

# DOĞA BİLİMLERİ VE MATEMATİKTE İLERİ VE ÇAĞDAŞ ÇALIŞMALAR



**Editörler**  
**Prof. Dr. M. Çiğdem SAYIL**  
**Dr. Rahile ÖZTÜRK**



**DOĞA BİLİMLERİ VE  
MATEMATİKTE İLERİ VE  
ÇAĞDAŞ ÇALIŞMALAR**

**Editörler**

**Prof. Dr. M. Çiğdem SAYIL**

**Dr. Rahile ÖZTÜRK**



**DOĞA BİLİMLERİ VE MATEMATİKTE İLERİ VE ÇAĞDAŞ ÇALIŞMALAR**  
**Editörler: Prof. Dr. M. Çiğdem SAYIL, Dr. Rahile ÖZTÜRK**

**Genel Yayın Yönetmeni:** Berkan Balpetek  
**Kapak ve Sayfa Tasarımı:** Duvar Design  
**Baskı:** Aralık 2023  
**Yayıncı Sertifika No:** 49837  
**ISBN:** 978-625-6585-90-4

© Duvar Yayınları  
853 Sokak No:13 P.10 Kemeraltı-Konak/İzmir  
Tel: 0 232 484 88 68

[www.duvar yayinlari.com](http://www.duvar yayinlari.com)  
[duvarkitabevi@gmail.com](mailto:duvarkitabevi@gmail.com)

## İÇİNDEKİLER

### **Bölüm 1.....5**

İdeal Akışkan Bulunan Konformal Olarak  
Düz Uzay-Zamanın  $f(R, L_m)$  Teoride İncelenmesi  
*Doğukan TAŞER, Ali KABAK*

### **Bölüm 2.....12**

Benzersiz Yapısı ve Olağanüstü Özellikleriyle Tetrazol  
*Gülay DİLEK*

### **Bölüm 3.....21**

Kanser Tedavisinde Isıyla İndüklenebilir Sistemler ve  
Gen Terapisinde Kullanımı  
*Melek ACAR, Yağmur ÜNVER*

### **Bölüm 4 .....39**

İklim Değişikliğinin İzlenmesinde Briyofitlerin  
Su Tutma Özelliklerinin Değerlendirilmesi  
*Özcan ŞİMŞEK, Kahraman SELVİ*

### **Bölüm 5 .....49**

Düzlemsel Yönelimli Sıvı Kristaller  
*Rıdvan KARAPINAR*

### **Bölüm 6 .....61**

Kurkumin Yüklü Siklomatriks Polifosfazen Mikrokürelerin Sentezi,  
Karakterizasyonu ve Floresans Özellikleri  
*Simge METİNOĞLU ÖRÜM*

**Bölüm 7 .....78**

Bulutlanma Noktası Ekstraksiyonu Sonrasında Allura Red Gıda Boyasının  
Spektrofotometrik Tayini  
*Cansu ALKAN, Can BİLGİLİ, Tufan GÜRAY*

**Bölüm 8 .....92**

Çevresel Örneklerden Pigment Üreten Bakterilerin İzolasyonu,  
Karakterizasyonu ve Pigmentlerin Potansiyel Uygulama Alanlarının  
Araştırılması  
*Özlem KÜTÜK, Mutlu Nisa ÜNALDI CORAL*

**Bölüm 9.....111**

Adi Diferansiyel Denklemlerin Sayısal Çözümleri  
Lagrange İnterpolasyonu  
*Ahmet BOZ*

**Bölüm 10 .....118**

Bakteriyel Kalsifikasyon ve Üreolitik Bakterilerin Rolü:  
Yapı Malzemelerinde Biyomineralizasyon Potansiyeli  
*Türkan DAL BİÇER, Seval CİNG YILDIRIM*

**Bölüm 11 .....134**

Pseudovirüs Üretimine Yönelik Olarak Lentiviral Vektörlerin  
Tasarlanması ve Geliştirilmesi  
*Zehra KÖSEOĞLU, Seval CİNG YILDIRIM*

## Bölüm 1

# İdeal Akışkan Bulunan Konformal Olarak Düz Uzay-Zamanın $f(R, L_m)$ Teoride İncelenmesi

Doğukan TAŞER<sup>1</sup>

Ali KABAK<sup>2</sup>

### GİRİŞ

Günümüzde modern kozmolojinin cevaplamaya çalıştığı iki önemli konu vardır. Bunlardan birincisi evrenin günümüze kadar geçirdiği evrelerin açıklanmasıdır. İkincisi ise evrenin geçmişinin ne olduğu, bugünü ve geleceğinde yapısının ne olabileceğidir. Özellikle son dönemdeki teknolojik gelişmelerle beraber yapılan hassas gözlemler, daha ayrıntılı soruların ve cevapların bulunmasına yol açmaktadır. Özellikle Einstein'ın Genel Relativite Teorisinin başarısı ve üzerinden bir yüzyıl geçmesinin ardından kozmoloji geniş ölçekteki olgulardan, yüksek enerji fiziğinin ilgilendiği noktalara kadar pek çok farklı alana değinmiş olması kozmolojinin en önemli avantajlarından bir tanesidir (Mukhanov, 2005).

Günümüzde son yapılan astrofiziksel ölçümler (Schwarz vd., 2016) Einstein'ın Genel Relativite Teorisinin büyük ölçekte düzeltilmesi gerektiğini ortaya koymuştur. Bu gözlemlerden en önemlisi Hubble teleskobunun ortaya çıkardığı evrenin ivmeli bir şekilde genişlemesidir (Albrecht and Steinhardt, 1982; Starobinsky, 1980). Bu problem için, birçok farklı karanlık enerji modelleri çözülmeye çalışılmaktadır. Bu yaklaşımlardan bir tanesi de alan denklemlerinde karanlık enerji formu tanımlamaktır. Karanlık enerji ve kozmolojik modeller evrenin farklı dönem davranışını anlamak için önemlidir (Bennett vd., 2003). Bu noktada,  $f(R)$ ,  $f(G)$ ,  $f(T)$ ,  $f(R, T)$ ,  $f(R, G)$ ,  $f(Q, T)$ ,  $f(R, L_m)$  gibi modifiye teoriler ortaya atılarak evrenin hem son dönem genişlemesi hem de ilk dönem davranışları incelenmektedir. Fakat bu modellere rağmen, hala karanlık enerji için tatmin edici bir açıklama henüz bulunmamaktadır. Ama yine de bu modeller son zamandaki hızlanmanın ve karanlık enerjinin belirlenebilmesi için oldukça ilgi çekicidir. Bu teoriler temel olarak Genel Relativite Teorisinin öne sürdüğü teorik yapının dışına

---

<sup>1</sup> Doç. Dr.; Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Elektrik ve Enerji Bölümü.  
dogukantaser@comu.edu.tr ORCID No: 0000-0002-8622-6830

<sup>2</sup> Y.L.; Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fizik Bölümü. alikabak6139@gmail.com ORCID No: 0009-0007-7033-1015

çıkıldığında gravitasyonun nasıl işlediğini doğru bir şekilde açıklayabilmek ve öngörülerde bulunabilmek amacıyla ortaya atılmışlardır. Bu teorilerde Einstein-Hilbert etki denkleminde bazı düzenlemeler yapılarak serbestlik dereceleri elde edilir ve kozmolojik sabit gibi artı bir terime ve karanlık enerjiye ihtiyaç duymadan son zaman ivmelenmesi açıklanabilmektedir (Başkaya and Kılınç, 2020; Maurya, 2023).

Konformal olarak düz uzay-zaman, bir uzay-zamanın metrik tensörünün belirli bir dönüşüm altında yani bir konformal dönüşüm ile, düz uzay-zamanın metrik tensörüyle ilişkilendirilebildiği durumu ifade eder. Eğer bir uzay-zaman konformal olarak düzleştirilebiliyorsa, orijinal uzay-zamanın geometrisi belirli bir konformal dönüşüm ile düz uzay-zamanın geometrisi ile aynı hale getirilebileceği anlamına gelir. Bu tür bir düzleştirmenin kullanımı, bazı hesaplamalarda matematiksel kolaylıklar sağlamaktır. Bu çalışmada konformal olarak küresel simetrik düz uzay-zaman ideal akışkan varlığında dikkate alınmıştır.

Bu çalışmada 2. bölümde  $f(R, L_m)$  gravitasyon teori kapsamında ideal akışkan bulunan konformal olarak düz uzay-zaman için alan denklemleri oluşturuldu. Alan denklemlerinin tam çözümleri elde edildi. Elde edilen çözümlerin yapısı kinematik nicelikler aracılığıyla incelendi. Son bölümde ise elde edilen çözümler hem fiziksel hem de geometrik açıdan detaylı olarak tartışıldı.

## METOT ve BULGULAR

$f(R, L_m)$  teori için Einstein-Hilbert etkisi aşağıdaki gibi tanımlanır. (Harko and Lobo, 2010).

$$S = \int f(R, L_m) \sqrt{-g} d^4x \quad (1)$$

Burada  $f(R, L_m)$  Ricci skaleri ve madde Lagrangianına bağlı keyfi bir fonksiyondur. (1) denkleminin varyasyonu alınarak,  $f(R, L_m)$  teori için alan denklemleri

$$f_R R_{ik} + (g_{ik} \square - \nabla_i \nabla_k) f_R - \frac{1}{2} (f - f_{L_m} L_m) g_{ik} = \frac{1}{2} f_{L_m} T_{ik} \quad (2)$$

şeklinde elde edilir. Burada  $f_R$  Ricci skalerine göre türevi ve  $f_{L_m}$  ise madde Lagrangiana göre türevi ifade etmektedir.

Konformal olarak küresel simetrik düz uzay-zaman için yay elemanı ise

$$ds^2 = e^{2A(r)}(dt^2 - dr^2 - r^2 d\theta^2 - r^2 \sin^2 \theta d\phi^2) \quad (3)$$

olarak tanımlanır (Ababe vd., 2013). Burada  $e^{A(r)}$  radyal koordinata bağlı metrik potansiyeldir. Konformal olarak düz uzay-zaman için eğrilik özelliklerini ifade eden Ricci skaleri

$$R = -\frac{6}{A^3} \left( A'' + \frac{2A'}{r} \right) \quad (4)$$

olarak elde edilir. Burada kesme işareti ( $'$ )  $r$  radyal koordinata göre kısmi türevi ifade etmektedir. Ayrıca ideal akışkan için enerji-momentum tensörü

$$T_{ik} = (p + \rho)u_i u_k - p g_{ik} \quad (5)$$

şeklinde tanımlanır. Burada  $p$  akışkanın basıncını ve  $\rho$  akışkanın enerji yoğunluğunu ifade etmektedir. Teori kapsamında bir çok farklı  $f(R, L_m)$  modeli çalışılmakta olup bu çalışmada lineer olmayan

$$f(R, L_m) = R/2 + L_m^\chi \quad (6)$$

modeli dikkate alındı (Kavya vd., 2023). Burada  $\chi = 1$  durumunda  $f(R, L_m)$  teori Genel Relativite teorisine indirgenmektedir. Aynı zamanda, oluşturulan model için alan denklemleri  $L_m = \rho$  durumu için incelendi (Bertolami, 2007). (1)-(6) denklemleri bir arada kullanılarak ideal akışkan bulunan konformal olarak düz uzay-zaman için  $f(R, L_m)$  teori için alan denklemleri

$$\frac{A'}{e^{2A}} \left( 3A' + \frac{4}{r} \right) = \rho^\chi \left( \chi - 1 + \frac{\chi p}{\rho} \right) \quad (7)$$

$$e^{-2A} \left( 2A'' + A'^2 + \frac{2A'}{r} \right) = \rho^\chi \left( \chi - 1 + \frac{\chi p}{\rho} \right) \quad (8)$$

$$e^{-2A} \left( -2A'' - A'^2 - \frac{4A'}{r} \right) = \rho^\chi \quad (9)$$



şeklinde elde edilir. Burada elde edilen denklem sistemi için bilinmeyen nicelikler sırasıyla  $A$ ,  $p$  ve  $\rho$  bilinmeyen niceliklerdir. Denklem sistemini oluşturun denklem sayısı ve bilinmeyen sayısı eşit olduğu için herhangi bir yaklaşım dikkate alınmadan, alan denklemlerinin tam çözümlerinden bilinmeyen nicelikler sırasıyla

$$e^{A(r)} = -\frac{2}{k_1 r^2 + k_2} \quad (10)$$

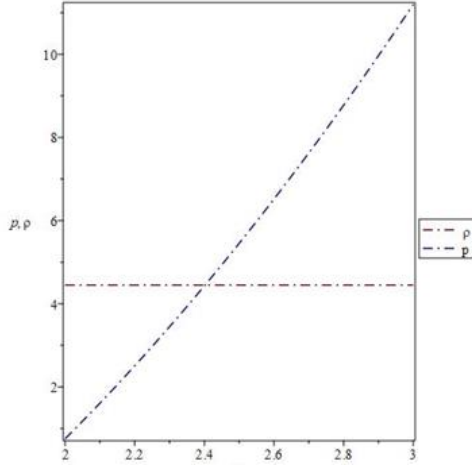
$$p(r) = \frac{(6k_1)^\chi k_2^{1-\chi} (k_1 r^2 - 6k_2 \chi + 2k_2)}{6\chi} \quad (11)$$

$$\rho = (6k_1 k_2)^{\frac{1}{\chi}} \quad (12)$$

olarak elde edilir. Burada açıkça görülmektedir ki oluşturulan model için ideal akışkanın basıncı radyal koordinata bağlı bir fonksiyon iken enerji yoğunluğu sabit olarak elde edilir. Ayrıca oluşturulan modelin anlamlı bir model olabilmesi için enerji yoğunluğunun pozitif olması gerekir. Bu durumda çözümlerden elde edilen keyfi sabitler  $k_1 k_2 > 0$  koşulunu sağlamalıdır. (10) denklemini ile verilen metrik potansiyel,  $e^{2A(r)}$ ,  $r \rightarrow 0$  durumda,  $k_2$  sabitine bağlı olarak pozitif veya negatif sabit değer alırken,  $r \rightarrow \infty$  olduğunda sıfır olmaktadır. (4) ve (10) denklemini dikkate alınarak ideal akışkanlı konformal olmayan düz uzay-zaman için Ricci skalari

$$R = 3k_1 (k_1 r^2 - 6k_2) \quad (13)$$

şeklinde elde edilir. Oluşturulan model için  $R(r_{cri}) = 0$  durumunda, kritik bir radyal değer belirlemek mümkündür. Bu durumda  $r_{cri} > \sqrt{\frac{3k_2}{k_1}}$  koşulu dikkate alınır. Oluşturulan model için basınç ve enerji yoğunluğunun değişimleri Şekil 1.'de verilmiştir.



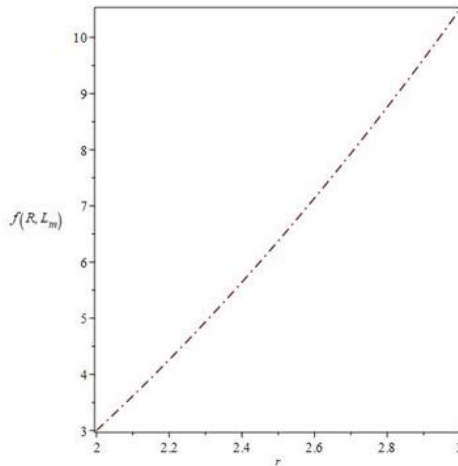
**Şekil 1:** Basınç ve Yoğunluğun radyal koordinata göre değişimi

$$(k_1 = 1, k_2 = 1 \text{ ve } \chi = 0.8).$$

(6), (12) ve (13) kullanılarak oluşturulan model için  $f(R, L_m)$  fonksiyonu

$$f(R, L_m) = \frac{3}{2} k_1^2 r^2 - 3k_1 k_2 \quad (14)$$

şeklinde elde edilir. Şekil 2'de, oluşturulan model için elde edilen  $f(R, L_m)$  fonksiyonunun radyal koordinata göre değişimi verilmiştir. Şekil 2'de görülmektedir ki  $f(R, L_m)$  fonksiyonu radyal koordinata bağlı olarak artan bir fonksiyondur.



**Şekil 2:**  $f(R, L_m)$  fonksiyonunun radyal koordinata göre değişimi

$$(k_1 = 1, k_2 = 1 \text{ ve } \chi = 0.8).$$

(3) denklemi ile verilen ideal akışkan bulunan konformal olarak düz uzay-zaman için yay elemanı elde edilen çözümler dikkate alınarak

$$ds^2 = \left( -\frac{2}{k_1 r^2 + k_2} \right)^2 (dt^2 - dr^2 - r^2 d\theta^2 - r^2 \sin^2 \theta d\phi^2) \quad (15)$$

şeklinde yeniden yazılabilir. Ayrıca elde edilen modelin kinematik nicelikleri incelendiğinde, genişleme skaleri, rotasyon tensörü ve shear tensörü sıfır olarak elde edilir. Burada oluşturulan modelin statik bir yapıya sahip olduğu kinematik nicelikler aracılığıyla da desteklenmektedir.

### SONUÇ

Bu çalışmada, ideal akışkan bulunan konformal olarak düz uzay-zaman ideal akışkan varlığında  $f(R, L_m)$  teori kapsamında incelendi. İlk olarak, ideal akışkanlı konformal olarak düz uzay-zaman için alan denklemleri  $f(R, L_m) = \frac{R}{2} + L_m^\chi$  modeli dikkate alınarak oluşturuldu. Burada madde Lagrangianı  $L_m = \rho$  olarak seçildi. Oluşturulan model için alan denklemlerinin tam çözümünden bilinmeyen nicelikler elde edildi. Oluşturulan model için akışkanın basıncı radyal koordinata bağlı bir fonksiyon olarak elde edilirken akışkanın enerji yoğunluğu sabit elde edildi. Çözümlerden gelen keyfi sabitlerin seçimleri altında ideal akışkanın basıncının artan fonksiyon olduğu gösterildi. Ayrıca oluşturulan model için enerji yoğunluğunun  $k_1 k_2 > 0$  olması durumunda fiziksel olarak anlamlı olacağı elde edildi. Oluşturulan model için  $R(r_{cri}) = 0$  durumu dikkate alınarak kritik radyal değer için değer aralığı

$$r_{cri} > \sqrt{\frac{3k_2}{k_1}} \text{ şeklinde tanımlandı. Bu kritik değer dikkate alınarak } f(R, L_m)$$

fonksiyonunun artan fonksiyon olduğu elde edildi.  $f(R, L_m)$  teori kapsamında ideal akışkan bulunan konformal olarak düz uzay-zaman için yay elemanı yeniden yazıldı. Kinematik nicelikler yardımıyla modelin statik bir yapıya sahip olduğu desteklendi.

## REFERANSLAR

- Abebe, G. Z., Govinder, K. S. and Maharaj, S. D. (2013). Lie symmetries for a conformally flat radiating star. *International Journal of Theoretical Physics* 52, 3244-3254.
- Albrecht, A. and Steinhardt, P. J. (1982). Cosmology for Grand Unified Theories with Radiatively Induced Symmetry Breaking, *Phys. Rev. Lett.* 48, 1220.
- Başkaya, Y. K. and Kılınç, C. B. (2020). Genel Göreliliğe Alternatif Gravitasyonel Kuramlar. *Turkish Journal of Astronomy and Astrophysics* 1(2), 643-646.
- Bennett, C.L., Halpern, M., Hinshaw, G., Jarosik, N., Kogut, A., Limon, M., Meyer, S.S., Page, L., Spergel, D.N., Tucker, G.S. (2003). First-Year Wilkinson Microwave Anisotropy Probe (WMAP) Observations: Preliminary Maps and Basic Results. *Astrophys. J. Suppl.* 148, 119–134.
- Bertolami, O., Boehmer, C. G., Harko, T. and Lobo, F. S. (2007). Extra force in  $f(R)$  modified theories of gravity. *Physical Review D* 75(10), 104016.
- Harko, T. and Lobo, F. S. (2010).  $f(R, L_m)$  gravity. *The European Physical Journal C* 70, 373-379.
- Kavya, N. S., Venkatesha, V., Mustafa, G. and Sahoo, P. K. (2023). On possible wormhole solutions supported by non-commutative geometry within  $f(R, L_m)$  gravity. *Annals of Physics* 169383.
- Maurya, D. C. (2023). Accelerating scenarios of massive universe in  $f(R, L_m)$ -gravity. *New Astronomy* 100, 101974.
- Mukhanov, V. F. (2005). Physical foundations of cosmology. Cambridge University Press.
- Schwarz, D. J., Copi, C. J., Huterer, D. and Starkman, G. D. (2016). CMB anomalies after Planck. *Classical and Quantum Gravity* 33(18), 184001.
- Starobinsky, A.A., (1980). A New Type of Isotropic Cosmological Models Without Singularity, *Phys. Rev. Lett.* 91, 99.

## BÖLÜM 2

### Benzersiz Yapısı ve Olağanüstü Özellikleriyle Tetrazol

Gülay DİLEK<sup>1</sup>

*1- Dr. Öğr. Üyesi; Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi Eczacılık Fakültesi  
Temel Eczacılık Bilimleri Bölümü. gulay.dilek@beun.edu.tr ORCID No:  
0000-0001-6562-2554*

#### ÖZET

Heterosiklik bileşikler organik kimyada yoğun bir araştırma alanı oluşturmaktadır. Halkalı yapıdaki bu bileşikler teknoloji ve yaşam biliminde birçok uygulama alanı bulmuştur. Heterosiklik bileşikler arasında tetrazoller araştırmacılar tarafından büyük ilgi görmektedir. Tetrazollerin sentezleri, uygulama alanları ve özellikleri ile ilgili her geçen gün yayın ve patent sayısı artmaktadır. Azot bakımından zengin, çok elektronlu, konjuge ve düzlemsel bir yapıya sahip tetrazollerin bu özellikleri, onların savunma sanayi, otomotiv, tarım, bilgi kayıt sistemleri, fotoğrafçılık, farmakoloji, kimya, ilaç sektörü gibi birçok alanda kullanılmalarını sağlamaktadır.

**Anahtar kelimeler:** Heterosiklik, Tetrazol, Endüstri, İlaç, Biyozoster

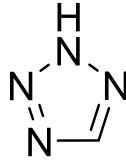
#### GİRİŞ

Teknoloji, sağlık ve yaşam biliminde birçok uygulama alanı bulan heterosiklik bileşikler organik kimyanın önemli bir çalışma konusudur. Halkalı yapılarında en az bir tane karbondan başka atom taşıyan bu bileşikler canlılığın var olduğu her yerde görebiliriz. Yaşamın temelini oluşturan kandaki hem, bitkiye yeşil rengini veren klorofil, nükleik asitlerin yapısında yer alan pürin ve pirimidinler yapılarında heterosiklik bileşik barındırır. Tiamin, riboflavin, piridoksin, folik asit ve biotin gibi vitaminler, prolin, histidin ve triptofan gibi aminoasitler ve daha pek çok sayamadığımız hücre metabolizmasında görev alan yapılar en az bir tane heterosiklik bileşik içermektedir. Kinin, klorokin, vioform, kamptotesin, puromisin, penisilin, papaverin, teobromin, emetin, teofilin, atropin, prokain, kodein, reserpin ve morfin gibi doğal bileşikler de iskeletlerinde hetero halka bulundurmaktadır (Saini, 2013). Bu bileşikler endüstri, ziraat, fotoğrafçılık, eczacılık, kimya gibi pek çok alanlarda da karşımıza çıkmaktadır. Birçok boyar maddenin, zirai kimyasalların, antikorozyflerin, katkı bileşiklerinin, tatlandırıcıların, ilaçların ve foto stabilizatörlerin yapılarında bu bileşikleri

görmekteyiz (Gomtsyan, 2012). Oldukça geniş bir kullanım alanına sahip bu bileşikler araştırmacılar için de yeni bileşiklerin keşfinde başlangıç bileşiği olarak büyük bir öneme sahiptir (Lv, 2010).

### Tetrazol

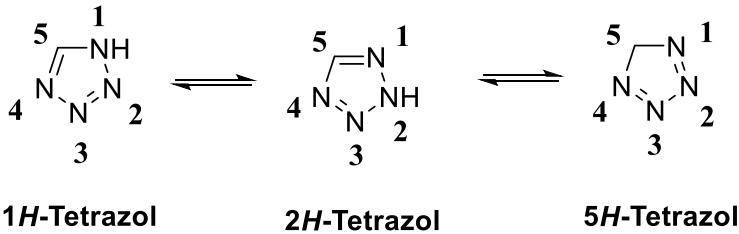
Tetrazol; yapısında bir karbon ve dört azot bulunduran,  $6\pi$  elektronlu, konjuge ve düzlemsel bir yapıya sahip; kararlı, aromatik, heterosiklik bir bileşiktir (Şekil 1). Sübstitüe olmamış tetrazol, sarı renkli kristal bir katı olup polar çözücüler içerisinde çözünürlüğü iyi, ancak benzen ve eter gibi apolar organik çözücüler içerisinde çözünürlüğü az olan bir bileşiktir (Bergman, 2011).



Şekil 1. Tetrazol

Sentez yöntemleri, özellikleri ve uygulamalarına ilişkin patent ve yayınların sayısı her geçen gün artan tetrazol, benzersiz yapısı nedeniyle araştırmacıların büyük ilgisini çekmektedir. (Xiong, 2019; Holzschneider, 2019; . Ishihara, 2019; Zhang, 2019; Yang, 2019). Kararlı heterosiklikler arasında en yüksek azot içeriğine sahip bu çok elektronlu bileşiğin birçok uygulama alanında yer alması onun sıra dışı moleküler yapısından dolayıdır (Wei, 2015).

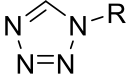
Tetrazolün teorik olarak üç izomeri bulunmaktadır. Bunlar *1H*-, *2H*-, ve *5H*-tetrazoldür. (Şekil 2). *5H*-tetrazol kararlı olması nedeniyle deneysel olarak gözlenemese de, birbirlerinin tautomerleri olan *1H*-tetrazol ve *2H*-tetrazol denge içerisinde bulunmaktadır (Wei, 2015).



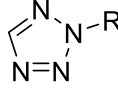
Şekil 2. N-Sübstitüe olmamış tetrazoller

Sübstitüe tetrazoller ise mono veya disübstitüe yapıdadır. Monosübstitüe tetrazollerde sübstitüentler N-1, N-2 veya C-5 atomlarına bağlı iken; disübstitüe

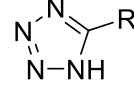
tetrazollerde sübstütientler N-1 ile C-5 veya N-2 ile C-5 atomları üzerindedir (Şekil 3) (Elderfield, 1967).



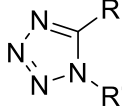
**1-Sübstütie tetrazol**



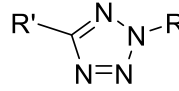
**2-Sübstütie tetrazol**



**5-Sübstütie tetrazol**



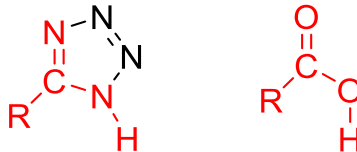
**1,5-Disübstütie tetrazol**



**2,5-Disübstütie tetrazol**

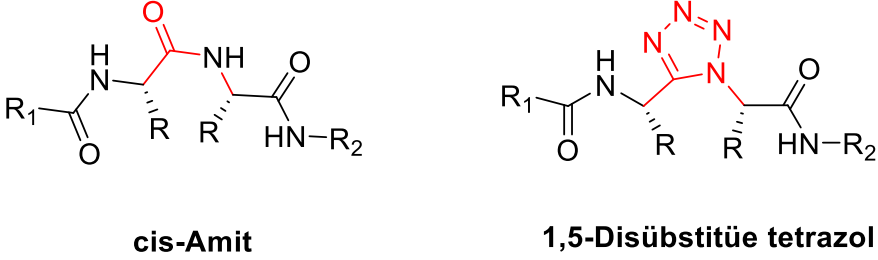
Şekil 3. Mono ve disübstütie tetrazoller

Tetrazol ve 5-sübstütie tetrazoller (diğer bir deyişle *N*-sübstütie olmamiş tetrazoller) yapılarında hareketli hidrojen de denilen, asidik karakterli bir hidrojen bulundurmaktadır. Bu nedenle *N*-sübstütie olmamiş tetrazollere NH asitleri de diyebiliriz (Myznikov, 2007). Yapılan hesaplamalara göre 5-sübstütie tetrazollerin asitlik değeri 5 konumundaki sübstütiente göre değışmektedir. Buna göre, elektron verici bir grup tetrazolün asitliğini azaltırken, elektron çekici grup da asitliği artırmaktadır. Örneğın, 5 konumunda  $-CF_3$  grubu bulunduğunda pKa değeri 1.14 iken;  $-NH_2$  grubu bulunduğunda bu değeri 5.93 olarak hesaplanmıştır (Trifonov, 2004). Bununla beraber, 5-sübstütie tetrazollerin pKa değeri karşılık gelen karboksilik asitlerin pKa değeri oldukça yakındır (tetrazollerin pKa değeri 4.5-4.9; karboksilik asitlerin pKa değeri 4.2-4.4) (Herr, 2002). Bu iki fonksiyonel grup yapısal olarak farklı olmasına ve farklı sayıda atoma sahip olmasına rağmen, benzer fizikokimyasal özellikleri nedeniyle benzer biyolojik aktivite sergilemektedir (Şekil 4). Bu nedenle 5-sübstütie tetrazoller karboksilik asitlerin biyoizosterleridir. 5-Sübstütie tetrazoller aynı zamanda oligonükleotit sentezinin de ara ürünleridir (Pozharskii, 1978; Myznikov, 2007; Roh, 2012).



Şekil 4. Tetrazol ve biyoizosteri olan karboksilik asit

Öte yandan, 1,5-disübstitüe tetrazoller peptit bağlarında bulunan *cis*-amit konformasyonunu taklit eden izosterlerdir (Roh, 2012). 1,5-Disübstitüe tetrazolün *cis*-amit bağı içeren bir bileşiğin yapısına katılması o bileşiğin metabolik kararlılığını artırmaktadır (Şekil 5) (Zabrocki, 1988; Sarvay, 2014).

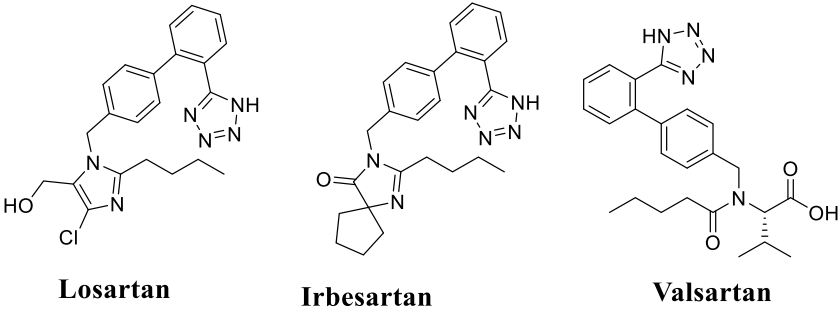


Şekil 5. *cis*-Amit ve onu taklit eden izosteri 1,5-disübstitüe tetrazol (Sarvay, 2014)

*N*-sübstitüe olmamış tetrazoller karboksilik asitler gibi fizyolojik pH'da (pH~7.4) iyonize olmaktadır. Tetrazol iyonizasyona uğradığında, yani azota bağlı hareketli hidrojen yapıdan ayrıldığında, oluşan tetrazolat anyonu rezonansla kararlı kılınır. Bu durum karboksilik asitler ile benzer pK<sub>a</sub> değerine sahip olan tetrazollerin karboksilik asitlere kıyasla daha fazla metabolik kararlılığa sahip olmasını sağlar. Diğer bir deyişle tetrazol içeren ilaç molekülleri karboksilik asit içerenlere göre daha fazla yarı-ömre sahiptir. Bir molekülün daha fazla metabolik kararlılığa sahip olması ilaç molekülünün hücre içinde daha uzun süre kalmasını, dolayısıyla ilacın etki süresinin uzamasını, böylece de biyoyararlanımın artmasını sağlar. Metabolik kararlılık ilacın toksisitesini de azaltır (Neochoritis, 2019). Dahası, tetrazolat anyonundaki azotların hidrojen bağları vasıtasıyla reseptörlere bağlanmaları sübatrat-reseptör etkileşiminde de kolaylık sağlar. Bununla beraber, anyonik tetrazoller karboksilatlardan daha lipofildir. Lipofilitenin artışı ilaç molekülüne daha fazla membran geçirgenliği sağlamaktadır (Noda, 1995; Herr, 2002). Tetrazoller esnek ligandlar oldukları için bağlanma bölgelerine uyum da daha kolaydır (Kamiya, 1991; Schames, 2004).

Tüm bu özelliklerinden dolayı tetrazollere ilgi oldukça yükündür. Özellikle ilaç, eczacılık, kimya ve tarım endüstrilerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Karboksilik asit grubunun biyoizosteri olması ve karboksilik asitten daha kararlı olması nedeniyle, tetrazol farmakolojik olarak aktif birçok bileşiğin yapısında yer almıştır. Örneğin, losartan, olmesartan, irbesartan, kardesartan, valsartan, tasosartan, forasartan ve valsartan yapılarında tetrazol bulunan angiotensin II reseptör blokerleridir (Şekil 6) (Wexler, 1996; Matta, 2010; Kumar, 2011).





Şekil 6. Tetrazol içeren bazı angiotensin II reseptör blokerleri

Sefmetazol, sefotiam, sefamandol, sefpiramid, sefmenoksim, seforanid, sefoperazon, sefonicid ve sefotetan ise FDA onayı almış, *N*-süstitüe tetrazol içeren,  $\beta$ -laktam inhibitörleridir ve bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde klinikte kullanılmaktadır (Neochoritis, 2019).

Tetrazol ve türevleri oldukça geniş bir yelpazede biyolojik aktivite sergilemektedir. Bu bileşiklerin analjezik, antibakteriyel, antifungal, antiviral, antihiperlipidemik, antitümör, antiinflamatuvar, nootropik, antitüberküloz, antikonvülsan, antihistaminik antidiyabetik gibi pek çok farmakolojik etkinlikleri bulunmaktadır (Popova, 2019). DrugBank veritabanında yer alan tetrazol içeren 64 farmasötikten FDA onayı almıştır (Neochoritis, 2019). Bu sayı her geçen gün artmaktadır.

Azot bakımından zengin tetrazol sadece ilaç endüstrisinde değil, daha pek çok alanda da kullanılmaktadır. Patlayıcı ve yanıcı özelliğe sahip tetrazol toksik olmayan, yüksek sıcaklıklı reaksiyon ürünleri verdiğinden gaz jenaröterlerinin bir bileşenidir (Klapötke, 2011). Bu enerjik bileşik otomobillerde hava yastıklarının açılmasını sağlayan itici gazın üretim kaynağı olarak (Yusuke, 2010; Srinivas, 2013) kullanılır. Patlayıcı ve havai fişeklerde ateşleme bileşenidir (Xia, 2011; Hammerl, 2001). Roketlerde ise itici güç olarak kullanılmaktadır (Paul, 2009). Tarım ilaçlarındaki bitki gelişim düzenleyicilerinin, herbisitlerin ve fungusitlerin yapısında da bu halka vardır (Sandmann, 1996; Habibi, 2011; Hamilton, 1960). Tiyotetrazoller bilgi kayıt sistemlerinde ve fotoğrafçılıkta ışığa duyarlı (fotosensitif) malzeme olarak kullanılmaktadır (Le Blanc, 1998). Tetrazol halkası içeren bileşikler metallerle kararlı kompleksler oluşturduğundan metalleri korozyondan korumak için antikoroziv olarak kullanılır. Bu yeteneği nedeniyle koordinasyon kimyasında ve supramoleküler kimyada da tetrazoller geniş bir yer edinmiştir (Zucchi, 1996; Mihit, 2006). Daha pek çok farklı uygulama kullanılan ve oldukça popüler olan tetrazol, bu popüleritesini uzun bir süre daha devam ettirecek gibi gözükmektedir.

## KAYNAKÇA

- Bergman, J., Janosik, T. (2011) Five-membered heterocycles with four heteroatoms: tetrazoles. *In Modern Heterocyclic Chemistry, Eds. Alvarez-Builla, J., Vaquero, J.J., Barluenga, John Wiley-VCH Verlag GmbH and Co., 269-375*
- Elderfield, R.C. (1967) Tetrazoles, tetrazines and purines and related ring systems. *In Heterocyclic Compounds. John Wiley and Sons, Inc, New York, 2-105*
- Gomtsyan, A. (2012) Heterocycles in drug and discovery. *Chemistry of Heterocyclic Compounds, 48, 7-10*
- Habibi, D., Nasrollahzadeh, M., Bayat, Y. (2011)  $\text{AlCl}_3$  as an effective lewis acid for the synthesis of arylaminotetrazoles. *Synthetic Communications, 41, 2135-2145*
- Hamilton, R.H., Kivilaan, A., McManus, J. (1960) Biological activity of tetrazole analogues of indole-3-acetic acid and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Plant Physiology, 35, 136-140*
- Hammerl, A., Klapötke, T.M., Nóth, H., Warchhold, M. (2001)  $[\text{N}_2\text{H}_5]^+_2[\text{N}_4\text{C-N=N-CN}_4]^{2-}$ : a new high-nitrogen high-energetic material. *Inorganic Chemistry, 40, 3570-3575*
- Herr, R.J. (2002) 5-Substituted-1H-tetrazoles as carboxylic acid isosteres: medicinal chemistry and synthetic methods. *Bioorganic and Medicinal Chemistry, 10, 3379-3393*
- Holzschneider, K., Tong, M.Y., Mohr, F., Kirsch, S.F. (2019) Asynthetic route toward tetrazoles: the thermolysis of geminal diazides. *Chemistry: A European Journal, 25, 11725-11733*
- Ishihara, K., Shioiri, T., Matsugi, M. (2019) Stereospecific synthesis of 1,5-disubstituted tetrazoles from ketoximes via a Beckmann rearrangement facilitated by diphenyl phosphorazidate. *Tetrahedron Letters, 60, 1295-1298*
- Kamiya, N., Shire, Y., Iwata, T., Iizuka, T., Iwasaki, H. (1991) Heme environmental structure of a novel artificial myoglobin with a closed Heme pocket: Site-specific chemical modification producing distal N-tetrazolyllhistidine E7 by cyanogen bromide and azide ion. *Journal of American Chemical Society, 113, 1826-1829*
- Klapötke, T.M., Piercey, D.G. (2011) 1,1'-Azobis(tetrazole): a highly energetic nitrogen-rich compound with a  $\text{N}_{10}$  chain. *Inorganic Chemistry, 50, 2732-2734*
- Kumar, C.N.S.S.P., Parida, D.K., Santhoshi, A., Kota A.K., Sridhar, B., Rao, V.J. (2011) Synthesis and biological evaluation of tetrazole containing

- compound as possible anticancer agents. *Medicinal Chemistry Communications*, 2, 486-492
- Le Blanc, B.W., Jursic, B.S. (1998) Preparation of 5-alkylthio and 5-arylthiotetrazoles from thiocyanates using phase transfer catalysis. *Synthetic Communications*, 28, 3591-3599
- Lv, H.S., Zhao, B.X., Li, J.K., Xia, Y., Lian, S., Liu, W.Y., Gong, Z.L. (2010) The synthesis, characterization and optical properties of novel, substituted, pyrazoly 1,3,4-oxadiazole derivatives. *Dyes and Pigments*, 86, 25-31
- Matta, C.F., Arabi, A.A., Weaver, D.F. (2010) The bioisosteric similarity of the tetrazole and carboxylate anions: clues from the topologies of the electrostatic potential and of the electron density. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 45, 1868-1872
- Mihit, M., Salghi, R., El Issami, S., Bazzi, L., Hammouti, B., Addi, E.A., Kertit, S. (2006) A study of tetrazoles derivatives as corrosion inhibitors of copper in nitric acid. *Pigment and Resin Technology*, 35 (2006) 151-157
- Myznikov, L.V., Hrabalek, A., Koldobskii, G.I. (2007) Drugs in the tetrazole series. (review). *Chemistry of Heterocyclic Compounds*, 43, 1-9
- Neochoritis, C.G., Zhao, T., Dömling, A. (2019) Tetrazoles via multicomponent reactions. *Chemical Reviews*, 119, 1970-2042
- Noda, K., Saad, Y., Kinoshita, A., Boyle, T.P., Graham, R.M., Husain, A. Karnik, S.S. (1995) Tetrazole and carboxylate groups of angiotensin receptor antagonists bind to the same subsite by different mechanisms. *Journal of Biological Chemistry*, 270, 2284-2289
- Paul, K. W., Hurley, M.M., Irikura, K.K. (2009) Unimolecular decomposition of 5-aminotetrazole and its tautomer 5-iminotetrazole: new insight from isopotential searching. *Journal of Physical Chemistry A*, 113, 2483-2490
- Popova, E.A.; Trifonov, R.E.; Ostrovskii, V.A. (2019) Tetrazoles for biomedicine. *Russian Chemical Reviews*, 88, 644-676
- Pozharskii, A.F., Soldatenkov, A.T., Katritzky, A.R. (1978) Why nature prefers heterocycles. In *Heterocycles in Life and Society*. John Wiley and Sons Inc, New York, 11-33
- Roh, J., Vavrova, K., Hrabalek, A. (2012) Synthesis and functionalization of 5-substituted tetrazoles. *European Journal of Organic Chemistry*, 2012, 6101-6118
- Saini, M.S., Kumar, A., Dwivedi, J., Singh, R. (2013) A review: Biological Significanes of Heterocyclic Compounds. *International Journal of Pharma Sciences and Research*, 4, 66-77

- Sandmann, G., Schneider, C., Boger, P. (1996) A new non-radioactive assay of phytoene desaturase to evaluate bleaching herbicides. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 51, 534-538
- Sarvary, A., Maleki, A. (2015). A review of syntheses of 1,5-disubstituted tetrazole derivatives. *Molecular Diversity*, 19, 189-212
- Schames, J.R., Henchman, R.H., Siegel, J.S., Sotriffer, C.A., Ni, H., McCammon, J.A. (2004) Discovery of a novel binding trench in HIV integrase. *Journal of Medicinal Chemistry*, 47, 1879-1881
- Srinivas, D., Ghule, V.D., Muralidharan, K. (2013) Synthesis of nitrogen-rich imidazole, 1,2,4-triazole and tetrazole-based compounds. *RCS Advances*, 54, 7041-7051
- Trifonov, R.E., Alkorta, I., Ostrovskii, V.A., Elguero, J. (2004) A theoretical study of the tautomerism and ionization of 5-substituted NH-tetrazoles. *Journal of Molecular Structure*, 668, 123-132
- Wei, C.X., Bian, M., Gong, G.H. (2015). Tetrazolium compounds: synthesis and applications in medicine. *Molecules*, 20, 5528-5553
- Wexler, R.R., Greenlee, W.J., Irvin, J. D., Goldberg, M.R., Prendergast, K., Smith, R.D., Timmermans, P.B.M.W.M. (1996) Nonpeptide angiotensin II receptor antagonists: the next generation in antihypertensive therapy. *Journal of Medicinal Chemistry*, 39, 625-656
- Xia, Z., Chen, S., Wei, Q., Qiao, C. (2011) Synthesis and characterization of energetic compounds constructed from alkaline earth metal cations (Sr and Ba) and 1,2-bis(tetrazol-5-yl)ethane. *Journal of Solid State Chemistry*, 184, 1777-1783
- Xiong, X., Yi, C., Liao, X., Lai, S. (2019) A practical multigram-scale method for the green synthesis of 5-substituted-1H-tetrazoles in deep eutectic solvent. *Tetrahedron Letters*, 60, 402-406
- Yang, J., Xu, Y., Jiang, M., Zou, D., Yang, G., Shen, L., Zou, J. (2019) Photochemical property of two Ru(II) compounds based on 5-(2-pyrazinyl) tetrazole for cancer phototherapy by changing auxiliary ligand. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 193, 124-129
- Yusuke, W., Mitsuru, A. (2010) A study of ammonium nitrate-metal nitrate double salts of oxidizers for gas generating agent. *Science and Technology of Energetic Materials*, 71, 39-43
- Zabrocki, J., Smith, G.D., Dunbar, J.B., Iijima, J.H. and Marshall, G.R. (1988) Conformational mimicry: 1. 1,5-Disubstituted tetrazole ring as a surrogate for the cis amide bond. *Journal of American Chemical Society*, 110, 5875-5880

- Zhang, X., He, W., Chen, S., Lyu, J., Guo, Z., Gozin, M., Yan, Q. (2019) Tuning the crystal morphology and catalytic behavior of graphene-templated energetic bis-tetrazole copper coordination polymers. *Advanced Composites and Hybrid Materials*, 2, 289-300
- Zucchi, Z., Trabanelli, G., Fonsati, M. (1996) Tetrazole derivatives as corrosion inhibitors for copper in chloride solutions. *Corrosion Science*, 38, 2019-2029.

## BÖLÜM 3

# KANSER TEDAVİSİNDE ISIYLA İNDÜKLENEBİLİR SİSTEMLER VE GEN TERAPİSİNDE KULLANIMI

Melek ACAR<sup>1</sup>

Yağmur ÜNVER<sup>2</sup>

1- Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü.

[mlkacar@yahoo.com](mailto:mlkacar@yahoo.com) ORCID No: 0000-0001-5931-7799

2- Doç. Dr.; Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü.

[yagmurunver@yahoo.com](mailto:yagmurunver@yahoo.com) ORCID No: 0000-0003-1497-081X

## GİRİŞ

IQVIA'nın verilerine göre 2022 yılında dünya ilaç pazarı 1,5 trilyon ABD dolarına ulaşmıştır (IQVIA, 2023). Hızla artan vaka sayısı nedeniyle bu rakam gün geçtikçe artmaktadır. 2022 yılında dünya reçeteli ilaç satışları incelendiğinde ise en büyük payın onkoloji ilaçlarında olduğu görülmektedir. Kanser dünyada ölüm nedenleri arasında ikinci sırada yer almaktadır. GLOBOCAN'ın 2020 verilerine göre yeni vaka görülme oranlarında en başta gelen kanser türleri meme kanseri (%11,7) ve akciğer kanseridir (%11,4). Ölüm oranlarına bakıldığında ise akciğer (%18) ve kolorektum kanseri (%9,4) ilk sıraları almaktadır (World Health Organization, 2020). Amerika Kanser Topluluğu (American Cancer Society)'na göre 2023'te kanserde toplam yeni vaka sayısının 1.958.310, toplam ölüm sayısının ise 609.820 olması beklenmektedir (American Cancer Society, 2023).

Artan vakalar, kanser için kullanılan geleneksel tedavilere (cerrahi, radyoterapi ve kemoterapi) alternatif olarak uygulanacak yeni tedavi yöntemleri bulma ihtiyacı doğurmuştur. Ulusal Kanser Enstitüsü (National Cancer Institute)'nün mevcut verilerine göre, geleneksel yöntemlere alternatif olarak kullanılmakta olan yeni kanser tedavi yöntemleri; hormon terapisi, immünoterapi, fotodinamik terapi, fototermal terapi, kök hücre nakli, hedeflenmiş terapi ve hipertermidir (National Cancer Institute, 2015). Bunlara ek olarak kanser ve genetik bozukluklar gibi tedavi edilemeyen birçok ciddi

hastalığın tedavisi için umut verici bir teknik olan gen terapisi, son dönemlerde sıklıkla kullanılmaktadır.

Gen terapisinde bozuk bir genin sağlıklı bir genle değiştirilmesi veya gerekli proteinin ekspresyonu için eksik bir genin tamamlanması ile tedavi gerçekleştirilir (Ibraheem, Elaissari ve Fessi, 2014). Zhao vd. (2021), kanser tedavisi için geliştirdikleri çoklu terapide gen terapisini ve fototermal terapiyi birlikte kullanmış, gen terapisinde survivin proteinini hedef almışlardır. Survivin apoptoz proteinleri inhibitör ailesinin bir üyesi olduğundan bu proteinin ekspresyonunun düzenlenmesi yoluyla tümör hücrelerinin büyümesinin inhibe edilmesini amaçlamışlardır. Bu sebeple gen susturma aracı olarak siRNA'ları kullanarak survivin proteininin ekspresyonunu baskılamışlardır. Bu sayede tümörlü bölgede küçülme görmüşlerdir. Gen terapisini daha etkili bir hale getirmek için birlikte uyguladıkları fototermal terapi ile ortam sıcaklığının da artırılmasıyla daha etkili bir anti-tümör etki oluşturmuşlardır.

Bazen de gen terapisi terapötik genlerin istenen hücre veya dokularda ekspresyonu şeklinde de uygulanabilir (Huang vd., 2000). Bilindiği üzere, terapötik proteinler uzun yıllardır kanser başta olmak üzere birçok hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır. Fakat proteinlerin kullanımının (protein terapisi) bazı dezavantajları bulunmaktadır. Biyolojik ortamda bozunabilmeleri ve *in vivo* kararsızlıkları proteinlerin kullanımını kısıtlamaktadır. Ayrıca proteinlerin endüstriyel üretim maliyetinin yüksek olması da bir diğer caydırıcı etkidir (Han, Mahato, Sung ve Kim, 2000; Ibraheem vd., 2014). Bu nedenle terapötik proteinleri kodlayan genlerin kullanımının proteinin kendisini kullanmaktan daha kolay ve etkili olduğu görülmektedir. Hücrelere transfer edilen tek bir gen, terapötik etkinin oluşabileceği kadar protein ekspresyonunu sağlayabilir. Ayrıca spesifik olarak istenilen bölgede bu ekspresyonun gerçekleşmesi de sağlanabilir (Stribley, Rehman, Niu ve Christman, 2002). Belirli bir türe ait olan proteini kodlayan DNA veya RNA'nın başka bir türün hücresine transfer edilerek ilgili yabancı proteinin konakçıda eksprese edilmesine heterolog protein ekspresyonu denir (Gagnon, 2010). Bu strateji ile birçok proteinin heterolog olarak farklı organizmalarda üretildiği görülmektedir (Acar ve Unver, 2022; Unver vd., 2021). Örneğin, Kalakenger vd. (2023), *Pseudomonas aeruginosa*'ya ait azurin proteininin ekspresyonunu sağlıklı insan meme epitel hücresi hattı olan MCF-10A'da gerçekleştirmişlerdir. Bunun için öncelikle daha yüksek bir ekspresyon elde edebilmek için proteine ait gen sekansını konakçı hücreye uygun olarak optimize etmişlerdir (kodon optimizasyon). Sonrasında ilgili sekans CMV promotörüne sahip bir plazmide yerleştirip klonlamışlardır. Elde edilen rekombinant DNA'yı manyetik nanopartiküller aracılığıyla MCF-10A hücrelerine transfer etmişlerdir (manyetofeksiyon). Gen terapisi amacıyla farklı taşıyıcı sistemlerin kullanıldığı çalışmalar

Tablo 1’de verilmiştir.

