
BİYOLOJİ

Editör: Dr. Öğr. Üyesi Fatma Gonca KOÇANCI
Doç. Dr. Ekrem BÖLÜKBAŞI

BİYOLOJİ

Editör

Dr. Öğr. Üyesi Fatma Gonca KOÇANCI

Doç. Dr. Ekrem BÖLÜKBAŞI

yaz
yayınları

2024

BİYOLOJİ

Editör: Dr. Öğr. Üyesi Fatma Gonca KOÇANCI

Doç. Dr. Ekrem BÖLÜKBAŞI

© YAZ Yayınları

Bu kitabın her türlü yayın hakkı Yaz Yayınları'na aittir, tüm hakları saklıdır. Kitabın tamamı ya da bir kısmı 5846 sayılı Kanun'un hükümlerine göre, kitabı yayınlayan firmanın önceden izni alınmaksızın elektronik, mekanik, fotokopi ya da herhangi bir kayıt sistemiyle çoğaltılamaz, yayınlanamaz, depolanamaz.

E_ISBN 978-625-6104-44-0

Ekim 2024 – Afyonkarahisar

Dizgi/Mizanpaj: YAZ Yayınları

Kapak Tasarım: YAZ Yayınları

YAZ Yayınları. Yayıncı Sertifika No: 73086

M.İhtisas OSB Mah. 4A Cad. No:3/3
İscehisar/AFYONKARAHİSAR

www.yazyayinlari.com

yazyayinlari@gmail.com

info@yazyayinlari.com

İÇİNDEKİLER

Alzheimer Hastalığında DNA Metilasyonunun Önemi: Patogenezdaki Rolü	1
--	----------

Fatma Gonca KOÇANCI

The Functions of Nucleolar Channel Systems (NCS) in the Implantation Process: A Molecular and Cellular Perspective	43
---	-----------

Tiinçe AKSAK

Likenleşmiş Mantarlar (Likenler)	55
---	-----------

Merve YİĞİT, Mehmet Gökhan HALICI

Bitki Gelişiminde Çevresel Faktörlere Karşı Nanopartiküllerin Kullanımı	70
--	-----------

Ekrem BÖLÜKBAŞI, Mustafa Sami ATA

Türkiye’de Bal Poleni Araştırmaları: Tespit Edilen Polen Taksonları.....	90
---	-----------

*Salih AKPINAR, Gül Esmâ AKDOĞAN KARADAĞ,
Mustafa Kemal ALTUNOĞLU*

Hücre Kültürü Çalışmalarında Kontaminasyonun Belirlenmesi ve Önlenmesi.....	112
--	------------

Harika Eylül ESMER DURUEL

Leaf Devour Pests Of Mulberry (Morus spp.).....	
--	--

*Aabid Ahmad BHAT, Lubna ALTAF, Umar FAROOQ,
Hakan BOZDOĞAN*

"Bu kitapta yer alan bölümlerde kullanılan kaynakların, görüşlerin, bulguların, sonuçların, tablo, şekil, resim ve her türlü içeriğin sorumluluğu yazar veya yazarlarına ait olup ulusal ve uluslararası telif haklarına konu olabilecek mali ve hukuki sorumluluk da yazarlara aittir."

ALZHEİMER HASTALIĞINDA DNA METİLASYONUNUN ÖNEMİ: PATOGENEZDEKİ ROLÜ

Fatma Gonca KOÇANCI¹

1. GİRİŞ

Alzheimer hastalığı, nörodejeneratif bir bozukluk olup, genetik ve epigenetik faktörlerin karmaşık bir etkileşimi sonucunda ortaya çıkmaktadır. Bu kitap bölümü, Alzheimer hastalığı ile hastalığın patogenezinde önemli bir epigenetik düzenleyici olan DNA metilasyonu arasındaki bağlantıyı ele almaktadır.

Alzheimer hastalığı, kognitif gerileme, hafıza kaybı ve nöronal kayıpların kompleks bir kombinasyonu ile karakterizedir. Bu kompleks tablo, genetik faktörlerin yanı sıra epigenetik düzenlemelerin de katkısıyla şekillenir. Son yıllarda, DNA metilasyonunun, özellikle de gen ekspresyonunun düzenlenmesinde önemli rol oynayan bir epigenetik mekanizma olarak, Alzheimer hastalığının anlaşılmasında merkezi bir konumda olduğu anlaşılmıştır.

DNA metilasyonu, DNA molekülündeki sitozin bazlarının metil grupları ile modifikasyonunu içeren bir süreçtir. Bu süreç, gen ekspresyonunun düzenlenmesi, hücre farklılaşması ve genomik istikrarın sağlanması gibi temel hücresel olaylara katkıda bulunur. Alzheimer hastalığı bağlamında, DNA

¹ Dr. Öğr. Üyesi, Alanya Alaaddin Keykubat Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Tıbbi Hizmetler ve Teknikler Bölümü, Antalya, Türkiye.
email:gonca.kocanci@alanya.edu.tr ORCID:0000-0002-7248-7933

metilasyonunun hastalık riski, progresyonu ve klinik özellikleri üzerinde belirleyici bir etkisi olduğu görülmektedir.

Bu kitap bölümünde, öncelikle Alzheimer hastalığının tanımı, epidemiyolojisi ve patofizyolojisi ve DNA metilasyonu hakkında genel bilgi sağlanmakta, ardından, Alzheimer hastalığında DNA metilasyonunun spesifik yönlerine odaklanılarak, bu epigenetik mekanizmanın hastalık patogenezindeki rolü detaylandırılmaktadır. Ayrıca, bu alandaki güncel araştırmaların, potansiyel tedavi stratejilerinin ve gelecekteki yönelimlerin öne çıkan yönleri vurgulanmıştır. Bu bilgilerin bir araya getirilmesi, Alzheimer hastalığının anlaşılmasında ve gelecekteki tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesinde temel bir dayanak noktası sağlayacaktır.

2. ALZHEİMER HASTALIĞI: TANIMI, EPİDEMİYOLOJİSİ VE PATOFİZYOLOJİSİ

Alzheimer, ilk olarak 1906 yılında Alois Alzheimer tarafından tanımlanmış ve temel olarak, beyindeki sinir hücrelerinin zamanla dejenere olmasını ve beyin dokusundaki anormal protein birikimlerine bağlı olarak nöronal fonksiyon kaybını temsil eden bir hastalıktır. Hastalığın belirgin özellikleri arasında bilişsel gerileme, hafıza kaybı, dil bozuklukları ve kişilik değişiklikleri bulunur. Dünya genelinde özellikle 65 yaş ve üzerindeki bireyler arasında giderek artan bir sağlık sorunu olarak karşımıza çıkan Alzheimer hastalığı, nüfusun yaşlanmasıyla birlikte sağlık sistemleri ve toplumlar üzerinde önemli bir yük oluşturmaktadır.

Alzheimer hastalığının patogenezinin dair çeşitli hipotezler ortaya konulmuştur. Bunlar arasında amiloid kaskad hipotezi (De Strooper & Karran, 2016; Hardy & Higgins, 1992; Herrup, 2015), tau protein hipotezi (Eftekharzadeh vd., 2018; Gibbons, Lee, & Trojanowski, 2019; Wegmann vd., 2019),

kolinerjik hipotez (Bartus, Dean, Beer, & Lippa, 1982), lipid metabolizma bozukluğu hipotezi (Sparks vd., 1994), nöroinflamasyon hipotezi (Zhou vd., 2003) ve oksidatif stres hipotezi (Farr vd., 2014) yer almaktadır.

Amiloid kaskad hipotezi, Alzheimer hastalığının temelinde sinir hücrelerinde amiloid beta ($A\beta$) adlı proteinin birikimi ve sonrasında bir dizi olayın tetiklenmesiyle ilgilidir. Bu hipotez, 1991 yılında Hardy ve Higgins tarafından önerilmiştir (Hardy & Higgins, 1992). $A\beta$ proteini, normalde hücre zarının bir parçası olan amiloid öncü proteinin (APP) anormal bir şekilde parçalanması sonucu oluşur. Bu durum, $A\beta$ proteini birikimlerinin oluşmasına ve özellikle plak şeklinde beyin dokusunda depolanmasına neden olur. Amiloid kaskad hipotezine göre, bu $A\beta$ birikimi, bir dizi patolojik olayı başlatarak nöronal dejenerasyona yol açar. İlk olarak, $A\beta$ oligomerleri, sinir hücre zarına zarar verir ve bu da nöronların işlevini bozar. Ardından, tau proteininin hiperfosforilasyonu başlar, bu da nörofibriller yumakların oluşumuyla sonuçlanır. Bu patolojik değişiklikler, nöronal kayıplar ve sinir hücrelerinin ölümüyle sonuçlanarak Alzheimer hastalığına katkıda bulunur.

Tau protein hipotezi olarak bilinen ve normalde nöronlarda mikrotübüllere bağlanarak hücresel iskelet stabilitesini sağlayan tau'nun anormal hiperfosforilasyonu sonucu mikrotübüllere bağlanma yeteneğini kaybetmesinin ve nöronlar içinde fibriller halinde anormal bir şekilde birikmesinin Alzheimer hastalığındaki nöronal dejenerasyona katkıda bulunduğu dair görüş 1991'de Iqbal ve diğerleri tarafından öne sürülmüştür (Iqbal vd., 1986).

Alzheimer hastalığının gelişiminde etkili olan diğer faktörlerden biri kolinerjik hipotezde öne sürülen nörotransmitter dengesizliklerdir (Reisberg vd., 2003). Nörotransmitterler, sinir hücreleri arasında iletişimi sağlayan kimyasal bileşiklerdir.

Özellikle, asetilkolin ve glutamat, bu iletişim sürecinde kilit roller oynayan nörotransmitterlerdir. Asetilkolin, öğrenme, hafıza ve genel bilişsel fonksiyonların düzenlenmesinde önemli rol oynayan bir nörotransmitterdir. Alzheimer hastalığında, beyindeki asetilkolin seviyelerinde azalmalar gözlemlenir. Bu azalmalar, sinir hücrelerinin iletişimde bozulmalara ve bilişsel fonksiyonlarda azalmalara neden olabilir (Chen, Huang, Yang, & Hong, 2022). Glutamat ise bir diğer önemli nörotransmitterdir ve sinir hücreleri arasında uyarı iletimini sağlar. Ancak, Alzheimer hastalığı durumunda, glutamat düzenlemelerinde bozukluklar ortaya çıkabilir. Bu durum, sinir hücrelerine zarar verebilecek aşırı glutamat salınımına veya düzensiz glutamat reseptör aktivitesine yol açabilir (Bukke vd., 2020).

Lipid metabolizma bozuklu da Alzheimer hastalığı ile ilişkilendirilen bir diğer hipotezdir. Bu hipotez, beyinde özellikle hücre zar ve membranlarda meydana gelen anormal lipid dengesizlikleri, lipid iletişimi ve sinyalleme üzerindeki etkileri içeren lipid metabolizmasıyla ilgili anormalliklerin hastalığın gelişimine katkıda bulunduğunu öne sürmektedir. Hücre zarlarının yapısındaki bozulmalar, sinir hücreleri arasındaki iletişimi etkileyebilir ve lipidlerin hücre zarı sinyalleme rollerinde oynadığı rolde anormalliklere yol açabilir. Ayrıca, lipid metabolizma bozukluğunun amiloid beta birikimini etkileyebileceği düşünülmektedir (Cutler vd., 2004).

Beyindeki inflamatuvar yanıtın nöronal hasarın bir parçası olduğu ve hastalığın ilerlemesine katkıda bulunduğu da düşünülmektedir. Nöroinflamasyon, özellikle mikroglia adı verilen bağışıklık sistemi hücrelerinin aktivasyonu yoluyla ortaya çıkar. Bu hücreler, beyin dokusundaki hasarlı hücreleri temizlemeye ve enfeksiyonla mücadele etmeye yönelik görevlere sahiptir. Ancak, uzun süreli ve kronik bir şekilde devam eden inflamasyon, nörodejeneratif hastalıkların, özellikle Alzheimer hastalığının patogenezinde rol oynayabilir (Heneka vd., 2015).

Alzheimer hastalığı ile nöroinflamasyon arasındaki ilişki, mikrogliya hücrelerinin anormal bir şekilde aktivasyonu ile başlar. Aktive olan mikrogliya, sitokinler ve diğer inflamatuvar mediyatörleri salgılar. Bu inflamatuvar yanıt, nöronal hasarı artırabilir ve A β birikimiyle ilişkilidir. Aynı zamanda, nöroinflamasyonun Alzheimer hastalığının ilerleyişinde tau proteininin anormal bir şekilde fosforile olmasını tetikleyebileceği düşünülmektedir. Bu hipotezin öne çıkardığı önemli noktalardan biri, nöroinflamasyonun Alzheimer hastalığının sadece bir sonucu değil, aynı zamanda bir tetikleyici faktörü olabileceğidir (Kinney vd., 2018).

Alzheimer hastalığının patogeneze dair bir diğer hipotez ise oksidatif stres hipotezidir. Bu hipotez, hücrelerdeki oksidatif stresin, özellikle serbest radikallerin zararlı etkilerinin, Alzheimer hastalığının gelişimine katkıda bulunduğunu öne sürer. Oksidatif stres, serbest radikallerin hücrelerde normalden fazla üretilmesi veya antioksidan savunma sistemlerinin yetersiz olması sonucu ortaya çıkan bir durumu ifade eder. Bu hipoteze göre, serbest radikaller hücrelerde lipitler, proteinler ve nükleik asitlere zarar verebilir, bu da nöronal hasarın artmasına ve Alzheimer hastalığı patolojisine katkıda bulunabilir (Butterfield & Halliwell, 2019). Oksidatif stresin, özellikle A β ve tau proteinlerinin anormal bir şekilde birikimine katkıda bulunabileceği de düşünülmektedir (Tönnies & Trushina, 2017). Bunun yanı sıra, oksidatif stresin mitokondriyal hasara yol açarak enerji üretimini azaltabileceği ve nöronların enerji ihtiyacını karşılamakta zorlanmasına neden olabileceği düşünülmektedir. Bu durum da nöronal sağlığın bozulmasına ve Alzheimer hastalığının ilerlemesine katkıda bulunabilir (Reddy & Beal, 2008).

Son yıllarda, bu mekanizmalara ek olarak, epigenetik düzenlemelerin de Alzheimer hastalığının gelişiminde kritik rol oynayabileceği belirlenmiştir (Xiao, Liu, & Jiao, 2020). Epigenetik, gen ifadesinin düzenlenmesi ve kalıtsal özelliklerin

nesilden nesile geçişinde rol oynayan genetik olmayan değişiklikleri inceleyen bir bilim dalını ifade eder. Bu değişiklikler, DNA dizisinin kendisinde bir değişiklik olmaksızın, genlerin nasıl ifade edileceğini ve bu ifadenin nasıl düzenleneceğini belirleyen faktörleri içerir. Epigenetik düzenlemeler, çevresel faktörlerle etkileşim içinde olan ve gen ifadesini şekillendiren dinamik bir süreci temsil eder. Bu düzenlemeler, hücrel farklılaşma, hastalıkların gelişimi ve kalıtsal özelliklerin aktarımı gibi biyolojik süreçlerde önemli bir rol oynar (Portela & Esteller, 2010). Epigenetik düzenlemeler, DNA metilasyonu, histon modifikasyonları, kromatin yapısı ve kodlamayan RNA'lar gibi çeşitli mekanizmaları içerir. Epigenetik düzenlemeler üzerine yapılan çalışmalar daha çok modifiye edilmiş DNA bazı 5-metilsitozin (5-mC)'e yoğunlaşmış olsa da önemli epigenetik düzenleyiciler olarak tanımlanan metillenmiş sitozinin (5-mC) oksidasyonu ile 5-hidroksimetilsitozin (5-hmC), 5-formilsitozin (5-fC), 5-karboksisitozin (5-caC) ve adeninin (A) metilasyonu ile N6-metiladenin (6-mA) gibi ek bazı modifikasyonlarının yakın zamanda keşfedilmiş olması epigenomik çalışmalarına olan ilginin artmasına neden olmuştur (Klungland & Robertson, 2017).

Epigenetik mekanizmaların rolü ile ilgili araştırmalar ilk etapta onkolojik hastalıklara odaklanmış olsa da (Kanwal & Gupta, 2010), günümüzde daha çok farklı patolojilere, özellikle otoimmün ve nörodejeneratif hastalıklara yönelmiştir (Surace & Hedrich, 2019; Urduingio, Sanchez-Mut, & Esteller, 2009). Pek çok nörodejeneratif hastalıkta beyindeki gen ekspresyonunun değiştiği epigenomun düzensizliği rapor edilmiştir (MacArthur & Dawlaty, 2021; Singleton & Hardy, 2019; Younesian, Yousefi, Momeny, Ghaffari, & Bashash, 2022). Bu hastalıkların epigenetik düzenleme özelliklerinin belirlenmesi, gelişim mekanizmalarını anlamamıza yardımcı olabilir ve yeni etkili terapötik ilaçların geliştirilmesine katkıda bulunabilir.

Epigenetik düzenlemelerin Alzheimer hastalığının patogeneziindeki rolünün anlaşılması, hastalığın daha etkili tedavi stratejileri ve önleyici yaklaşımlarının geliştirilmesi açısından kritik bir öneme sahiptir. Bu kitap bölümünde, gen ekspresyonunun epigenetik düzenlemesinin önemli bir bileşeni olan DNA metilasyonuna ve bu mekanizmanın Alzheimer hastalığı ile ilişkisine odaklanılmıştır.

3. DNA METİLAYONU

DNA metilasyonu, genetik materyal olan DNA molekülüne metil gruplarının (CH_3) eklenmesi sürecini ifade eder. Metil grupları, DNA'nın fiziksel yapısında bir değişikliğe neden olmasa da, bulundukları bölgedeki genin okunabilirliğini etkiler. DNA metilasyonu ve demetilasyonu, gen ekspresyonunun epigenetik düzenlenmesinden sorumlu olan çeşitli moleküler faktörler arasındaki karmaşık etkileşimleri içerir. Bu etkileşimler arasında, histon proteinlerinin transkripsiyon sonrası modifikasyonlarını gerçekleştiren enzimler, kodlamayan RNA'lar ve kromatinin yeniden modellenmesinden sorumlu faktörler bulunmaktadır (Gallusci, Hodgman, Teyssier, & Seymour, 2016; Pikaard & Mittelsten Scheid, 2014). DNA metilasyonu, genomik bölgelerin düzenleyici proteinlere veya protein komplekslerine erişilebilirliğini etkileyerek kromatin yapısını değiştirir ve gen transkripsiyon hızını düzenler. Bu, genellikle promotör ve güçlendirici bölgelerde bulunan metilasyonun gen baskılanmasıyla ilişkilendirilmesiyle karakterize edilir (Charlet vd., 2016). Ancak, gen gövdesi metilasyonunun, genlerin transkripsiyonel aktivitesini hem baskılayabilir hem de artırabilir olduğu tespit edilmiştir (Buck-Koehntop & Defossez, 2013; Spruijt & Vermeulen, 2014).

Bu modifikasyon genellikle sitozin bazlarının metil gruplarıyla modifiye edilmesiyle gerçekleşir (Kumar,

Chinnusamy, & Mohapatra, 2018). Sitozin metilasyonu, genetik bilginin düzenlenmesinde önemli bir rol oynayan, iyi anlaşılmış tek DNA modifikasyon mekanizmasıdır (Kumar vd., 2018). DNA metilasyon süreci, öncelikle hücre tarafından metilasyonun gerçekleşeceği belirli sitelerin tanımlanması ile başlar. Bu siteler genellikle sitozin-guanin çifti arasındaki CpG dinükleotidleridir (Gershman vd., 2022). DNA’da metilasyonun gerçekleşebilmesi için metil gruplarının DNA metiltransferaz enzimleri ile yer değiştirmesi sağlanır. DNA metiltransferazlar, S-adenozil metiyonin (SAM) gibi metil gruplarını taşıyan donör moleküllerden metil gruplarını alarak hedef CpG dinükleotidlerindeki sitozin bazının 5. karbonuna transfer eder. Bu ekleme 5-metilsitosini oluşturur (5mC). Bu transfer reaksiyonu sırasında, SAM molekülü demetillenerek S-adenozil homosistein (SAH) adlı bir moleküle dönüşür (Kiselev, Kulakova, Boyko, & Favorova, 2021; Moore, Le, & Fan, 2013).

DNA metilasyonu, genel olarak dokularda gen ekspresyonunun düzenlenmesinde kritik bir rol oynar ve bu mekanizmanın beyin dokusundaki özel durumu, sinir sisteminin karmaşıklığını ve hassaslığını yansıtarak nörolojik işlevler üzerinde belirleyici bir etkiye sahiptir. 5mC paternlerindeki anormal değişiklikler zihinsel engellilik, hareket bozuklukları ve büyüme anormallikleri gibi gelişimsel bozukluklara yol açabilir (Lister vd., 2013). İnsanlarda, merkezi sinir sisteminin büyümesinden ve gelişmesinden sorumlu olan belirli lokuslardaki 5mC seviyeleri doğumdan sonra önemli ölçüde artar ve nöronal farklılaşmaya katılır; bu süreç tüm yaşam boyunca da devam edebilir (Fan vd., 2005; Siegmund vd., 2007). Ayrıca, beyin gelişimi ve nöral farklılaşmada rol oynayan bazı genlerin promotörlerindeki 5mC değişikliklerinin, nöral farklılaşmayı etkileyebildiği bildirilmiştir (Santiago vd., 2020). Benzer şekilde, DNA metilasyonu sinir sisteminin işlevselliğini sağlamak, desteklemek ve düzenlemek için görev alan astrositlerin

farklılaşmasının ve olgunlaşmasının düzenlenmesinde rol oynar (He vd., 2020). Dolayısıyla, bu epigenetik düzenleme, hücrel farklılaşma, hücrel bellek ve genomik stabilite gibi temel süreçleri düzenleyen genetik bir anahtarın epigenetik kontrolünü temsil eder ve nöronal fonksiyonlarda, öğrenme ve hafıza süreçlerinde önemli rol oynar (Jones, 2012; Xie, Xie, Wei, Li, & Lin, 2023). Çalışmalar, belirli genomik bölgelerde DNA metilasyon değişikliklerinin yaşla ilişkili olarak meydana geldiğini göstermiştir. Belirli CpG bölgelerindeki 5mC'nin, yaşla birlikte önemli hipermetilasyon sergilediği kanıtlanmıştır (Bacalini vd., 2017; Cruickshanks vd., 2013; Fuke vd., 2004). Hafıza fonksiyonlarıyla ilişkilendirilen genlerdeki anormal DNA metilasyon düzenlemelerinin Alzheimer hastalığının gelişimine katkıda bulunabileceğine dair bulgular (Jose Vicente Sanchez-Mut vd., 2014), DNA metilasyonunun Alzheimer hastalığı ve yaşlanma arasındaki kompleks ilişkide önemli bir rol aldığının kanıtıdır. Ayrıca, Alzheimer hastalığı patolojisi ile ilişkilendirilen pek çok beyin lokasyonunda DNA metilasyonu belirlenmiş olup, elde edilen sonuçlar, DNA metilasyonunun bozulmasının Alzheimer hastalığının patolojik sürecine katıldığını daha da doğrulamaktadır (Yu vd., 2015). Bu bulgular ışığında Alzheimer hastalığı riski taşıyan bireyleri belirlemek için DNA metilasyonunun kullanışlı bir belirteç olabileceği ortaya konulmuştur (Di Francesco vd., 2015; Kobayashi vd., 2016b, 2016a; Sliwinska vd., 2017).

4. DNA METİLAYONUNUN ALZHEİMER HASTALIĞI İLE İLİŞKİSİ

Epigenetik düzenlemelerin, Alzheimer hastalığının heterojen klinik belirtileri ve bireyler arasındaki farklılıkları açıklamada potansiyel bir rolü olduğu öne sürülmüştür (Jose V. Sanchez-Mut & Gräff, 2015). Bu, hastalığın daha

bireyselleştirilmiş tedavi stratejileri geliştirmek için anlaşılması gereken karmaşıklığını vurgulamaktadır. Bu bağlamda, Alzheimer hastalığının altında yatan epigenetik düzenlemelerin, özellikle DNA metilasyonunun, hastalığın mekanizmalarını anlamak ve potansiyel tedavi hedefleri belirlemek için devam eden araştırmalarda kilit bir odak noktası olması kaçınılmazdır. Bu alandaki derinlemesine çalışmalar, Alzheimer hastalığının kökenlerini ve ilerleyişini anlamada önemli bir ilerleme sağlayabilir.

Alzheimer hastalığında, özellikle genetik yatkınlık ve çevresel faktörlerin etkileşimiyle ilişkilendirilen DNA metilasyonunun, hastalığın başlangıcından ilerleyişine kadar çeşitli aşamalarda hem küresel DNA'da hem de genlere spesifik DNA'da değişiklik gösterdiği belirtilmiştir (Iwata vd., 2014).

4.1.Küresel DNA Metilasyonu

"Küresel DNA metilasyonu" terimi, bir organizmanın genel DNA moleküllerinin metil grupları ile modifiye edilme durumunu ifade eder. Şimdiye kadar, Alzheimer hastalığındaki DNA metilasyon değişikliklerini araştıran çalışmalar esas olarak insan postmortem beyin dokularında gene spesifik düzeyde yürütülmüş olsa da (Chouliaras vd., 2010), küresel DNA metilasyonu, genellikle büyük veri setlerini içermesi, gen spesifik metilasyon durumlarından daha kapsamlı bir analiz sağlaması, hastalığın farklı evrelerindeki ve farklı bireylerdeki değişiklikler hakkında bilgi verebilmesi ve Alzheimer hastalığı ile ilişkili olabilecek genel epigenetik değişikliklerin belirlenmesi açısından avantajlıdır. Ayrıca gene spesifik DNA metilasyonu üzerinde yapılan çalışmaların ölüm sonrası beyin örnekleri üzerinde olması, beyin dokusunun sınırlı mevcudiyeti ve bu çalışmaların Alzheimer hastalığına ait süreçlerin ancak nihai sonuçlarına dair bilgiler sunması da göz önüne alındığında hastaların periferik kan, plazma ve beyin omurilik sıvısı gibi daha ulaşılabilir

örneklerinde hastalıkla ilişkilendirilebilecek küresel DNA metilasyon belirteçlerinin korelasyonlarını incelemek, Alzheimer hastalığının erken teşhisi ve izlenmesi için potansiyel biyobelirteçleri tanımlamak açısından önemli olabilir (Di Francesco vd., 2015). Bu çalışmalar, hastalığın gelişimini anlamak ve etkili tedavi stratejileri geliştirmek adına geniş bir perspektif sunabilir.

Alzheimer hastalarının hipokampus dokularında genel DNA metilasyon ve hidroksimetilasyon düzeylerinin düşük olduğunu gösteren bulgular, Alzheimer hastalığının patofizyolojik süreçlerinde epigenetik değişikliklerin rol oynayabileceğini ve hipokampusun bu hastalıkta etkilendiği önerisini desteklemektedir (Chouliaras vd., 2013). Buna karşın Alzheimer hastalarının beyin dokularında genel DNA metilasyon ve hidroksimetilasyon düzeylerinin kontrol grubuyla karşılaştırıldığı bir çalışmada, gruplar arasında anlamlı bir farkın bulunmadığı kaydedilmiştir (Lashley vd., 2015). Bu bulgu, Alzheimer hastalığına özgü epigenetik değişikliklerin genel DNA metilasyonu ve hidroksimetilasyon düzeylerinde değil, belirli genler veya bölgelerde olabileceğini veya epigenetik değişikliklerin bu hastalıkta farklı bir şekilde meydana geldiğini öne sürmektedir (Lashley vd., 2015).

Alzheimer hastalığı açısından farklı klinik seyir gösteren (hasta olan ve olmayan) bir çift monozygot ikizde kortikal nöronlardaki epigenetik farklılıkları inceleyen bir çalışmada ikizler arasındaki epigenetik farklılıklar, hastalığın varlığında belirgin hale gelmiştir. Bu durum, Alzheimer hastalığı ile ilişkili genlerdeki epigenetik düzenlemelerin hastalığın gelişimi üzerinde potansiyel bir rol oynayabileceğini göstermektedir (Mastroeni, McKee, Grover, Rogers, & Coleman, 2009).

Alzheimer hastalarının periferik kan mononükleer hücrelerindeki DNA metilasyonunu inceleyen bir çalışmada bu

kişilerde genel olarak anormal DNA metilasyonu olduğu gösterilmiştir (Di Francesco vd., 2015). Ancak, Alzheimer hastalığı ile periferik kandaki DNA metilasyon farklılıklarına ilişkin kanıtlar yeterli değildir (Tannorella vd., 2015).

Küresel DNA metilasyonu açısından Alzheimer hastalarının beyinlerindeki çeşitli bölgelerde farklı eğilimlerin olduğunu gösteren çalışmalar vardır. Chouliaras ve ark. (2013) Alzheimer hastalarının hipokampus dokularında hasta olmayan bireylere göre genel olarak DNA metilasyonu ve hidroksimetilasyonunda istikrarlı bir azalmanın olduğunu göstermiştir. (Chouliaras vd., 2013). Mastroeni ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada da Alzheimer hastası bir kişinin Alzheimer hastası olmayan ikizine göre frontal korteksinde DNA metilasyonunda azalma olduğu bulunmuştur (Mastroeni vd., 2009). Bu bulgular, Alzheimer hastalığı ile ilişkilendirilen epigenetik değişikliklerin, özellikle bilişsel fonksiyonlarda ve hastalığın patogenezinde önemli bir rol oynayabileceğini öne sürmektedir. Buna karşın Alzheimer hastalarının beyinlerindeki çeşitli bölgelerde hasta olmayanlara göre daha yüksek düzeyde DNA metilasyonunun olduğunu gösteren çalışmalar da vardır: Bradley-Whitman ve ark. Alzheimer hastalarının hipokampuslarında Alzheimer hastası olmayanlara göre daha yüksek düzeyde DNA metilasyonu olduğunu kanıtlamıştır (Bradley-Whitman & Lovell, 2013). Coppieters ve ark. tarafından yapılmış olan çalışmalarda Alzheimer hastalarının frontal ve temporal korteksinde; Rao ve ark. tarafından yapılmış olan çalışmalarda ise Alzheimer hastalarının frontal korteksinde DNA metilasyonunun, bilişsel açıdan normal kontrollerle karşılaştırıldığında daha yüksek olduğu bulunmuştur (Coppieters vd., 2014; Rao, Keleshian, Klein, & Rapoport, 2012). Lashley ve ark. ise Alzheimer hastalarında ve hasta olmayan kontrollerinde entorhinal korteksindeki küresel DNA metilasyonunda anlamlı bir fark olmadığını kaydetmiştir (Lashley vd., 2015). Bu bulgular,

Alzheimer hastalığı ile ilişkilendirilen küresel DNA metilasyon değişiklikleri konusunda karmaşık ve çelişkili bir tabloyu ortaya koymaktadır. Farklı çalışmaların çeşitli beyin bölgelerinde küresel DNA metilasyonu açısından farklı yönelimlere işaret etmesi, Alzheimer hastalığındaki epigenetik değişikliklerin heterojen ve bölgesel özellikler taşıdığını göstermektedir. Ayrıca bu bulgular, Alzheimer hastalığının karmaşıklığını yansıtmakta olup, epigenetik değişikliklerin hastalığın farklı aşamalarında ve farklı beyin bölgelerinde nasıl rol oynadığını anlamak için daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulduğunun bir göstergesidir.

Küresel DNA metilasyonu açısından beyindeki çeşitli hücreler de farklı özellikler sergileyebilmektedir. Alzheimer hastası olan ve olmayan bireylerin karşılaştırıldığı bir çalışmada, hastaların astrositlerinde ve mikroglialarında DNA metilasyon seviyelerinin hasta olmayanlara göre düşük olduğu ancak, nöronlarda yükseldiği tespit edilmiştir (Coppeters vd., 2014). Phipps ve ark. özellikle piramidal nöronların, kontrol gruplarına kıyasla Alzheimer hastalarında azalmış DNA metilasyonuna sahip olduğunu, ancak kalretinin internöronları veya mikroglialarda bu durumun gözlemlenmediğini belirtmiştir (Phipps, Vickers, Taberlay, & Woodhouse, 2016). Öğrenme ve hafıza ile ilişkilendirilen hipokampus bölgelerinde glial hücrelerindeki DNA metilasyonunun önemli ölçüde farklı olduğu bulunmuştur (Chouliaras vd., 2013). Alzheimer hastalarının beyin örneklerindeki piramidal nöronlar ve astrositlerin DNA metilasyon durumlarında azalma olduğunu gösteren çalışmalar da vardır (Thangavel, Sahu, Van Hoesen, & Zaheer, 2009). Bu bulgular, DNA metilasyonunun hücre tipine özgü olarak farklılık gösterdiğini düşündürmektedir.

4.2. Gene Spesifik DNA Metilasyonu

“Gene spesifik DNA metilasyonu”, DNA molekülündeki belirli genlerin veya gen bölgelerinin metil grubu eklenerek veya

çıkarılarak modifiye edilmesini ifade eder. Bu metilasyon olayları, gen ekspresyonunu düzenleyebilir ve hücreler arasındaki farklılaşmayı, gelişimi ve genel biyolojik fonksiyonları etkileyebilir. Alzheimer hastalığı üzerindeki etkileri incelendiğinde, gen spesifik DNA metilasyonunun bir dizi moleküler mekanizma aracılığıyla bu hastalığın gelişimine katkıda bulunabileceği öne sürülmüştür (Semick vd., 2019). Örneğin, spesifik genlerin promotör bölgelerindeki anormal DNA metilasyonu, sinir hücrelerinin işlevselliğini etkileyebilir ve Alzheimer hastalığına katkıda bulunabilir. Ayrıca, DNA metilasyonunun, gen ekspresyonunu düzenleyerek ve hücresel işlevleri modüle ederek, Alzheimer hastalığının epigenetik kalıplarını etkileyen ana risk faktörlerinden biri olan yaşlanma sürecine katkıda bulunduğu belirlenmiştir (Vlaming & van Leeuwen, 2012). Özellikle, A β peptidi birikimi ile ilişkilendirilen genlerin metilasyon durumlarındaki artışın, Alzheimer patofizyolojisine katkıda bulunabileceği kaydedilmiştir (Sung, Choi, Ahn Jo, Oh, & Ahn, 2011). Bununla birlikte, tau proteininin modifikasyonu da gen spesifik DNA metilasyonu tarafından etkilenebilmekte, bu durum Alzheimer hastalığına özgü nöropatolojiyi tetikleyebilmektedir (Zimmer-Bensch & Zempel, 2021). İnflamasyon süreçlerinin kontrolünde de gen spesifik DNA metilasyonunun rol oynadığı ve bu mekanizmanın Alzheimer hastalığındaki beyin iltihabını etkileyebileceği tespit edilmiştir (Nicolia, Ciraci, vd., 2017). Ayrıca, sinir hücrelerindeki gen ekspresyonunu düzenleme yeteneği ile gen spesifik DNA metilasyonunun, Alzheimer hastalığının nöronal kayıplarına ve bilişsel fonksiyonlardaki azalmalara katkıda bulunabileceği üzerinde durulmuştur (Poon, Tse, & Lim, 2020).

