TÜRKİYE CUMHURİYETİ'NİN YÜZÜNCÜ YILI

Moleküler Biyoloji ve Genetik Alanında Güncel Yaklaşımlar

Editör
Meryem Şenay Şengül Demirak

BİDGE

BİDGE Yayınları

Moleküler Biyoloji ve Genetik Alanında Güncel Yaklaşımlar

Editör: Doç. Dr. Meryem Şenay ŞENGÜL DEMİRAK

ISBN: 978-625-372-455-9

1. Baskı
Sayfa Düzeni: Gözde YÜCEL
Yayınlama Tarihi: 25.12.2024
BİDGE Yayınları

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

Sertifika No: 71374
Yayın hakları © BİDGE Yayınları
www.bidgeyayinlari.com.tr - bidgeyayinlari@gmail.com
Krc Bilişim Ticaret ve Organizasyon Ltd. Şti.
Güzeltepe Mahallesi Abidin Daver Sokak Sefer Apartmanı No: 7/9 Çankaya / Ankara

İçindekiler

Nanoteknolojinin Kozmetikteki Güncel Yeri 5
Berçem Dilan ÖZTANRIKULU 5
Hakan AŞKIN 5
Jel Filtrasyon Kromatografisi ile Proteinlerin Molekül Kütlelerinin Tayini 34
Mehmet ÇİFTCİ 34
Abiyotik Stres Faktörlerine Karşı Bitki Kurtarıcısı Nanopartiküller 46
Mustafa AKÇAY 46
mTOR Sinyal Yolağı ve Biyolojik Önemi 87
Deniz MIHÇIOĞLU 87
Türkan GÜRER 87
Mikrobiyal Polisakkaritler: Sentezi, Üretimi Ve Biyoteknolojik Uygulamaları 113
Şeyda ALBAYRAK 113
Tuğba NAFIZOĞLU 113
Nurdan GÖNÜL BALTACI 113
İzotermal Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Pcr) Analizleri 137
Ayşe Nur PEKTAŞ 137
Binnur BAĞCI 137
Adipokinlerin Obezite İle İlişkili İnflamatuar Mekanizmalar Üzerindeki Etkileri 173
Binnur BAĞCI 173
Ayşe Nur PEKTAŞ 173

Kuantum Noktaların Fizikokimyasal Özellikleri ve Toksik Etkileri 208
Emel CANPOLAT 208
Domatesin Genetik Kararlılığına Ağır Metal Etkisi 238
Hüseyin BULUT 238
Likenleşmiş Mantarlarda (Likenlerde) DNA Barkodlama 250
Merve YİĞİT 250
Ekrem BÖLÜKBAŞI 250
Mehmet Gökhan HALICI 250
DNA Barkodlama Yöntemi ile Sivrisineklerde Tür Teşhisi 292
Nurhayat OĞLAKÇI 292
Meryem Şenay ŞENGÜL DEMİRAK 292
Endüstriyel Enzimlerde Enzim Mühendisliği ve Makine Öğrenmesi Uygulamaları 315
Havva Esra TÜTÜNCÜ 315
Akciğer Kanserlerinde Yeni Nesil Dizileme 335
Neslihan KAYA TERZİ 335

BÖLÜM I

Nanoteknolojinin Kozmetikteki Güncel Yeri

Berçem Dilan ÖZTANRIKULU[1]
Hakan AŞKIN[2]

Giriş

Nanopartiküllerin boyutları 1 ila 100 nm arasında değişmekle birlikte (Cornier, Keck & Van de Voorde, 2019) kozmetikte kullanılan nano boyutlu partiküller genellikle 50 ila 5000 nm arasında değişen partikül boyutuna sahiptir (Meinke & ark., 2018). Doğaçlama farmakodinamik ve farmakokinetik özellikler, ilaç, biyotıp, kimya, tarım ve kozmetik vb. sektörleri kapsayan çeşitli sektörlerde nanoteknolojik ilkelerin kullanılmasına yönelik yolların

[1] Berçem Dilan ÖZTANRIKULU- Öğretim Görevlisi, Ardahan Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Tıbbi Laboratuvar Teknikleri Programı, Ardahan, Türkiye, ORCID ID: 0000-0003-4146-2052, bercemdilanhanoglu@ardahan.edu.tr
[2] Hakan AŞKIN- Profesör Doktor, Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Erzurum, Türkiye, ORCID ID: 0000-0003-3248-759X, hakanbiyolog@gmail.com

açılmasına yardımcı olur. Nanoteknoloji ile kozmetiklerin bir araya gelme ihtimalinin düşünülmesi, kozmetik sektöründe daha önce görülmemiş bir gelişme ve ilerlemeye yol açmıştır. ''Kozmetik'' terimi, ABD Kozmetik Kimyagerleri Derneği'nin kurucularından Bay Raymond Reed tarafından 1961 yılında ortaya konmuştur. Daha sonra FDA, kozmetikleri "temizleme, çekiciliği teşvik etmek veya görünümü değiştirmek, güzelleştirme maksadıyla insan vücuduna veya herhangi bir bölümüne uygulanması amaçlanan ürünler" olarak tasvir etmiştir (Dhawan, Sharma & Nanda, 2020a).

Gün geçtikçe nanoteknoloji temelli kozmetikler kavramsallaştırılmış ve başarıyla geliştirilmiştir. Bu gelişim, halihazırda piyasada bulunan, kozmetik maddenin nanoboyutlu formu olan veya uygun bir nanotaşıyıcı dağıtım sistemi yoluyla teslim edilen çok sayıda nanokozmetik ürünle sonuçlanmıştır. Bu avantajlarının yanı sıra nanokozmetiklerin nanopartiküllerin kısıtlayıcı yanlarından kaynaklı, hala çözülmeyi bekleyen bazı dezavantajları da mevcuttur. Literatür ve çalışmalar, günümüz teknolojisinin son ürünlerinden olan nanopartiküllerin bu kısıtlı yanlarını geliştirmeye ve problemleri çözmeye odaklanmış durumdadır.

1. Nanoteknoloji

Nanoteknoloji, maddelerin atomik ve moleküler ölçekte incelenmesine olanak tanıyan bilim alanıdır. Nanoteknoloji, metrenin milyarda biri (10^{-9}) büyüklüğüne karşılık gelen nanometre ölçeğindeki yapılar ve nesneleri kapsar (Munhoz & ark., 2017). Grip virüsünün çapı 100 nm, insan saçının kalınlığı yaklaşık 100 µm yani 100000 nm 'dir. Dahası, iki karbonlu bir organik molekül 0,15 nm iken bir bakteri 10 µm boyutundadır. Bu nedenle nanoteknolojide

kullanılan boyutları tasavvur edebiliriz (Mohd-Setapar & ark., 2022).

Nanoteknoloji, tüm dünyada insanların ilgisini çekmiştir. Birçok sektörde, maddeyi nano boyutta değiştirme veya etkileme yeteneği, toplum için birçok oyunun kuralını değiştirecek bir beklenti vaat etmektedir. Nanoteknoloji, hiçbir şeyin daha küçük üretilemeyeceği kadar küçük malzemelerin ve aletlerin manipüle edilmesini ve kullanılmasını içerir (Cardoza & ark., 2022). Nanoteknoloji ve nano dağıtım sistemleri, malzemelerin, cihazların ve sistemlerin nanoölçek düzeyinde (1-100 nm) tasarımını, karakterizasyonunu, üretimini ve uygulamasını kapsayan yenilikçi bilim alanlarıdır (Raj & ark., 2012; Kaul & ark., 2018). 1974 yılında Tokyo Üniversitesi'nden Profesör Norio Taniguchi, "Nanoteknoloji" terimini, malzemeyi molekül moleküle veya atom atoma deforme etme, birleştirme ve ayırma yöntemi olarak tanımlamış ve sonunda maddenin benzersiz nano ölçekli özelliklere sahip olduğu keşfedilmiştir (Effiong & ark., 2020).

1.1. Kozmetikte Nanoteknoloji

Nanokozmetikler cilt, saç, tırnak ve ağız bakımı ile ilgili olarak sağlıklı bir cilt, artan gençleşme, kollajen yapının güçlendirilmesi ve diğer gerekli peptitlerin onarılması ile ilgili geniş bir uygulama yelpazesi sunar. Ek olarak, cildi besleme-nemlendirmenin yanı sıra yaşlanma karşıtı/kırışıklık önleyici etki sağlar, hiperpigmentasyonu, yaşlanmayı, temizlemeyi ve diğer birçok kozmetik kaygıyı tedavi eder. Benzer şekilde saç bakım ürünleri de saçın onarılması, yumuşatılmasıyla vb. ilgilidir. Dudak bakımı daha çok estetik bir görünüm sağlamak, dudakların çatlamasını önlemek ve ruj, dudak parlatıcısı ve dudak dolgunlaştırıcılar vb. aracılığıyla koruyucu bir

tabaka oluşturmakla ilgilidir. Ağız ve tırnak bakımı,dişleri ve tırnakları mikrobiyal etkenlerden korumaya, güçlendirmeye ve diğer sorunlara odaklanır.

Nanomalzemelerin kozmetik uygulamalar için tercih edilen taşıyıcılar haline gelmesindeki en büyük etken bu yapıların fizikokimyasal özellikleridir. Bu özellikler ve sundukları avantajların başında cilde uygulandıklarında hedeflenen etkiye, yüksek tutulma süresine, daha derin penetrasyona sahip olma, daha dayanıklı olma vb. gelmektedir (Dubey & ark., 2022).

Kozmetikte nanoteknoloji, yeni kozmetiklerin araştırılması, geliştirilmesi ve tasarlanmasında nano özellikli çözümler bulmaya çalışmaktadır. Nanoteknoloji dili ve kavramları yalnızca birkaç on yıl önce popüler hale gelmiş olsa da (Cardoza & ark., 2022), yüzyıllar öncesinden beri nanomateryaller kozmetik üretiminde kullanılmaktadır. Kadınlar tırnak renkleri olarak gümüş ve altın nanopartikülleri kullanmışlardır. Altın-gümüş nanopartikülleri içeren yaşlanma karşıtı ürünler de Orta Çağ'da kullanılmaktaydı (Dini & Mancusi, 2023). MÖ 4000 döneminde Romalılar, Yunanlılar ve Mısırlılar, saçlar için nanomalzeme bazlı renk preparatları fikri de dahil olmak üzere nanoparçacık bazlı teknolojinin kullanımını ilan etmişlerdi (Nasrollahzadeh & ark., 2019). Ancak son yıllarda kozmetik üretiminde nano ölçekli malzemelerin kullanımında önemli bir artış yaşanmaktadır.1959 yılından sonra nanoteknolojinin sağlık bakımı ve dermatojik formülasyonları içeren kozmetik alanında uygulanması yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır (Clunan & ark., 2014). 1980'lerin başlarında ise, nanomateryallerin güzellik ürünlerinde gelecek vaat

eden uygulamalarının araştırılmasıyla ilgili makaleler ortaya çıkmaya başlamıştır (Cardoza & ark., 2022).

Nanobilim, kozmetik sektöründe yaklaşık 40 senedir kullanılmaktadır (Bangale & ark., 2012). Nanoteknoloji, ileri tedavi ve kozmetik ürünleri için bilime dayalı alternatifler üretmek, yaşlanma karşıtı zorlukları çözmek ve refahı artırmak için bir platform olarak gerçekten önemlidir. Ayrıca, nanoteknolojinin kozmetikteki rolüne ilişkin, 2010'dan 2022'ye kadar literatürden elde edilen verilerden oluşan sayısız yayınlanmış makale bulunmaktadır (Mohd-Setapar & ark., 2022).

Malzemelerin özellikleri nano ölçekte değişir. Nanoteknoloji büyük bir etkiye sahiptir ve kozmetik, iletişim, tıp, ulaşım, tarım, enerji, imalat ve tüketim malları dahil olmak üzere çeşitli endüstrilerde oyunun kurallarını değiştiren ve faydalı bir teknolojidir. Nanoparçacıkların özel yapıları ve sundukları avantajlar, onları kozmetik de dahil olmak üzere çeşitli sektörler ve amaçlar için ilgi çekici hale getirmektedir. Kozmetik, kişisel bakım sektörünün en çok talep gören ve en hızlı büyüyen parçasıdır ve nanoteknolojinin kozmesötiklerdeki kullanımı ürün çeşitliliği gibi avantajlar sunmaktadır. Saç bakım ürünleri, nemlendiriciler, güneş koruyucular, makyaj ürünleri vb. nanoteknolojinin kapsadığı kozmetik ürün gruplarından sadece birkaçıdır (Cardoza & ark., 2022).

Normal bir yetişkin her gün 9 kozmetik ürünü kullanmaktadır. Hiç şüphe yok ki, kozmetikler dünya çapında en sık kullanılan ürünlerdir. Kozmetik, kişinin fiziksel görünümünü iyileştirmeyi veya değiştirmeyi amaçlayan, vücuda, özellikle de cilde, saça veya

tırnaklara uygulanan güzelliği artırıcı ürün veya maddeleri ifade eder. Bu ürünler temizleme, nemlendirme, güzelliği artırma, vücudun dış özelliklerini koruma gibi çeşitli amaçlara hizmet etmektedir (Salvioni & ark., 2021). Kozmetik alanı, makyaj, cilt bakım kremleri, losyonlar, parfümler, saç bakım ürünleri ve ojeler gibi çok çeşitli ürünleri içerir. Bu ürünlerin kullanım amacı estetik çekiciliği artırmak, kişisel bakım uygulamalarını teşvik etmek ve genel bakım ve kişisel hijyen standartlarını yükseltmektir. Bazı kozmetik ürünler, biyolojik etkiye sahip maddeler, hafif tedavi edici etki veya cilt üzerinde ilaçlarınkine benzer avantajlar içerebildiğinden "kozmesötik" ürünler olarak anılır (Badhe & ark., 2023). Kozmesötikler, geleneksel olarak kullanılan kozmetiklerle yüzeye uygulandığında spesifik olarak iyileştirici etkilere sahip olan, terapötik açıdan aktif bileşenler içeren preparatlar olarak tanımlanabilir. Bu ürünler cilt ve saç üzerinde ölçülebilir onarıcı etkilere sahiptir ve hasarlı saçlar, kırışıklıklar, fotoyaşlanma, cilt kuruluğu, hafif lekeler, hiperpigmentasyon vb. gibi farklı durumların tedavisinde kullanılır. Güzellik bakım ürünleri ile ilaçlar arasında köprü görevi görerek görünümde iyileşme vaadi sunarlar (URL-1; Fatima & ark., 2021). Kozmesötikler, günümüzde kişisel bakım alanının en hızlı büyüyen kısımlarından biri olmakla birlikte bireysel tercihe yönelik pazar da büyük oranda genişlemektedir (Kaul & ark., 2018).

Nanokozmesötikler, nano ölçekli bileşenler kullanılarak üretilen kozmetiklerdir (Badhe & ark., 2023). Nanokozmesötik araştırma, oldukça güncel ve çok hızlı gelişen girişimlerdendir. Malzemelerin nanoteknolojiyi kullanarak atom boyutunda güncellenmesi, kozmetik için büyük bir potansiyele sahiptir ve bu

sektör için yeni yollar açmaktadır. Kozmetik/kozmesötik ürünlerin araştırılması ve geliştirilmesinde çeşitli nanomateryallerin buluşturulması sırasıyla nanokozmetik/nanokozmesötiklerin ortaya çıkmasını sağlar. Etki süresinin uzaması, biyoyararlılığın artması ve ürünlerin estetik çekiciliğinin artması, nanoteknoloji bazlı kozmetiklerle ilgili avantajlardan birkaçıdır. Bu ürünler, geleneksel olarak kullanılan kozmesötiklere kıyasla, küçük boyut ve büyük yüzey-hacim oranı gibi birçok avantaj sunar ve bu da onları kozmesötiklerde etkili adjuvanlar haline getirir. Ayrıca nanoparçacıkların kozmetik formülasyonlara eklenmesi kozmesötiklerin özelliklerini değiştirmezken cilde yapışmalarını, görünümlerini, kaplamalarını geliştirir. Kozmetik üreticileri, UV korumasını, cilde nüfuzunu, rengini, koku salınımını, son kat kalitesini, yaşlanma karşıtı etkiyi ve çeşitli diğer özellikleri geliştirmek için nano boyutlu bileşenler kullanmaktadırlar. Bu yapılar, aktif bileşenlerin dağıtımını kontrol ederek, bölgeye özgülüğe neden olarak, biyouyumluluğu artırarak veya ilaç yükleme kapasitesini artırarak etki süresini uzatırlar. Nanokozmesötiklerden ayrıca çeşitli yaşlanma karşıtı formülasyonların formüle edilmesinde de oldukça yararlanılmaktadır. Büyümelerini teşvik ettikleri, yapılarını korudukları ve hidrasyon gücünü artırdıkları, böylece kozmetik ürünler olarak etkinliklerini artırdıkları iddiasıyla cilt bakımı, saç bakımı ve tırnak bakımı ürünleri olarak başarıyla pazarlanmaktadırlar (Santos & ark., 2019; Dhawan, Sharma & Nanda, 2020b). Bu faktörlerin tümü nanokozmesötikleri tüketiciler için daha popüler hale getirmekle birlikte güvenlik endişelerini gidermek için bu alanda daha fazla klinik deneme yapılmasını da zorunlu hale getirmektedir.

Cilt, vücudu serbest radikallere karşı savunan temel kalkandır. Tozlar, UV ışınları, kimyasal maddelere maruz kalma ve hava kirliliğiyle oluşan çok sayıda serbest radikal türü mevcuttur ve serbest radikaller insan cildi için oldukça zararlıdır. Serbest radikallere maruz kalmayla karşılaşılabilecek sonuçlar arasında cildin elastikiyetinin ve kollajen üretiminin zarar görmesi yer alır; bu da sonuçta kırışıklık çizgilerinin oluşmasına ve dolayısıyla cildin daha az elastik hale gelmesine neden olur. Serbest radikaller ayrıca melanositlerin ve melanin pigmentinin yayılmasını engelleyebilir, bu da düzensiz pigmentasyona ve cilt kanserine neden olabilir (Karayana, Jusuf & Putra, 2018).

Kozmetik ürünler cilt için önemli tedavi edici etkiler sunar ve cilt kuruluğu, akne, fotoyaşlanma, siyah nokta, kötü görünüm, hiperpigmentasyon gibi çeşitli durumların tedavisinde kullanılır. Nanokozmesötikler yüksek stabilite ve biyouyumluluğun yanı sıra cilde yük dağılımını iyileştirme potansiyeli ve uzun süreli etki sağlar. Lipozomlar, nanoyapılı lipit taşıyıcılar (NLC), niozomlar, katı lipit nanopartikülleri (SLN), nanoemülsiyonlar, altın nanopartikülleri ve polimerik nanopartiküller gibi birçok nanomateryal biyouyumlu malzemelerle üretildiklerinden, özellikle topikal ürün dağıtımı için kullanılmaktadır. Ayrıca, ince bir film oluşumu sayesinde kozmesötiklerin dağılımını düzenleme ve cilde daha hassas bir şekilde dağıtma potansiyelinden dolayı kişisel bakım ürünlerindeki uygulamalarda kullanılırlar. Ek olarak cilt yaşlanması, endojen ve eksojen olarak uyarılabilen karmaşık bir süreç (Otlatici & ark., 2019) olmakla birlikte bu sürecin yaklaşık %90'ı UV radyasyonuna maruz kalma sonucunda tetiklenir. Cilt yaşlanmasının ilerlemesini hızlandıran diğer faktörler arasında ise sigara, alkol kullanımı, uyku

düzeni, yetersiz beslenme gibi yaşam kalitesini etkileyen durumlar ve çevresel etkiler (kirlilik) sayılabilir. Kuru cilt, cilt esnekliğinde kayıp ve kırışıklık yapısının oluşumu cilt yaşlanmasının ilk belirtilerindendir. Günümüzde cilt yaşlanmasının bu ilk belirtileri geciktirilebilmekte ve/veya önlenebilmektedir. Aktif bileşenlerin topikal uygulaması için geleneksel topikal formülasyonlar (süspansiyonlar, solüsyonlar, jeller, aerosoller, toz ve emülsiyon) kabul edilebilir (Otlatici & ark., 2019). Fakat bu formülasyonların bazı sınırlamaları mevcuttur ve tedavinin güvenliğini veya verimini kötü yönde etkileyebilir. Bu kısıtlamaların üstesinden gelmek için aktif madde dağıtımına yönelik çeşitli nanomalzemeler geliştirilmiştir.

Kozmetik ve sağlık sektörlerinde nano yapıları kullanan aktif içerikli cilt ürünlerinin sürekli araştırılması ve geliştirilmesi endüstriler ve toplum üzerinde pozitif etkileri olan yeni imkanlar sunmaktadır (Souto & ark., 2020). Nano ürünleri üreterek ürün yeniliğini teşvik etmek için aktif farmasötik bileşenlerin (API'ler) nano boyutlu ilaç dağıtım sistemleri aracılığıyla yüklenmesi şu anda kullanılmaktadır. Nanokozmesötikler ve nanofarmasötikler gibi cilde API dağıtımı için kullanılan nanoürünlerin etkinliği, çok sayıda cilt bakım ürününün halihazırda piyasada olması nedeniyle daha önce kanıtlanmıştır. API'lerin cilt aracılığıyla iletilmesindeki ana zorluk, farklı kutupları olan birçok fizyolojik tabakanın üstesinden gelmektir. Cildin, vücudu sadece tehlikeli toksinlerden ve patojenlerden değil ayrıca ilaçları da içerebilen ksenobiyotiklerden de koruduğu ve aynı zamanda homeostazis için fizyolojik sıvıların dışarı atılmasına imkan sunduğu da iyi bilinmektedir. Ciltten emilme API emilimini azalttığı için topikal olarak uygulanan API'lerin

biyoyararlanımı oral ve intravenöz yollara kıyasla daha azdır. API'lerin cilde uygulamanın kısıtlamalarını çözme amacıyla çok sayıda nanopartikül türü önerilmiştir. Bu konuyla ilgili olarak, (Otlatici & ark., 2019) cilt yaşlanmasını geciktirmek, önlemek ve hatta mümkünse iyileştirmek için çeşitli API'lerin kozmetik ürünlerde kullanılabileceğini savunmaktadır (Mohd-Setapar & ark., 2022).

1.1.1. Kozmetik Endüstrisinde Nanoteknolojik Uygulamalar

Kozmetik maddelerinin korunmasıyla alakalı nanoteknoloji uygulamaları genel olarak nanopartikülleri, nanokompozitleri ve nano dağıtım sistemlerini içermektedir. Ambalajlama, kozmetiklerin korunmasında çok önemli bir rol oynamaktadır ve şu ana kadar mevcut literatürün %95'inden fazlası ambalajlamada NM'lerin koruma amaçlı uygulamalarını bildirmektedir (Angelopoulou, Giaouris, & Gardikis, 2022).

1.2. Kozmetik Ambalajları

"Ambalaj malzemesi" 2013/674/EU sayılı Komisyon Uygulama Kararı'na göre formülasyonla direkt temas halindeki kaptır (URL-2). Birincil ambalaj, kozmetik ürününün güvenliğinde ve korunmasında yalnızca ürünü mikrobiyal kontaminasyondan ve daha sonraki bozulma süreçlerinden koruduğu için değil, ayrıca maddelerin migrasyon yoluyla ürünle doğrudan etkileşime girebileceği için de önemli bir role sahiptir. Ayrıca kozmetik ürün ve bileşim ile uyumluluk testlerinin yapılması zorunludur. Avrupa Birliği esasen gıda ambalajına ilişkin ilgili mevzuata dayanmaktadır ve bir ambalaj malzemesinin gıda için kabul edilmesinin ardından

kozmetik için de onaylanmasının daha kolay olduğunu kabul etmektedir (URL-2).

1.3. Aktif ve Akıllı Paketleme

Kozmetik ambalajını geliştirerek onu “akıllı” hale getirmenin dört yolu vardır: (i) mekanik ve bariyer özelliklerinin iyileştirilmesi; (ii) ürüne yavaşça salınan antimikrobiyallerin verilmesi; (iii) zararlı maddeleri, mikrobiyal bozulmayı veya gazı tespit edebilecek sensörlerin dahil edilmesi; ve son olarak (iv) biyopolimerlerden yapılan bir ambalajın geliştirilmesi. Aktif paketleme teknolojisi, ambalaj malzemesine koruyucu maddeler, oksijen tutucular, nem emiciler, karbondioksit yayıcılar ve etilen temizleyiciler ekleyerek ürünlerin raf ömrünü uzatmak için kullanılır. Aktif paketleme, gıda ve ambalaj malzemeleri arasında oksijeni veya nemi tutabilen, aroma ve etanol gibi uçucu maddelerin buharlaşmasını önleyebilen bir mikro ortam oluşturur ve ayrıca antimikrobiyal aktivite de sunabilir (Dobrucka & Cierpiszewski, 2014). Son on yılda paketli ürünlerin mikrobiyal bozulmasını önlemek ve raf ömrünü uzatmak amacıyla filmlere, ambalaj malzemelerine ve kaplamalara çeşitli antimikrobiyal maddeler ilave edilmiştir. Bu uygulamaya özellikle "antimikrobiyal aktif" paketleme denir ve antimikrobiyal ajanları bazen kontrollü bir biçimde ürün içinde dağıtan ve/veya serbest bırakan paketleme mekanizmalarıyla ilgilidir. Kozmetik endüstrisi, son zamanlarda mikrobiyal bozulmayı önlemek maksadıyla gıda endüstrisinden aktif paketleme teknolojisini elde etmiştir (Zema & ark., 2010).

Aktif paketlemenin yanı sıra “akıllı” ambalajlar da geliştirilerek bu yapılar birlikte “akıllı” ambalaj terimini oluşturmuştur. Akıllı ambalaj, üründeki biyokimyasal veya

mikrobiyal değişikliklerin yanı sıra tehlikeli maddelerin safsızlıklarını da tespit edebilen bir kap, kaplama veya filmdir. Bu mekanizma ambalaja sensörleri entegre etme ile sağlanmakta ve bu başarının arkasında artık nanoteknoloji bilimi yer almaktadır. Nanomateryallerin algılama sistemlerine dahil edilmesi, optik, termal, plazmonik, katalitik vb. özellikleri kazandırarak performanslarını artırmaktadır (Angelopoulou, Giaouris, & Gardikis, 2022).

1.4. Mevcut Pazar

Nanomalzemelerin emilmeden cilt üzerinde kalma eğilimi, formülasyonda gerekli olan nispeten düşük konsantrasyonlar, doku ve çözünürlükte istenilen değişiklikleri kolaylaştırmadaki etkileri gibi faktörlerden dolayı, bu nanomateryallerin ilgili işlevselliklerde kullanılmasının önemli olduğu düşünülmektedir (Thibane & ark., 2019). Piyasaya sürülen ilk nanokozmetik ürün, 1986 yılında Dior tarafından yaşlanma karşıtı lipozomlar olan "Capture Totale" idi, bunu L'Oreal Paris'in yine aktif retinol ahanının polimerik nanokapsüllerinden oluşan yaşlanma karşıtı bir krem olan "Plentitude Revitalift" izledi (Nanda, 2018; Madheswaran & ark., 2017). Nanopartikül uygulamasının patentini almak amacıyla 600 milyon ABD doları bütçe ayıran L'Oreal, nanopartiküllerin kozmetikte sanayileştirilmesi hususunda liderdir. Bugüne kadar L'Oreal, nanokozmetik patentlerin en büyük sahibidir ve onu Procter & Gamble, Henkel, Unilever vb. takip etmektedir (Chauhan & Chauhan, 2021). Nanoteknoloji Ürünleri Veri Tabanına göre güncel olarak, 31 ülkede 276 şirketin ürettiği 104 türde 903 nanokozmetik ürün mevcuttur (Dubey & ark., 2022). Nanoteknolojinin dahil edilmesi kozmetik biliminde ilerlemelere yol açmış ve bu da dünya

çapında tüketici talebinin artmasına neden olmuştur (Ajazzuddin & Jeswani & Jha, 2015). Günümüzde geleneksel olarak kullanılan kozmetik ürünlere göre daha büyük avantajlar sunan nanomalzemeler bu alanda ilgi çekmektedir. Ayrıca, nanomateryallerin birleştirilmesi, ilaç ve kozmetik ürünlerinin pazar payının küresel artışına büyük ölçüde katkıda bulunmuştur. 2019 yılında nanomalzemelerin uluslararası pazar büyüklüğünün yaklaşık 8,5 milyar ABD doları olduğu bilinmekle beraber, 2020-2027 yılları arasında %13,1'e varan bileşik yıllık büyüme oranıyla artması beklenmektedir (URL-3). Nanomalzeme ifadesi kozmetikte birkaç yıldır güncel olarak kullanılmasına rağmen bu yapıların son yıllarda uygulamalarının kapsamı gitgide genişlemiştir (Gupta & ark.., 2022). Öyle ki COVID-19 salgını bile dünya çapındaki nanomalzeme üretimi ve tedarik ağını etkilemiştir.

Kozmetik pazarının, genel olarak yirmi birinci yüzyılın en büyük teknolojik atılımı olarak kabul edilen nanoteknolojiden önemli ölçüde etkileneceği öngörülmektedir. Kübozomlar, nanoemülsiyonlar, kıvırma maşaları, jiletler, dendrimerler, yaşlanma karşıtı ürünler ve güneş kremleri kozmetikte kullanılan nanoyapılı parçacıkların bazılarını temsil etmektedir (Martel-Estrada & ark., 2022). Nanomalzeme pazarına başta karbon nanotüpler egemen olmuş, bunu titanyum nanopartiküller ve gümüş nanopartiküller izlemiştir. Verimli koku giderici ve antibakteriyel etkileri dolayısıyla nano gümüş, kozmetikte hızla kullanılmaya başlanmış ve pazar payının artmasına katkı sunmuştur. Pazar, son yıllarda sürekli Araştırma ve Geliştirme (Ar-Ge) faaliyetleri nedeniyle büyük bir potansiyele tanık olmaktadır. Güneş bakım ürünlerinin üretiminde ise çinko oksit (ZnO) ve titanyum dioksit (TiO_2) nanopartiküllerine

olan talep pazarın büyümesine katkı sunmaktadır. Nanomalzemeler, özellikle Hindistan ve Çin gibi gelişmekte olan ülkelerde kozmetik ve kişisel bakım alanında yüksek talep görmektedir (URL-4). Altın nanopartikül (AuNP'ler) pazarının artan sağlık harcamaları ve yenilikler nedeniyle Avrupa'da 2025 yılına kadar %10'luk bir Bileşik Büyüme Oranı ile gelişeceği tahmin edilmektedir. Gümüş nanopartikülleri ise L'Oreal ve L'Core Paris gibi büyük şirketler tarafından özellikle losyonları ve kremleri formüle edip geliştirmek için kullanılmaktadır (URL-5). Lipozom temelli nemlendiriciler 40 yıldan fazla zaman önce sağlık ürünleri ve kozmetik sektöründe nanoteknolojinin ilk kullanımıydı. Yüksek yüzey alanlı nanomalzemeler, bileşenlerin cilt yoluyla daha verimli bir şekilde taşınmasına olanak tanır. Daha fazla nanoteknolojik ürün piyasaya çıktıkça halkın nanomateryallere olan ilgisi artmaktadır. Bununla birlikte, ihtimal dahilindeki tehlikeleri önceden tanımlamak kritik öneme sahiptir. Bundan ötürü, nanomateryallerin biyolojik doğasını daha iyi anlamaya yönelik çalışmalar dünya çapında düzenleyici kuruluşların gündeminde ilk sıralarda yer almaktadır (Cardoza & ark., 2022).

1.5. Kozmetik Endüstrisinde Kullanılan Nanokompozitler

Nanoteknolojinin gelişimi ve NP'lerin sahip olduğu çok sayıda özellik, aktif ve akıllı paketlemenin üretilmesiyle paketleme teknolojisini daha da geliştirmiştir. Bu sayede, ürünün raf ömrünün uzatılması, koruyucuların ambalajdan ürüne salınmasının kontrolü, üründeki kimyasal koruyucu sistemlerin konsantrasyonunun azaltılması ve böylelikle ürün güvenliğinin artırılması sağlanmıştır. Biyobozunur ambalajlama ve sürdürülebilir atık bertaraf yönetimine yönelik tüketici talepleri ve olumlu çevresel etkisi, filmler ve

kaplamalar da dahil olmak üzere, yalnızca biyopolimerler olarak da adlandırılan biyolojik olarak parçalanabilen malzemelerin kullanıldığı ambalajların geliştirilmesine yol açmıştır. Bu biyopolimerler arasında en çok araştırılanlar selüloz, karragenan, agar, nişasta ve kitosandır. Diğer yandan, yapılan geniş çaplı araştırmalar, biyopolimerlerin kullanıldığı ambalajların aslında bariyer ve mekanik özelliklerini içeren geçirgenlik ve dayanıklılık bakımından bazı dezavantajlara sahip olduğunu ortaya koymuştur. Nanokompozitlerin bu dezavantajları iyileştirdiği gösterilmiştir.

Nanokompozit, kimyasal ve fiziksel olarak farklı özelliklere sahip iki veya daha fazla bileşenden oluşan ve bileşenlerden birinin nano ölçekte en az bir boyuta sahip olduğu heterojen bir sistemdir. Ambalajlardaki nanokompozitler, süreksiz faz olarak nano dolguları ve sürekli faz olarak ise biyopolimerleri içermektedir. Biyopolimerler, nano ölçekte üretildiğinde "bakteriyel" nanoselüloz denilen antimikrobiyal aktif filmleri oluşturmada ideal malzemeler haline gelen özel ve önemli özelliklere sahiptir. Bu, benzersiz nano yapılı morfolojiye sahip, özel bakteri türlerinden sentezlenen, geniş yüzey alanı, kristallik, gözeneklilik ve dirençle birlikte elastik özellikler sağlayan doğal, toksik olmayan bir biyopolimeri ifade eder (Angelopoulou, Giaouris, & Gardikis, 2022).

2. Doğal İçeriklerin Nanoteknolojiyle Birleştirilmesi ve Uygulanması

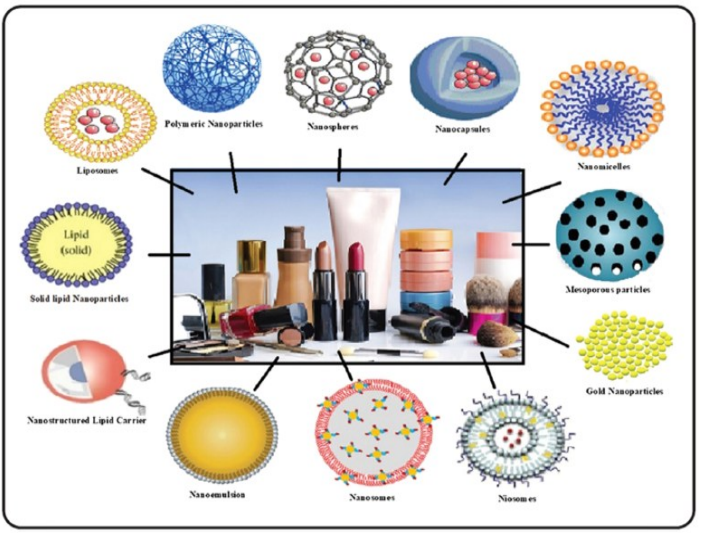
Özellikle bitki özlerini içeren doğal hammaddelerin cilde uygulanma açısından birçok zengin avantaja sahip olduğu görülmüştür. Bununla birlikte bu bileşenler kimyasal açıdan stabil değildirler. Ayrıca formüle edilmeleri kısmında biyolojik etkilerin azalmasına sebep olabilecek olumsuz reaksiyon riskleri mevcuttur.

Fitobileşiklerin nanokapsülasyonunun stabiliteyi ve çözünürlüğü artırdığı ayrıca bitkisel ekstraktların terapötik faydalarını koruduğu gösterilmiştir (Aziz & Mohd Setapar, 2022). Ek olarak nanokapsülleme, ekstraktların bölgesel ve kontrollü deri dağıtımının verimini artırarak kozmetiklerin duyusal özelliklerini geliştirir (Faria-Silva & ark., 2022). Doğal bileşenlerin nanoenkapsülasyonunun bu avantajları, doğal bileşenlerin kozmetikte nanoteknolojik uygulamasının eğilimini artırarak tetiklemektedir. Biyouyumlu bileşiklerden elde edilen bitkisel ekstrakt içeren nanopartiküller, uzun vadeli, düşük maliyetli ve yenilenebilir ilaç dağıtım sistemleri için cazip olmaktadır. Bu nanoyapılar, lipitler, proteinler, polisakkaritler ve çok daha fazlasını içeren çok çeşitli malzemelerden tek tek veya kombinasyon halinde oluşur (Kumar, Lather & Pandita, 2015). Birçok bilimsel çalışma doğal maddeleri hedef bölgeye ulaştırmada nanokozmetiğin faydalarını ve etkinliğini doğrulamıştır. Sugumar ve arkadaşları antifungal, antitümoral, antiviral, antioksidan ve antibakteriyel biyoaktiviteleri açısından mangosten özünü kullanarak bu özü içeren su içerisinde yağ (O/W) nanoemülsiyonlarını formüle edip bir nanoemüljel geliştirdiklerini rapor etmişlerdir. Bu araştırmacılar mangosten misellerini içeren nanoemüljelin cilt tabakasına başarıyla nüfuz ettiğini ve toplam mangosten içeriğinin %95'inden fazlasını ilettiğini göstermişlerdir. Bu teknik, antioksidan, lignin ve UV koruma özellikleriyle iyi bilinir. Ayrıca yapılan çalışmalarda hayvan hücre hatlarına karşı düşük toksisite gösterdiği tespit ediliğinden güneş kremlerin ve kozmetik preparatlarda kullanımı güvenli kabul edilmektedir. Değiştirilmiş kraft ligninin nanopartiküllere dönüştürülmesi özellikle güneş koruma faktörünü (SPF) ve

UVA/UVB geçirgenliğini olmak üzere güneş koruyucudaki UV emilim özelliklerini önemli ölçüde artırır. Modifiye edilmiş kraft lignini (CatLignins içeren) güneş koruyucuları, SPF 15 (%2,7-51,1) içeren ticari güneş kremlerine göre daha düşük UV geçirgenliğine (%0,5-3,8) sahiptir. Bu güneş koruyucu özel bileşen cildi istenmeyen yan etkilerden korur ve daha çevre dostudur. Bu örnekte olduğu gibi piyasada fayda ve değer artışı için nanoparçacıkları uygulamakta olan pek çok ticarileştirilmiş ürün mevcuttur (Mohd-Setapar & ark., 2022).

3. Nanokozmetik Sistem Türleri

Nanoteknolojiye dayalı yaklaşımlarla sunulan kozmetiklere nanokozmetik adı verilmektedir. Sistemin özelliklerine, hazırlama yöntemine ve ilgili bileşenlere bağlı olarak çeşitli tiplere ayrılırlar. Şekil 1'de çeşitli nano sistemlere ilişkin özet bir genel bakış verilmektedir (Dubey & ark., 2022).



Şekil 1: Kullanılan Nanotaşıyıcı Sistem veya Nanomateryal Türüne Bağlı Olarak Nanokozmetik Formülasyon Türleri (Dubey & ark., 2022).

4. Nanomateryallerin Kısıtlamaları

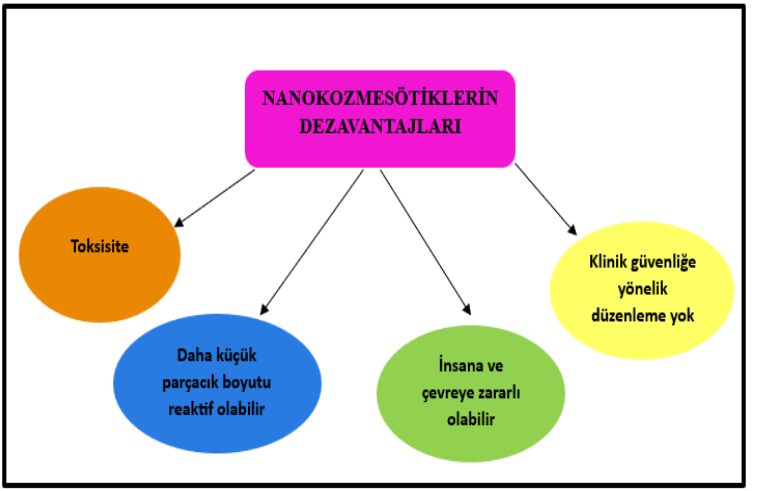
Nanopartiküller (NP) maruz kalma yoluna göre değişmekle birlikte en çok gastrointestinal sistem, solunum, deri veya sistemik uygulama yoluyla vücuda girebilmektedir. Birçok çalışma NP'lerin akciğer, karaciğer, dalak gibi farklı insan organlarında biriktiğini göstermiştir. Hücrelerle temas halindeyken, hücresel seviyede NP'ler normalde endositoz yoluyla içeri alınır ve sitoplazmaya girmeden lizozomlar veya endozomlar içinde yakalanırlar (Cheng & ark., 2013). Kimyasal bilgi almak ve NP'lerin hücrelere dağılımını incelemek için kullanılan in vitro teknikleri desteklemek amacıyla, kenar yapısına yakın SR-X-ışını absorpsiyonu (XANES) uygulanabilir. Bu teknik, kültürlenmiş makrofajların içinde gümüş NP'lerin yavaş yavaş iyonik gümüşe dönüştüğünü göstermiştir

(Wang & ark., 2015). Nanopartikül birikiminin hücre iskeleti üzerindeki etkisini göstermek için yapılan in vitro çalışmalar, (Pernodet & ark., 2006) NP'lerin (gümüş nanopartiküller) hücreye girdikten sonra en büyük yıkıcı etkisinin %350'ye kadar arttığı tespit edilen serbest radikal üretimi olduğunu göstermiştir. Daha spesifik olarak, bu etki mitokondriyal membranın bozulmasına ve sonuç olarak hücre canlılığının azalmasına neden olur. Yakın zamanda yapılan bir çalışmada, gümüş NP reaksiyonu nedeniyle mitokondriyal membranda meydana gelen depolarizasyon fenomeni, akış sitometrisi ile görselleştirilmiş ve bilim insanları, hücresel canlılığın azalışını gözlemlemek için canlılık testi olan WST-8'i uygulamışlardır (De Matteis & ark., 2018).

Nanomateryaller, çeşitli faydalara sahip olmalarına rağmen aynı zamanda stabilite, ölçeklenebilirlik, toksisite, maliyet vb. ile ilgili sınırlamalara da sahiptirler. Ayrıca nanomateryallerin toksisite ve güvenlik durumları hala tartışmalıdır. Nanopartiküllerin nispeten küçük boyutu, pozitif yüzey yükü ve geniş yüzey alanı onların mikro çevreyle biyolojik etkileşimlerini artırmaktadır. Bununla birlikte doza ve farklı uygulama yollarına bağımlı toksisiteleri mevcuttur. Aktif bir bileşenin biyoyararlılığının aktif kısmın fizikokimyasal özelliklerinden çok dozajdan daha fazla etkilendiği bilinmektedir (Hoag & Hussain, 2001). Bundan dolayı kozmetik ürünler söz konusu olduğunda nanoformülasyonların araştırılması ve geliştirilmesindeki en büyük kaygı bu yapıların kana ulaşan aktif bileşenlerin miktarını artırabilmesi ve toksisiteyi tetikleyebilmesidir (Souto & ark., 2020).

Amerika Birleşik Devletleri'nde FDA, kozmetik ürünlerin güvenliği ve bütünlüğüne odaklanan düzenleyici değerlendirme için

nanoteknoloji kılavuzlarını tanıttığında nanomateryal güvenliği ihtiyacı vurgulanmıştır. Kozmetiklerdeki nanopartiküllerin güvenliğini değerlendirmek için FDA'nın iki önemli bilgiye ihtiyacı vardır. Öncelikle, maddenin özellikle nano boyutlu halinin özellikleri hakkında detaylı bilgi vermek çok önemlidir. Bu, nanopartiküller çeşitli fizikokimyasal özellikler sergilediğinden, kullanılan malzemeler, bitmiş kozmetik ürünler, biyolojik etkileşimler ve ilgili kirletici maddelerin karakterizasyonu hakkındaki ayrıntıları içerir. Bu nitelikteki kesin ve erişilebilir bilgilere sahip olmak, zehirlenme, kirlilik ve alerjilerle ilgili endişelerin giderilmesine önemli ölçüde yardımcı olabilir. İkinci bileşen, nano boyutlu kozmetik ürünlerin değerlendirilmesine özgü toksikolojik verileri içerir; akut, kronik ve sub-kronik sistemik toksisitenin yanı sıra potansiyel cilt tahrişi, alerji, foto tahriş ve fotoalerjik reaksiyonların kapsamlı bir değerlendirmesini kapsamalıdır (Effiong & ark., 2019). Ek olarak, benzer ürünlerden kaynaklanan nanopartiküllere kümülatif maruz kalma veya belirli öğelerin uzun süreli kullanımı potansiyel bir toksikolojik risk oluşturur. Genotoksisite, fetal toksisite, kanserojenlik ve üreme sağlığı etkilerini değerlendirmek için ek veri toplamak gereklidir (Nohynek & ark., 2010). Özetle, nanokozmesötiklerin Şekil 2'de gösterildiği gibi bazı dezavantajlara da sahip olduğunu belirtmek önemlidir.



Şekil 2: Nanokozmesötiğin Dezavantajları (Kaul & ark., 2018).

5. Sonuç

Kozmetiklerde kullanılan nanopartiküllerin benzersiz özellikleri hem avantajlı hem de zararlı olabilmektedir. Dikkat çekici kozmetik faydalar sunarken aynı zamanda vücudun sistemlerini olumsuz yönde etkileme potansiyeline de sahiptirler. Bunun nedeni, nano ölçekte parçacık özelliklerindeki hızlı değişikliklerdir ve bu da güvenlik ve sağlıkla ilgili endişeleri artırmaktadır. Nanomalzemelerin toksisite açısından güvenliği hala tam olarak anlaşılamamıştır ve nano boyutlu parçacıkların kozmetikte kullanımı konusunda önemli bir endişe yaratmaktadır. Üretim veya uygulama sırasında kan dolaşımına girme potansiyelleri ve bu tür maruziyetlerden kaynaklanabilecek potansiyel olumsuz etkiler konusunda endişeleri artırmaktadır (Subramaniam & ark., 2019).

Kaynakça

Ajazzuddin, M.; Jeswani, G.; Jha, A.(2015). Nanocosmetics: Past, Present and Future Trends. Recent Patents Nanomed. 5, 3–11.[CrossRef]

Angelopoulou, P., Giaouris, E., & Gardikis, K. (2022). Applications and Prospects of Nanotechnology in Food and Cosmetics Preservation. *Nanomaterials (Basel, Switzerland)*, *12*(7), 1196. https://doi.org/10.3390/nano12071196.

Aziz, Z.A.A.; Mohd Setapar, S.H. 9-Current status and future prospect of nanotechnology incorporated plant-based extracts in cosmeceuticals. In Nanotechnology for the Preparation of Cosmetics Using Plant-Based Extracts; Mohd Setapar, S.H., Ahmad, A., Jawaid, M., Eds.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2022; pp. 235–261. [CrossRef]

Badhe, Nutan & Shitole, Pratiksha & Chaudhari, Yash & Matkar, Swarup & Jamdhade, Prashik & Gharat, Tanmay & Doke, Rohit. (2023). Nanoparticles in Cosmetics: The Safety and Hidden Risks. International Journal of Biological Engineering. 1156.

Bangale, M.S.; Mitkare, S.; Gattani, S.G.; Sakarkar, D.M. (2012). Recent nanotechnological aspects in cosmetics and dermatological preparations. Int. J. Pharm. Pharm. Sci., 4, 88–97.

Cardoza, Clive & Nagtode, Vaishnavi & Pratap, Amit & Mali, Suraj & Pratap, Amit. (2022). Emerging Applications of Nanotechnology in Cosmeceutical Health Science: Latest Updates. Health Sciences Review. 4. 10.1016/j.hsr.2022.100051.

Chauhan, A.; Chauhan, C. (2021). Emerging Trends of Nanotechnology in Beauty Solutions: A Review. Mater. Today Proc., in press.[CrossRef]

Cheng, L.-C.; Jiang, X.;Wang, J.; Chen, C.; Liu, R.-S. (2013). Nano–bio effects: Interaction of nanomaterials with cells. Nanoscale 5,3547. [CrossRef] [PubMed]

Clunan, A., Rodine-Hardy, K., Hsueh, R., Kosal, M. E. & McManus, I. (2014). Nanotechnology in a globalized world: strategic assessments of an emerging technology. Naval Postgraduate School Monterey CA Centeron Contemporary Conflict.

Cornier, J. , Keck, C.M. , Van de Voorde, M. (2019.). Nanocosmetics: From Ideas to Products, Springer,

De Matteis, V.; Cascione, M.; Toma, C.C.; Leporatti, S.(2018). Morphomechanical and organelle perturbation induced by silver nanoparticle exposure. J. Nanopart. Res. 20, 273. [CrossRef]

Dhawan, S. Sharma, P. Nanda, S.(2020b). Cosmetic nanoformulations and their intended use, Nanocosmetics (2020 b) 141–169, https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822286-7.00017-6.

Dhawan, S.; Sharma, P.; Nanda, S. (2020a) Cosmetic nanoformulations and their intended use. In Nanocosmetics; Elsevier: Amsterdam,The Netherlands.

Dini, I. & Mancusi, A. (2023). Food Peptides for the Nutricosmetic Industry. Antioxidants, 12(4), 788.

Dobrucka, R.; Cierpiszewski, R. (2014). Active and Intelligent Packaging Food—Research and Development—A Review. Pol. J. Food Nutr. Sci. 64, 7–15. [CrossRef]

Dubey, S. K., Dey, A., Singhvi, G., Pandey, M. M., Singh, V., & Kesharwani, P. (2022). Emerging trends of nanotechnology in advanced cosmetics. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, *214*, 112440. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2022.112440

Effiong, D. E., Uwah, T. O., Jumbo, E. U. & Akpabio, A. E. (2019). Nanotechnology in cosmetics: basics, current trends and safety concerns—areview. Advances in nanoparticles, 9(1), 1-22.

Effiong, D.E.; Umoh, R.A.; Akpabio, A.E.; Sunday, N.-A.I.; Anamanyie, I.U. The oral film delivery-application of nanotechnology and potential in medication adherence. GSC Biol. Pharm. Sci. 2020, 11, 34–51. [CrossRef]

Faria-Silva, A.C.; Mota, A.L.; Costa, A.M.; Silva, A.M.; Ascenso, A.; Reis, C.; Marto, J.; Ribeiro, H.M.; Carvalheiro, M.; Simões, S.(2022). 7-Application of natural raw materials for development of cosmetics through nanotechnology. In Nanotechnology for the Preparation of Cosmetics Using Plant-Based Extracts; Mohd Setapar, S.H., Ahmad, A., Jawaid, M., Eds.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands,; pp. 157–201. [CrossRef]

Fatima, M.; Monawwar, S.; Mohapatra, S.; Alex, T.S.; Ahmed, A.; Taleuzzaman, M.; Ali, A.; Ansari, M.J.; Mirza, M.A.; Iqbal, Z. In silico drug screening based development of novel formulations for onychomycosis management. Gels 2021, 7, 221. [CrossRef]

Gold nanoparticles market size & share | industry report, (2019-2025). (30/09/2023 tarihinde https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/gold-nanoparticles-industry adresinden ulaşılmıştır.).

Gupta, V., Mohapatra, S., Mishra, H., Farooq, U., Kumar, K., Ansari, M. J., Aldawsari, M. F., Alalaiwe, A. S., Mirza, M. A., & Iqbal, Z. (2022). Nanotechnology in Cosmetics and Cosmeceuticals-A Review of Latest Advancements. Gels (Basel, Switzerland), 8(3), 173. https://doi.org/10.3390/gels8030173

Hoag, S.W.; Hussain, A.S.(2001). The impact of formulation on bioavailability: Summary of workshop discussion. J. Nutr., 131, 1389S–1391S. [CrossRef] [PubMed]

Information Exchange on Cosmetic Packaging Materials along the Value Chain in the Context of the EU Cosmetics Regulation EC 1223/2009 (2019). (29/09/2023tarihinde file///C:/Users/Paraskevi.agg/Downloads/Packaging_Advisory_document_-_June_2019.pdf adresinden ulaşılmıştır).

Karayana, J.; Jusuf, N.K.; Putra, I.B. (2018). Identification of HPV types 6 and 11 in skin tags using PCR. In Stem Cell Oncology; Adella, C.A., Ed.; CRC Press: London, UK; pp. 11–14.

Kaul, S.; Gulati, N.; Verma, D.; Mukherjee, S.; Nagaich, U. (2018). Role of Nanotechnology in Cosmeceuticals: A Review of Recent Advances. J. Pharm. 3420204. [CrossRef]

Kumar, S.; Lather, V.; Pandita, D. (2015). Green Synthesis of therapeutic nanoparticles: An expanding horizon. Nanomedicine . 10,2451–2471. [CrossRef]

Martel-Estrada, S. A., Morales-Cardona, A. I., VargasRequena, C. L., Rubio-Lara, J. A., Martínez-Pérez, C. A. & Jimenez-Vega, F. (2022). Delivery systems in nanocosmeceuticals. Reviews on Advanced Materials Science, 61(1), 901- 930.

Meinke, M.C. , Lademann, J., Knorr, F., Patzelt, A., Lohan, S.B. (2018) 7. Nanocosmetics, in: M. Van de Voorde (Ed.), De Gruyter, pp. 101–116, https://doi.org/10.1515/9783110547221-007.

Mendonça Munhoz, A.; Santanelli di Pompeo, F.; De Mezerville, R. Nanotechnology, nanosurfaces and silicone gel breast implants:Current aspects. Case Rep. Plast. Surg. Hand Surg. (2017) 4, 99–113. [CrossRef] [PubMed]

Mohd-Setapar, S.H.; John, C.P.; Mohd-Nasir, H.; Azim, M.M.; Ahmad, A.; Alshammari, M.B. (2022).Application of Nanotechnology Incorporated with Natural Ingredients in Natural Cosmetics. *Cosmetics* , *9*, 110. https://doi.org/10.3390/cosmetics9060110

Nanomaterials in cosmetic and personal care market overview(2020). (30/09/2023 tarihinde https://www.transparencymarketresearch.com/nanomaterials-cosmetic-personalcare. html adresinden ulaşılmıştır.)

Nasrollahzadeh, M., Sajadi, S. M., Sajjadi, M. & Issaabadi, Z. (2019). An introduction to nanotechnology. In Interface science and technology, 28, pp. 1-27. Elsevier

Nohynek, G. J., Antignac, E., Re, T. & Toutain, H. (2010). Safety assessment of personal care products/cosmetics and their

ingredients. Toxicology and Applied Pharmacology, 243(2), 239-259.

Otlatici, G.; Yegen, G.; Gungor, S.; Aksu, B. Overview on nanotechnology based cosmeceuticals to prevent skin aging. Istanb. J.Pharm. 2019, 48, 55–62. [CrossRef]

Pernodet, N.; Fang, X.H.; Sun, Y.; Bakhtina, A.; Ramakrishnan, A.; Sokolov, J.; Ulman, A.; Rafailovich, M. (2006). Adverse effects of citrate/gold nanoparticles on human dermal fibroblasts. Small, 2, 766–773. [CrossRef] [PubMed]

Raj, S.; Jose, S.; Sumod, U.S.; Sabitha, M. (2012). Nanotechnology in cosmetics: Opportunities and challenges. J. Pharm. Bioallied Sci., 4, 186–193. [CrossRef] [PubMed]

S. Nanda, Nanocosmeceuticals: Retrospect, precepts and prospects, Pharma. Times 50 (2018) 73–78.

Salvioni, L., Morelli, L., Ochoa, E., Labra, M., Fiandra, L., Palugan, L. & Colombo, M. (2021). The emerging role of nanotechnology in skincare. Advances in Colloid and Interface Science, 293, 102437.

Santos, A.C.; Morais, F.; Simões, A.; Pereira, I.; Sequeira, J.A.D.; Pereira-Silva, M.; Veiga, F.; Ribeiro, A. (2019). Nanotechnology for the development of new cosmetic formulations. Expert Opin. Drug Deliv., 16, 313–330. [CrossRef] [PubMed]

Search Worldwide, Life-Sciences Literature (2021). 30/09/2023 tarihinde https://www.cosmeticsandtoiletries.com/regulations/regional/article

/21834383/comparatively-speaking-cosmetic-vs-cosmeceutical-vs-drug adresinden ulaşılmıştır.)

Size, L.B.M.; Report, S.; Size, L.B.M.; Application, B.; Region, B.; Forecasts, S. Get Free, Instant, and Unlimited Access to a PDF Sample Report & Personalized Online Dashboard (2021). pp. 2021–2028. Available online: (30/09/2023 tarihinde https://main.mohfw.gov.in/sites/ default/files/Annual%20Report%202020-21%20English.pdf adresinden ulaşılmıştır.)

Souto, E.B.; Fernandes, A.R.; Martins-Gomes, C.; Coutinho, T.E.; Durazzo, A.; Lucarini, M.; Souto, S.B.; Silva, A.M.; Santini, A. (2020). Nanomaterials for skin delivery of cosmeceuticals and pharmaceuticals. Appl. Sci., 10, 1594. [CrossRef]

Subramaniam, V. D., Prasad, S. V., Banerjee, A., Gopinath, M., Murugesan, R., Marotta, F. & Pathak, S. (2019). Health hazards of nanoparticles: understanding the toxicity mechanism of nanosized ZnO in cosmetic products. Drug and Chemical Toxicology, 42(1), 8493.

T. Madheswaran, R. Baskaran, B.K. Yoo, P. Kesharwani, (2017). In vitro and in vivo skin distribution of 5α-reductase inhibitors loaded into liquid crystalline nanoparticles, J. Pharm. Sci. https://doi.org/10.1016/j.xphs.2017.06.016.

Thibane, V.S.; Ndhlala, A.R.; Abdelgadir, H.A.; Finnie, J.F.; Van Staden, J.(2019). The cosmetic potential of plants from the Eastern Cape Province traditionally used for skincare and beauty. S. Afr. J. Bot., 122, 475–483. [CrossRef]

Wang, L.; Zhang, T.; Li, P.; Huang, W.; Tang, J.; Wang, P.; Chen, C. (2015). Use of Synchrotron Radiation-Analytical Techniques to Reveal Chemical Origin of Silver-Nanoparticle Cytotoxicity. ACS Nano, 9, 6532–6547. [CrossRef] [PubMed]

Zema, L.; Sangalli, M.E.; Maroni, A.; Foppoli, A.; Bettero, A.; Gazzaniga, A.(2010). Active packaging for topical cosmetic/drug products: A hot-melt extruded preservative delivery device. Eur. J. Pharm. Biopharm. 75, 291–296. [CrossRef]

BÖLÜM II

Jel Filtrasyon Kromatografisi ile Proteinlerin Molekül Kütlelerinin Tayini

Mehmet ÇİFTCİ[1]

Giriş

Gerek prokaryot ve gerekse ökaryot hücrelerinde hayati öneme sahip on binlerce protein mevcuttur ve bu proteinlerin tümü hücre içinde 20 çeşit amino asitten sentezlenmektedir. Proteinler hücrelerin en önemli bileşikleri olup ve en bol bulunan organik maddelerdir. 20 çeşit amino asitten sentezlenen proteinlerin enzimatik katalizleme, taşıma ve depolama, mekanik hareket, mekanik destek, koruma, sinir uyarılarının üretimi ve iletimi, hormonların oluşumu, büyüme ve farklılaşmanın kontrolü gibi çok önemli fonksiyonları bulunmaktadır. Proteinler 20 çeşit amino asidin peptid bağları ile bağlanıp bir araya gelmesi ile oluşan polimerlerdir.

[1] Prof. Dr., Bingöl Üniversitesi, mciftci@bingol.edu.tr

Peptid bağı bir amino asidin karboksil grubu ile diğer amino asidin amino grubu arasında bir su molekülü çıkışı sonucu oluşan kuvvetli kovalent bağlardır. Birkaç amino asidin bir araya gelmesi ile oluşan polimere olipeptid (dipeptid, tripeptid, tetrapeptid vs.), birçok amino asidin birleşmesiyle oluşan yapıya ise polipeptid adı verilir. Şu ana kadar proteinlerin birincil yapı, ikincil yapı, üçüncül yapı ve dödüncül yapı olmak üzere dört yapısal seviyesi tespit edilmiştir. Birincil yapı genel manada polipeptiddeki amino asitlerin sıralamasından ibarettir. İkincil yapı polipeptid üzerinde birbirine yakın olan amino asitlerin etkileşimlerini ifade ederken, üçüncül yapı birbirinden uzak olan amio asitlerin etkileşimşlerini içermektedir.. Dördüncül yapı ise birden fazla polipeptidin bir araya gelerek işlevsel özellikler kazanmaları söz konusudur.

Ayrıca hücrelerde biyokimyasal olayların devem edebilmesi için oluşan tüm tepkimelerin kontrol altında olması gerekmektedir. Bu kontrol mekanizmasının hemen hemen tamamı protein yapısındaki enzimlerle sağlanmaktadır. Çok az sayıdaki enzimlerin RNA yapısında olduğu da son yıllarda tespit edilmiştir. Tüm enzimler hiçbir arka plan ürünü oluşturmadan % 100 verimle çalışırlar. Enzimlar aynı zamanda reaksiyon hızlarını olağanüstü bir şekilde arttıran biyolojik katalizörler olarak ta bilinirler.

Proteinlerin molekül kütleleri genellikle beş-on binden birkaç milyona kadar değişen çok büyük moleküllerdir. Örneğin, insülin 5,5; ribonükleaz 13,7; tripsin 23,8; hemoglobin 68; fibrinojen 450; tiroglobin 630 kDa molekül kütlesine sahiptir.

Proteinlerin Molekül Kütlelerinin Tayin Metotları

Proteinlerin ve özellikle de enzimlerin saflaştırılma karakterizasyon çalışmaları esnasında çoğunlukla yapılması gereken işlerden biri de molekül kütlesinin tayin edilmesidir. Bu tayin işlemi protein ya da enzim yapısının ortaya konması noktasında çok önemlidir. Dolayısıyla protein ya da enzimler saflaştırılıp karakterize edilirken çoğu zaman molekül kütlerinin bulunması gerekmektedir. Molekül kütlesi tayini sonrasında aktif formdaki protein ya da enzimin molekül kütlesi, polipeptid zincir sayısı, polipeptid zincirlerinin her birinin molekül kütleleri, amino asit bileşimleri ve dizilişlerinin analizleri yapılabilmektedir.

Günümüzde proteinlerin molekül kütlerinin tayininde birçok biyokimyasal metot kullanılmaktadır. Bu metotlar; kimyasal bileşimin kullanılarak molekül kütlelerinin bulunması, ozmotik basınç yardımıyla molekül kütlesi tayini, sedimentasyon metodu ile molekül kütlesi tayini, jel filtrasyon kromatografisi ile molekül kütlesi tayini, sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile molekül kütlesi tayini şeklinde sıralanabilir.

Kimyasal bileşimlerden molekül kütlesi tayini proteinlerin bir metal atomu içermesi durumunda, sedimentasyon metodu ise proteinin bir çözücüde çözünmesi durumunda $M = \frac{c}{\pi} \cdot RT$ formülü kullanılarak molekül kütlesi tayin edilir. Burada M molekül kütlesi, c gram/litre cinsinden konsantrasyon, π ölçülen osmotik basınç, R gaz sabiti ve T mutlak sıcaklıktır. Sedimentasyon metodunda ise ultrasantrifüjün kullanımı söz konusudur. Proteinlerin hareket hızları, şekilleri, büyüklükleri, çözündükleri ortamın yoğunluk ve

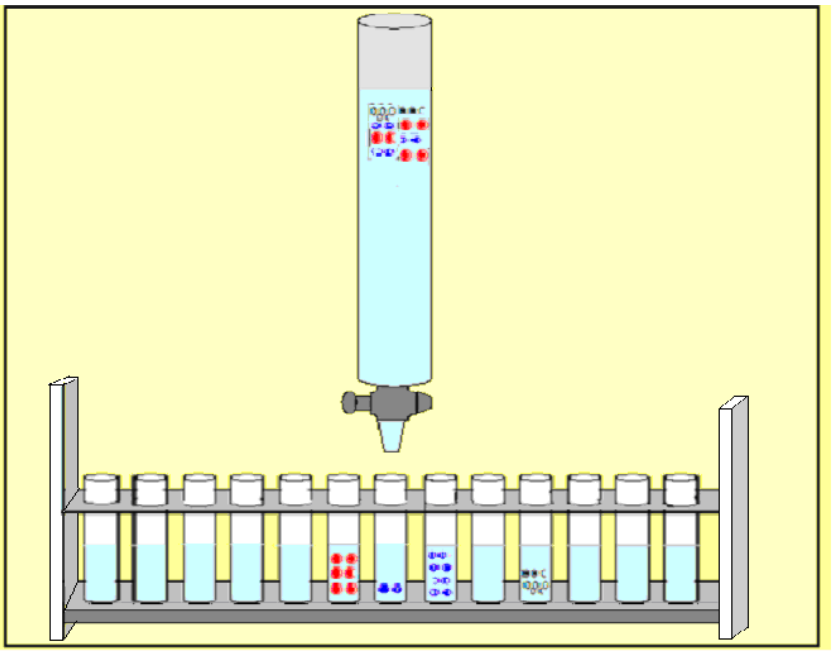
vizkoziteleri dikkate alınarak, molekül kütleleri $M = \frac{RTS}{D(1 - v.d)}$ denklemi kullanılarak hesaplanır. Burada M molekül kütlesi, R gaz sabiti, T mutlak sıcaklık, D difüzyon katsayısı, v proteinin kısmi spesifik hacmi, d çözeltinin yoğunluğu ve S de proteinin sedimentasyon katsayısıdır.

Jel filtrasyon kromatografisi vasıtasıyla molekül kütlesi tayini ise aşağıdaki alt başlıkta geniş şekilde anlatılmaktadır.

Jel Filtrasyon Kromatografisi ile Proteinlerin Mol Kütlelerinin Tayini

Genel adıyla dışarılama kromatografisi adıyla da bilinen jel fitrasyon kromatografisinde de duran faz, polimere emdirilip jel oluşturan bir sıvı, yürüyen faz da yine tampon özelliğine sahip bir sıvıdır. Jel fitrasyon kromatografisinde kullanılan polimerlerden en önemlisi Sephadex ticari adıyla bilinen polimerdir. Bu polimer, bir karbohidrat olan dekstranın üç boyutlu hale getirilmesi ile elde edilir. En önemli özelliği çok sayıda hidroksil grubu içermesi dolayısıyla suya ve daha bir çok sıvı maddeye ilgisi fazladır. Sephadex bu sıvıları emerek yarı saydam jel tanecikleri oluşturur, bu esnada şişerek hacmi artar. Elde edilen şişmiş jel tanecikleri su trompuyla havası alındıktan sonra tamponla doldurulmuş ve dengelenmiş olan kolona tatbik edilir. Daha sonra kolondan aynı dengeleme tamponu geçirilerek kolon hazır hale getirilir. Kolon hazır hale getirildikten sonra standart grafik elde edilebilmesi için kolonun üst tarafından standart protein karışımı (genellikle 5-6 çeşit protein) konur ve tekrar tampon geçirilmeye başlanır. Çoğu zaman proteinlerin tümü aynı karışımla kolondan geçirilmez. Çünkü çoğu standart proteinler birbiri ile agregat oluşturabilir. Dolayısıyla birbiri ile agregat

oluşturmayan standart proteinler karışım halinde kolona tatbik edilebilir. Bir standart protein karışımı kolondan geçirildikten sonra kolon tekrar aynı tamponla dengelenir ve diğer standart protein karışım tatbik edilir. Standart proteinler kolondan geçirildikten sonra kolon tekrar dengelenir ve en son olarak mol kütlesi tayin edilecek protein veya enzim kolondan geçirilir. Gerek standart protein karışımları ve gerekse saflaştırılmış protein elüe edilirken elüsyonlar genelde 1,5 mL'lik hacimler halinde bir dizi tüplere alınır. Bu iş için çoğunlukla laboratuvarda mevcut ise hassasiyetin sağlanması ve kolayladık açısında fraksiyon toplayıcı aletler de kullanılabilir. Böylece hem standart proteinler ve hem de saflaştırılan protein için ayrı ayrı olmak üzere spektrofotometrde 280 nm'de absorbanslar alınarak elüsyon hacimleri tespit edilmiş olur. Elüsyon hacmi proteinin kolona tatbikinden maksimum absorbansın elde edildiği ana kadar elde edilen elüat hacmi olarak kabul edilir. Karışımda bulunan maddelerden molekül büyüklükleri jel yuvalarının gözenek büyüklüğünden küçük olanlar bu gözeneklere girer. Daha büyük moleküllü maddeler ise yürüyen sıvı ile birlikte kolonda yürürler. Böylece küçük moleküllerden oluşan karışımlardan ayrılmış olurlar. Gözeneklere giren küçük moleküllü maddeler ise yürüyen sıvı tarafından bu gözeneklerden yer yer çıkartılarak yürütülürler. Bunların yürümeleri büyük moleküllü olanlara kıyasla daha yavaştır. Kolonun alt tarafında karışımda bulunan maddeler önce büyük molekül kütleli olandan başlayarak molekül kütle büyüklüğü sırasına göre elüe edilirler. Bu işlem süzme işleminin tersidir (Şekil 1).



Şekil 1. *Jel filtrasyon kromatografisinin temsili şeması*

Sephadex dışında başka ticari isimlerle piyasaya sürülen ve jel fitrasyon kromatografisinde kullanılabilen başka jeller de mevcuttur. Bunlardan biojel ticari adıyla piyasaya sürülenler üç boyutlu poliakrilamid polimerleri yuvalarından elde edilmiştir. Jellerin özelliklerini belirlemede kullanılan temel esas "su kazanım değeri"dir. Bir gram kuru jelin gözenekleri tarafından emilebilen su miktarına o jelin su kazanım değeri denir. Su kazanım değeri 10 ile çarpılarak ve önüne G harfi getirilerek jelin ticari adının sonuna yazılır. Örneğin Sephadex G-25 jelinin su kazanım değeri 2,5'tur (1g madde 2,5 g su emebilir). Jelin su kazanım değeri arttıkça gözenek büyüklüğü de artar ve daha büyük protein moleküllerinin ayırımında da kullanılabilir. Ayrıca jelin G değerleri jelin hangi molekül kütleleri aralığındaki ayırımlarda iş yapabilecekleri konusunda da

bize bilgi verir. Örneğin G-10 jeli ile molekül kütlesi ancak 700'e kadar olan moleküller ayrılabildiği halde, G-200 jeliyle molekül kütlesi 5000 ile 600.000 dalton arasında olan bileşikler ayrılabilir (Şekil 2). Daha büyük moleküllerin, mesela bazı proteinler ve virüslerin ayrılmasında agardan elde edilen ve nötral bir polisakkarit olan agaroz jeli kullanılır (Agar sülfat asidi ile esterleşmiş heksoz birimlerinden oluşan galaktozlardan oluşur).

Dolgu maddesi	**Ayırma sınırı**
Sehpadex G-10	0-700
Sehpadex G-15	0-1500
Sehpadex G-25	1000-5000
Sehpadex G-50	1500-30.000
Sehpadex G-75	3000-80.000
Sehpadex G-100	4000-150.000
Sehpadex G-150	5000-300.000
Sehpadex G-200	5000-600.000

Şekil 2. *Jel filtrasyonda kullanılan bazı Sephadex jellerin proteinleri ayırma sınırları*

Jel filtrasyon kromatografisinde karışımların ayrılmasında karışımda bulunan maddelerin molekül büyüklükleri rol oynar. Ancak moleküller büyüdükçe ayrılma molekül büyüklüğünden ziyade molekül kütlesine göre olur. Örneğin G-100 ve G-200 tipi jellerde elüe etme hacmi yaklaşık olarak molekül kütlesinin logaritmasıyla doğru orantılıdır. Bu bilgilerden yararlanılarak büyük moleküllü bileşikleri örneğin proteinlerin molekül kütleleri tayin

edilebilir. Yukarıda bahsedilen jeller su veya sulu çözeltiler için uygun olanlardır. Jellerdeki hidrofil grupları bazı reaktiflerle etkileştirilerek hidrofob gruplara çevrilebilir. Ayrıca hidrofob grupları içeren eden polimer yuvarları hazırlamak için polistirenin üç boyutlu hale getirilmesiyle elde edilen jel yuvarları, lipitler gibi hidrofob maddelerin ayrılmasında kullanılabilir. Bu ayrılmalarda yürütücü sıvı olarak organik çözücüler kullanılabilir. Jel filtrasyon kromatografisinde proteinlerin molekül kütlesi hesaplanırken öncelikle standart bir grafik elde edilmelidir. Bu standart grafik her bir standart protein için elde edilen Kav değeri ile her bir standart proteinin molekül kütlesinin logaritmasından (Kav-Log M_A) faydalanılarak çizilir. Kav değeri ise aşağıda verilen formülden elde edilir (Şekil 3).