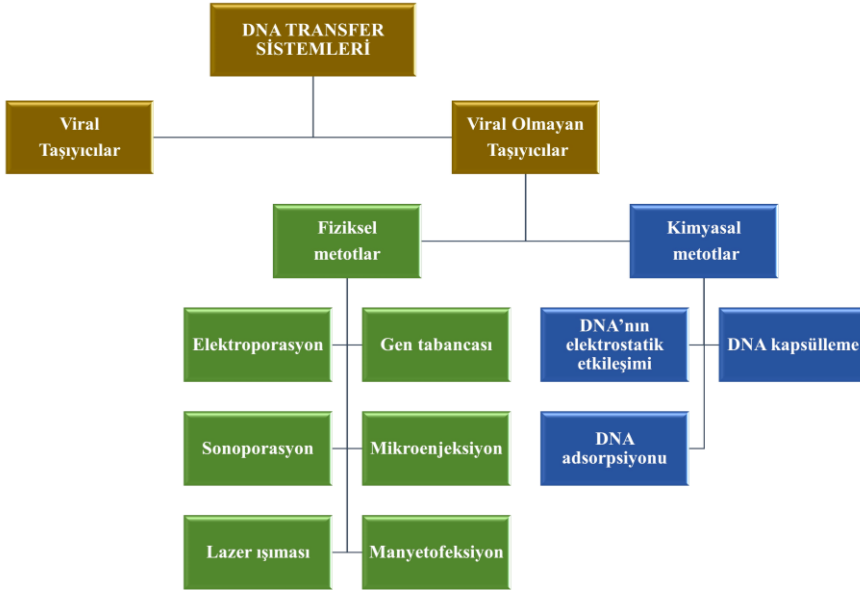
**Tablo 1.** Taşıyıcı sistemlerin kullanıldığı gen terapisi çalışmaları

Çalışmanın amacı	Hedef gen	Taşıyıcı	Referans
Beyin tümörünün tedavisi	Timidin kinaz (HSVtk)	Polimerik nanopartiküller	(Mangraviti vd., 2015)
Kemoterapiye bağlı kardiyotoksitenin önlenmesi	VEGF-B	Adeno-associated virus (AAV)	(Räsänen vd., 2016)
Akciğer kanserinin tedavisi	p53	Mezogözenekli silika nanoküreler	(C. Li, Hu, Li, Song ve Shen, 2017)
Kanser tedavisi (HeLa tümörü)	p53	Nanopartiküller	(Liu vd., 2018)
Yüksek verimli ve tekrarlanabilir <i>in vivo</i> transfeksiyon sisteminin oluşturulması	<i>S. aureus</i> AdsA mRNA	Lipid nanokompleksi (InstantFECT)	(Arya, Lin, Zhou, Gao ve Huang, 2020)
Kanser için DNA aşısı oluşturma	a-PD1	PEI/mezogözenekli silika çubuklar	(Nguyen, Yin, Choi, Jeong ve Kim, 2020)
Gen susturma yoluyla kanser tedavisi	Survivin	Lipid kaplı karbon nanotüpler	(Zhao vd., 2021)
Heterolog protein ekspresyonu	Azurin	Manyetik nanopartiküller	(Kalakenger vd., 2023)

Heterolog protein üretimindeki en büyük zorluk DNA gibi büyük, kırılğan ve negatif yüklü moleküllerin hücre çekirdeğine bozulmadan taşınmasıdır. Ayrıca aynı zorluk gen terapisinin *in vivo* uygulamasını da sınırlamaktadır. Başarılı ve etkili bir gen terapisi için DNA’nın güvenli ve verimli bir şekilde taşınması gerekmektedir. Bu nedenle DNA’yı taşımada kullanılacak olan taşıyıcı, DNA’yı lizozomal bozulmadan saklayarak hücre sitoplazmasına etkili bir şekilde taşıyabilmelidir (Ibraheem vd., 2014). Genel olarak kullanılan DNA transfer sistemleri Şekil 1’de gösterilmiştir (Attar, 2017; Ibraheem vd., 2014; Jin, Zeng, Liu, Deng ve He, 2014). Bilindiği üzere viral araçlar, DNA iletmek için en yaygın kullanılan yüksek verimlilikteki taşıyıcılardır. Ancak bu araçlar tehlikeli immünolojik yanıtları tetikleyebilir. Viral taşıyıcılara alternatif olarak geliştirilen viral olmayan taşıyıcılar ise nispeten güvenlidir ve genellikle düşük immün yanıtı neden olur. Ayrıca kolaylıkla ve büyük miktarlarda hazırlanabilirler. Fakat düşük transfeksiyon verimliliğine sahip olduklarından geniş ölçekte kullanımları sınırlıdır (Ibraheem vd., 2014). Bu sebeplerden



dolayı daha güvenli, daha ucuz ve transfeksiyon verimliliği yüksek olan alternatif taşıyıcılar geliştirilmeye çalışılmıştır.



Şekil 1. DNA transfer sistemleri

Katyonik lipitler olan lipozomlar, viral olmayan vektörler arasında yer alır ve gen dağıtım sistemlerinde sıklıkla kullanılmaktadır (Han vd., 2000; Jin vd., 2014). Lipozomlar, doğal veya sentetik lipitlerin sulu bir ortamda emülsiyon haline getirilmesi sonucu bir veya daha fazla lipit çift katmanından oluşan küresel lipit kesecikleridir (parçacık boyutu 50-500 nm çapındadır) (Nsairat vd., 2022). Hazırlama prosedürü, karıştırma oranı, plazmit DNA (pDNA) konsantrasyonu, lipozomların boyutu ve tampon gibi parametreler lipopleks oluşumunun etkinliğini etkilemektedir. Lipozomlar hem toksik olmamaları hem de biyolojik olarak parçalanabilmeleri yönünden avantaj sağlamaktadır. Ayrıca DNA'nın endozomal kaçışını da kolaylaştırır. Bununla birlikte, katyonik lipozomlar pozitif yükleri nedeniyle, serum proteini ve enzimler gibi negatif yüklü hücresel bileşenlerle spesifik olmayan etkileşime girebilir. Bunun sonucu olarak hücresel yapışma ve dolayısıyla transfeksiyon verimliliği azalabilir. Ayrıca lipozomların hazırlanmasında kullanılan organik reaktifler (etil eter ve kloroform gibi) hem hücrelere hem de dokulara zarar verebilir. Oluşabilecek sitotoksikite ve düşük transfeksiyon etkinlikleri lipozomların gen terapisinde taşıyıcı olarak kullanımını sınırlamaktadır. Bu nedenle, yüksek transfeksiyon

etkinliğine sahip, güvenli ve toksik olmayan katyonik sistemlerin geliştirilmesi büyük önem taşımaktadır (Jin vd., 2014).

Genetik materyallerin endositoz yoluyla hücreler tarafından alınmasına yardımcı olan katyonik polimer bazlı gen taşıyıcıların (polipleksler), lipozomlara göre nispeten daha yüksek transfeksiyon verimliliği göstermesi ve düşük toksisiteye sahip olması sebebiyle günümüzde alternatif bir taşıyıcı sistem olarak kullanımı artmaktadır (Chong, Yeap ve Ho, 2021; Jin vd., 2014). Katyonik polimerler kitosan, polietilenimin (PEI), poliamidoamin dendrimerler, poli (laktit-ko-glikolit) (PLGA) ve diğer polimerik taşıyıcılar olarak sınıflandırılabilirler (Jin vd., 2014). Kitosan, biyouyumluluk, biyolojik parçalanabilirlik, düşük toksisite ve düşük immünojenite gösterme gibi avantajlara sahip olsa da fizyolojik pH koşullarında çözünmez olmaları ve düşük transfeksiyon verimliliği nedeniyle kullanımı sınırlıdır (Lavertu vd., 2006; Prabakaran ve Mano, 2005). Dalı polietilenimin (PEI), fizyolojik pH'da pozitif yüklü olması sebebiyle gen aktarım çalışmalarında kullanılır (Lobov vd., 2007). PEI, güçlü DNA yoğunlaşma kapasitesine ve içsel endozomal aktiviteye sahiptir. Ayrıca proton sünger etkisi adı verilen tamponlama yeteneğine de sahiptir. Ozmotik şişme ve endozomların patlaması yoluyla genin sitoplazmaya salınmasını kolaylaştırır (Brown, Schätzlein ve Uchegbu, 2001; De Laporte, Cruz Rea ve Shea, 2006; Jin vd., 2014). Bu sebeple katyonik polimerler arasında en yaygın çalışılan moleküldür. PEI/pDNA poliplekslerinin transfeksiyon verimliliği N/P oranıyla (polimer nitrojeninin DNA fosfatına oranı) ilişkili olduğundan N/P oranı en çok optimize edilen parametredir. Ayrıca PEI'nin moleküler ağırlığı (MW, kDa) da transfeksiyon etkinliğini etkilemektedir. Bu nedenle farklı moleküler ağırlığa sahip PEI'ler kullanılarak (10 veya 25 kDa gibi) en uygun şartlar elde edilmektedir (Jin vd., 2014). Poliamidoamin (PAMAM) dendrimerler, sulu çözeltide yüksek oranda çözünen oldukça dallanmış küresel polimerlerdir. Büyük miktarlarda üretilebilirler. DNA ile artan iyonik etkileşimleri olduğundan kararlı ve yüksek oranda çözünür DNA kompleksleri oluşturulabilir. Hâlihazırda ticari olarak elde edilebilse de bu ürünler diğer katyonik polimerlerden daha pahalıdır. Poli (laktit-ko-glikolit) (PLGA) ise, ester bağlarıyla birbirine bağlanan laktik ve glikolik asitlerden oluşur. PLGA parçacıkları, pDNA'yı *in vivo* bozulmadan korur ve pDNA'nın kontrollü salınımını tetikler. Fakat geleneksel PLGA'nın düşük salım hızına ve DNA kapsüllenmesini engelleyen negatif yüke sahip olması, kullanım için dezavantaj oluşturmuştur (Cloninger, 2002; Han, Lee ve You, 2005; Jin vd., 2014; Lee, MacKay, Fréchet ve Szoka, 2005). Son zamanlarda gen aktarımı için inorganik nanotaşıyıcıların kullanımının arttığı görülmektedir. Altın nanopartiküller (AuNP), manyetik nanopartiküller (MNP), karbon nanotüpler

(CNT), grafen/CNT kompozitler, kuantum noktaları (QD), upconversion nanopartiküller (UCN) ve silika nanopartiküller bu amaçla sıklıkla kullanılmaktadır (Loh, Lee, Dou ve Deen, 2016).

Terapötik genlerin transfer edildikleri hücrelerde yeterli düzeylerde ifade edilebilmeleri gen terapisi stratejisi için büyük önem taşımaktadır. Bu nedenle kullanılacak olan taşıyıcı kadar protein ekspresyonunu başlatacak olan promotör seçimi de çok önemlidir. Promotör, ilgili proteinlerin (RNA polimeraz ve transkripsiyon faktörleri gibi) o genin transkripsiyonunu başlatmak için bağlandığı bir genin yukarı akışındaki DNA bölgesidir (NHGRI, 2023). Heterolog protein ekspresyonu için kullanılan promotörler yapısal veya indüklenbilir promotör olabilir. Yapısal promotör kullanımında ilgili gen hücreye transfer edildikten sonra herhangi bir indükleyici maddeye gerek kalmadan protein ekspresyonu gerçekleşmektedir. Memeli ekspresyon sistemleri için SV40 (simian virüsü 40), CMV (sitomegalovirüs), UBC (insan ubiquitin C), EF1A (insan uzama faktörü 1a), PGK (fare fosfogliserat kinaz 1) ve CAG (CMV enhancer/tavuk  $\beta$ -actin) gibi yapısal promotörler hücre kültürü çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır (Qin vd., 2010). CMV promotörü ise memeli ekspresyon plazmitlerinde en yaygın olarak kullanılan promotördür (Xia vd., 2006). Fakat CMV gibi yapısal promotörlerin kullanıldığı sistemlerde ilgili proteinin ekspresyonu kontrol altına alınamamaktadır. Oysaki birçok çalışmada belirli zamanlarda ve belirlenen miktarda protein ekspresyonunun gerçekleşmesi istenmektedir. İndüklenbilir promotörler bu amaçla kullanılırlar ve böylece proteinin ekspresyonu kontrol altına alınabilir. Bazı stratejiler kimyasal sinyal gerektiren indüksiyon sistemlerine odaklanmıştır. Örneğin, Qin vd. (2010)'nin yaptığı çalışmada doksisisiklin ile indüklenen TRE promotörü yapısal promotörler ile karşılaştırılmıştır. CMV promotörünün bazı hücre tiplerinde (293T ve CMMT) çok güçlü, bazılarında (MRC5 ve MSC) ise oldukça zayıf olduğu görülmüştür. Bu değişkenliğin bazı hücrelerde bu promotörün susturulması ile ilgili olabileceği belirtilmiştir. rtTA-TRE indüklenbilir sistemin kullanıldığı hücre hatlarında doksisisiklin eklenmeyen gruplarda GFP (Green Fluorescent Protein; Yeşil Floresan Protein) ışması gözlenmezken doksisisiklinin konsantrasyonuna bağlı olarak GFP ışmasının arttığı gözlenmiştir. Çalışmada kullanılan tüm hücre tiplerinde GFP ekspresyonunun yaklaşık 110 ng/ml doksisisiklin konsantrasyonunda maksimuma ulaştığı belirtilmiştir.

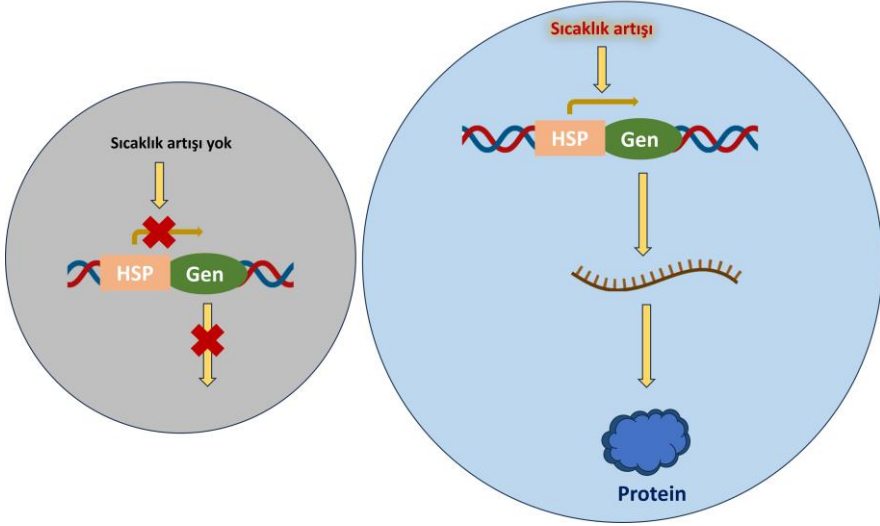
Protein ekspresyonunu kontrol altına almanın bir diğer yolu ise sıcaklıktır. Isı ile indüklenbilir promotörlerin kullanıldığı ekspresyon sistemlerinde protein ekspresyonunun gerçekleşmesi için hücrenin bulunduğu ortamın sıcaklığının belirli bir değere ulaşması gerekmektedir.

### ***Isıyla İndüklenebilir Sistemler: HSP (Heat Shock Protein)'ler***

1962'de *Drosophila melanogaster* (meyve sineği)'de keşfedilen HSP (heat shock protein; ısı şok proteini)'ler hem prokaryotik hem de ökaryotik organizmalarda bulunan korunmuş protein aileleri olup moleküler şaperonlar olarak adlandırılırlar (Binder, 2014; Hu vd., 2022; Martine ve Rébé, 2019; Shende vd., 2019). HSP'ler normal vücut sıcaklığından daha yüksek sıcaklıklara maruz kalınması durumunda indüklenir. Örneğin, *Drosophila* için normal vücut sıcaklığı 25 °C'dir ve 35-37 °C'de ısı şoku gerçekleşir (Shende vd., 2019). Isı şoku tepkisi (HSR; Heat Shock Response), ısı şoku gibi bir dizi strese tepki veren hücrel bir mekanizmadır ve HSP'lerin normal proteinlere göre belirgin ekspresyonuyla sonuçlanır. HSR, transkripsiyon seviyesinde ısı şoku transkripsiyon faktörü 1 (HSF1) tarafından düzenlenir. HSF1, stres sonrasında tüm önemli Hsp genlerinin promotörlerine bağlanır ve Hsp mRNA sentezinin yukarı regülasyonunu düzenler. *D. melanogaster*'da HSF, 55A bölgesinde yer alan tek bir gen tarafından kodlanır. Bu faktör yapısal olarak sentezlenir ve kromatinin her yerine yayılmış monomer şeklinde bulunur. Isı stresi sonucunda HSF, yüksek DNA bağlanma afinitesi ile aktive edilmiş bir formda trimerize olur. Daha sonra 9 majör Hsp lokusu da dâhil yaklaşık 100 farklı lokusa bağlanır. HSF'nin Hsp genlerinin promotörüne bağlanması, korunmuş bir element olan ısı şoku elementi (HSE) aracılığıyla sağlanır (Calderwood vd., 2010; Michaud, Marin ve Tanguay, 1997). HSE ilk olarak *Drosophila* Hsp70 geninde ısının indüklenebilirliği için gerekli bir dizi olarak tanımlanmıştır (Michaud vd., 1997; Mirault, Southgate ve Delwart, 1982). HSF/HSE bağlanması, farklı Hsp genlerinin transkripsiyonunu aktive eder ve bunların aşırı ekspresyonuna izin verir.

Isı şoku ayrıca hücre sinyal yollarında modülasyona neden olur. Protein kinaz aktivasyonuna ve HSF1'in fosforilasyonuna yol açar. Normal şartlarda RNA polimeraz II, Hsp genlerinin promotörleri üzerinde duraklatılır. Isı şoku sonucu aktivasyon gerçekleşir. Böylece HSF1 promotöre bağlanarak duraklatılmış RNA polimeraz II'nin salınmasını sağlar ve transkripsiyon gerçekleşir. Dolayısıyla HSF1, HSP/RNA transkriptlerinin başlatılmasında ve devamında önemli rol oynar (Calderwood vd., 2010). Ayrıca ısı şoku tepkisinde ısı şoku mRNA'larının normal mRNA'lara kıyasla tercihli bir transkripsiyonunun olduğu da belirtilmektedir (Michaud vd., 1997).

Tüm bu bilgiler ışığında bilim insanları HSP'leri protein ekspresyon sistemleri için kullanarak ısı indüksiyonlu sistemler geliştirmişlerdir. Böylece ilgili protein ekspresyonu sadece belirli sıcaklıkta gerçekleşecek ve kontrol altına alınabilecektir (Şekil 2).



**Şekil 2.** Isı indüksiyonlu protein ekspresyonu

Huang vd. (2000), hedefli gen ekspresyonu elde etmek için yaptıkları çalışmada ısı indüksiyonlu ekspresyon sistemi geliştirmişlerdir. Bu amaçla raportör gen olarak kullandıkları GFP'nin ekspresyonunu HSP70 promotörünün kontrolü altında gerçekleştirmişlerdir. Hücreler promotör aktivasyonu için 20 dakika boyunca farklı sıcaklıklarda bekletilmiştir (hipertermi). Promotör aktivasyonunun 39 °C'de başladığı ve 42-43 °C'de maksimum seviyeye ulaştığı gözlenmiştir. Yaptıkları FACS analizi sonucuna göre hipertermi ile GFP ekspresyonunun 500-1000 kata kadar artırılabilirdiği belirtilmiştir. Ayrıca GFP ekspresyonunun hipertermi uygulamasından 3 saat sonra artmaya başladığı ve maksimum seviyeye 18-24 saat civarında ulaştığı görülmüştür.

Farklı canlılara ait HSP promotörleri ve protein ekspresyonu için kullanıldıkları konak canlılar Tablo 2'de verilmiştir. Tablodan da görüleceği üzere konak canlıının optimum yaşama sıcaklığından daha yüksek sıcaklıklarda inkübe edilmesiyle HSP'lerin indüklenmesi sağlanmıştır.

**Tablo 2.** Isıyla indüklenabilir promotörler

Promotör	Kaynak	Konak	İndükleme sıcaklığı ve süresi	Referans
XHSP70	Xenopus	Zebra balığı	36-38 °C – 15 dakika	(Ádám, Bártfai, Lele, Krone ve Orbán, 2000)
mHSP68	Fare	Zebra balığı	36-38 °C – 15 dakika	(Ádám vd., 2000)
HSP70	Zebra balığı	Zebra balığı	38 °C – 30 dakika	(Shoji ve Sato-Maeda, 2008)
HSP18.2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Tütün hücreleri (BY2)	35-37 °C – 120 dakika	(Yoshida vd., 1995)
HSP70B'	İnsan	A549 hücreleri	43-45 °C – 30 dakika	(Yamaguchi, Ito, Ono, Kawabe ve Kamihira, 2014)
SfHSP20.71 veya SfHSP70	<i>Spodoptera frugiperda</i>	<i>S. frugiperda</i> Sf9 hücreleri, embriyoları ve larva dokuları	37 °C – 60 dakika	(Chen, Tan ve Palli, 2020)
sHSP26	Ekmeklik buğday	<i>Arabidopsis</i>	37 °C – 10 dakika	(Chauhan vd., 2012)
HSP90B	Yeşil alg	Yeşil alg	37 °C – 30 dakika	(Traewachiwiphak vd., 2018)
HSP17.3B	Soya fasulyesi	<i>Physcomitrella patens</i>	38 °C – 60 dakika	(Saidi vd., 2005)
HSP70	İnsan	HeLa hücreleri	39-41 °C – 5 dakika	Liu vd. (2018)
HSP70	<i>Drosophila melanogaster</i>	MCF-10A ve MCF-7 hücreleri	38 °C – 90 dakika	(Acar vd., 2022)

### ***HSP'lerin Gen Terapisinde Kullanımı***

Yapılan çalışmalar sonucunda iki veya daha fazla terapinin birlikte kullanımının tekli terapilere oranla çok daha etkili olduğu görülmektedir (Gurunathan vd., 2018). Kanser tedavisinde kullanılan çoklu terapilerde hipertermi ve gen terapisi sıklıkla birlikte kullanılmaktadır (Liu vd., 2018; Yin vd., 2016; Zhao vd., 2021). Araştırmacılar, gen terapisi için kullanılacak proteinin ekspresyonunu kontrol altına almak istediklerinden promotör aktivasyonunu ortam sıcaklığını artırarak gerçekleştirmektedir. Sıcaklık artışı sağlamada ise hipertermi, manyetik hipertermi ve fototermal terapi stratejileri sıklıkla kullanılmaktadır.

Yin vd. (2016), HSP70 promotörünün (ısıyla indüklenen bir promotör) arkasına apoptotik yolakla ilişkili TRAIL gen sekansını ekleyerek bir pDNA (HSP-sTRAIL) hazırlamışlardır. Bu pDNA'yı manyetofeksiyon yöntemi ile mezenşimal kök hücelere transfer etmişlerdir. Geni ve manyetik nanopartikülleri taşıyan mezenşimal kök hücreler hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak yumurtalık kanserinin tedavisinde kullanılmıştır. Çalışmada, gen ekspresyonu manyetik hipertermi ile kontrol edilmiş ve TRAIL ekspresyonu sonucunda kobaylarda tümör boyutunun önemli ölçüde azaldığı görülmüştür. Liu vd. (2018) ise gen terapisinde daha kontrollü ve etkin bir terapötik etki elde etmek ve ayrıca terapinin yan etkilerini en aza indirebilmek için gen terapisini fototermal terapi ile birleştirmişlerdir. Yaptıkları çalışmada ısıyla indüklenabilir HSP70 promotörünü kullanarak terapötik DNA (pHSP70-p53-GFP) oluşturmuşlardır. Elde ettikleri rekombinant DNA'yı nanopartiküllere yükleyerek (PB@PEI/pHSP70-p53-GFP) tümörlü bölgeye transfer etmişlerdir. Zayıf (41 °C) ve güçlü (50 °C) NIR lazer ışınlaması ile promotör aktive edilerek hücre apoptoz veya nekroza yönlendirilmiştir. Tek başına gen terapisi veya fototermal terapi kullanımına kıyasla uyguladıkları dual terapinin daha etkili olduğunu göstermişlerdir.

Terapötik proteinlerin ekspresyonlarını kontrol altına almak kadar spesifik olarak kanser hücrelerini hedefleyebilmek de önemlidir. Kanser tedavilerinde karşılaşılan en büyük sorun kullanılan terapötik ajanların sadece tümörlü bölgede kalmayıp aynı zamanda sağlıklı doku ve organlara da etki etmesidir. Böylece birçok ciddi yan etkilere neden olarak tedavinin kullanılabilirliğini olumsuz etkilemektedir (Ganesan vd., 2021). Bu sebeple bilim insanları kullanılacak olan terapötik ajanları hedefe spesifik olarak tasarlamaya oldukça önem vermektedir. Kullanılacak olan ajanların sadece tümörlü bölgede birikiminin sağlanması veya antikanser etkisinin sağlıklı hücrelerde görülmemesi için birçok strateji geliştirilmektedir.

Kanser hücrelerindeki değişimler kanser metabolizmasını tanımlamada önemli rol oynamaktadır (Schmidt vd., 2021). Kanser hücreleri normal şekilde besin ihtiyaçlarını karşılayamadıklarından metabolizmalarında değişiklik olur (Ada vd., 2021). Hedefe yönelik tedavi için kanser hücrelerindeki bu değişiklikler göz önüne alınarak terapötik ajanlar hedefe spesifik hale getirilir. Hedefleme çalışmalarında kullanılan stratejiler monoklonal antikorları hedefleme, aptamer hedefleme, oligopeptid bazlı hedefleme ve folat bazlı hedefleme şeklinde sınıflandırılabilir (Gu vd., 2007). Örneğin, meme kanseri hücrelerinin yüzeyinde aşırı eksprese edilen folik asit reseptörlerine özgüllüğü nedeniyle hedefleme çalışmalarında folik asit konjuge nanotaşıyıcılar sıklıkla kullanılmaktadır. Bu sayede taşıyıcının hedef dışı organlarda birikimi

azaltılmaktadır (Tagde vd., 2020). Folik asit reseptörü bir kanser biyobelirteci iken folik asit reseptörünün ligandı olan folik asit (FA) düşük immünojenik etkiye sahiptir (Zwicke vd., 2012).

Fasehee vd. (2016) de bu amaçla folat reseptör hedefli bir poli(laktid-ko-Glikolid) (PLGA)-Polietilen glikol (PEG) nanoparçacığını (PEG-PLGA), disülfiramın meme kanseri hücrelerine verilmesinde kullanmışlardır. Bunun için model olarak BALB/c fareleri kullanılmıştır. Farelere 4T1 hücreleri (meme kanseri) enjekte edilip tümör modeli oluşturulduktan sonra disülfiram kapsüllü PLGA-PEG-folat NP (DS-PPF-NP)'ler kuyruk damarına enjekte edilmiştir. Sonuç olarak, serbest disülfiramla karşılaştırıldığında DS-PPF-NP'lerin farelerde tümör büyümesini önemli ölçüde inhibe ettiği gösterilmiştir. PEG-PLGA'yı hedefleyen bir folat reseptörünün, kan dolaşımında DSF'nin bozulmasını önlediği ve DSF'yi özellikle meme kanseri dokularına ilettiği belirlenmiştir. Ayrıca, DS-PPF-NP enjeksiyonu yapılan hayvanlarda vücut ağırlığı kaybı gibi herhangi bir toksisite belirtisi tespit edilmemiştir. Bir başka çalışmada, Peerzade vd. (2019) zebra balıklarında insan rahim ağzı kanseri metastazının tespiti için ultra parlak floresan silika nanopartiküller hazırlamışlardır. Daha etkili bir hedefleme için nanopartikülleri folik asit ile konjuge etmişlerdir. Bir başka çalışmada ise üçlü negatif meme kanserini hedefleyici bir nanoplatform oluşturulmuştur. Meme kanseri hücre hatları östrojen reseptörü (ER), progesteron reseptörü (PR) ve insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER2)'yi eksprese edip etmemeleri yönünden birbirlerinden farklılık göstermektedir. Bu üç reseptörü de eksprese etmeyen ve en agresif meme kanseri türüne üçlü negatif meme kanseri (TNBC) denilmektedir (Subik vd., 2010). Li vd. (2023), TNBC tedavisinde hedefleme için bu reseptörler kullanılamayacağından farklı bir hedefleme geliştirmişlerdir. CD44 bir transmembran proteindir ve TNBC hücreleri tarafından aşırı eksprese edilir. Bir polisakkarit olan hyaluronik asit (HA) ise CD44'e spesifik bağlanma özelliği gösterir. Bu nedenle yapılan çalışmada TNBC hücrelerini hedefleyebilmek için HA kullanılmıştır. Bu sayede, oluşturulan kompleks TNBC hücreleri tarafından yüksek miktarda alındığından sağlıklı hücreler üzerindeki yan etki en az seviyeye indirilmiştir.

Birçok çalışmadan da görüldüğü üzere nanopartiküller taşıyıcı olarak sıklıkla kullanılmaktadır. Özellikle de hipertermi temelli terapilerde taşıyıcı olarak manyetik nanopartiküllerin (MNP) kullanılması durumunda ortam sıcaklığını artırmak için manyetik alan kullanılmaktadır. Manyetik hipertermi (MHT) adı verilen bu terapide, harici olarak uygulanan bir AC manyetik alan yardımıyla manyetik enerji sadece MNP'lerin olduğu bölgede termal enerjiye dönüştürülmektedir. Böylece MHT, MNP'lerin olduğu bölge ile sınırlı olan



dolayısıyla yan etkisi sınırlı bir kanser tedavi aracıdır (Espinosa vd., 2016; Hervault vd., 2016; Piehler vd., 2020). Spesifik olarak tümörlü bölgenin hedeflenmesinde MHT gen terapisi ile birlikte kullanılarak (dual terapi) daha etkili bir terapi sağlanabilir (Acar vd., 2022).

## **SONUÇ**

Isı indüksiyonlu ekspresyon sistemleri kullanılarak istenilen bölgede kontrollü bir protein ekspresyonu gerçekleştirilebilir. Ayrıca gen terapisinin diğer terapilerle birlikte kullanımı ile de hem daha etkili hem de yan etkisi sınırlı tedavi yöntemleri geliştirilebilir.

## REFERANSLAR

- Acar, M., Solak, K., Turhan, F., Yıldız, Ş., Mavi, A. ve Unver, Y. (2022). Magnetic Hyperthermia and Gene Therapy for Breast Cancer Treatment. 16th Nanoscience & Nanotechnology Conference (NANOTR16) Kongresine Sunulmuş Bildiri.
- Acar, M. ve Unver, Y. (2022). Constitutive and extracellular expression of pectin methylesterase from *Pectobacterium chrysanthemi* in *Pichia pastoris*. *3 Biotech*, 12(9), 219.
- Ada, S., Ertürk, C., Uçar, A., Akyüz, S., Doğan, F. ve Yücel, B. (2021). Kanser Hücre Metabolizması. *Türkiye Sağlık Enstitüleri Başkanlığı Dergisi*, 4(3), 66-75.
- Ádám, A., Bártfai, R., Lele, Z., Krone, P. H. ve Orbán, L. (2000). Heat-inducible expression of a reporter gene detected by transient assay in zebrafish. *Experimental Cell Research*, 256(1), 282–290.
- American Cancer Society. (2023). Cancer Facts & Figures. <https://www.cancer.org/>
- Arya, S., Lin, Q., Zhou, N., Gao, X. ve Huang, J. D. (2020). Strong Immune Responses Induced by Direct Local Injections of Modified mRNA-Lipid Nanocomplexes. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, 19(March), 1098–1109.
- Attar, A. (2017). Gene therapy techniques: Physical and chemical methods. *Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology*, 74(1), 103–112.
- Binder, R. J. (2014). Functions of Heat Shock Proteins in Pathways of the Innate and Adaptive Immune System. *The Journal of Immunology*, 193(12), 5765–5771.
- Brown, M. D., Schätzlein, A. G. ve Uchegbu, I. F. (2001). Gene delivery with synthetic (non-viral) carriers. *International Journal of Pharmaceutics*, 229(1-2), 1-21.
- Calderwood, S. K., Wang, Y., Xie, X., Khaleque, M. A., Chou, S. D., Murshid, A., Prince, T. ve Zhang, Y. (2010). Signal Transduction Pathways Leading to Heat Shock Transcription. *Signal Transduction Insights*, 2, STI.S3994.
- Chauhan, H., Khurana, N., Nijhavan, A., Khurana, J. P. ve Khurana, P. (2012). The wheat chloroplastic small heat shock protein (sHSP26) is involved in seed maturation and germination and imparts tolerance to heat stress. *Plant, Cell and Environment*, 35(11), 1912–1931.
- Chen, X., Tan, A. ve Palli, S. R. (2020). Identification and functional analysis of promoters of heat-shock genes from the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. *Scientific Reports*, 10(1), 2–10.

- Chong, Z. X., Yeap, S. K., & Ho, W. Y. (2021). Transfection types, methods and strategies: A technical review. *PeerJ*, 9, e11165.
- Cloninger, M. J. (2002). Biological applications of dendrimers. *Current Opinion in Chemical Biology*, 6(6), 742-748.
- De Laporte, L., Cruz Rea, J. ve Shea, L. D. (2006). Design of modular non-viral gene therapy vectors. *Biomaterials*, 27(7), 947-954.
- Espinosa, A., Di Corato, R., Kolosnjaj-Tabi, J., Flaud, P., Pellegrino, T. ve Wilhelm, C. (2016). Duality of Iron Oxide Nanoparticles in Cancer Therapy: Amplification of Heating Efficiency by Magnetic Hyperthermia and Photothermal Bimodal Treatment. *ACS Nano*, 10(2), 2436–2446.
- Fasehee, H., Dinarvand, R., Ghavamzadeh, A., Esfandyari-Manesh, M., Moradian, H., Faghihi, S. ve Ghaffari, S. H. (2016). Delivery of disulfiram into breast cancer cells using folate-receptor-targeted PLGA-PEG nanoparticles: in vitro and in vivo investigations. *Journal of Nanobiotechnology*, 14(1), 32.
- Gagnon, K. (2010). Measuring Electroneutral Chloride-Dependent Ion Fluxes in Mammalian Cells and in Heterologous Expression Systems. *Physiology and Pathology of Chloride Transporters and Channels in the Nervous System* (ss. 149–157).
- Ganesan, K., Wang, Y., Gao, F., Liu, Q., Zhang, C., Li, P., Zhang, J. ve Chen, J. (2021). Targeting engineered nanoparticles for breast cancer therapy. *Pharmaceutics*, 13(11), 1829.
- Gu, F. X., Karnik, R., Wang, A. Z., Alexis, F., Levy-Nissenbaum, E., Hong, S., Langer, R. S. ve Farokhzad, O. C. (2007). Targeted nanoparticles for cancer therapy. *Nano Today*, 2(3), 14-21.
- Gurunathan, S., Kang, M. H., Qasim, M. ve Kim, J. H. (2018). Nanoparticle-mediated combination therapy: Two-in-one approach for cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(10), 1–37.
- Han, C. K., Lee, M. ve You, H. B. (2005). Polymeric gene carriers. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression*, 15(4).
- Han, S., Mahato, R. I., Sung, Y. K. ve Kim, S. W. (2000). Development of Biomaterials for Gene Therapy. *Molecular Therapy*, 2(4), 302–317.
- Hervault, A., Dunn, A. E., Lim, M., Boyer, C., Mott, D., Maenosono, S. ve Thanh, N. T. K. (2016). Doxorubicin loaded dual pH- and thermo-responsive magnetic nanocarrier for combined magnetic hyperthermia and targeted controlled drug delivery applications. *Nanoscale*, 8(24), 12152–12161.

- Hu, C., Yang, J., Qi, Z., Wu, H., Wang, B., Zou, F., Mei, H., Liu, J., Wang, W. ve Liu, Q. (2022). Heat shock proteins: Biological functions, pathological roles, and therapeutic opportunities. *MedComm*, 3(3), 1–39.
- Huang, Q., Hu, J. K., Lohr, F., Zhang, L., Braun, R., Lanzen, J., Little, J. B., Dewhirst, M. W. ve Li, C. Y. (2000). Heat-induced gene expression as a novel targeted cancer gene therapy strategy. *Cancer Research*, 60(13), 3435–3439.
- Ibraheem, D., Elaissari, A. ve Fessi, H. (2014). Gene therapy and DNA delivery systems. *International Journal of Pharmaceutics*, 459(1–2), 70–83.
- IQVIA. (2023). The Global Use of Medicines. <https://www.iqvia.com/insights/the-iqvia-institute/reports/the-global-use-of-medicines-2023>
- Jin, L., Zeng, X., Liu, M., Deng, Y. ve He, N. (2014). Current progress in gene delivery technology based on chemical methods and nano-carriers. *Theranostics* (C. 4, Sayı 3, ss. 240–255).
- Kalakenger, S., Yildiz Arslan, S., Turhan, F., Acar, M., Solak, K., Mavi, A. ve Unver, Y. (2023). Heterologous Expression of Codon-Optimized Azurin Transferred by Magnetofection Method in MCF-10A Cells. *Molecular Biotechnology*, 1-12.
- Lavertu, M., Méthot, S., Tran-Khanh, N. ve Buschmann, M. D. (2006). High efficiency gene transfer using chitosan/DNA nanoparticles with specific combinations of molecular weight and degree of deacetylation. *Biomaterials*, 27(27), 4815-4824.
- Lee, C. C., MacKay, J. A., Fréchet, J. M. J. ve Szoka, F. C. (2005). Designing dendrimers for biological applications. *Nature Biotechnology*, 23(12), 1517-1526.
- Li, C., Hu, J., Li, W., Song, G. ve Shen, J. (2017). Combined bortezomib-based chemotherapy and p53 gene therapy using hollow mesoporous silica nanospheres for p53 mutant non-small cell lung cancer treatment. *Biomaterials Science*. 5(1), 77-88.
- Li, L., Li, J., Hu, R., Zhang, X., Ding, L., Ren, G., Liu, W., Wang, H., Wang, B., Zhang, C. ve Diao, H. (2023). Tumor Cell Targeting and Responsive Nanoplatfom for Multimodal-Imaging Guided Chemodynamic/Photodynamic/Photothermal Therapy toward Triple Negative Breast Cancer. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 15(23), 27706–27718.
- Liu, Y., Shu, G., Li, X., Chen, H., Zhang, B., Pan, H., Li, T., Gong, X., Wang, H., Wu, X., Dou, Y. ve Chang, J. (2018). Human HSP70 Promoter-Based Prussian Blue Nanotheranostics for Thermo-Controlled Gene Therapy

- and Synergistic Photothermal Ablation. *Advanced Functional Materials*, 28(32), 1–12.
- Lobov, I. B., Renard, R. A., Papadopoulos, N., Gale, N. W., Thurston, G., Yancopoulos, G. D. ve Wiegand, S. J. (2007). Delta-like ligand 4 (Dll4) is induced by VEGF as a negative regulator of angiogenic sprouting. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(9), 3219–3224.
- Loh, X. J., Lee, T. C., Dou, Q. ve Deen, G. R. (2016). Utilising inorganic nanocarriers for gene delivery. *Biomaterials Science* (C. 4, Sayı 1, ss. 70–86).
- Mangraviti, A., Tzeng, S. Y., Kozielski, K. L., Wang, Y., Jin, Y., Gullotti, D., Pedone, M., Buaron, N., Liu, A., Wilson, D. R., Hansen, S. K., Rodriguez, F. J., Gao, G. D., Dimeco, F., Brem, H., Olivi, A., Tyler, B. ve Green, J. J. (2015). Polymeric nanoparticles for nonviral gene therapy extend brain tumor survival in vivo. *ACS Nano*, 9(2), 1236-1249.
- Martine, P. ve Rébé, C. (2019). Heat Shock Proteins and Inflammasomes. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(18), 4508.
- Michaud, S., Marin, R. ve Tanguay, R. M. (1997). Regulation of heat shock gene induction and expression during Drosophila development. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 53(1), 104–113.
- Mirault, M. E., Southgate, R. ve Delwart, E. (1982). Regulation of heat-shock genes: a DNA sequence upstream of Drosophila hsp70 genes is essential for their induction in monkey cells. *The EMBO journal*, 1(10), 1279-1285.
- National Cancer Institute. (2015). Types of Cancer Treatment - National Cancer Institute. İçinde National Cancer Institute (s. 368). <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types>
- Nguyen, T. L., Yin, Y., Choi, Y., Jeong, J. H. ve Kim, J. (2020). Enhanced Cancer DNA Vaccine via Direct Transfection to Host Dendritic Cells Recruited in Injectable Scaffolds. *ACS Nano*, 14(9), 11623–11636.
- NHGRI. (2023). National Human Genome Research Institute. 17 Ekim 2023 tarihinde erişildi, <https://www.genome.gov/>
- Nsairat, H., Khater, D., Sayed, U., Odeh, F., Al Bawab, A. ve Alshaer, W. (2022). Liposomes: structure, composition, types, and clinical applications. *Heliyon*.
- Peerzade, S. A. M. A., Qin, X., Laroche, F. J. F., Palantavida, S., Dokukin, M., Peng, B., Feng, H. ve Sokolov, I. (2019). Ultrabright fluorescent silica nanoparticles for in vivo targeting of xenografted human tumors and cancer cells in zebrafish. *Nanoscale*, 11(46), 22316–22327.

- Piehler, S., Dähring, H., Grandke, J., Göring, J., Couleaud, P., Aires, A., Cortajarena, A. L., Courty, J., Latorre, A., Somoza, Á., Teichgräber, U. ve Hilger, I. (2020). Iron Oxide Nanoparticles as Carriers for DOX and Magnetic Hyperthermia after Intratumoral Application into Breast Cancer in Mice: Impact and Future Perspectives. *Nanomaterials*, 10(6), 1016.
- Prabaharan, M. ve Mano, J. F. (2005). Chitosan-based particles as controlled drug delivery systems. *Drug delivery*, 12(1), 41-57.
- Qin, J. Y., Zhang, L., Clift, K. L., Hular, I., Xiang, A. P., Ren, B.-Z. ve Lahn, B. T. (2010). Systematic Comparison of Constitutive Promoters and the Doxycycline-Inducible Promoter. *PLoS ONE*, 5(5), e10611.
- Räsänen, M., Degerman, J., Nissinen, T. A., Miinalainen, I., Kerkelä, R., Siltanen, A., Backman, J. T., Mervaala, E., Hulmi, J. J., Kivelä, R. ve Alitalo, K. (2016). VEGF-B gene therapy inhibits doxorubicin-induced cardiotoxicity by endothelial protection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(46), 13144-13149.
- Saidi, Y., Finka, A., Chakhporanian, M., Zryd, J. P., Schaefer, D. G. ve Goloubinoff, P. (2005). Controlled expression of recombinant proteins in *Physcomitrella patens* by a conditional heat-shock promoter: A tool for plant research and biotechnology. *Plant Molecular Biology*, 59(5), 697–711.
- Schmidt, D. R., Patel, R., Kirsch, D. G., Lewis, C. A., Vander Heiden, M. G. ve Locasale, J. W. (2021). Metabolomics in cancer research and emerging applications in clinical oncology. *A Cancer Journal for Clinicians*, 71(4), 333–358.
- Shende, P., Bhandarkar, S. ve Prabhakar, B. (2019). Heat Shock Proteins and their Protective Roles in Stem Cell Biology. *Stem Cell Reviews and Reports*, 15(5), 637–651.
- Shoji, W. ve Sato-Maeda, M. (2008). Application of heat shock promoter in transgenic zebrafish. *Development Growth and Differentiation*, 50(6), 401–406.
- Stribley, J. M., Rehman, K. S., Niu, H. ve Christman, G. M. (2002). Gene therapy and reproductive medicine. *Fertility and Sterility* (C. 77, Sayı 4, ss. 645–657).
- Subik, K., Lee, J.-F., Baxter, L., Strzepek, T., Costello, D., Crowley, P., Xing, L., Hung, M.-C., Bonfiglio, T., Hicks, D. G. ve Tang, P. (2010). The Expression Patterns of ER, PR, HER2, CK5/6, EGFR, Ki-67 and AR by Immunohistochemical Analysis in Breast Cancer Cell Lines. *Breast Cancer: Basic and Clinical Research*, 4(1), 35-41.

- Tagde, P., Kulkarni, G. T., Mishra, D. K. ve Kesharwani, P. (2020). Recent advances in folic acid engineered nanocarriers for treatment of breast cancer. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 56, 101613.
- Traewachiwiphak, S., Yokthongwattana, C., Ves-Urai, P., Charoensawan, V. ve Yokthongwattana, K. (2018). Gene expression and promoter characterization of heat-shock protein 90B gene (HSP90B) in the model unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Science*, 272(October 2017), 107–116.
- Unver, Y., Sensoy Gun, B., Acar, M. ve Yildiz, S. (2021). Heterologous expression of azurin from *Pseudomonas aeruginosa* in the yeast *Pichia pastoris*. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 51(7), 723–730.
- World Health Organization. (2020). Estimated number of new cases. <https://www.iarc.who.int/>
- Xia, W., Bringmann, P., McClary, J., Jones, P. P., Manzana, W., Zhu, Y., Wang, S., Liu, Y., Harvey, S., Madlansacay, M. R., McLean, K., Rosser, M. P., MacRobbie, J., Olsen, C. L. ve Cobb, R. R. (2006). High levels of protein expression using different mammalian CMV promoters in several cell lines. *Protein Expression and Purification*, 45(1), 115-124.
- Yamaguchi, M., Ito, A., Ono, A., Kawabe, Y. ve Kamihira, M. (2014). Heat-inducible gene expression system by applying alternating magnetic field to magnetic nanoparticles. *ACS Synthetic Biology*, 3(5), 273–279.
- Yin, P. T., Shah, S., Pasquale, N. J., Garbuzenko, O. B., Minko, T. ve Lee, K.-B. (2016). Stem cell-based gene therapy activated using magnetic hyperthermia to enhance the treatment of cancer. *Biomaterials*, 81, 46–57.
- Yoshida, K., Kasai, T., Garcia, M. R. C., Sawada, S., Shoji, T., Shimizu, S., Yamazaki, K., Komeda, Y. ve Shinmyo, A. (1995). Heat-inducible expression system for a foreign gene in cultured tobacco cells using the HSP18.2 promoter of *Arabidopsis thaliana*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 44(3–4), 466–472.
- Zhao, Y., Zhao, T., Cao, Y., Sun, J., Zhou, Q., Chen, H., Guo, S., Wang, Y., Zhen, Y., Liang, X. J. ve Zhang, S. (2021). Temperature-Sensitive Lipid-Coated Carbon Nanotubes for Synergistic Photothermal Therapy and Gene Therapy. *ACS Nano*, 15(4), 6517–6529.
- Zwicke, G. L., Ali Mansoori, G. ve Jeffery, C. J. (2012). Utilizing the folate receptor for active targeting of cancer nanotherapeutics. *Nano Reviews*, 3(1), 18496.

## BÖLÜM 4

# İklim Değişikliğinin İzlenmesinde Briyofitlerin Su Tutma Özelliklerinin Değerlendirilmesi

Özcan ŞİMŞEK<sup>1</sup>

Kahraman SELVİ<sup>2</sup>

### GİRİŞ

Yirmi birinci yüzyılda küresel olarak gözlemlenen iklim değişiklikleri ve küresel ısınma, son yılların en önemli sorunlarından biridir. İklim değişikliği, ekolojik, çevresel, sosyo-politik ve sosyo-ekonomik disiplinlerin çeşitli bileşenleri üzerindeki etkisiyle hükümetler arası karmaşık bir sorun olarak öne çıkmaktadır. Özellikle sanayi devrimi ve diğer birçok etmenin katkısıyla iklim değişikliğinin etkileri hız kazanmıştır. Bu küresel sorunun yıkıcı etkilerini engellemek için iklim değişikliği konusuna dikkat çekmek ve acil adımlar atmak gerekmektedir. Artan bilgi düzeyi, farkındalık ve iklimsel belirsizlikler, yerel ve ulusal düzeydeki politikalara etki etmektedir. Bu sebeple iklim değişikliğinin etkilerini yalnızca sektörel bazda yorumlamak yeterli değildir (Abbas vd., 2022).

İklim değişikliği, uzun vadeli sıcaklık ve yağış eğilimleri ile çevrenin basınç ve nem seviyeleri gibi çeşitli bileşenlere dayanarak tanımlanır. Ayrıca düzensiz hava koşulları, küresel buz tabakalarının azalması ve buna bağlı olarak deniz seviyesindeki yükselme, iklim değişikliğinin en bilinen uluslararası ve yerel etkileri arasındadır. Sanayi devriminden önce, volkanlar, orman yangınları ve sismik faaliyetler gibi doğal kaynaklar, sera gazlarının atmosfere salınmasının farklı kaynakları olarak kabul edilirdi. Ancak sanayi devrimi ile birlikte insan faaliyetleri kaynaklı sera gazı salınımı ciddi oranda artmıştır. Birleşmiş Milletler İklim Değişikliği Çerçeve Sözleşmesi (UNFCCC), 12 Aralık 2015'te Paris'te düzenlenen Taraflar Konferansı'nda (COP-21), iklim değişikliğiyle mücadele etmek ve sürdürülebilir düşük karbonlu bir gelecek için gerekli eylem ve yatırımları hızlandırmak amacıyla geniş çaplı bir anlaşmaya varılmasını sağlamıştır. Paris Anlaşması, iklim değişikliğini önlemek ve etkilerine uyum

---

<sup>1</sup> Dr. Öğr. Üyesi; Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Yenice MYO Ormancılık Bölümü. ozcan.simsek@gmail.com ORCID No: 0000-0002-3210-7641

<sup>2</sup> Dr. Öğr. Üyesi; Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Yenice MYO Ormancılık Bölümü. kahramanselvi@gmail.com ORCID No: 0000-0002-6974-4441



sağlamak için önlemler almayı hedefleyen bir çaba olarak tüm ulusları bir araya getirmiştir (Abbas vd., 2022).

İklim değişikliğini azaltmaya yönelik politikalar artmasına rağmen, insan kaynaklı sera gazı emisyonları sanayi öncesi dönemden bu yana artmaya devam etmektedir. Küresel olarak ortalama 1,0 °C'lik bir ısınma rapor edilmiş olup bu seviyenin 2030 ile 2052 arasında 1,5 °C'ye ulaşması ve önemli bölgesel etkiler yaşanması beklenmektedir. Örneğin Kuzey Kutbu'nda küresel yıllık ortalamanın iki ila üç katı daha yüksek ısınma oranları beklenmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalar, iklim değişikliğinin biyolojik çeşitlilik üzerindeki olumsuz etkilerini kanıtlamış ve en kötü senaryolarda dünya tarihinde altıncı kitlesel yok oluş olarak nitelendirilebilecek yok olma oranlarına yol açacağını iddia etmektedir (Zanatta vd., 2020).

Habibullah vd. (2022), 115 ülkenin analiz edildiği çalışmalarında iklim değişikliğinin etkilerinin biyolojik çeşitliliğin kaybı üzerinde önemli bir rol oynadığını göstermiştir. Biyoçeşitlilik kaybı, yağış ve sıcaklıktaki değişimlerden etkilenirken doğal afet olaylarının sıklığından daha az etkilenmektedir.