Alzheimer hastalığının patogenezinde önemli bir rol oynayan A β plaklarının birikimi ile yakından ilişkili olarak bulunan ve geç başlangıçlı Alzheimer hastalığı ile en güçlü genetik risk faktörü olarak ilişkilendirilen Apolipoprotein E

(ApoE), özellikle kolesterol metabolizmasında rol oynayan bir lipit taşıyıcı proteindir. İnsanlarda, ApoE2, ApoE3 ve ApoE4 olmak üzere üç ana aleli içermekte olup, bu aleller arasındaki genetik varyasyonlar, geç başlangıçlı Alzheimer hastalığı ile ilişkilendirilmektedir. ApoE4 aleli, A β plaklarının birikimi ile ilişkilidir ve bu alelin taşıyıcıları, diğer alellere sahip bireylere kıyasla daha yüksek Alzheimer riskine sahip olabilir (Corder vd., 1993). Diğer yandan, ApoE2 alelinin Alzheimer hastalığı riskini azaltabileceği ve hastalık için koruyucu bir etkiye sahip olabileceği bildirilmiştir (Z. Li, Shue, Zhao, Shinohara, & Bu, 2020). ApoE3 aleli ise, genellikle nörodejeneratif hastalıklarla ilişkilendirilmemiştir (Poirier vd., 1993). Wang ve ark. postmortem beyin doku örneklerini kullanarak, Alzheimer hastalarında prefrontal kortekte türetilen APOE'nin promotör bölgesinin kontrollere kıyasla hipermetile olduğunu tespit etmiştir (Wang, Oelze, & Schumacher, 2008). Başka bir çalışmada ise Alzheimer hastaları ve kontrol gruplarındaki APOE'de DNA metilasyon profili açısından farklılık belirlenememiştir (Iwata vd., 2014). Fakat, aynı çalışmada normal işlevi, sinir hücreleri arasındaki iletişimi düzenlemek ve hücre zarının stabilitesini sağlamak olan ancak, anormal bir şekilde işlenmesi sonucunda A β peptidi oluşumuna katkı sağlayan Amiloid Prekürsör Protein (APP) genindeki anormal CpG metilasyonu ile APOE ϵ 4 negatif vakalar arasında bir ilişki olduğu belirlenmiştir (Iwata vd., 2014). Başka bir çalışmada ise, demanssız kontrol bireyleri ile Alzheimer hastalarının frontal korteks ve hipokampus bölgelerinde, APP'ye ek olarak, Presenilin 1 (PSEN1) (APP'nin kesilmesinden sorumlu olan gen) geninin DNA metilasyon durumları karşılaştırılmış, ancak gruplar arasında bu genlerin metilasyonları açısından anlamlı bir farklılık belirlenememiştir (Barrachina & Ferrer, 2009). Alzheimer hastalarında ve kontrol gruplarında gen spesifik DNA metilasyon durumlarının araştırıldığı başka bir çalışmada ise bu veriler ile çelişkili sonuçlar kaydedilmiştir: hasta kişilerde

APP ve hücrel sinyal iletimi, hücre çoğalması, hücre farklılaşması ve hücre ölümü gibi birçok biyolojik süreçte rol oynayan Glikojen Sentaz Kinaz 3 Beta (GSK3 β) genlerinin DNA metilasyon profillerinde hasta olmayanlara göre anlamlı farklılıklar belirlenmiştir. Aynı çalışmada APP'deki metilasyon değişikliklerinin hem nöronal hem de nöronal olmayan hücrelerde meydana geldiği, oysa GSK3 β 'nın nöronal olmayan hücrelerde anormal şekilde metillendiği ortaya konulmuştur (Iwata vd., 2014). APP'nin A β 'ya bölünmesinde rol oynayan iki önemli gen olan Presenilin Arttırıcı-2 (PEN-2) ve Nikastin (NCSTN)'in promoter hipometilasyonu hipokampus nöronlarında artan A β plak yükü ile ilişkilendirilmiştir (Lang vd., 2022). APP'yi parçalayan ve böylece A β üretimi üzerinde etkili olan β -sekretazı kodlayan gen olan BACE1'i hedefleyen DSCAML1 geninin güçlendiricisindeki belirgin hipometilasyon Alzheimerda nöronlar tarafından sergilenir (P. Li vd., 2019). Ayrıca, A β 'nın parçalanmasında önemli bir rol oynayan bir proteaz enzimini kodlayan Neprilysin (NEP) geninin artan metilasyonu, ekspresyonun azalmasıyla sonuçlanır, bu da muhtemelen Alzheimer hastalığındaki yüksek A β plak yükünün nedenidir (K. Nagata, Mano, Murayama, Saido, & Iwata, 2018). Geç başlangıçlı Alzheimer hastalığı için ApoE'den sonra ikinci en güçlü genetik risk faktörü olan Köprü Entegratörü 1 (BIN1)'in seviyelerinin A β yükü ile bağlantılı olduğu ve genellikle Alzheimer hastalarında diferansiyel olarak metillendiği belirlenmiştir (De Jager vd., 2014; Yu vd., 2015). BIN1, hücre içi membran yapılarını düzenleyerek ve sinir hücrelerinin işlevselliğini etkileyerek A β birikimine katkıda bulunabilen bir genidir (Perdigão, Barata, Burrinha, & Guimas Almeida, 2021). A β üretimiyle ilgili diğer genler olan sortilin-ilgili reseptör 1 (SORL1) ve ATP Bağlayıcı Kaset Alt Ailesi A Üyesi 7 (ABCA7)'nin Alzheimer hastalarının beyin dokularında hipermetile olduğu da tespit edilmiştir (Yu vd., 2015).

Her ne kadar A β , Alzheimer hastalığının patogeneğinde birincil tetikleyici olsa da, hiperfosforilasyona uğramış tau da Alzheimer hastalığı kaynaklı demansın derecesi ile ilişkilidir (Agadjanyan vd., 2017). Alzheimer hastalarının beyinlerindeki tau proteini ile ilişkili genlerdeki DNA metilasyonunun hastalığın patogeneğinde önemli rol oynadığı belirlenmiştir (Wei, Du, & Zhao, 2021). Tau proteininin anormal birikimi ve nöronal hasarı modüle etme potansiyeline sahip olabileceği bildirilen Sirtuin1 (SIRT1) geninin normal popülasyonla karşılaştırıldığında Alzheimer hastalarında önemli ölçüde daha yüksek hipermetilasyonu gösterilmiştir (Hou vd., 2013). Alzheimer hastalarının hipokampusunda Çift Özgüllüklü Fosfataz 22 (DUSP22) geninin promotör bölgesinde artan DNA metilasyonunun hastalık seyriyle korelasyon gösterdiği saptanmıştır. DUSP22 geninin hipermetilasyonunun tau fosforilasyon durumunu etkilediği bilinmektedir, bu nedenle Alzheimer hastalığının patogeneğinde yer alması muhtemel bir aday gendir (Jose Vicente Sanchez-Mut vd., 2014). Tau fosforilasyonu ile ilişkili bir diğer gen olan Tanıma Reseptörü Miyeloid Hücreler 2 (TREM2)'nin DNA metilasyonu, kontrollere kıyasla Alzheimer vakalarında artmıştır (Celarain vd., 2016). Ayrıca, uzun zincirli yağ asitlerinin sentezinde rol alan Çok Uzun Zincirli Yağ Asitleri Proteini 2 (ELOVL2) ve histon protein ailesine ait genler olan Histon H3E ve Histon H3F (HIST1H3E/HIST1H3F) genlerinin metilasyon seviyelerinin fosfo-tau protein yükü ile ilişkili olduğu kaydedilmiştir (Blanco-Luquin vd., 2020). Hücrelipid metabolizmasında rol oynayan bir gen olan Fosfolipaz D3 (PLD3) geninin metilasyon seviyesinin de Alzheimer hastalarının hipokampus dokularında kontrol grubuna kıyasla daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Blanco-Luquin vd., 2018). Sinir hücrelerinin büyümesini, gelişmesini, sağlığını destekleyen bir nörotrofin proteininin üretimini kodlayan ve tau hiperfosforilasyonu ile yakından ilişkili olan Beyinden Türetilen Nörotrofik Faktör (BDNF) geninin

promotörünün, Alzheimer hastalarında anlamlı derecede yüksek DNA metilasyon seviyeleri içerdiği kaydedilmiştir (T. Nagata vd., 2015; Vasanthakumar vd., 2020). Fakat aynı bulgular Alzheimer hastaları ve kontrol gruplarının periferik kan numunelerinin karşılaştırıldığı çalışmalarda doğrulanamamıştır (Carboni vd., 2015; Fransquet vd., 2020).

Hücrel gelişim ve doku yenilenmesi süreçlerinde rol oynayan bir proteini üreten Prominin-1 (Prom1) adlı gendeki metilasyonun ise, fosfo-tau birikimi ile güçlü bir ters korelasyon gösterdiği saptanmıştır (Mendioroz vd., 2016). Tau proteininin nörofibriler yumaklar oluşturmak üzere hiperfosforilasyonunu teşvik eden GSK3 β genindeki hipometilasyonun in vitro deneylerde Alzheimer hastalığı ile ilişkili patolojiyi simüle ettiği gösterilmiştir (Nicolia, Ciraci, vd., 2017). Hücrel döngü, nöronal migrasyon, nöronal sinyal iletimi ve sinaptik plastisite gibi birçok hücrel süreçte önemli bir rol oynayan Siklin Bağımlı Kinaz 5 (Cdk5) geninin promotör bölgesinin de benzer şekilde Alzheimer modeli sıçanların hipokampusünde kontrol gruplarına göre düşük düzeyde metilasyon sergilediği tespit edilmiştir (L. Li, Zhang, Zi, Tu, & Guo, 2015). Bir transkripsiyon faktörü olan cAMP Cevap Elemanı Bağlayıcı Protein (CREB) geni tarafından düzenlenen transkripsiyon faktörü 1'in metilasyon seviyesinin Alzheimer hastalarının hipokampusünde kontrollerle karşılaştırıldığında azaldığı saptanmıştır. CREB tarafından düzenlenen transkripsiyon faktörü 1 içindeki bu metilasyon, tau ekspresyonundaki fosforilasyon ile ters orantılı şekilde ilişkili bulunmuştur (Mendioroz vd., 2016). Alzheimer hastalarının beyin omurilik sıvılarında beta-1,3-galaktoziltransferaz adlı bir enzimi kodlayan B3GALT4 geni ve çinko bağlayıcı alkol dehidrogenaz alanını içeren bir proteini kodlayan ZADH2 geninin hipometilasyonu da hem A β hem de tau seviyeleriyle ilişkili bulunmuştur (Madrid vd., 2018). İnsan metilasyonu 450 BeadChip'in kullanıldığı bir çalışmada, ileri yaşa ve nörofibriler

yumak patolojisinin varlığına bağlı olarak Katanin-Etkileşimli Protein (KIAA0566) geninde DNA hipometilasyonunun korelasyonu tanımlanmıştır (Andrés-Benito, Delgado-Morales, & Ferrer, 2018). Demanssız kontrol bireyleri ile Alzheimer hastalarının frontal korteks ve hipokampus bölgelerinde, mikrotübül ilişkili tau proteinini kodlayan MAPT genlerinin DNA metilasyon durumları karşılaştırılmış, ancak gruplar arasında anlamlı bir farklılık belirlenememiştir (Barrachina & Ferrer, 2009). Alzheimer hastalarında ve kontrol gruplarında gen spesifik DNA metilasyon durumlarının araştırıldığı başka bir çalışmada ise bu veriler ile çelişkili sonuçlar kaydedilmiştir: hastalarda hem nöronal hem de nöronal olmayan hücrelerde MAPT geninin DNA metilasyon profilinde hasta olmayanlara göre anlamlı farklılıklar belirlenmiştir (Iwata vd., 2014).

İnflamasyonla ilişkili genlerdeki belirli DNA metilasyonları da Alzheimer hastalığı ile bağlantılı bulunmuştur. Bu kapsamda, Alzheimer hastalarında, hastalığın erken evrelerinde kontrol katılımcılarına göre İnterlökin-1beta (IL-1 β) geninin promotör bölgesinde hipometilasyonun belirlendiği; ancak, bu farkın hastalığın ileri evrelerinde belirginliğini kaybettiği tespit edilmiştir. Bunun aksine, araştırmacılar hastalığın ilerlemesiyle birlikte İnterlökin-6 (IL-6) genindeki DNA metilasyon düzeylerinin kontrol gruplarına göre azaldığını kaydetmiştir (Nicolia, Cavallaro, vd., 2017). Ayrıca, ağırlıklı olarak bağışıklık hücrelerinde eksprese edilen ve eksprese edildiğinde IL-1 β oluşumunu destekleyen CASPASE-4'ün (CASP4) Alzheimer hastalarının beyinlerinde diferansiyel DNA hipometilasyon sergilediği ve bunun CASP4 ekspresyonunun artmasıyla ilişkilendirildiği belirlenmiştir. Ayrıca, Alzheimer modeli farelerin beyinlerinden elde edilen mikrogliyalarda, kontrollere kıyasla artan CASP4 seviyeleri saptanmıştır (Daily vd., 2024). Monosit ve makrofaj gibi bağışıklık hücrelerinin gelişimini ve işlevini düzenleyerek inflamatuvar yanıtın

düzenlenmesinde önemli bir rol oynayan Spesifik Transkripsiyon Faktörü 1 (SPI1) geninin aktivasyon düzeylerindeki değişikliklerin, Alzheimer hastalığı riskini artırma potansiyeli bulunmuştur. Alzheimer hastalığının patolojisine ilişkin kortikal meta-analizlerde SPI1 geni civarında diferansiyel DNA metilasyonu tanımlanmıştır (Shireby vd., 2022). İnsanlarda mitokondriyal elektron transport zincirinin bir parçası olan ve hücrelerde enerji üretiminde rol oynayan bir proteini kodlayan Ubikülinol-Sitokrom c Redüktaz, Kompleks III Alt Birimi 1 (UQCRC1) genini hipermetilasyonu Alzheimer hastalarında inflamasyon ve oksidatif strese sorumlu bulunmuştur (Ma, Tang, & Lam, 2016). Viral enfeksiyonlara karşı tepki veren ve hücrel savunma mekanizmalarını başlatan interferon sinyali tarafından aktive edilen bir gen olan 2',5'-Oligoadenilat Sentetaz (2-5A) genindeki metilasyon seviyelerinin Alzheimer hastalarında azaldığı kaydedilmiştir (An, Khanna, & Wu, 1994). Farklılaşma Kümesi 33 (CD33), TREM2 ve insan lökosit antijeni (HLA-DRB1/DQA1) gibi bağışıklık tepkilerinde yer alan çoklu risk genlerindeki DNA metilasyonunun Alzheimer patogeneziindeki nöroinflamasyon ile anlamlı bir şekilde ilişkili olduğu da kanıtlanmıştır (Giri, Zhang, & Lü, 2016; Karch & Goate, 2015; Yu vd., 2015).

Nöronlar ve nöronlarla ilişkili hücrelerde de gen ekspresyonlarının metilasyon mekanizmalarıyla düzenlenmesi Alzheimer hastalığı patofizyolojisine katkı sağlayabilir. Nöron ve glia hücrelerinde eksprese edilen, bir adezyon molekülünü kodlayan, hücrel sinyal iletimi, hücre iskelet organizasyonu ve hücrel yapışma gibi çeşitli biyolojik süreçlerde rol oynayan Sorbin ve SH3 Alanı İçeren 3 (SORBS3) geninin yaşla birlikte metillenme derecesinin giderek arttığı (Ito vd., 2007) ve Alzheimer hastalarının (Lonze & Ginty, 2002) ve Alzheimer modeli farelerin beyinlerinde hipermetile olduğu belirlenmiştir (Jose V. Sanchez-Mut vd., 2013; Siegmund vd., 2007).

Nöronlarla ilişkili önemli bağışıklık sistemi hücrelerinden olan lökositlerde, Miyeloid Hücrelerde Reseptör Ekspresyonunu Tetikleyen 2 (TREM2) geninin İntron 1'i Alzheimer hastası deneklerde azalmış metilasyon sergilemiştir (Nakamura, Kaneko, Dickson, & Kusaka, 2020; Suberbielle vd., 2015). Benzer şekilde Alzheimer hastalarının bilişsel gerilemesiyle kan hücrelerindeki Klatrin Düzenegİ Bağlayıcı Protein Fosfatidilinositol (PICALM) ve DNA-Metil-Transferaz 1 (DNMT1) geninin metilasyonu arasında korelasyon tespit edilmiştir (Di Francesco vd., 2015; Mercurio vd., 2018). Ayrıca, Alzheimer hastası deneklerinin plazma örneklerinde Koenzim A Sentetaz Geni (COASY) ve Serin Proteaz İnhibitör 1 (SPINT1) genlerinin promoter bölgelerinde kontrollere kıyasla artmış DNA metilasyon seviyeleri gösterilmiştir (Kobayashi vd., 2016b).

Spesifik genler üzerindeki DNA metilasyonlarının oksidatif stres yoluyla Alzheimer hastalığının patolojisi üzerinde etkili olduğu da belirlenmiştir. Özellikle, HOXA gen ailesi, hücre farklılaşması ve organ oluşumu gibi gelişimsel süreçlerde kritik bir rol oynar. Aynı zamanda ANK1 geni, hücre yapısının stabilitesini sağlamak ve hücre içi transportu düzenlemek gibi önemli işlevlere sahiptir. Bu gen bölgelerinde meydana gelen diferansiyel DNA metilasyonları, oksidatif stresin etkisiyle Alzheimer hastalığının patolojisini etkileyebilir (Hernández vd., 2018; Shireby vd., 2022; Smith vd., 2018). HOX gen ailesine ait olup, embriyonik gelişim sırasında organizmanın vücut segmentasyonunu düzenlemede görev alan HOXA5 geninin DNA metilasyon düzeyindeki değişikliklerin, Alzheimer hastalığı ile ilişkilendirilen erken beyin hasarı süreçleri ile ve oksidatif stresle korelasyon gösterdiği de tespit edilmiştir (Zhang vd., 2023).

Her ne kadar Alzheimer hastalığındaki patolojilere katkıları net şekilde belirlenememiş olsa da, embriyonik gelişimde ve damar oluşumunda rol oynayan bir transkripsiyon

faktörü kodlayan SOX18, SRY, öğrenme ve hafıza ile ilişkilendirilen bir gen olan HKR1, sinir hücrelerinin birbirleriyle etkileşim kurmasında rol oynayan hücresel adezyon molekülleri kodlayan PCDHA12 ve otofaji ile ilişkilendirilmiş bir düzenlemeyi temsil eden ATG16L2 genlerine yakın konumlanmış diferansiyel olarak metillenmiş CpG'lerin Alzheimer hastalığı ile güçlü korelasyon gösterdiği belirtilmiştir (Altuna vd., 2019).

Tüm bu bulgular, gen spesifik DNA metilasyonunun Alzheimer hastalığının karmaşık patogeneğinde önemli bir rol oynadığını ve potansiyel olarak hastalığın tanı ve tedavisinde hedeflenebilecek bir alan olduğunu vurgulamaktadır. Ancak, daha fazla araştırma gereklidir çünkü bazı sonuçlar çelişkili olabilir ve bu alandaki tam mekanizmalar henüz tam olarak anlaşılmamıştır.

5. SONUÇ

Alzheimer hastalığı, genetik ve çevresel etmenlerin kompleks etkileşimi sonucu ortaya çıkan bir hastalık olarak bilinmektedir. Bu hastalığın seyri üzerindeki anlayışımızı derinleştiren giderek artan bilimsel kanıtlar, epigenetik fenomenlerin oksidatif stres tepkisi, A β oluşumu, tau protein hiperfosforilasyonu, hücre apoptozu ve inflamatuvar tepkiler gibi Alzheimer hastalığının patogenetik mekanizmaları üzerinde kritik bir rol oynadığını göstermiştir. Ayrıca, bazı epigenetik değişikliklerin patolojik değişikliklerden önce ortaya çıkabileceği ve bu değişikliklerin Alzheimer hastalığının teşhisi için bir araç olabileceği öne sürülmüştür. Ancak, biyolojik belirteçlerdeki eksiklikler nedeniyle, Alzheimer hastalığı ile epigenetik kontrol arasındaki etkileşimin daha derinlemesine anlaşılması büyük önem taşımaktadır. Bu anlayış, Alzheimer hastalarında terapötik olarak faydalı belirteçlerin saptanmasına ve bu hastalık için ek

tedavi stratejilerinin geliştirilmesine katkı sağlayabilir. Hafıza ve öğrenme bozukluklarına ilişkin altta yatan mekanizmalarda, gen regülasyonlarının modifikasyonunda ve hücresel işlevlerin düzenlenmesinde etkili olduğu bilinen DNA metilasyonu, Alzheimer patolojilerinde etkili olduğu bilinen epigenetik mekanizmalardan biridir. Bu bağlamda, Alzheimer hastalığı'nda DNA metilasyonunun rolü, hastalığın anlaşılmasında, teşhisinde ve potansiyel tedavi stratejilerinin geliştirilmesinde önemli bir odak noktası oluşturmaktadır.

KAYNAKÇA

- Agadjanyan, M. G., Zagorski, K., Petrushina, I., Davtyan, H., Kazarian, K., Antonenko, M., ... Ghochikyan, A. (2017). Humanized monoclonal antibody armanezumab specific to N-terminus of pathological tau: Characterization and therapeutic potency. *Molecular Neurodegeneration*, 12(1), 33. <https://doi.org/10.1186/s13024-017-0172-1>
- Altuna, M., Urdánoz-Casado, A., Sánchez-Ruiz de Gordo, J., Zelaya, M. V., Labarga, A., Lepesant, J. M. J., ... Mendioroz, M. (2019). DNA methylation signature of human hippocampus in Alzheimer's disease is linked to neurogenesis. *Clinical Epigenetics*, 11(1), 91. <https://doi.org/10.1186/s13148-019-0672-7>
- An, S., Khanna, K. K., & Wu, J. M. (1994). mRNA levels and methylation patterns of the 2-5A synthetase gene in control and Alzheimer's disease (AD) fibroblasts. *Biochemistry and Molecular Biology International*, 33(5), 835-840.
- Andrés-Benito, P., Delgado-Morales, R., & Ferrer, I. (2018). Altered Regulation of KIAA0566, and Katanin Signaling Expression in the Locus Coeruleus With Neurofibrillary Tangle Pathology. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 12. <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00131>
- Bacalini, M. G., Deelen, J., Pirazzini, C., De Cecco, M., Giuliani, C., Lanzarini, C., ... Garagnani, P. (2017). Systemic Age-Associated DNA Hypermethylation of ELOVL2 Gene: In Vivo and In Vitro Evidences of a Cell Replication Process. *The Journals of Gerontology: Series A*, 72(8), 1015-1023. <https://doi.org/10.1093/gerona/glw185>
- Barrachina, M., & Ferrer, I. (2009). DNA Methylation of Alzheimer Disease and Tauopathy-Related Genes in

- Postmortem Brain. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 68(8), 880-891.
<https://doi.org/10.1097/NEN.0b013e3181af2e46>
- Bartus, R. T., Dean, R. L., Beer, B., & Lippa, A. S. (1982). The Cholinergic Hypothesis of Geriatric Memory Dysfunction. *Science*, 217(4558), 408-414.
<https://doi.org/10.1126/science.7046051>
- Blanco-Luquin, I., Acha, B., Urdániz-Casado, A., Sánchez-Ruiz De Gordo, J., Vicuña-Urriza, J., Roldán, M., ... Mendioroz, M. (2020). Early epigenetic changes of Alzheimer's disease in the human hippocampus. *Epigenetics*, 15(10), 1083-1092.
<https://doi.org/10.1080/15592294.2020.1748917>
- Blanco-Luquin, I., Altuna, M., Sánchez-Ruiz de Gordo, J., Urdániz-Casado, A., Roldán, M., Cámara, M., ... Mendioroz, M. (2018). PLD3 epigenetic changes in the hippocampus of Alzheimer's disease. *Clinical Epigenetics*, 10(1), 116. <https://doi.org/10.1186/s13148-018-0547-3>
- Bradley-Whitman, M. A., & Lovell, M. A. (2013). Epigenetic changes in the progression of Alzheimer's disease. *Mechanisms of Ageing and Development*, 134(10), 486-495. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2013.08.005>
- Buck-Koehntop, B. A., & Defossez, P.-A. (2013). On how mammalian transcription factors recognize methylated DNA. *Epigenetics*, 8(2), 131-137.
<https://doi.org/10.4161/epi.23632>
- Bukke, V. N., Archana, M., Villani, R., Romano, A. D., Wawrzyniak, A., Balawender, K., ... Cassano, T. (2020). The Dual Role of Glutamatergic Neurotransmission in Alzheimer's Disease: From Pathophysiology to

- Pharmacotherapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(20), 7452.
<https://doi.org/10.3390/ijms21207452>
- Butterfield, D. A., & Halliwell, B. (2019). Oxidative stress, dysfunctional glucose metabolism and Alzheimer disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 20(3), 148-160.
<https://doi.org/10.1038/s41583-019-0132-6>
- Carboni, L., Lattanzio, F., Candeletti, S., Porcellini, E., Raschi, E., Licastro, F., & Romualdi, P. (2015). Peripheral leukocyte expression of the potential biomarker proteins Bdnf, Sirt1, and Psen1 is not regulated by promoter methylation in Alzheimer's disease patients. *Neuroscience Letters*, 605, 44-48.
<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2015.08.012>
- Celarain, N., Sánchez-Ruiz de Gordo, J., Zelaya, M. V., Roldán, M., Larumbe, R., Pulido, L., ... Mendiorez, M. (2016). TREM2 upregulation correlates with 5-hydroxymethylcytosine enrichment in Alzheimer's disease hippocampus. *Clinical Epigenetics*, 8(1), 37.
<https://doi.org/10.1186/s13148-016-0202-9>
- Charlet, J., Duymich, C. E., Lay, F. D., Mundbjerg, K., Sørensen, K. D., Liang, G., & Jones, P. A. (2016). "Bivalent" regions of cytosine methylation and H3K27 acetylation suggest an active role for DNA methylation at enhancers. *Molecular cell*, 62(3), 422-431.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.03.033>
- Chen, Z.-R., Huang, J.-B., Yang, S.-L., & Hong, F.-F. (2022). Role of Cholinergic Signaling in Alzheimer's Disease. *Molecules*, 27(6), 1816.
<https://doi.org/10.3390/molecules27061816>

- Chouliaras, L., Mastroeni, D., Delvaux, E., Grover, A., Kenis, G., Hof, P. R., ... van den Hove, D. L. A. (2013). Consistent decrease in global DNA methylation and hydroxymethylation in the hippocampus of Alzheimer's disease patients. *Neurobiology of Aging*, 34(9), 2091-2099.
<https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2013.02.021>
- Chouliaras, L., Rutten, B. P. F., Kenis, G., Peerbooms, O., Visser, P. J., Verhey, F., ... van den Hove, D. L. A. (2010). Epigenetic regulation in the pathophysiology of Alzheimer's disease. *Progress in Neurobiology*, 90(4), 498-510.
<https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2010.01.002>
- Coppieters, N., Dieriks, B. V., Lill, C., Faull, R. L. M., Curtis, M. A., & Dragunow, M. (2014). Global changes in DNA methylation and hydroxymethylation in Alzheimer's disease human brain. *Neurobiology of Aging*, 35(6), 1334-1344.
<https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2013.11.031>
- Corder, E. H., Saunders, A. M., Strittmatter, W. J., Schmechel, D. E., Gaskell, P. C., Small, G. W., ... Pericak-Vance, M. A. (1993). Gene Dose of Apolipoprotein E Type 4 Allele and the Risk of Alzheimer's Disease in Late Onset Families. *Science*, 261(5123), 921-923.
<https://doi.org/10.1126/science.8346443>
- Cruickshanks, H. A., McBryan, T., Nelson, D. M., VanderKraats, N. D., Shah, P. P., van Tuyn, J., ... Adams, P. D. (2013). Senescent cells harbour features of the cancer epigenome. *Nature Cell Biology*, 15(12), 1495-1506.
<https://doi.org/10.1038/ncb2879>
- Cutler, R. G., Kelly, J., Storie, K., Pedersen, W. A., Tammara, A., Hatanpaa, K., ... Mattson, M. P. (2004). Involvement of

- oxidative stress-induced abnormalities in ceramide and cholesterol metabolism in brain aging and Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(7), 2070-2075. <https://doi.org/10.1073/pnas.0305799101>
- Daily, K. P., Badr, A., Eltobgy, M., Estfanous, S., Whitham, O., Tan, M. H., ... Amer, A. O. (2024). DNA hypomethylation promotes the expression of CASPASE-4 which exacerbates inflammation and amyloid- β deposition in Alzheimer's disease. *Alzheimer's Research & Therapy*, 16(1), 29. <https://doi.org/10.1186/s13195-024-01390-2>
- De Jager, P. L., Srivastava, G., Lunnon, K., Burgess, J., Schalkwyk, L. C., Yu, L., ... Bennett, D. A. (2014). Alzheimer's disease: Early alterations in brain DNA methylation at ANK1, BIN1, RHBDF2 and other loci. *Nature Neuroscience*, 17(9), 1156-1163. <https://doi.org/10.1038/nn.3786>
- De Strooper, B., & Karran, E. (2016). The Cellular Phase of Alzheimer's Disease. *Cell*, 164(4), 603-615. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.12.056>
- Di Francesco, A., Arosio, B., Falconi, A., Micioni Di Bonaventura, M. V., Karimi, M., Mari, D., ... D'Addario, C. (2015). Global changes in DNA methylation in Alzheimer's disease peripheral blood mononuclear cells. *Brain, Behavior, and Immunity*, 45, 139-144. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2014.11.002>
- Eftekharzadeh, B., Daigle, J. G., Kapinos, L. E., Coyne, A., Schiantarelli, J., Carlomagno, Y., ... Hyman, B. T. (2018). Tau Protein Disrupts Nucleocytoplasmic Transport in Alzheimer's Disease. *Neuron*, 99(5), 925-940.e7. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.07.039>

- Fan, G., Martinowich, K., Chin, M. H., He, F., Fouse, S. D., Hutnick, L., ... Sun, Y. E. (2005). DNA methylation controls the timing of astroglialogenesis through regulation of JAK-STAT signaling. *Development*, 132(15), 3345-3356. <https://doi.org/10.1242/dev.01912>
- Farr, S. A., Ripley, J. L., Sultana, R., Zhang, Z., Niehoff, M. L., Platt, T. L., ... Butterfield, D. A. (2014). Antisense oligonucleotide against GSK-3 β in brain of SAMP8 mice improves learning and memory and decreases oxidative stress: Involvement of transcription factor Nrf2 and implications for Alzheimer disease. *Free Radical Biology and Medicine*, 67, 387-395. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.11.014>
- Fransquet, P. D., Lacaze, P., Saffery, R., Phung, J., Parker, E., Shah, R. C., ... Ryan, J. (2020). DNA methylation analysis of candidate genes associated with dementia in peripheral blood. *Epigenomics*, 12(23), 2109-2123. <https://doi.org/10.2217/epi-2020-0236>
- Fuke, C., Shimabukuro, M., Petronis, A., Sugimoto, J., Oda, T., Miura, K., ... Jinno, Y. (2004). Age Related Changes in 5-methylcytosine Content in Human Peripheral Leukocytes and Placentas: An HPLC-based Study. *Annals of Human Genetics*, 68(3), 196-204. <https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.2004.00081.x>
- Gallusci, P., Hodgman, C., Teyssier, E., & Seymour, G. B. (2016). DNA Methylation and Chromatin Regulation during Fleshy Fruit Development and Ripening. *Frontiers in Plant Science*, 7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00807>
- Gershman, A., Sauria, M. E. G., Guitart, X., Vollger, M. R., Hook, P. W., Hoyt, S. J., ... Timp, W. (2022). Epigenetic patterns in a complete human genome. *Science*,

376(6588), eabj5089.
<https://doi.org/10.1126/science.abj5089>

Gibbons, G. S., Lee, V. M. Y., & Trojanowski, J. Q. (2019). Mechanisms of Cell-to-Cell Transmission of Pathological Tau: A Review. *JAMA Neurology*, 76(1), 101-108. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2018.2505>

Giri, M., Zhang, M., & Lü, Y. (2016). Genes associated with Alzheimer's disease: An overview and current status. *Clinical Interventions in Aging*. (world). Geliş tarihi gönderen
<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.2147/CIA.S105769>

Hardy, J. A., & Higgins, G. A. (1992). Alzheimer's Disease: The Amyloid Cascade Hypothesis. *Science*, 256(5054), 184-185. <https://doi.org/10.1126/science.1566067>

He, F., Wu, H., Zhou, L., Lin, Q., Cheng, Y., & Sun, Y. E. (2020). Tet2-mediated epigenetic drive for astrocyte differentiation from embryonic neural stem cells. *Cell Death Discovery*, 6(1), 1-12. <https://doi.org/10.1038/s41420-020-0264-5>

Heneka, M. T., Carson, M. J., Khoury, J. E., Landreth, G. E., Brosseron, F., Feinstein, D. L., ... Kummer, M. P. (2015). Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *The Lancet Neurology*, 14(4), 388-405. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(15\)70016-5](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(15)70016-5)

Hernández, H. G., Sandoval-Hernández, A. G., Garrido-Gil, P., Labandeira-Garcia, J. L., Zelaya, M. V., Bayon, G. F., ... Arboleda, H. (2018). Alzheimer's disease DNA methylome of pyramidal layers in frontal cortex: Laser-assisted microdissection study. *Epigenomics*, 10(11), 1365-1382. <https://doi.org/10.2217/epi-2017-0160>

- Herrup, K. (2015). The case for rejecting the amyloid cascade hypothesis. *Nature Neuroscience*, 18(6), 794-799. <https://doi.org/10.1038/nn.4017>
- Hou, Y., Chen, H., He, Q., Jiang, W., Luo, T., Duan, J., ... Wang, H. (2013). Changes in methylation patterns of multiple genes from peripheral blood leucocytes of Alzheimer's disease patients. *Acta Neuropsychiatrica*, 25(2), 66-76. <https://doi.org/10.1111/j.1601-5215.2012.00662.x>
- Iqbal, K., Zaidi, T., Wen, GuangY., Grundke-Iqbal, I., Merz, PatriciaA., Shaikh, SadiaS., ... Winblad, B. (1986). DEFECTIVE BRAIN MICROTUBULE ASSEMBLY IN ALZHEIMER'S DISEASE. *The Lancet*, 328(8504), 421-426. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(86\)92134-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(86)92134-3)
- Ito, H., Usuda, N., Atsuzawa, K., Iwamoto, I., Sudo, K., Katoh-Semba, R., ... Nagata, K. (2007). Phosphorylation by extracellular signal-regulated kinase of a multidomain adaptor protein, vinexin, at synapses. *Journal of Neurochemistry*, 100(2), 545-554. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.04222.x>
- Iwata, A., Nagata, K., Hatsuta, H., Takuma, H., Bundo, M., Iwamoto, K., ... Tsuji, S. (2014). Altered CpG methylation in sporadic Alzheimer's disease is associated with APP and MAPT dysregulation. *Human Molecular Genetics*, 23(3), 648-656. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddt451>
- Jones, P. A. (2012). Functions of DNA methylation: Islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nature Reviews Genetics*, 13(7), 484-492. <https://doi.org/10.1038/nrg3230>
- Kanwal, R., & Gupta, S. (2010). Epigenetics and cancer. *Journal of Applied Physiology*, 109(2), 598-605. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00066.2010>

