar gelişmeye devam ettikçe, mitokondriyal DNA'nın anlaşılması şüphesiz hem temel bilimlerde hem de tıp ve tarım dahil olmak üzere uygulamalı alanlarda önemli bir rol oynayacaktır.

Bitki mitokondriyal DNA'sı evrimsel biyoloji, genetik ve biyoteknolojiyi kapsayan büyüleyici bir çalışma alanını temsil eder. Bitki mtDNA'sının boyutu, karmaşıklığı ve dinamik yapısı gibi benzersiz özellikleri, bitki çeşitliliğini şekillendiren evrimsel süreçlere dair kritik içgörüler sağlar. Gelişmiş dizileme teknolojileriyle kolaylaştırılan bu alandaki devam eden araştırmalar, bitki biyolojisi ve tarım ve koruma alanındaki uygulamalarına ilişkin anlayışımızı geliştirmeyi vaat ediyor.

Yeni nesil dizileme teknolojileri mitokondriyal genomik manzarasını dönüştürerek mitokondriyal DNA'nın kapsamlı analizi için güçlü araçlar sağlamıştır. Uzun okuma ve kısa okuma dizileme platformlarının, gelişmiş zenginleştirme ve biyoenformatik yöntemleriyle bir araya getirilmesi, araştırmacıların mitokondriyal genom dizilemesindeki önceki sınırlamaların üstesinden gelmelerini sağlamıştır. Bu teknolojiler gelişmeye devam ettikçe, mitokondriyal işlev, evrim ve sağlık ve hastalıktaki rolleri hakkındaki anlayışımızı geliştirmek için büyük bir vaat taşımaktadır.

Yeni nesil dizileme teknolojilerinin tarihi, geleneksel yöntemlerden sofistike yüksek verimli platformlara doğru dikkate değer bir evrimi yansıtmaktadır. NGS'nin genomik, tıp ve biyolojik araştırmalar üzerindeki etkisi derin olmuştur ve genetik çeşitlilik, hastalık mekanizmaları ve mikrobiyal çeşitlilik konusunda benzeri

görülmemiş içgörüler sağlamıştır. Teknoloji gelişmeye devam ettikçe, NGS biyoloji ve tıbbın geleceğini şekillendirmede giderek daha önemli bir rol oynamaya hazırdır.

Yeni nesil dizileme teknolojileri, genomik araştırma ve klinik teşhis alanında önemli bir ilerlemeyi temsil eder ve yüksek verim, maliyet etkinliği ve kapsamlı veri üretimi gibi çok sayıda avantaj sunar. Ancak, NGS'nin çeşitli uygulamalardaki potansiyelini tam olarak gerçekleştirmek için veri karmaşıklığı, yorumlama, etik hususlar ve standardizasyonla ilgili zorlukların ele alınması gerekir. Alan gelişmeye devam ettikçe, teknoloji ve biyoenformatikteki devam eden gelişmeler muhtemelen bu dezavantajların bazılarını hafifletecek ve NGS'nin rutin klinik uygulamaya daha geniş bir şekilde benimsenmesinin ve entegre edilmesinin önünü açacaktır.

Yeni nesil dizileme teknolojileri, özellikle tıp, genomik ve biyoteknoloji olmak üzere çeşitli alanları derinden etkilemiştir. Kişiselleştirilmiş tıp, kanser genomı, bulaşıcı hastalık teşhisi ve ötesindeki uygulamaları, dönüştürücü potansiyellerinin altını çizmektedir. NGS teknolojileri gelişmeye devam ettikçe, karmaşık biyolojik sistemlere ilişkin anlayışımızı daha da geliştirmeyi ve farklı alanlardaki hasta sonuçlarını iyileştirmeyi vaat ediyor.

Eski nesil Sanger dizilemesi ile yeni nesil dizileme teknolojileri arasındaki karşılaştırma, metodoloji, verim, maliyet ve uygulamalarda önemli ilerlemeleri vurgulamaktadır. Sanger dizilemesi hedefli dizileme ve doğrulama için değerli bir araç olmaya devam ederken, NGS yüksek verimli, uygun maliyetli ve kapsamlı dizileme yetenekleri sağlayarak genomik alanında devrim yaratmıştır. NGS teknolojileri gelişmeye devam ettikçe, klinik uygulama ve araştırmalara entegrasyonları muhtemelen genişleyecek ve genetik ve hastalık anlayışımızı daha da geliştirecektir.