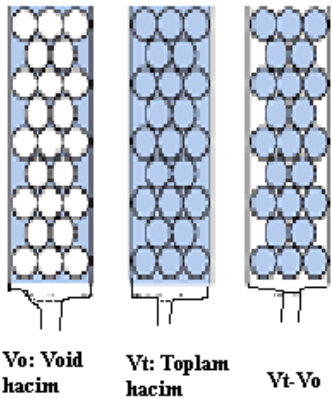
V_e: Proteinin elüsyon hacmi

V_o: Void hacim

V_t: Kolonun toplam hacmi

Şekil 3. *Jel filtrasyonda Kav değerlerinin elde edilmesinde kullanılan formül*

Burada V_e her bir proteinin elüsyon hacmini gösterir ve söz konusu proteinin kolona tatbikinden 280 nm'de maksimum absorbans elde edilen elüata kadar elde edilen hacim olarak kabul edilir. V_0 jel parçacıkları arasındaki boşlukların hacmini, Vt ise kolonun toplam hacmini göstermektedir. Bu parametrelerin daha iyi anlaşılabilmesi için Şekil 4 incelenebilir.

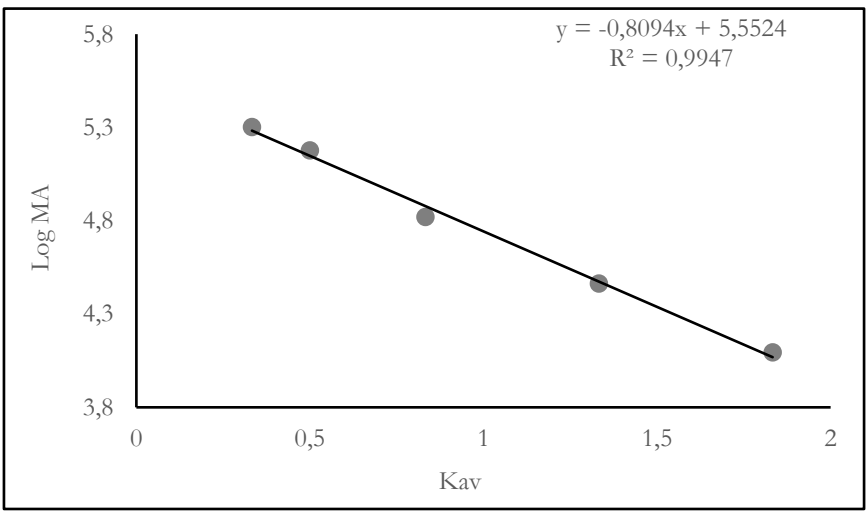


Şekil 4. *Jel filtrasyon kromatografisinde Vo, Vt ve Vt-Vo değerlerinin kolonda gösterilmesi*

Proteinlerin mol kütlesinin hesaplanmasının daha iyi anlaşılabilmesi için konuyu bir örnekle izah etmeye çalışalım. Elimizde standart olarak Sit C (12,400), BCA (29,000), BSA (66,000), Alkol Dehidrogenaz (150,000), ve β-amilaz (200,000) standart proteinlerinin, void hacmin hesaplanmasında kullanılan Blue Dextranın (2.000.000) ve tarafımızdan saflaştırılmış mol kütlesi bilinmeyen insan eritrosit glukoz 6-fosfat dehidrogenaz (G6PD) var olduğunu düşünelim. Öncelikle standart proteinlerin kolondan geçirildiğini ve elüsyon hacimlerinin sırasıyla, 75, 60, 45, 35, 30 mL ve ayrıca Blue Dextranın elüsyon hacminin de 20 mL, kolonun yatak hacminin de 50 mL bulduğumuzu varsayalım. Bu verileri dikkate alarak Kav-Log M_A standart grafiğini çizelim ve elüsyon hacmi 49 ml olan ve bizim saflaştırdığımız mol kütlesi bilinmeyen glukoz 6-fosfat dehidrogenaz enziminin mol kütlesini bulalım (Tablo 1).

Tablo 1. *Standart proteinler, Blue Dextran ve G6PD proteini için elde edilen elüsyon hacimleri, Kav ve log M_A değerleri*

Proteinler/Boya	Molekül Kütleleri (kDa)	Elüsyon hacmi (mL)	Kav değeri	Log M_A
Sit C	12,4	75	1,833	4,093
BCA	29	60	1,333	4,462
BSA	66	45	0,833	4,819
Alkol dehidrogenaz	150	35	0,500	5,176
Beta amilaz	200	30	0,333	5,301
Blue Dextran	2000	20	-	-
G6PD	?	49	0,966	?



Şekil 5. Jel filtrasyon grafiği kullanılarak çizilen standart Kav-Log M_A grafiği.

Çizilen Kav-Log M_A grafiğinden elde edilen y = -0,8094x + 5,5524 doğru denklemi yardımıyla tarafımızdan saflaştırılan ve 0,4 Kav değerine sahip G6PD enziminin molekül kütlesi rahatlıkla bulunabilir. Denklemde gerekli bilgiler yerine konulduğunda G6PD enzimin molekül kütlesinin yaklaşık olarak 58 kDa olduğu görülür (Şekil 5).

KAYNAKÇA

[1] Lehninger A.L,. Principles of Biochemistry, Worth Publishers Inc. Newyork, 2005.

[2] Keha, E.E., Küfrevioğlu Ö.İ., Biyokimya, 6. Baskı, Aktif Yayınevi, İstanbul, 2009.

[3] Berg, J. M. Tymoczko, J.L. Stryer L. (2014). Çeviri Ed. A. Denizli, A.K. Ozden, Biyokimya. 7. Baskıdan Çeviri, Ankara, Palme Yayncılık.

[4] Gözükara, M. E. (1997). Biyokimya. 3. Baskı, İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri.

[5] Temizkan G., Yılmazer S., Öztürk M., Arı Ş., Ertan H., Sarıkaya A.T., Arda N. (2004). Molekülerr Biyolojide Kullanılan Yöntemler. 2. Baskı, İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri.

BÖLÜM III

Abiyotik Stres Faktörlerine Karşı Bitki Kurtarıcısı Nanopartiküller

Mustafa AKÇAY[1]

Giriş

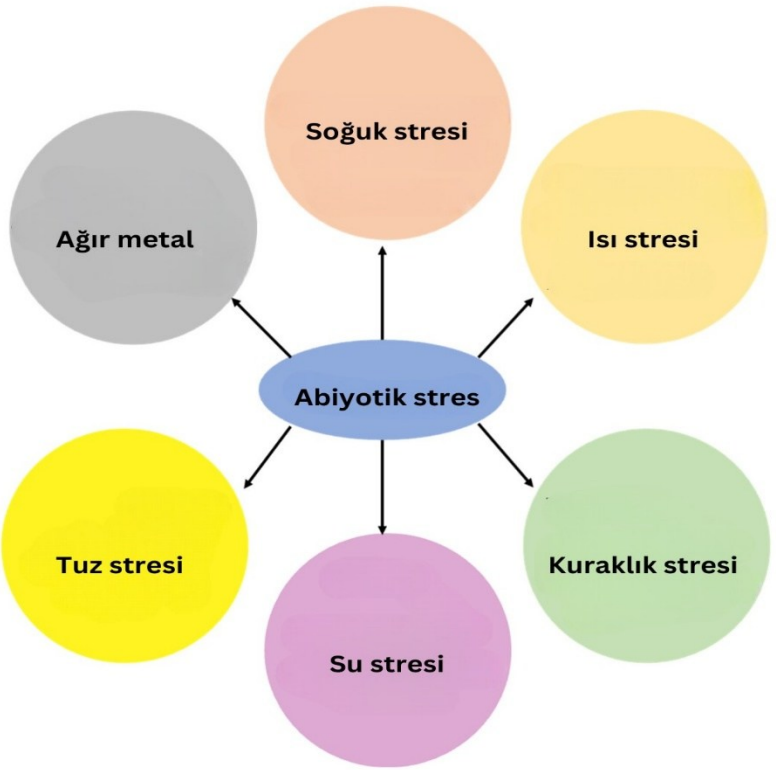
Abiyotik stres, canlı olmayan elementlerin herhangi bir ortamda canlıları nasıl olumsuz etkilediğini tanımlamak için kullanılan bir terimdir. Aşırı düşük ya da yüksek sıcaklıklar, ağır metaller, kuraklık, tuz, su baskını ve diğer çevresel uç noktalar potansiyel abiyotik stresler olarak kabul edilir (Şekil 1). Bitkiler abiyotik streslere son derece duyarlı canlılardır. Abiyotik stres durumlarının sıklığında ve şiddetinde son zamanlarda keskin bir artış söz konusudur (Zandalinas & ark., 2021). Doğal olayların yanı sıra sanayileşmenin artması, kapsamlı madencilik, artan nüfus ile hızlı kentleşme dolaylı olarak abiyotik strese ve yaşamın temel

[1] Öğr. Gör. Dr., Kafkas Üniversitesi, Kars Meslek Yüksekokulu, Kimya ve Kimyasal İşleme Teknolojileri Bölümü, Kars / Türkiye, Orcid: 0000-0003-1747-2314, mustafaakcay@kafkas.edu.tr

elementlerinin ciddi şekilde kirlenmesine neden olmuştur (Emamverdian & ark., 2015). Hareketsiz organizmalar olan bitkiler ağır metal, tuz, kuraklık, aşırı sıcaklıklar gibi abiyotik stres faktörlerine katlanmak zorundadırlar (Zhang & ark., 2022). Bitkilerin bu stres faktörlerine karşı vereceği tepkiler ise doku ve organları ile stresin yoğunluğu ve süresine bağlıdır (Cramer & ark., 2011). Stres tepkilerini azaltmak ve strese karşı toleransı artırmak adına bitkiler erken stres sinyal mekanizmalarını aktive ederler (Mohanta & ark., 2018). Bitki hücresi stresi algıladığı zaman ikinci haberciler (Ca, ROT, fosfolipitler, NO) ve çeşitli protein kinazlar sinyali iletir ve yükseltirler (Zhang & ark., 2020). Reaktif oksijen türü (ROT), abiyotik stres faktörlerine karşı yanıt olarak artar ve bitkilerin zarlarına, proteinlerine yani genel olarak tüm yapısal bileşenlerine zarar vererek, fizyolojik süreçlerde bozulmalara neden olur (Arbona & ark., 2017). Bundan dolayı da bitki savunma mekanizmalarının esas önceliği ROT'u temizlemektir. ROT moleküllerini temizlemek için antioksidan enzimlerin aktivasyonu önemli bir biyokimyasal değişikliktir. SOD, APX, GPX, katalaz oksidatif stresi tolere eden antioksidan enzimlerden bir kaçıdır (Sachdev & Ahmad, 2021).

Stres faktörlerinin uzun vadeli olması tarımsal verimi direkt etkiler ve bitkilerin büyüme ve gelişimi üzerinde olumsuz etkilere yol açar. Bitkiler üzerindeki olumsuz etki gıda güvenliğinde de endişe verici sonuçlara yol açmaktadır (Ahmad & ark., 2020). Çünkü abiyotik stres faktörleri ürün kayıplarında %50'lik bir orana sahiptir (Gonzalez & ark., 2021). Bu bağlamda bilim insanları abiyotik stresin azaltılması hedefiyle bitki ıslahı ve genetik mühendisliği gibi yaklaşımlara yönelik araştırmalara yoğunlaşmıştır. Nanoteknoloji

bu araştırmalar içerisinde abiyotik stres toleransında önemli bir uygulama alanı olarak son dönemde kendine yer bulmuştur (Rajput & ark., 2021). Kuraklık, ağır metal, tuz, düşük ve yüksek sıcaklık, su baskını gibi abiyotik stres faktörlerinin bitkilerin büyüme ve gelişmeleri üzerinde oluşturmuş oldukları zorluklara karşı nanomalzemelerin kullanımı dünya genelinde artmaktadır (Sarraf & ark., 2022). Çünkü nanopartiküllerin bitkilerde abiyotik strese karşı tolerans yeteneğini artırdığı böylelikle ürün verimini artırmada yararlı ve umut verici bir teknik olduğu düşünülmektedir (Kandhol & ark., 2022).



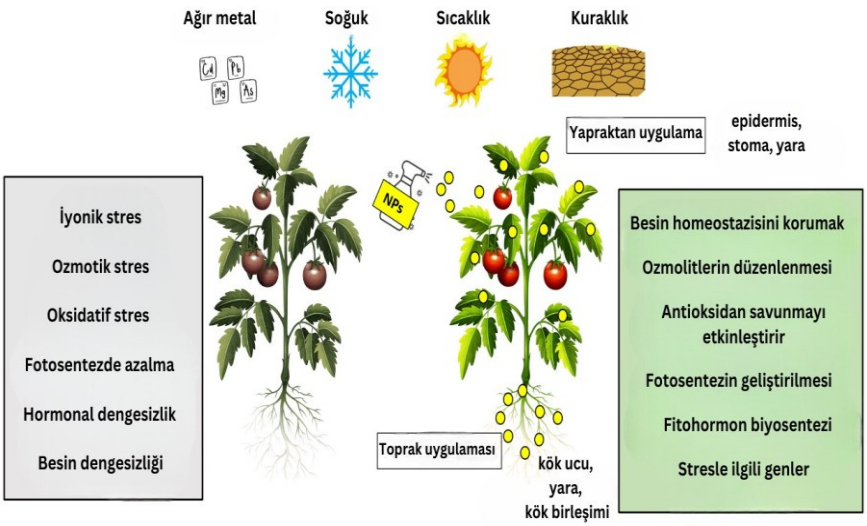
Şekil 1: Abiyotik stres faktörleri

Nanoteknoloji, maddenin çeşitli yapılarını bir metrenin milyarda biri ölçeğinde inceler. Adından da anlaşılacağı gibi, nanopartiküller 1 ile 100 nm arasında değişir ve benzersiz fizikokimyasal özelliklere sahiptir (Khan & ark., 2019). Nanopartiküller, tek tek moleküllerden ziyade organik malzemeleri ifade eder. Nanopartiküllerin toplu malzemeleri atomik veya moleküler yapılara bağlaması, bunların yüksek bilimsel ilgi görmesine neden olmuştur. Nanopartiküller genellikle aşağıdan yukarıya ve yukarıdan aşağıya sentez yolları olmak üzere 2 şekilde sentezlenir. Aşağıdan yukarıya yaklaşımı basit maddelerin birleşip reaksiyona girerek nanopartikülleri oluşturması esasına dayanırken, yukarıdan aşağıya yaklaşımı ise nanopartiküllerin ayrışmadan sonra daha büyük moleküllerden oluşması esasına dayanmaktadır. Metal oksit nanopartiküllerinin sentezi, mekanik öğütme, kimyasal aşındırma yolları ve püskürtme yukarıdan aşağıya yaklaşımana ait iken döndürme, yoğunlaşma, piroliz ve sol jel işlemi ise aşağıdan yukarıya yaklaşımına ait örneklerdir. Biyolojik örneklerden elde edilen nanopartikül yeşil sentezide aşağıdan yukarıya yaklaşımı içerisinde değerlendirilir (Iravani, 2011). Nanopartikül sentezinin başarısı için gerekli olan karakterizasyon yöntemleri şu şekildedir: 1. Mikroskopi kullanılarak yapılan morfolojik karakterizasyonlar (yani taramalı elektron mikroskobu ve transmisyon elektron mikroskobu). 2. XRD, XPS, Raman ve Zeta boyutlu analizörler kullanılarak yapılan yapısal karakterizasyonlar. 3. UV-görünür ışık ve fotolüminesans kullanılarak yapılan optik karakterizasyonlar (Khan & ark., 2019).

Yeşil sentezde, işlenmiş bitki, mantar ve mikrop özleri metal tuzu çözeltileriyle reaksiyona sokulur ve indirgeme ve kapatma

yoluyla daha fazla işlenir, bunun sonucunda istenen biyomoleküllerle kaplanmış metal nanopartiküller oluşur. Yeşil sentezlenen nanopartiküllerin boyutu çok küçük olduğundan, hedef bölgeye etkili bir şekilde taşınmasınave sonuçların iyileştirilmesine yardımcı olurlar (Parveen & ark., 2016). Bitkiler çevresel stresle başa çıkmak için stres faktörlerini hızla algılayıp uyum sağlamak için etkili ve kapsamlı moleküler programlar geliştirirler. Bitkiler, nanopartiküllerin bitkilerle etkileşimi yoluyla bu yanıtı artırabilir.

Bitkilerde çevresel stresle başa çıkmak için kullanılan çeşitli nanopartiküller şunlardır: Titanyum dioksit (TiO_2), çinko (Zn), çinko oksit (ZnO), kobalt (Co), sezyum (Ce), molibden (Mo), selenyum (Se), bakır (Cu), bakır oksit (CuO), manganez (Mn), gümüş (Ag), silisyum (Si), silisyum oksit (SiO_2), demir oksit (FeO), kalsiyum ($CaCO_3$), magnezyum (Mg) ve magnezyum oksit (MgO), alüminyum oksit (AlO_4) ve karbon nanotüplerdir (CNT). Birçok çalışma, nanopartiküllerin çeşitli fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler süreçleri düzenleyerek bitkilerin abiyotik streslere karşı toleransını iyileştirmede hayati bir rol oynadığını göstermiştir (Van Wallendael & ark., 2019) (Şekil 2).



Şekil 2: Bitkilerde nanopartiküllerin abiyotik stresleri azaltma mekanizmaları

Son dönemlerde nanopartiküllerin tarımda kullanımı önem kazanmıştır. Nanopartiküller; tarımsal gıda üretiminde, tarımsal çevre ve organik tarımda, nanotarımsal kimyasalların yeşil sentezlenen ve kaplanan nanopestisit, nanogübre ve nanokompozit tasarımında ve nanopartikül aracılığı ile gen aktarımı ile bitki genetik ilerlemesinde kullanılmaktadır (Shende & ark., 2021). Nanoteknoloji çevre dostu olduğu için ürünlerde kullanılan kimyasalların çevre üzerindeki zararlı etkilerini azaltmada önemli bir role sahiptir (Ahmad & ark., 2023).

Nanopartiküllerin bitki sistemine etkileşim ve nüfuz etmesi, emilim ve translokasyon süreçlerinde ve etki mekanizmasında ön adımdır. Ozmotik basınç ve kılcal kuvvetler, nanopartiküllerin kök epidermal bölgelerinden emiliminde önemli bir rol oynar. Genellikle, 3-5 nm aralığındaki nanopartiküller kolayca emilir.

Küçük gözeneklerin yardımıyla nanopartiküller köklerin epidermal hücre duvarını geçer ve bitki sistemine girer. Bazı durumlarda, az sayıda nanopartikül boyutları nanopartikülleri emen normal gözeneklerden daha büyükse hücre duvarında kendi gözeneklerini oluşturma yeteneğini artırır (Lin & Xing, 2008). Ayrıca nanopartiküllerin yükü epidermis bölgesi ile meydana gelen ilk etkileşimde önemli bir rol oynar (Kaphle & ark., 2018).

Nanopartiküller hedef dokuya ulaşmak için hem apoplastik hem de simplastik yollar izler. Genellikle, membran taşıyıcı protein nanopartiküllere eşlik eder ve ksilem kanallarını kullanarak taşımaya yardımcı olur (Perez-de-Luque, 2017). Daha sonra kanalların çeşitli bölgelerinde herhangi bir agregasyon varsa, floem yardımıyla köklere geri gönderilirler. Kütikül ve stomalar, nanopartiküllerin yaprağın iç sistemine ulaştığı geçiş yollarıdır. 5 nm'den küçük parçacıklar kütiküler yolu alırken, 5 nm'den büyük parçacıklar ikinci yolu izler. Kökle karşılaştırıldığında, yaprak benzer bir iç taşıma sistemine sahiptir. Nanopartiküller, floem tüpleri tarafından hem apoplastik hem de simplastik yollarla istenilen yere veya sürgünler, kökler ve meyve gibi organlara iletilirler (Ruttkay-Nedecky & ark., 2017).

1. Ağır Metal Stresi

Son on yıl içerisindeki sanayileşmenin hızla artması sera gazlarının yüksek emisyonlarıyla küresel çevre üzerindeki baskıyı önemli derecede artırmıştır. Küresel çevre koşullarının gittikçe kötüleşme endişesi kuraklık ve su kıtlığındaki artış ile birlikte ciddi anlamda artmıştır. Ağır metal, önemli bir kirletici sınıfı olarak kabul edilmektedir (Xu & ark., 2021). Ağır metal kirliliği, endüstriyel sektörden kaynaklanması ve devam eden kentleşme ile insan sağlığı

ve ekosistem için büyük bir tehlike içermektedir (Vila-Traver & ark., 2021). Son yıllardaki ağır metal kirliliğinin artışı sanayileşmenin hızlı olması, fosil yakıtların yanması, madencilik, tarımsal uygulamalar (kimyasal pestisit, gübre, modern tarım araçlarının kullanımı), metal içeriği yüksek olan atık malzemelerin direkt su kütlelerine veya tarım arazilerine atılmasıyla yakından ilişkili olmuştur (Noman & ark., 2020). Ağır metaller toprak bileşimini olumsuz etkiler.

Çevresel sistemlerde en yaygın bulunan ağır metaller; kurşun (Pb), kadmiyum (Cd), nikel (Ni), krom (Cr), arsenik (As), kobalt (Co), cıva (Hg) ve çinko (Zn) olup bu ağır metallerin bitkiler üzerinde zararlı etkileri söz konusudur (Yadav, 2010). Ağır metallerin serbest radikal oluşumunu uyarmaları ve ROT üretimini artırması, enzimlerin deaktivasyonu, protein denatürasyonu, hücre zarının tahrip olması, oksidatif stres etkisi gibi özellikler göstermeleri ile bitkinin fizyolojisinde, moleküler ve hücresel düzeyde değişikliklere yol açmaktadır. Bu durum bitkinin fotosentezini kısıtlayarak enzim aktivitelerini değiştirmektedir (Manoj & ark., 2020). Her ağır metal bitkide farklı şekilde tehdit oluşturmaktadır. Örneğin; bitkide su alınımındaki düzensizlik Pb, Cu ve Cd ağır metallerinden kaynaklanırken, Cu, Cd, Ni ve Cr ağır metalleri ise bitkide kloroza neden olmaktadır. Bu ağır metallerin zararlı etkisi yaygın bir sorun olup salınımları endüstriyel uygulamalardan doğrudan veya dolaylı olarak kaynaklanır ve bu da gıda zincirini etkileyerek gıda kalitesini ve verimliliğini azaltır (Jin & ark., 2015).

Ağır metal stresini hafifletmek için nanopartiküllerin kullanımıyla ilgili birçok çalışma yürütülmüştür. Nanopartikülün

toprağa uygulanmasıyla ağır metal nanopartikül tarafından emilebilir, dönüştürülebilir ve böylelikle ağır metal hareketliliği ve biyolojik birikimi azaltabilmektedir. Örneğin; Fe_3O_4 nanopartikülünün toprakta bulunan Cd ağır metal birikimini azalttığı gösterilmiştir (Wang & ark., 2020). Nanopartiküller, bitki köklerindeki ağır metal içeriğini azaltan apoplast bariyerlerinin oluşumunu indükler. Nanopartiküller ağır metallerin taşınmasını bitkilerdeki genlerin düzenlenmesiyle durdurabilir (Wang & ark., 2021). Nanopartiküller antioksidan sistemini etkinleştirerek reaktif oksijen türlerinin neden olduğu stresi azaltır (Wu & ark., 2017). Nanopartiküller ağır metallere yapışır ve böylelikle ağır metallerin hareketliliğini azaltmış olurlar. Nanopartiküller hücre duvarından boyutları sayesinde rahatlıkla geçebilirler aynı şekilde yüksek yüzey alan ve hacim oranına sahip olmaları nedeniyle de diğer moleküllerle etkileşime girmeyi daha etkin hale getirirler. Nanopartiküller, ağır metallerden etkilenen bitkilerde membran stabilitesini koruyarak kloroplast pigmentlerini ve fotosentez hızını iyileştirirler (Ahmed & ark., 2021).

Cd toksisitesinin hafifletilmesi adına (*Triticum aestivum)* buğdayda yapılan bir nanopartikül çalışmasında FeO nanopartikülü bitkilerdeki fotosentetik hız ve büyüme ile bitkinin kuru biyokütlesini artırarak Cd toksisitesinin olumsuz etkilerini sınırlandırmıştır (Hussain & ark., 2019). Benzer şekilde Cd stresinin yol açtığı oksidatif hasarın azaltılması adına uygulanan TiO_2 nanopartikülü kişniş bitkisinde Cd stresini iyileştirmede önemli rol oynamıştır (Sardar & ark., 2022). Nanopartiküllerin çeşitli uygulamalarının antioksidan enzimleri düzenleyerek (CAT, SOD, APX gibi) MDA ve H_2O_2 içeriğini azalttığı ve bitkilerdeki oksidatif

stresi giderdiği de bilinmektedir (Azeez & ark., 2021). Maş fasülyesinde (*Vigna radiata*) yapılan çalışmada As ağır metal alınımı Fe_2O_3 nanopartikülleri ile engellenerek, SOD ve CAT artışı ile toplam antioksidan kapasitesi geliştirilmiştir. (Shabnam & ark., 2019).

Nanopartiküller bitkilerde algılama, sinyalleme, transkripsiyon, translasyon ve protein modifikasyonlarına kadar çok sayıda hücresel süreci etkiler (Ali & ark., 2023). Bitkinin çevresel ipuçlarına verdiği tepkileri düzenleyen nanopartiküller sinyal molekülleri olarak hareket ederler. Besin alımı, stres tepkileri gibi belirli sinyal yollarını aktive etme yeteneğine sahiptirler. Çalışmalar nanopartiküllerin strese karşı tepki veren genlerin ifadesini uyarabileceğini, savunma mekanizmalarını aktive edebileceğini ve böylelikle bitki sağlığını ve performansını iyileştirebileceğini göstermiştir (Mustafa & Komatsu, 2021). Si nanopartikül uygulaması, Cd alımını ve taşıma genlerini aşağı düzenledi, bu da buğday büyümesini iyileştirdi ve ağır metal stresini hafifletti (Khan & ark., 2019). FeO nanopartikülleri pirinçteki üç genin de ifadesini önemli ölçüde azalttı (Tian & ark., 2021). Nanoölçekteki sıfır değerlikli demir Cd stresi altındaki pirinç bitkisinde, demir ve kadmiyum alımından sorumlu demir taşıyıcı genlerin (*IRT1, IRT2, YSL2, YSL15*) ekspresyon seviyelerinde azalma görülmüştür (Guha & ark., 2020).

2. Soğuk Stresi

Son yıllarda, küresel iklim değişikliğinin neden olduğu düşük sıcaklık felaketleri sıklıkla meydana gelmiş ve bu durum ürünlerin normal büyümesini ciddi şekilde etkilemiştir. Soğukluk ve donma bitkilerin genellikle düşük sıcaklık stresi yaşadığı iki türdür. Bitkiler

için soğukluk sıcaklığı bitkinin türüne ve tolerans seviyesine göre değişiklik gösterirken genel olarak 0-15 ºC arasında bir sıcaklık söz konusudur. Soğukluk sıcaklığını etkileyen çeşitli faktörler bulunmaktadır. Bunlar; bitkilerin soğuğa maruz kalma süresi, maruz kalma sırasındaki hava sıcaklığı, rüzgârın hızı gibi çeşitli faktörlerdir. Bitki soğukluk sıcaklıklarına tepki gösterirken donma sıcaklıklarına (0°C'nin altı) karşı ise savaşmaktadır (Aslam & ark., 2022).

Düşük ya da donmayan sıcaklıklar bitki türlerinin üretkenliklerini, hayatta kalmalarını ve çevreyle ilgili dağılımlarını etkileyerek bitkilere zarar verebilir hatta öldürebilir (Adhikari & ark., 2022). Düşük sıcaklıklarda solunum, savunma, ikinci metabolizma, protein ve nükleik asit üretimi gibi çok sayıda süreç etkilenirken daha düşük sıcaklıklarda ise enzim ve diğer protein aktiviteleri azalarak bitkinin büyümesi yavaşlar (Zhang & ark., 2020). Düşük sıcaklıklar bitkilerde çeşitli fizyolojik hasarlara neden olur. Bitkiler için önemli olan membran bütünlüğü, fotosentez, gaz değişimi, terleme, taşıma ve geçirgenlik gibi ilgili işlevler soğuk kaynaklı etkilenmektedir. Soğuk stresi ile genel anlamda tohumların çimlenmesinde inhibisyon, CO_2 alımı, terleme ve klorofil içeriğinde azalmalar olur ve bu durum fotosentezi etkiler (Suprasanna & Ghag, 2019). Aynı şekilde düşük sıcaklık ile bitki hücrelerinde elektrolit sızıntısı ve plazmoliz gerçekleşir (Yadav & ark., 2020). Moleküler anlamda ise düşük sıcaklıklar RUBİSCO (ribuloz-1,5-bifosfat karboksilaz oksijenazın) büyük alt birimini inhibi eder ve sonuç olarak küçük alt birimi bozularak CO_2 fiksasyonunda bir azalma söz konusu olur (Liu & ark., 2012).

Soğuk stresi toleransına karşı nanopartiküller bitkilerdeki stresi azaltır. Soğuk stresi toleransındaki etkinlikleriyle TiO_2 ve kitosan nanopartikülleri çeşitli çalışmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Soğuk stresinde uygulanan kitosan nanopartikülleri muz bitkilerinde ozmoprotektanların birikmesiyle reaktif oksijen türlerinin (ROT) etkisini azaltır (Wang & ark., 2021). TiO_2 nanopartikülü meyan bitkilerinde soğuk stresinin zararlı etkilerini azaltarak glisirizin içeriğini artırır (Ghabel & Karamian, 2020). Benzer şekilde düşük sıcaklıklarda şeker kamışına uygulanan Si nanopartikülleri bitkilerin fotosentez yeteneğini iyileştirir (Elsheery & ark., 2020).

Nanopartiküller gen ifadesine müdahale ederek de etkili olurlar. Gen ifadesi değişikliği ile bitkinin hayatta kalması üzerinde önemli etkileri vardır. ZnO nanopartikülleri soğuk stresine maruz kalan pirinç bitkilerine eksojen olarak yapraktan uygulandığında transkripsiyon faktörleri aracılığıyla soğuk stresinin etkisini azaltır. Pirinçte ZnO nanopartiküllerinin yapraktan eksojen uygulaması, soğukla tedavi edilen fidelerin yapraklarında antioksidatif sistemin (*OsCu/ZnSOD1*, *OsCu/ZnSOD2*, *OsCu/ZnSOD3, OsPRX11, OsPRX65, OsPRX89, OsCATA* ve *OsCATB*) soğukla indüklenen gen ifadesini ve soğukla tepki veren transkripsiyon faktörlerini (*OsbZIP52, OsMYB4, OsMYB30, OsNAC5, OsWRKY76* ve *OsWRKY94*) indüklemiştir (Song & ark., 2021). Farklı nanopartiküller soğuk stres indükleyici/düzenleyici transkripsiyon faktörü ve geninin yukarı ve aşağı düzenlenmesiyle ilişkilidir. Soğuk stres düzenleyici genlerin ve transkripsiyon faktörlerinin ekspresyon seviyelerindeki artış, bitki stres toleransını iyileştirir ve bu da

bitkinin fizyolojik, moleküler ve biyokimyasal modifikasyonlarına olanak tanır.

3. Sıcaklık Stresi

Dünyanın ortalama sıcaklığı yüzyılın başlangıcından beri yükselmiştir. Dünyadaki sıcaklık artışından dolayı küresel ısınma çevreyi olumsuz etkileyebilmektedir (Shafgat & ark., 2021). Isı ya da yüksek sıcaklık stresi kavramı kritik sınırın üzerindeki sıcaklığın artması ile oluşmaktadır (Hu & ark., 2020). Sıcaklıkların ideal aralığı aştığı iklimlerde ürünler daha az verim vermeye başlar. Aşırı iklim değişikliği yüksek sıcaklıklara ve kuraklığa neden olarak tarıma ciddi zararlar verebilir ve ağaç popülasyonları için tehdit oluşturabilir (Steiner & ark., 2018). Aşırı değişiklikler sıcak yaz aylarında optimum büyüme için gerekli olan moleküller arası bağlantılara zarar verebilir ve bu da bitki gelişimini ve meyve tutumunu engelleyebilir (Bita & Gerats, 2013). Genel olarak ısı stresi fotosentetik süreçlerin etkinliğini azaltır, bitki yaşam döngüsünü kısaltır ve verimliliği düşürür (Zhao & ark., 2020). Isı stresi tropikal ve subtropikal bölgelerde tarla ürünü verimliliğini kısıtlayan önemli bir sorun haline gelebilir.

Isı stresi bitkilerin fizyolojik ve moleküler mekanizmalarını olumsuz yönde etkiler (Guha & ark., 2022). Isı stresi ROS üretimini artırır ve oksidatif strese neden olup, zar lipitlerinin dejenerasyonuna, hücresel homeostazı ve çeşitli metabolik süreçlerin bozularak bitkide hücre ölümünün gerçekleşmesini sağlar (Savicka & Skute, 2010). Ayrıca, ısı stresi fotosistem II ve elektron akışının bozulmasına, karbon fiksasyonunun azalmasına ve klorofil

bozunmasına neden olarak fotosentez sürecini bozar ve bitki büyümesini azaltır (Liu & ark., 2021).

Bitkilerin abiyotik streslere özellikle de ısı stresine karşı tolerans göstermelerine nanopartiküller yardımcı olabilir (Aghdam & ark., 2016). Stres koşulları altında nanopartiküllerin uygulanmasıyla bitki büyümesi ve işlevi sürdürülebilir. Nanopartiküllerin farklı konsantrasyonlardaki uygulamaları ısı stresinin bitkide göstermiş olduğu olumsuz etkisini azaltır, bitki büyümesini ve hidrasyonunu artırır (Ali & ark., 2021). Birden fazla çalışma, mahsul bitkilerinde ısı stresi toleransını iyileştirmek için nanopartiküllerin potansiyel uygulamasını ortaya koymuştur (Thakur & ark., 2021). Yüksek sıcaklıklara maruz kalan ekmeklik buğdaya (*Triticum aestivum* L.) Se nanopartikül uygulaması bitki büyümesini, fotosentez hızını ve gaz değişimini iyileştirerek bitki verimliliğini artırdığı gösterilmiştir (El-Saadony & ark., 2021). Domates bitkilerine uygulanan TiO_2 nanopartikülleri ısı stresini stoma açılması yoluyla önemli derecede azalttığı ifade edilmiştir (Qi & ark., 2013). Benzer şekilde Zn nanopartikülleri lipid peroksidasyonunu azaltarak, antioksidan enzimlerin üretimini artırıp buğdayın ısı stresine karşı dayanma yeteneğini iyileştirmede yardımcı olmuştur (Hassan & ark., 2018). Yüksek sıcaklık stresi altında, Zn ve Fe nanopartikül uygulamaları bitkilerde antioksidan enzim aktivitesini iyileştirdiği belirtilmiştir (Tului & ark., 2021).

Moleküler anlamda gen ifadesi ve dolayısıyla enzimler ve protein üretimi aracılığıyla gerçekleşen bitki stres tepkisinin düzenlenmesi, tarımsal ürünlerdeki verimliliği doğrudan etkiler. Birçok gen, transkripsiyon faktörü ve protein, ısı stres toleransından sorumludur. Gen ifadelerinin artması veya azalması, bitkinin hayatta

kalması üzerinde doğrudan bir etkiye sahiptir. Isı stresi altında Si nanopartikül uygulaması buğday fidelerinde *TaPIP1* ve *TaNIP2* aquaporin genlerinin aşırı ekspresyonunu tetikleyip bağıl su içeriğini artırması gösterilmiştir(Younis & ark., 2020). Benzer şekilde ısı stresine maruz bırakılan *Arabidopsis thaliana* fidelerine uygulanan ZnO nanopartikülleri *TGS-GUS* genlerinin ekspresyonunda azalmaya sebebiyet verdiği ifade edilmektedir (Wu & Wang, 2020).

4. Tuz Stresi

Mahsul üretiminin sürdürülebilirliği toprak tuzluluğu ile ilişkilidir. Dünya geneline baktığımızda ekili arazilerin %20'lik kısmı tuzluluk tehdidi ile karşı karşıyadır ve bu oran gittikçe artmaktadır. 4 dS/m^{-1}'den fazla suda çözünür tuz konsantrasyonuna sahip toprak tuzlu olarak ifade edilir. Küresel ısınmanın neden olduğu su kıtlığı problemi, dünyadaki tüm tarım arazilerinde tuzlu su ile sulama yapılmasını zorunlu hale getirerek topraktaki tuz içeriği miktarının artmasına neden olmaktadır. Toprakta aşırı tuz birikmesi modern tarımda karşılaşılan zorluklardan olup, azalan toprak ozmotik kabiliyeti, besin dengesizlikleri ve bazik iyonik toksisitede (tuz stresi) artış nedeniyle bitkilerinbüyüme ve gelişmeleri doğrudan engellenmektedir. (Ahmed & ark., 2016; Isayenkov & Maathuis, 2019). Tuz içeriğinin 200 mM'den yüksek olması durumunda çoğu bitki ölür. Bitkinin yaşam döngüsü içerisinde yer alan tohum çimlenmesi, fide gelişimi, vejetatif büyüme, çiçeklenme gibi her aşamada tuzluluk önemli bir etkiye sahiptir (Mohamed & ark., 2022). Tuz stresi su stresine, ozmotik strese, hücresel redoks homeostazını bozan yüksek ROS birikimine, besin stresine, hücre bölünmesinin azalmasına, iyonik gücün dengesizleştirilmesi gibi çeşitli bozulmalara neden olur. Bu

durumlar, bir dizi fizyolojik, biyokimyasal ve metabolik süreçleri etkileyebilmektedir(Latef & ark., 2018; Sinha & Verma, 2021).

Bitkilerin tuz stresine karşı vermiş oldukları yanıtları oldukça karmaşıktır. Bu yanıtlar çözünen maddenin türüne, uygulama konsantrasyonuna, genetik yapıya, stresin türüne ve uygulama şiddeti gibi çeşitli faktörlere bağlı olarak değişiklik gösterir (Khalid & ark., 2022). Bununla beraber tuz stresinin türü ve uygulanan dozuna göre bitki hücreleri farklı şekilde yanıtlar verir. Tuz stresine karşı kendilerini korumak adına bitkiler fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler süreçler ile düzenlenebilir (Khalid & ark., 2020). Bu düzenlemeler, antioksidan ve hormonal düzenleme, ozmotik koruma ve gen ifadesindeki değişiklikler gibi çeşitli mekanizmalardır (Hanin & ark., 2016).

Tuz stresinin bitkiler üzerindeki olumsuz etkilerini minimuma indirmek adına çeşitli stratejiler geliştirilmiştir. Son dönemde tuz stresi altında bitkilerde büyümeyi ve hayatta kalmayı iyileştirmek için nanopartiküller etkili bir araç olarak büyük ilgi görmüştür (Ahmad & Akhtar, 2019). Çeşitli çalışmalarda nanopartiküllerin tuz stresi altındaki bitkiler üzerinde yararlı etkileri olduğu bildirilmiştir (Zulgiqar & Ashraf, 2021). Nanopartiküller bitkiler tarafından kökler ve yapraklar aracılığıyla emilirler. Nanopartiküller bitkilerde antioksidan enzim aktivitesini, gen ifadesini, savunma sistemi fonksiyonlarını etkileyerek tuz stresine karşı vereceği tepkileri değiştirebilmektedir. Tabi bu etkiler uygulanan nanopartikülün boyutuna, şekline, konsantrasyon dozuna, çevre koşullarına ve bitkinin farklı türlerine bağlı olarak değişebilmektedir (Wahid & ark., 2020).

Nanopartiküllerin yüksek doz konsantrasyonlarının bitki dokularında, büyüme ve gelişmede toksik ve olumsuz etki oluşturduğu da bilinmektedir. Tuz stresinin toksik etkilerini azaltmada Zn, Ag, SiO_2, Cu, Fe, Mn, C, Ti, Ce, K nanopartiküllerinin uygulanmasının etkili olduğu bildirilmiştir (Zulfiqar & Ashraf, 2021). Tuz stresi altında en çok etkilenen süreçlerden biri fotosentezdir (Hnilickova & ark., 2021). Nanopartiküllerin yapraktan uygulamasının yapılması ışık hasadı için daha fazla karmaşık sentezler ve fotosentez ile ışık emiliminde artış gerçekleşir. Klorofil içeriğindeki artışın nanopartikül uygulamasıyla önemli derecede arttığını bildiren çalışmalar söz konusudur (Ali & ark., 2021). Bitkiler üzerinde tuz stresinin etkilerini inceleyen farklı çalışmalara göre nanopartiküller fotosentetik pigmentlerin içeriğini artırarak fotosentezi artırırlar (Singh & ark., 2021). Nanopartiküller besin maddelerinin alınımı, taşınması gibi etkiler göstererek bitki beslenmesinde iyileştirici bir rol oynayabilir (Kopittke & ark., 2019). Bir bitkiye nanopartikül ilave edilmesiyle, tuz stresi altındaki bir bitkininbüyümesi ozmotik potansiyel artırılarak iyileştirilebilir (Tahjib & ark., 2019).

Bitkilerin abiyotik streslere karşı yanıt olarak ROS ürettiği çok iyi bilinmektedir. Tuz stresi altındaki bitki hücrelerindeki aşırı ROT birikimiyle başa çıkabilmek için bitkiler antioksidan enzimler geliştirir (You & Chan, 2015). Nanopartiküllerin antioksidan enzim seviyelerini artırdığı birçok çalışmada bildirilmiştir (Gonzalez & ark., 2021). Nanopartiküller antioksidan özelliğe sahiptirler ve bitkilere oksidatif stresin yol açtığı koşulların üstesinden gelmelerinde yardımcı olurlar. Tuz stresi altında *Dracocephalum moldavica* (Moldovya ejderi) TiO_2 nanopartikül uygulaması

antioksidan içeriğini artırır ve H_2O_2 konsantrasyonunu azaltır (Gohari & ark., 2020). Benzer şekilde Ag nanopartikülleri tuz stresi altında CAT, SOD ve GPX antioksidan enzimlerini artırarak ve bitkideki büyüme özelliklerinin görülmesine neden olur (Khan & ark., 2020).

Nanopartiküller tarafından etkilenen mekanizmaların moleküler düzeyde değerlendirilmelisi oldukça önemlidir (Ali & ark., 2021). Nanopartiküller tuz stresinin gen ifadesini etkileyerek ve bunun da hücre ürünlerinin çeşitli kısımlarındaki gen ifadesini değiştirerek bitki büyümesini destekler. Tuz stresi altında kolza (*Brassica napus* L.) bitkilerine yapraktan uygulanan Zn nanopartikülü *SKRD2, MYC* ve *MPK4* gibi bazı genlerin ifadesini azaltırken, fizyolojik ve hormonal tepkiler ve transkripsiyon faktörleri ile ilişkili *ARP* ve *MPK* ve bitki hücrelerinde abiyotik stres toleransında rol oynayan *MYC* ve *SKRD2* gibi diğer genlerin ifadesini artırır (Hezaveh & ark., 2019). Benzer şekilde hint kenevirine (*Cannabis sativa* L.) tuz stresi altında uygulanan Si nanopartikülleri bitkinin büyümesi ve moleküler değişimlerini iyileştirir (Guerriero & ark., 2021). Bu alanda yapılan çalışamalar neticesinde, nanopartiküllerin bitkilere uygulanmasının tuz stresinin zararlı etkilerini önemli ölçüde azaltabileceği ve böylece bitki adaptasyonlarını da kontrol edebileceği düşünülmektedir.

5. Kuraklık Stresi

Kronik bir abiyotik stres olarak değerlendirilen kuraklık en zararlı çevresel stres olarak kabul edilmektedir. Hükümetler Arası İklim Değişikliği Paneli'ne (IPCC) göre, 2100 yılına kadar ortalama sıcaklıkların 1,8 ile 4,0 ^{o}C artacağı ve kuraklığın dünyanın geniş alanlarını etkileyeceği bildirilmiştir (Ozturk & ark., 2021). Yağışın

az olması ya da nemdeki önemli değişikliklerin kuraklığa neden olması tarım ve ormancılığı engellemektedir. Çeşitli streslere maruz kalan bitkilerin kuraklık stresi nedeniyle gelişim aşamalarında özellikle morfolojileri olumsuz etkilenmekte ve bitkilerdeki ürün kayıplarının 2025 yılına kadar küresel çapta %30'a ulaşması öngörülmektedir. Bunanla birlikte su kıtlığının çok fazla olacağı öngörüldüğünden kuraklık stresi çok şiddetli bir şekilde tarım için sorun teşkil etmektedir.

Bir bitki için su ihtiyacının karşılanamaması durumu kuraklık olarak ifade edilir (Salehi-Lisar & Bakhshayeshan-Agdam, 2016). Kuraklık stresi sonucu bitkiler mevcut su durumlarını korumak adına anatomi, morfoloji, fizyoloji ve biyokimyasal ayarlamalar ile su kaybını azaltmaya çalışırlar (Chaudhry & Sidhu, 2022). Çeşitli fizyolojik ve biyokimyasal süreçler (fotosentez, solunum, enzimatik aktivite, besin metabolizması vs.) kuraklık stresi tarafından değiştirilir ve bitkinin büyümesi etkilenir. Kuraklık stresinin bitkiler üzerindeki başlıca etkileri arasında daha küçük yapraklar, buna karşın daha uzun sap ve kökler ile yavaş hücre bölünmesi, düzensiz stoma salınımları, düşük mahsul üretimi, verimsiz su kullanımı yer alır (Farooq & ark., 2012). Kuraklık nedeniyle meydana gelen su stresi yaprak stoma fonksiyonlarını etkiler ve gaz alışverişini sınırlayarak terleme ve karbon asimilasyonu azalmasına neden olur (Schulze & ark., 2019).

Bitkilerin kuraklık stresine karşı verdiği tepkiler kuraklık stresinin süresine, yoğunluğuna, bitkinin türüne, yaşına ve büyüme aşamasına bağlı olarak değişiklik gösterir ve bunlar bitkinin kuraklığa verdiği tepkiyi etkileyen temel faktörlerdir (Gray & Brady, 2016). Moleküler düzeyde kuraklık stresine verilen yanıt sinyal

iletim yoluyla gerçekleşir. Transkripsiyon faktörü, iyon taşınımı ve ABA sinyal iletimi bitkilerin yanıtında yer alan moleküler mekanizmalardır (Prakash & ark., 2019). Kök ve yaprağın fiziksel yapıları kuraklık stresiyle başa çıkmada yetersiz kaldığında bitkiler su kullanımını artırmak için çapraz konuşma yoluyla sinyalleri ve proteinleri kodlayan genleri dâhil eder böylelikle birçok başka geni ifade ederek bitki iyileştirmesini sağlar (Shahid & ark., 2020).

Bitkilerde abiyotik stres koşullarında tolerans mekanizmalarını artırarak ürün verimini düzenleyen nanopartiküller, kuraklık stresi üzerindede fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler düzeyde kuraklık stresi ile ilgili genlerin ifadesini düzenleyerek strese karşı hafifletici etki yaratırlar. Nanopartiküller kuraklık stresine maruz kalan bitkilerin fotosentetik aktivitelerini artırarak kök uzamasını sağlar. Nanopartiküller stomaların kapanması yoluyla ABA birikiminden kaynaklanan yaprak su kaybını azaltır. Nanopartiküller reaktif oksijen türlerini azaltarak, antioksidan savunma sistemlerini aktive ederek oksidatif stresin yaratmış olduğu hasarı azaltır. Kuraklık stresi altındaki bitkiye çinko oksit (ZnO), demir oksit (Fe_3O_4) ve titanyum dioksit (TiO_2) metal oksit nanopartiküllerinin uygulaması bitkinin fizyolojik ve metabolik aktivitelerini artırdığı bildirilmiştir (Alabdallah & ark., 2021). Si nanopartikülü kuraklık stresine maruz kalan nar bitkilerinde fotosentetik pigmentlerde, fenolik içeriklerde, ozmolit birikiminde, antioksidan enzim konsantrasyonlarında iyileştirme yapar (Zahedi & ark., 2021). Benzer şekilde Si nanopartikülü buğday bitkilerinde kuraklık stresini azaltır (Rizwan & ark., 2019). ZnO nanopartikülü ile kuraklık stresi altında yapılan çalışmalarda domatesin strese karşı toleransının artırılabileceği, aynı şekilde

buğdayın büyüme ve fizyolojik etkileri üzerine ZnO nanopartikülünün iyileştirici etki ettiği bildirilmiştir (Khan & ark., 2020; El-Zohri & ark., 2021).

Bitkilere aşırı nanopartikül uygulamaları yapılması durumunda oksidatif stres oluşumu, yani hücre döngüsünün durması, programlanmış hücre ölümü, protein düzenlemesi ve antioksidan enzimlerin indüksiyonu gibi olumsuz sonuçlar ortaya çıkabilir (Jalil & Ansari, 2019). Nanopartikül ile tedavi edilen bitkilerde kuraklık stresinde artış gösteren MDA ve H_2O_2'de önemli azalmalar olur (Ahmad & ark., 2019). Transkriptomik ve proteomik çalışmalar, nanopartiküllerin çeşitli bitki türleri üzerindeki etkilerini moleküler düzeyde derinlemesine araştırmıştır. Fizyolojik ve morfolojik etkiler nanopartiküllerin türüne, boyutuna, şekline ve kullanılan doza, bağlı olduğu bildirilmiştir. Biyotik ve abiyotik stresler dâhil olmak üzere farklı çevresel stres koşullarına karşı bitki toleransının artması sağlayan gen ifadelerine bakıldığında P5CS geninin ifadesinin prolin biyosentezini kodladığı, MAP kinaz gen ailesinin bir üyesi olan *MAPK2, Ca21'nin* reaktif oksijen türlerine yanıt olarak antioksidan mekanizmaları düzenlemede önemli rol oynadığı bildirilmiştir. Kuraklık stresinde *AREB/ABF* bitkiye direnç kazandırmada absisik asit kodlayan *AREB* geninin düzenlenmesinde gerekli transkripsiyonel düzenleyicilerdir. Öte yandan, *TAS14* gen ekspresyonundaki azalmaozmotik basıncı azaltır ve çözünen maddelerin agregasyonunu artırarak bitki türlerini kuraklık stresine karşı daha dirençli hale getirir. *Arabidopsis* bitkilerine uygulanan Ag nanopartikülü ile ilgili çalışmalar, nanopartikülün genlerin aşırı ekspresyonuna ve oksin ile ilgili genlerin ekspresyon seviyelerinde azalmaya neden olduğu bildirilmiştir (Perez-de-Luque, 2017; Perez-

Labrada & ark., 2020). Benzer şekilde kolza (*Brassica rapa* L.) bitkilerinde Ag nanopartikülü fenolikle ilgili genlerin metabolik yollarını düzenlediği, karetenoid genlerini inhibe ettiği gösterilmiştir (Thiruvengadam & ark., 2015). Kuraklık stresi altında soya fasulyesine (*Glycine max* L.) uygulanan dört farklı nanopartikül (Fe, Cu, Co ve Zn) bazı kuraklık stresi belirteç genlerini (*GmRD20A, GmDREB2, GmERD1, GmFDL19, GmNAC11, GmWRKY27, GmMYB118* ve *GmMYB174*) hem köklerde hem yaprakta yüksek ekspresyon göstererek, soya fasulyesi bitkilerinin erken vejetatif aşamada kuraklık stresine uyum sağlamasına etkili bir şekilde yardımcı olmuştuğu ifade edilmiştir (Linh & ark., 2020).

6. Su Baskını Stresi

Toprakta aşırı su birikmesi su baskınlarına yol açmaktadır. Çoğu bitki su baskınlarına karşı hassastır. Su baskını stresi kötü sulama, kötü toprak drenajı veya aşırı yağış ile oluşur. Su baskını stresi abiyotik stres faktörlerinden biridir. Çeşitli ekosistemlerde yetişen bitkiler su baskını stresine karşı farklı tepkiler verirler. Örneğin; kurak arazi bitki türleri su baskını stresine karşı hassas iken, sulak alan bitki türleri sürgün su altında kalmaya ve toprak su birikmesine karşı tolerans göstermektedir. Su baskını stresi altında toprağın pH'ı ve redoks potansiyeli etkilenir, karbondioksit içeriği artar, fitotoksinler harekete geçer ve bu da kök metabolizmasını, besin alımını kısacası bitki büyüme ve gelişmesini etkiler (Baıley-Serres & ark., 2014).

Nanopartiküllerin bitkilerde su baskını stresini hafiflettiği bildirilmiştir. Su baskını stresi altındaki soya fasulyesi bitkilerinde, Ag nanopartikülleri aminoasit sentezini, proteinleri, glikolizi ve mum oluşumunu düzenleyerek stres koşullarını hafifletmeye

yardımcı olmuş ve soya fasulyesi bitkilerinin büyümesini artırmıştır (Mustafa & ark., 2016). Taşkın stresi altındaki soya fasulyesi bitkileri üzerinde yapılan başka bir nanopartikül çalışmasında Al_2O_3 nanopartikülleri hipokotilde dâhil olmak üzere kök uzunluğunu artırmış, glikolize dâhil olan proteinleri bastırmış, askorbat/glutatyon yolunu (AsA/GSH) yukarı düzenleyerek ROT'un temizlenmesinde yer alan hücreleri tahkim etmiş ve ribozomal proteinleri artırmıştır (Mustafa & Komatsu, 2021).

7. Sonuç

Çok disiplinli bir yaklaşım olan nanoteknoloji, tıp, tarım, endüstri, çevre, elektronik gibi çeşitli alanlarda devrim yaratmaktadır. Nanoteknoloji tarımı, beslenme yoksulluğu ve gıda kıtlığının üstesinden gelecek araçlarla güçlendirerek tarım için önemli bir araç olmaktadır. Nanoteknoloji, bitkilerde abiyotik stres toleransı ile ilgili olarak yaygın olarak kullanılmaktadır. Nanoteknolojinin kullanımı ve sürdürülebilirliliği, mahsul verimliliği ve abiyotik streslerin üstesinden gelinmesi, kayıpların en aza indirilmesi ve verimin artırılması için avantaj sağlayacaktır..

Nanoteknoloji, fizyolojik çalışmaları tamamlamak için bitkilerde çeşitli abiyotik stres toleransı mekanizmasına yeni bakış açıları vaat etmektedir. Nanopartiküller daha küçük boyut ve yüksek reaktivite göstermeleri nedeniyle, nano gübreler, nano herbisitler veya nano pestisitler gibi herhangi bir formlarında bitkiler tarafından kolayca emilir. Nanopartiküller kimyasal yapılarına, boyutlarına, yüzey alanlarına ve hassasiyetlerine bağlı olarak bitkilerle çeşitli şekillerde etkileşime girerler. Bu etkileşimler ciddi morfolojik, anatomik ve fizyolojik değişikliklere neden olur ve mahsul bitkilerini iyileştirmek için çok önemlidir. Nanopartiküllerin

abiyotik stres yönetiminde kullanılmasının faydalı etkilerinden bazılarıda büyümede, biyokütle üretiminde, klorofil içeriğinde, şeker seviyesinde, ozmolit birikiminde ve antioksidan üretiminde iyileşme, protein ve klorofil içeriğini yükselten ve azot metabolizmasını teşvik eden stresle ilişkili genlerin ifadesindeki artıştır.

Nanopartiküllerin abiyotik stres toleransındaki etkinliği iyi belgelenmiş olsa da, bu çalışmaların çoğu hala laboratuvar aşamasındadır. Nanopartiküllerin yaygın kullanımı, çevre üzerindeki potansiyel olumsuz etkileri ve ayrıca yenilebilir bitki parçalarında nanopartikül birikimi olasılığı konusunda endişelere yol açmıştır. Bu nedenle, nanopartiküllerin ve nanogübrelerin biyotik ve abiyotik ekosistem bileşenleri üzerindeki etkilerini değerlendirmek için uygun değerlendirme metodolojileri oluşturmayı amaçlayan odaklanmış araştırmalara ihtiyaç vardır. Ayrıca, nanopartiküllerin insanlar üzerindeki etkisi ve kabul edilebilir sınırların belirlenmesi de gereklidir. Nanopartikül uygulama mekanizmalarının etkisini anlamanın en etkili yolu, nanoteknoloji ile birlikte moleküler biyoloji, bitki fizyolojisi, bitki ıslahı, sitoloji, toprak fiziği gibi çeşitli disiplinlerle iş birliği yaparak mevcut bilgiyi uygulamaktır. Bu tür birliktelikler, dünya çapında yürütülebilecek çok disiplinli projelerin teşvik edilmesine yardımcı olabilir. Gelecekteki çalışmalar, nanoteknolojiyi laboratuvardan tarım alanlarına ticarileştirmek için uygun fiyatlı, toksik olmayan, ekolojik olarak güvenli ve kendi kendine parçalanabilen nanopartiküller tasarlamaya odaklanmalıdır.

Kaynakça

Adhikari, L., Baral, R., Paudel, D., Min, D., Makaju, S. O., Poudel, H. P., & Missaoui, A. M. (2022). Cold stress in plants: Strategies to improve cold tolerance in forage species. *Plant Stress*, *4*, 100081.

Aghdam, M. T. B., Mohammadi, H., & Ghorbanpour, M. (2016). Effects of nanoparticulate anatase titanium dioxide on physiological and biochemical performance of Linum usitatissimum (*Linaceae*) under well-watered and drought stress conditions. *Brazilian journal of botany*, *39*, 139-146.

Ahmad, B., Zaid, A., Zulfiqar, F., Bovand, F., & Dar, T. A. (2023). Nanotechnology: A novel and sustainable approach towards heavy metal stress alleviation in plants. *Nanotechnology for Environmental Engineering*, *8*(1), 27-40.

Ahmad, I. & Akhtar, M.S. (2019). Use of nanoparticles in alleviating salt stress. In *Salt Stress, Microbes, and Plant Interactions: Causes and Solution* (pp. 199–215). Berlin/Heidelberg, Germany: Springer., ;.

Ahmad, J., Ali, A. A., Baig, M. A., Iqbal, M., Haq, I., & Qureshi, M. I. (2019). Role of phytochelatins in cadmium stress tolerance in plants. *Cadmium toxicity and tolerance in plants*, 185-212.

Ahmad, J., Qamar, S., Kausar, N., & Qureshi, M. I. (2020). Nanoparticles: the magic bullets in mitigating drought stress in plants. *Nanobiotechnology in Agriculture: An Approach Towards Sustainability*, 145-161.

Ahmed, M. Z., Gul, B., Khan, M. A., & Watanabe, K. N. (2016). Characterization and function of sodium exchanger genes in Aeluropus lagopoides under NaCl stress. In *Halophytes for food security in dry lands* (pp. 1-16). Academic Press.

Ahmed, T., Noman, M., Ijaz, M., Ali, S., Rizwan, M., Ijaz, U., ... & Li, B. (2021). Current trends and future prospective in nanoremediation of heavy metals contaminated soils: A way forward towards sustainable agriculture. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *227*, 112888.

Alabdallah, N. M., Hasan, M. M., Hammami, I., Alghamdi, A. I., Alshehri, D., & Alatawi, H. A. (2021). Green synthesized metal oxide nanoparticles mediate growth regulation and physiology of crop plants under drought stress. *Plants*, *10*(8), 1730.

Ali, S., Mehmood, A., & Khan, N. (2021). Uptake, translocation, and consequences of nanomaterials on plant growth and stress adaptation. *Journal of Nanomaterials*, *2021*(1), 6677616.

Ali, S., Mir, R. A., Tyagi, A., Manzar, N., Kashyap, A. S., Mushtaq, M., ... & Bae, H. (2023). Chromium toxicity in plants: signaling, mitigation, and future perspectives. *Plants*, *12*(7), 1502.

Arbona, V., Manzi, M., Zandalinas, S. I., Vives-Peris, V., Pérez-Clemente, R. M., & Gómez-Cadenas, A. (2017). Physiological, metabolic, and molecular responses of plants to abiotic stress. *Stress Signaling in Plants: Genomics and Proteomics Perspective, Volume 2*, 1-35.

Aslam, M., Fakher, B., Ashraf, M. A., Cheng, Y., Wang, B., & Qin, Y. (2022). Plant low-temperature stress: Signaling and response. *Agronomy*, *12*(3), 702.

Azeez, N. A., Dash, S. S., Gummadi, S. N., & Deepa, V. S. (2021). Nano-remediation of toxic heavy metal contamination: Hexavalent chromium [Cr (VI)]. *Chemosphere*, *266*, 129204.

Bailey-Serres, J. , & Colmer, T. D. (2014). Plant tolerance of flooding stress–recent advances. *Plant, Cell & Environment*, *37*(10), 2211-2215.

Bita, C. E., & Gerats, T. (2013). Plant tolerance to high temperature in a changing environment: scientific fundamentals and production of heat stress-tolerant crops. *Frontiers in plant science*, *4*, 273.

Chaudhry, S., & Sidhu, G. P. S. (2022). Climate change regulated abiotic stress mechanisms in plants: A comprehensive review. *Plant Cell Reports*, *41*(1), 1-31.

Cramer, G. R., Urano, K., Delrot, S., Pezzotti, M., & Shinozaki, K. (2011). Effects of abiotic stress on plants: a systems biology perspective. *BMC Plant Biology*, *11*, 1-14.

El-Saadony, M. T., Saad, A. M., Najjar, A. A., Alzahrani, S. O., Alkhatib, F. M., Shafi, M. E., ... & Hassan, M. A. (2021). The use of biological selenium nanoparticles to suppress *Triticum aestivum* L. crown and root rot diseases induced by Fusarium species and improve yield under drought and heat stress. *Saudi Journal of Biological Sciences*, *28*(8), 4461-4471.

Elsheery, N. I., Sunoj, V. S. J., Wen, Y., Zhu, J. J., Muralidharan, G., & Cao, K. F. (2020). Foliar application of nanoparticles mitigates the chilling effect on photosynthesis and photoprotection in sugarcane. *Plant Physiology and Biochemistry*, *149*, 50-60.

El-Zohri, M., Al-Wadaani, N. A., & Bafeel, S. O. (2021). Foliar sprayed green zinc oxide nanoparticles mitigate drought-induced oxidative stress in tomato. *Plants*, *10*(11), 2400.

Emamverdian, A., Ding, Y., Mokhberdoran, F., & Xie, Y. (2015). Heavy metal stress and some mechanisms of plant defense response. *The Scientific World Journal*, *2015*(1), 756120.

Farooq, M., Hussain, M., Wahid, A., & Siddique, K. H. M. (2012). Drought stress in plants: an overview. *Plant responses to drought stress: From Morphological to Molecular Features*, 1-33.
Ghabel, V. K., & Karamian, R. (2020). Effects of TiO_2 nanoparticles and spermine on antioxidant responses of *Glycyrrhiza glabra* L. to cold stress. *Acta Botanica Croatica*, *79*(2), 137-147.

Gohari, G., Mohammadi, A., Akbari, A., Panahirad, S., Dadpour, M. R., Fotopoulos, V., & Kimura, S. (2020). Titanium dioxide nanoparticles (TiO_2 NPs) promote growth and ameliorate salinity stress effects on essential oil profile and biochemical attributes of *Dracocephalum moldavica*. *Scientific Reports*, *10*(1), 912.

González-García, Y., Cárdenas-Álvarez, C., Cadenas-Pliego, G., Benavides-Mendoza, A., Cabrera-De-La-Fuente, M., Sandoval-Rangel, A., ... & Juárez-Maldonado, A. (2021). Effect of three

nanoparticles (Se, Si and Cu) on the bioactive compounds of bell pepper fruits under saline stress. *Plants*, *10*(2), 217.

González-García, Y., González-Moscoso, M., Hernández-Hernández, H., Méndez-López, A., & Juárez-Maldonado, A. (2021). Induction of stress tolerance in crops by applying nanomaterials. *Nanotechnology in Plant Growth Promotion and Protection: Recent Advances and Impacts*, 129-169.

Gray, S. B., & Brady, S. M. (2016). Plant developmental responses to climate change. *Developmental Biology*, *419*(1), 64-77.

Guerriero, G., Sutera, F. M., Torabi-Pour, N., Renaut, J., Hausman, J. F., Berni, R., ... & Saffie-Siebert, S. (2021). Phyto-courier, a silicon particle-based nano-biostimulant: evidence from Cannabis sativa exposed to salinity. *ACS Nano*, *15*(2), 3061-3069.

Guha, A., Vharachumu, T., Khalid, M. F., Keeley, M., Avenson, T. J., & Vincent, C. (2022). Short-term warming does not affect intrinsic thermotolerance but induces strong sustaining photoprotection in tropical evergreen citrus genotypes. *Plant, Cell & Environment*, *45*(1), 105-120.

Guha, T., Barman, S., Mukherjee, A., & Kundu, R. (2020). Nano-scale zero valent iron modulates Fe/Cd transporters and immobilizes soil Cd for production of Cd free rice. *Chemosphere*, *260*, 127533.

Hanin, M., Ebel, C., Ngom, M., Laplaze, L., & Masmoudi, K. (2016). New insights on plant salt tolerance mechanisms and their potential use for breeding. *Frontiers in Plant Science*, *7*, 1787.

Hassan, N. S., Salah El Din, T. A., Hendawey, M. H., Borai, I. H., & Mahdi, A. A. (2018). Magnetite and zinc oxide nanoparticles alleviated heat stress in wheat plants. *Current Nanomaterials*, *3*(1), 32-43.

Hezaveh, T. A., Pourakbar, L., Rahmani, F., & Alipour, H. (2019). Interactive effects of salinity and ZnO nanoparticles on physiological and molecular parameters of rapeseed (*Brassica napus* L.). *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, *50*(6), 698-715.

Hnilickova, H., Kraus, K., Vachova, P., & Hnilicka, F. (2021). Salinity stress affects photosynthesis, malondialdehyde formation, and proline content in *Portulaca oleracea* L. *Plants*, *10*(5), 845.

Hu, S., Ding, Y., & Zhu, C. (2020). Sensitivity and responses of chloroplasts to heat stress in plants. *Frontiers in Plant Science*, *11*, 375.

Hussain, A., Ali, S., Rizwan, M., Rehman, M. Z. U., Qayyum, M. F., Wang, H., & Rinklebe, J. (2019). Responses of wheat (*Triticum aestivum*) plants grown in a Cd contaminated soil to the application of iron oxide nanoparticles. *Ecotoxicology and Environmental safety*, *173*, 156-164.

Iravani, S. (2011). Green synthesis of metal nanoparticles using plants. *Green chemistry*, *13*(10), 2638-2650.

Isayenkov, S. V., & Maathuis, F. J. (2019). Plant salinity stress: many unanswered questions remain. *Frontiers in Plant Science*, *10*, 80.

Jalil, S. U., & Ansari, M. I. (2019). Nanoparticles and abiotic stress tolerance in plants: synthesis, action, and signaling mechanisms. *Plant Signaling Molecules*, 549-561.

Jin, C., Fan, J., Liu, R., & Sun, R. (2015). Single and joint toxicity of sulfamonomethoxine and cadmium on three agricultural crops. *Soil and Sediment Contamination: An International Journal*, *24*(4), 454-470.

Kandhol, N., Jain, M., & Tripathi, D. K. (2022). Nanoparticles as potential hallmarks of drought stress tolerance in plants. *Physiologia Plantarum*, *174*(2), e13665.

Kaphle, A., Navya, P. N., Umapathi, A., & Daima, H. K. (2018). Nanomaterials for agriculture, food and environment: applications, toxicity and regulation. *Environmental Chemistry Letters*, *16*, 43-58.

Khalid, M. F., Hussain, S., Anjum, M. A., Ali, M. A., Ahmad, S., Ejaz, S., ... & Morillon, R. (2020). Efficient compartmentalization and translocation of toxic minerals lead tolerance in volkamer lemon tetraploids more than diploids under moderate and high salt stress. *Fruits*, *75*(5), 204-215.

Khalid, M. F., Morillon, R., Anjum, M. A., Ejaz, S., Rao, M. J., Ahmad, S., & Hussain, S. (2022). Volkamer lemon tetraploid rootstock transmits the salt tolerance when grafted with diploid kinnow mandarin by strong antioxidant defense mechanism and efficient osmotic adjustment. *Journal of Plant Growth Regulation*, *41*(3), 1125-1137.

Khan, I., Raza, M. A., Awan, S. A., Shah, G. A., Rizwan, M., Ali, B., ... & Huang, L. (2020). Amelioration of salt induced toxicity in pearl millet by seed priming with silver nanoparticles (AgNPs): The oxidative damage, antioxidant enzymes and ions uptake are major determinants of salt tolerant capacity. *Plant Physiology and Biochemistry*, *156*, 221-232.

Khan, I., Saeed, K., & Khan, I. (2019). Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arabian Journal of Chemistry*, *12*(7), 908-931.

Khan, Z. S., Rizwan, M., Hafeez, M., Ali, S., Adrees, M., Qayyum, M. F., ... & Sarwar, M. A. (2020). Effects of silicon nanoparticles on growth and physiology of wheat in cadmium contaminated soil under different soil moisture levels. *Environmental Science and Pollution Research*, *27*, 4958-4968.

Kopittke, P. M., Lombi, E., Wang, P., Schjoerring, J. K., & Husted, S. (2019). Nanomaterials as fertilizers for improving plant mineral nutrition and environmental outcomes. *Environmental Science: Nano*, *6*(12), 3513-3524.

Latef, A., AH, A., Srivastava, A. K., El-sadek, M. S. A., Kordrostami, M., & Tran, L. S. P. (2018). Titanium dioxide nanoparticles improve growth and enhance tolerance of broad bean plants under saline soil conditions. *Land Degradation & Development*, *29*(4), 1065-1073.

Lin, D., & Xing, B. (2008). Root uptake and phytotoxicity of ZnO nanoparticles. *Environmental Science & Technology*, *42*(15), 5580-5585.

Linh, T. M., Mai, N. C., Hoe, P. T., Lien, L. Q., Ban, N. K., Hien, L. T. T., ... & Van, N. T. (2020). Metal-based nanoparticles enhance drought tolerance in soybean. *Journal of Nanomaterials*, *2020*, 4056563.

Liu, J., Li, G., Chen, L., Gu, J., Wu, H., & Li, Z. (2021). Cerium oxide nanoparticles improve cotton salt tolerance by enabling better ability to maintain cytosolic K^+/Na^+ ratio. *Journal of Nanobiotechnology*, *19*(1), 153.

Liu, Y. F., Qi, M. F., & Li, T. L. (2012). Photosynthesis, photoinhibition, and antioxidant system in tomato leaves stressed by low night temperature and their subsequent recovery. *Plant Science*, *196*, 8-17.

Manoj, S. R., Karthik, C., Kadirvelu, K., Arulselvi, P. I., Shanmugasundaram, T., Bruno, B., & Rajkumar, M. (2020). Understanding the molecular mechanisms for the enhanced phytoremediation of heavy metals through plant growth promoting rhizobacteria: A review. *Journal of Environmental Management*, *254*, 109779.

Mohamed, H. I., Sajyan, T. K., Shaalan, R., Bejjani, R., Sassine, Y. N., & Basit, A. (2022). Plant-mediated copper nanoparticles for agri-ecosystem applications. In *Agri-waste and microbes for production of sustainable nanomaterials* (pp. 79-120). Elsevier.

Mohanta, T. K., Bashir, T., Hashem, A., Abd_Allah, E. F., Khan, A. L., & Al-Harrasi, A. S. (2018). Early events in plant abiotic stress signaling: interplay between calcium, reactive oxygen species

and phytohormones. *Journal of Plant Growth Regulation*, *37*(4), 1033-1049.

Mustafa, G., & Komatsu, S. (2021). Plant proteomic research for improvement of food crops under stresses: a review. *Molecular Omics*, *17*(6), 860-880.

Mustafa, G., Sakata, K., & Komatsu, S. (2016). Proteomic analysis of soybean root exposed to varying sizes of silver nanoparticles under flooding stress. *Journal of Proteomics*, *148*, 113-125.