- Karch, C. M., & Goate, A. M. (2015). Alzheimer's Disease Risk Genes and Mechanisms of Disease Pathogenesis. *Biological Psychiatry*, 77(1), 43-51. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2014.05.006>
- Kinney, J. W., Bemiller, S. M., Murtishaw, A. S., Leisgang, A. M., Salazar, A. M., & Lamb, B. T. (2018). Inflammation as a central mechanism in Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions*, 4, 575-590. <https://doi.org/10.1016/j.trci.2018.06.014>
- Kiselev, I. S., Kulakova, O. G., Boyko, A. N., & Favorova, O. O. (2021). DNA Methylation As an Epigenetic Mechanism in the Development of Multiple Sclerosis. *Acta Naturae*, 13(2), 45-57. <https://doi.org/10.32607/actanaturae.11043>
- Klungland, A., & Robertson, A. B. (2017). Oxidized C5-methyl cytosine bases in DNA: 5-Hydroxymethylcytosine; 5-formylcytosine; and 5-carboxycytosine. *Free Radical Biology and Medicine*, 107, 62-68. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.11.038>
- Kobayashi, N., Shinagawa, S., Nagata, T., Shimada, K., Shibata, N., Ohnuma, T., ... Kondo, K. (2016a). Development of Biomarkers Based on DNA Methylation in the NCAPH2/LMF2 Promoter Region for Diagnosis of Alzheimer's Disease and Amnesic Mild Cognitive Impairment. *PLOS ONE*, 11(1), e0146449. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146449>
- Kobayashi, N., Shinagawa, S., Nagata, T., Shimada, K., Shibata, N., Ohnuma, T., ... Kondo, K. (2016b). Usefulness of DNA Methylation Levels in COASY and SPINT1 Gene Promoter Regions as Biomarkers in Diagnosis of Alzheimer's Disease and Amnesic Mild Cognitive

- Impairment. *PLOS ONE*, 11(12), e0168816. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0168816>
- Kumar, S., Chinnusamy, V., & Mohapatra, T. (2018). Epigenetics of Modified DNA Bases: 5-Methylcytosine and Beyond. *Frontiers in Genetics*, 9. <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00640>
- Lang, A.-L., Eulalio, T., Fox, E., Yakabi, K., Bukhari, S. A., Kawas, C. H., ... Montine, T. J. (2022). Methylation differences in Alzheimer's disease neuropathologic change in the aged human brain. *Acta Neuropathologica Communications*, 10(1), 174. <https://doi.org/10.1186/s40478-022-01470-0>
- Lashley, T., Gami, P., Valizadeh, N., Li, A., Revesz, T., & Balazs, R. (2015). Alterations in global DNA methylation and hydroxymethylation are not detected in Alzheimer's disease. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 41(4), 497-506. <https://doi.org/10.1111/nan.12183>
- Li, L., Zhang, C., Zi, X., Tu, Q., & Guo, K. (2015). Epigenetic modulation of Cdk5 contributes to memory deficiency induced by amyloid fibrils. *Experimental Brain Research*, 233(1), 165-173. <https://doi.org/10.1007/s00221-014-4100-0>
- Li, P., Marshall, L., Oh, G., Jakubowski, J. L., Groot, D., He, Y., ... Labrie, V. (2019). Epigenetic dysregulation of enhancers in neurons is associated with Alzheimer's disease pathology and cognitive symptoms. *Nature Communications*, 10(1), 2246. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10101-7>
- Li, Z., Shue, F., Zhao, N., Shinohara, M., & Bu, G. (2020). APOE2: Protective mechanism and therapeutic implications for Alzheimer's disease. *Molecular*

- Neurodegeneration*, 15(1), 63.
<https://doi.org/10.1186/s13024-020-00413-4>
- Lister, R., Mukamel, E. A., Nery, J. R., Urich, M., Puddifoot, C. A., Johnson, N. D., ... Ecker, J. R. (2013). Global Epigenomic Reconfiguration During Mammalian Brain Development. *Science*, 341(6146), 1237905.
<https://doi.org/10.1126/science.1237905>
- Lonze, B. E., & Ginty, D. D. (2002). Function and Regulation of CREB Family Transcription Factors in the Nervous System. *Neuron*, 35(4), 605-623.
[https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(02\)00828-0](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(02)00828-0)
- Ma, S. L., Tang, N. L. S., & Lam, L. C. W. (2016). Association of gene expression and methylation of UQCRC1 to the predisposition of Alzheimer's disease in a Chinese population. *Journal of Psychiatric Research*, 76, 143-147.
<https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2016.02.010>
- MacArthur, I. C., & Dawlaty, M. M. (2021). TET Enzymes and 5-Hydroxymethylcytosine in Neural Progenitor Cell Biology and Neurodevelopment. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9.
<https://doi.org/10.3389/fcell.2021.645335>
- Madrid, A., Hogan, K. J., Papale, L. A., Clark, L. R., Asthana, S., Johnson, S. C., & Alisch, R. S. (2018). DNA Hypomethylation in Blood Links B3GALT4 and ZADH2 to Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 66(3), 927-934. <https://doi.org/10.3233/JAD-180592>
- Mastroeni, D., McKee, A., Grover, A., Rogers, J., & Coleman, P. D. (2009). Epigenetic differences in cortical neurons from a pair of monozygotic twins discordant for Alzheimer's disease. *PloS One*, 4(8), e6617.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006617>

- Mendioroz, M., Celarain, N., Altuna, M., Sánchez-Ruiz de Gordo, J., Zelaya, M. V., Roldán, M., ... Echávarri, C. (2016). CRT1 gene is differentially methylated in the human hippocampus in Alzheimer's disease. *Alzheimer's Research & Therapy*, 8(1), 15. <https://doi.org/10.1186/s13195-016-0183-0>
- Mercorio, R., Pergoli, L., Galimberti, D., Favero, C., Carugno, M., Dalla Valle, E., ... Pesatori, A. C. (2018). PICALM Gene Methylation in Blood of Alzheimer's Disease Patients Is Associated with Cognitive Decline. *Journal of Alzheimer's Disease*, 65(1), 283-292. <https://doi.org/10.3233/JAD-180242>
- Moore, L. D., Le, T., & Fan, G. (2013). DNA Methylation and Its Basic Function. *Neuropsychopharmacology*, 38(1), 23-38. <https://doi.org/10.1038/npp.2012.112>
- Nagata, K., Mano, T., Murayama, S., Saido, T. C., & Iwata, A. (2018). DNA methylation level of the neprilysin promoter in Alzheimer's disease brains. *Neuroscience Letters*, 670, 8-13. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2018.01.003>
- Nagata, T., Kobayashi, N., Ishii, J., Shinagawa, S., Nakayama, R., Shibata, N., ... Nakayama, K. (2015). Association between DNA Methylation of the BDNF Promoter Region and Clinical Presentation in Alzheimer's Disease. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders Extra*, 5(1), 64-73. <https://doi.org/10.1159/000375367>
- Nakamura, M., Kaneko, S., Dickson, D. W., & Kusaka, H. (2020). Aberrant Accumulation of BRCA1 in Alzheimer Disease and Other Tauopathies. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 79(1), 22-33. <https://doi.org/10.1093/jnen/nlz107>

- Nicolia, V., Cavallaro, R. A., López-González, I., Maccarrone, M., Scarpa, S., Ferrer, I., & Fusó, A. (2017). DNA Methylation Profiles of Selected Pro-Inflammatory Cytokines in Alzheimer Disease. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 76(1), 27-31. <https://doi.org/10.1093/jnen/nlw099>
- Nicolia, V., Ciraci, V., A. Cavallaro, R., Ferrer, I., Scarpa, S., & Fusó, A. (2017). GSK3 β 5'-flanking DNA Methylation and Expression in Alzheimer's Disease Patients. *Current Alzheimer Research*, 14(7), 753-759. <https://doi.org/10.2174/1567205014666170203153325>
- Perdigão, C., Barata, M. A., Burrinha, T., & Guimas Almeida, C. (2021). Alzheimer's disease BIN1 coding variants increase intracellular A β levels by interfering with BACE1 recycling. *The Journal of Biological Chemistry*, 297(3), 101056. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.101056>
- Phipps, A. J., Vickers, J. C., Taberlay, P. C., & Woodhouse, A. (2016). Neurofilament-labeled pyramidal neurons and astrocytes are deficient in DNA methylation marks in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 45, 30-42. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2016.05.003>
- Pikaard, C. S., & Mittelsten Scheid, O. (2014). Epigenetic regulation in plants. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 6(12), a019315. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a019315>
- Poirier, J., Bertrand, P., Poirier, J., Kogan, S., Gauthier, S., Poirier, J., ... Davignon, J. (1993). Apolipoprotein E polymorphism and Alzheimer's disease. *The Lancet*, 342(8873), 697-699. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(93\)91705-Q](https://doi.org/10.1016/0140-6736(93)91705-Q)

- Poon, C. H., Tse, L. S. R., & Lim, L. W. (2020). DNA methylation in the pathology of Alzheimer's disease: From gene to cognition. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1475(1), 15-33. <https://doi.org/10.1111/nyas.14373>
- Portela, A., & Esteller, M. (2010). Epigenetic modifications and human disease. *Nature Biotechnology*, 28(10), 1057-1068. <https://doi.org/10.1038/nbt.1685>
- Rao, J. S., Keleshian, V. L., Klein, S., & Rapoport, S. I. (2012). Epigenetic modifications in frontal cortex from Alzheimer's disease and bipolar disorder patients. *Translational Psychiatry*, 2(7), e132-e132. <https://doi.org/10.1038/tp.2012.55>
- Reddy, P. H., & Beal, M. F. (2008). Amyloid beta, mitochondrial dysfunction and synaptic damage: Implications for cognitive decline in aging and Alzheimer's disease. *Trends in Molecular Medicine*, 14(2), 45-53. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2007.12.002>
- Reisberg, B., Doody, R., Stöffler, A., Schmitt, F., Ferris, S., & Möbius, H. J. (2003). Memantine in Moderate-to-Severe Alzheimer's Disease. *New England Journal of Medicine*, 348(14), 1333-1341. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa013128>
- Sanchez-Mut, Jose V., Aso, E., Panayotis, N., Lott, I., Dierssen, M., Rabano, A., ... Esteller, M. (2013). DNA methylation map of mouse and human brain identifies target genes in Alzheimer's disease. *Brain*, 136(10), 3018-3027. <https://doi.org/10.1093/brain/awt237>
- Sanchez-Mut, Jose V., & Gräff, J. (2015). Epigenetic Alterations in Alzheimer's Disease. *Frontiers in Behavioral*

Neuroscience, 9.
<https://doi.org/10.3389/fnbeh.2015.00347>

- Sanchez-Mut, Jose Vicente, Aso, E., Heyn, H., Matsuda, T., Bock, C., Ferrer, I., & Esteller, M. (2014). Promoter hypermethylation of the phosphatase DUSP22 mediates PKA-dependent TAU phosphorylation and CREB activation in Alzheimer's disease. *Hippocampus*, 24(4), 363-368. <https://doi.org/10.1002/hipo.22245>
- Santiago, M., Antunes, C., Guedes, M., Iacovino, M., Kyba, M., Reik, W., ... Marques, C. J. (2020). Tet3 regulates cellular identity and DNA methylation in neural progenitor cells. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 77(14), 2871-2883. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03335-7>
- Semick, S. A., Bharadwaj, R. A., Collado-Torres, L., Tao, R., Shin, J. H., Deep-Soboslay, A., ... Mattay, V. S. (2019). Integrated DNA methylation and gene expression profiling across multiple brain regions implicate novel genes in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathologica*, 137(4), 557-569. <https://doi.org/10.1007/s00401-019-01966-5>
- Shireby, G., Dempster, E. L., Policicchio, S., Smith, R. G., Pishva, E., Chioza, B., ... Mill, J. (2022). DNA methylation signatures of Alzheimer's disease neuropathology in the cortex are primarily driven by variation in non-neuronal cell-types. *Nature Communications*, 13(1), 5620. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-33394-7>
- Siegmund, K. D., Connor, C. M., Campan, M., Long, T. I., Weisenberger, D. J., Biniszkievicz, D., ... Akbarian, S. (2007). DNA Methylation in the Human Cerebral Cortex Is Dynamically Regulated throughout the Life Span and

- Involves Differentiated Neurons. *PLOS ONE*, 2(9), e895. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000895>
- Singleton, A., & Hardy, J. (2019). Progress in the genetic analysis of Parkinson's disease. *Human Molecular Genetics*, 28(R2), R215-R218. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddz183>
- Sliwinska, A., Sitarek, P., Toma, M., Czarny, P., Synowiec, E., Krupa, R., ... Sliwinski, T. (2017). Decreased expression level of BER genes in Alzheimer's disease patients is not derivative of their DNA methylation status. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 79, 311-316. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2017.07.010>
- Smith, R. G., Hannon, E., De Jager, P. L., Chibnik, L., Lott, S. J., Condliffe, D., ... Lunnon, K. (2018). Elevated DNA methylation across a 48-kb region spanning the HOXA gene cluster is associated with Alzheimer's disease neuropathology. *Alzheimer's & Dementia*, 14(12), 1580-1588. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2018.01.017>
- Sparks, D. L., Scheff, S. W., Hunsaker, J. C., Liu, H., Landers, T., & Gross, D. R. (1994). Induction of Alzheimer-like β -Amyloid Immunoreactivity in the Brains of Rabbits with Dietary Cholesterol. *Experimental Neurology*, 126(1), 88-94. <https://doi.org/10.1006/exnr.1994.1044>
- Spruijt, C. G., & Vermeulen, M. (2014). DNA methylation: Old dog, new tricks? *Nature Structural & Molecular Biology*, 21(11), 949-954. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2910>
- Suberbielle, E., Djukic, B., Evans, M., Kim, D. H., Taneja, P., Wang, X., ... Mucke, L. (2015). DNA repair factor BRCA1 depletion occurs in Alzheimer brains and impairs cognitive function in mice. *Nature Communications*, 6(1), 8897. <https://doi.org/10.1038/ncomms9897>

- Sung, H. Y., Choi, E. N., Ahn Jo, S., Oh, S., & Ahn, J.-H. (2011). Amyloid protein-mediated differential DNA methylation status regulates gene expression in Alzheimer's disease model cell line. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 414(4), 700-705. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.09.136>
- Surace, A. E. A., & Hedrich, C. M. (2019). The Role of Epigenetics in Autoimmune/Inflammatory Disease. *Frontiers in Immunology*, 10, 1525. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01525>
- Tannorella, P., Stoccoro, A., Tognoni, G., Petrozzi, L., Salluzzo, M. G., Ragalmuto, A., ... Coppedè, F. (2015). Methylation analysis of multiple genes in blood DNA of Alzheimer's disease and healthy individuals. *Neuroscience Letters*, 600, 143-147. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2015.06.009>
- Thangavel, R., Sahu, S. K., Van Hoesen, G. W., & Zaheer, A. (2009). Loss of nonphosphorylated neurofilament immunoreactivity in temporal cortical areas in Alzheimer's disease. *Neuroscience*, 160(2), 427-433. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.02.037>
- Tönnies, E., & Trushina, E. (2017). Oxidative Stress, Synaptic Dysfunction, and Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 57(4), 1105-1121. <https://doi.org/10.3233/JAD-161088>
- Urdinguio, R. G., Sanchez-Mut, J. V., & Esteller, M. (2009). Epigenetic mechanisms in neurological diseases: Genes, syndromes, and therapies. *The Lancet Neurology*, 8(11), 1056-1072. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(09\)70262-5](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(09)70262-5)

- Vasanthakumar, A., Davis, J. W., Idler, K., Waring, J. F., Asque, E., Riley-Gillis, B., ... for the Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative (ADNI). (2020). Harnessing peripheral DNA methylation differences in the Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative (ADNI) to reveal novel biomarkers of disease. *Clinical Epigenetics*, 12(1), 84. <https://doi.org/10.1186/s13148-020-00864-y>
- Vlaming, H., & van Leeuwen, F. (2012). Crosstalk between aging and the epigenome. *Epigenomics*, 4(1), 5-7. <https://doi.org/10.2217/epi.11.113>
- Wang, S.-C., Oelze, B., & Schumacher, A. (2008). Age-Specific Epigenetic Drift in Late-Onset Alzheimer's Disease. *PLOS ONE*, 3(7), e2698. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002698>
- Wegmann, S., Bennett, R. E., Delorme, L., Robbins, A. B., Hu, M., MacKenzie, D., ... Hyman, B. T. (2019). Experimental evidence for the age dependence of tau protein spread in the brain. *Science Advances*, 5(6), eaaw6404. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aaw6404>
- Wei, X., Du, P., & Zhao, Z. (2021). Impacts of DNA methylation on Tau protein related genes in the brains of patients with Alzheimer's disease. *Neuroscience Letters*, 763, 136196. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2021.136196>
- Xiao, X., Liu, X., & Jiao, B. (2020). Epigenetics: Recent Advances and Its Role in the Treatment of Alzheimer's Disease. *Frontiers in Neurology*, 11, 538301. <https://doi.org/10.3389/fneur.2020.538301>
- Xie, J., Xie, L., Wei, H., Li, X.-J., & Lin, L. (2023). Dynamic Regulation of DNA Methylation and Brain Functions. *Biology*, 12(2), 152. <https://doi.org/10.3390/biology12020152>

- Younesian, S., Yousefi, A.-M., Momeny, M., Ghaffari, S. H., & Bashash, D. (2022). The DNA Methylation in Neurological Diseases. *Cells*, 11(21), 3439. <https://doi.org/10.3390/cells11213439>
- Yu, L., Chibnik, L. B., Srivastava, G. P., Pochet, N., Yang, J., Xu, J., ... Bennett, D. A. (2015). Association of Brain DNA Methylation in SORL1, ABCA7, HLA-DRB5, SLC24A4, and BIN1 With Pathological Diagnosis of Alzheimer Disease. *JAMA Neurology*, 72(1), 15-24. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2014.3049>
- Zhang, W., Young, J. I., Gomez, L., Schmidt, M. A., Lukacsovich, D., Varma, A., ... Wang, L. (2023). Distinct CSF biomarker-associated DNA methylation in Alzheimer's disease and cognitively normal subjects. *Alzheimer's Research & Therapy*, 15(1), 78. <https://doi.org/10.1186/s13195-023-01216-7>
- Zhou, Y., Su, Y., Li, B., Liu, F., Ryder, J. W., Wu, X., ... Ni, B. (2003). Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs Can Lower Amyloidogenic A β 42 by Inhibiting Rho. *Science*, 302(5648), 1215-1217. <https://doi.org/10.1126/science.1090154>
- Zimmer-Bensch, G., & Zempel, H. (2021). DNA Methylation in Genetic and Sporadic Forms of Neurodegeneration: Lessons from Alzheimer's, Related Tauopathies and Genetic Tauopathies. *Cells*, 10(11), 3064. <https://doi.org/10.3390/cells10113064>

THE FUNCTIONS OF NUCLEOLAR CHANNEL SYSTEMS (NCS) IN THE IMPLANTATION PROCESS: A MOLECULAR AND CELLULAR PERSPECTIVE

Tiınçe AKSAK¹

1. INTRODUCTION

1.1.The Structure and Function of Nucleolar Channel Systems (NCS)

When examined under transmission electron microscopy, Nucleolar Channel Systems (NCS) are characterized as small, spherical entities approximately 1 μm in diameter, located within the nuclei of endometrial epithelial cells. Theories concerning the origin of NCS remain debated (Clyman, 1963). NCS are recognized as subcellular structures involved in the critical regulation of ribosomal RNA (rRNA) transcription and ribosome biogenesis. These structures comprise tubules associated with the inner nuclear membrane, embedded within an electron-dense matrix (Isaac et al., 2001). Morphologically, NCS present as hollow, sphere-like formations of variable sizes, typically consisting of 2-5 rows of tubules encircling a central region filled with fine fibrils and granules. The tubules, usually enclosed by a membrane approximately 60-90 nm in diameter, are surrounded by fine fibrils, with an electron-dense amorphous matrix filling the space between the tubules (Figure 1 A, B). In certain studies, NCS were observed near the inner nuclear membrane and, in some instances, appeared to protrude from the nucleus (Tzuneng

¹ Assist. Prof. Dr., University of Toros, tiince.aksak@toros.edu.tr, ORCID: 0000-0001-7841-8456.

& Schneider, 1992). While some research posits that NCS are formed through the inward folding of the inner nuclear membrane (More et al., 1974; Ryder et al., 1995), other studies suggest that NCS involution may represent an intranuclear regression process, during which NCS components recombine with the nuclear membrane (Tzuneng & Schneider, 1992). Furthermore, NCS have been found to contain a range of both nuclear and cytoplasmic proteins. These proteins interact with various structural and functional proteins located within the cell nucleus. NCS, which are observed at specific developmental stages of the oocyte and embryo, as well as during the late secretory phase of the endometrium, appear near the implantation window or simultaneously under the influence of progesterone (Kohorn et al., 1972). Notably, NCS are structures unique to humans, absent in other species. They are not present in the proliferative endometrium, endometrial stromal cell nuclei, breast tissue cells, endometrial carcinoma samples, or in baboon or gestational endometrium. The absence of animal models has restricted NCS research primarily to electron microscopy for many years (Dubrausky & Pohlman, 1960; Nilson, 1962).

However, studies that have identified NCS expression in fetal tissue suggest that these structures may serve as markers not only for uterine receptivity but also as hormone sensors responsive to estrogen and progesterone levels (Wang, 1987; Preston et al., 2022). In recent years, the structure of NCS has been further elucidated through the use of indirect immunofluorescence with monoclonal antibodies targeting specific subsets of complex proteins (Nejat et al., 2014). Despite their appearance during the mid-luteal phase and their role as key biomarkers of receptive endometrium, the absence of NCS is not considered a major cause of infertility (Rybak et al., 2011). Some research suggests that NCS may function as a feedback mechanism between the cytoplasm and the nucleus, potentially

serving as a site for the synthesis of specific RNA or proteins. This hypothesis proposes that NCS contribute to the increased production of RNA and proteins required by the cell, particularly during the secretory phase. Another widely accepted theory posits that NCSs serve as specialized systems for the rapid transport of newly synthesized mRNA. In this case, mRNA molecules are transported rapidly within the cell, supporting the rapid synthesis and function of necessary proteins. In addition, some studies have shown that electron-dense granules surrounding the NCS contain RNA and protein. Based on these findings, it is suggested that the NCS may have similar functions to the rER, that is, it may contribute to protein synthesis and secretion processes. In this case, it is thought that the NCS facilitates the secretory function by reducing the rER load inside the cell. Alternatively, it is suggested that the NCS may appear in places close to the nucleolus and increase the surface of the nuclear envelope, supporting this process, since the cell needs to produce abundant ribosomal RNA (rRNA) during periods when secretory activity peaks (Rossmann, 2006; Novotný, 1999; Cornillie et al., 1985).

Figure 1. Schematic Representation of NCS Formation Process

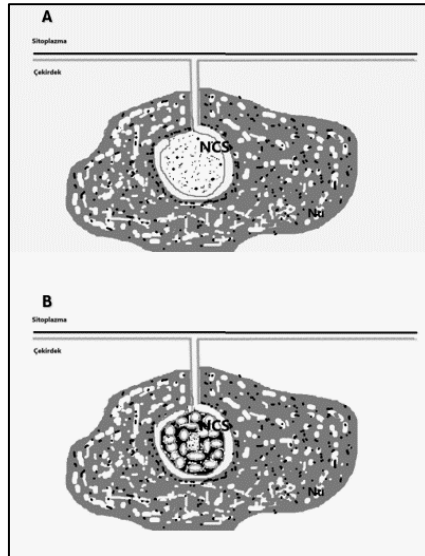


Figure 1. Schematic representation of the initiation of the NCS formation process with invagination of the nuclear inner envelope towards the nucleolus (Nu) (A). Schematic representation of NCS observed in the late secretory phase as an implantation window biomarker (B).

1.2.Molecular Mechanisms of the Implantation Process

During a normal 28-day menstrual cycle, the endometrium undergoes several structural and molecular changes to prepare for embryo implantation. The period during which the endometrium becomes suitable for blastocyst implantation in the secretory phase of the menstrual cycle is referred to as the "window of implantation." Successful implantation depends on a reciprocal synchronization between the endometrium and the blastocyst (Norwitz et al., 2001). Any morphological or genetic defect in either the endometrium or the embryo during this process can result in implantation failure. Implantation failure can occur due to either embryonic or maternal factors (Guffanti et al., 2008). Recent studies have focused on structural and molecular changes that affect endometrial receptivity, and it has been reported that approximately two-thirds of implantation failures are due to endometrial factors (Sehring et al., 2022). These endometrial factors may include endometrial thickness, uterine contour irregularities, or inadequate endometrial maturation; however, it is also known that molecular changes occurring during this period are crucial for successful blastocyst implantation. Some of the ultrastructural changes observed in secretory phase endometrial cells during the implantation window include giant mitochondria and subnuclear glycogen accumulations, which appear during the early luteal phase, as well as pinopodes and nucleolar channel systems (NCS) that emerge concurrently with the implantation window (Nikas et al., 1995).

In cases of unexplained and recurrent implantation failures, the assessment of endometrial receptivity during in vitro fertilization (IVF) cycles and the transfer of embryos to a receptive endometrium are becoming increasingly important. Studies have shown that the window of endometrial receptivity lasts approximately 24 to 48 hours (Bergh & Navot, 1992). The short duration of this window makes it challenging to determine endometrial receptivity. The transfer of a blastocyst to an asynchronous endometrium reduces implantation rates and increases pregnancy loss. The potential role of NCS as biomarkers of implantation in IVF treatment is strongly supported by the Endometrial Receptivity Analysis (ERA), which categorizes the menstrual cycle into proliferative, prereceptive, receptive, and postreceptive phases. ERA evaluates the genetic and molecular changes in endometrial biopsy samples obtained from patients to assess the suitability of cells and tissues for implantation (Meng et al., 2018). This approach enables personalized timing for endometrial receptivity.

1.3.The Role of Nucleolar Channel Systems in Implantation

The detection of Nucleolar Channel Systems (NCS) is proposed as a potential alternative for assessing endometrial receptivity. A study demonstrated that NCS can be identified in exfoliated epithelial cells obtained from uterine secretions, suggesting that these findings could provide a method for timing the receptive endometrium (Gerber et al., 2021). In recent years, the presence of NCS has been investigated in cases of unexplained infertility and recurrent implantation failure. Given that abnormal nucleolar activity can negatively impact oocyte quality and embryo development, NCS, particularly nucleolar dysfunction, may affect the implantation potential of oocytes and embryos. In this context, structural and functional abnormalities of NCS may contribute to the concept of unexplained infertility.

Recurrent implantation failure (RIF) is the occurrence of consecutive implantation failures in women under 40, despite the transfer of high-quality blastocysts in at least three IVF cycles (Aksak T, 2023). This situation requires a deeper understanding of the molecular and cellular mechanisms involved in implantation.

As a regulatory center for cellular growth and stress responses, the nucleolus plays a significant role in the interaction between the embryo and the uterus. Dysfunction of NCS in endometrial epithelial cells may prevent the embryo from developing in harmony with endometrial receptivity. Such dysfunctions can lead to the failure of the embryo to adhere to the uterus, resulting in recurrent implantation failures. It has been suggested that the use of various oral contraceptives and intrauterine devices may influence the timing and morphology of NCS formation in endometrial epithelial cells. In cases of unexplained primary infertility, a delay or complete absence of NCS development in endometrial epithelial cells has been observed as the only ultrastructural abnormality (Kittur et al., 2007; Guffanti et al., 2008). This suggests that NCS may play a critical role in preparing the uterine surface for embryo implantation and could serve as an important marker for human endometrial receptivity.

However, despite the available data on the ultrastructural details of this entity, the molecular characterization of NCS remains largely unclear. Therefore, further advanced research is required to gain a deeper understanding of the role of NCS in reproductive biology.

2. CONCLUSION

Nucleolar channel systems (NCS) are subcellular structures that may play significant roles in the implantation

process and the receptivity of the human endometrium. It is suggested that NCS could regulate critical cellular functions such as ribosomal RNA transcription, ribosome biogenesis, and protein synthesis during the preparation of the endometrium for embryo implantation. Moreover, the presence of NCS in the human endometrium during the window of implantation indicates that these structures may have unique and crucial roles in reproductive biology. Current research findings investigating the potential roles of NCS in the implantation process suggest that these structures may play a critical role in endometrial receptivity and blastocyst implantation. It is believed that NCS are particularly important in regulating ribosomal RNA (rRNA) transcription and ribosome biogenesis processes within endometrial epithelial cells. The observation of NCS in the human endometrium specifically during the window of implantation, and their absence in other mammalian species, suggests that these structures may be unique to human reproductive biology. However, the inability to study these structures in animal models has led NCS research to rely heavily on advanced technologies such as electron microscopy.

Two main hypotheses have been proposed regarding the functions of nucleolar channel systems (NCS). The first hypothesis suggests that NCS serve as a feedback mechanism between the cytoplasm and the nucleus, creating a microenvironment for the synthesis of specific RNA or proteins. The second, more widely accepted hypothesis proposes that NCS function as a specialized system for the rapid transport of newly synthesized mRNA. In this context, it is suggested that NCS may contribute to protein synthesis and transport processes, similar to the rough endoplasmic reticulum (rER) functions. However, the molecular characterization of NCS and their specific relationships with biochemical pathways remain largely unresolved, highlighting the need for further research. Particularly,

understanding the molecular characteristics of NCS could help clarify their potential use as biomarkers in reproductive health and infertility treatments. Advanced research is therefore essential to better elucidate the significance of NCS in reproductive biology and to uncover their functional roles.

REFERENCES

- Aksak, T. (2023). Immunohistochemical examination of MECA-79, $\alpha 4\beta 1$ integrin and MUC-2 expressions in the secretory phase endometrium of women diagnosed with recurrent implantation failure.(Thesis). <https://tez.yok.gov.tr/UlusalTezMerkezi/tezSorguSonucYeni.jsp>
- Bergh, P. A., & Navot, D. (1992). Ovarian hyperstimulation syndrome: a review of pathophysiology. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 9, 429-438.
- Clyman, M. J. (1963). A new structure observed in the nucleolus of the human endometrial epithelial cell. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 86(4), 430-432.
- Cornillie, F. J., Lauweryns, J. M., & Brosens, I. A. (1985). Normal human endometrium: an ultrastructural survey. *Gynecologic and obstetric investigation*, 20(3), 113-129.
- Dubrauszky, V., & Pohlmann, G. (1960). Strukturveränderungen am Nukleolus von Korpusendometriumzellen während der Sekretionsphase. *Naturwissenschaften*, 47(22), 523-524.
- Gerber, R. S., Buyuk, E., Zapantis, G., Lieman, H., & Meier, U. T. (2021). Presence of endometrial nucleolar channel systems at the time of frozen embryo transfer in hormone replacement cycles with successful implantation. *F&S Science*, 2(1), 80-87.
- Guffanti, E., Kittur, N., Brodt, Z. N., Polotsky, A. J., Kuokkanen, S. M., Heller, D. S., ... & Meier, U. T. (2008). Nuclear pore complex proteins mark the implantation window in human endometrium. *Journal of cell science*, 121(12), 2037-2045.

- Isaac, C., Pollard, J. W., & Meier, U. T. (2001). Intranuclear endoplasmic reticulum induced by Nopp140 mimics the nucleolar channel system of human endometrium. *Journal of cell science*, 114(23), 4253-4264.
- Kittur, N., Zapantis, G., Aubuchon, M., Santoro, N., Bazett-Jones, D. P., & Meier, U. T. (2007). The nucleolar channel system of human endometrium is related to endoplasmic reticulum and R-rings. *Molecular biology of the cell*, 18(6), 2296-2304.
- Kohorn, E. I., Rice, S. I., Hemperly, S., & Gordon, M. (1972). The relation of the structure of progestational steroids to nucleolar differentiation in human endometrium. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 34(2), 257-264.
- Meng, F., Zapantis, G., Williams, S. Z., Lieman, H. J., Buyuk, E., & Meier, U. T. (2018). Status of nucleolar channel systems in uterine secretions accurately reflects their prevalence—a marker for the window of implantation—in simultaneously obtained endometrial biopsies. *Fertility and sterility*, 109(1), 165-171.
- More, I. A. R., Armstrong, E. M., McSeveney, D., & Chatfield, W. R. (1974). The morphogenesis and fate of the nucleolar channel system in the human endometrial glandular cell. *Journal of ultrastructure research*, 47(1), 74-85.
- Nejat, E. J., Szmyga, M. J., Zapantis, G., & Meier, U. T. (2014). Progesterone threshold determines nucleolar channel system formation in human endometrium. *Reproductive Sciences*, 21(7), 915-920.

- Nikas, G., Drakakis, P., Loutradis, D., Mara-Skoufari, C., Koumantakis, E., Michalas, S., & Psychoyos, A. (1995). Implantation: Uterine pinopodes as markers of the 'nidation window' in cycling women receiving exogenous oestradiol and progesterone. *Human Reproduction*, 10(5), 1208-1213.
- Nilsson, O. (1962). Electron microscopy of the glandular epithelium in the human uterus: II. Early and late luteal phase. *Journal of ultrastructure Research*, 6(3-4), 422-431.
- Norwitz, E. R., Schust, D. J., & Fisher, S. J. (2001). Implantation and the survival of early pregnancy. *New England Journal of Medicine*, 345(19), 1400-1408.
- Novotný, R., Malínský, J., Oborná, I., & Dostál, J. (1999). Nuclear channel system (NCS) in normal endometrium and after hormonal stimulation. *Biomedical Papers*.
- Preston, C. C., Stoddard, A. C., & Faustino, R. S. (2022). A Transient Mystery: Nucleolar Channel Systems. In *Nuclear, Chromosomal, and Genomic Architecture in Biology and Medicine* (pp. 581-593). Cham: Springer International Publishing.
- Rossmann, M. G., & Arnold, E. (2006). Phase determination using NCS. *International Tables for Crystallography*. Vol. F. ch. 13.4, pp. 280-281.
- Rybak, E. A., Szmyga, M. J., Zapantis, G., Rausch, M., Beshay, V. E., Polotsky, A. J., ... & Meier, U. T. (2011). The nucleolar channel system reliably marks the midluteal endometrium regardless of fertility status: a fresh look at an old organelle. *Fertility and sterility*, 95(4), 1385-1389.

- Ryder, T. A., Mobberley, M. A., & Whitehead, M. I. (1995). The endometrial nucleolar channel system as an indicator of progestin potency in HRT. *Maturitas*, 22(1), 31-36.
- Sehring, J., Beltsos, A., & Jeelani, R. (2022). Human implantation: The complex interplay between endometrial receptivity, inflammation, and the microbiome. *Placenta*, 117, 179-186.
- Wang, T. (1987). Nucleolar channel system in the human fetal endometrium. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 24(4), 271-275.
- Wang, T., & Schneider, J. (1992). Origin and fate of the nucleolar channel system of normal human endometrium. *Cell Research*, 2(2), 97-102.

LİKENLEŞMİŞ MANTARLAR (LİKENLER)

Merve YİĞİT*¹

Mehmet Gökhan HALICI²

1. GİRİŞ

Likenleşmiş mantarlar (likenler) oldukça renkli ve çeşitli olmaları ile çarpıcı olmalarının yanı sıra hemen hemen Dünya'nın her yerinde yaşayabilmeleri, boyutları ve biçimleri ile benzersiz olmalarıyla da ön plana çıkmaktadır. En basit haliyle likenler mantarlar ve algler arasında bir simbiyozdur (Büdel ve ark., 2024).

Geçmişten günümüze likenleşmiş mantarların tanımlanmaları ve sınıflandırılmaları çeşitli şekillerde ele alınmıştır. İlk olarak “lichenes” terimi M. Ö. 4. yy'da Yunan Botanikçi Theophrastus tarafından kullanılmıştır. Theophrastus zeytin ağaçlarının kabuklarındaki belirgin büyümeyi belirtmek için kullandığı bu kavramı aslında günümüzde “ciğer otları” olarak bilinen grup için kullanmıştır. Bu kullanım, likenlerin şimdiki tanımına karşılık gelmemektedir. Daha sonra Tournefort *Elements de Botanique* isimli eserini hazırlarken “likens” kategorisi içerisinde birbirleriyle alakasız birkaç bitkiyi ele almıştır (Mitchell, 2007). Likenler ve mantarlar arasındaki ilişkiye ilk değinen botanikçi Antoine de Jussieu olmuştur. Jussieu 1730'da yaptığı makalede mantarlar hakkında “bitkilerde

¹ Dr., Erciyes Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, merveyigit@erciyes.edu.tr ORCID: 0000-0002-8082-8574.

