

T.C.
ERZİNCAN BİNALİ YILDIRIM ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS

BAZI *SIDERİTİS* TÜRLERİNİN ANTİGENOTOKSİK
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Neva ÇELİK

Danışman: Doç. Dr. Deniz ALTUN ÇOLAK

BİYOLOJİ
ANABİLİM DALI

ERZİNCAN
2023
Her Hakkı Saklıdır.

ÖZET

Yüksek Lisans

BAZI *SIDERITIS* TÜRLERİNİN ANTİGENOTOKSİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Neva ÇELİK

Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Deniz ALTUN ÇOLAK

Bu çalışmada, alkilleyici bir ajan olan etil metansülfonatın indüklediği genotoksik etkiye karşı geleneksel tıpta kullanılan ve antioksidan özelliklere sahip olduğu bilinen *Sideritis* bitkisinin Mersin yöresinden toplanan *Sideritis brevidens* ve *Sideritis libanotica* subsp. *violascens* türlerinin toprak üstü metanol ekstraktlarının dört farklı konsantrasyonu (1,25; 2,5; 5 ve 10 mg/mL) kullanılarak potansiyel antijenotoksik etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Kanat benek testi olarak da bilinen somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (SMART) uygulanarak *Drosophila melanogaster*'in genomunda çekinik *flare* (*flr³*) ve *çoklu kanat kılı* (*mwh*) belirleyici genlerini taşıyan iki farklı mutant soyu kullanılmıştır. Bu iki mutant soy arasında yapılan çaprazlamalar sonucu elde edilen 72±4 saatlik transheterozigot larvalar bitkilere ait metanol ekstresi ve alkilleyici ajanla kronik olarak beslenmiştir. Tüm uygulama gruplarındaki larvalardan yetişen ergin bireylerin kanatlarından hazırlanan preparatlar ışık mikroskopunda farklı benek tiplerine göre incelenmiştir. Bitki ekstraktlarının çalışılan konsantrasyonlarda genotoksik etki göstermediği buna karşın alkilleyici ajanlarla birlikte uygulandığında özellikle 5 ve 10 mg/mL'lik konsantrasyonlarda somatik mutasyon ve rekombinasyon oranlarını önemli ölçüde azalttığı belirlenmiştir. Elde edilen veriler istatistiksel olarak değerlendirildiğinde sonuçların anlamlı olduğu görülmüştür ($p<0,05$). Bu çalışma, *Sideritis* türlerinden elde edilen bileşiklerin potansiyel farmakolojik kullanımları ve doğal bir kaynak olarak genetik hasarı azaltıcı etkileri hakkında yeni araştırmaların yolunu açabilir.

2023, 56 Sayfa

Anahtar Kelimeler: Antijenotoksik etki, *Drosophila melanogaster*, *Sideritis*, SMART

ABSTRACT

Master Thesis

INVESTIGATION OF THE ANTIGENOTOXIC EFFECT OF SOME SPECIES OF *SIDERITIS*

Neva ÇELİK

Erzincan Binali Yıldırım University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Deniz ALTUN ÇOLAK

In this study, the potential antigenotoxic effects of above-ground methanol extracts of *Sideritis brevidens* and *Sideritis libanotica* subsp. *violascens*, two species of the *Sideritis* plant known for their traditional medicinal use and antioxidant properties, collected from the Mersin region, were investigated using four different concentrations (1,25; 2,5; 5; and 10 mg/mL) against the genotoxic effects induced by the alkylating agent ethyl methanesulfonate. The somatic mutation and recombination test (SMART), also known as the wing spot test, were conducted using *Drosophila melanogaster*, with two different mutant strains carrying the recessive *flare* (*flr³*) and *multiple wing hairs* (*mwh*) genes. Transheterozygous larvae aged 72±4 hours were obtained through crosses between these two mutant strains and were chronically fed with plant methanol extracts and the alkylating agent. Preparations from the wings of the adult individuals that emerged from all application groups were examined under a light microscope for different spot types. The plant extracts showed no genotoxic effect at the studied concentrations. However, when applied in conjunction with alkylating agents, it was observed that especially at concentrations of 5 and 10 mg/mL, the rates of somatic mutation and recombination were significantly reduced. The obtained data were statistically evaluated and the results were found to be significant ($p<0,05$). This study could pave the way for further research into the potential pharmacological uses of compounds derived from *Sideritis* species and their naturally sourced genetic damage-reducing effects.

2023, 56 Pages

Keywords: Antigenotoxic effect, *Drosophila melanogaster*, *Sideritis*, SMART

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrencisi olarak ilk başladığım günden ve son güne kadar yaptığım çalışmalarım boyunca beni destekleyen, yönlendiren, bilgi birikimleri ile bana katkı sağlayan ve tez yazımım sırasında bana zaman ayırarak yardımını esirgemeyen tez danışmanım ve çok değerli danışman hocam Sayın Doç. Dr. Deniz ALTUN ÇOLAK' a teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmalarında yardımını esirgemeyen Sayın Dr. Öğretim Üyesi Sinem KARAKUŐ' a ve doktora öğrencisi Sayın Bilge DOĞAN'a teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım süresince tüm ekipmanları kullanmama olanak veren ve çalışmalarımnda teknik destek sağlayan Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi Temel Bilimler Uygulama ve Araştırma, Merkez Laboratuvarı personellerine teşekkür ederim.

Bu çalışmanın ortaya çıkmasında çok büyük pay sahibi olan, hayatımın her aşamasında maddi ve manevi beni destekleyen aileme sonsuz teşekkür ederim.

Neva ÇELİK
Ağustos, 2023

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
ŞEKİLLER LİSTESİ	vi
SİMGELER ve KISALTMALAR	viii
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER	3
2.1. <i>S. brevidens</i> ve <i>S. libanotica</i> subsp. <i>violascens</i> 'in Genel Özellikleri.....	3
2.2. Alkilleyci Ajanlar	4
2.3. Genotoksisite Testleri.....	6
3. MATERYAL ve YÖNTEM	11
3.1. Materyal.....	11
3.1.1. <i>Drosophila melanogaster</i>	11
3.1.1.1. <i>D. melanogaster</i> 'in yaşam döngüsü.....	12
3.1.1.2. <i>D. melanogaster</i> 'in çalışmada kullanılan mutant soy hatları.....	17
3.1.2. Bitkisel organizma	19
3.1.2.1. <i>Sideritis brevidens</i> ve <i>Sideritis libanotica</i> subsp. <i>violascens</i>	19
3.1.3. Kimyasal ajanlar	19
3.2. Yöntem	20
3.2.1. Bitki örneklerinin toplanması ve ekstralarının hazırlanması	20
3.2.2. Somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (Kanat benek testi).....	22
3.2.2.1. Çaprazlama için birey seçimi	24
3.2.2.2. Çözeltilerin hazırlanması ve deney gruplarına uygulanması	25
3.2.2.3. Kanat preparatlarının hazırlanması ve incelenmesi	26
3.2.2.4. Klon indüksiyon frekansı ve inhibisyon yüzdesinin hesaplanması	27
3.2.2.5. SMART sonuçlarının veri analizi	27
3.2.2.6. Mikrofotografi.....	28
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	29

4.1. Yaşama Yüzdesi (Larval Mortalite) Deneilerine Ait Bulgular	29
4.2. Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi Bulguları.....	30
4.2.1. Distile su ve EMS uygulaması sonucu elde edilen SMART bulguları.....	34
4.2.2. SB ve SL uygulaması sonucu elde edilen SMART bulguları.....	35
4.2.3. EMS ile SB ve SL'nin birlikte uygulanması sonuçlarına ait SMART bulguları	37
5. SONUÇ ve TARTIŞMA	42
KAYNAKLAR	47
EKLER.....	55
Ek-1. Tez Çalışması Süresince Yapılan Akademik Çalışmalar	56



ŞEKİLLER LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 2. 1. <i>Sideritis brevidens</i>	4
Şekil 2. 2. <i>Sideritis libanotica</i> subsp. <i>violascens</i>	4
Şekil 2. 3. Genotoksinlerin etki mekanizması	7
Şekil 3. 1. <i>Drosophila melanogaster</i> 'e ait dişi ve erkek bireyler	11
Şekil 3. 2. <i>Drosophila melanogaster</i> 'in yaşam döngüsü	12
Şekil 3. 3. <i>Drosophila melanogaster</i> yumurtası	13
Şekil 3. 4. <i>Drosophila melanogaster</i> yumurtası	14
Şekil 3. 5. <i>Drosophila melanogaster</i> 'in imajinal diskleri.....	15
Şekil 3. 6. <i>Drosophila melanogaster</i> pupası.....	15
Şekil 3. 7. <i>Drosophila melanogaster</i> 'in ergin bireyi	16
Şekil 3. 8. <i>Drosophila</i> 'da belirleyici genlerin üçüncü kromozom üzerinde konumları..	18
Şekil 3. 9. <i>Drosophila</i> 'da normal ve serrat kanat fenotipleri.....	19
Şekil 3. 10. Etil metansülfonatin moleküler yapısı	19
Şekil 3. 11. <i>S. brevidens</i> ve <i>S. libanotica</i> subsp. <i>violascens</i> metanol ekstraktları	20
Şekil 3. 12. Evaporasyon işlemi.....	21
Şekil 3. 13. <i>S. brevidens</i> ve <i>S. libanotica</i> subsp. <i>violascens</i> bitkilerinin stok çözeltileri	21
Şekil 3. 14. Somatik mutasyon ve rekombinasyonun etki süreci	23
Şekil 3. 15. Çaprazlama yapılan <i>D. melanogaster</i> bireyelerine ait görüntü	24
Şekil 3. 16. <i>Drosophila</i> kanat benek testinin şematik olarak gösterilmesi	25
Şekil 4. 1. <i>D. melanogaster</i> 'de larval mortalite oranları.....	30
Şekil 4. 2. Kanat preparatlarının hazırlanışı.....	31
Şekil 4. 3. Normal kıllara sahip kanat yapısı (400X).....	32
Şekil 4. 4. Küçük tekli <i>mwh</i> klona sahip kanat yapısı (400X).....	32
Şekil 4. 5. Büyük tekli <i>mwh</i> klona sahip kanat yapısı (400X).....	33
Şekil 4. 6. Büyük tekli <i>flr³</i> klona sahip kanat yapısı (400X)	33
Şekil 4. 7. İkiz klona sahip kanat yapısı (400X)	34

TABLÖLAR LİSTESİ

	Sayfa
Tablo 3. 1. Standart <i>Drosophila</i> besiyerinin içeriği	17
Tablo 3. 2. Faure solüsyonun içeriği	26
Tablo 4. 1. SB ve SL uygulanan <i>D. melanogaster</i> 'in 72±4 saatlik transheterozigot larvalarında yaşama yüzdesi (larval mortalite) oranları	30
Tablo 4. 2. Distile su ve EMS uygulaması sonuçlarına ait SMART verileri	36
Tablo 4. 3. SB ve SL uygulaması sonucuna ait SMART verileri	38
Tablo 4. 4. EMS+SB ve EMS+SL uygulaması sonuçlarına ait SMART verileri	40

SİMGELER ve KISALTMALAR

Simgeler

♀	Dişi
♂	Erkek
C	Santigrat
°	Derece
cm	Santimetre
dk	Dakika
g	Gram
i	Önemsiz fark
Mg	Miligram
mL	Mililitre
mM	Milimolar
Mm	Milimetre
X	Çaprazlama
%	Yüzde

Kısaltmalar

Ames	<i>Salmonella</i> /Mikrozom mutajenite testi
<i>Bd^S</i>	Beaded serrat
CGH	Karşılaştırmalı genomik hibridizasyon testi
DNA	Deoksiribonükleik asit
EMS	Etil metansülfonat
<i>flr³</i>	<i>Flare</i> geni
FISH	Floresan in situ hibridizasyon
KA	Kromozomal anormallik testi
MN	Mikronükleus testi
<i>mwh</i>	<i>Çoklu kanat kılı</i> geni
SB	<i>Sideritis brevidens</i>
SDB	Standart <i>Drosophila</i> Besiyeri

SL	<i>Sideritis libanotica</i> subsp. <i>violascens</i>
SMART	Somatik mutasyon ve rekombinasyon testi
TM3	Dengeleyici kromozom



1. GİRİŞ

Bitkiler, tarih boyunca geleneksel tıpta kullanılan ve sağlık faydaları bilinen doğal kaynaklardır. Antioksidan özelliklere sahip bitkiler, serbest radikallerin neden olduğu DNA hasarını önlemede ve genotoksik etkilere karşı korunmada önemli bir role sahip olabilirler. Bu nedenle, bitkilerin potansiyel antigenotoksik etkilerini araştırmak, genetik materyalin korunmasında önemli bir adımdır.

Sideritis, Lamiaceae familyasına ait bir bitki cinsidir ve geleneksel tıpta yaygın olarak kullanılan bir bitki türüdür. *Sideritis* bitkisi, antioksidan özellikleri ve biyoaktif bileşenler içermesi nedeniyle büyük ilgi çekmektedir. Özellikle *Sideritis* bitkisi üzerinde yapılan çalışmalar, bu bitkinin anti-inflamatuvar, antioksidan, antikanser ve antimikrobiyal etkilere sahip olduğunu göstermektedir. Ancak, *Sideritis* bitkisinin potansiyel antigenotoksik etkileri hakkında sınırlı bilgi bulunmaktadır.

Bu tez, *Sideritis* bitkisinin bazı türlerinin antigenotoksik etkilerini araştırmayı amaçlamaktadır. Özellikle, Mersin bölgesinden toplanan *Sideritis brevidens* ve *Sideritis libanotica* subsp. *violascens* türlerinin toprak üstü metanol ekstraktlarının alkilleyici bir ajan olan etil metansülfonat tarafından indüklenen genotoksik etkilere karşı potansiyel antigenotoksik etkilerini değerlendirmek hedeflenmektedir. Bu çalışma, *Sideritis* bitkisinin genetik materyalin korunması üzerindeki etkisini anlamamıza ve potansiyel sağlık faydalarını belirlememize yardımcı olacaktır.

Bu araştırma için *Drosophila melanogaster*, genetik ve biyomedikal araştırmalarda sıkça kullanılan bir model organizma olarak seçilmiştir. *Drosophila melanogaster*, genetik mutasyonların ve rekombinasyonun incelenmesi için ideal bir sistem sunmaktadır. Somatic Mutation and Recombination Test (SMART) olarak da bilinen kanat benek testi, *Drosophila melanogaster*'in genomunda taşıdığı belirli genetik markörlerin değişimini izleyerek genotoksik etkilerin değerlendirilmesini sağlamaktadır.

Bu tezde, *Sideritis* bitkisinden elde edilen metanol ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarının, genotoksik etkilere karşı *Drosophila melanogaster* üzerindeki antigenotoksik etkilerini belirlemek için SMART testi kullanılacaktır. Elde edilen veriler, *Sideritis* bitkisinin genetik materyalin korunmasında önemli bir role sahip olabileceğini

ve sağlık faydalarını daha iyi anlamamıza katkı sağlayabileceğini vurgulamaktadır. Ayrıca, bitkinin potansiyel kullanım alanlarını keşfetmek ve gelecekteki çalışmalara temel oluşturmak için daha fazla araştırma yapılması gerektiğini vurgulamaktadır.



2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. *S. brevidens* ve *S. libanotica* subsp. *violascens*'in Genel Özellikleri

Lamiaceae familyasına ve *Sideritis* cinsine ait olan bu iki bitki endemik olarak Akdeniz bölgesinde yetişmektedir. Kendi özgün habitatında yetişen ve farklı coğrafi bölgelerde bulunan bu bitkilerin genel özellikleri, morfoloji, çiçeklenme ve kullanım amaçları gibi faktörlere bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Çok yıllık otsu olup genellikle halk arasında dağ çayı veya bitkisel çay olarak kullanılmaktadır. *Sideritis* cinsinin önemli bir özelliği ise tıbbi ve aromatik bitkiler içinde yer almasıdır. Bu sebeple bu bitkiler insanlar tarafından iştah açıcı, iltihap giderici, kas gevşetici, idrar söktürücü ve soğuk algınlığını giderici olarak kullanılmaktadır (Arı, 2021). Bitkinin gözlenen *in vivo* ve *in vitro* farmakolojik aktiviteleri, içeriğinde bulunan flavonoidler, diterpenler terpenler, flavonoidler, uçucu yağlar, iridoidler, kumarinler, lignanlar ve steroller gibi aktif kimyasal bileşenlerden kaynaklanmaktadır. Bunun yanı sıra antioksidan, antispazmotik, antikonvülsan, antiinflamatuar, antiülseratif, antimikribyal, analjezik, yara iyileştirici ve gaz giderici gibi farmakolojik etkilere sahip olması insanlar tarafından geleneksel tıpta kullanılma sıklığını arttırmaktadır (González-Burgos vd., 2011).

Gövde ve yaprakları yoğun tüylü, genellikle gri-yeşil renkte ve eliptik şekilde; çiçekleri genellikle beyaz veya soluk sarı renkte, yoğun küresel başaklarda toplanmış olan *Sideritis brevidens* bitkisi (Topal ve Uzun, 2020) Şekil 2.1'de gövde ve yapraklar tüylü; yaprakları genellikle yeşil renkte ve uzunlamasına oval şekilde; çiçekleri morumsu veya soluk mor renkte, yoğun başaklarda toplanmış olan *Sideritis libanotica* subsp. *violascens* bitkisi (Yılmaz, 2013) Şekil 2.2'de verilmiştir.



Şekil 2. 1. *Sideritis brevidens*



Şekil 2. 2. *Sideritis libanotica* subsp. *violascens*

2.2. Alkilleyici Ajanlar

Alkilleyiciler, kanser tedavisinde sıkça kullanılan ve DNA'ya bir alkil grubunu (C_nH_{2n+1}) bağlayarak etki gösteren ajanlardır (Saffhill vd., 1985). Bu maddeler DNA üzerinde farklı bölgelerle etkileşebilirler. DNA'nın yapısını ve işlevini değiştirebilen bu kimyasal

ajanlar, DNA üzerindeki bazları veya DNA molekülünün diğer bileşenlerini modifiye ederek genotoksik etkilere neden olurlar. DNA'nın yapısal özellikleri içerisinde bulunan adenin, timin, guanin ve sitozin bazlarının halka üzerindeki azot atomları, halka yapısındaki oksijen atomları ve nükleotidler arasındaki fosfatların 5'-3' fosfodiester bağında bulunmayan oksijen atomları, DNA üzerinde en sık alkilenen bölgelerdir (Ronai vd., 1993). Alkil grubu, DNA'da guanin bazına pürin halkasının 7 numaralı azot atomuna bağlanmasını ifade eder (Saffhill vd., 1985). Kanser hücrelerinin temel özelliği, sağlıklı hücrelere kıyasla daha az hata ve daha hızlı onarım ile çoğalmalarıdır. Bu nedenle, DNA hasarına karşı oldukça hassastırlar. Alkilleyici maddeler, DNA ile kovalent bağ oluşturarak DNA'ya hasar veren ve hücre ölümünü indükleyen kimyasal maddelerdir ve kanser tedavisinde yaygın olarak kullanılırlar (Damia and D'Incalci, 1998). Ancak, alkilleyici maddeler sağlıklı hücrelerde, özellikle gastrointestinal sistemde, testislerde, yumurtalıklarda ve kemik iliğinde bulunan sıklıkla bölünebilir özelliğine sahip hücreler için toksik olup infertiliteye neden olabilirler. Ayrıca, alkilleyici maddelerin büyük bir çoğunluğu kanserojen etkisi gösteren maddelerdir (Wiedemann vd., 1996). Alkilleyici maddeler, DNA'ya bağlanarak hasara yol açarlar. Bu hasarlar, iplik kopmaları, kromozom kayıpları veya hücre bölünmesi sırasında serbest kalan kromozom fragmanlarının veya kromozomların varlığını sürdürmesi gibi etkileri içerir. Bu tür etkiler, biyosentetik mekanizmaların durmasına, teratojeniteye, hücre ölümüne ve hücre döngüsünde hasara yol açabilir. Sonuç olarak, alkilleyici maddeler kanser tedavisinde etkili olabilirken, aynı zamanda sağlıklı hücreler için de toksik olabilir ve genetik hasara neden olabilirler (Brookes, 1990; Santos-Mello vd., 2005). Genetik araştırmalarda sıkça kullanılan bir alkilleyici ajan olan ve DNA üzerinde alkilasyon reaksiyonlarına yol açarak mutasyonlara neden olabilen etil metansülfonatın (EMS) da aralarında bulunduğu alkilleyici ajanlar kendi aralarında farklı kimyasal yapıları ve etkileşim mekanizmalarına göre altı gruba ayrılarak incelenirler (Ralhan ve Kaur, 2007).