Kaynaklar

Abbas, B., Tjolli, I., & Dailami, M. (2019). Phylogenetic of sago palm (*Metroxylon sagu*) and others monocotyledon based on mitochondrial nad2 gene markers. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 20(8). <https://doi.org/10.13057/biodiv/d200820>

Abbasi, I., Halaseh, L., Darwish, H., & Matouk, I. (2021). Strategy for DNA extraction and detection from insect pests in stored home grain samples research. *AQUJ*, 01(1), 24-32. <https://doi.org/10.47874/2021p3>

Abnizova, I., Boekhorst, R., & Orlov, Y. (2017). Computational errors and biases in short read next generation sequencing. *Journal of Proteomics & Bioinformatics*, 10(1). <https://doi.org/10.4172/jpb.1000420>

Akesson, L., Eggers, S., Love, C., Chong, B., Krzesinski, E., Brown, N., ... & Stark, Z. (2019). Early diagnosis of Pearson syndrome in neonatal intensive care following rapid mitochondrial genome sequencing in tandem with exome sequencing. *European Journal of Human Genetics*, 27(12), 1821-1826. <https://doi.org/10.1038/s41431-019-0477-3>

Alqahtani, F., & Mandoiu, I. (2019). SMART: Statistical mitogenome assembly with repeats. <https://doi.org/10.1101/795633>

Angerilli, V., Galuppini, F., Pagni, F., Fusco, N., Malapelle, U., & Fassan, M. (2021). The role of the pathologist in the next-generation era of tumor molecular characterization. *Diagnostics*, 11(2), 339. <https://doi.org/10.3390/diagnostics11020339>

Asada, K., Kaneko, S., Takasawa, K., Machino, H., Takahashi, S., Shinkai, N., & Hamamoto, R. (2021). Integrated analysis of whole genome and epigenome data using machine learning technology: Toward the establishment of precision oncology. *Frontiers in Oncology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.666937>

Ayala-García, V., Baruch-Torres, N., García-Medel, P., & Briebe, L. (2018). Plant organellar DNA polymerases paralogs exhibit dissimilar nucleotide incorporation fidelity. *FEBS Journal*, 285(21), 4005-4018. <https://doi.org/10.1111/febs.14645>

Batista, M., Costa, D., & Borralho, P. (2021). Next-generation sequencing in breast cancer management: A case report of genomic tumor evolution over time. *Case Reports in Oncology*, 14(2), 1212-1219. <https://doi.org/10.1159/000517441>

Becher, H., & Nichols, R. (2019). Mitochondrial sequences or NUMTs – by-catch differs between sequencing methods. <https://doi.org/10.1101/739805>

Besser, J., Carleton, H., Gerner-Smidt, P., Lindsey, R., & Trees, E. (2018). Next-generation sequencing technologies and their application to the study and control of bacterial infections. *Clinical Microbiology and Infection*, 24(4), 335-341. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.10.013>

Borm, S., Wang, J., Granberg, F., & Colling, A. (2016). Next-generation sequencing workflows in veterinary infection biology: Towards validation and quality assurance. *Revue Scientifique Et Technique De L Oie*, 35(1), 67-81. <https://doi.org/10.20506/rst.35.1.2418>

Burzyński, A. (2024). The absence of canonical respiratory complex I subunits in male-type mitogenomes of three *Donax* species. *Scientific Reports*, 14(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-024-63764-8>

Căinap, C., Bălăcescu, O., Căinap, S., & Pop, L. (2021). Next generation sequencing technology in lung cancer diagnosis. *Biology*, 10(9), 864. <https://doi.org/10.3390/biology10090864>

Caratti, S., Turrina, S., Ferrian, M., Cosentino, E., & Leo, D. (2015). MiSeq FGX sequencing system: A new platform for forensic genetics. *Forensic Science International Genetics Supplement Series*, 5, e98-e100. <https://doi.org/10.1016/j.fsigss.2015.09.040>

Chaudhary, S., & Sharma, P. (2016). Next generation sequencing-based exploration of genomes and transcriptomes of medicinal plants. *Indian Journal of Plant Physiology*, 21(4), 489-503. <https://doi.org/10.1007/s40502-016-0258-8>

Cheng, C., & Xiao, P. (2022). Evaluation of the correctable decoding sequencing as a new powerful strategy for DNA sequencing. *Life Science Alliance*, 5(8), e202101294. <https://doi.org/10.26508/lsa.202101294>

Cheng, C., Fei, Z., & Xiao, P. (2023). Methods to improve the accuracy of next-generation sequencing. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2023.982111>