² Prof. Dr., Erciyes Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, mghalici@erciyes.edu.tr, ORCID: 0000-0003-4797-1157.

* Corresponding author

benzediği ve karşılaştığı bir cins ararsanız, bunlar likendir” acıkması yapmıştır. Linnaeus, *Species Plantarum* (1753) eserinde likenleri kriptogami-alg sınıfında ele almıştır. Likenleri algler altında ele almıştır. Günümüzdeki liken tanımlaması ise ilk defa Eric Archarius tarafından yapılmıştır. İsveçli bir bilim insanı olan Archarius, bazı kaynaklarda likenolojinin babası olarak geçmektedir (Şen ve ark., 2014). Eric Archarius, *Lichenographia universalis* (1810) eserinde “tüm parçaların eksiksiz ve dikkatli bir incelemesinden özetlemek gerekirse, likenlerin diğer kriptogamik bitkilerden ayrı, özel, doğal bir grubu temsil ettiği sonucuna vardım” diyerek likenlerin farklı benzersiz yapılarına terminoloji oluşturmuş, birçok tür tanımlayarak yeni cinsler oluşturmuştur ve sonraki eserlerinde likenlerin ilk sınıflandırmalarını yapmıştır (Tripathi ve Joshi, 2009).

19 ve 20. yy’lar boyunca likenlerin tek bir bitki gövdesinden (tallus) oluştuğuna inanılmıştır. Likenlerin “ikili doğasının” keşfi 1866 yılında yapılmıştır. Anton de Bary, 1866’da likenlerin tek bir organizma değil, yakın bir ilişki içinde bir mantar ve bir algden oluşan birliktelik olduğunu söylemiştir. 1867’de ise Alman botanikçi Schwendener kanıtlar sunarak likenlerin “alg” ve “mantar” birlikteliğinden oluşan ikili doğasını açıklamıştır (Stephenson, 2010). Böylece likenler Üçüncü Uluslararası Botanik Kongresi tarafından uygulanan Uluslararası Botanik Adlandırma Kodu kapsamında Mantarlar alemi altında yer almaya başlamıştır (Voss ve ark., 1983)

Yakın zamanda yapılan bir çalışmada ise birçok liken türünün bir Ascomycetes’in yanı sıra belirli Basidiomycetes mayalarını da içerdiği ortaya çıkmıştır (Spribille ve ark., 2016). Likenlere dair bu son bulgu ile likenler üç ya da daha fazla organizma temelinde tanımlanmaya başlamıştır.

2. LİKENLEŞMİŞ MANTAR

Likenler, üç ya da daha fazla organizmanın kolayca tanınabilen ancak benzersiz olan vejetatif tallus yapısını oluşturduğu simbiyotik birlikteliklerdir. Bu birliktelikte “mikobiyont” olarak adlandırılan bir mantar ortağı, “fotobiyont” olarak adlandırılan bir yeşil alg ve/veya siyanobakteri ile bir maya ortak bulunmaktadır.

Liken birlikteliği mikobiyont, fotobiyont ve diğer mikroskobik organizmalar arasında olağanüstü derecede başarılı, kendi kendini destekleyen birlikteliklerdir. Mantar ortak barınak sağlamakta ve dış yapıyı oluşturmaktadır. Fotosentetik fotobiyontlar, fotosentetik olmayan bakteri ve mayaları ve bazen diğer mantarları sarmaktadır. Likenlerde mantar ortak ile fotosentetik ortak arasındaki ilişki çeşitli biçimlerde ele alınmaktadır (Nash, 2008). Bazen ortakların her ikisinin de fayda sağladığı bir mutualizm olarak kabul edilir. Fotosentetik ortak kurumaktan korunurken, mantar ortak karbonhidrat kazanır. Alternatif olarak ikili mantar ortağın yarar sağladığı ancak fotobiyontun yalnızken olduğundan daha az ve yavaş gelişerek kayba uğradığı kontrollü bir parazitizm olarak da ele alınabilmektedir. Ekolojik bir bakış açısı ile ortaklar arasındaki ilişki genelde mutualisttir. Çünkü liken tallusu içerisinde ortaklar bir arada tek başlarına olacağından daha fazla hayatta kalma yetisine sahiptir ve daha bol bulunabilmektedir (Will-Wolf ve ark., 2004). Özetle liken birlikteliği ekolojik olarak zorunlu, kararlı ve mutualist bir simbiyozdur. Birliktelik organizmadan ziyade bir “ekosistem” olarak görülebilir (Hawksworth, 2021).

Likenler, mantar aleminde sınıflandırılmaktadır. Dünyanın her yerinde bulunmaktadır. Tür sayısı tahminleri 15.000 ile 20.000 tür arasındadır. Dünyanın birçok bölgesi yetersiz bir şekilde toplandığından, tür sayısının daha yüksek olduğu düşünülmektedir. Birçoğu belirli ekosistemlere özeldir ve

yalnızca manzaralarda nadiren görülürken, diğerleri doğada nadirdir (Bhagarathi ve ark., 2022). Bilinen likenlerin neredeyse tamamı Ascomycetes'dir. Ascomycetes mantarlarının neredeyse yarısı liken birlikteliğindedir. Ek olarak Basidiomycetes ve Deuteromycetes'e ait birkaç likenleşmiş mantar da bulunmaktadır (Nash, 2008).

Likenlerin yapısına katılan fotobiyontların büyük bir kısmı ökaryotiktir. Bilinen likenlerin %90'ında fotobiyont ortak yeşil algtir. *Trebouxia* cinsi en yaygın görülen fotobiyonttur. Likenlerin kalan kısmında (%8-10) ise prokaryotik fotobiyont olarak siyanobakteriler görülmektedir. En yaygını *Nostoc*'dur (Nash, 2008). Bir tallus genellikle bir mantar türü, bir siyanobakteri veya bir alg türünden oluşur. Binlerce mantar türünün yanı sıra yalnızca 150-200 kadar fotobiyont türü liken simbiyozuna katılabilir (Will-Wolf ve ark., 2004).

Yaşam alanları ve habitatlarına göre likenler üç ana morfolojik gruba ayrılırlar. Bunlar kabuksu, yapraksı ve dalsıdır. Kabuksu tallus alt yüzeyinde korteks olmayan, sıkı bir şekilde bulunduğu yüzeye bağlanan ve farklılaşmanın az olduğu formdur. Yapraksı tallus en iyi bilinen tallus şekli olup; mikobiyontun oldukça organize olduğu, dallanmanın çeşitli düzeylerde olabildiği ve üstünde bulunduğu yüzeye yalnızca kısmen bağlı yassı lobları olan yaprağa benzeyen formdur. Dalsı tallus ise üç boyutlu düzleme yayılmış yaprak benzeri yapılar, dallar ve saplar ile ciddi düzeyde farklılaşmış formlardır (Nash, 2008). Bu üç ana morfolojik grubun yanı sıra türe özgü morfoloji bazı kaynaklarda beş kategoride ele alınmaktadır. Kabuksu, yapraksı ve dalsı formların yanı sıra iç içe geçmiş mantar hifleri ve alg hücrelerinin unsu parçacıklarından oluşan leproz ve tallusun küçük pullar şeklinde katmanlar oluşturduğu pulsu talluslar da mevcuttur (Will-Wolf ve ark., 2004).

**Resim 1. Likenlerde üç yaygın büyüme formu. Soldan sağa:
Kabuksu, yapraksı ve dalsı**



Likenler tür çeşitliliği ve kantitatif zenginlik bakımından dünyadaki karasal ekosistemin %8'ine hakimdir (Nash, 2008). Zorlu ve aşırı çevre şartlarına dayanıklı olduklarından, özellikle yüksek enlemlerde zorlu şartların olduğu yerlerde vejetasyonun dominant bileşenini oluştururlar (Longton, 1988). Likenler tropik yaprak, zor şartlara maruz kalan harç, asbest ve kaya yüzeyleri ile tundra gibi habitatlarda bulunabilmektedir (Skye, 1979; Szczepaniak ve Biziuk, 2003). Likenler kutuplarda çöllere ve çöllerden tropik bölgelere kadar neredeyse bütün karasal habitatlarda yaşamaktadır. Hem alg hem de mantar ortağı normalde ılımlı ve nemli ortamları tercih ederken, simbiyotik birlikteliğin bir getirisi olarak, ayrı ayrı iken hiç bulunamadığı ya da nadir yaşayabildiği habitatlarda hayatta kalabilmektedir (Nash, 2008). Yapılan çalışmalar likenlerin yalnızca dünyada değil, diğer gezegenlerde de hayatta kabileceğini göstermektedir. De Vera (2012) *Circinaria fruticosa*, *Rhizocarpon geographicum* ve *Xanthoria elegans* gibi liken türlerini uzay simulasyonu kullanarak Mars atmosferine maruz bırakmış ve likenlerin hayatta kalabildiklerini göstermiştir. Diğer bir çalışmada Sancho ve ark. (2007) uzay aracı ile bazı liken türlerini uzaya göndermiş ve uzayda bu liken türlerinin hayatta kalabildiklerini göstermişlerdir.

Likenlerin mevcudiyetini ve bolluğunu etkileyen ana etmenler şu şekildedir:

1. Alt tabaka kimyası, uzun ömürlülüğü ve kararlılığı
2. Işık
3. Nem

Işığın bolluğu daha büyük ve daha hızlı büyüyen likenler ile doğrudan ilişkilidir. Öte yandan likenlerin büyümesini destekleyen yaygın substratlar arasında odun, odunsu bitki kabuğu ve kaya yüzeylerinin yanı sıra ölü organik madde, toprak ve geniş yaprak dökmeyen yapraklar da vardır. Türlerin birçoğunun bazı belirli habitat ve substrat tercihi vardır ve habitat ve substrat özgüllüğü türlere göre değişiklik gösterir. Odun kabuğu üzerinde bulunan likenler konak ağacın yüzeyinden az miktarda karbonhidrat elde edebilmektedir. Ayrıca likenler omurgasızlar için yiyecek görevi ve mikro habitat işlevi görebilmektedir. Ağaçlarda ve karada bulunan likenler geyik, karibu ve ren geyiği gibi memeli otçullar için önemli besin kaynaklarıdır. Bazen memeli ve kuşlar tarafından yuva malzemesi olarak da kullanılabilmektedir (Will-Wolf ve ark., 2004).

Likenler poiklohidrik organizmalardır. Kurumayı engelleyecek bir mekanizmaları yoktur. Bu nedenle bulundukları ortam kurduğunda kuruyarak uykuda kalmakta ve su mevcudiyeti durumunda yeniden su alarak hayatlarına devam etmektedirler. Yalnızca yağmur ya da tozdan gelen çok az miktardaki besin ve nem ile hayatta kalabilmektedir. Genellikle su buharı, sis ve aerosol yoluyla tallus yüzeylerinden direkt su absorbe edebilmekte ve kuru alanlarda bu şekilde uzun süre hayatlarını sürdürebilmektedir. Suyun yılın sadece belli dönemlerinde olduğu ya da günlük kısa süreli suya erişim sağlanabilen orman gölgeliklerinde, ağaç kabuklarında ve çıplak kayalarda bile hayatta kalabilmektedir. Türlerin birçoğu çok sert çevre şartlarında ve düşük sıcaklıklarda da yaşamlarını sürdürebilmektedir (Søchting, 1999).

Likenler tıpkı basit organizasyonu diğer bitki grupları gibi vejetatif, eşeysiz ve eşeyli üreyebilmektedir. Eşeysiz üremenin bir çeşidi olan vejetatif üremeleri izid, sored, hormosist, goniosist, blastid, dikenler ve parçalanma ile mümkündür. Eşeysiz üremeleri konidyum ve konidyosporlarla gerçekleşmektedir. Eşeyli üremeleri ise peritesyum ve apotesyum içerisinde üretilen bazidio ve askosporlar ile mümkün olmaktadır. Eşeyli üreme ile sadece mikobiyonların eşeyli üremesinden bahsedilmektedir (Tripathi ve Joshi, 2019).

Likenler “liken asitleri” şeklinde adlandırılan alg ve mantar arasındaki benzersiz birlikteliğe özgü, yalnızca likenlerde bulunan ve ilaç üretimi gibi amaçlarla kullanılabilen bir grup sekonder bileşik üretmektedir. Genel olarak 200’den çok sekonder bileşik bilinmektedir ve bunların altmıştan fazlası likenler tarafından üretilmektedir (Rundel, 1978; Gilbert, 2000). Mantar kökenli bu ikincil metabolitler tallusun kuru ağırlığının %20’si kadar olabilmektedir. Sentezlenmeleri üç metabolik yolla olmaktadır: (1) şikimik asit yolu, (2) mevalonik asit yolu ve (3) asetil polimalonil yolu (Boustie ve Grube, 2005). Kimyasal yapısına göre ikincil metaboliklerin çoğu kinonlar (parietin), pulvinik asit türevleri, fenolik bileşikler (β -orsinol ve orsinol türevleri), laktonlar (nephrosterinik asit ve protolikenesterisnik asit), dibenzofuranlar (usnik asit), depsonlar (pikrolikenik asit), depsidonlar (salazinik asit) ve depsidler (barbatik asit) şeklindedir (Shukla ve ark., 2010). İkincil metabolitlerin büyük bir kısmı medulla bölgesinde bulunmaktadır ve renksizdir. Bu metabolitlerden bazıları ise likenlerin tallusunda korteks kısmında bulunabilir ve likenlerin sarı, yeşilimsi, kırmızı ya da kahverengi gibi oldukça geniş bir renk yelpazesinde olmasından sorumlu olan pigmentlerdir. Likenlerin büyük bir kısmı taksonomide kemotaksonomi olarak isimlendirilen özel metabolitler üretebilmektedir. Bu bağlamda metabolitler bazen bir liken türünün belirlenmesinde rol oynayabilmektedir.

Likenlerdeki bu metabolitler ince tabaka kromatografisi, mikrokristalografi, yüksek performanslı sıvı kromatografisi ve nokta testleri ile belirlenebilmektedir. “Spot” test olarak da bilinen nokta testlerinde liken tallusu ya da diğer kısımlarına doğrudan potasyum, fenildiamin, iyot ve klor gibi maddelerin damlatılması ve renk değişimi temeline dayanarak ön fikir oluşmasına fayda sağlamaktadır. Mikrokristalografi mikroskop altında görülebilen kristal şeklinden bileşikleri tanımlarken, ince tabaka kromatografisi standart protokoller ile yaygın şekilde kullanılmaktadır. Modern spektrofotometrik tekniklerin geliştirilmesi ile uygulanan LC-MS/MS ve GC-MS gibi teknikler de biyoaktif bileşiklerin karakterizasyonunda yüksek verime sahiptir. Ayrıca bu bileşenleri içeren liken kısmına karşılık gelen maddelerin çoğu uzun ya da kısa dalga UV lambalarının sarı, mavi-beyaz ya da beyaz renklerde parlaması ile ayrılabilir. Rutin bir şekilde bu testlerin hepsi liken metabolitlerinin tanınması ve likenlerin tanımlanmasında kullanılmaktadır (Tripathi ve Joshi, 2019).

Likenler radyonükleidler ve ağır metaller için yüksek biriktirme kapasiteleri ve atmosferdeki besine bağımlı olmaları nedeniyle atmosferik eser element kirliliği için etkin toplayıcılardır. Çünkü bunlarda kütikül ya da kök sistemi yoktur. Bu bağlamda biyomonitor ve biyoindikatör olarak kullanımları oldukça yaygındır (Eckl ve ark., 1984; Conti ve Cecchetti, 2001; Thakur ve ark., 2024).

Likenler iklim değişikliği bağlamında da oldukça önemlidir. İklim değişikliğine hızla yanıt verdiği görülmüştür. Son yıllarda çok sayıda çalışma likenleri küresel ısınma ve iklim değişikliği bağlamında ele almıştır. Günümüze kadar iklim değişikliği nedeniyle ciddi bir tehdit altında olan hiçbir liken bildirilmemiştir. Ancak öngörülen iklim değişikliği ve habitat tercihlerine bakılarak likenlerin dağılım ve oluşumlarında iklim değişikliği nedeniyle belirgin değişimler görülmüştür. Çoğu

kriptogam gibi likenler kara hayvanları ve fanerogramlardan daha yaygın olma eğilimindedir. Ancak birçok tür subtropikal ve ılımana yakın bölgelerde daha hızlı yayılma yeteneği göstermektedir (Approot ve ark., 2021).

Likenler ekonomik anlamda da oldukça önemlidir. Yüzyıllardır parfümeri, dekorasyon, gıda, boyama ve ilaç endüstrisinde kullanılmaktadır. Doğal boya olarak likenlerden elde edilen boyalar sanayi devriminde oldukça önemlidir. Tekstil malzemelerinin boyanmasında likenler önemlidir ve en eski zamanlarda ipeğin ve yünün boyanmasında kullanıldığı bilinmektedir. Asırlardır dünyanın birçok yerindeki farklı kültürdeki insanların likenleri gıda olarak yediği ya da içtiğine dair kanıtlar görmek mümkündür. Herhangi bir toplumda diyetin önemli bir kısmını oluşturmada da, diğer yiyecek kaynaklarını artırmak için kullanılan ve son çare olarak yenilen besinler olmuştur. Kıtlik dönemlerinde yendiğine ve İncil’de geçen manna’nın bir liken olduğuna dair iddialar vardır. Hindistan’da köri olarak kullanılan liken türleri bulunmaktadır. Fransa’da pasta yapımında ve çikolata imalatında kullanıldığı görülmektedir (Elkhateeb ve ark., 2022).

Yüz ve vücut losyonları, parfümler, deodorantlar ve bebek kremlerinde yaygın katkı maddeleri olarak halen kullanılmaktadır. Yapılan bir çalışmada liken türev bileşenlerini açıkça listeleyen 90’dan fazla deodorant, parfüm ve kolonya olduğu belirlenmiştir (Schalock, 2009). İlaç endüstrisinde ise biyolojik aktiviteleri nedeniyle kullanılmaları konusunda potansiyel büyüktür. Likenler geçmişten bu yana etnolikenoloji kapsamında sindirim sistemi ve akciğer rahatsızlıkları için kaynatılarak içilebilmekte; yara pansumanında kanamayı durdurmak ve dezenfektan amaçlı kullanılabilenekte; geleneksel tıp kapsamında solucan, enfeksiyon, kuduz, farenjit, cüzam, böbrek hastalıkları, kabızlık, alopesi, artrit gibi hastalık tedavisinde kullanılmaktadır. Biyolojik aktiviteleri ve farmasötik

potansiyelleri günümüzde halen araştırılmaktadır (Elkhateeb ve ark., 2022). Yüksek farmasötik potansiyelleri keşfedilmeye devam edilmektedir. Endüstriyel üretimleri henüz ilerlememiştir ancak ikincil metabolit analizleri sürmektedir. Çok yavaş büyümeleri nedeniyle endüstride kullanımları hala sorunludur. Bol miktarda biyokütle üretiminin laboratuvar koşullarında yapılması çözüldüğünde içerdikleri önemli bileşikler ile insan yaşamına katkılarının ne denli büyük olacağı tartışılmazdır.

3. SONUÇ

Likenler, alg, mantar ve mayaların oluşturduğu oldukça başarılı simbiyotik birlikteliklerdir. Geçmişten günümüze sınıflandırmaları ve tanımlanmaları defalarca değişmiş, moleküler yöntemlerin ortaya çıkması ile daha net bir hal almaya başlamıştır. Ancak günümüzde halen türlerin tespit edilmesi ve sınıflandırılması oldukça zahmetli ve uğraştırıcıdır.

Likenler tanımlanırken dış ve iç görünüşleri, kimyasal yapıları gibi birçok özelliğinden faydalanılmaktadır. Morfolojik ve anatomik karakterleri arasında tallus renk, form ve uzunluğu, dalların şekli ve kalınlığı, vejetatif propagüllerin varlığı, tallus korteks yapısı, kalınlığı, örneğin coğrafik olarak dağılışı, kesit olarak incelenebilecek olan parafiz özellikler, askusun kaç spor içerdiği, askosporların uzunluk ve genişlikleri, hipotesyum, himenyum ve epihimenyum renk ve kalınlıkları ve piknidyum, peritesyum ve apotesyum çapları gibi birçok karakter vardır. Bunlar likenlerin sınıflandırılmasında önemli olsa da yeterli değildir. Bu bağlamda günümüzde likenlerin tanımlanmasında moleküler yöntemler kullanılmaktadır. Böylece anatomik ve morfolojik açıdan çok benzeyen popülasyonlar bile moleküler çalışmalarla ayırtılabilmektedir. Tanımlama için kullanılan karakterler birçok durumda ayırt edilmesi zor karakterler olmakta ve kimyasal karakterler de ayrımı netleştirmede yetersiz

kalabilmektedir. Bu bağlamda geleneksel fenotip temelli yaklaşımların yanı sıra moleküler yaklaşımın esas alınması ve DNA barkodlamanın kullanımı önerilmektedir.

Çalışmada özetlendiği üzere likenler oldukça önemli canlılardır. Orman ekosistemlerinde önemli rol oynamakta, hayvanlar için yem olabilmekte, kuşlar için yuva materyali olmakta, omurgasızlar için yaşam alanı olabilmekte, besin döngüsüne katılmakta, ekonomik kullanımları ile ekonomiye fayda sağlamaktadır. Ancak sayıları gün geçtikçe azalmaktadır ve liken türlerinin birçoğu daha nadir hale gelmektedir. Çünkü yaşam alanları değişmekte ve yok edilmektedir. Eski herbaryumlarda bugün var olmayan türlere rastlanabilmektedir. Likenlerin azalışında trafik nedeniyle hava kirliliği, endüstriyel ve evsel yanma, elektrik santralleri, egzotik ağaç türleriyle ağaçlandırma nedeniyle habitatların kaybolması ve değişmesi, sokaklar ve caddeler boyunca ağaçların kesilmesi, monokültür plantasyon uygulamaları, orman yangınları, orman alanlarının tarım alanına dönüştürülmesi ya da ormansızlaştırma gibi birçok nedenden kaynaklanmaktadır. Oldukça önemli olan likenlerin korunması için Moore (2001) şu stratejileri önermektedir:

- Kamu eğitimi
- Likenolog ve mikologların korunması
- Doğal toplulukların ve çevresinin korunması ve böylece habitatların korunması
- Likenolojik veya mikolojik rezervlerin yerinde korunması
- Liken açısından elverişli arazi uygulamalarının yapılması
- Uluslararası ve ulusal mevzuatlara likenlerin korunmasına dair maddelerin eklenmesi

- Uluslararası iş finansmanı ve araştırmalar ile likenlerin korunmasına yönelik çalışmalar yapılması

KAYNAKÇA

- Aptroot, A., Stapper, N. J., Košuthová, A., & van Herk, K. C. (2021). Lichens as an indicator of climate and global change. In *Climate Change* (pp. 483-497). Elsevier.,
- Bhagarathi, L. K., Maharaj, G., DaSilva, P. N., & Subramanian, G. (2022). A review of the diversity of lichens and what factors affect their distribution in the neotropics. *GSC Biological and Pharmaceutical Sciences*, 20(3), 027-063.
- Boustie, J., & Grube, M. (2005). Lichens—a promising source of bioactive secondary metabolites. *Plant Genetic Resources*, 3(2), 273-287.
- Büdel, B., Friedl, T., & Beyschlag, W. (Eds.). (2024). *Biology of algae, lichens and bryophytes*. Springer Spektrum.
- Conti, M. E., & Cecchetti, G. (2001). Biological monitoring: lichens as bioindicators of air pollution assessment—a review. *Environmental pollution*, 114(3), 471-492.
- De Vera, J. P. (2012). Lichens as survivors in space and on Mars. *Fungal Ecology*, 5(4), 472-479.
- Elkhateeb, W. A., El-Ghwas, D. E., & Daba, G. M. (2022). Lichens uses surprising uses of lichens that improve human life. *Journal of Biomedical Research & Environmental Sciences*, 3(2), 189-194.
- Gilbert, O. L. (2000). *Lichens* (Vol. 86). Harpercollins Pub Ltd.
- Hawksworth, D. L. (2021). Lichens. *eLS*, 2(7), 1-13.
- Longton, R. E. (1988). *Biology of polar bryophytes and lichens*. CUP Archive.
- Mitchell, M. E. (2007). Signposts to symbiosis: a review of early attempts to establish the constitution of lichens. *Huntia*, 13(2), 101-120.

- Moore, D. (Ed.). (2001). *Fungal conservation: issues and solutions* (No. 22). Cambridge University Press.
- Nash, T. H. 2008. *Lichen biology* (2nd edition). Cambridge University Press.
- Rundel, P. W. 1978. The ecological role of secondary lichen substances. *Biochemical Systematics and Ecology*, 6(3), 157-170.
- Sancho, L. G., De la Torre, R., Horneck, G., Ascaso, C., de los Rios, A., Pintado, A., Schuster, M. (2007). Lichens survive in space: results from the 2005 LICHENS experiment. *Astrobiology*, 7(3), 443-454.
- Schalock, P. C. (2009). Lichen extracts. *Dermatitis*, 20(1), 53-54.
- Shukla, V., Upreti, D. K., Patel, D. K., & Tripathi, R. (2010). Accumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons in some lichens of Garhwal Himalayas, India. *International Journal of Environment and Waste Management*, 5(1-2), 104-113.
- Skye, E. (1979). Lichens as biological indicators of air pollution. *Annual Review of Phytopathology*, 17(1), 325-341.
- Søchting, U. (1999). *Lichens of Bhutan – biodiversity and use*. Botanical Institute, University of Copenhagen, Denmark.
- Spribille, T., Tuovinen, V., Resl, P., Vanderpool, D., Wolinski, H., Aime, M. C., Schneider, K., Stabentheiner, E., Toome-Heller, M., Thor, G., Mayrhofer, H., Johannesson, H., McCutcheon, J. P. (2016). Basidiomycete yeasts in the cortex of ascomycete macrolichens. *Science*, 353(6298): 488-492.
- Stephenson, S. L. (2010). *The kingdom fungi: The biology of mushrooms, molds, and lichens*. Timber Press.

- Szczepaniak, K., & Biziuk, M. (2003). Aspects of the biomonitoring studies using mosses and lichens as indicators of metal pollution. *Environmental Research*, 93(3), 221-230
- Şen, H., Aksoy, A., Çobanoğlu, G., & Selvi, S. (2014). Natural dyeing works on some lichens species distributed in Ayvacık (Çanakkale) and İvrindi (Balıkesir/Turkey). *Biological Diversity and Conservation*, 7(3), 184-189.
- Thakur, M., Bhardwaj, S., Kumar, V., & Rodrigo-Comino, J. (2023). Lichens as effective bioindicators for monitoring environmental changes: a comprehensive review. *Total Environment Advances*, 200085.
- Tripathi, M., & Joshi, Y. (2019). *Endolichenic fungi: present and future trends*. Springer.
- Voss, E. G., Burdet, H. M., Chaloner, W. G. (1983). International code of botanical nomenclature, adopted by the thirteenth international botanical congress, Sydney, August 1981.
- Will-Wolf, S., Hawksworth, D. L., Mccune, B., Rosentreter, R., & Sipman, H. J. (2004). Lichenized fungi. In *Biodiversity of fungi* (pp. 173-195). Academic Press.

BİTKİ GELİŞİMİNDE ÇEVRESEL FAKTÖRLERE KARŞI NANOPARTİKÜLLERİN KULLANIMI

Ekrem BÖLÜKBAŞI¹

Mustafa Sami ATA²

1. GİRİŞ

Nanopartiküller (NP'ler) bu yüzyılın en çok çalışılan malzemelerinden biridir. Bu malzemeler, “nanoteknoloji” olarak bilinen yeni bir bilim dalının doğuşuna yol açmıştır. NP'leri benzersiz kılan spesifik özelliklerinin başında, 1 ile 100 nm arasında değişen boyutlarıdır. NP'ler, büyük boyutlu malzemelerden elde edilebilse de, bu parçacıkların küçük boyut ve şekilleri, kimyasal etkilerini orijinal malzemelerinden tamamen farklı kılar (Brunner vd., 2006; Ata vd., 2024). NP'lerin daha küçük boyutları, belirli hücresel bölgelere nüfuz etmelerine yardımcı olur ve ilave yüzey alanı, maddelerin daha fazla adsorpsiyonunu ve hedeflenmiş dağıtımını kolaylaştırır. NP'ler volkanik toz, mineral bileşiklerde ve kömür yanması, dizel egzozu, kaynak dumanları gibi insan kaynaklı atık maddelerde de bulunur. Ayrıca, nanoskopik boyutlarda üretilen mühendislik ürünü NP'ler, genellikle dört türe ayrılır: karbon bazlı NP'ler, metal bazlı NP'ler, metal oksitler, dendrimerler ve kompozitlerdir (Yu-Nam ve Lead, 2008).

¹ Doç. Dr., Amasya Üniversitesi, Suluova Meslek Yüksekokulu, Çevre Koruma Teknolojileri, ekrem.bolukbasi@amasya.edu.tr, ORCID: 0000-0003-3828-1226.

² Dr. Öğr. Üy., Amasya Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Makine Mühendisliği, mustafa.ata@amasya.edu.tr, ORCID: 0000-0003-0944-4276.

Mühendislik ürünü NP'ler, hemen her bilim alanında devrim yaratmıştır ve elbette bitki bilimi de bu durumdan etkilenmiştir. Bu NP'lerin, bitkilerin yaşam döngüsünün her aşamasını etkilediği gösterilmiştir. Gübreler, bitkilerin büyüme ve gelişmesine yardımcı olan tarımın ayrılmaz bir parçasıdır. Ancak, son zamanlarda kullanılan nano-gübreler, geleneksel gübrelere kıyasla daha verimli alternatifler olarak kanıtlanmıştır. Nanopartiküllerin (NP'ler) daha küçük boyutu, ilave yüzey alanı sağlar ve bu da gübrelerin bitkiler tarafından daha fazla emilmesini artırır, böylece gübrelerin yıkanma, emisyonlar ve toprak mikroorganizmaları tarafından uzun vadeli kullanımı nedeniyle meydana gelen kayıpları azaltır. Ayrıca, nano-gübreler daha yavaş oranlarda salınır, bu da geleneksel kimyasal gübrelerin aşırı uygulanmasıyla ilişkili toksik etkileri azaltarak toprak verimliliğini korumaya yardımcı olmaktadır (Liu vd., 2006; Suman vd., 2010).

Bitkiler; kuraklık, tuzluluk, çeşitli kirlilik ve aşırı sıcaklık gibi olumsuz çevresel koşullardan kaçma veya saklanma şansına sahip değildirler. Bu stresler, çeşitli reaktif oksijen türlerinin (ROT) üretimini tetikleyerek oksidatif strese yol açar. Aşırı ROT birikimi, hücre zarlarına, proteinlere ve nükleik asitlere zarar verir ve büyümeyi baskılar (Begum vd., 2012). Oksidatif strese karşı koymak için bitkiler, süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), askorbat peroksidaz (APX), glutatyon redüktaz (GR) ve glutatyon, askorbat gibi enzimatik olmayan antioksidanlardan oluşan bir sistemle donatılmıştır ve bu sistem sürekli olarak zararlı ROT'ları yok eder. Buna karşın bitkiler, osmotik stresle mücadele etmek için trehaloz, poliyoller (gliserol, inositoller, sorbitoller vb.), amino asitler (prolin, glisin betain ve taurin) gibi organik ozmolitlerin birikimini artırarak hücrelerin normal hidrasyon seviyesini korurlar. Hipoksik koşullarda bitkiler yeterli oksijen temin edemezler ve bu da enerji tükenmesine neden olur. Ancak enerji seviyesini korumak için bitkiler metabolizmalarını

değiştirir ve karbonhidrat metabolizmasından fermentasyona geçerler. Metal stresine karşı koymak için bitkiler, toksik metallerin apoplazmada veya simplazmada sınırlandırılmasına ve tutulmasına neden olan metal şelatları, organik asitler ve polifosfatlar sentezlerler (Banti vd., 2013).

NP'lerin, bitki büyüme ve gelişmesindeki rollerinin yanı sıra çeşitli abiyotik streslere karşı bitkilerin korunmasında da önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. NP'ler, antioksidan enzimlerin aktivitelerini taklit eder ve bu ROT'ları temizler (Wei ve Wang, 2013).

Bununla birlikte, bitkilerin NP'lere tepkisi, bitki türüne ve uygulanan NP'lere bağlı olarak farklılık gösterir. Faydalarının yanı sıra, bazı NP'ler toksisite semptomları da gösterebilmektedir (Begum ve Fugetsu, 2012). NP'ler ayrıca biyotik ve abiyotik stres tepkileri, hücre biyosentezi, hücre organizasyonu, elektron taşınımı ve enerji yollarında yer alan gen ekspresyonunu değiştirir (Aken, 2015).

2. NANOPARTİKÜLLERİN BİTKİ BÜYÜMESİNE ETKİLERİ

Doğal çevresel koşullarda büyüyen bitkiler, sürekli olarak çeşitli biyotik ve abiyotik stres faktörlerine maruz kalırlar. Abiyotik stresler açısından kuraklık, tuzluluk, ısı, soğuk, metal gibi bitkilerin yaşam döngüsünün çeşitli aşamalarında karşılaştığı yaygın stresler bulunmaktadır. Çeşitli çalışmalar, NP'lerin abiyotik streslerin ve stres kaynaklı değişimlerin hafifletilmesinde önemli rol oynadığını göstermektedir. Tohum çimlenmesi, bitkinin yaşam döngüsünün çevresel strese maruz kalan ilk aşamasıdır ve fidelerin başarılı bir şekilde yetişmesi, bitkinin optimum büyüme ve verimlilik kapasitesine sahip olmasını sağlar. Nano-TiO₂'nin su emilimine yardımcı olduğunu ve tohumların çimlenmesini iyileştirdiğini gözlemlemiştir. TiO₂

NP'leri, azot metabolizmasını ve fotosentezi artırarak bitki büyümesini iyileştirir (Mingyu vd., 2007). NP'lerin tohum çimlenmesi üzerindeki olumlu etkisi, aquaporinlerin, yani su geçirgenliğini düzenleyen ve tohum çimlenmesi ile bitki büyümesinde önemli rol oynayan su kanallarının düzenlenmesindeki rollerine de bağlanabilir (Heinen vd., 2009). Bitkilerin NP'lere maruz kalması, su kanal proteini ve hücre döngüsünü düzenleyerek daha iyi hücre büyümesi sağlayan genlerin aktif hale gelmesine neden olur; bu NP etkileri, bitkilerin iyileşmiş tohum çimlenmesi ve büyümesi olarak yansır (Khodakovskaya vd., 2012). Bunlara ek olarak, Lahiani vd. (2013) tarafından yapılan çalışmalarda da çok duvarlı karbon nanotüplerin (MWCNT'ler), tohum kabuğunda su kanalı proteinlerini kodlayan genlerin ifadesini düzenlediği tespit edilmiştir. Bu çalışmalar NP'lerin tohuma nüfuz ederek ve su emilimini artırarak tohum çimlenmesini iyileştirdiğini göstermektedir.