Araştırmaları, bu etkilerin, ulusların daha yüksek ekonomik büyüme çabalarının bir sonucu olarak ortaya çıkan küresel ısınmayla ilişkili olduğunu ortaya koymuştur. Rosales'in (2008) "iklim değişikliğine bağlı biyolojik çeşitlilik kaybının ana itici gücünün ekonomik büyüme olduğu" sonucunu doğrulamışlardır. Ayrıca, ekonomik kalkınma düzeyinin biyolojik çeşitliliğin kaybına katkıda bulunduğunu tespit etmişlerdir. Bu nedenle, biyolojik çeşitliliğin etkili bir şekilde korunması için, ulusların çabalarını karbondioksit emisyonlarını azaltmak için kullanması gerektiği ve biyoçeşitlilik kaybından hükümetlerin yanı sıra finans sektörü gibi sektörlerin de sorumlu tutulması gerektiği vurgulanmıştır.

Shin vd. (2022), türlerin ve habitatların enerji ve su döngülerine, radyoaktif olarak aktif gazların ve aerosollerin tüketimine ve üretimine katkıda bulunduğunu ancak biyoçeşitliliğin korunmasına yönelik eylemlerin bu kritik role odaklanmadığına dikkat çekmiştir. Çalışmalarında, biyoçeşitlilik kaybını yavaşlatmayı, durdurmayı veya tersine çevirmeyi amaçlayan birçok koruma eyleminin aynı zamanda antropojenik kaynaklı iklim değişikliğini yavaşlatabileceğini göstermişlerdir. Ormansızlaşmanın önlenmesi ve ekosistemlerin eski haline getirilmesi, iklim değişikliğini hafifletme konusunda en büyük potansiyele sahip koruma eylemleri arasında yer almaktadır. Bu sebeple, biyoçeşitlilik ile iklim arasındaki ilişkinin tam anlamıyla anlaşılması için tam entegre göstergelerin, modellerin ve senaryoların geliştirilmesinin önemli olduğunu belirtmektedirler. Bu, karar verme süreçlerine ekosistem temelli bütünsel yaklaşımın entegre edilmesini kolaylaştırabilir.

## İKLİM DEĞİŞİKLİĞİNİN İZLENMESİ

Küresel iklim değişikliğinin etkileri arttıkça, bu konuya olan ilgi de giderek artmaktadır. Bu ilgi, atmosferdeki sera gazı konsantrasyonlarının artması sonucu beklenen küresel ısınma ile doğrudan ilişkilidir. Bu ilginin bir sonucu olarak, iklim değişikliği ile ilgili çeşitli sorular ortaya çıkmıştır. Örneğin, uzun vadeli iklim değişikliği nasıl tahmin edilebilir? Bu tahminler ne kadar doğru olacak? Değişikliklerin ciddiyeti ve kapsamı nasıl olacak? Eğer iklim değişikliği tahmin edildiği gibi gerçekleşirse, biyoçeşitlilik, ekosistemler ve habitatlar nasıl etkilenecek? Türler ve ekosistemler, iklim değişikliğine nasıl tepki verecek? Tüm bu soruların cevaplarına ulaşmak için küresel çapta araştırmalar devam etmektedir (Gignac, 2001).

Ekosistem işleyişi sürerken, hassas türleri ve habitatları korumak ve insanlar için iklim değişikliğine karşı doğa temelli çözümler geliştirmek acil bir ihtiyaçtır. Sera gazı emisyonlarını değiştirerek iklim değişikliğinin azaltılması üzerinde yönetimin potansiyel etkilerini göz önünde bulundurmak da önemlidir (Gignac, 2001).

Farklı arazi yönetimi gerekliliklerinden kaynaklanan potansiyel riskler ve sinerjiler göz önüne alındığında, karar alma sürecini optimize etmek için iklim değişikliği karşısında kara, tatlı su ve deniz politikası ve yönetimine farklı yaklaşımların etkilerine ilişkin kanıtlara ihtiyaç vardır. İhtiyaç duyulan kanıtlar, iklim değişikliği ile mücadeleye yönelik uygulamaların ve etkilerinin izlenmesiyle mümkün olabilir. Atmosferdeki sera gazlarının ölçümü ve izlenmesi daha kolay olsa da türlerin, habitatların ve ekosistemlerin bu müdahalelere veya iklim değişikliğine nasıl tepki verdiğinin izlenmesi daha zordur (Pearce-Higgins vd., 2022).

Çevresel izleme, farklı matrislerdeki (hava, su ve topraklar gibi) ortam kirleticilerinin (karbon monoksit, partikül madde, ozon, metaller, nitrojen oksitleri, uçucu organik bileşikler vb.) varlığını doğrulamak ve seviyelerini belirlemek için sıklıkla farklı izleme sistemleriyle yapılır. Ancak bu çevresel izleme araçları pahalıdır, düzenli yönetim gerektirir ve her alana uygulanamaz. Bu nedenle, ortamın daha iyi izlenebilmesi için tercihen non-invaziv ve daha gerçekçi yaklaşımlarla yenilikçi ve alternatif cihazlara ihtiyaç duyulmaktadır. Çevresel biyoizleme, yerel fauna ve floradaki organizmaların (biyomonitörler) farklı ortamlardaki kirleticilerin varlığı ve etkisi de dahil olmak üzere habitatlarıyla ilgili niteliksel/kantitatif bilgilerin toplanması için kullanılmasını içerir (Soares vd., 2023).

## İKLİM DEĞİŞİKLİĞİ VE BRIYOFİTLER

İklim değışikliği, bazı habitatları elverişsiz hale getirirken, aynı zamanda türlerin yeni uygun alanlara yerleşmesine de olanak tanıyabilir. Ancak, türlerin uygun habitat kaybını dengeleme yetenekleri konusunda tartışmalar bulunmaktadır (Gignac, 2001).

Biyozleme (biomonitoring), çevresel değışikliklerin uzun vadeli izlenmesi, değerlendirilmesi ve gözlemlenmesi için kullanılan bir sistemdir. Bazen bu terimle karıştırılan biyoindikatör ifadesi ise çevrenin kalitesi hakkında bilgi içeren canlı organizmaları, organizmanın bir parçasını veya belirli bir canlı grubunu tanımlamak için kullanılır. Biyoindikatörler, çevre kalitesi hakkında bilgi sağlarken, biyozleme çevrenin kalitesi hakkında niceliksel bilgi sunar. Bir biyomonitör aynı zamanda bir biyoindikatördür ancak her biyoindikatör bir biyomonitör olmayabilir (Şimşek ve Selvi, 2023).

Briyofitler, bitkilerin hemen hemen tüm karasal ve tatlı su ortamlarında yetişebilen bir grubudur. Bu ortamlar küresel dağılıma sahip olup, kalıcı buzların dışında neredeyse tüm iklim rejimlerinde bulunabilirler. Briyofitlerin başarısı, benzersiz ve etkili su ilişki sistemleri sayesinde farklı iklimlerde yaşayabilme yeteneklerinden gelir. Bu su ilişki sistemleri, su mevcut olduğunda büyümelerine, olmadığında ise metabolizmalarının durmasına izin verir (Gignac, 2001).

Çoğu cins ektohidriktir, yani suyu tüm yüzeyleriyle alırlar ve topraktan su çekmek için köklere ihtiyaç duymazlar. Ayrıca mineral besinleri, bitkilerle temas eden sudaki çözünmüş maddelerden tüm yüzeyleriyle alırlar. Briyofitler, su kaybını önlemek için kıllar, papillalar, ince tabakalar (lamella), fotosentetik yaprakları korumak için ölü hyalin yapraklar, kalın hücre duvarları ve yaprakların yönlendirilmesi gibi adaptasyonlar geliştirmişlerdir. Bu adaptasyonlar, kurumaya dayanma yeteneklerinde büyük farklılıklar yaratır ve yeniden canlandıktan sonra kuraklığa karşı dayanıklılık sürelerini etkileyebilir (Gignac, 2001).

Briyofitler, yaklaşık 450 milyon yıl öncesinden beri var olan bir canlı grubu olup, bu süre zarfında birçok yok olma sürecini başarıyla atlattımlardır (Bechteler vd., 2023). Bu özellikleri sayesinde briyofitler, geçmiş iklim değışiklikleri hakkında bilgi sağlayabilirler. İklim değışikliğinin briyofitler üzerindeki etkileri, büyüme üzerinde olduğú kadar, bireysel türlerin, toplulukların ve temsil ettikleri ekosistemlerin dağılımı üzerinde de görülebilir. Briyofitlerin iklim değışikliğinden etkilenmesi öncelikle gelişimlerinde görülebilir, ancak daha sonra habitatlarını terk etme şeklinde de ortaya çıkabilir. Belirli bir alanda veya bölgedeki bir türün gelişimini uzun süre izlemek, iklim değışikliğinin etkilerini gözlemlemek için önemlidir. Bu izleme için, seçilen türün o bölgedeki mezoklima ile ilişkisini anlamak amacıyla ön araştırmalar yapılması gereklidir. Briyofit türlerini veya topluluklarını izleyen çalışmalar, mezoklima tarafından

açıkça kısıtlanan bireysel türleri ve iklimsel olarak hassas habitatları gösterebilir. Bu çalışmalar, briyofit bitki örtüsünün bolluğunu ve dağılımını ölçmek ve haritalandırmak için kalıcı karelere ihtiyaç duyar. Bu kalıcı karelerin, tür kompozisyonundaki değişiklikleri belirlemek için yıllar sonra yeniden analiz edilmesi gerekir. İzleme çalışmalarının verimli sonuçlar verebilmesi için birkaç yıl boyunca bu analizlerin devam etmesi gerekebilir. Ancak, bu çalışmalar özellikle türlerin veya toplulukların dağılım sınırlarındaki iklim değişikliğinin etkileri hakkında değerli bilgiler sağlayabilirler (Gignac, 2001).

Briyofitlerin iletim sistemi bulunmaz. Suyun ve çözeltilerin dahili taşınmasını sağlayan basit dokulardan oluşan briyofitler, tundra veya bataklıklar gibi bazı ekosistemlerde önemli bir rol oynarlar. Özellikle Sphagnum gibi karayosunları, ortamdaki bolluklarıyla karbonun tutulmasına önemli katkılarda bulunabilirler. Ancak iklim değişikliğinin etkileri sıcak hava dalgaları, kuraklık, su seviyelerinde düşüşler ve yangınlar gibi olaylarla sonuçlanabilir. Son yıllarda, bu felaket olayları Kuzey Sibirya'nın donmuş topraklarında sıkça meydana geldiğinden donmuş zeminin stabilitesi etkilenmiş ve turbalıklar zarar görmüştür. Bu durum karbon depolama ve tutma dengesini etkileyebilir, karbon yutakları karbon kaynaklarına dönüşebilir. Bitki örtüsünün iklim değişikliğine tepkisi, bitki gruplarına bağlı olarak farklılık göstermektedir. Briyofitler, poikilohidrik özellikleri nedeniyle önemli zararlara maruz kalabilirler (Volkova vd., 2023).

Batı Sibirya'ya özgü turbalıklar da bu bağlamda iklim kaynaklı tehditlerle karşı karşıya olabilirler. Dünyanın en büyük karbon yutaklarından biri olan bu alanlarda yaşanan değişimler, karbon döngüsünü etkileyerek daha fazla çözülmüş karbon salınımına neden olabilir ve bu da daha sonra bakteriyel aktiviteyle CO<sup>2</sup>'ye dönüşebilir (Volkova vd., 2023).

## **BRİYOFİTLERİN SU TUTMA ÖZELLİKLERİ VE İKLİM DEĞİŞİKLİĞİ**

Su alımı, taşınması ve kaybı, toplulukların ve ekosistemlerin işleyişini tanımlamak için önemli özelliklerdir ve küresel iklim değişikliğinin bitkiler üzerindeki etkisini tahmin etmede faydalı araçlar olabilirler. Briyofitler poikilohidrik bitkilerdir ve fotosentezleri büyük ölçüde suyun mevcudiyetine bağlıdır. Fotosentez, su fazlalığına ve kıtlığına uyum sağlama stratejileri açısından türler arasında büyük farklılıklar gösterir. Geniş bir briyofit tür yelpazesi, su ilişkileri ile fotosentetik özellikler arasındaki ilişkilerin daha iyi anlaşılmasına katkıda bulunarak, bunların benzersiz ekofizyolojik adaptasyonlarına ve dolayısıyla bitki stratejilerinin genel prensiplerine dair önemli veriler sunabilir (Volkova vd., 2023). Briyofitlerin su içeriği büyük ölçüde dış ortamlarına bağlıdır ve sıcaklığın artması ve nemin düşmesi

durumunda bitkideki su hızla azalır. Su eksikliği kuraklık stresine neden olabilir, metabolik aktiviteyi ciddi şekilde azaltabilir ve doku hasarına yol açabilir. Briyofitlerin poikilohidrik özellikleri, topluluk içinde büyük miktarda su içeriğini tutma yeteneği verir. Kuru kütlelerinin %200 ila %3000'i kadar muazzam bir su hacmini tutabilirler (Volkova vd., 2023).

Briyofitlerin su tutma kapasitelerinin ölçülmesi için kullanılan metotlar genellikle bitkinin toprak, kabuk vs partiküllerden temizlendikten sonra doğal habitatından toplandığı taze ağırlığının ölçülmesi, bitkinin su içinde bekletilerek maksimum su almış haliyle ağırlığının ölçülmesi ve fırında kurutularak kuru ağırlığının ölçülmesi ile elde edilen değerlere dayanır. Belirli örnekleme noktaları seçildikten sonra bu alanlardan belirlenen miktarda ve belli zamanlarda briyofit örnekleri toplanarak ağırlıkları ölçülür ve bitkilerin in situ ağırlığı tespit edilir (Fw). Plastik poşetlerde laboratuvar ortamına getirilen briyofitler burada su dolu kaplar içinde bekletilerek maksimum seviyede su ile şişmeleri sağlanır. Bitkilerin üzerinde kalan su damlacıklarının uzaklaşması için belli bir süre (yaklaşık 10-20 dk) kurumaya bırakılır, dış yüzeyinde kalmış olan su tanecikleri bitkiden uzaklaştırılır. Bu işlemden sonra da bitkinin ağırlığı ölçülür ve kaydedilir (Sw). Sonrasında bitki örnekleri fırında (yaklaşık 60-80 °C'de) kurutulur. Kurutma süresi bitki türüne ve miktarına göre değişebilir. Genellikle 48-72 saat aralığında kurutma süresi uygulanır. İç suyunu tamamen kaybeden briyofitlerin kuru ağırlığı ölçülür ve kaydedilir (Dw). Bu veriler kullanılarak iki parametre elde edilir. Bitkinin taze ağırlığından kuru ağırlığı çıkarılarak arazideki su tutma miktarı belirlenir ( $Fw - Dw = WSC_f$ ). Bitkinin maksimum su ile şiştiği ağırlığından kuru ağırlığı çıkarıldığında ise kurutulmuş bitkinin maksimum su tutma kapasitesi belirlenir ( $Sw - Dw = WSC_d$ ).  $WSC_f$  bitkinin arazi koşulları altında maksimum su tutma kapasitesi hakkında bilgi sağlarken,  $WSC_d$  bitkinin su tutma kapasitesinin diğer araştırmalarla karşılaştırılması için önemli bir veri sağlar (Michel vd, 2013; Ah-Peng vd, 2017; Oishi, 2018).

Su seviyesindeki değişimleri belirlemek için damarlı bitkiler yerine briyofitlerin kullanılması daha avantajlı olabilir. Damarlı bitkiler gelişmiş kök sistemleri sayesinde suya ulaşabilirlerken, briyofitler bu avantaja sahip değildir ve bu nedenle su seviyesindeki değişikliklere daha duyarlıdır. Bu nedenle, briyofit türlerinin bileşiminde ve dağılımında yaşanan değişiklikler, ekosistemde olası değişiklikler konusunda uyarıcı sinyaller verebilir. Kuzey Alberta'daki hidrolojik olarak izole edilmiş bazı küçük turbalıklarda, yüzeyde serbest su bulunmaması bu sürecin zaten başladığını göstermektedir. Bu tür turbalıklarda yapılan bir briyofit izleme çalışması, ısınmanın damarlı bitki örtüsü üzerindeki potansiyel etkilerini belirleme konusunda da çok değerli sonuçlar verebilir (Gignac, 2001).

Orman ekosistemlerinde özellikle subalpin bölgelerde briyofitler önemli bir örtüş oranına erişebilirler. Subalpin bölgelerdeki sıcaklık, nemlilik, yağış gibi faktörler ve bu ormanların genellikle koniferlerden oluşması, briyofitlerin daha fazla yayılış göstermesine olanak sağlar. Bu ekosistemlerdeki briyofitler, yüksek su tutma kapasiteleri nedeniyle sis, yağmur, kar ve nemli havalardan elde ettikleri su ile toprağın neminin düzenlenmesinde önemli rol oynarlar (Oishi, 2018).

İklim değişikliği, subalpin bölgeler gibi yüksek rakımlı ekosistemlerin ısınmasıyla briyofitlerde tür kaybından ziyade yayılışın ve örtüşün azalmasına neden olabilir. Ayrıca, tür kompozisyonundaki değişiklikler, endohidrik taksonların ektohidrik taksonlara baskın hale gelmesine yol açarak toprağın madde döngüsü, nemlilik, mikrobiyolojik aktivite gibi özelliklerinin olumsuz etkilenmesine neden olabilir (Oishi, 2018).

Son yıllarda briyofitlerin biyolojik çeşitliliği, küresel çevresel değişiklikler nedeniyle tehlike altındadır. Avrupa'da, endemik briyofitlerin çoğu, önümüzdeki birkaç on yılda iklimde ciddi değişiklikler yaşanacağı tahmin edilen ve türlerin tükenme riski yüksek olan Akdeniz bölgesinde bulunmaktadır. Küresel ısınmanın bir sonucu olarak, özellikle yüksek enlemlerdeki kuzey ormanları, Alp biyomları ve tropik dağların yüksek rakımları gibi türlerin çok olduğu bölgelerde briyofit çeşitliliğinde önemli kayıplar beklenmektedir (He vd., 2016). Bu durum, briyofitlerin tuttuğu suyun karasal ekosistemdeki döngüsünü, atmosferik nemliliği, karbon ve diğer madde döngülerini olumsuz etkileyebilir.

## SONUÇ

İzleme çalışmaları, gösterge türlerin dağılımında ve bolluğunda meydana gelen değişikliklerin kesin olarak iklim değişikliğinden kaynaklandığını kanıtlamamaktadır. Özellikle yalnızca bir veya iki olayın gözlemlenmesi durumunda, bu değişimlerden sorumlu olabilecek birçok başka faktör bulunabilir. Ancak, bu değişiklikler bir bölge genelinde meydana gelirse, iklim değişikliklerinin etkisi olduğunu gösteren güçlü kanıtlar olabilir. Bu tür araştırmaların ilginç yanı, ekosistemde meydana gelecek daha büyük ölçekli değişikliklere erken uyarı sağlayabilme potansiyelleridir. Briyofitler, diğer iklim değişikliği analiz türlerinden elde edilen sonuçları tanımlama veya doğrulama ve gelecekteki iklim değişikliğinin ekosistemlerin dağılımı üzerindeki etkilerini öngörme amacıyla kullanılabilir. Ayrıca, iklim açısından hassas habitatlar ve ekosistemler nedeniyle, habitat veya ekosistemin kendisi etkilenmeden önce iklim değişikliğinin erken belirtileri olarak çeşitli olanaklar sunabilirler (Gignac, 2001).

Tüm bu biyolojik ve ekolojik özellikleri sayesinde briyofitler, ekosistemlerin önemli birer bileşeni ve ekosistem izleme çalışmalarında değerli birer kaynak

olarak kabul edilebilirler. Ekosistemlerin su döngüsünde oynadıkları rolün yanı sıra karbon tutma kapasiteleri, bu bitkilerin önemini daha da arttırmaktadır. Karbon döngüsünün iklim değişikliği üzerine etkileri ortadayken önemli karbon yutakları olan ve briyofitlerin yoğun olarak bulunduğu turbalıklar, su tutma kapasiteleri sayesinde ekosistemin anahtar rollerinden birini oynadıkları subalpin ormanlar, endemizm ve biyoçeşitliliğin yüksek seviyede olduğu Akdeniz bölgesi gibi önemli ekosistemlerin etkilenmesi küresel yok oluşu hızlandırabilecek etmenler olarak görülmektedir. Gezegende 450 milyon yıldan beri varlıklarını sürdüren briyofitler çok geniş alanlarda yayılış göstermekte ve çok çeşitli habitatlarda bulunabilmektedirler. Birçok yok oluş sürecini başarı ile atlattığı olan briyofitler, ekosistemdeki değişimlere yüksek yapılı bitkilere göre çok daha hızlı tepki verebilmektedirler. Bu özellikleri ile iklim değişikliği gibi ekolojik bozulmaya sebep olacak afetlerin etkilerini anlamada yararlı olabilecek ve erken uyarı sistemi olarak faydalanılabileceklerdir. Dolayısıyla, briyofitlerin ekolojik değişikliklerden nasıl etkilendiğinin daha iyi anlaşılmasına ihtiyaç vardır. Briyofitler üzerine yapılan araştırmaların artması, iklim değişikliğinin etkilerinin daha iyi anlaşılmasına ve gelecekteki senaryoların tahmin edilmesine katkı sağlayacaktır.

## KAYNAKLAR

- Abbass, K., Qasim, M. Z., Song, H., Murshed, M., Mahmood, H., & Younis, I. (2022). A review of the global climate change impacts, adaptation, and sustainable mitigation measures. *Environmental Science and Pollution Research*, 29(28), 42539-42559.
- Ah-Peng, C., Cardoso, A. W., Flores, O., West, A., Wilding, N., Strasberg, D., & Hedderson, T. A. (2017). The role of epiphytic bryophytes in interception, storage, and the regulated release of atmospheric moisture in a tropical montane cloud forest. *Journal of Hydrology*, 548, 665-673.
- Bechteler, J., Peñalosa-Bojacá, G., Bell, D., Burleigh, G., McDaniel, S.F., Davis, C., Sessa, E., Bippus, A., Cargill, C., Chantanaorrapint, S., Draper, I., Ee Lee, G., Endara, L., Forrest, L.L., Garilleti, R., Graham, S., Huttunen, S., Jauregui Lazo, J., Lara, F., Larraín, J., Lewis, L., Long, D., Quandt, D., Renzaglia, K.S., Schäfer-Verwimp, A., Michel Sierra Pinilla, A., von Konrat, M., Zartman, C., Goffinet, B., Carlos Villarreal, J.A., (2023). Phylogenomic time tree of bryophytes resolves 500 million years of diversification. <https://doi.org/10.22541/au.168295740.05040250/v1>
- Gignac, L. D. (2001). Bryophytes as indicators of climate change. *The bryologist*, 104(3), 410-420.
- Habibullah, M. S., Din, B. H., Tan, S. H., & Zahid, H. (2022). Impact of climate change on biodiversity loss: global evidence. *Environmental Science and Pollution Research*, 29(1), 1073-1086.
- He, X., He, K. S., & Hyvönen, J. (2016). Will bryophytes survive in a warming world?. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, 19, 49-60.
- Michel, P., Payton, I. J., Lee, W. G., & During, H. J. (2013). Impact of disturbance on above-ground water storage capacity of bryophytes in New Zealand indigenous tussock grassland ecosystems. *New Zealand Journal of Ecology*, 114-126.
- Oishi, Y. (2018). Evaluation of the water-storage capacity of bryophytes along an altitudinal gradient from temperate forests to the alpine zone. *Forests*, 9(7), 433.
- Pearce-Higgins, J. W., Antão, L. H., Bates, R. E., Bowgen, K. M., Bradshaw, C. D., Duffield, S. J., ... & Morecroft, M. D. (2022). A framework for climate change adaptation indicators for the natural environment. *Ecological indicators*, 136, 108690.
- Rosales J (2008) Economic growth, climate change, biodiversity loss: distributive justice for the global North and South. *Conserv Biol* 22(6):1409–1417.



- Shin, Y. J., Midgley, G. F., Archer, E. R., Arneeth, A., Barnes, D. K., Chan, L., ... & Smith, P. (2022). Actions to halt biodiversity loss generally benefit the climate. *Global change biology*, 28(9), 2846-2874.
- Şimşek, Ö., & Selvi, K. (2023). Briyofitlerin Sucul Ekosistemlerde Biyomonitör Olarak Kullanımları. *AS-Proceedings*, 1(2), 341-344.
- Soares, S., Delerue-Matos, C., & Oliveira, M. (2023). Climate change, air pollution, and risks to honeybees—a review of biomonitoring data. 18th International Conference on Environmental Science and Technology. Athens, Greece.
- Volkova, I. I., Volkov, I. V., Morozova, Y. A., Nikitkin, V. A., Vishnyakova, E. K., & Mironycheva-Tokareva, N. P. (2023). Water Holding Capacity of Some Bryophyta Species from Tundra and North Taiga of the West Siberia. *Water*, 15(14), 2626.
- Zanatta, F., Engler, R., Collart, F., Broennimann, O., Mateo, R.G., Papp, B., Munoz, J., Baurain, D., Guisan, A., Vanderpoorten, A., (2020). Bryophytes are predicted to lag behind future climate change despite their high dispersal capacities. *Nat. Commun.* 11, 5601.

## BÖLÜM 5

### Düzlemsel Yönelimli Sıvı Kristaller

Rıdvan KARAPINAR<sup>1</sup>

1- Prof. Dr.; Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi  
Nanobilim ve Nanoteknoloji Bölümü. rkarapinar@mehmetakif.edu.tr ORCID  
No: 0000-0002-4694-6876

#### 1. GİRİŞ

Sıvı kristallerin, günümüzde bilgisayar, televizyon, telefon ve otomobil kontrol panelleri gibi gösterge aygıtlarında, yine akıllı cam ve sensör gibi elektro-optik sistemlerinde kullanımı nedeniyle; bu tür malzemeler üzerinde yapılan araştırmalara yoğun bir ilginin olduğu gözlenmektedir. Bilindiği gibi, bir katı eridiğinde tek basamaklı bir faz geçişi yaparak izotropik sıvıya dönüşür. Ancak bazı organik maddeler bu tür bir geçiş yerine, birden fazla basamaklı faz geçişi gösterirler. İzotropik sıvıların akışkanlık özelliklerini ve kristal yapı katıların anizotropik fiziksel özelliklerini bir arada sergileyen ve termodinamik olarak kararlı faz gösteren bu tür maddeler sıvı kristaller olarak bilinmektedir (Pieranski, 2019).

Sıvı kristalli yapıyı daha iyi anlamak için basitçe bir kristal yapıyı gözden geçirelim. Bir kristalde atom, iyon veya moleküller üç boyutlu uzayda düzenli ve periyodik biçimde bir uzaysal düzenlenmeye sahiptir. Bu tür bir kristal örgüde fiziksel özelliklerin doğrultuya bağlı değişim göstermesi nedeniyle bir anizotropik davranış gözlenir. Örneğin kuvarz kristali üzerine düşen ışığı çift kırılmaya uğratarak optikçe anizotropi sergiler. Basit bir kübik örgüde küre biçimli atomlar örgünün köşelerinde bulunduğu, bu yapı bir konumsal düzene sahiptir. Bu kristal yapı ısıtıldığında konumsal düzenin bozulmasıyla, moleküllerin serbestçe hareket ettiği sıvı faza geçiş olur. Eğer kübik örgünün köşelerinde çubuk biçimli moleküller bulunursa, konumsal düzene ilaveten bir yönelimsel düzen ortaya çıkar. Bu kristal örgü ısıtıldığında, konumsal düzen ortadan kalksa bile, yönelimsel düzen hala mevcut kalır ve bu yönelimsel düzen ortamda anizotropik bir davranışa neden olur. Yönelmiş moleküllerden oluşan ve akışkanlık özelliği gösteren sıvı kristal faz türbid görünümündedir. Bu fazın daha da ısıtılması ile moleküller yönelim düzeni bozulur ve her madde için farklı bir sıcaklık noktası olan temizlenme sıcaklığında düzenin tümüyle yok olması sonucunda izotropik sıvı faza geçiş olur.

Sıvı kristal bir madde genellikle organik kimyasal bileşik olup, belirli bir sıcaklık aralığında çubuksu veya disk biçimli moleküllerden oluşur. Teknolojik uygulamalarda geniş bir sıvı kristal sıcaklık aralığına sahip maddeler tercih edilir. Bu amaçla farklı sıvı kristal faz sıcaklığı aralığına sahip bileşiklerin ağırlıkça belirli oranlarda karışımı ile oluşan bileşikler kullanılmaktadır. Sıvı kristaller oluşum biçimine bağlı olarak iki grupta incelenir. Ortamdaki sıcaklık değişimine bağlı olarak sıvı kristal fazlar sergileyen maddeler termotropik sıvı kristaller olarak adlandırılır ve bu tür maddeler özellikle görsel bilgi sunan ekran uygulamalarında kullanılmaktadır (De Jeu, 1980). Diğer taraftan, içinde bulunduğu bir çözücünün (örneğin su gibi) konsantrasyonuna bağlı olarak ortaya çıkan liyotropik sıvı kristaller ise çeşitli biyolojik sistemlerde gözlenmektedir. Bu tür maddeler özellikle hücre yapısının anlaşılmasında oldukça önemli bilgi vermektedir (Jia ve ç.a., 2022). Termotropik sıvı kristaller farklı moleküler düzenlenme biçimlerine bağlı olarak çok sayıda ara faz göstermekle beraber, bunlar arasında daha geniş kullanım alanına sahip olan nematik sıvı kristal (NSK) fazlardır (Karapınar, 2020). Son zamanlarda farklı ekzotik fazlar üzerine çalışmalar yapılmaktadır (Martinez-Raton ve Velasco, 2023).

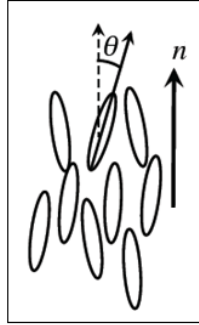
NSK ekranlar, yüksek görüntü kalitesi ve düşük enerji harcamaları nedeniyle çeşitli elektro-optik cihazlarda yaygın olarak kullanılmaktadır. NSK maddelerin gösterge amaçlı uygulamalarına ilaveten, telekomünikasyon sistemlerinde kullanımı gittikçe ilgi toplamaktadır. NSK maddelerin elektro-optik özellikleri üzerine çeşitli araştırmalar bulunmaktadır (Karapınar ve Gündüz, 1994; MacGregor, 1988; Van Aerle ve ç.a., 1993; Zhang ve ç.a., 2022). NSK ortamdaki moleküllerin yönelimi için uygulanan yüzey etkinlik işlemlerinin moleküllerin yönelme konumlarını nasıl etkilediği üzerine ileri sürülen teorilerde, genel olarak levha yüzeyleri ile moleküller arasında Van der Waals, hidrojen bağları, dipol-dipol etkileşimi gibi fiziko-kimyasal kuvvetlerin rol oynadığı belirtilmektedir (Kahn, 1972; Mei ve Higgins, 2000). Yine polarize ışık etkisiyle elde edilen yönelim tabakasındaki NSK moleküllerin optik davranışı incelenmiştir (Karapınar, 2015). NSK maddelerin çeşitli gösterge aygıtlarında kullanımı üzerine yapılan çalışmalar özellikle bükümlü NSK cihazların elektro-optik özellikleri üzerine yoğunlaşmış olup, tepki süresi, kontrast oranı ve uygulama voltajı gibi çeşitli fiziksel parametreler incelenmektedir. Yüksek verimli bükümlü NSK göstergenin yapımı gerçekleştirilmiştir (Guo ve Kwok, 2000). Bükümlü NSK filmin kutuplanmaya bağlı elektro-optik davranışı deneysel olarak incelenmiş ve bu tür sistemin ışık geçirgenliği uygulanan voltaja ve dalga boyuna bağlı olarak araştırılmıştır (Wang ve ç.a., 2004). NSK filmin elektrik alanındaki elektro-optik tepkisi Chen

ve Lee (2005) tarafından incelenmiştir. NSK filmin optik modülasyonu ve bununla ilgili çalışma mekanizması Merlin ve ç.a. (2005) tarafından incelenmiştir. Yine bükümlü NSK filmin bazı optiksel özellikleri inceleme konusu edilmiştir (Karapınar, 2017) Bu araştırmada, düzlemsel yönelimli NSK bir filmin elektro-optik özellikleri inceleme konusu edilmektedir.

## 2. NEMATİK SIVI KRİSTALLER

NSK fazda moleküllerin uzun eksenleri  $\mathbf{n}$  direktörü olarak bilinen bir yön vektörü boyunca dizilim eğilimi gösterir (Şekil 1). Nematik fazdaki moleküllerin ortalama yönelim doğrultusuna göre direktörün konumu  $S$  gibi bir düzen parametresi tanımlanır:

$$S = \frac{1}{2} \langle 3 \cos^2 \theta - 1 \rangle \quad (1)$$



Şekil 1: NSK ortamdaki moleküler düzenlenme.

Burada  $\theta$  bir molekülün uzun eksenine ile direktör arasındaki açıdır. İzotropik fazda direktör dağılımının rastgele olması nedeniyle  $S = 0$ 'dır. Kristal yapı gibi tümüyle mükemmel bir düzen için  $\theta = 0$  ve  $S = 1$ 'dir. Düzen parametresi nematik faz sıcaklık aralığında  $S = 0.3-0.8$  değerleri arasında değişir. Temizlenme sıcaklığında ( $T_c$ ) izotropik faza geçiş olması nedeniyle  $S = 0$  olur.  $S$  düzen parametresi ortamdaki sıcaklığın bir fonksiyonu olup,  $T < T_c$  için sıcaklığa bağlı olarak monoton olarak azalmaktadır. Nematik ortamın moleküler yapısına ve molekülün dipol momentine bağlı olarak tek boyutlu veya iki boyutlu düzenlenmeler gözlenmektedir. Moleküller arası uzun menzilli etkileşimleri açıklayan çeşitli kuramsal modeller bulunmaktadır. NSK maddenin optik özellikleri bir polarize mikroskop yardımıyla incelenmektedir. Uygun hazırlanmış NSK film çapraz polarizör sistemi altında mikroskop ile incelendiğinde nematik fazı belirleyen kendine özgü desenler gözlenir. Burada, nematik madde üzerine düşen polarize ışık, ortamın çift kırıcı olması nedeniyle,

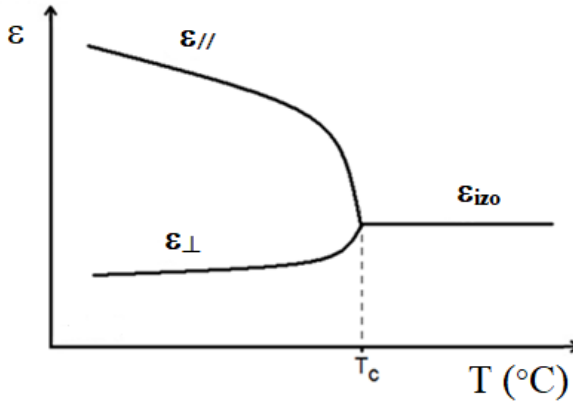
olağan ve olağan üstü iki bileşene ayrılır. Bu bileşenler birbirlerine dik olarak kutuplanmış olup, aralarında bir faz farkı bulunmaktadır. Bu doğrusal kutuplanmış ışınlar girişim yaptığıında eliptik kutuplanmış ışık meydana gelir. Bu eliptik kutuplanma gelen ışığın dalga boyuna bağlı olarak değiştiğinden, ortamda farklı renklerin ortaya çıkmasına yol açar. Bu durum sıvı kristallerin sıcaklığa bağlı olarak farklı fazlarda, farklı moleküler düzenlenmelere karşılık gelen kendine özgü desenlerin gözlenme nedenini açıklamaktadır. Çeşitli sıvı kristal fazlara ait ilginç yapısal desenler Demus ve Richter (2003) tarafından ayrıntılı olarak incelenmiştir.

NSK maddeler akışkanlık özellikleri göstermekle beraber, vizkoziteleri olağan sıvılarınkinden daha büyüktür ve sıvının akış yönüne bağlı olarak anizotropik bir davranış göstermektedir. Tipik bir nematik bileşik için vizkozite değeri oda sıcaklığında 400 mPa.s değerinde olabilir. NSK malzemeler arasında düşük vizkoziteye ve yüksek temizlenme sıcaklığına sahip bileşikler olarak sikloheksan bileşikler kullanılmaktadır.

NSK maddeler kristal yapıları katılar gibi optiksel olarak anizotropik maddelerdir. Molekülün optik eksen doğrultusuna göre yönelimine ve molekül yapısına bağlı olarak olağan kırılma indisi ( $n_o$ ) ve olağanüstü kırılma indisi ( $n_e$ ) olmak üzere iki kırılma indisi ile tanımlanır. Optik eksenin direktöre paralel olması halinde madde çiftkırıcı özellik göstermez. Ancak diğer doğrultularda çiftkırıcı davranış sergiler. Çiftkırıcılık, moleküldeki etkin elektron sayısına bağlı olarak değişir. Kırılma indisleri arasındaki fark  $\Delta n = n_e - n_o$  ifadesi ile tanımlanır. Pozitif çiftkırıcı nematik maddeler için tipik  $\Delta n$  değerleri 0.05 - 0.45 arasında değişir. Görsel amaçlı uygulamalarda arzu edilen  $\Delta n$  değerlerini elde etmek için özel kimyasal yapıya sahip bileşikler sentez edilmektedir. Örneğin gösterge devrelerinde yaygın olarak kullanılan bileşikler arasında yer alan E7 karışımı üç siyanobifenil ve bir siyanoterfenil içeren bir karışımdır. Kol saati ve hesap makinesi gibi basit bükümlü nematik göstergelerin yapımında oldukça yaygın olarak kullanılan maddedir. Bu maddenin erime noktası  $-10\text{ }^\circ\text{C}$  temizlenme sıcaklığı  $+61\text{ }^\circ\text{C}$  ve vizkositesi 39 cSt ( $20\text{ }^\circ\text{C}$ 'de) olup, çiftkırıcılığı 0,225 değerindedir. Nematik faz aralığını genişletmek için kullanılan bileşiklerin sayısının artması vizkoziteyi artırmaktadır. Çok bileşenli eutektiklerin üretimi deneysel açıdan problemler taşımaktadır. Karışım içindeki bileşenlerin seçimi bu açıdan önemlidir. Tipik bir NSK bileşik için eşik voltajı 1.50 V olup, doygunluk voltajı 1.96 V değerindedir. Bir NSK ekranı bir güç kaynağı ile çalıştırabilmek için, eşik değerinden ziyade bir doygunluk voltajı gereklidir.

NSK ekranın çalışma ilkesini anlamak için, optik özelliklere ilaveten dielektrik ve esneklik özelliklerinin bilinmesi gerekir. Dielektrik özellikler

maddeye elektrik alan uygulandığında, esneklik özellikler ise bir mekanik kuvvet uygulandığında önemli rol oynar. Her iki etki direktörün yönelimini değiştirmeye zorlar. NSK moleküller dipol davranışı sergiler, yani molekülün bir ucu pozitif yüke diğer ucu negatif yüke sahiptir. Bir elektrik alan etkisiyle dipolün pozitif ucu alan boyunca, negatif ucu ise zıt doğrultuda olacak şekilde yönelir. Oysa, katılarda dipoller kristal örgüye çok sıkı bağlıdır. Sıvılarda ise moleküllerin termal hareketleri dipol yönelimlerini etkiler. NSK ortamın kısmen düzenli ve esnek yapısı dipollerin uygulanan alanla etkileşmesine neden olur. Bu durum NSK ortamdaki elektro-optik olayların temelini oluşturur. Dielektrik sabiti elektrik alan ile nematik madde arasındaki etkileşiminin bir ölçüsüdür. Nematik madde uygulanan elektrik alanının molekül yönelimine paralel ve dik olmasına bağlı olarak paralel ( $\epsilon_{//}$ ) ve dik ( $\epsilon_{\perp}$ ) olmak üzere iki dielektrik sabiti ile tanımlanır. NSK bileşiğin dielektrik sabitleri sıcaklığın fonksiyonudur (Şekil 2). Dielektrik sabiti sıcaklıkla azalır ve madde izotropik faza geçtiğinde yalnızca tek bir sabitle tanımlanır ( $\epsilon_{izo}$ ).



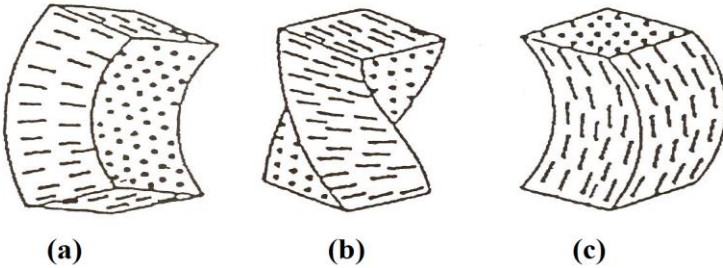
**Şekil 2:** NSK bileşiğin dielektrik sabitinin sıcaklıkla değişimi.

Dielektrik anizotropi, yani  $\Delta\epsilon = \epsilon_{//} - \epsilon_{\perp}$  niceliği bazı bileşikler için pozitif, bazı bileşikler için negatif değerler alır. Eğer NSK ortamın moleküler eksen boyunca olan polarizebilitesi eksene dik olan doğrultudaki değerinden büyük ise, yani  $\Delta\epsilon = \epsilon_{//} - \epsilon_{\perp} > 0$  ise, nematik moleküller elektrik alanına paralel,  $\Delta\epsilon < 0$  ise moleküller elektrik alanına dik olarak yönelir. Her iki yönelim için serbest elektriksel enerji terimi ( $\Delta\epsilon E^2$ ) minimum olur. Birçok nematik madde için  $\Delta\epsilon$  değeri 10 ile +50 arasında değişmektedir. Temizlenme sıcaklığı üzerindeki sıcaklıklarda optik ve dielektrik anizotropi gözlenmez. Bu durumda

düzen parametresi sıfır olur. Görsel amaçlı cihazlarda temizlenme sıcaklığı yüksek olan nematik bileşikler tercih edilir. Bifenil bileşiklerin temizlenme sıcaklığı artan zincir uzunluğu ile değişim gösterir. Öyle ki çift zincirli bifenil karışımları tek zincirli karışımlardan yaklaşık 10 °C daha düşük N-I faz geçişi sıcaklığına sahiptir. Yine kısa alkil zincirine sahip bifenillerin erime sıcaklığı daha yüksektir.

Çok sayıda NSK madde diamanyetik özellik sergiler. Manyetik alan uygulandığında molekülün yapısındaki aromatik halkalarda ortaya çıkan dairesel akımlar diamanyetizma etkisine neden olmaktadır. Diamanyetik alınganlık manyetik alanın direktöre paralel veya dik olmasına bağlı olarak değişmektedir.  $\Delta \chi = \chi_{||} - \chi_{\perp}$  ise direktör manyetik alana paralel yönelir. Benzer şekilde, NSK maddenin esneklik özellikleri anizotropik davranış göstermektedir. Nematik ortama mekanik bir kuvvet veya bir dış alan uygulandığında, ortamdaki esneklik kuvvetler geri çağırıcı bir tepki gösterir. NSK ortamda gözlenen başlıca esneklik şekil değişimleri açılma, burulma ve eğilme türü olup, bu değişimler sırasıyla  $K_{11}$ ,  $K_{22}$  ve  $K_{33}$  esneklik sabitleri ile tanımlanmaktadır. NSK ortamdaki şekil değişimleri Şekil 3’de gösterilmektedir. Esneklik sabitlerinin büyüklükleri genellikle  $10^{-12}$  N mertebesindedir. Gösterge cihazları için  $K_{33}/K_{11}$  oranı önemli bir parametredir ve 0.5 ile 2 arasında değişir. Uygulanan elektrik alanın eşik alanı değerinin üzerinde olması durumunda, nematik madde iç enerjisinin minimum olduğu denge durumuna gelme eğilimi gösterir. Ortamın birim hacimdeki serbest enerjisi aşağıdaki bağıntısı ile verilir. Burada  $\mathbf{n}$  nematik direktör,  $K_{11}$  açılma,  $K_{22}$  burulma ve  $K_{33}$  eğilme türü esneklik sabitleridir.

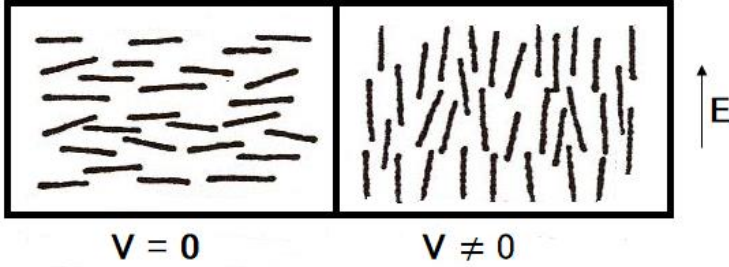
$$E = 1/2[K_{11}(\nabla \cdot \mathbf{n})^2 + K_{22}(\mathbf{n} \cdot \nabla \times \mathbf{n})^2 + K_{33}(\mathbf{n} \times \nabla \times \mathbf{n})^2] \quad (2)$$



**Şekil 3:** Nematik sıvı kristal ortamda (a) açılma, (b) burulma ve (c) eğilme türü esneklik şekil değişimleri

### 3. DÜZLEMSEL YÖNELİMLİ NEMATİK SIVI KRİSTALLER

NSK bir ortamdaki moleküler yönelimin bir elektrik alan tarafından değişebilmesi ve bu tür ortamların anizotropik optik özelliklere sahip olması, çeşitli elektro-optik olayların ortaya çıkmasına neden olur. NSK maddenin elektrik alanı ile uyarılması durumunda, ortam sürekli ve anizotropik olarak ele alınır. Elektrik alan uygulanması sonucunda ortamda esneklik şekil değişikliği meydana gelir. Bu etki elektrik alanın zayıf şiddetlerinde gözlenmez. Ancak elektrik alanı belirli bir eşik değerinin üzerinde ise, nematik moleküller orijinal konumdan sapmaya başlar ve daha şiddetli alan durumunda ise uygulanan alana paralel olarak yönelir (Şekil 4).



Şekil 4: NSK ortamda moleküler yönelim.

Molekülün konumunda bir değişiklik yapmak için gerekli mekanik şekil değişikliğine karşı gelen serbest enerji yoğunluğu

$$F_e = -\Delta\epsilon E^2/8\pi \quad (3)$$

ifadesi ile verilir. Burada  $\Delta\epsilon$  dielektrik sabitindeki anizotropi,  $E$  ise elektrik alan şiddetidir. Elektrik alan uygulandığında, nematik maddenin pozitif veya negatif anizotropiye sahip olması durumuna bağlı olarak, moleküller alana paralel veya dik olarak yönelir. Uygulanan elektrik alanın değeri, ortamın esneklik ve dielektrik sabitlerine bağlı olarak aşağıdaki bağıntıyla verilir:

$$E_c = (\pi/d)[K_{ii}/\Delta\epsilon]^{1/2} \quad (4)$$

Burada  $K_{ii}$  esneklik sabitleri,  $\Delta\epsilon$  dielektrik anizotropi ve  $d$  ise nematik filmin kalınlığıdır.

NSK ortamda düzlemsel bir yönelim elde edilerek oluşan film çapraz polarizör sistemi arasına yerleştirip elektrik alanı uygulandığında, ortamdaki geçen ışığın optik özelliklerinde bir değişim gözlenir. Bu tür bir filmde geçen ışık şiddeti ( $I$ ) aşağıdaki bağıntı ile verilir:

$$I = I_0 \sin^2(2\theta) \sin^2(\Delta\Phi/2) \quad (5)$$

burada



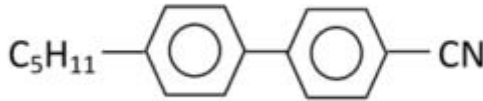
$$\Delta\Phi = \frac{2\pi}{\lambda} d|\Delta n| \quad (6)$$

ile verilir. Burada  $I_0$  gelen ışık şiddeti,  $\lambda$  ışığın dalga boyu,  $d$  filmin kalınlığı,  $\Delta n$  ise direktör yönelimi ile polarizörün geçirgenlik eksenindeki arasındaki açıdır.

Genel olarak gösterge amaçlı cihazlarda yaygın olarak bükümlü nematik filmler tercih edilmektedir. NSK maddenin bulunduğu yüzeylerin birbirlerine göre  $90^\circ$  konumlandırılması ile oluşan bükümlü NSK filme elektrik alan uygulandığında, ortamdaki bükümlü yapının bozulması sonucu, geçen ışığın optik özellikleri değişime uğramaktadır. Bu tür filme düşen ışık bükümlü yapıyı takip ederek filminden ayrılır. Bu durumda film saydam görünür. Ancak elektrik alan uygulandığında, moleküler yönelim değişmesi sonucu çapraz polarizör sistemi arasındaki filminden ışık geçişi mümkün olmaz ve film karanlık görünüm alır. Böylece elektrik alan etkisiyle aydınlık ve karanlık halleri arasında geçiş yapan bir elektro-optik etki meydana gelir.

#### 4. DÜZLEMSEL YÖNELİMLİ NSK FİLMİN İNCELENMESİ

NSK olarak 5CB kısaltma adı ile bilinen 4-siyano-4'-pentilbifenil bileşiği inceleme konusu edilecektir (Şekil 5). Genel olarak siyanobifenil bileşikler, hem kimyasal olarak ve hem de ışığa karşı kararlı tepkileri olan bileşiklerdir. Bu maddeler oda sıcaklığında nematik faz göstermeleri ve kısa yanıt sürelerine sahip olmaları nedeniyle çeşitli elektro-optik gösterge cihazlarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu maddenin katı fazdan nematik faza geçiş sıcaklığı (K-N)  $T = 23^\circ\text{C}$  olup, nematik fazdan izotropik faza geçiş sıcaklığı (N-I) ise  $T = 34^\circ\text{C}$ ' dir.