Chiara, M., Gioiosa, S., Chillemi, G., D'Antonio, M., Flati, T., Picardi, E., & Castrignanò, T. (2018). CoVACS: A consensus

variant calling system. *BMC Genomics*, 19(1).
<https://doi.org/10.1186/s12864-018-4508-1>

Chow, J., Rahman, J., Achermann, J., Dattani, M., & Rahman, S. (2016). Mitochondrial disease and endocrine dysfunction. *Nature Reviews Endocrinology*, 13(2), 92-104.
<https://doi.org/10.1038/nrendo.2016.151>

Djurišić, I., Dražić, M., Tomović, A., Spasenović, M., Šljivančanin, Ž., Jovanović, V., & Žikić, R. (2020). DNA sequencing with single-stranded DNA rectification in a nanogap gated by N-terminated carbon nanotube electrodes. *ACS Applied Nano Materials*, 3(3), 3034-3043.
<https://doi.org/10.1021/acsanm.0c00385>

Dominguez, D., & Wang, X. (2020). Impact of next-generation sequencing on outcomes in hepatocellular carcinoma: How precise are we really? *Journal of Hepatocellular Carcinoma*, 7, 33-37. <https://doi.org/10.2147/jhc.s217948>

Donnelly, K., Cottrell, J., Ennos, R., Vendramin, G., A'Hara, S., King, S., & Cavers, S. (2017). Reconstructing the plant mitochondrial genome for marker discovery: A case study using *Pinus*. *Molecular Ecology Resources*, 17(5), 943-954.
<https://doi.org/10.1111/1755-0998.12646>

Doyle-Lindrud, S. (2022). Personalized cancer care. *Journal of the American Association of Nurse Practitioners*, 34(11), 1184-1186. <https://doi.org/10.1097/jxx.0000000000000793>

Ebihara, T., Nagatomo, T., Sugiyama, Y., Tsuruoka, T., Osone, Y., Shimura, M., & Murayama, K. (2021). Neonatal-onset

mitochondrial disease: Clinical features, molecular diagnosis and prognosis. *Archives of Disease in Childhood - Fetal and Neonatal Edition*, 107(3), 329-334. <https://doi.org/10.1136/archdischild-2021-321633>

Feng, Y., Xiang, X., Akhter, D., Pan, R., Fu, Z., & Jin, X. (2021). Mitochondrial phylogenomics of Fagales provides insights into plant mitogenome mosaic evolution. *Frontiers in Plant Science*, 12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.762195>

Gagan, J., & Allen, E. (2015). Next-generation sequencing to guide cancer therapy. *Genome Medicine*, 7(1). <https://doi.org/10.1186/s13073-015-0203-x>

Goodwin, S., McPherson, J. D., & McCombie, W. R. (2016). Coming of age: Ten years of next-generation sequencing technologies. *Nature Reviews Genetics*, 17(6), 333–351. <https://doi.org/10.1038/nrg.2016.49>

Goyal, A., Kwon, H., Lee, K., Garg, R., Yun, S., Kim, Y., & Lee, M. (2017). Ultra-fast next generation human genome sequencing data processing using DRAGEN™ Bio-IT processor for precision medicine. *Open Journal of Genetics*, 7(1), 9-19. <https://doi.org/10.4236/ojgen.2017.71002>

Gulilat, M., Lamb, T., Teft, W., Wang, J., Dron, J., Robinson, J., ... & Schwarz, U. (2019). Targeted next-generation sequencing as a tool for precision medicine. *BMC Medical Genomics*, 12(1). <https://doi.org/10.1186/s12920-019-0527-2>

Habbane, M., Montoya, J., Rhouda, T., Sbaoui, Y., Radallah, D., & Emperador, S. (2021). Human mitochondrial DNA:

Particularities and diseases. *Biomedicines*, 9(10), 1364.
<https://doi.org/10.3390/biomedicines9101364>

Haghi, A., Alvarez, L., Polo, J., Diamantopoulos, D., Hagleitner, C., & Moret , M. (2020). A hardware/software co-design of k-mer counting using a CAPI-enabled FPGA. *2020 30th International Conference on Field-Programmable Logic and Applications (FPL)*, 57-64.
<https://doi.org/10.1109/fpl50879.2020.00020>

Hamamoto, R., Koyama, T., Kouno, N., Yasuda, T., Yui, S., Sudo, K., ... & Yamamoto, N. (2022). Introducing AI to the molecular tumor board: One direction toward the establishment of precision medicine using large-scale cancer clinical and biological information. *Experimental Hematology & Oncology*, 11(1).
<https://doi.org/10.1186/s40164-022-00333-7>