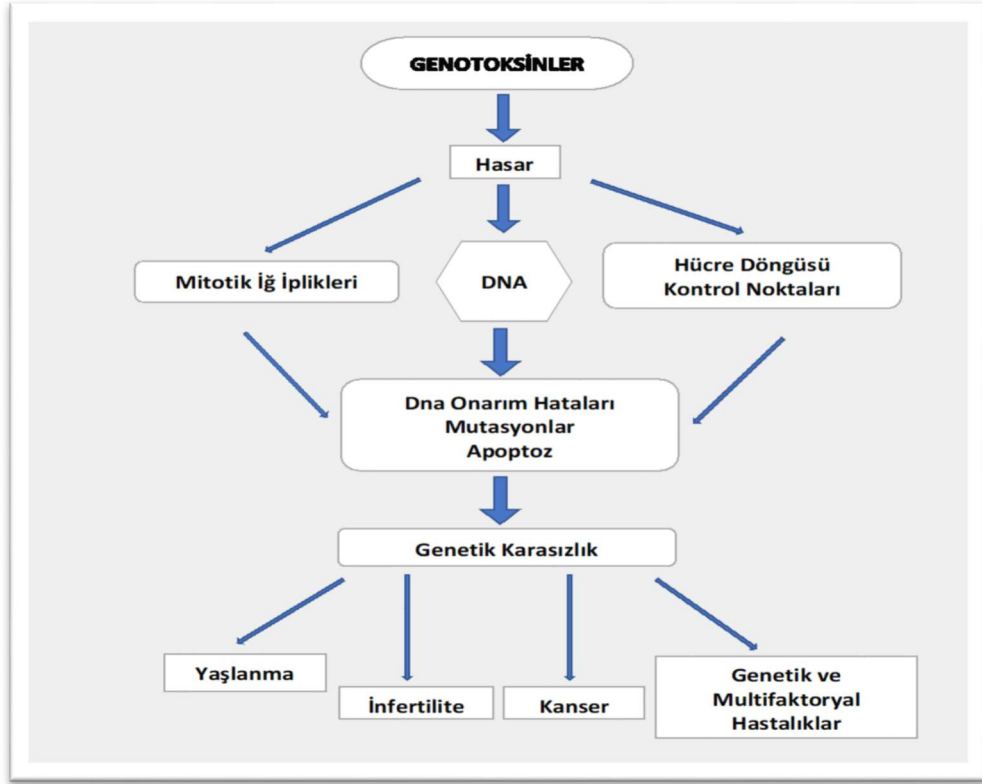
1. Nitrojen mustarlar [mekloreteamin, siklofosfamid, ifosfamid, melfalan ve klorambusil]
2. Etilenamin ve metilenamin türevleri [heksametilmelamin, altretamin, tiotepa]
3. Alkil sülfonatlar [etil metansülfonat, busulfan]
4. Nitrozürelere [karmustin, lomustin]
5. Triazenler [dakarbazin, prokarbazin, temozolomid]

6. Platin içeren antineoplastik ajanlar [sisplatin, karboplatin, oksaliplatin]

Etil metansülfonat (EMS), alkil sülfonatlar sınıfına dahil edilen bir alkilleyici ajan olarak kabul edilir. Alkil sülfonatlar, genellikle hücrelerde DNA hasarına neden olan ve genetik materyalde değişikliklere yol açan kimyasal bileşiklerdir. EMS timin ile reaksiyona girdiğinde O⁶-etil timin meydana gelir ve O⁶-etil timin guanin ile baz çifti yapar. Sonuçta TA→CG transisyonu meydana gelir. Benzer şekilde EMS, guaninle reaksiyona girerse O⁶-etil guanin meydana gelir. O⁶-etil guanin ise T ile baz çifti yapar ve GC→AT transisyonu oluşur (Ateş, 2002). Bu mutasyonlar rastgele oluşur, GC'den AT'ye ve AT'den GC transisyon mutasyonlarına, insersiyonlara ve delesyonlara sebep olarak genetik materyallerde değişikliklere yol açar (Yan vd., 2021).

2.3. Genotoksisite Testleri

Genotoksisite, fiziksel ya da kimyasal maddeler (mutajen ve kanserojenler) tarafından DNA'da hasar oluşumunu tanımlanır. Bu ajanlar hem bireyin kendisini hem de bir sonraki nesillerin yapısını etkileyebilecek hasarları ortaya çıkarabilir (Yüzbaşıoğlu vd., 2016). Genotoksisite testleri, günlük yaşamımızla iç içe olan ilaçlar, katkı maddeleri, fiziksel etkenler ve çevresel kirlenmeler gibi faktörlerin genetik materyal üzerinde oluşturabileceği zararları tespit etmek ve kanserojenik etkilerini belirlemek için kullanılan test teknikleridir. Bu testler, genotoksik ve kanserojenik etkilerin varlığını tespit ederek olası hasarları tahmin etmeyi amaçlar (Tucker ve Preston, 1996). Genotoksinlerin etki mekanizması (Ersöz, 2019) Şekil 2.3'de şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 2. 3. Genotoksinlerin etki mekanizması

Üreme hücrelerindeki kalıtsal değişiklikler, kimyasal maddeler tarafından indüklenebilir ve genetik hasar oluşturabilirler. Bu kimyasalların neden olduğu değişikliklerin belirlenebilmesi sebebiyle çok sayıda *in vivo* ve *in vitro* kısa zamanlı testler geliştirilmiştir. Bu testler, farklı alanlarda yaygın ve başarılı bir şekilde kullanılmaktadır.

Salmonella/Mikrozom Mutajenite (Ames) Testi

Salmonella/mikrozom mutajenite testi olarak da bilinen Ames testi, kimyasal maddelerin mutajenik etkilerini araştırmak için kullanılan, test parametreleri açısından standartize edilmiş ve mutajenik/kanserojen etkileri bilinen kimyasallarla geçerliliği kabul görmüş bakteriyel test sistemlerinden biridir. Bu test, hızlı, ekonomik ve kolayca uygulanabilmesi gibi önemli avantajlara sahiptir. Ames testi, somatik hücrelerin tümör baskılayıcı genlerinde oluşan DNA'daki baz çiftlerinin değiştirilmesini saptamak için insanlarda ve model organizmalarda tümör oluşumunu araştırmada ve kimyasalların DNA ile etkileşimlerini engelleyerek mutajenik ve kanserojenik etkilerini yok eden antimutajenik ve antikanserojenik maddelerin tespitinde de kullanılır. Bu test, potansiyel tehlikeli

kimyasalların değerlendirilmesi ve çevresel sağlık açısından önemli bilgilerin elde edilmesi için önemli bir araçtır (McCann vd., 1975; Mortelmans ve Zeiger, 2000; Choy, 2001).

Tek hücre jel elektroforezi (Comet Assay, SCGE) Testi

Comet testi, bazik pH'da moleköl ağırlıkları birbirinden farklı ve farklı elektriksel yük bulduran DNA moleküllerinin elektriksel alanda farklı bölgelere yayılış göstermesi prensibine dayanır. Bu prensibe göre, hücreler veya nükleoluslar agarozta yerleştirildikten sonra lizis ve alkali elektroforez tamponunda yürütme ve asit-baz işlemlerinden geçirilerek floresan boya ile boyanır. Floresan mikroskop altında incelemesi yapılan preparatlarda hasar oluşumu görülmeyen DNA'lar comet (kuyruk) oluşumu göstermezken, zarar gören DNA moleküllerindeki fragmentler farklı moleköl ağırlıklarına ve elektrik yüklerine sahip olacağından elektriksel bölgede değişik hızlarda yayılış göstererek nükleustan dıőarı doğru hareket ederek kuyruklu yıldız görüntüsü meydana getirmektedir. Bu görüntü sebebiyle bu tekniğe "Comet" denilmiştir. Comet yöntemi ile DNA hasarının kantitatif olarak belirlenmesinde; kuyruk momenti, kuyruktaki DNA yüzdesi ve kuyruk uzunluğu gibi parametreler kullanılmaktadır (Ostling ve Johanson, 1984; Singh vd., 1988; McKelvey vd., 1993; Albertini vd., 2000).

Mikronükleus (MN) Testi

Mikronükleuslar, hücre bölünmesi sırasında oluşan ve kromozom veya asentrik kromozom fragmanlarından köken alan, nükleusa dahil olmayan küçük çekirdekçik yapılarıdır (Kirsch-Volders vd., 1997). Mikronükleusların oluşumu, çeşitli faktörlerden kaynaklanabilir, bunlar kinetokorları bir arada tutan yapısal parçalardan, mitotik iç ipliğindeki hatalardan, hücre bölünmesini kontrol eden genlerdeki eksikliklerden ve kromozomal hasarlardan oluşabilir ve sayıları farklı etkenlerin neden olduğu yapısal ve sayısal kromozom anormallikleri nedeniyle artabilir (Vanparys vd., 1990).

Anöploidi oluşumunu sağlayan ajanlar, sentromer bölünme hasarlarına neden olabilirken, klastojenler ise kromozom kırıklarına yol açabilirler. Bu nedenle, mikronükleus miktarındaki artış, vücut hücrelerinde genomik dengesizliği gösteren bir belirteçtir.

Mikronükleusların varlığı, genotoksik ve karsinojenik etkilerin tespitinde kullanılan önemli bir gösterge olarak kabul edilir. (Şekeroğlu ve Atlı Şekeroğlu, 2011).

Kromozomal Anormallik (KA) Testi

Kromozomal anormallikler, DNA düzeyinde meydana gelen kromozomal hasarın ve genomik kararsızlığın sonucu olarak ortaya çıkan değişikliklerin belirlenmesi için sıkça tercih edilen bir test tekniğidir (Yüzbaşıoğlu vd., 2006). Kromozomal kırıklar, DNA'da var olan ve tamir edilmeyen çift zincirli kırıklardan, yeni yapıya sahip kromozomlar ise DNA'da meydana gelen iplik kırıklarının uygun bir şekilde tamir edilememesinden kaynaklanmaktadır (Şekeroğlu ve Şekeroğlu, 2011).

In vitro kromozomal anormallik (KA) testi, memeli hücre kültürlerinde, *in vivo* KA testi ise kemik iliği hücrelerinde etkinlik gösterir ve *in vivo* test ile mutajen kökenli hasarların belirlenmesinde, tür ve dokuya özgü metabolizma, farmakokinetik ve DNA onarım mekanizmalarının anlaşılmasına katkı sağlar. Bu testler, ksenebiyotiklerin etkilerinin değerlendirilmesi ve insan sağlığı açısından önemli bilgilerin elde edilmesi için değerli araçlardır (Choy, 2001).

Floresan *in situ* Hibridizasyon (FISH) Testi

FISH kromozomlar üzerinde bulunan genlerin spesifik lokalizasyonunu sağlamak için uygulanan bir testtir. Mikrodelesyonlar ve trizomilerin hızlı tespiti için özel probler kullanılarak elde edilir. Genellikle bir metafaz kromozom yayılımına denatüre bir prob eklenir ve sekansa özgü hibridizasyona izin vermek için gece boyunca inkübe edilir. Bağlanmamış probu yıkadıktan sonra, bağlı prob UV ışığı altında floresan ile görselleştirilir; böylece ilgilenilen genin yeri *in situ* olarak gözlemlenir (Levsky ve Singer, 2003).

Karşılaştırmalı Genomik Hibridizasyon (CGH) Testi

CGH testi tüm genomik dengesizlikleri tespit etmek için kullanılan özel bir FISH (çift prob) tekniğidir. Bu tekniğin temeli verilen numunenin toplam genomik DNA'sının

normal hücrelerin toplam genomik DNA'sı ile karşılaştırılmasına dayanır. Tipik olarak hem tümör hem de normal DNA'dan alınan aynı miktarda örnekler iki farklı floresan boya ile etiketlenir; normal bir lenfosit metafaz lamına karışım eklenir ve hibridize edilir. Bir CCD kamera ile donatılmış bir floresan mikroskop ve değerlendirme için görüntü analiz sistemi kullanılır (Houldsworth ve Chaganti, 1994). CGH, kanserde ve karyotipi çok zor olan hücrelerde genomun kopya sayısı değişikliklerini belirlemek, hazırlamak veya analiz etmek için kullanılır.

Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi (SMART)

Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi, son yıllarda kanat benek testi ve göz benek testi olmak üzere iki şekilde uygulanır. SMART, akademik çalışmalarda çok fazla tercih edilen model organizmalardan biri olan *Drosophila melanogaster*'in kullanıldığı testlerden biridir. Bu test, mitotik rekombinasyon, delesyonları ve nokta mutasyonları gibi genetik değişikliklerin tanınmasını mümkün kılar (Frölich ve Würzler, 1990; Graf vd., 1998). SMART testinin diğer testlere kıyasla daha çok tercih edilmesi, daha hızlı, ekonomik ve güvenilirliğinin kanıtlanmış olması ve sonuçların hızlı elde edilmesi gibi avantajlarından kaynaklanır. Ayrıca, tek bir kanat veya gözde birden çok hücrenin analizine olanak sağlaması ve genotoksik etkinin dış görünüşte kolaylıkla gözlenmesi de bu testin tercih edilme sebeplerindedir. SMART testi, genetik hasarların değerlendirilmesi ve potansiyel etkilerinin anlaşılması için önemli bir araçtır (Guzmán-Rincón ve Graf, 1995).

Bu tez çalışmasında, somatik mutasyon ve rekombinasyon test yöntemiyle *Sideritis* cinsine ait *Sideritis brevidens* ve *Sideritis libanotica* subsp. *violascens* bitkilerinin topraküstü metanol ekstraktlarının *Drosophila melanogaster*'in mutant soyları üzerinde antigenotoksik etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

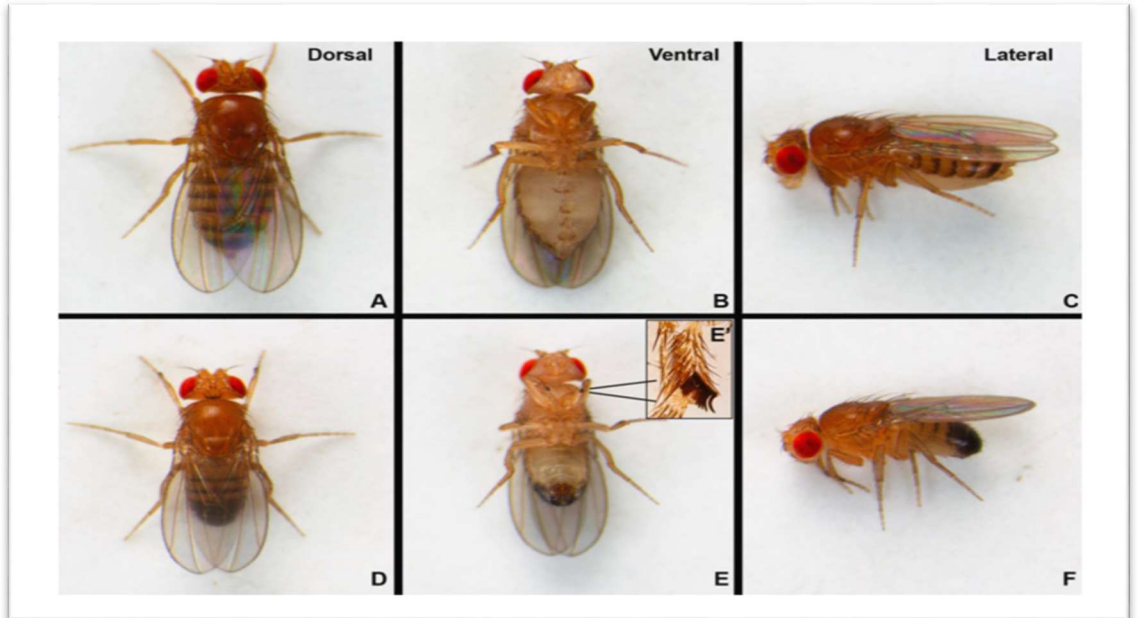
3. MATERYAL ve YÖNTEM

Teze ait tüm deneysel çalışmalar Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi Temel Bilimler Uygulama ve Araştırma Merkezi Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

3.1. Materyal

3.1.1. *Drosophila melanogaster*

Drosophila melanogaster halk arasında meyve sineği olarak bilinen ve genetik çalışmalarda model organizma olarak sıklıkla kullanılan bir türdür. *Drosophilidae* familyasına ait olan *Drosophila* cinsinin *D. melanogaster*, *D. erecta*, *D. yakuba*, *D. simulans*, *D. santomea* gibi 1500'ün üzerinde türü olduğu bilinmektedir (Bachli, 2006). Tür çeşitliliği çok fazla olmasına rağmen model organizma olarak çalışmalarda en çok tercih edilen *D. melanogaster*'dir. Şekil 3.1'de yabancı tip *D. melanogaster*'e ait dişi (A-C) ve erkek (D-F) sineklerin dorsal, ventral ve lateral görünümü ile erkeklerde protosik çift bacakların 1. tarsal segmentindeki seks tarağının (E) büyütülmüş bir görünümü verilmiştir.