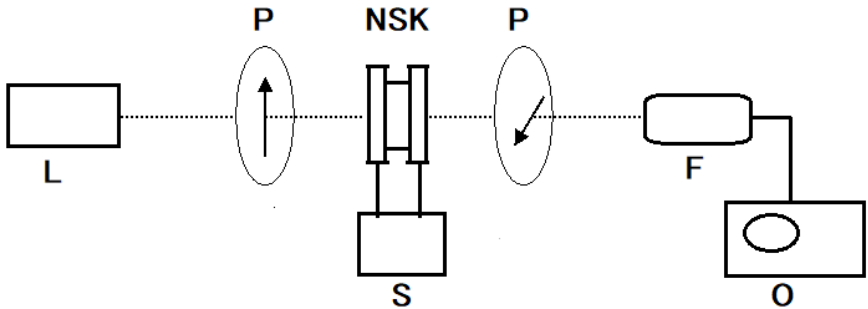


Şekil 5: NSK bileşiğinin molekül yapısı

NSK filmin elektro-optik özelliklerinin incelenmesinde, iletken film kaplı cam levha yüzeylerine moleküllerin paralel yönelimini sağlayabilmek için sürtme işlemi uygulanmaktadır. Genel olarak seri üretim amaçlı olarak polimer kaplı iletken levha yüzeyleri üzerinde kadife kumaş sarılmış bir silindirin sabit hızla dönmesi ile sürtme işlemi uygulanır. Burada silindirin dönme hızı, kumaş tipi ve polimer türü gibi parametreler sürtme işlemi etkileyen parametrelerdir. Polimer kaplı cam levha yüzeyindeki sürtme işleminin etkisi çeşitli

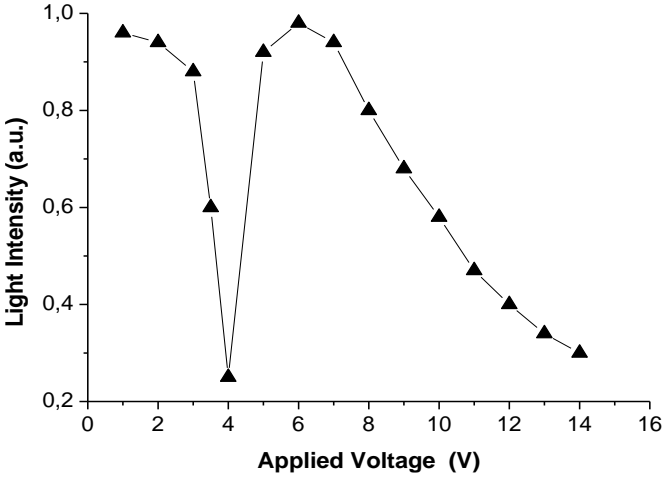
araştırmacılar tarafından incelenmiştir (Van Aerle ve .a., 1993). Bu olayın açıklanmasında ne sürülen görüş, NSK moleküllerinin serbest enerjilerinin minimum olduğu denge durumuna gelmek üzere sürtme işlemi sonucu levha yüzeyinde oluşan mikroskobik yivler boyunca dizilim eğilimi göstermesidir. NSK filmin kalınlığı cam levhalar arasına konulan ince Mylar şeritler ile sağlanır. Kalınlığı  $d = 13 \mu\text{m}$  olan NSK filmdeki moleküllerin yönelim durumu polarize mikroskop yardımıyla incelenmektedir. NSK filmin elektro-optik davranışı bir optik sistem ile yapılmaktadır (şekil 6). NSK filme bir sinyal reteci yardımıyla (S) AC gerilim uygulanır. Polarizör sistemi (P) arasındaki NSK filmde geçen lazer işığı (L) ( $\lambda = 633 \text{ nm}$ ) bir fotodedektör (F) aracılığı ile osiloskop ekranı (O) zerinde analiz edilmektedir.

NSK filme uygulanan sürtme işlemi doğrultusu polarizrlerden birisinin geçirgenlik eksenini boyunca olacak biçimde seçildiğinde, filmdeki optik eksen doğrultusunun sürtme doğrultusu boyunca olduğu gözlenmektedir. Deneyde NSK film moleküllerinin yönelim doğrultusu polarizörün geçirgenlik eksenini ile 45 derecelik bir açıyla konumlanmıştır.



**şekil 6:** Işık geçişi deneyi için optik sistem.

Düzlemsel yönelimli NSK filmde geçen ışık şiddetinin uygulanan voltaja bağlı davranışı şekil 7’de gösterilmektedir. 500 Hz sinüzoidal AC voltaj uygulanarak elde edilen normalize edilmiş ışık şiddetinin değişimini incelendiğinde, belirli voltaj değerlerinde ışık şiddetinin minimum değerler aldığı gözlenmektedir. Moleküler yönelim NSK filmin anizotropisini değiştirir. Voltaja bağlı optik geçirgenlik moleküler yönelime bağlı değişim göstermektedir.  $V > 4$  volt değerinde moleküllerin elektrik alan tarafından yeniden yönelime maruz kalmaları sonucu optik anizotropi minimum değer almaktadır. Daha yüksek voltajlarda olağan ve olağanüstü işınlar arasındaki faz farkının azalmasına bağlı olarak ışık geçirgenliği azalmaktadır.



**Şekil 7:** NSK filmden geçen ışık şiddeti.

Sonuç olarak nematik sıvı kristal maddelerin elektro-optik özellikleri ve çeşitli teknolojik aygıtlarda kullanımı üzerine yoğun araştırmalar yapılmaktadır. Bu tür elektro-optik aygıtlarda yaygın olarak düzlemsel yönelimli nematik sıvı kristal filmler kullanılmaktadır. Düzlemsel nematik sıvı kristal filmlerin fiziksel özellikleri, özellikle elektrik alan etkimeli ışık geçirgenliği görsel amaçlı aygıtların çalışma ilkesini oluşturmaktadır.

## KAYNAKLAR

- De Jeu, W. H. (1980). *Physical Properties of Liquid Crystalline Materials*, Gordon and Breach.
- Chen, H., Y., Lee, W. (2005). Electro-optical characteristics of a twisted nematic liquid-crystals cell doped with carbon nanotubes in a dc electric field. *Optical Review*, **12** (3):223-225.
- Demus, D., Richter, L. (2003). *Textures of Liquid Crystals*, Wiley-Vch Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
- Guo, L.X., Kwok, H.S. (2000). High performance transmittive bistable twisted nematic liquid display. *Jpn. J. Appl. Phys.*, 39:1210-1216.
- Jia, TZ., Bellini, T., Clark, N., Fraccia, TP. (2022). A liquid crystal world for the origins of life. *Emerg. Topics Life Sci.* 6(6): 557-569.
- Kahn, F.J. (1972). Orientation of liquid crystals by surface coupling agents. *Appl. Phys. Lett.*, 22:386-388.
- Karapınar, R, Gündüz, E. (1994). An acousto-optic modulator with a liquid crystal. *Optics Communications*, 105: 29-32.
- Karapınar, R. (2015). Photoalignment method in PVCi film. *AASCIT Communications*, 2, 18 23.
- Karapınar, R. (2017). Bükümlü Nematik Sıvı Kristal Aygıtlar, The Journal of Graduate School of Natural and Applied Sciences of Mehmet Akif Ersoy University, 8 (1): 268-275.
- Karapınar, R. (2020). Termotropik Mezofaz Geçişleri, Fen ve Matematik Bilimleri Teori, Güncel Araştırmalar ve Yeni Eğilimler, Ivpe, Cetinje-Montenegro.
- MacGregor, A.R. (1988). Modeling of the optical properties of twisted nematic guest-host liquid crystals. *J. Phys.D: Appl. Phys.*, 21:1438-1446.
- Martinez-Raton, Y., Velasco, E., 2023. Exotic liquid crystalline phases in monolayers of vertically vibrated granular particles, *Liquid Crystals*, 50, 7–10, 1261–1278
- Mei, E., Higgins, D. A. (2000). Nanometer-scale resolution and depth discrimination in near-field optical microscopy studies of electric-field-induced molecular reorientation, *Dynamics*, *Journal of Chemical Physics*, 112: 7839-7847.
- Merlin, J., Chao, E., Winkler, M., Singer, K.D. (2005). All-optical switching in a nematic liquid crystal twist cell. *Optics Express*, 13 (13):5024-5029.
- Pieranski, P. (2019). Pierre-Gilles de Gennes: Beautiful and mysterious liquid crystals, *Comptes Rendus Physique*, 20, 7–8, 756-769.

- Van Aerle, N. A. J., Barmantlo M., Hollering, R. (1993). Effect of rubbing on the molecular orientation within polyimide orienting layers of liquid crystal displays, *J.Appl. Phys.*, 74(5)1.
- Wang, Q.H., Wu, T.X., Zhu, X., Wu, S.T. (2004). Achromatic polarization switch using a film-compensated twisted nematic liquid crystal cell. *Liq. Cryst.*, 31:535-539.
- Zhang, Y., Zhao, X., Zhao, Y., Guo, Z., Gao, J., Ma C Zhao, Y. (2022). Investigation of electro-optical properties in bistable liquid crystal films doped with Cs x WO 3 nanorods. *Liq. Cryst.* 49(14): 1926-1932.

## BÖLÜM 6

# Kurkumin Yüklü Siklomatriks Polifosfazen Mikrokürelerin Sentezi, Karakterizasyonu ve Floresans Özellikleri

Simge METİNOĞLU ÖRÜM<sup>1</sup>

*1- Doç. Dr.; Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Fen Edebiyat  
Fakültesi Kimya Bölümü. simge.metinoglu@gmail.com ORCID No:  
<https://orcid.org/0000-0003-4166-4973>*

### Özet

Yeni, yüksek oranda çapraz bağlı ve floresans özellikli polifosfazen mikroküreler, tek adımlı bir polikondenzasyon reaksiyonu ile sentezlendi. Elde edilen mikroküreler, SEM, EDX, FTIR, XRD ve UV-gör teknikleri ile karakterize edildi. Ayrıca, antikanser özelliğe sahip kurkumin mikrokürelere yüklendi ve mikrokürelerin ilaç yükleme yüzdesi %75,80 olarak hesaplandı. Mikrokürelerin floresans özellikleri araştırıldı. Sentezlenen mikroküreler, 470 nm dalga boyunda uyarıldığında hem katı halde hem de etanolde floresans emisyonları gösterdi. Mikrokürelerin 60 dakika boyunca foto sönmelenmeye karşı dirençli olduğu belirlendi. Floresans ışınması için optimum pH'ın 8,0 olduğu tespit edildi. Sentezlenen mikroküreler, orijinalikleri, kurkumin içermeleri ve floresans özellikleri sayesinde, kanser tedavisi için kurkuminin taşınması ve floresans görüntülenmesi amacıyla kullanılabilme potansiyeline sahiptir. Ayrıca, diğer sensör uygulamaları için de kullanılabilceği düşünülmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Polifosfazen, Mikroküre, Floresein, Kurkumin, Floresans

### GİRİŞ

Polifosfazenler, inorganik-organik hibrit moleküler yapıları ve çeşitli fonksiyonel özellikler kazanabilmeleri nedeniyle çok yönlü makromolekül sınıflarından biridir. Bu bileşikler yapılarında heksaklorosiklotrifosfazen halkasına (HCCP, trimer) ait tekrarlayan  $-P=N-$  grupları içerir. HCCP'de fosfor atomlarına bağlı klor atomları, amino, hidroksil veya tiyol grupları ile yer değiştirebilir (Ahmad vd., 2022, Ogueri vd., 2020). Siklomatriks polifosfazenler ise HCCP ile iki veya daha fazla fonksiyonel gruba sahip organik bileşikler

arasındaki çöktürme polimerizasyonu reaksiyonu ile sentezlenen ve yüksek oranda çapraz bağlı yapıya sahip polifosfazen sınıfıdır. Siklomatriks polifosfazen küreler, tek adımlı bir polikondenzasyon reaksiyonu ve eşzamanlı kendiliğinden birleşme prosedürü yoluyla kolayca elde edilebilir (Mehmood vd., 2020, Wan ve Huang, 2017). Çapraz bağlı yapıya katılan monomerler, kürelere farklı özellikler kazandırır ve bu sayede oluşan nano/mikroküreler kontrollü ilaç salımı (Onder ve Ozay, 2021, Mehmood vd., 2023), organik azo boyaların/metallerin adsorpsiyonu (Onder ve Ozay, 2021, Ma vd., 2020), alev geciktirme (Guo vd., 2019, Zhang vd., 2021), kataliz (Ahmad vd.,2022, Basharat vd.,2020), floresans sensörleri (Basharat vd.,2019, Hong vd., 2018), hücre görüntüleme (Meng vd., 2015, Akram vd., 2020) gibi birçok uygulama için kullanılabilir.

Son yıllarda, floresans malzemelere olan ilgi oldukça artmış ve kuantum noktaları (QDs) (Assi vd., 2023), karbon noktaları (Xu vd., 2023), nanokabuklar (Zhai vd., 2017), organik floresans boyalar (Tian vd., 2023) ve boya katkılı nanoparçacıklar (Saita vd., 2023) gibi birçok floresans özellikli materyal sentezlenmiştir. Ancak, bu floresans özellikli materyallerin toksisitesi ve kimyasal kararsızlığı pek çok uygulamada kısıtlamalara neden olmaktadır. Örneğin, kuantum noktaları, ağır metal bileşenleri nedeniyle potansiyel toksisiteye sahiptir. Organik floresans boyaların da hidrofobiklik, konsantrasyon-sönümlenme etkisi, oksijen varlığında zayıf fotokararlılık ve bulundukları sistemlerden dışarı sızma gibi kısıtlamaları mevcuttur (Sun vd., 2015). Öte yandan, siklomatriks polifosfazenler, yüksek derecede çapraz bağlı yapı (Zhu vd., 2007), su ve organik ortamlarda dispers olabilme (Hu vd., 2013), biyobozunurluk (Wang vd., 2021) ve biyoyumluluk (Yan vd., 2021) gibi üstün özelliklere sahiptir. Son on yılda, floresans özellikli siklomatriks polifosfazen küreler sentezlenerek (Hong vd., 2018, Pan vd., 2012, Li vd., 2011), nitroaromatik patlayıcılar (Wei vd., 2012),  $Fe^{3+}$ ,  $Hg^{2+}$  iyonları (Chen vd., 2020, Hu vd., 2014), pikrik asit gibi kimyasalların algılanması için sensörler (Wei vd., 2015), ilaç salımını izleme (Sun vd., 2015) ve hücre görüntüleme (Meng vd., 2015) gibi bazı floresans uygulamaları araştırıldı.

Bu çalışmada, tek kaptan, yeni, floresans özellikli ve siklomatriks yapılu polifosfazen mikroküreler çöktürme polimerizasyonu reaksiyonu ile sentezlendi. Sentez sırasında çapraz bağlayıcı HCCP'nin yanı sıra, monomer olarak floresans özellikli floresein ve kurkumin kullanıldı. Kurkumin, floresans özelliklerinin dışında antikanser bir bileşik olması sebebiyle de seçildi. Elde edilen polifosfazen mikroküreler, ultrasonik güç kullanılarak sadece 4 saatte hazırlandı. Mikroküreler yapılarındaki monomerler sayesinde kendiliğinden floresans özellik sergilediler. Mikrokürelerin hem etanolde hem de katı halde

floresans emisyonu gösterdikleri belirlendi. Mikroküreler, fotosönümlenmeye karşı oldukça yüksek kararlılık gösterdi. Floresans ölçümleri için optimum pH, 8,0 olarak tespit edildi. Elde edilen polifosfazen mikrokürelerden kurkuminin salımı ve salımın floresans görüntülenerek takibinin daha sonra araştırılabileceği düşünülmektedir. Sentezlenen yeni ve floresans özellikli polifosfazen mikroküreler sensör uygulamaları için de potansiyele sahiptir. Ayrıca, bu mikrokürelerin sentezi yeni polifosfazenlerin sentezlenmesine de ışık tutacaktır.

## **1. Materyal ve Metot**

Hekzaklorosiklotrifosfazen (HCCP, e.n.: 113-114°C) kuru n-hekzandan yeniden kristallendirilerek kullanılmıştır. Kurkumin, floresein, trietilamin (TEA), aseton ve etanol Sigma-Aldrich firmasından satın alınmış, saflaştırılmadan kullanılmıştır.

Taramalı elektron mikroskobu (SEM-EDX) analizleri, ZEISS geminiSEM 500 elektron mikroskobu ile hızlanma voltajı 3 kV'da gerçekleştirilmiştir. Sentezlenen mikroküreler, çapraz bağlayıcı ve monomerlerin infrared spektrumları, Perkin Elmer FT-IR Spectrometer Spotlight 400 Imaging System cihazı kullanılarak elde edilmiştir. Mikrokürelerin XRD spektrumu, Bruker AXS, D8 Advance instrument ile Cu K $\alpha$  radyasyonu 40 kV'da, 40 mA'de ölçülmüştür. UV-gör ölçümleri PG Instruments T60 Model Uv-gör spektrofotometre ile yapılmıştır. Floresans deneyleri LS-55 Fluorescence Spectrometers cihazı yardımıyla gerçekleştirilmiştir.

### **1.1. Polifosfazen Mikrokürelerin Sentezi ve Kurkumin Yükleme**

HCCP (0.100 g, 0.287 mmol), kurkumin (0.106 g, 0.287 mmol), floresein (0.095 g, 0.287 mmol) ve aseton (50 mL) 100 mL'lik reaksiyon balonuna konuldu. HCCP, kurkumin ve floresein 15 dk ultrasonik banyoda tutularak çözüldükten sonra, TEA (3 mL, 14,35 mmol) reaksiyon karışımına yavaşça eklendi. Reaksiyon ultrasonik banyoda (100W, 35Hz), 40°C'de, 4 saat tutuldu. Reaksiyon tamamlandıktan sonra, elde edilen ürün 4500 rpm'de santrifüjlenerek ayrıldı. Sırasıyla aseton, saf su ve etanol ile üçer kez yıkanarak saflaştırıldı. Son olarak, sentezlenen mikroküreler 50 °C'de vakum etüvünde kurutuldu.

Mikrokürelere yüklenen kurkumin miktarı standart kurkumin çözeltileri kullanılarak hazırlanmış olan UV-gör kalibrasyon doğrusu kullanılarak belirlendi. Reaksiyon tamamlandıktan sonra, reaksiyona girmeyen kurkuminin miktarını belirlemek için süzütünün 420 nm'deki absorbansı ölçüldü. Mikrokürelerin kurkumin yükleme kapasitesi % YK, eşitlik 1'de ifade edildiği



üzere, toplam kurkumin kütlesi ile reaksiyona girmeden kalan kurkumin kütlesi arasındaki farktan hesaplanabilir.

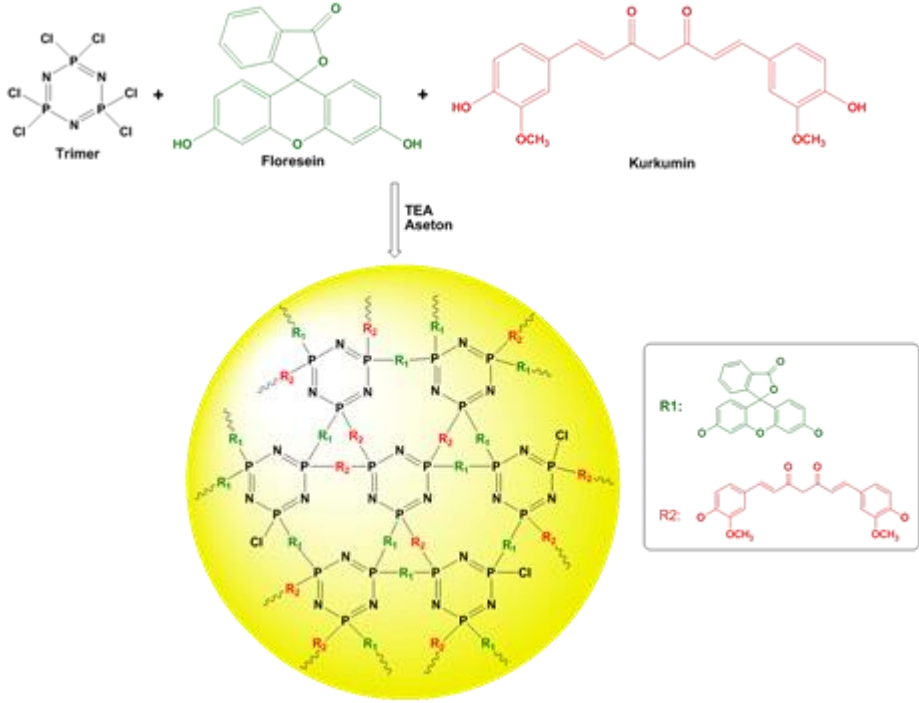
$$\%YK = \left( \frac{M_{TK} - M_{RGK}}{M_{Mikroküreler}} \right) \times 100 \quad (1)$$

$M_{Mikroküreler}$ ,  $M_{TK}$  ve  $M_{RGK}$  sırasıyla mikroküreler, toplam kurkumin ve reaksiyona girmeyen kurkuminin kütlesini ifade etmektedir.

## 2. Bulgular

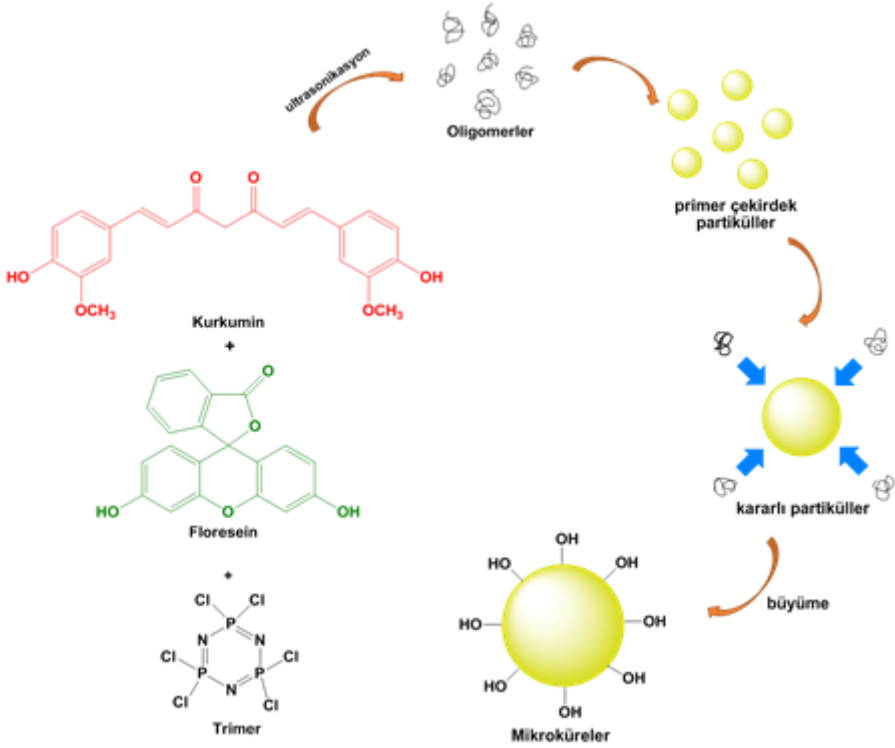
### 2.1. Polifosfazen Mikrokürelerin Sentezi ve Kurkumin Yükleme

Polifosfazen mikrokürelerin tek adımda polimerizasyon reaksiyonu Şekil 1'de gösterilmiştir. Polifosfazen mikroküreler ultrasonik güç kullanılarak HCCP, kurkumin ve floreseinin polikondenzasyon polimerizasyon reaksiyonu ile kolaylıkla sentezlenmiştir. Aynı zamanda kendiliğinden birleşme prosesi olan bu reaksiyonun, reaksiyon süresinin kısa olması, yüzey aktif madde ile inert atmosfer kullanımının gerekli olmaması gibi avantajları mevcuttur. Reaksiyonda TEA, asit tutucu ve katalizör olarak rol oynar. Kurkumin ve floreseine ait hidroksil grupları HCCP'nin klor atomları ile TEA aktivasyonu sayesinde yer değiştirerek yüksek oranda çapraz bağlı küreleri oluştururlar. TEA, reaksiyon sırasında oluşan hidroklorik asidi tutarak reaksiyon boyunca TEA.HCl tuzunun oluşmasını sağlayarak reaksiyonu hızlandırır.



**Şekil 1.** Mikrokürelerin sentez reaksiyonu ve çapraz bağlı yapısı.

Mikrokürelerin oluşum mekanizması Şekil 2’de verilmiştir. HCCP, kurkumin ve floresein asetonunda ultrasonik güç yardımıyla çözülür. Reaksiyona TEA eklenir eklenmez oligomerler oluşmaya başlar. Sonra, oligomerler bir araya gelerek primer çekirdek partikülleri meydana getirirler. Daha sonra, primer çekirdek partiküllerin hidrojen bağları ile bir araya gelmesi ile kararlı partiküller elde edilir. Son olarak, kararlı partiküller ortamdaki oligomerik türleri absorbe ederek büyürler ve yüksek derecede çapraz bağlı polifosfazen mikroküreler oluşur (Wang vd., 2012).



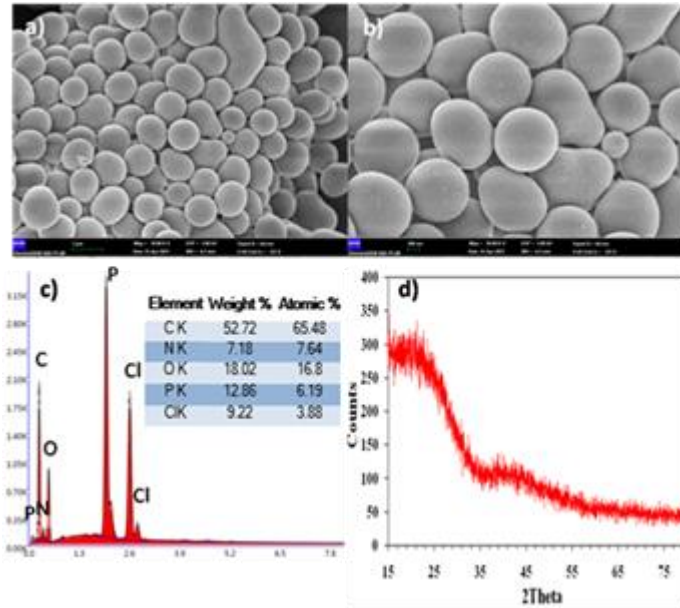
**Şekil 2.** Polifosfazen mikrokürelerin oluşum mekanizması.

Kurkumin HCCP'ye tek kapta kendiliğinden birleşme mekanizması ile kovalent olarak bağlanmaktadır. Mikrokürelerin ilaç yükleme kapasitesi %75,80 olarak hesaplanmıştır. Sentezlenen mikrokürelerin literatürdeki diğer materyaller ile kıyaslandığında daha yüksek oranda kurkumin içerdiği görülmüştür. Örneğin, veziküller; % 8,52 (Liu vd., 2023), nanotüpler; % 12,00 (Rao vd., 2018), miseller; % 9,56 (Wang vd., 2018), katı lipit nanopartiküller; % 0,81 (Rahman vd., 2023), metal-organik çerçeveler; % 7,33 (Bazzaran vd., 2023). Mikrokürelere yüklenen kurkumin miktarı literatürdeki fosfazen materyaller ile kıyaslandığında da daha yüksek bir kapasiteye sahip olduğu anlaşılmıştır. Örnek vermek gerekirse, bir çalışmada kurkumin içeren fosfazen yapılı poli(amidoamin) dendrimerlerin sentezlenerek kurkumin yüklendiği ve yükleme kapasitesinin % 27,2 olduğu görülmüştür [39]. Başka bir çalışmamızda ise, kurkumin ve kuersetini birlikte içeren polifosfazen nanoküreler hazırlanmış ve kurkuminin % 36,00 oranında kürelere yüklenmiş olduğu belirlenmiştir (Metinoğlu Örüm, 2022).

## 2.2. Mikrokürelerin Karakterizasyonu

Şekil 3a ve 3b’de verilen, mikrokürelerin farklı büyütmelemlerdeki SEM görüntülerine göre, mikrokürelerin küresel ve yüzeylerinin düzgün bir yapıya sahip olduğu, boyutlarının yaklaşık 1,00 µm olduğu anlaşılmaktadır. Ayrıca EDX analizi ile mikrokürelerin % 65,48 C, %7,64 N, % 16,80 O, % 6,19 P ve % 3,88 Cl atomu içerdiği belirlenmiştir (Şekil 3c). Karbon ve oksijen atomlarının miktarlarının yüksek oluşu kurkumin ve floreseinin HCCP’ye bağlandığını göstermektedir. Sterik engelden dolayı mikroküreler % 3,88 oranında az bir miktar klor atomu içermektedir. Buradan mikrokürelerin yüksek derecede çapraz bağlı bir yapıya sahip olduğu anlaşılmaktadır (Wang vd., 2012, Sahin vd., 2017).

Şekil 3d’de görüldüğü üzere, polifosfazın mikrokürelerin XRD spektrumu geniş bir kırınım deseni göstermektedir. Bu da mikrokürelerin kristal bir yapı içermediğini, tamamen amorf bir yapıya sahip olduğunu göstermektedir. XRD spektrumunda floresein, kurkumin ve TEA.HCl tuzuna ait herhangi bir pik görülmemesi mikrokürelerin iyi saflaştırıldığını ortaya koymaktadır (Zhu vd., 2007).

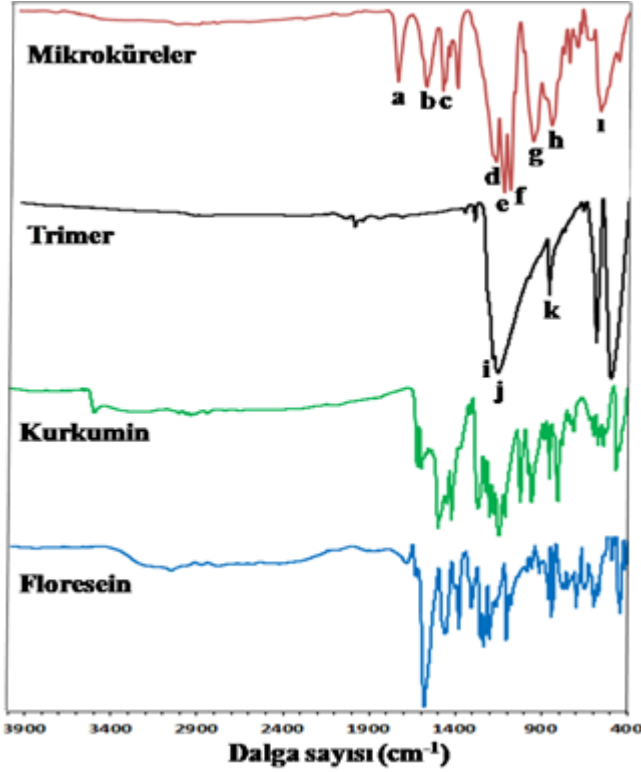


**Şekil 3.** (a) Mikrokürelerin farklı büyütmelemlerdeki SEM görüntüleri 10.00 KX, (b) 20.00 KX, (c) EDX spektrumu ve elementlerin kütlece/atomik yüzdeleri (d) Mikrokürelerin XRD spektrumu.

HCCP, kurkumin ve floresein arasındaki bağlanmayı açıklayabilmek amacıyla mikroküreler FTIR spektroskopisi ile karakterize edildi. Mikroküreler,

HCCP, kurkumin ve floreseinin FTIR spektrumları karşılaştırıldı (Şekil 4). 1770  $\text{cm}^{-1}$ (a)'de gözlenen pik mikrokürelerde floreseine ait lakton halkasının varlığını göstermektedir (Markuszewski ve Diehl, 1980). 1600  $\text{cm}^{-1}$  (b)'de bulunan pik C=C bağına aittir. 1505  $\text{cm}^{-1}$  (c)'de bulunan pik kurkumine ait karbonil grubunu, 1108  $\text{cm}^{-1}$  (f)'de görülen pik ise kurkuminin metoksi grubunun C-O bağını işaret etmektedir. Bu iki pik mikrokürelerin çapraz bağlı yapısında kurkuminin varlığını ispatlamaktadır (Mohan vd., 2012). Mikroküreler ile HCCP'nin spektrumları karşılaştırıldığında HCCP'nin karakteristik piklerinin (1206  $\text{cm}^{-1}$ (i), 1179 $\text{cm}^{-1}$  (j)(P=N) ve 873 $\text{cm}^{-1}$ (k) (P-N)) mikrokürelerde kırmızıya kaydığı (1192 $\text{cm}^{-1}$  (d), 1144  $\text{cm}^{-1}$ (e); 864  $\text{cm}^{-1}$  (h)) gözlenmiştir. P-O-Ar grubuna ait pik 973  $\text{cm}^{-1}$  (g)'de görülmektedir. Bu pik de HCCP'nin fosfor atomlarına monomerlerin bağlandığını göstermektedir. 575  $\text{cm}^{-1}$  (ı)'de gözlenen pik ise P-Cl bağına aittir ve sterik engelden dolayı reaksiyona girmeden kalan bir miktar klor atomu olduğunu göstermektedir. FTIR sonuçları HCCP, kurkumin ve floresein arasındaki polikondenzasyon reaksiyonunun başarıyla gerçekleştiğini ortaya koymaktadır (Wei vd., 2017, Zhang vd., 2009).

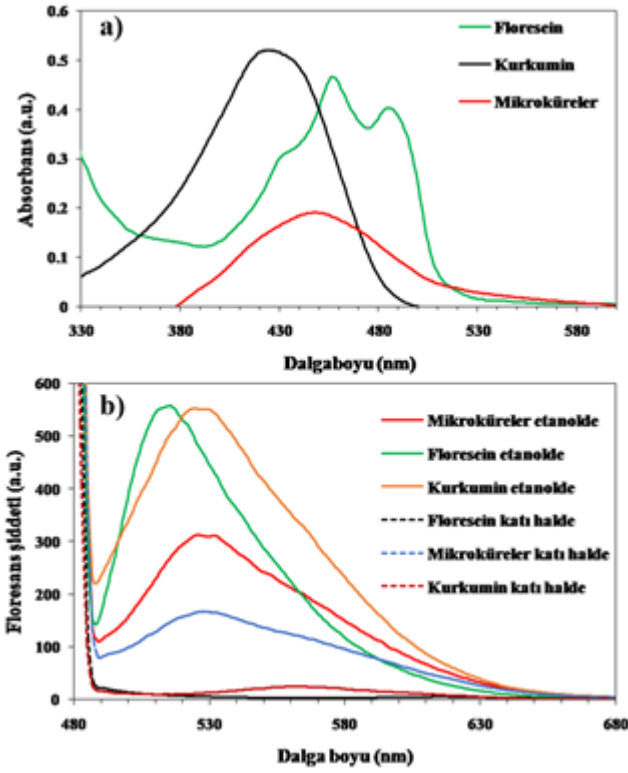
Kurkumin, floresein ve mikrokürelerin UV-gör absorpsiyon spektrumları Şekil 5a'da verilmektedir. Kurkumin ve floreseinin etanoldeki maksimum absorpsiyon pikleri sırasıyla 425 nm ve 457, 485 nm dalga boylarında görülmektedir. Mikroküreler etanolde, 1,0  $\text{mg.mL}^{-1}$  derişimde olacak şekilde dispers edildikten sonra absorbansları ölçüldü ve mikrokürelerin yüksek derecede çapraz bağlı yapıya sahip olmasından dolayı 450 nm dalgaboyunda geniş bir pik gözlendi.



Şekil 4. Mikroküre, HCCP, kurkumin ve floreseinin FTIR spektrumları.

### 2.3. Mikrokürelerin Floresans Özellikleri

Mikroküreler, floresein ve kurkuminin floresans emisyon spektrumları etanolde ve katı halde karşılaştırıldı (Şekil 5b). Uyarılma ve emisyon dalgaboylarının sırasıyla 470 ve 528 nm olduğu belirlenmiştir. Mikroküreler, floresein ve kurkuminin etanolde, 470 nm dalga boyunda uyarılmasıyla sırasıyla 526, 515 and 529 nm dalga boyunda güçlü emisyonlar gösterdikleri belirlendi. Floresein ve kurkumin HCCP'ye bağlandığında, mikrokürelerde floreseinin ve kurkuminin elektron transferi için enerji aralığı değişebilir. Bu durum sebebiyle mikrokürelerin floresans emisyon piki kurkumin ile neredeyse aynı emisyonu verirken, floresein ile karşılaştırıldığında kırmızıya kayma göstermiştir (Meng vd., 2015).

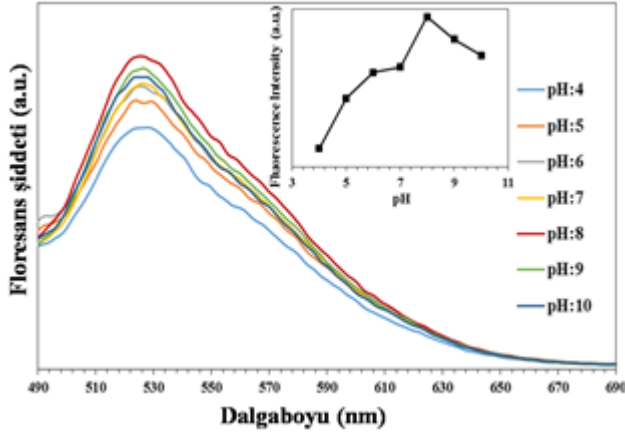


**Şekil 5.** (a) Floresein, kurkumin ve mikrokürelerin UV-gör absorpsiyon spektrumları, (b) Etanolde ve katı halde floresans spektrumları.

Mikrokürelerin katı halde 470 nm dalga boyunda uyarıldığında, 528 nm dalga boyunda floresans emisyon gösterdiği görüldü. Kurkumin ve floreseinin katı halde agregasyon kaynaklı sönmürlenme sebebiyle floresans emisyonu göstermediği belirlenmiştir (Wang vd., 2015). HCCP halkaları elektron transferi için konjuge olmayan sistemlerdir, rezonans yapmazlar ve fotokimyasal olarak inerttirler. Sonuç olarak, floresein ve kurkumin birimlerini birbirlerinden ayıran halkalardır. Floresein ve kurkumin arasındaki elektron ve enerji transferi çapraz bağlı yapıda etkili bir şekilde tutuklanır. Böylece, mikroküreler hem çözeltide hem de katı halde floresans sönmürlenmeyi azaltarak floresans emisyon gösterirler (Sun vd., 2015, Wang vd., 2015).

Polifosfazen mikrokürelerin sulu dispersiyonlarının pH'a bağlı floresans emisyonları pH 4-10 arasında incelendi. Kürelerin maksimum emisyonu pH:8,0'de yaptığı gözlemlendi. pH'ın mikrokürelerin floresans davranışı üzerinde önemli bir parametre olduğu görüldü (Şekil 6). Floresein ve kurkuminin hidroksil grupları ortaklanmamış elektron çiftine sahiptir. Bazı ortamda, hidroksil grupları floresein ve kurkumine elektron transfer edebilir. Bu sebeple,

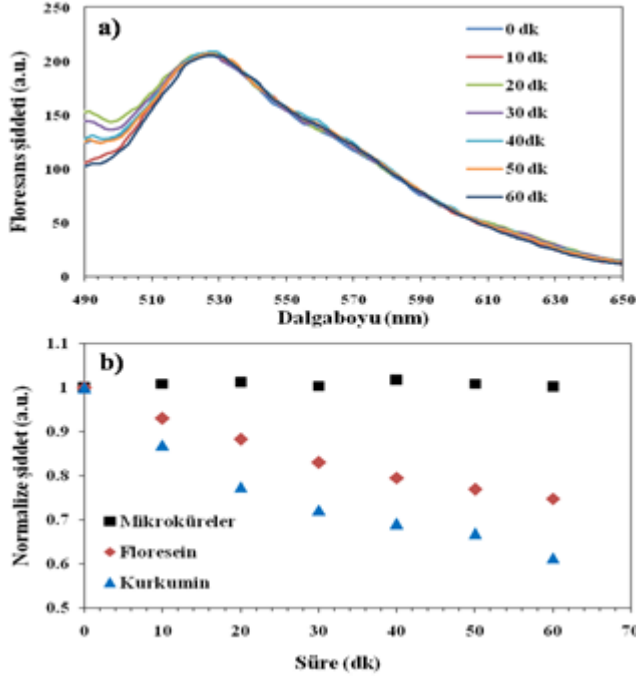
mikroküreler bazik ortamda daha yüksek floresans emisyonu gösterirler. Ancak, asidik ortamda, hidroksil gruplarının protonasyonu, elektron transferini elimine eder ve floresans emisyon pikleri daha zayıf görünür (Chen vd., 2020).



**Şekil 6.** Polifosfazen mikrokürelerin pH'a bağlı floresans spektrumları.

Şekil 7'de mikrokürelerin, floresein ve kurkuminin etanolde fotosönümlenme özellikleri karşılaştırıldı. Şekil 7a ve 7b'de görüldüğü üzere, mikroküreler mükemmel fotosönümlenme kararlılığı göstermektedir. Mikrokürelerin maksimum floresans emisyon şiddetinin 60 dakika boyunca, 470 nm'de kararlı kaldığı belirlendi. Ancak, Şekil 7b'de görüldüğü üzere, aynı koşullarda, floresein ve kurkuminin floresans emisyon şiddetleri 60 dakika boyunca giderek azaldı. Monomer olarak floresein ve kurkumin birimleri çapraz bağlı yapıya katıldıklarında fotokimyasal kararlılığı sağlamaktadırlar (Sun vd., 2015). Polifosfazen mikrokürelerin yüksek derecede çapraz bağlı, inorganik-organik hibrit yapısı sebebiyle fotosönümlenme etkili bir şekilde azalmıştır (Hong vd., 2018, Wei vd., 2012). Mikrokürelerin bu özelliği sensör uygulamaları için oldukça önemli bir parametredir.





**Şekil 7.** (a) Mikrokkürelerin 60 dakika boyunca ölçülen floresans spektrumları ( $30 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) (b) Mikrokküre, floresein ve kurkuminin zamanla floresans şiddetinin değişimi.

## SONUÇ

Bu çalışmada, yeni, siklomatriks polifosfazen mikrokküreler tek adımlı polikondenzasyon polimerizasyon tekniği ile hazırlandı. Floresans özellikli floresein ve kurkumin monomer olarak kullanıldı. Polifosfazen mikrokküreler SEM-EDX, FTIR, XRD ve UV-gör teknikleri ile karakterize edildi. Floresans özellikli monomerler sayesinde elde edilen mikrokküreler hem katı halde hem de etanolde 470 nm dalga boyunda uyarıldıklarında floresans emisyonu gösterdiler. Mikrokküreler kurkumin ve floresein ile kıyaslandığında 470 nm'de uyarıldığında, 60 dakika süresince fotosönümlenmeye karşı mükemmel direnç sergilediler. Mikrokküreler için optimum pH, 8,0 olarak tespit edildi. Yanı sıra, mikrokkürelerin ilaç yükleme kapasitesi %75,80 olarak hesaplandı. Sonuç olarak, mikrokkürelerin hem kurkumin salımı için taşıyıcı olarak, hem de sensör uygulamalarında kullanım potansiyeline sahip olduğu düşünülmektedir.

## REFERANSLAR

- Ahmad, M., Nawaz, T., Hussain, I. et al. 2022. Phosphazene cyclomatrix network-based polymer: chemistry, synthesis, and applications. *ACS Omega*, 7, 33, 28694–28707.
- Ahmad, M., Nawaz, T., Assiri, M. A. et al. 2022. Fabrication of bimetallic Cu–Ag nanoparticle-decorated poly(cyclotriphosphazene-co-4,4'-sulfonyldiphenol) and its enhanced catalytic activity for the reduction of 4-nitrophenol. *ACS Omega*, 7, 8, 7096–7102.
- Akram, R., Arshad, A., Dar, S. U. et al. 2020. Biocompatible fluorescent polyamine-based cyclophosphazene hybrid nanospheres for targeted cell imaging. *Polymers for Advanced Technologies*, 31, 425–432.
- Assi, N., Rypar, T., Macka, M., Adam, V., Vaculovicova, M. 2023. Microfluidic paper-based fluorescence sensor for L-homocysteine using a molecularly imprinted polymer and in situ-formed fluorescent quantum dots. *Talanta*, 255, 124185.
- Basharat, M., Khan, M. S., Abbas, Y. et al. 2020. Cyclotriphosphazene (P3N3) hybrid framework for aggregation induced photocatalytic hydrogen evolution and degradation of rhodamine B. *Materials Chemistry Frontiers*, 4, 3216–3225.
- Basharat, M., Liu, W., Zhang, S. et al. 2019. Poly(cyclotriphosphazene-co-tris(4-hydroxyphenyl)ethane) microspheres with intrinsic excitation wavelength tunable multicolor photoluminescence. *Macromolecular Chemistry and Physics*, 220, 18, 1900256.
- Bazzazan, S., Moeinabadi-Bidgoli, K., Lalami, Z. A. et al. 2023. Engineered UIO-66 metal-organic framework for delivery of curcumin against breast cancer cells: An in vitro evaluation. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 79, 104009.
- Chen, K., Liu, Y., Hu, Y., et al. 2020. Facile synthesis of amino-functionalized polyphosphazene microspheres and their application for highly sensitive fluorescence detection of Fe<sup>3+</sup>. *Journal of Applied Polymer Science*, 137, 32, 48937.
- Guo, X., Geng, X., Gao, X. et al. 2019. Platinum loaded cyclomatrix polyphosphazene submicrospheres improve fire retardancy of epoxy with very low addition. *Composites Communications*, 11, 27–30.
- Hong, S., Li, J., Huang, X., Liu, H. 2018. A facile approach to generate cross-linked poly(cyclotriphosphazene-co-oxyresveratrol) nanoparticle with intrinsically fluorescence. *Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials*, 28, 2258–2263.

- Hu, Y., Meng, L., Lu, Q. 2014. “Fastening” porphyrin in highly cross-linked polyphosphazene hybrid nanoparticles: powerful red fluorescent probe for detecting mercury ion. *Langmuir*, 30, 15, 4458–4464.
- Hu, Y., Meng, L., Niu, L., Lu, Q. 2013. Highly cross-linked and biocompatible polyphosphazene-coated superparamagnetic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles for magnetic resonance imaging. *Langmuir*, 29, 29, 9156–9163.
- Liu, H., Meng, X., Li, L. et al. 2023. The incorporated hydrogel of chitosan-oligoconjugated linoleic acid vesicles and the protective sustained release for curcumin in the gel. *International Journal of Biological Macromolecules*, 227, 17-26.
- Liu, W., Huang, X., Wei, H., Tang, X., Zhu, L. 2011. Intrinsically fluorescent nanoparticles with excellent stability based on a highly crosslinked organic–inorganic hybrid polyphosphazene material. *Chemical Communications*, 47, 11447-11449.
- Ma, Z., Wang, Y., Luo, Y., Xie, X., Xiong, Z. 2020. Highly efficient elimination of thorium(IV) from aqueous solution using poly(cyclotriphosphazene-co-melamine) microspheres. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 323, 993–1002.
- Markuszewski, R., Diehl, H. 1980. The infrared spectra and structures of the three solid forms of fluorescein and related compounds. *Talanta*, 27, 11, 937-946.
- Mehmood, S., Uddin, M. A., Yu, H. et al. 2023. Study on fully cross-linked poly(cyclotriphosphazene-co-epigallocatechin) nanospheres and their application as drug delivery carriers. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*,
- Mehmood, S., Wang, L., Yu, H. et al. 2020. Recent progress on the preparation of cyclomatrix-polyphosphazene based micro/nanospheres and their application for drug release. *Chemistry Select*, 5, 20, 5939-5958.
- Meng, L., Xu, C., Liu, T., Li, H., Lu, Q., Lon, J. 2015. One-pot synthesis of highly cross-linked fluorescent polyphosphazene nanoparticles for cell imaging. *Polymer Chemistry*, 6, 3155.
- Metinoğlu-Örüm, S. 2022. Novel cyclomatrix polyphosphazene nanospheres: preparation, characterization and dual anticancer drug release application. *Polymer Bulletin*, 79, 2851–2869.
- Mohan, P.R.K., Sreelakshmi, G., Muraleedharan, C.V., Joseph, R. 2012. Water soluble complexes of curcumin with cyclodextrins: characterization by FT-Raman spectroscopy. *Vibrational Spectroscopy*, 62, 77-84.
- Ogueri, K. S., Ogueri, K. S., Allcock, H. R., Laurencin, C. T. 2020. Polyphosphazene polymers: the next generation of biomaterials for

- regenerative engineering and therapeutic drug delivery. *Journal of Vacuum Science & Technology B*, 38, 3, 030801.
- Onder, A., Ozay, H. 2021. Highly efficient removal of methyl orange from aqueous media by amine functional cyclotriphosphazene submicrospheres as reusable column packing material. *Chemical Engineering and Processing-Process Intensification*, 165, 108427.
- Onder, A., Ozay, H. 2021. Synthesis and characterization of biodegradable and antioxidant phosphazene-tannic acid nanospheres and their utilization as drug carrier material. *Materials Science and Engineering:C*, 120, 111723.
- Pan, T., Huang, X., Wei, H., Wei, W., Tang, X. 2012. Intrinsically fluorescent microspheres with superior thermal stability and broad ultraviolet-visible absorption based on hybrid polyphosphazene material. *Macromolecular Chemistry and Physics*, 213, 15, 1590-1595.
- Rahman, M.A., Ali, A., Rahamathulla, M. et al. 2023. Fabrication of sustained release curcumin-loaded solid lipid nanoparticles (cur-slns) as a potential drug delivery system for the treatment of lung cancer: optimization of formulation and in vitro biological evaluation. *Polymers*, 15, 3, 542.
- Rao, K. M., Kumar, A., Suneetha, M., Han, S. S. 2018. pH and near-infrared active; chitosan-coated halloysite nanotubes loaded with curcumin-Au hybrid nanoparticles for cancer drug delivery. *International Journal of Biological Macromolecules*, 112, 119-125.
- Sahin, O., Koc, O. K., Ozay, H., Ozay, O. 2017. The preparation of phosphazene crosslinked cyclen microspheres as host for Cu<sup>2+</sup> ions and their utilization as a support material for the preparation of a copper nanocatalyst. *Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials*, 27, 122–130.
- Saita, S., Niwa, K., Pottathara, Y. B., Kawasaki, H. 2023. Highly bright full-color emission from dye-doped silica nanoparticles with prevention of dye self-quenching. *Optical Materials*, 139, 113803.
- Sun, L., Liu, T., Li, H., Yang, L., Meng, L., Lu, Q., Long, J. 2015. Fluorescent and cross-linked organic–inorganic hybrid nanoshells for monitoring drug delivery. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 7, 8, 4990–4997.
- Tian, Y., Yin, D., Yan, L. 2023. J-aggregation strategy of organic dyes for near-infrared bioimaging and fluorescent image-guided phototherapy. *Wires Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 15, 1, e1831.
- Wan, C., Huang, X. 2017. Cyclomatrix polyphosphazenes frameworks (Cyclo-POPs) and the related nanomaterials: synthesis, assembly and functionalisation. *Materials Today Communications*, 11, 38-60.