Harrer, S., Kim, S., Schieber, C., Kannam, S., Gunn, N., Moore, S., ... & Wagner, J. (2015). Label-free screening of single biomolecules through resistive pulse sensing technology for precision medicine applications. *Nanotechnology*, 26(18), 182502.
<https://doi.org/10.1088/0957-4484/26/18/182502>

Harvey, N., Albury, C., Stuart, S., Benton, M., Eccles, D., Connell, J., & Griffiths, L. (2019). Ion torrent high throughput mitochondrial genome sequencing (HTMGS). *PLOS ONE*, 14(11), e0224847. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0224847>

He, K., Ge, D., & He, M. (2017). Big data analytics for genomic medicine. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(2), 412. <https://doi.org/10.3390/ijms18020412>

Hiruma, T. (2023). Successful transcatheter mitral valve repair for functional mitral regurgitation in a patient with mitochondrial cardiomyopathy: A case report. *European Heart Journal - Case Reports*, 7(9). <https://doi.org/10.1093/ehjcr/ytad440>

Hou, M. (2024). The diagnostic value of metagenomics next-generation sequencing in HIV-infected patients with suspected pulmonary infections. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2024.1395239>

Jackman, S., Coombe, L., Warren, R., Kirk, H., Trinh, E., MacLeod, T., ... & Birol, I. (2020). Complete mitochondrial genome of a gymnosperm, Sitka spruce (*Picea sitchensis*), indicates a complex physical structure. *Genome Biology and Evolution*, 12(7), 1174-1179. <https://doi.org/10.1093/gbe/evaa108>

Jackman, S., Coombe, L., Warren, R., Kirk, H., Trinh, E., McLeod, T., ... & Birol, I. (2019). Largest complete mitochondrial genome of a gymnosperm, Sitka spruce (*Picea sitchensis*), indicates complex physical structure. <https://doi.org/10.1101/601104>

Jamuar, S., Kuan, J., Brett, M., Tiang, Z., Tan, W., Lim, J., ... & Foo, R. (2016). Incidentalome from genomic sequencing: A barrier to personalized medicine?. *EBioMedicine*, 5, 211-216. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.01.030>

Jayasekera, L., Senanayake, K., Ranasinghe, R., & Tennekoon, K. (2022). A bioinformatics pipeline for variant discovery from targeted next generation sequencing of the human mitochondrial genome. *EMBnet Journal*, 28. <https://doi.org/10.14806/ej.28.0.1007>

Keaney, T., Wong, H., Dowling, D., Jones, T., & Holman, L. (2020). Sibling rivalry versus mother's curse: Can kin competition facilitate a response to selection on male mitochondria? *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 287(1930), 20200575. <https://doi.org/10.1098/rspb.2020.0575>

Khatami, F., & Tavangar, S. (2018). Circulating tumor DNA (ctDNA) in the era of personalized cancer therapy. *Journal of Diabetes & Metabolic Disorders*, 17(1), 19-30. <https://doi.org/10.1007/s40200-018-0334-x>

Kim, M., Lee, C., Hong, J., Kim, J., Jeong, J., Park, N., ... & Park, J. (2023). Validation and clinical application of OncoAccuPanel for targeted next-generation sequencing of solid tumors. *Cancer Research and Treatment*, 55(2), 429-441. <https://doi.org/10.4143/crt.2022.891>

Koliogeorgi, K., Voss, N., Fytraki, S., Xydis, S., Gaydadjiev, G., & Soudris, D. (2019). Dataflow acceleration of Smith-Waterman with traceback for high throughput next-generation sequencing. *2019 29th International Conference on Field Programmable Logic and Applications (FPL)*. <https://doi.org/10.1109/fpl.2019.00021>

Landolt, L., Strauss, P., Marti, H., & Eikrem, Ø. (2016). Next-generation sequencing: A tool for this generation of nephrologists. *European Medical Journal*, 50-57. <https://doi.org/10.33590/emj/10314001>

Lee, H., Choi, J., Baek, J., Oh, J., Lee, S., & Kim, C. (2018). Assembly of the mitochondrial genome in the Campanulaceae family using illumina low-coverage sequencing. *Genes*, 9(8), 383. <https://doi.org/10.3390/genes9080383>

Lee, S. (2023). Comparison of two variant analysis programs for next-generation sequencing data of whole mitochondrial genome. *Journal of Korean Medical Science*, 38(36). <https://doi.org/10.3346/jkms.2023.38.e297>