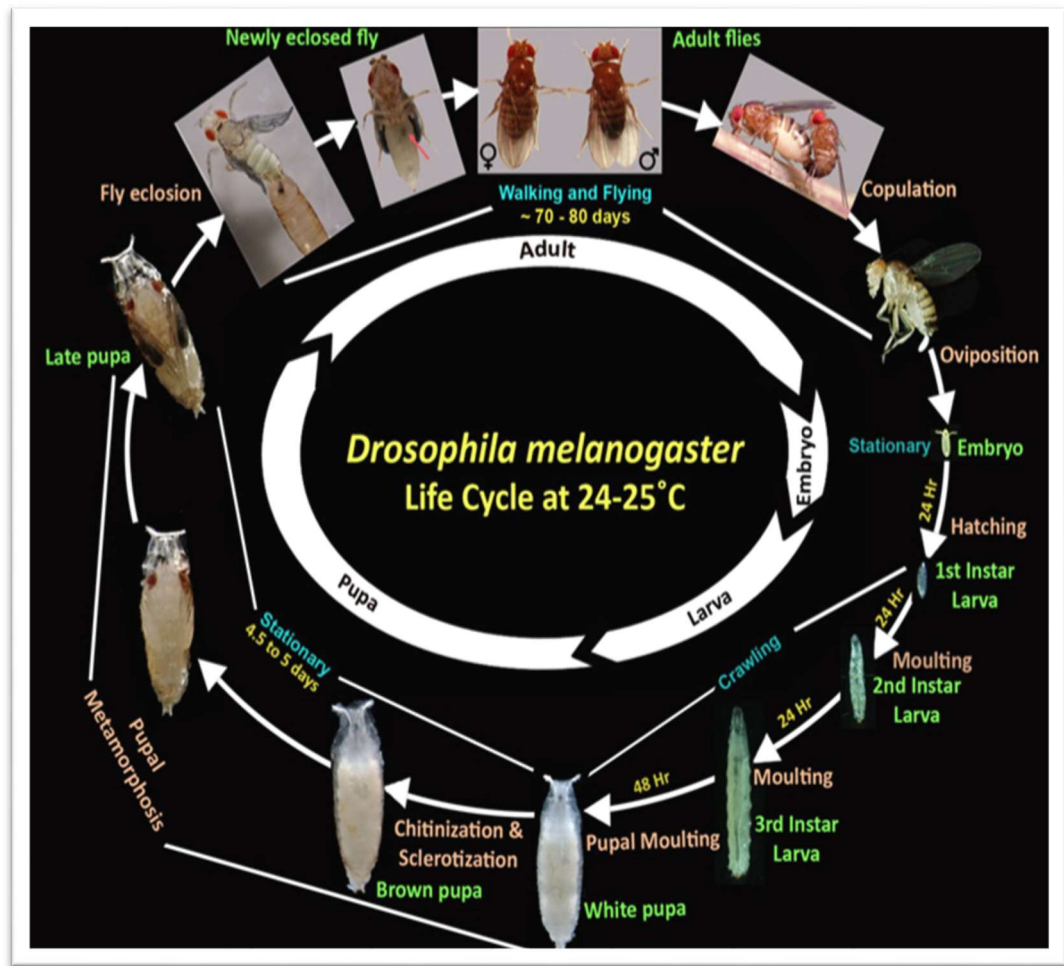


Şekil 3. 1. *Drosophila melanogaster*'e ait dişi ve erkek bireyler

Bu türün tercih edilmesinde; endemik olmaması, dünyanın her yerinde bulunabilmesi ve kolaylıkla elde ediliyor olması gibi temel nedenler bulunmaktadır. Ayrıca sürekli çalışılması sayesinde anatomisinin ve fizyolojisinin çok iyi belirlenmiş olması, hücre tiplerinin iyi bilinmesi, birçok genin tanımlanmasında kullanılmış olması ve ardından bu genlerin homologlarının insanlarda keşfedilmesi bu türü diğer türlerden ayırarak ön plana çıkmasını sağlamıştır (McGurk vd., 2015).

3.1.1.1. *D. melanogaster*'in yaşam döngüsü

D. melanogaster'in hayat döngüsü (Dizman, 2016) Şekil 3.2'de görüldüğü gibi tam metamorfoz geçirerek yumurta, larva, pupa ve ergin olmak üzere dört evrede tamamlanır.



Şekil 3. 2. *Drosophila melanogaster*'in yaşam döngüsü

D. melanogaster'in gelişim evreleri birçok faktörden etkilenmektedir. Bunlardan en önemlileri; sıcaklık, beslenme, populasyon yoğunluğu, radyasyon ve nem gibi faktörlerdir (Keser, 2010). Gelişim evresi sıcaklığa göre değiştiği için ektodermik bir canlıdır. Uygun koşullarda (25°C sıcaklık, %40-60 bağıl nem) yaşam döngüsü yaklaşık 10 gündür (Klug vd., 2009).

Drosophila melanogaster yumurtası (Bkz. Şekil 3.3) besiyerine giriş yapan ve oksijen alışverişini sağlayan anterior tarafında filamentlere sahip, yaklaşık 0,5 mm uzunluğunda oval görünümlü yapıdır (Graf vd., 1992; Pyrowolakis vd., 2017). Yumurtalar, anterior tarafında bulunan bu yapılar sayesinde gelişimleri için gerekli olan besin ve oksijeni alırlar.



Şekil 3. 3. *Drosophila melanogaster* yumurtası

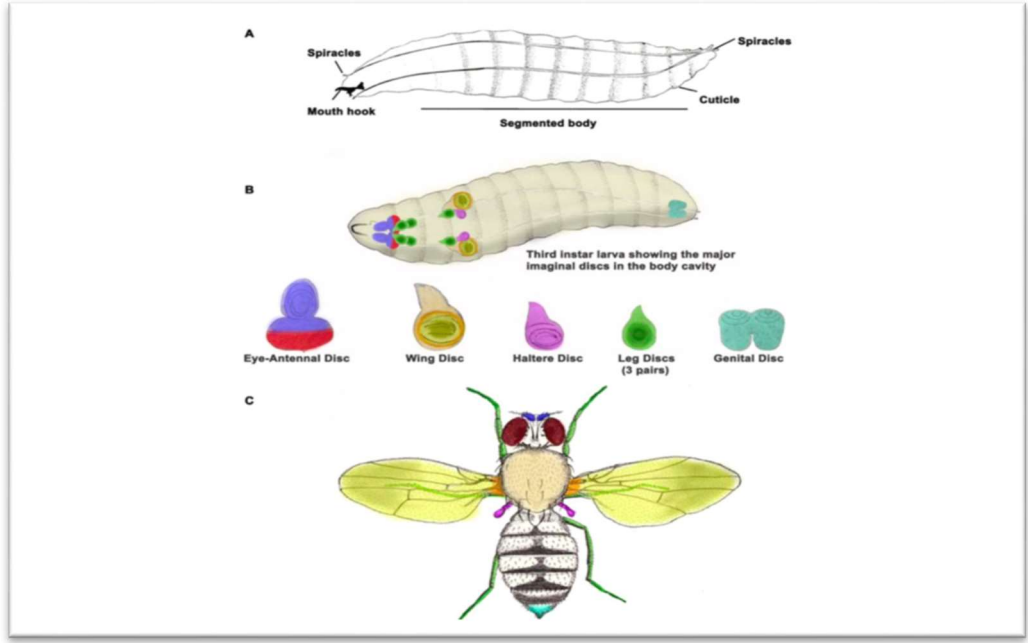
Drosophila melanogaster larvası (Bkz. Şekil 3.4), yumurta evresinin ardından besiyerinde gelişim gösteren bir yapıya sahiptir (Tamtürk ve Atlı, 2019). Gömlek değiştirme adı verilen süreçte, iki kez kütikula tabakasını yeniler ve bu iki gömlek değiştirme arasındaki süreçte bu yapıya “instar” adı verilir.



Şekil 3. 4. *Drosophila melanogaster* yumurtası

Larva evresi kendi içinde gelişim yapılarına göre birinci evre larva, ikinci evre larva ve üçüncü evre larva olarak adlandırılır. Bu süreçte en önemli nokta, “imajinal disk hücreleri” olarak adlandırılan hücrelerin (Bkz. Şekil 3.5), larva evresinden pupa evresine kadar geçen süre içinde hücre bölünmesiyle çoğalarak, pupa evresinde meyve sineğinin organogenez olayı ile organlarını oluşturmasıdır (Nienhaus, 2013). *Drosophila melanogaster*'in imajinal diskleri, birçok kansere hassas olan memeli hücresi ile benzerlik gösteren özelliklere sahiptir. Bu diskler, ergin sineklerde birçok yapı ve organda rol oynayan özelleşmiş epitel hücre keseleridir. Larval dönemde imajinal disk hücrelerinin yetişkin sineğin organlarının gelişimini sağlaması nedeniyle *Drosophila melanogaster*, biyolojik çalışmalarda önemli bir model organizma olarak kabul edilir (Ashburner, 1989; Potter vd., 2000; Bier, 2005; Marsh ve Thompson, 2006; Allocca vd., 2018).

Drosophila melanogaster pupası (Bkz. Şekil 3.6) besiyerinde beslenen üçüncü evre larvaların nemli besiyerinden kuru ortama geçmesiyle başlayan bir süreçtir. Bu geçiş sırasında dış zar kahvemsî sarı bir renge bürünerek sertleşip sabitleşir ve prepupa evresi oluşur. (Tamtürk ve Atlı, 2019). Bu evre yaklaşık 24 saat sürer. Pupa, puparyum olarak adlandırılan kütikula yapının içinde olgunlaşma gerçekleşene kadar hareketsiz bir şekilde bekler.



Şekil 3. 5. *Drosophila melanogaster*'in imajinal diskleri

D. melanogaster pupası erginleştğinde, kanat ve göz yapısının ortaya çıkması pupa evresinden yaklaşık 1 gün önce gözlenmeye başlar. Bu süreçte pupa dönemindeki değişiklikler, *Drosophila*'nın yetişkin ergin sineğe dönüşmesini sağlar ve bu dönem, meyve sineği biyolojisinin önemli bir aşamasını temsil eder (Falakalı, 1990; Rubin ve Lewis, 2000; Dayanıklı, 2014).



Şekil 3. 6. *Drosophila melanogaster* pupası

Drosophila melanogaster ergin bireylerinde (Bkz. Şekil 3.7), pupa evresinden sonra vücudun ön kısmı parçalanır ve beyazımsı renkte olan kanatları henüz açılmamış bir şekilde uzun abdomen bölgesiyle birlikte ortaya çıkarlar. Pupa evresinden çıktıktan 1-2 saat sonra kanatlar açılır ve vücut koyu bir renge bürünür (Hales vd., 2015). Dişiler, çiftleşmeden 8-9 saat sonra çiftleşme olgunluğuna erişirken, erkekler hemen çiftleşme olgunluğuna ulaşırlar. Dişiler, gelişiminin ikinci veya üçüncü gününde yumurtlama işlemini gerçekleştirirler. Yumurta bırakma işlemi, çiftleşmeden bağımsız olarak gerçekleşir ve döllenmeyen yumurtalar açılmaz. Erginlerin dış genital organları, kanat yapıları, ağız parçaları, bacakları, anten, göz ve halterleri imaginal disklerin farklılaşmasıyla oluşur. Bu imaginal diskler, olgunlaşacak yapıya göre özel olarak programlanmış yapılar olup, birinci larva evresinde sayıları az olan hücreler mitoz bölünme geçirerek pupa evresine girer ve sayılarını birkaç bine çıkartırlar (Graf vd., 1992; Bozcuk, 2000; Lloyd ve Taylor, 2010). *D. melanogaster*, kitin yapıli bir dış iskelete sahiptir ve vücut yapısı baş, toraks ve abdomen olmak üzere üç kısımdan oluşmaktadır. Şekil 3.7’de eşeyssel dimorfizme sahip olan *D. melanogaster*’in kiremit kırmızısı gözleri ve sarı-kahverengi abdomeni görülmektedir (Can, 2020). Erkeklerin birinci çift bacakların tarsus segmentinin bazal tarafında, kısa kalın kıllardan meydana gelen ve “eşey tarağı” (sex comb) denilen bir yapı bulunur. Dişilerde bu yapı bulunmaz. Eşey tarağı çiftleşme sırasında erkek bireylerin dişiyi kavramasını sağlar (Falakalı, 1990).



Şekil 3. 7. *Drosophila melanogaster*’in ergin bireyi

3.1.1.2. *D. melanogaster*'in çalışmada kullanılan mutant soy hatları

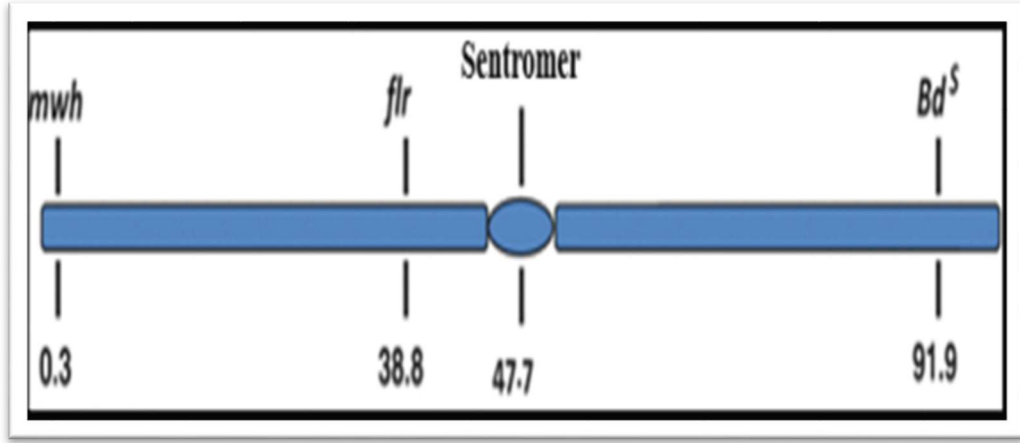
D. melanogaster'in mutata soyları olan *multiple wing hair (mwh)* ve *flare³ (flr³; flr³ /In (3LR) TM3 Bd^S)* kullanılmıştır. Bu soylar Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi Biyoloji Bölümü'nden temin edilmiştir. Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvar'ında standart *Drosophila* besiyeri ortamında yetiştirilmiştir (Bkz. Tablo 3.1). Normal metabolizma aktivitesine sahip olan bu türlerin genetik yapısı kısaca aşağıdaki gibidir.

- ✓ *Multiple wing hair (mwh/mwh)*
- ✓ *Flare³ (flr³ /In (3LR) TM3, ri p^p sep I (3) 89Aa bx^{34s} e^S)*. Bu türün genotipik olarak kısaca gösterimi *flr³ /TM3, Bd^S* şeklindedir.

Tablo 3. 1. Standart *Drosophila* besiyerinin içeriği

MADDE	MADDE MİKTARI
Saf su	660 mL
Toz şeker	80 g
Mısır unu	70 g
Bira mayası	20 g
Agar agar	10 g
Propiyonik asit	3-4 mL

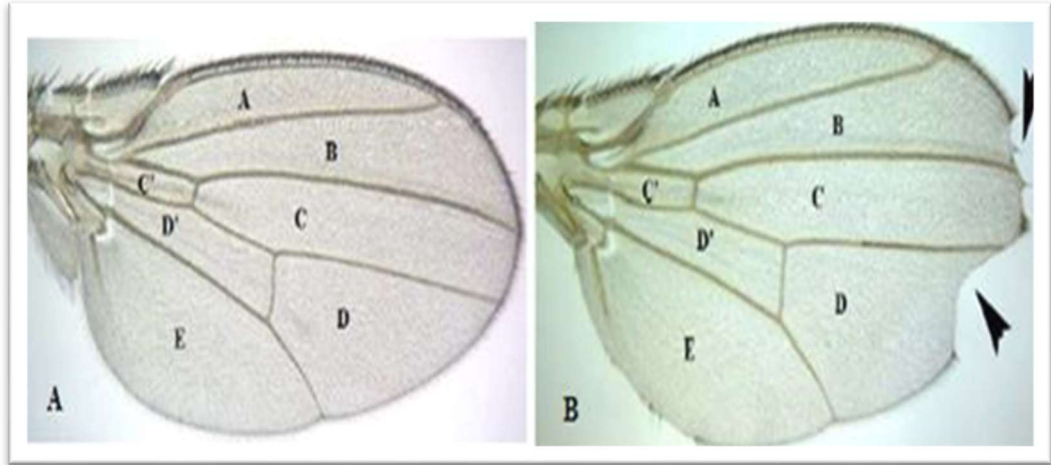
Multiple wing hair (mwh/mwh): Bu çalışmada tercih edilen *mwh* mutant soyu üçüncü kromozomun sol kolunun ucunda yer alan, *çoklu kanat kılı* mutasyonuna sahip çekinik bir genidir. Şekil 3.8'de görüldüğü gibi belirleyici genler olan *TM3* ve *Bd^S* genleri de üçüncü kromozomun üzerinde yer almakta ve aralarındaki mesafenin uzaklığı rekombinasyon ve mutasyonların geniş parametrelerde gözlenmesi avantajını ortaya koymaktadır (Graf vd., 1992; Kaya vd., 2000).



Şekil 3. 8. *Drosophila*'da belirleyici genlerin üçüncü kromozom üzerinde konumları

D. melanogaster bireylerinde meydana gelen mutasyonlar, fenotipte farklılıklara yol açmaktadır (Dayanıklı, 2014). Bu mutasyonlar, imajinal disklerde oluştuğunda, ergin sineklerin kanatlarında görsel olarak gözlenebilen değişikliklere neden olmaktadır. Özellikle homozigot durumda olan *mwh* soyu bireylerinin kanatlarında, normalde bir hücrede bir adet olan kanat kılı (trikom) sayısında değişiklikler gözlenmektedir. Normalde bu bireylerde hücre başına bir kanat kılı bulunması gerekirken, mutasyon sonucu *çoklu kanat kılı* bulunduğu gözlenmektedir (Wurgler, 1986; Rubin ve Lewis, 2000).

Flare³ (flr³ /In (3LR) TM3, ri p^p sep I (3) 89Aa bx^{34s} e^S): Bu soy, çekinik bir gen olan *flare* (*flr³*) mutasyonunu taşımaktadır. *flr³* geni, homozigot halde letal olan üç adet 26 mutant allele sahiptir. Bu mutant kanat hücreleri, kanatlardaki imajinal disklerde bulunan homozigot hücrelerin gelişiminden kaynaklanır. Homozigot durumda olan bu mutant hücreler, kanat kenarlarının testere dişli şeklinde görünmesine neden olur ve bunu sağlayan dominant bir mutasyon geni olan *Bd^S* (beaded serrat) etkisini gösterir (Bkz. Şekil 3.9). *Bd^S* geni, heterozigot durumunda etkisini gösterir ve TM3 dengeleyici kromozomu üzerinde bulunur, bu sayede testere şeklindeki kanat kenarları sayesinde diğer sineklerden kolayca ayırt edilebilir (Graf vd., 1984; Graf vd., 1992). *flr³* fenotipinde kanat kılları normal ve düz görünürken, *Bd^S* de düzgün olmayan, kısa, kalın, nokta veya koyu renkli bir top gibi görünen kıl yapısı mevcuttur.



Şekil 3. 9. *Drosophila*'da normal ve serrat kanat fenotipleri

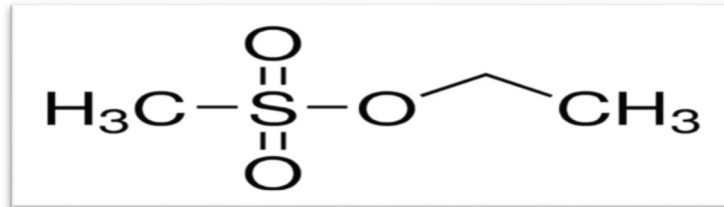
3.1.2. Bitkisel organizma

3.1.2.1. *Sideritis brevidens* ve *Sideritis libanotica* subsp. *violascens*

Mersin ilinin Anamur ilçesinden toplanan *Sideritis brevidens* ve *Sideritis libanotica* subsp. *violascens* bitkilerin teşhisi Orman Mühendisi İsmail GÜBEŞ tarafından yapılmıştır. Tez çalışmamızda bitkilerin topraküstü parçalarından elde edilen metanol ekstreleri kullanılmıştır.

3.1.3. Kimyasal ajanlar

Çalışmamızda kullanılan etil metansülfonat (EMS) alkilleyici bir ajan olup Sigma firmasından M0880 koduyla ticari olarak satın alınmıştır. Şekil 3.10'da moleküler ağırlığı 124,16 g/mol olan etil metansülfonatin moleküler formülü ($\text{CH}_3\text{SO}_3\text{CH}_2\text{CH}_3$) gösterilmiştir.