- Wang, D., Hu, Y., Meng, L., Wang, X., Lu, Q. 2015. One-pot synthesis of fluorescent and cross-linked polyphosphazene nanoparticles for highly sensitive and selective detection of dopamine in body fluids. *RSC Advances*, 5, 92762-92768.
- Wang, D., Zhou, N., Zhang, N., Zhi, Z., Shao, Y. et al. 2021. Facile preparation of pH/redox dual-responsive biodegradable polyphosphazene prodrugs for effective cancer chemotherapy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 200, 111573.
- Wang, L.L., He, D.D., Wang, S.X. et al. 2018. Preparation and evaluation of curcumin-loaded self-assembled micelles. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 44, 4, 563-569.
- Wang, Y., Mu, J., Li, L., Shi, L., Zhang, W., Jiang, Z. 2012. Preparation and properties of novel fluorinated cross-linked polyphosphazene micro-nano spheres. *High Performance Polymers*, 24, 3, 229-236.
- Wei, W., Huang, X., Chen, K., Tao, Y., Tang, X. 2012. Fluorescent organic–inorganic hybrid polyphosphazene microspheres for the trace detection of nitroaromatic explosives. *RSC Advances*, 2, 3765-3771.
- Wei, W., Lu, R., Tang, S., Liu, X. 2015. Highly cross-linked fluorescent poly(cyclotriphosphazene-co-curcumin) microspheres for the selective detection of picric acid in solution phase. *Journal of Materials Chemistry A*, 3, 4604-4611.
- Wei, X., Zhang, G., Zhou, L., Li, J. 2017. Synthesis and characterization of hydrophobic amino-based polyphosphazene microspheres with different morphologies via two strategies. *Applied Surface Science*, 419, 744-752.
- Xu, B., Li, J., Zhang, J. et al. 2023. Solid-state fluorescent carbon dots with unprecedented efficiency from visible to near-infrared region. *Advanced Science*, 10, 4, 2205788.
- Yan, K., Mu, C., Wang, D., Jing, X., Zhang, N. et al. 2021. Yolk-shell polyphosphazenes nanotheranostics for multimodal imaging guided effective phototherapy. *Composites Communications*, 28, 100950.
- Yang, X., Kuang, Z., Yang, X. et al. 2023. Facile synthesis of curcumin-containing poly(amidoamine) dendrimers as pH-responsive delivery system for osteoporosis treatment. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 222, 113029.
- Zhai, Y., Meng, L., Xu, L. et al. 2017. Strong fluorescence enhancement with silica-coated Au nanoshell dimers. *Plasmonics*, 12, 263–269.
- Zhang, P., Huang, X., Fu, J., Huang, Y., Zhu, Y., Tang, X. 2009. A one-pot approach to novel cross-linked polyphosphazene microspheres with

active amino groups. *Macromolecular Chemistry and Physics*, 210, 9, 792-798.

Zhang, Y., Cui, J., Wang, L. et al. 2021. Cross-linked salen-based polyphosphazenes (Salen-PZNs) enhancing the fire resistance of epoxy resin composites. *Journal of Applied Polymer Science*, 138.

Zhu, L., Zhu, Y., Pan, Y., Huang, Y., Huang, X., et al. 2007. Fully crosslinked poly[cyclotriphosphazene-co-(4,4'-sulfonyldiphenol)] microspheres via precipitation polymerization and their superior thermal properties. *Macromolecular Reaction Engineering*, 1, 1, 45-52.

## BÖLÜM 7

# Bulutlanma Noktası Ekstraksiyonu Sonrasında Allura Red Gıda Boyasının Spektrofotometrik Tayini

Cansu ALKAN<sup>1</sup>

Can BİLGİLİ<sup>2</sup>

Tufan GÜRAY<sup>3</sup>

1- *Yüksek Lisans Öğrencisi.; Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya ABD. [cnsalkan@gmail.com](mailto:cnsalkan@gmail.com) ORCID No: 0000-0002-5846-7952*

2- *Lisans Öğrencisi.; Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü. [cannbilgili@gmail.com](mailto:cannbilgili@gmail.com) ORCID No: 0009-0003-8868-5365*

3- *Prof. Dr.; Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü. [tguray@ogu.edu.tr](mailto:tguray@ogu.edu.tr) ORCID No: 0000-0002-7509-7260*

## GİRİŞ

Gıdalara eklenen renklendiriciler, gıda rengini geliştirmek, gıdaya daha çekici, iştah açıcı görünümler, tat ve lezzet sağlamak için yaygın olarak kullanılmaktadır.

Allura Red AC (E129) gibi sentetik azo boyalar, birkaç yıldır birçok ülkede gıda renklendirme maddesi olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır. Ancak Allura Red (AR) de dahil olmak üzere bazı azo renklendirici maddelerin güvenliği ve bunların gıda katkı maddesi olarak kullanımı yıllar içinde sorgulanmıştır. Yiyecek ve içeceklerde kırmızı renk verilmesi amacıyla kullanılan E129 ve diğer azo boyar maddeler genellikle çocuklarda dikkat eksikliği, davranış bozukluğu gibi belirtiler sonucu hiperaktiviteye neden olabileceği belirtilmiştir (McCann vd. 2007; Zetterberg ve Ilback, 2013). AR'nin bu ve önerilen diğer olumsuz sağlık etkileri, Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA) tarafından eleştirel bir şekilde değerlendirilmiştir ve mevcut ve yayınlanmış tüm veriler dikkate alındığında bu tür etkilerin bilimsel olarak desteklenemeyeceği açıktır (EFSA, 2009). Bundan bağımsız olarak Avrupa Parlamentosu ve Konseyi, gıda maddelerine AR eklendiğinde etikette

"çocuklarda aktivite ve dikkat üzerinde olumsuz etki yaratabilir" ek bilgisinin yer almasına karar vermiştir (Regulation (EC) No. 1333 / 2008).

Ancak son çalışmalarda yeterince bilinmeyen ve kanıtlanmayan bir risk, ticari içeceklerin taşıma ve depolama aşamalarında sıklıkla maruz kaldığı güneş ışığı ışınımının etkisi nedeniyle içeceklerde güvenli gıda boyalarının bozunma olasılığıdır (Gianotti vd. 2005; Gosetti vd, 2008). Her zaman olmasa da çoğu zaman bozunma, içeceğin renginin açılması veya renk değişimleri yoluyla çıplak gözle açıkça kanıtlanır. Renk değişimi veya rengin açılması, içeceklerin boyası ve diğer bileşenleri arasında meydana gelen, ışık ışınımının desteklediği yan reaksiyonlardan kaynaklanmaktadır. Avrupa'da AR'in çocuklar tarafından tüketimi önerilmemektedir ve bazı Avrupa ülkeleri tarafından da kullanımı yasaklanmıştır. Sentetik boyalar genel olarak insan sağlığına zararlı azo fonksiyonel gruplar ve aromatik halka yapıları içermektedir (Pourreza vd. 2011). Son yıllarda yayınlanan çok sayıda çalışma, AR gibi sentetik boyaların analizi için hızlı, doğru ve seçici tekniklerin geliştirilmesinin önemini ortaya koymaktadır (Chanlon vd. 2005; Huang vd. 2003; Silva vd. 2007).

AR tayini için bazı analitik çalışmalar; voltametri (Alghamdi, 2005), polarografi (Chanlon, vd. 2005), spektrofotometri (Dinç, vd., 2002), kütle spektrometrisi (Gosetti, vd. 2013), kapiler elektroforez (CE) (Huang, vd. 2003, yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) (Kiseleva, vd., 2003) mevcuttur.

Bulutlanma noktası ekstraksiyonu (CPE), spektrofotometride en çok kullanılan analitik kimya yöntemlerindedir. Bulutlanma noktası ekstraksiyonu diğer ekstraksiyon yöntemlerine göre düşük maliyetli hızlı sonuç veren güvenilir bir yöntemdir (Thani, 2017). Bulutlanma noktası ekstraksiyonunda kritik misel oluşum sıcaklığına ulaşmanın önemli parametrelerinden biri de ortama tuz ilavesidir. CPE yönteminde iki aşama gözlenmektedir. Birinci aşama yüzey aktif maddece zengin küçük hacimli faz. Büyük hacimli seyreltilmiş sulu faz ise ikinci aşamayı oluşturmaktadır (Bişgin, 2018).

Yüksek verimli deneysel çalışmalar, deneysel tasarım ve kantitatif değerlendirme yöntemlerine dayanır. Bu değerlendirmeler matematiksel modeller veya tasarımlar vasıtasıyla ortaya konabilmektedir. Kemometrinin temel araçları olan istatistik ve uygulamalı matematik, analitik verilerin işlenmesinde önemli rol oynamaktadır.

İstatistiksel olarak faydalı bir yöntem olan yanıt yüzeyi metodolojisi (RSM), modellerin oluşturulmasında, bağımsız faktörlerin yanıt üzerindeki etkilerinin analizinde ve deneylerin tasarımında yaygın olarak kullanılmaktadır. Tüm küresel tasarımları içeren ve yalnızca üç faktör seviyesinin çalıştırılmasını gerektiren Box-Behnken tasarımı (BBD) tamamen veya kısmen çevrilebilir.



Ayrıca, bu tasarımlar tüm faktörler için aynı anda en yüksek veya en düşük seviyelerinde kombinasyonlar içermez, çünkü BBD gerekli deney sayısını azaltabilir ve yetersiz sonuçlar verebilecek aşırı koşullar altında deneylerden kaçınılabilir (Box vd. 1978).

Bu çalışmanın amacı, AR'in spektrofotometrik tayini öncesinde CPE için Brij 58 (polietilen glikol hekza desil eter) kullanarak bir yöntem geliştirmektir. Brij 58'in AR'in ekstraksiyonunda kullanımı literatür için bir yenilik olacaktır. Ayrıca, bu çalışmada, RSM altındaki BBD, CPE geri kazanımı üzerindeki güçlü parametreleri incelemek ve optimize etmek için kullanılmıştır.

## **KULLANILAN MALZEMELER VE YÖNTEM**

### ***Cihazlar, Kimyasallar ve Örnek***

Çalışmada, Agilent Transport 60 UV spektrofotometrenin (Stevens Creek Boulevard, Santa Clara, CA, USA) yanı sıra pH/ion metre olarak ThermoOrion 720A (Beverly, MA, USA) ve santrifüj cihazı olarak da Sigma 1-6P (Osterode am Harz, Germany) kullanılmıştır.

Minitab 20 paket programıyla optimum deney koşullarının belirlenmesi için elde edilen bütün cevap verilerinin çoklu regresyon analizi yapılmıştır.

Bütün kimyasallar analitik saflıkta bölge temsilcilerinden temin edilmiştir.

Gerçek numune analizi için kullanılan ilaç örneği bölge eczanesinden ve enerji içeceği bölge marketlerinden satın alınmıştır.

### ***Standart Çözeltilerin Hazırlanması***

50 µg mL<sup>-1</sup> stok AR çözeltisi hazırlamak için 0,5 g boya hassas tartımda tartılarak balon jojeye alındı, deiyonize suda çözüldü ve 100 mL seyreltildi. Standart çözelti karanlık ortamda ve oda sıcaklığında saklandı. Brij 58 çözeltisini % 10'luk (w/v) hazırlamak için, 25 g Brij 58 tartıldı ve 250 mL'ye deiyonize su ile çözülerek tamamlandı.

### ***Gerçek Örneklerde AR'in Tayini İçin Kullanılan Yöntem***

1mL şurup numunesinden alınarak 100 mL seyreltilerek analiz için kullanılmıştır. Marketten satın alınan enerji içeceğinin içinden 50 mL alınarak carez 1 ve carez 2 çözeltileri ile şeker çöktürüldü, süzüldü ve süzüntüden 1mL alınarak 10 mL'ye seyreltikten sonra analize hazırlanmıştır.

Geliştirilen yöntem, 15 mL'lik santrifüj tüpüne 1mL numune çözeltilerinden konur. Üzerine %10'luk Brij 58 çözeltisinden 0,5 mL ve katı Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> dan da 2,0 g tartılıp eklenir. Deiyonize su ile 10 mL'ye (pH=1-8) tamamlanır. Karışım 10 dakika 70°C' de bekletilir ve sonrasında oda sıcaklığına gelene kadar bekletilir.

5 dakika 4000 rpm’de santrifüjlenerek faz ayrımı sağlanır. Yüzey aktif maddece zengin olan faz ayrılarak 1mL deiyonize su ile vortekste karıştırılıp UV-GB spektroskopisi ile 505 nm’ de köre karşı ölçüm alınır.

## **BULGULAR**

### ***Box-Behnken Tasarımı Kullanarak Yöntem Optimizasyonu***

Çevre koşullarının optimizasyonu, prosesin verimliliğinin artırılması ve maliyetinin düşürülmesi açısından büyük avantajlar sağlamaktadır. Bu yöntem ile işlem kontrolü kolaydır. Son yıllarda analitik yöntemlerin optimizasyonu için çok değişkenli istatistiksel tekniklerden biri olan deneysel tasarım yöntemleri kullanılmaktadır. Bu yöntemlerde faktörlerin tüm kombinasyonları ve seviyeleri için deneyler yapılmaktadır. Bu durum deney sayısının fazla olmasına yol açmaktadır. Dolayısıyla deney maliyetini ve deney için harcanan zamanı büyük ölçüde artırmaktadır. Tam faktöriyel deney tasarımında ise etkisi incelenen faktör sayısı arttıkça yapılacak deney sayısı da parabolik olarak artmaktadır (Montgomery, 2009). Kimyasal teknolojiler açısından bir işletmede istenilen kalite ve verimlilikte ürün üretebilmek için birçok parametrenin optimum seviyelerinin belirlenmesi gerekmektedir. Bu deneyler zaman maliyetini ve malzeme kaldırmayı artırmaktadır. Ortam koşullarının optimizasyonu bu maliyetlerin azaltılmasında önemli bir fayda sağlamaktadır. Bu yöntemlerin başında yanıt yüzeyleri yöntemleri (RSM) gelmektedir. RSM genellikle çoklu yanıt değişkenlerinin birçok faktörden etkilendiği problemleri modellemek ve analiz etmek için kullanılan matematiksel ve istatistiksel tekniklerin toplamı olarak tanımlanır (Montgomery, 2009, Khuri, vd. 2010). RSM ile minimum sayıda deneysel denemeden çok fazla bilgi elde edilebilir. RSM genellikle birden fazla yanıt değişkeninin birçok faktörden etkilendiği problemi modellemek ve analiz etmek için kullanılan matematiksel ve istatistiksel tekniklerin toplamı olarak tanımlanır (Montgomery, 2009, Khuri, vd. 2010). RSM ile tasarlanan deneyler sonucunda sürecin modeli genellikle ikinci dereceden polinom denklemlerinden (regresyon modeli) elde edilir. Elde edilen model ikinci dereceden terimler içerdiği için faktörlerin karesel etkileri de hesaplanabilmektedir (Montgomery, 2009, Khuri, vd. 2010). Tüm RSM yöntemlerinde deneyler en az 3 farklı faktör seviyesinde yapıldığından, olası tüm faktör etkilerini (doğrusal veya ikinci dereceden) tanımlamak mümkündür. RSM kullanmanın bir diğer avantajı da sonuçların sayısal olarak optimize edilebilmesidir. RSM’de en yaygın kullanılan tasarımlar kesirli faktöriyel tasarımlar, en dik yükseliş stroku, merkezi kompozit tasarım ve daha karmaşık merkezi kompozit, Box-Behnken, Doehlert ve karışım tasarımlarıdır (Ferreira,

vd., 2007 a). Box Behnken (BBD), üç seviyeli tamamlanmamış faktöriyel tasarımlara dayanan küresel, döndürülebilir bir tasarımdır (Ferreira, vd., 2007 b; Bezerra, vd. 2008; Kumar, vd., 2008; Souza, vd., 2005).

Bu çalışmada, Box-Behnken tekniğine ile en önemli faktörlerin kesin değerlerini bulmak için 46 deney seti oluşturulmuştur. Tablo 1'de faktörlerin (A: pH, B: Brij 58 konsantrasyonu, C: Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> miktarı, D: Ekstraksiyon sıcaklığı ve E: Bekleme süresi) incelenen seviyeleri verilmiştir. Tablo 2 ve 3'de Box-Behnken tekniğine göre yapılan deneyler ve elde edilen yanıtlar verilmiştir. Bağımsız değişkenler (kodlanmış değerler olarak) ve analitik sinyal (Abs) arasındaki nedensellik ilişkisi için denklem aşağıda verilmiştir.

**Tablo 1:** AR çıkarımı için BBD'de (Box-Behnken tasarımı) kullanılan bağımsız değişkenlerin seviyesi

Faktörler	Semboller	Seviyeler		
		-1	0	+1
pH	A	3	6	9
Brij 58 derişimi (%)	B	0.25	0.5	0.75
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> miktarı (%)	C	15	20	25
Ekstraksiyon sıcaklığı (°C)	D	60	70	80
Bekleme süresi (dk)	E	5	10	15

**Tablo 2:** Box-Behnken tasarımı için tasarım matrisi ve cevap değereleri

Deney No	A	B	C	D	E	Abs
1	6	0.5	1	60	10	0.553
2	9	0.5	2	70	15	0.652
3	6	0.5	2	70	10	0.907
4	3	0.25	2	70	10	0.819
5	9	0.5	3	70	10	0.661
6	3	0.5	2	70	15	0.821
7	6	0.5	2	70	10	0.905
8	6	0.5	3	60	10	0.864
9	6	0.5	2	80	5	0.863
10	6	0.5	2	70	10	0.91
11	6	0.5	2	70	10	0.908
12	6	0.75	3	70	10	0.742
13	6	0.75	2	80	10	0.759
14	6	0.5	2	70	10	0.909
15	3	0.5	3	70	10	0.834
16	3	0.5	2	80	10	0.854
17	9	0.25	2	70	10	0.602
18	6	0.5	1	70	5	0.566
19	6	0.5	1	70	15	0.569
20	6	0.75	2	70	15	0.778
21	6	0.25	2	80	10	0.745
22	6	0.5	2	60	5	0.862
23	6	0.25	1	70	10	0.412
24	6	0.5	2	70	10	0.906
25	3	0.5	1	70	10	0.556
26	6	0.5	2	60	15	0.873
27	3	0.5	2	70	5	0.801
28	3	0.5	2	60	10	0.787
29	6	0.75	1	70	10	0.678
30	9	0.5	2	70	5	0.669
31	6	0.25	2	70	5	0.741
32	6	0.5	1	80	10	0.564
33	6	0.25	3	70	10	0.735
34	6	0.5	3	70	5	0.865
35	6	0.25	2	60	10	0.698
36	6	0.25	2	70	15	0.745
37	6	0.75	2	60	10	0.748

38	9	0.5	2	80	10	0.654
39	6	0.5	3	70	15	0.868
40	6	0.5	2	80	15	0.874
41	6	0.5	3	80	10	0.86
42	9	0.5	2	60	10	0.604
43	3	0.75	2	70	10	0.829
44	6	0.75	2	70	5	0.855
45	9	0.75	2	70	10	0.655
46	9	0.5	1	70	10	0.609

**Tablo 3.** BBD ile tanımlanan modelin ANOVA sonuçları

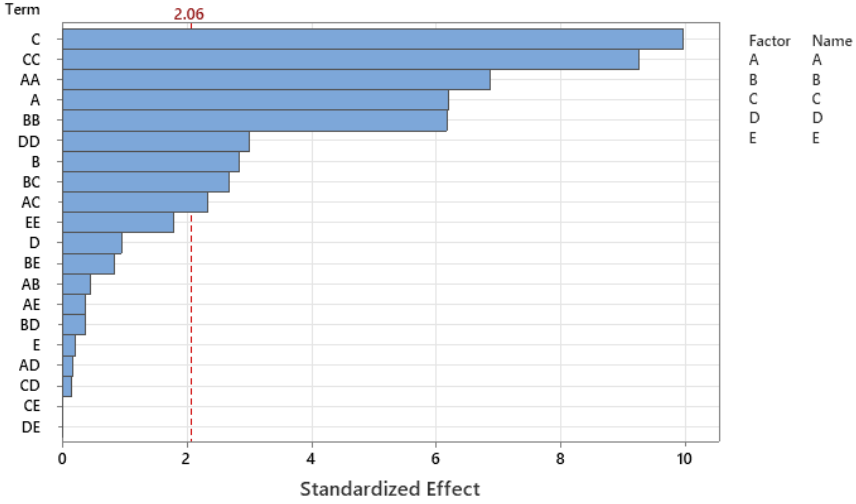
Kaynak	Kareler toplamı	Ort. karesi	F-Değeri	P-Değeri
Model	0.653477	0.032674	14.03	0.000
A	0.089252	0.089252	38.31	0.000
B	0.018701	0.018701	8.03	0.009
C	0.230880	0.230880	99.11	0.000
D	0.002116	0.002116	0.91	0.350
E	0.000110	0.000110	0.05	0.830
A*A	0.109475	0.109475	47.00	0.000
B*B	0.088733	0.088733	38.09	0.000
C*C	0.199650	0.199650	85.71	0.000
D*D	0.021026	0.021026	9.03	0.006
E*E	0.007382	0.007382	3.17	0.087
A*B	0.000462	0.000462	0.20	0.660
A*C	0.012769	0.012769	5.48	0.027
A*D	0.000072	0.000072	0.03	0.862
A*E	0.000342	0.000342	0.15	0.705
B*C	0.016770	0.016770	7.20	0.013
B*D	0.000324	0.000324	0.14	0.712
B*E	0.001640	0.001640	0.70	0.409
C*D	0.000056	0.000056	0.02	0.878
C*E	0.000000	0.000000	0.00	1.000
D*E	0.000000	0.000000	0.00	1.000
Hata	0.058237	0.002329		
Toplam	0.711714			

$$\begin{aligned} \text{Abs} = & -4.10 + 0.1710 A + 2.596 B + 0.994 C + 0.0733 D + \\ & 0.0345 E - 0.01244 A*A - 1.613 B*B - 0.1513 C*C - 0.000491 D*D - \\ & 0.001163 E*E + 0.0143 A*B - 0.01883 A*C - 0.000142 A*D - 0.00062 \\ & A*E - 0.2590 B*C - 0.00360 B*D - 0.0162 B*E - 0.00037 C*D + \\ & 0.00000 C*E - 0.000000 D*E \end{aligned}$$

BBD ile tahmin edilen verilere ilişki katsayısı ( $R^2$ ) değeri % 91,82 ve düzeltilmiş ilişki katsayısı ( $R^2_{\text{düzeltilmiş}}$ ) % 85,27 olarak bulunmuştur. AR tayini

için bu tasarımda elde edilen model denklemin incelenen bağımsız değişkenlerin ölçüm aralığında yüksek doğrulukta uygulanabilir olduğunu vermektedir.

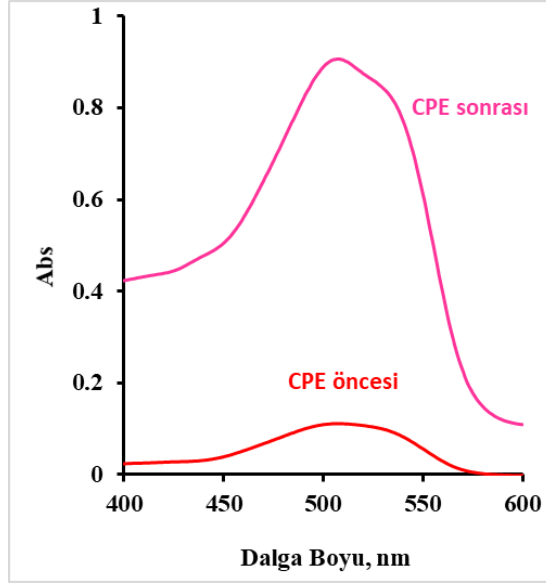
BBD optimizasyonunda her bir faktörün tek başına etkileri ve bu faktörlerin birbirleri ile olan etkileşiminin sonucu ortaya çıkan etkileri hesaplanmış ve Pareto grafiği çizilmiştir. Tablo 3'teki regresyon analizi sonuçları doğrultusunda elde edilen Pareto grafikleri Şekil 1'te verilmiştir.



Şekil 1. AR için BBD sonrası Pareto grafiği

Bu değişken seviyelerinin deneysel sonuçlarına göre Tablo 2' deki önerilen 46 deneysel tasarımı ve onun sonucunda hesaplanan ANOVA değerleri ile optimum koşullar belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre optimum koşullar pH'nın 6 civarı, Birij 58 yüzey aktif derişiminin % 5, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> miktarının 2 g, uygulanan sıcaklığın 70 °C ve 10 dk olarak bundan sonraki deneylerde kullanılmıştır.

Bu koşullarda elde edilen CPE öncesinde ve sonrasında AR'nin UV spektrumu şekil 2'de verilmiştir.



**Şekil 2.** CPE öncesinde ve CPE sonrasında 3,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$  AR standart çözeltisinin UV-görünür bölge spektrumu.

### ***Analitik Performans***

Optimum şartlarda ölçülen absorbansa karşı artan AR konsantrasyonlarının korelasyon grafikleri elde edilmiştir. Çalışma aralığı, AR için  $\text{Abs} = 0,2119 C (\mu\text{g mL}^{-1}) + 0,1413$  ( $R^2 = 0,9999$ ) denklemiyle 0,05 ve 5,00  $\mu\text{g mL}^{-1}$  arasında elde edilmiştir. AR için gözlenebilirlik sınırı (LOD) 0,0010  $\mu\text{g mL}^{-1}$  olarak hesaplanmıştır. Geliştirilen yöntemin düşük LOD 'ye sahip olması bu renklendiricinin gerçek örneklerde eser miktarlarının tayinlerinde kullanılabilir olduğunu göstermiştir.

### ***Yöntemin Şurup Örneğine Uygulanması***

AR'ın spektrofotometrik tayini için geliştirilen bu yöntem, bir şurup örneğine uygulanmıştır. Şurupdaki AR tayini, “Gerçek Örneklerde AR'in Tayini İçin Kullanılan Yöntem” bölümünde belirtildiği gibi gerçekleştirilmiştir. Numunelere standart AR çözeltisinin ilavesiyle standart katma uygulanarak geri kazanım deneyleri gerçekleştirilmiştir. Bu deneylerde AR'ın geri kazanımı %96,00 ve %101,33 arasında değişmiştir. Bu, geliştirilen yöntemin AR için CPE yönteminin uygulanabilirliğini göstermektedir (Tablo 4).

**Tablo 4.** CPE sonrasında şurup numunesindeki AR'ın spektrofotometrik tayin sonuçları

Eklenen AR ± GS <sup>a</sup> (µg mL <sup>-1</sup> )	Bulunan AR ± GS <sup>a</sup> (µg mL <sup>-1</sup> )	Geri kazanım <sup>b</sup>
-	0,76± 0,05	-
1,0	1,72± 0,07	96,00
1,5	2,28 ± 0,02	101,33
2,5	3,27 ± 0,02	100,40

<sup>a</sup>GS, güven sınırı, ( $\frac{t_s}{\sqrt{n}}$ ); n=5

<sup>b</sup>Geri kazanım =  $\frac{(c_2 - c_1)}{c_3} \times 100$

C<sub>1</sub>= Örnek konsantrasyonu

C<sub>2</sub>= Örnek + Eklenen std konsantrasyonu

C<sub>3</sub>=Eklenen std konsantrasyonu

### ***Yöntemin Enerji İçeceğine Uygulanması***

Geliştirilen bu yöntem marketlerde satılan AR içerikli bir enerji içeceğine de “Gerçek Örneklerde AR’ın Tayini İçin Kullanılan Yöntem” bölümünde belirtildiği gibi uygulanmıştır. Tablo 5’te sonuçlar verilmiştir.

**Tablo 5.** CPE sonrasında enerji içeceği numunesindeki AR'ın spektrofotometrik tayin sonuçları

Eklenen AR ± GS <sup>a</sup> (µg mL <sup>-1</sup> )	Bulunan AR ± GS <sup>a</sup> (µg mL <sup>-1</sup> )	Geri kazanım <sup>b</sup>
-	1,15 ± 0,03	-
1,0	2,16 ± 0,07	101,05
1,5	2,65 ± 0,01	100,08
2,5	3,59 ± 0,06	97,87

<sup>a</sup>GS, güven sınırı, ( $\frac{t_s}{\sqrt{n}}$ ); n=5

<sup>b</sup>Geri kazanım =  $\frac{(c_2 - c_1)}{c_3} \times 100$

C<sub>1</sub>= Örnek konsantrasyonu

C<sub>2</sub>= Örnek + Eklenen std konsantrasyonu

C<sub>3</sub>=Eklenen std konsantrasyonu

### **SONUÇ ve TARTIŞMA**

Bu çalışma, bir şurup örneğinden AR ekstraksiyonu için CPE yönteminin optimizasyonu için, deney tasarım yöntemi olan yanıt yüzey metodolojisinin (RSM) optimizasyon modeli BBD yöntemini kullanılarak, AR’ın spektrofotometrik tayin yapılmıştır. Bu çalışmada, AR’ın spektrofotometrik



taini öncesi CPE için ilk kez Brij 58 kullanılmıştır. Geliştirilen CPE yönteminin hassas, seçici, yüksek ekstraksiyon verimi ve düşük maliyetli olmasının yanı sıra çevreye zararının olmaması gibi avantajları vardır. Literatürde bildirilen benzer diğer yöntemlerle karşılaştırıldığında (Tablo 6) bu yeni optimize edilmiş AR tayini yönteminin analitik performansı, AR'ın hassas tayini için rutin analizlerde ve kısa sürede sonuç veren benzeri çalışmalara alternatif oluşturabilecektir.

**Tablo 6.** Literatürde bildirilen CPE sonrasında AR'ın spektrofotometrik tayini yöntemlerinin mevcut yöntem ile karşılaştırılması.

Yüze y aktif Madd e	Tuz	pH	İnk. <sup>a</sup> sıcaklığı, (°C)	İnk. <sup>a</sup> süre si (dk)	Seyrelt me çözücüsü	Kalibrasy on aralığı, (□g mL <sup>-1</sup> )	LOD , (□g mL <sup>-1</sup> )	% Geri kazanı m	Kaynak
Tergitol NP-7	NaCl, 1,5 mL, 2,0 M	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 0,2 M	30	20	Etanol, 2 mL	0,00-6,00	0,00 3	98,00-100,00	Bişgin, 2018
CTA B, Triton X-100	KCl, 6,0 mL, 1 M	4	80	40	Su, 2,5 mL	0,025-2,500	0,01 0	92,00-96,00	Heidariz adi ve Tabaraki , 2016
Brij 35, Triton X-114	NaCl, 0,75 mL, 2,0 M	4	70	30	Su, 5,0 mL	2,0-40,0	1,2 1,9	83,00-91,00 94,00-99,00	Thani, 2017
CTA B, Triton X-114, Triton X-100	KCl, 7,0 mL, 1 M	2,5	60	50	Su, 2,0 mL	0,020-1,400	0,00 78	96,50-106,10	Pourreza ve ark. 2011
Brij 58	Na <sub>2</sub> S O <sub>4</sub> , 2 g	6 (4-8)	70	10	Su, 1,0 mL	0,05-5,00	0,00 10	96,00-101,33	Mevcut çalışma

<sup>a</sup>İnk.= İnkübasyon

## KAYNAKLAR

- Alghamdi, A.H. (2005) Determination of allura red in some food samples by adsorptive stripping voltammetry. *J. AOAC Int.* 88, 1387–1393.
- Bezerra, M.A., Santelli, R.E., Oliveira, E.P. (2008) Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta* 76, 965–977.
- Bişgin, A.T. (2018) Cloud point extraction and spectrophotometric determination of allura red (E129) in foodstuffs. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 8(4): 239-246.
- Box, G.E.P., Hunter, W.G., Hunter, J.S. (1978) *Statistics for Experimenters*, Wiley, New York, USA.
- Chanlon, S., Joly-Pottuz, L., Chatelut, M., Vittori, O. Cretier, J.L. (2005), Determination of carmoisine, allura red and Ponceau 4R in sweets and soft drinks by differential pulse polarography. *Journal of Food Composition and Analysis*. 18(6), 503-515.
- Chanlon, S., Joly-Pottuz, L., Chatelut, M., Vittoria, O., Cretier, J.L. (2005) Determination of Carmoisine, Allura red and Ponceau 4R in sweets and soft drinks by Differential Pulse Polarography. *Journal of Food Composition and Analysis*, 18, 503-515.
- Dinç, E., Baydan, E., Kanbur, M. Onur, F. (2002). Spectrophotometric multicomponent determination of sunset yellow, tartrazine and allura red in soft drink powder by double divisor ratio spectrum derivative, least inverses and principal component regression methods. *Talanta*, 58(3), 579-594.
- EFSA (2009) Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to food (ANS), scientific opinion on the re-evaluation of Allura Red AC (E129) as a food additive *EFSA J.*, 7(11), 1327.
- Ferreira, S.L.C., Bruns, R.E., da Silva, E.G.P., dos Santos, W.N.L., Quintella, C.M., David, J.M., de Andrade, J.B., Breikreitz, M.C., Jardim, I.C.S.F., Neto, B.B. (2007 a) Statistical designs and response surface techniques for the optimization of chromatographic systems, *Journal of Chromatography A*, 1158, 2–14.
- Ferreira, S.L.C., Bruns, R.E., Ferreira, H.S., Matos, G., David, J., Brandao, G., Dos Santos, W. (2007 b) Box-Behnken design: an alternative for the optimization of analytical methods. *Analytica Chimica Acta*, 597, 179–186.
- Gianotti, V., Angioi, S., Gosetti, F., Marengo, E., Gennaro, M.C. (2005) Chemometrically assisted development of IP-RP-HPLC and spectrophotometric methods for the identification and determination of

- synthetic dyes in commercial soft drinks. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 28, 923-937.
- Gosetti, F., Chiuminatto, U., Mazzucco, E., Calabrese, G., Gennaro, M.C. ve Marengo, E. (2013). Non-target screening of Allura Red AC photodegradation products in a beverage through ultra high performance liquid chromatography coupled with hybrid triple quadrupole/linear ion trap mass spectrometry. *Food Chemistry*, 136(2), 617-623.
- Gosetti, F., Frascarolo, P., Mazzucco, E., Gianotti, V., Bottaro, M., Gennaro, M.C. (2008) Photodegradation of E110 and E122 dyes in a commercial aperitif – A high performance liquid chromatography-diode array-tandem mass spectrometry study. *Journal of Chromatography A*, 1202, 58-63.
- Heidarizadi, E. ve Tabaraki R. (2016) Simultaneous spectrophotometric determination of synthetic dyes in food samples after cloud point extraction using multiple response optimizations. *Talanta*, 148, 237–246.
- Huang, H.Y., Chiu, C.W., Sue, S.L., Cheng, C.F. (2003) Analysis of food colorants by capillary electrophoresis with large-volume sample stacking. *Journal of Chromatography A*, 898, 271-275.
- Huang, H.Y., Chiu, C.W., Sue, S.L., Cheng, C.F. (2003). Analysis of food colorants by capillary electrophoresis with large-volume sample stacking. *Journal of Chromatography A*, 995(1-2), 29-36.
- Khuri, A., Mukhopadhyay, S. (2010) Response surface methodology, *WIREs Computational Statistics*, 2, 128-149.
- Kiseleva, M.G., Pimenova, V.V., Eller, K.I. (2003) Optimization of conditions for the HPLC determination of synthetic dyes in food. *Journal of Analytical Chemistry*, 58,685–690.
- Kumar, A., Prasad, B., Mishra, I.M. (2008) Optimization of process parameters for acrylonitrile removal by a low-cost adsorbent using Box–Behnken design. *Journal of Hazardous Materials*, 150, 174–182.
- McCann, D., Barret, A., Cooper, C., Crumpler, D., Dalen, L., Grimshaw, K., Kitchin, E., Lok, K., Porteous, L., Prince, E., Sonuga-Barke, E., O’Warner, J., Stevenson J. (2007) Food additives and hyperactive behavior in 3-year and 8/9-year-old children in the community: a randomized, double-blinded, placebo-controlled trial. *Lancet*, 370(9598), 1560-1567.
- Montgomery, D.C. (2009) *Design and Analysis of Experiments*, 7th Edition, John Wiley&Sons, Singapore.
- Pourreza, N., Rastegarzadeh, S., Larki, A. (2011) Determination of Allura red in food samples after cloud point extraction using mixed micelles. *Food Chemistry*, 126(3),1465-1469.

- Regulation (EC) No 1333/2008 of the European Parliament and of the Council of the 16 December 2008 on food additives, Article 24.1 and Annex V.
- Silva, M.L.S., Garcia M.B.Q., Lima, J.L.F.C., Barrado E. (2007) Voltammetric determination of food colorants using a polyallylamine modified tubular electrode in a multi commutated flow system. *Talanta*, 72, 282-288.
- Souza, A.S., dos Santos, W.N.L., Ferreira, S.L.C. (2005) Application of Box–Behnken design in the optimisation of an on-line pre-concentration system using knotted reactor for cadmium determination by flame atomic absorption spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B*, 60, 737–742.
- Thani, M.Z. (2017) A simple spectrophotometric evaluation method of allura red (E129) in several food samples using cloud point extraction. *Al-Mustansiriyah Journal of Science*, 28(3), 134-140.
- Zetterberg, L.A., Ilbäck, N.G. (2013) The synthetic food colouring agent Allura Red AC (E129) is not genotoxic in a flow cytometry-based micronucleus assay in vivo. *Food and Chemical Toxicology*, 59, 86-89.

## BÖLÜM 8

# Çevresel Örneklerden Pigment Üreten Bakterilerin İzolasyonu, Karakterizasyonu ve Pigmentlerin Potansiyel Uygulama Alanlarının Araştırılması

Özlem KÜTÜK<sup>1</sup>

Mutlu Nisa ÜNALDI CORAL<sup>2</sup>

1- *Yüksek Lisans Öğrencisi; Mersin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü  
ozlemkutuk69@gmail.com ORCID No: 0000-0002-4433-5625*

2- *Prof. Dr.; Mersin Üniversitesi Eğitim Fakültesi Matematik ve Fen  
Bilimleri Eğitimi Bölümü mutlunisa@mersin.edu.tr ORCID No: 0000-0001-  
6124-4576*

3- *Bu çalışma 2022 yılında Mersin Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü bünyesinde hazırlanan “Çevresel örneklerden pigment üreten bakterilerin izolasyonu, karakterizasyonu ve pigmentlerin potansiyel uygulama alanlarının araştırılması” isimli yüksek lisans tezinden türetilmiştir.*

### GİRİŞ

İnsanlar geçmişten günümüze yoğun bir şekilde renk maddelerini gıda, kozmetik, ilaç sektörü ve boya üretiminde kullanmaktadır. Sentetik pigmentler bulununcaya kadar doğal pigmentler yaygın olarak kullanılmaktaydı. Doğal pigmentler çeşitli bitkilerden, böceklerden, bakteri ve mantar gibi mikroorganizmalardan ekstrakte edilen boyalardır. Doğal pigmentler dünyada ticari olarak özellikle kürk, yün, deri ve pamuk boyama gibi amaçlar için kullanılmıştır. Ancak doğal pigmentlerin üretiminin yavaş olmasından kaynaklı piyasadaki talebi yeterince karşılayamamış ve sentetik pigmentlerin ortaya çıkışı kaçınılmaz olmuştur. Sentetik pigmentlerin ilk olarak Pekin’de 1856’da tanıtılmasıyla birlikte oldukça maliyeti düşük olan bu pigmentlerin kullanımı artmış ve doğal boyalara olan talep giderek azalmıştır. Ayrıca yarı sentetik pigmentler de üretilmiş ve kullanıma sunulmuştur (Venil vd., 2013). Sentetik

pigmentli boyaların, geliştirilmesinin kolay olması, ekonomik olması, gıdalarda istenmeyen tatların olmaması ve az miktarda kullanılsa bile mükemmel renklendirme özellikleri gibi çeşitli özelliklerinden dolayı büyük ilgi görmüştür (Sajjad vd., 2020).

Tekstil alanında çok yaygın bir şekilde kullanılan sentetik pigmentler özellikle ciddi su kayıplarına neden olmaktadır. Bir kg'lık bir tekstil malzemesinin boyanması için 100 L'ye kadar su tüketilebilmektedir. Su tüketiminin fazla olmasının yanında boyalı suların çevreye bırakılması ve yeraltı sularına karışması neticesinde çevre kirliliğine de neden olmaktadır (Sudova vd., 2007). Sentetik pigmentlerin boyama endüstrisinde yoğun bir şekilde kullanımı sonucunda doğaya olumsuz etkilerinin olduğu görülmüştür. İşlemler sonrasında büyük miktarlardaki boya maddelerinin sulara karışması insanlar için tehdit oluşturmakta ve insanların uzun süre maruz kalmaları durumunda kanserojen etki göstermektedirler. Bu sebeplerden dolayı, doğal pigmentler özellikle çocuk tekstilinde, gıda maddelerinde vb. kullanımı çevre dostu olmasından dolayı tercih edilmesi gerekmektedir (Velmurugan vd., 2010). Kullanılan sentetik pigmentli boyaların çoğu, insan sağlığına zararlı benzen, kurşun, bakır, cıva, krom gibi ağır metaller içeren kimyasal bileşiklerden oluşmaktadır. Daha önce Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından ilaç, gıda, tekstil ve kozmetik geliştirmede kullanılmasına izin verilen birçok sentetik renklendiricinin daha sonra kullanımlarında kansere neden olduğu bulunmuştur (Sajjad vd., 2020). Sentetik pigmentlerin birçok soruna neden olduğunu gösteren çalışmalar sonrasında bakteriler tarafından üretilen pigmentlerin kullanımı söz konusu olmuştur. Doğal pigmentlerin uygulama alanlarının araştırılmasına büyük ilgi ve önem verilmiştir (Tuli vd., 2015; Chandika vd., 2015).

### ***Pigmentleri Tarihçesi***

Pigment, renkli cisimleri belirtmek amacıyla kullanılan Latince kökenli bir kelimedir. Ortaçağ dönemlerinde pigment gıda renklendiricisi terimi olarak kullanılmıştır. Biyolojik terminolojide ise pigment, hücre granüllerinde oluşan ve dokuların içinde depolanan hayvan ve bitkilerde yaygın olarak bulunan renklendirici maddelerdir. Bütün bu doğal ve yapay katmanlara da "pigment" adı verilmiştir (Babitha vd., 2009).

Tarih öncesi dönemlerde insanların kıyafetlerini renklendirmek, kendilerini süslemek ve yaşadıkları ortamlara iz bırakmak amacıyla çeşitli boyaları kullandıkları bilinmektedir. MÖ 1900-2600 yıllarında İndus vadisi uygarlığında kullanılan elbise kumaşlarının iplik ve bez kısımlarında kök boyasının izleri bulunmaktadır. Yine insanların kendilerini güzelleştirmek için kına gibi doğal

boyaları kullandıkları bilinmektedir. Doğal boyalar, yazılı kaynaklara göre ilk kez Çin’de MÖ 2600 yılında kullanılmış ve kayıtlara geçmiştir (Siva, 2007). İlkel boyama teknikleri bitkilerin ham halde ya da kaynatılarak özütünün çıkarılıp rengin kumaşı boyaması ile gerçekleştirilmiştir. Bu metotun kullanımı zor ve zaman alıcı olduğundan daha ileri yöntemlerle, bir çok meyve ve bazı bitkilerin ezildikten sonra kaynatılıp, elde edilen boyanın kumaşa uygulanması şeklinde geliştirilmiştir. Kırmızı renkli bir boya olan Koşnil boyası ise Aztek ve Maya medeniyetleri tarafından ilk olarak kullanılmıştır. Tarih boyunca kullanılan çivit otu, kına ve safran gibi doğal boyalar günümüze kadar ulaşmıştır. 8. yüzyılda Japonya’da soya ve adzuki fasulyesinden elde edilmiş boyalar gıdalarda kullanılmıştır. Ayrıca doğal pigmentlerle ilgili yapılan farklı çalışmalar boyama sanatı gibi birçok alanı da etkilemiştir (Venil vd., 2013).

18. yy’ da hızlı nüfus artışı ve sanayi devriminin başlaması ile endüstriyel alanda doğal renk maddelerine talep artmıştır. Ancak artan talebin karşılanmasında doğal üretilen pigmentler yetersiz kalınca sentetik pigmentler üzerinde yapılan çalışmalar yoğunlaştırılmıştır. 1704’te Almanya’da Johann Jacob Diesbach, laboratuvarında Prus mavisini üretmiştir ve bu pigment kimyasal olarak sentezlenen ilk renk maddesi olmuştur. Az miktarlarda kullanılsa bile sentetik pigmentlerin doğal pigment maddelerine göre renk verme gücü, renk spektrumları ve kalıcılıkları daha yüksek olmuştur. Bu nedenlerden dolayı sentetik pigmentli renk maddeleri sanayide çok geniş bir kullanım alanı bulmuştur. Ancak daha sonraki yıllarda yapılan çalışmalarda sentetik pigmentlerin özellikle gıdalarda kullanımı konusunda olumsuz sonuçların olması nedeniyle üreticiler doğal pigmentleri kullanmaya tekrar yönelmişlerdir.

Mikroorganizmalar kullanılarak pigment üretiminin yapıldığı Blakeslea küfünden  $\beta$ -karoten elde edilmesi ilk başarılı çalışmadır. 20. yy’dan itibaren doğal pigmentlerin bu şekilde üretimi ile ve organik kimyadaki biyoteknolojik yöntemlerin gelişmesi ile doğal pigmentler yeniden dikkat çekmeye başlamıştır (Venil vd., 2013; Gurpreet ve Balmeat, 2014).

### ***Pigmentlerin Sınıflandırılması***

Günümüzde pigmentler doğal, sentetik ve inorganik pigmentler olarak sınıflandırılmaktadır. Sentetik pigmentler in vitro ortamlarda, doğal pigmentler ise bitkinin kök, gövde, yaprak gibi organlarından, çeşitli böceklerden ve mikroorganizmalardan izole edilirler. Endüstriyel amaçlı kullanımda pigmentlerin özelliklerinin bilinmesi tüketiciler için tercih aşamasında da önem teşkil etmektedir (Erdal ve Ökmen, 2013).

Pigmentler elde edildikleri kaynaklarına göre; bitkisel, hayvansal ve mikrobiyal pigmentler olarak sınıflandırılmaktadırlar. Kimyasal özelliklerine göre ise; flavonoid türevleri (yapısında iki fenil halkası bulunduran pigment türevleri), isoprenoid türevleri, pirol türevleri (C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>NH yapısında olan pigmentler) ve azot-heterosiklik (yapısında azot grubu bulunduran bileşikler) türevleri olarak sınıflandırılırlar (Sigurdson vd., 2017).

Bir gıda maddesinin renginin göze hoş gelen güzel görünümlü ve bu görünümün gıdanın tazeliğini ve güvenliğini göstermesi açısından önemlidir. Doğal kaynaklardan üretilen pigmentlerin renklendirilme çalışmalarında son yıllarda dünya çapında ilgi görmekte ve önem kazanmaktadır. Bu pigmentler, istenmeyen pazar nedeniyle sentetik olanların yerine doğal bir gıda boyası olarak güvenli kullanımları için aranmaktadır (Soliev vd., 2011).

### ***Bakteriyel Pigmentler***

Mikroorganizmalar arasında bakteriler, çeşitli biyoürünler üretme konusunda muazzam bir potansiyele sahiptir. Bakteriyel pigmentlerin doğal renklendiriciler olarak üretimi ve uygulamaları çeşitli araştırmacılar tarafından incelenmiştir. Mikrobiyal kökenli kaynaklardan özellikle bakterilerin üretiminin hızlı ve kolay olması, sürekli kültür bioreaktörlerde üretilebilmeleri ve gen manipülasyonuna uygun olmalarından kaynaklı pek çok avantajı bulunmaktadır. Bu nedenle bakteriler biyoteknolojik çalışmalarda pigment üretimi için çok daha fazla tercih edilmektedir. Çeşitli araştırmacılar bakteriyel pigmentlerin doğal renklendirici olarak üretimi ve uygulanması konusunda çalışmalar yapmış ve olumlu sonuçlar alınmıştır (Ahmad vd., 2012).

Endüstriyel alanlarda kullanılan bazı bakteriyel pigmentlerin bakterileri tanımlamak için de kullanılabilirler bilinmektedir. *Agrobacterium aurantiacum* tarafından üretilen Astaksantin pigmenti kırmızı renkli bir pigment olup iyi bir örnektir. Kantaksantin pigmenti ise fotosentetik *Bradyrhizobium sp.* bakterisinden elde edilen bir pigment olup, yıllarca balık yeminde kullanılmıştır. *Halobacterium*'dan elde edilen kırmızı- turuncu renkli kantaksantin mikrobiyal kaynaklı diğer bir pigmenttir. Zeaksantin ise *Flavobacterium* türünden elde edilen sarı renkli pigmenttir. Kümes hayvanlarının yemlerine katkı maddesi olarak ilave edilmekte ve yumurta sarısı rengini arttırmak için kullanılmaktadır (Dufossé vd., 2005).



**Tablo 1: Bakteriyel pigmentler ve uygulama alanları (Tunca, 2019)**

Bakteri	Pigment	Renk	Uygulama alanları
<i>Pseudoalteromonas denitrificans</i>	Cycloprodigiosin	Sarı	Antiplasmodiyal, antikanser
<i>Chromobacterium violaceum</i>	Violacein	Mor	Antioksidant, ROS etkisini giderici, antifugal ajan
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Piyosiyenin	Mavi, Yeşil	Sitotoksiste, nötrofilapoptozis, proinflamatuvar, antimikrobiyal ajan
<i>Agrobacterium aurantiacum</i>	Astaxanthin	Pembe Kırmızı	Antioksidant, fotoprotektant, antikanser, antiinflamatuvar, gıda renklendiricisi
<i>Bradyrhizobium sp.</i>	Cathaxanthin	Turuncu	Antioksidant, antikanser
<i>Streptomyces sp.</i>	Undecylprodigiosin	Kırmızı	Antibakteriyel, antioksidatif
<i>Staphylococcus aureus</i>	Staphyloxanthin	Altın Sarısı	Antioksidant, ROS etkisini giderici
<i>Xanthomonas oryzae</i>	Xanthomonadin	Sarı	Fotohasara karşı koruma
<i>Serratia marcescens</i>	Prodigiosin	Kırmızı	Sitotoksiste; antiproliferatif etki; diabetes mellitus; B-cell kronik lenfotik lösemi hastaları
<i>Flavobacterium</i>	Zeaxanthin	Sarı	Hayvan derisinin ve yumurta sarısının rengini artırmak için kanatlı yemlerinde katkı maddesi olarak; kozmetik ve gıda endüstrisinde renklendirici olarak
<i>Vogesella indigofera</i>	Blue pigment	Mavi	Ağır metal gideriminde

Bu çalışmada çevresel örneklerden pigment üreten bakteri izolasyonu ve bu pigmentlerin kısmi karakterizasyonu ile potansiyel uygulama alanlarının araştırılması hedeflenmiştir. Potansiyel uygulama alanı olarak çeşitli sektörlerde renk maddesi şeklinde kullanımı ile sınırlı kalmayarak bunun yanında antibakteriyel ve antiyalgal özelliklerinin araştırılması da amaçlar içerisinde. Bakterilerden üretilen pigmentlerin sentetik pigmentlere göre kolay, ekonomik ve yüksek verimlilikte elde edilmesi hedefi de bu çalışmamızın diğer bir önemli amacını oluşturmaktadır.

## MATERYAL VE YÖNTEM

### *Örneklerin Toplanması*

Çalışmada çeşitli çevresel örneklerden pigment üreten bakteri izolasyonu yapmak amacıyla toprak ve su örnekleri toplanmıştır. Örnekler aseptik koşullarda laboratuvara getirilerek izolasyon aşamasına geçilmiştir. Çalışmada

kullanılan örnekler Mersin ili ve Tarsus ilçesinin farklı bölgelerinden alınmıştır. Tablo 2’de örneklerin toplandığı bölgeler verilmiştir.