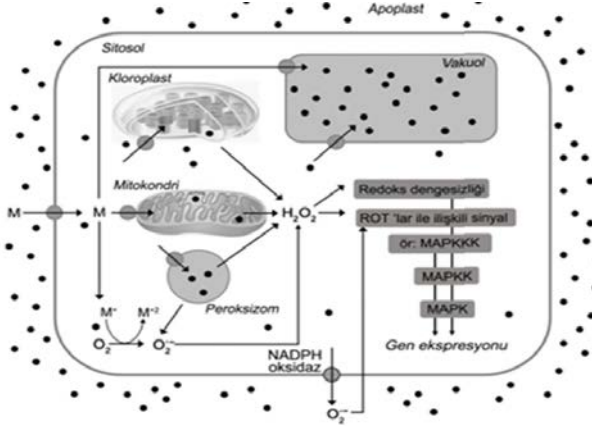
3. ABİYOTİK STRES ALTINDAKİ BİTKİLERDE NANOPARTİKÜLLERİN ETKİ MEKANİZMASI

Bitkiler, bir savunma birimleri ağına sahip olsa da, stres uyarısının savunma sistemine doğru algılanması ve iletilmesi ile bu savunma birimlerinin stres uyarısına karşı doğru zamanlama ve mekânda aktive edilmesi, bitkilerin hücresel makinelerinin korunması açısından kritik öneme sahiptir. Abiyotik stresler altında NP-bitki etkileşimi hakkında mevcut bilgileri incelediğimizde, ROT'un bitkilerin hemen hemen tüm streslere ortak bir yanıt olduğu açıkça görülmektedir. Bu ROT, bitkinin savunma sistemini aktive etmek için bir stres sinyali görevi görürken, aynı zamanda hücresel hasarı da artırır. Ancak NP'ler bir yandan ROT üretimini tetiklerken diğer yandan antioksidan

enzimlerin aktivitelerini taklit ederek ROT'u süzer. Bu iki yönlü etkinin sistematik olarak analiz edilmesi, NP'lerin ROT'a karşı nasıl koruma sağladığını ve aynı zamanda kendilerinin oksidatif stresi tetikleyici olarak nasıl hareket ettiğini anlamak için önemlidir.

Savunma sisteminin aktive edilmesi esas olarak belirli bir strese karşı moleküler prosesleri tetikleyen bir sinyal ağı tarafından gerçekleştirilir. Kalsiyum (Ca^{2+}) ikinci haberci olarak hareket eder ve çeşitli streslere karşı sinyal yanıtlarında önemli bir rol oynar. Stres uyarısının algılanması, Ca^{2+} depolarından sitozole doğru Ca^{2+} kanalları aracılığıyla hareket etmesini sağlar ve sitozolik Ca^{2+} konsantrasyonunu artırarak, Ca^{2+} bağlayan proteinler (CaBP'ler) tarafından algılanarak, gen ifadesindeki değişikliklere ve bitkilerin strese adaptasyonuna yol açan bir dizi biyokimyasal ve genetik süreçlerin başlamasına neden olur (Şekil 1)

Şekil 1. Abiyotik Stres Faktörlerine Bağlı Olarak Reaktif Oksijen Türlerinin (ROT) Oluşumu



Kaynak: (Sharma, 2008)

Pirinç köklerinde Ag-NP'lere yanıt veren proteinlerin çoğunlukla oksidatif stres yanıt yolu, Ca^{2+} düzenlemesi ve sinyal, transkripsiyon, protein bozulması, hücre duvarı sentezi, hücre

bölünmesi ve apoptoz ile ilişkili olduğunu gözlemlemiştir. Üretilen CaBP'lerin stres yanıtlarını düzenlediği ve aşırı ifade edilmesinin bitkilerde çeşitli abiyotik strese karşı direnç artışı sağladığı gösterilmiştir (Boudsocq ve Sheen, 2013).

Ancak, NP'lerin bitkilerdeki sinyal iletim mekanizmasının algılamadan gen ifadesine kadar olan tüm aşamaları üzerinde daha derinlemesine bir araştırma gerekmektedir. Ayrıca, NP'ler üzerindeki fitotoksinite çalışmalarında, hem toksik bileşikler hem de sinyal molekülleri olarak çift rol oynayan ROT'un artmış olduğu da gözlemlenmiştir. ROT'un çift rolü, hassas bir şekilde, üretim ve süzme arasındaki dengeye bağlıdır; bu iki süreç arasındaki herhangi bir dengesizlik, ya aşırı birikim ya da ROT'un azaltılmış bulunabilirliğine yol açarak oksidatif strese ya da sinyal bozulmasına neden olabilir.

4. STRES ALTINDA BİTKİLERDE FOTOSENTEZ VE NANOPARTİKÜLLERİN KULLANIMI

Fotosentez, bitkilerdeki tüm metabolik süreçlerin temelidir ve çevresel streslere karşı en hassas fizyolojik süreçlerden biri olarak kabul edilir. Bu nedenle, stres koşullarında optimal fotosentetik hızın korunması, bitkilerin hayatta kalabilmesi için hayati önem taşır. NP ile muamele edilen bitkiler, çeşitli abiyotik streslere karşı koruma göstermiş ve fotosentez hızı, stoma iletkenliği, transpirasyon hızı, su kullanım verimliliği, klorofil (Chl) ve prolin içeriği ile karbonik anhidraz aktivitesinde iyileşme sergilemiştir (Siddiqui vd., 2014).

Bilindiği gibi, ribüloz-1,5-bisfosfat karboksilaz/oksijenaz (Rubisco), daha yüksek bitkilerde fotorespirasyon ve fotosentetik CO₂ sabitlemesinin rekabetçi metabolik yollarındaki ilk adımları katalize eden enzimdir (Hong vd., 2005). Bununla birlikte,

Rubisco'nun aktivasyonunun düzenlenmesi, nükleer olarak kodlanmış bir kloroplastik enzim olan Rubisco-aktivaz (R-A) enzimine bağlıdır. Rubisco-aktivaz, Rubisco ile bir ara kompleks oluşturur ve Rubisco'nun RuBP'den ayrılmasına, aktif bölgelere CO₂'nin daha kolay ulaşmasına neden olur, bu da Rubisco'nun karboksilasyonunu artırır.

Ispanak bitkisinde yapılan çalışmada, NP-TiO₂'nin Rubisco ve R-A'nın aktivitelerini hızlandırdığını, Rubisco karboksilasyonunu aktive ettiğini ve böylece fotosentez hızının arttığını gözlemlemişlerdir (Gao vd. 2006). Buna karşılık, Gao vd. (2013), NP-TiO₂'nin *Ulmus elongata* fidanlarının fotosentetik kapasitesini azalttığını bildirmiştir.

Nanopartiküllerin fotosentezdeki rolü dikkate alındığında, abiyotik stres koşulları altında fotosentez üzerindeki etkilerini araştıran birçok çalışma yapılmıştır. Örneğin, silikon (Si) NP'lerinin tuz stresi altındaki kiraz domatesine uygulanması, fotosentez hızını, mezofil iletkenliğini ve su kullanım verimliliğini artırmıştır (Haghighi ve Pessarakli, 2013). Diğer bir çalışmada NP-SiO₂'nin kabak yapraklarında net fotosentez oranını, stomatal iletkenliği, transpirasyon oranını, su kullanım verimliliğini, toplam klorofil, prolin ve karbonik anhidraz aktivitesini artırarak bitkilerin tuz stresine karşı savunma mekanizmalarını geliştirdiğini bildirmiştir (Siddiqui vd. 2014).

5. ABİYOTİK STRES FAKTÖRLERİNE KARŞI BİTKİLERDE NANOPARTİKÜL UYGULAMALARI

Çeşitli hücre organelleri tarafından aşırı reaktif oksijen türleri (ROT) üretimi, abiyotik stres kaynaklı oksidatif stresin tipik bir etkisidir. ROT'un zararlı etkilerinin yanı sıra, hücre sinyal iletim yollarını aktive ederek ve birçok genin ekspresyonunu indükleyerek ya da baskılayarak çeşitli savunma

sistemlerini tetiklediği bilinmektedir (Hancock vd., 2001). Bununla birlikte, bitkiler zararlı ROT'u sürekli olarak temizleyen enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan sistemlerle donatılmıştır. Bu savunma sistemlerine rağmen, bitkiler, hücrel savunma sistemi abiyotik streslerin yıkıcı kapasitesinin gerisinde kaldığında, abiyotik streslerin olumsuz etkileriyle karşı karşıya kalır. Bu nedenle, stres kaynaklı hasarın başlamasından önce savunma sisteminin strese doğru zaman ve mekansal yanıt vermesi, bitkilerin stresli çevre koşullarında hayatta kalabilmesi için kritik öneme sahiptir.

Nanopartiküller, antioksidan enzimlerin aktivitelerini, osmolite, serbest amino asitler ve besin maddelerinin birikimini teşvik ederek, bitkileri çeşitli abiyotik streslere karşı korumada önemli bir rol oynar. Nanopartiküllerin abiyotik stresler faktörlerine karşı uygulandığı örnekler ve etkileri Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1. Nanopartikül Uygulaması Yapılan Bitki Örnekleri ve Elde Edilen Sonuçlar

Nanopartikül	Bitki Örneği	Abiyotik Stres Koşulu	Etkisi
TiO ₂	Buğday (<i>Triticum aestivum</i> L.)	Kuraklık	Büyüme, verim, glüten ve nişasta içeriğinde artış
ZnO	Soya Fasulyesi (<i>Glycine max</i>)	Kuraklık	Çimlenme yüzdesi ve hızı artışı, tohum kalıntısında taze ve kuru ağırlıkta azalma
Analsit	Buğday (<i>Triticum aestivum</i> L.), Mısır (<i>Zea mays</i> L.)	Kuraklık	Katalaz aktivasyonu, flavonoid ve karotenoid birikimi artışı, prolin birikimi azalması
Fe	Aspir (<i>Carthamus tinctorius</i> L.)	Kuraklık	Kuraklığın etkisini azaltma ve verim artışı
TiO ₂	Keten (<i>Linum usitatissimum</i> L.)	Kuraklık	Klorofil ve karotenoid içeriğinde artış, büyüme ve verim özelliklerinde iyileşme
TiO ₂	Fesleğen (<i>Ocimum basilicum</i> L.)	Kuraklık	Kuraklık stresinin olumsuz etkilerini azaltma

SiO₂	Alıç (<i>Crataegus sp.</i>)	Kuraklık	Fotosentetik hızda, stomatal iletkenlikte ve bitki biyokütlesinde pozitif etki
Fe	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Kuraklık	Plazma membranı H ⁺ -ATPaz aktivasyonu, normal kuraklık hassasiyeti korunması
Fe₂O₃	Ayçiçeği (<i>Helianthus annuus</i>)	Kuraklık	Kuraklık stresine karşı koyma, prolin ve amino asitlerde değişiklik olmaması,
Ag	<i>Carum copticum</i>	Kuraklık	Verim özellikleri ve su kullanma verimliliğinde anlamlı etki yok
SiO₂	Domates (<i>Lycopersicum esculentum</i>)	Tuzluluk	Düşük seviyelerde NP-SiO ₂ tohum çimlenme potansiyeli, kök uzunluğu ve kuru ağırlığı artış
SiO₂	Kabak (<i>Cucurbita pepo</i> L.)	Tuzluluk	Tohum çimlenme ve büyüme özelliklerinde iyileşme, malondialdehit, hidrojen peroksit ve elektrolit sızıntısında azalma
SiO₂	Bakla (<i>Vicia faba</i> L.)	Tuzluluk	Tohum çimlenme, büyüme, antioksidan enzim aktivitesi, göreceli su içeriği ve toplam verimde artış
ZnO ve Fe₃O₄	<i>Moringa peregrina</i>	Tuzluluk	Toplam klorofil, karotenoid, prolin, karbonhidrat, ham protein ve antioksidan içerikte artış
ZnO	Ayçiçeği (<i>Helianthus annuus</i>)	Tuzluluk	Büyüme, yapraklarda Na ⁺ içeriğinde azalma
SiO₂	Domates (<i>Solanum lycopersicum</i> L.)	Tuzluluk	Dört tuz stres geni (<i>AREB</i> , <i>TAS14</i> , <i>NCED3</i> ve <i>CRK1</i>) ekspresyonunda artış
Se	Salatalık (<i>Cucumis sativus</i> L.)	Soğuk	Bitkilerin kısa süreli soğuk stresi karşısında fizyolojik yanıtını düzenleme; yapraklarda prolin içeriğinde artış
TiO₂	Nohut (<i>Cicer arietinum</i> L.)	Soğuk	Antioksidan enzim aktivitelerinde artış
SiO₂	<i>Agropyron elongatum</i> L.	Soğuk	Tohum uyku halini aşma, tohum çimlenme ve fide ağırlığında artış
Ag	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Soğuk	Genlerde antioksidan aktivite artışı

TiO₂	Domates (<i>Lycopersicon esculentum</i>)	Isı	Fotosentezi düzenleyerek enerji dağılımını iyileştirme
Na₂SeO₄	Domates (<i>Lycopersicum esculentum</i>)	Yüksek ve düşük sıcaklıklar	Bitki büyümesi, klorofil ve yaprak göreceli su içeriğinde iyileşme
TiO₂	Alg (<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>)	Cd	Cd toksisitesini azaltma
Au³⁺	Bakla (<i>Vigna unguiculata</i>)	Au ³⁺	Toksik Au ³⁺ 'in toksik olmayan Au NP'lere dönüşmesi
Fe	Hint Hardalı (<i>Brassica juncea</i>)	Cr(VI)	Cr(VI)'in Cr(III)'e dönüşümünü hızlandırarak mikrobiyal aktiviteyi indüklemeye
TiO₂	Soya Fasulyesi (<i>Glycine max</i> L.)	Cd	Cd alımında artış, Cd toksisitesinin sınırlandırılması, lipid peroksidasyonunda ve prolin içeriğinde azalma

Kaynak: (Khan vd., 2017'den değiştirilerek)

5.1. Bitkilerde Kuraklık Stresi ve Nanopartikül Uygulaması

Kuraklık stresi, bitki üretimini ve dağılımını dünya genelinde sınırlayan antropojenik iklim değişikliğinin sonuçlarından biridir. Bitkilerde kuraklık kaynaklı tahribatla başa çıkmak için benimsenen çeşitli stratejiler arasında, nanopartikül kullanımı umut verici bir çözüm olmuştur.

Keten tohumları ile yapılan çalışmada; kuraklık stresi koşullarında NP-TiO₂'nin etkisini incelemiştirlerdir. Düşük dozda uygulanan NP-TiO₂'nin, keten tohumunun kuraklık stresi kaynaklı hasarını hafifletmede daha yüksek dozlara kıyasla daha iyi performans gösterdiği sonucuna varmışlardır (Khan vd., 2010) (Tablo 1).

Zaimenko vd. (2014), buğday ve mısırdaki analsit NP'lerinin uygulanmasının, fotosentetik pigmentlerin ve koruyucu antioksidanların birikimini artırarak kuraklık stresini önemli ölçüde hafiflettiğini bildirmişlerdir. Bununla birlikte,

analsitle muamele edilen kuraklık stresine maruz kalmış fidelerde prolin içeriğinde bir azalma kaydedilmiştir.

Demir elementi, çeşitli enzimlerin yapısında bulunur ve eksikliği kloroza yol açar. Zareii vd. (2014), demir NP'lerinin yapraktan uygulanmasının, asperde kuraklık stresinin olumsuz etkilerini azalttığını ve aspirin verim bileşenlerini iyileştirdiğini bildirmişlerdir. Benzer şekilde; Kim vd. (2015), demir NP'lerinin, plazma zarındaki H^+ -ATPazı aktive ederek *Arabidopsis thaliana*'da stomatal açılmayı aktive ettiğini gözlemlemişlerdir. Martínez-Fernández vd. (2015), NP- Fe_2O_3 'ün ayçiçeği bitkisinde kuraklık stresi belirtilerini önemli ölçüde hafiflettiğini bildirmiştir (Tablo 1).

5.2. Bitkilerde Tuzluluk Stresi ve Nanopartikül Uygulaması

Tuzluluk, esas olarak aşırı NaCl birikiminden kaynaklanır ve bitkilerde ozmotik ve iyonik stres yaratır. Ozmotik stres, bitkilerin su ve besin maddelerini alma yeteneğini azaltırken, sitozolde Na^+ 'nın aşırı birikmesi nedeniyle oluşan iyonik stres, düşük K^+/Na^+ oranına ve aşırı reaktif oksijen türleri (ROT) üretimine yol açar. Bu da biyolojik moleküllerde ciddi hasara neden olarak elektrolitlerin sızmasına ve sitozoldeki metabolik aktiviteleri olumsuz etkilemesine sebep olur (Ismail vd., 2014). Son yıllarda nanopartiküller, olumsuz çevre koşulları altında, tuz stresi de dahil olmak üzere, bitki büyümesi ve verimliliğini artırmak için önemli bir araç olarak kullanılmaktadır. Örneğin, Siddiqui vd. (2014), NP- SiO_2 ile yapılan uygulamanın kapak bitkisinde tuzluluğu önemli ölçüde hafiflettiğini, gözlemlemiştir. NP- SiO_2 'nin tuzluluğu hafifletici etkileri, Qados (2015) tarafından asma bitkisinde de bildirilmiştir. Nanopartiküllerin tuz stresini hafifletici etkisi, Almutairi (2016) tarafından NP- SiO_2 'nin tuz stresi genlerinin ekspresyonunu farklı şekillerde düzenlediği şeklinde de doğrulanmıştır (Tablo 1).

5.3. Bitkilerde Sıcaklık Stresi ve Nanopartikül Uygulaması

Sıcaklık stresi, tarım bitkilerinin sürdürülebilir büyümesini ve üretimini etkileyen önemli bir faktördür. Sıcaklık stresi hem yüksek sıcaklık hem de düşük sıcaklık stresini içerir. Yüksek sıcaklık stresi, bitki büyüme ve gelişimini geri dönülemez şekilde hasara uğratacak kritik bir sıcaklık eşiğinin ötesine geçen bir süre boyunca sıcaklığın artmasıdır. Soğuk stresi ise (0-15°C), bitki dokularında buz kristalleri oluşturmada yaralanmalara neden olan yeterince düşük sıcaklıklardan kaynaklanırken, donma stresi (<0°C) bitki dokularında buz kristallerinin oluşmasına yol açar (Hasanuzzaman vd., 2013) (Tablo 1).

Yapılan araştırmalarda; TiO₂ gibi nanopartiküllerin, bitki hücre zarında zararları azaltarak ve elektrolit kaçaklarını hafifleterek soğuk stresinin olumsuz etkilerini azaltma yeteneğine sahip olduğu belirtilmiştir (Mohammadi vd., 2013). Fotosentez, bitkilerin soğuk stresine en duyarlı süreçlerden biridir. Soğuk stresine maruz kalan bitkilerde klorofil (Chl) içeriği, CO₂ asimilasyonu, terleme oranı azalır ve Rubisco enzimi bozulur. Nanopartiküllerin fotosentez üzerindeki iyileştirici etkileri, Rubisco'nun karboksilasyonunun artması, kloroplastın ışık absorpsiyon kapasitesinin artması, elektron taşıma hızı ve kloroplastta ROT oluşumunun engellenmesiyle ilişkilidir. NP-TiO₂ uygulaması, Rubisco ve Chl bağlayıcı protein genlerinin ifade seviyesini artırarak, SOD, CAT ve APX aktivitelerini desteklemektedir. Ayrıca, nanopartiküllerin tek başına veya kısa süreli soğuk uygulamasıyla birlikte uygulanmasının, soğuk stresine maruz kalan bitkilerin büyüme, fizyolojik ve biyokimyasal özelliklerini iyileştirdiği gösterilmiştir (Haghighi vd., 2014) (Tablo 1).

5.4. Bitkilerde Metal Stresi ve Nanopartikül Uygulaması

Metal stresi dünya genelinde bitkilerde fitotoksosite ve büyüme inhibisyonuna neden olarak ciddi bir endişe haline gelmiştir. Metal toksisitesinin belirtileri ve buna bağlı bitki büyüme inhibisyonu, enzim aktivitelerinin baskılanması, temel elementlerin alımının bozulması ve bunun sonucunda oluşan eksiklik belirtileriyle gerçekleşir. Büyüme ortamında metallerin varlığı, aşırı ROT üretimini hızlandırarak oksidatif strese ve hücre yapısının, hücre zarının ve biyomoleküllerin denatürasyonuna yol açar. Ancak, bitkiler metal stresine karşı çeşitli savunma sistemleri geliştirmiştir. Bu savunma sistemleri arasında biyofiziksel bariyerler metal stresine karşı ilk savunma hattı olarak hizmet eder. Ayrıca, bitkiler metal-şelatları, organik asitler ve polifosfatlar biriktirerek metal alımını kısıtlar ve metal iyonlarının dışarı atılmasını sağlar. Ayrıca metallerin hücre içinde tutulması ve antioksidan savunma sisteminin aktivasyonu ile ROT'ları temizleyebilmektedirler. Ancak, bu savunma sistemlerinin zamanında ve hedefe yönelik aktivasyonu metal stresine karşı koymak için kritik öneme sahiptir.

Küçük boyutları ve geniş yüzey alanları sayesinde nanopartiküller (NP'ler) kontaminasyon bölgelerine kolayca nüfuz eder ve metallere karşı güçlü bir bağlanma eğilimindedirler. Worms vd. (2012), nanopartiküllerin stres metallerine bağlanarak Cu ve kurşun (Pb) gibi metallerin kullanılabilirliğini azalttığını ve hücre duvarının ek bir koruyucu bariyer görevi gördüğünü rapor etmiştir. Bununla birlikte, eğer metal biyofiziksel bariyerleri aşar ve hücreye girerse, bitkiler, metal kaynaklı ROT'un zararlı etkilerini hafifletmek için biyomoleküller, besinler biriktirerek ve hücresel savunma sistemini aktive ederek bu durumla başa çıkmaya çalışır. Birçok NP arasında, bitkilerde NP-TiO₂'nin rolü en kapsamlı şekilde incelenmiştir. NP-TiO₂'nin diğer stresler üzerindeki hafifletici

etkilerinin yanı sıra, kadmiyum (Cd) toksisitesini de kısıtladığı ve fotosentez ve bitki büyüme hızını artırdığı gözlemlenmiştir (Singh ve Lee, 2016). Tripathi vd. (2015), Si-NP'lerinin bezelye fidelerinde Cr(VI) fitotoksitesine karşı kapasitesini test etmiştir. Sonuçlar, büyüme ortamına Si-NP'lerinin eklenmesinin, bezelye fidelerini Cr(VI) fitotoksitesine karşı çeşitli yollarla koruduğunu göstermiştir (Tablo 1).

5.4.1. Nanopartiküller ve Fitoremediasyon

Nanopartiküller (NP'ler), bitkilerde metal kaynaklı toksisitenin hafifletilmesinin yanı sıra, metal iyonları için etkili adsorbanlar olarak, kontamine alanlardan metal uzaklaştırılması için kullanılan fitoremediasyon tekniğinde de faydalı bulunmuştur. Roy ve Bhattacharya (2012), sentezlenmiş NP-Fe nanopartiküllerinin potansiyel manyetik nano-adsorban olarak su içerisindeki metal iyonlarının uzaklaştırılmasında kullanılabileceğini göstermişlerdir. Silika/grafit oksit nano-kompozitleri, metal uzaklaştırılması için etkili bir adsorban olarak bulunmuş, grafit oksitin metal iyonlarının yaklaşık %90'ını uzaklaştırma kapasitesine sahip olduğu tespit edilmiştir (Sheet vd., 2014). NP-Fe'lerinin çiftlik gübresi ile birlikte uygulanması, mikrobiyal aktiviteyi teşvik ederek Cr(VI)'nın Cr(III)'e indirgenmesini artırmış ve hardal otu bitkilerinde Cr(VI)'nın biyo-yararlanımını azaltmıştır (Madhavi vd., 2013) (Tablo 1).

6. SONUÇLAR

Mevcut bilgiler, NP'lerin abiyotik stres kaynaklı hasarı, bitkilerin savunma sistemini aktive ederek hafiflettiğini göstermektedir. NP'lerin küçük boyutu, kolay penetrasyonu sağlar ve tohum çimlenmesini ve bitkilerin büyümesini destekleyen su kanallarını düzenlemektedir. Ayrıca, geliştirilmiş yüzey alanı daha fazla adsorpsiyon ve maddelerin hedefe yönelik taşınmasını kolaylaştırır. Öte yandan, NP'lerin ROT üretimini

tetiklediği ve bitkiler üzerinde çeşitli toksik etkiler sergilediği bildirilmiştir. NP'lerin artırdığı ROT seviyesi, bitkinin savunma sistemini daha etkili bir şekilde aktive edebilecek stres sinyalinin gúclendirilmesi ile ilişkilendirilebilir. NP'lerin etki mekanizması aşıından, mevcut bilgiler henüz yeni ve daha fazla araştırması gerekmektedir. Ancak, NP'lerin ya Ca^{2+} veya sitozoldeki sinyal moleküllerini taklit ettiği ve CaBP'ler veya diğer NP'lere özđü proteinler tarafından algılandığı anlaşılmaktadır. Sonuç olarak, bir dizi sinyal molekölünün indüksiyonu, gen ifadesini artırarak strese karşı toleransı yükselmektedir. Sonuç olarak bu bölümde belirtilen tüm bilgiler doğrultusunda elde edilen veriler NP'lerin bitki yetiştirilmesindeki etkin rolünü göstermektedir. Ancak NP'lerin bitkilerdeki rolü, alt hücresele ve molekülere seviyede daha fazla araştırma gerektirmekte olup, NP'lerin stres inhibe edicileri ve/veya stres indüktörleri olarak işlev görüp görmediğini belirlemek de ileri düzeyde çalışmalar yapılması gereğini açıkça belirtmektedir.

KAYNAKÇA

- Aken, B.V., (2015). Gene expression changes in plants and microorganisms exposed to nanomaterials. Curr. Opin. Biotechnol. 33, 206e219.
- Almutairi, Z.M., (2016). Effect of nano-silicon application on the expression of salt tolerance genes in germinating tomato (*Solanum lycopersicum* L.) seedlings under salt stress. Plant Omics J. 9, 106e114.
- Ata, M.S., Avuluğlu-Yılmaz, E., Polatçı, Ş., Bölükbaşı, E., (2024). An in vitro study: Assessment of gene expression changes induced by nanoparticles synthesized from *Cladonia subulata* lichen on colon cell lines. Int. J. Nat. Life Sci., 8(1), 23-35.
- Banti, V., Giuntoli, B., Gonzali, S., Loreti, E., (2013). Low oxygen response mechanisms in green organisms. Int. J. Mol. Sci. 14, 4734e4761.
- Begum, P., Fugetsu, B., (2012). Phytotoxicity of multi-walled carbon nanotubes on red spinach (*Amaranthus tricolor* L.) and the role of ascorbic acid as an antioxidant. J. Hazard. Mater. 243, 212e222.
- Begum, P., Ikhtiari, R., Fugetsu, B., Matsuoka, M., (2012). Phytotoxicity of multi-walled carbon nanotubes assessed by selected plant species in the seedling stage. Appl. Surf. Sci. 262, 120e124.
- Boudsocq, M., Sheen, J., (2013). CDPKs in immune and stress signaling. Trends Plant Sci. 18, 30e40.
- Brunner, T.I., Wick, P., Manser, P., Spohn, P., (2006). In vitro cytotoxicity of oxide nanoparticles: comparison to asbestos, silica, and effect of particle solubility. Environ. Sci. Technol. 40, 4374e4381.

- Gao, F.Q., Hong, F.S., Liu, C., Zheng, L., Su, M.Y., (2006). Mechanism of nanoanatase TiO₂ on promoting photosynthetic carbon reaction of spinach: inducing complex of Rubisco-Rubisco activase. Biol. Trace Elem. Res. 11, 239e254.
- Gao, J., Xu, G., Qian, H., Liu, P., Zhao, P., Hu, Y., (2013). Effects of nano-TiO₂ on photosynthetic characteristics of *Ulmus elongata* seedlings. Environ. Pollut. 176, 63e70.
- Haghighi, M., Abolghasemi, R., Teixeira da Silva, J.A., (2014). Low and high temperature stress affect the growth characteristics of tomato in hydroponic culture with Se and nano-Se amendment. Sci. Hortic. 178, 231e240.
- Haghighi, M., Pessarakli, M., (2013). Influence of silicon and nano-silicon on salinity tolerance of cherry tomatoes (*Solanum lycopersicum* L.) at early growth stage. Sci. Hortic. 161, 111e117.
- Hancock, J.T., Desikan, R., Neill, S.J., (2001). Role of reactive oxygen species in cell signalling pathways. Biochem. Soc. Trans. 29, 345e350.
- Hasanuzzaman, M., Nahar, K., Fujita, M., (2013). Extreme temperature responses, oxidative stress and antioxidant defense in plants. In: Vahdati, K., Leslie, C. (Eds.), Abiotic Stress - Plant Responses and Applications in Agriculture. InTech Open Access Publisher.
- Heinen, R.B., Ye, Q., Chaumont, F., (2009). Role of aquaporins in leaf physiology. J. Exp. Bot. 11, 2971e2985.
- Hong, F.S., Yang, P., Gao, F.Q., Liu, C., (2005). Effect of nano-TiO₂ on spectral characterization of photosystem II particles from spinach. Chem. Res. Chin. Univ. 21, 196e200.

- Ismail, A., Takeda, S., Nick, P., (2014). Life and death under salt stress: same players, different timing? J. Exp. Bot. 65, 2963e2979.
- Khan, M.N., Mobin, M., Abbas, Z.K., AlMutairi, (2017). Role of nanomaterials in plants under challenging environments. Plant physiology and biochemistry, 110, 194-209.
- Khan, M.N., Siddiqui, M.H., Mohammad, F., (2010). Calcium chloride and gibberellic acid protect Linseed (*Linum usitatissimum* L.) from NaCl stress by inducing antioxidative defence system and osmoprotectant accumulation. Acta Physiol. Plant 32, 121e132.
- Khodakovskaya, M.V., de Silva, K., Biris, A.S., (2012). Carbon nanotubes induce growth enhancement of tobacco cells. ACS Nano 6, 2128e2135.
- Kim, J.H., Oh, Y., Yoon, H., Hwang, I., Chang, Y.S., (2015). Iron nanoparticle-induced activation of plasma membrane H⁺-ATPase promotes stomatal opening in *Arabidopsis thaliana*. Environ. Sci. Technol. 49, 1113e1119.
- Lahiani, M.H., Dervishi, E., Chen, J., Nima, Z., (2013). Impact of carbon nanotube exposure to seeds of valuable crops. ACS Appl. Mater. Interfaces 5, 7965e7973.
- Liu, F., Wen, L.X., Li, Z.Z., Yu, W., (2006). Porous hollow silica nanoparticles as controlled delivery system for water soluble pesticide. Mat. Res. Bull. 41, 2268e2275.
- Madhavi, V., Prasad, T., Reddy, A.V.B., Madhavi, G., (2013). Plant growth promoting potential of nano-bioremediation under Cr (VI) stress. Int. J. Nanotechnol. Appl. 3, 1e10.
- Martínez-Fernández, D., Vítková, M., Bernal, M.P., (2015). Effects of nano-maghemite on trace element accumulation

- and drought response of *Helianthus annuus* L. in a contaminated mine soil. *Water Air Soil Pollut.* 226, 101.
- Mingyu, S., Xiao, W., Chao, L., Chunxiang, Q., (2007). Promotion of energy transfer and oxygen evolution in spinach photosystem II by nano-anatase TiO₂. *Biol. Trace Elem. Res.* 119, 183e192.
- Mohammadi, R., Maali-Amiri, R., Abbasi, A., (2013). Effect of TiO₂ nanoparticles on chickpea response to cold stress. *Biol. Trace Elem. Res.* 152, 403e410.
- Qados, A.M.S.A., (2015). Mechanism of nanosilicon-mediated alleviation of salinity stress in faba bean (*Vicia faba* L.) plants. *Am. J. Exp. Agric.* 7, 78e95.
- Roy, A., Bhattacharya, J., (2012). Removal of Cu(II), Zn(II) and Pb(II) from water using microwave-assisted synthesized maghemite nanotubes. *Chem. Eng. J.* 211e212,
- Sharma, S.S., Dietz, K.J. (2008). The relationship between metal toxicity and cellular redox imbalance. *Trends Plant Sci.*, 14, 43-50.
- Sheet, I., Kabbani, A., Holail, H., (2014). Removal of heavy metals using nanostructured graphite oxide, silica nanoparticles and silica/graphite oxide composite. *Energy Procedia* 50, 130e138.
- Siddiqui, M.H., Al-Whaibi, Faisal, M., Alsahli, A.A., (2014). Nano-silicon dioxide mitigates the adverse effects of salt stress on *Cucurbita pepo* L. *Environ. Toxicol. Chem.* 33, 2429e2437.
- Siddiqui, M.H., Al-Whaibi, M.H., (2014). Role of nano-SiO₂ in germination of tomato (*Lycopersicum esculentum* Mill.) seeds. *Saudi J. Biol. Sci.* 21, 13e17.

- Singh, J., Lee, B.K., (2016). Influence of nano-TiO₂ particles on the bioaccumulation of Cd in soybean plants (*Glycine max*): a possible mechanism for the removal of Cd from the contaminated soil. J. Environ. Manag. 170, 88e96.
- Suman, P.R., Jain, V.K., Varma, A., (2010). Role of nanomaterials in symbiotic fungus growth enhancement. Curr. Sci. 99, 1189e1191.
- Tripathi, D.K., Singh, V.P., Prasad, S.M., (2015). Silicon nanoparticles (SiNp) alleviate chromium (VI) phytotoxicity in *Pisum sativum* (L.) seedlings. Plant Physiol. Biochem. 96, 189e198.
- Wei, H., Wang, E., (2013). Nanomaterials with enzyme-like characteristics (nanozymes): next-generation artificial enzymes. Chem. Soc. Rev. 42, 6060e6093.
- Worms, I.A.M., Boltzman, J., Garcia, M., Slaveykova, V.I., (2012). Cell-wall-dependent effect of carboxyl-CdSe/ZnS quantum dots on lead and copper availability to green microalgae. Environ. Pollut. 167, 27e33.
- Yu-Nam, Y., Lead, R., (2008). Manufactured nanoparticles: an overview of their chemistry, interactions and potential environmental implications. Sci. Total Environ. 400, 396e414.
- Zaimenko, N.V., Didyk, N.P., Dzyuba, O.I., Zakrasov, O.V., (2014). Enhancement of drought resistance in wheat and corn by nanoparticles of natural mineral analcite. Ecol. Balk. 6, 1e10.
- Zareii, F.D., Roozbahani, A., Hosnamidi, A., (2014). Evaluation the effect of water stress and foliar application of Fe nanoparticles on yield, yield components and oil percentage of safflower (*Carthamus tinctorious* L.). Int. J. Adv. Biol. Biomed. Res. 2, 1150e1159.