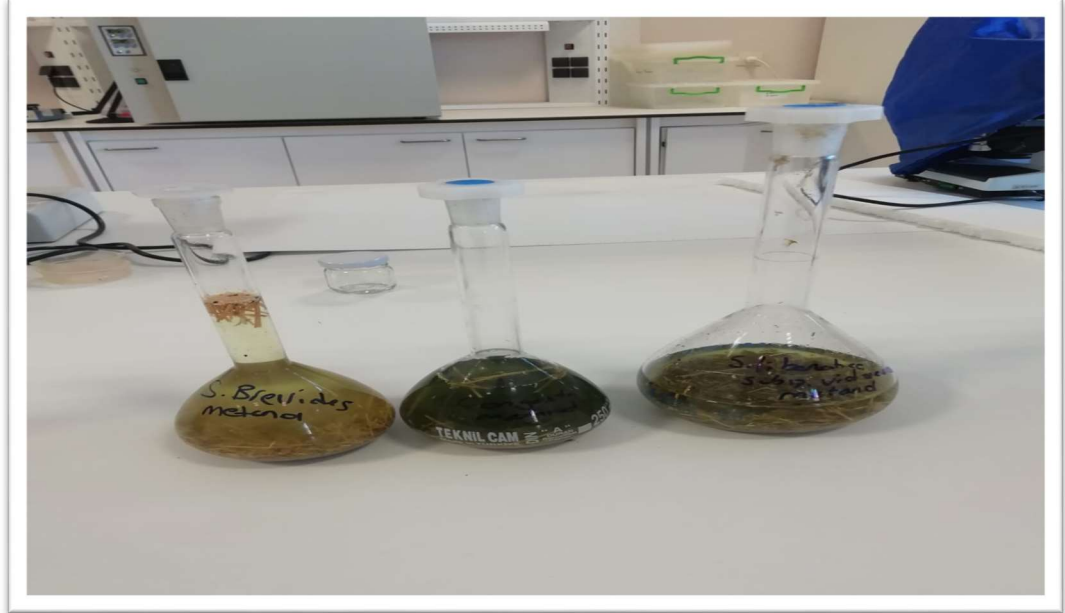


Şekil 3. 10. Etil metansülfonatin moleküler yapısı

3.2.Yöntem

3.2.1. Bitki örneklerinin toplanması ve ekstralarının hazırlanması

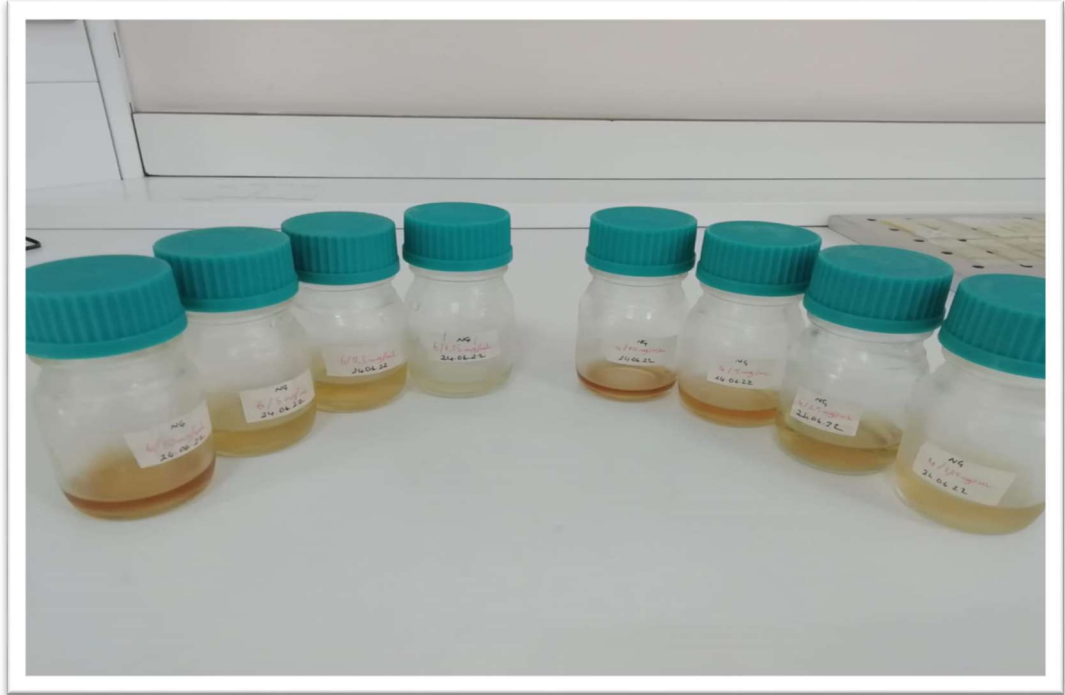
Çalışmamızda kullandığımız bitkiler Mersin ilinin Anamur ilçesinde toplanmış ve kurutulmuştur. Kurutulmuş bitkilerin toprak üstü yapıları sıvı azotla beraber ekstraksiyona uygun hale getirilmiştir. Toz haline getirilen bitki kısımları hassas terazide her bir ekstrakt için 50 g tartılmış ve her bir bitki için Şekil 3.11’de ayrı ayrı metanol ile 250 mL’ye tamamlanmıştır. Ekstrakte edilen kısımların içerdiği saf metanolün büyük bir kısmı 40°C ve düşük basınç altında rotary evaporatör yardımıyla 3 saat süreyle uzaklaştırılmıştır (Bkz. Şekil 3.12). Metanol ekstraksiyonu Kotan ve arkadaşlarının belirlediği yöntem dahilinde tamamlanmıştır (Kotan vd., 2010). Elde edilen *Sideritis brevidens* (SB) ve *Sideritis libanotica* subsp. *violascens* (SL) ekstraktlarından stok çözeltiler hazırlanmış ve farklı konsantrasyonlarda (1,25; 2,5; 5 ve 10 mg/mL) uygulama gruplarına ilave edilmiştir (Bkz. Şekil 3.13). Stok çözelti +4°C’de buzdolabında saklanmıştır.



Şekil 3. 11. *S. brevidens* ve *S. libanotica* subsp. *violascens* metanol ekstraktları



Şekil 3. 12. Evaporasyon işlemi



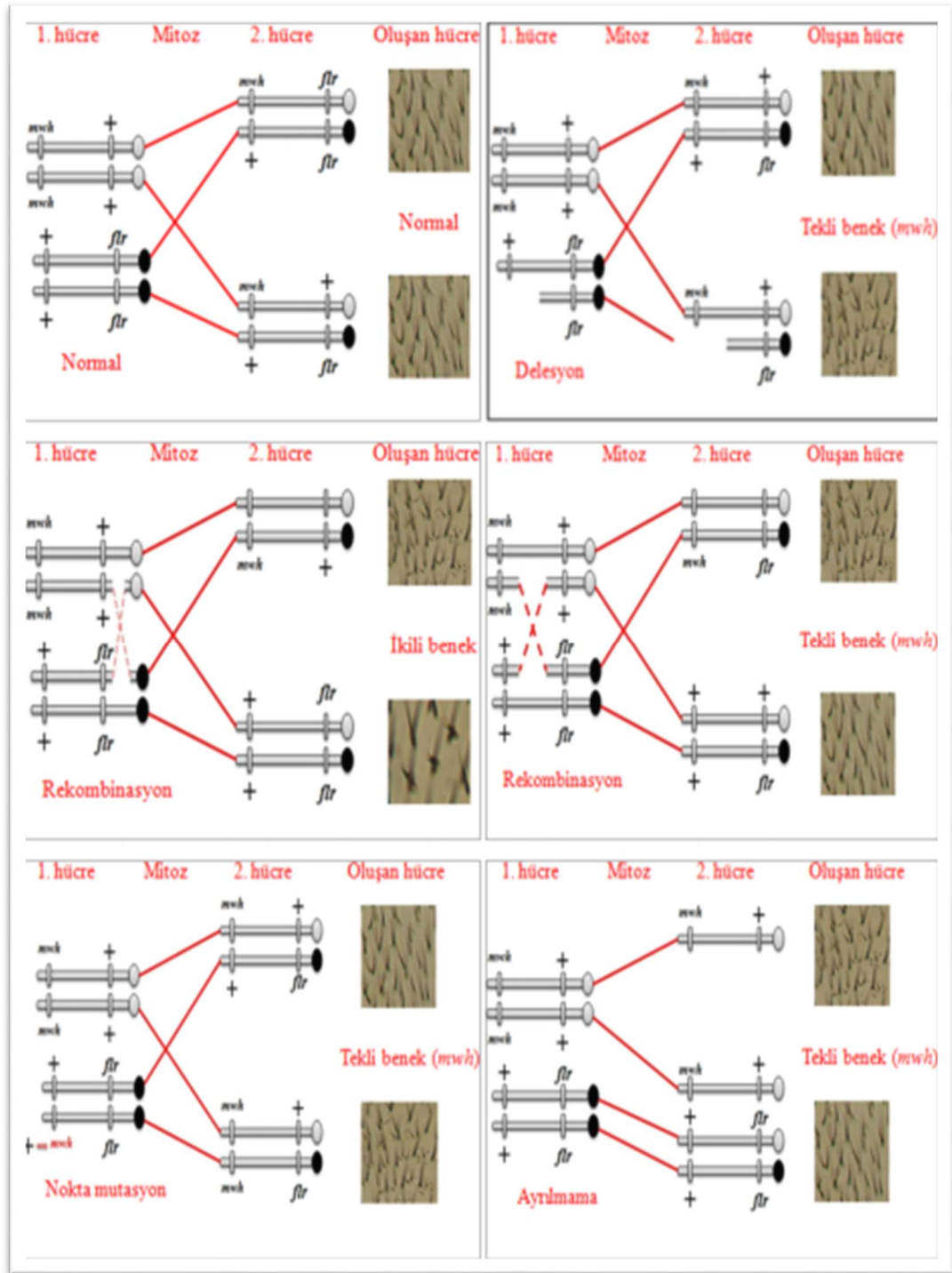
Şekil 3. 13. *S. brevidens* ve *S. libanotica* subsp. *violascens* bitkilerinin stok çözeltileri

3.2.2. Somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (Kanat benek testi)

Kanat benek testi ve göz benek testi olmak üzere iki şekilde uygulanan SMART testi, nokta mutasyonları, kromozom kayıpları, kromozom bozuklukları ve mitotik rekombinasyonlarının tespit edilmesini sağlar (Graf vd., 1984; Kaya vd., 2000). Uygun genleri içeren larvalardaki heterozigotluğun ortadan kaldırılmasına dayanan bu testler, mitotik olarak imajinal disklerde büyüyen büyük hücre gruplarını hedef alır. Ancak, bu imajinal disk hücrelerinin genetik yapısında meydana gelen değişiklikler genetik kökenli ve sonraki nesillere aktarılırsa mutant hücre grupları (klonları) oluşur. Bu genetik değişiklikler dışarıdan gözle görülebilecek değişikliklere neden olursa, klonlar ergin sineğin kanatlarında ve gözlerinde mutant hücre benekleri olarak ortaya çıkar. Kimyasal ajanların etkisi altındaki sineklerde oluşan klonların toplam sayısı, uygulanan kimyasal maddelerin toplam genotoksik etkisi hakkında sayısal sonuçlar verirken, klonların tipi, klon oluşumundaki mutasyon mekanizmaları ortaya çıkarır (Henderson, 2004). İkili benekler 3. kromozomun sentromeri ve *flr³* geni arasındaki somatik rekombinasyon sonucu meydana gelirken tekli benekler, nokta mutasyonlar ve kromozom kayıpları ve iki işaret geni (*mwh* ve *flr³*) arasındaki mitotik rekombinasyonla oluşmaktadır (Özçelik, 2019). Somatik mutasyon ve rekombinasyonun etki süreci Şekil 3.14’de gösterilmektedir.

SMART *Drosophila melanogaster*’e ait *flare* (*flr³*) dişi ve *multiple wing hair* (*mwh*) erkek mutant sineklerinin çaprazlanması sonucu üçüncü evre (72±4 saatlik) transheterozigot larvaların kanat yapısında bulunan imajinal disk hücrelerindeki heterozigotluğun herhangi bir mutasyonla ortadan kalkması başka bir deyişle ergin sineklerin fenotipinde yabancı fenotip yerine mutant fenotipin gözlenmesi prensibine uygun olarak gerçekleşmektedir (Graf vd., 1984).

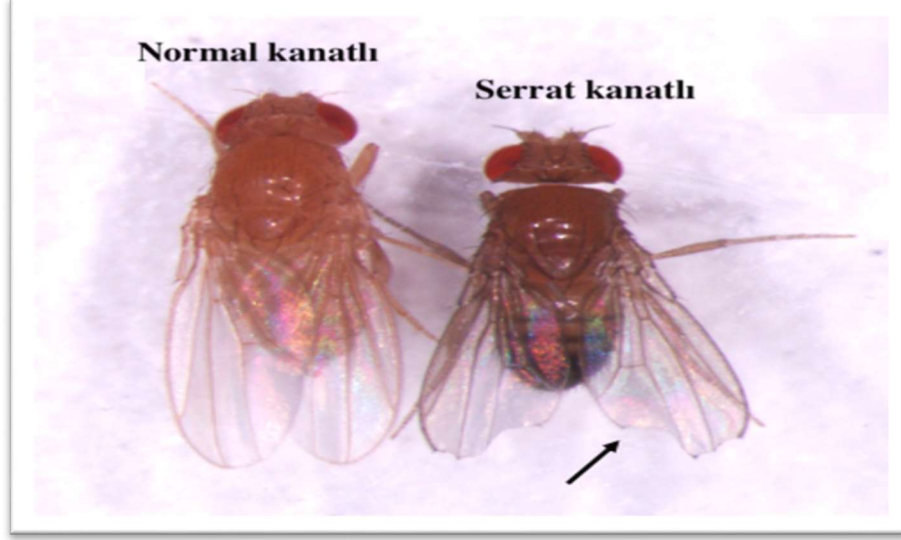
Kanat benek testinde iki uygun işaret geni kullanılır. Amaç bu genlerin fenotipte gözlemlenebilmesidir. Bu belirleyici genlerden ilki *flare* (*flr³*, 3-38,8) geni olarak isimlendirilir. Bu gen sinek kanatlarındaki normal düz ve uzun kıllar yerine, körelmiş, nokta şeklinde kıl oluşturmaktadır. *flr³* geni homozigot durumda iken embriyonik gelişim evresinde letal (öldürücü) etki oluşturur ve ergin birey oluşumunu engeller. Sağlıklı bireylerin embriyonik dönemde letal etkilerden korunması ve rekombinasyonun kontrol altında tutulması amacıyla dengeleyici TM3 kromozomu kullanılmaktadır.



Şekil 3. 14. Somatik mutasyon ve rekombinasyonun etki süreci

İkinci belirleyici gen olarak, *mwh* (*multiple wing hair*=çoklu kanat kılları, 3-0,3) adı verilen gen kullanılır. Bu gen, aynı hücreden üç veya daha fazla kanat kılının çıkması şeklinde kendini gösterir.

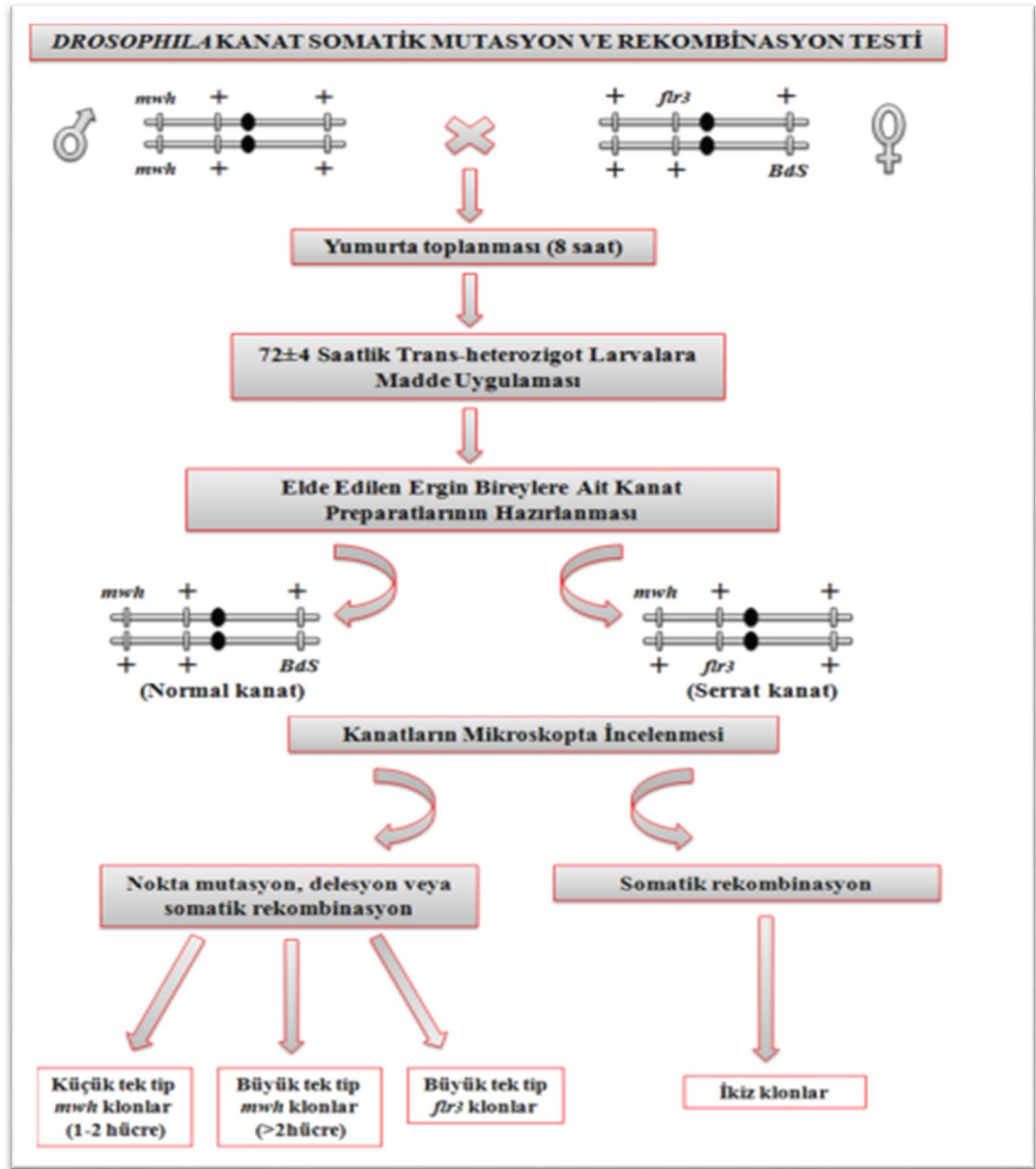
Çalışmamızda, erkek *mwh/mwh* X *flr³ /In(3LR) TM3, Bd^S* dişi şeklinde yapılan çaprazlamalar (Bkz. Şekil 3. 15) sonucunda oluşan transheterozigot larvalar kullanılarak değerlendirmesi yapılmıştır. Oluşan larvalara madde uygulamasının aşamalarının gösterildiği *Drosophila* Kanat Benek Testi (Ayar, 2013) Şekil 3.16’da özetlenmiştir.



Şekil 3. 15. Çaprazlama yapılan *D. melanogaster* bireylerine ait görüntü

3.2.2.1. Çaprazlama için birey seçimi

Çalışmamızda 3. evre (72 ± 4 saatlik) transheterozigot larvaları elde etmek için *D. melanogaster*'in *multiple wing hair (mwh)* erkek bireyleri ile *flare (flr³)* dişi bireylerin olduğu kültür ortamı kullanılmıştır. Deney için her bir şişede 40 *flr³* dişi ve 40 *mwh* erkek olacak şekilde düzenlenmiş ve 3 gün boyunca 8 saatlik aralıklarla çaprazlamalar yapılmıştır. Dişi bireyler henüz çiftleşmemiş (virgin) durumda toplanmış ve başka bir kültür ortamına aktarılmıştır. Oogenezin gerçekleşmesi için dişi ve erkek bireyler bir gün boyunca aynı kültür ortamında bekletilmiştir. Transheterozigot larvaların aynı evrede olmaları için yumurta oluşumu gerçekleşmiş bireylerin 8 saatlik çaprazlama süreçlerinde yumurta bırakmaları sağlanmıştır.