Levy, S., & Myers, R. (2016). Advancements in next-generation sequencing. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 17(1), 95-115. <https://doi.org/10.1146/annurev-genom-083115-022413>

Li, C. (2024). Generation of mitochondrial replacement monkeys by female pronucleus transfer. *Zool Res.* 45(2), 292-298. <https://doi.org/10.24272/j.issn.2095-8137.2023.287>

Li, E., Truong, D., Hallett, S., Mukherjee, K., Schutte, B., & Liao, E. (2017). Rapid functional analysis of computationally complex rare human IRF6 gene variants using a novel zebrafish model. *PLoS Genetics*, 13(9), e1007009. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007009>

Li, G. (2023). Comparative analysis of chloroplast and mitochondrial genomes of sweet potato provides evidence of gene transfer. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-3248164/v1>

Li, G. (2024). Comparative analysis of chloroplast and mitochondrial genomes of sweet potato provides evidence of gene transfer. *Scientific Reports*, 14(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-024-55150-1>

Li, G., & Qiu, S. (2022). Comparing sweet potato chloroplast genome and mitochondrial genome reveals organelle gene transfer. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-2323159/v1>

Li, L., & O'Conner, S. (2021). Mitochondrial fostering: The mitochondrial genome may play a role in plant orphan gene evolution. *The FASEB Journal*, 35(S1). <https://doi.org/10.1096/fasebj.2021.35.s1.01749>

Lim, K. (2024). Mitochondrial genome editing: Strategies, challenges, and applications. *BMB Reports*, 57(1), 19-29. <https://doi.org/10.5483/bmbrep.2023-0224>

Liu, P., Weng, X., Zhou, J., Xu, X., He, F., Du, Y., ... & Peng, G. (2018). Next-generation sequencing based pathogen analysis in a patient with neurocysticercosis: A case report. *BMC Infectious Diseases*, 18(1). <https://doi.org/10.1186/s12879-018-3015-y>

López-García, G., Jerez, J., Franco, L., & Veredas, F. (2019). A transfer-learning approach to feature extraction from cancer transcriptomes with deep autoencoders. *Lecture Notes in Computer Science*, 11748, 912-924. https://doi.org/10.1007/978-3-030-20521-8_74

Lubitz, S., & Ellinor, P. (2015). Next-generation sequencing for the diagnosis of cardiac arrhythmia syndromes. *Heart Rhythm*, 12(5), 1062-1070. <https://doi.org/10.1016/j.hrthm.2015.01.011>

Luthra, R., Chen, H., Roy-Chowdhuri, S., & Singh, R. (2015). Next-generation sequencing in clinical molecular diagnostics of cancer: Advantages and challenges. *Cancers*, 7(4), 2023-2036. <https://doi.org/10.3390/cancers7040874>

Lü, N., Zhang, Y., Yang, C., Yang, J., Ren, W., Zhong, X., & Yang, X. (2022). Complete mitochondrial genome sequence and

comparative analysis of the cultivated yellow nutsedge. *The Plant Genome*, 15(3). <https://doi.org/10.1002/tpg2.20239>

Magdaleno-Moncayo, D., Lopez, H., & Hornedo, J. (2017). The complete mitochondrial genome of the green microalgae *Dunaliella salina* strain SQ. *Mitochondrial DNA Part B*, 2(1), 311-312. <https://doi.org/10.1080/23802359.2017.1331331>

Mardis, E. R. (2008). Next-generation DNA sequencing. *Nature Reviews Genetics*, 9(7), 379-388. <https://doi.org/10.1038/nrg2341>

Mittal, S., & Pathak, B. (2022). A step toward amino acid-labeled DNA sequencing: Boosting transmission sensitivity of graphene nanogap. *ACS Applied Bio Materials*, 6(1), 218-227. <https://doi.org/10.1021/acsabm.2c00851>

Morash, M., Mitchell, H., Beltran, H., Elemento, O., & Pathak, J. (2018). The role of next-generation sequencing in precision medicine: A review of outcomes in oncology. *Journal of Personalized Medicine*, 8(3), 30. <https://doi.org/10.3390/jpm8030030>

Nagahashi, M., Shimada, Y., Ichikawa, H., Kameyama, H., Takabe, K., Okuda, S., ... & Wakai, T. (2018). Next-generation sequencing-based gene panel tests for the management of solid tumors. *Cancer Science*, 110(1), 6-15. <https://doi.org/10.1111/cas.13837>