Noman, M., Ahmed, T., Hussain, S., Niazi, M. B. K., Shahid, M., and Song, F. (2020). Biogenic copper nanoparticles synthesized by using a copper-resistant strain *Shigella flexneri* SNT22 reduced the translocation of cadmium from soil to wheat plants. *Journal of Hazardous Material,* 398,123175.

Ozturk, M., Turkyilmaz Unal, B., García-Caparrós, P., Khursheed, A., Gul, A., & Hasanuzzaman, M. (2021). Osmoregulation and its actions during the drought stress in plants. *Physiologia Plantarum*, *172*(2), 1321-1335.

Parveen, K., Banse, V., & Ledwani, L. (2016). Green synthesis of nanoparticles: Their advantages and disadvantages. In *AIP conference proceedings* (Vol. 1724, No. 1). AIP Publishing.

Pérez-de-Luque, A. (2017). Interaction of nanomaterials with plants: what do we need for real applications in agriculture? *Frontiers in Environmental Science*, *5*, 12.

Pérez-Labrada, F., Hernández-Hernández, H., López-Pérez, M. C., González-Morales, S., Benavides-Mendoza, A., & Juárez-

Maldonado, A. (2020). Nanoparticles in plants: morphophysiological, biochemical, and molecular responses. In *Plant life under changing environment* (pp. 289-322). Academic Press.

Prakash, V., Singh, V. P., Tripathi, D. K., Sharma, S., & Corpas, F. J. (2019). Crosstalk between nitric oxide (NO) and abscisic acid (ABA) signalling molecules in higher plants. *Environmental and Experimental Botany*, *161*, 41-49.

Qi, M., Liu, Y., & Li, T. (2013). Nano-TiO_2 improve the photosynthesis of tomato leaves under mild heat stress. *Biological Trace Element Research*, *156*, 323-328.

Rajput, V. D., Minkina, T., Kumari, A., Harish, Singh, V. K., Verma, K. K., ... & Keswani, C. (2021). Coping with the challenges of abiotic stress in plants: New dimensions in the field application of nanoparticles. *Plants*, *10*(6), 1221.

Rizwan, M., Ali, S., Ali, B., Adrees, M., Arshad, M., Hussain, A., ... & Waris, A. A. (2019). Zinc and iron oxide nanoparticles improved the plant growth and reduced the oxidative stress and cadmium concentration in wheat. *Chemosphere*, *214*, 269-277.

Ruttkay-Nedecky, B., Krystofova, O., Nejdl, L., & Adam, V. (2017). Nanoparticles based on essential metals and their phytotoxicity. *Journal of Nanobiotechnology*, *15*, 1-19.

Sachdev, S., & Ahmad, S. (2021). Role of nanomaterials in regulating oxidative stress in plants. *Nanobiotechnology: Mitigation of Abiotic Stress in Plants*, 305-326.

Salehi-Lisar, S. Y., & Bakhshayeshan-Agdam, H. (2016). Drought stress in plants: causes, consequences, and tolerance. *Drought Stress Tolerance in Plants, Vol 1: Physiology and Biochemistry*, 1-16.

Sardar, R., Ahmed, S., & Yasin, N. A. (2022). Titanium dioxide nanoparticles mitigate cadmium toxicity in *Coriandrum sativum* L. through modulating antioxidant system, stress markers and reducing cadmium uptake. *Environmental Pollution*, *292*, 118373.

Sarraf, M., Vishwakarma, K., Kumar, V., Arif, N., Das, S., Johnson, R., ... & Hasanuzzaman, M. (2022). Metal/metalloid-based nanomaterials for plant abiotic stress tolerance: An overview of the mechanisms. *Plants*, *11*(3), 316.

Savicka, M., & Škute, N. (2010). Effects of high temperature on malondialdehyde content, superoxide production and growth changes in wheat seedlings (*Triticum aestivum* L.). *Ekologija*, *56*(1), 26-33.

Schulze, E. D., Beck, E., Buchmann, N., Clemens, S., Müller-Hohenstein, K., Scherer-Lorenzen, M., ... & Scherer-Lorenzen, M. (2019). Water deficiency (drought). *Plant Ecology*, 165-202.

Shabnam, N., Kim, M., & Kim, H. (2019). Iron (III) oxide nanoparticles alleviate arsenic induced stunting in Vigna radiata. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *183*, 109496.

Shafqat, W., Jaskani, M. J., Maqbool, R., Chattha, W. S., Ali, Z., Naqvi, S. A., ... & Vincent, C. I. (2021). Heat shock protein and aquaporin expression enhance water conserving behavior of citrus

under water deficits and high temperature conditions. *Environmental and Experimental Botany*, *181*, 104270.

Shahid, M. J., Ali, S., Shabir, G., Siddique, M., Rizwan, M., Seleiman, M. F., & Afzal, M. (2020). Comparing the performance of four macrophytes in bacterial assisted floating treatment wetlands for the removal of trace metals (Fe, Mn, Ni, Pb, and Cr) from polluted river water. *Chemosphere*, *243*, 125353.

Shende, S., Rajput, V. D., Gade, A., Minkina, T., Fedorov, Y., Sushkova, S., ... & Boldyreva, V. (2021). Metal-based green synthesized nanoparticles: Boon for sustainable agriculture and food security. *IEEE Transactions on NanoBioscience*, *21*(1), 44-54.

Singh, P., Arif, Y., Siddiqui, H., Sami, F., Zaidi, R., Azam, A., ... & Hayat, S. (2021). Nanoparticles enhances the salinity toxicity tolerance in Linum usitatissimum L. by modulating the antioxidative enzymes, photosynthetic efficiency, redox status and cellular damage. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *213*, 112020.

Sinha, R. K., & Verma, S. S. (2021). Proteomics approach in horticultural crops for abiotic-stress tolerance. In *Stress Tolerance in Horticultural Crops* (pp. 371-385). Woodhead Publishing.

Song, Y., Jiang, M., Zhang, H., & Li, R. (2021). Zinc oxide nanoparticles alleviate chilling stress in rice (*Oryza Sativa* L.) by regulating antioxidative system and chilling response transcription factors. *Molecules*, *26*(8), 2196.

Steiner, J. L., Briske, D. D., Brown, D. P., & Rottler, C. M. (2018). Vulnerability of Southern Plains agriculture to climate change. *Climatic Change*, *146*, 201-218.

Suprasanna, P., & Ghag, S. B. (2019). Plant Tolerance to Environmental stress: Translating research from lab to land. *Molecular Plant Abiotic Stress: Biology and Biotechnology*, 1-28.

Tahjib-UI-Arif, M., Sohag, A. A. M., Afrin, S., Bashar, K. K., Afrin, T., Mahamud, A. S. U., ... & Murata, Y. (2019). Differential response of sugar beet to long-term mild to severe salinity in a soil–pot culture. *Agriculture*, *9*(10), 223.

Thakur, S., Asthir, B., Kaur, G., Kalia, A., & Sharma, A. (2021). Zinc oxide and titanium dioxide nanoparticles influence heat stress tolerance mediated by antioxidant defense system in wheat. *Cereal Research Communications*, 1-12.

Thiruvengadam, M., Gurunathan, S., & Chung, I. M. (2015). Physiological, metabolic, and transcriptional effects of biologically-synthesized silver nanoparticles in turnip (*Brassica rapa* ssp. *rapa* L.). *Protoplasma*, *252*, 1031-1046.

Tian, W., He, G., Qin, L., Li, D., Meng, L., Huang, Y., & He, T. (2021). Genome-wide analysis of the NRAMP gene family in potato (*Solanum tuberosum*): Identification, expression analysis and response to five heavy metals stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *208*, 111661.

Tului, V., Janmohammadi, M., Abbasi, A., Vahdati-Khajeh, S., & Nouraein, M. (2021). Influence of iron, zinc and bimetallic Zn-Fe nanoparticles on growth and biochemical characteristics in chickpea (*Cicer arietinum*) cultivars. *Poljoprivreda i Sumarstvo*, *67*(2), 179-193.

VanWallendael, A., Soltani, A., Emery, N. C., Peixoto, M. M., Olsen, J., & Lowry, D. B. (2019). A molecular view of plant local adaptation: incorporating stress-response networks. *Annual Review of Plant Biology*, *70*(1), 559-583.

Vila-Traver, J., Aguilera, E., Infante-Amate, J., & de Molina, M. G. (2021). Climate change and industrialization as the main drivers of Spanish agriculture water stress. *Science of the Total Environment*, *760*, 143399.

Wahid, I., Kumari, S., Ahmad, R., Hussain, S. J., Alamri, S., Siddiqui, M. H., & Khan, M. I. R. (2020). Silver nanoparticle regulates salt tolerance in wheat through changes in ABA concentration, ion homeostasis, and defense systems. *Biomolecules*, *10*(11), 1506.

Wang, A., Li, J., Al-Huqail, A. A., Al-Harbi, M. S., Ali, E. F., Wang, J., ... & Eissa, M. A. (2021). Mechanisms of chitosan nanoparticles in the regulation of cold stress resistance in banana plants. *Nanomaterials*, *11*(10), 2670.

Wang, K., Wang, Y., Wan, Y., Mi, Z., Wang, Q., Wang, Q., & Li, H. (2021). The fate of arsenic in rice plants (*Oryza sativa* L.): Influence of different forms of selenium. *Chemosphere*, *264*, 128417.

Wang, Y., Liu, Y., Zhan, W., Zheng, K., Lian, M., Zhang, C., ... & Li, T. (2020). Long-term stabilization of Cd in agricultural soil using mercapto-functionalized nano-silica (MPTS/nano-silica): A three-year field study. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *197*, 110600.

Wu, H., Tito, N., & Giraldo, J. P. (2017). Anionic cerium oxide nanoparticles protect plant photosynthesis from abiotic stress by scavenging reactive oxygen species. *ACS Nano*, *11*(11), 11283-11297.

Wu, J., & Wang, T. (2020). Synergistic effect of zinc oxide nanoparticles and heat stress on the alleviation of transcriptional gene silencing in *Arabidopsis thaliana*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, *104*(1), 49-56.

Xu, D. M., Fu, R. B., Liu, H. Q., & Guo, X. P. (2021). Current knowledge from heavy metal pollution in Chinese smelter contaminated soils, health risk implications and associated remediation progress in recent decades: A critical review. *Journal of Cleaner Production*, *286*, 124989.

Yadav, S. K. (2010). Heavy metals toxicity in plants: an overview on the role of glutathione and phytochelatins in heavy metal stress tolerance of plants. *South African Journal of Botany*, *76*(2), 167-179.

Yadav, S., Modi, P., Dave, A., Vijapura, A., Patel, D., & Patel, M. (2020). Effect of abiotic stress on crops. *Sustainable Crop Production*, *3*(17), 5-16.

You, J., & Chan, Z. (2015). ROS regulation during abiotic stress responses in crop plants. *Frontiers in Plant Science*, *6*, 1092.

Younis, A. A., Khattab, H., & Emam, M. M. (2020). Impacts of silicon and silicon nanoparticles on leaf ultrastructure and TaPIP1 and TaNIP2 gene expressions in heat stressed wheat seedlings. *Biologia Plantarum*, *64*(1).

Zahedi, S. M., Hosseini, M. S., Daneshvar Hakimi Meybodi, N., & Peijnenburg, W. (2021). Mitigation of the effect of drought on growth and yield of pomegranates by foliar spraying of different sizes of selenium nanoparticles. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *101*(12), 5202-5213.

Zandalinas, S. I., Fritschi, F. B., & Mittler, R. (2021). Global warming, climate change, and environmental pollution: recipe for a multifactorial stress combination disaster. *Trends in Plant Science*, *26*(6), 588-599.

Zhang, H., Zhao, Y., & Zhu, J. K. (2020). Thriving under stress: how plants balance growth and the stress response. *Developmental Cell*, *55*(5), 529-543.

Zhang, H., Zhu, J., Gong, Z., & Zhu, J. K. (2022). Abiotic stress responses in plants. *Nature Reviews Genetics*, *23*(2), 104-119.

Zhao, J., Lu, Z., Wang, L., & Jin, B. (2020). Plant responses to heat stress: physiology, transcription, noncoding RNAs, and epigenetics. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(1), 117.

Zulfiqar, F., & Ashraf, M. (2021). Nanoparticles potentially mediate salt stress tolerance in plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, *160*, 257-268.

BÖLÜM IV

mTOR Sinyal Yolağı ve Biyolojik Önemi

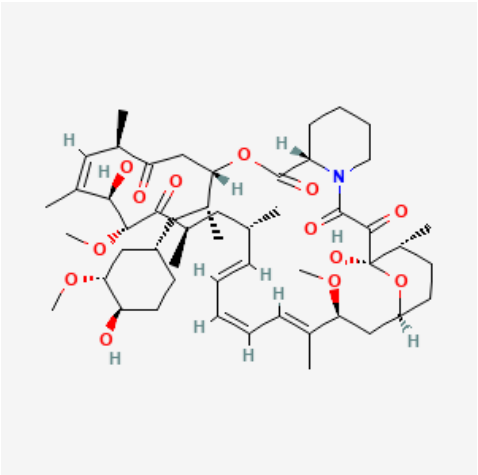
Deniz MIHÇIOĞLU[1]
Türkan GÜRER[2]

Giriş

Güney Pasifik adasında yer alan Rapa Nui'den 1964 yılında toplanan toprak örneklerinde bulunan, *Streptomyces hygroscopicus* kültürlerinde antifugal, antitümör ve immün baskılayıcı özellikleri olan bir bileşik keşfedilmiştir. Bu bileşiğe daha sonra *S. Hygroscopicus'un* keşfedildiği yerden dolayı rapamisin adı verilmiştir (Eng & ark., 1984; Martel & ark., 1977; Vézina & ark., 1975) (Şekil 1). Bierer ve ark. 1990 yılında rapamisinin kısmen prolil-izomeraz peptidil-propil cis-trans izomeraz (FKBP12)'a

[1] Dr.Öğr.Üyesi Deniz Mıhçıoğlu, SANKO Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Beslenme ve Diyetetik Bölümü, Gaziantep, Türkiye, ORCID: 0000-0003-2355-8026, denizmihcioglu@hotmail.com
[2] Dr.Öğr.Üyesi Türkan Gürer, Gaziantep Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Gaziantep, Türkiye, ORCID: 0000-0003-2207-0360, turkanayte@hotmail.com

bağlanarak hücre büyümesini ve çoğalmasını büyük ölçüde engelleyici bir etki oluşturduğunu bildirmişlerdir (Bierer & ark., 1990; Chung & ark., 1992).



Şekil 1: Rapamisin'in kimyasal yapısı

Kaynak: PubChem database

Rapamisin, maya ve memeli hücrelerinde hücre döngüsünü G1 fazında durdurur ve aç bırakılmış hücrelere özgü bir fenotipi ortaya çıkarır. Böylece, hücresel bileşenin bozulmasına ve geri dönüşümüne yardımcı olan otofaji mekanizmasını harekete geçirir (Barbet & ark., 1996; Hardwick & ark., 1999; Sabatini & ark., 2002). mTOR, doğal bileşik rapamisin ve prolil izomeraz FKBP12 tarafından oluşturulan bir kompleks yoluyla allosterik olarak inhibe edilir (Brown & ark., 1994). Çalışmalar, mTOR'un besin taşıyıcılarının ifadesinin düzenlenmesinde rol oynadığını göstermiştir. Ayrıca, mTOR yolunun ATP seviyelerinden etkilendiğini gösteren çalışmalar, mTOR'un besin sinyal sisteminin

bir bileşeni olduğu fikrini daha da güçlendirmiştir (Szwed & ark., 2021).

mTOR

Rapamisinin mekanik bir hedefi olan mTOR, birden fazla metabolik yolun ve büyümeyi teşvik edici sinyalin entegrasyonunda rol oynayan PI3K ile ilişkili protein kinazlar (PIKK) ailesinde yer alan 289-kDa'lık bir serin/treonin protein kinazdır (Keith & Schreiber, 1995; Saxton & Sabatini, 2017). mTOR protein kinaz, hücre büyümesini çevresel koşullarla koordine eden ve hücre ile organizma fizyolojisinde temel bir rol oynayan sinyal yolağının merkezidir (Saxton & Sabatini, 2017).

Son yirmi yıldır yapılan kapsamlı araştırmalar, mTOR'un protein sentezinden otofajiye kadar birçok temel hücre sürecini düzenlemede merkezi bir rol oynadığını ortaya koymuştur ve düzensiz mTOR sinyallemesinin kanser ve diyabetin ilerlemesinde, birçok metabolik bozuklukta, nörodejenerasyonda ve yaşlanma sürecinde de rol oynadığını göstermiştir (Liu & Sabatini, 2020; Saxton & Sabatini, 2017).

Memelilerde, mTOR kompleksi 1 (mTORC1) ve mTOR kompleksi 2 (mTORC2) olarak bilinen iki ayrı kompleksin katalitik alt birimini oluşturur (Liu & Sabatini, 2020). mTORC1 rapamisin duyarlı iken, mTORC2 akut rapamisin tedavisine duyarsızdır (Loewith & ark., 2002).

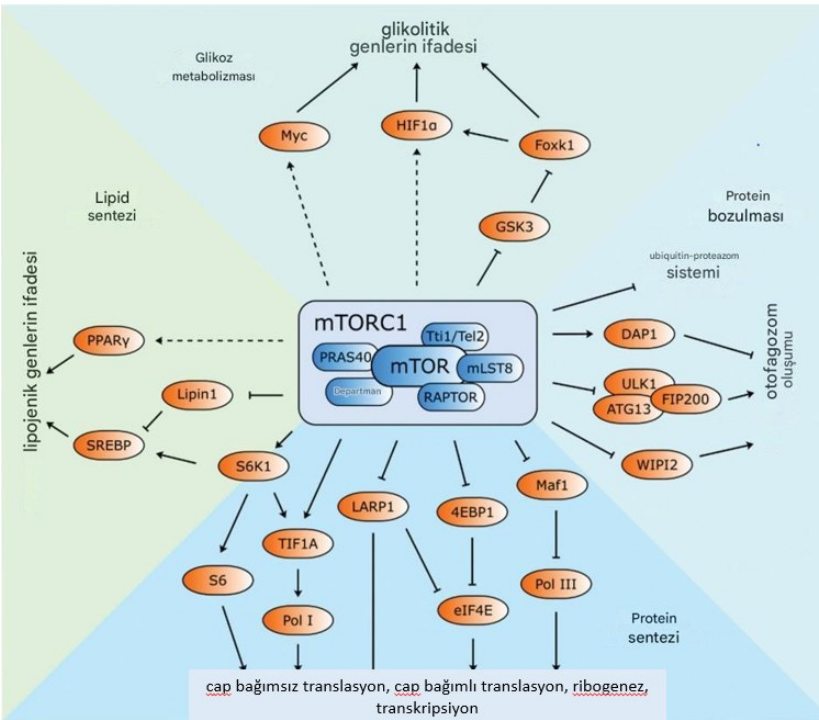
mTORC1

mTORC1 çoklu protein kompleksi altı protein bileşeninden oluşur. Bunlar; mTOR, memeli öldürücü SEC13 proteini 8

(mLST8), TOR'un düzenleyici ilişkili proteini (Raptor), Tti1/Tel2 kompleksi, Prolin açısından zengin Akt substratı 1 40 kDa (PRAS40) ve DEP alanı içeren mTOR ile etkileşime giren protein (Deptor) (Chrienova & ark., 2021; Hara & ark., 2002; D.-H. Kim & ark., 2002; D.-H. Kim & ark., 2003).

mTORC1, hücresel bileşenlerin otofajik parçalanmasını sınırlarken protein, lipit, nükleotid ve ATP üretimini artıran substratların fosforilasyonunda yer alır. Protein sentezi, büyüyen hücrelerde yüksek oranda enerji ve kaynak gerektiren bir süreçtir. mTORC1, ökaryotik başlatma faktörü 4E bağlayıcı proteinleri (4E-BP'ler) ve p70 S6 kinaz 1'i (S6K1) fosforlayarak protein sentezinin düzenlenmesinde görev almaktadır. Fosforile edilmemiş halinde, 4E-BP1, eIF4F başlık bağlayıcı kompleksinin temel bir bileşeni olan ökaryotik çeviri başlatma faktörü 4E'ye (eIF4E) bağlanır. mTORC1 tarafından fosforilasyon gerçekleştikten sonra, 4E-BP1 eIF4E'yi serbest bırakır ve mRNA'ların 5' cap bağımlı translasyonunu hızlandırır (Liu & Sabatini, 2020). rRNA ve tRNA sentezleri de mTORC1 tarafından kontrol edilir. Memeli RNA Polimeraz I (RNA Pol I), dört olgun rRNA türünden üçünü (5.8S, 18S ve 28S) sırayla oluşturan öncül rRNA'yı transkribe ederken, RNA Polimeraz III (RNA Pol III) dördüncü RNA türü olan 5S rRNA'yı ve tRNA'yı transkribe eder. RNA Pol I, mTORC1 efektörü S6K1 veya daha sonra Pol I aktive edebildiği nükleolusa taşınan transkripsiyon başlatma faktörü IA'nın (TIF1A) mTORC1 aracılı fosforilasyonu ile aktive edilebilir. mTORC1 ayrıca RNA Pol III transkripsiyon MAF1 homologunun (MAF1) represörünü fosforile eder. Ayrıca, mTORC1'in RNA Pol I ve RNA Pol III'ün promotör bölgelerine doğrudan bağlanması da gen ifadesini artırır (Hannan & ark., 2003;

Mayer & ark., 2004; Shor & ark., 2010; Tsang & ark., 2010). Lipid ve kolesterol sentezi, mTORC1 tarafından sterol düzenleyici element bağlayıcı protein (SREBP) ve peroksizom proliferatör-aktifleştirilmiş reseptör-c (PPAR-c) aracılığıyla desteklenir. Bu transkripsiyon faktörleri lipid ve kolesterol homeostazıyla ilişkili genlerin protein ifadesini düzenler. SREBP aktivasyonu hücredeki düşük sterol seviyeleri veya mTORC1-S6K1 yolu tarafından desteklenir. mTORC1 SREBP baskılayıcı lipin-1'i fosforile eder, bu da nükleer girişini engeller ve SREBP inhibisyonunu zayıflatır (Düvel & ark., 2010; Eid & ark., 2017; J. E. Kim & Chen, 2004; Peterson & ark., 2011; Porstmann & ark., 2008) (Şekil 2).



Şekil 2: mTORC1'in yapı ve fonksiyonları

Kaynak: Chrienova & ark., 2021

Mitokondriyal oksidatif fonksiyon dengesi de mTORC1 tarafından yürütülür. Çünkü mTORC1 rapamisin tarafından inhibe edilince peroksizom-proliferatör-aktifleştirilmiş reseptör koaktivatörü (PGC) ve yinyang1 (YY1) transkripsiyonel kompleksinin aktivitesi azalır. Ayrıca, Schieke ve ark. mTORC1 inhibisyonu sonucunda mitokondriyal membran potansiyelinde, oksijen tüketiminde ve hücresel ATP seviyelerinde azalmalar ve ayrıca modifiye edilmiş mitokondriyal fosfoproteomlar olduğunu bildirmişlerdir (Schieke & ark., 2006).

mTOR, hipoksi-indüklenebilir faktör 1-alfa (HIF1a) veya Myc proto-onkogen proteini (Myc) gibi transkripsiyon faktörlerini düzenleyerek glikolitik yolu da birkaç noktada etkileyebilir (West & ark., 1998; Hudson & ark., 2002; Toschi & ark., 2008).

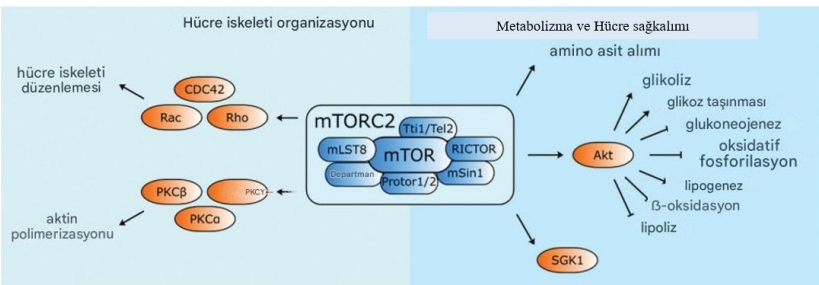
mTORC2

mTORC1 aktivitesi esas olarak rapamisin kaynaklı sinyal yolunun inhibisyonunu içermekteyken, mTORC2 rapamisine akut direnç göstermektedir. mTORC2, Rictor, Protor 1 veya 2, memeli stresle aktive olan protein kinaz etkileşimli protein 1 (mSin1), mLST8, Tti1/Tel2 ve Deptor ile etkileşime giren mTOR proteininden oluşur (Stuttfeld & ark., 2018).

Tti1/Tel2 ve Deptor mTORC1 kompleksine benzer şekilde inhibitör etki gösterir. Rictor, mTORC2 birleşmesini ve aktivitesini stabilize ederken, mSin1 substrat alımı ve seçiminde rol oynar. mLST8, mTORC2 işlevi için önemlidir çünkü delesyonu kompleks aktivitesini tamamen bastırır. Buna karşılık, mLST8 delesyonunun mTORC1 üzerinde belirgin bir etkisi yoktur. Son kompleks bileşen

Protor 1, mTORC2 aracılığıyla serum/glukokortikoidle düzenlenen kinaz 1 (SGK1) aktivasyonu için gereklidir (Chrienova & ark., 2021).

mTORC2 esas olarak AGC kinaz ailesinin birkaç üyesinin (PKA/PKG/PKC) fosforilasyonunda işlev görür. Protein kinaz Cα aracılığıyla aktin polimerizasyonunu düzenleyerek hücre morfolojisini düzenler. mTORC2, Rac, Rho ve Cdc42 dahil olmak üzere küçük GTPazların Rho ailesi aracılığıyla hücre iskelet yapısını değiştirir ve dolaylı olarak mTORC1 aktivitesini ve PI3K-Akt eksenindeki diğer etkenleri uyaran Akt'yi aktive eder (Ikenoue & ark., 2008; Sarbassov & ark., 2005). Plazma membranı ile ilişkili mTORC2'nin aktivitesi süreklidir ve mTORC1'den farklı olarak PI3K sinyalinden bağımsızdır. Ancak, endozomal mTORC2'nin aktivitesi PI3K'ya duyarlıdır. mTORC2 aktivitesi mLST8 ve Deptor'un ubikitinasyonu ve Rictor'un fosforilasyonu veya asilasyonu tarafından kontrol edilir. Ribozomlar, küçük GTPazlar, TSC kompleksi ve amino asitler mTORC2'nin düzenlenmesine yardımcı olur (Şekil 3) (Chrienova & ark., 2021).



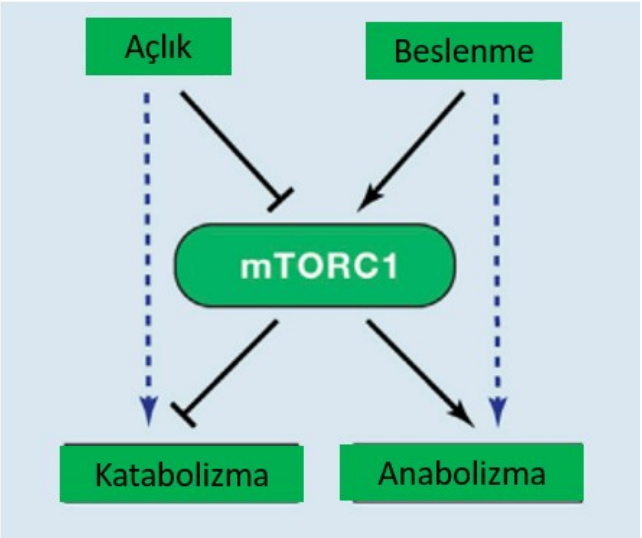
Şekil 3: mTORC2'nin yapı ve fonksiyonları

Kaynak: Chrienova & ark., 2021

mTORC2, Akt'yi aktive eder ve GLUT1 ekspresyonunu indükler (Barthel & ark., 1999; Deprez & ark., 1997). mTORC2, Sınıf IIa histon deasetilazlarının fosforilasyonunu baskılayarak glikolizin hızlanmasını düzenler, laktat dehidrogenaz (LDH) ve pirüvat kinaz PKM2 gibi çeşitli genleri aktive eden Myc'nin ekspresyonunun artmasına yol açar (Masui & ark., 2013; Zha & ark., 2011). mTORC2 lipogenezi artırır ve Akt ve SREBP yolları aracılığıyla lipolizi ve yağ asidi β-oksidasyonunu baskılar (Guri & ark., 2017). mTORC2 aracılı Akt aktivasyonu, fosforibosil pirofosfat (PRPP) üretimini düzenleyerek ve bifonksiyonel pürin biyosentezi proteini ATIC'in aktivitesini değiştirerek nükleotid sentezini düzenler (Wang & ark., 2009).

mTOR sinyal yolağının fizyolojik önemi

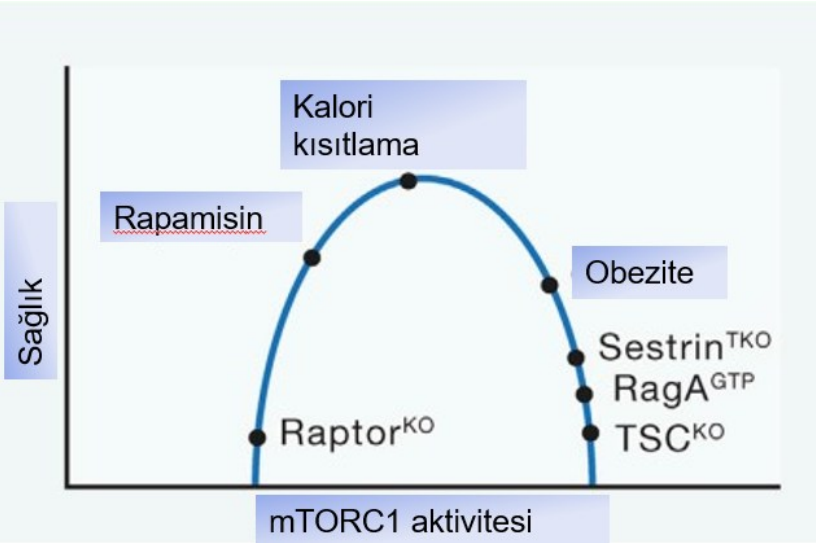
Homeostazisi korumak için, açlık veya beslenmeyi takip eden mevcut enerji kaynaklarındaki değişiklikler, tüm vücut metabolizmasını etkiler. Açlık durumunda, besin ve büyüme faktörlerinin seviyeleri düşer. Bunun sonucunda enerji depolarının temel işlevlerini sürdürmek için harekete geçirildiği katabolik süreç başlar. Bununla birlikte, beslenmiş durumdaki yüksek besin seviyeleri ise anabolik büyümeye ve enerji depolamasına doğru bir süreci başlatır (Şekil 4) (Saxton & Sabatini, 2017).



Şekil 4: mTOR sinyali tarafından düzenlenen anabolizma ve katabolizma arasındaki denge

Kaynak: Saxton & Sabatini, 2017

Hücresel düzeyde anabolik ve katabolik metabolizmayı koordine etmedeki görevine paralel olarak, farelerde yapılan fizyolojik çalışmalar mTOR yolağının organizma düzeyinde de uygun metabolik düzenleme için gerekli olduğunu ortaya koymuştur. Ancak önemli olan, yapısal mTOR aktivasyonunun olumsuz fizyolojik sonuçlarla da ilişkili olmasıdır ve bu da değişen çevre koşullarına yanıt olarak mTOR yolağının uygun şekilde modüle edilmesinin çok önemli olduğunu gösterir (Saxton & Sabatini, 2017).



Şekil 5: mTORC1 aktivitesi

Kaynak: Saxton & Sabatini, 2017

Glikoz metabolizması hem ATP formunda enerji hem de makromolekül sentezi için gerekli olan ara maddeler üretir. PI3K ve mTOR yolağını düzenleyen insülin gibi büyüme faktörleri glikozun alımını ve metabolizmasını kontrol etmektedir (Hopkins & ark., 2020).

Hayvanlar, kanda besin birikimini önlemek amacıyla beslenmeden sonra makromolekülleri ve enerjiyi muhafaza etmek için mekanizmalar geliştirmiştir. Bu süreçler, pankreastan insülin salınımı ile farklı dokular arasında koordine edilir ve bu da hipertrofi ve büyümeyi artırmak için mTORC1 ve mTORC2'yi birlikte aktive eder. İskelet kasında insülin, mTORC2–Akt yolunu uyararak glikoz alımını başlatır ve glikojen olarak depolanmasını artırır; aynı

zamanda, dolaşımdaki amino asitler de mTORC1'e bağımlı bir şekilde yeni kas biyokütlesine dahil edilir (Liu & Sabatini, 2020).

Buna karşılık, açlık sonrası düşük insülin seviyeleri, otofajiyi tetikler ve karaciğerdeki glukoneogenezi beslemek için protein depolarını parçalar. Bir araştırmada, fareler 24 saat açlığa maruz bırakılmış ve bunun sonucunda karaciğer ağırlıkları yaklaşık olarak %25 oranında azalmıştır. Azalmanın hücre sayısındaki değişikliklerden değil, hücre boyutundaki azalmalardan kaynaklandığı gösterilmiştir. Çalışmada açlık kaynaklı küçülme, TSC1, Raptor veya otofaji geni Atg7'nin karaciğere özgü nakavtları olan farelerde ortadan kalkmıştır (Sengupta & ark., 2010). Bu sonuç anabolizmadan katabolizmaya geçişin mTORC1 tarafından düzenlendiğini göstermektedir.

mTOR sinyal yolağı ve nörodejeneratif hastalıklar

Toplumda sıklıkla görülen Alzheimer hastalığı (AH), Parkinson hastalığı (PH) ve Huntington hastalığı (HH) gibi nörodejeneratif bozuklukların patogenezinin altında mTOR yolağındaki defektler yer almaktadır (de Mello & ark., 2019).

AH olan bireylerin beyin dokularında yapılan bir araştırmada, mTORC1'in bu dokularda aktive olduğunu ama mTORC2'nin aktive olmadığını gösterilmiştir. Ayrıca bu çalışmada, mTOR sinyal yolağının aktivite düzeyinin AH olan bireylerin bilişsel şiddetiyle de ilişkili olduğu gösterilmiştir (Sun & ark., 2014). AH ayrıca metabolik anormalliklerle de ilişkilidir. Dallı zincirli amino asit (BCAA) katabolizmasındaki bozukluklar, artan BCAA seviyelerine yol açarak mTOR'a bağlı AH' de tau fosforilasyonunu artırır (Li & ark., 2018). İnsülin/mTOR sinyal yolu, mitokondriyal işlev

bozukluğu ve Lewy cisimcikleri adı verilen α-sinüklein içeren inklüzyonların birikmesiyle karakterize bir hastalık olan PH' de düzensizdir. A53T α-sinüklein, mTOR/S6K1 sinyallemesini yukarı yönde düzenleyen ve otofajiyi bozan, böylece toksik A53T α-sinükleinin toplanmasına daha fazla sebep olan PH' de yaygın bir mutasyondur. mTOR'un tükenmesi, otofajinin indüklenmesine ve A53T α -sinükleinin temizlenmesine neden olur (Jiang & ark., 2013).

Ancak, mTOR aktivitesinin artmasının PH' de olumlu etkileri olabilir. mTORC1 aktivitesinin negatif düzenleyicisi REDD1, Parkinson hastalarında ve PH 'nin hücresel modellerinde dopaminerjik nöronlarda yukarı yönde düzenlenir. REDD1 seviyeleri yükseldiğinde, TSC2'nin (tuberous sclerosis complex) tükenmesiyle mTOR aktivitesini yeniden oluşturmanın nöroprotektif etkileri vardır (Malagelada & ark., 2006). Bu nedenle, mTOR aktivasyonunun optimum seviyelerini korumanın PH' nin önlenmesinde etkili olabileceği düşünülmektedir.

mTOR aktivitesinin HH patogenezinde de rolü vardır. HH'li fare modelinde TSC1'in delesyonunun mTORC1 aktivitesini artırdığı ve farenin ölümünü hızlandırdığı gösterilmiştir. Ancak, HH murin modellerinde, mTORC1 düzenleyicisi olan sürekli aktif bir Rheb'in ifadesi, mitokondriyal disfonksiyonu ve anormal kolesterol metabolizmasını hafifletir ve HH' de otofajiyi artırır (Szwed & ark., 2021).

mTOR sinyal yolağı ve immün fonksiyonu

Rapamisinin biyolojik özelliklerine ilişkin yapılan ilk çalışmalar, lenfosit proliferasyonunu engellemede etkin olduğunu

ortaya koymuştur. Bu sebeple rapamisin 1999 yılında böbrek nakilleri için bir immün baskılayıcı olarak klinik onay almıştır. Rapamisinin bağışıklık sistemini baskılayıcı etkisi büyük ölçüde adaptif immün yanıtın önemli bir bileşeni olan T hücresi aktivasyonunu bloke etmesine bağlanmaktadır (Saxton & Sabatini, 2017). mTORC1, T hücresi aktivasyonu için gerekli olan anabolik metabolizmaya geçişi kolaylaştırır. Ayrıca T hücrelerinde bulunan çeşitli aktive edici sinyallerin aşağı yönde ilerlemesine katkı sağlar. Bunlar, interlökin-2 (IL-2), kostimülatör reseptör CD28 ve amino asitler olarak sıralanabilir. Antijen sunumu sırasında mTORC1 inhibisyonu T hücre anerjisi ile sonuçlanır, bu sayede hücreler daha sonra antijene maruz kaldıklarında aktive olmazlar (Zheng & ark., 2007). Besin tükenmesi veya diğer inhibitör sinyaller yoluyla T hücre anerjisinin indüklenmesi, tümörler tarafından bağışıklıktan kaçınmada kullanılan bir mekanizmadır. Bu bağlamda bağışıklık hücrelerinde mTORC1 aktivasyonunu indüklemek kanser immünoterapisinde faydalı olabilir.

mTOR sinyal yolağı ve otofaji

Otofaji, ubikitin-proteazom sistemi (UPS) ile birlikte, hücredeki sitoplazmik protein kalitesini korur. Hücre içi maddelerin tutulması ve parçalanmasını içeren bu süreç mTORC1 tarafından kontrol edilir. ULK1/ATG13/FIP200 protein kompleksi Raptor ile etkileşime girer. ULK1 ve ATG13'ün fosforilasyonu otofagozom oluşumunu baskılar. ULK1, mTORC2'ye özgü bileşen Rictor'a bağlanmadığı için otofaji düzenlemesi mTORC1 ile sınırlıdır (Ganley & ark., 2009; Jung & ark., 2009). mTORC1 ayrıca otofajiyi, otofaji baskılayıcı ölümle ilişkili protein 1'in (DAP1) aktivasyonu veya fosfoinozitid 2 ile etkileşime giren WD-tekrar proteininin

(WIPI2) fosforilasyonu ile düzenler (Koren & ark., 2010; Wan & Liu, 2019). Bu protein, mTORC1 fosforilasyonu üzerine proteazomal bozunmaya eğilimli olan otofagozom oluşumunun pozitif bir düzenleyicisidir. Ayrıca, mTORC1 UPS'in bir baskılayıcısıdır (Zhao & ark., 2015).

mTOR sinyal yolağı ve kanser

mTOR, tümör oluşumunda ve gelişiminde önemli bir rol oynar. Bir çok araştırma, tümörlerin tipik olarak AKT/mTOR sinyal yolunu aşırı aktive ettiğini bildirmiştir (Zou & ark., 2020).

Normal şartlar altında mTOR, hücre büyümesi ve bölünmesinin önemli bir düzenleyicisidir. Bununla birlikte, tümör hücrelerinde, anormal şekilde aktive olan mTOR, tümör hücrelerini büyümeye, metastaz yapmaya ve yeni sağlıklı dokuları istila etmeye teşvik eden sinyaller gönderir (Hsieh & ark., 2012). Bunlar arasında PI3K/fosfat ve (PTEN)/AKT/TSC yolu mTORC1'in ana aktivatörüdür ve bu yoldaki gen mutasyonları malign tümörlere yol açabilir. Ayrıca, PTEN ekspresyonu genellikle çoğu kötü huylu tümörde PI3K/Akt/mTOR yolunu yukarı düzenlemek için epigenetik, genetik ve transkripsiyon sonrası modifikasyonla ortadan kaldırılır (Zou & ark., 2020). mTORC1, PI3K/Akt yolu ve Ras/Raf/Mek/Erk (MAPK) yolu da dahil olmak üzere sıklıkla mutasyona uğrayan onkojenik yol için bir alt akış efektörü olarak işlev görür ve bu da insan kanserlerinin büyük çoğunluğunda mTORC1’in hiperaktivasyonuna sebep olmaktadır. mTORC2 sinyallemesi, büyük ölçüde, glikoz alımı ve glikoliz gibi pro-proliferatif süreçleri yönlendiren ve aynı zamanda apoptozu

engelleyen Akt'yi aktive etmedeki rolü nedeniyle kanserle de ilişkilendirilir (Saxton & Sabatini, 2017).

mTOR sinyal yolağı ve yaşlanma

Yaşlanma, zamanla biyolojik aktifliğin azalmasına yol açan metabolik değişikliklerle karakterize edilen bir süreçtir. mTOR sinyallemesinin maya, solucan, sinek ve memeliler de dahil olmak üzere çeşitli organizmaların yaşlanma sürecinde güçlü bir şekilde rol oynadığı düşünülmektedir (Saxton & Sabatini, 2017). mTOR'un metabolizmadaki temel rolü, mTOR'u yaşlanma karşıtı terapötikler için ideal bir hedef haline getirmektedir. mTOR, çok hücreli organizmalarda glikoz metabolizmasını kontrol eden, büyüme faktörü sinyal yolağı insülin/insülin benzeri büyüme faktörü sinyalinin (IIS) bir parçasıdır. Rapamisin, kalori kısıtlaması veya bu yolun bileşenlerinin genetik mutasyonları ile mTOR'un aşağı regülasyonu sonucu azalan sinyalizasyon, uzun ömürlülükle bağlantılıdır. İnsanlar da dahil olmak üzere çeşitli organizmalarda mTOR aktivitesinin rapamisin ile azaltılması yaşam süresini uzatır ya da sağlığı iyileştirir (Bitto & ark., 2016; Lamming & ark., 2012; Leontieva & ark., 2014). Genel olarak, çeşitli dokularda mTORC1 inhibisyonu, senesensi inhibe ederek, otofaji ile eski ve işlevsiz mitokondrilerin temizlenmesini uyararak, kök hücre havuzunu koruyarak ve kendini yenilemeyi sürdürerek yaşlanmayı yavaşlatabilir (Szwed & ark.,2021).

Sonuç

mTOR, fosfatidilinositol kinazla ilişkili kinaz ailesine aittir. Bu kinazlar, DNA hasarı ve besin eksikliği gibi streslere karşı hücresel tepkileri düzenler. mTOR kompleksleri, transkripsiyon ve

translasyondan, posttranslasyonel mekanizmalara kadar farklı seviyelerde metabolik yolları kontrol eder. mTOR, metabolik hedeflerini doğrudan fosforilasyon yoluyla kontrol eder. Bu kinaz, protein sentezini, hücre büyümesini ve çoğalmasını kontrol eden mTORC1 ve aktin hücre iskeletinin düzenleyicisi olan ve hücre sağ kalımını, hücre döngüsü ilerlemesini destekleyen mTORC2 olmak üzere iki ayrı kompleksin bir bileşenidir. Bu protein, FKBP12-rapamisin kompleksinin hücre döngüsü durması ve immün baskılayıcı etkileri için hedef görevi görür. mTOR inhibitörleri, organ nakillerinde immün baskılayıcı olarak kullanılmaktadır. Aşırı mTOR aktivitesi metabolik sendroma yol açabildiği gibi, obezite de moleküler yaşlanmayı hızlandırır ve bu da nörodejeneratif hastalık ve kanser riskini artırır. Ayrıca düşük mTOR aktivitesi genel sağlıkta iyileşmeye, kontrollü hücre büyümesine ve nihayetinde daha uzun bir ömre yol açar.

Kaynakça

Barbet, N. C., Schneider, U., Helliwell, S. B., Stansfield, I., Tuite, M. F., & Hall, M. N. (1996). TOR controls translation initiation and early G1 progression in yeast. *Molecular Biology of the Cell, 7*(1), 25-42.

Barthel, A., Okino, S. T., Liao, J., Nakatani, K., Li, J., Whitlock, J. P., & Roth, R. A. (1999). Regulation of GLUT1 gene transcription by the serine/threonine kinase Akt1. *Journal of Biological Chemistry, 274*(29), 20281-20286.

Bierer, B. E., Mattila, P. S., Standaert, R. F., Herzenberg, L. A., Burakoff, S., Crabtree, G., & Schreiber, S. L. (1990). Two distinct signal transmission pathways in T lymphocytes are inhibited by complexes formed between an immunophilin and either FK506 or rapamycin. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 87*(23), 9231-9235.

Bitto, A., Ito, T. K., Pineda, V. V., LeTexier, N. J., Huang, H. Z., Sutlief, E., Tung, H., Vizzini, N., Chen, B., & Smith, K. (2016). Transient rapamycin treatment can increase lifespan and healthspan in middle-aged mice. *elife, 5*, e16351.

Brown, E. J., Albers, M. W., Bum Shin, T., Ichikawa, K., Keith, C. T., Lane, W. S., & Schreiber, S. L. (1994). A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin–receptor complex. *Nature, 369*(6483), 756-758.

Chrienova, Z., Nepovimova, E., & Kuca, K. (2021). The role of mTOR in age-related diseases. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 36*(1), 1678-1692.

Chung, J., Kuo, C. J., Crabtree, G. R., & Blenis, J. (1992). Rapamycin-FKBP specifically blocks growth-dependent activation of and signaling by the 70 kd S6 protein kinases. *Cell, 69*(7), 1227-1236.

de Mello, N., Orellana, A., Mazucanti, C., de Morais, L., Scavone, C., & Kawamoto, E. (2019). Insulin and autophagy in neurodegeneration. Front Neurosci 13: 491. In.

Deprez, J., Vertommen, D., Alessi, D. R., Hue, L., & Rider, M. H. (1997). Phosphorylation and activation of heart 6-phosphofructo-2-kinase by protein kinase B and other protein kinases of the insulin signaling cascades. *Journal of Biological Chemistry, 272*(28), 17269-17275.

Düvel, K., Yecies, J. L., Menon, S., Raman, P., Lipovsky, A. I., Souza, A. L., Triantafellow, E., Ma, Q., Gorski, R., & Cleaver, S. (2010). Activation of a metabolic gene regulatory network downstream of mTOR complex 1. *Molecular Cell, 39*(2), 171-183.

Eid, W., Dauner, K., Courtney, K. C., Gagnon, A., Parks, R. J., Sorisky, A., & Zha, X. (2017). mTORC1 activates SREBP-2 by suppressing cholesterol trafficking to lysosomes in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 114*(30), 7999-8004.

Eng, C., Sehgal, S., & Vezina, C. (1984). Activity of rapamycin (AY-22, 989) against transplanted tumors. *The Journal of antibiotics, 37*(10), 1231-1237.

Ganley, I. G., Lam, D. H., Wang, J., Ding, X., Chen, S., & Jiang, X. (2009). ULK1· ATG13· FIP200 complex mediates mTOR

signaling and is essential for autophagy. *Journal of Biological Chemistry, 284*(18), 12297-12305.

Guri, Y., Colombi, M., Dazert, E., Hindupur, S. K., Roszik, J., Moes, S., Jenoe, P., Heim, M. H., Riezman, I., & Riezman, H. (2017). mTORC2 promotes tumorigenesis via lipid synthesis. *Cancer Cell, 32*(6), 807-823. e812.

Hannan, K. M., Brandenburger, Y., Jenkins, A., Sharkey, K., Cavanaugh, A., Rothblum, L., Moss, T., Poortinga, G., McArthur, G. A., & Pearson, R. B. (2003). mTOR-dependent regulation of ribosomal gene transcription requires S6K1 and is mediated by phosphorylation of the carboxy-terminal activation domain of the nucleolar transcription factor UBF. *Molecular and Cellular Biology*.

Hara, K., Maruki, Y., Long, X., Yoshino, K.-i., Oshiro, N., Hidayat, S., Tokunaga, C., Avruch, J., & Yonezawa, K. (2002). Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action. *Cell, 110*(2), 177-189.

Hardwick, J. S., Kuruvilla, F. G., Tong, J. K., Shamji, A. F., & Schreiber, S. L. (1999). Rapamycin-modulated transcription defines the subset of nutrient-sensitive signaling pathways directly controlled by the Tor proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 96*(26), 14866-14870.

Hopkins, B. D., Goncalves, M. D., & Cantley, L. C. (2020). Insulin–PI3K signalling: an evolutionarily insulated metabolic driver of cancer. *Nature Reviews Endocrinology, 16*(5), 276-283.

Hsieh, A. C., Liu, Y., Edlind, M. P., Ingolia, N. T., Janes, M. R., Sher, A., Shi, E. Y., Stumpf, C. R., Christensen, C., & Bonham,

M. J. (2012). The translational landscape of mTOR signalling steers cancer initiation and metastasis. *Nature, 485*(7396), 55-61.

Hudson, C. C., Liu, M., Chiang, G. G., Otterness, D. M., Loomis, D. C., Kaper, F., Giaccia, A. J., & Abraham, R. T. (2002). Regulation of hypoxia-inducible factor 1α expression and function by the mammalian target of rapamycin. *Molecular and Cellular Biology, 22*(20), 7004-7014.

Ikenoue, T., Inoki, K., Yang, Q., Zhou, X., & Guan, K. L. (2008). Essential function of TORC2 in PKC and Akt turn motif phosphorylation, maturation and signalling. *The EMBO journal, 27*(14), 1919-1931.

Jiang, T.-F., Zhang, Y.-J., Zhou, H.-Y., Wang, H.-M., Tian, L.-P., Liu, J., Ding, J.-Q., & Chen, S.-D. (2013). Curcumin ameliorates the neurodegenerative pathology in A53T α-synuclein cell model of Parkinson's disease through the downregulation of mTOR/p70S6K signaling and the recovery of macroautophagy. *Journal of Neuroimmune Pharmacology, 8*, 356-369.

Jung, C. H., Jun, C. B., Ro, S.-H., Kim, Y.-M., Otto, N. M., Cao, J., Kundu, M., & Kim, D.-H. (2009). ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery. *Molecular Biology of the Cell, 20*(7), 1992-2003.

Keith, C. T., & Schreiber, S. L. (1995). PIK-related kinases: DNA repair, recombination, and cell cycle checkpoints. *Science, 270*(5233), 50-50.

Kim, D.-H., Sarbassov, D. D., Ali, S. M., King, J. E., Latek, R. R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., & Sabatini, D. M.

(2002). mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell, 110*(2), 163-175.

Kim, D.-H., Sarbassov, D. D., Ali, S. M., Latek, R. R., Guntur, K. V., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., & Sabatini, D. M. (2003). GβL, a positive regulator of the rapamycin-sensitive pathway required for the nutrient-sensitive interaction between raptor and mTOR. *Molecular Cell, 11*(4), 895-904.

Kim, J. E., & Chen, J. (2004). Regulation of peroxisome proliferator–activated receptor-γ activity by mammalian target of rapamycin and amino acids in adipogenesis. *Diabetes, 53*(11), 2748-2756.

Koren, I., Reem, E., & Kimchi, A. (2010). DAP1, a novel substrate of mTOR, negatively regulates autophagy. *Current Biology, 20*(12), 1093-1098.

Lamming, D. W., Ye, L., Katajisto, P., Goncalves, M. D., Saitoh, M., Stevens, D. M., Davis, J. G., Salmon, A. B., Richardson, A., & Ahima, R. S. (2012). Rapamycin-induced insulin resistance is mediated by mTORC2 loss and uncoupled from longevity. *Science, 335*(6076), 1638-1643.

Leontieva, O. V., Paszkiewicz, G. M., & Blagosklonny, M. V. (2014). Weekly administration of rapamycin improves survival and biomarkers in obese male mice on high-fat diet. *Aging cell, 13*(4), 616-622.

Li, H., Ye, D., Xie, W., Hua, F., Yang, Y., Wu, J., Gu, A., Ren, Y., & Mao, K. (2018). Defect of branched-chain amino acid

metabolism promotes the development of Alzheimer's disease by targeting the mTOR signaling. *Bioscience Reports, 38*(4), BSR20180127.

Liu, G. Y., & Sabatini, D. M. (2020). mTOR at the nexus of nutrition, growth, ageing and disease. *Nature reviews Molecular cell biology, 21*(4), 183-203.

Loewith, R., Jacinto, E., Wullschleger, S., Lorberg, A., Crespo, J. L., Bonenfant, D., Oppliger, W., Jenoe, P., & Hall, M. N. (2002). Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control. *Molecular Cell, 10*(3), 457-468.

Malagelada, C., Ryu, E. J., Biswas, S. C., Jackson-Lewis, V., & Greene, L. A. (2006). RTP801 is elevated in Parkinson brain substantia nigral neurons and mediates death in cellular models of Parkinson's disease by a mechanism involving mammalian target of rapamycin inactivation. *Journal of Neuroscience, 26*(39), 9996-10005.

Martel, R., Klicius, J., & Galet, S. (1977). Inhibition of the immune response by rapamycin, a new antifungal antibiotic. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology, 55*(1), 48-51.

Masui, K., Tanaka, K., Akhavan, D., Babic, I., Gini, B., Matsutani, T., Iwanami, A., Liu, F., Villa, G. R., & Gu, Y. (2013). mTOR complex 2 controls glycolytic metabolism in glioblastoma through FoxO acetylation and upregulation of c-Myc. *Cell Metabolism, 18*(5), 726-739.

Mayer, C., Zhao, J., Yuan, X., & Grummt, I. (2004). mTOR-dependent activation of the transcription factor TIF-IA links rRNA synthesis to nutrient availability. *Genes and Development, 18*(4), 423-434.

Peterson, T. R., Sengupta, S. S., Harris, T. E., Carmack, A. E., Kang, S. A., Balderas, E., Guertin, D. A., Madden, K. L., Carpenter, A. E., & Finck, B. N. (2011). mTOR complex 1 regulates lipin 1 localization to control the SREBP pathway. *Cell, 146*(3), 408-420.

Porstmann, T., Santos, C. R., Griffiths, B., Cully, M., Wu, M., Leevers, S., Griffiths, J. R., Chung, Y.-L., & Schulze, A. (2008). SREBP activity is regulated by mTORC1 and contributes to Akt-dependent cell growth. *Cell Metabolism, 8*(3), 224-236.

Sabatini, D. M., Erdjument-Bromage, H., Lui, M., Tempst, P., & Snyder, S. H. (2002). Mammalian proteins that bind to FKBP12 in a rapamycin-dependent fashion. In: Google Patents.

Sarbassov, D. D., Guertin, D. A., Ali, S. M., & Sabatini, D. M. (2005). Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science, 307*(5712), 1098-1101.

Saxton, R. A., & Sabatini, D. M. (2017). mTOR signaling in growth, metabolism, and disease. *Cell, 168*(6), 960-976.

Schieke, S. M., Phillips, D., McCoy, J. P., Aponte, A. M., Shen, R.-F., Balaban, R. S., & Finkel, T. (2006). The mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway regulates mitochondrial oxygen consumption and oxidative capacity. *Journal of Biological Chemistry, 281*(37), 27643-27652.

Sengupta, S., Peterson, T. R., Laplante, M., Oh, S., & Sabatini, D. M. (2010). mTORC1 controls fasting-induced ketogenesis and its modulation by ageing. *Nature, 468*(7327), 1100-1104.

Shor, B., Wu, J., Shakey, Q., Toral-Barza, L., Shi, C., Follettie, M., & Yu, K. (2010). Requirement of the mTOR kinase for the regulation of Maf1 phosphorylation and control of RNA polymerase III-dependent transcription in cancer cells. *Journal of Biological Chemistry, 285*(20), 15380-15392.

Stuttfeld, E., Aylett, C. H., Imseng, S., Boehringer, D., Scaiola, A., Sauer, E., Hall, M. N., Maier, T., & Ban, N. (2018). Architecture of the human mTORC2 core complex. *ELIFE, 7*, e33101.

Sun, Y.-X., Ji, X., Mao, X., Xie, L., Jia, J., Galvan, V., Greenberg, D. A., & Jin, K. (2014). Differential activation of mTOR complex 1 signaling in human brain with mild to severe Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease, 38*(2), 437-444.

Szwed, A., Kim, E., & Jacinto, E. (2021). Regulation and metabolic functions of mTORC1 and mTORC2. *Physiological Reviews, 101*(3), 1371-1426.

Toschi, A., Lee, E., Gadir, N., Ohh, M., & Foster, D. A. (2008). Differential dependence of hypoxia-inducible factors 1α and 2α on mTORC1 and mTORC2. *Journal of Biological Chemistry, 283*(50), 34495-34499.

Tsang, C. K., Liu, H., & Zheng, X. S. (2010). mTOR binds to the promoters of RNA polymerase I-and III-transcribed genes. *Cell Cycle, 9*(5), 953-957.

Vézina, C., Kudelski, A., & Sehgal, S. (1975). Rapamycin (AY-22, 989), a new antifungal antibiotic I. taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. *The Journal of antibiotics, 28*(10), 721-726.

Wan, W., & Liu, W. (2019). MTORC1 regulates autophagic membrane growth by targeting WIPI2. *Autophagy, 15*(4), 742-743.

Wang, W., Fridman, A., Blackledge, W., Connelly, S., Wilson, I. A., Pilz, R. B., & Boss, G. R. (2009). The phosphatidylinositol 3-kinase/akt cassette regulates purine nucleotide synthesis. *Journal of Biological Chemistry, 284*(6), 3521-3528.

West, M. J., Stoneley, M., & Willis, A. E. (1998). Translational induction of the c-myc oncogene via activation of the FRAP/TOR signalling pathway. *Oncogene, 17*(6), 769-780.

Zha, X., Wang, F., Wang, Y., He, S., Jing, Y., Wu, X., & Zhang, H. (2011). Lactate dehydrogenase B is critical for hyperactive mTOR-mediated tumorigenesis. *Cancer Research, 71*(1), 13-18.

Zhao, J., Zhai, B., Gygi, S. P., & Goldberg, A. L. (2015). mTOR inhibition activates overall protein degradation by the ubiquitin proteasome system as well as by autophagy. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 112*(52), 15790-15797.

Zheng, Y., Collins, S. L., Lutz, M. A., Allen, A. N., Kole, T. P., Zarek, P. E., & Powell, J. D. (2007). A role for mammalian target of rapamycin in regulating T cell activation versus anergy. *The Journal of Immunology, 178*(4), 2163-2170.

Zou, Z., Tao, T., Li, H., & Zhu, X. (2020). mTOR signaling pathway and mTOR inhibitors in cancer: progress and challenges. *Cell & bioscience, 10*(1), 31.

BÖLÜM V

Mikrobiyal Polisakkaritler: Sentezi, Üretimi Ve Biyoteknolojik Uygulamaları

Şeyda ALBAYRAK
Tuğba NAFIZOĞLU
Nurdan GÖNÜL BALTACI

Giriş

Polisakkaritler, çok sayıda monosakkaritin bir araya gelmesiyle oluşmakta ve kendilerini oluşturan monosakkarit çeşidine göre homopolisakkarit ve heteropolisakkarit ismini almaktadır. Homopolisakkarit yapısındaki ekzopolisakkaritlere, selüloz, glukan, mutan, pullulan, fruktanlar, dekstran, alternan, levan ve kurdlan örnek verilmektedir. Heteropolisakkaritlerden ise jellan, welan, diutan ve ksantan en çok bilinenleridir. Hayatımızın her alanında yer alan ve birçok çeşidi olan ekzopolisakkaritler (EPS); bakteriler, küfler ve mayalar tarafından üretilmektedir. EPS üreten bakterilere; *Lactobacillus, Lactococcus, Xanthomonas,*

Leuconostoc, *Thermococcus, Bacillus* ve *Anoxybacillus* örnek verilirken, mantarlardan en sık kullanılanlar; *Zygosaccharomyces, Saccharomyces, Rhodotorula* ve *Candida* cinsleridir. EPS'ler yukarıda belirtilen en sık kullanılan cinsler haricinde yüzlerce mikroorganizma tarafından üretilmekte, son yıllarda atık maddelerden de elde edilmektedir. Bunun yanı sıra, EPS'nin biyoteknolojik uygulamaları çok çeşitlidir: petrol geri kazanımı, bitki büyümesinde teşvik edici, gıda da yenilebilir ürün olarak kullanılması, tıpta antitümör aktivite göstermesi gibi kullanım alanları vardır.. Gelişen dünyada çevre kirliliğinin önüne geçmek, insan sağlığına faydalı ve yenilenebilir ürün üretmek büyük önem arz etmektedir. Bu yüzden EPS üretimi ile ilgili yapılan çalışmalara olan ilgi her geçen gün artmakta, endüstriyel ve tıp alanlarında (antikanser aktivite, kolesterol düşürücü, antiülser, antimutajenik, antioksidan ve serbest radikal bağlayıcısı etkinlikleri gibi) sıklıkla kullanılmaktadır. Tüm bu bilgiler bize EPS'lerin multidisipliner alanlarda çalışılmak için uygunluğunu, her geçen gün artan popülerliğini ve önemini ortaya koymaktadır.

1. Ekzopolisakkarit (EPS) Nedir ?

EPS'ler, bulundukları ortama mikroorganizmalar tarafından salgılanan çevre dostu doğal polimerlerdir (Vaishnav & ark.,2020). Mikrobiyal polisakkaritler ise başlıca bakteriler, mantarlar ve mavi-yeşil algler dahil olmak üzere çeşitli mikroorganizmalar tarafından salgılanan, karbonhidratlardan oluşan kompleks biyosentetik polimerlerdir. Ekstrem ortamlarda yaşayan mikroorganizmalar, koruyucu önlem olarak hücre çevresine EPS salgılamaktadır (Insulkar & ark., 2018). EPS'ler hücreyi korur, bakterilerin

bulundukları yüzeye yapışmasına yardımcı olur ve hücre-hücre etkileşimlerinde rol oynamaktadır (Cahndwani & Amaresan.,2022).

1.1. EPS'lerin Özellikleri

EPS, kendilerini üreten mikroorganizmaları fagositozdan, kurumadan, faj etkisinden, ışık, ısı ve ses gibi stres koşullarından korumaktadır. Endüstriyel amaç için üretilen EPS'ler petrol, gıda, kimya ve kozmetik gibi alanlarda kullanılmaktadır. Mikrobiyal EPS'ler gıdalarda jelleştirme ajanı, stabilizatör, nem tutucu, emülgatör ve kıvam verici gibi amaçlarla kullanılmaktadır. Bu amaçlar için en çok kullanılan polisakkaritlerin başında ksantan ve jellan gelmektedir. Bunların yanı sıra; pullulan, dekstran, levan, kurdlan, ve bakteriyel aljinatlar gibi önemli özelliklere sahip EPS'lerin de kullanımları mevcuttur (Donot & ark., 2012).

Yüksek molekül ağırlıklığına sahip EPS'ler, DNA, protein, lipid, humik asit, nükleik asit, fosfolipid ve diğer polimerik bileşiklerden oluşan heteropolimer bir yapı göstermektedir. Faklı moleküler ağırlıkta bulunabilen polisakkaritlerin fizikokimyasal özellikleri değişkenlik gösterip; monosakkarit kompozisyonu, glikozid bağ, polisakkarit geometrisi, konformasyonu ve hücredeki lokasyonuyla bağlantılıdır. İçerdikleri silt, silika ve karbonat gibi inorganik bileşenlerle de fototrofik biyofilmlerin EPS'sine katkı sağladığı düşünülmektedir (Bharti & ark., 2017).

EPS genel olarak polisakkarit, protein ve DNA olmak üzere üç temel bileşenden oluşmaktadır. Polisakkarit, bakteriyal yada viral enfeksiyon, inflamasyon ve immun sistem gibi birçok kimyasal reaksiyonda rol oynamaktadır. Polisakkaritlerin büyük kısmı karbonhidrat içermekte ve homo ve hetero polisakkarit şeklinde

bulunmaktadır. Polisakkaritler genelde doğrusal yapıda bulunmalarına rağmen çok dallı bir yapıda gösterebilirler, tek tip polisakkaritten oluşuyorsa homopolisakkarit, iki yada daha fazla sayıda polisakkaritten meydana geliyorsa heteropolisakkarit olarak adlandırılmaktadır (Zeidan & ark., 2017).

Selüloz, parçalanma sürecindeki karmaşıklığa rağmen, doğada bol bulunmakta ve diğer substratlara göre daha düşük maaliyeti olduğundan dolayı birçok ürünün üretiminde substrat olarak kullanılmaktadır (Mokale & ark., 2022). Glukan dallanmış bir homopolisakkarittir ve glukan sükraz ve fruktan sükraz gibi farklı substratlarda farklı glukan tipinde EPS üretimiyle karakterize edilmektedir. Glukanların ve fruktanların özellikle ekmek dokusunda ve hamur reolojisine etkin olduğu bilinmektedir. Bu polimerlerin gıda katkı maddesi olarak kullanılan ksantan ve diğer zamkların yerini alma potansiyeline sahip olduğu öne sürülmüştür (İsprili & ark., 2020; Mayer & ark., 2020) Pullulan, *Aureobasidium pullulans* tarafından ticari olarak üretilen doğrusal, dallanmamış bir polisakkarittir ve α (1 → 6) bağlarıyla bağlanmış tekrarlayan maltotrioz ünitelerinden oluşmaktadır. Toksik ve kanserojen olmayan bu polisakkarit gıda, ilaç ve kozmetik alanlarında aktif olarak kullanılmaktadır (Omar-Aziz & ark., 2020).

Fruktan, birçok mikroorganizma tarafından üretilmektedir. Özellikle laktik asit bakterilerinden izole edilen fruktanın probiyotik olarak kullanıldığı bilinmektedir (Korakli & ark.,2002) Diyet lifi olarak kullanılan fruktanlar, β-(2,1) veya β-(2,6) bağları içeren D - fruktoz uzantılarından meydana gelmektedir. β-(2,1) bağlantısı olan fruktanlara inülin tipi fruktanlar denir ve birçok bitkide bulunurlar. β-(2,6) bağlantıları olan fruktanlara levan tipi fruktanlar

denir ve bitkilerde ve mikroplarda bulunabilirler. Mikrobiyal β-(2,6)-fruktanlar, bakterilerin dış yüzeyinde, gevşek bir şekilde bağlı veya salgılanmış halde bulunabilir (Young & ark., 2021).

Dekstran, laktik asit bakterileri tarafından sükroz fermantasyonu sonucu üretilen bir polisakkarittir. Homopolimer ve doğrusal zincirden oluşan dekstran α-(1 → 6) ve α-(1 → 3) glikozidik bağı ile birbirine bağlanmış glikoz ünitelerinden oluşmaktadır. Toksik olmaması, yüksek su adsorpsiyon kapasitesine sahip olması ve polimer çapraz bağlama yeteneğinin bulunması önemli ayırt edici özelliklerindendir. Bu özellikleri sayesinde anjiyojenik tedavide, özellikle hücre çoğalması yaraların iyileşmesinde ve cilt yenilenme sürecinde bu polisakkaritten yararlanılmaktadır (Sood & ark., 2021; Priya & ark., 2023).

Alternan, prebiyotik kullanım potansiyeline sahip, benzersiz yapıda bir α-glukan polisakkarittir. Düşük derecede dallanma gösteren α-(1→6) ve α-(1→3) bağlantılarından oluşur ve düşük glisemik indeksine sahiptir. Alternanlar memeli ve mikrobiyal enzimlerin çoğuna dirençli olduğu için prebiyotik olarak kullanılabilmektedir. Ayrıca düşük glisemik indeksli tatlandırıcı olarak da kullanıldığı çalışmalar mevcuttur (Park & ark., 2009; Gangoiti & ark., 2020).

Levan, yüzey yapışması ve biyofilm oluşumunu desteklemek için mikroorganizmalar tarafından üretilen β-(2,1) bağlı fruktan tipi polisakkarittir. Prebiyotik olma potansiyelinin yanında kolesterol düşürme, antitimör ve antiviral gibi aktiviteleri de bildirilmiştir. Bunun yanında fermente gıdalarda, ekmeğe doku vermekte de kullanılabilmektedir. Moleküler ağırlığı ve hidrodinamik yapısı

üretilen mikroorganizmaya bağlı olarak değişkenlik göstermektedir (Runyon & ark., 2014; Hundschell & ark., 2020)

Kurdlan, *Rhizobium radiobacter* tarafından üretilen ticari bir EPS'dir. Glikoz birimlerinin β-(2,1) bağ ile bağlanması sonucu oluşan düz, lineer bir zincirdir. Suda çözünmeyen bu polisakkarit sodyum hidroksit gibi çözeltilerde çözünerek jel yapısı oluşturmaktadır. Jel kuvvetini artması ve sıkı bir yapı oluşturması kurdlanın konsantrasyonuna ve moleküler ağırlığına bağlıdır (Funami & ark.,2007; Ergene & Avcı, 2016).

Jellan, *Sphingomonas elodea* tarafından üretilen ekstraselüler bir polisakkarittir. En fazla bu bakteriden elde edilsede; *Pseudomonas elodea* ve *Sphingomonas paucimobilis ATCC 31461* tarafından da üretilmektedir. Ana zincirde iki D-glikoz, L-ramnoz ve D-glukuronik asit olmak üzere dört tekrarlayan karbonhidrat biriminden oluşmaktadır (Wang & ark., 2016). Jellan molekülü yüksek sıcaklıkta rastgele, düşük sıcaklıkta ise çift sarmal şekilde bulunmaktadır (Zand-Rajabi & Madadlou, 2016).

Welan, anyonik bir polisakkarittir ve kimyasal yapısındaki D-glukuronik asit nedeniyle polielektrolit özellik göstermektedir. Yaygın olarak kullanılan ksantanla karşılaştırıldığında daha yüksek sıcaklıklarda kararlı olduğu (150°C'ye kadar) ve yağ yer değiştirme reaksiyonlarında (petrol sondajı vb.) yer alabileceği öngörülmektedir (Li & ark., 2016).

Diutan, *Sphingomonas sp.* tarafından üretilen, yüksek molekül ağırlığına sahip, suda çözünebilen anyonik bir ekzopolisakkarittir. Diutan zamkının omurga yapısı, hekzasakkarit birimleri β-1,3-d-glukopiranosil, β-1,4-d-glukuronopiranosil, β-1,4-d-glukopiranosil

ve α-1,4-l-ramnopiranosil'in tekrarlanmasından ve (1→4) bağlı glukopiranosil kalıntısına bağlı iki sakkaritli bir L-hamnopiranosil yan zincirinden oluşmaktadır (Mota & ark.,2021).

Ksantan, 2:2:1 mol oranından tekrarlayan glikoz, mannoz ve glukuronik asit ünitelerinden oluşan uzun zincirli bir heteropolisakkarittir. *Xanthomonas* spp*., Xanthomonas campestris, Xanthomonas phaseoli* ve *Xanthomonas malvacearum* tarafından aerobik solunumla üretilmektedir. Ksantan gıda, kozmetik ve ilaç sektöründe koyulaştırıcı ve stabilizatör olarak kullanılmaktadır. Bunun yanında çevre dostu yağ yüzey aktif maddeleri, yenilenebilir filmler, doku mühendisliği ve biyouyumlu kompozitlerde de kullanılmaktadır (Asgarani & ark., 2015; Berezina & ark., 2024).

Yukarıda açıklanan EPS'lerin protein bileşenleri en fazla çalışılan kısımlarıdır. Protein EPS'nin ana bileşeni olduğu ve farklı tipte kullanılan karbon kaynaklarına paralel olarak, çeşitli protein ürettikleri tespit edilmiştir. DNA gibi nükleik asitler hücre parçalanmasına bağlı olarak salınır ve EPS matrisine absorbe olabilmektedir (Iyer & ark., 2005)

EPS' de yer alan matris, mikropların biyofilmdeki kolektif davranışında önemli bir rol oynar ve onlara avcılardan ve biyositlerden korunma, mekanik stabilite, genetik stabilite, oligotrofik ortamdan besin seleksiyonu ve hücreler arası su kanalları ağı dahil olmak üzere ekolojik avantajlar sağlamaktadır (Zeidan & ark., 2017).