**Tablo 2.** Örneklerin toplandığı bölgeler

İzolatlar	Temin edilen yer
T1–Sarı	Toprak
BYL- Kırmızı	Toprak
Phyto	Biy. Lab
T2- Sarı	Toprak
BYL –Sarı	Deniz suyu
LAB – Siyah	Toprak
BYL3 – Sarı	Deniz suyu
BYL-1 Sarı	Deniz suyu
T3 – Kırmızı	Toprak
Şelale Pembe	Şelale suyu

### ***Pigment Üreten Bakterilerin Seçimi ve Saklanması***

Su örneklerinden 100 µl alarak daha önceden hazırlanmış besi yerlerine direk yayma ekim yöntemi ile ekim yapılmış, 48 saat 35°C’de inkübasyondan sonra renkli koloniler seçilmiştir. İnkübasyon sonrasında seçilen koloniler tekrar saflaştırılmak üzere 3 kez tek koloni ekim yapılmıştır. Toprak örnekleri ise suda çözülüp dinlendirildikten sonra süpernatanttan alınarak ekim yapılmıştır. 1-4 gün inkübasyon sonrasında pigment üreten tek düşmüş saf koloniler seçilmiştir. Renkli koloni oluşturan örnekler seçilerek daha sonraki çalışmalarda kullanmak üzere stok kültürleri hazırlanıp +4 derecede buzdolabında saklanmıştır.

### ***Bakterilerin Tanımlanması***

Bakteri izolatlarının tanımlanması kültürel, morfolojik, biyokimyasal özellikleri ile rRNA analizlerine göre yapılmıştır. Besiyerinde pigment üretmiş olan renkli bakteri kolonilerinin karakterizasyonu, rengi, şekli, hareketliliği gram boyama metodu kullanılarak yapılmıştır.

### ***Pigment Üretimi***

Pigment üretimi için, izole edilen bakterilerden 4 farklı besi yerine (Nutrinet Agar, Nutrient Broth, Luria Bertani Broth (LB) ve Luria Bertani (LB) Agara ekim yapılmıştır. Sıvı kültürler 35 derecelik 150 rpm’de çalkalamalı inkübatörde 7 gün ünkübasyona bırakılmıştır. Pigmentler, katı besiyerinden ve sıvı besiyerinden ekstraksiyon yöntemi kullanılarak elde edilmiştir. Kültürler, 100 ml’lik steril Nutrient Broth ve LB broth besiyerlerinde 35 °C’de inkübatörde statik durumda ve 150 rpm’de döner çalkalayıcıda tutulmuş, katı besiyerleri ise

35 °C'de standart etüvde 7 gün boyunca inkübasyona bırakılarak pigment oluşumu gözlenmiştir (Goswami vd., 2014).

### ***Farklı ve pH ve Sıcaklık Ortamlarında Pigment Üretimi***

NA ve LB agar besi yerleri pigment üretmek için üçlü setler halinde (I, II, III) hazırlanmıştır. Farklı pH'ta besiyerleri elde etmek için otoklavlanmadan önce besiyerlerinin pH'ı 5,3, 7,0 ve 8,5'e HCl ile ayarlanmıştır. Ekim yapılan petripler 2-4 gün arası 35°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından petri kutusunda üremiş bakteriler sıyrılarak alınmış ve spektrofotometrik ölçümler gerçekleştirilmiştir.

Farklı sıcaklıklar için, benzer şekilde hazırlanan besiyerleri kullanılmış bakteri ekimi yapıldıktan sonra 25-30-37 °C aralıklarında üçlü setler şeklinde inkübasyona bırakılmıştır. 2-4 gün arası inkübe edildikten sonra, petri kutusunda üremiş bakteriler sıyrılarak alınmış ve spektrofotometrik ölçümler gerçekleştirilmiştir.

### ***Pigment Ekstraksiyonu***

Pigment ekstraksiyonu için, izole edilen bakterilerden Nutrient Broth ve LB Broth besiyerlerine ekim yapılmış çalkalamalı etüvde 150 rpm'de 35 derecelerde 1 hafta inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra 4000 rpm'de 10 dakika 2 kez santürlüj edilmiş ve süpernatant 5 mL'lik çözücülerde (etanol, metanol) çözülerek 60 °C'lik su banyosunda 20 dakika bekletilmiştir Ardından 4000 rpm'de 10 dakika daha santürlüj edilmiş, süpernatant daha sonraki uygulamalar için steril endorfllara aktararak +4 °C'de saklanmıştır (Shetti, 2017).

### ***Spektrofotometrik Ölçümler (400, 500, 600 nm ölçümler)***

Literatürdeki çalışmalardan pigment dalga boyu aralığı dikkate alınmıştır ve buna bağlı olarak UV spektrofotometrik ölçümler için quartz küvetler kullanılmıştır. Cam küvetlerin tipik olarak görünür ışığın dalga boyu aralığında kullanımı için uygundur. Renkli bakteri kolonilerinden izole edilen pigmentler metanol ile çözdürüldükten sonra ve santrifüj işlemlerinin yapılp pellet kısımları atıldıktan sonra süpernatant kısımları renkli sıvı pigmentler quartz küvetler kullanılarak kırmızı pigmentliler için 400, 500 ve 600 nm (Ahmad vd., 2012), açık sarı ve sarı olanlar için ise 400, 500, 600 nm dalga boyunda ölçümler alınmıştır (Gupta vd., 2019). Daha sonrasında bakterilerin farklı pH'larda pigment üretimi gerçekleştirilmiştir. Farklı pH'larda üretilen pigmentler metanol ile çözdürüldükten sonra yeniden spektrofotometrik ölçümleri yapılmıştır. İkinci ölçümlerde 10 adet bakteri türü ölçülmüştür. Ölçüm sonucunda çıkan pikler doğrultusunda değerlendirmeler yapılmıştır.

Sonuçlar araştırma bulguları ve tartışma kısmında detaylı bir şekilde anlatılmıştır.

### ***Thin Layer Kromatografi (TLC)***

İnce tabaka kromatografi (TLC) pigmentlerin karakterizasyon işlemleri ve tanısı için kullanılan bir ayırma yöntemidir. Sabit ve hareketli olmak üzere iki fazı bulunmaktadır. Ekstrakte edilmiş olan pigmentler kısmi saflaştırma işlemleri için Kloroform: metanol (9:1), Kloroform: metanol (6:4), kullanılarak İnce Tabaka Kromatografisi (TLC) plakaları ile ayrıştırılmıştır. Örnekler hazır silika jel tabakası (Merk) üzerine kapiler tüp yardımıyla uygulanarak havada kurutulmuştur. Kör olarak çözücü TLC tabakaları solvent sistemine batırılıp ve pigmentlerin yürüme mesafelerine tespit edilmiştir. Metanol ile ekstrakte edilmiş olan pigmentlerin kromatografik olarak analizinde (Gupta vd., 2019) kırmızı pigmentler için çözücü olarak etil asetat, hareketli faz olarak kloroform/metanol (9/1 oranında) turuncu ve sarı pigmentler için çözücü olarak metanol, hareketli faz olarak ise metanol/aseton (30/20 oranında) tercih edilmiştir. Çalışmada kırmızı pigmentler için çözücü olarak metanol hareketli faz olarak kloroform/metanol sarı ve açık sarı pigmentler için ise çözücü olarak metanol hareketli faz olarak kloroform/metanol (9/1 oranında) kullanılmıştır. Uygun çözücülerle ekstrakte edilen pigmentlerden 20 µl alınarak silika tabakası üzerine damlatılmıştır. Kromatografi tankına yerleştirilen silika tabaka 1 cm yükseklikte olacak şekilde kutunun içerisine dik bir şekilde konulmuştur. Yaklaşık 15-20 dakika sonrasında silika tabaka üzerindeki pigmentlerin yürüme mesafeleri hesaplanarak pigmentler hakkında yorumlar yapılmıştır.

### ***Antimikrobiyal Etkisinin Belirlenmesi***

Pigmentlerin antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesi için öncelikle pigmentlerin ekstraksiyon işlemleri gerçekleştirilmiştir. Ekstrakte edilen pigmentlerin konsantre etmek için Rotary evaporatör kullanılmıştır. Konsantre edilmiş pigmentler 1 ml metanol ile tamamen çözdürülmüştür. MHA'lı besiyerlerinin üzerine disk difüzyon testi uygulamak için Oxoid™ marka (Blank Antimicrobial Susceptibility discs) antimikrobiyal duyarlılık testi diskleri kullanılmıştır. Disklerin herbirine 20 µL hazırlanmış olan pigment solüsyonu emdirilerek etüvde kurutulmuştur. Pigmentlerin antimikrobiyal etkilerini araştırmak için disk difüzyon tekniği kullanılarak Müller Hilton agarda standart bakteri türler üzerinde test edilmiştir. Standart bakteri türleri; *E.coli*,(25922) *Staphylococcus aureus*,(25953), *Pseudomonas aeruginosa* (27853), *B. subtilis spizenii*, *En. faecalis* ve *En. hormaecheni* kullanılmıştır. Bakteri kültürü için MHA besiyerine ekimleri gerçekleştirilmiş ve üzerine

hazırlanmış olan pigmentli diskler belli aralıklarla yerleştirilmiştir. Petriler ters çevrilmeden 36 °C'lik etüvde 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucunda her bakteri kültürü için inhibisyon zon çapı milimetrik cetvel ile ölçülmüştür.

### ***Antialgal Etkinin Belirlenmesi***

Pigmentlerin algler üzerindeki etkisinin belirlenmesi için 2 alg kültürü kullanılmıştır. Bunlar *Grammatophora* cinsi ve *Prymnesium parvum* türüdür. Akdeniz suyundan izole edilen *Grammatophora*'nın 13 mL'lik F2 besiyerindeki kültürüne, bakteri pigmenti 50 µL ilave edilmiştir ve sonuçlar gözlemlenmiştir. *Prymnesium parvum* Marmara denizinden izole edilmiştir. 13 mL'lik alg kültürü üzerine 50 µL pigment örneği F2 besi yerine konularak birlikte inkübasyona bırakılmıştır. Her iki alg kültürü için bir kontrol tüpü kullanılmıştır.

### **BULGULAR VE TARTIŞMA**

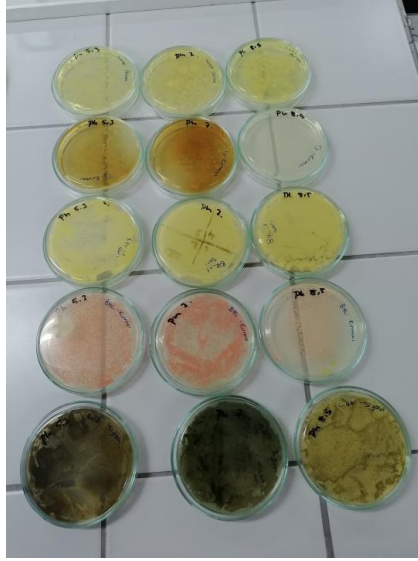
Örnekler, aseptik koşullarda laboratuvara getirilmiş izolasyon için NA ve LB agarlara ekim yapılmıştır. Toprak örnekleri sulandırılarak katı besiyerine tek koloni ekim yapılırken tatlı ve deniz suyu örnekleri direk ekilmiştir. Üreyen koloniler saflaştırmak için tekrarlar şeklinde ekilmiştir. Pigment üretimi gözlenen izolatlar seçilerek çalışmalara bu suşlar ile devam edilmiştir. Şekil 1'de bazı izolatların besiyerinde oluşturdukları pigmentleri görülmektedir. Phyto olarak kodlanan izolat Biyoloji Araştırma Laboratuvarında bulunan alg kültür koleksiyonundan izole edilmiştir. *Nitzschia navis-varingica* kültüründen bakteri izolasyonu yapılmıştır.

Pigment üreten bakterilerin izolasyonu ile ilgili yapılan çalışmalarda, (Sasidharan vd., 2013) havadan, (Asker, 2017) sulardan ve toprak ortamlarından (Kadıoğlu vd., 2018), bitki (Ozidal ve Kurbanoglu, 2018), böcek ve hayvanların farklı bölgelerinden, enfekte olmuş bitki ve hayvan örneklerinden, kısacası steril olmayan herhangi bir ortamdan bakteri izolasyonu yapılabileceği gösterilmiştir. Aksan (2005), çalışmalarında *Rhodotorula glutinis*'in hava, su, meyve fabrikaları atığı, insan ve diğer memeli hayvanlar gibi çok farklı ortamlarda izolasyon yapılabileceğini göstermişlerdir. Bu çalışmada da hem toprak hem de tatlı ve tuzlu sudan izole edilen bakterilerde pigment üreten suşlar tespit edilmiştir.

### ***Bakterilerin Tanımlanması***

rRNA tür analizi sonuçlarına göre izolatlar *Micrococcus yunnanensis*, *Micrococcus luteus* ve *Bhargavaea ginsengi* olarak tespit edilmiştir Kırmızı

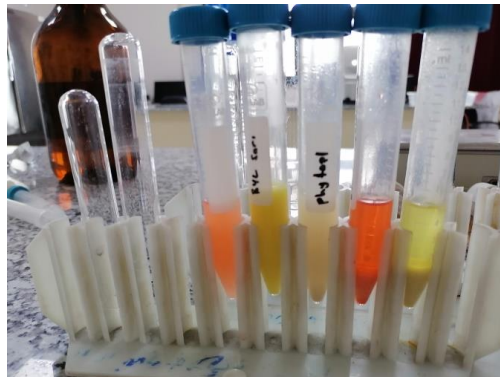
kodlu suşun biyokimyasal test sonuçları ve API 20E sonuçlarına göre *Serratia* cinsi olarak tanımlanmış ancak tür tanımlamasında sonuç elde edilememiştir.



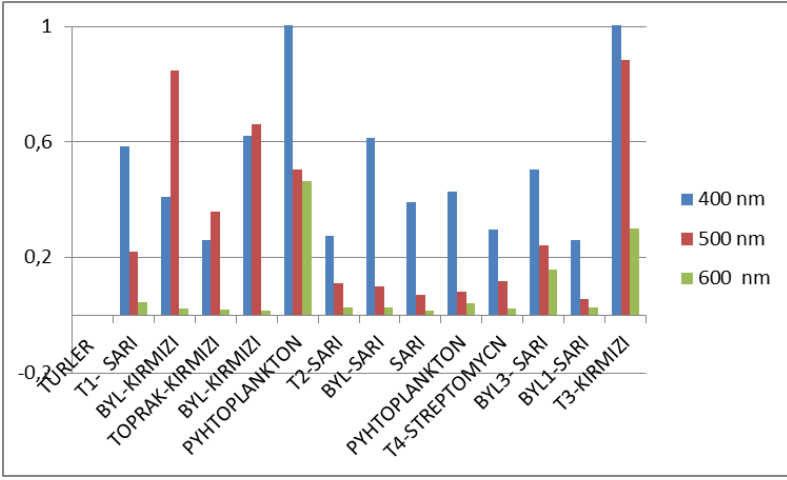
Şekil 1. Katı besiyerlerinde üretilmiş bakteri ve pigmentleri

### ***Pigment Ekstraksiyonu ve Spektrofotometrik Ölçüm***

Pigment ekstraksiyonunda çok farklı organik çözümler kullanılmaktadır. Daha önce yapılan çalışmalarda ekstraksiyon için metanol, etanol, etil asetat ve aseton sıklıkla kullanılmıştır. Bu çalışmada pigment ekstraksiyonunda çözücü olarak metanol kullanılmıştır (Şekil 2) (Shetti, 2017). Ekstrakte edilen pigmentlerin hangi dalga boyunda en iyi absorbans verdiğini tespit etmek için spektrofotometrik ölçümler yapılmıştır. 400-500 ve 600 nm dalga boyunda yapılan ölçüm sonuçları Şekil 3’de verilmiştir.



Şekil 2. Metanol ile çözülmüş olan pigmentler



**Şekil 3.** Pigmentlerin UV spektrofotometrik ölçüm sonuçları

### ***Pigmentlerin Kısmi Karakterizasyonu:***

Pigmentlerin karakterizasyon işlemleri için literatürde farklı çalışmalar yapılmıştır. Trivedi vd. (2017), pirinç tarlasından almış oldukları toprak örneklerinden bakteri izolasyonları gerçekleştirmişlerdir. Bakterilerden pigment izolasyonu için üç çözücü kullanmışlardır. Bunlar; metanol, n-hekzan ve etil asetatdır. Bu üç çözücü kullanılarak bakterilerden pigment izolasyonu yapmışlar ve izole ettikleri pigmentlerin karakterizasyonu için Fourier dönüşümü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) tekniğini kullanmışlardır. Pigment oluşturan bakterilerin 16S rRNA gen dizi analizleri yapılarak bakteri türünün *B. subtilis* olduğu, FTIR analizleri sonucunda elde edilen pigmentin standart olarak kullanılan beta karotene benzerlik gösterdiği ve pigmentin karotenoid türevidir olduğu tespit edilmiştir.

Indra vd. (2014), çalışmalarında 41 toprak örneği üzerinde yüksek karotenoid pigment üreten bakteri türleri araştırmışlardır. Araştırmalar ve bakteri izolasyonu sonucunda sarı renkli pigment oluşturduğu görülen 24 bakteri izolatu elde etmişlerdir. Bu pigmentler metanol ekstraktı kullanılarak spektrofotometrik ölçümler için hazırlanmıştır. Spektrofotometrik analizler sonucunda değerlendirmeler yapılmış ve 450 nm'de oluşan pikler, karotenoid pigmentinin varlığını göstermiştir.

Çalışmada kullanılan pigmentlerin karakterizasyonu işlemleri için İnce Kolon (Tabaka) Kromatografisi (TLC) ve UV Spektrofotometrik Ölçümler (400, 500, 600 nm ölçümler) yapılmış ve sonuçlar değerlendirilmiştir. TLC kromatografisi için Rf değeri hesaplanmış ve pigmentlerin karakterizasyonu hakkında literatürde yapılan çalışmalar ile karşılaştırılmıştır.

BYL-Kırmızı için Rf değeri

$$Rf = \frac{8}{10} = 0,8 \text{ cm olarak hesaplanmıştır.}$$

BYL-3 Sarı için Rf değeri

$$Rf: \frac{1,5}{10} = 0,15 \text{ cm olarak hesaplanmıştır.}$$

Rf değerleri incelendiğinde sonuçlar; literatürdeki çalışmalarla karşılaştırılmış BYL- Kırmızı pigmentinin Indra vd. (2014) ve Gupta vd. (2019)'nın yaptığı çalışmalardaki prodigiosinin ile, kırmızı pigmentli olduğu varsayılmıştır. BYL-3 Sarı pigmentinin ise Faraag vd. (2017) ve Srimathi vd. (2017) tarafından yapılan çalışmalarda ki beta-karotenler ile benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 4).



Şekil 4. TCL kağıt kromotografisinde pigmentlerin ölçülmesi

### ***Pigmentlerin Biyolojik Aktivitelerinin Belirlenmesi***

Çalışmada üretilmiş olan bakteri pigmentlerinin biyolojik aktivitelerinin belirlenmesi için antibakteriyel ve antiyalgal özellikleri incelenmiştir. Literatür çalışmaları incelendiğinde Shetti vd. (2017) tarafından yapılan bir çalışmada toprakta pigment üreten bakterilerin izolasyonunu gerçekleştirip pigment üretimi görülmüş olan bakterilerden ekstraksiyon işlemi yapılarak bakteri pigmentlerinin antibakteriyel etkisi araştırılmıştır. İzolasyonu gerçekleştirilen pigmentin morfolojik ve biyokimyasal testleri yapılarak bakteri izolatının *Serratia sp.* (*Serratia marcescens* türüne ait gram negatif çubuk şeklinde



bakteri) olduğu tanımlanmış ve bu izolatin üretmiş olduğu kırmızı pigmentin *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* standart patojen bakterilere karşı antibakteriyel aktiviteye sahip olduğu belirtilmiştir.

Büyüksırt ve Kuleaşan (2013), çevresel kaynaklardan pigment üreten mikroorganizmaların izolasyonu gerçekleştirmiş 16S ve 18S ribozomal DNA dizi analizi yaparak türleri tanımlamışlardır. Tanımlama sonrasında kavuniçi - sarı renkte pigment üreten *Rhodotorula glutinis*, sarı renk üreten *Cellulosimicrobium funkei* (gram pozitif aerobik bakteri) ve turuncu- kırmızı renk üreten türü ise *Dietzia natronolimnaea* olarak tanımlamışlardır. Tanımlanmış olan türlerden üretilen pigmentleri çeşitli çözücüler kullanarak ekstrakte etmişler. Saflaştırılan pigmentlerin bazı özelliklerini belirlemek amacıyla, ışık ve buzdolabı gibi düşük sıcaklık ortamında kararlılık testleri yapılmış ve renk değişimi olmadığını gözlemlemişlerdir. Ayrıca FT-IR spektroskopisinde spektrum analizleri ile kimyasal yapıları belirlenmiştir. En ideal pH aralığının 5-7 arasında tespit edilen pigmentlerin gıda renklendiricisi olarak dondurma üretiminde renk verme amacıyla kullanılmış ve başarılı sonuçlar elde etmişlerdir.

### ***Pigmentlerin Antibakteriyel Özelliklerinin Belirlenmesi***

Çalışmada ekstrakte edilen 10 farklı pigment antibakteriyel test için kullanılmıştır. BYL-Kır, BYL3-Sarı ve BYL1-Sarı kodlu suşların pigmentlerinin belirgin inhibisyon zonu oluşturduğu tespit edilmiştir. Standart bakteri türleri ile yapılan antibakteriyel test sonuçları Tablo 3’de gösterilmiştir.

**Tablo 3.** Kullanılan pigmentler ve antibakteriyel test sonuçları

Pigmentler	Standart bakteri türleri					
	<i>E.coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>B. subtilis spizenii</i>	<i>En. faecalis</i>	<i>En. hormaecheni</i>
BYL-Kırm	+	+	+	+	+	+
BYL1-Sarı	+	-	+	+	+	+
BYL-Sarı	+	±	+	+	-	-
BYL3-Sarı	+	-	+	+	+	+
LAB-Siyah	-	-	-	-	-	-
Şelale pembe	-	-	-	-	-	-
T1-Sarı	±	-	+	+	-	-
T2-Sarı	+	-	-	±	-	-
Phyto	±	-	-	-	±	±
T3-Kırmızı	±	-	-	+	-	-

### ***Pigmentlerin Algler Üzerindeki Etkisinin Belirlenmesi***

Pigmentlerin algler üzerindeki etkisinin belirlenmesi için 2 alg kültürü kullanılmıştır. Bunlar *Grammatophora* cinsi ve *Prymnesium parvum* türüdür. Kültür ortamına pigment eklendikten sonra alg miktarları mikroskopta değerlendirilmiştir. Bir hafta sonrasında kültür içerisindeki algleri inhibe ettiği gözlemlenmiştir. Denenen 4 pigmentin alglerin üremesi üzerine olumsuz etki oluşturduğu tespit edilmiştir.

### ***Sıcaklığın etkisi***

Pigment üretiminde uygun sıcaklık değerinin belirlenmesi için, farklı sıcaklık 25-30-37 °C'lik aralıklarında üretilen bakteriler inkübasyon sonrasında değerlendirmeler yapılmıştır. BYL-Kırmızı renk pigment üretiminin sırasıyla 25°C, 30°C ve de maksimum olduğunu göstermektedir. BYL3-Sarı, pigment üreten bakterilerin maksimum pigment ürettiği sıcaklık 30 °C olarak görülmüştür. Yapılan tez çalışmalarında Jinendiran vd., (2019) farklı pH koşulları sıcaklık denemeleri sonuçlarına göre; literatür çalışmalarıyla paralel şekilde pH 8,0 – 8,5 – 9,0 değerleri izolatlar için optimum pH gereksinimleri olarak belirlenmiştir. Sıcaklık koşulları denemeleri sonuçlarına göre; 37 ve 40°C sıcaklıklar izolatlar için optimum sıcaklık olarak seçilmiştir. Bunu yanı sıra, test edilen farklı pH ve sıcaklık değerlerinde, oldukça değişkenlik gösteren mikrobiyal sayım sonuçları elde edilmiştir. Bu sonuçlar sınanan koşullardaki mikrobiyal gelişimin, ortam koşullarından fazlasıyla etkilendiğini göstermiştir.

### ***pH'in etkisi***

Farklı pH'larda bakterilerden pigment üretiminin araştırılması için öncelikle asidik (5,3), nötr (7,0) ve bazik (8,3) olmak üzere ayrı ayrı besi yerleri hazırlanmıştır. Maksimum pigment üretimi en fazla BYL-Kırmızı ve BYL-3 Sarı kodlu bakteri pigmentleri için pH 7,0' de olduğu gözlemlenmiştir. BYL-Sarı kodlu bakteri pigment üretimi için maksimum pH'ın 8,5 olduğu gözlemlenmiştir.

## **SONUÇLAR VE ÖNERİLER**

Sentetik pigmentlerin yaygınlığına rağmen, sağlık sorunlarına neden olması, toksik etkileri ve çevreye çok fazla atık oluşturmalarından kaynaklı doğal pigmentlere olan eğilim artmıştır. Son araştırmalar, biyopigmentlerin üretiminin bu faydalı metabolitleri çıkarmak için ekonomik bir yaklaşım olduğunu ortaya koymuştur; bununla birlikte, düşük stabilite, sonraki işlem maliyetlerinin yüksek olması, teknolojik başarısızlıklar, düşük verim ve işlem yoluyla toksin

üretimi gibi bazı sınırlamalar hala mevcuttur. Bakteriyel pigment üretiminin çoğu hala Ar-Ge aşamasındadır. Bu nedenle, bakteriyel pigmentler üzerindeki çalışmalar, özellikle maliyeti azaltabilecek ve endüstriyel üretim için uygulanabilirliğini artırabilecek ucuz ve uygun büyüme ortamının bulunması konusunda yoğunlaştırılmalıdır. Pigment üreten bakteriler, sucul ortamlardan, toprak, bitki, böcekler ve insan veya hayvan gibi çeşitli çevresel kaynaklardan izole edilebilir/ kültürlenebilir/ saflaştırılabilir. Farklı bakteri türlerini izole etmek için çeşitli büyüme ortamları kullanılabilir. Bununla birlikte, sentetik besiyeri kullanmanın yüksek maliyeti nedeniyle, izolasyon işlemi sırasında olduğu kadar pigmentlerin üretimi için de düşük maliyetli yeni yöntemler geliştirmeye ihtiyaç vardır. Örneğin, tarımsal-endüstriyel artıkların kullanımı, substrat maliyetini düşürmenin karlı bir yolunu sağlayacaktır. Bakteriler tarafından üretilen pigment, solvent ekstraksiyonu kullanılarak izole edilebilir. Çeşitli ürünlerin bakteriyel pigmentlerle renklendirilmesi daha sürdürülebilir ve çevre dostu bir potansiyele sahiptir.

Küresel pazarın artan talebini karşılamak için, daha etkili bir saflaştırma yöntemi elde etmek için iyileştirilmiş mikrobiyal suşların geliştirilmesi ve yetiştirme parametrelerinin optimizasyonu gerekmektedir. Ayrıca, biyopigment üretimini optimize etmek için genetik mühendisliği teknikleri araştırılmalıdır. Ek olarak, yeni çalışmalar, kanser gibi tehlikeli hastalıklara karşı insanların hayatta kalması için yeni yaklaşımların keşfedilmesinde gerçekten yararlı olabilecek biyopigmentlerin farmakolojik yönlerinin etki mekanizmasını açıklamaya odaklanmıştır. Bu şekilde, gelecekteki araştırmalar daha çok mikrobiyal pigmentlerin kimyasal yapısı ve yapıları ile farmakolojik işlev arasındaki ilişkiye yönelik olmalıdır. Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda, bakteriyel izolatlardan elde edilen pigmentlerin antimikrobiyal özellikleri, antikanser ve antiviral etkileri ile hücrelere toksisitelerine bakılmıştır. Bakteri pigmentler antibakteriyel, antiviral, yara onarımı, yaşlanma karşıtı ve migren tedavisinde kullanılabilecek biyolojik aktivitelere sahip olmalarından kaynaklı ilaç endüstrisinde önemli bir kullanım alanına sahiptirler. Virüslerin enfeksiyonları bütün dünya genelinde sayısız salgın ve hastalıklara neden olmaktadır. Bu yüzden virüs kaynaklı enfeksiyonel hastalıklar için yapılan birçok çalışma vardır.

Bu çalışmada, çevresel örneklerde pigment üreten bakteri izolasyonu ve bu pigmentlerin karakterizasyonu ile bazı potansiyel uygulama alanları araştırılmıştır. Mersin ili ve Tarsus ilçesinden su ve toprak örneklerinden pigment üreten bakteri izolasyonu yapılmıştır. Toplam 50 pigmentli bakteri arasından seçilen BYL-1, BYL-3, BYL-Kır ve Phyto izolatları pigment üretimi için kullanılmıştır. 16S rRNA analizi ile *Micrococcus yunnanensis*,

*Micrococcus luteus* ve *Bhargavaea ginsengi* olarak tanımlanan türlerden pigmentler ekstrakte edilerek antimikrobiyal ve antialgal etkileri belirlenmiştir. Pigment üretimi üzerine sıcaklık, pH ve ağır metallerin etkisi araştırılmıştır. BYL, BYL-3 ve BYL-Kır izolatlarının pigmentlerinde antimikrobiyal etki tespit edilmiştir. Ekstrakte edilen pigmentin kısmi tanımlanması için UV-Spektrofometri ve TLC yöntemleri kullanılmıştır. Tam tanımlama yapabilmek ve pigmentin yapısını belirlemek için FTIR, HPLC, NMR gibi daha ileri tekniklerin kullanılmasına ihtiyaç vardır. Ayrıca bu çalışmada pigment üretiminin yaklaşık bir haftalık sürelerde gerçekleşmesi, endüstriyel üretim için pratik bir yaklaşım değildir. Pigment üretim süresinin kısalmasını sağlayacak rekombinant DNA teknolojileri çalışmaları gerekmektedir.

## REFERANSLAR

- Ahmad, A. S., Ahmad, W. Y. W. and Zakaria, Z. K. (2012) *Applications of bacterial pigments as colorant: The Malaysian perspective*, Springer Berlin, Heidelberg.
- Aksan, E. (2005). Çeşitli Mayalardan Karotenoidlerin Elde Edilmesi ve Sucukta Renklendirici Olarak Kullanım Olanaklarının Araştırılması, Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi, Adana, Türkiye.
- Asker, D. (2017). Isolation and characterization of a novel, highly selective astaxanthin-producing marine bacterium. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 65 (41), 9101-9109.
- Babitha, S., Joshi, V., Bala, A. and Shashi, B. (2009). Microbial pigments (S.K. Brar, G.S. Dhillon and C.R. Saccal Editors). *Biotransformation of Waste Biomass into High Value Biochemicals*, (pp. 147–162) Springer, New York.
- Büyüksırt, T. ve Kuleaşan, H. (2013). Farklı Kaynaklardan Doğal Renk Maddesi Üreten Mikroorganizmaların İzolasyonu, Tanısı ve Elde Edilen Pigmentlerin Karakterizasyonu. *Gıda Dergisi*, Vol. 38 (4), 199-206.
- Chandika, P., Ko, S. C. and Jung W. K. (2015). Marine-derived biological macromolecule-based biomaterials for wound healing and skin tissue regeneration. *International Journal of Biological Macromolecules*, 77, 24-35.
- Dufossé, L., Galaup, P., Yaron, A., Arad, M.S., Philippe Blanc, P., Murthy, C.N.K. and Ravishankar, A.G. (2005). Microorganisms and microalgae as sources of pigments for food use: a scientific oddity or an industrial reality? *Trends in Food Science & Technology*, 16, 389–406.
- Erdal, P. ve Ökmen, G. (2013). Microbial Pigments Used in Foods. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 6 (2), 56–68.
- Faraag, I., El-Batal, A. I. and El-Hendawy. (2017). Characterization of prodigiosin produced by *Serratia marcescens* strain isolated from irrigation water in Egypt. *Biology*, 13680603.
- Goswami, B. and Bhowal, J. (2014). Identification and Characterization of Extracellular Red Pigment Producing Bacteria Isolated from Soil. *International Journal of Current Microbiology Applied Sciences*, 3 (9) 169-176.
- Gupta, N., Poddar, K., Sarkar, D., Kumari, N., Padhan, B. and Sarkar, A. (2019). Fruit waste management by pigment production and utilization of residual as bioadsorbent. *Journal of Environmental Management*, 244, 138–143.

- Gurpreet, K. C. and Balmeet, S. G. (2014). Production and Characterization of Microbial Carotenoids as an Alternative to Synthetic Colors: a Review. *International Journal of Food Properties*, 14, 503–513.
- Indra Arulselvi, P., Umamaheswari, S., Ranandkumar Sharma, G., Karthik, C. and Jayakrishna, C. (2014). Screening of yellow pigment producing bacterial isolates from various eco-climatic areas and analysis of the carotenoid produced by the isolate. *Journal of Food Processing Technology*, 5, 292.
- Jinendiran, S., Kumar, B.S.D., Dahms, H.U., Arulanandam, C.D. and Sivakumar, N. (2019). Optimization of submerged fermentation process for improved production of  $\beta$ -carotene by *Exiguobacterium acetylicum* S0. *Heliyon*, 5 (5), e01730
- Kadioğlu, G. B., Koseoglu, M. S., Ozdal, M., Sezen, A., Ozdal, O. G. and Algur, O. F. (2018). Isolation of cold tolerant and ACC Deaminase producing Plant Growth Promoting Rhizobacteria from High Altitudes. *Romanian Biotechnological Letters*, 23 (2), 13479-13486.
- Ozdal, M. and Kurbanoglu, E. B. (2018). Valorisation of chicken feathers for xanthan gum production using *Xanthomonas campestris* MO-03. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 16(2), 259-263.
- Sajjad, W., Din, G., Rafiq, M., Iqbal, A., Khan, S., Zada S, et al. (2020). Pigment production by cold-adapted bacteria and fungi: colorful tale of cryosphere with wide range applications. *Extremophiles*, 24, 447-473.
- Sasidharan, P., Raja, R., Karthik, C. and Sharma, R. (2013). Isolation and characterization of yellow pigment producing *Exiguobacterium* sps. *Journal of Biochemistry Toxicology*, 4 (4), 632-635.
- Shetti, A. A. (2017). Antibacterial Potentials of Red Pigment Extracted from Soil Isolate *Serratia* sp. *IOSR-JBB*, 3, 49-52.
- Sigurdson, G. T., Tang, P., and Giusti, M. M. (2017). Natural colorants: Food colorants from natural sources. *Annual Review of Food Science and Technology*, 8, 261-280.
- Siva, R. (2007). Status of natural dyes and dye-yielding plants in India. *International Journal of Current Science*, 92 (7), 916–925.
- Soliev, A.B., Hosokawa, K. and Enomoto K.(2011). Bioactive pigments from marine bacteria: applications and physiological roles. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 670349.
- Srimathi, R., Priya, R., Nirmala, M. and Malarvizhi, A. (2017). Isolation, Identification, Optimization of Prodigiosin Pigment Produced by *Serratia marcescens* and its Applications. *International Journal of Engineering Business Management*, 2 (2), 11-21.

- Sudova, E., Machova, J., Svobodova, Z. and Vesely, T. (2007). Negative effects of malachite green and possibilities of its replacement in the treatment of fish eggs and fish: a review. *Veterinarni Medicina*, 52 (12), 527-539.
- Trivedi, N., Tandon, S., Dubey, A. (2017). Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) profiling of red pigment produced by *Bacillus subtilis* PD5. *African Journal of Biotechnology*, 16 (27), 1507-1512.
- Tuli, H. S., Chaudhary, P., Beniwal, V. and Sharma, A. K. (2014). Microbial pigments as natural color sources: current trends and future perspectives. *Journal of Food Science and Technology*, 52, 4669-4678.
- Tunca, M. (2019). Biyoaktif bakteriyel pigmentlerin izolasyonu karakterizasyonu ve alternatif ilaç olarak uygulamaları, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Ankara, Türkiye.
- Velmurugan, P., Kamala-Kannan, S., Balachandar, V., Lakshmanaperumalsamy, P., Chae, J. C. and Oh, B. T. (2010). Natural pigment extraction from five filamentous fungi for industrial applications and dyeing of leather. *Carbohydrate Polymers*, 79 (2), 262–268.
- Venil, C. K., Zakaria, Z. A. and Ahmad, W. A. (2013). Bacterial pigments and their applications. *Process Biochemistry*, 48 (7), 1065–1079.

## BÖLÜM 9

### Adi Diferansiyel Denklemlerin Sayısal Çözümleri Lagrange İnterpolasyonu

Ahmet BOZ<sup>1</sup>

#### GİRİŞ

Bu çalışmada adi diferansiyel denklemlerin yaklaşık çözümleri konusunda sayısal yöntemlere bir giriş yapılacaktır. Yaklaşık çözümleri gerçekleştirebilmek için diferansiyel ve integral hesap, diferansiyel denklem teorisi, karmaşık analiz ve lineer cebirde bilinmesi gereken minimum önkoşulların sağlandığı varsayılmaktadır. Literatürde adi türevli denklemlerin birçok sayısal çözüm yöntemleri üzerine çalışmalar mevcuttur. Bu çalışmada ise bu sayısal çözümler arasında önemli bir yer tutan Lagrange interpolasyon yöntemi üzerinde durulacaktır.

Burada amaç, bilinen belli noktalardaki fonksiyon değerleri kullanılarak gerçek fonksiyon değerine en uygun polinomsal ifadeyi elde etmektir. İşlemlere başlayabilmek için tek  $x$  reel değişkenli ve reel değerli  $f$  fonksiyonunu ele alacağız. Reel düzlem üzerinde tanımlı  $\{x_0, x_1, \dots, x_n\}$  sonlu noktalar kümesindeki herbir noktada  $f$  fonksiyonunun  $f(x_0), f(x_1), \dots$  değerlerine karşılık gelen ifadeler **Lagrange interpolasyon polinomu** denir. Eğer  $f$  diferansiyellenebilirse,  $f$  fonksiyonunun belirtilen noktalardaki türev değerleri kullanılarak elde edilen polinoma **Hermite interpolasyon polinomu** denir. (Suli E ve Mayers D.F. 2003) (Hildebrand, F.B. 1956)

İnterpolasyon polinomları arasında neden Lagrange ve Hermite polinomlarıyla ilgileniyoruz? Eğer reel ekseninde bir kapalı aralıkta alınan her  $x$  için  $f(x)$  fonksiyon değerleri biliniyorsa verilen aralık üzerinde polinomlar yardımıyla  $f$  fonksiyonuna yaklaşım interpolasyon olarak tanımlanmıştır.

Verilen her polinom katsayılar yardımıyla tamamen özelleştirilebilir. Bilgisayarda,  $f$  için interpolasyon polinomunun saklanması, genellikle  $f'$  nin kendisinin saklanmasından daha ekonomik olacaktır ifade edilebilir.

$f(x)$  fonksiyonunun sadece  $x_0, x_1, \dots, x_n$  gibi sonlu noktalar kümesinin elemanlarında aldığı değerler bu noktalar arasında kalan diğer tüm noktalardaki fonksiyon değerlerinin yaklaşık olarak hesaplanabilmesine imkan verir. Polinom interpolasyonunun amacı bilinmeyen  $f$  fonksiyonuna uygun bir polinom

---

<sup>1</sup> Prof. Dr., Kütahya Dumlupınar Üniversitesi Tavşanlı Uygulamalı Bilimler Fakültesi, ahmet.boz@dpu.edu.tr, ORCID: 0000-0002-1438-2391.



oluşturmaktır. Elde edilen polinom  $(x, y)$  koordinat düzleminde  $(x_i, f(x_i))$ ,  $i = 0, \dots, n$  noktasından geçer. Genel olarak elde edilen  $P_n$  polinomu  $f'$  nin kendisi  $P_n$  ile aynı derecede bir polinom olmadığı sürece  $f'$  den farklıdır böylece bir hata ortaya çıkar. Elde edilen sonuçlara göre ortaya çıkan hatanın sınırları da ortaya çıkmış olur. (Hildebrand, F.B. 1956) ,(Rudin, W. 1976).

### LAGRANGE INTERPOLASYONU

$n$ , negative olmayan bir tamsayı, ve  $P_n$ ,  $R$  reel sayılar kümesi üzerinde tanımlı, derecesi  $\leq n$  olan reel değerli polinomları gösterebilir. En kolay interpolasyon problemi aşağıdaki şekilde oluşturulabilir:

$R$  'de  $x_0$  ve  $y_0$  noktası verilir.  $p_0(x_0) = y_0$  olacak şekilde  $p_0 \in P_0$  polinomu bulunur. Genel olarak bu problemin çözümü  $p_0(x) = y_0$  koşuluyla aranır. Şu ana kadar verilen bilgiler yardımıyla daha genel problemlerin çözümünü inceleyelim.

$n \geq 1$  olsun. Kabul edelim ki  $x_i$ ,  $i = 0, 1, \dots, n$  olacak şekilde birbirinden farklı reel sayılar ( $x_i \neq x_j$  için  $i \neq j$ ) ve  $y_i$ ,  $i = 0, 1, \dots, n$  reel sayılar olsun. Bu durumda  $p_n(x_i) = y_i$  olacak şekilde  $p_n \in P_n$  polinomu elde edilecektir.

Bu problem, eğer aşağıdaki koşullar sağlanıyorsa tek çözüme sahiptir.

Kabul edelim ki  $n \geq 1$  olsun.

$$L_k(x_i) = \begin{cases} 1, & i = k \\ 0, & i \neq k \end{cases} \quad (1)$$

olacak şekilde bir  $L_k \in P_n$ ,  $i, k = 0, 1, \dots, n$  polinomu mevcuttur. İlave olarak

$$P_n(x) = \sum_{k=0}^n L_k(x)y_k \quad (2)$$

yukarıdaki interpolasyon koşullarını sağlar. Diğer bir deyişle  $p_n \in P_n$  ve  $p_n(x_i) = y_i$ ,  $i = 0, 1, \dots, n$ . Bu durumu ispatlamak için,  $0 \leq k \leq n$  olacak şekilde her  $k$  sabiti için  $L_k$ ,  $x_i$  şeklinde  $i \neq k$  için  $n$ -tane sifira sahip olur. Böylece  $L_k$ , aşağıdaki formda ifade edilir.

$$L_k(x) = C_k \prod_{\substack{i=0 \\ i \neq k}}^n (x - x_i) \quad (3)$$

Burada  $C_k \in R$  hesaplanacak sabitlerdir.  $x = x_k$  için  $L_k(x_k) = 1$  değerinin elde edileceği açıktır. (3) eşitliğinden hareketle ;

$$C_k = \prod_{\substack{i=0 \\ i \neq k}}^n \frac{1}{(x_k - x_i)}$$

$C_k$  değerinin (3) de yerine yazılmasıyla

$$L_k(x) = \prod_{\substack{i=0 \\ i \neq k}}^n \frac{(x-x_i)}{(x_k-x_i)} \quad (4)$$

eşitliği elde edilmiş olur.

(2) ile tanımlanan  $p_n$  fonksiyonu,  $L_k \in P_n$ ,  $i = 0, 1, \dots, n$  polinomlarının lineer birleşiminden oluşur. (Douglass, S.A. 1996)

**Teorem1 (Lagrange interpolasyon teoremi):**  $n \geq 0$  olsun.  $x_i$ ,  $i = 0, 1, \dots, n$  olacak şekilde birbirinden farklı reel sayılar ve  $y_i$ ,  $i = 0, 1, \dots, n$  reel sayılar olsun. Bu durumda

$$p_n(x_i) = y_i, \quad i = 0, 1, \dots, n \quad (5)$$

olacak şekilde tek bir  $p_n \in P_n$  polinomu vardır.

**İspat:**  $n = 0$  ispat açıktır. Bu yüzden  $n \geq 1$  için ispatı gösterelim.  $p_n \in P_n$  polinomunu aşağıdaki şekilde ifade edelim:

$$P_n(x) = \sum_{k=0}^n L_k(x)y_k$$

(5) koşulunu sağlar. Böylece aranan polinomun varlığı gösterilmiş olur. Geriye  $p_n(x)$  polinomu için  $p_n(x_i) = y_i$ ,  $i = 0, 1, \dots, n$  koşulunun sağlandığı tek bir çözüm olduğunu göstermek kalır. Tersine bir kabul ile  $p_n$ ' den farklı olarak  $q_n(x_i) = y_i$  koşulunu sağlayan  $q_n \in P_n$  varolsun. Böylece  $p_n - q_n \in P_n$  ve  $p_n - q_n$ ,  $(n + 1)$  farklı  $x_i$ ,  $i = 0, 1, \dots, n$  birbirinden farklı köke sahiptir. Polinomun derecesi  $n$  olduğu için sıfırdan farklı  $n$ 'den fazla birbirinden farklı köke sahip olamaz. Bu nedenle

$$p_n(x) - q_n(x) \equiv 0,$$

olur. Buradan kabulümüzün tersine  $p_n$  ve  $q_n$  birbirinden farklıdır. Bu da çelişki oluşturur. Böylece (5) şartını sağlayan tek bir  $p_n \in P_n$  polinomu mevcuttur. İspat tamamlanmış olur.

**Tanım 1:**  $n \geq 0$  olsun.  $x_i$ ,  $i = 0, 1, \dots, n$  olacak şekilde birbirinden farklı reel sayılar ve  $y_i$ ,  $i = 0, 1, \dots, n$  reel sayılar olsun. Bu durumda  $p_n$  polinomu

$$P_n(x) = \sum_{k=0}^n L_k(x)y_k$$

şeklinde tanımlanır. Burada  $L_k(x)$ ,  $k = 0,1, \dots, n$  ,  $n \geq 1$  için (4) ile tanımlanan ve  $n = 0$  için  $L_0(x) = 1$  olan bu ifadelere  $(x_i, y_i)$  noktalarında  $n$ . dereceden Lagrange interpolasyon polinomu denir.  $x_i$  ,  $i = 0,1, \dots, n$  noktalarına da interpolasyon noktaları denir. (Axelson, O. 1996)

Sıklıkla  $y_i$  reel sayıları,  $[a,b]$  kapalı aralığında tanımlı  $x_i$  interpolasyon noktalarında, reel değerli  $f$  fonksiyonu olarak tanımlanır.( Ralston, A. and Rabinowitz, P. 1978)

**Tanım 2:**  $n \geq 0$  olsun.  $[a,b]$  kapalı aralığı üzerinde tanımlı ve sürekli, reel değerli  $f$  fonksiyonu verilsin.  $x_i \in [a, b]$  farklı interpolasyon noktalarında  $p_n$  polinomu aşağıdaki şekilde tanımlanır:

$$P_n(x) = \sum_{k=0}^n L_k(x)f(x_k)$$

Bu polinoma  $f$  fonksiyonu için  $x_i$  interpolasyon noktalarında  $n$ . dereceden Lagrange interpolasyon polinomu denir.( Gautschi, W. 1997)

**Teorem 2:**  $n \geq 0$  olsun ve  $[a,b]$  kapalı aralığı üzerinde tanımlı ve sürekli, reel değerli  $f$  fonksiyonu verilsin. Ayrıca,  $f$  fonksiyonunun  $n + 1$  inci mertebeden türevi mevcut ve  $[a,b]$  aralığı üzerinde sürekli olsun. Böylece , verilen  $x \in [a, b]$  için  $(a,b)$  noktasında  $\varepsilon = \varepsilon(x)$  vardır öyle ki

$$f(x) - p_n(x) = \frac{f^{(n+1)}(\varepsilon)}{(n+1)!} \pi_{n+1}(x) \quad (6)$$

burada,

$$\pi_{n+1}(x) = (x - x_0) \dots (x - x_n) \quad (7)$$

dir. Buna ilave olarak

$$|f(x) - p_n(x)| \leq \frac{M_{n+1}}{(n+1)!} |\pi_{n+1}(x)| \quad (8)$$

burada,

$$M_{n+1} = \max_{\delta \in [a,b]} |f^{(n+1)}(\delta)|$$

dır.

**İspat:** Bazı  $i$  değerleri için (6) denkleminin her iki tarafında  $x = x_i$  alınmasıyla sonuç sıfır olur ve eşitlik açık bir şekilde sağlanmış olur.  $x \neq x_i$  olması durumunu inceleyelim.  $[a,b]$  aralığı üzerinde  $\varphi(t)$  yardımcı fonksiyonunu tanımlayalım.

$$\varphi(t) = f(t) - p_n(t) - \frac{f(x) - p_n(x)}{\pi_{n+1}(x)} \pi_{n+1}(t) \quad (9)$$

Açıkça,  $(x_i) = 0, i = 0,1, \dots, n$  ve  $\varphi(x) = 0$  dır. Böylece,  $\varphi$  fonksiyonu  $[a,b]$  aralığında herbiri birbirinden farklı  $n + 2$  noktada ortadan kalkar. Sonuç olarak Rolle teoremine göre  $\varphi'(t)$ ,  $t$ ' ye göre  $\varphi$  fonksiyonunun birinci türevini göstermek üzere  $(a,b)$  üzerinde  $n + 1$  noktada ortadan kalkar. (Kantorovich, L.V., 1952)

Özellikle eğer  $n = 0$  alınırsa  $(a,b)$  aralığında var olan  $\varepsilon = \varepsilon(x)$  fonksiyonu için  $\varphi'(\varepsilon) = 0$  olur.  $p_0(x) \equiv f(x_0)$  ve  $\pi_1(t) = t - x_0$  olduğundan (9) eşitliğinden

$$0 = \varphi'(\varepsilon) = f'(\varepsilon) - \frac{f(x) - p_0(x)}{\pi_1(x)}$$

olur. Şimdi de  $n \geq 1$  olduğunu kabul edelim.  $\varphi'(t)$ ,  $(a,b)$  aralığında  $n + 1$  noktada bulunmaz. Tekrar Rolle teoremi uygulanırsa  $\varphi''(t)$ ,  $n$  farklı noktada görünmez.  $f$  ile ilgili kabulümüz Rolle teoremini ardışık olarak  $n + 1$  defa uygulamak için yeterlidir.  $\varphi$  fonksiyonunun  $t$ 'ye göre  $n + 1$  defa türevlenmesiyle ve  $p_n$  polinomunun  $n$ . yada daha düşük dereceden alınmasıyla

$$0 = \varphi^{(n+1)}(\varepsilon) = f^{(n+1)}(\varepsilon) - \frac{f(x) - p_n(x)}{\pi_{n+1}(x)} (n + 1)!$$

olur. Böylece,

$$f(x) - p_n(x) = \frac{f^{(n+1)}(\varepsilon)}{(n + 1)!} \pi_{n+1}(x)$$

elde edilir.

(8) eşitsizliğini ispatlamak için  $[a,b]$  aralığı üzerinde  $f^{(n+1)}$

fonksiyonu sürekli olduğu gibi  $|f^{(n+1)}|$  fonksiyonu da süreklidir. Bu yüzden  $|f^{(n+1)}(x)|$  fonksiyonu  $[a,b]$  bölgesi üzerinde sınırlıdır ve maksimum değerini alır. Bu yüzden (8) ifadesi (6) dan elde edilir.