Nakagaki, T., Tamura, M., Kobashi, K., Omori, A., Koyama, R., Idogawa, M., ... & Sasaki, Y. (2018). Targeted next-generation sequencing of 50 cancer-related genes in Japanese patients with oral

squamous cell carcinoma. *Tumor Biology*, 40(9).
<https://doi.org/10.1177/1010428318800180>

Nikas, I., Mountzios, G., Sydney, G., Ioakim, K., Won, J., & Papageorgis, P. (2022). Evaluating pancreatic and biliary neoplasms with small biopsy-based next-generation sequencing (NGS): Doing more with less. *Cancers*, 14(2), 397.
<https://doi.org/10.3390/cancers14020397>

Niu, Y., Gao, C., & Liu, J. (2022). Complete mitochondrial genomes of three *Mangifera* species, their genomic structure and gene transfer from chloroplast genomes. *BMC Genomics*, 23(1).
<https://doi.org/10.1186/s12864-022-08383-1>

Odahara, M., Mori, M., & Numata, K. (2023). Ongoing gene transfer from chloroplasts to mitochondria in tobacco.
<https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-3066242/v1>

Ojha, A. (2024). Gap-app: A sex-distinct AI-based predictor for pancreatic ductal adenocarcinoma survival as a web application open to patients and physicians. *bioRxiv*.
<https://doi.org/10.1101/2024.06.04.597246>

Othman, N., Abel, J., Haris, H., Ilham-Norhakim, M., Munian, K., Ramli, F., & Abdul-Latiff, M. (2023). DNA barcoding of commercial fish sold in Muar Fish Market, Johor. *Journal of Sustainable Natural Resources*, 3(2).
<https://doi.org/10.30880/jsunr.2022.03.02.007>

Pagnamenta, A., Wei, W., Rahman, S., & Chinnery, P. (2021). Biparental inheritance of mitochondrial DNA revisited.

Nature Reviews Genetics, 22(8), 477-478.
<https://doi.org/10.1038/s41576-021-00380-6>

Palanivelu, P. (2023). Polymerase and proofreading exonuclease domains of the nuclear-encoded DNA-dependent RNA polymerase of plant mitochondria. *World Journal of Advanced Research and Reviews*, 19(2), 989-1004.
<https://doi.org/10.30574/wjarr.2023.19.2.1670>

Park, S., Grewe, F., Zhu, A., Ruhlman, T., Sabir, J., Mower, J., & Jansen, R. (2015). Dynamic evolution of geranium mitochondrial genomes through multiple horizontal and intracellular gene transfers. *New Phytologist*, 208(2), 570-583.
<https://doi.org/10.1111/nph.13467>

Pathak, N., I, A., Kulkarni, P., & Patel, A. (2023). A survey on unmet need for uniform next-generation sequencing reporting in India. *Indian Journal of Medical and Paediatric Oncology*, 45(2), 142-146. <https://doi.org/10.1055/s-0043-1770936>

Rabbani, B., Nakaoka, H., Akhondzadeh, S., Tekin, M., & Mahdiah, N. (2016). Next-generation sequencing: Implications in personalized medicine and pharmacogenomics. *Molecular Biosystems*, 12(6), 1818-1830. <https://doi.org/10.1039/c6mb00115g>

Rahman, M., Tumpa, A., Rahaman, M., Islam, F., Sutradhar, P., Ahmed, M., ... & Ashraf, G. (2023). Emerging promise of therapeutic approaches targeting mitochondria in neurodegenerative disorders. *Current Neuroparmacology*, 21(5), 1081-1099.
<https://doi.org/10.2174/1570159x21666230316150559>

Rango, M., & Bresolin, N. (2018). Brain mitochondria, aging, and Parkinson's disease. *Genes*, 9(5), 250. <https://doi.org/10.3390/genes9050250>

Rebollar-Vega, R., Arriaga-Canon, C., & Rosa-Velázquez, I. (2018). Clinical applications of next-generation sequencing. *Revista De Investigación Clínica*, 70(4). <https://doi.org/10.24875/ric.18002544>

Reddy, P., Ocampo, A., Suzuki, K., Luo, J., Bacman, S., Williams, S., ... & Belmonte, J. (2015). Selective elimination of mitochondrial mutations in the germline by genome editing. *Cell*, 161(3), 459-469. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.03.051>

Rey, V., & Tamargo-Gómez, I. (2023). From kinases to diseases: Investigating the role of AMPK in human pathologies. *Kinases and Phosphatases*, 1(3), 181-205. <https://doi.org/10.3390/kinasesphosphatases1030012>