EPS karakterizasyonun ilk basamağı, polisakkaritin çözündüğü solventleri (Örneğin; etanol, su, metanol, kloroform, benzen, formik asit gibi) belirlemektir.. EPS karakterizasyonunda

element analizi yapılarak, nitrojen, karbon, hidrojen ve sülfür içerikleri belirlenmektedir. EPS'nin yüzey morfolojisi çalışılırken Taramalı elektron mikroskobu (SEM) üretilen polisakkaritin kristal yapısını incelemek için X-ışını kırınımı analizi yapılmaktadır (Banerjee & ark., 2020).

Protein miktarını belirlemek için; protein yapısında yer alan peptid bağ oluşumuna katılan Azot (N) atomu ile Cu^{+2} 'nin renkli kompleksine dayanan Biüre yöntemi kullanılmaktadır. Moleküler kompozisyonun aydınlatılması için EPS'nin polimer yapısı parçalanarak monomer yapısı açığa çıkarılıp, HPLC kolonu kullanılmaktadır (Wang & ark.,2019 ;Nguyen & ark., 2020).

Biyofilm, biyotik veya abiyotik bir yüzeyde büyüyen ve hücre dışı polimerik maddelerden (EPS gibi) oluşan kendi kendine üretilen bir matris içine gömülü karmaşık bir mikrop topluluğudur (Yuan & ark., 2018). Biyofilm içindeki bakteriler, fizyolojilerindeki belirli değişiklikler ve EPS matriksinin koruyucu etkisi nedeniyle dezenfektanlara ve antimikrobiyallere karşı önemli ölçüde direnç gösterirler bu nedenle kalıcı bir mikrobiyal kontaminasyon rezervuarı görevi görmektedirler. Ayrıca, bu bakteriyel biyofilmler patojenleri barındırabilir ve hastalıkların bulaşmasına neden olabilir. Amerika Birleşik Devletleri'nde bakteriyel enfeksiyonların yaklaşık % 80' inin biyofilmlerle bağlantılı olduğu bildirilmiştir. Gıda sektörü bağlamında, bakteriyel biyofilmler, gıdaya bakteriyel yapışmanın veya biyofilm oluşumuna yol açan gıdayla temas yüzeyinin mikrobiyal bozulma nedeniyle ciddi sağlık sorunlarına ve önemli ekonomik kayıplara neden olduğu, süt sektörü de dahil olmak üzere birçok endüstri için ciddi çıkarımlar sunmuştur (Yuan & ark., 2018).

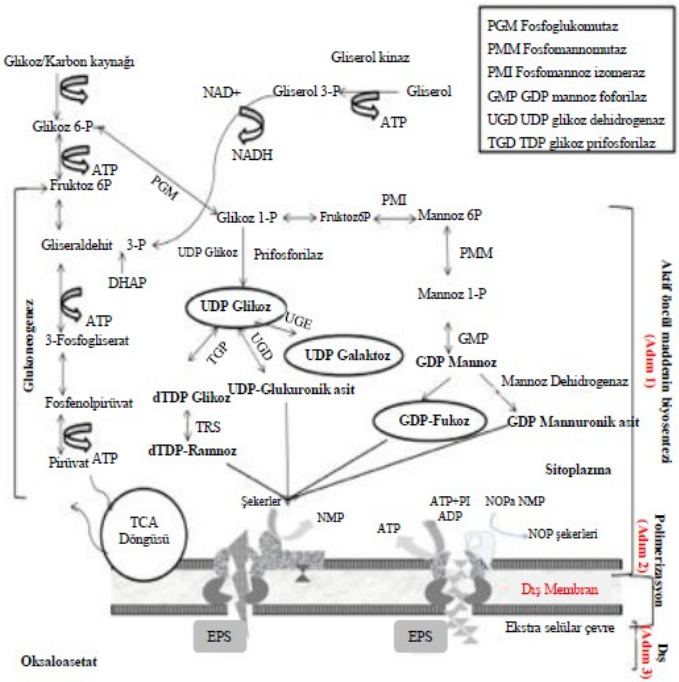
1.2. EPS Üreten Mikroorganizmalar

EPS üreten mikroorganizmalar, tatlı su, deniz suyu, atık su, toprak, biyofilmler gibi hem sucul hem de karasal ortamların farklı doğal kaynaklarından; ayrıca sıcak su kaynakları, soğuk ortamlar, hipersalin ve halofilik ortamlar, tuz gölleri ve tuzlu sular gibi ekstrem alanlardan izole edilmiştir. Bu ekstrem ortamlar bakteri, arkeler, algler ve mantarlar için önemli bir kaynak olarak tanımlanmıştır ve burada yaşayan organizmalar, olumsuz yaşam koşullarıyla başa çıkmak için farklı stratejiler geliştirmiştir. Bu sık görülen hayatta kalma stratejisinden biri de EPS üretimidir. Örneğin, kutup bölgelerinin soğuk sularında, okyanus çukurlarında veya derin deniz hidrotermal menfezleri gibi ekstrem sularda yaşayan bakteriler, genellikle EPS'leri etkili bir koruyucu bariyer olarak kullanmaktadırlar (Poli & ark., 2018; Atouei & ark., 2019)

EPS üretim süreci (ksantan, dekstran, gellan ve curdlan sentezleyen), *Xanthomonas, Leuconostoc, Pseudomonas* ve *Alcaligenes* gibi bazı mikrobiyal cinsler için fizyolojik bir mekanizma ve aynı zamanda biyotik ve abiyotik stres faktörlerine yanıt olarak sonuçlanmıştır (Poli & ark., 2018).

EPS biyosentezi genel olarak üç aşamada gerçekleşir; ilk aşamada öncül substrat sentezi, ikinci aşamada polimerizasyon ve sitoplazmik membran transferi, üçüncü aşamada hücre zar dışına salınım şeklinde gerçekleştirilmektedir. Bu basamaklar aynı

zamanda kullanılan karbon kaynağına ve mikroorganizma türüne göre değişiklik göstermektedir (Schmid & ark.,2018)



Şekil 1:Bakterilerde EPS üretim yolakları

Kaynak: Nouha & ark.,2018

EPS'ler, içinde gen ve metabolit transferlerinin çok yaygın olduğu mikro ortamlar yaratır, böylece mikroorganizmalara besin eksikliği olan ortamlarda hayatta kalmalarını sağlamak için bir yol sağlar**.** Diğer bir önemli rolu yüksek-düşük sıcaklık ve tuzluluğa karşı koruyucu işlevle ilgilidir. EPS üreten bakteriler, küfler ve mayalar çoğunlukla ekstrem ortama uyum sağlamak için yaşam stratejisi olarak EPS üretmektedirler (Squillaci & ark., 2016).

Psikrofilik bakteriler, düşük sıcaklıklarda büyüyebilen ve ısıya dayanıklı enzimler üretebilen bir grup mikroorganizmadır. Psikrofilik bakteriler tarafından oluşturulan biyofilm, süt depolama ve taşıma tankerlerinin yüzeyinde tutunarak ham süt kontaminasyonuna yol açan bozulma enzimleri üretmektedir. Düşük sıcaklıkların EPS üretimini desteklediği ve biyofilm oluşum olasılığını arttırdığı düşünülmektedir. Örneğin, etkili biyofilm oluşturucu *Pseudomonas* spp.'nin *Listeria monocytogenes* ve *Salmonella* gibi patojenlerin tutunmasını kolaylaştırdığı ve koruduğu düşünülmektedir (Yuan & ark., 2018).

EPS üreten termofiller, hem bakterilerden (*Brevibacillus, Aeribacillus, Bacillus, Thermus Geobacillus, Thermotoga*) hem de Archaea (*Sulfolobus ve Thermococcus*) gruplarından izole edilmiştir (Poli & ark., 2018).

Laktik asit bakterileri (LAB) büyüdükleri matrikste bulunan karbon kaynaklarına ve ortam koşullarına bağlı olarak laktik asit üretimine ek olarak vitaminler, biyoaktif peptitler, antibakteriyel bileşikler, aroma bileşikleri, düşük kalorili şekerler ve EPS üretmektedirler (Torino & ark., 2015).

Mantarlar genellikle büyüme ortamına salgılanan veya hücre yüzeyine sıkıca bağlı kalan EPS üretirler. *Aspergillus sp*. tarafından üretilen EPS'nin antioksidan özelliğe sahip olduğu gösterilmiştir (Chen & ark., 2011).

2. EPS'nin Kullanım Alanları

Mikrobiyal kökenli EPS'ler, psödoplastik reolojik davranışları ve su bağlama kapasiteleri nedeniyle yapı düzenleyici olarak, viskozite edici, emülgatör ve sinerez düşürücü ajanlar olarak

potansiyel uygulamalara sahiptir (Franco & ark., 2020).Metabolik süreçler sırasında mikroorganizmalar tarafından salgılanan mikrobiyal EPS'ler, çevre dostu ve yenilenebilir yapıları nedeniyle biyoteknolojide yaygın olarak kullanılmaktadır (Li & ark., 2017).

Biyofilm oluşumu tıp biliminde bir sorundur; ancak tarımda, toprakta ve kök çevresinde daha iyi ve etkili kolonizasyona yardımcı olduklarından, topraktan bitkiye bir ağ sağlayarak, entegre besin ve hastalık yönetimi veya toprak yapısının iyileştirilmesi için güçlü aday olarak gösterilmektedirler (Bharti & ark., 2017).

Mikrobiyel EPS'ler sayıca oldukça fazla olmalarına rağmen dekstran, ksantan, jellan, pullulan, kurdlan ve levan gibi EPS'ler endüstriyel açıdan önemli olanlardır. Benzersiz yapısal bileşimleri nedeniyle EPS, gıda formülasyonları, farmasötik, kozmetik endüstrisi vb. gibi çeşitli alanlarda uygulanabilmektedir (Vaishnav & ark., 2020).

Mikroorganizmalar kullanılarak ağır metallerin biyolojik arıtılması, yenilenebilir kaynakların kullanılması ve özellikle katyonların düşük konsantrasyonlarda uzaklaştırılmasındaki verimlilikleri nedeniyle geleneksel fizikokimyasal yöntemlere kıyasla avantajlı olduğu düşünülmektedir (Mota & ark., 2016).

Fototrofik biyofilmler, katı bir yüzeye tutturulmuş EPS (hücre dışı polimerik maddeler) içeren bir müsilajinöz matris içine gömülü heterotroflar ile ototroflar olarak ışıkla çalışan mikroorganizmaların karmaşık kümeleridir. EPS, yapısal ve işlevsel bütünlük sağlar ve biyofilmlerin fiziko-kimyasal ve biyolojik özellikleri için gereklidir. Bu biyofilmler basitten aşırıya kadar ortamlarda gelişir ve siyanobakteriler, diatomlar, mikroalgler, mantarlar, bakteriler ve

protozoa içerir. Flokların / biyofilmlerin oluşumu, biyoremediasyon ve atık su arıtmanın önemli bir yönüdür (Bharti & ark., 2017).

Cheng & ark. (2020) tarafından yapılan bir çalışmada ormandan aldıkları toprak örneklerinden, *Pseudomonas chlororaphis* ve *Bacillus proteolyticus* izole edilmiş ve bu bakteriler tarafından üretilen EPS'nin suya dayanıklı toprak makro agrega oluşumu üzerindeki etkisini çalışılmıştır.Çin'in Dagang petrol sahasındaki rezervuardan izole edilen *Bacillus licheniformis* türü ile petrol geri kazanımı çalışmasında izole edilen bakterinin ürettiği EPS ile umut verici sonuçlar ortaya konmuştur (Fan & ark.,2020). *B.licheniformis*'in EPS üretimi için petrol hidrokarbonlarını ve tarımsal sanayi yan ürünü olan melas kullanılarak dizayn edilen deney ile 7 günlük yerinde biyo-otogmentasyondan sonra gelişmiş petrol geri kazanım verimliliğinin % 19.2 olduğunu belirtmişlerdir (Fan & ark., 2020).

Mukhtar & ark. (2020), *Solanum lycopersicum*' (domates) da ısı stresinin azaltılması için *Bacillus cereus* tarafından üretilen ACC deaminase ve EPS'nin biyokimyasal profillerini incelemişlerdir.

Banerjee & ark. (2020), kaplıcadan izole edilen *Pseudomonas sp.*'nin ürettiği EPS'nin karakterizasyonunu gerçekleştirerek atomik kuvvet mikroskobunda EPS birimlerinin molekül içi ve moleküller arası agregasyonuna bakıp antimikrobiyal özelliğe sahip gümüş nanopartiküllerin (AgNP) birlikte çökeltme yöntemi kullanarak EPS aracılı yeşil sentezini gerçekleştirmişlerdir.

Kalpana & ark. (2019), halofilik toprak örneklerindetekstil boyasının renksizleştirilmesinde EPS üreten mikroorganizmaları belirleyerek, izole edilen *Exiguobacterium sp.* türünün, pH 6 ve 40

°C' de maksimum % 79.1 biyosorpsiyon kapasitesi ile malaşit yeşili boya ortaya çıkardığını göstermişlerdir (Kalpana & ark., 2020).

Koutinas & ark. (2019) tarafından yapılan bir çalışmada iyonik sıvıların biyoremediasyonu için EPS üreten *Sphingomonas sp.*'nin izolasyonu gerçekleştirilmiş, ortaya çıkan kirletici maddelerin bozunması ve toksisitesi incelenmiştir..

Sichuan Pickles adlı yöresel turşudan izole edilen *Bacillus sp.*'den bir antioksidan eksopolisakkaritin izolasyonu ve karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir (Hu ve ark., 2019). Bu çalışmada, yenilebilir gıdalardan EPS üretme potansiyeline sahip suşlar belirlenmiş, EPS karakterizasyonu yapılmıştır ve*in vitro* antioksidan aktivite analizi gerçekleştirilmiştir. Buna göre, EPS'lerin doza bağlı bir şekilde süperoksit, hidroksil ve DPPH radikalleri üzerinde güçlü söndürme (quenching) kapasitelerine sahip olduğunu kanıtlanmıştır (Hu & ark., 2019).

Rhodotorula mucilaginosa tarafından üretilen EPS, biyopolimer-metal nanopartikül biyokompozitlerinin sentezinde kaplama ajanı olarak kullanılmıştır (Garza-Cervantes & ark., 2019). EPS kaplı Zn ve Ni metal nanopartiküllerinden oluşan biyokompozitler, yeşil sentez metodolojisi ile sentezlenmiştir. Ni-EPS ve Zn-EPS biyokompozitleri, antibiyotiğe dirençli *Staphylococcus aureus* ve *Pseudomonas aeruginosa* suşlarına karşı antimikrobiyal ve antibiyofilm aktivite göstermişlerdir (Garza-Cervantes & ark., 2019).

Li & ark. (2017), *Sphingomonas* türleri tarafından üretilen yeni bir mikrobiyal EPS olan diutan gumu yüksek sıcaklıkta ve yüksek tuzlulukta karakterize ederekağır yağ geri kazanımı için

potansiyelini değerlendirmişlerdirr. Bu çalışmada, iki geleneksel polimer olan ksantan gum ve HPAM karşılaştırılmıştır (Li & ark., 2017).

Marcial & ark. (2017), probiyotik *Streptococcus thermophilus* suşunun ve EPS'lerinin mide mukozasına yapışma yeteneğini incelemişlerdir. İnsan mide epitelyumuna probiyotik bakteri bağlanması, insan mide dokusu örneklerinde ve mide epitel hücre hattı AGS'de doğrulanmıştır. EPS üreten *Streptococcus thermophilus, Helicobacter pylori* 'nin neden olduğu inflamatuar yanıtı azalttığını bildirmişlerdir (Marcial & ark., 2017).

Meyve pulp ve patates kabuklarından EPS üreten bakterilerin karakterizasyonu ve eksopolisakarit üretim potansiyelinin iyileştirilmesine yönelik çalışmışlar yapılmıştır (Vaishnav & ark., 2020). . Bu çalışmada taze meyve, bozulmuş meyve, taze patates kabuğu ve bozulmuş patates kabuğundan oluşan numuneler toplanmış, karbonhidrat substratı olarak sukroz, glikoz ve galaktoz içeren 4 farklı katı ortam ve MRS agar kullanılmıştır. Çalışma sonucunda EPS üreten bakterilerin, karbonhidrat olarak sükrozu tercih ettikleri ve EPS üreten izolatların % 40 'ının *Bacillus* cinsine ait olduğu vurgulanmıştır ().

Tek hücreli *Cyanobacterium, Cyanothece sp*.'nin çeşitli kültür fraksiyonları ile yapılan bir çalışmada, su kütlelerinde en yaygın üç ağır metal kirleticileri (bakır, kadmiyum ve kurşun) ayrı ayrı veya birleşik sistemler kullanılarak biyoremoval deney düzenekleri kurulmuş, salınan polisakkaritlerin, metalleri biyosorpsiyonla ortadan kaldırdığı gösterilmiştir (Mota & ark., 2016).

Sonuç

EPS çok çeşitlidir ve hayatımızın her alanında yer alırlar, multidisipliner alanda çalışılması oldukça uygundur. Birçok mikroorganizma tarafından üretilmekte, atık maddeleri kullanarak da değerli ürünler elde edildiği bilinmektedir. Bunun yanı sıra, EPS'nin biyoteknolojik uygulamaları çok çeşitlidir (petrol geri kazanımı, bitki büyümesinde teşvik edici, gıda da yenilebilir ürün olarak kullanılması, tıpta antitümör aktivite göstermesi vb.). Gelişen dünya da çevre kirliliğinin önüne geçmek, insan sağlığına faydalı ve yenilenebilir ürün üretmek büyük önem arz etmektedir, bu yüzden EPS ile ilgili yapılan çalışmalar endüstriyel ve tıp alanlarında (antikanser aktivite, antioksidan etkinlikleri gibi) kullanılabilmektedir. Tüm bu bilgiler EPS'lerin gün geçtikçe artan popülerliğini açıklamakla birlikte, aslında ne kadar önemli olduğunu da ortaya koymaktadır.

Kaynakça

Asgarani, E., Ghashghaei, T., Soudi, M. R., & Alimadadi, N. (2015). Enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) PCR based genetic diversity of *Xanthomonas* spp. and its relation to xanthan production. *Iranian Journal of Microbiology*, *7*(1), 38.

Atouei, M. T., Pourbabaee, A. A., & Shorafa, M. (2019). Alleviation of salinity stress on some growth parameters of wheat by exopolysaccharide-producing bacteria. *Iranian Journal of Science and Technology, Transactions A: Science*, *43*(5), 2725-2733.

Banerjee, A., et al. (2020). Characterization of Exopolysaccharide Produced by *Pseudomonas sp.* PFAB4 for Synthesis of EPS-Coated AgNPs with Antimicrobial Properties. *Journal of Polymers and the Environment*, *28*(1): 242-256.

Berezina, O. V., Rykov, S. V., Schwarz, W. H., & Liebl, W. (2024). Xanthan: enzymatic degradation and novel perspectives of applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *108*(1), 227.

Bharti, A., et al. (2017). "Phototrophic biofilms: diversity, ecology and applications." Journal of Applied Phycology **29**(6): 2729-2744.

Chandwani, S., & Amaresan, N. (2022). Exopolysaccharides. *Practical Handbook on Agricultural Microbiology*, 369-373.

Chen, Y., et al. (2011). "Structural characterization and antioxidant properties of an exopolysaccharide produced by the mangrove endophytic fungus *Aspergillus sp*. Y16." Bioresource Technology **102**(17): 8179-8184.

Cheng, C., et al. (2020). "Effect of Exopolysaccharide-Producing Bacteria on Water-Stable Macro-Aggregate Formation in Soil." Geomicrobiology Journal: 1-8.

Enterobacter cloacae" Indian Journal of Experimental Biology, 43(5), 467-71, 2005.

Ergene, E., & Avcı, A. (2016). Mikrobiyel ekzopolisakkaritler. *Sakarya University Journal of Science, 20*(2).

F. Donot, A. Fontana, J.C. Baccou, S.S. Galindo, "Main Examples Of Synthesis, Excretion, Genetics And Extraction," Carbohyd Polym, vol. 87, pp. 951– 962, Jan. 2012.

Fan, Y., et al. (2020). "A novel exopolysaccharide-producing and long-chain n-alkane degrading bacterium *Bacillus licheniformis* strain DM-1 with potential application for in-situ enhanced oil recovery." Scientific Reports **10**(1): 1-10.

Franco, W., et al. (2020). "Isolation of Exopolysaccharide-Producing Yeast and Lactic Acid Bacteria from Quinoa (Chenopodium Quinoa) Sourdough Fermentation." Foods **9**(3): 337.

Funami, T., & Nishinari, K. (2007). Gelling characteristics of curdlan aqueous dispersions in the presence of salts. *Food Hydrocolloids*, *21*(1), 59-65.

Gangoiti, J., Corwin, S. F., Lamothe, L. M., Vafiadi, C., Hamaker, B. R., & Dijkhuizen, L. (2020). Synthesis of novel α-glucans with potential health benefits through controlled glucose release in the human gastrointestinal tract. *Critical reviews in food science and nutrition*, *60*(1), 123-146.

Garza-Cervantes, J. A., et al. (2019). "Antimicrobial and antibiofilm activity of biopolymer-Ni, Zn nanoparticle biocomposites synthesized using R. mucilaginosa UANL-001L exopolysaccharide as a capping agent." International journal of nanomedicine **14**: 2557.

Hu, X., et al. (2019). "Isolation and characterization of an antioxidant exopolysaccharide produced by *Bacillus sp*. S-1 from Sichuan Pickles." Carbohydrate polymers **204**: 9-16.

Hundschell, C. S., Jakob, F., & Wagemans, A. M. (2020). Molecular weight dependent structure of the exopolysaccharide levan. *International Journal of Biological Macromolecules*, *161*, 398-405.

Insulkar, P., et al. (2018). "Purification and structural-functional characterization of an exopolysaccharide from *Bacillus licheniformis* PASS26 with in-vitro antitumor and wound healing activities." International journal of biological macromolecules **120**: 1441-1450.

İspirli, H., Özmen, D., Yılmaz, M. T., Sağdıç, O., & Dertli, E. (2020). Impact of glucan type exopolysaccharide (EPS) production on technological characteristics of sourdough bread. *Food Control*, *107*, 106812.

Iyer,A., Mody, K., Jha B., Characterization of an exopolysaccharide produced by a marina ??????????????????

Kalpana, R., et al. (2020). "Decolorization of Textile Dye by Halophilic *Exiguobacterium* sp. VK1: Biomass and

Exopolysaccharide (EPS) Enhancement for Bioremediation of Malachite Green." ChemistrySelect **5**(28): 8787-8797.

Korakli M., Gänzle M.G., Vogel R.F. (2002). Metabolism by bifidobacteria and lactic acid bacteria of polysaccharides from wheat and rye, and exopolysaccharides produced by *Lactobacillus sanfranciscensis*. *Journal of Applied Microbiology*, *92*, 958-965, 2002

Koutinas, M., et al. (2019). "Biodegradation and toxicity of emerging contaminants: Isolation of an exopolysaccharide-producing *Sphingomonas* sp. for ionic liquids bioremediation." Journal of hazardous materials **365**: 88-96.

Li, H., Zhu, H., Sun, S., Feng, Z., Sun, Y., & Zhou, W. (2016). Biological production of welan gum. *Physical Sciences Reviews*, *1*(10), 20160049.

Li, Y., et al. (2017). "A microbial exopolysaccharide produced by *Sphingomonas* species for enhanced heavy oil recovery at high temperature and high salinity." Energy & Fuels **31**(4): 3960-3969.

Marcial, G., et al. (2017). "Exopolysaccharide-producing *Streptococcus thermophilus* CRL1190 reduces the inflammatory response caused by *Helicobacter pylori*." Beneficial microbes **8**(3): 451-461.

Mayer, M. J., D'Amato, A., Colquhoun, I. J., Le Gall, G., & Narbad, A. (2020). Identification of genes required for glucan exopolysaccharide production in *Lactobacillus johnsonii* suggests a novel biosynthesis mechanism. *Applied and Environmental Microbiology*, *86*(8), e02808-19.

Mokale Kognou, A. L., Chio, C., Khatiwada, J. R., Shrestha, S., Chen, X., Han, S., ... & Qin, W. (2022). Characterization of cellulose-degrading bacteria isolated from soil and the optimization of their culture conditions for cellulase production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *194*(11), 5060-5082.

Mota, G., & Guimarães Pereira, R. (2021). The influence of concentration and temperature on the rheological behavior of diutan gum aqueous solutions. *International Journal of Polymer Analysis and Characterization*, *26*(8), 735-753.

Mota, R., et al. (2016). "Released polysaccharides (RPS) from *Cyanothece sp*. CCY 0110 as biosorbent for heavy metals bioremediation: interactions between metals and RPS binding sites." Applied microbiology and biotechnology **100**(17): 7765-7775.

Mukhtar, T., et al. (2020). "Mitigation of Heat Stress in Solanum lycopersicum L. by ACC-deaminase and Exopolysaccharide Producing *Bacillus cereus*: Effects on Biochemical Profiling." Sustainability **12**(6): 2159.

Nguyen, H. T., Nguyen, T. H., & Otto, M. (2020). The staphylococcal exopolysaccharide PIA–Biosynthesis and role in biofilm formation, colonization, and infection. *Computational and Structural Biotechnology Journal*.

Nouha, K., Kumar R. S., Balasubramanian, S., & Tyagi, R. D. (2018). Critical review of EPS production, synthesis and composition for sludge flocculation. *Journal of Environmental Sciences*, *66*, 225-245.

Omar-Aziz, M., Yarmand, M. S., Khodaiyan, F., Mousavi, M., Gharaghani, M., Kennedy, J. F., & Hosseini, S. S. (2020). Chemical modification of pullulan exopolysaccharide by octenyl succinic anhydride: Optimization, physicochemical, structural and functional properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, *164*, 3485-3495.

Park, J. K., & Khan, T. (2009). Other microbial polysaccharides: Pullulan, scleroglucan, elsinan, levan, alternant, dextran. In *Handbook of Hydrocolloids* (pp. 592-614). Woodhead Publishing.

Poli, A., et al. (2018). Exopolysaccharide-Producing Microorganisms from Extreme Areas: Chemistry and Application. Extremophiles in Eurasian Ecosystems: Ecology, Diversity, and Applications, Springer**:** 405-433.

Priya, S., Choudhari, M., Tomar, Y., Desai, V. M., Innani, S., Dubey, S. K., & Singhvi, G. (2023). Exploring polysaccharide-based bio-adhesive topical film as a potential platform for wound dressing application: A review. *Carbohydrate Polymers*, 121655.

Runyon, J. R., Nilsson, L., Ulmius, M., Castro, A., Ionescu, R., Andersson, C., & Schmidt, C. (2014). Characterizing changes in levan physicochemical properties in different pH environments using asymmetric flow field-flow fractionation. *Analytical and bioanalytical chemistry*, *406*, 1597-1605.

Schmid, J. (2018). Recent insights in microbial exopolysaccharide biosynthesis and engineering strategies. *Current opinion in biotechnology*, *53*, 130-136.

Sood, A., Gupta, A., & Agrawal, G. (2021). Recent advances in polysaccharides based biomaterials for drug delivery and tissue engineering applications. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications*, *2*, 100067.

Squillaci, G., et al. (2016). "Production and properties of an exopolysaccharide synthesized by the extreme halophilic archaeon *Haloterrigena turkmenica*." Applied microbiology and biotechnology **100**(2): 613-623.

Torino, M. I., et al. (2015). "Biopolymers from lactic acid bacteria. Novel applications in foods and beverages." Frontiers in microbiology **6**: 834.

Vaishnav, A., et al. (2020). "Characterization of potent exopolysaccharide producing bacteria isolated from fruit pulp and potato peels and enhancement in their exopolysaccharide production potential." Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences **9**(4): 874-877.

Wang, F., Wen, Y., & Bai, T. (2016). The composite hydrogels of polyvinyl alcohol–gellan gum-Ca2+ with improved network structure and mechanical property. *Materials Science and Engineering: C*, *69*, 268-275.

Wang, J., Salem, D. R., & Sani, R. K. (2019). Extremophilic exopolysaccharides: A review and new perspectives on engineering strategies and applications. *Carbohydrate polymers*, *205*, 8-26.

Young, I. D., Latousakis, D., & Juge, N. (2021). The immunomodulatory properties of β-2, 6 fructans: a comprehensive review. *Nutrients*, *13*(4), 1309.

Yuan, L., et al. (2018). "Interspecies variation in biofilm-forming capacity of psychrotrophic bacterial isolates from Chinese raw milk." Food Control **91**: 47-57.

Zand-Rajabi, H., & Madadlou, A. (2016). Caffeine-loaded whey protein hydrogels reinforced with gellan and enriched with calcium chloride. *International dairy journal*, *56*, 38-44.

Zeidan, A. A., et al. (2017). "Polysaccharide production by lactic acid bacteria: from genes to industrial applications." FEMS Microbiology Reviews 41(Supp_1): S168-S200.

BÖLÜM VI

İzotermal Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Pcr) Analizleri

Ayşe Nur PEKTAŞ[1]
Binnur BAĞCI[2]

Giriş

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), biyoloji, hastalık tanısı ve adli bilimlerde kullanılan en değerli tekniklerden biri haline gelmiştir (H. Zhu & ark., 2020). İlk olarak PCR, orak hücreli anemiye neden olan HBB genindeki mutasyonların tespiti için geliştirilmiştir. Radyoaktif etiketli oligonükleotidlerin hibridizasyonu ve ardından gelen restriksiyon analizi, bu tür kalıtsal mutasyonları aramak için kullanılmıştır. Bu nedenle, β-globin geninin dizileri enzimatik amplifikasyon için ilk olarak seçilmiştir (Embury & ark., 1987; Saiki & ark., 1985). HBB geni üzerinde

[1] Öğr. Gör. Dr., Sivas Cumhuriyet Üniversitesi
[2] Doç. Dr., Sivas Cumhuriyet Üniversitesi

yapılan bu çalışma sırasında elde edilen bilgi, HLA-DQ alellerinin analizinde kullanılmış ve amplikonların alel-spesifik oligonükleotidlerle hibridizasyonu kullanılarak bu çok alleli lokus için bir genotipleme yönteminin geliştirilmesiyle sonuçlanmıştır (Saiki, Bugawan, Horn, Mullis, & Erlich, 1986; Saiki & ark., 1988). Teknik transplantoloji ve adli bilimlerde uygulanmıştır. PCR teknolojisinin çok sayıda klinik uygulaması, özellikle klinik genetik alanında ve mikrobiyolojide viral ve bakteriyel enfeksiyonların tespiti için kullanılmıştır. PCR teknolojisinin bulaşıcı hastalık tanısı için bir araç olarak yararlılığı ilk olarak 1987'de gösterilmiş ve sonraki yıllarda daha da ayrıntılı olarak çalışılmıştır (Beggs, Koenig, Boyce, & Kunkel, 1990; Cassol & ark., 1989; Lebo & ark., 1990; Olive, 1989; Zeldis & ark., 1989).

Mikroakışkan sistemlerinin uygulanması, akışlı minyatür ve hızlı PCR gibi tamamen yeni bir cihaz ailesinin geliştirilmesine yol açmıştır ve ilk olarak çok erken döngülerde görülen bir uzay alanı sistemi kullanılmıştır. Silikon mikroişlemeyle uğraşan araştırmacılar bu zorluğun üstesinden hızla gelerek minyatür ve taşınabilir uç nokta PCR ve ardından qPCR cihazları geliştirmişlerdir (H. Zhu & ark., 2020).

PCR platform sistemleri

PCR platform sistemleri; damlacık tabanlı sistemler, çip tabanlı sistemler ve hibrit sistemler olmak üzere üç başlık altında incelenebilir (H. Zhu & ark., 2020).

Örnekleri damlacıklar oluşturmak için bölen birkaç teknik vardır (Streets & Huang, 2014). Hücreler de dahil olmak üzere damlacıklar mikro akışkan kanala yüklenir ve çip içinde farklı

pozisyonlara aktarılır, ardından hücre lizisi, DNA çıkarma ve saflaştırma, PCR ve floresan tespiti gibi bir dizi prosedüre tabi tutulur. Çıkarılmış DNA'ya sahip birkaç nanolitrelik küçük bir hacimdeki damlacıklar, mineral yağ gibi karışmayan bir sıvı ile ayrılarak bir emülsiyon oluşturur. Daha sonra bu emülsiyon ısıtılarak termal döngü gerçekleştirilir ve kameralar sonraki floresans ışımayı yakalar (Rival & ark., 2014). Bu platform genellikle tek hücreli çalışmalarda kullanılır ve genellikle "single- cell PCR" olarak adlandırılır (Rival & ark., 2014).

Çeşitli çip yapıları, silikon, cam veya polimerler, tipik olarak polidimetilsiloksan veya polimetilmetakrilat gibi malzemelerde farklı kuyular veya mikroakışkan kanallarıyla mikroişleme yoluyla üretilir. Numuneler, PCR ile daha sonraki DNA amplifikasyonu için kuyulara veya kanallara yüklenir (Shao & ark., 2015). Minyatürleştirilmiş PCR sistemleri taşınabilirlik sağlar ve zamandan tasarruf sağlar. Toplam reaksiyon süresi, çip boyutu, PCR ana karışım hacmi, substratın termal iletkenliği ve sıcaklık döngüsü hızı gibi bir dizi parametreye bağlıdır. Bu analizde toplam reaksiyon süresi 15 saniye gibi kısa bir süredir (Farrar & Wittwer, 2015).

Alternatif olarak, PCR ana karışımı, hidrofobik/oleofobik bir cam lamel gibi sabit bir yere dağıtılır ve mineral yağ ile kaplanır, sanal reaksiyon odasının altında termal döngüyü yürütmek için donut şeklinde bir mikro ısıtıcı kullanılarak sanal bir reaksiyon odası oluşturulur ve pasif bir soğutma yöntemi kullanılır (Neuzil, Pipper, & Hsieh, 2006). Floresan optik algılama yöntemi ile entegre edilmiş bu ısıtma/soğutma sistemi, H7N9 kuş gribi virüsünden cDNA'nın amplifikasyonunu ve Ebola virüsü RNA'sının qPCR analizinde

kullanılmıştır (Ahrberg, Ilic, Manz, & Neužil, 2016; Ahrberg, Manz, & Neužil, 2016).

Klasik PCR analizinden ilham alan ve gelişen teknolojiler

PCR teknolojisinin hızlı gelişmesiyle birlikte artık dijital PCR (dPCR), damlacık tabanlı dijital PCR (ddPCR) ve çip tabanlı dijital PCR (cdPCR) türleri de ortaya çıkmıştır (H. Zhu & ark., 2020). Birçok teknoloji orijinal PCR teknolojisinen evrimleşmiştir; bir PCR örneğini orijinalinden binlerce, bazı durumlarda milyonlarca alt örneğe bölerek her alt örnekte tek bir kopyası olan veya hiç kopyası olmayan DNA molekülleri havuzunu sayısallaştırmaya dayanan analiz dijital PCR (dPCR)'dır (Vogelstein & Kinzler, 1999). dPCR her zaman mikroakışkanlara dayanır ve damlacık tabanlı veya çip tabanlıdır. dPCR, standart eğrilere dayalı qPCR ile zaman alıcı kantifikasyondan kaçınarak DNA/RNA kopya sayısının mutlak kantifikasyonunu belirleyebilir. Ayrıca, bol ve nadir DNA'lar arasında olumsuz oranlara sahip DNA örneklerinin kopya sayısını çoğaltmak için multipleks PCR yapılmasına da olanak sağlar (H. Zhu & ark., 2020).

Damlacık tabanlı dijital PCR (ddPCR) da ise örnekler bir tür segmentli akış oluşturan mikroakışkan çipten geçer ve burada örnek, emülsiyon oluşturan mineral yağ gibi karışmayan bir sıvı ile ayrılmış on binlerce damlacığa bölünür (Schiffman & ark., 1991). Emülsiyon bir şişede toplanır, PCR gerçekleştirilir ve daha sonra örnek, pozitif PCR'lı damlacıkların sayısını saymak için akış sitometresi ile işlenir. Alternatif olarak, emülsiyon tek bir damlacık tabakası oluşturan plastik bir çipe beslenir. Termal döngü gerçekleştirilir ve damlacıkların floresan görüntüsü yakalanır ve değerlendirilir (Madic

& ark., 2016). qPCR ile karşılaştırıldığında, ddPCR daha yüksek hassasiyet ve mutlak kantifikasyonda daha düşük bir varyasyon katsayısı avantajlarına sahiptir (Hindson & ark., 2013). PCR multiplekslemesi tipik olarak her DNA/RNA için farklı uyarma renklerine sahip prob tabanlı floresan ile gerçekleştirilir. Ayrıca tek hücreli RNA dizilemesi için kütüphaneler oluşturmak için kullanılır (Hwang & Lee, 2018).

Çip tabanlı dijital PCR (cdPCR) da durum; örnek, mikroişleme tekniğiyle yapılmış kuyucuklara sahip silikon çiplere yüklenir. Daha sonra termal döngü gerçekleştirilir ve çip, pozitif PCR sonuçlarına sahip kuyucuk sayısını belirlemek için floresan mikroskobu ile görüntülenir (H. Li & ark., 2019; Q. Zhu & ark., 2017). Multipleksleme de ddPCR'de olduğu gibi yapılır (Thompson & ark., 2014). Silikon tabanlı mikrofabrikasyon, PCR'yi izlemek için her kuyuda iyon duyarlı alan etkili transistör kullanan bir ısıtıcı/sensörle entegre cdPCR'nin birleştirilmesine olanak tanır ve ayrı bir floresan görüntüleme sistemine olan ihtiyacı ortadan kaldırır (Guiducci & Spiga, 2013).

İzotermal PCR Teknolojisi

İzotermal nükleik asit amplifikasyonu sıcaklık döngüsü gerektirmez ve hızlı PCR ile karşılaştırıldığında daha düşük güç tüketimiyle daha basit cihaz tasarımı avantajına sahiptir. İzotermal amplifikasyon, soğutma işlemi gerektirmediği için soğutma sorunlarının üstesinden gelir (H. Zhu & ark., 2020). Günümüzde popüler olan döngü aracılı izotermal amplifikasyon (LAMP) ve rekombinasyon polimeraz amplifikasyonu gibi izotermal amplifikasyonla çeşitli teknikler geliştirilmiştir (Notomi & ark.,

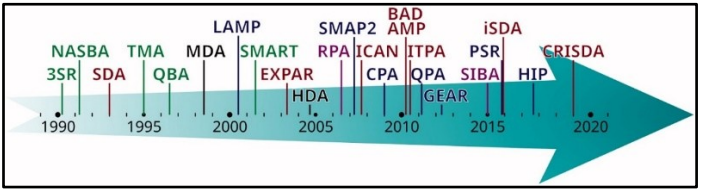
2000; Toldrà & ark., 2018). LAMP, hedefin sekiz DNA dizisini tanımlamak için altı primere kadar kullanarak yüksek özgüllüğe ulaşır. Farklı izotermal amplifikasyon tekniklerinin tanıtılması, amplifikasyon ürünlerinin görselleştirilmesi ve TaqMan probları ile qPCR'de kullanılan DNA polimerazının ekzonükleaz aktivitesinden bağımsız olarak reaksiyon kinetiğinin izlenmesi için yeni yaklaşımların geliştirilmesinin önünü açmıştır.

PCR sonrası dönemde dikkat çeken ilk modern izotermal amplifikasyon yöntemleri, 1990'da yayınlanan kendi kendini sürdüren dizi replikasyonu (3SR) idi ve kısa bir süre sonra 1991'de çok benzer nükleik asit dizisine dayalı amplifikasyon (NASBA) ve transkripsiyon aracılı amplifikasyon (TMA) teknolojisi gelmiştir (Compton, 1991; Guatelli & ark., 1990; Kacian & Fultz, 1995). NASBA, tek sarmallı RNA genomlarına sahip çeşitli patojenik virüsler için hızlı tanı testleri şeklinde bioMérieux için ticari olarak başarılı olmuş, oysa TMA, cinsel yolla bulaşan enfeksiyonların tespiti için Gen-Probe Inc. tarafından ticarileştirilmiştir (Glökler, Lim, Ida, & Frohme, 2021).

İzotermal amplifikasyon alanına giren bir sonraki önemli yöntem, 1992'de yayınlanan ve bir sarmal yer değiştirme polimerazı ile birlikte başlatma için enzimatik bölgeye özgü çentikler gerçekleştirmeye dayanan sarmal yer değiştirme (SDA) amplifikasyonudur (Walker, Little, Nadeau, & Shank, 1992). SDA, Becton Dickinson tarafından bulaşıcı hastalıkların teşhisi için ticarileştirilmiştir. Döngü aracılı izotermal amplifikasyon (LAMP), 2000 yılında Notomi ve arkadaşları tarafından yayınlanmış ve tek zincirli yer değiştiren polimeraz ve değiştirilmemiş primerler içeren bileşenlerin mevcudiyeti ve yüksek amplifikasyon verimliliği

nedeniyle en popüler amplifikasyon yöntemlerinden biri haline gelmiştir (Notomi & ark., 2000). Ancak çoğunlukla akademik uygulamalarda popüler olmasına rağmen, Eiken Chemical Co., Ltd. tarafından pazarlanan bazı reaksiyon kitlerinin ötesinde çok az ticarileştirme gerçekleştirilmiştir. Bir sonraki popüler ve daha ticari olarak uygulanan izotermal amplifikasyon yöntemi, polimeraza yardımcı bir enzim gerektirir. Daha spesifik olarak, helikaz bağımlı amplifikasyon (HDA), 2004 yılında yayınlanmış ve BioHelix Corp. tarafından pazarlanmıştır (Vincent, Xu, & Kong, 2004). HDA, bulaşıcı hastalıkların tespiti için teşhis testlerinde hala yaygın olarak kullanılmaktadır.

Şimdiye kadar en etkili ve umut vadeden izotermal amplifikasyon yöntemi, ilk olarak 2006'da yayınlanan ve TwistDx tarafından ticarileştirilen rekombinasyonla hazırlanmış (RPA) amplifikasyonudur (Piepenburg, Williams, Stemple, & Armes, 2006) . RPA, yeni nesil dizilemede küme oluşturma gibi basit tanılamanın ötesinde uygulamalar bulmuştur. Bu yöntemler arasındaki kritik ayırt edici faktörler, süreçte yer alan enzimler ve DNA iplikçik yer değiştirmesinin gerçekleştirildiği mekanizmadır (Glökler & ark., 2021). Şekil 1’de izotermal PCR teknolojisin gelişiminin yöntemlerin ilk yayınlandığı tarihe göre zaman çizelgesi verilmiştir.



Şekil 1. *İzotermal nükleik asit amplifikasyon yöntemlerinin zaman çizelgesi (Glökler & ark., 2021).*

İzotermal ve üstel amplifikasyon yöntemlerinin karşılaştırmalı örnekleri de Tablo 1'de verilmiştir. Burada tüm yöntemler, yayın tarihlerine göre kronolojik olarak sıralanmıştır.

Tablo 1. *İzotermal ve üstel amplifikasyon yöntemleri (Glökler & ark., 2021).*

İsim	Kısaltma	Sıcaklık	Süre (dk)	İlk denatürasyon	Mekanizma	Polimeraz	Yardımcı	Şablon
Kendi kendine devam eden dizi replikasyon reaksiyonu	3SR	37–42	<60	Yok	Promoter	T7 RNA pol + AMV RT	RNase H	DNA, RNA
Nükleik asit dizisine dayalı amplifikasyon	NASBA	41	<120	Var	Promoter	T7 RNA pol + AMV RT	RNase H	RNA, DNA
İplik yer değiştirme amplifikasyonu	SDA	37	<120	Var	Çentik atma	Klenow exo-	Restriksiyon enzimi	DNA
Transkripsiyon aracılı amplifikasyon	TMA	41	<140	Var	Promoter	T7 RNA pol + rev. transkriptaz	N/A	RNA, DNA

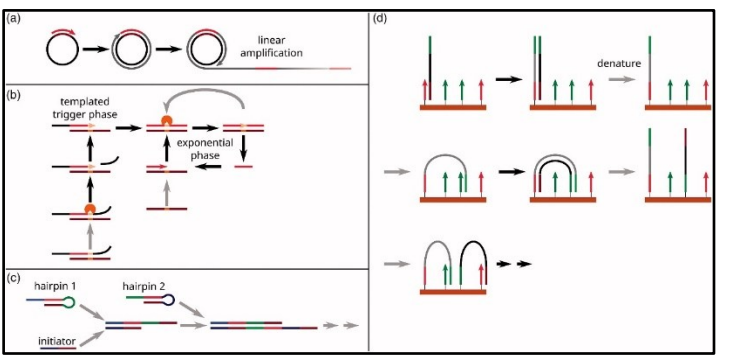
QBeta amplifikasyonu	QBA	37	<30	Var	Promoter	Q beta replikaz	Ligaz	RNA
Döngü aracılı AMPlifikasyon	LAMP	60–68	<60	Var	Yeniden katlama	Bst DNA pol	N/A	DNA (RNA)
RNA teknolojisinin sinyal aracılı amplifikasyonu	SMART	41	60	Var	Promoter	T7 RNA pol+Bst DNA pol	N/A	RNA, DNA
Dallanma amplifikasyonu	RAM/MDA	30, 63	60	Var	Çoklu primerleme	Phi29, Bst DNA pol	Ligaz ile birlikte	DNA
Üstel amplifikasyon reaksiyonu	EXPAR	60	10	Yok	Çentik atma	Vent Exo- pol	Çentikleme enzimi	DNA
Helikaz-bağımlı amplifikasyon	HDA	65	<90	Yok	İplik çözülmesi	Bst DNA pol	UvrD or T7 gp4 helikaz + SSB	DNA (RNA)

Rekombinaz polimeraz amplifikasyonu	RPA	30–42	15–60	Yok	İplik invazyonu	Bsu DNA pol	RecA + SSB	DNA
Akıllı amplifikasyon süreci sürüm 2	SMAP2	60	<60	Var	Yeniden katlama	Aac DNA pol	Taq MutS	DNA
Nükleik asitlerin izotermal ve kimerik primerle başlatılan amplifikasyonu	ICAN	60–65	<80	Var	Çentikleme/digest	Bst DNA pol	RNase H	DNA
Çapraz astarlama amplifikasyonu	CPA	63	60	Yok	Yeniden katlama	Bst DNA pol	N/A	DNA (RNA)
İşaret destekli tespit	BAD AMP	40	40	Var	Çentik atma	Bst DNA pol	Çentikleme enzimi	DNA

AMPlifikasyonu								
Nicking enzimi amplifikasyon reaksiyonu	NEAR	55	5–10	Yok	Çentik atma	Bst DNA pol	Çentikleme enzimi	DNA (RNA)
İzotermal zincir amplifikasyonu	iTPA	60	40	Var	Çentikleme/digest	Bst DNA pol	RNase H, T4 gene 32 protein	DNA
Dörtlü astarlama amplifikasyonu	QPA	70	<120	Yok	Yeniden katlama	Taq DNA pol	N/A	DNA
Genom üstel amplifikasyon reaksiyonu	GEAR	60	15–30	Var	Yeniden katlama	Bst DNA pol	N/A	DNA
İplik istilasına dayalı amplifikasyon	SIBA	30–42	<30	Yok	İplik invazyonu	Bsu DNA pol	RecA + SSB	DNA

Polimeraz spiral reaksiyonu	PSR	60–65	<50	Var	Yeniden katlama	Bst DNA pol	N/A	DNA,
İzotermal SDA	iSDA	49	20–30	Yok	Çentik atma	Bst DNA pol	Çentikleme enzimi	dsDNA
Nükleik asitlerin menteşe başlatılmış primer bağımlı amplifikasyonu	HIP	60–65	60	Var	Yeniden katlama	Bst DNA pol	N/A	DNA (RNA)
CRISPR-Cas9 tetiklemeli çentik endonükleaz aracılı iplik yer değiştirme amplifikasyonu	CRISDA	37	90	Yok	Çentik atma	Klenow exo-	Çentik Cas9-sgRNA	DNA

Amplifikasyon çok farklı koşullar altında meydana gelebilir. Geleneksel PCR tekrarlayan sıcaklık değişiklikleri gerektirirken, tanımı gereği izotermal amplifikasyonlar az çok sabit bir sıcaklıkta meydana gelmelidir. Ancak, izotermal amplifikasyon yöntemlerinin bazı farklı kategorileri ayırt edilebilir. En önemli ayrım doğrusal ve üstel amplifikasyon arasında yapılabilir. Yuvarlanan daire amplifikasyonu (RCA) gibi doğrusal amplifikasyonlarda, bir hedef dizi yalnızca şablonundan çoğaltılır ve yavrularından çoğaltılmaz. Çoğu üstel amplifikasyonda, işlemde üretilen kopyalar kendileri tekrar şablon haline gelebilir. Ancak, PCR'den farklı olarak, üstel izotermal amplifikasyon yöntemlerinin çoğu polimeraz başlatma ve uzatma adımı başına kesinlikle iki kopya üretmez. Bu, özellikle bir çoğaltılmış ürünün kaskad içindeki sonraki bir aşamada farklı bir tür ürünün oluşumunu tetiklediği izotermal amplifikasyon kaskadları için geçerlidir. Bu tür kademeli amplifikasyon reaksiyonları iki aşamadan daha fazlasını da kapsayabilir ve amplifikasyon ürünlerini hızla üretmek için polimerazlarla sınırlı değildir (Glökler & ark., 2021). Farklı izotermal amplifikasyon kategorilerine örnekler Şekil 2'de verilmiştir.



Şekil 2. *İzotermal PCR türleri (Glökler & ark., 2021).*

Şekilde (a) **RCA ile doğrusal amplifikasyon**u temsil eder. Dairesel tek zincirli bir DNA, konkatemerik tek zincirli bir ürüne yol açan bir primerin tavlanmasından sonra bir şablon görevi görür. (b) **EXPAR ile şablondan türetilen bilgi olmadan üstel amplifikasyon**dur. Bir tetikleyici dizi ve bir çentik enzim tanıma bölgesi içeren tek zincirli bir şablon, tetikleyici dizinin tekrarını içeren tamamlayıcı bir oligonükleotit ile hibridize edilir ve böylece iplik kopması şablonlanmış tetikleyici faza girer. Bir polimeraz, sürekli olarak kesilen ve polimeraz tarafından yerinden edilen tetikleyici diziyi kopyalamak için şablonu uzatır ve böylece başka bir oligonükleotite bağlanarak üstel faza girer. (c) **HCR ile enzimsiz amplifikasyon**. Saç tokası 1, başlatıcı dizisine bağlanarak konformasyonu değiştirir, saç tokası 2'nin bağlanması ve başlatıcıyla aynı olan ve saç tokası 1 tarafından tekrar tanınan bir bölgeyi açığa çıkarması için tek iplikli bir bölgeyi açığa çıkarır. Bir enzimin yardımı olmadan, saç tokalarından doğrusal çift iplikli bir konkatemer oluşturulur. (d) **Kesintili izotermal köprü amplifikasyon**udur. Tek iplikli bir şablon, ilk astarlama ve uzatma adımında immobilize edilmiş bir primer 1'e hibritlenir. Şablon, kimyasal denatürasyonla kaldırılır ve geride immobilize edilmiş kopyalanmış iplik bırakılır. Başka bir immobilize edilmiş primer 2, ikinci astarlama ve uzatma adımı için kopyalanan ipliğin tamamlayıcı bölgesine hibritlenir. Ürün şimdi her iki ipliğin de 5' uçları tarafından immobilize edildiği köprü benzeri bir yapı oluşturmaktadır. Daha fazla denatürasyon ve kopyalama adımları, ilk şablon kopyası etrafında kümelenen klonal amplifikasyon ürünleri üretir (Glökler & ark., 2021).

Reaksiyon başlatma mekanizmaları izotermal PCR teknolojisinde doğayı taklit edecek yöntemler şeklinde geliştirilmiştir. Çoğu doğal replikasyon sistemi, çift sarmallı nükleik asitlerin çözülmesini ve primaz adı verilen özel enzimler tarafından tek sarmallı bölgelerde kısa primer parçalarının oluşturulmasını gerektirir. Bu nedenle, izotermal amplifikasyon yöntemleri, erişilebilir primer bağlanma bölgeleri oluşturmak için özellikle denatürasyon adımını telafi etmek için farklı araçlara güvenmelidir. Örnek olarak doğayı ele alarak, retroviral replikasyon stratejisini taklit etmek için bir transkripsiyon amplifikasyon sistemini değiştirerek ve izotermal koşullar altında (37 °C) çalışan 3SR PCR teknolojisi geliştirilmiştir (Gingeras, Whitfield, & Kwoh, 1990). Gerçekten de, izotermal amplifikasyon yöntemlerinin çoğu, doğal replikasyon sistemlerinde zaten bilinen başlatma mekanizmalarını kullanır. Bu amplifikasyon yöntemlerindeki polimeraz başlatma bölgeleri tipik replikasyon kökenlerine benzediğinden, bu özel özelliği belirtmek için için "amplifikasyon kökeni"(veya kısaca oriA) terimini kullanılır (Glökler & ark., 2021). Jenerik şablonların amplifikasyonu için polimerazların bölgeye özgü bir başlatılmasını sağlamak amacıyla bu tür oriA'lardan bir veya daha fazlasını üretmek için çeşitli mekanizmalar geliştirilmiştir. Çoğu amplifikasyon yöntemi, bir oriA mekanizmaları paneline dayalı bir temanın varyasyonu olarak anlaşılabilir. Mekanizmalar, amplikonun her iki ucuna simetrik olarak uygulanabilir veya asimetrik bir şekilde birleştirilebilir. Mekanizma türüne bağlı olarak, amplifikasyonu başlatmak için hedef dizinin başlangıçta denatürasyonu gereklidir. Ek olarak, çoğu mekanizma aktif bir oriA'yı yeniden oluşturmak için terminal dizilerinin yenilenmesini gerektirir (Glökler & ark., 2021).

- Promotör mekanizması

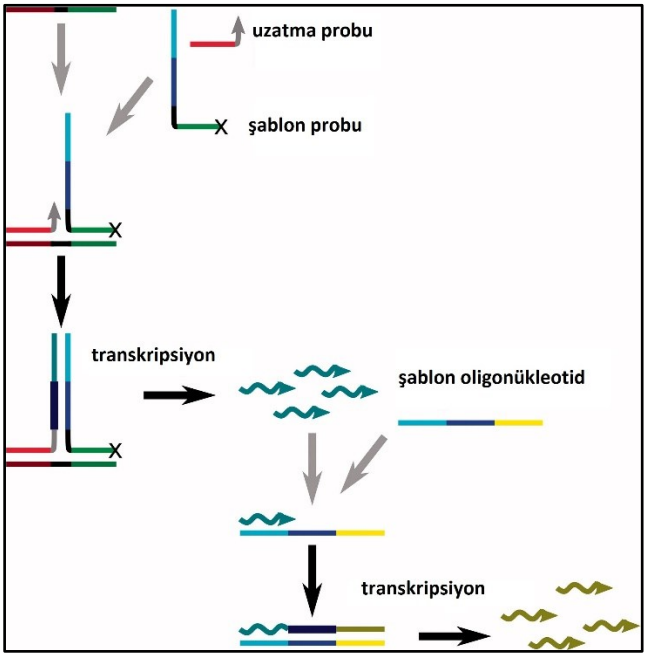
Qβ ve 3SR/NASBA/TMA (Tablo 1) amplifikasyonları, oriA'da polimerazın başlatılması için promotör benzeri bir mekanizmaya dayanır. Qβ amplifikasyonu durumunda, Qβ replikazı için promotör görevi gören uçlardan kaynaklanan oldukça verimli üç boyutlu bir RNA yapısının oluşumudur. Replikaz tek bir yapı ve dizi türüyle sınırlı olmasa da, promotör olarak belirli yapıları güçlü bir şekilde tercih eder (Ugarov & Chetverin, 2008). Qβ replikazının esnekliği nedeniyle daha spesifik ve yapısal olarak daha az bağımlı promotörler tanıtılmıştır. En değerli promotör, düzensiz E. coli bakteriyofajı T7'den türetilen popüler T7 RNA transkripsiyon sistemine dayanmaktadır. T7 RNA polimerazının optimum promotör dizisi uzun zamandır bilinmektedir ve enzim, bir amplifikasyon bileşimine kolayca entegre edilebilmesi için birden fazla kaynaktan ticari olarak temin edilebilir. T7 promotörü genellikle belirli bir şablonda bulunmadığından ve T7 RNA polimerazı promotör dizisinin sonunda guanin ile başladığından, promotör dizilerinin şablona eklenmesi gerekir. Bu, promotör dizisinin 5' olağan şablona özgü bölgeye kaynaştırıldığı primerler tasarlanarak elde edilir. Böyle bir yaklaşım ilk olarak, in vitro transkripsiyon ve ters transkripsiyonun dönüşümlü döngülerini homojen olmayan bir şekilde gerçekleştiren ve ayrıca denatürasyon ve primer tavlaması için ısıtma adımlarını da içeren transkripsiyona dayalı amplifikasyon sisteminde (TAS) araştırılmıştır (Glökler & ark., 2021; Kwoh & ark., 1989).

Orijinal 3SR konsepti, kesikli TAS'den yararlanarak ve RNase H kullanılarak aksi takdirde erişilemeyen RNA/cDNA-heterodupleksinden primer bağlanması için tek zincirli bir DNA'yı

(ssDNA) yeniden oluşturarak izotermal ve homojen bir amplifikasyon yöntemine dönüştürmüştür. Başlangıçta, oriA olarak hareket eden terminal T7 promotör dizilerine sahip simetrik bir konsept, T7 RNA polimeraz, iki değiştirilmemiş DNA primer oligonükleotid (T7 promotör dizisinin tanıtımı için), AMV ters transkriptaz ve E. coli RNase H ile birlikte kullanılmıştır. İzotermal reaksiyonlar, 3SR'nin erken versiyonlarında 37 °C'de gerçekleştiriltirmiştir (Guatelli & ark., 1990). 3SR'nin daha optimize edilmiş versiyonları daha sonra T7 promotörü olan bir oriA ile asimetrik bir konsept kullanarak ve diğer oriA'yı basit bir primer bağlanma yeri olarak oluşturmak için yalnızca RNase H'nin aktivitesi ile reaksiyon 42 °C'lik daha katı bir sıcaklıkta gerçekleşmiştir (Fahy, Kwoh, & Gingeras, 1991). NASBA ve TMA gibi diğer patentli yöntemlerin mekanizması, 3SR'nin bu sonraki formatıyla çok benzerdir (Glökler & ark., 2021).

T7 promotörü doğrusal izotermal amplifikasyon yöntemlerinde oriA olarak da tanıtılmıştır. Örneğin, tek primer izotermal amplifikasyon (SPIA) doğrusal amplifikasyon yöntemi, girdi materyalinin stokiyometrisini koruma yeteneği nedeniyle tüm transkriptom gibi karmaşık örneklerin tarafsız amplifikasyonu için kullanılmıştır (Kurn & ark., 2005). Ancak, RNA teknolojisinin sinyal aracılı amplifikasyonu (SMART), bir oriA olarak hizmet eden bir T7 promotör dizisini içeren üç yollu birleşme (3WJ) yapısının şablona bağlı oluşumuna dayanmaktadır (Wharam & ark., 2001). T7 RNA polimerazı, hibridizasyona dayalı bir deneyde tespit edilecek bir sinyal RNA'sını çoğaltır. Ayrık sinyal RNA'larının tarafsız doğrusal amplifikasyonu, çoklu tespite izin verir. İkinci şablon oligonükleotid setini kullanarak, üstel amplifikasyon elde edilebilir.

Ancak, orijinal şablondan hiçbir bilgi SMART tarafından çoğaltılmaz, bu da eserlere karşı ayrımı zorlaştırır (Glökler & ark., 2021).



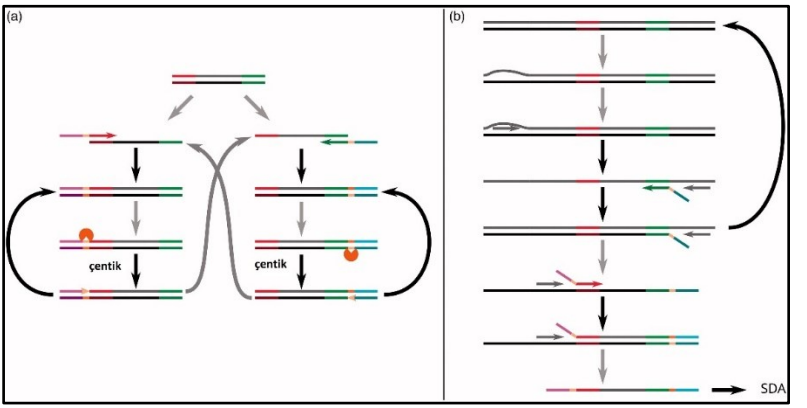
Şekil 3. *Sinyal Aracılı RNA Amplifikasyonu Teknolojisi (SMART) (Glökler & ark., 2021).*

Tek zincirli şablon, uzatma probu ve bir T7 promotör dizisi (parlak mavi çizgi), bir sinyal dizisi (mavi çizgi) ve bir bloklama modifikasyonu (x) içeren şablonla melezleşir. Birleştirilmiş kompleks, şablon probunda uzamayı başlatabilen serbest bir 3' ucu (gri ok) sunan 3 yönlü bir bağlantı yapısı oluşturur. Bst DNA polimerazı, uzatma probunu uzatır ve böylece T7 RNA polimerazı tarafından tanınan bir T7 promotörü (kalın mavi ipliği içerir) üretir. RNA polimerazı, ilk sinyal RNA'sının (dalgalı mavi-yeşil oklar)

birçok kopyasının üretildiği birden fazla transkripsiyon turu başlatabilir. İlk sinyal RNA'sı daha sonra, Bst DNA polimerazı tarafından uzama için bir primer görevi görmek üzere bir T7 promotör dizisi de içeren başka bir şablon oligo ile melezleşebilir. Bu yeni oluşturulan şablon, tekrar T7 RNA polimerazı tarafından transkripsiyona tabi tutulur ve tespit için ikinci bir sinyal RNA'sının (dalgalı yeşil renkli oklar) birden fazla kopyası elde edilir (Glökler & ark., 2021).

- İplik kırma mekanizması

Birçok doğal replikasyon sistemi, replikasyon sürecini başlatmak için bir ipliği kıran çentik enzimlerinin kullanımını içerir. Örneğin, konjugatif plazmidler genellikle transferin kökeninde kesen bölgeye özgü bir çentik kodlar. Ortaya çıkan serbest 3' ucu, polimerazlar tarafından yuvarlanan daire replikasyonunu başlatmak için kullanılabilir. Bu mekanizmanın izotermal amplifikasyon yönteminde bir oriA olarak yapay bir uygulamasının ilk örneği İplik yer değiştirme amplifikasyonu (SDA) teknolojisidir (Walker & ark., 1992). Bu dönemde ticari olarak çentik enzimi mevcut değildi ve bu nedenle, tipik bir restriksiyon enzimi, yeni sentezlenen ipliği kesilmeye dirençli hale getiren modifiye edilmiş bir nükleotid kullanılarak bir çentik enzimine dönüştürülmüştür. Escherichia coli DNA polimeraz I'in büyük parçasının (ekzo-Klenow polimerazı) ekzonükleaz eksikliği olan bir formu, iplik kaydırma aktivitesine sahip olup, dGTP, dCTP, TTP ve Rp-α-fosforotioat-deoksiadenozin kullanarak, bölünme bölgelerinde hemifosforotioat tanıma bölgeleri üreten dublekslerin 3' uçlarını uzatır. SDA mekanizması Şekil 4’te gösterilmiştir.



Şekil 4. Zincir yer değiştirme amplifikasyonu (SDA) (Glökler & ark., 2021).

Şekilde (a) SDA'nın basitleştirilmiş mekanizmasını gösterir. Şablon, başlangıçta, bir çentik enzimi tanıma dizisi ve 3' hedef bağlama bölgesi içeren SDA primerleriyle hibridizasyon için hedef dizileri kullanılabilir hale getirmek üzere denatüre edilir. Her iki zincir için mekanizma simetrik bir şekilde gösterilir. Şablon, hedef bağlı SDA primerinden kopyalanan çentik dizisi tarafından uzatılır. Yeni tanıtılan çentik dizisi, bir çentik enzimi tarafından tanınır ve kesilir ve uzatılabilir 3' ucu olan bir çentik oluşturulur. Zincir yer değiştiren polimeraz çentikten uzanır ve böylece SDA primerinin bir kısmından yoksun olan tek zincirli şablon dizisini yerinden oynatır. Tek zincirli şablon, SDA primerleriyle hibridizasyon yoluyla tekrar geri dönüştürülürken, yeni oluşturulan çift zincir, çentik enzimi tarafından tekrar tekrar tanınır ve böylece şablon dizisinin üstel bir amplifikasyonuna yol açar. (b) iSDA tarafından ilk şablon dönüştürme adımları. Şablon, bir çentik enzimi tanıma dizisi tanıtmak için ilk adımlarla dönüştürülmelidir. iSDA durumunda, tampon primerlerine dayalı SDA primerleri tarafından dönüşüm için

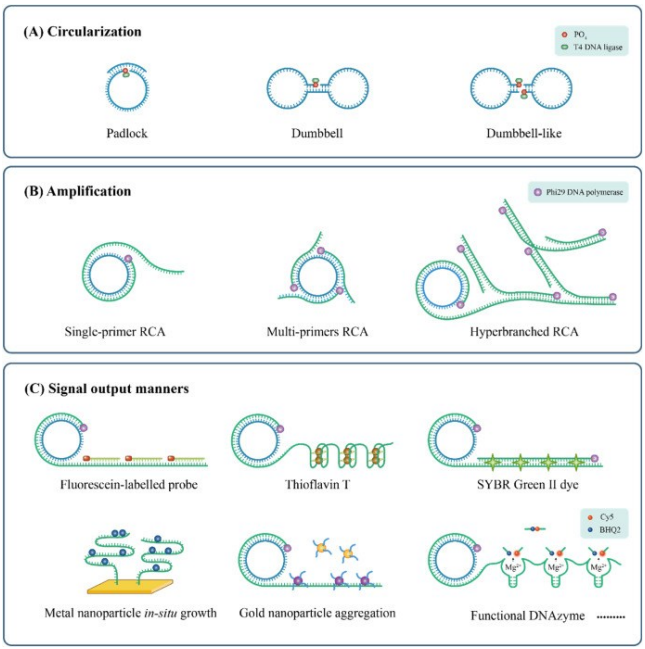
tek bir ipliğin üretimini başlatabilen bir primer için belirli bir "nefes alma" yeri seçilir. Tampon primerleri, daha sonra tamamlayıcı SDA primerleri tarafından daha fazla kopyalanan çentik enzimi tanıma dizisiyle yeni sentezlenen ipliğin yer değiştirmesini hızlandırır. Ürün daha sonra doğrudan üstel SDA reaksiyonuna girebilir.

Çentik enzim tabanlı bir yöntem için başka bir örnek primer oluşturma-yuvarlanma dairesi amplifikasyonudur (PG-RCA) (Murakami, Sumaoka, & Komiyama, 2009). Bu yöntemin özel bir özelliği, çentik enzimleri tarafından bir zincir kırılmasının, üstel bir kaskad reaksiyonuyla sonuçlanan doğrusal bir yuvarlanma dairesi amplifikasyonunun başlatılmasıyla birleştirilmesidir. Şablon, çift sarmallı hibrit bölgesinde bir çentik enzimi tanıma bölgesi içeren sıkı koşullar altında dairesel bir proba hibridizasyonla tanınır. Sıkılık, Vent ekzo-DNA polimerazı ve 7 bazlı bir tanıma bölgesine sahip bir çentik enzimi kullanılarak 60 °C'lik bir tavlama sıcaklığında 19 bazlı tamamlayıcı bir dizi içeren tek sarmallı dairesel bir proba hibridizasyonla kontrol edilir. Çentik enzimi şablon ipliğini keser ve böylece ilk doğrusal yuvarlanma dairesi amplifikasyon adımını başlatır. Bu yuvarlanma dairesi amplifikasyonu, artık tanıma bölgesini içeren ve aynı zamanda birden fazla dairesel proba da tavlanabilen birden fazla parçadan oluşan bir konkatemerik doğrusal tek sarmallı ürün üretir. Bu iplik-prob komplekslerinin çentiklenmesiyle, bağımsız olarak ek konkatemerik ürünler üreten ikinci amplifikasyon aşaması tetiklenir. Bu reaksiyonun verimliliği, tamamlayıcı hedef dizisinin birkaç kopyasını içeren dairesel problar kullanılarak iyileştirilebilir (Glökler & ark., 2021). Bu tür yuvarlanan daire kaskadı, bu nedenle çok küçük hedef miktarlarının bile son derece hassas bir şekilde

tespiti için bir ürünü hızla çoğaltabilir. Ancak, ürün dairesel prob tarafından kodlananın dışında herhangi bir orijinal şablon dizisi içermediğinden, hiçbir bilgi çoğaltılmaz. Bu nedenle, yanlış pozitif bir amplifikasyon ürünü, belirli bir örnekteki gerçek hedefin varlığından ayırt edilemez (Murakami & ark., 2009).

Tipik bir RCA sisteminde, sürekli amplifikasyon için dört bileşen gereklidir: a) şablona tamamen tamamlayıcı kısa oligonükleotid primer veya şablona kısmen tamamlayıcı diziye sahip uzun nükleik asit zinciri; b) dairesel DNA şablonu; c) karşılık gelen tamponuyla DNA/RNA polimerazı ve d) deoksinükleotid trifosfatlar (dNTP'ler) veya NTP'ler. DNA/RNA polimeraz (örn. Phi29 DNA polimeraz, Bst DNA polimeraz veya T7 RNA polimeraz) zincir yer değiştirme aktivitesiyle, şablon dizilerine dayanarak primeri uzatmak için kullanılır ve yüzlerce tandem tekrarı olan uzun tek zincirli DNA (ssDNA) veya RNA nanotelleri elde edilir, RCA ürünlerinin uzunluğu dNTP/NTP, polimeraz veya reaksiyon süresinin konsantrasyonlarının ayarlanmasıyla kontrol edilebilir. RCA'dan önce dairesel ssDNA şablonu hazırlanabilir. İstenilen şablonu elde etmek için “kilit, dambıl ve dambıl benzeri” olmak üzere üç temel yöntem vardır (Şekil 5A). Doğrusal RCA'nın (LRCA) temel prensibi Şekil 5B'de gösterilmiştir. Başlangıçta, primer tamamlayıcı dizi sayesinde dairesel DNA şablonuna bağlanır, DNA polimeraz daha sonra şablona uygun olarak primerin 3' ucunu uzatır ve yukarı akış ipliğini sürekli olarak yerinden oynatır. Son olarak, şablona uygun olarak tandem tekrarlı diziye sahip uzun bir ssDNA üretilebilir. Jel elektroforezi, RCA ürünlerini karakterize etmek için kullanışlı bir araçtır, genellikle ürün bandı, büyük moleküler ağırlığı (>1000 nt) nedeniyle jel şeridinin en üstünde görünecektir. Son

derece hassas bir biyosensör genellikle algılamayı başarmak için dört modül içerir: hedef tanıma modülü (biyoreseptör), sinyal iletim modülü, sinyal amplifikasyon modülü ve sinyal çıkış modülü. RCA şablon siklizasyon adımı, son derece spesifik hedef tanımayı başarmak için tasarlanabilir (Şekil 5C)(Liu, Xie, Lv, Xiong, & Xu, 2023).



Şekil 5. *RCA şablon daireselleştirme yöntemleri, RCA türleri ve yaygın RCA sinyal çıkış biçimleri. A) RCA şablon daireselleştirme yöntemleri; B) RCA amplifikasyon türleri; C) RCA sinyal çıkış biçimlerine örnekler (Liu & ark., 2023).*

İzotermal PCR teknolojisinin çeşitli alanlarda kullanımı

Geleneksel tespit teknolojileri, karmaşık çalışma, düşük doğruluk, düşük hassasiyet, uzun süreli tespit vb. gibi az çok

dezavantajlar sunmaktadır. Bu nedenle, mikroorganizma tespiti için daha rahat, doğru ve hassas ölçümlere ihtiyaç duyulmaktadır. İzotermal amplifikasyon teknolojisi, yukarıda belirtilen avantajları içeren alternatif yaklaşımlardan biridir. İzotermal PCR teknolojisinin bir türü olan LAMP, bitki hastalığı tespiti, hayvan hastalığı tespiti, gıda güvenliği tespiti vb. alanlarda yaygın olarak kullanılmaktadır. LAMP sürekli olarak farklı alanlarda optimize edilmekte ve geliştirilmektedir (X. Li & ark., 2022).