Şekil 3. 16. *Drosophila* kanat benek testinin şematik olarak gösterilmesi

3.2.2.2. Çözeltilerin hazırlanması ve deney gruplarına uygulanması

Tez çalışmamızda, EMS uygulaması için belirlenen 1 mM konsantrasyon, genotoksik etki gösterecek düzeyde ve transheterozigot larvalarda imajinal diskleri etkileyerek mutasyon oluşturacak yeterlilikte bir dozdur. Araştırmamızda, antigenotoksik etkinliğini araştırdığımız bitki örneği için farklı konsantrasyonlarda (1,25; 2,5; 5; 10 mg/mL) çözeltiler hazırlanmıştır. Bu konsantrasyonlardaki bitki ekstraktlarıyla birlikte alkilleyici madde önce tek başına, sonra da bitki ekstraktlarıyla birlikte uygulanmıştır. Hazırlanan sulu çözeltiler kullanılarak 5 mL'lik kültür tüplerine içerisinde 5 g hazır *Drosophila*

besiyeri (Carolina Formula 4-24 Instant Medium) bulunan kültür ortamı oluşturulmuştur. Her bir kültür tüpüne 100 larva eklenerek, bu larvalardan ergin bireyler elde edilmiştir. Her deney, üç ayrı tekrarlamayla gerçekleştirilmiştir.

3.2.2.3. Kanat preparatlarının hazırlanması ve incelenmesi

Deney gruplarında erginleşen bireyler eterle bayılarak toplanmış ve %70'lik etil alkol çözeltisinde +4°C'de saklanmıştır. Toplanan bireyler, kanat yapılarına göre normal kanat özellikli transheterozigot (*mwh/flr³*) ve testere dişli kanatlı (dengelenmiş heterozigot *mwh/TM3, Bd^S*) olmak üzere iki farklı gruba ayrılmıştır. Kanat preparatlarını incelemeye hazır hale getirmek için "Faure solüsyonu" kullanılmıştır (Bkz. Tablo 3.2). Çukur lam üzerine Faure solüsyonundan 1-2 damla eklendikten sonra her bir sinek sırasıyla çukur lam üzerine aktarılmıştır. Leica marka EZ4 model stereo mikroskobun kullanıldığı kanat koparma işlemi sırasında ince uçlu pens yardımıyla kanatların vücutla birleştiği bölgeden hassas ve dikkatli bir şekilde tutularak bu solüsyon sayesinde kanatlara zarar vermeden işlem gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3. 2. Faure solüsyonun içeriği

MADDE	MADDE MİKTARI
Distile su	50 mL
Kloral hidrat	50 g
Gam arabik	30 g
Gliserol	20 mL

Binoküler mikroskop altında bu koparılan kanatlar, steril bir düz lam üzerine uygun aralıklarla yerleştirilerek preparatların oda sıcaklığında kuruması beklenildikten sonra, lamlara 1-2 damla entellan damlatılarak üstleri lamel ile kapatılmış ve preparatlar incelenmeye hazır hale getirilmiştir. Hazırlanan preparatlar Leica marka DM 500 model ışık mikroskobunda 10x40 büyütmede incelenmiştir. Her kanat, A, B, C, C₁, D, D₁ ve E olarak adlandırılan sektörlere ayrılarak detaylı bir şekilde incelenmiştir. Her bir sektördeki *flr³* ve/veya *mwh* mutant klonları sayılarak kayıtları tutulmuştur. Bu inceleme sayesinde kanat yüzeyindeki genetik farklılıklar tespit edilmiştir.

3.2.2.4. Klon indüksiyon frekansı ve inhibisyon yüzdesinin hesaplanması

Kronik uygulamalarda tüm hücredeki ortalama indüksiyon frekansı aşağıdaki formülde gösterildiği şekilde hesaplanmıştır (Szabad vd., 1983).

$$f = \frac{n}{NC} \times 10^5$$

Bu formüle göre; “f” *mwh* klonların indüksiyon frekansını, “N” analiz edilen kanat sayısını, “C” sabit bir değer olan bir kanat üzerindeki incelenebilecek hücre sayısını (24 400) ve “n” gözlenen toplam *mwh* klon sayısını temsil etmektedir (Wurgler, 1986). Bitki özütlerinin antigenotoksik etkinliğini değerlendirirken, inhibisyon yüzdeleri dikkate alınarak yorumlanmıştır. Bu oran aşağıdaki formülle hesaplanmaktadır (Abraham, 1994).

$$\% \text{ Inhibisyon} = \frac{a - b}{a} \times 100$$

Bu formülde, “a” genotoksik madde uygulamasındaki toplam klon frekansını, “b” ise *S. brevidens* ve *S. libanotica* subsp. *violascens* ekstraktının birlikte uygulamasının toplam klon frekansını temsil etmektedir.

3.2.2.5. SMART sonuçlarının veri analizi

SMART ile elde edilen sonuçların istatistiksel analizi, özel olarak tasarlanmış bir bilgisayar programı olan Microsta kullanılarak yapılmıştır (Frei ve Würgler, 1988). Microsta, bu yöntem için özel olarak geliştirilmiş bir bilgisayar yazılımıdır ve SMART verilerinin analizini kolaylaştıran ve istatistiksel sonuçları sağlayan bir programdır. Bu program sayesinde elde edilen verilerin istatistiksel değerlendirmeleri yapılarak sonuçlar belirlenmiştir.

3.2.2.6. Mikrofotoğrafi

Çalışmamızda, ergin bireylerin kanatlarından hazırlanan preparatlarda gözlenen küçük tek tip, büyük tek tip ve ikiz klonlara ait fotoğraf çekimleri, Olympus marka DX63 model ışık mikroskobu kullanılarak yapılmıştır.



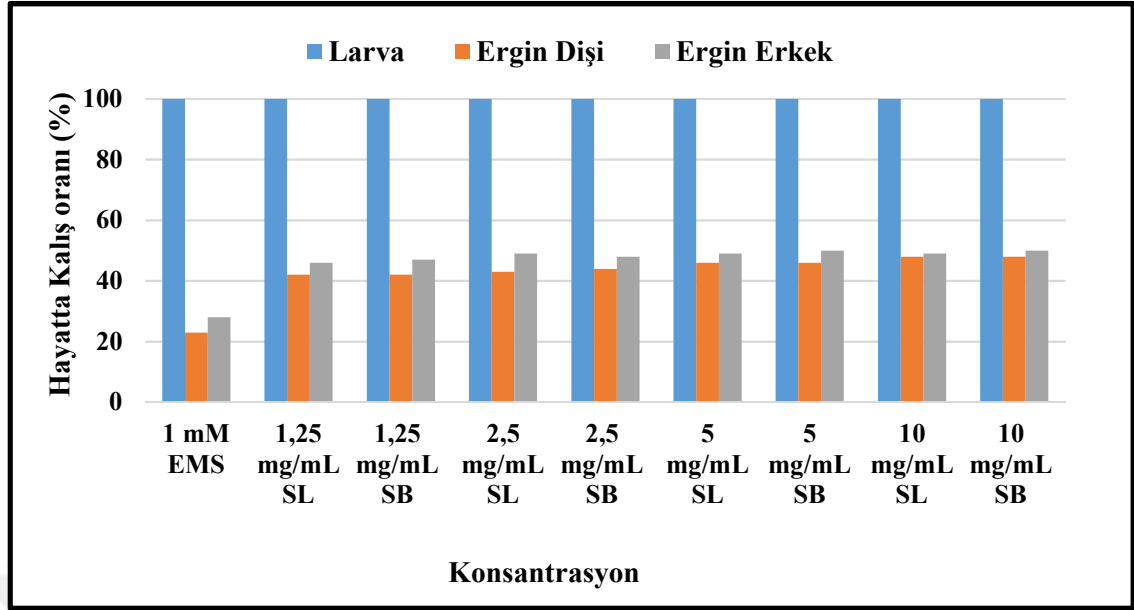
4. ARAŞTIRMA BULGULARI

İki aşamada gerçekleştirilen bu tez çalışmasında, öncelikle birbirinden farklı konsantrasyonlarda (1,25; 2,5; 5,0 ve 10 mg/mL) SB ve SL içeren besiyerlerinde (*mwhxflr³*) çaprazlaması sonucu elde edilen *Drosophila melanogaster*'in 72±4 saatlik transheterozigot larvalarının hayatta kalma oranları belirlenerek ekstrelerinin hayatta kalma yüzdesi (larval mortalite) üzerindeki etkisi incelenmiştir. Son aşamada ise, aynı konsantrasyonlarda SB ve SL içeren besiyerlerinde yaşayabilen ergin bireylerin kanatları kullanılarak *Drosophila* kanat benek testi gerçekleştirilmiş ve genotoksik aktivitenin olası sonuçları karşılaştırmalı olarak araştırılmıştır. SMART yöntemiyle SB ve SL'nin *D. melanogaster*'in genetik materyaline olan etkisi değerlendirilmiş ve bu ekstrelerin potansiyel genotoksik etkileri ortaya konulmuştur.

4.1. Yaşama Yüzdesi (Larval Mortalite) Deneylerine Ait Bulgular

SB ve SL bitki ekstrelerinin genotoksisiteleri, *D. melanogaster* larvaları üzerinde yapılan yaşama yüzdesi deneyleriyle karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. Bu sebeple, 72±4 saatlik 100 adet transheterozigot larva, farklı konsantrasyonlarda (1,25; 2,5; 5 ve 10 mg/mL) SB ve SL içeren besiyerlerine yerleştirilmiştir. Her uygulama grubunda larvalardan ergine gelişebilen bireylerin sayısı hesaplanarak hayatta kalış oranları verilerek toksik etkileri değerlendirilmiştir (Bkz. Şekil 4.1 ve Tablo 4.1).

Yaşama yüzdesi deneylerinin sonuçlarına göre, EMS'nin toksik etki gösterdiği ve *D. melanogaster* larvalarının hayatta kalış oranında kontrol grubuna kıyasla azalmaya neden olduğu tespit edilmiştir. Ancak, yüksek konsantrasyonlarda (5 ve 10 mg/mL) SB ve SL'nin larvaların yaşama yüzdesini kontrol grubuna göre arttırdığı belirlenmiştir (Bkz. Tablo 4.1 ve Şekil 4.1). Bu sonuçlar, EMS'nin zararlı etkilerine karşın, SB ve SL'nin belirli konsantrasyonlarda *D. melanogaster* üzerindeki toksik etkilerini azaltabileceğini veya tersine, hayatta kalış oranlarını artırabileceğini göstermektedir.



Şekil 4. 1. *D. melanogaster*'de larval mortalite oranları

Tablo 4. 1. SB ve SL uygulanan *D. melanogaster*'in 72 ± 4 saatlik transheterozigot larvalarında yaşama yüzdesi (larval mortalite) oranları

Uygulama Grupları	Konsantrasyon (mg/mL)	Larva Sayısı	Hayatta Kalış Oranı (%)		
			Dişi Birey	Erkek Birey	Toplam Birey
Kontrol (Distile su)	0	100	48	46	94
EMS	1 mM	100	23	28	51
SB	1,25	100	42	47	89
	2,5	100	44	48	92
	5	100	46	50	96
	10	100	48	50	98
SL	1,25	100	42	46	88
	2,5	100	43	49	89
	5	100	46	49	95
	10	100	48	49	97

4.2. Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi Bulguları

Transheterozigot larvalara ayrı ayrı ve birlikte olacak şekilde EMS ve farklı konsantrasyonlarda hazırlanan bitki ekstratlarıyla uygulamalar yapıldıktan sonra

larvalardan erginleşebilen bireyler normal kanat (*mwh/flr³*) ve serrat kanat (*mwh/TM3*) fenotiplerine göre ayrılmıştır. Ardından, bu ergin bireylerin kanat preparatları hazır duruma getirildikten sonra mikroskop altında incelenmiştir (Bkz. Şekil 4.2).

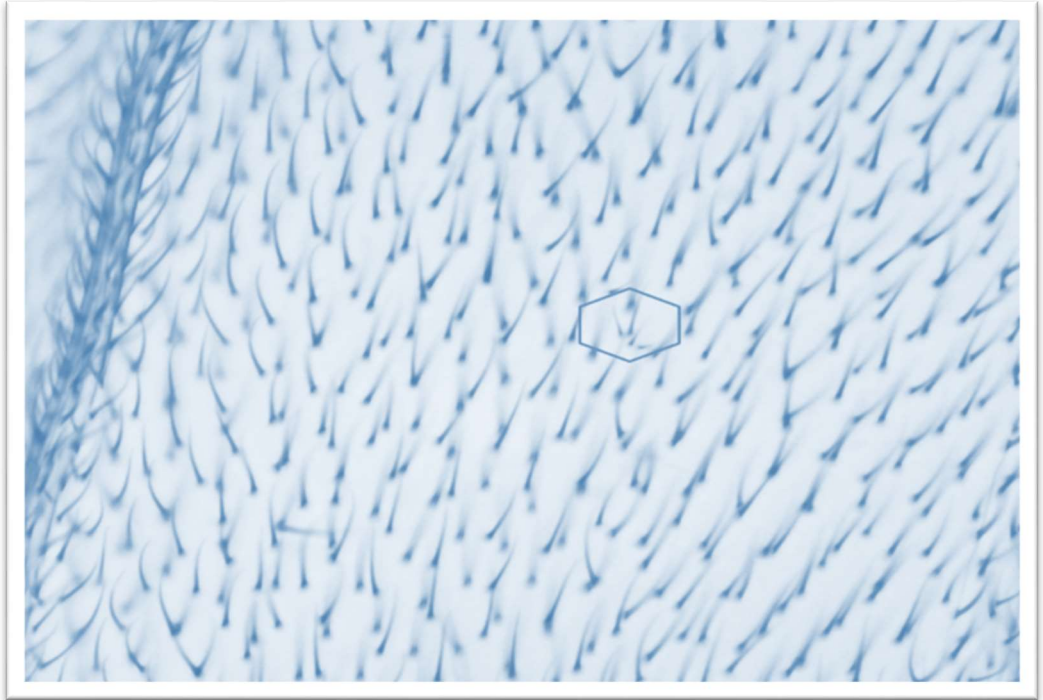


Şekil 4. 2. Kanat preparatlarının hazırlanışı

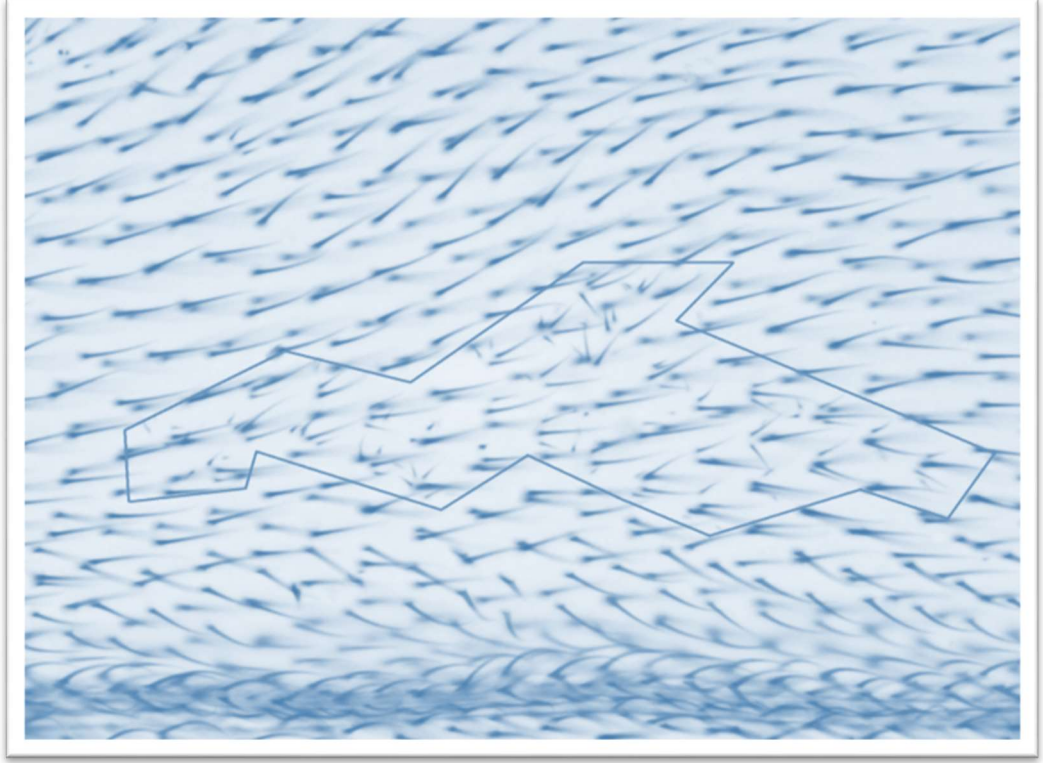
Her uygulama grubu için seçilen 80 kanat, benek sayısını belirlemek amacıyla ışık mikroskopunda 400X büyütme altında kanat benek tipleri yapısına göre ayırt edilerek sayılmıştır. Negatif kontrol olarak kullanılan distile su grubu, EMS pozitif kontrol grubu ve uygulama gruplarından elde edilen preparatlardaki kanat benekleri dikkatlice değerlendirilmiş ve istatistiksel analizlerde kullanılmak üzere belirli kategorilere ayrılmıştır. Tekli benek (*mwh* veya *flr³* fenotipinde), ikiz benek (*mwh* ve *flr³* fenotipinde), küçük tekli benek (1-2 klon) ve büyük tekli benek ($3 \leq$ klon) olmak üzere benek tipleri fotoğraflanmıştır (Bkz. Şekil 4.3- Şekil 4.7).