Ridge, P., Wadsworth, M., Miller, J., Saykin, A., Green, R., & Kauwe, J. (2018). Assembly of 809 whole mitochondrial genomes with clinical, imaging, and fluid biomarker phenotyping. *Alzheimer's & Dementia*, 14(4), 514-519. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2017.11.013>

Sahoo, L., Bit, A., Meher, P., Murmu, K., Sundaray, J., & Das, P. (2017). Rapid recovery of complete mitogenome of Indian major carp, *Catla catla* from low depth paired end illumina sequencing. *Mitochondrial DNA Part B*, 2(1), 155-156. <https://doi.org/10.1080/23802359.2017.1298413>

Santibanez-Koref, M., Griffin, H., Turnbull, D., Chinnery, P., Herbert, M., & Hudson, G. (2019). Assessing mitochondrial heteroplasmy using next generation sequencing: A note of caution. *Mitochondrion*, 46, 302-306. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2018.08.003>

Sarker, K., Uddin, M., Islam, M., Das, T., Shakur, R., & Bayzid, M. (2019). Emed-DNA: An in silico operating system for clinical medical data storage within the human genome. *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/814830>

Sawicki, J. (2024). Nanopore sequencing technology as an emerging tool for diversity studies of plant organellar genomes. *Diversity*, 16(3), 173. <https://doi.org/10.3390/d16030173>

Saxena, N., Taneja, N., Shome, P., & Mani, S. (2018). Mitochondrial donation: A boon or curse for the treatment of incurable mitochondrial diseases. *Journal of Human Reproductive Sciences*, 11(1), 3. https://doi.org/10.4103/jhrs.jhrs_54_17

Sayitoğlu, M. (2016). Clinical interpretation of genomic variations. *Turkish Journal of Hematology*, 33(3), 172-179. <https://doi.org/10.4274/tjh.2016.0149>

Schmidt, B., & Hildebrandt, A. (2021). Deep learning in next-generation sequencing. *Drug Discovery Today*, 26(1), 173-180. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2020.10.002>

Shin, J., Jeon, J., Jung, D., Kim, K., Kim, Y., Jeong, D., ... & Yoon, J. (2022). PhengenVar: A user-friendly genetic variant detection and visualization tool for precision medicine. *Journal of*

Personalized Medicine, 12(6), 959.
<https://doi.org/10.3390/jpm12060959>

Shin, S., & Park, J. (2016). Characterization of sequence-specific errors in various next-generation sequencing systems. *Molecular Biosystems*, 12(3), 914-922.
<https://doi.org/10.1039/c5mb00750j>

Stewart, D., Robicheau, B., Youssef, N., Garrido-Ramos, M., Chase, E., & Breton, S. (2021). Expanding the search for sperm transmission elements in the mitochondrial genomes of bivalve mollusks. *Genes*, 12(8), 1211.
<https://doi.org/10.3390/genes12081211>

Sun, Z., Wu, Y., Fan, P., Guo, D., Zhang, S., & Song, C. (2023). Assembly and analysis of the mitochondrial genome of *Prunella vulgaris*. *Frontiers in Plant Science*, 14.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1237822>

Sweet, A., Johnson, K., & Cameron, S. (2019). Mitochondrial genomes of *Columbicola* feather lice are highly fragmented, indicating repeated evolution of minicircle-type genomes in parasitic lice. <https://doi.org/10.1101/668178>

Tang, F., Chang, W., Tsai, E., Tsai, M., & Kuo, P. (2019). Investigating novel genes potentially involved in endometrial adenocarcinoma using next-generation sequencing and bioinformatic approaches. *International Journal of Medical Sciences*, 16(10), 1338-1348. <https://doi.org/10.7150/ijms.38219>

Tezel, A., Çetinkaya, Ö., Güzeltepe, B., & Kiliç, N. (2016). Genetic identification with heteroplasmic variations in maternally

related individuals in forensic cases. *Turkish Journal of Biology*, 40, 694-698. <https://doi.org/10.3906/biy-1506-62>

Th, A., & Saeed, M. (2015). Next generation sequencing technologies: A short review. *Journal of Next Generation Sequencing & Applications*, 01(S1). <https://doi.org/10.4172/2469-9853.s1-006>

Uliano-Silva, M., Ferreira, J., Krashennnikova, K., Mieszkowska, N., Hall, N., Holland, P., ... & McCarthy, S. (2023). MitoHiFi: A python pipeline for mitochondrial genome assembly from PacBio high fidelity reads. *BMC Bioinformatics*, 24(1). <https://doi.org/10.1186/s12859-023-05385-y> 29.