DNA hidrojelleri, dizi programlanabilirliği, hassas moleküler tanıma, uyaranlara yanıt verme, biyouyumluluk ve biyolojik olarak parçalanabilirlik gibi benzersiz özelliklere sahiptir ve bu özellikler, malzeme biliminden biyomedikal uygulamalara kadar çeşitli uygulamalarda kullanılmalarını sağlamıştır. Rasyonel olarak programlanmış dizilere ve ayarlanabilir fiziksel, kimyasal ve biyolojik özelliklere sahip 3B DNA hidrojellerinin yuvarlanan daire amplifikasyonu (RCA) tabanlı sentezi yapılmaktadır (Yao, Zhang, Tang, & Yang, 2021).

Diğer amplifikasyon stratejileriyle karşılaştırıldığında, RCA'nın birçok belirgin avantajı vardır. İlk olarak, bir asma kilit probunun bağlanmasında gereken kesin tamamlayıcılık nedeniyle, RCA reaksiyonuna yüksek özgüllük kazandırır ve hatta tek baz uyumsuzluklarını ayırt etmek için kullanılabilir. İkinci olarak, çoklu primerlerin tanıtımı yoluyla, üstel amplifikasyon kolayca elde edilebilir ve iyi bir duyarlılığa yol açar. Üçüncüsü, RCA ürünleri, aptamer, DNAzimler ve restriksiyon enzim bölgeleri gibi işlevsel nükleik asitler üretmek için dairesel şablonlar kullanılarak özelleştirilebilir. Dahası, RCA iyi biyouyumluluğa sahiptir ve özellikle yerinde tespit için uygundur. Bu nedenle, RCA,

biyobelirteçlerin son derece hassas tespiti için etkili ve potansiyel bir araç olarak önemli ilgi görmüştür (Xu, Duan, Chen, Ding, & Cheng, 2021).

İn vitro tanı (IVD) araştırma alanı ve endüstriyel pazarı COVID-19 salgını sırasında ve sonrasında gelişirken, izotermal nükleik asit amplifikasyon testi (INAAT) tabanlı hızlı tanının geliştirilmesi, küresel çapta büyük ölçüde bir problem çözme egzersizi olarak ortaya çıkmıştır. Klinikte hızlı virüs tespiti için uygun test kitleri ve/veya yöntemleri seçerken farklı INAAT sistemlerinin ve sinyal çıkış biçimlerinin kullanılabilirliği araştırılmıştır (Wei & ark., 2023).

Yüksek patojenik kuş gribi virüsleri (HPAIV'ler) ve düşük patojenik kuş gribi virüsleri (LPAIV'ler), kümes hayvanı endüstrisi ve küresel insan sağlığı için önemli tehditler oluşturmaktadır. Daha hızlı AIV tespiti için sahada belirli moleküler teşhis araçları uygulanabilir. Kısa protokolleri ve kısa tespit süreleri nedeniyle, POCKIT DUO ve POCKIT Central, AIV'nin güvenilir tespiti için umut vadeden moleküler teşhis cihazlar olarak tespit edilmiştir (Lee & ark., 2021).

Gıda kaynaklı ve enterik virüsler için çok sayıda izotermal amplifikasyon tekniği bildirilmiştir. Bunlardan NASBA, LAMP ve RPA son zamanlarda gıda kaynaklı ve enterik virüslerin izotermal amplifikasyonu için büyük ölçüde odaklanılan teknolojiler olmuştur (Suther, Stoufer, Zhou, & Moore, 2022).

Ayrıca sütte *S. aureus*'un tespiti için bir SRCA yöntemi oluşturulmuştur (Yang & ark., 2019). SRCA yönteminin sonuçları beyaz çökeltinin varlığı veya floresan ölçümü ile görsel olarak

değerlendirilebilir. SRCA testi, geleneksel PCR yöntemine kıyasla en az 100 kat daha yüksek hassasiyete ulaşmıştır (Yuan & ark., 2020).

Sonuç

İzotermal amplifikasyon (IA), hastalık tanısı, mikrobiyal tanılama ve patojen tespiti için yüksek özgüllük ve hassasiyete sahip güçlü bir polimerizasyon tekniğidir. Bu teknoloji çeşitli yaklaşımlarda dayanıklı ve esnek olan etkili bir hedef nükleik asit amplifikasyon stratejisidir. Prob dizilerinin rasyonel ön tasarımı, birden fazla işlev sağlayabilir. Ayrıca klasik PCR genel sağlık sisteminde yaygın olarak kullanılmasına rağmen, yetenekli personel ve termal döngü kontrol sistemlerine ihtiyaç duyulması nedeniyle kaynak sınırlı hastanelerde nadiren kullanılır. Bu nedenle, basit bir termal kontrol sistemi kullanarak nükleik asitleri çoğaltan ve testi gerçekleştirmek için daha az yetenekli personel gerektiren bir teknoloji olan izotermal amplifikasyon, hastane/sağlık hizmetlerinde yerinde test için potansiyel olarak uygulanabilir.

Üç popüler izotermal amplifikasyon tekniği, LAMP, RCA ve CRISPR sistemleri, hastalık teşhisi için sürekli olarak geliştirilmiştir. Ancak bu yöntemlerin hepsinin avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır. Bu üç teknoloji arasında LAMP, kısa amplifikasyon süreleri nedeniyle POC (yerinde uygulama testleri) uygulamaları için yaygın olarak kullanılmıştır. Ancak, iyileştirilmesi beklenen iki büyük zorluk vardır: spesifik olmayan amplifikasyon ve primer-dimer oluşumu gibi durumlar söz konusu olabilmektedir. RCA, son derece hassas ve seçici tespit için dikkat çekicidir. Özellikle, reaksiyonu ilk denatürasyon gereksinimi olmadan düşük

bir sıcaklıkta gerçekleştirme yeteneği vardır. Ancak, optimum şekilde tasarlanmış dairesel DNA veya RNA şablonları gereklidir. CRISPR-Cas sistemleri düşünüldüğünde ise, bunlar yüksek hassasiyet ve özgüllük teşhis platformlarıdır, ancak çalışma süreleri kusurludur (Boonbanjong, Treerattrakoon, Waiwinya, Pitikultham, & Japrung, 2022).

Kaynakça

Ahrberg, C. D., Ilic, B. R., Manz, A., & Neužil, P. (2016). Handheld real-time PCR device. *Lab on a Chip, 16*(3), 586-592.

Ahrberg, C. D., Manz, A., & Neužil, P. (2016). Palm-sized device for point-of-care Ebola detection. *Analytical chemistry, 88*(9), 4803-4807.

Beggs, A. H., Koenig, M., Boyce, F. M., & Kunkel, L. M. (1990). Detection of 98% of DMD/BMD gene deletions by polymerase chain reaction. *Human genetics, 86*, 45-48.

Boonbanjong, P., Treerattrakoon, K., Waiwinya, W., Pitikultham, P., & Japrung, D. (2022). Isothermal Amplification Technology for Disease Diagnosis. *Biosensors, 12*(9), 677. Retrieved from https://www.mdpi.com/2079-6374/12/9/677

Cassol, S. A., Poon, M.-C., Pal, R., Naylor, M. J., Culver-James, J., Bowen, T., . . . Hoar, D. (1989). Primer-mediated enzymatic amplification of cytomegalovirus (CMV) DNA. Application to the early diagnosis of CMV infection in marrow transplant recipients. *The Journal of clinical investigation, 83*(4), 1109-1115.

Compton, J. (1991). Nucleic acid sequence-based amplification. *Nature, 350*(6313), 91-92.

Embury, S. H., Scharf, S. J., Saiki, R. K., Gholson, M. A., Golbus, M., Arnheim, N., & Erlich, H. A. (1987). Rapid prenatal diagnosis of sickle cell anemia by a new method of DNA analysis. *New England Journal of Medicine, 316*(11), 656-661.

Fahy, E., Kwoh, D., & Gingeras, T. (1991). Self-sustained sequence replication (3SR): an isothermal transcription-based amplification system alternative to PCR. *Genome Research, 1*(1), 25-33.

Farrar, J. S., & Wittwer, C. T. (2015). Extreme PCR: efficient and specific DNA amplification in 15–60 seconds. *Clinical chemistry, 61*(1), 145-153.

Gingeras, T., Whitfield, K., & Kwoh, D. (1990). *Unique features of the self-sustained sequence replication (3SR) reaction in the in vitro amplification of nucleic acids.* Paper presented at the Annales de biologie clinique.

Glökler, J., Lim, T. S., Ida, J., & Frohme, M. (2021). Isothermal amplifications – a comprehensive review on current methods. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology, 56*(6), 543-586. doi:10.1080/10409238.2021.1937927

Guatelli, J. C., Whitfield, K. M., Kwoh, D. Y., Barringer, K. J., Richman, D. D., & Gingeras, T. R. (1990). Isothermal, in vitro amplification of nucleic acids by a multienzyme reaction modeled after retroviral replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 87*(5), 1874-1878.

Guiducci, C., & Spiga, F. M. (2013). Another transistor-based revolution: on-chip qPCR. *Nature methods, 10*(7), 617-618.

Hindson, C. M., Chevillet, J. R., Briggs, H. A., Gallichotte, E. N., Ruf, I. K., Hindson, B. J., . . . Tewari, M. (2013). Absolute quantification by droplet digital PCR versus analog real-time PCR. *Nature methods, 10*(10), 1003-1005.

Hwang, B., & Lee, J. H. (2018). D. Bang Single-cell RNA sequencing technologies and bioinformatics pipelines Exp. *Mol. Med, 50*, 96.

Kacian, D. L., & Fultz, T. J. (1995). Nucleic acid sequence amplification methods. In: Google Patents.

Kurn, N., Chen, P., Heath, J. D., Kopf-Sill, A., Stephens, K. M., & Wang, S. (2005). Novel isothermal, linear nucleic acid amplification systems for highly multiplexed applications. *Clinical chemistry, 51*(10), 1973-1981.

Kwoh, D., Davis, G., Whitfield, K., Chappelle, H., DiMichele, L., & Gingeras, T. (1989). Transcription-based amplification system and detection of amplified human immunodeficiency virus type 1 with a bead-based sandwich hybridization format. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 86*(4), 1173-1177.

Lebo, R. V., Saiki, R. K., Swanson, K., Montano, M. A., Erlich, H. A., & Golbus, M. S. (1990). Prenatal diagnosis of α-thalassemia by polymerase chain reaction and dual restriction enzyme analysis. *Human genetics, 85*, 293-299.

Lee, J., Cho, A. Y., Ko, H.-H., Ping, J.-F., Ma, L.-J., Chai, C.-F., . . . Song, C.-s. (2021). Evaluation of insulated isothermal PCR devices for the detection of avian influenza virus. *Journal of Virological Methods, 292*, 114126. doi:https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2021.114126

Li, H., Zhang, H., Xu, Y., Tureckova, A., Zahradník, P., Chang, H., & Neuzil, P. (2019). Versatile digital polymerase chain

reaction chip design, fabrication, and image processing. *Sensors and Actuators B: Chemical, 283*, 677-684.

Li, X., Zhang, X., Shi, X., Shi, H., Wang, Z., & Peng, C. (2022). Review in isothermal amplification technology in food microbiological detection. *Food Science and Biotechnology, 31*(12), 1501-1511. doi:10.1007/s10068-022-01160-6

Liu, J., Xie, G., Lv, S., Xiong, Q., & Xu, H. (2023). Recent applications of rolling circle amplification in biosensors and DNA nanotechnology. *TrAC Trends in Analytical Chemistry, 160*, 116953. doi:https://doi.org/10.1016/j.trac.2023.116953

Madic, J., Zocevic, A., Senlis, V., Fradet, E., Andre, B., Muller, S., . . . Droniou, M. (2016). Three-color crystal digital PCR. *Biomolecular detection and quantification, 10*, 34-46.

Murakami, T., Sumaoka, J., & Komiyama, M. (2009). Sensitive isothermal detection of nucleic-acid sequence by primer generation–rolling circle amplification. *Nucleic acids research, 37*(3), e19-e19.

Neuzil, P., Pipper, J., & Hsieh, T. M. (2006). Disposable real-time microPCR device: lab-on-a-chip at a low cost. *Molecular bioSystems, 2*(6-7), 292-298.

Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., & Hase, T. (2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic acids research, 28*(12), e63-e63.

Olive, D. M. (1989). Detection of enterotoxigenic Escherichia coli after polymerase chain reaction amplification with a

thermostable DNA polymerase. *Journal of Clinical Microbiology, 27*(2), 261-265.

Piepenburg, O., Williams, C. H., Stemple, D. L., & Armes, N. A. (2006). DNA detection using recombination proteins. *PLoS biology, 4*(7), e204.

Rival, A., Jary, D., Delattre, C., Fouillet, Y., Castellan, G., Bellemin-Comte, A., & Gidrol, X. (2014). An EWOD-based microfluidic chip for single-cell isolation, mRNA purification and subsequent multiplex qPCR. *Lab on a Chip, 14*(19), 3739-3749.

Saiki, R. K., Bugawan, T. L., Horn, G. T., Mullis, K. B., & Erlich, H. A. (1986). Analysis of enzymatically amplified β-globin and HLA-DQα DNA with allele-specific oligonucleotide probes. *Nature, 324*(6093), 163-166.

Saiki, R. K., Chang, C.-A., Levenson, C. H., Warren, T. C., Boehm, C. D., Kazazian Jr, H. H., & Erlich, H. A. (1988). Diagnosis of sickle cell anemia and β-thalassemia with enzymatically amplified DNA and nonradioactive allele-specific oligonucleotide probes. *New England Journal of Medicine, 319*(9), 537-541.

Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A., & Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of β-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science, 230*(4732), 1350-1354.

Schiffman, M., Bauer, H., Lorincz, A., Manos, M., Byrne, J., Glass, A., . . . Howley, P. (1991). Comparison of Southern blot hybridization and polymerase chain reaction methods for the

detection of human papillomavirus DNA. *Journal of Clinical Microbiology, 29*(3), 573-577.

Shao, H., Chung, J., Lee, K., Balaj, L., Min, C., Carter, B. S., . . . Weissleder, R. (2015). Chip-based analysis of exosomal mRNA mediating drug resistance in glioblastoma. *Nature communications, 6*(1), 6999.

Streets, A. M., & Huang, Y. (2014). Microfluidics for biological measurements with single-molecule resolution. *Current opinion in biotechnology, 25*, 69-77.

Suther, C., Stoufer, S., Zhou, Y., & Moore, M. D. (2022). Recent Developments in Isothermal Amplification Methods for the Detection of Foodborne Viruses. *Frontiers in Microbiology, 13*. doi:10.3389/fmicb.2022.841875

Thompson, A. M., Gansen, A., Paguirigan, A. L., Kreutz, J. E., Radich, J. P., & Chiu, D. T. (2014). Self-digitization microfluidic chip for absolute quantification of mRNA in single cells. *Analytical chemistry, 86*(24), 12308-12314.

Toldrà, A., Jauset-Rubio, M., Andree, K. B., Fernández-Tejedor, M., Diogène, J., Katakis, I., . . . Campàs, M. (2018). Detection and quantification of the toxic marine microalgae Karlodinium veneficum and Karlodinium armiger using recombinase polymerase amplification and enzyme-linked oligonucleotide assay. *Analytica Chimica Acta, 1039*, 140-148.

Ugarov, V. I., & Chetverin, A. B. (2008). Functional circularity of legitimate Qβ replicase templates. *Journal of molecular biology, 379*(3), 414-427.

Vincent, M., Xu, Y., & Kong, H. (2004). Helicase-dependent isothermal DNA amplification. *EMBO reports, 5*(8), 795-800.

Vogelstein, B., & Kinzler, K. W. (1999). Digital pcr. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 96*(16), 9236-9241.

Walker, G. T., Little, M. C., Nadeau, J. G., & Shank, D. D. (1992). Isothermal in vitro amplification of DNA by a restriction enzyme/DNA polymerase system. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 89*(1), 392-396.

Wei, Z., Wang, X., Feng, H., Ji, F., Bai, D., Dong, X., & Huang, W. (2023). Isothermal nucleic acid amplification technology for rapid detection of virus. *Critical Reviews in Biotechnology, 43*(3), 415-432. doi:10.1080/07388551.2022.2030295

Wharam, S. D., Marsh, P., Lloyd, J. S., Ray, T. D., Mock, G. A., Assenberg, R., . . . Cardy, D. L. (2001). Specific detection of DNA and RNA targets using a novel isothermal nucleic acid amplification assay based on the formation of a three-way junction structure. *Nucleic acids research, 29*(11), e54-e54.

Xu, L., Duan, J., Chen, J., Ding, S., & Cheng, W. (2021). Recent advances in rolling circle amplification-based biosensing strategies-A review. *Analytica Chimica Acta, 1148*, 238187. doi:https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.12.062

Yang, Q., Zhang, Y., Li, S., Lu, X., Yuan, Y., & Zhang, W. (2019). Saltatory rolling circle amplification for sensitive visual detection of Staphylococcus aureus in milk. *Journal of dairy science, 102*(11), 9702-9710.

Yao, C., Zhang, R., Tang, J., & Yang, D. (2021). Rolling circle amplification (RCA)-based DNA hydrogel. *Nature Protocols, 16*(12), 5460-5483. doi:10.1038/s41596-021-00621-2

Yuan, N., Zhang, Y., Xu, H., Zhou, Z., Lu, X., Chen, T., . . . Zhang, W. (2020). Development of the saltatory rolling circle amplification assay for rapid and visual detection of Alicyclobacillus acidoterrestris in apple juice. *Journal of agricultural and food chemistry, 68*(15), 4538-4545.

Zeldis, J. B., Lee, J. H., Mamish, D., Finegold, D. J., Sircar, R., Ling, Q., . . . Mimms, L. T. (1989). Direct method for detecting small quantities of hepatitis B virus DNA in serum and plasma using the polymerase chain reaction. *The Journal of clinical investigation, 84*(5), 1503-1508.

Zhu, H., Zhang, H., Xu, Y., Laššáková, S., Korabečná, M., & Neužil, P. (2020). PCR Past, Present and Future. *BioTechniques, 69*(4), 317-325. doi:10.2144/btn-2020-0057

Zhu, Q., Xu, Y., Qiu, L., Ma, C., Yu, B., Song, Q., . . . Mu, Y. (2017). A scalable self-priming fractal branching microchannel net chip for digital PCR. *Lab on a Chip, 17*(9), 1655-1665.

BÖLÜM VII

Adipokinlerin Obezite İle İlişkili İnflamatuar Mekanizmalar Üzerindeki Etkileri

Binnur BAĞCI[1]
Ayşe Nur PEKTAŞ[2]

Dünya genelinde başlıca halk sağlığı sorunu olan obezite salgın boyutlarına ulaşmış ve gelişmekte olan ülkelerde artmaya devam etmektedir. Obezite, Tip 2 diabetes mellitus, kardiyovasküler hastalık, osteoartrit (OA) ve romatoid artrit (RA) gibi çeşitli kronik otoimmün ve inflamatuar hastalıklarla ilişkilidir ve bu nedenle yüksek bir sosyoekonomik etkiye sahiptir (Zhang & ark., 2014). Obeziteyi incelemeyi amaçlayan modern çalışmalar, obezitenin patogenezinin çok faktörlü yapısını ortaya koymaktadır; bunlar arasında hiperinsülinemi, insülin direnci, hormonal düzenleme ve kronik sistemik inflamasyon, obezitenin, komplikasyonlarının ve

[1] Doç. Dr., Sivas Cumhuriyet Üniversitesi
[2] Öğr. Gör. Dr., Sivas Cumhuriyet Üniversitesi

eşlik eden hastalıkların gelişiminde en önemli patojenik faktörler olarak yer almaktadır (Wei & ark., 2022). Obezitenin yönetilmesi, inflamatuar mekanizmaları engelleyerek kardiyovasküler hastalık ve kötü prognoz risklerinin azaltılmasına yardımcı olabilir (Ellulu & ark., 2017).

İnflamasyon, doku ve organ homeostazını korumak için tasarlanmış düzenli bir olaylar dizisidir. Bağışıklık sisteminin zararlı ve yabancı uyaranları tanıyıp ortadan kaldırması ve iyileşme sürecini başlatması sürecidir. İnflamasyon akut veya kronik olabilir. Yapılan araştırmalardan elde edilen sonuçlar, obezitenin kronik düşük dereceli bir inflamasyon düzeyi ile nedensel olarak bağlantılı olduğunu göstermektedir (Hotamisligil, 2006; Shoelson & ark., 2006). Artık yağ dokusunun yalnızca enerji depolamada yer almadığı, aynı zamanda çeşitli biyoaktif maddeleri salgılayan bir endokrin organ olarak da işlev gördüğü iyi bilinmektedir (Ouchi & ark., 2005). Aşırı yağlanma ve yağ hücresi işlev bozukluğunun neden olduğu bu faktörlerin düzensiz ifadesi, değişen bağışıklık tepkileri yoluyla çeşitli hastalık süreçlerinin patogeneziyle ilişkilendirilmiştir.

Ayrı anatomik konumlardaki yağ dokusu depoları, enerji depolama, besin salınımı ve termojenez gibi metabolizmanın temel yönlerini düzenler (Corvera, 2021). Enerjinin depolanması ve salınması için uzmanlaşmış bir hücre türü olan adipositler (yağ doku hücreleri), yakıt depolama, termojenez, mekanik destek ve bağışıklık koruması gibi sistemik enerji metabolizmasının temel yönlerini kontrol etmektedir. Yağ doku, farklılaşmış yağ hücrelerine ek olarak birçok hücre tipinden oluşur. Bu hücrelere olan ilgi, yağ dokusunun adipojenik, osteojenik ve kondrojenik (Gimble & Guilak, 2003; .

Zuk & ark., 2001) dahil olmak üzere çeşitli soylara farklılaşabilen çok potansiyelli mezenkimal progenitör hücrelerin bir kaynağı olduğu ve yağ depolarının bağışıklık hücresi bileşiminin metabolik ve beslenme durumlarına karşı oldukça hassas olduğu (Weisberg & ark., 2003; Ferrante, 2013) keşifleriyle önemli ölçüde hızlanmıştır. Bu bulgular, yağ hücrelerinin doku hacminin %90'ından fazlasına katkıda bulunmalarına rağmen yağ dokusu hücrelerinin %50'sinden daha azını temsil ettiğinin kabul edilmesine yol açmıştır (Eto & ark., 2009).

Beyaz adipoz doku (BAD), enerji depolama dokusu görevi görmesinin yanı sıra, artık aktif bir endokrin organ ve yağ dokusundan türetilen faktörlerin (adipokinler) kaynağı olarak kabul edilmektedir. BAD, olgun ve gelişmekte olan yağ hücrelerinin yanı sıra fibroblastlar, endotel hücreleri ve yağ dokusu makrofajları, nötrofiller, eozinofiller, mast hücreleri, T ve B hücreleri gibi çok çeşitli bağışıklık hücrelerinden oluşan aktif bir endokrin organdır (Huh & ark., 2014). Yağ dokusu, adipokinler olarak bilinen peptitleri üreterek otokrin, parakrin ve endokrin işlevlerini yerine getirebilir (Aghili & ark., 2021). Adipoz doku tarafından salgılanan adipokinler, sağlık ve hastalık üzerinde çeşitli etkileri olan biyoaktif moleküllerdir (Fasshauer & Blüher, 2015). Adipoz doku adipokinler sayesinde, organlar arası çapraz konuşma ağında merkezi bir düğüm oluşturur ve adipokinler (Romacho & ark., 2014) aracılığıyla birden fazla organ ve dokunun düzenlenmesini sağlar; bu biyolojik olarak aktif moleküller, anjiyogenez, metabolizma ve inflamasyonun modülasyonu da dahil olmak üzere pek çok pleyotropik etkilere neden olur(Szydło & ark., 2016). Adipokinler, esas olarak iştahı, metabolizmayı, bağışıklığı, davranışı, kardiyovasküler işlevi ve

üremeyi düzenleyen otokrin/parakrin/endokrin mediatörler olarak etki eder (Vegiopoulos & ark., 2017). Bu nedenle yağ dokusu aynı zamanda diğer organlarla çok çeşitli hormonal, inflamatuvar ve metabolik etkileşimlere yanıt veren ve bunlardan sorumlu olan bir dokudur, dolayısıyla yağ dokusunun düzgün çalışması sağlıklı kalmak için olmazsa olmazdır (Feijóo-Bandín & ark.,2020).

Adipokinler, obez bireylerde düşük dereceli sistemik inflamasyona önemli katkıda bulunan pleyotropik moleküller olarak da tanımlanmaktadır. Bu bağlantı, inflamasyon bölgelerine bitişik yağ dokusunda adipokinlerin değişen ifade örüntüsüyle vurgulanmaktadır (Batra & Siegmund, 2012). Bir aracılar ailesi olarak adipokinler, ağırlıklı olarak pre- ve olgun adipositler tarafından üretilen gerçek adipokinlerden ve adipositler ve yağ dokusunun stromal vasküler fraksiyonunda (SVF) bulunan bağışıklık hücreleri ve yağ dokusu depolarının dışındaki birçok hücre tipi tarafından üretilen klasik sitokinlerden oluşur. Pro- ve anti-inflamatuar adipokinlerin dengesi, konakçının beslenme/metabolik durumu, enfeksiyon veya sistemik inflamasyonun varlığı, oksidatif stres, sigara içme durumu, yaş ve cinsiyet gibi birçok farklı faktör tarafından belirlenir. (Mancuso & ark., 2006; Sull & ark.,2009; Somech & ark.,2007; Nakanishi & ark., 2005). En önemlisi, adipokinler obezite gelişimi sırasında ve enfeksiyona veya sistemik inflamasyona yanıt olarak yağ dokusundaki inflamatuar yanıtın düzenlenmesinde önemli bir rol oynar (Lord & ark., 1998; Friedman & Halaas, 1998; Takabatake & ark., 1999).

Adipokinlerin ekspresyonu, yağ dokusu deposunun bulunduğu yere bağlı olarak da değişebilir. En çok ve çeşitli adipokin üreten depolar viseral ve subkutan adipoz dokularıdır (Samaras & ark., 2010; Fried & ark., 1998). Ek olarak, adipoz doku kalp ve böbrekler de dahil olmak üzere vücutta birden fazla organla ilişkilidir. Yağ hücreleri ayrıca kemik iliğinde, akciğerlerde ve büyük kan damarlarının adventitiasında bulunur. Bazı durumlarda, yüksek kalorili diyetlerin, deri altı ve viseral yağ dokusunda gözlemlenene benzer şekilde bu depolarda proinflamatuar bir durumun gelişimini teşvik edebileceği gösterilmiştir (Chatterjee & ark., 2009). Bu bireysel yağ depolarının çoğunun işlevsel önemi genel olarak bilinmemekle birlikte, son kanıtlar diyetle indüklenen adipokin salgılarındaki değişikliklerin ilişkili dokunun işlevini etkileyebileceğini göstermektedir (Takaoka & ark., 2009).

Obezitede yağ dokusunun hücresel bileşimi, bağışıklık, vasküler ve yapısal hücrelerin sayısı, fenotipi ve lokalizasyonu açısından değişmektedir (Ouchi & ark., 2011). İnsanlarda ve hayvan modellerinde yapılan araştırmalar obezitede adipoz dokuya çok sayıda makrofaj göçü olduğunu ve bu durumun sistemik inflamasyon ve insülin direnci ile ilişkili olduğunu göstermiştir (Xu &ark., 2003). Pre-adipositler makrofajlara farklılaşabilse de, adipositler ve makrofajların kökeni farklıdır (Cousin & ark., 1999). Fare kemik iliği kimeralarında yapılan deneyler, beyaz adipoz doku makrofajlarının kemik iliğinden türediğini göstermiştir. Bu da yağ dokusunda bulunan makrofajların in situ olarak pre-yağ hücrelerinin farklılaşmasından değil, BAD'ı infiltre eden dolaşımdaki monositlerden türediğini göstermektedir (Weisberg & ark., 2003).

Ayrıca, adipoz dokuda makrofajlarının birikimi hem insanlarda hem de farelerde yağlanma miktarı ile orantılıdır ve devam eden kilo kaybı, obez bireylerin pro-inflamatuar profillerinde bir azalmaya eşlik eden yağ dokusu makrofajlarının sayısında bir azalmaya neden olur (Cancello & ark., 2005). Yağ dokusu ayrıca, hücre dışı matris bileşenleri üreten fibroblastlar içerir. Son zamanlarda, metabolik olarak işlevsiz yağ dokusunun, yağ kütlesi genişlemesine müdahale edebilen ve metabolik düzensizliğe katkıda bulunabilen aşırı matris bileşenleri ürettiği gösterilmiştir (Khan & ark., 2009). Bu nedenle, yağ dokusu içindeki hücreler arası iletişimin normal metabolik işlev için gerekli olduğu giderek daha belirgin hale gelmektedir. Bu kitap bölümü, obezitenin inflamasyon mekanizmalarında adipokinlerin temel işlevlerinin açıklanması amaçlanmaktadır.

Proinflamatuar adipokinler

Obezitede artan yağ doku kütlesi ile birlikte çoğu adipokinin üretimi de artar ve bu pro-inflamatuar proteinler obeziteyle bağlantılı metabolik hastalıkların gelişiminde rol alabilir. Leptin, TNF ve IL-6 resistin, retinol bağlayıcı protein 4 (RBP4), lipokalin 2, IL-18, anjiyopoietin benzeri protein 2 (ANGPTL2), CC-kemokin ligandı 2 (CCL2), CXC-kemokin ligandı 5 (CXCL5) ve nikotinamid fosforiboziltransferaz (NAMPT) proinflamatuar sitokinler arasındadır ve her geçen yıl yeni adipokinler keşfedilmektedir.

Leptin

En iyi bilinen proinflamatuar adipokinlerden biri leptindir. Leptin, esas olarak adipositlerde sentezlenen bir hormondur; hipotalamustaki bir reseptör aracılığıyla merkezi kilo kontrolünü sağlar ve hipotalamusu uyararak iştahı azaltabilir (Sánchez-Margalet

& ark., 2003; , Roca-Rodríguez & ark., 2022). Leptin, 16 kDa'lık bir moleküler ağırlığa sahiptir ve 4500 bp'lik bir diziden oluşan ob geni tarafından kodlanır ve 167 amino asitten oluşan aktif bir bileşik olarak dolaşıma verilir. Leptin reseptörü (LepR), sitokin reseptörleri ailesine aittir ve altı izoformda bulunur. Bu izoformlar ortak bir leptin bağlama alanını paylaşır ancak hücre içi alanlarında farklılık gösterir (Wada & ark., 2014; Münzberg & Morrison, 2015). Olumlu fizyolojik fonksiyonlarına rağmen leptin geleneksel olarak proinflamatuar bir sitokin olarak kabul edilir. Uzun zincirli sarmal sitokinler ailesine aittir ve moleküler yapısında TNFα, IL-6, IL-12 veya IL-15 gibi diğer sitokinlerle homoloji gösterir. Leptinin bir akut faz inflamatuar protein olarak görev yapabileceği, dolayısıyla dolaşımdaki konsantrasyonlarının sepsis ve ateş sırasında arttığı ve üretiminin TNFa ve IL-1 gibi diğer inflamatuar aracılar tarafından uyarılabileceği öne sürülmüştür (Gruzdeva & ark., 2019; Lee & ark., 2019). Leptin, monositleri, lökositleri ve makrofajları IL-6, TNFa ve IL-12 üretmek üzere aktive eder, monositlerde reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimini ve göç yanıtını artırır ve makrofajlarda CC- kemokin üretimini artırır (Gainsford & ark., 1996; Feijóo-Bandín, & ark., 2015). Tüm bu fonksiyonları ile leptin inflamatuar yanıtta önemli bir role sahiptir. TNF ve Lipopolisakkarit (LPS) dahil olmak üzere proinflamatuar uyaranlara yanıt olarak serum ve yağ dokularındaki leptin düzeyleri artar (Grunfeld & ark., 1996).

Kemerin

Kemerin, tazaroten kaynaklı gen 2 (TIG2) veya retinoik asit reseptör yanıtlayıcısı 2 (RARRES2) olarak da bilinir, bağışıklık, adipogenez, metabolizma ve inflamasyonda düzenleyici işlevlere sahip bir kemotaktik proteindir (Ernst & Sinal, 2010) bir

prepropeptid olarak sentezlenir ve20 amino asitlik bir sinyal peptidinin N-terminalinin kesilmesi 18 kDa'lık inaktif öncü prokemerin (chemerin163) olarak salgılananır (Mattern & ark., 2014). İnaktif prokemerin kan dolaşımında katılır, ancak biyolojik etkisini gösterebilmesi için pıhtılaşma, fibrinolitik ve inflamasyon kaskadlarının ekstraselüler proteazları tarafından C-terminalinin proteolitik olarak kesilip aktive edilmesi gerekir ve bu da farklı kemerin formlarının oluşumuna yol açar (Du & Leung, 2009). Prokemerinden C-terminusunu ayıran proteaz türlerine göre, üç aktif kemerin ürünü üretilebilir: chemerin156, chemerin157 ve chemerin158. Bu moleküller kemokin benzeri reseptör 1 (CMKLR1), G proteinine bağlı reseptör 1 (GPR1) ve C-C kemokin reseptörü benzeri 2 (CCRL2) için farklı aktivite ve afiniteye sahiptir. Bunlar arasında CMKLR1, birincil kemerin reseptörüdür ve vücutta geniş ekspresyona sahip olup en çok çalışılanıdır (Wittamer & ark., 2003). CCRL2 reseptörünün, kemerinin lokal olarak konsantrasyonunu artırmak için bir bağlanma alanı olarak hareket ettiği düşünülmektedir. Bu şekilde, prokemerin CCRL2'ye bağlanarak, C-terminusunu proteolitik olarak aktif formuna işlenmek üzere açıkta bırakır ve daha sonra CMKLR1 reseptörlerini ifade eden bitişik hücrelerle etkileşime girer, bu da kemerin hücre içi sinyalizasyonunu tetikler (Zabel & ark.,2008; Monnier & ark., 2012). Dolaşımdaki kemerin düzeyi inflamatuar koşullarda yükselir ve proinflamatuar sitokinler olan TNF-α, IL-1β ve IL-6 tarafından aktive edildiği gösterilmiştir. Kemerinin proinflamatuar yolaklar olan PI3K/Akt ve MAPK'leri aktive ettiği gösterilmiştir (Kaur & ark., 2010). Ayrıca kemerin, ateroskleroz gelişiminde kritik bir adım olan artmış monosit-endotel adezyonuna yol açan endotel hücre

adezyon molekülleri VCAM-1, ICAM-1 ve E-selektinin ekspresyonunu ve salgılanmasını artırır (Dimitriadis & ark., 2018). Kemerin, BMI, C-reaktif protein ve insülin direncinin homeostaz modeli değerlendirmesi (HOMA-IR) indeksi ile pozitif korelasyona sahipken, HDL düzeyleri ile negatif korelasyona sahiptir (Sell & ark., 2010). Bu nedenle kemerin, obezitenin ve komplikasyonlarının gelişimine eşlik eden inflamatuar süreçlerin önemli bir belirtecidir.

Resistin

Resistin, inflamatuar süreçlerin aktivasyonuyla ilişkili olan sistein açısından zengin resistin benzeri moleküller (RELM'ler) ailesinin bir üyesidir. RETN geni tarafından kodlanır (Pang & Le,.2006). Resistin, moleküler ağırlığı 12,5 kDa olan bir polipeptittir (Cebeci & ark., 2019), 108 aminoasitten oluşur, salgılanması obezite ile artar ve insülin kaynaklı glikoz alımını inhibe ederek doğrudan yağ hücreleri üzerinde etki eder. Resistinin farelerde insülin direncini indüklediğini göstermiştir (Steppan & ark., 2001). Resistinden yoksun farelerin düşük hepatik glikoz üretimi nedeniyle açlık sonrası kan glikoz seviyeleri düşüktür (Banerjee & ark., 2004). Resistinin glikoz metabolizmasını düzenleme yeteneği, adipositlerde insülin sinyallemesinin bir inhibitörü olan sitokin sinyallemesinin baskılayıcısı 3'ün (SOCS3) aktivasyonuyla ilişkilidir (Steppan & ark., 2005). Hayvan modelleri üzerinde yapılan çalışmalar, resistinin insülin direncini desteklediğini tutarlı bir şekilde gösterse de, insanlarda bu etkiye dair kanıtlar daha az açıktır (Lee & ark., 2003). Resistinin insanlarda kemik iliği ve makrofajlarda yüksek oranda ifade edildiği gösterilmiştir (Patel & ark., 2003). Esas olarak monositler/makrofajlar tarafından ve küçük miktarlarda doğrudan yağ hücreleri tarafından üretilir, böylece

inflamatuar, metabolik, otoimmün ve kardiyovasküler hastalıklarda yer alan moleküler yolları düzenler. Resistin, anjiyogenez, tromboz, göç ve VSMC'nin proliferasyonunda rol oynar; ayrıca, aterosklerozun gelişimine katkıda bulunan endotel disfonksiyonunu etkiler (Jamaluddin & ark., 2012). Resistinin insanlardaki ana rolü proinflamatuar gibi görünmektedir. İnsan periferal mononükleer hücrelerinde (PBMC), resistin NF-κB sinyal iletim yolağına bağlı bir mekanizmada proinflamatuar sitokinler TNFα, IL-1β ve IL-6'nın ifadesini artırmaktadır (Bokarewa & ark., 2005). Aynı doğrultuda, insan kaynaklı makrofaj kültür çalışmalarında, resistin ifadesi lipopolisakkarit (LPS) tarafından artırılır ve TNFα, IL-6 ve IL-1β'nin immüno-nötralizasyonu ve NF-κB'yi hedef alan anti-inflamatuar insülin duyarlılaştırıcı ilaçlar tarafından engellenmektedir. Bu durum bu hücrelerde resistin üretimi için bir dizi proinflamatuar sitokin indüklenmesinin gerekli olduğunu gösterir (Lehrke & ark. 2004). Resistin düzeylerinin aşırı kilolu ve obez hastalarda önemli ölçüde daha yüksek olduğu gösterilmiştir (Kollari & ark., 2022). Ek olarak, obezite ve T2DM'de dolaşımdaki resistin düzeyleri normal olan kişilerin aksine, hiperresistinemisi olan kişilerde resistin düzeylerinin insülin direnci ile pozitif ilişkili olduğu gösterilmiştir (Su & ark., 2019). Bu nedenle, resistinin obezitenin ve özellikle ateroskleroz olmak üzere vasküler komplikasyonlarının gelişiminde rol oynadığı sonucuna varabiliriz (Kirichenko & ark., 2022).

Visfatin

Visfatin, muhtemelen viseral yağ dokusu (vBAD) tarafından üretilen ve salgılanan proinflamatuar bir adipokindir. 52 kDa moleküler ağırlığa sahiptir ve 473 amino asitten oluşur (Saddi-Rosa & ark., 2010). Visfatin, vBAD'ın makrofajları tarafından

inflamatuar sinyallere yanıt olarak ifade edilir ve salınır (Curat & ark., 2006). Visfatinin pro-inflamatuar etkileri, transkripsiyon faktörü NF-κB, aktivatör protein 1 (AP-1), sitokinler IL-6, IL-8 ve TNF-α, hücreler arası yapışma molekülü-1 (ICAM-1), vasküler hücre yapışma molekülü-1 (VCAM-1), E-selectin ve (MMP)–MMP-1 ve MMP-3 gibi yapışma moleküllerinin aktivasyonu ile ilişkilidir (Brentano & ark., 2007). Visfatinin sadece TNF-α seviyesini artırma yeteneği değil, aynı zamanda patojenik bir halkayı temsil edebilecek TNF-α uyarımına artan ifade ile yanıt verme yeteneği de ortaya çıkarılmıştır (Dahl & ark., 2007; Lee & ark., 2009). Bu, hem obezite hem de özellikle ateroskleroz olmak üzere vasküler komplikasyonları da dahil olmak üzere inflamatuar hastalıkların gelişimi ve ilerlemesinde önemli bir mekanizmadır (Kirichenko & ark., 2022).

Lipokalin 2

Lipokalin 2 (nötrofil jelatinaz ilişkili lipokalin ve 24p3 olarak da bilinir), RBP4'ü de içeren lipokalin protein süper ailesine aittir (Yan & ark., 2008). Lipokalinler, retinoidler, araşidonik asit ve steroidler gibi çeşitli küçük lipofilik maddelere bağlanır ve bunları taşır. Lipokalin 2, lökotrien B4 ve trombosit aktive edici faktör dahil olmak üzere lipokalinlerin bazı yaygın ligandlarına zayıf bir şekilde bağlanabilir, ancak yüksek afiniteli endojen ligandları henüz tanımlanmamıştır. Başlangıçta fare böbrek hücreleri ve insan nötrofil granüllerinde tanımlanan Lipocalin-2, ana kaynağı BAD olmasına rağmen bağışıklık hücreleri, karaciğer, dalak ve kondrositlerde de ifade edilmektedir (Abella & ark.,2015). Lipokalin 2'nin serum konsantrasyonları, obezite, hiperglisemi, insülin direnci ve CRP düzeyleri ile pozitif ilişkilidir (Zhang & ark., 2008). Bir

araştırmada Lipocalin 2 eksikliği olan fareler, yaşlanma veya obezite koşullarında kontrol yavrularına kıyasla insülin duyarlılığında iyileşme gösterdiği tespit edilmiştir. Bu İyileştirilmiş metabolik özellikler, inflamasyon ve insülin direnciyle bağlantılı bir enzim olan araşidonat 12-lipoksijenazın inhibisyonuna atfedilmektedir (Law & ark., 2010).

Anti-inflamatuar Adipokinler

Adiponektin

Adiponektin, BAD tarafından salgılanan ve çok sayıda fizyolojik süreçte pleyotropik etkilere sahip bir adipokindir (Brochu-Gaudreau & ark., 2010). Adiponektin, 244 amino asitten oluşan yaklaşık 30 kDa moleküler ağırlığa sahip bir proteindir (Fruebis & ark., 2001). AdipoR1 ve AdipoR2 reseptörleri aracılığıyla etki eden bir anti-inflamatuar, anti-diyabetik ve anti-aterosklerotik adipokin olarak bilinir (Iwabu & ark., 2015). Adiponektin, anti-inflamatuar bir adipokin olarak kabul edilir. Pro-inflamatuar belirteçlerin ifadesini ve oksidatif stresi azaltarak insülin direncini iyileştirir ve aterosklerozu önler Yanai & Yoshida, 2019). Serum adiponektini, CRP, IL-6 ve TNFα gibi pro-inflamatuar belirteçlerle negatif bir korelasyon ile çalışır ve yapışma moleküllerinin ifadesini baskılayarak ve NF-κβ'nin inhibisyonu yoluyla pro-inflamatuar sitokinlerin üretimini azaltarak endotel üzerinde anti-inflamatuar bir etkiye sahiptir (Devaraj & ark., 2008; Zhou & ark., 2011; Hattori &ark., 2008; Wu & ark., 2007; Ouedraogo & ark., 2007). Adiponektin ve TNFα'nın T2DM farelerinde NF-κβ sinyal iletim yolağıyla mikro ve makrosirkülasyonda karşılıklı olarak düzenlendiği gösterilmiştir. Bu, adiponektinin TNFα ekspresyonunu

baskıladığı ve TNFα blokajının koroner arteriol ve aortta adiponektin ekspresyonunu artırdığı, endotel disfonksiyonunu düzenlediği ve adiponektinin T2DM'de vasküler hasarın önlenmesinde rol oynadığını öne sürdüğü anlamına gelir (Zhang & ark., 2010; Feijóo-Bandín & ark., 2020).

Dolaşımdaki artmış adiponektin düzeylerinin serum HDL kolesterolü, toplam kolesterol/LDL kolesterol oranı ve antioksidan kapasite ile pozitif korelasyon gösterdiği ve serumdaki HOMA-IR insülin direnci indeksi ve lipid peroksidasyonu ile ters orantılı olduğu bulunmuştur (Gradinaru & ark., 2017). Dolaşımdaki adiponektin düzeyleri ile BKİ arasında ters bir korelasyon gösterilmiştir (Cnop & ark., 2003). Vücut yağının birikimi adiponektin düzeyi ile ters orantılıyken, alt ekstremitelerde yağ birikimi daha yüksek bir adiponektin düzeyi ile ilişkilidir (Turer & ark., 2011; Gradidge & ark.,2022). Adiponektin, üzerinde en çok çalışılan anti-inflamatuar adipokin olup, obezitenin tanısal belirteci olarak kullanılabileceği gibi, eşlik eden hastalıkların gelişiminin de tanısal belirteci olarak kullanılabilir (Kirichenko & ark., 2022).

Omentin

Omentin, aynı zamanda intelectin-1, laktoferrin reseptörü veya endotel lektin olarak da bilinir, ilk olarak sırasıyla 1998 ve 2001'de farelerde ve insanlarda bağırsak hücrelerinde (Komiya & ark., 2001). ve 2001'de insan endotel hücrelerinde (Lee & ark., 2001) tanımlanan salgılanan bir proteindir. Daha sonra, 2005'te insanlarda bir omental yağ cDNA kütüphanesinde tanımlanmıştır (Schäffler & ark., 2005). Omentin, viseral yağ dokusu tarafından ifade edilen ve salgılanan anti-inflamatuar potansiyele sahip bir adipokindir.

Omentin, 313 amino asitten oluşan 35 kDa moleküler ağırlığa sahip bir proteindir. Omentinin iki izoformu bilinmektedir ve omentin 1, insan kanında dolaşan ana izoformdur (De Souza Batista & ark., 2007; Katsi & ark.,2014). Obezite, insülin direnci ve tip 2 diyabette ve ayrıca ateroskleroz ve diğer inflamatuar hastalıklar, özellikle inflamatuar bağırsak hastalıkları gibi kardiyovasküler hastalıklarda omentin düzeylerinde azalma gözlemlenmiştir (Zhou & ark., 2014; Yin & ark., 2015; Tsai & ark., 2022). Omentinin anti-inflamatuar etkisi, inflamatuar sinyal yollarının bileşenlerinin ekspresyonu üzerindeki inhibitör etkisiyle ilişkilidir. Bu nedenle, TLR4 proteininin mRNA ekspresyonunu ve NF-κB fosforilasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (Yan & ark., 2022). Ayrıca omentin-1'in makrofajlarda integrin, Akt ve AMPK ile ilişkili sinyal yolunun fosforilasyonunu desteklediği ve inflamatuar sitokinlerin ekspresyonunu baskıladığı bulunmuştur (Lin & ark., 2021). Omentin-1 konsantrasyonu, IL-6 ve TNF-α gibi proinflamatuar sitokinlerin seviyeleriyle ters orantılıdır (Wang & ark., 2020). Omentinin, oksidatif stresi ve apoptozu azaltan nitrik oksit üretiminin iyileştirilmesi yoluyla endotel fonksiyonu üzerinde olumlu bir etkisi olduğu gösterilmiştir (Niu & ark., 2022; Leandro & ark., 2021).

Nesfatin-1

Nesfatin-1, 2006 yılında sıçanlarda, leptin bağımsız melanokortin sinyal sistemi aracılığıyla anoreksiyayı teşvik eden, gıda alımının düzenlenmesinde rol oynayan yeni bir hipotalamik molekül olarak tanımlanan 82 amino asitli bir peptittir. Öncül proteini olan nükleobindin-2'den (NUCB2) proteolitik olarak ayrılır ve bu, farklı işlenmesine bağlı olarak, üç polipeptide yol açabilir:

nesfatin-1, nesfatin-2 ve nesfatin-3, anoreksijenik etki yalnızca nesfatin-1 için tanımlanmıştır. Nesfatin-1, insan ve fare yağ dokusu tarafından ifade edilir ve salgılanır ve yağ, hipotalamik ve dolaşım seviyeleri açlıkla azalır ve yeniden beslenme veya yüksek yağlı diyetle artar (Oh-I & ark., 2006; Ramanjaneya & ark., 2010). Nesfatinin karbonhidrat metabolizmasına katılımı, pre-proinsülin mRNA ekspresyonunu uyarması, glikoz kaynaklı insülin salınımını artırması ve ayrıca glukagon salgılanmasını inhibe etmesi gerçeğiyle doğrulanmıştır (Ruszała & ark., 2022). Nesfatinin insülin duyarlılığını artırdığı ve anti-inflamatuar ve kardiyoprotektif etkilere sahip olduğu bulunmuştur. Bu nedenle, çalışmalar nesfatinin p38 MAPK/c-Jun ve IKK/NF-κB dahil olmak üzere MAPK sinyal yollarını inhibe ettiğini ve ayrıca inflamatuar sitokinler IL-6, IL-1β ve TNF-α düzeylerini azalttığını göstermiştir (Li & ark., 2021; Fan & ark., 2022; Cheng & ark., 2022). Ek olarak, nesfatinin oksidatif stres göstergelerini etkilediği, yani ROS'un artan üretimini baskıladığı ve ayrıca süperoksit dismutaz aktivitesini artırdığı bulunmuştur (Cheng & ark.,2022).

Kaynaklar

Aghili, S. M. M., Ebrahimpur, M., Arjmand, B., Shadman, Z., Pejman Sani, M., Qorbani, M., Larijani, B., & Payab, M. (2021). Obesity in COVID-19 era, implications for mechanisms, comorbidities, and prognosis: a review and meta-analysis. International journal of obesity (2005), 45(5), 998–1016. https://doi.org/10.1038/s41366-021-00776-8

Abella, V., Scotece, M., Conde, J., Gómez, R., Lois, A., Pino, J., Gómez-Reino, J. J., Lago, F., Mobasheri, A., & Gualillo, O. (2015). The potential of lipocalin-2/NGAL as biomarker for inflammatory and metabolic diseases. Biomarkers : biochemical indicators of exposure, response, and susceptibility to chemicals, 20(8), 565–571. https://doi.org/10.3109/1354750X.2015.1123354

Banerjee, R. R., Rangwala, S. M., Shapiro, J. S., Rich, A. S., Rhoades, B., Qi, Y., Wang, J., Rajala, M. W., Pocai, A., Scherer, P. E., Steppan, C. M., Ahima, R. S., Obici, S., Rossetti, L., & Lazar, M. A. (2004). Regulation of fasted blood glucose by resistin. Science (New York, N.Y.), 303(5661), 1195–1198. https://doi.org/10.1126/science.1092341

Batra, A., & Siegmund, B. (2012). The role of visceral fat. Digestive diseases (Basel, Switzerland), 30(1), 70–74. https://doi.org/10.1159/000335722

Bokarewa, M., Nagaev, I., Dahlberg, L., Smith, U., & Tarkowski, A. (2005). Resistin, an adipokine with potent proinflammatory properties. Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950), 174(9), 5789–5795. https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.9.5789

Brentano, F., Schorr, O., Ospelt, C., Stanczyk, J., Gay, R. E., Gay, S., & Kyburz, D. (2007). Pre-B cell colony-enhancing factor/visfatin, a new marker of inflammation in rheumatoid arthritis with proinflammatory and matrix-degrading activities. Arthritis and rheumatism, 56(9), 2829–2839. https://doi.org/10.1002/art.22833

Brochu-Gaudreau, K., Rehfeldt, C., Blouin, R., Bordignon, V., Murphy, B. D., & Palin, M. F. (2010). Adiponectin action from head to toe. Endocrine, 37(1), 11–32. https://doi.org/10.1007/s12020-009-9278-8

Cancello, R., Henegar, C., Viguerie, N., Taleb, S., Poitou, C., Rouault, C., Coupaye, M., Pelloux, V., Hugol, D., Bouillot, J. L., Bouloumié, A., Barbatelli, G., Cinti, S., Svensson, P. A., Barsh, G. S., Zucker, J. D., Basdevant, A., Langin, D., & Clément, K. (2005). Reduction of macrophage infiltration and chemoattractant gene expression changes in white adipose tissue of morbidly obese subjects after surgery-induced weight loss. Diabetes, 54(8), 2277–2286. https://doi.org/10.2337/diabetes.54.8.2277

Cebeci, E., Cakan, C., Gursu, M., Uzun, S., Karadag, S., Koldas, M., Calhan, T., Helvaci, S. A., & Ozturk, S. (2019). The Main Determinants of Serum Resistin Level in Type 2 Diabetic Patients are Renal Function and Inflammation not Presence of Microvascular Complication, Obesity and Insulin Resistance. Experimental and clinical endocrinology & diabetes : official journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association, 127(4), 189–194. https://doi.org/10.1055/s-0043-121262

Chatterjee, T. K., Stoll, L. L., Denning, G. M., Harrelson, A., Blomkalns, A. L., Idelman, G., Rothenberg, F. G., Neltner, B., Romig-Martin, S. A., Dickson, E. W., Rudich, S., & Weintraub, N. L. (2009). Proinflammatory phenotype of perivascular adipocytes: influence of high-fat feeding. Circulation research, 104(4), 541–549. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.108.182998

Cheng, H., Zhu, Y., Chen, L., & Wang, Y. (2022). Nesfatin-1 alleviated lipopolysaccharide-induced acute lung injury through regulating inflammatory response associated with macrophages modulation. Journal of cardiothoracic surgery, 17(1), 206. https://doi.org/10.1186/s13019-022-01952-1

Cnop, M., Havel, P. J., Utzschneider, K. M., Carr, D. B., Sinha, M. K., Boyko, E. J., Retzlaff, B. M., Knopp, R. H., Brunzell, J. D., & Kahn, S. E. (2003). Relationship of adiponectin to body fat distribution, insulin sensitivity and plasma lipoproteins: evidence for independent roles of age and sex. Diabetologia, 46(4), 459–469. https://doi.org/10.1007/s00125-003-1074-z

Corvera S. (2021). Cellular Heterogeneity in Adipose Tissues. Annual review of physiology, 83, 257–278. https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-031620-095446

Cousin, B., Munoz, O., Andre, M., Fontanilles, A. M., Dani, C., Cousin, J. L., Laharrague, P., Casteilla, L., & Pénicaud, L. (1999). A role for preadipocytes as macrophage-like cells. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 13(2), 305–312. https://doi.org/10.1096/fasebj.13.2.305

Dahl, T. B., Yndestad, A., Skjelland, M., Øie, E., Dahl, A., Michelsen, A., Damås, J. K., Tunheim, S. H., Ueland, T., Smith, C., Bendz, B., Tonstad, S., Gullestad, L., Frøland, S. S., Krohg-Sørensen, K., Russell, D., Aukrust, P., & Halvorsen, B. (2007). Increased expression of visfatin in macrophages of human unstable carotid and coronary atherosclerosis: possible role in inflammation and plaque destabilization. Circulation, 115(8), 972–980. https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.665893

de Souza Batista, C. M., Yang, R. Z., Lee, M. J., Glynn, N. M., Yu, D. Z., Pray, J., Ndubuizu, K., Patil, S., Schwartz, A., Kligman, M., Fried, S. K., Gong, D. W., Shuldiner, A. R., Pollin, T. I., & McLenithan, J. C. (2007). Omentin plasma levels and gene expression are decreased in obesity. Diabetes, 56(6), 1655–1661. https://doi.org/10.2337/db06-1506

Devaraj, S., Torok, N., Dasu, M. R., Samols, D., & Jialal, I. (2008). Adiponectin decreases C-reactive protein synthesis and secretion from endothelial cells: evidence for an adipose tissue-vascular loop. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, 28(7), 1368–1374. https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.108.163303

Dimitriadis, G. K., Kaur, J., Adya, R., Miras, A. D., Mattu, H. S., Hattersley, J. G., Kaltsas, G., Tan, B. K., & Randeva, H. S. (2018). Chemerin induces endothelial cell inflammation: activation of nuclear factor-kappa beta and monocyte-endothelial adhesion. Oncotarget, 9(24), 16678–16690. https://doi.org/10.18632/oncotarget.24659

Du, X. Y., & Leung, L. L. (2009). Proteolytic regulatory mechanism of chemerin bioactivity. Acta biochimica et biophysica Sinica, 41(12), 973–979. https://doi.org/10.1093/abbs/gmp091

Ellulu, M. S., Patimah, I., Khaza'ai, H., Rahmat, A., & Abed, Y. (2017). Obesity and inflammation: the linking mechanism and the complications. Archives of medical science : AMS, 13(4), 851–863. https://doi.org/10.5114/aoms.2016.58928

Ernst, M. C., & Sinal, C. J. (2010). Chemerin: at the crossroads of inflammation and obesity. Trends in endocrinology and metabolism: TEM, 21(11), 660–667. https://doi.org/10.1016/j.tem.2010.08.001

Eto, H., Suga, H., Matsumoto, D., Inoue, K., Aoi, N., Kato, H., Araki, J., & Yoshimura, K. (2009). Characterization of structure and cellular components of aspirated and excised adipose tissue. Plastic and reconstructive surgery, 124(4), 1087–1097. https://doi.org/10.1097/PRS.0b013e3181b5a3f1

Fan, Z., Dong, J., Mu, Y., & Liu, X. (2022). Nesfatin-1 protects against diabetic cardiomyopathy in the streptozotocin-induced diabetic mouse model via the p38-MAPK pathway. Bioengineered, 13(6), 14670–14681. https://doi.org/10.1080/21655979.2022.2066748

Fasshauer, M., & Blüher, M. (2015). Adipokines in health and disease. Trends in pharmacological sciences, 36(7), 461–470. https://doi.org/10.1016/j.tips.2015.04.014

Feijóo-Bandín, S., Aragón-Herrera, A., Moraña-Fernández, S., Anido-Varela, L., Tarazón, E., Roselló-Lletí, E., Portolés, M.,

Moscoso, I., Gualillo, O., González-Juanatey, J. R., & Lago, F. (2020). Adipokines and Inflammation: Focus on Cardiovascular Diseases. International journal of molecular sciences, 21(20), 7711. https://doi.org/10.3390/ijms21207711

Feijóo-Bandín, S., Portolés, M., Roselló-Lletí, E., Rivera, M., González-Juanatey, J. R., & Lago, F. (2015). 20 years of leptin: Role of leptin in cardiomyocyte physiology and physiopathology. Life sciences, 140, 10–18. https://doi.org/10.1016/j.lfs.2015.02.016

Feijóo-Bandín, S., Aragón-Herrera, A., Moraña-Fernández, S., Anido-Varela, L., Tarazón, E., Roselló-Lletí, E., Portolés, M., Moscoso, I., Gualillo, O., González-Juanatey, J. R., & Lago, F. (2020). Adipokines and Inflammation: Focus on Cardiovascular Diseases. International journal of molecular sciences, 21(20), 7711. https://doi.org/10.3390/ijms21207711

Fruebis, J., Tsao, T. S., Javorschi, S., Ebbets-Reed, D., Erickson, M. R., Yen, F. T., Bihain, B. E., & Lodish, H. F. (2001). Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 98(4), 2005–2010. https://doi.org/10.1073/pnas.98.4.2005

Fried, S. K., Bunkin, D. A., & Greenberg, A. S. (1998). Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6: depot difference and regulation by glucocorticoid. The Journal of clinical endocrinology and metabolism, 83(3), 847–850. https://doi.org/10.1210/jcem.83.3.4660

Friedman, J. M., & Halaas, J. L. (1998). Leptin and the regulation of body weight in mammals. Nature, 395(6704), 763–770. https://doi.org/10.1038/27376

Ferrante A. W., Jr (2013). Macrophages, fat, and the emergence of immunometabolism. The Journal of clinical investigation, 123(12), 4992–4993. https://doi.org/10.1172/JCI73658

Gainsford, T., Willson, T. A., Metcalf, D., Handman, E., McFarlane, C., Ng, A., Nicola, N. A., Alexander, W. S., & Hilton, D. J. (1996). Leptin can induce proliferation, differentiation, and functional activation of hemopoietic cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 93(25), 14564–14568. https://doi.org/10.1073/pnas.93.25.14564

Gimble, J., & Guilak, F. (2003). Adipose-derived adult stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential. Cytotherapy, 5(5), 362–369. https://doi.org/10.1080/14653240310003026

Gradidge, P. J., Jaff, N. G., Norris, S. A., Toman, M., & Crowther, N. J. (2022). The negative association of lower body fat mass with cardiometabolic disease risk factors is partially mediated by adiponectin. Endocrine connections, 11(12), e220156. https://doi.org/10.1530/EC-22-0156

Gradinaru, D., Margina, D., Borsa, C., Ionescu, C., Ilie, M., Costache, M., Dinischiotu, A., & Prada, G. I. (2017). Adiponectin: possible link between metabolic stress and oxidative stress in the elderly. Aging clinical and experimental research, 29(4), 621–629. https://doi.org/10.1007/s40520-016-0629-z

Grunfeld, C., Zhao, C., Fuller, J., Pollack, A., Moser, A., Friedman, J., & Feingold, K. R. (1996). Endotoxin and cytokines induce expression of leptin, the ob gene product, in hamsters. The Journal of clinical investigation, 97(9), 2152–2157. https://doi.org/10.1172/JCI118653

Gruzdeva, O., Borodkina, D., Uchasova, E., Dyleva, Y., & Barbarash, O. (2019). Leptin resistance: underlying mechanisms and diagnosis. Diabetes, metabolic syndrome and obesity : targets and therapy, 12, 191–198. https://doi.org/10.2147/DMSO.S182406

Hattori, Y., Nakano, Y., Hattori, S., Tomizawa, A., Inukai, K., & Kasai, K. (2008). High molecular weight adiponectin activates AMPK and suppresses cytokine-induced NF-kappaB activation in vascular endothelial cells. FEBS letters, 582(12), 1719–1724. https://doi.org/10.1016/j.febslet.2008.04.037

Hotamisligil G. S. (2006). Inflammation and metabolic disorders. Nature, 444(7121), 860–867. https://doi.org/10.1038/nature05485

Huh, J. Y., Park, Y. J., Ham, M., & Kim, J. B. (2014). Crosstalk between adipocytes and immune cells in adipose tissue inflammation and metabolic dysregulation in obesity. Molecules and cells, 37(5), 365–371. https://doi.org/10.14348/molcells.2014.0074

Iwabu, M., Okada-Iwabu, M., Yamauchi, T., & Kadowaki, T. (2015). Adiponectin/adiponectin receptor in disease and aging. NPJ aging and mechanisms of disease, 1, 15013. https://doi.org/10.1038/npjamd.2015.13

Jamaluddin, M. S., Weakley, S. M., Yao, Q., & Chen, C. (2012). Resistin: functional roles and therapeutic considerations for cardiovascular disease. British journal of pharmacology, 165(3), 622–632. https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01369.x

Katsi, V., Vamvakou, G., Lekakis, J., Tousoulis, D., Stefanadis, C., Makris, T., & Kallikazaros, I. (2014). Omentin, fat and heart: classical music with new instruments. Heart, lung & circulation, 23(9), 802–806. https://doi.org/10.1016/j.hlc.2014.03.013

Kaur, J., Adya, R., Tan, B. K., Chen, J., & Randeva, H. S. (2010). Identification of chemerin receptor (ChemR23) in human endothelial cells: chemerin-induced endothelial angiogenesis. Biochemical and biophysical research communications, 391(4), 1762–1768. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.12.150

Khan, T., Muise, E. S., Iyengar, P., Wang, Z. V., Chandalia, M., Abate, N., Zhang, B. B., Bonaldo, P., Chua, S., & Scherer, P. E. (2009). Metabolic dysregulation and adipose tissue fibrosis: role of collagen VI. Molecular and cellular biology, 29(6), 1575–1591. https://doi.org/10.1128/MCB.01300-08

Kollari, E., Zografou, I., Sampanis, C., Athyros, V. G., Didangelos, T., Mantzoros, C. S., & Karagiannis, A. (2022). Serum adipokine levels in patients with type 1 diabetes are associated with degree of obesity but only resistin is independently associated with atherosclerosis markers. Hormones (Athens, Greece), 21(1), 91–101. https://doi.org/10.1007/s42000-021-00328-9

Komiya, T., Tanigawa, Y., & Hirohashi, S. (1998). Cloning of the novel gene intelectin, which is expressed in intestinal paneth

cells in mice. Biochemical and biophysical research communications, 251(3), 759–762. https://doi.org/10.1006/bbrc.1998.9513

Kirichenko, T. V., Markina, Y. V., Bogatyreva, A. I., Tolstik, T. V., Varaeva, Y. R., & Starodubova, A. V. (2022). The Role of Adipokines in Inflammatory Mechanisms of Obesity. International journal of molecular sciences, 23(23), 14982. https://doi.org/10.3390/ijms232314982

Law, I. K., Xu, A., Lam, K. S., Berger, T., Mak, T. W., Vanhoutte, P. M., Liu, J. T., Sweeney, G., Zhou, M., Yang, B., & Wang, Y. (2010). Lipocalin-2 deficiency attenuates insulin resistance associated with aging and obesity. Diabetes, 59(4), 872–882. https://doi.org/10.2337/db09-1541

Leandro, A., Queiroz, M., Azul, L., Seiça, R., & Sena, C. M. (2021). Omentin: A novel therapeutic approach for the treatment of endothelial dysfunction in type 2 diabetes. Free radical biology & medicine, 162, 233–242. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.10.021

Lee, J. H., Chan, J. L., Yiannakouris, N., Kontogianni, M., Estrada, E., Seip, R., Orlova, C., & Mantzoros, C. S. (2003). Circulating resistin levels are not associated with obesity or insulin resistance in humans and are not regulated by fasting or leptin administration: cross-sectional and interventional studies in normal, insulin-resistant, and diabetic subjects. The Journal of clinical endocrinology and metabolism, 88(10), 4848–4856. https://doi.org/10.1210/jc.2003-030519

Lee, M. W., Lee, M., & Oh, K. J. (2019). Adipose Tissue-Derived Signatures for Obesity and Type 2 Diabetes: Adipokines, Batokines and MicroRNAs. Journal of clinical medicine, 8(6), 854. https://doi.org/10.3390/jcm8060854

Lee, W. J., Wu, C. S., Lin, H., Lee, I. T., Wu, C. M., Tseng, J. J., Chou, M. M., & Sheu, W. H. (2009). Visfatin-induced expression of inflammatory mediators in human endothelial cells through the NF-kappaB pathway. International journal of obesity (2005), 33(4), 465–472. https://doi.org/10.1038/ijo.2009.24

Lehrke, M., Reilly, M. P., Millington, S. C., Iqbal, N., Rader, D. J., & Lazar, M. A. (2004). An inflammatory cascade leading to hyperresistinemia in humans. PLoS medicine, 1(2), e45. https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0010045

Li, M., Li, K., & Ren, Y. (2021). Nesfatin-1 protects H9c2 cardiomyocytes against cobalt chloride-induced hypoxic injury by modulating the MAPK and Notch1 signaling pathways. Journal of biological research (Thessalonike, Greece), 28(1), 21. https://doi.org/10.1186/s40709-021-00147-4

Lin, X., Sun, Y., Yang, S., Yu, M., Pan, L., Yang, J., Yang, J., Shao, Q., Liu, J., Liu, Y., Zhou, Y., & Wang, Z. (2021). Omentin-1 Modulates Macrophage Function via Integrin Receptors αvβ3 and αvβ5 and Reverses Plaque Vulnerability in Animal Models of Atherosclerosis. Frontiers in cardiovascular medicine, 8, 757926. https://doi.org/10.3389/fcvm.2021.757926

Lord, G. M., Matarese, G., Howard, J. K., Baker, R. J., Bloom, S. R., & Lechler, R. I. (1998). Leptin modulates the T-cell immune

response and reverses starvation-induced immunosuppression. Nature, 394(6696), 897–901. https://doi.org/10.1038/29795

Mancuso, P., Huffnagle, G. B., Olszewski, M. A., Phipps, J., & Peters-Golden, M. (2006). Leptin corrects host defense defects after acute starvation in murine pneumococcal pneumonia. American journal of respiratory and critical care medicine, 173(2), 212–218. https://doi.org/10.1164/rccm.200506-909OC

Mattern, A., Zellmann, T., & Beck-Sickinger, A. G. (2014). Processing, signaling, and physiological function of chemerin. IUBMB life, 66(1), 19–26. https://doi.org/10.1002/iub.1242

Monnier, J., Lewén, S., O'Hara, E., Huang, K., Tu, H., Butcher, E. C., & Zabel, B. A. (2012). Expression, regulation, and function of atypical chemerin receptor CCRL2 on endothelial cells. Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950), 189(2), 956–967. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1102871

Münzberg, H., & Morrison, C. D. (2015). Structure, production and signaling of leptin. Metabolism: clinical and experimental, 64(1), 13–23. https://doi.org/10.1016/j.metabol.2014.09.010

Nakanishi, S., Yamane, K., Kamei, N., Nojima, H., Okubo, M., & Kohno, N. (2005). A protective effect of adiponectin against oxidative stress in Japanese Americans: the association between adiponectin or leptin and urinary isoprostane. Metabolism: clinical and experimental, 54(2), 194–199. https://doi.org/10.1016/j.metabol.2004.08.012

Niu, X., Cheng, Y., Zhang, M., Du, L., Wu, X., Lu, C., Li, X., Liu, S., Zhao, A., Zhang, S., Wu, Z., Ding, B., Shi, W., Wang, C., Yang, Y., & Tian, Y. (2022). Neuroprotective Effects of Omentin-1 Against Cerebral Hypoxia/Reoxygenation Injury via Activating GAS6/Axl Signaling Pathway in Neuroblastoma Cells. Frontiers in cell and developmental biology, 9, 784035. https://doi.org/10.3389/fcell.2021.784035

Oh-I, S., Shimizu, H., Satoh, T., Okada, S., Adachi, S., Inoue, K., Eguchi, H., Yamamoto, M., Imaki, T., Hashimoto, K., Tsuchiya, T., Monden, T., Horiguchi, K., Yamada, M., & Mori, M. (2006). Identification of nesfatin-1 as a satiety molecule in the hypothalamus. Nature, 443(7112), 709–712. https://doi.org/10.1038/nature05162

Ouchi, N., Kihara, S., Funahashi, T., Matsuzawa, Y., & Walsh, K. (2003). Obesity, adiponectin and vascular inflammatory disease. Current opinion in lipidology, 14(6), 561–566. https://doi.org/10.1097/00041433-200312000-00003

Ouchi, N., Parker, J. L., Lugus, J. J., & Walsh, K. (2011). Adipokines in inflammation and metabolic disease. Nature reviews. Immunology, 11(2), 85–97. https://doi.org/10.1038/nri2921

Ouedraogo, R.; Gong, Y.; Berzins, B.; Wu, X.; Mahadev, K.; Hough, K.; Chan, L.; Goldstein, B.J.; Scalia, R. Adiponectin deficiency increases leukocyte-endothelium interactions via upregulation of endothelial cell adhesion molecules in vivo. J. Clin. Invest. 2007, 117, 1718–1726.

Pang, S. S., & Le, Y. Y. (2006). Role of resistin in inflammation and inflammation-related diseases. Cellular & molecular immunology, 3(1), 29–34.

Patel, L., Buckels, A. C., Kinghorn, I. J., Murdock, P. R., Holbrook, J. D., Plumpton, C., Macphee, C. H., & Smith, S. A. (2003). Resistin is expressed in human macrophages and directly regulated by PPAR gamma activators. Biochemical and biophysical research communications, 300(2), 472–476. https://doi.org/10.1016/s0006-291x(02)02841-3

Ramanjaneya, M., Chen, J., Brown, J. E., Tripathi, G., Hallschmid, M., Patel, S., Kern, W., Hillhouse, E. W., Lehnert, H., Tan, B. K., & Randeva, H. S. (2010). Identification of nesfatin-1 in human and murine adipose tissue: a novel depot-specific adipokine with increased levels in obesity. Endocrinology, 151(7), 3169–3180. https://doi.org/10.1210/en.2009-1358

Roca-Rodríguez, M. D. M., Ramos-García, P., López-Tinoco, C., & Aguilar-Diosdado, M. (2022). Significance of Serum-Plasma Leptin Profile during Pregnancy in Gestational Diabetes Mellitus: A Systematic Review and Meta-Analysis. Journal of clinical medicine, 11(9), 2433. https://doi.org/10.3390/jcm11092433

Romacho, T., Elsen, M., Röhrborn, D., & Eckel, J. (2014). Adipose tissue and its role in organ crosstalk. Acta physiologica (Oxford, England), 210(4), 733–753. https://doi.org/10.1111/apha.12246

Ruszała, M., Pilszyk, A., Niebrzydowska, M., Kimber-Trojnar, Ż., Trojnar, M., & Leszczyńska-Gorzelak, B. (2022). Novel Biomolecules in the Pathogenesis of Gestational Diabetes Mellitus

2.0. International journal of molecular sciences, 23(8), 4364. https://doi.org/10.3390/ijms23084364

Saddi-Rosa, P., Oliveira, C. S., Giuffrida, F. M., & Reis, A. F. (2010). Visfatin, glucose metabolism and vascular disease: a review of evidence. Diabetology & metabolic syndrome, 2, 21. https://doi.org/10.1186/1758-5996-2-21

Samaras, K., Botelho, N. K., Chisholm, D. J., & Lord, R. V. (2010). Subcutaneous and visceral adipose tissue gene expression of serum adipokines that predict type 2 diabetes. Obesity (Silver Spring, Md.), 18(5), 884–889. https://doi.org/10.1038/oby.2009.443

Sánchez-Margalet, V., Martín-Romero, C., Santos-Alvarez, J., Goberna, R., Najib, S., & Gonzalez-Yanes, C. (2003). Role of leptin as an immunomodulator of blood mononuclear cells: mechanisms of action. Clinical and experimental immunology, 133(1), 11–19. https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.2003.02190.x

Schäffler, A., Neumeier, M., Herfarth, H., Fürst, A., Schölmerich, J., & Büchler, C. (2005). Genomic structure of human omentin, a new adipocytokine expressed in omental adipose tissue. Biochimica et biophysica acta, 1732(1-3), 96–102. https://doi.org/10.1016/j.bbaexp.2005.11.005

Shoelson, S. E., Lee, J., & Goldfine, A. B. (2006). Inflammation and insulin resistance. The Journal of clinical investigation, 116(7), 1793–1801. https://doi.org/10.1172/JCI29069

Somech, R., Reif, S., Golander, A., & Spirer, Z. (2007). Leptin and C-reactive protein levels correlate during minor infection in

children. The Israel Medical Association journal : IMAJ, 9(2), 76–78.