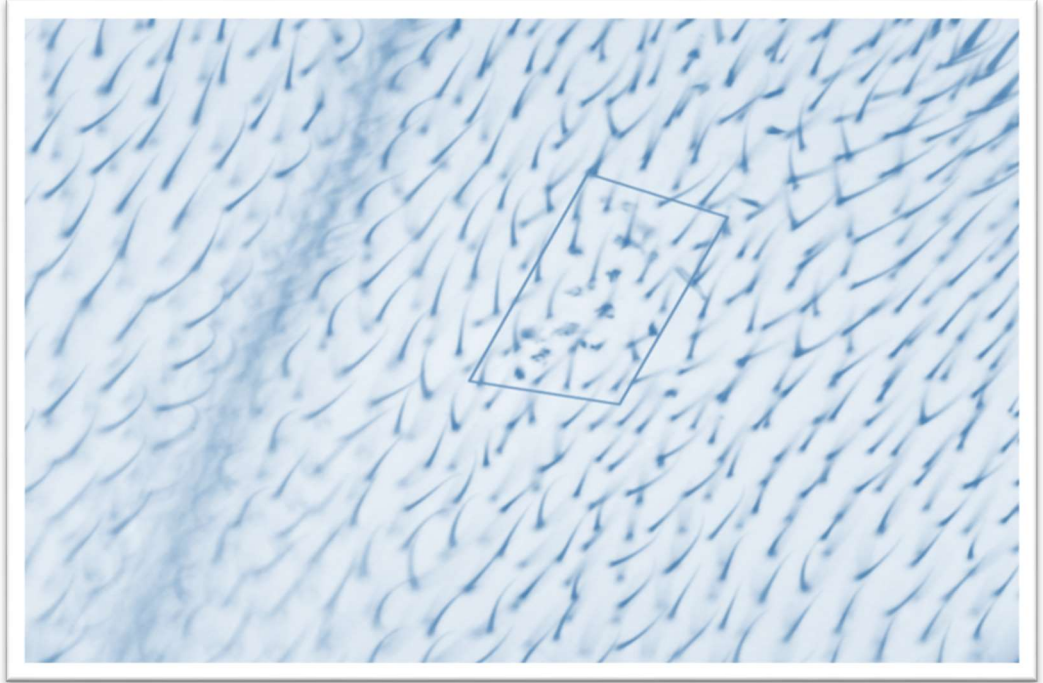
Şekil 4. 3. Normal kıllara sahip kanat yapısı (400X)



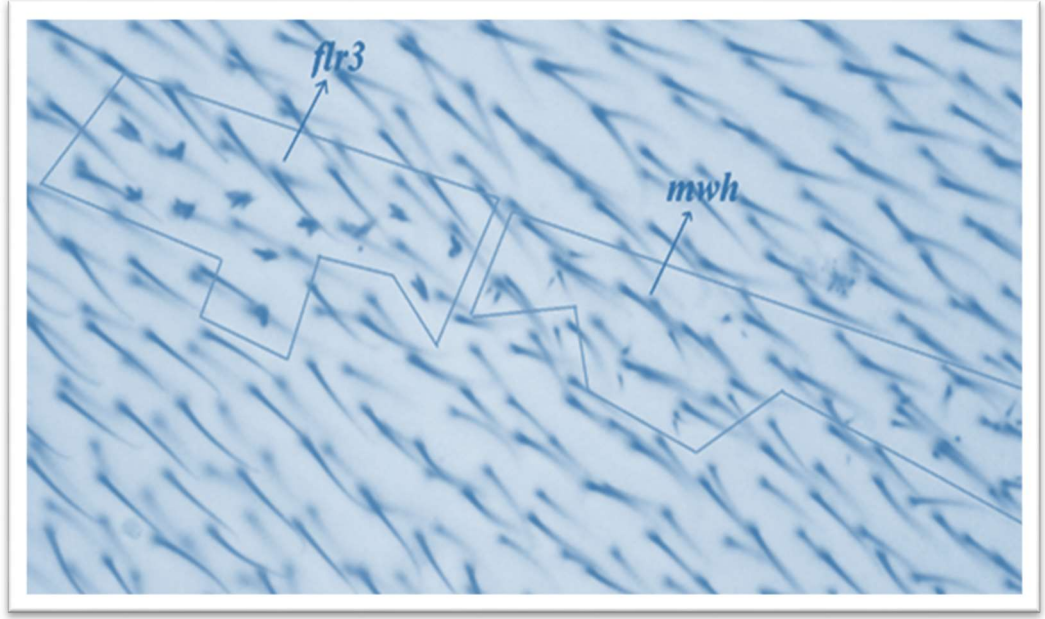
Şekil 4. 4. Küçük tekli *mwh* klona sahip kanat yapısı (400X)



Şekil 4. 5. Büyük tekli *mwh* klona sahip kanat yapısı (400X)



Şekil 4. 6. Büyük tekli *flr³* klona sahip kanat yapısı (400X)



Şekil 4. 7. İkiz klonla sahip kanat yapısı (400X)

4.2.1. Distile su ve EMS uygulaması sonucu elde edilen SMART bulguları

EMS uygulaması için belirlenen 1 mM konsantrasyon, genotoksik etki gösterecek düzeyde ve transheterozigot larvalarda imajinal diskleri etkileyerek mutasyon oluşturacak yeterlilikte bir dozdur. Aynı zamanda, araştırma yapabilmek için gerekli sayıda canlı birey elde etmemizi sağlayan bir konsantrasyondur. SMART yöntemi ile transheterozigot larvalardan elde edilen ergin bireylere ait kanat preparatları incelendiğinde tüm kanat benek ya da klon tiplerinde 1 mM EMS uygulanan gruplarda distile su negatif kontrol grubuna oranla önemli artışların olduğu gözlenmiştir (Bkz. Tablo 4.2).

Distile su uygulamasından elde edilen normal kanat preparatlarında küçük tek tip klon frekansı 0,33, büyük tek tip klon frekansı 0,04, ikiz klon frekansı 0,03, toplam *mwh* klon frekansı 0,38 ve toplam klon frekansı 0,39 olarak bulunmuştur. EMS uygulamasından elde edilen normal kanat preparatlarında bu oranlar sırasıyla 2,20; 1,39; 0,36; 3,39 ve 3,95'dir (Bkz. Tablo 4.2).

Serrat kanatlı bireylerde dengeleyici TM3 kromozomunun bulunmasından dolayı *flr³* klonlar oluşmaması sebebiyle ikiz klonlar gözlenememektedir. Distile su kontrol grubuna ait serrat kanat preparatlarının incelenmesi sonucu oluşturulan Tablo 4.2'de küçük tek tip, büyük tek tip, toplam *mwh* ve toplam klon frekanslarının sırasıyla 0,21; 0,03; 0,26 ve 0,24

olduğu; EMS uygulanan gruplardan elde edilen serrat kanat preparatlarında ise bu oranların sırasıyla 1,96; 1,34; 2,90 ve 3,30 olduğu gör÷lmektedir. Tüm uygulama gruplarında gözlenen bu artışların istatistiksel açıdan da önemli/anlamalı (+) olduğu bulunmuştur ($p<0,05$).

Klon indüksiyon frekansı (KİF) genotoksik ajanın mutasyon oluşturma potansiyelini ve genetik hasarın sıklığını gösterir. Negatif ve pozitif kontrol gruplarına ait mutasyon frekanslarından hesaplanan klon indüksiyon frekanslarına (KİF) bakıldığında normal kanat fenotipinde negatif kontrol grubunda bu değerin 1,54'den EMS uygulanan grupta 13,88'e, serrat kanatlı bireylerde ise 1,08'den 11,88'e kadar artışı tespit edilmiştir (Bkz. Tablo 4.2).

4.2.2. SB ve SL uygulaması sonucu elde edilen SMART bulguları

Tez çalışmamızda antijenotoksik etkisi araştırılan *Sideritis* cinsine ait SB ve SL bitkilerinin sürgün kısmından elde edilen metanol ekstraktlarının belirlenen konsantrasyonlarının öncelikle kanatlar üzerinde herhangi bir toksik etkisinin olup olmadığına bakılmıştır. Farklı konsantrasyonlarda SB ve SL ekstratlarıyla distile su negatif kontrol grubu sonuçları istatistiksel olarak karşılaştırdığında SB ve SL ekstratlarının uygulandığı hiçbir grupta genotoksik veya mutajenik bir etki gözlenmeyerek kanatlardaki toplam klon sayılarında artış olmadığı tespit edilmiştir (Bkz. Tablo 4.3).

Tablo 4. 2. Distile su ve EMS uygulaması sonuçlarına ait SMART verileri

Uygulama Grupları		Kanat Sayısı (N)	Küçük tek tip klon (1-2 hücre) (m = 2)			Büyük tek tip klon (>2 hücre) (m = 5)			İkiz klon (m = 5)			Toplam <i>mwh</i> klon (m = 2)			Toplam klon (m = 2)			Klon indüksiyon frekansı (KİF) (10 ⁵ hücre)
			No	Fr.	D	No	Fr.	D	No	Fr.	D	No	Fr.	D	No	Fr.	D	
Normal Kanat (<i>mvh/fr</i> ³)	Distile su	80	26	(0,33)		3	(0,04)		2	(0,03)		30	(0,38)		31	(0,39)		1,54
	EMS (1 mM)	80	176	(2,20)	+	111	(1,39)	+	29	(0,36)	+	271	(3,39)	+	316	(3,95)	+	13,88
Serrat Kanat (<i>mvh/TM3</i>)	Distile su	80	17	(0,21)		2	(0,03)					21	(0,26)		19	(0,24)		1,08
	EMS (1 mM)	80	157	(1,96)	+	107	(1,34)	+		*		232	(2,90)	+	264	(3,30)	+	11,88

EMS: Etil metansülfonat; No: Klon sayısı, Fr: Frekans, D: İstatistik sonuçların gösterimi (Frei and Würgler, 1988), “+”: pozitif, “-”: negatif, “i”: önemsiz fark, “m”: çarpım faktörü, *: TM3 dengeleyici kromozomundan dolayı ikiz klon oluşmaz. Olasılık düzeyi: $\alpha=\beta=0,05$.

Elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildiğinde, sayısal olarak anlamlı düşüşler negatif (-) olarak sınıflandırılmışken, istatistiksel olarak anlamsız düşüşler ise önemsiz (i) olarak kabul edilmiştir ($p>0,05$). Tablo 4.3’de kanatlardaki toplam klon sayıları incelendiğinde distile su negatif kontrol grubuna ait toplam klon frekansı normal kanat için 0,39, serrat kanat için 0,24 olduğu görülmektedir. SB uygulama gruplarında konsantrasyon artışına bağlı olarak toplam klon frekans değerleri sırasıyla normal kanat için 0,24; 0,20; 0,20 ve 0,14 iken serrat kanat için 0,21; 0,19; 0,19 ve 0,14’dür. Benzer şekilde SL uygulama gruplarında konsantrasyon artışına bağlı olarak toplam klon frekans değerlerinin sırasıyla normal kanat için 0,23; 0,20; 0,18 ve 0,15 iken serrat kanat için 0,23; 0,18; 0,14 ve 0,10 olduğu belirtilmiştir. Normal kanat için KİF değerlerine bakıldığında negatif kontrol grubunda 1,54 olan bu değer SB ve SL uygulama gruplarında konsantrasyon artışına paralel olarak düşüş gösterdiği tespit edilmiştir. SB ve SL uygulama grupları için konsantrasyon artışına göre bu değerlerin sırasıyla 0,82-0,72, 0,67-0,76, 0,72-0,61 ve 0,56-0,41 şeklinde olduğu hesaplanmıştır. Yine Tablo 4.3’de serrat kanat fenotipi için KİF değerlerine bakıldığında negatif kontrol grubunda 1,08 olan bu değer SB ve SL uygulama gruplarında konsantrasyon artışına paralel olarak düşüş gösterdiği tespit edilmiştir. SB ve SL uygulama grupları için konsantrasyon artışına göre bu değerlerin sırasıyla 1,08-0,97, 1,02-0,97, 0,97-0,87 ve 0,82-0,76 olduğu verilmiştir.

Tüm bu verilerin analizinden, *Sideritis* cinsine ait SB ve SL bitkilerinin topraküstü metanol ekstralarının bu çalışmanın amacına uygun olarak, muhtemelen antigenotoksik etkinliklere sahip olduğu sonucuna varılmıştır.

4.2.3. EMS ile SB ve SL’nin birlikte uygulanması sonuçlarına ait SMART bulguları

Etil metansülfonat (EMS) ile birlikte *Sideritis* cinsine ait SB ve SL bitkilerinin topraküstü metanol ekstralarının uygulandığı deney aşamasında elde edilen veriler, tek başına 1 mM’lik EMS uygulaması ile elde edilen verilerle istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır. Tablo 4.4’de, tüm uygulama gruplarında (EMS+SB ve EMS+SL) ‘+’ ve ‘i’ olan sonuçların ‘-’ olarak değiştiği görülmektedir. Bu düşüşler, artan konsantrasyonlara bağlı olarak tüm klon tiplerinde istatistiksel olarak anlamlı olarak belirlenmiştir ($p<0,05$).

Tablo 4. 3. SB ve SL uygulaması sonucuna ait SMART verileri

Uygulama Grupları	N	Küçük tek tip klon (1-2 hücre) (<i>m</i> = 2)			Büyük tek tip klon (>2 hücre) (<i>m</i> = 5)			İkiz klon (<i>m</i> = 5)			Toplam <i>mwh</i> klon (<i>m</i> = 2)			Toplam klon (<i>m</i> = 2)			Klon indüksiyon frekansı (KİF) (10 ⁵ hücre)	
		No	Fr.	<i>D</i>	No	Fr.	<i>D</i>	No	Fr.	<i>D</i>	No	Fr.	<i>D</i>	No	Fr.	<i>D</i>		
Normal Kanat (<i>mvh/ft³</i>)	Distile su	80	26	(0,33)		3	(0,04)		2	(0,03)		30	(0,38)		31	(0,39)		1,54
	EMS (1 mM)	80	176	(2,20)	+	111	(1,39)	+	29	(0,36)	+	271	(3,39)	+	316	(3,95)	+	13,88
	1,25 mg/mL SB	80	14	(0,18)	-	4	(0,05)	i	1	(0,01)	-	16	(0,20)	-	19	(0,24)	-	0,82
	1,25 mg/mL SL	80	13	(0,16)	-	3	(0,04)	i	2	(0,03)	i	14	(0,18)	-	18	(0,23)	-	0,72
	2,5 mg/mL SB	80	12	(0,15)	-	2	(0,03)	i	2	(0,03)	i	13	(0,16)	-	16	(0,20)	-	0,67
	2,5 mg/mL SL	80	14	(0,18)	-	2	(0,03)	i	0	(0,00)	-	15	(0,19)	-	16	(0,20)	-	0,76
	5 mg/mL SB	80	13	(0,16)	-	2	(0,03)	i	1	(0,01)	-	14	(0,18)	-	16	(0,20)	-	0,72
	5 mg/mL SL	80	11	(0,14)	-	1	(0,01)	-	2	(0,03)	i	12	(0,15)	-	14	(0,18)	-	0,61
	10 mg/mL SB	80	10	(0,13)	-	1	(0,01)	-	0	(0,00)	-	11	(0,14)	-	11	(0,14)	-	0,56
	10 mg/mL SL	80	8	(0,10)	-	3	(0,04)	i	1	(0,01)	-	8	(0,10)	-	12	(0,15)	-	0,41
Serrat Kanat (<i>mvh/TM3</i>)	Distile su	80	17	(0,21)		2	(0,03)					21	(0,26)		19	(0,24)		1,08
	EMS (1 mM)	80	157	(1,96)	+	107	(1,34)	+				232	(2,90)	+	264	(3,30)	+	11,88
	1,25 mg/mL SB	80	13	(0,16)	-	4	(0,05)	i				21	(0,26)	i	17	(0,21)	-	1,08
	1,25 mg/mL SL	80	14	(0,18)	-	4	(0,05)	i				19	(0,24)	-	18	(0,23)	i	0,97
	2,5 mg/mL SB	80	13	(0,16)	-	2	(0,03)	i			*	20	(0,25)	i	15	(0,19)	-	1,02
	2,5 mg/mL SL	80	13	(0,16)	-	1	(0,01)	-				19	(0,24)	-	14	(0,18)	-	0,97
	5 mg/mL SB	80	12	(0,15)	-	3	(0,04)	i				19	(0,24)	-	15	(0,19)	-	0,97
	5 mg/mL SL	80	10	(0,13)	-	1	(0,01)	-				17	(0,21)	-	11	(0,14)	-	0,87
	10 mg/mL SB	80	9	(0,11)	-	2	(0,03)	i				16	(0,20)	-	11	(0,14)	-	0,82
	10 mg/mL SL	80	8	(0,10)	-	0	(0,00)	-				15	(0,19)	-	8	(0,10)	-	0,76

EMS: Etil metansülfonat; N: Kanat sayısı, No: Klon sayısı, Fr: Frekans, D: İstatistik sonuçların gösterimi (Frei and Würzler, 1988), “+”: pozitif, “-”: negatif, “i”: önemsiz fark, “m”: çarpım faktörü, *: TM3 dengeleyici kromozomundan dolayı ikiz klon oluşmaz. Olasılık düzeyi: $\alpha=\beta=0,05$.

EMS'nin tek başına uygulandığı gruplarda normal kanat fenotipli bireylerde küçük tek tip, büyük tek tip, ikiz, toplam *mwh* ve toplam klon sayılarının frekansları sırasıyla 2,20; 1,39; 0,36; 3,39 ve 3,95 olarak tespit edilmiştir. EMS+SB uygulama grupları içinde en yüksek uygulama grubu olan 1 mM EMS+10 mg/mL SB uygulama grubunda bu frekanslar sırasıyla 0,89; 0,89; 0,14; 0,85 ve 1,91 şeklinde düşüş gösterirken benzer şekilde EMS+SL uygulama grupları içinde en yüksek uygulama grubu olan 1 mM EMS+10 mg/mL SL uygulama grubunda da bu frekanslar sırasıyla 0,86; 0,84; 0,11; 0,81 ve 1,81 şeklinde düşüş gösterdiği tespit edilmiştir (Bkz. Tablo 4.4). Aynı tabloda serrat kanat fenotipindeki bireylerde küçük tek tip, büyük tek tip, toplam *mwh* ve toplam klon sayılarının frekansları 1 mM EMS grubunda 1,96; 1,34; 2,90 ve 3,30 şeklinde olduğu görülmektedir. En fazla düşüşlerin gözlemlendiği 1 mM EMS+10 mg/mL SB uygulama grubunda bu frekanslar sırasıyla 0,84; 0,86; 0,70 ve 1,71 şeklinde iken 1 mM EMS+10 mg/mL SL uygulama grubunda bu frekanslar sırasıyla 0,80; 0,83; 0,63 ve 1,63 şeklinde hesaplanmıştır (Bkz. Tablo 4.4).

Çalışmamızda % inhibisyon, pozitif kontrol olarak kullanılan EMS'ye kıyasla antigenotoksik ajanların etkisini belirlemek için hesaplanmıştır. Tablo 4.4 incelendiğinde EMS uygulanan bireylerde gözlenen toplam klon frekansları ile EMS+SB ve EMS+SL uygulanan gruplardan elde edilen hem normal hem de serrat kanat fenotipli bireylerde gözlenen toplam klon frekansları kullanılarak hesaplanan % inhibisyon oranlarında anlamlı düşüşlerin olduğu belirlenmiştir (Bkz. Tablo 4.4). Örneğin en yüksek inhibisyon oranı normal kanatlı bireylerde %51,65 ile 1 mM EMS+10 mg/mL SB ve %54,18 ile 1 mM EMS+10 mg/mL SL uygulama grubunda kaydedilmiştir. Benzer şekilde serrat kanatlı bireylerde ise %48,18 ile 1 mM EMS+10 mg/mL SB ve %50,60 ile 1 mM EMS+10 mg/mL SL uygulama grubunda tespit edilmiştir (Bkz. Tablo 4.4).

Tüm bu bulgular, *Sideritis* cinsine ait SB ve SL bitkilerinin topraküstü metanol ekstraktlarının EMS tarafından indüklenen genotoksik etkiyi ortadan kaldıracı önemli etkilere sahip olduğunu göstermektedir. Bu etki, özellikle SB ve SL uygulama gruplarının 10 mg/mL konsantrasyonunda en belirgin şekilde gözlenmiştir.