Vega-García, N., Benito, R., Esperanza-Cebollada, E., Llop, M., Robledo, C., Vicente-Garcés, C., & Camós, M. (2020). Helpful criteria when implementing NGS panels in childhood lymphoblastic leukemia. *Journal of Personalized Medicine*, 10(4), 244. <https://doi.org/10.3390/jpm10040244>

Vestergaard, L., Oliveira, D., Høgdall, C., & Høgdall, E. (2021). Next generation sequencing technology in the clinic and its challenges. *Cancers*, 13(8), 1751. <https://doi.org/10.3390/cancers13081751>

Walsh, D., Bernard, D., Pangilinan, F., Esposito, M., Harold, D., Parle-McDermott, A., & Brody, L. (2022). Mito-SIPE is a sequence-independent and PCR-free mtDNA enrichment method for accurate ultra-deep mitochondrial sequencing. *Communications Biology*, 5(1). <https://doi.org/10.1038/s42003-022-04182-2>

Walsh, D., Bernard, D., Pangilinan, F., Esposito, M., Harold, D., Parle-McDermott, A., & Brody, L. (2022). Mito-SIPE is a sequence-independent and PCR-free mtDNA enrichment method for accurate ultra-deep mitochondrial sequencing. *Communications Biology*, 5(1). <https://doi.org/10.1038/s42003-022-04182-2>

Walsh, D., Bernard, D., Pangilinan, F., Esposito, M., Harold, D., Parle-McDermott, A., & Brody, L. (2022). Mito-SIPE: A sequence-independent, PCR-free mitochondrial DNA enrichment method for ultra-deep sequencing that minimizes amplification and alignment artifacts for the analysis of mitochondrial heteroplasmy/variation. <https://doi.org/10.1101/2022.10.15.512094>

Walt, D., Steenkamp, E., Wingfield, B., & Wilken, P. (2023). Evidence of biparental mitochondrial inheritance from self-fertile crosses between closely related species of *Ceratocystis*. *Journal of Fungi*, 9(6), 686. <https://doi.org/10.3390/jof9060686>

Wensel, C., Pluznick, J., Salzberg, S., & Sears, C. (2022). Next-generation sequencing: Insights to advance clinical investigations of the microbiome. *Journal of Clinical Investigation*, 132(7). <https://doi.org/10.1172/jci154944>

Wu, Z., Waneka, G., Broz, A., King, C., & Sloan, D. (2020). *MSH1* is required for maintenance of the low mutation rates in plant mitochondrial and plastid genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(28), 16448-16455. <https://doi.org/10.1073/pnas.2001998117>

Xu, Y., Zhe, L., Tang, C., Tang, Y., Cai, Y., Huang, Z., & Gao, Q. (2018). A new massively parallel nanoball sequencing platform for whole exome research. <https://doi.org/10.1101/451641>

Yang, J., Yang, X., Su, T., Hu, Z., & Zhang, M. (2021). The development of mitochondrial gene editing tools and their possible roles in crop improvement for future agriculture. *Genetics & Genomics Next*, 3(1). <https://doi.org/10.1002/ggn2.202100019> 30.

Yang, W., Hsu, F., & Yang, P. (2020). Precision radiotherapy for non-small cell lung cancer. *Journal of Biomedical Science*, 27(1). <https://doi.org/10.1186/s12929-020-00676-5>

Yang, X. (2021). Editorial: Next generation sequencing (NGS) for rare diseases diagnosis. *Frontiers in Genetics*, 12. <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.808042>

Yoon, H., & Lee, S. (2021). Integration of genomic profiling and organoid development in precision oncology. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(1), 216. <https://doi.org/10.3390/ijms23010216>

Zardoya, R. (2020). Faculty opinions recommendation of repeats of unusual size in plant mitochondrial genomes: Identification, incidence and evolution. <https://doi.org/10.3410/f.734662539.793573137>

Zascavage, R., Hall, C., Thorson, K., Mahmoud, M., Sedlazeck, F., & Planz, J. (2019). Approaches to whole mitochondrial genome sequencing on the Oxford Nanopore MinION. *Current Protocols in Human Genetics*, 104(1). <https://doi.org/10.1002/cphg.94>

Zhang, D., Xing, Y., Xu, L., Zhao, R., Yang, Y., Zhang, T., & Kang, T. (2020). Comparative analysis of the mitochondrial

genome sequences of two medicinal plants: *Arctium lappa* and *A. tomentosum*. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-28443/v1>