## **KAYNAKÇA**

- Axelsson, O. (1996). Iterative Solution Methods (Cambridge University Press, Cambridge)
- Douglass, S.A. (1996). Introduction to Mathematical Analysis (Addison-Wesley, Reading, MA).
- Gautschi, W. (1997). Numerical Analysis: an Introduction (Birkh"auser, Boston, MA).
- Hildebrand, F.B. (1956). Introduction to Numerical Analysis (McGraw-Hill, New York)
- Kantorovich, L.V., (1952). Functional analysis and applied mathematics. Uspekhi Mat. Nauk 3, 89–185, 1948;English transl., Rep. 1509, National Bureau of Standards, Washington, DC
- Ralston, A. and Rabinowitz, P. (1978). A First Course in Numerical Analysis, Second Edition (McGraw-Hill, New York).
- Rudin, W. (1976). Principles of Mathematical Analysis, Third Edition, (McGraw-Hill, New York).
- Suli E ve Mayers D.F.(2003) An Introduction to Numerical Analysis, Cambridge University Press

## BÖLÜM 10

### Bakteriyel Kalsifikasyon ve Üreolitik Bakterilerin Rolü: Yapı Malzemelerinde Biyomineralizasyon Potansiyeli

Türkan DAL BİÇER<sup>1</sup>  
Seval CİNG YILDIRIM<sup>2</sup>

#### ÖZET

Bu çalışma, bakteriyel kalsifikasyon ile mikrobiyal minerallerin sentezi konusunda literatürdeki bilgileri derlemektedir. Biyokalsifikasyon, bakterilerin belirli koşullar altında sentezlediği kalsiyum karbonatın çeşitli uygulama alanlarında nasıl kullanılabileceğini incelemektedir. Özellikle, üreolitik bakterilerin etkisiyle katalize edilen kalsiyum karbonat biyomineralizasyonu, çevre dostu inovasyonlar ve yapı malzemelerinin sürdürülebilirliği açısından önemli potansiyeller sunmaktadır.

Üre hidrolizi yoluyla üreolitik bakterilerin salgıladığı kalsiyum karbonatın çökmesi, yapı malzemelerinin mukavemetini artırabilir ve çevresel restorasyonu destekleyebilir. Bu süreç, özellikle üreaz enziminin rol aldığı bir dizi reaksiyon ile gerçekleşir. Bakterilerin çevresel koşullara dayanıklılığı ve uyum yetenekleri, bu biyokalsifikasyon sürecini çeşitli uygulama alanlarında kullanılabilir kılmaktadır. Ayrıca, mikrobiyal kalsiyum karbonat çökeltimi, beton gibi yapı malzemelerinin özelliklerini iyileştirmek ve kendi kendini onarmasını sağlamak için potansiyel sunmaktadır. Mermer yapıların çevresel hasarlarının onarımında biyokalsifikasyonun kullanımı, asidik ortamların neden olduğu çözünme süreçlerine karşı etkili bir çözüm olabilir. Bu, geleneksel onarım yöntemlerine bir alternatif olarak çevre dostu ve uzun vadeli restorasyon çözümleri sunabilir.

Bakteriyel kalsifikasyon, yapı malzemelerinin geliştirilmesi ve çevresel restorasyonun desteklenmesi açısından önemli potansiyeller taşımaktadır. Gelecekteki araştırmalar, bu biyolojik süreçlerin etkinliğini artırmak ve endüstriyel ölçekte daha geniş bir kullanım alanı bulmalarını sağlamak için odaklanmalıdır. Bu, çevre dostu inovasyonlar ve sürdürülebilir yapı malzemeleri açısından önemli fırsatlar sunabilir.

**Anahtar Kelimeler:** Biyokalsifikasyon, Üreolitik bakteriler, Çevresel restorasyon, Üreaz enzimi, Çevre dostu restorasyon

---

<sup>1</sup> Yüksek Lisans Öğrencisi; İnönü Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Biyoteknoloji Anabilimdalı posk44@gmail.com ORCID No: 0000-0002-4040-1410

<sup>2</sup> Doç. Dr.; İnönü Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Biyoteknoloji Anabilimdalı seval.cing@inonu.edu.tr ORCID No: 0000-0001-7163-9512

## GİRİŞ

Tarihi çağlardan günümüze, insanlık barınaklar inşa etmeye ve tarım yoluyla beslenme ihtiyacını karşılamaya yönelik olarak büyük bir gelişme kaydetmiştir. Bu süreç, ekim faaliyetlerinin toprağın etkili bir şekilde kullanılmasını sağlamasıyla yerleşik yaşamın ortaya çıkmasına neden olmuştur. İlk dönemlerde, insanlar çevrelerindeki malzemelerle primitif konutlar inşa etmişlerdir. Ancak, şehirleşme süreci, doğal kaynaklardan uzaklaşmayı beraberinde getirerek konut malzemesi ve mimaride önemli değişikliklere yol açmıştır. İlk yerleşik topluluklar, bölgesel malzeme özelliklerine dayalı olarak konutlar inşa etmişlerdir. Taş bulunan bölgelerde taş evler, toprakta kerpiç evler, ağaçla çevrili alanlarda ahşap evler ve soğuk iklimlerde igloo gibi farklı malzemeler kullanılmıştır. Ancak, şehirleşmenin yaygınlaşmasıyla birlikte, doğal malzemelerden uzaklaşma eğilimi artmış ve konut malzemeleri tek tipleşmiştir. Özellikle Türkiye'de, briketler ve tuğlalar, betonarme yapıların yaygın olarak kullanıldığı malzemeler olmuştur. Ancak, son dönemde ponza, perlit ve ytong gibi malzemelerin kullanımı artış göstermiştir.

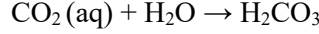
Günümüzde, betonarme yapıların yaygınlaşmasıyla birlikte mermer kullanımında önemli bir artış gözlemlenmektedir. Dünya çapında Çin, İtalya ve Türkiye'nin mermer üretiminde öncü ülkeler olduğu bilinmektedir. Mermer, estetik özellikleri nedeniyle birçok alanda kullanılmaktadır. Ancak, çevresel koşullar ve iklim şartları yapıların yüzeyinde hasarlara neden olabilir. Özellikle asit yağmurları, mermerin ana bileşeni olan kalsiyum karbonatın çözünme oranını artırarak yapıların yıpranmasına yol açabilir. Bu durum, malzeme kaybına, deliklerin oluşmasına, aşınmaya ve renk değişimine neden olabilir. Yapılardaki hasarların onarılmaması, birçok yapının kaybolmasına ve deformasyonların geleneksel yöntemlerle tamir edilmesine neden olabilir. Bu tamir yöntemleri, uyumsuz yüzey filmlerine ve çevre kirliliğine yol açabilir. Günümüzde, mermerin dayanıklılığını artırmak ve çevresel etkileri en aza indirmek adına yeni araştırma alanları, üreolitik-odaklı CaCO<sub>3</sub> oluşumu gibi incelenmektedir.

Ayrıca, yapı malzemelerinin dayanıklılığını artırmak ve çevresel etkileri en aza indirmek adına inovatif çözümler de araştırılmaktadır. Özellikle depremlerin neden olduğu beton çatlaklarına karşı biyokalsifikasyon yöntemi üzerine yapılan çalışmalar, dikkat çekmektedir. Bu yöntemde, üreolitik bakteriler kullanılarak çatlakların doğal olarak doldurulması amaçlanmaktadır. Biyobeton olarak adlandırılan bu malzeme, bakterilerin ürettiği minerallerin çatlakları kapatarak betonun dayanıklılığını artırmasını hedefler. Bu çözüm, hem yapı malzemelerinin ömrünü uzatmayı hem de çevre dostu bir yaklaşım sunmayı amaçlamaktadır. Bu yenilikçi yöntem, inşaat sektöründe sürdürülebilirlik ve çevresel etkilerin azaltılması konusunda önemli bir adım olarak değerlendirilmektedir.

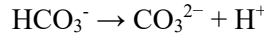
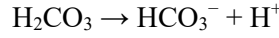


## ***1. Kalsifikasyon***

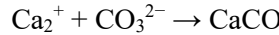
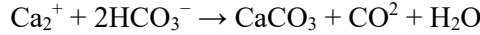
Kalsifikasyon, toprak içerisinde bulunan minerallerin ve kaya tuzlarının birleşerek kireç taşı oluşturması sürecini ifade eden bir terimdir. Bu olayın temelinde, karbon dioksitin (CO<sub>2</sub>) kalsiyum karbonata (CaCO<sub>3</sub>) dönüşümünü kontrol eden bir mekanizma yatar. Karbon dioksitin (CO<sub>2</sub>) suda çözünme oranı, atmosferde yaygın olarak bulunan diğer üç gazdan (N<sub>2</sub>, O<sub>2</sub> ve Ar) daha yüksektir. CO<sub>2</sub>'nin çözülmüş hali, su ile reaksiyona girerek karbonik asidi (H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) oluşturur.



Karbonik asidin oluşumu sırasında H<sup>+</sup> iyonu açığa çıkar ve bikarbonat (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) oluşur. Bir kısmı da bikarbonatın karbonata (CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>) dönüşümüne yol açar.



Doğal suların, örneğin göl veya deniz suyu gibi çözeltilerin, karbonat anyonları ile çözünmeyen karbonatlar oluşturmak için içerdikleri kationlarla etkileşime girmesi mümkündür (Kamennaya vd., 2012:338).



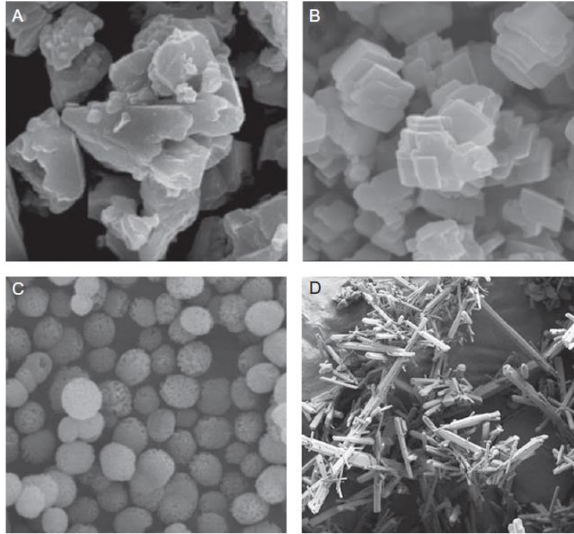
### ***1.1 Kalsiyum karbonat***

Kalsiyum karbonat (CaCO<sub>3</sub>), dünya genelinde en prevalan mineral türlerinden biridir ve biyomineralizasyon süreçlerinde önemli bir role sahiptir. Tek hücreli organizmalardan çok hücreli organizmalara kadar geniş bir biyoçeşitlilikte, kalsiyum karbonatın çökmesi çeşitli yapıların oluşumuna neden olabilmektedir (Kart, 2021:1). Karbonatlı kayaçların temel minerali olan kalsit, kimyasal formülü CaCO<sub>3</sub> ile karakterizedir. Kalsitin amorf görünümü, renksiz ve saydam özellikleri dikkate değerdir. Kalsit, dünya genelinde pigment pazarında sınırlı bir tüketim almaktadır; ancak, tebeşir, beyaz kireç taşları ve iri kristalli mermerler gibi doğal oluşumların ana bileşenidir (Ercan vd., 2018:34).

Kalsiyum karbonat, yapıştırıcılar, dolgu malzemeleri, gıda ve farmasötik endüstriler, boya, kaplama, çimento ve inşaat malzemeleri üretimi gibi çeşitli sektörlerde katma değerli ürünlerin üretilmesinde kullanılabilir (Chang

vd., 2017:1). Ayrıca, kalsiyum karbonatın membran üretiminde ısı ve su yalıtımını sağlayarak, ses izolasyonunu destekleyen plakaların üretiminde, halı tabanlarının yapımında ve kâğıt endüstrisinde önemli bir rol oynadığı gözlemlenmiştir. Kalsitin selüloz tüketimini azaltma özelliği, çevresel sürdürülebilirlik açısından önemlidir. Tıp alanında, kalsiyum karbonatın kronik böbrek yetmezliği, fosfor bağlanması ve fosfatlı bileşiklerin dengelemesi gibi durumlar için kullanımı önem arz etmektedir. Ayrıca, ilaç üretiminde özellikle mide ilaçlarında yaygın olarak tercih edilmektedir (Demirci, 2019:1).

Kalsiyum karbonatın çökmesi sürecinde, kalsit, aragonit ve vaterit olmak üzere üç farklı polimorfik forma dönüşüm gösterir. Bu polimorfik yapıların oluşumu, çeşitli faktörler tarafından etkilenir; bu faktörler arasında pH, sıcaklık, konsantrasyon, karbonat ve kalsiyum iyonlarının oranı, katkı maddeleri, karıştırma ve reaksiyon süresi bulunmaktadır (Chang vd., 2017:1). Bu koşullar altında, kalsit en tercih edilen ve kararlı polimorfik yapı olarak öne çıkmaktadır (Şekil 1A-B).



**Şekil 1:** CaCO<sub>3</sub> formlarının SEM görüntüleri: (A) amorf kalsit, (B) katmanlı ve eşkenar dörtgen kalsit, (C) küresel vaterit ve (D) iğneli aragonit (Al Omari vd., 2016:31).

### **1.2 Vaterit**

Vaterit, Mateescu ve diğerleri (2011:1) tarafından belirtildiği üzere, altıgen bir yapıya ve küresel bir morfolojiye sahip olan bir polimorf olarak tanımlanmaktadır. Kalsitten daha düşük yoğunluğa sahip olması, vaterit partiküllerinin daha büyük bir hacmi kaplayabilme yeteneği ile karakterizedir.

Vaterit, genellikle renksiz bir görünüme sahiptir, bu nedenle yapıların estetiğini bozmadan kullanılabilir (Seifan vd., 2016:9895).

Vaterit, standart ve jeolojik koşullarda kalsit ile karşılaştırıldığında yarı kararlı bir kristal yapısına sahiptir. Vateritin çözünmesi ve kalsitin kristalleşmesi sürecinde, vaterit kalsite dönüşebilir (Wei vd., 2003:516). Amonyak, vaterit çekirdeklerinin büyümesine katkıda bulunurken aynı zamanda vateritin kalsite dönüşümünü engelleyebilir (Han vd., 2006:269). Bu bağlamda, vateritin kararlılık ve dönüşüm potansiyeli üzerindeki etkileşimler, önemli bir bilimsel odak noktası oluşturmaktadır (Şekil 1C).

### ***1.3 Aragonit***

Aragonit, ortorombik bir yapıya sahip olan ve iğne görünümünde bir polimorf olan bir mineral türüdür (Mateescu vd., 2011:1) (Şekil 1D). Kalsit ile karşılaştırıldığında, aragonit yarı kararlı bir polimorf olarak bilinir ve bu nedenle çeşitli faktörlere bağlı olarak kalsite dönüşebilir. Bu faktörler arasında çözeltinin pH değeri, sıcaklık ve aşırı doygunluk bulunmaktadır, ve bu koşullar polimorf oluşumunu etkilemektedir (Han vd., 2006:269).

Aragonit, renksizden beyaz, sarıya ve kahverengiye kadar farklı renk tonlarında çökelebilen partiküller halinde bulunabilir (Seifan vd., 2016:9895). Kalsitten daha az kararlı olmasına rağmen, aragonit magnezyum aragonit oluşumunu destekleyebilir. Bu durum, kalsiyum karbonat çökelişi sırasında ortamda yüksek miktarda  $Mg^{+2}$  iyonu bulunmasından kaynaklanmaktadır. Yüksek  $Mg^{+2}$  içeriği, aragonit polimorfunun oluşumunu teşvik eder ve bu da monohidro kalsit nanokristallerinin oluşumuna yol açar. Monohidro kalsitin metastabilitesi nedeniyle, nanopartiküller sürekli olarak birleşir ve pürüzsüz iğne benzeri aragonite dönüşürler. Nanopartiküller kaybolduğunda, ortamda sadece pürüzsüz yüzeyli aragonit kalır (Wei vd., 2003:516).

## ***2. Mikrobiyal aktivitelerle oluşan karbonat çökeltisi: bakterilerin rolü ve mineralizasyon süreçleri***

Mineralizasyon, doğal düzenlemelerle organik yapıların inorganik bileşenlere dönüşümünü anlatan bir fenomen olarak tanımlanmaktadır (Yıldırım vd., 2016:70). Mineral sentezi, özellikle belirli koşullar altında biyolojik kontrol altında gerçekleşen bir mineralizasyon süreci olarak, hücre içinde veya hücre yüzeyinde meydana gelebilmektedir (Reddy, 2013:314). Biyomineralizasyon ise mikroorganizmalar aracılığıyla minerallerin çökeltilmesi ve yapılarının modifikasyonu olarak tanımlanmaktadır. Bu sürecin arkasında üç ana mekanizma bulunmaktadır:

1. **Biyolojik kontrol ile mineralizasyon:** Bu mekanizma, özellikle hücrel faaliyetlerin mineral oluşumunu tetiklediği bir süreci içermektedir. Mikroorganizmalar, belirli koşullar altında hücre içinde veya hücre yüzeyinde minerallerin çekirdeklenmesini ve büyümesini düzenleyerek biyolojik kontrol sağlamaktadır.

2. **Biyolojik etkilenen mineralizasyon:** Bu süreç, biyofilmlerle ilişkili hücre dışı polimerik maddelerin hücre yüzeyinde pasif mineral çökmesinden kaynaklanan bir süreçtir.

3. **Biyolojik indüklenen mineralizasyon:** Bu mekanizma, mikroorganizmaların aktiviteleri ve ortamın kimyasal modifikasyonu sonucunda minerallerin çökmesine neden olan bir süreçtir (Anbu vd., 2016:1; Anitha vd., 2018:257).

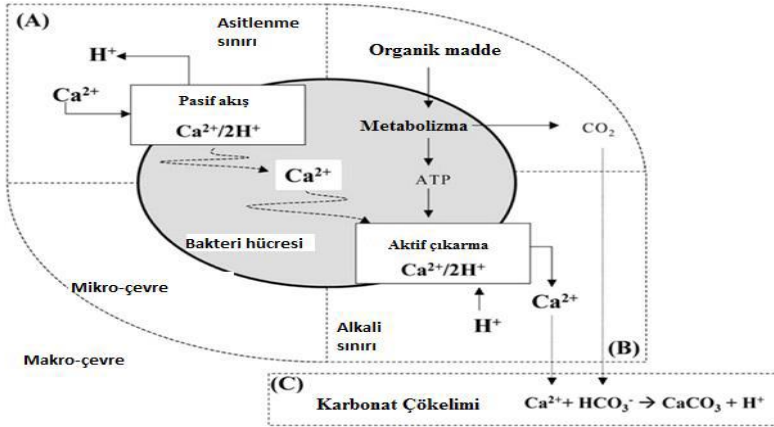
Biyomineraller, çeşitli yapısal öğelerde gözlemlenebilen yapısal bileşenlerdir; örneğin mercanlar, karınca tepeleri, mağaralar, yumuşakça kabukları, dişler, kemikler ve kayalar (Reddy, 2013:314).

### ***2.1 Mikrobiyal indüklenen karbonat çökmesi (MİKÇ)***

Mikroorganizmaların metabolik süreçlerinden kaynaklanan mineralleşme olayını ifade eder. Bu süreçte, bazı bakteri suşları üreyi hidrolize ederek karbonat iyonları üretir ve kalsiyum karbonat oluşturarak çökler. Bu biyokimyasal aktiviteler, üreaz ve karbonik anhidraz enzimleri aracılığıyla gerçekleşir (Achal vd., 2014:307). Kalsiyum karbonat çökmesinde: etkili olan bazı faktörler şunlardır:

1. Kalsiyum konsantrasyonu,
2. Çözünmüş inorganik karbon konsantrasyonu,
3. pH,
4. Çekirdeklenme alanlarının varlığıdır.

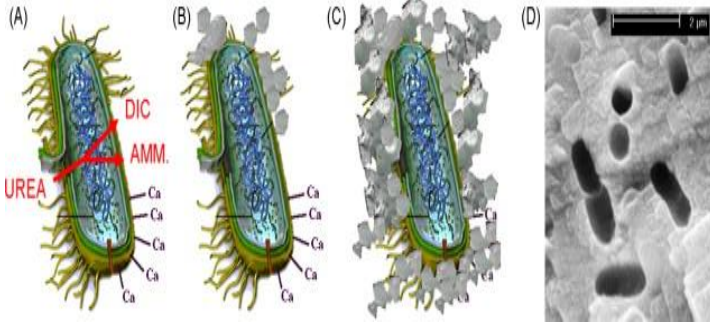
Bu faktörlerin yanı sıra, bakteri türü, bakteri konsantrasyonu, sıcaklık ve üre konsantrasyonunun da kalsiyum karbonat çökeltmesini etkilediği belirtilmiştir. Kalsiyum karbonat, mikroorganizmalar tarafından hem doğal hem de yapay yollardan oluşturulan bir dolgu malzemesidir (Candoğan, 2015:1). Mikrobiyal kalsiyum karbonat çökmesi, Şekil 2'de gösterildiği gibi bakteriyel kalsiyum mekanizması ile ilişkilidir. Mikrobiyal kalsiyum karbonat çökmesi için kalsiyum kaynağının olması kritiktir. Ancak, yüksek  $Ca^{+2}$  iyon konsantrasyonunun mikrobiyal suş aktivitesini etkileyebileceği veya düşük  $Ca^{+2}$  iyon konsantrasyonunun iyonik reaksiyonları etkileyebileceği göz önüne alındığında,  $Ca^{+2}$  konsantrasyonunun dikkatlice ayarlanması gereklidir (Seifan vd., 2016:9895).



**Şekil 2:** Kalsiyum karbonatın bakteriler aracılığıyla çökmesinin şematik gösterimi (Hammes, 2002:3).

### 2.2 Bakteriyel kalsifikasyon: mikrobiyal minerallerin sentezi

Biyokalsifikasyon, biyolojik süreçlerin bir sonucu olarak kalsiyum karbonatın çökmesi ve kalsit oluşumu olarak tanımlanmaktadır (Demirci, 2019:1). Bakteriyel biyokalsifikasyon ise belirli koşullarda bazı bakteri türlerinin hücre dışına salgıladığı kalsiyum karbonatın gözeneklerin ve çatlakların içsel olarak doldurulması sürecidir. Bu durum, yapısal çatlakların daha kompakt ve dirençli hale gelmesine, basınç dayanımının önemli ölçüde artmasına ve sızıntının kalıcı bir şekilde azalmasına yol açar. Bu biyokalsifikasyon sürecinin genellikle üreolitik bakteriler tarafından gerçekleştirildiği belirtilmektedir (Şekil 3).

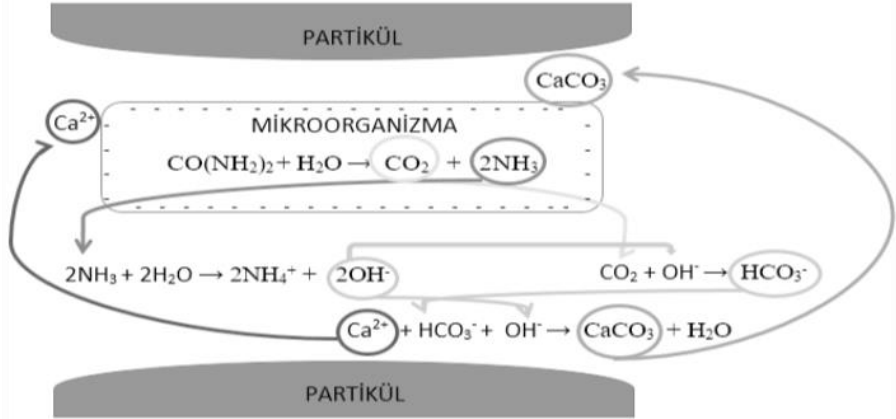


**Şekil 3:** Kalsiyum karbonat çökmesi sürecinde bakterilerin rolü: A, Bakterinin Ca iyonları ile etkileşimi; B, Yapının kapsül oluşturarak gelişimi; C, kalsiyum karbonat çökmesinin oluşumu; D, Elektron mikroskobundan görülen çökelim yapısı (Anbu vd., 2016:1).

Ürenin üreaz enzimi tarafından hidrolizi, kalsiyum karbonatın oluşumuna neden olan önemli bir aşamadır. Bu reaksiyonun adımları şunlardır: İlk olarak, 1 mol üre, 1 mol amonyak ve 1 mol karbamat olarak hidrolize olur. Bu süreçte aynı zamanda 1 mol amonyak ve karbonik asit oluşur. Bu ürünler, suda dengeli bir şekilde bikarbonat, 2 mol amonyum ve hidroksit iyonlarına ayrılır ve pH artışı nedeniyle bikarbonat karbonat iyonlarına dönüşür. Ortamdaki kalsiyum iyonlarının varlığıyla kalsiyum karbonat çökelişi meydana gelir (Hammes vd., 2003:3). Kalsiyum karbonat kristallerinin çökmesi, aşırı doygunluk durumuna ulaşıldıktan sonra bakteri hücre duvarında heterojen çekirdeklenme ile gerçekleşir (Siddique ve Chahal, 2011:3791). Üreaz ve karbonik anhidraz enzimlerinin reaksiyonları sonucunda hücrenin dış yüzeyinde CaCO<sub>3</sub> çökmesi meydana gelmesi için ortamda belirli bir kalsiyum iyonu seviyesinin bulunması gerekmektedir. Bu nedenle, kalsiyum karbonat çökme miktarının kalsiyum kaynağının türüne ve ortamdaki yoğunluğuna bağlı olduğu düşünülmektedir (Kart, 2021:1).

### ***2.3 Üreolitik bakterilerin etkisiyle katalize edilen kalsiyum karbonat biyomineralizasyonu***

Üre, yapısında azot içeren bir organik bileşiktir ve aynı zamanda üreaz enziminin substratı olarak görev yapar. Bu nedenle, ortamdaki ürenin miktarı mikrobiyal kalsiyum karbonat çökelişi için kritik bir öneme sahiptir (Kart, 2021:1). Negatif yüzey yükü ve üreaz enzimine sahip mikroorganizmalar, çevredeki üreyi karbonat ve amonyuma parçalayarak kalsiyum iyonlarını mikroorganizmaların negatif yüzeyine bağlamak suretiyle ortamda CaCO<sub>3</sub> çökmesini oluşturabilir (De Mynck vd., 2010:118). Bakterilerin ortamda daha fazla CaCO<sub>3</sub> çökmesine neden olabilmesi, üre miktarının arttığı durumlarda ortaya çıkmaktadır. Bu sebeple, üreolitik bakteriler, ortam koşullarına dayanıklı ve uyum sağlayabilen bakteriler olarak kullanılmaktadır. Ürenin üreaz enzimleri tarafından hidrolizi, karbonat iyonlarını üretebilen ve ilgili bir proton üretimi olmadan biyolojik olarak gerçekleşen birkaç reaksiyondan biridir. Bu hidroliz, ortamda yeterli miktarda kalsiyum olduğunda, kalsit adlı katı bir kristalin çökmesine neden olur (Şekil 4). Dolayısıyla, üreolitik bakterilerin ortama eklenmesi, suda bulunan kalsiyum iyonlarını uzaklaştırmak için etkili bir yöntem olabilir (Siddique ve Chahal, 2011:3791). Üre hidrolizi ile biyoçimentolama, biyolojik onarım, biyolojik tıkkama, biyolojik tortulaşma ve su arıtma gibi alanlarda çeşitli çalışmalar yapılmaktadır (Yıldırım vd., 2016:70).



**Şekil 4:** Üreolitik bakterilerin etkisiyle katalize edilen kalsiyum karbonat çökelimi (Yıldırım vd., 2016).

### 3. *Biyomineralizasyon ile mermer yapıların sürdürülebilir restorasyonu*

Günümüzde, mermer geniş bir kullanım alanına sahiptir ve özellikle modern yapı sektöründe önemli bir malzeme olarak öne çıkmaktadır. Mermer, estetik ve dayanıklılık özellikleri nedeniyle birçok mimari yapının temel malzemesi olarak tercih edilmektedir. Ancak, çevresel faktörler ve iklim koşulları, mermer yapıların yüzeyinde çeşitli hasarların ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Bu hasarlar arasında asit yağmurlarının etkisi özellikle önemlidir. Mermerin ana bileşiği olan kalsiyum karbonat ( $\text{CaCO}_3$ ), normal şartlarda suda düşük çözünürlüğe sahiptir. Ancak, asit yağmurlarıyla ortaya çıkan asidik ortamlar,  $\text{CaCO}_3$ 'ü kimyasal reaksiyonlar aracılığıyla çözünebilir tuzlara dönüştürebilir. Bu çözünme süreci sonucunda malzeme kaybı yaşanır, yapı yüzeylerinde delikler meydana gelir ve aşınma ile renk değişimleri gözlenir (Naidu vd., 2016:3421). Bu hasarların ihmal edilmesi, birçok yapının zaman içinde yok olmasına ve birçoğunun tamamen kaybolma riskiyle karşı karşıya kalmasına yol açmaktadır. Hasarlı yapıların geleneksel yöntemlerle tamir edilmesi, genellikle akrilik veya epoksi reçineleri gibi malzemelerin kullanımını içerir. Ancak, bu malzemelerin kullanımı, uyumsuz ve zararlı yüzey filmlerinin oluşmasına neden olabilir. Ayrıca, organik çözücülerin aşırı kullanımı çevre kirliliğini artırabilir. Kireç-su tekniği gibi geleneksel  $\text{CaCO}_3$  üretim yöntemleri de kırılgan ve etkisiz kabukların oluşmasına neden olabilir (De Muynck vd., 2010:118). Bu teknikler, yapıların dayanıklılığını azaltabilir veya yetersiz kalabilmektedir.

Bu durumlar, sadece insan sağlığını olumsuz etkilemekle kalmayıp aynı zamanda yapıların estetik görünümünü de olumsuz yönde etkileyebilir. Bu durum, uzmanları daha sürdürülebilir ve çevre dostu çözümler aramaya yöneltmektedir. Bu bağlamda, günümüzde üreolitik-odaklı  $\text{CaCO}_3$  oluşumu gibi

alternatif araştırma alanlarına yönelik ilgi artmaktadır. Kalsiyum karbonatın özellikle üreolitik bakteriler tarafından oluşturulma eğilimi, bu alandaki potansiyeli göstermektedir.

#### **4. Geleneksel yapı malzemelerindeki problemlere biyobeton ve bakteriyel biyokalsifikasyon çözümleri**

Mimari tasarımda biyoişbirlikçi bir yaklaşım olarak öne çıkan bakteriyel biyokalsifikasyon yöntemi, Demirci'nin (2019:1) çalışmasında detaylı bir şekilde incelenmiştir. Bu benzersiz yaklaşımla, biyokalsifikasyonun farklı alanlarda nasıl kullanılabilceği açıklanarak, doğadan ilham alınan bir tasarımın geleneksel yöntemlerden nasıl farklı olduğu ve çevre dostu bir uygulama olarak nasıl öne çıktığı vurgulanmıştır. Yapı çevrelerinin genellikle betonarme yapılar olarak oluşturulmasının, kullanılan malzemenin insan sağlığını tehdit eden üretim ve kullanım süreçlerini barındırdığı bir gerçeği ortaya konmuştur. Küresel ölçekteki çevresel sorunlar, sürdürülebilir yapı malzemelerine olan ihtiyacı daha da artırmaktadır. Biyoişbirlikçi yaklaşım, gelecekte canlı organizmaların mimarlık ve tasarım alanlarında nasıl kullanılabilceği konusunda umut vadetmektedir. Bakteriyel biyokalsifikasyon yöntemi ise zararsız, patojen içermeyen ve kanserojen olmayan yeni tasarımların kapılarını aralamaktadır.

Castro-Alonso vd., (2019:1), mikrobiyal olarak indüklenmiş kalsiyum karbonat çökeltmesi (MICP) sürecinde mikrobiyolojik ve moleküler kavramların biyobeton üzerindeki etkilerini inceleyerek, üre hidrolizinin MICP'nin yönlendirildiği denitrifikasyon, disimilasyon ve sülfat indirgemesi yoluyla biyobetonun geliştirilmesine katkı sağladığını ve betonun dayanıklılık özelliklerinde artışa neden olduğunu ortaya koymuştur. Ayrıca, beton yapıların kendi kendini iyileştirme sürecini teşvik ettiği sonucuna varılmıştır. Üre hidrolizinin, beton onarım mekanizmalarında yaygın olarak kullanılan bir yöntem olduğu belirtilmiştir. Biyobetonun performansını artırmak için mikrobiyolojik ve moleküler bileşenlerin gerekliliği vurgulanmıştır. Üreik aktivite sergileyen bakteriler, toprakta kalsiyum karbonat üretebilmenin yanısıra topraktan ağır metallerin uzaklaştırılması, toprak biyokonsolidasyonu, biyoçimento üretimi ve karbondioksitin tutulması gibi süreçlerde de etkili olabilirler. Bakteri türü, bakteri hücre konsantrasyonları, pH, sıcaklık, kalsiyum ve üre konsantrasyonları gibi faktörler MICP'nin etkinliğini etkileyebilir. Bu bağlamda, bakteri üreazı, kalsiyum karbonat kristalleri ile MICP'nin etkinliğini etkileyen mekanizmalar üzerine yapılan araştırmalar ve uygulamalar önem arz etmektedir (Chaparro-Acuña vd., 2018:277). Çimento hamuruna *S. pasteurii* suşu eklenerek kalsiyum karbonat (CaCO<sub>3</sub>) seviyesi artırılmış ve çimento harcındaki boşluk miktarında azalma gözlemlenmiştir. Ayrıca, çimento harcının basınca daha dayanıklı olduğu



saptanmıştır. Bu biyomineralizasyon yöntemi, çimento esaslı malzemelerin yapısında önemli değişikliklere neden olarak, betonun kendiliğinden iyileşmesini sağlamada yenilikçi bir yöntem olarak öne çıkmaktadır (Bundur vd., 2015:237). Aynı zamanda, mikrokapsüllü bakteri sporlarını kullanarak kendi kendini iyileştiren beton üzerine yapılan çalışmalarda önemli gelişmeler kaydedilmiştir. Çatlak oluşan numunelere mikrokapsül eklenmiş, bu numuneler Taramalı elektron mikroskopu (TEM) ile incelenmiştir. İyileşme oranları, çatlakların iyileşme süreleri ve su geçirgenliği değerlendirmeleri yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar, biyomikrokapsül içeren numunelerin iyileşme yüzdelerinin, bakteri içermeyenlere göre daha yüksek olduğunu göstermiştir (Wang vd., 2014:139).

Çimento matrisine eklenen bakterilerin, çatlak onarım sürecini başlatma ve iyileştirme sürecinde aktif rol oynayıp oynamadığını belirlemek önemlidir. Beton karışımına dahil edilen bakterilerin sadece mekanik streslere dayanmakla kalmayıp aynı zamanda uzun süreli yüksek alkaliliğe de direnç göstermesi gereklidir. Bu nedenle, alkalofilik spor üreten *Bacillus* cinsi bakteriler tercih edilmektedir. Elde edilen sonuçlar, *Bacillus* cinsi bakterilerin çatlak içine eklenen su ile birlikte kalsiyum laktatı kalsiyum karbonata dönüştürdüğünü ve oluşan çatlakları kapattığını göstermiştir. Bu onarım sürecinin çevre dostu ve maliyet açısından uygun olması, gelecek açısından umut verici bir perspektif sunmaktadır (Jonkers vd., 2010:230). Bakteriyel aktivitenin,  $Ca^{+2}$  eklenme şekli ve üre miktarına bağlı olarak oluşacak kalsiyum karbonat tabakasının özelliklerini etkileyebileceği görülmektedir. X-ışını kırınımı, oluşan tabakanın bileşimini karakterize ederken; taramalı elektron mikroskopu, parçacıkların morfolojisi hakkında bilgi sağlamaktadır. Ayrıca koruyucu tabakanın su penetrasyonuna karşı direncini değerlendirmek için kılcal su emme testi de gerçekleştirilmektedir. Bu bağlamda, yüksek bakteri aktivitesi, uygun kalsiyum konsantrasyonu ve üreden önce  $Ca^{+2}$  eklenmesi durumunda oluşan kalsiyum karbonat tabakasının, numunelerin yüzeyinde su penetrasyonuna karşı yüksek direnç sağladığı tespit edilmiştir (Chunxiang vd., 2009:1273).

Mikrobiyal kalsiyum karbonat çökeltmesi, bir toprak güçlendirme yöntemi olarak değerlendirilmektedir. Arazi uygulamaları için gerçek koşullarda beş metrelik bir kum kolonuna bakteri ve reaktiflerin enjekte edilerek uygulanmıştır. *Sporosarcina pasteurii* düşük basınçlarda kolonun tamamına enjekte edilmiş ve yapılan işlemin ardından kolon test edilmiştir. Test sonuçları, birkaç metre boyunca mukavemet ve sertlikte önemli bir gelişme olduğunu göstermiştir. Dayanım artışının kolonun üst kısmında daha belirgin olduğu gözlemlenmiştir. Beş metrelik tedavi uzunluğunun tamamında kalsiyum karbonat çökmesinin gerçekleştiği tespit edilmiştir. Bu bağlamda, mikrobiyal kalsiyum karbonat çökeltmesi ile toprağın yük taşıma özelliğinin iyileştirilebileceği ve toprağı sıvı geçirimsiz hale getirilmeden uygulanabileceği sonucuna varılmıştır (Whiffin vd., 2007).

Mikrobiyal kalsiyum karbonat çökeltmesi, toprak güçlendirme yöntemi olarak değerlendirilmektedir. Gerçek arazi koşullarında, beş metrelik bir kum kolonuna bakteri ve reaktiflerin enjekte edilmesiyle uygulanmıştır. Düşük basınçta *Sporosarcina pasteurii* kolonun tamamına enjekte edilmiş ve işlem sonrasında kolon test edilmiştir. Test sonuçları, birkaç metrelik bölgede mukavemet ve sertlikte önemli bir gelişme olduğunu göstermiştir. Dayanım artışının kolonun üst kısmında daha belirgin olduğu gözlemlenmiştir. Beş metrelik tedavi uzunluğunun tamamında kalsiyum karbonat çökeltmesinin gerçekleştiği tespit edilmiştir. Bu bağlamda, mikrobiyal kalsiyum karbonat çökeltmesinin, toprağın yük taşıma özelliğini iyileştirebileceği ve toprağı sıvı geçirimsiz hale getirmeden uygulanabileceği sonucuna varılmıştır (Whiffin vd., 2007:147). Stocks-Fischer vd., (1999:1563) tarafından yapılan araştırma, *Bacillus pasteurii* kullanılarak indüklenen kalsiyum karbonat ( $\text{CaCO}_3$ ) çökeltmesinin fiziksel ve biyokimyasal özelliklerini incelemiştir. Çalışma, mikrobiyolojik ve kimyasal  $\text{CaCO}_3$  çökeltmelerinin kinetiklerini karşılaştırmış ve üreaz aktivitesinin çeşitli pH seviyelerindeki etkilerini incelemiştir. Mikrobiyal çökeltmenin, taramalı elektron mikroskobu ve X-ışını kırınım analizi kullanılarak kum kolonlarının yüzeyi ve altında değerlendirildiği belirtilmiştir. Araştırma,  $\text{CaCO}_3$  çökeltme oranının hücre büyümesine bağlı olduğunu öne sürmüş ve üreazın kalsit çökeltmesinde yüksek pH seviyelerinde etkili olduğunu belirtmiştir. Sonuçlar, mikrobiyal çökeltmenin gözenekli ortamın biyolojik olarak iyileştirilmesinde potansiyel bir uygulama olabileceğini öne sürmektedir.

### **5. Bakterilerin etkisiyle mineral oluşumu - pasif ve aktif çekirdeklenme mekanizmaları**

Doğada yaygın olarak bulunan mineral türleri arasında kalsit, aragonit ve vaterit bulunmaktadır. Bakteriler tarafından sıklıkla sentezlenen vaterit, kalsit oluşumunda bir geçiş formu olarak görev yapar. Kalsit minerali,  $\text{CaCO}_3$ 'ün en kararlı formudur (Tourney ve Ngwenya, 2009:138; Wang ve Becker, 2009:380). Bakteriyel karbonat çökeltmesi, pasif ve aktif çekirdeklenme olmak üzere iki temel mekanizmadan kaynaklanır (Schultze-Lam ve Beveridge, 1994:216; Schultze-Lam vd., 1996:171; Stocks-Fischer vd., 1999:1563; Warren vd., 2001:93). Pasif çekirdeklenme, bakteri hücrelerinin mikroçevrelerinde ve çözeltinin kimyasında metabolik değişikliklerle mineral uygunluğunu artıran ve çekirdeklenmeyi tetikleyen bir süreçtir (Schultze-Lam vd., 1996:171). Bu genellikle bakteriyel amonyaklaşma veya anoksik ortamlarda sülfat indirgenmesi yoluyla  $\text{CO}_3^{2-}$  veya  $\text{HCO}_3^-$  üretiminden kaynaklanır. Diğer bir etken de fotosentetik  $\text{HCO}_3^-$  tüketimi ve bakteriler tarafından  $\text{OH}^-$  üretimiyle ortaya çıkan pH artışıdır (Ferris vd., 1997:213).

Kristalleşmelerin oluşumu, aktif çekirdeklenme reaksiyonu ile gerçekleşirse bu mekanizma, canlı hücrelerin amonifikasyon süreci sonucunda üretilen  $\text{HCO}_3^-$  ile

ilgilidir. Bu süreç,  $\text{CaCO}_3$  oluşumu yerine kation adsorpsiyonunu içerir. Kimyasal olarak heterojen makromoleküller, bakteri hücre yüzeylerinde çekirdeklenme substratları olarak etkileşir ve  $\text{CO}_3^{2-}$  veya  $\text{HCO}_3^-$ 'nin çekiciliğini destekler. Bu karmaşık süreç, literatürde aktif çekirdeklenme olarak bilinir (Schultze-Lam ve Beveridge, 1994:216; Bosak ve Newman, 2003:577; Van Lith vd., 2003:237).

## SONUÇ

Bakteriyel kalsifikasyon ile mikrobiyal minerallerin sentezi, yapı malzemelerinin mukavemetini artırma ve ekolojik restorasyonu destekleme potansiyeli sunan karmaşık bir biyolojik süreçtir. Bu süreç, doğal olarak ortaya çıkan mikroorganizmaların, özellikle üreolitik bakterilerin, çeşitli çevresel koşullar altında mineral oluşturabilme yeteneğini içerir. Üreolitik bakteriler, üre hidrolizi yoluyla serbest bırakılan amonyak ve karbon dioksit kullanarak kalsiyum karbonat çökmesini oluşturur. Bu çökme, yapı malzemelerindeki çatlakları doldurarak malzeme dayanıklılığını artırabilir. Biyokalsifikasyon süreci, sadece yapı malzemelerinin fiziksel özelliklerini iyileştirmekle kalmaz, aynı zamanda çeşitli çevresel avantajlar da sağlar. Bu süreç, çevresel restorasyon projelerinde kullanılarak çeşitli ekosistemleri destekleme potansiyeline sahiptir. Örneğin, asidik yağmurların neden olduğu kireçtaşı ve mermer yapıların çözünmesini önlemek için biyokalsifikasyon uygulanabilir. Bu uygulama, çevresel zararları onarma ve yapı malzemelerini sürdürülebilir bir şekilde koruma potansiyeli taşır.

Çimento ve beton gibi yaygın yapı malzemelerinde bakteriyel biyokalsifikasyonun kullanımı, malzeme dayanıklılığını artırma ve kendi kendini onarma yetenekleri sağlama potansiyeli taşır. Bu, ekolojik açıdan sürdürülebilir inovasyonlar ve yapı malzemeleri için önemli bir adımdır. Ancak, bu biyolojik süreçlerin endüstriyel ölçekte optimize edilmesi ve farklı uygulama alanlarında daha geniş bir kullanım potansiyeli elde etmek için daha fazla bilimsel araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

Sonuç olarak, bakteriyel kalsifikasyon, sadece yapı malzemelerinin geliştirilmesi değil, aynı zamanda ekolojik restorasyonun desteklenmesi konularında da umut vadeden bir alan oluşturur. Bu biyolojik süreçlerin daha derinlemesine anlaşılması ve etkinliğinin artırılması, çevre dostu ve uzun vadeli restorasyon çözümleri sunma potansiyelini daha da artırabilir. Bu nedenle, gelecekteki araştırmalar, biyokalsifikasyonun çeşitli uygulama alanlarındaki etkinliğini optimize etmek ve çevresel sürdürülebilirlik için yeni olanaklar keşfetmek üzerine odaklanmalıdır.

## REFERANSLAR

- Achal, V., Pan, X. (2014). Influence of calcium sources on microbially induced calcium carbonate precipitation by *Bacillus* sp. CR2. *Applied biochemistry and biotechnology*, 173(1), 307-317.
- Al Omari, M. M. H., Rashid, I. S., Qinna, N. A., Jaber, A. M., Badwan, A. A. (2016). Chapter Two—Calcium Carbonate. İçinde H. G. Brittain (Ed.), *Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology* (C. 41, ss. 31-132). Academic Press.
- Anbu, P., Kang, C.-H., Shin, Y.-J., So, J.-S. (2016). Formations of calcium carbonate minerals by bacteria and its multiple applications. *Springerplus*, 5(1), 1-26.
- Anitha, V., Abinaya, K., Prakash, S., Seshagiri Rao, A., Vanavil, B. (2018). *Bacillus cereus* KLUVAA mediated biocement production using hard water and urea. *Chemical and biochemical engineering quarterly*, 32(2), 257-266.
- Bosak, T., Newman, D. K. (2003). Microbial nucleation of calcium carbonate in the Precambrian. *Geology*, 31(7), 577-580.
- Candoğan, T. Ş. (2015). Üreolitik bakteriler ile kalsiyum karbonat mineralizasyonu ve zemin iyileştirmede kullanımı [Master's Thesis]. Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Castro-Alonso, M. J., Montañez-Hernandez, L. E., Sanchez-Muñoz, M. A., Macias Franco, M. R., Narayanasamy, R., Balagurusamy, N. (2019). Microbially Induced Calcium Carbonate Precipitation (MICP) and Its Potential in Bioconcrete: Microbiological and Molecular Concepts. *Frontiers in Materials*, 6.
- Chang, R., Kim, S., Lee, S., Choi, S., Kim, M., Park, Y. (2017). Calcium Carbonate Precipitation for CO<sub>2</sub> Storage and Utilization: A Review of the Carbonate Crystallization and Polymorphism. *Frontiers in Energy Research*.
- Chaparro-Acuña, S. P., Becerra-Jiménez, M. L., Martínez-Zambrano, J. J., Rojas-Sarmiento, H. A. (2018). Soil bacteria that precipitate calcium carbonate: Mechanism and applications of the process. *Acta Agronómica*, 67(2), 277-288.
- Chunxiang, Q., Jianyun, W., Ruixing, W., Liang, C. (2009). Corrosion protection of cement-based building materials by surface deposition of CaCO<sub>3</sub> by *Bacillus pasteurii*. *Materials Science and Engineering: C*, 29(4), 1273-1280.

- Demirci, B. F. (2019). Mimari Tasarımda Biyoışbirlikçi Bir Yaklaşım Olarak Bakteriyel Biyokalsifikasyonun Kullanımı Üzerine Bir İnceleme. Dokuz Eylül Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, İzmir.
- Ercan, M., Koltka, S., Sabah, E. (2018). Mermer Artıklarından Öğütülmüş Kalsiyum Karbonat (Gcc) Üretimi: Yaş Ve Kuru Öğütme Ürünlerinin Karşılaştırılması. *Bilimsel Madencilik Dergisi*, 57(1), 34-43.
- Hammes, F. (2002). Key roles of pH and calcium metabolism in microbial carbonate precipitation. *Reviews in environmental science and biotechnology*, 1(1), 3-7.
- Han, Y. S., Hadiko, G., Fuji, M., Takahashi, M. (2006). Crystallization and transformation of vaterite at controlled pH. *Journal of crystal growth*, 289(1), 269-274.
- Jonkers, H. M., Thijssen, A., Muyzer, G., Copuroglu, O., Schlangen, E. (2010). Application of bacteria as self-healing agent for the development of sustainable concrete. *Ecological engineering*, 36(2), 230-235.
- Kamennaya, N. A., Ajo-Franklin, C. M., Northen, T., Jansson, C. (2012). Cyanobacteria as biocatalysts for carbonate mineralization. *Minerals*, 2(4), 338-364.
- Kart, N. N. B. (2021). Bakteriyel kalsiyum karbonat mineralizasyonunda üreolitik bakteri-kil etkileşimi: *Paenibacillus Favisporus* U3. Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Denizli.
- Mateescu, C. D., Sarbu, C., Isopescu, R., Dumitrescu, O., Ghica, D. (2011). Sonocrystallization of calcium carbonate metastable polymorphs in alcoholic solutions as reaction media. Conference: 18th International Symposium on Industrial Crystallization, ISIC-18, 13-16 Sept. 2011At: Zurich, Switzerland.
- Naidu, S., Blair, J., Scherer, G. W. (2016). Acid-resistant coatings on marble, *J. Am. Ceram. Soc.*, 99(10): 3421–3428.
- Reddy, M. S. (2013). Biomineralization of calcium carbonates and their engineered applications: A review. *Front Microbiol.* 4, 314-330.
- Schultze-Lam, S., Beveridge, T. J. (1994). Physicochemical characteristics of the mineral-forming S-layer from the cyanobacterium *Synechococcus* strain GL24. *Canadian journal of microbiology*, 40(3), 216-223.
- Schultze-Lam, S., Fortin, D., Davis, B. S., Beveridge, T. J. (1996). Mineralization of bacterial surfaces. *Chemical Geology*, 132(1-4), 171-181.
- Seifan, M., Samani, A. K., Berenjian, A. (2016). Induced calcium carbonate precipitation using *Bacillus* species. *Applied microbiology and biotechnology*, 100(23), 9895-9906.

- Siddique, R., Chahal, N. K. (2011). Effect of ureolytic bacteria on concrete properties. *Construction and building materials*, 25(10), 3791-3801.
- Stocks-Fischer, S., Galinat, J. K., Bang, S. S. (1999). Microbiological precipitation of CaCO<sub>3</sub>. *Soil Biology and Biochemistry*, 31(11), 1563-1571.
- Tourney, J., Ngwenya, B. T. (2009). Bacterial extracellular polymeric substances (EPS) mediate CaCO<sub>3</sub> morphology and polymorphism. *Chemical Geology*, 262(3-4), 138-146.
- Van Lith, Y., Warthmann, R., Vasconcelos, C., McKenzie, J. A. (2003). Microbial fossilization in carbonate sediments: a result of the bacterial surface involvement in dolomite precipitation. *Sedimentology*, 50(2), 237-245.
- Wang, J., Becker, U. (2009). Structure and carbonate orientation of vaterite (CaCO<sub>3</sub>). *American Mineralogist*, 94(2-3), 380-386.
- Wang, J. Y., Soens, H., Verstraete, W., De Belie, N. (2014). Self-healing concrete by use of microencapsulated bacterial spores. *Cement and concrete research*, 56, 139-152.
- Warren, L. A., Maurice, P. A., Parmar, N., Ferris, F. G. (2001). Microbially mediated calcium carbonate precipitation: implications for interpreting calcite precipitation and for solid-phase capture of inorganic contaminants. *Geomicrobiology Journal*, 18(1), 93-115.
- Wei, H., Shen, Q., Zhao, Y., Wang, D.-J., Xu, D.-F. (2003). Influence of polyvinylpyrrolidone on the precipitation of calcium carbonate and on the transformation of vaterite to calcite. *Journal of Crystal Growth*, 250(3-4), 516-524.
- Whiffin, V. S., Van Paassen, L. A., Harkes, M. P. (2007). Microbial carbonate precipitation as a soil improvement technique. *Geomicrobiology Journal*, 24(5), 417-423.
- Yıldırım, N., Gürtuğ, Y., Sesal, C. (2016). Mikrobiyal kalsiyum karbonat oluşum mekanizmaları ve uygulama alanları. *Marmara Fen Bilimleri Dergisi*, 28(2), 70-80.