Steppan, C. M., Bailey, S. T., Bhat, S., Brown, E. J., Banerjee, R. R., Wright, C. M., Patel, H. R., Ahima, R. S., & Lazar, M. A. (2001). The hormone resistin links obesity to diabetes. Nature, 409(6818), 307–312. https://doi.org/10.1038/35053000

Steppan, C. M., Wang, J., Whiteman, E. L., Birnbaum, M. J., & Lazar, M. A. (2005). Activation of SOCS-3 by resistin. Molecular and cellular biology, 25(4), 1569–1575. https://doi.org/10.1128/MCB.25.4.1569-1575.2005

Su K.Z., Li Y.R., Zhang D., Yuan J.H., Zhang C.S., Liu Y., Song L.M., Lin Q., Li M.W., Dong J. Relation of Circulating Resistin to Insulin Resistance in Type 2 Diabetes and Obesity: A Systematic Review and Meta-Analysis. Front. Physiol. 2019;10:1399. doi: 10.3389/fphys.2019.01399.

Sull, J. W., Kim, H. J., Yun, J. E., Park, E. J., Kim, G., & Jee, S. H. (2009). Serum adiponectin is associated with smoking status in healthy Korean men. Endocrine journal, 56(1), 73–78. https://doi.org/10.1507/endocrj.k08e-231

Szydło, B.; Kiczmer, P.; ´Swi¸etochowska, E.; Ostrowska, Z. Role of omentin and chemerin in metabolic syndrome and tumor diseases. Post¸epy Hig. Med. Do´swiadczalnej 2016, 70, 844–849

Takabatake, N., Nakamura, H., Abe, S., Hino, T., Saito, H., Yuki, H., Kato, S., & Tomoike, H. (1999). Circulating leptin in patients with chronic obstructive pulmonary disease. American

journal of respiratory and critical care medicine, 159(4 Pt 1), 1215–1219. https://doi.org/10.1164/ajrccm.159.4.9806134

Takaoka, M., Nagata, D., Kihara, S., Shimomura, I., Kimura, Y., Tabata, Y., Saito, Y., Nagai, R., & Sata, M. (2009). Periadventitial adipose tissue plays a critical role in vascular remodeling. Circulation research, 105(9), 906–911. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.109.199653

Turer, A. T., Khera, A., Ayers, C. R., Turer, C. B., Grundy, S. M., Vega, G. L., & Scherer, P. E. (2011). Adipose tissue mass and location affect circulating adiponectin levels. Diabetologia, 54(10), 2515–2524. https://doi.org/10.1007/s00125-011-2252-z

Tsai, Z. Y., & Liu, P. Y. (2022). Omentin-1: One Novel Biomarker for Calcified Aortic Valve Stenosis. Acta Cardiologica Sinica, 38(5), 591–593. https://doi.org/10.6515/ACS.202209_38(5).20220322A

Wada, N., Hirako, S., Takenoya, F., Kageyama, H., Okabe, M., & Shioda, S. (2014). Leptin and its receptors. Journal of chemical neuroanatomy, 61-62, 191–199. https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2014.09.002

Wang, J., Gao, Y., Lin, F., Han, K., & Wang, X. (2020). Omentin-1 attenuates lipopolysaccharide (LPS)-induced U937 macrophages activation by inhibiting the TLR4/MyD88/NF-κB signaling. Archives of biochemistry and biophysics, 679, 108187. https://doi.org/10.1016/j.abb.2019.108187

Wei, W., Zhang, X., Zhou, B., Ge, B., Tian, J., & Chen, J. (2022). Effects of female obesity on conception, pregnancy and the

health of offspring. Frontiers in endocrinology, 13, 949228. https://doi.org/10.3389/fendo.2022.949228

Weisberg, S. P., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R. L., & Ferrante, A. W., Jr (2003). Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. The Journal of clinical investigation, 112(12), 1796–1808. https://doi.org/10.1172/JCI19246

Wittamer, V., Franssen, J. D., Vulcano, M., Mirjolet, J. F., Le Poul, E., Migeotte, I., Brézillon, S., Tyldesley, R., Blanpain, C., Detheux, M., Mantovani, A., Sozzani, S., Vassart, G., Parmentier, M., & Communi, D. (2003). Specific recruitment of antigen-presenting cells by chemerin, a novel processed ligand from human inflammatory fluids. The Journal of experimental medicine, 198(7), 977–985. https://doi.org/10.1084/jem.20030382

Wu, X., Mahadev, K., Fuchsel, L., Ouedraogo, R., Xu, S. Q., & Goldstein, B. J. (2007). Adiponectin suppresses IkappaB kinase activation induced by tumor necrosis factor-alpha or high glucose in endothelial cells: role of cAMP and AMP kinase signaling. American journal of physiology. Endocrinology and metabolism, 293(6), E1836–E1844. https://doi.org/10.1152/ajpendo.00115.2007

Xu, H., Barnes, G. T., Yang, Q., Tan, G., Yang, D., Chou, C. J., Sole, J., Nichols, A., Ross, J. S., Tartaglia, L. A., & Chen, H. (2003). Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. The Journal of clinical investigation, 112(12), 1821–1830. https://doi.org/10.1172/JCI19451

Vegiopoulos, A., Rohm, M., & Herzig, S. (2017). Adipose tissue: between the extremes. The EMBO journal, 36(14), 1999–2017. https://doi.org/10.15252/embj.201696206

Yan, Q. W., Yang, Q., Mody, N., Graham, T. E., Hsu, C. H., Xu, Z., Houstis, N. E., Kahn, B. B., & Rosen, E. D. (2007). The adipokine lipocalin 2 is regulated by obesity and promotes insulin resistance. Diabetes, 56(10), 2533–2540. https://doi.org/10.2337/db07-0007

Yan, X., Wu, L., Gao, M., Yang, P., Yang, J., & Deng, Y. (2022). Omentin inhibits the resistin-induced hypertrophy of H9c2 cardiomyoblasts by inhibiting the TLR4/MyD88/NF-κB signaling pathway. Experimental and therapeutic medicine, 23(4), 292. https://doi.org/10.3892/etm.2022.11222

Yanai, H., & Yoshida, H. (2019). Beneficial Effects of Adiponectin on Glucose and Lipid Metabolism and Atherosclerotic Progression: Mechanisms and Perspectives. International journal of molecular sciences, 20(5), 1190. https://doi.org/10.3390/ijms20051190

Yin, J., Hou, P., Wu, Z., & Nie, Y. (2015). Decreased levels of serum omentin-1 in patients with inflammatory bowel disease. Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research, 21, 118–122. https://doi.org/10.12659/MSM.892081

Zhang, H., Park, Y., & Zhang, C. (2010). Coronary and aortic endothelial function affected by feedback between adiponectin and tumor necrosis factor α in type 2 diabetic mice. Arteriosclerosis,

thrombosis, and vascular biology, 30(11), 2156–2163. https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.110.214700

Zhang, J., Wu, Y., Zhang, Y., Leroith, D., Bernlohr, D. A., & Chen, X. (2008). The role of lipocalin 2 in the regulation of inflammation in adipocytes and macrophages. Molecular endocrinology (Baltimore, Md.), 22(6), 1416–1426. https://doi.org/10.1210/me.2007-0420

Zhang, Y., Liu, J., Yao, J., Ji, G., Qian, L., Wang, J., Zhang, G., Tian, J., Nie, Y., Zhang, Y. E., Gold, M. S., & Liu, Y. (2014). Obesity: pathophysiology and intervention. Nutrients, 6(11), 5153–5183. https://doi.org/10.3390/nu6115153

Zhou, J. Y., Chan, L., & Zhou, S. W. (2014). Omentin: linking metabolic syndrome and cardiovascular disease. Current vascular pharmacology, 12(1), 136–143. https://doi.org/10.2174/1570161112999140217095038

Zhou, Y., Wei, Y., Wang, L., Wang, X., Du, X., Sun, Z., Dong, N., & Chen, X. (2011). Decreased adiponectin and increased inflammation expression in epicardial adipose tissue in coronary artery disease. Cardiovascular diabetology, 10, 2. https://doi.org/10.1186/1475-2840-10-2

Zuk, P. A., Zhu, M., Mizuno, H., Huang, J., Futrell, J. W., Katz, A. J., Benhaim, P., Lorenz, H. P., & Hedrick, M. H. (2001). Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. Tissue engineering, 7(2), 211–228. https://doi.org/10.1089/107632701300062859

BÖLÜM VIII

Kuantum Noktaların Fizikokimyasal Özellikleri ve Toksik Etkileri

Emel CANPOLAT[1]

Giriş

Nanoteknolojinin hızla gelişmesiyle birlikte nanomalzemeler ilaç, gıda, kozmetik, elektronik ve mühendislik gibi farklı alanlarda kullanılmaya başlanmıştır. Nanoteknolojinin geniş bir uygulama alanına sahip olması nedeniyle insanlar doğrudan ya da dolaylı olarak bu materyallere maruz kalmakta ve maruziyete bağlı olarak da riskler ortaya çıkmaktadır. Nanopartiküllerin nano boyutta olmalarının sağladığı avantajlara rağmen biyolojik sistemlerle etkileşime girebilme yetenekleri olası toksik etkilerini ve etki mekanizmalarının araştırılmasını zorunlu kılmış, aynı zamanda nanotoksikoloji olarak adlandırılan bir bilim dalının gelişmesine de öncülük etmiştir. Sahip oldukları eşsiz optik ve elektronik özellikleri nedeniyle son yıllarda araştırmacıların dikkatini çeken kuantum nokta nanopartiküller kanser araştırmaları, biyosensör uygulamaları,

[1] Dr. Öğr. Üyesi, Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Tokat/Türkiye, Orcid: 0000-0003-0969-0995, emelcanpolat@yahoo.com

biyolojik görüntüleme, tanı, gen ve ilaç taşınması başta olmak üzere birçok alanda kullanılma potansiyeline sahiptir ancak olası toksik etkiler özellikle sağlıkla ilgili alanlarda güvenilir bir şekilde kullanımlarını sınırlamaktadır.

Bu bölümde, bir nanoteknoloji ürünü olarak kuantum nokta nanopartiküllerin fizikokimyasal özellikleri ele alınmakta ve son yıllarda yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar doğrultusunda toksik etkileri değerlendirilmektedir.

1. Kuantum Noktalar

Yarı kristal nanopartiküller olarak da bilinen kuantum noktalar ilk kez 1980'li yıllarda fizikçi Alexei Ekimov tarafından keşfedilmiş olup, atomik düzeyde birkaç nanometre (2-10 nm) boyuta sahip moleküllerdir (Ekimov, Efros & Onushchenko,1985). İlk olarak çekirdek kısmı kadmiyum (Cd) içeren kuantum noktalar geliştirilmesine rağmen hem nanoteknolojik gelişmelere hem de uygulama alanlarındaki gereksinimlere bağlı olarak kadmiyum içermeyen, farklı özelliklere sahip kuantum noktaları da yavaş yavaş ortaya çıkmıştır. Halihazırda araştırmacılar tarafından geliştirilmiş oldukça farklı tiplerde kuantum noktaları bulunmakta ve çeşitli şekillerde sınıflandırmalar yapılmaktadır.

Kuantum noktalarının sınıflandırılmasında kimyasal bileşimleri, çekirdek türü, kabuk yapısı, boyutu ve yüzey ligand özellikleri gibi faktörler dikkate alınmaktadır. Kimyasal bileşimlerine göre kuantum noktalar 12 tipte sınıflandırılabilir. Bu sınıflandırma kuantum noktalarını oluşturan elementlerin periyodik tablodaki konumuna bağlı olarak yapılmaktadır (Abdellatif & ark., 2022). Örneğin, grup IV A kuantum noktalar en dış kabuklarında dört elektrona sahip olan, metaloid yapıları ve yarı iletken elektriksel özellikleri de dahil olmak üzere ortak fizikokimyasal özellikleri paylaşan karbon, silikon ve germanyum gibi dört değerlikli elementlerden oluşmaktadır (Kolobov, 2015; Li & ark., 2020). Kuantum noktalarının büyük bir çoğunluğu özellikle periyodik tablodaki grup II-IV elementleri (CdTe, CdSe, CdS, ZnS, ZnSe ve

ZnTe), grup III-V elementleri (InP, InAs, GaAs ve GaN) ya da grup IV-VI (PbSe ve PbS) elementlerinden oluşmaktadır (Dabbousi & ark., 1997; Hines & Guyot-Sionnest, 1996; Xu & ark., 2016). Diğer bir sınıflandırma kuantum noktaların yapısını oluşturan çekirdeğin türüne bağlı olarak kadmiyum (Cd), gümüş (Ag), indiyum (In) bazlı metal kuantum noktalar, karbon (C) ve silikon (Si) bazlı metalik olmayan kuantum noktaları şeklinde yapılmaktadır (Liu & Tang, 2020). Olağanüstü özellikleri nedeniyle araştırmacıların dikkatini çeken ve en fazla çalışılan kuantum noktalar kadmiyum selenit (CdSe), kadmiyum tellür (CdTe) ve kadmiyum sülfür (CdS) gibi kadmiyum bazlı kuantum noktalardır.

Son yıllarda, özellikle floresans özellikli nanopartiküllerin en yeni sınıfını oluşturan karbon kuantum noktaları ya da floresan kuantum noktaları adı verilen nanopartiküller dikkati çekmektedir. 2004 yılında elektroforez yoluyla tek duvarlı karbon nanotüplerin saflaştırılması sırasında tesadüfen elde edilen, ağır metal içermeyen karbon bazlı kuantum noktalarının özellikle küçük boyutları, kimyasal kararlılık, suda çözünürlük, kolay üretim, yüksek biyouyumluluk ve düşük toksisite gibi özellikleri nedeniyle geleceğin malzemesi olarak pek çok uygulamada kullanılacağı öngörülmektedir (Xu & ark., 2004; Nair & ark., 2020; Alaghmandfard & ark., 2021; Bingül, Önal & Gökbulut, 2023).

2. Kuantum Noktaların Fizikokimyasal Özellikleri

Kuantum noktalarını biyomedikal uygulamalar ve araştırmalar için cazip hale getiren unsurlar, optik özellikleri sayesinde farklı bir renk skalası ortaya çıkarması ve manyetik özelliklerinin sağladığı avantajlardır. Kuantum noktalar en küçük boyutta (2-3 nm) mavi ışıma özelliğine sahipken, boyutları büyüdükçe (5-6 nm) renkleri maviden kırmızıya doğru değişmektedir (Brkić, 2016). Kuantum noktaları geleneksel florokromlarla karşılaştırıldığında yüksek floresans yoğunluğu, parlaklık ve fotostabilite gibi özellikle biyomedikal alanda kullanımlarını kolaylaştıran eşsiz optik özelliklere sahiptir. Optik özellikleri dışında, kuantum noktalarının küçük parçacık boyutu,

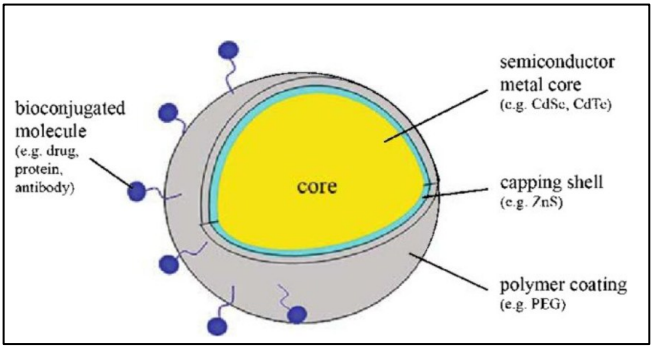
bileşimleri, moleküler yapıları, şekilleri ve yüzeysel yapıları onların hem işlevselliğini hem de toksisitelerini belirleyen önemli unsurlar olarak belirtilmiştir (Brkić, 2018).

Kuantum noktaların genel yapısına bakıldığında iç kısımda genellikle ağır metallerden oluşan bir inorganik çekirdek ve onu çevreleyen koruyucu bir kabuk kısmından oluşmaktadır (Vasudevan & ark., 2015; Wang & Tang, 2021). İçte bulunan çekirdek kısmı kuantum noktalarına yarı iletken özellik kazandırırken, kabuk kısmı ise özellikle biyouyumluluk açısından önemlidir. Kuantum noktalarının çekirdek kısmı bütün yarı-iletken metal bileşiklerden elde edilebilmesine rağmen, en fazla kullanılan elementler özellikle periyodik tablodaki grup II-IV ya da grup III-V elementleridir. Çekirdek kısmı Grup II-IV serisi kuantum noktalarda çinko-sülfür (ZnS), çinko-selenyum (ZnSe), kadmiyum-selenyum (CdSe) ve kadmiyum-tellür (CdTe), grup III–V serisi kuantum noktalarda ise indiyum fosfat (InP), indiyum arsenat (InAs), galyum arsenat (GaAs) ve galyum nitrürden (GaN) oluşmaktadır (Dabbousi & ark., 1997; Hines & Guyot-Sionnest, 1996). CdSe ve CdTe çekirdeklerin ZnS ile kaplanması sonucunda elde edilen CdSe/ZnS ve CdTe/ZnS bileşimlerinde, ZnS bir kabuk görevi üstlenerek iç kısımda bulunan çekirdeği oksidasyondan korumakta ve kuantum verimini artırmaktadır (Bozrova & ark., 2018). Dolayısıyla, çekirdek/kabuk şeklindeki yapı, hem ağır metalden oluşan çekirdeğin lüminesans özelliklerini korumakta hem de sitotoksisiteyi azaltarak kuantum noktalarının fotofiziksel özelliklerini geliştirmektedir (Dana & ark., 2018).

Yeni sentezlenen kuantum noktaları hidrofobik özelliğe sahip olmaları nedeniyle biyolojik uygulamalar için kullanıma uygun değildir. Sadece çekirdek ya da çekirdek/kabuktan oluşan kuantum noktaları suda çözünemedikleri yani hidrofobik olmaları nedeniyle, sentezlendikten sonra onları hem suda çözünebilir yani hidrofilik hem de biyouyumlu hale getirebilmek için koruyucu bir kabuk, yüzey ligandları ve çeşitli fonksiyonel grupların eklenmesi şeklinde yeni sentetik yöntemler ve yüzey modifikasyonları

kullanılarak gerekli değişiklikler yapılabilmektedir (Brkić, 2018). Çözünürlükleri sağlandıktan sonra kuantum noktalarını biyolojik işlevleri bozulmaksızın biyomedikal uygulamalarda kullanılabilecek hale dönüştürmek için farklı biyolojik moleküllerle konjuge etmek gerekmektedir. Kuantum noktaların kabuk kısmı biyouyumluluk açısından önemli olup özellikle ilaç, gen, ligand ve antikor gibi moleküllerin bağlandığı bölgedir. Kuantum noktaları hedefi tanıyabilecek özelliğe sahip antikor, peptit, avidin, biyotin, albumin, ve oligonükleotid gibi biyomoleküllerle konjuge edilebilmektedir (Azzazy, Mansour & Kazmierczak, 2007; Mulder & ark., 2006). Peptitler biyolojik ortamı taklit etmeleri ve fizyolojik pH'da stabil olmaları gibi avantajlara sahiptir. Aminler, karboksil ve tiyol gibi reaktif gruplar istenilen özelliklere sahip moleküllerin elde edilmesi için gerekli enzimatik veya standart konjugasyon ortamını sağlamaktadır. Ayrıca, peptit dizilerini belirli molar oranlarda karıştırarak *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar için tek bir adımda çok işlevli kuantum noktalar sentezlenebilmektedir. Bu sebeplerden dolayı peptitlerin kuantum noktalarının yüzeyini kaplamak için mükemmel bir ligand olduğu belirtilmiştir (Iyer & ark., 2007). Dolayısıyla, kuantum noktaların yapısı biyolojik dağılımlarını ve farmakokinetik özelliklerini modüle etmek amacıyla hedefleyici ligandlarla ya da fonksiyonel kaplamalarla tasarlanabilecek şekilde çeşitli fiziksel ve kimyasal modifikasyonlara uygun olup etkin bir şekilde kullanıldığına dair birçok çalışma bulunmaktadır (Abdellatif & ark., 2022).

Koruyucu bir kabuğun eklenmesi ve farklı türdeki ligandlarla konjuge edilmesi kuantum noktalarının yapısını güçlendirmekte, çözünürlüğünü artırmakta ve bulundukları ortamla etkileşimini kolaylaştırmaktadır (Yu & ark., 2019; Abdul Ghani & ark., 2014; Zhang, Schnoes & Clapp, 2010). Çekirdek ve kabuktan oluşan kuantum noktalarını (örneğin, CdSe/ZnS) hem suda çözünebilir hem de biyouyumlu hale getirebilmek için organik yapıda koruyucu bir katman, yüzey ligandları ve çeşitli fonksiyonel gruplar eklenerek modifikasyonlar yapılabilmektedir (Şekil 1).



Şekil 1: Kuantum noktaların yapısı

Kaynak: Choi & Maysinger, 2008

Kadmiyum selenit (CdSe), kadmiyum tellür (CdTe) ve kadmiyum sülfür (CdS) gibi kadmiyum bazlı kuantum noktalar diğer kuantum nokta türlerine kıyasla araştırmacıların büyük ilgisini çekmektedir. Kadmium kuantum noktaları sahip oldukları yüksek kuantum verimi, geniş UV uyarımı, dar emisyon ve parlak fotolüminesans gibi olağanüstü özellikleri nedeniyle izlenebilir ilaç dağıtımı ve biyogörüntüleme gibi biyomedikal uygulamalar için sıklıkla tercih edilmektedir (Zhimin, Wang & Yang, 2013; Kloepfer, Bradforth & Nadeau, 2005). Ancak, kadmiyum hem çevre hem de insan sağlığı için ciddi zararları olan bir ağır metal türü olup (Rafati Rahimzadeh & ark., 2017; Branca, Morucci & Pacini, 2018), özellikle kadmiyum bazlı kuantum noktaların çekirdek kısmında yer alan Cd^{2+} iyonu bu nanopartiküllerin biyolojik amaçlar için kullanımına engel olmaktadır (Chen & ark., 2012; Mo & ark., 2017). Kadmiyum bazlı kuantum noktaların kullanımı esnasında çekirdek kısmında yer alan ve toksik bir metal olan Cd^{2+} iyonlarının salınımına bağlı olarak ortaya çıkabilecek toksik etkiler endişe uyandırmaktadır. Bu problemin üstesinden gelebilmek için kuantum noktalarının yapısında bazı değişikliklere gidilmekte, olası bir kadmiyum salınımı ilave yüzey kaplamaları eklenerek azaltılabilmekte ya da ortadan kaldırılabilmektedir. Örneğin, CdSe kuantum noktalarının kullanımı esnasında, oksitleyici bir ortam

yüzeyde bulunan Se'nin oksidasyonuna ve genel yapılarının bozularak Cd^{2+} iyonlarının sızmasına neden olmaktadır. ZnS gibi ilave bir tabakanın eklenmesi, Se'nin oksidasyonunu azaltmakta ve genel olarak Cd^{2+} iyon salınımını düşürerek toksisiteyi engellemektedir (Balaz & ark., 2014). CdTe kuantum noktalarının üretimi sırasında kullanılan jelatinin bu nanopartiküllerin toksisitesini azalttığı belirtilmiştir (Byrne & ark., 2007). Çoğu organizmada bulunan tripeptit glutatyon stabilizatör olarak uygulandığında, şelatlama özelliği nedeniyle Cd^{2+} iyonlarını detoksifiye ederek suda çözünebilir ve biyouyumlu CdTe nanokristallerinin sentezlendiği gösterilmiştir (Qian & ark., 2006). Hidrofilik özellik gösteren PEG (polietilen glikol) ile kaplama, biyoaktif ve fonksiyonel gruplarla konjugasyon şeklinde sentez yöntemleri uygulandığında kuantum noktalarının toksik etkisinin azaldığı belirtilmiştir (Gopee & ark., 2009).

Sahip oldukları optik özellikleri nedeniyle biyomedikal uygulamalar için tercih edilen kadmiyum bazlı kuantum noktalarının kullanımı esnasında Cd^{2+} iyon salınımına bağlı olarak ortaya çıkan toksik etkiler nedeniyle araştırmacılar alternatif olarak daha güvenilir, kadmiyum içermeyen, diğer metallerden oluşan InP, InAs, $CuInS_2$, GaAs, GaN, PbSe ve PbS gibi farklı bileşimlere sahip metalik kuantum noktaların yanı sıra metalik olmayan karbon kuantum noktaları gibi nanopartikülleri sentezleme yoluna gitmişlerdir (Lin & ark., 2020; Ozyurt & ark., 2023). Cd içeren kuantum noktalara kıyasla bu alternatiflerin daha az toksik olduğu kabul edilmiş olsa da toksisiteleri ile ilgili daha detaylı çalışmaların yapılmasının gerekli olduğu vurgulanmaktadır (Harris & Kim, 2024).

3. Kuantum Noktalarının Toksisitesi ve Etki Mekanizmaları

Kuantum noktalarının fizikokimyasal özellikleri ile toksisiteleri arasında bir ilişki olduğu görülmektedir. Her kuantum noktası farklı özellikler taşımaktadır. Her birisinin kendine özgü avantaj ve dezavantajları olup bu özelliklere göre kullanımları şekillenmektedir. Toksisitelerinin anlaşılabilmesi için de her

birisinin ayrı ayrı özelliklerinin incelenmesi gerekmektedir. Kuantum noktaları ile başlangıçta yapılan çalışmaların çoğu kuantum noktaların sahip oldukları fizikokimyasal özelliklerine yönelik olarak gerçekleştirilmiştir. Nanoteknoloji araştırmacıları tarafından gerçekleştirilen bu çalışmaların aslında kuantum nokta toksisitesini değil de kuantum noktalarının floresans, stabilite ve hücre etiketleme gibi fizikokimyasal özelliklerini test etmeye yönelik olduğu görülmektedir. Ancak toksikolojik değerlendirme için kuantum noktalarının yapı, boyut, şekil, kiralite ve yüzey özellikleri gibi fizikokimyasal özelliklerinin dışında doz, süre, maruziyet sıklığı, maruziyet yolu ve etki mekanizmaları gibi toksisitede belirleyici rol oynayan faktörlerin de dikkate alınması gerekmektedir. İlave olarak, hücre tipi, çevresel ve deneysel faktörlerinde önemli olduğu, dolayısıyla sitotoksisitenin sadece bir faktöre değil birkaç faktörün birleşimine bağlı olduğu belirtilmiştir (Hardman, 2006; Manshian & ark., 2015).

Kuantum noktaların neden olduğu sitotoksisitenin oksidatif stres, reaktif oksijen türleri (ROS), endoplazmik retikulum stresi, inflamasyon, metal iyonlarının salınımı, DNA hasarı, organellerin yapı ve işlevlerinin bozulması ile bağlantılı olduğu belirtilmiştir (Wang & Tang, 2018). Kuantum noktaların toksisiteleri ile ilgili çalışmalara bakıldığında sahip oldukları eşsiz optik özellikleri nedeniyle kadmiyum bazlı kuantum noktaların en fazla çalışılmış olduğu görülmektedir (Huy & ark., 2018). Araştırmalarda yaygın olarak kullanılan ilk nesil, ağır metal bazlı Cd kuantum noktalarının neden olduğu toksisite incelendiğinde, sitotoksisitenin özellikle bu nanopartiküllerin çekirdek, kabuk, ligand ve yüzey modifikasyonları gibi yüzey özellikleri ile ilişkili olduğu belirtilmiştir (Oh & ark., 2016). Karaciğer modeli olarak primer hepatositlerin kullanıldığı bir çalışmada çekirdek kısmı CdSe'den oluşan kuantum noktaların belirli koşullar altında akut toksisiteye neden olduğu gösterilmiştir. Ancak CdSe çekirdekli kuantum noktalarının yüzeyi uygun şekilde ZnS ve BSA (sığır serum albümini) ile kaplandığında sitotoksisitenin önemli ölçüde azaldığı ve etkin bir şekilde hücre

göçünün izlenmesinde kullanılabileceği belirtilmiştir (Derfus, Chan & Bhatia, 2004).

Cd bazlı kuantum noktalarda çekirdek kısmında bulunan kadmiyumun sitotoksisitenin birincil nedeni olduğu belirtilmiştir (Mansur & ark., 2016). Kuantum nanopartiküllerin yüzey oksidasyonuna bağlı olarak salınan Cd^{2+} iyonları daha sonra intraselüler proteinlerin sülfhidril gruplarına bağlanmakta ve hücre içi organellerde fonksiyon kaybına neden olmaktadır. Serbest Cd^{2+} iyonları belirgin şekilde kuantum noktaların toksisitesine katkıda bulunsa da Cd bazlı kuantum noktalar tarafından üretilen reaktif oksijen türlerinin de önemli rol oynadığı belirtilmiştir (Clift & ark., 2010; Jigyasu & ark., 2016; Li & ark., 2017; Soenen & ark., 2012). Fazla miktarda üretilen ROS potansiyel olarak DNA hasarı, epigenetik ve genomik etkiler, metabolik fonksiyonların kaybı, DNA delesyon ve kırılmaları ve hatta apoptozis gibi akut toksik etkilere neden olurken (Peng & ark., 2013), Cd^{2+} salınımı ise uzun süreli toksisiteye neden olmaktadır (Su & ark., 2010). Mitokondri özellikle reaktif oksijen türlerinin hedefi olup kuantum noktaların neden olduğu strese karşı çok duyarlıdır. Kadmiyum iyonlarının mitokondride kritik moleküller üzerindeki tiyol gruplarına bağlanabildikleri ve hücre ölümüne neden olacak şekilde stres ve hasara neden oldukları bildirilmiştir (Walling, Novak & Shepard, 2009).

Kuantum noktaların neden olduğu sitotoksisitenin üç aşamadan geçerek oluştuğu ileri sürülmektedir: 1. aşamada, dışarıdan gelen maddelere karşı hücresel antioksidan savunma aracılığı ile hücrelerin ilk cevabı ortaya çıkmaktadır. İkinci aşamada, aşırı miktarda ROS üretimine bağlı olarak ortaya çıkan oksidatif hasar ve enflamasyon nedeniyle hücresel savunma sistemi yetersiz kalmaktadır. Üçüncü aşamada ise hücresel hasar, mitokondriyal disfonksiyon ve apoptozise bağlı olarak sitotoksisite indüklenmektedir (Hu, Zhong & He, 2021).

Kadmiyum bazlı kuantum noktalarının belirgin şekilde toksisiteye neden olması ve özellikle kullanımlarının *in vivo*

biyomedikal uygulamalar için uygun olmaması nedeniyle araştırmacılar kadmiyum içermeyen, daha güvenilir ve toksik olmayan farklı tipte kuantum noktaları sentezleme yoluna gitmişlerdir. Bu kapsamda ağır metal içermeyen ancak metalik yapıda olan kuantum noktaların yanı sıra metalik olmayan karbon ya da silikon kuantum noktalar olarak adlandırılan farklı fizikokimyasal özelliklere sahip nanopartiküller geliştirilmiştir (Wang & Tang, 2021).

Kadmiyum içermeyen kuantum nokta tipleri arasında en fazla öne çıkan InP bazlı nanopartiküllerdir. Özellikle InGaP/ZnS ve InP/ZnS'nin Cd bazlı kuantum noktalara kıyasla düşük toksisiteye sahip oldukları ve daha güvenilir bir alternatif olabileceği belirtilmiştir (Tarantini & ark., 2019). InP/ZnS kuantum noktaların CdSe/ZnS ile karşılaştırıldığında, çekirdek bölgesinden benzer miktarda sızıntı olmasına rağmen daha az hücre hasarına neden olduğu ve InP'nin kadmiyum iyonlarına göre daha az toksik olduğu belirtilmiştir (Brunetti & ark., 2013). InGaP/ZnS kuantum noktaların CdSe/ZnS'e göre daha az nitrojen oksit ve oksijen radikali ürettikleri (Juzenas & ark., 2008), InP/ZnS kuantum noktaların ise CdTe ya da CdSe/ZnS'e göre daha az toksik oldukları gösterilmiştir (Brunetti & ark., 2013). Başka bir çalışmada, kadmiyum içeren kuantum noktalara alternatif olarak InP/ZnS, $CuInS_2$/ZnS ve nitrojen katkılı karbon kuantum noktaların karaciğer hücrelerindeki sitotoksik etkilerine bakılmıştır. HepG2 ve THLE-2 karaciğer hücre hatları üzerinde nitrojen katkılı kuantum noktalarının en az toksisiteye sahip olduğu, CdSe/ZnS dışındaki diğer metalik kuantum noktaların (InP/ZnS ve $CuInS_2$/ZnS) düşük dozlarda toksik etki göstermedikleri ancak toksisitelerinin tam olarak anlaşılabilmesi için daha detaylı çalışmalara ihtiyaç olduğu belirtilmiştir (Harris & Kim, 2024).

Ağır metal içermeyen gümüş (Ag) bazlı kuantum noktalarının ağır metal içerenlerin aksine ciddi toksisiteye neden olmadığı gösterilmiştir. Özellikle Ag_2S (gümüş sülfür) kuantum noktalar aynı anda hem tanı hem de tedaviyi kolaylaştıracak şekilde mükemmel optik ve kimyasal özelliklere sahip olmaları nedeniyle

bir teragnostik ajan olarak araştırmacıların dikkatini çekmiştir (Purushothamanand & Song, 2021). Ag_2S, Ag_2Se and $AgInSe_2$ gibi kuantum noktaların Cd içeren kuantum noktalara nazaran biyouyumlu oldukları belirtilmiştir (Duman & ark., 2015). Optik görüntüleme için ve teröpatik ajan olarak kullanılmak üzere N-asetil-L-sistein (NAC) ile kaplanarak hazırlanan Ag_2S'nin (NAC-Ag_2S) farklı hücre hatlarındaki toksisitesi incelendiğinde, özellikle MCF-7 hücre hattında ROS seviyelerini baskıladığı ancak DNA hasarına bağlı apoptozu tetiklediği gösterilmiştir (Buz & ark., 2019). DMSA (dimercaptosuccinic acid) ile kaplı Ag_2S kuantum noktaların çözünmeyen yarı iletken çekirdekleri nedeniyle biyouyumlu oldukları ve düşük toksisite gösterdikleri belirtilmiştir. Ag_2S kuantum noktaları tıbbi olarak uygun bir konsantrasyon aralığında V79 hücre hattında test edildiğinde sitotoksik veya genotoksik etkilerin görülmediği, ancak yüksek dozlarda yalnızca p53, survivin veya kaspaz gibi sinyal yolaklarının aracılık ettiği apoptozun indüklendiği belirtilmiştir (Özkan & ark., 2019).

Karbon kuantum noktaları ve grafen kuantum noktaları olmak üzere iki ana gruptan oluşan karbon bazlı kuantum noktaların toksisitelerinin oldukça düşük olduğu ve özellikle biyolojik uygulamalar için gelecek vaat ettiği belirtilmiştir. Cd bazlı kuantum noktalar başta olmak üzere geleneksel kuantum noktalara nazaran en iyi alternatif oldukları düşünülmektedir. Özellikle grafen kuantum noktaların *in vivo* testlerde bile düşük toksisite sergiledikleri, fotodinamik tedavi amacıyla kullanılabilecekleri ve nanotıp alanında potansiyel uygulamaları olabileceği düşünülmektedir (Tabish & ark., 2018; Henna & Pramod, 2020).

Kuantum noktalarının toksik etkilerini belirlemek amacıyla yapılan ve yukarıda da belirtilen *in vitro* çalışmalardan elde edilen sonuçlar, özellikle yaygın kullanımı olan Cd bazlı kuantum noktaların toksik olduğunu ve bu durumun medikal uygulamalar için potansiyel bir tehdit olabileceğini göstermektedir. Kuantum noktaların biyolojik sistemlerle etkileşimlerinin ve dolayısıyla

toksik etkilerinin anlaşılabilmesi için farklı model organizmaların kullanıldığı *in vivo* çalışmaların önemi büyüktür.

Kuantum noktaları ile ilgili olarak yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar karşılaştırıldığında toksisite açısından belirgin farklılıkların olduğu görülmektedir. Tsoi ve arkadaşları, bu tip çalışmalarda dozun önemli olduğunu, kültür koşulları altında hücrelerin sabit bir kuantum nokta dozuna maruz kalırken, *in vivo* ortamda bu miktarın değişebileceğini, kuantum noktaların hayvanlarda tutulmasına bağlı olarak uzun süreli toksisitenin problem olabileceğini ve tüm bu faktörlerin göz önüne alınması gerektiğini vurgulamıştır (Tsoi & ark., 2013).

Kuantum noktalarının toksisitesine yönelik olarak yapılan *in vivo* çalışmalardan çelişkili sonuçlar ortaya çıkmaktadır. Araştırmacılar hücre kültürü çalışmalarında gözlemledikleri toksisiteyi hayvan modelleriyle doğrulamaya çalışmaktadırlar. Ancak, *in vitro* deneylerde sitotoksisite kolaylıkla ölçülebilir olmasına rağmen, hayvanlarda ölçülmesi bu kadar kolay basit değildir. Araştırmada kullanılan kuantum noktanın çeşidi ve fizikokimyasal özelliklerinin yanı sıra model organizmanın tipi, kullanılan doz, maruziyet yolu (enjeksiyon, inhalasyon vb.), maruziyet sıklığı ve maruziyet süresi gibi faktörlerinde dikkate alınması gerekmektedir. Vücudun savunma sisteminin bir parçası olan retiküloendotelyal sistemin (RES) organları tarafından kuantum noktalar nonspesifik olarak alınmakta, tutulmakta sonrasında da bu organlarda parçalanmaktadır (Ballou & ark., 2004). Dolayısıyla, kuantum noktalar organlarda birikerek ya da inflamatuvar reaksiyonları tetiklemek suretiyle vücudun farklı organlarında potansiyel tehdit oluşturabilmektedir. Örneğin, CdSe/ZnS kuantum noktaları enjekte edildikten sonra BALB/c ve nude farelerde 2 yıl sonrasına kadar izlenmiş, özellikle karaciğer, dalak ve lenf nodları gibi organlarda maviye kayan emisyon pikleri gözlenmiştir. Bu durum, kuantum nokta parçalarının uzun süreli olarak organlarda tutulduğunu ve parçalandığını göstermektedir (Fitzpatrick & ark., 2009).

Deney hayvanları üzerinde yapılan çalışmalar, biyolojik bariyerleri geçerek farklı yollardan vücuda giren kuantum noktalarının karaciğer, akciğer, böbrek ve beyin gibi organlarda doku hasarına neden olduğunu göstermektedir (Liang, Zhang & Tang, 2022). Karaciğer hasarın görüldüğü başlıca organlardan birisidir. Karaciğerdeki hasar, metal içeren kuantum noktalarda bulunan metal iyonlarının salınımına bağlı olarak ortaya çıkan biyolojik hasardan kaynaklanmaktadır. Reaktif oksijen türlerinin aşırı üretimi, intraselüler Ca^{2+} seviyelerindeki artış ve Cd bazlı kuantum noktalarından kaynaklanan Cd^{2+} iyon salınımının karaciğer toksisitesindeki başlıca moleküler mekanizmalar olduğu belirtilmiştir (Lin & Chen, 2023). Kuantum noktaların karaciğerde birikmesi, haftalar süren bozulma süreci ve parçalanması gibi olaylar karaciğer toksisitesine yol açmaktadır. *İn vivo* çalışmalarda, kadmiyum bazlı kuantum noktaları ile enjekte edilen farelerde karaciğerde hem morfolojik hem de fonksiyonel bozuklukların ortaya çıktığı gösterilmiştir (Liu & ark., 2011; Tang & ark., 2013). CdSe/ZnS kuantum noktalarının C57BL/6 farelerde hepatotoksisiteye neden olduğu, bunun kadmiyum ve reaktif oksijen türlerinden kaynaklandığı belirtilmiştir (Lu & ark., 2016).

In vivo sitotoksisiteye ilişkin olarak sıçanlarda yapılan çalışmalardan farklı sonuçlar elde edilmiştir. CdSe/ZnS kuantum noktalarına hem kısa (7 günden az) hem de uzun süreli (80 günden fazla) maruziyetin çalışma süresince Sprague-Dawley cinsi sıçanlarda kayda değer bir toksisiteye neden olmadığı belirtilmiştir (Hauck & ark., 2010). Wistar cinsi sıçanlarda ise yüksek karaciğer enzimleri ve karaciğer iltihabıyla bağlantılı olarak ciddi toksisiteye neden olmuştur (Tiwari & Behari, 2011). İlave olarak, CdSe/ZnS kuantum noktaların sıçanlarda uygulamayı takiben akciğer hasarı ve enflamasyona (Roberts & ark., 2013), Cd bazlı kuantum noktaların ise fare akciğerinde kalıcı enflamasyon ve granülom oluşumuna yol açtığı belirtilmiştir (Ho & ark., 2013). Karaciğer ve akciğer toksisitesi dışında, Cd bazlı kuantum noktaların farelerde enjeksiyon sonrasında yüksek kreatinin seviyeleri ile karakterize böbrek hasarına da neden olduğu bildirilmiştir (Tang & ark., 2013). Böbrek

özellikle Cd içeren kuantum noktalar için hedef organlardan birisidir. Kuantum noktaları, metabolik atıkların boşaltımı, asit-baz dengesi ve homeostaziden sorumlu önemli bir organ olan böbreklerde birikerek böbrek hasarına neden olmaktadır. CdTe kuantum noktalar intravenöz uygulama sonrası doza bağlı bir şekilde akut böbrek hasarına neden olmaktadır. Hasarın nedeninin ise kuantum nokta kaynaklı otofaji olduğu belirtilmiştir (Fan & ark., 2016).

Kuantum noktalar beyinde de toksisiteye neden olmaktadır. Merkezi sinir sistemi ile ilgili hastalıkların tedavisi araştırmacıların zorlandığı bir alandır. Özellikle kan-beyin bariyeri beyne erişilebilirliği zorlaştırmakta ve ilaç tedavilerinin etkinliğini engellemektedir (Alexander & ark., 2019). Kuantum noktaları nano ölçekte boyutlarının sağlamış olduğu avantajları nedeniyle kan-beyin bariyerini geçebilmektedir (Kato & ark., 2010). CdTe/ZnS ile intravenöz olarak enjekte edilen farelerde, 3 saat sonra kuantum nokta konstrasyonunun en yüksek seviyesine ulaştığı belirtilmiştir (He & ark., 2020). CdTe kuantum noktalara maruz kalan sıçanların nöronlarında artan ROS ve intraselüler Ca^{2+} seviyelerine bağlı olarak nöronal apoptozis ve hatta ölümün tetiklendiği belirtilmiştir (Wu & ark., 2015). CdS kuantum noktaların korteks ve serebellum üzerindeki nörotoksik etkilerini belirlemek amacıyla yapılan bir çalışmada, bu nanopartiküllerin 0.01 μg/kg'lık dozunun *in vitro* testlerde belirgin bir sitotoksisiteye neden olmadığı gösterilmiştir. Ancak *in vivo* çalışmalarda, CdS'nin doza bağlı olarak kan-beyin bariyerini kolaylıkla geçebildiği ve dejenerasyon belirtilerinin 0.1 mg/kg'ı aşan dozlarda ortaya çıktığı belirtilmiştir (Varmazyari & ark., 2020).

Kuantum noktaların tek doz şeklinde değil de tekrarlayan dozlar şeklinde uygulandığı tam ölçekli uzun dönemli toksikolojik çalışmaların yetersiz olması nedeniyle toksisiteleri ile ilgili bilgilerin sınırlı olduğu düşünülmektedir. Yapılan bir çalışmada, kuantum noktalarının bir kez ve 14 gün boyunca uygulandığı hayvanlar toksisite açısından değerlendirilmiştir. Kuantum noktalarının 2.5

mg/kg'lık dozu 14 gün boyunca uygulandığında özellikle akciğer, karaciğer, dalak, böbrekler ve tiroid bezinde geri dönüşümsüz değişikliklerin olduğu gözlenmiştir (Kuznetsov & ark., 2023). Dolayısıyla, doz kadar maruziyet sıklığının da önemli olduğu görülmektedir.

Cd bazlı kuantum noktalara alternatif olarak geliştirilen ve COOH, NH_2 ve OH gibi farklı yüzey modifikasyonlarına sahip InP/ZnS'nin pulmoner aerosol inhalasyonu sonrası farelerde toksisitesine bakılmıştır. Yüzeyinde OH ve COOH içeren InP/ZnS kuantum noktaların genel olarak toksisitesinin oldukça düşük olduğu, belirgin histopatolojik anormalliklere neden olmadığı, ancak gelecekteki biyomedikal uygulamalar için bu durumun yine de dikkate alınması gerektiği vurgulanmıştır (Lin & ark., 2020). Başka bir çalışmada, intravenöz olarak indiyum bazlı kuantum noktalarının farklı dozları (12.5 mg/kg ya da 50 mg/kg) ile enjekte edilen sıçanlarda 24 saat, 1 ve 4 hafta sonrasında histolojik, biyokimyasal ve hematolojik parametrelerde herhangi bir anormallik saptanmamıştır (Yaghini & ark., 2018). Başka bir çalışmada, InP/ZnS'nin 25 mg/kg'lık yüksek dozunun 84 günlük bir süre boyunca farelerde gözlemlenebilir toksik etkilere neden olmadığı belirtilmiştir (Lin & ark., 2015).

Kuantum noktalarının *in vivo* toksisitesi ile ilgili çalışmalarda sıklıkla fare ve sıçanlar model organizma olarak kullanılmasına rağmen, son yıllarda özellikle omurgasız modeli olarak *Caenorhabditis elegans (C. elegans)* ve omurgalı modeli olarak da zebra balığı (*Danio reiro*) öne çıkmaktadır. Her iki model de nanotoksikolojik çalışmalar için sahip oldukları avantajları nedeniyle alternatif olarak kullanılmaktadır. *C. elegans* nörotoksisite ile ilgili çalışmalarda (Zhao & ark., 2015), zebra balığı ise özellikle gelişim biyolojisi ile ilgili nanotoksikolojik çalışmalar için tercih edilmektedir. Nanomateryallere maruziyet zebra balığında memeli organizmalardakine benzer fizyolojik ve patolojik tepkilere neden olmaktadır. Bundan dolayı, hem CdTe, CdSe ve CdSe/Zn gibi kadmiyum bazlı kuantum noktalar hem de metalik olmayan karbon

bazlı grafen kuantum noktalarda dahil olmak üzere birçok farklı kuantum noktasının toksik etkilerini araştırmak amacıyla zebra balığı bir model organizma olarak kullanılmaktadır (Bai & Tang, 2022; Liu & ark., 2020).

4. SONUÇ

Kuantum noktaların sahip olduğu eşsiz optik özellikler onları biyomedikal uygulamalar için cazip hale getirmektedir. Bununla birlikte, birçok araştırmacı potansiyel toksisiteleri nedeniyle kuantum noktaların teşhis ve tedavi amaçlı olarak henüz güvenilir bir şekilde kullanılabileceğini düşünmemektedir.

Yapılan çalışmalar kuantum noktalarının toksisitesinin anlaşılmasında taşıdıkları fizikokimyasal özelliklerin önemli olduğunu göstermektedir. Nanopartikülün boyutu, şekli, yüzey alanı, yüzeydeki yükleri, konjuge ligandlar, dağılabilirliği ve kararlılığı gibi fizikokimyasal özelliklerinin bilinmesi hem istenilen performansa sahip, biyolojik olarak uyumlu kuantum noktaların sentezi hem de toksisitenin azaltılması bakımından önem arz etmektedir (Hu, Zhong & He, 2021). Özellikle bu nanopartiküllerin sentezlenmeleri sürecinde kullanılan kadmiyum gibi ağır metal iyonlarının potansiyel toksik etkileri nedeniyle ağır metalsiz üretim de dahil olmak üzere daha güvenilir, çevre dostu ve biyouyumlu nanopartiküllerin sentezlenmesi toksisitenin kontrol altına alınmasında faydalı olacaktır. Kuantum noktaların neden olduğu toksisitenin anlaşılabilmesi için fizikokimyasal özellikleri dışında özellikle biyolojik sistemlerle etkileşimlerinin de bilinmesi gerekmektedir. *In vitro* ve *in vivo* çalışmalarda, kuantum noktaların toksisitelerine ilişkin olarak farklı sonuçların ortaya çıkması, sadece kuantum noktasının yapısı ile ilişkili olmayıp nanopartikül ile hücreler arasındaki etkileşimin de önemli olduğu görülmektedir. *In vitro* ortamda hücreler sabit bir kuantum nokta dozuna maruz kalırken, *in vivo* ortamda canlının doğası gereği bu durum değişebilmekte, hatta canlı içerisinde tutularak uzun süreli toksisiteye neden olabilmektedir (Sayes, Reed & Warheit, 2007).

Kuantum noktaların yapısının tek tip olmaması, her birisinin kendine özgü fizikokimyasal bileşimlerinin olması onların biyolojik aktivitelerini de etkilemektedir. Sonuç olarak, kuantum noktalarının sahip oldukları fizikokimyasal özelliklerin biyolojik sistemlerde neden olabileceği toksik etkilerin belirlenmesi, bu nanopartiküllerin özellikle tıp ve eczacılık gibi sağlıkla ilgili alanlarda daha güvenilir bir şekilde kullanımına olanak sağlayacaktır.

Gelecekte yapılacak çalışmalarda, özellikle doz indeksinin standartlaştırılması, *in vitro* çalışmalarda kullanılacak hücre tipinin rastgele seçilmemesi, kuantum noktaları ile *in vivo* hücreler arasındaki etkileşimi yansıtabilecek *in vitro* modellerin belirlenmesi kuantum noktaların kullanımı ile ilgili tutarlı ve karşılaştırılabilir toksikolojik verilerin toplanabilmesi adına önem arz etmektedir (Hu, Zhong & He, 2021).

6. KAYNAKÇA

Abdellatif, A. A. H, Younis, M. A., Alsharidah, M., Al Rugaie, O., & Tawfeek, H. M. (2022). Biomedical Applications of Quantum Dots: Overview, Challenges, and Clinical Potential. International Journal of Nanomedicine, 2 (17), 1951-1970. Doi: 10.2147/IJN.S357980

Abdul Ghani, S. F., Wright, M., Paramo, J. G., Bottrill, M., Green, M., Long, N., & Thanou, M. (2014). Three Bisphosphonate Ligands Improve the Water Solubility of Quantum Dots. Faraday Discussions, 175, 153–169.

Alaghmandfard, A., Sedighi, O., Tabatabaei, R. N., Abedini, A. A., Malek, K. A., Toprak, M. S., & Seifalian, A. (2021). Recent Advances in the Modification of Carbon-Based Quantum Dots for Biomedical Applications. Materials Science and Engineering, 120 Doi: 10.1016/j.msec.2020.111756

Alexander, A., Agrawal, M., Uddin, A., Siddique, S., Shehata, A. M., Shaker, M. A., Ata Ur Rahman, S., Abdul, M. I. M., & Shaker M. A. (2019). Recent expansions of novel strategies towards the drug targeting into the brain. International Journal of Nanomedicine, 14, 5895-5909. Doi: 10.2147/IJN.S210876

Azzazy, H. M., Mansour, M. M., & Kazmierczak, S. C. (2007). From diagnostics to therapy: prospects of quantum dots. Clinical Biochemistry, 40 (13-14), 917-27. Doi: 10.1016/j.clinbiochem..05.018

Bai, C., & Tang, M. (2023). Progress on the toxicity of quantum dots to model organism-zebrafish. Journal of Applied Toxicology, 43 (1):89-106. Doi: 10.1002/jat.4333

Baláž, P., Sayagués, M. J., Baláž, M., Zorkovská, A., Hronec, P., Kováč, J., Kováč, J., Dutková, E., & Mojžišová, G. (2014). CdSe@ZnS nanocomposites prepared by a mechanochemical route: No release of Cd2+ ions and negligible in

vitro cytotoxicity. Materials Research Bulletin, 302-309. Doi:101016/jmaterresbull201308070

Ballou, B., Lagerholm, B. C, Ernst, L. A, Bruchez, M. P., & Waggoner, A. S. (2004). Noninvasive imaging of quantum dots in mice. Bioconjugate Chemistry, 15 (1), 79-86. Doi: 10.1021/bc034153y.

Bingül, S., Önal, Y. & Gökbulut, İ. (2023). Geleceğin malzemesi olarak karbon kuantum noktacık ve uygulamaları. European Journal of Science and Technology, 50, 23-29.

Bozrova, S. V., Baryshnikova, M. A., Sokolova, Z. A., Nabiev, I. R., & Sukhanova, A. V. (2018). In vitro cytotoxicity of CdSe/ZnS quantum dots and their interaction with biological systems. KnE Energy, 58-63.

Branca, J. J. V., Morucci, G., & Pacini, A. (2018). Cadmium-Induced Neurotoxicity: Still Much Ado. Neural Regeneration Research, 13, 1879–1882.

Brkić, S. (2016). Optical Properties of Quantum Dots. European International Journal of Science and Technology, 5 (9): 98-107.

Brkić, S. (2018). Applicability of Quantum Dots in Biomedical Science. IntechOpen, 21-39. Doi:10.5772/INTECHOPEN.71428

Brunetti, V., Chibli, H., Fiammengo, R., Galeone, A., Malvindi, M. A., Vecchio, G., Cingolani, R., Nadeau, J. L., & Pompa, P. P. (2013). InP/ZnS as a safer alternative to CdSe/ZnS core/shell quantum dots: in vitro and in vivo toxicity assessment. Nanoscale 5, 307–317. Doi: 10.1039/c2nr33024e

Buz, P. T., Duman, F. D., Erkisa, M., Demirci, G., Ari, F., Ulukaya, E., & Acar, H. Y. (2019). Development of near-infrared region luminescent N-acetyl-L-cysteine-coated Ag2S quantum dots

with differential therapeutic effect. Nanomedicine (Lond.) 14, 969–987. Doi:10.2217/nnm-2018-0214

Byrne, S. J., Williams, Y., Davies, A., Corr, S. A., Rakovich, A., Gun'ko, Y. K., Rakovich, Y. R., Donegan, J. F., & Volkov, Y. (2007). "Jelly dots": Synthesis and cytotoxicity studies of CdTe quantum dot-gelatin nanocomposites. Small, 3, 1152–1156. Doi: 10.1002/smll.200700090

Chen, N., He, Y., Su, Y., Li, X., Huang, Q., Wang, H., Zhang, X., Tai, R., & Fan, C. (2012). The Cytotoxicity of Cadmium-Based Quantum Dots. Biomaterials, 33, 1238–1244. Doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.10.070

Choi, A. O., & Maysinger, D. (2008). Applications of quantum dots in biomedicine. In: Rogach, A.L. (eds) Semiconductor Nanocrystal Quantum Dots. Springer, Vienna. Doi: 10.1007/978-3-211-75237-1_12

Clift, M. J. D., Boyles, M. S. P., Brown, D. M., & Stone, V. (2010). An investigation into the potential for different surface-coated quantum dots to cause oxidative stress and affect macrophage cell signalling in vitro. Nanotoxicology 4, 139–149. Doi: 10.3109/17435390903276925

Dabbousi, B. O., Rodriguez, V. J., Mikulec, F. V., Heine, J. R., Mattoussi, H., & Ober, R. (1997). (CdSe)ZnS core-shell quantum dots: synthesis and characterization of a size series of highly luminescent nanocrystallites. Journal of Physical Chemistry, B.101 (46), 9463–9475

Dana, J., Maiti, S., Tripathi, V. S, & Ghosh, H. N. (2018). Direct Correlation of Excitonics with Efficiency in a Core-Shell Quantum Dot Solar Cell. Chemistry, 24 (10), 2418-2425. Doi: 10.1002/chem.201705127.

Derfus, A. M., Chan, W.C.W., & Bhatia, S. N. (2004). Probing the cytotoxicity of semiconductor quantum dots. Nano Letters, 4 (1), 11-18. Doi: 10.1021/nl0347334

Duman, F. D., Hocaoglu, I., Ozturk, D. G., Gozuacik, D., Kiraz, A., & Yagci, A. H. (2015). Highly luminescent and cytocompatible cationic Ag2S NIR-emitting quantum dots for optical imaging and gene transfection. Nanoscale, 7, 11352–11362. Doi: 10.1039/c5nr00189g

Ekimov, A. I, Efros, A.L, & Onushchenko, A. A. (1985). Quantum size effect in semiconductor microcrystals. Solid State Communications, 56 (11), 921–924. Doi: 10.1016/0038-1098(93)90275-R

Fan, J., Yun, S., Wang, S., Li, Y., Zeng, X., Cao, Z., Yang, P., Song, P., Wang, Z., Xian, Z., Gao, H., Chen, Q., Cui, D., & Ju, D. (2016). Inhibition of autophagy overcomes the nanotoxicity elicited by cadmium-based quantum dots. Biomaterials, 78, 102-114, Doi: 10.1016/j.biomaterials.2015.11.029

Fitzpatrick, J. A., Andreko, S. K, Ernst, L. A, Waggoner, A. S., Ballou, B., Bruchez, M. P. (2009). Long-term persistence and spectral blue shifting of quantum dots in vivo. Nano Letters, 9 (7), 2736-41. Doi: 10.1021/nl901534q

Gopee, N. V., Roberts, D. W., Webb, P., Cozart, C.R., Siitonen, P.H., Latendresse, J.R., Warbitton, A.R., Yu, W.W., Colvin, V.L., Walker, N.J., & Howard, P.C. (2009). Quantitative determination of skin penetration of PEG-coated CdSe quantum dots in dermabraded but not intact SKH-1 hairless mouse skin. Toxicological Sciences, 111(1), 37-48. Doi: 10.1093/toxsci/kfp139

Hardman, R. (2006). A toxicologic review of quantum dots: toxicity depends on physicochemical and environmental factors. Environmental Health Perspectives, 114, 165–172. Doi:10.1289/ehp.8284

Harris, S., Kim, K. A. (2024). Comparison of Common Quantum Dot Alternatives to Cadmium-Based Quantum Dots on the Basis of Liver Cytotoxicity. Nanomaterials (Basel),14 (13):1086. Doi: 10.3390/nano14131086

Hauck, T. S., Anderson, R. E., Fischer, H. C., Newbigging, S., & Chan, W. C. (2010). In vivo quantum-dot toxicity assessment. Small, 6 (1), 138-44. Doi: 10.1002/smll.200900626

He, K., Liang, X., Wei, T., Liu, N., Wang, Y., Zou, L., Bai, C., Yao, Y., Wu, T., Kong, L., Zhang, T., Xue, Y., & Tang, M. (2020). A metabolomics study: CdTe/ZnS quantum dots induce polarization in mice microglia. Chemosphere, 246:125629. Doi: 10.1016/j.chemosphere.2019.125629

Henna, T. K., & Pramod, K. (2020). Graphene Quantum Dots Redefine Nanobiomedicine. Materials Science and Engineering, 110, 110651. Doi: 10.1016/j.msec.2020.110651

Hines, M. A, & Guyot-Sionnest, P. (1996). Synthesis and characterization of strongly luminescing ZnS-capped CdSe nanocrystals. The Journal of Physical Chemistry, 100, 468–471.

Ho, C. C., Chang, H., Tsai, H. T., Tsai, M. H., Yang, C. S., Ling, Y. C, Lin, P. (2013). Quantum dot 705, a cadmium-based nanoparticle, induces persistent inflammation and granuloma formation in the mouse lung. Nanotoxicology, 7 (1), 105-15. Doi: 10.3109/17435390.2011.635814

Hu, L., Zhong, H., & Zhiguo He. (2021). Toxicity evaluation of cadmium-containing quantum dots: A review of optimizing physicochemical properties to diminish toxicity, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 200, 111609. Doi: 10.1016/j.colsurfb.2021.111609

Huy, B. T., Phuong, N. T. K., Nguyen, T. T. T., & Lee, Y. I. (2018). Photoluminescence spectroscopy of Cd-based quantum dots

for optosensing biochemical molecules. Applied Spectroscopy Reviews, 53, 313–332. Doi:10.1080/ 05704928.2017.1309424

Iyer, G., Pinaud, F., Tsay, J., & Weiss, S. (2007). Solubilization of quantum dots with a recombinant peptide from Escherichia coli. Small, 3, 793–798. Doi: 10.1002/smll.200600516

Jigyasu, A. K., Siddiqui, S., Lohani, M., Khan, I. A., & Arshad, M., (2016). Chemically synthesized CDSE quantum dots inhibit growth of human lung carcinoma cells via ROS generation. EXCLI Journal, 15, 54–63. Doi: 10.17179/excli2015-705

Juzenas, P., Generalov, R., Juzeniene, A., & Moan, J. (2008). Generation of nitrogen oxide and oxygen radicals by quantum dots. Journal of Biomedical Nanotechnology, 4, 450–456. Doi:10.1166/jbn.2008.008

Kato, S., Itoh, K., Yaoi, T., Tozawa, T., Yoshikawa, Y., Yasui, H., Kanamura, N., Hoshino, A., Manabe, N., Yamamoto, K., & Fushiki, S. (2010). Organ distribution of quantum dots after intraperitoneal administration, with special reference to area-specific distribution in the brain. Nanotechnology, 21 (33), 335103. Doi: 10.1088/0957-4484/21/33/335103

Kolobov, A.V. (2015). Group IV Quantum Dots and Nanoparticles. In: Schnohr, C., Ridgway, M. (eds) *X-Ray Absorption Spectroscopy of Semiconductors*. Springer Series in Optical Sciences, 190, 203-222. Springer, Berlin, Heidelberg. Doi: 10.1007/978-3-662-44362-0_10

Kloepfer, J. A., Bradforth, S. E., & Nadeau, J. L. (2005). Photophysical Properties of Biologically Compatible CdSe Quantum Dot Structures. The Journal of Physical Chemistry B, 109, 9996–10003.

Kuznetsov, D., Krylsky, D., Dezhurov, S., Grachev, A., Neschisliaev, V., Orlova, E., & Kuznetsova, A. (2023). Quantum dots are time bomb: Multiscale toxicological study. Chemico-

Biological Interactions, 374, 110396. Doi: 10.1016/j.cbi.2023.110396

Li, P., Cuiyan, Wu., Xu, Y., Cheng, D., Lu, Q., Gao, J., Yang, W., Zhu, X., Liu, M., Li, H., Yin, P., & Zhang, Y. (2020). Group IV nanodots: Newly emerging properties and application in biomarkers sensing. Trends in Analytical Chemistry, 131,116007. Doi:10.1016/j.trac.2020.116007

Li, K., Xia, C., Wang, B., Chen, H., Wang, T., He, Q., Cao, H., & Wang, Y. (2017). Effects of quantum dots on the ROS amount of liver cancer stem cells. Colloids Surf. B Biointerfaces 155, 193–199. Doi: 10.1016/j.colsurfb.2017.04.019

Liang, Y., Zhang, T., Tang, M. (2022). Toxicity of quantum dots on target organs and immune system. Journal of Applied Toxicology, 42 (1), 17-40. Doi: 10.1002/jat.4180

Lin, X., & Chen, T. (2023). A review of in vivo toxicity of quantum dots in animal models. *International Journal of Nanomedicine*, 18, 8143-8168. Doi: 10.2147/IJN.S434842

Lin, G., Chen, T., Pan, Y., Yang, Z., Li, L., Yong, K. T, Wang, X., Wang, J., Chen, Y., Jiang, W., Weng, S., Huang, X., Kuang, J., & Xu, G. (2020). Biodistribution and acute toxicity of cadmium-free quantum dots with different surface functional groups in mice following intratracheal inhalation. Nanotheranostics, 4 (3), 173-183. Doi: 10.7150/ntno.42786

Liu, W, Zhang, S, Wang, L, Qu, C, & Zhang, C, (2011). CdSe Quantum Dot (QD)-Induced Morphological and Functional Impairments to Liver in Mice. PLOS ONE 6 (9), e24406. Doi: 10.1371/journal.pone.0024406

Liu, Na, & Tang, M. (2020). Toxicity of different types of quantum dots to mammalian cells in vitro: An update review. Journal of Hazardous Materials, 399, 122606, Doi: 10.1016/j.jhazmat..122606

Lin G, Chen T, Pan Y, Yang Z, Li L, Yong KT, Wang X, Wang J, Chen Y, Jiang W, Weng S, Huang X, Kuang J, Xu G. (2020). Biodistribution and acute toxicity of cadmium-free quantum dots with different surface functional groups in mice following intratracheal inhalation. Nanotheranostics, 4 (3), 173-183. doi: 10.7150/ntno.42786

Lin, G., Ouyang, Q., Hu, R., Ding, Z., Tian, J., Yin, F., Xu, G., Chen, Q., Wang, X., Yong, K. (2015). In vivo toxicity assessment of non-cadmium quantum dots in BALB/c mice. Nanomedicine and Nanotechnology Journal, 11, 341–350. Doi:10.1016/j.nano.2014.10.002

Liu, W., Huang, G., Su, X., Li, S., Wang, Q., Zhao, Y., Liu, Y., Luo, J., Li, Y., Li, C., Yuan, D., Hong, H., Chen, X., & Chen, T. (2020). Zebrafish: A Promising Model for Evaluating the Toxicity of Carbon Dot-Based Nanomaterials. ACS Applied Materials & Interfaces Journal, 12 (43), 49012-49020. Doi: 10.1021/acsami.0c17492

Lu, Y., Xu, S., Chen, H., He, M., Deng, Y., Cao, Z., Pi, H., Chen, C., Li, M., Ma, Q., Gao, P., Ji, Y., Zhang, L., Yu, Z., Zhou, Z. (2016). CdSe/ZnS quantum dots induce hepatocyte pyroptosis and liver inflammation via NLRP3 inflammasome activation, Biomaterials, 90, 27-39. Doi: 10.1016/j.biomaterials.2016.03.003

Manshian, B. B., Soenen, S. J., Al-Ali, A., Brown, A., Hondow, N., Wills, J., Jenkins, G .J. S., & Doak, S. H. (2015). Cell type-dependent changes in CdSe/ZnS quantum dot uptake and toxic endpoints. Toxicological Sciences 144, 246–258. Doi:10.1093/toxsci/kfv002

Mansur, A. A. P., Mansur, H. S., de Carvalho, S. M., Lobato, Z. I. P., Guedes, M .I. M. C., & Leite, M. F. (2016). Surface biofunctionalized CdS and ZnS quantum dot nanoconjugates for nanomedicine and oncology: to be or not to be nanotoxic?

International Journal of Nanomedicine and Nanosurgery, 11, 4669–4690. Doi: 10.2147/IJN.S115208

Mo, D., Hu, L., Zeng, G., Chen, G., Wan, J., Yu, Z., Huang, Z., He, K., Zhang, C., & Cheng, M. (2017). Cadmium-Containing Quantum Dots: Properties, Applications, and Toxicity. Applied Microbiology and Biotechnology, 101, 2713–2733. Doi: 10.1007/s00253-017-8140-9

Mulder, W. J., Koole, R., Brandwijk, R. J., Storm, G., Chin P. T, Strijkers, G. J., de Mello Donegá, C., Nicolay, K., & Griffioen, A.W. (2006). Quantum dots with a paramagnetic coating as a bimodal molecular imaging probe. Nano Letters, 6 (1), 1-6. Doi: 10.1021/nl051935m

Nair, A., Haponiuk, J. T., Thomas S., Gopi, S. (2020). Natural Carbon-Based Quantum Dots and Their Applications in Drug Delivery: A Review. Biomedicine and Pharmacotherapy, 132:110834. Doi: 10.1016/j.biopha.2020.110834

Oh, E., Liu, R., Nel, A., Gemill, K. B., Bilal, M., Cohen, Y., & Medintz, I. L. (2016). Metaanalysis of cellular toxicity for cadmium-containing quantum dots. Nature Nanotechnology, 11, 479. Doi: 10.1038/NNANO.2015.338

Ozyurt, D., Al Kobaisi, M., Hocking, R. K., & Fox, B. (2023). Properties, synthesis, and applications of carbon dots: A review, Carbon Trends, 12, 100276, Doi:10.1016/j.cartre.2023.100276

Özkan Vardar, D., Aydin, S., Hocaoğlu, İ, Yağci Acar, H., & Başaran, N. (2019). An In Vitro Study on the Cytotoxicity and Genotoxicity of Silver Sulfide Quantum Dots Coated with Meso-2,3-dimercaptosuccinic Acid. Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences, 16 (3):282-291. Doi: 10.4274/tjps.galenos.2018.85619

Peng, L., He, M., Chen, B., Wu, Q., Zhang, Z., Pang, D., Zhu, Y., & Hu, B. (2013). Cellular uptake, elimination and toxicity of

CdSe/ZnS quantum dots in HepG2 cells. Biomaterials, 34 (37), 9545-58. Doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.08.038

Purushothaman, B. & Song, J.M. (2021). Ag2S quantum dot theragnostics. Biomaterials Science, 9, 51-69.

Qian, H. F., Dong, C. Q, Weng, J. F, & Ren, J. C. (2006). Facile one-pot synthesis of luminescent, water-soluble, and biocompatible glutathione-coated CdTe nanocrystals. Small, 2:747–751. Doi: 10.1002/smll.200500530

Rafati Rahimzadeh, M., Rafati Rahimzadeh, M., Kazemi, S., Moghadamnia, A. A. (2017). Cadmium toxicity and treatment: An update. Caspian Journal of Internal Medicine, 8 (3), 135-145. Doi: 10.22088/cjim.8.3.135

Roberts, J. R., Antonini, J. M., Porter, D. W. et al. (2013). Lung toxicity and biodistribution of Cd/Se-ZnS quantum dots with different surface functional groups after pulmonary exposure in rats. Particle and Fibre Toxicology 10, 5 Doi: 10.1186/1743-8977-10-5

Sayes, C. M., Reed, K. L, & Warheit, D. B. (2007). Assessing toxicity of fine and nanoparticles: comparing in vitro measurements to in vivo pulmonary toxicity profiles. Toxicological Sciences, 97 (1):163-80. Doi: 10.1093/toxsci/kfm018

Soenen, S. J., Demeester, J., De Smedt, S. C, & Braeckmans, K. (2012). The cytotoxic effects of polymer-coated quantum dots and restrictions for live cell applications. Biomaterials, 33 (19), 4882-8. Doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.03.042

Su,Y., Hu, M., Fan, C., He, Y., Li, Q., Li, W., Wang, L.H., Shen, P., & Huang, Q. (2010). The cytotoxicity of CdTe quantum dots and the relative contributions from released cadmium ions and nanoparticle properties, Biomaterials, 31, 4829–4834.

Tabish, T. A., Scotton, C. J., Ferguson, J. D. C., Lin, L., der Veen, A. V.; Lowry, S., Ali, M., Jabeen, F., Winyard, P. G., & Zhang, S. (2018). Biocompatibility and Toxicity of Graphene

Quantum Dots for Potential Application in Photodynamic Therapy. Nanomedicine, 13, 1923–1937.

Tang, Y., Han, S., Liu, H., Chen, X., Huang, L., Li, X., & Zhang, J. (2013). The role of surface chemistry in determining in vivo biodistribution and toxicity of CdSe/ZnS core–shell quantum dots, Biomaterials, 34, 8741-8755, Doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.07.087

Tarantini, A., Wegner, K. D., Dussert, F., Sarret, G., Beal, D., Mattera, L., Lincheneau, C., Proux, O., Truffier-Boutry, D., Moriscot, C., et al. (2019). Physicochemical Alterations and Toxicity of InP Alloyed Quantum Dots Aged in Environmental Conditions: A Safer by Design Evaluation. NanoImpact, 14:100168. Doi: 10.1016/j.impact.2019.100168

Tiwari, D. K., Jin, T., & Behari, J. (2011). Bio-distribution and toxicity assessment of intravenously injected anti-HER2 antibody conjugated CdSe/ZnS quantum dots in Wistar rats. International Journal of Nanomedicine, 6, 463-475.