TÜRKİYE’DE BAL POLENİ ARAŞTIRMALARI: TESPİT EDİLEN POLEN TAKSONLARI

Salih AKPINAR¹

Gül Esmâ AKDOĞAN KARADAĞ²

Mustafa Kemal ALTUNOĞLU³

1. GİRİŞ

Türkiye, coğrafi konumu ve iklim çeşitliliği sayesinde, zengin bir bitki çeşitliliğine sahiptir. Ülke, Akdeniz, İran-Turan ve Avrupa-Sibiryâ fitocoğrafik bölgelerinin kesişim noktasında yer almasıyla 12.000 civarında bitki taksonunu barındırmaktadır (Atasoy & Sarış, 2021). Bu çeşitlilik, Türkiye'yi dünya genelinde önemli bir biyoçeşitlilik merkezi haline getirir. Türkiye florasında 2.066 alttür, 888 varyete ve 287 hibrit bitki türü bulunmaktadır (Sefalı & Ünal, 2023). Ayrıca Türkiye, endemik bitkiler açısından da zengindir ve burada 3.000'den fazla endemik tür bulunmaktadır (Şenkul & Kaya, 2017). Bitki çeşitliliği, Türkiye'nin farklı ekosistemlerinde önemli rol oynar. Örneğin, orman ekosistemlerinde karaçam, kızılçam, boylu ardıç ve meşe gibi türler, biyolojik çeşitliliği artıran başlıca bitkilerdir (Ürkmez, 2023). Bu türlerin varlığı, orman ekosistemlerinin sağlıklı işleyişi için kritik öneme sahiptir ve Türkiye'nin farklı bölgelerinde

¹ Dr. Öğr. Üyesi, Kafkas Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, slh_akpinar@hotmail.com, ORCID: 0000-0003-2435-7373.

² Dr. Öğr. Üyesi, Kafkas Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, gulesmaakdogan@gmail.com, ORCID: 0000-0001-7959-2130.

³ Dr. Öğr. Üyesi, Kafkas Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, mkaltun@gmail.com, ORCID: 0000-0001-6906-3403.

yapılan floristik araştırmalar, bitki çeşitliliğinin korunması açısından önemli veriler sunmaktadır (Tel ve ark., 2019).

Polen, bitkilerin üreme süreçlerinde kritik bir rol oynar. Polen, döllenme için gerekli olan erkek gametleri taşır ve bu süreçte polinatörlerin etkisi büyüktür. Türkiye, polinatör çeşitliliği açısından da zengindir; arılar, kelebekler ve diğer böcekler bitkilerin polinasyonunda önemli bir rol oynar (Görhan, 2021). Polen analizi, bitkilerin polinasyon süreçlerini anlamak ve ekosistem sağlığını değerlendirmek için kullanılan önemli bir yöntemdir. Özellikle bal örneklerinde yapılan polen analizleri, bölgedeki bitki çeşitliliği hakkında bilgi sağlamaktadır (Gürbüz ve ark., 2019; Mısır ve ark., 2023). Polen analizi aynı zamanda çevresel değişikliklerin izlenmesi ve biyoçeşitliliğin korunması için kritik bir araçtır (Ören, 2020). Türkiye'deki polen çeşitliliği, bitki türlerinin yaygınlığına ve çevresel koşullara bağlı olarak değişiklik gösterir. Ormanlık alanlarda odunsu bitkilerin polen yoğunluğu, otsu bitkilere göre daha fazladır (Kılıç ve ark., 2023). Bu durum, polenlerin ekosistem içindeki rolünü ve bitki türleri arasındaki etkileşimleri anlamak için önemlidir. Polenlerin çevresel faktörlerden nasıl etkilendiği üzerine yapılan çalışmalar, bitki çeşitliliği ve ekosistem sağlığı arasındaki ilişkiyi ortaya koymaktadır (Biçakçı & Tosunoğlu, 2016).

Polen canlılığı, bitkilerin üreme başarısını etkileyen önemli bir faktördür. Çevresel koşullar, toprak yapısı ve iklim, polen canlılığını etkiler (Koca ve ark., 2021). Örneğin, ağır metal kirliliği gibi çevresel stres faktörleri, polen canlılığını olumsuz etkileyebilir (Muradoğlu ve ark., 2019). Bu nedenle polen analizi, çevresel değişikliklerin izlenmesi ve bitki sağlığının değerlendirilmesi için önemli bir araçtır (Çağatay, 2020). Türkiye'nin bitki çeşitliliği ve polen yapısı, ekosistemlerin sürdürülebilirliği ve biyoçeşitliliğin korunması açısından büyük bir öneme sahiptir. Bu nedenle bitki çeşitliliğinin korunması ve polinatörlerin desteklenmesi, ekosistem sağlığının sürdürülmesi

için kritik bir gerekliliktir (Aslan & Uslu, 2021). Türkiye'deki bitki çeşitliliği ve polen yapısı üzerine yapılan araştırmalar, bu alandaki bilgi birikimini artırmakta ve ekosistemlerin korunmasına yönelik stratejilerin geliştirilmesine katkı sağlamaktadır (Tel ve ark., 2019).

Balın polen çeşitliliği ve polen analizinin önemi, arıcılık ve gıda bilimi açısından da kritik bir konudur. Polen, arıların beslenmesinde temel bir kaynak olmasının yanı sıra, balın kalitesi ve saflığı hakkında bilgi veren önemli bir biyomarker olarak da işlev görür. Polen analizi, balın coğrafi kökenini, saflığını ve kalitesini belirlemek için melissopalinooloji adı verilen bir bilim dalı tarafından gerçekleştirilir. Bu analiz, balın içeriğini etkileyen bitkisel kaynakların çeşitliliğini ortaya koyar ve bu da balın besin değerini ve sağlık yararlarını etkileyebilir (Gürbüz ve ark., 2019; Keskin ve ark., 2020). Türkiye'nin farklı bölgelerinde yapılan polen analizleri, balın besin değeri ve sağlık yararlarını etkileyen önemli bir faktör olan bölgesel bitki örtüsünün çeşitliliğini ortaya koymaktadır (Özkök & Bayram, 2021; Mısır ve ark., 2023). Polen analizi, aynı zamanda balın saflığını ve orijinini belirlemede önemli rol oynar. Farklı polen türlerinin varlığı, balın monofloral veya multifloral olup olmadığını anlamayı sağlar (Bayram & Demir, 2018).

Polen çeşitliliği, arıların sağlığı ve koloninin sürdürülebilirliği açısından da önem taşır. Yeterli polen alımı, arıların bağışıklık sistemini güçlendirir ve koloninin genel sağlığını destekler (Apan ve ark., 2021). Ayrıca, balın kimyasal ve fiziksel özellikleri, polen analizi ile birlikte değerlendirildiğinde, balın kalitesi hakkında daha kapsamlı bilgi sunar (Nisbet ve ark., 2013). Örneğin, polen, protein, vitamin ve mineral açısından zengin bir kaynaktır ve bu da arıların sağlığı için kritik önem taşır (Apan ve ark., 2021). Polen analizi, balın içeriğinde bulunan alerjenlerin belirlenmesi açısından da

önemlidir. Alerji riski taşıyan bireyler için polen analizi, kritik bilgiler sağlar (Özkök & Bayram, 2021).

Sonuç olarak, balın polen çeşitliliği ve polen analizinin önemi, hem arıcılık uygulamaları hem de gıda güvenliği açısından büyük bir yere sahiptir. Bu analizler, balın kalitesini, saflığını ve besin değerini belirlemede kritik bir rol oynar. Ayrıca, polen çeşitliliği, arıların sağlığı ve çevresel sürdürülebilirlik açısından önemli bir gösterge olarak değerlendirilmektedir. Bu nedenle, polen analizi, arıcılık sektöründe ve gıda bilimi alanında daha fazla dikkate alınması gereken bir konu olarak öne çıkmaktadır. Bu araştırmada da Türkiye’de yapılan bal polen analiz çalışmaları değerlendirilmeye çalışılmıştır.

2. TÜRKİYE’DE YAPILAN ÇALIŞMALAR

Çalışmalarda, birçok Avrupa ülkesinin arıcılık enstitülerinde kabul edilen ballarda polen analizi metoduna uygun olarak preparat yapılmıştır (Lieux, 1972). Çalışmalarda polen yüzdelерini belirlemek için 100 ile 1000 arasında polen sayılmıştır. Bu araştırmada Adana (Daltarak, Saimbeyli, Seyhan, Tufanbeyli), Adıyaman, Aksaray, Antalya (Akseki, Alanya, Beydağı, Çakırlar, Elmalı, Finike, Gündoğmuş, Kale, Kaş, Korkuteli, Kumluca, Manavgat, Saklıkent, Serik), Aydın (Burhaniye-Kuyucak, Konuklu, Kuşadası, Söke), Balıkesir (Edremit), Bartın (Iskalan, Kurucaşile), Bayburt (Aşağı Cimal), Batman, Bilecik, Bingöl, Bitlis (Hizan), Bolu (Çaydurt), Burdur (Gölhisar), Bursa (Gemlik, İnegöl, Karacabey, Kemalpaşa), Çankırı (Kesecik, Ortahöyük, Orta Elmalı), Çanakkale (Kaz Dağları), Çorum, Denizli (Akköy, Babadağ, Çivril), Diyarbakır, Düzce (Akçakoca-Yığılca, Yığılca), Edirne (Uzunköprü), Elazığ (Keban), Erzincan (Kemaliye), Erzurum, Eskişehir (Yakakayık), Gaziantep, Gümüşhane (Kaletaş), Hakkari, Hatay (Çetelik, Dört Yol, Kırıkhan, Suselli), Isparta, İçel (Bolkarsuyu,

Karaduman, Yumalı), İstanbul (Kartal), İzmir (Menemen, Sasalı, Sevre), Kahramanmaraş, Karabük, Karaman (Sarıveliler), Kastamonu, Kayseri (Pınarbaşı, Tomarza), Kırklareli, Kocaeli, Konya (Altınoba, Bozkır, Ereğli, Hadim-Taşkent, Kadınhanı, Karapınar, Ulukışla), Kütahya (Dominik, Güvecik, Kırğıllı, Şahmelik), Malatya (Çelikhan), Manisa (Kırkağaç), Muğla (Bodrum, Datça, Marmaris), Niğde (Ulukışla), Osmaniye, Rize (Anzer, Ayder-Ceymakçur, Komati), Sakarya, Sivas (Göklüce), Şanlıurfa, Şırnak, Tekirdağ (Çevrimkaya, Saray), Tokat (Uğrak), Trabzon, Van, Yalova, Yozgat (Argason), Zonguldak bölgelerinde yapılan bal polen analizi çalışmalarında belirlenen bitki taksonları ve dominant bitki taksonları saptanmış ve değerlendirilmiştir (Sorkun & Doğan, 1995; Sorkun & Dogan, 1995; Dogan & Sorkun, 2001; Sorkun ve ark., 2002; Silici, 2004; Demircan, 2005; Kaya ve ark., 2005; Yurtsever & Sorkun, 2005; Baba, 2007; Bağcı & Tunç, 2006; Erdoğan ve ark., 2006; Silici & Gökceoglu, 2007; Erdoğan ve ark., 2009; Kelez, 2009; Taşkın & İnce, 2009; Terzi, 2009; Çam ve ark., 2010; Sarısu, 2011; Demir, 2012; Bakoğlu ve ark., 2014; Bozbeyoğlu, 2014; Canlı, 2014; Sorkun ve ark., 2014; Çenet ve ark., 2015; Günarslan, 2015; Özler, 2015; Tümerdem ve ark., 2015; Bayramlı ve ark., 2016; Fişne, 2016; Kaynar, 2016; Memiş, 2016; Acar, 2017; Çenet & Kölük, 2017; Şik ve ark., 2017; Altay ve ark., 2018; Karakoyun, 2018; Özler, 2018; Gencay-Celemlı ve ark., 2018; Bayram ve ark., 2019; Çelemlı ve ark., 2019; Gürbüz ve ark., 2019; Uzunca, 2019; Yalazi, 2019; Çakır ve ark., 2020; Karaman, 2020; Tosunoğlu, 2020; Yıldırım, 2020; Gurdal & Sönmez, 2021; Topal, 2020; Yıldırım ve ark., 2021; Atsay Altundağ Çakır, 2022; Kılınçarslan, 2023; Tosunoğlu ve ark., 2023; Demir ve ark., 2024).

3. BULGULAR

Türkiye'nin ballarında yapılan polen analizi çalışmalarında polenler çalışmalarda farklılık göstermekle familya, cins ve tür olarak belirlenmiştir. Tespit edilen familya, cins ve türler Tablo 1.de gösterilmiştir. Çalışmalar incelendiğinde 85 familya, 325 cins ve toplam 231 türe ait polenler belirlenmiştir. En çok cinsi tespit edilen familyalar: Asteraceae (40), Fabaceae (32), Apiaceae (26), Rosaceae (22), Brassicaceae (17), Lamiaceae (16) ve Boraginaceae (12). Ayrıca ballarda en çok türü bulunan cinslerin ise *Trifolium* (9), *Citrus* (5), *Onobrycis* (4), *Cyanus* (3), *Pinus* (3), *Ranunculus* (3), *Salix* (3), *Teucrium* (3) olduğu bulunmuştur (Tablo 1).

Çalışmalarda Marmara Bölgesi'nde: Balıkesir'de *Castanea sativa*, *Erica*, *Hedera*, *Trifolium pratense*, *Paliurus spina-christi*; Bilecik'te *Castanea sativa*, *Olea*; Bursa'da *Castanea sativa*, *Olea*, *Allium*, *Trifolium repens*, *Trifolium pratense*; Çanakkale'de *Helianthus annuus*, *Castanea sativa*, *Erica*, *Brassica napus*, *Plantago*; Edirne'de *Paliurus spina-christi*, *Helianthus annuus*; İstanbul'da *Erica*, *Castanea sativa*, *Helianthus annuus*, *Brassica napus*; Kırklareli'de *Castanea sativa*, *Paliurus spina-christi*, *Helianthus annuus*, *Plantago*; Kocaeli'de *Castanea sativa*, *Helianthus annuus*; Sakarya'da *Castanea sativa*, *Paliurus spina-christi*, *Myosotis*, *Lupinus*; Tekirdağ'da *Helianthus annuus*, *Paliurus spina-christi*, *Castanea sativa*; Yalova'da *Castanea sativa*, Ege Bölgesi'nde: İzmir'de *Eucalyptus camaldulensis*, *Gossypium*; Kütahya'da *Isatis tinctoria*; Aydın'da *Lotus corniculatus*; Aydın-Kuşadası ve Aydın-Söke'de *Castanea sativa*, Akdeniz Bölgesi'nde: Adana'da *Eucalyptus camaldulensis*, *Gossypium sp.*, *Salix sp.*; Antalya'da *Pimpinella anisum*, *Vicia cracca*; Burdur'da *Salvia verticillata*, *Dianthus*, *Cardamine*, *Pimpinella anisum*, *Anthriscus*, *Centaurea*; Hatay'da *Eucalyptus camaldulensis*, *Trifolium*, *Petroselinum crispum*; İçel'de *Astragalus*, İç Anadolu

Bölgesi'nde: Konya-Kadıhanı'nda *Centaurea*, *Centaurea triumfetti*; Niğde'de *Anthemis tinctoria*, *Astragalus*; Kayseri'de *Trifolium*; Ankara'da *Echium vulgare*, *Onobrychis*, *Astragalus*, *Trifolium*; Yozgat'ta *Trifolium*; Çankırı'da *Trifolium campestre*, *Trifolium pratense*; Karaman'da *Helianthus annuus*, Karadeniz Bölgesi'nde: Rize-Anzer'de *Castanea sativa*, *Centaurea*, *Trifolium ambiguum*, *Thymus*; Zonguldak'ta *Marrubium vulgare*, *Castanea sativa*, *Rhododendron*; Bartın'da *Castanea sativa*, *Rhododendron*; Düzce'de *Rhododendron ponticum*, *Castanea sativa*; Gümüşhane'de *Trifolium repens*, *Lupinus*, *Symphytum*, Doğu Anadolu Bölgesi'nde: Erzurum'da *Trifolium pratense*; Erzincan-Kemaliye'de *Astragalus*, *Paliurus*, *Salix*, *Sanguisorba*, *Trifolium*; Bitlis'te *Astragalus lagurus willd.*; Kars'ta *Trifolium*, *Carduus*, Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde: Siirt'te *Astragalus*, *Trifolium*, *Carduus*, *Centaurea*, *Salix*, *Onobrychis*; Şanlıurfa'da *Astragalus*; Gaziantep'te *Medicago*, *Salix* taksonlarının dominant olduğu saptanmıştır.

Tablo 1. Çalışmalarda tespit edilen taksonlar

Familya	Cins/Tür
Acanthaceae	<i>Acanthus</i>
Adoxaceae	<i>Sambucus ebulus</i> L. <i>Viburnum</i>
Amaranthaceae	<i>Chenopodium album</i> L.
Amaryllidaceae	<i>Allium cepa</i> L. <i>Narcissus</i> , <i>Sternbergia</i>
Anacardiaceae	<i>Pistacia terebinthus</i> L.
Apiaceae	<i>Anthriscus</i> , <i>Apium</i> , <i>Astrantia</i> , <i>Bifora</i> , <i>Bunium</i> , <i>Carum</i> , <i>Chaerophyllum</i> , <i>Coriandrum</i> , <i>Echinophora</i> , <i>Falcaria</i> , <i>Grammosciadium</i> , <i>Heracleum</i> , <i>Scandix</i> , <i>Seseli</i> , <i>Tordylium</i> , <i>Artemisia squamata</i> L.
	<i>Astrodaucus orientalis</i> (L.) Drude
	<i>Bupleurum falcatum</i> L.
	<i>Conium maculatum</i> L.
	<i>Daucus carota</i> L.
	<i>Eryngium campestre</i> L., <i>Eryngium kotschy</i> Boiss.
	<i>Ferula communis</i> L.
	<i>Malabaila dasyantha</i> (K.Koch) Grossh.
	<i>Petroselinum crispum</i> (Mill.) A.W.Hill
	<i>Pimpinella anisum</i> L.
	<i>Turgenia latifolia</i> (L.) Hoffm.

Aquifoliaceae	<i>Ilex aquifolium</i> L., <i>Ilex colchica</i> Pojark.
Araliaceae	<i>Hedera helix</i> L.
Arecaceae	<i>Washingtonia</i>
Asparagaceae	<i>Muscari</i>
	<i>Ornithogalum sphaerocarpum</i> A.Kern.
Asteraceae	<i>Achillea</i> , <i>Ambrosia</i> , <i>Anthemis</i> , <i>Artemisia</i> , <i>Aster</i> , <i>Carlina</i> , <i>Chondrilla</i> , <i>Cirsium</i> , <i>Cousinia</i> , <i>Crepis</i> , <i>Echinops</i> , <i>Gaillardia</i> , <i>Gundelia</i> , <i>Helichrysum</i> , <i>Lactuca</i> , <i>Picris</i> , <i>Scorzonera</i> , <i>Senecio</i> , <i>Solidago</i> , <i>Tanacetum</i> , <i>Tragopogon</i> , <i>Xeranthemum</i> , <i>Zinnia</i>
	<i>Arctium minus</i> (Hill) Bernh.
	<i>Bellis perennis</i> L.
	<i>Bidens tripartita</i> L.
	<i>Carduus nutans</i> L.
	<i>Carthamus tinctorius</i> L.
	<i>Centaurea solstitialis</i> L.
	<i>Centaureum erythraea</i> Rafn.
	<i>Cyanus depressus</i> (M.Bieb.) Soják, <i>Cyanus segetum</i> Hill, <i>Cyanus triumfettii</i> (All.) Dostál ex Á.Löve & D.Löve
	<i>Cichorium intybus</i> L.
	<i>Cota tinctoria</i> (L.) J.Gay
	<i>Echinacea purpurea</i> (L.) Moench
	<i>Helianthus annuus</i> L.
	<i>Lapsana communis</i> L.
	<i>Rhagadiolus stellatus</i> (L.) Gaertn.
	<i>Silybum marianum</i> (L.) Gaertn.
	<i>Taraxacum microcephaloides</i> Soest
	<i>Tussilago farfara</i> L.
	<i>Xanthium strumarium</i> L.
Berberidaceae	<i>Berberis vulgaris</i> L.
Betulaceae	<i>Alnus glutinosa</i> (L.) Gaertn.
	<i>Corylus avellana</i> L.
Boraginaceae	<i>Alkanna</i> , <i>Cynoglossum</i> , <i>Heliotropium</i> , <i>Moltkia</i> , <i>Nonea</i> , <i>Symphytum</i>
	<i>Anchusa azurea</i> Mill., <i>Anchusa leptophylla</i> Roem. & Schult.
	<i>Cerinthe minor</i> L.
	<i>Echium plantagineum</i> L., <i>Echium vulgare</i> L.
	<i>Myosotis lithospermifolia</i> Hornem.
	<i>Phacelia tanacetifolia</i> Benth.
	<i>Rindera lanata</i> (Lam.) Bunge
Brassicaceae	<i>Aethionema</i> , <i>Alyssum</i> , <i>Bunias</i> , <i>Cardamine</i> , <i>Diplotaxis</i> , <i>Draba</i> , <i>Eruca</i> , <i>Lepidium</i> , <i>Matthiola</i> , <i>Alyssum</i>
	<i>Barbarea vulgaris</i> R.Br.
	<i>Brassica napus</i> L., <i>Brassica vulgaris</i> L.
Brassicaceae	<i>Isatis tinctoria</i> L.
	<i>Raphanus raphanistrum</i> L.
	<i>Rapistrum raphanistrum</i> (L.) Crantz, <i>Rapistrum rugosum</i> (L.) All.
	<i>Rorippa sylvestris</i> (L.) Besser

	<i>Sinapis alba</i> L., <i>Sinapis arvensis</i> L.
	<i>Sisymbrium elatum</i> K.Koch
Buxaceae	<i>Buxus sempervirens</i> L.
Cactaceae	<i>Opuntia ficus-barbarica</i> A.Berger
Campanulaceae	<i>Campanula</i>
Capparaceae	<i>Capparis spinosa</i> L.
Caprifoliaceae	<i>Centranthus</i> , <i>Cephalaria</i> , <i>Dipsacus</i> , <i>Knautia</i> , <i>Lonicera</i> . <i>Scabiosa caucasica</i> M.Bieb., <i>Scabiosa columbaria</i> L.
Caryophyllaceae	<i>Acanthophyllum</i> , <i>Dianthus</i> , <i>Gypsophila</i> , <i>Minuartia</i> , <i>Stellaria</i> <i>Saponaria glutinosa</i> M.Bieb. <i>Silene caryophylloides</i> (Poir.) Otth, <i>Silene vulgaris</i> (Moench) Garcke
Cistaceae	<i>Cistus creticus</i> L., <i>Cistus salviifolius</i> L. <i>Fumana</i> <i>Helianthemum nummularium</i> (L.) Mill.
Colchicaceae	<i>Colchicum</i>
Convolvulaceae	<i>Calystegia</i> <i>Convolvulus arvensis</i> L.
Cornaceae	<i>Cornus mas</i> L.
Cucurbitaceae	<i>Citrullus lanatus</i> (Thunb.) Matsum. & Nakai <i>Cucumis melo</i> L., <i>Cucumis sativus</i> L. <i>Ecballium elaterium</i> (L.) A.Rich.
Cupressaceae	<i>Cupressus sempervirens</i> L. <i>Juniperus</i> , <i>Thuja</i>
Cyperaceae	<i>Carex</i> <i>Cyperus</i>
Ebenaceae	<i>Diospyros lotus</i> L.
Elaeagnaceae	<i>Elaeagnus angustifolia</i> L.
Ephedraceae	<i>Ephedra</i>
Ericaceae	<i>Arbutus andrachne</i> L., <i>Arbutus unedo</i> L. <i>Calluna vulgaris</i> (L.) Hull <i>Erica arborea</i> L., <i>Erica manipuliflora</i> Salisb.
Ericaceae	<i>Rhododendron ponticum</i> L.
Euphorbiaceae	<i>Euphorbia</i> , <i>Mercurialis</i>
Fabaceae	<i>Acacia</i> , <i>Colutea</i> , <i>Cytisus</i> , <i>Genista</i> , <i>Lupinus</i> , <i>Ononis</i> , <i>Sophora</i> , <i>Trigenella</i> <i>Astragalus lagopoides</i> Lam, <i>Astragalus microcephalus</i> Willd. <i>Calicotome villosa</i> (Poir.) Link <i>Ceratonia siliqua</i> L. <i>Cercis siliquastrum</i> L. <i>Cicer arietinum</i> L. <i>Dorycnium graecum</i> (L.) Ser. <i>Galega officinalis</i> L. <i>Glycyrrhiza glabra</i> L. <i>Hedysarum varium</i> Willd. <i>Lathyrus rotundifolius</i> Willd. <i>Lotus corniculatus</i> L. <i>Medicago falcata</i> L., <i>Medicago lupulina</i> L. <i>Melilotus officinalis</i> (L.) Desr.

	<i>Onobrychis radiata</i> (Desf.) M.Bieb., <i>Onobrychis tournefortii</i> (Willd.) Desv., <i>Onobrychis viciifolia</i> Scop., <i>Onobrychis oxyodonta</i> Boiss.
	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.
	<i>Pisum sativum</i> L.
	<i>Prosopis farcta</i> (Banks & Sol.) J.F.Macbr.
	<i>Robinia pseudoacacia</i> L.
	<i>Securigera varia</i> (L.) Lassen
	<i>Trifolium ambiguum</i> M.Bieb., <i>Trifolium campestre</i> Schreb., <i>Trifolium nigrescens</i> Viv., <i>Trifolium ochroleucum</i> Huds., <i>Trifolium pratense</i> L., <i>Trifolium purpureum</i> Lois., <i>Trifolium repens</i> L., <i>Trifolium striatum</i> L., <i>Trifolium subterraneum</i> L.
	<i>Vicia cracca</i> L., <i>Vicia sativa</i> L.
Fagaceae	<i>Castanea sativa</i> Mill.
	<i>Fagus orientalis</i> Lipsky
	<i>Quercus coccifera</i> L.
Gentianaceae	<i>Gentiana</i>
Geraniaceae	<i>Erodium</i> , <i>Geranium</i> , <i>Pelargonium</i>
Hyacinthaceae	
Hypericaceae	<i>Hypericum calycinum</i> L.
Iridaceae	<i>Crocus</i> , <i>Gladiolus</i>
	<i>Iris x germanica</i> L., <i>Iris sintenisii</i> Janka
Juglandaceae	<i>Juglans regia</i> L.
Lamiaceae	<i>Ajuga</i> , <i>Lallemantia</i> , <i>Mentha</i> , <i>Nepeta</i> , <i>Phlomis</i> , <i>Prunella</i> , <i>Stachys</i>
	<i>Lamium amplexicaule</i> L., <i>Lamium purpureum</i> L.
	<i>Lavandula stoechas</i> L.
	<i>Marrubium vulgare</i> L.
	<i>Mellisa officinalis</i> L.
	<i>Rosmarinus officinalis</i> L.
	<i>Salvia officinalis</i> L., <i>Salvia verticillata</i> L.
	<i>Teucrium chamaedrys</i> L., <i>Teucrium orientale</i> L., <i>Teucrium polium</i> L.
	<i>Thymus leucostomus</i> Hausskn. & Velen., <i>Thymus longicaulis</i> C.Presl, <i>Thymus zygioides</i> Griseb.
Lamiaceae	<i>Vitex agnus-castus</i> L.
Lauraceae	<i>Laurus nobilis</i> L.
Lentibulariaceae	<i>Utricularia</i>
Lythraceae	<i>Lythrum salicaria</i> L.
	<i>Punica granatum</i> L.
Malvaceae	<i>Alcea</i> , <i>Althaea</i>
	<i>Gossypium hirsutum</i> L.
	<i>Tilia rubra</i> DC.
Moraceae	<i>Ficus</i>
	<i>Morus alba</i> L., <i>Morus nigra</i> L.
Musaceae	<i>Musa rubra</i> Wall. Ex Kurz
Myrtaceae	<i>Eucalyptus camaldulensis</i> Dehnh.
	<i>Myrtus communis</i> L.
Oleaceae	<i>Fraxinus excelsior</i> L., <i>Fraxinus ornus</i> L.
	<i>Jasminum</i>

	<i>Ligustrum vulgare</i> L.
	<i>Olea europaea</i> L.
	<i>Phillyrea latifolia</i> L.
Onagraceae	<i>Circaea lutetiana</i> L.
	<i>Epilobium angustifolium</i> L.
	<i>Oenothera</i>
Orchidaceae	<i>Cephalanthera rubra</i> (L.) Rich.
Oxalidaceae	<i>Oxalis</i>
Papaveraceae	<i>Glaucium</i>
	<i>Papaver hybridum</i> L., <i>Papaver somniferum</i> L.
Pedaliaceae	<i>Sesamum indicum</i> L.
Phyllanthaceae	<i>Andrachne</i>
Pinaceae	<i>Abies nordmanniana</i> (Steven) Spach
	<i>Cedrus libani</i> A.Rich.
	<i>Picea orientalis</i> (L.) Peterm.
	<i>Pinus brutia</i> Ten., <i>Pinus nigra</i> J.F.Arnold, <i>Pinus sylvestris</i> L.
Plantaginaceae	<i>Digitalis</i> , <i>Globularia</i> , <i>Veronica</i>
	<i>Linaria genistifolia</i> (L.) Mill., <i>Linaria simplex</i> DC.
	<i>Linum nodiflorum</i> L.
	<i>Plantago lanceolata</i> L., <i>Plantago minor</i> Gilib.
Platanaceae	<i>Platanus</i>
Poaceae	<i>Avena</i> , <i>Cynodon</i> , <i>Dactylis</i> , <i>Phalaris</i> , <i>Phleum</i> .
	<i>Holcus lanatus</i> L.
	<i>Phragmites australis</i> (Cav.) Trin. ex Steud.
Poaceae	<i>Triticum aestivum</i> L.
	<i>Zea mays</i> L.
Polygonaceae	<i>Polygonum salicifolium</i> Brouss. ex Willd.
	<i>Rumex acetosella</i> L.
Portulacaceae	<i>Portulaca oleracea</i> L.
Primulaceae	<i>Anagallis arvensis</i> L.
	<i>Lysimachia verticillaris</i> Spreng.
	<i>Primula</i>
Pteridaceae	<i>Cryptogramma</i>
Ranunculaceae	<i>Adonis aestivalis</i> L.
	<i>Anemone</i> , <i>Clematis</i>
	<i>Consolida orientalis</i> (J.Gay) Schrödinger
	<i>Nigella arvensis</i> L.
	<i>Ranunculus grandiflorus</i> L.
	<i>Ranunculus neopolitanus</i> Ten.
	<i>Ranunculus repens</i> L.
Resedaceae	<i>Reseda lutea</i> L.
Rhamnaceae	<i>Paliurus spina-christi</i> P. Mill.
	<i>Rhamnus</i> , <i>Ziziphus</i>
Rosaceae	<i>Agrimonia repens</i> L.
	<i>Armeniaca vulgaris</i> Lam.
	<i>Aruncus vulgaris</i> (Maxim.) Raf. ex H.Hara
	<i>Cerasus angustifolia</i> (Spach) Browicz
	<i>Cotoneaster</i> , <i>Crataegus</i> , <i>Geum</i> , <i>Potentilla</i> , <i>Sanguisorba</i> , <i>Sorbus</i>
	<i>Cydonia oblonga</i> Mill.

	<i>Fragaria vesca</i> L.
Rosaceae	<i>Laurocerasus officinalis</i>
	<i>Malus pumila</i> Mill., <i>Malus sylvestris</i> (L.) Mill.
	<i>Mespilus germanica</i> L.
	<i>Persica vulgaris</i> Mill.
	<i>Prunus x domestica</i> L.
	<i>Pyracantha coccinea</i> M.Roem.
	<i>Pyrus communis</i> L.
	<i>Rosa canina</i> L.
	<i>Rubus canescens</i> DC.
	<i>Sarcopoterium spinosum</i> (L.) Spach
Rubiaceae	<i>Asperula</i> , <i>Galium</i> , <i>Rubia</i>
	<i>Sherardia arvensis</i> L.
Rutaceae	<i>Citrus aurantium</i> L., <i>Citrus limon</i> (L.) Burm.f., <i>Citrus paradisi</i> Macfad., <i>Citrus reticulata</i> Blanco, <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck
	<i>Ruta</i>
Salicaceae	<i>Populus nigra</i> L.
	<i>Salix alba</i> L., <i>Salix caprea</i> L., <i>Salix vulgaris</i> Clayton ex Gronov.
Sapindaceae	<i>Acer</i>
	<i>Aesculus hippocastanum</i> L.
Scrophulariaceae	<i>Scrophularia</i>
	<i>Verbascum blattaria</i> L.
Simaroubaceae	<i>Ailanthus altissima</i> (Mill.) Swingle
Smilacaceae	<i>Smilax</i>
Solanaecae	<i>Capsicum</i> , <i>Datura</i> , <i>Nicotiana</i> , <i>Solanum</i>
	<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill.
Styracaceae	<i>Styrax officinalis</i> L.
Tamaricaceae	<i>Tamarix</i>
Thymelaeaceae	<i>Daphne</i>
Typhaceae	<i>Typha</i>
Ulmaceae	<i>Ulmus minor</i> Mill.
Urticaceae	<i>Urtica dioica</i> L.
Verbenaceae	<i>Verbena</i>
Vitaceae	<i>Vitis vinifera</i> L.
Xanthorrhoeaceae	<i>Asphodelus</i>
Zygophyllaceae	<i>Tribulus terrestris</i> L.

4. SONUÇ

Türkiye'de yapılmış bal poleni araştırmalarını derleyerek gerçekleştirilen bu araştırmada, ülkemizin farklı bölgelerindeki ballarda tespit edilen polen taksonlarını kapsamlı bir şekilde incelenmiştir. Elde edilen bulgular, Türkiye'nin biyolojik çeşitliliğinin ballar üzerindeki etkisini ve bal polenlerinin floristik

özelliklerini ortaya koymaktadır. Çalışmaların sonuçları, bölgesel flora ile bal kompozisyonları arasındaki güçlü ilişkiyi gözler önüne sermekte ve bu alandaki gelecekteki araştırmalar için önemli bir temel oluşturmaktadır. Bu araştırma, Türkiye'deki bal poleni çalışmalarına dair genel bir perspektif sunmakta ve polenlerin izlenmesi, balın kaynağının doğrulanması ve çevresel faktörlerin incelenmesi gibi konularda yeni araştırma fırsatları doğurmaktadır.