## BÖLÜM 11

### Pseudovirüs Üretimine Yönelik Olarak Lentiviral Vektörlerin Tasarlanması ve Geliştirilmesi

Zehra KÖSEOĞLU<sup>1</sup>  
Seval CİNG YILDIRIM<sup>2</sup>

#### 1- ÖZET

Canlı virüs araştırmaları genellikle biyogüvenlik seviyesi 3 laboratuvarları ile sınırlı olduğundan bu durum birçok araştırma laboratuvarının virüs çalışmalarına erişimini kısıtlamaktadır. Ancak pseudovirüsler, yakın zamanda SARS-CoV-2'ye karşı aşı ve terapötik geliştirmelerde önemli bir rol oynamıştır. Pseudovirüsler, farklı virüslerden vektörler aracılığıyla türetilen bir rekombinant virüs türüdür ve genellikle genleri değiştirilmiş veya modifiye edilmiştir.

Pseudovirüslerin viral yüzey proteinlerini eksprese etmelerine rağmen biyogüvenlik seviyesi 2 laboratuvarlarında güvenli bir şekilde işlenebilmektedir. Bu özelliklerinin dolaylı hücresel tropizm, reseptör tanıma, ilaç keşfi ve antikörlerin/aşıların geliştirilmesi ve değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılabilir. Pseudovirüsler, memeli hücre hatlarına çeşitli viral vektörlerin transfekte edilmesiyle in vitro olarak üretilmektedir. Genetik bilginin bir hücreye transferini kolaylaştırmak amacıyla vektör adı verilen araçlar kullanılır. En yaygın olarak kullanılan viral vektörler arasında adeno-ilişkili virüs (AAV), adenovirüs ve retrovirüsten türetilenler bulunmaktadır. Retrovirüs olan lentivirüs omurgası, genellikle pseudovirüslerin üretiminde kullanılabilir.

Lentivirüsler, genetik materyallerini konakçı hücreye entegre ederek ilgili cDNA'nın stabil ve uzun süreli ekspresyonuna izin verir. Bu özellik, primer hücreleri ve bazı ölümsüzleştirilmiş hücre hatlarını transfekte etmeyi zorlaştıran geleneksel yöntemlere kıyasla lentivirüslerin daha etkili bir seçenek olmasını sağlar. Lentivirüsler, pseudotipleme kullanımıyla birçok farklı hücre tipini enfekte edebilme yeteneğine sahiptirler. Lentivirüs üretimi için transfer, zarf ve paketleme plazmidlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Lentiviral vektör kullanımında öne çıkan iki güvenlik endişesi bulunmaktadır. Kendiliğinden inaktive olan

---

<sup>1</sup> Yüksek Lisans Öğrencisi; İnönü Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Biyoteknoloji Anabilimdalı zehrako1989@gmail.com ORCID No:0009-0005-1175-7054

<sup>2</sup> Doç. Dr.; İnönü Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Biyoteknoloji Anabilimdalı seval.cing@inonu.edu.tr ORCID No: 0000-0001-7163-9512

vektörlerin geliştirilmesi ve kimerik 5'LTR'lerin (uzun terminal tekrarları) kullanımı ile lentiviral vektörlerin daha güvenli ve kontrollü bir şekilde kullanılmasını sağlamıştır.

Sonuç olarak, lentiviral vektör bileşenlerinin in vitro üretimi, gen terapisi, virüs araştırmaları ve antikor nötralizasyon testleri gibi alanlarda önemli bir teknoloji olarak devam etmektedir. Güvenlik, verimlilik ve özelleştirilebilirlik açısından sürekli olarak geliştirilen bu sistemler, ilerleyen çalışmalarda önemli bir rol oynayacaktır.

**Anahtar Kelimeler:** Pseudovirüs, Lentiviral vektörler, Biyogüvenlik, SARS-CoV-2 pseudovirüsleri, Nötralizasyon antikor testi

## GİRİŞ

Canlı virüs araştırmaları, biyogüvenlik seviyesi 3 laboratuvar araştırmalarıyla sınırlıdır. Bu durum, dünya genelinde birçok araştırma laboratuvarının virüs çalışmalarına erişimini kısıtlamıştır. Pseudovirüsler, yakın zamanda SARS-CoV-2'ye karşı aşı ve terapötik geliştirmelerde önemli bir rol oynamıştır. Bu alternatif yöntemle, dünya çapındaki birçok araştırma laboratuvarının ulaşamadığı SARS-CoV-2 araştırmalarını mümkün kılmıştır.

Pseudovirüsler, farklı virüslerden vektörler aracılığıyla türetilen bir rekombinant virüs türüdür (Sanders, 2002:437). Bu virüslerin genleri genellikle değiştirilir veya modifiye edilir, böylece doğal yüzey protein ekspresyonu ortadan kaldırılır. Pseudovirüsler, ilk defa 1960'larda bilim insanlarının sığırlardan izole edilen veziküler stomatit virüsü (VSV) üzerinde çalışmaya başlamasının ardından geliştirildi. VSV-G yüzey proteininin hücreye kolay girişini sağlaması, virüsü pseudovirüs olarak değil, aynı zamanda DNA'yı hücrelere iletmek için kullanışlı bir vektör haline getirmiştir (Ory vd., 1996:11400). İlk Ebola aşısı VSV platformu kullanılarak geliştirildi ve daha sonra virüs, kanser hücrelerini aramak ve yok etmek için tasarlanmıştır. Yüzey proteinlerini eksprese etmek için ek bir plazmit kullanılarak hücre içinde çoğalan bir pseudovirüs üretimine olanak sağlamıştır (Welch vd., 2016:9).

Pseudovirüslerin viral yüzey proteinleri, konakçı hücrelere girişte önemli roller oynamaktadır. Ancak pseudovirüslerin, yabancıl tip virüslere göre virülansları azaltmış ve biyogüvenlik seviyesi 2 laboratuvarlarında güvenli bir şekilde işlenmelerine olanak sağlamıştır (Nie vd., 2017:1). Sonuç olarak, pseudovirüsler hücresel tropizm, reseptör tanıma, ilaç keşfi ve antikorların/aşıların geliştirilmesi ve değerlendirilmesi için yaygın olarak kullanılmaktadır.



## ***1. Genetik bilgi transferi için vektörler***

Genetik bilginin bir hücreye transferini kolaylaştırmak amacıyla vektör adı verilen araçlar kullanılır. Bu vektörler, viral ve viral olmayan olmak üzere iki temel dağıtım sistemine ayrılabilir. En yaygın olarak kullanılan viral vektörler arasında adeno-ilişkili virüs (AAV), adenovirüs ve retrovirüsten türetilenler bulunmaktadır. Retrovirüs olan lentivirüs omurgası, genellikle pseudovirüslerin üretiminde kullanılabilir. Viral olmayan vektörler ise bakteriyel çift sarmallı plazmit DNAsı, oligodeoksinükleotitler veya benzeri kimyasal olarak sentezlenmiş bileşikler olabilir (Howarth vd., 2009:1).

## ***2. Lentivirüsler: genom yapısı ve yaşam döngüsü özellikleri***

Lentivirüsler, Retroviridae familyasının yedi cinsinden biri olarak sınıflandırılmakta olup primat ve primat olmayan retrovirüsleri içermektedir. Retrovirüs ailesi, genetik organizasyon ve yapı özellikleri açısından tamamen benzerdir. Lentivirüslerin genom çapı genellikle 80-120 nm arasında değişmekte olup, tek sarmallı iki pozitif yüklü RNA içermektedir. Ayrıca, benzersiz bir replikatif stratejiye sahip olup viral RNA'nın hücresel genoma entegre edilmiş DNA'ya ters kopyalanmasını içerir (Coffin vd., 1997:1).

Aynı zamanda bir çift lipit zarı ile kaplı bir protein kapside sahiptir. Lentivirüs genomlarında, ortak retroviral genlerin ötesinde çeşitli düzenleyici genler bulunmaktadır. Bu düzenleyici genler, konakçı hücre savunmasını devre dışı bırakma, replikasyonu düzenleme ve bağışıklık tepkilerini baskılama gibi özel görevlere sahiptir. Ayrıca, bazı proteinler bulaşıcı parçacıklar olarak paketlenabilir ve viral replikasyonun ilk aşamasında sentezlenebilir (Adamson ve Jones, 2004:107). Lentiviral vektörler, *in vitro* olarak bölünen ve bölünmeyen hücrelerin genomlarına entegre olma yeteneğine sahiptir.

Lentivirüs genomu genellikle 9-10 kb'dir ve homolog bölgelere (LTR: uzun terminal tekrarları) sahiptir. Lentivirüslerin, virüs replikasyonu, entegrasyonu ve ekspresyonu için gerekli olan 600-900 nükleotit uzunluğundaki bu LTRbölgeleri U3, R ve U5 olarak ayrılmaktadır. Gag, pol ve env genleri, tüm retrovirüslerde ortak olan genlerdir. Gag geni, polipeptit zincirini viral proteaz (PR) tarafından matris (MA), kapsid (CA) ve nükleokapsid (NC) olmak üzere üç ana yapısal proteine bölünebilen bir polipeptidi kodlamaktadır. Pro geni, integras (IN) ve ters transkriptaz (RT) yapımında görev alan bir polipeptidi kodlar (Katz ve Skalka, 1994:133). Env geni; SU (yüzey) ve TM (transmembran) protein alt birimlerine hücresel proteaz yardımıyla ayrılabilen polipeptidi kodlamaktadır (Pluta, 2009:531). Bu enzimler, lentivirüslerin yaşam döngüsünde önemli bir rol oynamaktadır. Viral polipeptitlerin bölünmesi, viral RNA'nın çift sarmallı DNA'ya ters transkripsiyonu ve lentivirüsün hücresel

genoma entegrasyonunu sağlayarak, bu enzimler virüsün olgunlaşmasında ve replikasyonunda kilit bir rol oynamaktadır (Katz ve Skalka, 1994:133).

### ***2.1. Lentiviral yaşam döngüsü ve pseudotiplendirme***

Lentivirüslerin yaşam döngüsü, Retroviridae ailesinin diğer üyeleriyle benzerlik gösterir. Hedef hücre ile etkileşim, viral zarf glikoproteininin, virüsün hücresel hedefini tanımlayan spesifik bir reseptöre bağlanması yoluyla gerçekleşir (viral tropizm) (Li vd., 2018:1963). Viral membran, hücresel membran ile füzyona uğradıktan sonra matris ve kapsid proteinleri demonte edilir ve nükleoprotein kompleksi hücreye verildikten sonra sitoplazmada ters transkripsiyon başlar. Lentivirüslerin özgül bir özelliği, pseudo, retroviral parçacıklar oluşturabilme yetenekleridir. Bu pseudotiplendirme sürecinde genellikle Veziküler Stomatit Virüsü'nün (VSV-G) zarf glikoproteini tercih edilir. VSV-G, geniş bir konak aralığına sahip olmanın yanı sıra, stabil bir zarf yapısı oluşturarak vektörlerin etkili bir şekilde konsantre edilmesine ve yüksek titre elde edilmesine olanak tanır (Amirache vd., 2014:1422).

İlk VSV-G pseudotipli retroviral vektör, murin lösemi virüsü çekirdeğini ve genomunu içermektedir. Bu vektör, ultrasantrifüjleme yöntemiyle konsantre edildiğinde yaklaşık 109 enfeksiyöz birim titresine ulaşabilmiştir (Chen vd., 2005:1574).

#### ***2.1.1. Ters transkripsiyon: viral genomların oluşumu***

Ters transkripsiyon, öncelikle hücresel tRNA'nın kullanılmasıyla tek sarmallı bir RNA şablonundan çift sarmallı, doğrusal DNA'nın sentezine yol açan bir süreçtir. Bu aşama, düzeltme yeteneği olmayan ters transkriptaz enzimi tarafından katalizlenir. Bu düşük doğruluk, viral replikasyonda önemli bir rol oynar ve viral genomun yüksek değişkenliğinden kısmen sorumludur (Katz ve Skalka, 1994:133).

#### ***2.1.2. Genom entegrasyonu: provirüsün kalıcı genetik birim haline dönüşümü***

Lineer viral DNA sentezi tamamlandıktan sonra, viral integraz molekülü spesifik bölümleri 5' ve 3' terminallerinde gerçekleştirir ve konakçı genoma entegrasyonunu başlatır. Bu entegrasyon süreci, retroviral gen ekspresyonu için kritik bir adımdır (Katz ve Skalka, 1994:133) ve provirüsün konakçı hücrede kalıcı bir genetik birim haline gelmesine olanak tanır.

### ***2.1.3. Virion montajı ve serbest bırakılması: lentiviral vektörlerde gag/pol üretiminin düzenlenmesi***

Viral RNA ve yapısal proteinler, viral partiküller halinde paketlenir ve plazma zarından tomurcuklanarak serbest bırakılır. Poliproteinler, Gag ve Gag/Pol, viral proteaz tarafından parçalandıktan sonra olgun partiküller tamamen bulaşıcı hale gelir. Lentiviral vektörlerde, halihazırda mevcut olan gag/pol transfer yapısı bulunmamasıyla birlikte, bir paketleme yapısı tarafından trans olarak sağlanır (Milone ve O'Doherty, 2018:1529). Bu nedenle, transfer vektörü konakçı hücreye entegre edildiğinde, gag/pol üretimini yönlendirememesi, sonraki viral soy oluşumunu engeller.

### ***2.2. Yenilikçi ekspresyon yöntemleri: lentivirüsleri geleneksel sistemlerden ayıran özellikler***

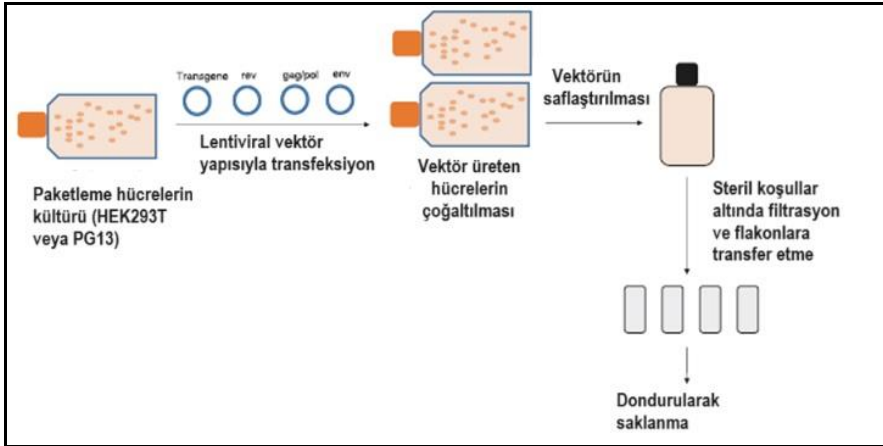
Memeli hücreleri genellikle plazmitleri aktif olarak kopyalayamaz ve hücre bölündükçe plazmit vektörünü kaybedebilir. Lentivirüsler, genetik materyallerini konakçı hücreye entegre ederek ilgili cDNA'nın stabil ve uzun süreli ekspresyonuna izin verir. Bu özellik, primer hücreleri ve bazı ölümsüzleştirilmiş hücre hatlarını transfekte etmeyi zorlaştıran geleneksel yöntemlere kıyasla lentivirüslerin daha etkili bir seçenek olmasını sağlar. Lentivirüsler, pseudotipleme kullanımıyla birçok farklı hücre tipini enfekte edebilme yeteneğine sahiptirler (Dufait vd., 2012:1).

### ***2.3. Lentiviral Vektörler: Gen Terapisi Alanında Evrim ve Güvenliğin Yükselişi***

Lentiviral vektörler, Retroviridae ailesine ait Lentivirüslerden türetilir. Bu aile içinde en yaygın kullanılan tür, insan immün yetmezlik virüsü-1 (HIV-1)'dir. Lentivirüsler, konakçı hücrelere önemli miktarda genetik bilgi aktarabilme kapasitesi nedeniyle gen terapisi alanında etkili bir gen transfer yöntemi olarak kabul edilir. İlk nesil lentiviral vektörler, HIV genomunun önemli bir kısmını içeren gag ve pol genleri ile birkaç ek viral proteini içeriyordu (Vannucci vd., 2013:1). Bu vektör tasarımına, en yaygın olarak kullanılan VSV-G'nin zarf proteini eklenmiştir. VSV-G, düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) reseptörü olarak bilinen bir reseptörü tanıır, bu da lentiviral vektörün geniş bir hücre yelpazesini transfekte etmesine izin verir (Amirache vd., 2014:1422). İlk nesil lentiviral vektörlere tat ve rev dahil edilmiştir, ancak bu genlerin çıkarılması daha güvenli ikinci nesil lentiviral vektörlerin geliştirilmesine yol açmıştır (Vannucci vd., 2013:1). Üçüncü nesil lentiviral vektörler, güvenliği daha da artırmak ve rekombinant virüs oluşumunu sağlamak amacıyla viral genomu ayrı plazmitlere bölerek tasarlanmıştır (Dull

vd., 1998:8463). Gag ve pol genleri, rev veya env genlerinden farklı bir plazmitte kodlanmıştır. Tat geni ise üçüncü nesil lentiviral vektörlerde çıkarılmıştır. Bu sistemde, üçüncü nesil lentiviral vektörler, rekombinasyonu önlemek için kendi kendini etkisiz hale getiren (SIN) lentiviral LTR dizilerini içeren iki ayrı paketleme plazmitinden oluşur. Biri, kodlama gag ve pol'u içerirken diğeri rev'i kodlar. Ayrıca, VSV-G'den türetilen zarf proteinini kodlayan ek bir plazmit de bulunmaktadır.

Üçüncü nesil lentiviral vektörler, iki ayrı paketleme plazmitini bir araya getirir. Ek bir plazmit, VSV-G'den türetilmiş zarf proteinini içerir. İlgili geni kodlayan plazmit, rekombinasyonu önlemek için kendini etkisiz hale getiren (SIN) lentiviral LTR dizilerine sahiptir. SIN lentiviral vektörler, güvenliği artırmak amacıyla viral genomun 3'LTR'sine silmelerin eklenmesiyle tasarlanmıştır (Dull vd., 1998:8463). Bu silmeler, LTR'nin promotör/arttırıcı aktivitesini engelleyerek ek bir güvenlik önlemi sağlar. Üçüncü nesil SIN lentiviral vektörlerinde kullanılan dahili promotörlerin seçimi de hayati bir faktördür. Lentiviral vektörün üretimi, Good Manufacturing Practices (GMP) standartlarını karşılayan bir tesis içinde hücre hattının kültürü ile başlar. Hücreler, üçüncü nesil lentiviral vektörü oluşturan plazmitlerle transfekte edilir ve vektör üreten hücreler kültürde çoğaltılır. Vektör, hücrelerden ve kültür artıklarından arındırılır, steriliteyi sağlamak için filtrelenir ve tek tek alikotlar halinde dondurularak saklanır (Şekil 1).



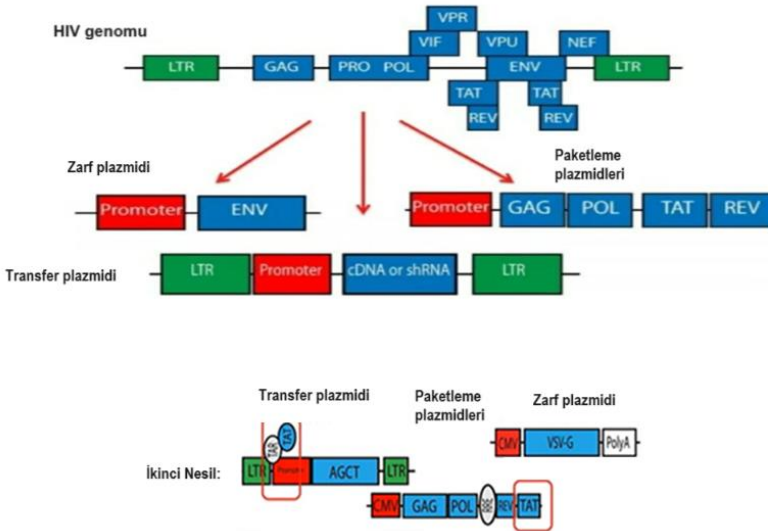
**Şekil 1:** Lentiviral vektör üretimi.

#### **2.4. Lentivirüslerin genetik düzenlenmesi**

İkinci nesil lentiviral plazmitler, Şekil 2'de gösterilen üç plazmit distribütörü tarafından oluşturulan bir sistemdir. Bu düzenek, Gag, Pol, Rev ve Tat genlerini

kodlayan tek bir paketleme plazmidini içermektedir. Transfer plazmidini, viral LTR'leri ve psi paketleme sinyalinin içerir. Dahili bir promotör sağlanmadığı sürece, gen ekspresyonu, zayıf bir promotör olan ve Tat'ın varlığını gerektiren 5'LTR tarafından düzenlenir (Cronin vd., 2005:387). Zarf proteini Env (genellikle VSV-G), üçüncü bir zarf plazmidinde kodlanır. Tüm 2. nesil lentiviral transfer plazmitleri, 2. nesil paketleme sistemiyle kullanılmalıdır, çünkü LTR'den kaynaklanan transgen ekspresyonu Tat'a bağlıdır (<https://www.addgene.org/guides/lentivirus/>).

Üçüncü nesil sistem, ikinci neslin güvenliğini daha da artırmak için bir dizi önemli gelişmeyi içerir. İlk olarak, paketleme sistemi iki ayrı plazmid üzerinde yer alır: biri Rev'i kodlarken diğeri Gag ve Pol'i kodlar (Şekil 2). Bu sistem, daha fazla güvenlik sağlamakla birlikte, kullanımı daha karmaşık olabilir ve ek bir plazmitin eklenmesi nedeniyle daha düşük viral titrelerle sonuçlanabilir (Tareen vd., 2013:421). Ayrıca, Tat'ın eliminasyonu için, 3. nesil sistemde, transfer plazmiti üzerindeki heterolog bir promotöre kaynaşmış kimerik bir 5' LTR eklenir. Bu sayede transgenin ekspresyonu artık Tat transaktivasyonuna bağlı olmadan gerçekleşir. 3. nesil transfer plazmidini, paketleme için 2. nesil veya 3. nesil sistemle kullanılabilir (Maetzig vd., 2011:677).



**Şekil 2:** İkinci nesil lentiviral plazmitlerin şematik tasarım görseli (<https://www.addgene.org/>).

## 2.5. Lentivirüs plazmit bileşenlerinin in vitro üretimi

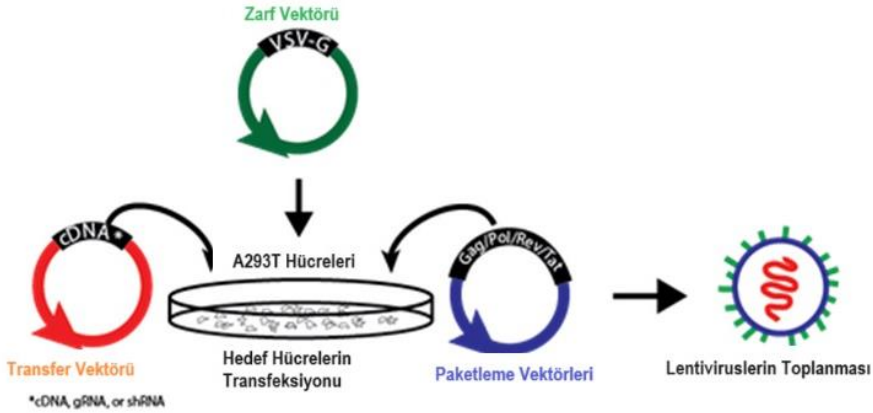
Lentivirüs üretimi için kullanılan üç farklı plazmid türü şunlardır:

**Transfer Plazmidi/Lentiviral Vektör:** Bu plazmid, genetik materyali (cDNA, shRNA) LTR'ler aracılığıyla konakçı genomuna entegre eden bir yapıya sahiptir.

**Zarf Plazmidi:** Bu plazmid, genellikle veziküler stomatit virüsünün (VSV G) G proteinini içerir. Bu protein, virüsün hangi hücre türlerini enfekte edebileceğini belirleyen özgülüğü kontrol eder. Zarf plazmidi, çoğu transfer plazmidi ile uyumlu kullanılabilir.

**Paketleme Plazmidi:** Bu plazmid, HIV-1 çekirdek proteinlerini (ve yardımcı faktörleri) ve minimum düzeyde Gag, Pol ve Rev içerir. Farklı versiyonları bulunur ve bir veya iki plazmit içerebilir (Xiang vd., 2022:126993)

Paketleme süreci için kullanılan HEK293T hücreleri gibi bir hücre hattına, üç plazmid bileşeni transfer edilir. Elde edilen virüs, hedef/konakçı hücreleri enfekte etmek amacıyla toplanır. Genetik materyal, hedef hücreye LTR'ler aracılığıyla entegre edilir, böylece cDNA veya shRNA gibi unsurlar stabil bir şekilde ifade edilebilir (Şekil 3). Lentiviral vektör kullanımının öne çıkan iki güvenlik endişesi şunlardır: Çoğaltma yeteneği olan lentivirüs üretme potansiyeli ve potansiyel onkogenез riski (<https://www.addgene.org/guides/lentivirus>).



Şekil 3: Pseudovirüs üretim şeması (<https://www.addgene.org/>).

## 2.6. Lentiviral vektörlerin kullanımında dikkate alınması gereken güvenlik endişeleri

Üçüncü nesil lentiviral sistemlerin, paketleme vektörü iki ayrı plazmide bölünmüş olmasından dolayı, 2. Nesil sistemlere kıyasla daha güvenli kabul

edildiği bilinmektedir. Ayrıca, 3. Nesil sistemler, viral üretim aşamasında tam boy virüs üretimi için HIV tat proteinini kullanmazlar. Addgene firmasına ait lentiviral transfer vektörlerinin çoğu, kendi kendini inaktive eden (SIN) vektörlerdir. Bu vektörler, bir tur ters transkripsiyondan sonra 5'LTR'ye aktarılan viral genomun 3'LTR'sinde bir delesyona sahiptir. Bu delesyon, bir konak hücreye dahil edildikten sonra tam uzunluktaki virüsün transkripsiyonunu ortadan kaldırır (Xiang vd., 2022:126993).

### 2.7. Lentiviral vektörlerin güvenlik boyutu

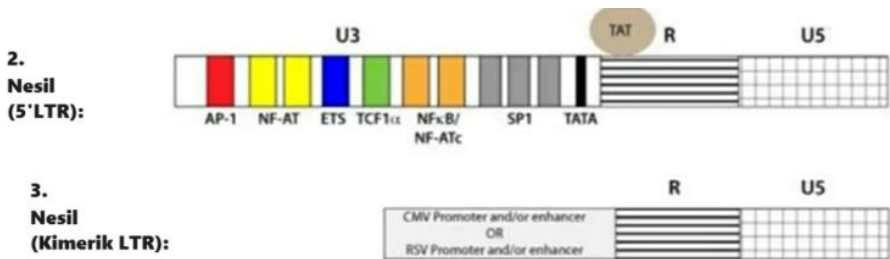
Lentiviral vektörlerin güvenli kullanımını temin etmek adına çeşitli kritik düzenlemeler yapılmıştır:

1. Viral Genomun Ayrılması: Replikasyon bileşenli retrovirüs (RCR) oluşturma riskini en düşük seviyeye indirmek adına, çoklu plazmitlerin kullanımı tercih edilmektedir.

2. HIV Yapısal Geni Tat'a Bağımlılığı Azaltma: Kimerik bir LTR'nin kullanılması, HIV yapısının geni Tat'a olan bağımlılığı azaltarak güvenlik önlemlerine katkıda bulunmuştur.

3. Kendi Kendini Etkinleştirmeyen (SIN) Vektörlerin Geliştirilmesi: Güvenlik açıkları giderilmiş ve istenmeyen etkileşimleri en aza indirmek amacıyla kendi kendini etkinleştirmeyen vektörlerin geliştirilmesiyle sağlanan bir diğer önemli düzenlemedir.

4. Kimerik 5'LTR'lerin Kullanımı: Tat, 5' LTR'de doğrudan U3 bölgesine bağlanarak transkripsiyonu düzenleme görevi görür. Transta Tat geni kaybını telafi etmek için, 3. nesil sistemde U3 bölgesini bir CMV veya RSV promotörü ile değiştiren kimerik bir 5' LTR oluşturulmuştur (Şekil 4). Bu düzenleme, lentiviral vektörlerin daha güvenli ve kontrollü bir şekilde kullanılmasını sağlar (Millet vd., 2019:1).



Şekil 4: Üçüncü nesil lentivirüslerde kimerik 5' LTR'lerin kullanımı (<https://www.addgene.org/>).

5. Kendiliğinden İnaktive Olan (SIN) Plazmidlerin Kullanımı: Kısaltılmış 3' LTR (SIN) bölgesi içeren plazmidler özel olarak dizayn edilir. SIN plazmitleri, 3' LTR'nin U3 bölgesinde büyük bir delesyon içerir. Bu delesyon, ters transkripsiyon işlemi sırasında 5' LTR'yi çoğaltır ve 5' LTR'yi tam uzunlukta viral genomik RNA'nın transkripsiyonunu teşvik edemez hale getirir, böylece virüs replikasyonunu etkisizleştirir (Maetzig vd., 2011:677). Lentiviral plazmitler, geniş bir hücre yelpazesinde gen ekspresyonu ve susturma için kullanılabilir. HIV-1 ile ilgili güvenlik endişelerini gidermek amacıyla lentiviral plazmitlerin genetik özellikleri değiştirilmiştir. İkinci ve üçüncü nesil lentiviral plazmitler, belirgin dizi farklılıklarına ve plazmit bileşenlerine sahiptir. Lentiviral teknolojilerdeki ilerlemeler, birçok alanda ilerlemeleri kolaylaştırmaya devam etmektedir.

### **3. Pseudovirüs üretiminde tercih edilen paketleme sistemleri**

#### **3.1. İnsan immün yetmezlik virüsü (HIV-1) temelli lentiviral paketleme sistemi**

HIV-1 lentiviral paketleme sistemi, şu anda SARS-CoV-2 pseudoviral paketleme sistemleri arasında en yaygın kullanılan yöntemdir. Genel olarak, pseudovirüsleri üretmek için hücrelere iki veya üç plazmid birlikte transfekte edilmiştir. İki plazmitli paketleme sistemi, şu anda SARS-CoV-2 pseudoviral paketleme sistemleri içinde en geniş kullanılan yöntemdir. Bu sistem, SARS-CoV-2-S proteinini ifade etmek üzere bir plazmit ile paketleme proteinlerini ve sinyallerini ifade etmek üzere başka bir HIV-1 omurga plazmitini içermektedir. İki plazmidin yanı sıra, bu yaklaşımda pNL4-3-kfs18, pNL4-3 ve Luc RE gibi birkaç HIV-1 lentiviral omurga plazmiti de kullanılmıştır (Yang vd., 2021:1347).

HIV-1 üçlü plazmit paketleme sistemi genellikle bir paketleme plazmiti, raportör geni içeren bir transfer plazmiti ve bir SARS-CoV-2 S proteini eksprese eden plazmitten oluşmaktadır. Bu sistemde, paketleme plazmidini Gag ve Pol proteinlerini ifade ederken, transfer plazmidini HIV-1 ters transkripsiyon, entegrasyon ve paketleme için gerekli cis-düzenleyici elemanları içerir. Ayrıca, çoklu klonlama bölgeleri ve heterojen bir promotör kontrolü altında bir raportör geni içermektedir (Huang vd., 2020:497). SARS-CoV-2 S protein ekspresyon plazmidini, bir sitomegalovirüs (CMV) promotörü tarafından indüklenen bir vektör kullanılarak yapılmaktadır. Çeşitli bağımsız araştırma grupları, pNL4-3LuRE ve SARS-CoV-2 S proteinini içeren plazmitin birlikte transfeksiyonunun SARS-CoV-2 pseudovirüsü üretebileceğini bildirmiştir (Yang vd., 2021:1347, Wang vd., 2020:894). SARS-CoV-2 pseudovirüsleri üretimi için, bir SARS-CoV-2 S proteinini ifade eden plazmit, psPAX2 ve



pLenti-GFP'yi HEK 293T hücrelerine birlikte transfekte etmek genellikle tercih edilen bir yöntemdir.

### **3.2. Murin lösemi virüsü (MLV) tabanlı paketleme sistemi**

MLV'ler, genellikle basit retrovirüsler olarak tanımlanırlar ve zarflıdırlar. Viral kapsid proteinlerini, viral enzimleri ve zarf proteinlerini kodlayan üç geni (gag, pol ve env) taşıyan pozitif iplikli RNA içerirler (Johnson vd., 2020:1). Veziküler stomatit virüsü (VSV), MLV'nin paketlenildiği hücreleri enfekte etmek için kullanıldığı bir çalışma tarafından gösterilmiştir. Zheng vd. (2021:259) son zamanlarda, SARS-CoV-2 pseudovirion partikülleri oluşturmak için üç plazmit içeren MLV paketleme sistemini HEK 293T hücrelerine birlikte transfekte etmiştir. Bu plazmitler şunlardır: İlk plazmit (SV-Psi--Env--MLV): Paketleme yapısını içerir. İkinci plazmit (L-LUC-SN): Minimal bir retroviral transfer vektörüdür ve lusiferaz raportör genini kodlar. Üçüncü plazmit: SARS-CoV-2 S proteinini kodlayan bir ekspresyon plazmididir.

### **3.3. VSV paketleme sistemi**

VSV, negatif zincirli bir RNA virüsü olup tek tip bir zarf glikoproteinine (G) sahiptir. Nie ve ekibi, SARS-CoV-2'nin tam uzunluktaki spike proteinini içeren pseudo tipte bir VSV'den oluşan, SARS-CoV-2 için bir pseudo virüs nötralizasyon tahlili başarıyla oluşturmuştur (Nie vd., 2020:680). Özellikle, VSV paketleme sistemi kullanılarak SARS-CoV-2 pseudo virüsü hazırlanırken, pseudo virüsle karıştırılan kalıntı VSV virüsü olabilir, bu da yanlış pozitif sonuçlara neden olabilir. Bu nedenle, VSV miktarının mümkünse en aza indirilmesi tercih edilir. Ancak, fazla VSV'nin pseudovirüs bazlı bir tahlile müdahale ettiği düşünülüyorsa, pseudovirüs preparasyonu bir VSV nötralize edici antikor ile tedavi edilebilir (Hoffman vd., 2020:271).

### **3.4. Diğer paketleme sistemleri**

Araştırmacılar, önceki bahsedilen SARS-CoV-2 pseudovirüs paketleme sistemlerine ek olarak farklı yöntemlerle de SARS-CoV-2 pseudovirüsleri üretmişlerdir. Yan ve ekibi, bir faj vektörü kullanarak SARS-CoV-2 pseudovirüsü üretmiştir. Özellikle, N, E, ORF1ab ve SARS-CoV-2 genlerini eklemek için MS2 vektörü kullanılmıştır (Yang vd., 2021:1347). MS2 tabanlı zırlı L-RNA teknolojisi, 500 bp'lik RNA'nın verimli bir şekilde paketlenmesine izin verirken, 1,5 kb'lik RNA'nın paketlenmesi iyi çalışmamaktadır. MS2'nin paketleme kapasitesi lentivirüsler kadar etkili olmasa da, araştırmacılar bu sınırlamayı aşmak için N, E ve ORF1ab geninin dokuz parçasını ayrı MS2 vektörlerine yerleştirmiş ve farklı MS2-tabanlı pseudovirüsleri bir araya getirerek kalite kontrol materyalleri oluşturmuşlardır.

Ayrıca, SARS-CoV-2 Spike proteinini ifade etmek için NS1 ile silinmiş bir influenza A virüsü vektörü kullanılmıştır ve bu influenza virüsü temelli pseudovirüs, şu anda bir klinik denemede aday aşı olarak test edilmektedir. Adenovirüs vektörü de SARS-CoV-2 S proteinini ifade etmek için kullanılmış ve SARS-CoV-2'ye karşı aday aşı olarak değerlendirilmiştir (Zhu vd., 2020:727; Van vd., 2020:1).

#### ***4. Pseudovirüslerin nötralizasyon antikör testlerinde kullanılması***

Pseudovirüsler, laboratuvar ortamında virüslerle konakçı hücreler arasındaki etkileşimi incelemek için yaygın olarak kullanılır. Bu tür çalışmalar, viral enfeksiyon ve biyolojik dağılım mekanizmalarını anlamak için in vivo araştırmalarda da önemli bir rol oynamıştır. Analiz kolaylığı sağlamak amacıyla genellikle pseudovirüslere raportör genler eklenmiştir. Bu genler genellikle lusiferaz ve flüoresan proteinleri içerir ve her bir seçenek avantajlar ve dezavantajlar sunar. Örneğin, biyoluminesans deneyleri düşük arka plan gürültüsü ve daha yüksek hassasiyet sağlar, ancak maliyetlidir. Diğer yandan, floresan protein kullanan tahliller daha ucuz ve kullanımı daha kolaydır; ancak daha yüksek arka plan sorunlarına ve düşük duyarlılığa sahiptir (Chang vd., 2006:59; Nie vd., 2020:680).

Günümüzde, spike içeren SARS-CoV-2 pseudovirüsü, en yaygın olarak kullanılan pseudoviral sistemdir. SARS-CoV-2'nin konak hücre yüzey reseptörü olarak ACE2'yi kullandığı ve S proteini ile ACE2 etkileşiminin virüsün hedef hücrelere girişini aracılık ettiği birçok çalışma tarafından doğrulanmıştır (Zhou vd., 2020:1; Walls vd., 2020:281). Antikor nötralizasyon deneyleri genellikle S protein temelli SARS-CoV-2 pseudovirüsleri üzerinde yoğunlaşmıştır. Bu tahliller, geleneksel yöntemlere kıyasla daha yüksek verimlilik ve daha az numune serumu gerektirme avantajına sahiptir (Schmidt vd., 2020:1). Nie ve ekibi, biyogüvenlik düzeyi 2 olan laboratuvarlarda SARS-CoV-2'ye karşı nötralize edici antikörleri değerlendirmek için VSV pseudovirüs üretim sistemi kullanmıştır (Nie vd., 2020:680). Crawford ve arkadaşları, lusiferaz tabanlı bir tahlilde pseudo tipte lentiviral partiküller kullanarak insan serumu veya plazmasının SARS-CoV-2'ye karşı nötralize edici aktivitesini ölçmüşler ve bu yöntemin değerli bir tamamlayıcı olduğunu belirtmişlerdir (Crawford vd., 2020:513).

#### **SONUÇ**

Pseudovirüslerin biyolojik araştırmalarda güvenli kullanımı önemli bir gelişmedir. Pseudovirüslerle biyogüvenlik seviyesi 2 laboratuvarlarında rahatlıkla çalışılmaktadır. Günümüzde biyolojik araştırmalarda, özellikle

SARS-CoV-2 gibi patojenlerle çalışmada pseudovirüslerin kullanımı önemli bir yer tutmaktadır. Pseudovirüslerin güvenli kullanımı, biyolojik araştırmalarda ilerleme kaydetmek ve hastalıklara karşı etkili tedaviler geliştirmek adına kritik bir unsurdur.

Lentivirüs tabanlı pseudovirüsler, nötralizasyon antikor testlerinde etkili bir şekilde kullanılabilir önemli araçlardan biridir. Lentivirüslerden türetilen pseudovirüsler, nötralizasyon antikor testlerinde kullanılmak üzere başarıyla üretilmektedir. Bu süreç, yüksek düzeyde infektivite ve antikor tepkilerinin güvenilir bir şekilde değerlendirilebilmesi için gerekli olan özel özellikleri sağlamaktadır. Üretilen lentivirüs tabanlı pseudovirüsler, hücre zarına entegrasyon kapasitesi ve geniş hücresel tropizma aralığı ile karakterizedir. Bu özellikler, antikor testlerinde geniş bir hücresel hedef yelpazesi içinde kullanılabilirliğine olanak tanır. Ayrıca, bu pseudovirüsler, doğal virüslerin patojenitesini simüle ederek, antikorların gerçek bir enfeksiyon durumundaki tepkilerini daha etkili bir şekilde yansıtabilir. Güvenlik endişeleri, lentiviral vektör kullanımının önde gelen konularından biridir. Ancak, üçüncü nesil lentiviral sistemler, özellikle kendi kendini inaktive eden (SIN) vektörlerin geliştirilmesiyle birlikte, daha güvenli kabul edilmektedir. Bu SIN vektörler, potansiyel onkogeneze riskini azaltarak ve virüs replikasyonunu etkisizleştirerek güvenlik açıklarını gidermeyi amaçlar.

Pseudovirüsler, laboratuvar ortamında virüslerle konakçı hücreler arasındaki etkileşimi incelemek ve nötralizasyon antikor testleri için kullanılmaktadır. Özellikle, SARS-CoV-2'nin spike proteinini içeren pseudovirüsler, nötralizasyon deneylerinde yaygın olarak tercih edilmektedir. Bu tahliller, yüksek verimlilik, düşük maliyet ve daha az numune serumu gereksinimi gibi avantajlara sahiptir. Pseudovirüsler, viral enfeksiyon ve biyolojik mekanizmaların anlaşılmasına katkıda bulunmak için değerli araçlar olarak kabul edilmektedir.

Sonuç olarak, lentiviral vektör bileşenlerinin in vitro üretimi, gen terapisi, virüs araştırmaları ve antikor nötralizasyon testleri gibi alanlarda önemli bir teknoloji olarak devam etmektedir. Güvenlik, verimlilik ve özelleştirilebilirlik açısından sürekli olarak geliştirilen bu sistemler, ilerleyen çalışmalarda önemli bir rol oynayacaktır.

## REFERANSLAR

- Adamson, C. S., Jones, I. M. (2004). The molecular basis of HIV capsid assembly—five years of progress. *Reviews in medical virology*, 14(2), 107-121.
- Amirache, F., Lévy, C., Costa, C., Mangeot, P. E., Torbett, B. E., Wang, C. X., Verhoeyen, E. (2014). Mystery solved: VSV-G-LVs do not allow efficient gene transfer into unstimulated T cells, B cells, and HSCs because they lack the LDL receptor. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 123(9), 1422-1424.
- Chang, C. K., Sue, S. C., Yu, T. H., Hsieh, C. M., Tsai, C. K., Chiang, Y. C., Huang, T. H. (2006). Modular organization of SARS coronavirus nucleocapsid protein. *Journal of biomedical science*, 13(1), 59-72.
- Chen, M., Zhang, X. E. (2021). Construction and applications of SARS-CoV-2 pseudoviruses: a mini review. *International Journal of Biological Sciences*, 17(6), 1574–1580. <https://doi.org/10.7150/ijbs.59184>
- Coffin, J. M., Hughes, S. H., Varmus, H. E. (1997). *Retroviruses*. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1997.
- Crawford, K. H., Eguia, R., Dingens, A. S., Loes, A. N., Malone, K. D., Wolf, C. R., Bloom, J. D. (2020). Protocol and reagents for pseudotyping lentiviral particles with SARS-CoV-2 spike protein for neutralization assays. *Viruses*, 12(5), 513-530.
- Cronin, J., Zhang, X. Y., Reiser, J. (2005). Altering the Tropism of Lentiviral Vectors through Pseudotyping. *Current Gene Therapy*, 5(4), 387–398. <https://doi.org/10.2174/1566523054546224>.
- Dufait, I., Liechtenstein, T., Lanna, A., Bricogne, C., Laranga, R., Padella, A., Breckpot, K., , Escors, D. (2012). Retroviral and Lentiviral Vectors for the Induction of Immunological Tolerance. *Scientifica*, 2012, 1–14. <https://doi.org/10.6064/2012/694137>
- Dull, T., Zufferey, R., Kelly, M., Mandel, R. J., Nguyen, M., Trono, D., Naldini, L. (1998). A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *Journal of virology*, 72(11), 8463-8471.
- Hoffmann, M., Kleine-Weber, H., Schroeder, S., Krüger, N., Herrler, T., Erichsen, S., Pöhlmann, S. (2020). SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. *cell*, 181(2), 271-280.
- Huang, C., Wang, Y., Li, X., Ren, L., Zhao, J., Hu, Y., Cao, B. (2020). Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *The lancet*, 395(10223), 497-506.

- Howarth, J. L., Lee, Y. B., Uney, J. B. (2009). Using viral vectors as gene transfer tools (Cell Biology and Toxicology Special Issue: ETCS-UK 1 day meeting on genetic manipulation of cells). *Cell Biology and Toxicology*, 26(1), 1–20. <https://doi.org/10.1007/s10565-009-9139-5>.
- Johnson, M. C., Lyddon, T. D., Suarez, R., Salcedo, B., LePique, M., Graham, M., Ritter, D. G. (2020). Optimized pseudotyping conditions for the SARS-CoV-2 spike glycoprotein. *Journal of virology*, 94(21), e01062-20.
- Katz, R. A., Skalka, A. M. (1994). The retroviral enzymes. *Annu Rev Biochem.*, 63(1), 133-173.
- Li, Q., Liu, Q., Huang, W., Li, X., , Wang, Y. (2018). Current status on the development of pseudoviruses for enveloped viruses. *Reviews in medical virology*, 28(1), e1963.
- Maetzig, T., Galla, M., Baum, C., Schambach, A. (2011). Gammaretroviral Vectors: Biology, Technology and Application. *Viruses*, 3(6), 677–713. <https://doi.org/10.3390/v3060677>
- Millet, J. K., Tang, T., Nathan, L., Jaimes, J. A., Hsu, H. L., Daniel, S., Whittaker, G. R. (2019). Production of Pseudotyped Particles to Study Highly Pathogenic Coronaviruses in a Biosafety Level 2 Setting. *Journal of Visualized Experiments*, 145. <https://doi.org/10.3791/59010>
- Nie, J., Wu, X., Ma, J., Cao, S., Huang, W., Liu, Q., Wang, Y. (2017). Development of in vitro and in vivo rabies virus neutralization assays based on a high-titer pseudovirus system. *Scientific reports*, 7(1), 1-12.
- Nie, J., Li, Q., Wu, J., Zhao, C., Hao, H., Liu, H., Wang, Y. (2020). Establishment and validation of a pseudovirus neutralization assay for SARS-CoV-2. *Emerging microbes , infections*, 9(1), 680-686.
- Ory, D. S., Neugeboren, B. A., Mulligan, R. C. (1996). A stable human-derived packaging cell line for production of high titer retrovirus/vesicular stomatitis virus G pseudotypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(21), 11400-11406.
- Pluta, K., Kacprzak, M. (2009). Use of HIV as a gene transfer vector. *Acta Biochimica Polonica*, 56(4), 531-595.
- Schmidt, F., Weisblum, Y., Muecksch, F., Hoffmann, H. H., Michailidis, E., Lorenzi, J. C. C., Mendoza, P., Rutkowska, M., Bednarski, E., Gaebler, C., Agudelo, M., Cho, A., Wang, Z., Gazumyan, A., Cipolla, M., Caskey, M., Robbiani, D. F., Nussenzweig, M. C., Rice, C. M., Hatziioannou, T., Bieniasz, P. D. (2020). Measuring SARS-CoV-2 neutralizing antibody activity using pseudotyped and chimeric viruses. *The Journal of experimental medicine*, 217(11), e20201181. <https://doi.org/10.1084/jem.20201181>.

- Tareen, S. U., Nicolai, C. J., Campbell, D. J., Flynn, P. A., Slough, M. M., Vin, C. D., Kelley-Clarke, B., Odegard, J. M., , Robbins, S. H. (2013). A Rev-Independent gag/pol Eliminates Detectable psi-gag Recombination in Lentiviral Vectors. *BioResearch Open Access*, 2(6), 421–430. <https://doi.org/10.1089/biores.2013.0037>
- Vannucci, L., Lai, M., Chiuppesi, F., Ceccherini-Nelli, L., , Pistello, M. (2013). Viral vectors: a look back and ahead on gene transfer technology. *New Microbiol*, 36(1), 1-22.
- Van Boheemen, S., De Graaf, M., Lauber, C., Bestebroer, T.M., Raj, V.S., Zaki, A.M., , Fouchier, R.A. (2012). Genomic characterization of a newly discovered coronavirus associated with acute respiratory distress syndrome in humans. *MBio* 2012;3. pii:e00473-12.
- Walls, A. C., Park, Y. J., Tortorici, M. A., Wall, A., McGuire, A. T., , Veessler, D. (2020). Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Cell*, 181(2), 281-292.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.058>.
- Wang, Q., Zhang, Y., Wu, L., Niu, S., Song, C., Zhang, Z., , Qi, J. (2020). Structural and functional basis of SARS-CoV-2 entry by using human ACE2. *Cell*, 181(4), 894-904.
- Welch, S. R., Guerrero, L. W., Chakrabarti, A. K., McMullan, L. K., Flint, M., Bluemling, G. R., ... , Albariño, C. G. (2016). Lassa and Ebola virus inhibitors identified using minigenome and recombinant virus reporter systems. *Antiviral Research*, 136, 9-18.
- Xiang, Q., Li, L., Wu, J., Tian, M., Fu, Y. (2022). Application of pseudovirus system in the development of vaccine, antiviral-drugs, and neutralizing antibodies. *Microbiological Research*, 258, 126993. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2022.126993>.
- Yang, L., Pei, R. J., Li, H., Ma, X. N., Zhou, Y., Zhu, F. H., Zuo, J. P. (2021). Identification of SARS-CoV-2 entry inhibitors among already approved drugs. *Acta Pharmacologica Sinica*, 42(8), 1347-1353.
- Zheng, Y. Y., Ma, Y. T., Zhang, J. Y., , Xie, X. (2020). COVID-19 and the cardiovascular system. *Nature reviews cardiology*, 17(5), 259-260.
- Zhou, P., Yang, X. L., Wang, X. G., Hu, B., Zhang, L., Zhang, W., Shi, Z. L. (2020). Discovery of a novel coronavirus associated with the recent pneumonia outbreak in humans and its potential bat origin. *BioRxiv*, 2020-01.
- Zhu, N., Zhang, D., Wang, W., Li, X., Yang, B., Song, J., ... , Tan, W. (2020). A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *New England journal of medicine*.