Tsoi, K. M, Dai, Q., Alman, B. A., & Chan, W. C. (2013). Are quantum dots toxic? Exploring the discrepancy between cell culture and animal studies. Accounts of Chemical Research, 46 (3),662-71. Doi: 10.1021/ar300040z

Varmazyari, A., Taghizadehghalehjoughi, A., Sevim, C., Baris, O., Eser, G., Yildirim, S., Hacimuftuoglu, A., Buha, A., Wallace, D. R, Tsatsakis, A., Aschner, M., & Mezhuev, Y. (2020). Cadmium sulfide-induced toxicity in the cortex and cerebellum: In vitro and in vivo studies. Toxicology Reports, 7:637-648. Doi: 10.1016/j.toxrep.2020.04.011.

Vasudevan, D., Gaddam, R.R., Trinchi, A., & Cole, I. (2015). Core-Shell Quantum Dots: Properties and Applications. Journal of Alloys and Compounds, 636, 395–404.

Walling, M. A., Novak, J.A., & Shepard, J. R. E. (2009). Quantum dots for live cell and in vivo imaging. International Journal of Molecular Sciences, 10:441–491. doi: 10.3390/ijms10020441

Wang, Z., & Tang, M. (2021). The Cytotoxicity of Core-Shell or Non-Shell Structure Quantum Dots and Reflection on Environmental Friendly: A Review. Environmental Research, 194, 110593.

Wang, Y., & Tang, M. (2018). Review of in vitro toxicological research of quantum dot and potentially involved mechanisms. Science of The Total Environment, 625, 940-962. Doi:10.1016/j.scitotenv.2017.12.334

Wu, T., He, K., Zhan, Q., Ang, S., Ying, J., Zhang, S., Zhang, T., Xue, Y., Chen, Y., & Tang, M. (2015). Partial protection of N-acetylcysteine against MPA-capped CdTe quantum dot-induced neurotoxicity in rat primary cultured hippocampal neurons. *Toxicology Research, 4* (6), 1613-1622. Doi: 10.1039/c5tx00127g

Xu, X., Ray, R., Gu, Y., Ploehn, H. J., Gearheart, L., Raker, K., & Scrivens, W. A. (2004). Electrophoretic analysis and purification of fluorescent single walled carbon nanotube fragments. Journal of the American Chemical Society, 126 (40), 12736-12737.

Xu, G., Zeng, S., Zhang, B., Swihart, M. T., Yong, K., & Prasad, P. N. (2016). New generation cadmium-free quantum dots for biophotonics and nanomedicine. Chemical Reviews, 116 (19), 12234–12327. Doi: 10.1021/acs.chemrev.6b00290

Yaghini, E., Turner, H., Pilling, A., Naasani, I., & MacRobert, A.J. (2018). In vivo biodistribution and toxicology studies of cadmium-free indium-based quantum dot nanoparticles in a rat model. Nanomedicine and Nanotechnology, 14, 2644–2655. Doi: 10.1016/j.nano.2018.07.009

Yu, S., Zhang, X., Li, L., Xu, J., Song, Y., Liu, X., Wu, S., & Zhang, J. (2019). High Photostability and Luminescent Efficiency

of Quantum Dots: Ultrathin Epitaxial Al Self-Passivation Layer with a Homogeneous Ligand. Materials Research Express, 6, 0850f7.

Zhang, Y., Schnoes, A. M., & Clapp, A.R. (2010). Dithiocarbamates as Capping Ligands for Water-Soluble Quantum Dots. ACS Applied Materials & Interfaces Journal, 2, 3384–3395.

Zhao Y, Wang X, Wu Q. (2015). Translocation and neurotoxicity of CdTe quantum dots in RMEs motor neurons in nematode Caenorhabditis elegans. *Journal of Hazardous Materials*, 283, 480–489. Doi:10.1016/j.jhazmat.2014.09.063

Zhimin, Y., Wang, J., & Yang, P. (2013). Highly Luminescent CdTe/CdS/ZnO Core/Shell/Shell Quantum Dots Fabricated Using an Aqueous Strategy. Luminescence, 28, 169–175.

BÖLÜM IX

Domatesin Genetik Kararlılığına Ağır Metal Etkisi

Hüseyin BULUT[1]

Giriş

Domates (*Solanum lycopersicum*), dünya genelinde yaygın olarak tüketilen bir sebze olup, beslenme açısından son derece önemlidir. Yüksek oranda C vitamini, A vitamini, potasyum ve likopen gibi antioksidan bileşenler içerir. Likopen, serbest radikallerle savaşarak hücresel hasarı önleyen bir karotenoid olarak bilinir. Ayrıca, likopenin kalp-damar sağlığı üzerindeki olumlu etkileri ve belirli kanser türlerine karşı koruyucu olduğu çeşitli çalışmalarda ortaya konmuştur (Giovannucci & ark., 2002). Domates ayrıca düşük kalori içeriği ile diyetlerin vazgeçilmez bir parçasıdır. Domatesin lif içeriği, sindirim sistemini düzenlemede de önemli rol oynar.

[1] Doç.Dr. Hüseyin BULUT., Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Eczane Hizmetleri Bölümü, Erzincan/Türkiye, Orcid: 0000 0003 3424 7012, huseyinbulut@erzincan.edu.tr

Domates, hem çiğ hem de pişirilmiş halde tüketilebilen çok yönlü bir besindir. Pişirme işlemi sırasında likopenin biyoyararlanımı artmakta, bu da domatesin besin değerini daha da yükseltmektedir. Bu nedenle, domates salçası ve sosları gibi işlenmiş ürünler de beslenmede önemli bir yere sahiptir.

Dünya genelinde domates üretimi 2023 yılı itibarıyla yaklaşık 190 milyon ton olarak kaydedilmiştir (FAO, 2023). Türkiye, dünya domates üretiminde önemli bir yere sahiptir ve yıllık yaklaşık 13 milyon ton üretim ile lider ülkeler arasındadır. Bu yüksek üretim hacmi, hem iç tüketim hem de ihracat açısından ülkeye ekonomik katkı sağlar. Türkiye'deki üretim, çoğunlukla Akdeniz, Ege ve Marmara bölgelerinde yoğunlaşmıştır. Modern seracılık tekniklerinin uygulanması, üretim miktarını ve kalitesini artırmaktadır.

Domates, sadece gıda endüstrisinde değil, aynı zamanda kozmetik ve ilaç sektörlerinde de kullanılmaktadır. Özellikle domatesten elde edilen likopen, çeşitli sağlık ürünlerinde aktif bileşen olarak kullanılmaktadır. Retrotranspozonlar, bitki genomlarında yaygın bulunan ve genetik çeşitliliği artırmada önemli rol oynayan hareketli DNA elemanlarıdır. Özellikle bitkilerin evrimsel süreçlerinde genetik materyalin yeniden düzenlenmesine katkıda bulunurlar. Retrotranspozonlar, gen ekspresyonunu etkileyebilir ve çevresel streslere adaptasyonda rol oynayabilir (Kumar & Bennetzen, 1999).

Bitki genomlarının büyük bir kısmını retrotranspozonlar oluşturur. Örneğin, mısır genomunun yaklaşık %85'ini retrotranspozonlar kaplar. Domates gibi diğer bitkilerde de

retrotranspozonlar, genetik çeşitliliğin ve adaptasyonun temel bir unsuru olarak işlev görür. Retrotranspozonların hareketliliği, "kopyala-yapıştır" mekanizması ile gerçekleşir. İlk adımda retrotranspozon, RNA'ya transkribe edilir. Daha sonra bu RNA molekülü, ters transkriptaz enzimi yardımıyla DNA'ya geri çevrilir ve genomun farklı bölgelerine entegre edilir (Wessler & ark., 1995). Bu süreç, bitki genomlarında genetik çeşitliliği artırarak evrimsel avantaj sağlayabilir.

Retrotranspozonların hareketliliği, çevresel koşullara ve bitkinin fizyolojik durumuna bağlı olarak değişiklik gösterebilir. Örneğin, kuraklık, tuz stresi ve ağır metal kirliliği gibi stres faktörleri retrotranspozon hareketliliğini artırabilir. Bu durum, bitkilerin zorlu çevresel koşullara adaptasyonunda kritik bir rol oynar.

Retrotranspozon hareketliliği, bitki genomlarında hem olumlu hem de olumsuz etkiler yaratabilir:

Genetik Çeşitliliğin Artması: Retrotranspozonların hareketi, genetik materyalin yeniden düzenlenmesine neden olur. Bu durum, bitkilerin çevresel streslere uyum sağlamasına katkıda bulunabilir. Retrotanspozonlar, genetik materyalin yeniden düzenlenmesine yol açarak bitkilerin çevresel koşullara uyum sağlamasına yardımcı olabilir. Yeni gen düzenlemeleri veya düzenleyici bölgelerin değiştirilmesi, bitkilerin stres faktörlerine (ör. kuraklık, tuzluluk) direnç geliştirmesini sağlayabilir. (Kumar & Bennetzen, 1999).

Gen İfadesinin Değişmesi: Retrotranspozonların genomda yeni yerlere entegre olması, yakınlarındaki genlerin ifadesini artırabilir veya azaltabilir. Bu değişiklikler, bitkilerin stres yanıtlarını modüle edebilir (Wessler & ark., 1995).

Genom Boyutunun Artması: Retrotranspozonlar, "kopyala-yapıştır" mekanizması ile genom boyutunda artışa neden olabilir. Bu durum, özellikle geniş genomlara sahip bitkilerde belirgin bir etki yaratır (Dubrovina & ark., 2013).

Mutasyonlara Neden Olma: Retrotranspozonların kritik gen bölgelerine entegre olması, mutasyonlara yol açabilir. Bu durum, hem zararlı hem de faydalı olabilecek genetik değişiklikler yaratabilir (Kumar & Bennetzen, 1999).

Bitkiler sabit konumlu yaşam tarzlarından dolayı soğuk, sıcak, kuraklık, tuzluluk, ağır metal toksisitesi, pestisitler, UV ışık stresi ve besin eksikliği gibi çeşitli abiyotik streslere maruz kalmaktadır (Lal & ark., 2023; Liu & ark., 2023; Xue & ark., 2023). Doğal afetler ya da antropojenik faaliyetler sonucunda ağır metallerin çevre kirliliğindeki rolü giderek artmaktadır. Bu kirliliğin etkilerinin büyüklüğü farklı sebzelerde metal toksisitesinin rapor edilmesiyle tüm dünyada daha belirgin ve dikkat çekici hale gelmektedir (Ali & Gill, 2022).

Diğer stres üreten faktörlerden bağımsız olarak, ağır metallerin toksisitesinden kaynaklanan stres, insanların günlük tüketiminde önemli yere sahip olan sebze üretimi üzerinde önemli derecede zararlı etkiye sahip ciddi bir sorundur (Pande & ark., 2022). Gıda maddelerinde birikimi söz konusu olan ağır metal varlığı insan sağlığı açısından ciddi bir tehdit oluşturmaktadır. Ağır metallerle kirlenmiş sebzelerin tüketimi, bu toksik ağır metallere maruz kalma nedeniyle ciddi sağlık sorunlarına yol açmaktadır (Zwolak & ark., 2019).

Ağır metallerden kaynaklanan çevre kirliliği oldukça yaygındır. Bitki verimliliğine ve yapısına verdiği zarar, tarımsal üretimin sürdürülebilirliği açısından önemli bir konudur (Hoque & ark., 2021).

Bu bölüm çalışmasının amacı, insan beslenmesinde önemli yere sahip olan domateste Cd ağır metalinin retrotransposon hareketliliğine etki düzeyinin tespit edilmesidir.

1. Örneklerin Yetiştirilmesi ve Cd uygulaması

Eşit büyüklükte seçilen domates (*Solanum lycopersicum* L.) tohumları sterilize edildikten sonra kurulandı. Domates tohumları kurutma kâğıdı bulunan pedrilere yerleştirildi. Kontrol, 50 µM, 100 µM ve 150 µM olarak 4 grup oluşturuldu. Kontrol grubu sadece su ile muamele edilirken, Cd stresini değerlendirmek için deney gruplarındaki her pedri kabına sırasıyla 50, 100 ve 150 µM konsantrasyonlarında $CdCl_2$ verildi.

2. DNA İzolasyonu

Bitki örneklerinden DNA izolasyonu, PCR tabanlı bir işaretleyici sistem olan Inter Retrotransposon Amplified Polymorphism (IRAP) yönteminde kullanılmak için gerçekleştirildi. Shagai-Maroof ve arkadaşlarının (1984) izolasyon protokolü genomik DNA'yı izole etmek için küçük farklılıklarla uygulandı. İzolasyon için ekstraksiyon çözeltisi 1 M TRIS-HCl, 5 M NaCl, 0.5 M EDTA, %2 CTAB, %0.2 β-merkaptoetanol ve %0.1 $Na_2S_2O_3$ ile hazırlandı.

3. PCR Aşaması

PCR uygulaması için PCR buffer, dNTPs, ultra saf su, primer, genomik DNA ve $MgCl_2$ ile PCR master karışımı hazırlandı. PCR tüplerinde 1µl genomik DNA + 1 µl IRAP primer + 18 µl master karışımı ile PCR reaksiyon karışımı oluşturulmuştur. Bu karışımlar her bir primerin bağlanma sıcaklığına uygun olarak Bio-Rad C1000 Touch PCR cihazında döngü sayısı, süresi ve sıcaklıkları ayarlanarak gerçekleştirildi. sukkula, 3LTR-5, LTR 6150, nıkıta E2647- ve 5LTR1 IRAP primerleri kullanıldı.

4. Elektroforez

PCR ile çoğaltılan genomik DNA ürünlerinin görüntülenebilmesi ve bant büyüklüklerinin tespiti için agaroz jel üzerinde elektrik akımında yürütüldü. Bu işlem 90 voltta 105 dakika gerçekleştirildi. UV kamera ile elde edilen DNA bant profilleri görüntülendi.

5. Görüntüleme ve Hareketliliğin Hesaplanması

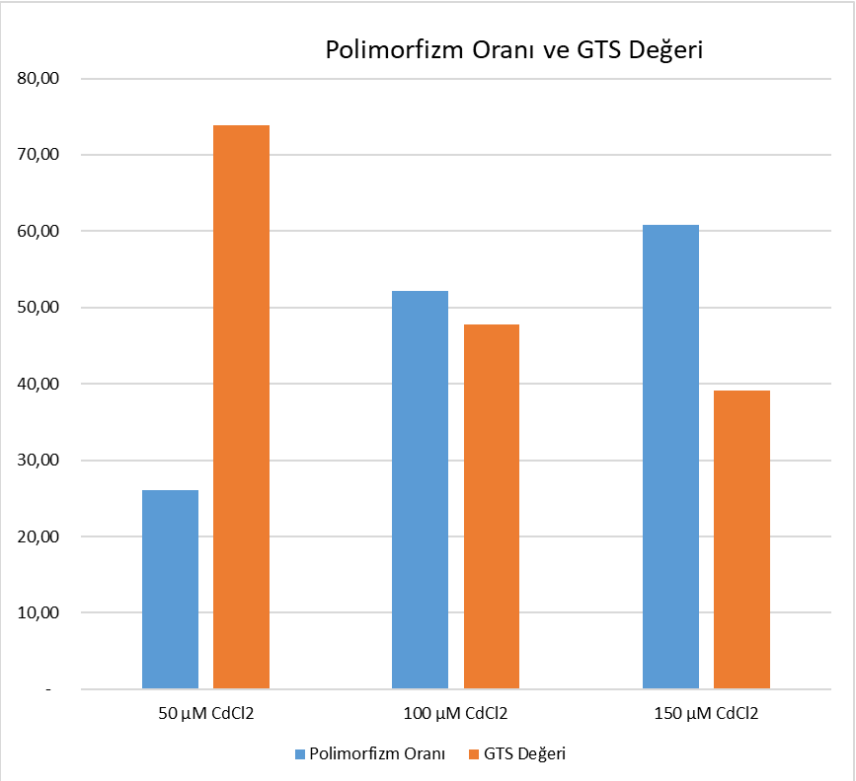
Her bir primer için tüm örneklerde amplifiye olan DNA bantlarının varlığı ve yokluğu, negatif kontrol IRAP profillerine göre bant yoğunluklarındaki azalma ve artmalar görüntüleme cihazı ve Total LAB TL 120 (Nonlinear Dynamics) yazılımıyla belirlenmiştir.

6. Bulgular

Çalışmada kullanılan 5 IRAP primerinin tamamında polimorfik bant elde edilmiştir. Oluşan polimorfik bantlar domates genomunda meydana gelen değişimlerin belirteci olarak kullanılmaktadır. Oluşan farklılıklar polimorfizm olarak ifade edilmektedir.

Kontrol grubu domates fidelerinden elde edilen bant görüntüleri ile karşılaştırıldığında %60.86 ile en büyük polimorfizm değeri 150 µM $CdCl_2$ uygulanan domates fidelerinde tespit edilmiştir. 100 µM $CdCl_2$ uygulamasında %52.17 polimorfizm tespit edilmiştir. Elde edilen en düşük polimorfizm değeri ise %26.08 ile 50 µM $CdCl_2$ uygulaması yapılan fidelerden elde edilmiştir.

$CdCl_2$ ağır metal stresinin domates genom kararlılığını olumsuz yönde etkilediği elde edilen GTS değerleri ile tespit edilmiştir. GTS değerleri 150 µM $CdCl_2$ uygulamasında %39.14, 100 µM $CdCl_2$ uygulamasında %47.83 ve 50 µM $CdCl_2$ uygulamasında ise %73.92 olarak hesaplanmıştır. Retrotranspozon hareketliliği sonucu elde edilen GTS değerleri ve polimorfizm oranları Şekil 1' de verilmiştir.



Şekil 1. Oluşan polimorfizm oranları ve GTS değerleri

Sonuç

Retrotanspozonların yerleştikleri bölgeler, gen ekspresyonunu artırabilir veya azaltabilir. Bu, genetik çeşitliliği artırarak bitkilerde yeni fenotiplerin ortaya çıkmasına neden olabilir. Retrotranspozon hareketliliği, DNA metilasyonu gibi epigenetik mekanizmaları tetikleyebilir. Bu, genetik materyalin düzenlenmesinde önemli bir rol oynar (Dubrovina & ark., 2013). Yapılan Cd uygulamasının domateste retrotranspozon hareketliliğine neden olduğu

belirlenmiştir. Uygulama dozu arttıkça genetik kararlılığın azaldığı anlaşılmaktadır. Bu durum bitki gelişimini engelleyecektir.

Kaynaklar

Ali, B., Gill, R.A. (2022). Heavy metal toxicity in plants: recent insights on physiological and molecular aspects, *Front. Plant Sci*., 13 , Article 1016257

Cordaux, R., & Batzer, M. A. (2009). The impact of retrotransposons on human genome evolution. *Nature Reviews Genetics*, 10(10), 691-703. doi:10.1038/nrg2640

Dubrovina, A. S. Kiselev, K. V., Zhuravlev, Y. N. (2013). The Role of Canonical and Noncanonical Pre-mRNA Splicing in Plant Stress Responses. *Hindawi Publishing Corporation BioMed Research International*, Volume Article ID 264314, 14 pages http://dx.doi.org/10.1155/ 2013/ 264314

Feschotte, C., & Pritham, E. J. (2007). DNA transposons and the evolution of eukaryotic genomes. *Annual Review of Genetics*, 41, 331-368. doi:10.1146/annurev.genet.40.110405. 090448

Giovannucci E., Rimm, E. B., Liu, Y., Stampfer, M. J., Willett, W. C. (2002). A prospective study of tomato products, lycopene, and prostate cancer risk. *J Natl Cancer Inst.* 6;94(5):391-8. doi: 10.1093/jnci/94.5.391.

Grandbastien, M. A. (2015). LTR retrotransposons, handy hitchhikers of plant regulation and stress response. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 1849(4), 403-416. doi:10.1016/j.bbagrm.2014.07.017

Hoque, M.N., Tahjib-Ul-Arif, M., Hannan, A., Sultana, N., Akhter, S., Hasanuzzaman, M., Akter F., Hossain, M.S., Sayed, M.A., Hasan, M.T., Skalicky, M. (2021). Melatonin modulates

plant tolerance to heavy metal stress: morphological responses to molecular mechanisms. *Int. J. Mol. Sci*., 22 , p. 11445

Kazazian, H. H. (2004). *Mobile elements: Drivers of genome evolution*. Science, 303(5664), 1626-1632. doi:10.1126/science.1089670

Kumar, A., Bennetzen, J. L. (1999). Plant retrotransposons. *Annu Rev Genet.* 33:479-532. doi: 10.1146/annurev.genet. 33.1.479.

Lal, M.K., Tiwari, R.K., Altaf, M.A., Kumar, A., Kumar, R. (2023). Abiotic and biotic stress in horticultural crops: insight into recent advances in the underlying tolerance mechanism. *Front. Plant Sci*., 14 , Article 1212982

Liu, J. , Wei, L., Feng, S. (2023). Research progress of non-coding RNAs in vegetable responses to abiotic stresses. *Gene*, 87, Article 147537

Pande, A., Mun, B.G., Methela, N.J., Rahim, W., Lee, D.S., Lee, G.M., Hong, J.K., Hussain, A., Loake, G., Yun, B.W. (2022). Heavy metal toxicity in plants and the potential NO-releasing novel techniques as the impending mitigation alternatives. *Front. Plant Sci*., 13, Article 1019647

Wessler, S. R., Bureau, T. E., White, S. E. (1995). LTR-retrotransposons and MITEs: important players in the evolution of plant genomes. *Current Opinion in Genetics & Development.* Volume 5, Issue 6, December, Pages 814-821

Wicker, T., et al. (2007). A unified classification system for eukaryotic transposable elements. *Nature Reviews Genetics*, 8(12), 973-982. doi:10.1038/nrg2165

Xue, Y., Bai, X., Zhao, C., Tan, Q. , Li, Y., Luo, G., Wu, L., Chen, F., Li, C., Ran, C., Zhang, S. (2023). Spring photosynthetic phenology of Chinese vegetation in response to climate change and its impact on net primary productivity, *Agric. For. Meteorol*., 342 , Article 109734

Zwolak, A., Sarzyńska, M., Szpyrka, E., Stawarczyk, K. (2019). Sources of soil pollution by heavy metals and their accumulation in vegetables: a review. *Water Air Soil Pollut*., 230 , pp. 1-9

BÖLÜM X

Likenleşmiş Mantarlarda (Likenlerde) DNA Barkodlama

Merve YİĞİT[1]
Ekrem BÖLÜKBAŞI[2]
Mehmet Gökhan HALICI[3]

Giriş

Likenleşmiş mantarlar; (likenler) mikobiyont olarak adlandırılan bir mantar ortağı ile fotobiyont olarak adlandırılan bir yeşil alg ve/veya siyanobakteri ve Basidiomycetes mayalarının bir araya gelerek benzersiz bir tallus oluşturdukları simbiyotik birlikteliklerdir (Yiğit & Halıcı, 2024).

[1] Dr., Erciyes Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Kayseri/Türkiye, Orcid: 0000-0002-8082-8574, merveyigit@erciyes.edu.tr
[2] Doç. Dr., Amasya Üniversitesi, Suluova Meslek Yüksekokulu, Çevre Koruma Teknolojileri Bölümü, Amasya/Türkiye, Orcid: 0000-0003-3828-1226, ekrem.bolukbasi@amasya.edu.tr
[3] Prof. Dr., Erciyes Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Kayseri/Türkiye, Orcid: 0000-0003-4797-1157, mghalici@erciyes.edu.tr

Likenler zorlu çevresel şartlarda, hemen hemen her yerde hayatta kalabilme becerisine sahiptir. Çöllerden tropik bölgelere, tropiklerden kutuplara kadar neredeyse bütün karasal habitatlarda görülebilmektedir (Bölükbaşı & Halıcı, 2024). Hem çok zorlu çevresel şartlarda bile hayatta kalabilmeleri hem de içerdikleri sekonder bileşenler nedeniyle ekolojik açıdan oldukça önemlidir. Bu durum likenlerle ilgili araştırmaların çoğalmasına yol açmıştır. Likenlerin mantar olduğunun keşfi ve "fungi" alemi içerisinde sınıflandırılması ile birlikte likenlerle ilgili ilk çalışmalar olarak 1932'de Nannfeldt, 1952'de Santesson tarafından yapılan çalışmalar ön plana çıkmaktadır. O zamandan günümüzde likenlerin tanımlanmasında ve biyoçeşitlilik çalışmalarında morfolojik ve anatomik karakterler kullanılmaktadır. Zaman içerisinde bu karakterlere kimyasal veriler eklenmiştir ve günümüzde moleküler açıdan da likenler ele alınmaya başlanmıştır (Halıcı & ark., 2023a).

Likenler tanımlanırken morfolojik, anatomik, kimyasal ve moleküler özelliklerinden faydalanılmaktadır. Bir liken tanımlanırken morfolojik ve anatomik karakterler olarak tallusun formu, rengi, uzunluk ve genişlik gibi ölçüleri, varsa dalların kalınlıkları ve şekli, bazal pigmentasyonu, korteks ve medulla kalınlığı, vejetatif propagül varlığı ya da yokluğu, alınan kesitte varsa epihimenyum, himenyum ve hipotesyum kalınlıkları ve renkleri, askus tipi, askosporların ölçüleri ve özellikleri, parafizin özellikleri gibi birçok karakter sayılabilmektedir. Fakat bu karakterler bir likenin doğru teşhisinde her daim yeterli olmamaktadır.

Likenlerle ilgili yapılan taksonomik çalışmaların büyük bir kısmı morfolojik ve anatomik yöntemlere dayanmaktadır.

Taksonomik çalışmaların iyileştirilmesi ve doğrulanması için günümüzde moleküler ve filogenetik çalışmaların yapılması ve DNA barkodlamalarının gerçekleştirilmesi oldukça önemlidir (Halıcı & ark., 2023b).

Likenleşmiş mantarlar, mantar ve alg ya da siyanobakteri arasında simbiyotik bir birliktelik gösteren organizmalardır ve ekosistemlerde önemli roller üstlenirler. Bu organizmaların doğru şekilde tanımlanması, özellikle biyolojik çeşitliliğin korunması ve ekolojik çalışmalar açısından kritik öneme sahiptir. Ancak, morfolojik benzerlikler ve çevresel koşulların neden olduğu değişiklikler, liken türlerinin geleneksel yöntemlerle tanımlanmasını zorlaştırmaktadır. DNA barkodlama, likenleşmiş mantarların moleküler düzeyde hızlı ve güvenilir bir şekilde tanımlanmasını sağlayan modern bir yöntem olarak öne çıkmaktadır. Bu yöntem, belirli gen bölgelerinin sekanslanarak karşılaştırılmasına dayanır ve tür seviyesinde doğru tespit yapılmasını kolaylaştırır. Bu bağlamda, DNA barkodlama likenlerin biyolojik çeşitliliğinin ortaya konmasında, filogenetik analizlerde ve ekolojik adaptasyonların anlaşılmasında güçlü bir araç sunmaktadır.

1. DNA Barkodlama

Genel olarak tür tanımlamada kullanılan geleneksel yöntemler çok sayıda soruna ve zorluğa yol açmakta hatta yetersiz kalmaktadır. Bu sebeple taksonomistler moleküler teknikleri kullanmaya başlamışlardır. Moleküler teknikler morfoloji ve anatomi tabanlı tanımlama yaklaşımlarındaki zorlukların üstesinsen gelmede oldukça umut verici bir yaklaşım olarak görülmektedir. Günümüzde tür tanımlamada moleküler teknikler alanında “DNA barkodlaması”

yenilikçi bir yaklaşım olarak ön plana çıkmaktadır (Suriya & ark., 2020).

DNA barkodları genellikle polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile çoğaltılabilen ve türlerin analizinde dizilenebilen kısa DNA dizilerinden oluşmaktadır. Yani DNA barkodlamada, barkodlar kısa standartlaştırılmış DNA bölgeleri olarak tanımlanabilmektedir (Chase & Fay, 2009). DNA barkodlama, geleneksel taksonomik tanımlamanın pratik olmadığı çok çeşitli ekolojik ve biyolojik çalışmalara katkıda bulunmak amacıyla, genomun küçük "bir parçasından DNA dizileri kullanılarak tür tanımlamanın yapıldığı bir tekniktir (Lahaye & ark., 2008).

DNA barkodlama ilk defa Hebert ve arkadaşları tarafından 2003 yılında kullanılmıştır. İlk kullanımından bu yana taksonomistlerin çok ilgisini çekmiş ve hayvanlarda yaygın olarak kullanılmaya başlamıştır. DNA barkodlama birçok amaç için kullanılabilmektedir. Bunlar arasında mülkiyet ve fikri mülkiyet haklarının desteklenmesi, kriptik türlerin belirlenmesi, adli tıpta biyolojik örneklerin suç mahali ile ilişkilendirilmesi, gıda güvenliğinin desteklenmesi, ekolojik ve çevresel genomik çalışmalar gibi çok çeşitli amaçlar bulunmaktadır (Li & ark., 2015). Taksonomide ise DNA barkodlamanın iki temel amacı bulunmaktadır. Bunlardan ilki; yeni türlerin keşfi ve tanımlanması, ikincisi ise bilinmeyen örneklerin belirlenmesi ve türlere atanmasıdır (Hebert & ark.,2003).

DNA barkodlama ile örnek tanımlamada genellikle türün genomundan kısa bir DNA dizisi (barkod) elde edilerek başlanmaktadır. Bu barkod dizisi bilinen türlerin barkod dizilerinin

olduğu referans kütüphanesiyle karşılaştırılmaktadır. Eğer yakından eşleşme varsa, tür tanımlanmaktadır. Yeni bir barkod dizisi, yeni tür bulgusuna işaret edebilmektedir. DNA barkodlama koruma biyolojisi, biyocoğrafya, biyoloji, biyotıp, ekoloji, epidemiyoloji gibi birçok bilimsel alana önemli katkılar sağlamaktadır (Suriya & ark., 2020).

2. Likenlerde DNA Barkodlama

Likenleşmiş mantarların bilinen yaklaşık 13.500 türü vardır ve bilinen mantar çeşitliliğinin yaklaşık % 18'ini oluşturmaktadır (Hawksworth, 2001). Dünya çapında bu rakamın 2-3 katı kadar tür bulunduğunun muhtemel olduğu düşünülmektedir (Lücking & ark., 2009). Mantar çeşitliliğinin en iyi bilinen bileşenlerden biri olmasına rağmen, likenlerin doğru şekilde tanımlanması kullanılan karakterlerin çeşitliliği nedeniyle oldukça zor ve karmaşık olabilmektedir. Bir likenin yalnızca morfolojik ve anatomik özelliklerine göre tanımlanması uzman ellerde bile zorlayıcı olabilmektedir. Çünkü doğru bir tanımlama yapmak için gerekli morfolojik ve kimyasal karakterler her daim bir örnekte bulunmamakta; genç ya da parçalı materyallerin çözümlenmesi zor olmaktadır. DNA barkodlaması bu bağlamda likenlerin tanımlanmasında önemli bir aracı oluşturmaktadır (Kelly & ark., 2011).

Likenlerde DNA barkodlama süreci birkaç temel basamaktan oluşmaktadır. Bu basamaklar şu şekilde sıralanabilir:

1. Liken materyalinin elde edilmesi

2. DNA izolasyonu için örneğin hazırlanması

3. DNA izolasyonu

4. PZR Analizleri

5. DNA dizi analizi, sekansların hizalanması ve filogenetik ağaçların oluşturulması

2.1. Liken Materyalinin Elde Edilmesi

Likenlerde DNA barkodlama için ilk aşama, barkodlama yapılacak olan liken örneğinin elde edilmesidir. Örneğin toplanması için arazi çalışmasının yapılması gerekmektedir. Toplanan örnek ya da örnekler, hasar almamaları için pelür kâğıttan imal edilmiş torbalar içerisine yumuşak kâğıtlara sarılarak koyulmalı ve özenle taşınmalıdır. Örneğin toplanmasında bıçak, keski ve çekiç gibi aletler kullanılırken hem liken örneğinin hem de subsratın zarar görmemesine özen gösterilmelidir. Ayrıca toplandığı yere ait bilgiler (subsrat özelliği, toplanma tarihi, habitat özelliği, yüksekliği vb.) ve konumu not edilmelidir.

Likenlerde taze toplanmış örneklerinin yanı sıra herbaryumda bulunan eski örneklerde de DNA barkodlama çalışması yapılabilmektedir.

2.2. DNA İzolasyonu İçin Örneğin Hazırlanması

Likenler “mantarlar” aleminde sınıflandırılmaktadır ve mantar ortağın ismiyle anılmaktadır. Likenlerde DNA izolasyonu için de mantar ortak esas alınmaktadır. Bu nedenle fotobiyontun en az olduğu ve mikobiyont ağırlıklı olan üreme organları apotesyum, peritesyum gibi kısımlardan DNA izolasyonu gerçekleştirilmektedir. Fertil örneklerde tallusun kendisi ve vejetatif propagüller gibi kısımlarda kullanılmaktadır.

Bir likenden DNA izolasyonu yapılacağı zaman liken örneğinden birkaç tane apotesyum, peritesyum vb. üreme yapısı jiletle alınarak eppendorf tüpe aktarılmaktadır. Örnek fertil olduğunda tallus, tallus parçası, vejetatif propagüller, loplar gibi diğer kısımlardan alınan parçalar kullanılmaktadır.

2.3. DNA İzolasyonu

Likenlerde DNA izolasyonu manuel yöntemlerle ya da ticari izolasyon kitleri ile yapılabilmektedir. Manuel yöntemlerin içerisinde yavaş ya da hızlı olarak adlandırılan çeşitli yöntemlerde mevcuttur (Grube & ark., 1995). Likenlerde DNA barkodlama için özel tasarlanmış protokoller kullanılması gerekmektedir. Çünkü likenler sekonder metabolit olarak polisakkaritler, polifenoller ve tanninler açısından oldukça zengin içeriğe ahiptir. DNA ekstraksiyonu için bu bileşenlerin ortadan kaldırılması gerekmektedir. Aksi takdirde DNA'nın ileri enzimatik analizlerini engelleyici etki gösterebilmektedir (Martin & Winka, 2000).

Geçmişten günümüze likenlerde DNA izolasyonu ile ilgili birçok yöntem yayınlanmıştır (Werth & ark., 2016; Park & ark., 2014; Bölükbaşı & Halıcı, 2024). Bu yöntemler temelde (1) lizis tamponlarında bulunan kaotropik ajanlar, (2) proteinleri, polifenolleri ve/veya polisakkaritleri uzaklaştırmak için kullanılan saflaştırma adımları ve (3) DNA çökelmesi bakımından farklılık göstermektedir. Örneğin bu yöntemlerin bir kısmında sekonder metabolitler setil-trimetik amonyum bromür (CTAB) ya da sodyum dodeasil sülfat (SDS) gibi bir deterjan içeren sıcak lizis tamponlarında inkübasyondan sonra kloroform ya da fenol:kloroform ile uzaklaştırılmaktadır. DNA ise izopropanol ile

çökeltilmektedir (Lee & ark., 1988; Lee & Taylor, 1990; Armaleo & Clerc, 1995; Crespo & ark., 1997). Bu yöntemlerin bir kısmında ise kaotropik tuz guanidin tiyosiyanat proteinleri denatüre eder ve DNA silika matriks (GlassMilk™) üzerine çökeltilmektedir. Polisakkaritler DNA bağlayıcı silika matriks pelletini etanol ile yıkanmasıyla uzaklaştırılmaktadır (Armaleo & Clerc, 1991; Grube & ark., 1995; Landvik & ark., 1996). Bu yöntemlerin yanı sıra bu yöntemleri birleştiren, düzenleyen, modifikasyonlar ile uygulayan diğer manuel yöntemlere de rastlamak mümkündür (Martin & Winka, 2000).

Taze liken örneklerinde DNA barkodlamanın yanı sıra herbaryum örneklerinden DNA barkodlama için de aynı yöntemler kullanılabilmektedir. Uzun süre önce ölmüş organik materyalden DNA elde etmenin daha zor olduğuna dair bilgiler mevcuttur. Bazı çalışmalar DNA'nın zamanla bozulduğunu göstermektedir (Werth & ark., 2016). Bu nedenle mümkün olan her zaman taze örneklerin toplanması ve DNA barkodlamanın taze örnek üzerinden yapılması gerektiği öne sürülmektedir (Sohrabi & ark., 2010). Ancak yeni bir türün geçmiştekilerle moleküler anlamla da kıyaslanmasını sağlamak için herbaryum örneklerinde de DNA barkodlaması yapılması gerekmektedir. Herbaryum örneklerden toplamadan bu yana geçen süre, kötü depolama koşulları, kurutmak için kullanılan kimyasal işlemler ve kurutma sürecinin etkin yönetilememesi gibi birçok faktör DNA bozulmasına katkıda bulunabilmektedir. Bu nedenle herbaryum örnekleri için özel DNA barkodlama yöntemleri geliştirilmekte ve bunlar uygulanmaktadır (Sohrabi & ark., 2010; Bendiksby & ark., 2014; Kistenich & ark., 2019).

Günümüzde likenlerde DNA izolasyonu için ticari kitlerin kullanımı da oldukça yaygındır. Doğrudan likenlerden DNA izolasyonu için üretilmiş bir kit bulunmamaktadır. Bitkiler için üretilen kitlerden bazıları kullanılmaktadır. En yaygın olarak kullanılan ticari kit Qiagen DNeasy Plant Mini Kit'tir. Bunun yanı sıra E.Z.N.A.® HP Plant DNA Mini Kit, MoBio PowerPlant Pro DNA extraction kit, Qiagen DNeasy PowerSoil kit, DNeasy PowerSoil kit gibi çeşitli kitlerde kullanılabilmektedir. Bu kitler ile likenden DNA izolasyonu yapılırken kitlerin ticari protokolleri doğrudan uygulanabildiği gibi, çeşitli liken grupları için modifikasyonlar ile uygulamalarda bazı farklılıklar olmaktadır. Likenlerde DNA izolasyon kitlerinin kullanılması özellikle 10 mg'dan az materyalle çalışılan durumlarda yüksek kalitede DNA elde edilebilmesini sağlaması açısından önemlidir.

2.4. PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) Analizleri

Likenlerde genel olarak standart PZR basamakları uygulanmaktadır. Ancak likenlerde yapılan moleküler çalışmalarda PZR'da dikkat edilmesi gereken önemli bazı faktörler bulunmaktadır. İlk olarak DNA izolasyonu yapılırken diğer mantarlardan gelen DNA, bryofitlere ait subsrat parçacıkları gibi ekzojen kirleticilerden kaçınmak gerekmektedir. İstenmeyen DNA kaynağı olarak likenikol mantar da görülebilir. Ayrıca likenlerdeki çeşitli sekonder metabolit varlığı ve polisakkaritlerin yüksek konsantrasyonu PZR etkinliğini engelleyebilir. Bu nedenle izolasyon yapılırken bunların ortadan kaldırılmasına yönelik optimizasyonlar yapılmalıdır (Crespo & ark., 1998).

Yukarda bahsedildiği üzere liken materyalinin dikkatli biçimde diseksiyonu, genel olarak diğer organizmalar ve özellikle mantarla birlikte yaşayan alg ve likenikol likenlerin DNA'sını ortadan kaldırmak açısından önemlidir. Mikroskobik bir inceleme ile fotosentetik partnerin genomik materyalinin çoğaltılması önlenebilir. Ayrıca liken tallusundan mantar materyalinin mekanik izolesinin yanı sıra sadece mantar DNA'sını çoğaltan oligonükleotid primerleri seçilebilmektedir.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR), belirli bir DNA bölgesini milyarlarca kez çoğaltmak için kullanılan hızlı, hassas ve yaygın bir moleküler biyoloji tekniğidir. 1983 yılında Kary Mullis tarafından geliştirilen bu yöntem, genetik araştırmalardan tıbbi teşhislere kadar birçok alanda devrim yaratmıştır (Mullis & Faloona, 1987). PZR, yalnızca küçük miktarda DNA örneği gerektirir ve belirli bir hedef bölgenin seçici çoğaltılmasını sağladığından, düşük miktardaki genetik materyalin analiz edilmesine olanak tanır. Bu özellik, hem akademik araştırmalarda hem de klinik uygulamalarda PZR'yi vazgeçilmez bir araç haline getirmiştir.

PZR'nin temel prensibi, hedef DNA bölgesinin enzimatik olarak çoğaltılmasıdır. Bu işlem üç ana aşamada gerçekleşir:

1. İlk adım DNA şablonunun denatürasyonunu içerir. 5 dakikadan uzun sürmemelidir. Aksi takdirde DNA polimeraz denatürasyona uğrayabilir ve reaksiyon başarısız olur ya da amplikon üretimi azalır.

2. İkinci adım reaksiyonun denatürasyon, bağlanma (yapışma) ve uzatma evresini geçirdiği 25-30 döngüden oluşan bir süreçtir. İlk olarak 15-30 saniye boyunca 95°C'de denatürasyon basamağı

vardır. Bu süre, şablonun GC içeriğine bağlıdır ve DNA şablonu zaten ilk denatürasyon adımından geçtiği için mümkün olduğunca kısa tutulmalıdır. İkinci adım, 30-60 saniye boyunca 54-66°C'de bağlanma şablonudur. Üçüncü adım, şablon dizisinin Taq DNA polimerazı tarafından uzatılmasıdır. Uzama süresi ve sıcaklığı, hedeflenen şablona ve kullanılan polimeraza bağlıdır.

3. Üçüncü ve son adım ise hedeflenen dizinin edeflenen dizinin Taq DNA polimerazı tarafından son uzaması/uzatılmasıdır. Bu adım, polimerazın bitmemiş amplikonu tamamlamasına ve amplikonun sonuna moleküler klonlama prosedürleri için yararlı olabilecek bir 3' kalıntısı eklemesine olanak tanır.

Tüm bu döngüler tamamlandıktan sonra termal döngü cihazı genellikle amplifikasyon reaksiyonun sonlandırılması ve depolanması amacıyla bir tutma sıcaklığına kaydırılmaktadır. Bu sıcaklık genellikle 4°C olmaktadır (Saiki & ark., 1985).

PCR teknolojisinin avantajları arasında hızlı sonuç vermesi, yüksek hassasiyeti ve geniş uygulama alanı bulunur. İnsan genetiği, adli tıp, tarım biyoteknolojisi ve bulaşıcı hastalık teşhisi gibi birçok alanda yaygın olarak kullanılan bu teknik, modern biyoteknolojinin temel taşlarından biri olarak kabul edilir. Örneğin, adli bilimlerde, çok küçük miktarlardaki DNA örnekleri üzerinden kimlik tespiti yapılırken, tıbbi teşhislerde ise patojenlerin genetik materyali tespit edilerek hastalıkların tanısı konmaktadır (Bartlett & Stirling, 2003).

Likenlerde PZR analizlerinde bu adımlar, döngülerin sayısı, hangi sıcaklığın seçileceği gibi hususlar çalışılan örneklerin türünü, cinsine, grubuna, hangi gen bölgesinin çalışılacağına ve diğer bazı faktörlere göre değişebilmektedir. Bu bağlamda PZR analizleri için

daha önce yapılan çalışmalardan yararlanabileceği gibi, bu çalışmalardaki prosedürlerin optimizasyonu ile de analiz gerçekleştirilebilir.

PZR'da en öenmli bileşenlerden birisi de primerlerdir. Primerler PZR'ın başlatılması için gereken kısa DNA zincirleridir. Başarılı bir PZR için uygun primerlerden oluşan bir set tasarlanmalıdır. Her pimer ileri (Forward) ve geri (Reverse) olarak DNA zincirlerini sense ve anti-sense denen zıt uçlarına sırasıyla 5' →3' ve 3'→5' bağlanmaktadır (Asif & ark., 2021). Geleneksel bir PCR için primer tasarlarken şu parametrelere dikkat edilmesi gerekmektedir:

-Bağlanma ve şablona özgüllük primerin uzunluğuna bağlıdır ve ne çok uzun ne de çok kısa olmalıdır. Normal PZR için optimum primer uzunluğu yaklaşık 14-25 bp ve multipleks PZR için 28-34 bp olmalıdır.

-Primerlerdeki optimum Guanin-Sitozin bileşimi % 40-60 olmalıdır.

-Ardışık di-nükleotitler (GCGCGCGC ve TATATATA gibi) ve tek bazlı kısımlardan (GGGGGG ve TTTTTT gibi) kaçınılmalıdır. Çünkü yanlış eşleşme ve spesifik olmayan bağlanma görülebilmektedir.

-Primer dizisinin 3' ucunda 4 bazdan oluşan bir GC-kelepçesi bulunmalıdır. Primer-şablon bağlanmasını artırdığı ve yanlış eşleşmeyi önlediği düşünülmektedir.

-Optimum erime sıcaklığı 52-60 °C olmalıdır. Dizilenen çeşitli hedef diziler için bu sıcaklık farklı olabilir. Geri ve ileri primerler arasındaki sıcaklık farkı 5°C'den fazla olmamalıdır.

-Tamamlayıcı dizilerin oluşumu önemlidir. Primerlerin 3' uçları birbirini tamamlamazsa primer-dimer oluşumu ve saç tokası halka yapıları oluşarak reaksiyonun özgüllüğünü düşürmektedir.

Primer tasarımı için en çok kullanılan araçlar şu şekildedir:

- http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/

- http://perlprimer.sourceforge.net/index.htmL

-https://www.eurofinsgenomics.eu/en/ecom/tools/pcr-primer-design/

- https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/

Likenlerde DNA çoğaltılırken fungal spesifik oligonükleotitlerin PZR primeri olarak kullanımı oldukça yaygındır. Böylece likenlerde mekanik bir diseksiyon ile mantar ve alg ortağın kaldırılmasına gerek kalmamakta ve toplam likenden DNA izolasyonu mümkün olmaktadır. Uygun PZR şartları altında primer çiftinde genelde sadece bir mantara özgü primer olması yeterlidir (Grube & ark., 1998). Likenlerde yaygın kullanılan primerler 2.4.1. başlığında daha detaylı şekilde ele alınmaktadır.

Polimeraz zincir reaksiyonunda istenen üründen büyük oranlarda üretmek oldukça hassas bir süreçtir. Optimum şartlar altında çoğaltma yapılamaması, istenen ürünün dışlanmasıyla dahi birden fazla tanımlanmamış ve istenmeyen ürünün üretilmesine yol açabilmektedir. Öte yandan hiç ürün elde edilememe olasılığı da vardır. Bu nedenle primer-şablon uyumluluğu, primer uzamasına

etki eden faktörlerin doğru ayarlanması oldukça önemlidir. Optimizasyon değişkenleri içerisinde Mg^{++} konsantrasyonları, tampon pH'ı ve döngü koşulları en üst öneme sahiptir. Döngü koşullarında bağlanma sıcaklığı oldukça önemlidir. Ayrıca değişkenlerin bazılarının birbirine bağlı olması gerçeğiyle daha karmaşık hale gelmektedir. Bu bağlamda çeşitli optimizasyon stratejileri kullanılmalıdır (Roux, 2009):

PZR optimizasyonunda primer optimum erime sıcaklığı (T_m) oldukça önemlidir. T_m, DNA çift zincirinin ayrışarak tek sarmallı hale geleceği sıcaklıktır ve DNA çiftinin stabilitesini gösterir. Genellikle T_m'si 52-58 °C aralığında olan primerler en iyi sonuçları vermektedir. Etkin sonuç için T_m ile yakından eşleşen optimum primer çiftleri tasarlanmalı ve uygun T_m hesaplanmalı ya da tahmin edilmelidir (Roux, 2009). T_m hesaplaması yapmak için kullanılan bazı araçlar şu şekildedir:

- http://insilico.ehu.es/tm.php?primer

- https://tmcalculator.neb.com/#!/main

-https://worldwide.promega.com/resources/tools/bio-math/tm-calculator/

- https://galaxy.pasteur.fr/forms::melting

- http://mcb.berkeley.edu/labs/krantz/tools/oligocalc.htmL

- http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.htmL

PZR optimizasyonunda Mg^{++} iyon konsantrasyonu, tüm konsantrasyon değişimleri için ayrı tüplerde aynı anda kullanılabileceği için manipüle edilmesi en kolay bileşendir. Tedarikçiler konsantrasyonu ayarlamayı kolaylaştırmak için standart

reaksiyon tamponu yanında ayrı bir $MgCl_2$ çözeltisi sağlamaktadır. Tipik bir optimizasyonda 0,5 ile 5 mM arasında 0.5 mM'lik artışlarla konsantrasyon değişimi yapılabilir ve bu konsantrasyonlar elde edilen sonuçlara göre azaltılıp artırılabilir (Roux, 2009).

PZR optimizasyonunda döngü sayısının artırılması da sonucun etkinliği için izlenen stratejilerden birisidir. Ancak bu durum sahte bantlara ve tek zincirli DNA açısından zengin yüksek moleküler ağırlıklı ürünlerden oluşan kontaminasyona da yol açabilmektedir (Bell & DeMarini, 1991).

PZR'da verimi ve özgüllüğü artırmak için çeşitli katkı maddeleri kullanılabilmektedir. Bunlar arasında sığır serum albümini (BSA), formamid (% 1,25-10), iyonik olmayan deterjanlar, gliserol (% 5-20), polietilen glikol (PEG) 6000 (% 5-15), betain (1-2 M) bulunmaktadır. Bunları içeren çeşitli optimizasyon kitleri ticari olarak da satılmaktadır (Roux, 2009).

Likenlerde PZR analizlerinde zayıf ya da eksik PZR ürünü sıklıkla karşılaşılan problemlerden birisidir. Sorun zayıf ya da eksik PZR ürünü olduğunda sorunu gidermek için yapılacaklar şu şekilde sıralanabilmektedir (Myllys & ark., 2002):

1- Likenlerde DNA izolasyonu yapılan materyal, eski bir herbaryum örneği olabilmektedir. DNA'nın izolasyon edildiği örneğin kaç yıldır herbaryumda olduğu, PZR sonucunu doğrudan etkileyebilmektedir. Genellikle daha genç örneklerde sonucun daha yüksek verimli olduğu görülmektedir. Eski herbaryum örneklerinden başarıyla DNA izole edilen örnekler olsa da örneklerin tazeliğinin PZR performansını doğrudan etkilediği bilinmektedir.

2- Daha önce iyi çalışan ve performans gösteren primerler bilinmeyen nedenlerle çalışmayı bırakabilmektedir. Tekrarlayan dondurma-çözdürme döngüleri nedeniyle kararlı ikincil yapılar oluşabilmektedir. Bazı primerlerin 5 dk. boyunca 95-100 °C'ye ısıtılıp ardından sıvı nitrojen veya kuru buz/etanol banyosunda hızla soğutulduğunda eski haline gelebileceğine dair kanıtlar bulunmaktadır (Hengen, 1995).

3- Primerlerin hedef dizi ile eşleşmediği durumlar görülebilmektedir. Bu durumda farklı bir primer seti kullanılması ya da bağlanma sıcaklığı azaltılarak yeniden denenmelidir.

4- Reaksiyondaki şablon yada kalıp DNA konsantrasyonu çok yüksek ya da çok düşük olabilir. Hem şablon konsantrasyonunu azaltmak hem de artırmak denenmelidir. Eğer şablon konsantrasyonu çok düşükte PZR döngü sayısı artırılmalıdır ya da daha hassas bir polimeraz kullanılmalıdır.

5- Bağlanma sıcaklığı daha önce belirlenen optimum sıcaklıkla uyuşmayabilir. Bu durumda yeniden optimum sıcaklık hesaplanmalı ve ayarlanmalıdır.

6- Magnezyum iyon konsantrasyonu düşük olabilir. Konsantrasyon yeniden ayarlanmalıdır.

7- Uzama basamağı kısa kalabilmektedir. Bu da polimerazyonun beklenenden yavaş olmasına yol açmaktadır.

8- Reaksiyon inhibitörler tarafından bozulabilmektedir. Şablon miktarı, PZR döngü sayısı ile birlikte azaltımalıdır. İzolasyon prosedürü değiştirilmelidir ve nested PZR denenebilir.

9- Şablon çok uzun olabilmekte ya da doğası gereği zor olabilmektedir. Uzun mesafeli bir polimeraz ya da zor şablon polimerazı denenmelidir.

Likenlerde PZR sorunları birden fazla PZR ürünü nedeniyle de olabilmektedir. Bu doğrultuda;

1- Bağlanma sıcaklığı artırılmalı, magnezyum iyon konsantrasyonu azaltılmalı, PZR döngü sayısı azatılmalı ya da sıcak başlatma teknikleri, oldukça spesifik polimerazlar ve nested PZR gibi diğer yöntemler denenmelidir. Çeşitli takviyelerle reaksiyon özgüllüğünün iyileştirilmesi de seçenekler arasındadır.

2- Sorun başka bir mantarın küçük oranlardaki kontaminasyonundan kaynaklanıyorsa, uzama süresi artırılmalı ya da mikroslayt PZR gibi teknikler kullanılmalıdır.

3- Sorun devam ederse istenmeyen ürünler oluşmayana kadar optimizasyon yapılmalı ya da agaroz jele yükleme yaparak jelden saflaştırma yöntemi tercih edilmelidir.

2.4.1. Likenlerde, PZR Analizlerinde Kullanılan Primerler

Likenlerde PZR analizlerinde ve genel olarak DNA barkodlamada nükleer ribozomal genlerin kullanımı oldukça yaygındır. Cinsler, aileler veya takımlar içindeki ilişkiler üzerine yapılan çalışmalar için *SSU* ve *LSU'yu* çoğaltan primerler önerilmektedir çünkü ribozomal genin bu kısımları yavaş bir şekilde evrimleşmektedir ve varyasyon oldukça düşüktür. Öte yandan cins ve türler arasındaki ilişkiler üzerine yapılan çalışmalarda *ITS* (Internal Transcribed Spacer-İç Transkribe Edici Boşluklar) gen bölgesinin kullanılması önerilmektedir. Tür içi varyasyonlar için

IGS gen bölgeleri kullanılmaktadır. Ayrıca protein kodlayan genler, likenlerden gelen birkaç anonim lokus, mitokondriyal *SSU* rDNA'yı çoğaltan primerler gibi birçok primer de kullanılabilmektedir.

Likenlerde kullanılan primerlerden bazılarının genel bir özeti aşağıda Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1. Likenlerde filogenetik çalışmalarda kullanılan hedef gen bölgesi ve primerlerden bazıları

Gen Bölgesi	**Primerler**	**Primer dizisi**	**Kaynak**
nrITS	ITS1-F (İleri)	5’-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTA-3’	White & ark., 1990; Gardes & Bruns, 1993
	ITS4 (Geri)	5’-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3’	
mtSSU	mrSSUI	5'-AGCAGTGAGGAATATTGGTC-3'	Zoller & ark. 1999a
	mrSSU2	5'-CTGACGTTGAAGGACGAAGG-3'	
mtLSU	ML1	5'-GTACTTTTGCATAGGGTCAGC-3'	White & ark. 1990; Zoller & ark., 1999b
	ML2	5'-TATGTTTCGTAGAAAACCAGG-3'	
β-tübülin	bt3LM	5’-GAACGTCTACTTCAACGAG-3’	Myllys & ark., 2001
	bt10LM	5’-TCGGAAGGACATCATGTTCTT-3’	
GAPDH	Gpdl-LM	5’-ATTGGCCGCCGTCTTCCGCAA-3’	Myllys & ark., 2002
	Gpd2-LM	5’-CGGAAGGACATCATGTTCTT-3’	
nrIGS	IGSf	5’-TAGTGGCCGWTRTATCATT-3’	Wirtz & ark., 2008
	IGSr	5’-TGCATGGCTTAATCTTTGAG-3’	
nrLSU	LRlecF	5’-CCTCAGTAACGGCCAG-3’	Seymour & ark., 2007
	LRlecR	5’-AGGCTTCGTCACGAC-3’	
RPB1	gRPB1-Af	5'-GADTGYCCYGGYCATTTYGG-3’	Seymour & ark., 2007
	fRPB1-cR	5'-CNGCDATNTCRTRTCCATRTA-3’	
RPB2	fRPB2-7cF	5'-ATGGGYAARCAAGCYATGGG-3'	Liu & ark., 1999
	fRPB2-7cR	5'-CCCATRGCTTGYTTRCCCAT-3'	
MCM7	MCM7	5'-GGTGCAAGTCAYGCCTAYAC-3’	Raja & ark., 2001
	MCM7	5'-GGTGCAAGTCAYGCCTAYAC-3’	

Tablo 1'de verilen gen bölgeleri likenlerde DNA barkodlama çalışmalarında en fazla kullanılan gen bölgeleridir. Bunlardan *ITS* gen bölgesi, ikinci büyük alem olan Fungi (Mantarlar) alemi için evrensel bir gen bölgesidir. Gen bankta şu anda 172000 full-uzunlukta fungal *ITS* sekans verisi bulunmaktadır. Bunların çok küçük bir kısmı *ITS* ile *LSU* genlerinin kombine verileridir. Geriye kalan veriler *ITS* verileri olup, bu durum *ITS* geninin fungal filogeni ve sistematiğindeki önemini göstermektedir.

Ökaryotlarda, ribozomal RNA'ları kodlayan genler, 18S, 5.5S ve 23-28S rRNA'ları, iki *ITS1* ve *ITS2*'yi ve iki ETS sekansını tekrarlayan transkripsiyonel birimleri içeren diziler halinde düzenlenirler. Bu birimler RNA polimeraz I tarafından kopyalanır ve transkribe edilmemiş intergenik aralayıcılar (*IGS*) ile ayrılırlar (Halıcı & ark., 2022). Birçok organizma için *ITS* bölgeleri çoğu kez tamamen spesifik olarak korunur, ancak bunlar arasında bazı bölgeler spesifik olarak korunmazlar. Dolayısıyla *ITS* bölgelerindeki varyasyon, genellikle mantar türlerinin filogenetik analizi için kullanılmaktadır. *ITS* gen bölgelerinin filogenetik analizlerde çok tercih edilmelerinin bazı sebepleri bulunmaktadır. Bunlar şu şekilde sıralanabilmektedir:

- Oldukça korunaklı bitişik dizilerin mevcudiyeti ile ilişkili küçük boyutu sayesinde hızlı bir şekilde çoğaltılabilmektedir.

- rRNA kümelerinin yüksek kopya sayısından dolayı, küçük miktardaki DNA'dan bile kolayca tespiti sağlanabilmektedir.

- Eşit olmayan geçiş ve gen dönüşümü yoluyla hızlı bir evrim geçirmektedir. Bu durum tekrar eden iç genomik birimlerin homojenliğini korumasına neden olmakta ve yüksek verimli

sekanslama ile türler arasında varyasyonların oluşması gerçekleşmektedir.

- Yakından ilişkili türler arasında bile yüksek derecede varyasyon göstermektedir. Böylece türlerin ayrımı kolaylıkla yapılabilmektedir.

ITS bölgeleri rRNA prosesinde önemli biyolojik amaca sahiptir. Ayrılma bölgelerinin doğru tanımlanmasında spesifik ikincil yapılar oluştururlar ve ribozom olgunlaşması esnasında nükleolar protein ve RNA'lar için bağlanma bölgeleri sağlarlar. Ayrıca *ITS* gen bölgesi fungilerde sadece filogenetik ve taksonomide değil, tıp ve ekolojideki türlerin tanımı için teşhis stratejilerinde de işlevsel gen bölgesi olarak kullanılmaktadır. Medikal mikolojideki epidemiyolojik iz sürme ve türlerin tanımlanmasında da önemli bir rol oynamaktadır.

2.5. DNA Dizi Analizi, Sekansların Hizalanması ve Filogenetik Ağaçların Oluşturulması

Hoffman ve Lendemer (2018)'de likenolojide Sanger DNA dizi analizi ve yeni nesil sekanslama yöntemlerini (NGS-Next Generation Sequencing) kullanan çalışmaların bir meta-analizini gerçekleştirmişlerdir. Çalışmada 2000-2016 arasındaki likenoloji literatürünü taramışlardır. Yaptıkları çalışma sonucunda NGS ortaya çıkmadan önce Sanger dizileme yönteminin en fazla kullanılan yöntem olduğunu belirlemişlerdir. 2000-2016 yılları arasında, NGS'yi kullanan 65 liken çalışması olduğunu ancak 2009'dan önce NGS çalışmasını kullanan hiç çalışma olmadığını belirlemişlerdir.

Günümüzde likenoloji çalışmalarında halen hem geleneksel Sanger dizileme yöntemi hem de NGS tekniklerine dayalı

uygulamalar mevcuttur. Likenolojide *ITS* gen bölgesinin çok yaygın kullanımı ve tür açısından zengin liken ailelere odaklanma gibi eğilimler vardır. Bu eğilimler nedeniyle evrimsel çeşitlilikte önemli yer tutan Lecanorales gibi ailelerdeki çeşitliliğin belirlenmesi konusundaki çalışmalar günümüzde halen yetersizdir. NGS uygulamalarının artması ile birlikte likenolojide önemli bir adım atılcağı ve veri artışında ciddi bir atılım olacağı düşünülmektedir (Hoffman & Lendemer, 2018).

Likenolojide DNA dizi analizi sonucunda elde edilen sekansların hizalanması ise manuel yapılabildiği gibi çeşitli programlar kullanılarak da yapılabilmektedir. Filogenetik ağaçların oluşturulması için de çeşitli programlar ve yazılım paketleri mevcuttur. Bunların en bilinen ve yaygın kullanılanları Tablo 2'de özetlenmektedir.

Tablo 2. Likenlerde DNA Dizi Analizi, Sekansların Hizalanması ve Filogenetik Ağaçların Oluşturulması için yaygın olarak kullanılan bazı programlar ve yazılım paketleri

Program/Yazılım Paketi	Açıklama	Kaynak
AWTY	Bayes filogenetik çıkarımında Markov Zinciri Monte Carlo (MCMC) zincirlerinin yakınsamasını grafiksel olarak keşfetmek için bir sistemdir.	http://king2.scs.fsu.edu/CEBProjects/awty/awty_start.php
BayArea	Moleküler filogeni ve varlık-yokluk verilerini kullanarak ata türlerinin aralıklarını çıkarsamak için bir Bayes yöntemi. Analiz başına yüzlerce ila binlerce alanın dahil edilmesine olanak tanır.	https://sites.google.com/site/mlandis/main/bayareav10release
BayesTrait	Ayrık morfolojik özelliklerde evrimsel korelasyonu ve atasal durum yeniden yapılandırması	http://www.evolution.rdg.ac.uk/BayesTraits.html

	nı değerlendirmeyle ilgili çeşitli analizler gerçekleştirir. ML ve Bayes çıkarımını kullanır.	
BEAST	MCMC kullanarak moleküler dizileri analiz etmek için bir Bayes çıkarım programı. Çeşitli moleküler saat modelleri kullanılarak çıkarılan köklü, zaman ölçümlü filogenilere yöneliktir. Nükleotid, amino asit dizileri ve morfolojik veriler analiz edilebilir	http://beast.bio.ed.ac.uk
Bioedit	Dizi hizalama için kullanılan bir yazılımdır. Birkaç dizi işleme ve analiz seçeneği ve harici analiz programlarına bağlantıları ile basit bir şekilde dizileri düzenleme ve işlemeye	https://thalljiscience.github.io/

	olanak tanımaktadır.	
BioHPC	Çeşitli hesaplamalı biyoloji araçları için bir web arayüzüdür.	http://cbsuapps.tc.cornell.edu/
Biology WorkBench	Çok çeşitli analiz ve modelleme araçlarına erişim sağlayan bir web sunucusudur.	http://workbench.sdsc.edu
CIPRES Portal	Filogenetik analizler için bir web sunucusudur.	http://www.phylo.org/sub_ sections/portal
ExaBayes	MCMC kullanarak tüm genom analizi için bir Bayes ağacı çıkarım programı. Bilgisayar kümelerinde büyük ölçekli analizler için daha uygundur. Şu anda yalnızca Linux ve MacOS'u destekler.	http://sco.h-its.org/exelixis/web/ software/exabayes/index.html
FigTree	Destek değerlerinin ve dal uzunluklarının çizilmesi, düğüm zamanlarında güven aralıkları, özet	http://tree.bio.ed.ac.uk/software/ figtree

	grafiklerin oluşturulması gibi işlemler yapan bir yazılımdır.	
GARLI	Hızlı maksimum olasılık çıkarımı için genetik algoritmalar kullanan bir program. Dizi evriminin nükleotid, amino asit ve kodon tabanlı modellerini uygular ve tüm platformlarda çalışır. En son sürümüne, bölümlenmiş modeller ve morfoloji benzeri veri türleri için destek eklenmiştir.	http://code.google.com/p/garli/
Hamstr	Tüm genom verilerinde (EST veya protein dizisi verileri) yönlendirilmiş bir ortolog araması için profil gizli Markov model tabanlı bir araçtır. Program, giriş	http://www.deep-phylogeny.org/ hamstr

	olarak önceden tanımlanmış bir ortolog diziler çekirdek grubu (çekirdek ortologlar) ve bir arama taksonundan bir dizi dizi alır. HaMStR daha sonra iki adımlı bir stratejide pHMM tabanlı bir aramayı ve BLAST üzerinden ters aramayı birleştirerek çekirdek ortolog grubunu arama taksonundan yeni dizilerle genişletir.	
jModelTest	Nükleotid ikamesinin en uygun modellerinin istatistiksel seçimini gerçekleştirme k için bir araçtır.	http://code.google.com/p/ jmodeltest2
Lagrange	Filogenetik ağaçlarda coğrafi aralık evrimini (atasal alanlar, dağılma/aralık genişlemesi oranları ve	http://www.reelab.net/lagrange/ configurator/index

	yerel yok oluş/aralık daralması) yeniden yapılandırır.	
Lifeportal	Filogenetik analizler için bir web sunucusudur.	https://lifeportal.uio.no/root
MAFFT	Çoklu dizi hizalama programıdır ve birçok hizalama yöntemi seçeneği sunar.	https://mafft.cbrc.jp/alignment/software/
MEGA	Dizi hizalaması yapmak, filogenetik ağaç oluşturmak, ayrışma sürelerini tahmin etmek, çevrimiçi veritabanlarını incelemek, moleküler evrim oranlarını tahmin etmek, ata dizilerini çıkarmak ve evrimsel hipotezleri test etmek için entegre bir araçtır. Filogenetik ağaç oluşturmak için mesafe,	http://www.megasoftware.net/

	maksimum tutumluluk ve maksimum olasılık yaklaşımlarını içerir	
Mesquite	Ataların durumlarının yeniden yapılandırılmas ı (MP, ML); korelasyon dahil olmak üzere karakter evrimi sürecinin testlerini yapar. Bir program paketidir ve ayrıca kromatogramla rın işlenmesi, dizi hizalaması, morfometrik verilerin düzenlenmesi ve diğerleri dahil olmak üzere verileri yönetmek ve işlemek için birçok özelliğe sahiptir.	http://mesquiteproject.wikispaces. com/installation
Minimap2	Uzun okumalar ve örtüşmeler olan dizileri basit ve hızlı şekilde hizalama ve işlemeye yarayan bir progrmdır.	https://lh3.github.io/minimap2/minimap 2.html

MrBayes	MCMC kullanarak moleküler dizileri analiz etmek için bir Bayes çıkarım programı. Olasılık analizi için nükleotid, amino asit ve kodonun ikame modellerini içerir.	http://mrbayes.sourceforge.net
PAUP	Filogeni yeniden yapılandırması nın mesafe, maksimum parsimoni ve maksimum olasılık yöntemlerini uygular.	http://paup.csit.fsu.edu
PhyML	Maksimum olasılık tabanlı filogenetik çıkarım için model tabanlı hızlı bir program. Hem nükleotid hem de amino asit dizileri için kullanılabilir. Yeni sürüm PhyML 3.1, aBayes dalları destek algoritmasını uygular.	http://www.atgc-montpellier.fr/ phyml/versions.php
RASP	S-DIVA (İstatistiksel	http://mnh.scu.edu.cn/soft/blog/ RASP/

	dağılım-vicarians analizi), Lagrange (DEC), Bayes-Lagrange (S-DEC), BayArea ve BBM (Bayes İkili MCMC) yöntemini kullanarak ataların durumunu (ataların alan yeniden yapılandırması) çıkarsamak için bir araçtır.	
RAxML	Maksimum olasılık tabanlı filogenetik çıkarım için model tabanlı hızlı ve güçlü bir programdır. Hem nükleotid hem de amino asit dizileri için kullanılabilir	http://sco.h-its.org/exelixis/web/software/raxml/index.html
SIMMAP	Özellik evriminin Bayes analizleri, stokastik karakter haritalaması, moleküler veya moleküler olmayan karakterler arasındaki	http://www.simmap.com/

	kovaryasyon, pozitif seçilim testleri, model ve ağaç belirsizliğini hesaba katarak çalışır.	
Tracer	Bayes MCMC çalıştırmaları tarafından oluşturulan iz dosyalarını analiz etmek için bir programdır.	http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer

Kaynak: Divakar & Crespo (2015).

Likenlerde filogenetik ağaçlar Tablo 2'de verilen programlar kullanılarak oluşturulmaktadır. Birden fazla tür ve özellik kullandığında, eşit derecede iyi desteklenen birkaç filogenetik ağaç üretilebilir, bu ağaçlardan hangisinin filogeniyi daha gerçekçi yansıtacağını seçmek içinse kullanılan birkaç yöntem bulunmaktadır. Bu yöntemler arasında parsimoni, maksimum olasılık (ML), Bayesian, Neighbor Joining (NJ) gibi çok çeşitli yöntemler bulunmaktadır. Likenolojide günümüzde filogenetik ağaçların oluşturulmasında en fazla Maksimum Olasılık (ML) ve Bayesian modelleri kullanılmaktadır.

3. SONUÇ

Likenleşmiş mantarlar, doğadaki ekolojik ve biyolojik dengede önemli bir rol oynar. Farklı çevresel koşullara dayanıklılıkları ve geniş dağılımları nedeniyle biyolojik çeşitliliğin önemli bileşenleri arasında yer alırlar. Bununla birlikte, likenlerin doğru şekilde tanımlanması, genellikle karmaşık morfolojik yapıları

ve çevresel faktörlerin etkileri nedeniyle zorlu bir süreçtir. Geleneksel yöntemler her ne kadar faydalı olsa da, morfolojik ve anatomik karakterlerin bazı durumlarda yeterli olmaması, likenlerin doğru teşhisini engelleyebilir. Bu bağlamda DNA barkodlama, liken araştırmalarında bir devrim niteliği taşımakta ve bu organizmaların daha etkin bir şekilde incelenmesine olanak sağlamaktadır.

DNA barkodlama, genetik çeşitliliğin anlaşılması ve taksonomik tanımlama süreçlerinin modernize edilmesi açısından kritik bir araçtır. Moleküler düzeyde gerçekleştirilen bu yöntem, likenlerin tanımlanmasında geleneksel yöntemlerin sınırlamalarını aşarak, özellikle genç ya da bozulmuş örneklerde doğru teşhis yapılmasını kolaylaştırmaktadır. *ITS* gen bölgesi gibi yaygın kullanılan DNA bölgeleri sayesinde likenlerin filogenetik ilişkileri daha net bir şekilde ortaya konulmuş ve bu sayede türler arası ayrımlar daha hassas bir şekilde belirlenmiştir. Bunun yanı sıra, herbaryum materyallerinden DNA izolasyonu gibi uygulamaların geliştirilmesi, geçmişe ait genetik verilerin bugünün araştırmalarına entegre edilmesine olanak tanımıştır.

DNA barkodlama, yalnızca taksonomik bir araç olmanın ötesine geçerek, likenlerin ekolojik ve biyolojik rollerini anlamada yeni ufuklar açmaktadır. Likenler, çevresel değişikliklere karşı duyarlı organizmalar olarak bilinir ve bu özellikleri sayesinde hava kirliliği gibi çevresel sorunların izlenmesinde biyoindikatör olarak kullanılmaktadır. DNA barkodlama teknikleri, likenlerin çevresel streslere karşı geliştirdiği adaptasyon mekanizmalarını incelemek için de güçlü bir temel oluşturur. Örneğin, farklı habitatlarda bulunan liken türlerinin genetik yapılarının karşılaştırılması, bu

organizmaların iklim değişikliği gibi küresel sorunlara nasıl tepki verdiğini anlamamıza yardımcı olabilir.