KAYNAKÇA

- Acar, L. 2017. Batman, Siirt ve Şırnak Yöresi ballarının palinolojik ve fizikokimyasal parametreler yönünden araştırılması (Yüksek Lisans Tezi). Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Osmaniye.
- Altay, V., Karahan, P., Karahan, F., & Öztürk, M. (2018). Pollen analysis of honeys from Hatay/Turkey. *Biological Diversity and Conservation*, 11(3), 209-222.
- Apan, M., Zorba, M., & Kayaboynu, Ü. (2021). Honey bee and honey bee products. *Sinop Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 6(2), 202-223.
- Aslan, H. & Uslu, A. (2021). Biyoçeşitliliğin geliştirilmesi için polinatör böcekleri çeken bitki türlerinin kentsel peyzajda kullanımı: kalecik örneği. *Mimarlık Bilimleri Ve Uygulamaları Dergisi*, 6(1), 358-373
- Atasoy, F., & Sarış, F. (2021). Classification of Turkey's bioclimatic regions by cluster analysis. *Türk Coğrafya Dergisi*, (77), 67-76.
- Atsay, Ç., & Altundağ Çakır, E. (2022). Düzce yöresi ballarında polen analizi. *Eurasian Journal Forest Science*, 10(2), 42-63.
- Baba, H. (2007). Kadınhanı (Konya) yöresi ballarında polen analizi. *OT Sistemik Botanik Dergisi*, 14(1), 115-130.
- Bağcı, Y., & Tunç, B. (2006). Hadim-Taşkent (Konya), Sarıveliler (Karaman) yöresi ballarında polen analizi. *Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Fen Dergisi*, 2(28), 73-82.
- Bakoğlu, A., Kutlu, M., & Bengü, A. (2014). Bingöl ilinde arıların yoğun olarak konakladıkları alanlarda üretilen

- ballarda bulunan polenlerin tespiti. *Türk Tarım ve Doğa Bilimleri Dergisi*, 1(3), 348-353.
- Bayram, N. E. (2022). Ticari olarak satışa sunulan bazı bal örneklerinin polen analizi ile botanik orijinlerinin tespit edilmesi. *Arı ve Arıcılık Teknolojileri Dergisi*, 1(1), 11-18.
- Bayram, N., & Demir, E. (2018). Specifying some quality characteristics of monofloral and multifloral honey samples. *Hacettepe Journal of Biology and Chemistry*, 3(46), 417-423.
- Bayram, N., Yüzer, M. O., & Bayram, S. (2019). Melissopalynology analysis, physicochemical properties, multi-element content and antimicrobial activity of honey samples collected from Bayburt, Turkey. *Uludağ Arıcılık Dergisi*, 19(2), 161-176.
- Bayramlı, B., Ay, G., & Demir, E. (2016). Manisa merkez köyleri'nde üretilen balların polen analizi. *Anadolu Doğa Bilimleri Dergisi*, 7(1), 18-24.
- Biçakçı, A. & Tosunoğlu, A. (2016). The influence of environmental and atmospheric variables on allergenic pollen. *Asthma Allergy Immunology*, 14(3), 107-116.
- Bozbeyoğlu, N. N. (2014). Farklı kaynaklardan alınan balların bakteriyolojik, fizikokimyasal ve melissopalinolojik analizleri (Yüksek Lisans Tezi), Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Denizli.
- Cagatay, N. (2020). Akgöl'de (Sakarya) fosil polen analizine dayalı paleovejetasyon araştırmaları: İlk bulgular. *Journal of Geography*, 40, 2019-230
- Canlı, D. (2014). Ardahan bölgesinde bal arıları tarafından toplanan polenlerin morfolojik ve organoleptik analizleri

ile nişasta içeriklerinin incelenmesi (Yüksek Lisans Tezi). Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

- Çakır, Y., Çobanoğlu, D. N., Dervişoğlu, G., Koçyiğit, S., Karahan, D., & Yelkovan, S. (2020). Determination antimicrobial activity, palynological characteristics and chemical composition of some honey samples from Turkey. *Mellifera*, 20(1), 41-60.
- Çam, B., Pehlivan, S., Uraz, G., & Dogan, C. (2010). Pollen analysis of honeys collected from various regions of Ankara (Turkey) and antibacterial activity of these honey samples against some bacteria. *Mellifera*, 10 16–19.
- Çelemlı, Ö. G., Gürbüz, S., Özenirler, Ç., Mayda, N., Özkök, A., & Sorkun, K. (2019). Melissopalynological analysis of honey samples collected from Şırnak City. *Uludağ Arıcılık Dergisi*, 19(2), 126-135.
- Çenet, M. & Kölük, G. (2017). Palynological and physicochemical analysis of honeys in Gaziantep Province. International Advanced Researches & Engineering Congress-2017 (Tam metin bildirisi). Sakarya.
- Çenet, M., & Yalçın, I. (2017). Palynological and physicochemical analysis of honeys in Osmaniye Province. International Advanced Researches & Engineering Congress-2017 (Tam metin bildirisi). Sakarya.
- Çenet, M., Toroğlu, S., Keskin, D., & Bozok, F. (2015). Pollen analysis and antimicrobial properties of honey samples sold in Western Turkey. *Pakistan Journal of Zoology*, 47(1): 269-273.
- Demir, E. (2012). Pollen analysis of honey samples from Komati (Çamlıhemşin) Plateau. *Mellifera*, 12-24: 11-16.
- Demir, İ., Keser, A. M., Altunoğlu, M. K., Akpınar, S., & Akdoğan, G. E. (2024). Characteristic Features of

- Kolludere Valley (Bitlis-Hizan) Honey. *Yuzuncu Yıl University Journal of Agricultural Sciences*, 34(1), 24-35.
- Demircan, A. D. (2005). Kartal ilçesi (İstanbul) ballarının palinolojik analizi (yüksek lisans tezi). Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Dogan, C., & Sorkun, K. (2001). Pollen analysis of honeys from Aegean, Marmara, Mediterranean and Black Sea regions in Turkey. *Mellifera*, 1: 34-44.
- Erdoğan, N., Pehlivan, S., & Doğan, C. (2006). Pollen analysis of honeys from Hendek-Akyazı and Kocaali districts of Adapazarı province (Turkey). *Mellifera*, 6 (10-12):20-27.
- Erdoğan, N., Pehlivan, S., & Doğan, C. (2009). Pollen analysis of honeys from Sapanca Karapürçek-Geyve and Taraklı districts of Adapazarı province (Turkey). *Mellifera*, 9-17:9-18.
- Fişne, A. (2016). Trabzon Yöresi Ballarında Polen Analizi. (Doktora Tezi). Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Gencay-Celemlı, O., Ozenirler, C., Ecem Bayram, N., Zare, G., & Sorkun, K. (2018). Melissopalynological analysis for geographical marking of Kars honey. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 24(1), 53–59
- Görhan, K. (2021). Marrubium türlerinin mersin arıcılığındaki yeri ve önemi. *Mas Journal of Applied Sciences*, 8(8).
- Gurdal, B., & Sönmez, S. (2021). Pollen and physicochemical analysis of honey samples from Akçakoca and Yığılca district (Western Black Sea). *Yuzuncu Yıl University Journal of Agricultural Sciences*, 31(3), 576-586.
- Günarşlan, E. (2015). Van yöresi ballarının fizikokimyasal özelliklerinin ve biyolojik aktivitelerinin tespit edilmesi

- (Yüksek Lisans Tezi). Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Osmaniye.
- Gürbüz, S., Özenirler, Ç., Mayda, N., Çelemlı, Ö. G., & Özkök, A. (2019). Pollen spectrum of some honey samples produced in Siirt-Turkey. *Hacettepe Journal of Biology and Chemistry*, 47(3), 295-303.
- Kambur, M., Yıldız, İ., & Kekeçoğlu, M. (2015). Düzce ili Yığılca ilçesinde üretilen balların kimyasal ve paninolojik analiz yöntemleri ile değerlendirilmesi. *Uludağ Arıcılık Dergisi*, 15(2), 67-79.
- Karakoyun, Y. (2018). Adıyaman, Kahramanmaraş ve Şanlıurfa yörelerine ait ballarının palinolojik ve fizikokimyasal parametreler yönünden araştırılması (Yüksek Lisans Tezi). Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Osmaniye.
- Karaman, S. (2020). Adana ve Niğde yöresi ballarının palinolojik ve fizikokimyasal parametreler yönünden araştırılması (Yüksek Lisans Tezi). Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Osmaniye
- Kaya, Z., Binzet, R., & Orcan, N. (2005). Pollen analysis of honeys from some regions in Turkey. *Apiacta*, 40:10-15.
- Kaynar, N. (2016). Malatya yöresi ballarının palinolojik ve fizikokimyasal parametreler yönünden araştırılması (Yüksek Lisans Tezi). Korkut Ata Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Osmaniye.
- Kelez, A. (2009). Batı Karadeniz Bölgesi ballarının polen analizi (Yüksek Lisans Tezi). Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- Keskin, Ş., Mayda, N., Keskin, M., & Özkök, A. (2020). Investigation of Bilecik honeys in terms of

- melissopalynology and chemical analyses. *GIDA-the Journal of Food*, 45(2), 275-289.
- Kılıç, N., Dağdeviren, R., & Yıldırım, E. (2023). Kirazpınar kayın ormanlarının 2014-2017 yılları arasındaki güncel polen dağılımının incelenmesi (Kırklareli, Türkiye). *Anadolu Orman Araştırmaları Dergisi*, 9(1), 104-110.
- Kılınçarslan, S. (2023). Tokat ili ballarında polen analizleri (Yüksek lisans Tezi). Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Bursa.
- Koca, A., Bülbül, H., & Özmen, Ö. (2021). Kayseri koşullarında yetiştirilen farklı çerezlik kabak (*Cucurbita pepo* L.) genotiplerinde kendileme depresyonunun polen canlılığı üzerine etkisi. *Erciyes Tarım Ve Hayvan Bilimleri Dergisi*, 4(2), 17-22.
- Lieux, M. H. (1972). A melissopalynological study of 54 Louisiana (USA) honeys. *Review of Palaeobotany and Palynology*, 13(2), 95-124.
- Memiş, E. C. (2016). Isparta ili ballarının palinolojik ve fizikokimyasal özellikler yönünden incelenmesi (Yüksek Lisans Tezi). Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Osmaniye.
- Muradoğlu, F., Sulum, Z., Başak, İ., & Akkuş, G. (2019). The effect of heavy metal toxicity on pollen viability and pollen tube growth in red chief and granny smith apple cultivars. *Uluslararası Tarım Ve Yaban Hayatı Bilimleri Dergisi*, 5(1), 54-62.
- Nisbet, C., Güler, A., Yarım, G., Çenesiz, S., & Ardalı, Y. (2013). Relationship between environmental and flora change with mineral content of honey bee products. *Turkish Journal of Biochemistry*, 38(4), 494-498.

- Ozler, H. (2015). Melissopalynological analysis of honey samples belonging to different districts of Sinop, Turkey. *Mellifera*, 15(1), 1-11.
- Ören, A. (2020). Evaluation of anthropogenic indicators used in fossil pollen analysis and land-use types. *Türk Coğrafya Dergisi*, (75), 163-172.
- Özkök, A., & Bayram, N. (2021). Kestane (*Castanea sativa*) balı örneklerinin botanik orijinlerinin doğrulanması ve toplam polen sayıları. *Uludağ Arıcılık Dergisi*, 21(1), 54-65.
- Özler, H. (2018). Pollen analysis of the honey from South Anatolia. *Uludağ Arıcılık Dergisi*, 18(2), 73-86.
- Sarısu, G. (2011). Hakkari ili ballarında polen analizi (Yüksek Lisans Tezi). Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Sefalı, A., & Ünal, M. (2023). Türkiye'de yayılış gösteren bazı *Sisymbrium* L. (Brassicaceae) taksonlarının meyve ve tohum yapılarının mikromorfolojik açıdan incelenmesi. *Bayburt Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 6(1), 65-72.
- Silici, S. (2004) Physicochemical and palynological analysis of honey samples belonging to different regions of Turkey. *Mellifera*, 4:44–50 23.
- Silici, S., & Gökceoglu, M. (2007). Pollen analysis of honeys from Mediterranean region of Anatolia. *Grana*, 46(1), 57-64.
- Sorkun, K., & Doğan, C. (1995). Türkiye'nin Çeşitli yörelerinden toplanan ballarında polen analizi *Hacettepe Fen ve Mühendislik Bilim Dergisi*, 16:15-24.
- Sorkun, K., Çelemlı, Ö. G., Özenirler, Ç., Bayram, N. E., & Güzel, F. (2014). Palynological investigation of honey produced in Ardahan-Turkey. *Bee World*, 91(3), 80-83.

- Sorkun, K., Dogan, C. (1995). Pollen analysis of Rize-Anzer (Turkish) honey. *Apiacta*, 3, 75–81.
- Sorkun, K., Dogan, C., Basoglu, N., Gumus, Y., Rgun, K., Bulakeri, M., & Isik, N. (2002). Physical, chemical and microscopic analyses in distinguishing natural and artificial honey produced in Turkey. *Mellifera*, 2 (4), 45–53.
- Şenkul, Ç. & Kaya, S. (2017). Türkiye endemik bitkilerinin coğrafi dağılışları. *Türk Coğrafya Dergisi*, 69, 109-120.
- Şik, L., Güvensen, A., Durmuşkahya, C., & Erol, O. (2017). Pollen analysis of honeys from Ardahan/Turkey. *Biological Diversity and Conservation*, 10(2), 12-19.
- Taşkın, D., & İnce, A. (2009). Burdur yöresi ballarının polen analizi. *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 13(1): 10-19.
- Tel, A., Ortaç, İ., & İlçim, A. (2019). A floristic research on karatepe-aslantaş national park and some protected natural/cultural areas (Osmaniye, Türkiye). *Commagene Journal of Biology*, 3(2), 103-109.
- Terzi, E. (2009). Bilecik ve çevresinde üretilen ballarda bulunan polenlerin araştırılması (Yüksek Lisans Tezi). Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- Topal, M. C. (2020). Çanakkale’de bal arıları tarafından toplanan arı polenlerinin çeşitliliği (Yüksek Lisans Tezi). Çanakkale Onsekizmart Üniversitesi Fen bilimleri Enstitüsü, Çanakkale
- Tosunoglu, H., Tosunoglu, A., Ergün, N., & Bicakci, A. (2023). Botanical characterisation of natural honey samples from a high altitudinal region, Gümüşhane, east-Türkiye. *Grana*, 62(1), 59-69.

- Tosunoğlu, H. (2020). Marmara Bölgesi Ballarının Polen Analizi (Doktora Tezi). Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Bursa.
- Tümerdem, Ç., Pehlivan, S., & Doğan, C. (2016), Pollen analysis of honeys from Beypazarı District of Ankara Province (Turkey), *Mellifera*, 16(1):19– 26.
- Uzunca, H. (2019). Kastamonu yöresi ballarının fiziko-kimyasal ve palinolojik yönden incelenmesi (Yüksek Lisans Tezi) Kastamonu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kastamonu.
- Ürkmez, H. (2023). Karaçam, kızılçam, boylu ardıç ve meşe ormanlarında bitki tür çeşitliliği ve çevresel faktör ilişkileri. *Turkish Journal of Forestry*, 24(3), 223-234.
- Yalazi, E. (2019). Kazdağları bölgesi salgı ballarının kalite parametrelerinin belirlenmesi (Yüksek Lisans Tezi), Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Çanakkale.
- Yıldırım, E. A. (2020). Yığılca Yöresi Ballarının Polen Analizi ve Ballı Bitkiler Florası (Yüksek Lisans Tezi). Düzce Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Düzce.
- Yıldırım, E. A., Kılıç, N. K., & Özkan, N. G. (2021). Pollen analysis of honeys from Yığılca region (Düzce), Turkey. *Eurasian Journal of Forest Science*, 9(3), 259-271.
- Yurtsever, N., & Sorkun, K. (2005). Determination of botanical origin of te honey produced in the Kemaliye-Erzincan region in Fastern Turkey by microscopical and oganoleptical analyses. *Mellifera*, 5(9): 44-55.

HÜCRE KÜLTÜRÜ ÇALIŞMALARINDA KONTAMİNASYONUN BELİRLENMESİ VE ÖNLENMESİ

Harika Eylül ESMER DURUEL¹

1. GİRİŞ

Hücre kültürü yöntemleri; temel hücresel süreçleri anlamlandırmamızı sağlayan, biyolojik testleri ve ilaç geliştirme süreçlerini destekleyen, hayvan testlerine alternatif olarak geliştirilen yöntemlerdir. Kültür ortamı dışardan gelebilecek fiziksel, kimyasal ve biyolojik tüm etkenlere karşı korunaklı hale getirilmeye çalışılmasına rağmen, pek çok etken tarafından tehdit altında kalmaya devam etmektedir (Mahmood ve Ali, 2017). Hücre kültürü çalışmalarında araştırmacıların en büyük sorumluluklarından biri, hücre kültüründeki kontaminasyonları önlemektir. Hücrelerin yaşadığı ve büyüme ortamı olarak kullanılan besiyerleri, istenmeyen organizmalar için de beslenme olanağı sağlamaktadır. Hücre kültürünün; ortamda istenmeyen bakteri, mantar ve virüs ile kirlenmesi kontaminasyon olarak tanımlanmaktadır. Karşılaşılan bu durum iş gücü kayıplarına ve ekonomik zararlara sebep olmaktadır (Sharma ve ark., 2021). Hücre kültürü çalışmalarında olası risk faktörlerini belirleyerek kontaminasyon ajanlarının oluşturabilecekleri hasarı önleyebilmek önemlidir. Çalışanların iş güvenliğine yönelik riskler belirlendikten ve besiyerinin güvenliği sağlandıktan sonra çalışmalar güvenle gerçekleştirilebilir. Uygulamalar sırasında

¹ Dr. Öğr. Üyesi, Kahramanmaraş İstiklal Üniversitesi, Elbistan Meslek Yüksekokulu, Veterinerlik Bölümü, harikaeyul@gmail.com, ORCID: 0000-0002-0792-2062.

kontaminasyonu engelleyen bazı tesadüfi durumlar (uzun süreli ısıtma, kurutma, pH değişikliği) olabileceği gibi, bu riskin artabileceği durumlar da (saklama koşulları, kemirgenler gibi istenmeyen ajanlarla temas) göz önünde bulundurulmalıdır. Kontaminasyonu önlemeye yönelik en güçlü katkılar arasında, laboratuvar çalışanlarının aseptik tekniği kullanma konusundaki becerileri yer almaktadır. Çalışanlar kullandıkları hücrelerin durumunu takip ettikleri ve laboratuvar ortamındaki kontaminasyon riskini artırabilecek değişikliklerin farkında oldukları durumlarda gerekli önlemleri alabileceklerdir (Stacey, 2011). Bu çalışmada, kontaminasyonun türleri, kaynakları, etkisi ve kontaminasyon ile başa çıkmanın olası yolları ele alınacaktır.

2. HÜCRE KÜLTÜRLERİNDE KARŞILAŞILAN KONTAMİNASYON TÜRLERİ

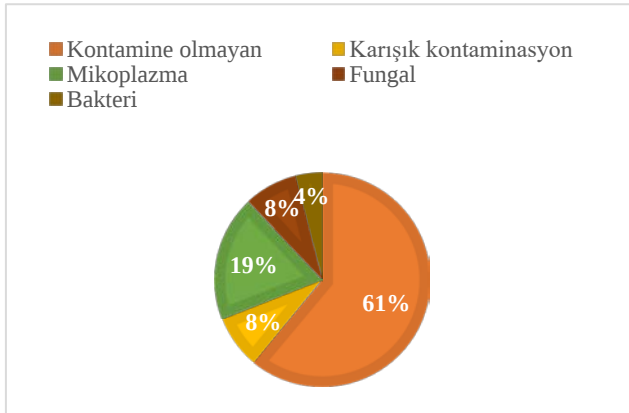
In vitro hücre kültürünün ortamı, canlı vücudunun dokularından farklı bir yapıya sahiptir. Süreç içinde canlılığını korumak, bakımını sağlamak, kaynağı bilinen ve bilinmeyen bulaşlar ile kontaminasyonu engellemek için çeşitli fiziksel ve kimyasal düzenlemeler yapılmaktadır (Uphoff ve Drexler, 2014). Kontaminasyonlar, hücre kültürü tekniklerinin uygulanması sırasında hedeflenen büyütme ortamında bulunmaması gereken bakteri, mantar, maya, virüsler ve çapraz kontaminasyon sonucu farklı ökaryotik hücreler ile yaşanan bulaşmalar olarak tanımlanabilmektedir. Araştırmanın kalitesini ve sonuçlarını tehlikeye atarak kültür üzerinde istenmeyen etkilere sebep olabilmektedir (Mahmood ve Ali, 2017). Bu tehlikeler önem derecelerine göre şu şekilde sınıflandırılabilir: birkaç plakayı etkileyen küçük kontaminasyonlar; mevcut deneyleri ve kültürleri etkileyen orta ölçekli kontaminasyonlar; geçmiş ve mevcut tüm çalışmaları etkileyen büyük kontaminasyonlar (Langdon, 2004).

Kontaminasyonlar ayrıca bulaş kaynaklarına göre biyolojik, kimyasal ve fiziksel olarak sınıflandırılabilir. Bu çalışmada bulaş kaynaklarına göre yapılan sınıflandırma dikkate alınmıştır.

2.1. Biyolojik Kontaminasyon Nedenleri

Hücre kültür ortamları tuz, eser element, glikoz gibi zengin besin içeriklerinden dolayı bakteri, mantar, protozoa ve virüsler gibi biyolojik kontaminasyon risklerine maruz kalabilmektedir. Temel karbon, azot ve ATP sentez kaynaklarını besiyerinde bulan canlılar ortamda hızlıca çoğalarak beklenmeyen biyolojik kökenli kontaminasyona sebep olabilmektedir (Capes-Davis ve ark., 2010). Kontamine hücrelerin kullanılması hatalı sonuçların elde edilmesine veya hücre hatlarının kaybına sebep olabilmektedir (Nikfarjam ve Farzaneh, 2012). Yapılan bir çalışmada 2002-2004 yılında İran Hücre ve Gen Bankası'nda yapılan analizler sonucunda, hücrelerin taşıdıkları kontaminasyon oranları belirlenmiştir. Bu oranlar Şekil 1'de yüzde değerler olarak gösterilmiştir (Mirjalili ve ark., 2005). Bu durumun ne denli ciddi sonuçlar doğurabileceği değerlendirilmelidir.

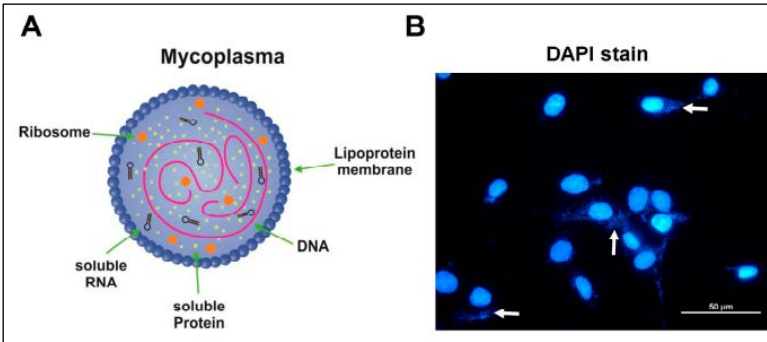
Şekil 1. 2002-2004 Yılları Arasında İran Hücre ve Gen Bankası Örneklerinin Kontaminasyon Yüzdeleri



Kaynak: (Mirjalili ve ark., 2005)

2.1.1. Bakteriyel kontaminasyonlar: Bakteriyel kontaminasyonlar arasında en ciddi kontaminasyon türlerinden biri mikoplazmalardır. Çünkü bu yavaş üreyen çok küçük bakteriler rutin mikroskop kontrolleri sırasında görüntülenememektedir (Freshney, 2006). *Mycoplasma penetrans* gibi bazı türleri hücre içinde büyümesine rağmen, bazı türleri de yüksek konsantrasyonda adezin içeriği sayesinde hücre zarına yapışarak gelişimini sürdürebilmektedir. Hayvansal dokulardan, havadaki partiküllerden, kimyasal reaktiflerden, steril olmayan yüzeylerden ve laboratuvar çalışanlarından yayılabilmektedir. Hücre duvarı bulunmadığı için yaygın olarak kullanılan birçok antibiyotik ile ortadan kaldırılmaları mümkün olmamaktadır (Stacey, 2011). Mikoplazmalar, laboratuvar ortamında hızla bulaşabilmektedirler. İlk olarak 1956 yılında, mikoplazma ile enfekte olan hücreler incelenmiştir. Yapılan çalışma, mikoplazmanın saptanmasına ilişkin ilk rapor olarak değerlendirilmektedir (Robinson ve ark., 1956; Chernov ve ark., 2014). Pek çok pasaj yapıldığında bile mikoplazmaların varlıkları saptanamayabilir, önlemler alınmasına rağmen küçük boyutları sebebiyle filtrelerden dahi geçebilmektedir (Şekil 2).

Şekil 2. (A) Mikoplazmaların hücresel yapısı, (B) Mikoplazma ile kontamine sıçan hücre hattının DAPI boyaması ve uygun bir UV filtre (340/380 nm uyarım) ile 400x büyütmede floresan mikroskop analizi. Ok ile gösterilen kısımlar mikoplazmayı işaret etmektedir



Kaynak: (Weiskirchen ve ark., 2023).

Ancak büyüme, metabolizma, morfoloji ve genom yapısı üzerine etki göstererek bunların değişmesine, yüzey antijeninin reseptör ifadesinin etkilenmesine, sitokin ifadesinin ise indüklenmesine veya baskılanmasına sebep olabilmektedir (Mahmood ve Ali, 2017). 2007 yılında 32 kök hücre hattı üzerinde yapılan bir araştırmada; 158 hücre pasajından 19'unun kontamine olduğu tespit edilmiştir (%12). Kontaminasyonu oluşturan mikroorganizmalar sırasıyla Gram pozitif koklar, Mycoplasma türleri, Gram negatif basiller ve Gram pozitif basiller olarak tanımlanmıştır (Cobo ve ark., 2007). Mikoplazmanın hücre kültürleri üzerindeki etkisi Tablo 1'de özetlenmiştir.

Tablo 1. Mikoplazma Kontaminasyonunun Hücre Kültürleri Üzerindeki Olası Etkileri

Kromozomal anomalilerin ortaya çıkması	Sitokin ifadesinin değişmesi
Hücre metabolizmasının değişmesi	Çoğalma özelliklerinin değişmesi
Protein, DNA ve RNA sentezinin etkilenmesi	Yüzey antijeni özelliklerinin değişmesi
Hücre morfolojisinin değişimi	Toplam kültürün kaybedilmesi

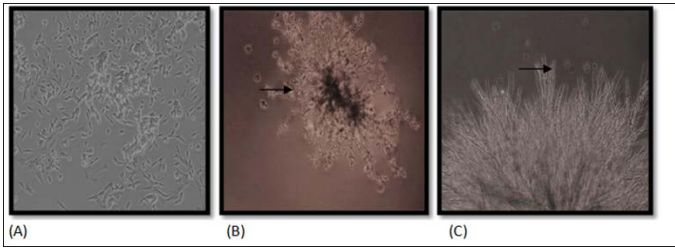
Kaynak: (Drexler ve Uphoff, 2002)

2.1.2. Viral kontaminasyonlar: Hücre kültürlerinde görülen bir diğer biyolojik kontaminasyon ise viral kontaminasyonlardır. Hepatit virüsleri, retrovirüsler, herpes virüsleri kontaminant olarak karşımıza çıkabilmektedir (Merten, 2002). Virüslere bağlı bu kontaminasyonlar laboratuvar çalışanlarını tehdit etmektedir. Uygun tekniklerin kullanılması, bulaşların önlenmesi adına yapılabilecek en temel savunma olarak görülmektedir. Hücre kültüründen elde edilecek verilerin güvenilirliği, kontaminasyonun varlığında riske girmektedir (Niehues ve ark., 2020). Virüsler hücre içi zorunlu parazitler oldukları için viral genomun entegrasyonunun görsel olarak belirlenmesi oldukça güçtür. Bu belirleme sitopatik etkiler

gösteren HIV, Herpes virüsleri ya da adenovirüsler gibi virüslerde mikroskopla gerçekleştirilebilmektedir. Bazı virüsler için pasajlama sırasında seyrilmelerinden dolayı hücre hattının riskinin azaltılabileceği yorumu yapılmaktadır (Mahmood ve Ali, 2017).

2.1.3. Fungal Kontaminasyonlar: Mantarlar ökaryotik canlılar oldukları için yok edilmeleri sırasında kullanılması gereken antifungal ajanlar hücre hattının kendisi için de sitotoksiste göstermektedir. Sporlarının dayanıklı ve hızla yayılabiliyor olması sebebiyle hem kültürde hem de çevrede bulunabilmektedir. Varlıklarının belirlenmesinde kullanılan en temel yöntemlerden biri olan pH belirleme ancak kontaminasyonun ilerleyen aşamalarında etkili olmaktadır. Mikroskop altında incelendiğinde, tomurcuk halinde dikkat çekmektedir (Mirjalili ve ark., 2005). Fungal kontaminasyonlarda hücreler flasklara yapışmamış, ince iplikler halinde veya spor kümeleri olarak görülebilmektedir. Başlangıçta mikroskop ile görüntülenseler de ileri aşamalarda çıplak gözle de görülür hale gelmektedir (Şekil 3).

Şekil 3. (A) Kontaminasyon olmayan HepG2 hücreleri, (B, C) Fungal kontaminasyonda hücreler, 10X büyütmede incelenmiştir



Kaynak: (Mahmood ve Ali, 2017)

Kontaminasyonun ilk aşamalarında hücre büyümesi etkilenmezken, ilerleyen aşamalarda pH değişmekte, ortam bulanıklaşmakta ve hücre büyümesi etkilenmektedir. Hücre sağ kalım verilerinde güvenilmeyen sonuçların ortaya çıkmasına

sebepler olabilmektedir (Malik ve ark., 2023). Laboratuvara dışarıdan getirilen kültürler mutlaka güvenilir kaynaklardan sağlanmalıdır. Bu kültürlerin belirli bir süre karantinada tutulması ve ayrı inkübatörlerde bekletilmesi gerekmektedir. Gerekli taramalar yapıldıktan sonra bulaşma riskinin en aza indiği düşünülmektedir (Weiskirchen ve ark., 2023).

2.2. Kimyasal Kontaminasyon Nedenleri

Hücre kültürü oluşturmak amacıyla kullanılan kimyasal maddeler kontaminasyonun potansiyel taşıyıcısı olarak görev alabilmektedir. Ürünlerin steril olması ya da sterilizasyon gerektirme durumu ile ilgili bilgilerin doğru değerlendirilmesi gerekmektedir. Özellikle serum ve büyüme faktörü gibi kimyasallar, sterilize edilemedikleri için kaynaktan alındıktan sonra kontaminasyon oluşturma riski taşıyabilmektedir. Kullanılan su ve serumlarda yer alabilen endotoksinlerin varlığı da önemli risk faktörlerini oluşturmaktadır. Ayrıca kültür ortamını oluştururken kullanılan kimyasalların ve plastik malzemelerin ultraviyole ışığa maruz kalması sonucunda ortaya çıkan serbest radikaller de kültür ortamını olumsuz etkilemektedir (Weiskirchen ve ark., 2023). Kültürleme işleminin yapıldığı ortam olarak kullanılan biyogüvenlik kabinleri ve inkübatörler de hava akışındaki kirliliklerle veya dezenfeksiyon amacıyla kullanılan çeşitli kimyasallarla birlikte hücre kültürü için uygun olmayan koşulların ortaya çıkmasına sebep olabilmektedir. Kültürlerin saklanması aşamasında kullanılan sıvı azot mikoplazmaların yayılma nedenleri arasında gösterilmektedir. Mikoplazmalar kriyoprezervasyon olmadan bile ortamda bulunabildikleri için o ortamda tutulan hücre kültürlerini kontamine edebilmektedir (Bielanski ve Vajta, 2009).

Mikrobiyal kontaminasyonu önleyebilmek için hücre kültürü ortamına antibiyotik ilavesi yapmak laboratuvarlarda tercih edilen bir uygulamadır. Ancak aşırı antibiyotik kullanımı

sonucunda dirençli türler gelişebilmekte veya antibiyotiğin etki etmediği türler gizlenerek kültürü kontamine edebilmektedir (Nikfarjam ve Farzaneh, 2012).

2.3. Fiziksel Kontaminasyon Nedenleri

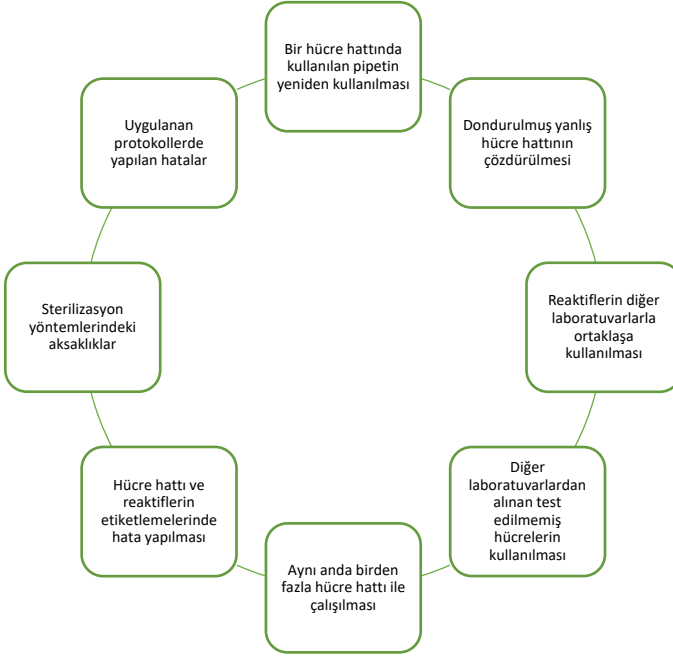
Hücre kültürü oluşturulurken kullanılmakta olan fiziksel ekipmanlar veya yöntemler de kontaminasyona yol açabilmektedir. Kültür kaplarının düzgün kapatılmaması sonucunda kontaminantlar giriş yapabilmektedir. Kapakların ıslanması sonucunda ise filtre etkinliğini koruyamayacağı için risk faktörü haline gelecektir. Pipetler, aspiratörler, santrifüjler, inkübatörler ve buzdolapları kontaminantların bulunabileceği ekipmanlar olarak görülerek önlemler alınmalıdır. Laboratuvar ortamında çalışan kişiler de potansiyel olarak kontaminasyon tehlikesi oluşturmaktadır. Deri döküntüleri ve ağız florasından bulaşmalar en yaygın bulaş kaynakları olarak bilinmektedir. Ayrıca bireysel olarak taşınan hastalık etkenleri de ortama bulaşabilmektedir. Laboratuvara alınan malzemelerin fiziksel kontrolü, laboratuvarın temizliği, eldiven kullanma hassasiyeti ve aseptik tekniğin uygulanması bu riskleri en aza indirecektir (Cornish ve ark., 2021). İnkübatörlerin içerisinde yer alan fanlarla birlikte mikroorganizmaların ortama yayılma ihtimali söz konusu olabilmektedir. Ayrıca uygun olmayan sterilizasyon tekniklerinin uygulanması ve malzeme depolamasında hatalı alanların kullanılması da önemli kontaminasyon kaynakları olarak görülmektedir (Nikfarjam ve Farzaneh, 2012).

2.4. Çapraz Kontaminasyon

Araştırma yapılan laboratuvarda aynı anda kullanılan birden fazla hücre hattı varsa, bu kültür ortamları arasında çapraz kontaminasyon meydana gelebilmektedir. Hücre hatlarının aynı türün farklı hücre tipleriyle veya başka bir türlere ait hücrelerle kontaminasyonu yaygın bir sorundur (Huang ve ark., 2017). Farklı hücrelerin bir arada kültürünün yapılması, hücrelerde

genotipik ve fenotipik farklılaşmaya yol açabilmektedir (Geraghty ve ark., 2014). Çapraz kontaminasyon, uygulanan tekniklerdeki hatalar, reaktiflerin paylaşılması, dondurma/çözme protokollerindeki aksaklıklar, sterilizasyonun doğru uygulanmaması gibi durumlardan ortaya çıkabilmektedir. Şekil 4'te olası nedenler sıralanmaktadır:

Şekil 4. Çapraz Kontaminasyonun Olası Nedenleri



Çapraz kontaminasyonların ortaya çıkmaması için çeşitli önlemler alınabilmektedir bunlar:

- Aynı anda birden fazla hücre hattının kullanımı engellenmelidir.
- Eğer aynı anda birden fazla farklı hücre hattı kullanılması gerekiyorsa; hücre hatları aynı anda açık bırakılmamalı, hücre hatları arasında ortak besiyeri ve pipet kullanılmamalıdır.

- Besiyeri ve reaktifler başka laboratuvarlarla ortaklaşa kullanılmamalıdır.
- Ortamda kirlilik belirteçleri görüldüğü anda hemen silinmeli, %70'lik alkol ile temizlenmelidir.
- Mikroskop ile hücre hatlarının incelemesi sırasında hücrelerdeki morfolojik özelliklerde değişiklikler varsa mutlaka belirtilmelidir (Freshney, 2006).