Tablo 4. 4. EMS+SB ve EMS+SL uygulaması sonuçlarına ait SMART verileri

Uygulama Grupları (mg/mL)	N	Küçük tek tip klon (1-2 hücre) (m = 2)			Büyük tek tip klon (>2 hücre) (m = 5)			İkiz klon (m = 5)			Toplam mwh klon (m = 2)			Toplam klon (m = 2)			Klon indüksiyon frekansı (KİF) (10 ⁵ hücre)	% İnhibisyon	
		No	Fr.	D	No	Fr.	D	No	Fr.	D	No	Fr.	D	No	Fr.	D			
Normal Kanat (mvh/ff ²)	Distile su	80	26	(0,33)		3	(0,04)		2	(0,03)		30	(0,38)		31	(0,39)		1,54	
	EMS (1 mM)	80	176	(2,20)	+	111	(1,39)	+	29	(0,36)	+	271	(3,39)	+	316	(3,95)	+	13,88	
	EMS+SB (1,25)	80	146	(1,82)	-	100	(1,25)	-	22	(0,28)	-	115	(1,44)	-	268	(3,35)	-	5,89	15,19 ↓
	EMS+SL (1,25)	80	151	(1,88)	-	97	(1,21)	-	20	(0,25)	-	122	(1,53)	-	268	(3,35)	-	6,25	15,19 ↓
	EMS+SB (2,5)	80	139	(1,74)	-	90	(1,13)	-	19	(0,24)	-	93	(1,16)	-	248	(3,10)	-	4,76	21,52 ↓
	EMS+SL (2,5)	80	130	(1,63)	-	93	(1,16)	-	22	(0,28)	-	89	(1,11)	-	245	(3,06)	-	4,56	22,53 ↓
	EMS+SB (5)	80	121	(1,51)	-	88	(1,10)	-	17	(0,21)	-	77	(0,96)	-	226	(2,83)	-	3,94	28,36 ↓
	EMS+SL (5)	80	114	(1,43)	-	81	(1,01)	-	16	(0,20)	-	73	(0,91)	-	211	(2,64)	-	3,74	33,17 ↓
	EMS+SB (10)	80	71	(0,89)	-	71	(0,89)	-	11	(0,14)	-	68	(0,85)	-	153	(1,91)	-	3,48	51,65 ↓
EMS+SL (10)	80	69	(0,86)	-	67	(0,84)	-	9	(0,11)	-	65	(0,81)	-	145	(1,81)	-	3,33	54,18 ↓	
Serrat Kanat (mvh/TM3)	Distile su	80	17	(0,21)		2	(0,03)					21	(0,26)		19	(0,24)		1,08	
	EMS (1 mM)	80	157	(1,96)	+	107	(1,34)	+				232	(2,90)	+	264	(3,30)	+	11,88	
	EMS+SB (1,25)	80	142	(1,78)	-	101	(1,26)	-				101	(1,26)	-	243	(3,04)	-	5,17	7,88 ↓
	EMS+SL (1,25)	80	140	(1,75)	-	98	(1,23)	-				97	(0,21)	-	238	(2,98)	-	4,97	9,70 ↓
	EMS+SB (2,5)	80	130	(1,63)	-	94	(1,18)	-			*	89	(0,11)	-	224	(2,80)	-	4,56	15,15 ↓
	EMS+SL (2,5)	80	133	(1,66)	-	91	(1,14)	-			*	83	(1,04)	-	224	(2,80)	-	4,25	15,15 ↓
	EMS+SB (5)	80	125	(1,56)	-	83	(1,04)	-			*	71	(0,89)	-	208	(2,60)	-	3,64	21,21 ↓
	EMS+SL (5)	80	110	(1,38)	-	81	(1,01)	-			*	73	(0,91)	-	191	(2,39)	-	3,74	27,57 ↓
	EMS+SB (10)	80	67	(0,84)	-	70	(0,86)	-			*	56	(0,70)	-	137	(1,71)	-	2,87	48,18 ↓
EMS+SL (10)	80	64	(0,80)	-	66	(0,83)	-			*	50	(0,63)	-	130	(1,63)	-	2,56	50,60 ↓	

EMS: Etil metansülfonat; N: Kanat sayısı, No: Klon sayısı, Fr: Frekans, D: İstatistik sonuçların gösterimi (Frei and Würzler, 1988), “+”: pozitif, “-”: negatif, “i”: önemsiz fark, “m”: çarpım faktörü,

*: TM3 dengeleyici kromozomundan dolayı ikiz klon oluşmaz. Olasılık düzeyi: $\alpha=\beta=0,05$.

Bu sonuçlar, *Sideritis* bitkilerinin topraküstü metanol ekstralarının EMS'nin genotoksik etkilerini önemli ölçüde azalttığını ve genetik hasarın oluşumunu engellediğini göstermektedir. Yani, bu bitki ekstraları, genotoksik etkilerin ortadan kaldırılmasında veya azaltılmasında potansiyel bir etkiye sahiptir. Elde edilen istatistiksel veriler, bu bitki ekstralarının potansiyel olarak antigenotoksik etkinliklere sahip olduğunu ve genetik hasarın önlenmesine katkı sağlayabileceğini göstermektedir.



5. SONUÇ ve TARTIŞMA

Eski çağlardan beri bitkiler ve bitki türevi bileşenler, birçok hastalığın tedavisinde insanların hayatında önemli bir rol oynamıştır. Günümüzde ilaçlarla yapılan tedavi yöntemleri hızlı sonuçlar sağlasa da bu ilaçların sürekli kullanımı alerjik reaksiyonlar veya karaciğer hastalıklarını içeren ciddi sağlık sorunları gibi bazı olumsuz etkilere neden olabilir. Bu tür olumsuz etkilerin ortaya çıkmasını engellemek ve yan etkileri minimize etmek için tıbbi bitkilerin araştırılması ve kullanımı, insan sağlığı açısından büyük önem taşımaktadır.

Doğal bileşenleri sayesinde çeşitli hastalıkların tedavi sürecine yardımcı olan tıbbi bitkilerin yan etkileri daha azdır. Bu nedenle alternatif tıp ve bitkisel tedavi yöntemleri giderek daha fazla ilgi görmektedir. Tıbbi bitkilerin farmakolojik özellikleri ve terapötik etkileri araştırılarak modern tıbbın yanında tamamlayıcı bir rol oynaması hedeflenmektedir. Ayrıca, tıbbi bitkilerin güvenli kullanımı ve etkili dozlama yöntemleri üzerinde yapılan çalışmalar, hastalıkların daha iyi tedavi edilmesine ve insan sağlığının korunmasına katkı sağlamaktadır. Bu nedenle tıbbi bitkilerin potansiyeli ve etkileri hakkında daha fazla araştırma yapılması, gelecekte sağlık alanında daha etkili ve güvenli tedavi seçeneklerinin geliştirilmesine olanak tanıyacaktır (Mahmoud ve Gairola, 2013; Özçelik, 2019).

Antioksidan, anti-aging, anti-genotoksik, antimutagenik, bioinsektisidal ve nöroprotektif aktiviteler gibi farmakolojik özellikler bitkilerin içerdikleri bileşenlerle ilişkilendirilmektedir (Petrovska, 2012; Rakotoarivelo vd., 2015). Bitkilerin potansiyel özelliklerinin etkilerini değerlendirmek için model organizmalar kullanılmaktadır (Leeuw vd., 2007; Posgai vd., 2009). Meyve sineği olarak bilinen, toksisite ve genotoksisite çalışmalarında *in vivo* model organizma olarak uzun yıllardır kullanılan *D. melanogaster* bu organizmalardan biridir (Schneider, 2000; Marsh ve Thompson, 2006). İnsan hastalık genlerinin %75'i, hücre sinyal yolları ve gelişimsel süreçlerde etkili pek çok gen *Drosophila* ile büyük benzerlik göstermektedir. Bu nedenle, *D. melanogaster*, insanlarda görülen hastalıklarla ilişkilendirilen genlerin çalışılması ve ilgili süreçlerin anlaşılması için önemli bir model olarak tercih edilmektedir (Panchal vd., 2016). *D. melanogaster*'in model organizma olarak kullanıldığı alanlar arasında hücre ölümü

(McCall, 2009; Denton ve Kumar, 2015), fenotipik bozukluklar (Hirth, 2010; Iyer vd., 2016), immünohistokimya (Fulda vd., 2010; Shukla vd., 2014), biyokimya (Altun, 2013; Pant vd., 2013; Panchal vd., 2016), beslenme (Edgecomb vd., 1994; Altun, 2013), gelişimsel toksisite ve hayatta kalma (Rand vd., 2014) gibi pek çok farklı deneysel çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalar, *D. melanogaster*'in geniş kullanım alanlarını ve çeşitli biyolojik süreçlerin anlaşılmasında önemli bir model organizma olarak değerini göstermektedir.

Hücre ölümü çalışmaları, *D. melanogaster*'in apoptoz ve hücre döngüsü gibi süreçlerin anlaşılmasında kullanılmasına odaklanırken, fenotipik bozukluk üzerine yapılan çalışmalar genlerin işlevi ve morfolojik değişiklikler ile ilgilenir. Immünohistokimya çalışmalarında ise *D. melanogaster*, immün sistem ve hücre tiplerinin analizinde kullanılırken, biyokimya çalışmalarında enzimatik reaksiyonlar ve moleküler bileşenlerin incelenmesi için tercih edilir. Yine beslenme çalışmalarında *D. melanogaster*, besin alımı ve metabolizma üzerindeki etkilerin anlaşılmasında kullanılırken, gelişimsel toksisite çalışmalarında, kimyasal maddelerin embriyonik ve larval dönemlerdeki etkilerini araştırmak için kullanılır. Son olarak, ömür uzunluğu çalışmaları, çevresel stres faktörlerinin ve genetik manipülasyonların *D. melanogaster*'in hayatta kalma ve yaşam süresi üzerindeki etkilerini araştırmak için yararlı bir model organizma olarak kabul edilir. Tüm bu çalışmalar, *D. melanogaster*'in birçok farklı araştırma alanında değerli bir model organizma olarak kullanıldığını ve temel biyolojik süreçlerin anlaşılmasına ve insan sağlığı ile ilgili konularda bilgi sağlanmasına büyük katkı sağladığını göstermektedir.

Etil metansülfonatin (EMS) *D. melanogaster* transheterozigot larvalarında olası genotoksik etkilerinin *S. brevidens* ve *S. libanotica* subsp. *violascens* bitkilerinin topraküstü metanol ekstraktları ile giderilmesinin amaçlandığı bu tez çalışmasında, literatürde benzer birçok çalışmada güvenilir bir test tekniği olması sebebiyle yaygın kullanıma sahip olan SMART yöntemi kullanılmıştır. Antigenotoksik etkinliğini araştırdığımız bitkilerin endemik bitkiler olması ve bu yöntemle çalışılmamış olması sebebiyle literatürde ilk çalışma olma özelliği taşımaktadır.

Çalışmamızın ilk aşamasında kimyasal ajanlara karşı antigenotoksik etkinliğini araştırdığımız *S. brevidens* ve *S. libanotica* subsp. *violascens* bitkilerinin *Drosophila*

bireylerinin yaşama oranları üzerindeki etkileri incelenmiş ve çalışılan konstrasyonlarda toksik etkiye rastlanılmamıştır. Çalışmamızın ikinci aşamasında ise deney gruplarına tek başına EMS ve tek başına SB/SL uygulamaları ile EMS+SB/SL şeklinde birlikte uygulamalar yapılarak elde edilen sonuçlar karşılaştırılmıştır. *D. melanogaster*'in transheterozigot larvaları üzerinde EMS'nin genotoksik etkili ve SB/SL'nin antigenotoksik etkili oldukları tespit edilmiştir. EMS+SB/SL uygulamalarında ise EMS'nin genotoksik etkisinin önemli bir fark ile azaldığı gözlenmiştir.

Bu çalışmada olduğu gibi EMS ile gerçekleştirilmiş bir dizi genotoksisite çalışmasıyla birlikte bitki ekstraktlarının antigenotoksik etkinliğinin araştırıldığı ve EMS'nin genotoksik etkisini azalttığına dair birçok literatür bulunmaktadır. EMS'nin genotoksik etkisine karşı borun iyileştirici kapasitesinin SMART yöntemiyle araştırıldığı bir çalışmada EMS indüklemesi sonucu oluşan genotoksik etkilerin 0,1; 5, 10, 20 ve 40 mg/mL konsantrasyonlarda bor ile giderildiği ve bu sonuçların borun antioksidan özellikleri ile ilgili olduğu ifade edilmiştir (Sarıkaya vd., 2016).

Doksorubisin ve benzopiren maddeleri tarafından indüklenen Alıç bitkisinde, gözlenen genotoksik etkiyi bitki içeriğinde bulunan bir flavonoidin azalttığı ve antigenotoksik etki gösterdiği (Fernandes vd., 2017); Kuzey Amerika'da alternatif tıpta kullanılmakta olan *Peumus boldus* ve *Cryptocarya alba* bitkilerine ait metanol ekstraktlarının etil metansülfonata karşı antigenotoksik etki gösterdiği (Carmona vd., 2017) saptanmıştır. *Citrus aurentium* L. (*Rutaceae*) meyve kabuğu yağının (CPO) etkisi kanat benek testi ile araştırılmış genotoksik etkili etil metansülfonat (EMS), N-etil-N-nitrosoüre (ENU), kobalt klorür (CoCl_2) ve potasyum dikromat ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) kimyasal ajanlarına karşı CPO'nun antigenotoksik etki gösterdiği tespit edilmiştir (Demir vd., 2009).

Echium amoenum (*Boraginaceae*) bitkisine ait farklı dozlarda kloroform ekstraktı ile EMS'nin genotoksik etkisinin giderildiği kanat benek testi ile gösterilmiştir (Uysal vd., 2015). Özçelik (2019) tarafından yapılan bir çalışmada, *Iris taochia* *Woronow ex Grossh.* bitkisinin sürgün kısmından elde edilen metanol ekstraktlarının, iki farklı alkilleyici madde olan siklofosamid ve etil metansülfonatin neden olduğu genotoksik etkiye karşı olan etkisi araştırılmıştır. Çalışmada, beş farklı konsantrasyonda (0,625; 1,25; 2,5 ve 10 mg/mL) hazırlanan bitki ekstraktlarının genotoksik etki göstermediği, alkilleyici maddelerle birlikte uygulandığında ise özellikle 5 ve 10 mg/mL konsantrasyonlarda

somatik mutasyon ve rekombinasyon oranlarının pozitif kontrole göre önemli ölçüde azaldığı tespit edilmiştir.

Yapılan başka bir çalışmada, *Althaea officinalis* L. bitkisinin Mitomisin C (MMC) mutajenine karşı antigenotoksik etkisi SMART tekniğiyle belirlenmeye çalışılmıştır. *A. officinalis* bitkisinin kurutulmuş herbasının 5, 15 ve 45 mg/mL konsantrasyonlarda MMC'nin DNA'da oluşturduğu hasarı indüklediği ve MMC ile indüklenen toplam benek sayılarının sırasıyla % 3,66, % 2,03 ve % 1,83 oranında inhibe ettiği bulunmuştur (Karabulut, 2022).

Sevindik vd. (2021) bir çalışmada, *Sideritis* cinsine ait *S. rubriflora*, *S. libanotica* subsp. *violascens*, *S. erythrantha* var. *cedretum*, *S. congesta*, *S. brevidens* ve *S. vuralli* türlerinin öğütülmüş yüzey kısımlarının fenolik, flavonoid içeriği ve toplam antioksidan kapasitesini değerlendirmiştir. Bitkilerde bu içerik oranlarının yüksek olduğu ve bu türlerin ilaç ve gıda endüstrisinde olası bir doğal kaynak olarak kullanılabilceği vurgulanmıştır.

Berber ve Aksoy (2021) tarafından yapılan çalışmada, halk tarafından dağ çayı olarak tüketilen endemik *Sideritis trojana* bitkisinin metanol ekstralarının 0,1, 1, 10, 100 ve 500 µg/mL'lik konsantrasyonlarda insan periferik lenfositlerinde mitomisin (MMC) ile indüklenen klastojenik/anojenik etkiye karşı oluşturdukları antigenotoksik etki mikronükleus test yöntemiyle değerlendirilmiştir. Sağlıklı bireylerden alınan kan örneklerinin MMC ile maruziyeti sonucu %9,15 mikronükleus frekansı tespit edilmiştir. MMC ile birlikte uygulanan bitki ekstresi gruplarında konsantrasyon artışına bağlı olarak mikronükleus frekanslarında anlamlı azalmalar gözlenmiştir.

Bu çalışmalara ek olarak *S. brevidens* ve *S. libanotica* subsp. *violascens* bitkilerinin de ait olduğu Lamiaceae familyasına ait bitkilerin antijenotoksik etki gösterdiği birçok çalışmayla kanıtlanmıştır. Lamiaceae familyasına ait olan *Prunella grandiflora* bitkisinin SMART tekniğiyle antijenotoksik etkisi değerlendirilerek bitkinin antitümör ilaç olan etoposidinin genotoksitesine karşı koruyucu etkili olduğu saptanmıştır (Magombe vd., 2022). Alternatif tıpta kullanılan ve Lamiaceae familyasına ait üç bitki türü olan *Scutellaria salviifolia*, *Stachys annua* ve *Nepeta nuda*'nın antijenotoksik etkinliğinin SMART ile incelendiği başka bir çalışmada, etil metansülfonatın (EMS) genotoksik

etkisini karşı bitkilerin etkinliği araştırılmıştır. Üç bitki türünden elde edilen ekstraktlar arasında, *S. salviifolia* bitki ekstraktlarının EMS'nin genotoksik etkisini daha iyi bertaraf ettiği tespit edilmiştir (Ayar vd., 2018). Chia yağının (*Salvia hispanica* L.) kansorejen maddelerden doksorubisin ve benzopirene karşı antigenotoksik etkisi SMART tekniğiyle incelenmiş ve gözlenen genotoksik etkiyi Chia yağının %97 oranında azalttığı saptanmıştır (Guterres vd., 2022).

İki kekik türü olan *Origanum minutiflorum* O. Schwarz ve *Origanum onites* L. türlerinden elde edilen uçucu yağlar ile yapılan ve SMART tekniğinin kullanıldığı farklı bir çalışmada uçucu yağların kobalt klorür (CoCl_2) ve potasyum dikromata (KCr_2O_7) karşı antigenotoksik aktivite sergiledikleri saptanmıştır. Sonuç olarak ortaya çıkan bu iyileştirici etkinin tercih edilen uçucu yağların antioksidan özelliklerinden kaynaklandığını göstermektedir (Demir vd., 2013).

Tez çalışma bulgularımız literatürü destekler niteliktedir. Tez çalışmamızdan elde edilen verilerden hareketle *S. brevidens* ve *S. libanotica* subsp. *violascens* ekstraktlarının alkilleyici maddelerin neden olduğu genetik hasara karşı antigenotoksik etki göstererek genetik stabiliteyi korumada olumlu bir rol oynadığını ve yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğunu düşünmekteyiz.

Sonuç olarak, tez çalışmamızda somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (SMART) kullanılarak bir alkilleyici ajan olan EMS'nin meyve sineği olarak da bilinen *D. melanogaster* üzerinde genotoksik etkiye neden olduğu; *S. brevidens* ve *S. libanotica* subsp. *violascens* bitkilerinin antigenotoksik etkili olduğu ve artan konsantrasyonla birlikte EMS'nin genotoksik etkisine karşı koruyucu etki gösterdiği belirlenmiştir. Bu tür genetik hasarların giderilmesi için ilaç veya farklı kimyasal maddeler kullanmak yerine doğal, kolay elde edilebilir, ucuz ve en önemlisi herhangi bir yan etkisi olmayan bu bitkilerin kullanılabilir olması önemlidir. *Sideritis* cinsine ait çalışmamızda kullanılan türlerin ve bu cinse ait diğer türlerin potansiyel farmakolojik kullanımları ve doğal bir kaynak olarak genetik hasarı azaltıcı etkileri hakkında yeni araştırmaların yolu açılabilir. Bu tür bitki ekstreleri, genetik toksikoloji alanında ve çevresel sağlık risk değerlendirmelerinde potansiyel koruyucu ajanlar olarak daha fazla çalışmaya değer görülebilir.