3. KONTAMİNASYONU BELİRLEME YÖNTEMLERİ

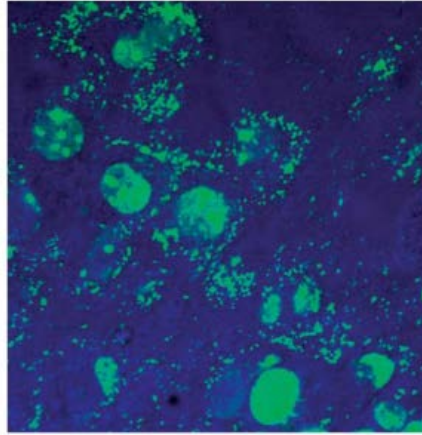
Hücre hatlarında meydana gelen kontaminasyonların belirlenmesinde laboratuvarlarda pek çok yöntem geliştirilmiştir. Bu yöntemler aşağıda başlıklar halinde sıralanmaktadır.

- **pH değişimi ile kontaminasyonun belirlenmesi:** Kültür ortamında bakteriyel veya fungal bir kontaminasyon söz konusuysa ortamın pH'ında değişim meydana gelir. Kültür ortamındaki bulanıklaşma kontaminasyonun ileri aşamalarının habercisi olmaktadır (Mahmood ve Ali, 2017).
- **Rutin mikroskopik gözlem:** Hücrelerin düzenli aralıklarla gözlenmesiyle birlikte kontaminantların erken tespiti söz konusu olabilmektedir. Bakteriyel ve fungal kontaminasyonlar bu şekilde belirlenebilmektedir. Şüphelenilen kültürlerde kontaminasyonu gösterebilmek adına boyama tekniklerine başvurulabilmektedir (Nims ve Price, 2017).
- **Mikrobiyolojik koloni testi:** Mikoplazmaların oluşturdukları koloniler agar yüzeyinde rahatlıkla tespit edilebilmektedir. Sahanda yumurta görünümü kolonilerin belirlenmesi ile kontaminasyonu netleştirilmiş

olmaktadır. Farklı bakteriyel ve fungal bulaşmalar sonucunda da benzer şekilde oluşan kolonilerin şekillerinden kontaminasyon sebebi olan organizma tespit edilebilmektedir. Yorumlanması sırasında uzman görüşüne ihtiyaç duyulmaktadır, ayrıca inkübasyon süresinin uzun olması da dezavantajlı bir yöntem olarak görülmesine neden olmaktadır. Hassas ve ekonomik bir referans yöntem olması bu uygulamanın avantajı olarak görülmektedir (Drexler ve Uphoff, 2002).

- **Boyama yöntemleri:** Gram boyama, aside dirençli boyama, fungal boyama, Hoechst boyama, immün boyama ve floresans boyama (Şekil 5) gibi yöntemler ile mikroorganizmaların tespiti sağlanabilmektedir (Drexler ve ark., 1994; Rottem ve ark., 2012).

Şekil 5. Mikoplazma ile kontamine olmuş ökaryotik hücrelerin Floresan DNA boyası ile boyanarak incelenmesi



Kaynak: (Rottem ve ark., 2012)

- **Floresan in situ hibridizasyon (FISH) yöntemi:** Floresan mikroskopisi ve lüminometre kullanılarak ATP üretiminin saptanmasına dayalı analiz yöntemleridir. Sonuçlar hızlıca elde edilebilmektedir.

- **İmmünolojik testler:** ELISA testleri, immün boyama ve pürin analogları ile sitotoksikite testleri duyarlılıkları daha az olsa da uygulanan yöntemler arasında yer almaktadır. Son yıllarda bu yöntemlerin tercih edilme oranı azalmıştır (Uphoff ve Drexler, 2014).
- **Endotoksinlerin belirlenmesi:** Membran bileşeni olan endotoksinler canlı bakterilerden ya da bakterilerin parçalanmasından ortama salınmaktadır. Endotoksinler pirojeniktir ve depirojenizasyon için otoklavlama tek başına yeterli olmamaktadır. İlk başlarda pirojenite testleri için tavşan deneyleri uygulansa da yeni yöntemlerin geliştirilmesiyle birlikte jel-clot gibi daha kolay ve hızlı yanıt veren testler geliştirilmiştir.
- **Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR):** Klasik yöntemlere ek olarak kullanılabilmektedir. Son derece hassas, spesifik, hızlı, maliyet olarak uygun olması avantajları arasında sayılabilmektedir. Dondurulmuş örneklerde bile etkili olmasından dolayı tercih edilen bir yöntemdir (Drexler ve Uphoff, 2002). Bu yöntem ile bakteriyel, fungal veya viral bulaş olması fark etmeksizin kontaminasyon kesin olarak belirlenebilmektedir (Nims ve Price, 2017).
- **STR profilinin belirlenmesi:** DNA'nın kısa tandem tekrarları (STR) aracılığıyla profillenmesi ilkesine dayanmaktadır. STR parçacıklarını tespit etmek için PCR ile amplifikasyonu takiben jel elektroforezi kullanılmaktadır. Böylelikle hücre hattının kimlik doğrulaması referans veri tabanı kullanılarak yapılabilmektedir (Korch ve ark., 2012).
- **Diğer moleküler teknikler:** Hücre hatlarında meydana gelen kontaminasyonları belirlemek için Giemsa-banlı karyotipleme, izoenzim analizi, moleküler ve serolojik

testler, DNA parmak izi gibi yöntemler kullanılabilmektedir (Routray ve ark., 2016). İzoenzim örnekleri elektroforetik özelliklere göre ayrılarak tür kimliğini doğrulayan karakteristiği oluşturabilmektedir.

4. KONTAMİNASYONUN ELİMİNASYONU

Eliminasyon yöntemleri genellikle zaman alan işlemler olarak görülmektedir. Ancak kolay uygulanan, hızlı, güvenilir ve ekonomik eliminasyon yöntemleri hücre kaybının önüne geçebilmektedir. Bu yöntemlerin kesin başarı vadedmediği bilinmelidir.

Bazı uygulamalarda ışınlar (gamma, UV) kontaminasyonun fiziksel eliminasyonu amacıyla kullanılabılırken, yöntemin orijinal hücre hattına zarar verme ihtimali de mutlaka göz önünde bulundurulmalıdır (Shiratori ve Kiss, 2018). Otoklav gibi basınçlı ısı ortamında da eliminasyon uygulanabileceği gibi ısıyla bozulma özelliği olan besiyerlerinde yöntem filtrasyon ile sağlanabilmektedir. Aynı zamanda bu filtrasyon özelliği laboratuvar ve biyogüvenlik kabininin içerisindeki havanın filtrelenmesinde de uygulanmalı, böylece aerosol bulaşmalarının da önüne geçilmelidir.

Kimyasal eliminasyon yöntemleri arasında deterjanlara maruz bırakma, eter kloroform ile yıkama gibi prosedürler tercih edilebilmektedir. Dekontaminasyon yöntemlerinin uygulanabileceği prosedürlere dair örnekler Tablo 2’de yer almaktadır.

Tablo 2. Kontaminasyonun eliminasyonu için farklı prosedür önerileri

Fiziksel Prosedürler	Kimyasal Prosedürler	İmmünojik Prosedürler	Kemoterapötik Prosedürler
Isıl işlem	Deterjanlara maruz bırakma	Makrofajlarla kültürleme	Antibiyotik tedavisi
Filtrasyon	Eter-kloroform ile yıkama	Antimikoplazma serumları ile kültürleme	Antibiyotik tedavisine ilave hiperimmün serum uygulaması
Işınlar ile hücre hasarının indüklenmesi	6-metilpurin deoksiribozidde kültürleme	Hücre klonlama	

Kaynak: (Drexler ve Uphoff, 2002)

Kültür ortamlarında ortaya çıkan kontaminasyonlarda ise fiziksel ve kimyasal prosedürler uygulanamıyorsa immünojik prosedürler uygulanmalıdır. Ortamda bulunan bulaş kaynaklarını uzaklaştırmak için makrofajlarla kültürleme, antimikoplazma serumlarının ilavesi yapılabilmektedir. Bu aşamada çapraz kontaminasyon riski bulunuyorsa dikkatli olunmalıdır.

Kemoterapötik uygulamalar, kültür ortamı kontamine olduğunda antibiyotik ilavesiyle sağlanabilmektedir. Antibiyotiklerin tek başına yeterli olmaması durumunda antibiyotikle birlikte hiperimmün serum takviyesi de sağlanabilmektedir.

Kültür ortamının kontamine olup olmadığı düzenli gözlemler ve ölçümler ile belirlenebilmektedir. Kontaminasyon görüldüğünde diğer kültürlere yayılmadan önce mutlaka eliminasyon prosedürleri uygulanmalıdır. Uygulamaların her birinin farklı bir durumun ortaya çıkmasına sebep olacağı da (örneğin, antibiyotiğe dirençli mikroorganizma oluşması) göz önünde bulundurulmalıdır (Freshney, 2006).

5. KONTAMİNASYONUN ÖNLENMESİ

Hücre kültürü çalışmalarındaki en önemli kısım hücrelerin kontamine olmadan, fizyolojik sapmalar göstermeden

araştırmayı yürütebilmektir. Kontaminasyonu önleyebilmek adına atılabilecek en doğru adım bilinçli, eğitilmiş, dikkatli personel ile çalışmaktır. Kontaminasyonun erken aşamada tespit edilmesi; diğer hücre hatlarını ve kullanılan kimyasalları riske atmadan önüne geçilmesi açısından önemlidir (Stacey, 2011).

Kültürü oluşturulurken kullanılan kimyasal maddeler potansiyel kontaminasyon taşıyıcısı olarak düşünülmelidir. Kullanılan malzemelerin özelliklerinde yazan sterilizasyon gereklilikleri mutlaka yerine getirilmelidir. Zaruriyet sebebiyle sterilize edilemeyen ürünlerin risk oluşturacağı göz önünde bulundurularak çalışmaya devam edilmelidir. Serumlar ve kimyasal reaktifler deneyden önce her zaman sterilite açısından test edilmelidir. Her zaman üretici tarafından sterilize edilmiş kültür kapları tercih edilmelidir (Phelan ve ark., 2015).

Antibiyotik kullanımının sürekli olması aseptik tekniğin zayıflamasına, mikroorganizmalarda antibiyotik dirençliliğine ve bazı ökaryotik hücresel süreçlerin engellenmesine sebep olabilmektedir. Ayrıca mikoplazma gibi hücre duvarı bulunmayan türlerde penisilin ve sefalosporin gibi hücre duvarını inhibe eden antibiyotiklerin etkili olmayacağı da göz önünde bulundurulmalıdır. Dekontaminasyon işlemi kontaminasyonun ortadan kaldırılmasında son çare olarak görülmelidir. Çünkü bu yöntemin kullanılması da dirençli türlerin ortaya çıkmasına neden olabilmektedir. (Freshney, 2006)

Kontaminasyonların önlenmesinde aşağıda yer alan basamaklar takip edilebilir (Drexler ve Uphoff, 2002; Stacey, 2011):

- Biyogüvenlik kabinleri laboratuvarın ana hava akım noktalarından uzağa yerleştirilmeli, atık toplama alanları temiz alanın uzağında tutulmalı, mikroorganizmalarla çalışma yapılacak ise bunlar temiz hücre kültürü ortamından ayrı bir yere konumlandırılmalıdır.

- Biyogüvenlik kabininin içerisine alınacak sarf malzemeler ve cihazlar sterilize edilmelidir. Hücre kültürü amacıyla uygulanan işlemlerin hiçbiri biyogüvenlik kabini dışında yapılmamalıdır.
- Biyogüvenlik kabininin kirlenmesi durumunda önce temizlik yapılmalı, ardından UV sterilizasyonu sağlanmalıdır.
- Laboratuvarın havalandırma sisteminde HEPA filtreler kullanılmalıdır.
- Kültür ortamında kontaminasyon görülmesi durumunda hangi kültürlerin etkilendiği, farklı hücreler üzerinde bir etkide bulunup bulunmadığı, yakın zamanda değişen sarf malzemesinin olup olmadığı tespit edilerek raporlanmalıdır.
- Açılmış olan tüm kontamine kültürler ve ilişkili besiyerleri atılmalıdır.
- Dolaplar, inkübatörler, inkübatörde yer alan su tepsileri düzenli olarak kirlilik belirteçleri açısından incelenmelidir.
- Yeni hücre hatlarına kalıntı kontaminasyonun geçmesi engellenmelidir. Bu amaçla işleyişi durdurmak ve detaylı laboratuvar temizliği yapmak gerekmektedir.
- Yeniden hücre kültürü sürecine başlandığında kontaminasyonun tamamen ortadan kalktığından emin olmak için dikkatli bir gözlem yapılmalıdır. Şüpheli durumlar hızlıca rapor edilmelidir.
- Mikroorganizma tarama prosedürleri düzenli aralıklarla tekrarlanmalıdır.

- Laboratuvar ortamında yeme, içme, makyaj yapma gibi kontaminasyona sebep olabilecek aktiviteler engellenmelidir.

6. SONUÇ

Hücre kültürü çalışmaları, hücresel süreçleri anlamamızı sağlayan önemli çalışmalardır. Hayvan testlerine alternatif olarak kullanılabilmekte ve araştırma geliştirme süreçlerine olanak tanımaktadır. Kültürlerin biyolojik, kimyasal ve fiziksel kontaminasyonları ile çapraz kontaminasyonları, yürütülen çalışmaların başarısız sonuçlanmasına neden olabilmektedir. Bu çalışmada olası riskler ile kontaminasyonun belirlenmesi, eliminasyonu ve önlenmesi için gereken yöntemler bir arada sunulmuştur.

Kontaminasyonun, hücre kültürü çalışmalarına büyük zararlar verebilecek ve laboratuvarlarda her an karşımıza çıkabilecek bir durum olduğu unutulmamalıdır. Araştırma süresi boyunca çalışılan hücre hatlarının morfolojik ve fizyolojik yapısının iyi tanınması, olası kontaminasyon risk faktörlerinin tespit edilmesi, riskin en aza indirilmesi için alınması gereken önlemler ve kontaminasyon durumunda hangi yöntem ile elimine edilebileceği hususlarına özen gösterilmelidir. Çalışanların hücre kültürü konusunda alacakları eğitimler, laboratuvar ortamının kontaminasyon yükünün azaltılması, hücre kültüründe kullanılacak kimyasalların ve cihazların yer alacağı süreçler titizlikle takip edilmelidir.

KAYNAKÇA

- Bielanski, A., & Vajta, G. (2009). Risk of contamination of germplasm during cryopreservation and cryobanking in IVF units. *Human reproduction*, 24(10), 2457-2467.
- Capes-Davis, A., Theodosopoulos, G., Atkin, I., Drexler, H. G., Kohara, A., MacLeod, R. A., ... & Freshney, R. I. (2010). Check your cultures! A list of cross-contaminated or misidentified cell lines. *International journal of cancer*, 127(1), 1-8.
- Chernov, V. M., Chernova, O. A., & Sanchez-Vega, J. T. (2014). Mycoplasma contamination of cell cultures: vesicular traffic in bacteria and control over infectious agents. *Acta Naturae*, 6(3 (22)), 41-51.
- Cornish, N. E., Anderson, N. L., Arambula, D. G., Arduino, M. J., Bryan, A., Burton, N. C., ... & Campbell, S. (2021). Clinical laboratory biosafety gaps: lessons learned from past outbreaks reveal a path to a safer future. *Clinical microbiology reviews*, 34(3), 10-1128.
- Drexler, H. G., & Uphoff, C. C. (2002). Mycoplasma contamination of cell cultures: Incidence, sources, effects, detection, elimination, prevention. *Cytotechnology*, 39, 75-90.
- Drexler, H. G., Gignac, S. M., Hu, Z. B., Hopert, A., Fleckenstein, E., Voges, M., & Uphoff, C. C. (1994). Treatment of mycoplasma contamination in a large panel of cell cultures. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*, 30, 344-347.
- Freshney, R. I. (2006). Basic principles of cell culture. *Culture of cells for tissue engineering*, 3-22.
- Geraghty, R. J., Capes-Davis, A., Davis, J. M., Downward, J., Freshney, R. I., Knezevic, I., ... & Vias, M. (2014).

- Guidelines for the use of cell lines in biomedical research. *British journal of cancer*, 111(6), 1021-1046.
- Huang, Y., Liu, Y., Zheng, C., & Shen, C. (2017). Investigation of cross-contamination and misidentification of 278 widely used tumor cell lines. *PloS one*, 12(1), e0170384.
- Korch, C., Spillman, M. A., Jackson, T. A., Jacobsen, B. M., Murphy, S. K., Lessey, B. A., ... & Bradford, A. P. (2012). DNA profiling analysis of endometrial and ovarian cell lines reveals misidentification, redundancy and contamination. *Gynecologic oncology*, 127(1), 241-248.
- Langdon, S.P. (2004). Cell culture contamination: an overview. *Methods Mol Med* , 88, 309-17.
- Mahmood, A., & Ali, S. (2017). Microbial and viral contamination of animal and stem cell cultures: common contaminants, detection and elimination. *Journal of Stem Cell Research & Therapeutics*, 2(5), 149-155.
- Malik, P., Mukherjee, S., & Mukherjee, T. K. (2023). Microbial contamination of mammalian cell culture. In *Practical Approach to Mammalian Cell and Organ Culture* (pp. 187-231). Singapore: Springer Nature Singapore.
- Merten, O. W. (2002). Virus contaminations of cell cultures—a biotechnological view. *Cytotechnology*, 39, 91-116.
- Mirjalili, A., Parmoor, E., Bidhendi, S. M., & Sarkari, B. (2005). Microbial contamination of cell cultures: a 2 years study. *Biologicals*, 33(2), 81-85.
- Niehues, H., Jansen, P. A., Rodijk-Olthuis, D., Rikken, G., Smits, J. P., Schalkwijk, J., ... & van den Bogaard, E. H. (2020). Know your enemy: Unexpected, pervasive and persistent viral and bacterial contamination of primary cell cultures. *Experimental Dermatology*, 29(7), 672-676.

- Nikfarjam, L., & Farzaneh, P. (2012). Prevention and detection of Mycoplasma contamination in cell culture. *Cell Journal (Yakhteh)*, 13(4), 203.
- Nims, R. W., & Price, P. J. (2017). Best practices for detecting and mitigating the risk of cell culture contaminants. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*, 53, 872-879.
- Phelan, K., & May, K. M. (2015). Basic techniques in mammalian cell tissue culture. *Current protocols in cell biology*, 66(1), 1-1.
- Robinson, L. B., Wichelhausen, R. H., & Roizman, B. (1956). Contamination of human cell cultures by pleuropneumonia-like organisms. *Science*, 124(3232), 1147-1148.
- Rottem, S., Kosower, N. S., & Kornspan, J. D. (2012). Contamination of tissue cultures by mycoplasmas. *Biomedical Tissue Culture*, 3, 35-58.
- Routray, I., Mahmood, A., Ngwa, N. E., Tasleem, M., Sahin, K., Kucuk, O., & Ali, S. (2016). Cell line cross-contamination and accidental co-culture. *J Stem Cell Res Ther*, 1(5), 00031.
- Sharma, A. K., Singh, A. K., Waseem, M., & Kumar, S. (2021). Animal cell culture. In *Clinical Biochemistry and Drug Development* (pp. 7-31)Ed. Shashank Kumar. Apple Academic Press.
- Shiratori, M., & Kiss, R. (2018). Risk mitigation in preventing adventitious agent contamination of mammalian cell cultures. *New bioprocessing strategies: development and manufacturing of recombinant antibodies and proteins*, 75-93.

- Stacey, G. N. (2011). Cell culture contamination. In *Cancer cell culture: methods and protocols*(pp. 79-91.), Ed. Ian A. Cree, Humana Press.
- Uphoff, C. C., & Drexler, H. G. (2014). Detection of Mycoplasma contamination in cell cultures. *Current protocols in molecular biology*, 106(1), 28-4.
- Weiskirchen, S., Schröder, S. K., Buhl, E. M., & Weiskirchen, R. (2023). A beginner's guide to cell culture: Practical advice for preventing needless problems. *Cells*, 12(5), 682.

LEAF DEVOUR PESTS OF MULBERRY (*Morus* spp.)

Aabid Ahmad BHAT¹

Lubna ALTAF²

Umar FAROOQ³

Hakan BOZDOĞAN⁴

1. INTRODUCTION

The practice of rearing silkworms to produce silk is called sericulture, This agro-based sector entails several tasks and is a significant rural industry in India. With a history dating back to the 18th century, India is currently the second-largest silk producer globally. Sericulture provides livelihood support to over 7 million people, primarily in rural areas, with major sericulture hubs located in Karnataka, Andhra Pradesh, Tamil Nadu, and West Bengal. India produces four varieties of silk - Mulberry, Tasar, Eri, and Muga -with mulberry accounting for approximately 70% of total production. The Indian government has initiated various programs to promote sericulture, including

¹ College of Temperate sericulture, Mirgund, Sher-e-Kashmir University of Agricultural Science and Technology of Kashmir (SKUAST-K), Shalimar, J&K, India.

² College of Temperate sericulture, Mirgund, Sher-e-Kashmir University of Agricultural Science and Technology of Kashmir (SKUAST-K), Shalimar, J&K, India.

³ College of Temperate sericulture, Mirgund, Sher-e-Kashmir University of Agricultural Science and Technology of Kashmir (SKUAST-K), Shalimar, J&K, India.

⁴ Assoc Prof, Hakan Bozdoğan Kırşehir Ahi Evran University, Vocational School of Technical Sciences, Department of Plant and Animal Science, Kırşehir, Turkey, hakan.bozdogan@ahievran.edu.tr, ORCID: 0000-0002-6836-4383.

the National Sericulture Mission, to enhance silk production, improve quality, and increase exports. As a result, India's sericulture sector has witnessed steady growth, contributing significantly to the country's rural economy and textile heritage.

The mulberry leaf (*Morus* spp.) is the exclusive natural food source for the silkworm, *Bombyx mori* L. Mulberry is a perennial, evergreen crop that thrives in diverse soils and conditions, including rainfed and irrigated environments, and can be cultivated in row, pit, hedge, or avenue tree systems. To date, over 300 insect and non-insect species have been identified as mulberry pests, infesting the crop at varying intensities during different stages and seasons. The composition of arthropod pests and resultant damage vary according to agro-climatic conditions, crop diversity, and regional farming practices. In India, mulberry is susceptible to infestation by numerous organisms due to its rapid growth and lush foliage. To date, over 300 insect and non-insect species have been identified as mulberry pests, infesting the crop at varying intensities during different stages and seasons. The composition of arthropod pests and resultant damage vary according to agro-climatic conditions, crop diversity, and regional farming practices. Key insect pests affecting mulberry belong to the following orders: Hemiptera, Lepidoptera, Coleoptera, Thysanoptera, Orthoptera and Isoptera. Pest flare-ups on mulberry are often triggered by a combination of factors, including climatic changes, agricultural practices, and ecosystem imbalances. Excessive rainfall, drought, or temperature fluctuations can weaken mulberry plants, making them more susceptible to pest attacks. Improper irrigation, fertilization, and pruning practices can also contribute to pest infestations. Additionally, the widespread use of broad-spectrum pesticides has led to the development of pesticide-resistant pest populations and disrupted beneficial insect communities. Monoculture farming practices, lack of crop rotation, and poor sanitation

further exacerbate pest issues. Moreover, introduction of exotic pest species through international trade and human movement has increased the risk of pest invasions. Climate change has altered pest dynamics, enabling some species to thrive and spread more rapidly.

Finally, inadequate pest monitoring and management practices, coupled with limited farmer awareness and training, perpetuate pest problems, ultimately threatening mulberry productivity and sericulture sustainability. 1. Climatic changes, 2. Agricultural practices (irrigation, fertilization, pruning), 3. Ecosystem imbalances, 4. Pesticide misuse and resistance, 5. Monoculture farming, 6. Poor sanitation, 7. Exotic pest introductions, 9. Inadequate pest monitoring and management, 10. Limited farmer awareness and training. Keeping in view the importance of sericulture in India Understanding these pests is crucial for effective management strategies to ensure healthy mulberry cultivation and sustainable sericulture practices.

2. THE BIOLOGY AND MANAGEMENT OF IMPORTANT PESTS OF MULBERRY

2.1. Mulberry Leaf Roller (*Diaphania pulverulentalis*)

The mulberry leaf roller, *Diaphania pulverulentalis* (Hampson), is a significant pest infesting mulberry plantations in Karnataka, Andhra Pradesh, and Tamil Nadu, causing substantial economic losses to sericulturists.

Distribution and Period of Occurrence

The pest is observed after the onset of monsoon (June to February), with peak infestation during September to November.

Symptoms and Nature of Damage

- Early-stage larvae create a silken web among apical leaves, feeding by scraping tissue.
- As larvae grow, they roll up tender leaves, consuming entire leaves except midrib and veins.
- Distributed larvae move among webbed leaves, soiling lower leaves with fecal matter.

Life Cycle

- Fecundity: 80-150 eggs
- Egg period: 3-4 days
- Five larval instars; total larval period: 12-15 days
- Pupal period: 7-9 days
- Adult longevity: 8 (male) and 11 (female) days
- Life cycle completion: 17-24 days

Management

Mechanical Control

1. Clip-infested portions; collect and destroy them polythene bags or buckets with 0.5% soap solution.
2. Top clipping (apical bud and next leaf) and burning apical tips when silkworms are in IV moult.
3. Flood irrigation and deep ploughing to kill pupae.
4. Use light traps to attract and kill adults.

Chemical Control

1. Foliar application of 0.076% DDVP (Dichlorvos) 76% EC, 10 days after pruning/leaf harvest.
2. Commercial neem pesticide (0.03% AZ) with 10-day safe period.
3. Spray insecticides during evening hours.

Biological Control

1. Release pupal parasitoid *Tetrastichus howardi* (@ 50,000 adults/acre).
2. Release *Trichogramma chilonis* – an egg parasitoid (@ 1 Trichocard/week).

2.2. Bihar Hairy Caterpillar (*Spilarctia obliqua* Walker) Symptoms

- Newly hatched larvae congregate on the lower surface of leaves, scraping and feeding on green matter, leaving only the veinal network.
- Mature larvae disperse, feeding on entire leaves, except midrib and veins, causing bare branches in severe attacks.

Occurrence

Incidence of Bihar hairy caterpillar, *S. obliqua* in mulberry starts with the onset of monsoon. It occurs throughout the year in certain pockets. Peak infestation is seen from March to April and July to November.

Life Cycle

- Eggs: 1000-1200
- Incubation period: 5-7 days
- Larval period: 28-30 days
- Pupal duration: 12-14 days
- Life cycle completion: 45-51 days

Management

Mechanical/Physical

1. Regularly monitor mulberry gardens and collect/destroy egg masses and young caterpillars.
2. Deep ploughing and flood irrigation to kill pupae.

3. Create trenches around the plot to prevent caterpillar migration. Fill trenches with poisonous baits (see preparation below).

Bait preparation

- Dissolve 2 kg jaggery in 1 liter water.
- Add 20-25 kg sawdust/wheat bran + 3 liters water.
- Add 250 ml Nuvacron; mix well and ferment for 1 day.

Chemical

1. Spray 0.15% DDVP (2 ml/1 liter water) to kill caterpillars.
2. Safety period: 15 days.

Biological

1. Release pupal parasitoid *Tetrastichus howardi* (@ 50,000 adults/acre).
2. Release *Trichogramma chilonis* – an egg parasitoid (@ 1 Trichocard/week).

2.3. Cutworm (*Spodoptera litura*)

Description

Spodoptera litura is a widely distributed, polyphagous pest that infests mulberry plants.

Occurrence The cutworm incidence occurs from August to February, mainly in winter season.

Life Cycle

- Eggs: Laid in clusters of 200-300 on lower leaf surfaces, covered in brown hairs.
- Egg hatch: 4-5 days.
- Larvae: Cylindrical, pale greenish-brown with gray dorso-ventral bands; nocturnal.
- Larval period: 15-22 days.

- Pupation: In soil, within an earthen cell.
- Adult emergence: 15-20 days.
- Total life cycle: 30-40 days.

Seasonal Occurrence

August to February, with peak severity during winter.

Damage

- 40-50% crop loss during peak season.
- Cutworm caterpillars attack young mulberry shoots, cutting them off.
- Leaves are voraciously consumed.

Management

1. Light traps: Attract and kill adults.
2. Egg mass collection: Destroy to prevent hatching.
3. Poison baits: Wheat bran mixed with insecticide; attract larvae during dusk hours.
4. Deep ploughing: Expose pupae.
5. Chemical control: Spray Nuvan 0.05% during evening hours; 7-day safe period.

Biological Control

- Natural parasitization by *Apanteles* sp. and *Chelonus* sp.

2.4. Wingless Grasshopper (*Neorthacris acuticeps nilgirensis*)

Description:

Neorthacris acuticeps nilgirensis Uvarov (Orthoptera: Acrididae) is a significant pest in rainfed mulberry plantations, particularly in black cotton soils of Mysore and Chamarajanagar districts, Karnataka.

Infestation and Damage

- Infestation rate: 8-95%
- Host range: Mulberry, sunflower, ragi, groundnut, beans, potato, jowar, etc.
- Period of occurrence: Monsoon and post-monsoon periods (October peak)
- Symptoms: Nymphs and adults feed on sprouting buds, leaves, and green bark, causing defoliation

Life Cycle

- Adults: Light green, gravid females lay 6-8 egg pods in loose soil (2-3 cm depth)
- Eggs: 8-18 per pod, hatch in 28-31 days
- Nymphs: 8 instars, 90-95 days; straw-coloured (I-III instars) then light green
- Females: Larger, live 45-60 days
- Life cycle completion: 163-186 days

Management Practices

1. Mechanical control: Sweep grasshoppers with insect nets on bunds and infested crops.
2. Cultural control: Trim bunds after the first monsoon rains to expose egg pods.
3. Deep ploughing: Expose egg pods to the sun and natural enemies after the monsoon.
4. Chemical control: Spray Nuvan 0.05% on bunds and infested crops.
5. Safety precaution: Avoid harvesting grass or mulberry leaves for 8-10 days to prevent residual toxicity.

2.5. May and June Beetles/Cock Chafer Beetles (*Holotrichia serrata*)

Description

Holotrichia serrata (Coleoptera: Melolonthidae), commonly known as May and June beetles, are pests that infest mulberry gardens.

Life Cycle

- One-year life cycle
- Adult reproductive flights: May-August
- Eggs laid individually in earthen balls of soil
- Larval development (three instars): one year
- Overwintering stages: second or third instar grubs

Damage and Symptoms

- Adult beetles swarm into mulberry gardens at night, devouring foliage and leaving only stems.
- Serious pest in Banur, Malavally (Karnataka), Udumalpet (Tamil Nadu), and Marayoor (Kerala).

Management

- 1. Light traps:** Collect adult beetles in containers with kerosene and water during night time.
- 2. Soil application**
 - 0.2% Malathion or Chlorpyrifos dust in white grub areas.
- 3. Foliar application**
 - 0.2% DDVP (2.63 ml/liter water; 17-day safety period)
 - 0.2% Neem oil (2 ml/liter water; 12-day safety period)

2.6. Weevils

Description

Thirteen weevil species damage mulberry, with *Mylocerus dentifer*, *M. discolor*, *M. viridanus*, and *M. dorsatus* being common pests in southern sericultural dry zones of Karnataka.

Damage and Symptoms

- Adults: Feed on foliage, creating irregular serrated margins.
- Grubs: Scrape and feed on rootlets and roots.

Period of Infestation

Maximum infestation occurs from July to October.

Management

- Spot application of Dieldrin 1.5% (@ 10-12 kg/ha) before planting cuttings provides effective protection against severe grub infestation.

2.7. Molluscan Pests of Mulberry

Mulberry is susceptible to damage from snails and slugs, particularly in areas with high relative humidity and organic soil content.

Snail Species Infesting Mulberry

- Giant African snail (*Achatina fulica fulica* Bowdich)
- Land snail (*Rachis punctatus* Anton)
- *Ariophanta bistrialis* (Beck.)
- *Cryptozona semirugata* (Beck.)
- *Machrochlamys pedina* (Benson)
- *Indoplanorbis exustus* (Deshayes)
- *Pila globosa*
- *Cochliopa* sp.

Giant African Snail (*Achatina fulica* Bowdich)

- Major pest in Bangalore Rural, Ramanagaram, Mandya, and Tumkur districts of Karnataka
- Native to East Africa, introduced to India in 1847 as a food source
- Now widespread in India, affecting various crops, including mulberry

Damage to Mulberry

- Snails feed on tender leaves, stem, and bark
- Infested leaves have circular holes
- Affected plants show stunted growth, reducing leaf yield and quality
- Silkworms consume less when fed snail-infested leaves due to mucus secretion

Management

1. Sanitation

- Periodically clean drains, canals, and river banks near mulberry gardens
- Deep ploughing
- Manual picking and destruction

2. Snail Control

- Keep hiding places dry using lime, ash, salt, or sawdust
- Use metaldehyde pellets (2.50%) near hiding places
- Spray 4% salt solution near hiding places

3. Baiting

- Papaya + methomyl (Lannate) poison bait

3. CONCLUSION

Mulberry leaf devouring pests pose a significant threat to sericulture sustainability, causing substantial yield losses and economic consequences. Understanding the biology, damage symptoms, and economic impact of these pests is crucial for developing effective management strategies. This chapter has provided a comprehensive overview of the major leaf-devouring pests of mulberry, including their biology, damage patterns, and economic implications. The Integrated Pest Management (IPM) strategies outlined in this chapter, encompassing cultural practices, biological control, and chemical control, offer a holistic approach to mitigating pest damage.

Key Takeaways

1. Effective pest management is critical for ensuring mulberry productivity and sericulture sustainability.
2. IPM strategies can significantly reduce pest damage and promote eco-friendly sericulture practices.
3. Continuous monitoring and research are necessary to develop resistant cultivars and innovative pest management techniques.

Future Directions

1. Development of climate-resilient mulberry cultivars with built-in pest resistance.
2. Exploration of novel biological control agents and biopesticides.
3. Integration of precision agriculture techniques for optimized pest management.

Recommendations

1. Sericulture practitioners should adopt IPM strategies to minimize pest damage.

2. Policy makers should prioritize funding for research on mulberry pest management.
3. Stakeholders should promote awareness and training programs for sustainable sericulture practices.

REFERENCES

1. Anonymous, 1990, Hand book on pest and disease control of mulberry and silkworm, United Nations, Thailand.
2. Dandin, S. B., Jayaswal, J. and Giridhar, K. (2000) Hand Book of Sericulture Technologies. Central Silk Board, Bangalore, Karnataka (India)
3. Anonymous, Diseases and pests of mulberry and Govindaiah, Gupta, V.P., Sharma, D.D., Rajadurai, S. and Naik, V.N. (2005) Mulberry crop protection. Central Silk Board Publication, India.
4. Govindaiah, Gupta, V.P., Sharma, D.D., Rajadurai, S. and Naik, V.N. (2005) Mulberry crop protection. Central Silk Board Publication, Bangalore.
5. Narendra Kumar, J.B., Shekhar, M.A and Qadri, S.M.H. (2011) Giant African snail in Mulberry: Physiology and management. Indian Silk, 1 (12): 4-5.
6. Rangaswamy, G., Narasimhanna, M.N., Kasiviswanathan, K., Sastry, C.R. and Jolly, M.S. 1976, Sericulture Manual, Vol. 1, Mulberry Cultivation, FAO, United Nations, Rome.

BİYOLOJİ

yaz
yayınları

YAZ Yayınları
M.İhtisas OSB Mah. 4A Cad. No:3/3
İscehisar / AFYONKARAHİSAR
Tel : (0 531) 880 92 99
yazyayinlari@gmail.com • www.yazyayinlari.com