KAYNAKLAR

- Abraham, S.K. (1994) “Antigenotoxicity of coffee in the *Drosophila* assay for somatic mutation and recombination”, *Mutagenesis*, 9(4), 383-386.
- Albertini, R. J., Anderson, D., Douglas, G. R., Hagmar, L., Hemminki, K., Merlo, F. and Aitio, A. (2000) “IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans”, *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 463(2), 111-172.
- Altun Çolak, D. (2013) “Dioksinlerin toksik etkilerinin *Drosophila* kanat benek testi ve biyokimyasal yöntemlerle belirlenmesi ve bu etkilerin farklı antioksidanlar ile giderilmesi üzerine araştırmalar”, Doktora Tezi, *Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Erzurum.
- Allocca, M., Zola, S. and Bellosta, P. (2018) “The fruit fly, *Drosophila melanogaster*: the making of a model (Part I)”, *Drosophila melanogaster: Model for Recent Advances in Genetics and Therapeutics*, 113.
- Arı, Ö. (2021) “Dağ çayının (*Sideritis stricta* Boiss. and Heldr) tohumla ve çeltikle çoğaltılması üzerine bir araştırma”, Yüksek Lisan Tezi, *Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Antalya.
- Ashburner, M. (1989) “*Drosophila* a laboratory handbook”, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Ateş, A. (2002), Moleküler Biyoloji, Selçuk Üniversitesi, 97–133.
- Ayar, A. (2013) “Bazı parabenlerin genotoksik etkilerinin *in vivo* ve *in vitro* şartlarda kısa süreli test teknikleri ile belirlenmesi”, Doktora tezi, *Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Erzurum.
- Ayar, A., Kilic, D. D., Baskan, C. and Yildirim, T. (2018) “Genotoxic and Antigenotoxic Effects of Some Plant Species of Lamiaceae Family1”, *European Journal of Science and Technology*, (14), 348-352.
- Bachli, G. (2006) Taxodros: The database on Taxonomy of Drosophilidae, 2007.
- Berber, A. A. and Aksoy, H. (2021) “Dağ Çayı’nın (*Sideritis trojana*) periferik insan lenfositlerinde *in vitro* antigenotoksik etkisi”, *Environmental Toxicology and Ecology*, 1(1), 8-13.
- Bier, E. (2005) “*Drosophila*, the golden bug, emerges as a tool for human genetics”, *Nature Reviews Genetics*, 6, 9-23.
- Bozcuk, A.N. (2000) “Genetik”, *Palme Yayıncılık*, Ankara, 269.

- Brookes, P. (1990) “The early history of the biological alkylating agents, 1918– 1968”, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 233(1-2), 3-14
- Can, D. F. (2020) “Karbonik anhidraz inhibitörlerinin *Drosophila melanogaster*'in bazı gelişimsel özellikleri üzerine etkileri”, Yüksek Lisans Tezi, *Kocaeli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Kocaeli.
- Carmona, E. R., Reyes-Díaz, M., Parodi, J. and Inostroza-Blancheteau, C. (2017)” Antimutagenic evaluation of traditional medicinal plants from South America *Peumus boldus* and *Cryptocarya alba* using *Drosophila melanogaster*” *Journal of Toxicology and Environmental Health*, Part A, 80(4), 208-217.
- Choy, W. N. (2001)” Regulatory genetic toxicology tests” In Genetic toxicology and cancer risk assessment (pp. 107-128). *CRC Press*.
- Damia G. and D'Incalci M. (1998) “Mechanisms of resistance to alkylating agents”, *Cytotechnology*, 27, 165-173.
- Dayanıklı, S. (2014) “Gıda katkı maddesi ferrolaktat (e585)'in *Drosophila melanogaster*'de yaptığı genotoksik etkilerin smart testi ve comet assay yöntemiyle belirlenmesi”, Yüksek Lisans Tezi, *Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Edirne.
- Demir, E., Kocaoğlu, S., Cetin, H. and Kaya, B. (2009) “Antigenotoxic effects of *Citrus aurantium* L. fruit peel oil on mutagenicity of two alkylating agents and two metals in the *Drosophila* wing spot test”, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 50(6), 483-488.
- Demir, E., Kaya, B., Marcos, R., Cenkci, S. K. and Çetin, H. (2013) “Investigation of the genotoxic and antigenotoxic properties of essential oils obtained from two *Origanum species* by *Drosophila* wing SMART assay”, *Turkish Journal of Biology*, 37(2), 129-138.
- Denton, D. and Kumar, S. (2015) “Studying apoptosis in *Drosophila*”, Cold Spring Harbor Protocols, 2015(7), pdb-top070433.
- Dizman, Ö. (2016) “*Citrus aurantium*'un *Drosophila melanogaster* üzerine gerontolojik ve genotoksik etkisi”, Yüksek Lisans Tezi, *Kırıkkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Kırıkkale.
- Edgecomb, R.S., Harth, C.E. and Schneiderman, A.M. (1994) “Regulation of feeding behavior in adult *Drosophila melanogaster* varies with feeding regime and nutritional state”, *Journal of Experimental Biology*, 197(1), 215-235.
- Ersöz, Ç. (2019) “*Drosophila melanogaster*'de sisplatin ve valproik asit'in indüklediği genotoksisteye karşı kudret narı'nın (*Momordica charantia* L.) etkisi”, Yüksek Lisans Tezi, *Erzincan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Erzincan.
- Falakalı, B. (1990) “*Drosophila* genetiği”, *Ege Üniversitesi Basımevi*, ss, 44.

- Fernandes, L. M., da Rosa Guterres, Z., Almeida, I. V. and Vicentini, V. E. P. (2017) “Genotoxicity and antigenotoxicity assessments of the flavonoid vitexin by the *Drosophila melanogaster* somatic mutation and recombination test”, *Journal of Medicinal Food*, 20(6), 601-609.
- Frei, H. and Würgler, F. E. (1988) “Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative, or inconclusive result”, *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 203(4), 297-308.
- Frölich, A. and Würgler, F. E. (1990) “*Drosophila* wing-spot test: improved detectability of genotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons”, *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 234(2), 71-80.
- Fulda, S., Gorman, A.M., Hori, O. and Samali, A. (2010) “Cellular stress responses: cell survival and cell death”, *International Journal of Cell Biology*, 2010.
- González-Burgos, E., Carretero, M. E. and Gómez-Serranillos, M. P. (2011) “*Sideritis spp.*: Uses, chemical composition and pharmacological activities review”, *Journal of Ethnopharmacology*, 135(2), 209-225.
- Graf, U., Würgler, F. E., Katz, A. J., Frei, H., Juon, H., Hall, C. B. and Kale, P. G. (1984) “Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*”, *Environmental Mutagenesis*, 6(2), 153-188.
- Graf, U., Van, S.N. and Würgler, F.E. (1992) “*Drosophila* Genetics”, A Practical course, *Springer-Verlag Press*, New York, 236.
- Graf, U., Abraham, S. K., Guzmán-Rincón, J. and Würgler, F. E. (1998) “Antigenotoxicity studies in *Drosophila melanogaster*”, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 402(1-2), 203-209.
- Guterres, Z. R., de Senes Lopes, T. F., de Queiróz, D. F., da Silva, L. M. G. E. and Migliolo, L. (2022) “Study of the modulator effect of oil chia (*Salvia hispanica* L.) associated with benzo (a) pyrene and doxorubicin hydrochloride”, *Research, Society and Development*, 11(4), e23611427254-e23611427254.
- Guzmán-Rincón, J and Graf, U. (1995) “*Drosophila melanogaster* somatic mutation and recombination test as a biomonitor”, *Environmental Science Research*, 50, 169-182.
- Hales, K.G., Korey, C.A., Larracuenta, A.M. and Roberts, D.M. (2015) “Genetics on the fly: a primer on the *Drosophila* model system”, *Genetics*, 201(3), 815-842.
- Henderson, D. S. (2004) “Whole-mount fluorescence *in situ* hybridization to chromosomes of embryos”. *Drosophila Cytogenetics Protocols*, 235-247.

- Hirth, F. (2010) “*Drosophila melanogaster* in the study of human neurodegeneration”, ***CNS and Neurological Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-CNS and Neurological Disorders)***, 9(4), 504-523.
- Houldsworth, J. and Chaganti, R. S. (1994) “Comparative genomic hybridization: an overview.”, ***The American Journal of Pathology***, 145(6), 1253.
- Iyer, J., Wang, Q., Le, T., Pizzo, L., Grönke, S., Ambegaokar, S.S. and Artero, R. (2016) “Quantitative assessment of eye phenotypes for functional genetic studies using *Drosophila melanogaster*”, ***G3: Genes, Genomes, Genetics***, 6(5), 1427-1437.
- Karabulut, A. K. (2022) “*Althaea officinalis* L. bitkisinin antijenotoksik aktivitesinin *Drosophila melanogaster*’de araştırılması”, İnönü Üniversitesi, ***Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu Dergisi***, 10(3), 977-983.
- Kaya, B., Yanikoğlu, A., Creus, A. and Marcos, R. (2000) “Genotoxicity testing of five herbicides in the *Drosophila* wing spot test”, ***Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis***, 465(1-2), 77-84.
- Keser, D. (2010) “Aspirin ve asetaldehitin *Drosophila melanogaster*’in bazı gelişimsel özellikleri üzerine etkileri”, Yüksek Lisans Tezi, ***Kocaeli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü***, Kocaeli.
- Kirsch-Volders, M., Elhajouji, A., Cundari, E. and Van Hummelen, P. (1997) “The *in vitro* micronucleus test: a multi-endpoint assay to detect simultaneously mitotic delay, apoptosis, chromosome breakage, chromosome loss and non-disjunction”, ***Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis***, 392(1-2), 19-30.
- Klug, W. S., Cummings, M. R., Spencer, C. A. and Öner, C. (2009) “Genetik kavramlar”, ***Palme Yayıncılık***.
- Kotan R., Cakir A., Dadasoglu F., Aydin T., Cakmakci R., Ozer H., Kordali S., Mete E. and Dikbas N. (2010) “Antibacterial activities of essential oils and extracts of Turkish Achillea, Satureja and Thymusspecies against plant pathogenic bacteria”, ***Journal of the Science of Food and Agriculture***, 90, 145-60.
- Levsky, J. M. and Singer, R. H. (2003) “Fluorescence in situ hybridization: past, present and future”, ***Journal of Cell Science***, 116(14), 2833-2838.
- Leeuw, T.K., Reith, R.M., Simonett, R.A., Harden, M., Cherukuri, P., Tsybouski, D. A., Beckingham, K.M. and Weisman, R.B. (2007) “Single-walled carbon nanotubes in the intact organism, Near-IR imaging and biocompatibility studies in *Drosophila*”, ***Nano Letter***, 7(9), 2650–2654.
- Lloyd, T.E. and Taylor, J.P. (2010) “Flightless flies: *Drosophila* models of neuromuscular disease”, ***Annals of the New York Academy of Sciences***, 1184, e1-20.

- Marsh J.L. and Thompson, L.M. (2006) “*Drosophila* in the study of neurodegenerative disease”, *Neuron*, 52, 169-178.
- Magombe, N., Kostenko, V. V., Antosyuk, O. N. and Bolotnik, E. V. (2022) “Testing the antigenotoxicity and anticytotoxicity properties of *Prunella grandiflora* L. extract using the example of *Drosophila melanogaster*”, *Chimica Techno Acta*, 9(2S), 202292-14.
- Mahmoud, T., and Gairola, S. (2013) “Traditional knowledge and use of medicinal plants in the Eastern Desert of Egypt: a case study from Wadi El-Gemal National Park”, *Journal of Medicinal Plants*, 1(6).
- McCann, J., Choi, E., Yamasaki, E. and Ames, B. N. (1975) “Detection of carcinogens as mutagens in the *Salmonella/microsome* test: assay of 300 chemicals”, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 72(12), 5135-5139.
- McKelvey- Martin, V. J., Green, M. H. L., Schmezer, P., Pool-Zobel, B. L., De Meo, M. P. and Collins, A. (1993) “The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): a European review”, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 288(1), 47-63.
- McCall, K., Peterson, J. S. and Pritchett, T. L. (2009) “Detection of cell death in *Drosophila*.”, *Apoptosis: Methods and Protocols*, Second Edition, 343-356.
- McGurk, L., Berson, A. and Bonini, N. M. (2015) “*Drosophila* as an *in vivo* model for human neurodegenerative diseases”, *Genetics*, 201(2), 377-402.
- Mortelmans, K. and Zeiger, E. (2000) “The Ames *Salmonella/microsome* mutagenicity assay”, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 455(1-2), 29-60.
- Nienhaus, U. (2013) “On growth and form and patterning of *Drosophila* wing imaginal discs”, Doctoral Dissertation, *University of Zurich*.
- Ostling, G. and Johanson, K. J. (1984) “Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells”, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 123(1), 291-298.
- Özçelik, Ö. (2019) “Bazı alkilleyici ajanların oluşturduğu genotoksik etkilere karşı endemik *Iris taochia* bitki ekstraktlarının antigenotoksik etkinliğinin araştırılması”, Yüksek Lisans Tezi, *Amasya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Amasya.
- Pant, D.C., Dave, M. and Tiwari, A.K. (2013) “Wheatgrass (*Triticum aestivum* L.) supplementation promotes longevity in *Drosophila melanogaster*”, *Annals of Plant Sciences*, 2(01), 49-54.
- Panchal, K., Patel, K. and Tiwari, A.K. (2016) “Dietary supplementation of citric acid (monohydrate) improves health span in *Drosophila melanogaster*”, *Journal of Applied Biology and Biotechnology*, Vol, 4(02), 060-066.

- Petrovska, B. B. (2012) “Historical review of medicinal plants’ usage”, *Pharmacognosy Reviews*, 6(11).
- Potter, C. J., Turenchalk, G. S. and Xu, T. (2000) “*Drosophila* in cancer research: an expanding role”, *Trends in Genetics*, 16(1), 33-39.
- Posgai, R., Ahamed, M., Hussain, S.M., Rowe, J.J. and Nielsen, M.G. (2009) “Inhalation method for delivery of nanoparticles to the *Drosophila* respiratory system for toxicity testing”, *Science of the Total Environment*, 408(2), 439– 443.
- Pyrowolakis, G., Veikkolainen, V., Yakoby, N. and Shvartsman, S. Y. (2017) “Gene regulation during *Drosophila* eggshell patterning”, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(23), 5808-5813.
- Ralhan, R. and Kaur, J. (2007) “Alkylating agents and cancer therapy”, *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 17(9), 1061-1075.
- Rand, M.D., Montgomery, S.L., Prince, L. and Vorojeikina, D. (2014) “Developmental toxicity assays using the *Drosophila* model”, *Current Protocols in Toxicology*, 59(1), 12.
- Rakotoarivelo, N. H., Rakotoarivony, F., Ramarosandratana, A. V., Jeannoda, V. H., Kuhlman, A. R., Randrianasolo, A. and Bussmann, R. W. (2015) “Medicinal plants used to treat the most frequent diseases encountered in Ambalabe rural community, Eastern Madagascar”, *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 11(1), 68.
- Ronai, Z. A., Gradia, S., Peterson, L. A. and Hecht, S. S. (1993) “G to A transitions and G to T transversions in codon 12 of the Ki-ras oncogene isolated from mouse lung tumors induced by 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) and related DNA methylating and pyridyloxobutylating agents”, *Carcinogenesis*, 14(11), 2419-2422.
- Rubin, G.M. and Lewis, E.B. (2000) “A brief history of *Drosophila*'s contributions to genome research”, *Science*, 287(5461), 2216-2218.
- Saffhill, R., Margison, G. P. and O'Connor, P. J. (1985) “Mechanisms of carcinogenesis induced by alkylating agents”, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 823(2), 111-145.
- Santos-Mello, R., Deimling, L. I., Lauer Júnior, C. and Carvalho, T. R. D. (2005) “Chemoprotective effect of cysteamine against the induction of micronuclei by methyl methanesulfonate and cyclophosphamide”, *Genetics and Molecular Biology*, 28(1), 156-160.
- Sarıkaya, R., Erciyas, K., Kara, M. I., Sezer, U., Erciyas, A. F. and Ay, S. (2016) “Evaluation of genotoxic and antigenotoxic effects of boron by the somatic mutation and recombination test (SMART) on *Drosophila*”, *Drug and Chemical Toxicology*, 39(4), 400-406.

- Sevindik, E., Gübeş, İ., Murathan, Z. T. and Tümen, G. (2021) “Determination of total phenolic content, total flavonoid content and total antioxidant capacity in some endemic *Sideritis* L. (*Lamiaceae*) species grown in Turkey”, *European Journal of Biological Research*, 11(2), 260-266.
- Schneider, D. (2000) “Using *Drosophila* as a model insect”, *Nature Reviews Genetics*, 1, 218-226.
- Shukla, A.K., Pragma, P., Chaouhan, H.S., Tiwari, A.K., Patel, D.K., Abdin, M.Z. and Chowdhuri, D.K. (2014) “Heat shock protein-70 (Hsp-70) suppresses paraquat-induced neurodegeneration by inhibiting JNK and caspase-3 activation in *Drosophila* model of Parkinson's disease”, *PLoS One*, 9(6), e98886.
- Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R. and Schneider, E. L. (1988) “A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells”, *Experimental Cell Research*, 175(1), 184-191.
- Şekeroğlu, V. ve Atlı-Şekeroğlu, Z. (2011) “Genotoksik hasarın belirlenmesinde mikronükleus testi”, *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 68(4), 241-252.
- Tamtürk, E. ve Atlı, E. (2019) “Resveratrolün *Drosophila melanogaster*'in gelişimi üzerine etkilerinin incelenmesi”, Yüksek Lisans Tezi, *Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Nevşehir.
- Topal, A. and Uzun, S. P. (2020) “Endemik Üç *Sideritis* L. taksonunun tohum ve dış morfolojik özellikleri”, *Turkish Journal of Forest Science*, 4(1), 1-10.
- Tucker, J. D. and Preston, R. J. (1996) “Chromosome aberrations, micronuclei, aneuploidy, sister chromatid exchanges, and cancer risk assessment”, *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, 365(1-3), 147-159.
- Uysal H., Kızılet H., Ayar A., Taheri A. (2015). “The use of endemic Iranian plant *Echium amoenum* against the ethyl methanesulfonate and the recovery of mutagenic effects”, *Toxicology and Industrial Health*, 44-51.
- Vanparys, P., Vermeiren, F., Sysmans, M. and Temmerman, R. (1990) “The micronucleus assay as a test for the detection of aneugenic activity”, *Mutation Research Letters*, 244(2), 95-103.
- Yan, W., Deng, X. W., Yang, C. and Tang, X. (2021) “The genome-wide EMS mutagenesis bias correlates with sequence context and chromatin structure in rice”, *Frontiers in Plant Science*, 12, 579675.
- Yılmaz, E. (2013) “Toroslar'da yetişen 7 endemik *sideritis* türünün fenolik maddeleri”, Doktora Tezi, *Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara.
- Yüzbaşıoğlu, D., Çelik, M., Yılmaz, S., Ünal, F. and Aksoy, H. (2006) “Clastogenicity of the fungicide afugan in cultured human lymphocytes”, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 604(1-2), 53-59.

- Yüzbaşıoğlu, D., Yılmaz, E. A. and Fatma, Ü. (2016) “Antidepresan ilaçlar ve genotoksisite”, *TÜBAV Bilim Dergisi*, 9(1), 17-28.
- Zeiger, E. (2004) “History and rationale of genetic toxicity testing: an impersonal, and sometimes personal, view”, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 44(5), 363-371.
- Wiedemann, G. J., Robins, H. I., Gutsche, S., Mentzel, M., Deeken, M., Katschinski, D. M. and Wagner, T. (1996) “Ifosfamide, carboplatin and etoposide (ICE) combined with 41.8 C whole body hyperthermia in patients with refractory sarcoma”, *European Journal of Cancer*, 32(5), 888-892.
- Wurgler, F. E. (1986). *In vivo* mutagenicity testing using somatic cells of *Drosophila melanogaster*”, *Chemical Mutagens*, 10, 1-72.





EKLER

Ek-1. Tez Çalışması Süresince Yapılan Akademik Çalışmalar

Çelik, N., Altun Çolak, D. (2022). “Türkiye’de yetişen endemik bazı *Sideritis* türlerinin *Drosophila melanogaster*’in transheterozigot larvaları üzerine koruyucu etkileri.” *5th International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences (EurasianBioChem 2022)*, Ankara, Türkiye, pp.1157-1161.

Dağlıoğlu, Y., Altun Çolak, D., Çolak S., **Çelik N.** (2022). “*Isatis tinctoria* (Çivit otu) aracılı gümüş nanopartiküllerin antibakteriyel aktivitesi.” *5th International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences (EurasianBioChem 2022)*, Ankara, Türkiye, pp.1153-1156.