Likenlerde DNA barkodlama çalışmaları, modern genetik teknolojilerin gelişmesiyle birlikte daha kapsamlı hale gelmektedir. Yeni nesil dizileme (NGS) gibi ileri yöntemler, daha fazla gen bölgesinin analiz edilmesine olanak tanıyarak likenlerin genetik yapısını çok daha ayrıntılı bir şekilde incelememizi sağlar. Bu durum, sadece yeni türlerin keşfi ve mevcut türlerin daha iyi tanımlanması açısından değil, aynı zamanda likenlerin simbiyotik ilişkilerinin moleküler düzeyde anlaşılması açısından da büyük önem taşımaktadır. Simbiyotik bir organizma olan likenlerin genetik çeşitliliğini anlamak, mantar ve alg ortakları arasındaki ilişkiyi daha iyi çözümlemek için de bir fırsat sunmaktadır.

Bununla birlikte, DNA barkodlama yöntemlerinin daha yaygın bir şekilde uygulanması, bazı zorlukların da üstesinden gelmeyi gerektirmektedir. Özellikle eski herbaryum örneklerinden DNA izolasyonu sırasında karşılaşılan zorluklar, DNA'nın zamanla bozulması gibi sorunları içerir. Bu nedenle, DNA izolasyonu ve çoğaltma süreçlerinde daha spesifik protokollerin geliştirilmesi gerekmektedir. Aynı zamanda, barkodlama çalışmalarında kullanılan primerlerin tasarımında ve PZR analizlerinde optimizasyon gerekliliği, bu yöntemin etkinliğini artırmak için sürekli olarak çalışılması gereken bir alan olarak karşımıza çıkmaktadır.

Sonuç olarak, DNA barkodlama, likenlerin doğru ve hızlı bir şekilde tanımlanması, genetik çeşitliliğinin belirlenmesi ve ekosistemlerdeki rolleri hakkında daha derinlemesine bilgi

edinilmesi için eşsiz bir araç sunmaktadır. Bu yöntem, likenolojide yeni bir çağ açarken, aynı zamanda bu organizmaların çevresel ve biyolojik sistemlerdeki önemini daha iyi kavramamıza yardımcı olmaktadır. Gelecekteki araştırmalar, DNA barkodlama teknolojilerinin daha fazla geliştirilmesi ve geniş çapta uygulanmasıyla, liken biyolojisi ve ekolojisi alanında daha büyük keşifler ve yenilikler yapılmasını sağlayacaktır. Bu bağlamda, likenlerin hem biyolojik çeşitliliğin korunmasında hem de çevresel değişikliklerin izlenmesinde merkezi bir role sahip olduğu bir kez daha anlaşılmıştır.

KAYNAKLAR

Armaleo, D. & Clerc, P. (1991). Lichen chimeras: DNA analysis suggests that one fungus forms two morphotypes. *Experimental mycology*, *15*(1), 1-10.

Armaleo, D. & Clerc, P. (1995). A rapid and inexpensive method for the purification of DNA from lichens and their symbionts. *The Lichenologist*, *27*(3), 207-213.

Asif, S., Khan, M., Arshad, M. W. & Shabbir, M. I. (2021). PCR Optimization for Beginners: A Step by Step Guide. *Research in Molecular Medicine*, *9*(2), 81-102.

Bartlett, J. M., & Stirling, D. (2003). A short history of the polymerase chain reaction. *Methods in Molecular Biology, 226*, 3-6.

Bell, D. A. & DeMarini, D. M. (1991). Excessive cycling converts PCR products to random-length higher molecular weight fragments. *Nucleic acids research*, *19*(18), 5079.

Bendiksby, M., Mazzoni, S., Jørgensen, M. H., Halvorsen, R. & Holien, H. (2014). Combining genetic analyses of archived specimens with distribution modelling to explain the anomalous distribution of the rare lichen Staurolemma omphalarioides: long-distance dispersal or vicariance?. *Journal of Biogeography*, *41*(11), 2020-2031.

Bölükbaşı, E. & Halıcı, M. G. (2024). Molecular signatures of environmental adaptation mechanisms of *Rhizocarpon geographicum* in Horseshoe Island (west of the Antarctic Peninsula) and Türkiye. *Polar Science*, 101134.

Chase, M. W., Fay, M. F. (2009). Barcoding of plants and fungi. *Science, 325*(5941), 682-683.

Crespo, A., Bridge, P. D., & Hawksworth, D. L. (1997). Amplification of fungal *rDNA-ITS* regions from non-fertile specimens of the lichen-forming genus Parmelia. *The Lichenologist*, *29*(3), 275-282.

Crespo, A., Cubero, O. F., & Grube, M. (1998). PCR applications in studies of lichen-forming fungi. *Applications of PCR in Mycology*, 85-106.

Divakar, P. K., & Crespo, A. (2015). Molecular phylogenetic and phylogenomic approaches in studies of lichen systematics and evolution. *Recent Advances in Lichenology: Modern Methods and Approaches in Lichen Systematics and Culture Techniques, 2*, 45-60.

Gardes, M., & Bruns, T. D. (1993). *ITS* primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular ecology*, *2*(2), 113-118.

Grube, M., DePriest, P. T., Gargas, A., & Hafellner, J. (1995). DNA isolation from lichen ascomata. *Mycological research*, *99*(11), 1321-1324.

Halıcı, M. G., Güllü, M., Bölükbaşı, E. & Kahraman-Yiğit, M. (2023b). *Thamnolecania yunusii* (Ramalinaceae)-A new species of lichenised fungus from Horseshoe Island (Antarctic Peninsula). *Polar Record, 59*, 1-7.

Halıcı, M. G., Kahraman-Yiğit, M., Bölükbaşı, E. & Güllü, M. (2023a). New record and new species of lichenized fungal genus

Candelariella Müll. Arg. in Antarctica. *Polish Polar Research, 44*, 1-15. 10.24425/ppr.2023.144537

Halıcı, M. G., Timdal. E., Möller. E., Bölükbaşı. E. & Kahraman-Yiğit, M. (2022). Rhizocarpon ozsoyae sp. nova (Rhizocarpaceae, lichenized Ascomycetes) from James Ross Island (Antarctic Peninsula). *Herzogia, 35*, 105-114. doi: 10.13158/heia.35.1.2022.105

Hawksworth, D. L. (2001). The magnitude of fungal diversity: the 1· 5 million species estimate revisited. *Mycological research*, *105*(12), 1422-1432.

Hebert, P. D., Cywinska, A., Ball, S. L., & DeWaard, J. R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, *270*(1512), 313-321.

Hengen, P. N. (1995). Methods and reagents: wayward PCR primers. *Trends in Biochemical Sciences*, *20*(1), 42-44.

Hoffman, J. R., & Lendemer, J. C. (2018). A meta-analysis of trends in the application of Sanger and next-generation sequencing data in lichenology. *The Bryologist*, *121*(2), 133-147.

Kelly, L. J., Hollingsworth, P. M., Coppins, B. J., Ellis, C. J., Harrold, P., Tosh, J., & Yahr, R. (2011). DNA barcoding of lichenized fungi demonstrates high identification success in a floristic context. *New Phytologist*, *191*(1), 288-300.

Kistenich, S., Halvorsen, R., Schrøder-Nielsen, A., Thorbek, L., Timdal, E., & Bendiksby, M. (2019). DNA sequencing historical lichen specimens. *Frontiers in Ecology and Evolution*, *7*, 5.

Lahaye, R., Van der Bank, M., Bogarin, D., Warner, J., Pupulin, F., Gigot, G., Savolainen, V. (2008). DNA barcoding the floras of biodiversity hotspots. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 105*(8), 2923-2928.

Landvik, S., Shailer, N. F., & Eriksson, O. E. (1996). SSU rDNA sequence support for a close relationship between the Elaphomycetales and the Eurotiales and Onygenales. *Mycoscience*, *37*(3), 237-241.

Lee, S. B., & Taylor, J. W. (1990). Isolation of DNA from fungal mycelia and single spores. In 'PCR protocols: a guide to methods and applications'.(Eds MA Innis, DH Gelfand, JJ Sninsky, TJ White) pp. 282-287.

Lee, S. B., Milgroom, M. G., & Taylor, J. W. (1988). A rapid, high yield mini-prep method for isolation of total genomic DNA from fungi. *Fungal Genet. Newsl*, *35*, 23-24.

Li, X., Yang, Y., Henry, R. J., Rossetto, M., Wang, Y., & Chen, S. (2015). Plant DNA barcoding: from gene to genome. *Biological Reviews, 90*(1), 157-166.

Liu, Y. J., Whelen, S., & Hall, B. D. (1999). Phylogenetic relationships among ascomycetes: evidence from an RNA polymerse II subunit. *Molecular biology and evolution*, *16*(12), 1799-1808.

Lücking, R., Archer, A. W., & Aptroot, A. (2009). A world-wide key to the genus Graphis (Ostropales: Graphidaceae). *The Lichenologist*, *41*(4), 363-452.

Martin, M. P., & Winka, K. (2000). Alternative methods of extracting and amplifying DNA from lichens. *The Lichenologist*, *32*(2), 189-196.

Mullis, K., & Faloona, F. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology*, *155*, 335-350.

Myllys, L., Lohtander, K., & Tehler, A. (2001). β-tubulin, *ITS* and group I intron sequences challenge the species pair concept in Physcia aipolia and P. caesia. *Mycologia*, *93*(2), 335-343.

Myllys, L., Stenroos, S., & Thell, A. (2002). New genes for phylogenetic studies of lichenized fungi: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and beta-tubulin genes. *The Lichenologist*, *34*(3), 237-246.

Park, S. Y., Jang, S. H., Oh, S. O., Kim, J. A., & Hur, J. S. (2014). An easy, rapid, and cost-effective method for DNA extraction from various lichen taxa and specimens suitable for analysis of fungal and algal strains. *Mycobiology*, *42*(4), 311-316.

Raja, H., Schoch, C. L., Hustad, V., Shearer, C., & Miller, A. (2011). Testing the phylogenetic utility of MCM7 in the Ascomycota. *MycoKeys*, *1*, 63-94.

Roux, K. H. (2009). Optimization and troubleshooting in PCR. *Cold Spring Harbor Protocols*, *2009*(4), pdb-ip66.

Saiki, R. K., et al. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science, 230*(4732), 1350-1354.

Seymour, F. A., Crittenden, P. D., Wirtz, N., Øvstedal, D. O., Dyer, P. S., & Lumbsch, H. T. (2007). Phylogenetic and morphological analysis of Antarctic lichen-forming Usnea species in the group Neuropogon. *Antarctic science*, *19*(1), 71-82.

Sohrabi, M., Myllys, L., & Stenroos, S. (2010). Successful DNA sequencing of a 75 year-old herbarium specimen of Aspicilia aschabadensis (J. Steiner) Mereschk. *The Lichenologist*, *42*(5), 626-628.

Suriya, J., Krishnan, M., Bharathiraja, S., Sekar, V., & Sachithanandam, V. (2020). Implications and utility of DNA barcoding. *DNA Barcoding and Molecular Phylogeny*, 3-22.

Werth, S., Reynisdóttir, S., Gudmundsson, H., & Andrésson, Ó. S. (2016). A fast and inexpensive high-throughput protocol for isolating high molecular weight genomic DNA from lichens. *Herzogia*, *29*(2), 610-616.

White, T. J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds) PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications, pp. 315-322. Academic Press, New York.

Wirtz, N., Printzen, C., & Lumbsch, H. T. (2008). The delimitation of Antarctic and bipolar species of neuropogonoid Usnea (Ascomycota, Lecanorales): a cohesion approach of species recognition for the *Usnea perpusilla* complex. *Mycological research*, *112*(4), 472-484.

Yiğit, M. & Halıcı, M. G. (2024). Likenleşmiş Mantarlar (Likenler). Koçancı, F. G., Bölükbaşı, E. (Eds). *Biyoloji* içinde (ss. 55-70). Afyonkarahisar: Yaz Yayınları.

Zoller, S., Lutzoni, F., & Scheidegger, C. (1999b). Genetic variation within and among populations of the threatened lichen Lobaria pulmonaria in Switzerland and implications for its conservation. *Molecular Ecology*, *8*(12), 2049-2059.

Zoller, S., Scheidegger, C., & Sperisen, C. (1999a). PCR primers for the amplification of mitochondrial small subunit ribosomal DNA of lichen-forming ascomycetes. *The Lichenologist*, *31*(5), 511-516.

BÖLÜM XI

DNA Barkodlama Yöntemi ile Sivrisineklerde Tür Teşhisi

Nurhayat OĞLAKÇI[1]
Meryem Şenay ŞENGÜL DEMİRAK[2]

Giriş

Sivrisinekler, Diptera takımı (iki kanatlılar), Culicidae ailesine ait Anophelinae ve Culicinae alt ailelerinde toplam 112 cinsten oluşan ve dünya genelinde 3727 tür ile temsil edilen böceklerdir (Harbach & Kitching, 1998; Harbach, 2024). Bu türlerin yaklaşık %10'nun insanlara hastalık bulaştıran 78 farklı patojene vektörlük yaptıkları ifade edilmektedir (Bisaglia & ark., 2024; Yee & ark., 2022). *Aedes*, *Anopheles* ve *Culex* cinsi sivrisinekler taşıdıkları patojenlerle insanlarda sıtma, Zika virüsü, sarı humma, Batı Nil ateşi, dang humması, Japon ensefaliti, Rift Vadisi ateşi gibi

[1] YL öğrencisi, Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik AD, Tokat/Türkiye, Orcid: 0009-0006-7591-5653, nurhayatoglakc@gmail.com
[2] Doç. Dr., Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Tokat/Türkiye, Orcid: 0000-0003-4879-1908, senay.sengul@gop.edu.tr

hastalıklara sebep olurlar. Anophelinae sivrisinekleri (*Anopheles gambiae*) *Plasmodium* cinsi parazitlerin neden olduğu sıtma hastalığının birincil vektörleridir. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ, 2024a) raporuna göre, 2023 yılında, dünya nüfusunun neredeyse yarısının sıtma riski altında olduğu, 83 ülkede yaklaşık 263 milyon sıtma vakası ve 597.000 sıtma ölümünün meydana geldiği rapor edilmiştir. Bu rapora göre, sıtma vaka ve ölümlerinin yaklaşık %95'i Afrika kıtasında görülmüştür. *Aedes* cinsi sivrisinekler (*Aedes aegypti* ve *Aedes albopictus*) sarıhumma, dang humması, Zika virüsü, Batı Nil virüsü, Chikungunya gibi hastalıklara sebep olmaktadırlar. 2000-2019 yılları arasında 129 ülkede görülen dang humması vaka sayısı 500,000'den 5,2 milyona çıktığı ifade edilmiştir (DSÖ, 2023). Dang humması vaka sayısının gün geçtikçe arttığı, Nisan 2024 itibariyle, 7,6 milyon vaka sayısına ulaştığı belirtilmiştir (DSÖ, 2024b). Dünyadaki Zika virüsü epidemiyolojisi hakkındaki raporlar, Zika virüsü vakalarının bugüne kadar toplam 89 ülkede görüldüğünü fakat diğer sivrisinek kaynaklı hastalıklara göre daha düşük seviyede ilerlediğini ifade etmektedir (DSÖ, 2024c).

Halk sağlığına etki etmesi ve dünyada yarattığı ölümcül sonuçlar, sivrisineklerin insana bulaştırdıkları patojenlerin engellenmesi, hastalıkların önlenmesi ve etkili mücadele yöntemlerinin geliştirilmesine yönelik çalışmaların önemini ortaya koymaktadır. Günümüzde tıbbi açıdan öneme sahip sivrisinek türlerinin hala tam bir listesinin olmadığı ve bu nedenle patojen bulaşmasında rol oynayan sivrisinek türlerin hedeflenmesine engel olduğu düşünülmektedir (Yee & ark., 2022). Ayrıca, hastalık bulaştırma kapasitesine sahip türler hala tanımlanmamış olabilir. Dolayısıyla, doğru tür teşhisi, sivrisinek kaynaklı hastalıkların başarılı bir şekilde kontrol altına alınması için son derece önemlidir.

Sivrisinek kaynaklı hastalık salgınlarının erken tespit edilmesi ve istilacı türlerin yayılmasının engellenmesi için sivrisinek yayılımının takip edilmesi çok büyük önem taşımaktadır. Sivrisineklerin vektörlük yaptığı hastalıkların engellenmesi ve

kontrol altına alınması, hedeflenen türlerin hızlı ve doğru bir şekilde tanımlanmasıyla gerçekleştirilebilir.

1. DNA Barkodlamaya Dayalı Tür Teşhisi ve Önemi

Günümüze kadar gerçekleştirilen geleneksel taksonomik çalışmaların çoğu türlerin morfolojik özelliklerine dayalı yapılmaktadır, ancak bu yöntem bazı dezavantajlara ve kısıtlamalara sebebiyet vermektedir. Morfolojik tür teşhisi, uzmanlık ve tecrübe gerektirir. Dünyada yaşayan milyonlarca canlının morfolojiye dayalı tür teşhisinin uzun yıllar alabileceği gerçeğinin yanı sıra, bunu yapabilecek tecrübe sahibi taksonomistler de kısıtlıdır. Sorunlardan bir diğeri ise tür düzeyindeki tanımlamada türün sadece bir yaşam evresine uygulanabilir olması ve cinsiyete bağımlı olmasının tür teşhisinin doğruluğunu sınırlamasıdır. Halbuki bir türün morfolojik olarak tam bir şekilde teşhisi için tüm yaşam evreleri ve tüm cinsiyetleri tek tek incelenmelidir. Ancak bu çalışmalar oldukça zaman alıcıdır. Ayrıca incelenecek örneklerin hasar görmesi durumunda morfolojik tanımlamalarda zorluklar ortaya çıkmaktadır. Fenotipik plastisite ve genotipik değişkenliklerin görülmesi yanlış tanımlamalara yol açabilmektedir. Böceklerin küçük olmaları ve sınırlı sayıda morfolojik karaktere sahip olması da teşhiste zorluklar doğurmaktadır. Birbirine çok benzeyen kriptik türlerin morfolojiye dayalı teşhisi yetersiz kalmaktadır. Bu kısıtlamalar nedeniyle, morfolojiye dayalı tür teşhis yöntemlerine alternatif olabilecek yeni nesil yöntemlerin geliştirilmesi büyük önem arz etmektedir.

Canlıların genom sekanslamaları ile birlikte oluşan moleküler veriler ve moleküler biyoloji alanındaki teknolojik gelişmeler, “moleküler taksonomi” çağının da başlangıcı olmuştur. Moleküler taksonomi, canlı organizmaların proteinlerin veya nükleik asitlerin özelliklerine göre sınıflandırılması veya tanımlanmasını ifade eder. DNA molekülleri, fenotiplerden ziyade genotiplerin incelenmesine, evrimleşme oranının veya kalıtımın çoklu diziler kullanılarak hesaplanabilirliğini sağlaması ve analitik yöntemlerin genellikle tüm DNA tiplerine uygulanabilirliği nedeniyle araştırmalarda etkili bir şekilde kullanılmaktadır.

Günümüzde moleküler veriye dayalı tür teşhisi, daha doğru ve güvenilir bir şekilde tanımlamanın yapılmasına, gizemli yeni taksonların da belirlenmesine olanak sağlamaktadır (Cywinska, Hunter & Hebert, 2006; Lamichhane & ark., 2024).

DNA barkodlama yöntemi, organizmaların kısa ve standart bir genomik DNA fragmanı kullanılarak tanımlanması olarak ifade edilebilir. Bir DNA fragmanına DNA barkodu diyebilmemiz için bazı özelliklere sahip olması gerekmektedir. Bu özellikler, tür düzeyinde belirli bir genetik çeşitliliğe ve ayırım gücüne sahip olması, geniş ve kapsamlı bir taksonomik teşhis için evrensel primerler ile çoğaltılabilen korunmuş bölgeleri bulundurması ve uygulama esnasında gerçekleştirilen DNA izolasyonu ve amplifikasyonu gibi aşamalarda sorun yaratmaması şeklindedir (Keskin & Atar, 2013).

Kısa ve standart bir genomik DNA fragmanı kullanımı, tür içi çeşitliliğin türler arası çeşitlilikten düşük olduğu düşüncesi sonucunda ortaya çıkmıştır. Dolayısıyla kısa DNA fragmanları bir takson içerisindeki tür ayrımını da gerçekleştirebilmektedir (Aravind & ark., 2007). DNA barkodlama, türlerin genomlarının kısa fragmanlarındaki DNA dizisi farklılıkları ile başka canlıların tür düzeyinde tanımlanmasını sağlayacak biyolojik barkodlar oluşturmaktadır. DNA barkodları, 400-800 baz çifti arasında değişmektedir ve kolayca üretilip, dünya üzerinde yaşayan tüm türler için karakterize edilebilmektedir. Bir türe ait bu DNA parçacıkları veri tabanlarına yüklenmekte ve tanımlanmamış veya ayırt edilmesi gereken türlerin DNA dizileri ile bu veri tabanlarındaki DNA dizileri eşleştirilerek, türlerin tanımlanması sağlanmaktadır. Ayrıca ayrımı zor türler ve yeni türlerin keşfi için DNA barkodları kapsamlı filogenetik analizlerde taksonların belirlenmesinde kullanılmaktadır. DNA barkod verileri, filogenetik analizlere, başka hiçbir dizi bilgisi bulunmayan çok sayıda organizmayı dâhil etmenin uygun maliyetli, kullanışlı ve hızlı bir yolunu sunmaktadır. DNA karşılaştırmasına dayalı moleküler filogenetik çalışmalar türlerin hızlı ve doğru bir şekilde

tanımlanmasına olanak sağlar. Böylelikle türlerin tanımlanmasında evrensel bir tür teşhis anahtarı oluşturulması mümkün olmaktadır.

1993 yılında Arnot & ark., DNA barkodu ifadesini ilk defa ortaya koyarak moleküler taksonomide DNA barkodlama yönteminin ilk adımlarını atmışlardır. Hayvansal organizmalarda, mitokondriyal sitokrom c oksidaz alt birim 1 (COI) geninin 658 baz çiftlik (bç) gen fragmanının çoğaltılmasına dayalı barkodlama tekniği ilk defa Hebert & ark. (2003a) tarafından önerilmiş ve günümüzde birçok canlıya ait tür teşhis çalışmalarına da ışık tutmuştur.

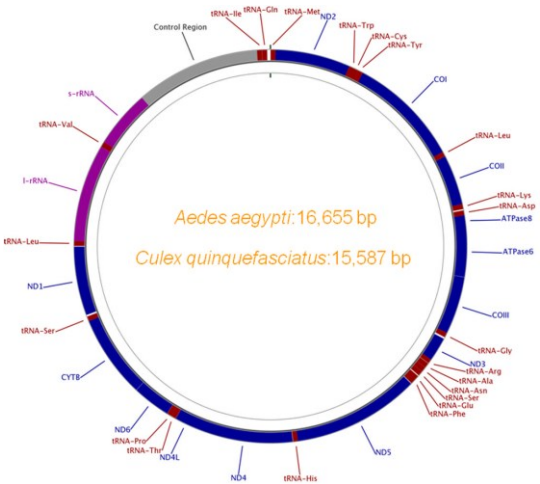
Sivrisinek tür teşhislerinde morfolojik yöntemlerin uygulanmasında bazı sorunlar yaşanmaktadır. Özellikle sivrisineklerin yakalanması esnasında kullanılan yakalama yöntemleri, sivrisinek morfolojik yapılarının bozulması sebep olmaktadır. Ayrıca sivrisinekler genellikle bir arada sibling türler olarak bulunurlar. Bu durumda, türlerin ortak birçok morfolojik özelliklere sahip olması bu türlerin ayırımını zorlaştırmaktadır. Örneğin, *Anopheles gambiae* tür kompleksi içerisinde atasal polimorfizm ve introgresyon kaynaklı türler arası yüksek genetik benzerlik olması, kompleks içerisindeki türlerin teşhisinde sorunlar yaratmaktadır (Hao & ark., 2017). Cywinska, Hunter & Hebert (2006) ile başlayan sivrisineklerde COI gen bölgesine dayalı DNA barkodlama ve filogenetik çalışmalar, ileriki süreçte sivrisinek tür teşhis çalışmaları için hızlı ve güvenilir bir araç olmasını sağlamıştır (Beebe & ark., 2015; Beebe, 2018). Ülkemizde, sivrisinek faunası hakkında bilgilerin eksik olması, sadece morfolojiye dayalı teşhis edilen türlerin hatalı kayıt olarak tanımlanan sivrisinek türleri olduğunun belirlenmesi, DNA barkodlama yöntemi ile türlerin revizyonunun gerekliliğini ortaya koymaktadır.

2. Sivrisinek Mitokondrial DNA'sı ve DNA Barkodları

Sivrisinek türlerinin belirlenmesi ve türler arası filogenetik analizlerin gerçekleştirilmesi için mitokondrial ve nükleer belirteçler kullanılmaktadır. Mitokondrial DNA (mtDNA) genleri arasında sitokrom c oksidaz I ve II (*CO1* ve *COII*) genleri en sıklıkla

kullanılan DNA barkodlama genleridir. Bununla birlikte mitokondrial sitokrom-b (*cyt b*), 16S ribozomal RNA (16S rDNA), 28S rDNA ve nükleer belirteç olan asetilkolinesteraz-2 (*ace-2*), iç transkripsiyon boşluk 2 (*ITS2*) gibi gen bölgeleri kullanılmaktadır (Smith & Fonseca, 2004; Bisaglia & ark., 2024).

Sıtmaya sebep olan sivrisinek türü *Anopheles gambiae*'ye ait mitokondrial genomun büyüklüğü 15,563 bç olarak belirlenmiştir (Beard, Hamm & Collins, 1993). Daha sonra, *Aedes aegypti* ve *Culex quinquefasciatus* türlerine ait mitokondrial genomlar belirlenmiş, sırasıyla, 16,655 bç ve 15,587 bç büyüklükte oldukları gösterilmiştir (Behura & ark., 2011). *Aedes aegypti* mitokondriyal genomu 13 protein kodlayan gen, 22 transfer RNA (tRNA) geni, bir 12S rRNA geni, bir 16S rRNA geni ve bir kontrol bölgesi içermektedir (Şekil 1). *Culex quinquefasciatus* mtDNA'sının da *Aedes aegypti* için belirlenen genlerle aynı sayıda ve aynı sırada organize olduğu tespit edilmiştir (Behura & ark., 2011).



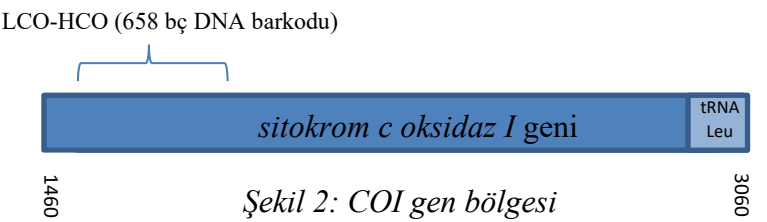
Şekil 1: Aedes ve Culex sivrisinek türlerine ait mitokondriyal DNA

Kaynak: Behura & ark., 2011

Mitokondrial DNA, yüksek kopya sayısına ve basit bir yapısal organizasyona sahiptir. İntronların bulunmaması, maternal kalıtım göstermesi, rekombinasyonun olmaması, genellikle indel (ekleme-silme polimorfizmi) görülmemesi, nükleer genomdan bağımsız olarak çoğalması, üçüncü pozisyondaki bazda yüksek substitüsyon oranı içermesi dolayısıyla interspesifik ve intraspesifik ayırımı yapabilmesi gibi özellikleri nükleer DNA'dan daha avantajlı bir moleküler belirteç olmasına olanak tanır (Hebert & ark., 2003a; Cywinska, Hunter & Hebert, 2006; Kumar & ark., 2007; Beebe, 2018). MtDNA gen bölgelerine göre tasarlanan evrensel primerler (Tablo 1) ile çoğaltılan DNA'lar, sivrisinek türlerinin tanımlanmasına, genetik çeşitlilik ve evrimsel ilişkilerin tahmin edilmesine yardımcı olmaktadır.

2.1. *COI* Gen Bölgesine Dayalı DNA Barkodlama

Hayvanlar aleminde *COI* gen bölgesine (Şekil 2) dayalı tür teşhisinin güvenirliğinin kanıtlanmasıyla birlikte (Hebert & ark., 2003a) tüm canlılara yönelik moleküler taksonomik çalışmalar ivme kazanmıştır. *COI* geninin, 658 bç'lik bölgesi LCO1490-HCO2198 primerleri (Tablo 1; Folmer & ark., 1994) ile çoğaltılabilmekte ve elden edilen DNA dizileri bir DNA barkodu olarak literatüre sunulmaktadır. Bu mitokondriyal genin 5' ucu tarafından kodlanan amino asit dizilerindeki çeşitliliğin, türleri daha yüksek taksonomik kategorilere güvenilir bir şekilde yerleştirmek için yeterli olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 2: COI gen bölgesi

Tablo 1. Sivrisinek DNA barkodlama çalışmalarında kullanılan gen bölgeleri ve primer dizileri

Gen Bölgesi	**Primer Adı**	**Primer Dizisi**	**Kaynakça**
COI	LCO1490	5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3'	*Folmer & ark., 1994*
	HCO2198	5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3'	
ITS2	5.8S primer	5'-TGTGAACTGCAGGACACATG-3'	*Collins & Paskewitz, 1996*
	28S primer	5'-ATGCTTAAATTTAGGGGGTA-3'	
cyt-b	REVCB2H	5'-TGAGGACAAATATCATTTTGAGGW-3'	*Simmons & Weller, 2001*
	REVCBJ	5'-ACTGGTCGAGCTCCAATTCATGT-3'	
ace-2	F1457	5'-GAGGAGATGTGGAATCCCAA-3'	*Smith & Fonseca, 2004*
	B1246	5'-TGGAGCCTCCTCTTCACGGC-3'	
16S rDNA	Culic_m16S_F91	5′-TAGAAACCAACCTGGCTTAC-3’	*Bisaglia & ark., 2024*
	Culic_m16S_R555	5’-GTGCGAAGGTAGCATAATCA-3’	

Hebert, Ratnasingham & deWaard (2003b) çalışmasında, Diptera’yı içeren 11 hayvan şubesine ait 13,320 kongenerik türlerden elde edilen COI dizilerini karşılaştırmışlar ve *Cnidaria* türleri hariç, tür teşhisi için yeterli olan %2’den fazla diziler arasında varyasyon tespit etmişlerdir.

Sivrisinekler üzerine yapılan çalışmalarda COI’ dayalı DNA barkodlama yönteminin farklı sivrisinek türlerinin teşhisi için oldukça etkili olduğunu göstermektedir (Erlank, Koekemoer, &

Coetzee, 2018; Karthika & ark., 2018; Chan-Chable & ark., 2019). Örneğin, Cywinska, Hunter & Hebert (2006), Kanada sivrisineklerine yönelik çalışmalarında, 37 türün (23 *Aedes*, 4 *Culex*, 4 *Anopheles*, 3 *Culiseta*, 1 *Coquillettidia*, 1 *Orthopodymia* ve 1 *Uranotaenia*) COI barkodlamasını gerçekleştirmiş, aynı türlerin birbirine yakın kümelendiklerini bildirmişlerdir. Aynı zamanda morfolojik farklılık gösteren iki alt tür olan *Aedes vexans vexans* ve *Aedes vexans nipponi* sivrisineklerinde barkod uyumu görüldüğü ifade edilmiştir.

Kumar & ark. (2007), Hindistan'da morfolojik tanımlama ile 63 tür olduğu belirlenen 111 sivrisinek örneğinin COI'e dayalı DNA barkodlamasını yapmış ve 62 türün doğru tespit edildiğini ortaya koymuşlardır. Ancak, birbirine yakın iki tür olan *Ochlerotatus portonovoensis* ve *Ochlerotatus wardi* sivrisineklerini ayrı türler olarak tanımlanamadığını ve ihmal edilebilir genetik farklılığa sahip olabileceklerini belirtmişlerdir.

Japonya'nın Ryukyu takımadalarına ait dokuz adada yaşayan, *Anopheles* (6 tür), *Aedes* (14 tür) ve *Culex* (17 tür) cinslerine ait 37 sivrisinek türlerine ait 228 örnekten elde edilen COI dizileri incelenmiştir (Taira & ark., 2012). Çalışmada, intraspesifik 35 türün %2'den (%0-1,5) daha az varyasyon gösterdiği belirtilmiştir. *Aedes aureostriatus okinawanus* ve *Culex hayashii ryukyuanus* türlerinde ise %2'den daha yüksek farklılıklar tespit edilmiş, ayrıca farklı adalardan gelen örnekler arasında ayırımda farklılıklar görüldüğü belirtilmiştir.

Demari-Silva & ark. (2011) tarafından *COI* geninin 478 bç'lik dizisi, Brezilya'dan *Culex* türlerini ayrıştırmak (örneklerden 9'u *Culex* alt cinsine aittir), *Lutzia* cinsinin *Culex*'e göre filogenetik ilişkilerini ve *Culex* cinsi içindeki *Phenacomyia* alt cinsinin taksonomik durumunu ortaya çıkarmak için kullanılmıştır. Sonuçlar yüksek intraspesifik varyasyonu göstermiş ve *Culex* içinde tür komplekslerinin varlığını ortaya koymuştur. Bu çalışmada COI barkod bölgesi hem tür tanımlamasını hem de Neotropiklerden *Culex* içindeki alt grupları değerlendirmek için kullanılmıştır.

Singapur'da gerçekleştirilen bir çalışmada, morfolojik olarak tanımlanan 12 cinse ait 45 sivrisinek türü COI'e dayalı DNA barkodlama yöntemi ile çalışılarak, moleküler yöntemlerinin daha güvenilir ve standart bir yöntem olarak kullanılmasını teyit etmek istemişlerdir (Chan & ark., 2014). Filogenetik analiz sonucunda, farklı cinslere ait türlerin yüksek destek değerleri ile ayrı kümelendiğini ortaya koymuşlardır.

Türkiye'de, *Aedes albopictus*'un varlığı Oter & ark. (2013) tarafından COI DNA barkodu ile tespit edilmiştir. Ardından Günay (2015), Türkiye sivrisinek faunasının revizyonu için COI'e dayalı DNA barkodlama çalışması gerçekleştirmiştir. Çalışmada 34 ilden toplanmış 6318 sivrisinek, morfolojik olarak teşhis edilmiş ve bu örneklerden 1015 tanesinin mtDNA *COI* gen bölgesi kullanılarak teşhisi yapılmıştır. Sonuçlarda Türkiye sivrisinek faunasının 64 taksondan oluştuğu bildirilmiş ve barkodlaması yapılan *Coquillettidia buxtoni*, *Culex impudicus* türleri ile *Anopheles hyrcanus var. pseudopictus*'un Türkiye'deki varlığı ilk defa açığa çıkarılmıştır. Yavaşoğlu & ark. (2016) ise Kuzey Kıbrıs ve Türkiye'de Mariae kompleksine ait 3 türü (*Aedes mariae*, *Aedes phoeniciae* ve *Aedes zammitii*) COI ve ITS2 barkodlarını kullanarak tanımlamışlardır. Popülasyon içindeki varyasyonun, gruplar arası ve grup içi varyasyondan daha fazla olduğunu aynı zamanda gruplar arasında düşük genetik yapılanmayı tespit etmişlerdir. Demirci & ark. (2021) istilacı sivrisinek türleri *Aedes aegypti* ve *Aedes albopictus'*un Türkiye'deki yayılışını tespit etmek için 5 yıl boyunca farklı bölgelerden (Karadeniz, İç Anadolu, Marmara, Akdeniz ve Ege Bölgeleri) larva örnekleri toplamış ve örneklerin doğru tanımlanması için COI barkodlama yöntemini kullanmışlardır. Çalışmada *Aedes albopictus'*un her geçen yıl daha da yayıldığını, *Aedes aegypti*'ın ise şu an sadece Türkiye'nin kuzeydoğusu ile sınırlı olduğunu belirtmişlerdir. Polat & Dede (2022), Kocaeli'deki sivrisinek türlerinin filogenetik analizi için *COI* gen bölgesini kullanmış ve *Aedes*, *Anopheles*, *Culiseta* ve *Culex* cinslerine ait 7 tür (*Aedes geniculatus*, *Aedes albopictus*, *Anopheles funestus*,

Anopheles plumbeus, *Culiseta longiareolata*, *Culex torrentium* ve *Culex pipiens complex sp.* tespit edilmiştir.

Bu ve benzer çalışmalar gösteriyor ki, standart mtDNA COI barkod bölgesi, sivrisinek tür tanımlaması için yeterli bilgiye sahip olup sivrisinek tür teşhisi için oldukça yeterlidir.

2.2. C*yt-b* Gen Bölgesine Dayalı DNA Barkodlama

COI gen bölgesi sivrisinek tür teşhisinde yaygın olarak kullanılsa da diğer mitokondrial gen bölgesi olan sitokrom b (*cyt-b*) geni de sivrisinek türlerinin tanımlanmasında kullanılabilmektedir. Sitokrom b mitokondriyal DNA tarafından kodlanan, mitokondrinin solunum zincirindeki elektron taşınmasında rol oynayan sitokromlardan biridir. Sitokrom b geni genellikle omurgalıların tanımlanmasında kullanılmakta ve oldukça doğru sonuçlar sunmaktadır. Bu bölge ile böceklerde DNA barkodlama çalışmaları olsa da (Simmons & Weller, 2001) sivrisineklerin tanımlanmasında sitokrom b belirtecinin kullanımı kısıtlı kalmaktadır.

Literatürde *cyt-b* gen bölgesi ile ilgili çok fazla çalışma bulunmamaktadır. Panda & ark. (2021) tarafından yapılan bir çalışmada *cyt-b* gen bölgesinin sivrisinekler için DNA barkod olarak kullanılabileceği gösterilmiştir. Bu çalışmada, *Anopheles* (*Anopheles stephensi* ve *Anopheles barbirostris*) türlerinin *COI*, *cyt-b* ve 28S rRNA genlerini kullanarak DNA barkodlama analizini gerçekleştirmişler ve *cyt-b* ile yapılan filogenetik analizin, diğer genler ile oluşturulan ağaçlarla benzerlik gösterdiği, her iki türün kladogenezini desteklediğini belirtmişlerdir.

2.3. 16S rDNA Gen Bölgesine Dayalı DNA Barkodlama

Diğer bir mitokondriyal gen olan 16S rDNA böceklerin barkodlamasında ve metabarkodlamasında, türlerin tanımlanmasında etkili olduğu ifade edilmektedir (Bisaglia & ark., 2024). 16S rDNA, *COI* gen bölgesine kıyasla yavaş evrimleştiği, sap-ilmek gibi yapılar bulundurması nedeniyle değişken bölgelerle çevrili korunan dizilerle karakterize edilmektedir (Epp & ark., 2012). 16S rDNA bölgesini hedefleyen DNA barkodlama

çalışmalarının çoğunlukla COI'e dayalı barkodlamaya göre daha kapsamlı taksonomik çalışmalarda kullanılabileceği düşünülmektedir (Bisaglia & ark., 2024).

2.4. *ITS2* Gen Bölgesine Dayalı DNA Barkodlama

Nükleer *ITS2* gen bölgesi, 5.8S ve 28S rDNA (ribozomal DNA) genleri arasında bulunan, kodlamayan bir bölgedir (Şekil 3). Böcek nükleer genomu ardışık tekrarlanan yüksek sayıda rRNA gen kopyası içerir. ITS bölgesinin genellikle polimorfizme dayalı DNA genotipleme çalışmaları ve PCR ürünlerinin restriksiyon enzim kesimi için uygunluğu ifade edilmektedir (Beebe, 2018). COI barkodu yerine kullanılabilecek en uygun alternatif olmaktadır. Tür seviyesi ayırımında *Anopheles* sivrisinek çalışmalarında en sıklıkla kullanılan barkod olması yanında (Beebe & ark., 2001), *Culex* sivrisineklerinin tanımlanmasında da kullanılmıştır (Miller, Crabtree & Savage, 1996; Vesgueiro & ark., 2011).

Şekil 3: İç Transkripsiyon Boşluk (Internal Transcribed Spacer, ITS) gen bölgeleri

Djadid & ark. (2007), Kuzey İran'daki *Anopheles maculipennis'*in palearktik üyelerinin ITS2 barkodu ile moleküler tanımlanmasını gerçekleştirmişlerdir. Çalışma sonucunda ITS2 dizisine dayalı filogenetik analizler, *maculipennis* kompleksinin altı İran üyesinin üç gruba ayrıldığını göstermişlerdir: *An. Atroparvus ve An. labranchiae* grubu; *An. maculipennis, An. messeae, An. Persiensis* grubu; *An. sacharovi* içeren grup.

ITS2'nin doğrudan dizilenmesi, izomorfik sivrisinek türlerini tanımlamak için en faydalı yöntemlerden biridir. Örneğin; Vesgueiro & ark. (2011), *Culex* cinsinin 16 türünden (7 tanesi *Culex* alt cinsine ait) ve *Lutzia'*nın bir türünden elde edilen ITS2 dizilerini

karşılaştırarak genomik farklılıkları anlamaya, *Culex* cinsinde taksonomik ilişkiyi değerlendirmeye ve ayrıca *Phenacomyia* ve *Lutzia* altcinslerinin *Culex* cinsi ile filogenetik ilişkisini ortaya çıkarmaya çalışmışlardır. Gözlemlenen varyasyona rağmen, aynı türün bireyleri bir araya getirilerek mevcut morfoloji tabanlı sınıflandırma ile ilişkilendirilmiş, böylece ITS2'nin *Culex* taksonomisinde kullanılmaya uygun bir barkod olduğu ortaya konmuştur.

Collins & Paskewitz (1996), rDNA'nın değişken bölgelerinin tür tanımlaması ve yakın türlerin filogenetik ilişkisini ortaya koymak için uygun olacağını öne sürmüşlerdir. Şekil 3'te de görüldüğü üzere, ITS bölgeleri etrafında, yüksek taksonomik seviyede bile korunmuş olan kodlayan rRNA bölgeleri içerir; bu bölgelere tekabül eden primerlerin kullanılması ile kriptik tür kompleksine ait bireylerin genetik farklılıklarının ortaya konulabileceğini ifade etmişlerdir. Öne sürdükleri primer çiftlerinin kullanılması ile, *Anopheles maculipennis* s.l. kompleksine ait sivrisinek bireylerinin, ITS2'nin çoğaltıldığı PCR-RFLP polimorfizm deneylerini yaparak tür düzeyinde tanımlanması gerçekleştirilmiştir (Vicente & ark., 2011). Goiri & ark., 2024, morfolojik olarak tanımlanan *Culex pipiens* s.l. kompleks türlerinde ITS2 barkodlama yaparak türlerin ekolojik tercihlerini de ortaya koymuşlardır.

Öztürk (2016), Orta ve Doğu Karadeniz Bölgesi'nde bulunan *Anopheles* türlerinin belirlenmesi ve *Anopheles maculipennis* kompleks türlerinin moleküler olarak tanımlanması için *ITS2* gen bölgesine dayalı DNA barkodlama gerçekleştirmişlerdir. Çalışmada, Sinop ilinden Gürcistan sınırına kadar 27 noktadan örnek toplanmış ve toplanan örneklerin moleküler analizi sonucunda 26 bölgede *Anopheles maculipennis s.s.* türünün varlığı tespit edilmiştir.

2.5. *Ace-2* Gen Bölgesine Dayalı DNA Barkodlama

Ace-2 geni, asetilkolini hidrolizleyen bir enzim olan asetilkolinesterazı (AChE) kodlamaktadır. Merkezi sinir sisteminde, sinir uyarılarının iletilmesinde görev alan bu enzim, sivrisinek gibi

böceklerle mücadelede de insektisitlerin hedefi olmaktadır. Bunun yanı sıra, sivrisineklerin moleküler tür teşhisinde hedef gen barkodu olarak kullanılan ve protein kodlayan tek nükleer barkoddur.

Sivrisinek tür ayırımına yönelik yapılan PCR-RFLP çalışmalarında ilk olarak kullanılmış, özellikle de *Culex pipiens* kompleksi tür ayırımında etkili olduğu görülmektedir. Bourguet & ark. (1998), *ace-2*'nin kullanıldığı polimorfizm çalışmasında, *Culex pipiens*, *Culex quinquefasciatus* ve melezlerinin ayırımını gerçekleştirmişlerdir. Bazı çalışmalarda hem nükleer hem de mitokondriyal bir belirteç kullanımının daha iyi sonuçlar verebileceği de ön görülmektedir. Buna örnek olarak, Hemmerter, Slapeta & Beebe (2009) çalışmalarında *ace-2* ve *COI* gen barkodlarının karşılaştırmalı değerlendirmesini yapmışlar ve iki yakın tür olan *Culex annulirostris* ve *Culex palpalis* sivrisineklerinin ayırımını gerçekleştirmişlerdir. Bu barkodlar ile yapılan filognetik analizler, *Culex* türleri arasında evrimsel çıkarımlara yardımcı olmaktadır.

Akıner & ark. (2022), Türkiye'nin Orta ve Doğu Karadeniz Bölgelerinde *Culex pipiens* kompleks türlerinin dağılımı ve moleküler farklılaşmasını incelemiş ve örnekleri *ace-2* gen barkoduna dayalı ayırt etmişlerdir. *Ace-2* barkodlarında 5 haplogruptan 22 haplotip tespit edilmiştir. Sonuçta, *Culex pipiens* kompleksi ve sibling türlerinin Türkiye'de Karadeniz bölgesinin kıyı ve iç kesimlerinde dağılım gösterdiği belirlenmiştir.

Sonuç

Sivrisineklerin sıtma, dang, Zika virüsü, Batı Nil virüsü, Chikungunya ve sarı humma gibi ölümcül hastalıklarının ortaya çıkmasına neden olan vektörler olmalarından dolayı, sürdürülebilir, etkili ve entegre vektör kontrol stratejilerinin geliştirilmesi için sivrisineklerin biyolojisi, ekolojisi ve moleküler çeşitliliğinin ayrıntılarına ihtiyaç duyulmaktadır. Bu nedenle, sivrisineklerin popülasyonlarının belirlenerek genetik yapısının ve gen akışı modellerinin derinlemesine incelenmesine ve anlaşılmasına ihtiyaç vardır. Ayrıca, moleküler yöntemler kullanarak sivrisinek türlerinin

kesin olarak tanımlanması ve yakın türlerden ayırt edilmesi, sivrisinek kaynaklı hastalıklar ile mücadelede etkili kontrol stratejilerinin başarısını etkileyecektir.

Günümüzde sivrisinek taksonomik çalışmalar kapsamında türlerinin ayırt edilmesi ve yeni türlerin tanımlanmasına yönelik çalışmalarda DNA barkodlama yöntemi tercih edilmektedir. Bu yöntemin güvenilirliği, çok yönlülüğü ve doğruluğu, öncelikli olarak sivrisinek türlerinin teşhisinde, genetik farklılığın, türlere özgü benzerliğin ve popülasyon çeşitliliğinin belirlenmesine yönelik çalışmalar için etkili bir araç olarak kullanılmasını sağlamaktadır. Bu çalışmalar hem sivrisinek yayılışı hem de sivrisinek kaynaklı hastalıkların takip edilmesi ve kontrol altına alınabilmesi açısından oldukça önemlidir.

Kaynakça

Adeniran, A. A., Hernández-Triana, L. M., Ortega-Morales, A. I., Garza-Hernández, J. A., Cruz-Ramos, J., Chan-Chable, R. J., Vázquez-Marroquín, R., Huerta-Jiménez, H., Nikolova, N. I., Fooks, A. R., & Rodríguez-Pérez, M. A. (2021). Identification of mosquitoes (Diptera: Culicidae) from Mexico State, Mexico using morphology and COI DNA barcoding. *Acta Tropica*, *213*, 105730. Doi: 10.1016/j.actatropica.2020.105730

Akıner, M. M., Öztürk, M., Beriş, F. Ş., Karacaoğlu, Ç., Şimşek, F. M., & Akgeyik, A. U. (2022). Distribution and molecular differentiation of *Culex* pipiens complex species in the Middle and Eastern Black Sea Regions of Turkey. *Turkish Journal of Zoology*, *46* (2), 207-219. Doi: 10.55730/1300-0179.3049

Aravind, K., Ravikanth, G., Uma Shaanker, R., Chandrashekara, K., Kumar, A. R. V., & Ganeshaiah, K. N. (2007). DNA barcoding: an exercise in futility or utility? *Current Science*, *92* (9). pp. 1213-1216.

Arnot, D. E., Roper, C., & Bayoumi, R. A. L. (1993). Digital codes from hypervariable tandemly repeated DNA sequences in the *Plasmodium falciparum* circumsporozoite gene can genetically barcode isolates. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 61: 15-24. Doi:10.1016/0166-6851(93)90154-p

Beard, C. B., Hamm, D. M. & Collins, F. H. (1993). The mitochondrial genome of the mosquito *Anopheles gambiae*: DNA sequence, genome organization, and comparisons with mitochondrial sequences of other insects. *Insect Molecular Biology,* 2, 103-124. Doi: 10.1111/j.1365-2583.1993.tb00131.x

Beebe N. W. (2018). DNA barcoding mosquitoes: advice for potential prospectors. *Parasitology*, *145* (5), 622-633. Doi: 10.1017/S0031182018000343

Beebe, N. W., Maung, J., van den Hurk, A. F., Ellis, J. T., & Cooper, R. D. (2001). Ribosomal DNA spacer genotypes of the

Anopheles bancroftii group (Diptera: Culicidae) from Australia and Papua New Guinea. *Insect Molecular Biology*, *10* (5), 407-413. Doi: 10.1046/j.0962-1075.2001.00278.x

Beebe, N. W., Russell, T., Burkot, T. R., & Cooper, R. D. (2015). *Anopheles punctulatus* group: evolution, distribution, and control. *Annual Review of Entomology*, *60*, 335-350. Doi: 10.1146/annurev-ento-010814-021206

Behura, S. K., Lobo, N. F., Haas, B., deBruyn, B., Lovin, D. D., Shumway, M. F., Puiu, D., Romero-Severson, J., Nene, V. And Severson, D. W. (2011). Complete sequences of mitochondria genomes of *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* and comparative analysis of mitochondrial DNA fragments inserted in the nuclear genomes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology, 41*, 770-777. Doi: 10.1016/j.ibmb.2011.05.006

Bisaglia, B., Castelli, M., Soresinetti, L., Negri, A., Arnoldi, I., Montarsi, F., Gobbo, F., Defilippo, F., Callegari, E., Di Luca, M., Calzolari, M., Mastrantonio, V., Porretta, D., Ficetola, G. F., Sassera, D., Gabrieli, P., Bandi, C., & Epis, S. (2024). Barcoding of Italian mosquitoes (BITMO): generation and validation of DNA barcoding reference libraries for native and alien species of Culicidae. *Parasites & Vectors*, *17* (1), 407. Doi: 10.1186/s13071-024-06478-0.

Bourguet, D., Fonseca, D., Vourch, G., Dubois, M. P., Chandre, F., Severini, C., & Raymond, M. (1998). The acetylcholinesterase gene Ace: a diagnostic marker for the Pipiens and Quinquefasciatus forms of the *Culex pipiens* complex. *Journal of the American Mosquito Control Association*, *14* (4), 390-396.

Chan, A., Chiang, L. P., Hapuarachchi, H. C., Tan, C. H., Pang, S. C., Lee, R., Lee, K. S., Ng, L. C., & Lam-Phua, S. G. (2014). DNA barcoding: complementing morphological identification of mosquito species in Singapore. *Parasites & Vectors*, *7*, 569. Doi: 10.1186/s13071-014-0569-4

Chan-Chable, R. J., Martínez-Arce, A., Mis-Avila, P. C., & Ortega-Morales, A. I. (2019). DNA barcodes and evidence of cryptic diversity of anthropophagous mosquitoes in Quintana Roo, Mexico. *Ecology and Evolution*, *9* (8), 4692-4705. Doi: 10.1002/ece3.5073

Collins, F. H., & Paskewitz, S. M. (1996). A review of the use of ribosomal DNA (rDNA) to differentiate among cryptic *Anopheles* species. *Insect Molecular Biology*, *5* (1), 1–9. Doi: 10.1111/j.1365-2583.1996.tb00034.x

Cywinska, A., Hunter, F. F., & Hebert, P. D. (2006). Identifying Canadian mosquito species through DNA barcodes. *Medical and Veterinary Entomology*, *20* (4), 413-424. Doi: 10.1111/j.1365-2915.2006.00653.x

Demari-Silva, B., Vesgueiro, F. T., Sallum, M. A., & Marrelli, M. T. (2011). Taxonomic and phylogenetic relationships between species of the genus *Culex* (Diptera: culicidae) from Brazil inferred from the cytochrome c oxidase I mitochondrial gene. *Journal of Medical Entomology*, *48* (2), 272-279. Doi: 10.1603/me09293

Demirci, B., Bedir, H., Öztürk, M. & Akıner, M.M. (2021). Status of the invasive mosquito species *Aedes aegypti* (L., 1762) and *Aedes albopictus* (Skuse, 1895) (Diptera: Culicidae) in Turkey. *Turkish Journal of Entomology*, *45*, 279-292. Doi: 10.16970/entoted.879297

DSÖ (2023). *Hastalık Salgını Haberleri; Dang humması-Küresel durum.* (12/12/2024 tarihinde https://www.who.int/emergencies/disease-outbreak-news/item/2023-DON498 adresinden ulaşılmıştır.)

DSÖ (2024a). *Dünya Sıtma Raporu 2024*. (12/12/2024 tarihinde https://www.who.int/publications/i/item/9789240104440 adresinden ulaşılmıştır.)

DSÖ (2024b). *Hastalık Salgını Haberleri; Dang humması-Küresel durum.* (12/12/2024 tarihinde https://www.who.int/emer-

gencies/disease-outbreak-news/item/2024-DON518 adresinden ulaşılmıştır.)

DSÖ (2024c). *Zika Epidemiyolojisi Güncellemesi Mayıs 2024*. (19/12/2024 tarihinde https://www.who.int/publications/m/item/zika-epidemiology-update-may-2024 adresinden ulaşılmıştır.)

Djadid, N. D., Gholizadeh, S., Tafsiri, E., Romi, R., Gordeev, M., & Zakeri, S. (2007). Molecular identification of Palearctic members of *Anopheles maculipennis* in Northern Iran. *Malaria Journal*, *6*, 6. Doi: 10.1186/1475-2875-6-6

Epp, L. S., Boessenkool, S., Bellemain, E. P., Haile, J., Esposito, A., Riaz, T., Erséus, C., Gusarov, V. I., Edwards, M. E., Johnsen, A., Stenøien, H. K., Hassel, K., Kauserud, H., Yoccoz, N. G., Bråthen, K. A., Willerslev, E., Taberlet, P., Coissac, E., & Brochmann, C. (2012). New environmental metabarcodes for analysing soil DNA: potential for studying past and present ecosystems. *Molecular Ecology*, *21* (8), 1821-1833. Doi: 10.1111/j.1365-294X.2012.05537.x

Erlank, E., Koekemoer, L.L. & Coetzee, M. (2018). The importance of morphological identification of African anopheline mosquitoes (Diptera: Culicidae) for malaria control programmes. *Malaria Journal*, *17*, 43. Doi: 10.1186/s12936-018-2189-5

Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., Vrijenhoek, R. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, *3* (5), 294-299.

Goiri, F., González, M.A., Cevidanes, A., Barandika, J.F., García-Peréz, A.L. (2024). Mosquitoes in urban green spaces and cemeteries in northern Spain. *Parasites & Vectors*, *17* (1), 168. Doi: 10.1186/s13071-024-06263-z

Günay, F. (2015). Türkiye sivrisinek faunası üzerine DNA barkodlama yöntemiyle moleküler analizler. Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 138 s.

Hao, YJ., Zou, YL., Ding, YR ., Xu, WY., Yan, ZT., Li, XD., Fu, WB., Li, TJ. & Chen, B. (2017). Complete mitochondrial genomes of *Anopheles stephensi* and *An. dirus* and comparative evolutionary mitochondriomics of 50 mosquitoes. *Scientific Reports*, *7* (1), 1-13. Doi: 10.1038/s41598-017-07977-0

Harbach, R. E., (2024). *Mosquito taxonomic inventory*. (12/12/2024 tarihinde http://mosquitotaxonomic-inventory.info/ adresinden ulaşılmıştır.)

Harbach, R.E. & Kitching, I.J. (1998). Phylogeny and classification of the Culicidae (Diptera). *Systematic Entomology, 23*(4), 327-370. Doi: 10.1046/j.1365-3113.1998.00072.x

Hebert, P. D., Cywinska, A., Ball, S. L., & deWaard, J. R. (2003a). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London B Biological Sciences*, *270*, 313-321. Doi: 10.1098/rspb.2002.2218

Hebert, P. D., Ratnasingham, S., & deWaard, J. R. (2003b). Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society of London B Biological Sciences (Supplement), 270*, S96-S99. Doi: 10.1098/rsbl.2003.0025

Hemmerter, S., Slapeta, J., & Beebe, N. W. (2009). Resolving genetic diversity in Australasian Culex mosquitoes: incongruence between the mitochondrial cytochrome c oxidase I and nuclear acetylcholine esterase 2. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *50* (2), 317-325. Doi: 10.1016/j.ympev.2008.11.016

Karthika, P., Vadivalagan, C., Thirumurugan, D., Kumar, R. R., Murugan, K., Canale, A., & Benelli, G. (2018). DNA barcoding of five Japanese encephalitis mosquito vectors (*Culex fuscocephala*, *Culex gelidus*, *Culex tritaeniorhynchus*, *Culex pseudovishnui* and *Culex vishnui*). *Acta Tropica*, *183*, 84-91. Doi: 10.1016/j.actatropica.2018.04.006

Keskin, E. & Atar, H. H. (2013). DNA Barkodlama: Mitokondriyal COI Geni Kullanılarak Moleküler Tanımlama. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, *6* (2), 01-08.

Kumar, N. P., Rajavel, A. R., Natarajan, R., & Jambulingam, P. (2007). DNA barcodes can distinguish species of Indian mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, *44* (1), 1-7. Doi: 10.1603/0022-2585(2007)44[1:dbcdso]2.0.co;2

Lamichhane, B., Brockway, C., Evasco, K., Nicholson, J., Neville, P. J., Mackenzie, J. S., Smith, D., & Imrie, A. (2024). DNA Barcoding for the Identification of Adult Mosquitoes (Diptera: Culicidae) in Western Australia. *Ecology and Evolution*, *14* (11), e70493. Doi: 10.1002/ece3.70493

Miller, B.R., Crabtree, M.B., & Savage, H.M. (1996). Phylogeny of fourteen *Culex* mosquito species, including the *Culex pipiens* complex, inferred from the internal transcribed spacers of ribosomal DNA. *Insect Molecular Biology*, *5*, 93-107. Doi: 10.1111/j.1365-2583.1996.tb00044.x

Muñoz-Gamba, A. S., Laiton-Donato, K., Perdomo-Balaguera, E., Castro, L. R., Usme-Ciro, J. A., & Parra-Henao, G. (2021). Molecular characterization of mosquitoes (Diptera: Culicidae) from the Colombian rainforest. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, *63*, e24. Doi: 10.1590/S1678-9946202163024

Oter, K., Gunay, F., Tuzer, E., Linton, Y. M., Bellini, R., & Alten, B. (2013). First record of *Stegomyia albopicta* in Turkey determined by active ovitrap surveillance and DNA barcoding. *Vector Borne and Zoonotic diseases (Larchmont, N.Y.)*, *13* (10), 753-761. Doi: 10.1089/vbz.2012.1093

Öztürk, E. (2016). Orta ve Doğu Karadeniz Bölgesinde bulunan *Anopheles* türlerinin belirlenmesi ve *Anopheles maculipennis* kompleks türlerinin moleküler olarak tanımlanması. Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 53 s.

Panda, D., Biswal, I., Seth, J. K., & Barik, T. K. (2021). Wing Morphometric and DNA Barcoding Analysis of Two Different Public Health Important *Anopheles* Mosquito Species. *Journal of the Entomological Research Society*, *23* (3), 239-255. Doi: 10.51963/jers.v23i3.2026

Polat, F., & Dede, S. (2022). Phylogenetic Analysis of Mosquito (Diptera: Culicidae) Species with Mitochondrial Cytochrome Oxidase Subunit 1 Gene Distributed in Kocaeli. *Celal Bayar University Journal of Science*, *18* (2), 193-202. Doi: 10.18466/cbayarfbe.1007398

Simmons, R. B., & Weller, S. J. (2001). Utility and evolution of cytochrome b in insects. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *20* (2), 196-210. Doi: 10.1006/mpev.2001.0958

Smith, J. L., & Fonseca, D. M. (2004). Rapid assays for identification of members of the *Culex (Culex) pipiens* complex, their hybrids, and other sibling species (Diptera: culicidae). *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *70* (4), 339-345.

Taira, K., Toma, T., Tamashiro, M., & Miyagi, I. (2012). DNA barcoding for identification of mosquitoes (Diptera: Culicidae) from the Ryukyu Archipelago, Japan. *Medical Entomology and Zoology*, *63* (4), 289-306. Doi: 10.7601/mez.63.289

Vadivalagan, C., Karthika, P., Murugan, K., Panneerselvam, C., Del Serrone, P., & Benelli, G. (2017). Exploring genetic variation in haplotypes of the filariasis vector Culex quinquefasciatus (Diptera: Culicidae) through DNA barcoding. *Acta Tropica*, *169*, 43-50. Doi: 10.1016/j.actatropica.2017.01.020

Vesgueiro, F. T., Demari-Silva, B., Malafronte, R.dosS., Sallum, M. A., & Marrelli, M. T. (2011). Intragenomic variation in the second internal transcribed spacer of the ribosomal DNA of species of the genera *Culex* and *Lutzia* (Diptera: Culicidae). *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, *106* (1), 1-8. Doi: 10.1590/s0074-02762011000100001

Vicente, J. L., Sousa, C. A., Alten, B., Caglar, S. S., Falcutá, E., Latorre, J. M., Toty, C., Barré, H., Demirci, B., Di Luca, M., Toma, L., Alves, R., Salgueiro, P., Silva, T. L., Bargues, M. D., Mas-Coma, S., Boccolini, D., Romi, R., Nicolescu, G., do Rosário, V. E., Ozer, N., Fontenille, D. & Pinto, J. (2011). Genetic and phenotypic variation of the malaria vector *Anopheles atroparvus* in southern Europe. *Malaria Journal*, *10*, 5. Doi: 10.1186/1475-2875-10-5

Yavasoglu, S.I., Yilmaz, C., Ulger, C., Simsek, F.M. (2016). Molecular identification and genetic structure of *Aedes phoeniciae* (Diptera: culicidae) in Northern Cyprus and Turkey. *Biochemical Systematics and Ecology*, *69*, 6-1. Doi.org/10.1016/j.bse.2016.08.003

Yee, D. A., Dean Bermond, C., Reyes-Torres, L. J., Fijman, N. S., Scavo, N. A., Nelsen, J., & Yee, S. H. (2022). Robust network stability of mosquitoes and human pathogens of medical importance. *Parasites & Vectors*, *15* (1), 216. Doi: 10.1186/s13071-022-05333-4

BÖLÜM XII

Endüstriyel Enzimlerde Enzim Mühendisliği ve Makine Öğrenmesi Uygulamaları

Havva Esra TÜTÜNCÜ[1]

1. Giriş

Enzimler tüm canlılarda sentez ve yıkım reaksiyonlarını gerçekleştiren biyokatalizörlerdir. Enzim teknolojisi hızla gelişmekte ve giderek daha fazla önem kazanmaktadır. Yüksek özgüllükleri sayesinde enzimler, endüstriyel alanda önemli kimyasal dönüşümleri gerçekleştirme potansiyeline sahiptir. Küresel enzim pazarının 2024 yılında 13,52 milyon dolarlık bir hacme sahip olduğu bilinmekle birlikte, bu değerin 2028 yılında %14'lük bir birleşik yıllık büyüme oranı ile 22,86 milyon dolara çıkacağı tahmin edilmektedir (Research and Markets, 2024). Enzimler gıda, medikal, biyoyakıt, kimya, deterjan ve tekstil endüstrileri gibi birçok alanda kullanılmaktadır. Biyoproses teknolojileri ve genetik mühendisliği alanlarındaki son ilerlemeler, endüstriyel enzim üretiminde çığır

[1] Dr. Öğr. Üyesi, Malatya Turgut Özal Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Beslenme ve Diyetetik Bölümü, Malatya/Türkiye, Orcid: 0000-0003-3951-399X, esra.tutuncu@ozal.edu.tr

açıcı başarılara olanak tanımıştır. Uzun yıllardan beri protein mühendisliği yoluyla, belirli özelliklere ve geliştirilmiş fonksiyonlara sahip enzimlerin tasarlanması mümkün hale gelmiştir (Patel ve ark., 2023).

Enzim mühendisliği hem enzimlerin yapısal elemanlarının fonksiyonel ve biyokimyasal özelliklerine olan etkilerinin değerlendirilebilmesi hem de endüstriyel koşulların gerektirdiği koşullara uyumlu enzimlerin elde edilmesi amacıyla uygulanabilmektedir. Geleneksel rasyonel tasarım ve yönlendirilmiş evrim çalışmaları bir yana, günümüzde makine öğrenmesi yolu ile daha iyi enzimlerin keşfedilmesi veya var olan enzimlerin özelliklerinin iyileştirilmesi alanında çalışmalar hız kazanmıştır. Bu çalışma kapsamında öncelikle endüstride önemli enzimler hakkında genel bilgiler verilecek, geleneksel enzim mühendisliği yöntemleri ele alınacak, sonrasında ise makine öğrenmesi ile enzimlerin özelliklerinin iyileştirilmesine yönelik son dönemde gerçekleştirilen çalışmalar sunulacaktır.

2. Endüstriyel Enzimler ve Sınıflandırılması

Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği (IUBMB) ve Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği'nin (IUPAC) ortak isimlendirme komitesine göre enzimler yedi sınıfa ayrılmaktadır (Enzyme Nomenculature, 2024). Bunlar sırasıyla oksidoredüktazlar, transferazlar, hidrolazlar, liyazlar, izomerazlar, ligazlar ve translokazlar olarak adlandırılmaktadır. Bu enzimler katalizledikleri reaksiyonlara göre isimlendirilmekte olup, her bir enzim grubunda değişen sayılarda alt gruplar bulunmaktadır. Tablo 1.'de enzim grupları katalizledikleri reaksiyonlara göre gösterilmektedir. Tablo 2.'de ise enzimlerin endüstrideki önemini vurgulamak amacıyla kullanım alanları listelenmiştir.

Tablo 1: Enzim grupları, reaksiyonlar ve örnek enzimler (Singh ve ark., 2016)

EC numarası	**Sınıfı**	**Reaksiyonlar**	**Örnek enzimler**
1	Oksidoredüktazlar	Moleküller arası hidrojen, oksijen veya elektron transferi	Dehidrogenazlar, oksidazlar, oksijenazlar, peroksidazlar
2	Trasferazlar	Bir molekülden diğerine bir grup atomun transferi	Fruktosiltransferazlar, transketolazlar, açiltransferazlar, transminazlar
3	Hidrolazlar	Bağların hidrolitik yıkımı	Proteazlar, amilazlar, açilazlar, dehidratazlar, fosfatazlar, kutinazlar
4	Liyazlar	Eliminasyon veya ekleme reaksiyonları ile hidrolitik olmayan bağ yıkımı	Pektik liyazlar, hidratazlar, dehidratazlar, dekarboksilazlar, fumaraz, arjinosukkin
5	İzomerazlar	Bir molekül içerisinde bir grubun bir pozisyondan diğerine aktarılması	İzomerazlar, epimerazlar, rasemazlar
6	Ligazlar	ATP veya diğer benzer trifosfatlardan hidrolizi ile beraber iki molekülün kovalent bağ ile bağlanması	Sentetazlar, ligazlar
7	Translokazlar	Membran boyunca iyonların veya moleküllerin hareket etmesi veya membran içinde ayrılmaları	DNA translokazlar, ABC tip transporter

Tablo 2: Enzimlerin endüstriyel uygulamaları (Singh ve ark., 2016)

Endüstri	**Enzim**	**Fonksiyonu**
Süt ve süt ürünleri	Asit proteinaz Lipaz Laktaz Aminopeptidaz Katalaz	Süt pıhtılaşması Peynir olgunlaşması, aroma oluşumu Laktozsuz süt üretimi Peyir olgunlaşması Peynir üretimi
Fırıncılık	Amilaz Maltojenik amilaz Ksilinaz Lipaz	Un ayarlanması, ekmek yumuşaklığı Ekmeklerin raf ömrünün uzatılması Hamurun iyileştirilmesi
İçecek	Pektinaz Glikoz oksidaz Selülaz Amilaz Glukanaz Proteaz Pullulanaz Naringinaz Limoninaz Aminopeptidazlar	Depektinizasyon Biradan oksijenin uzaklaştırılması Meyve sıvılaştırma Nişasta hidrolizi Bulanıklık oluşumunu azaltma Bulanıklık oluşumunu azaltma Nişasta sakkarifikasyonu Acılık giderme Acılık giderme Püreleme sırasında protein parçalanması
Hayvan yemi	Fitaz Ksilanaz Glukanaz	Fitik asidi hidrolize ederek fosforu serbest bırakma Sindirilebilirliği artırma Sindirim yardımcısı
Kağıt	Proteaz Amilaz Ksilanaz Lakkaz Selülaz	Biyofilm giderimi Deinking, drenaj iyileştirme Ağartıcı takviyesi Klor içermeyen ağartma, delignifikasyon Deinking, drenaj iyileştirme
Polimer	Lipaz Lakkaz Glikoz oksidaz Transglutaminaz Tirozinaz	Polikondensasyon, polimerizasyon Bisfenol A'nın polimerizasyonu Anilinlerin polimerizasyonu Proteinin çapraz bağlanması Lignin ve kitosanın polimerizasyonu
Deterjan	Amilaz	Karbonhidrat lekesi çıkarma

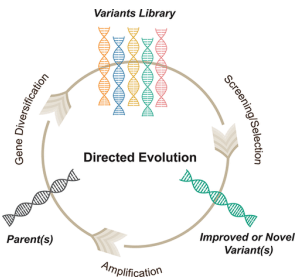
	Lipaz Proteaz Selülaz Kutinaz Mannanase	Yağ lekesi giderme Protein leke çıkarma Renk berraklaştırma Trigliserit giderimi Leke çıkarma
Deri	Alkali proteaz Nötral proteaz Lipaz Amilaz	Tüy alma, tüy dökme Tüy alma, ıslatma Yağ çözme Lif bölünmesi
Kozmetik	Süperoksit dismutaz Proteaz Endoglikozidaz Lakkaz Lipaz	Serbest radikal temizleme, cilt bakımı Ölü derinin uzaklaştırılması Diş ve diş eti dokusu bakımı Saç boyası Cilt bakımı
Organik sentez	Lipaz Glikozil transferaz Nitril hidrataz Glikoz izomeraz Açiltransferaz Lakkaz	İlaçların, polimerlerin, biyodizellerin, biyosurfaktanların sentezi Oligosakkaritlerin sentezi Akrilamid, bütiramid, nikotinamid sentezi Yüksek fruktozlu mısır şurubunun üretimi Hidroksamik asitlerin sentezi Tekstil boyaları, kozmetik pigmentleri, tatlandırıcılar ve pestisitlerin üretimi
Atık yönetimi	Amidaz Amidaz Amiloglukosidaz Lipaz Nitril hidrataz Proteaz Lakkaz Kütinaz Lignin peroksidaz Oksijenaz	Nitril içeren atıkların bozunması Sebze atıklarının biyoremediasyonu Biyoremediasyon için nişasta hidrolizi Ham petrol hidrokarbonlarının bozulması Nitril içeren atıkların bozunması Keratinik atıkların biyoremediasyonu Olefin ünitesi, poliüretan ve fenolik bileşikler içeren atıkların bozunması Plastiklerin bozulması, Fenolik bileşiklerin bozunması Halojenli kirleticilerin bozunması

3. Protein Mühendisliği Yaklaşımları

Enzimler biyokatalitik sentezde büyük bir potansiyele sahip olsa da genellikle düşük aktivite, kararsızlık, sınırlı substrat seçiciliği ve düşük reaksiyon seçiciliği gibi bazı kısıtlamalar gösterirler. Bu sorunların üstesinden gelmek için araştırmacılar genellikle iki yaklaşıma odaklanır: Farklı ortamlarda özel işlevlere sahip yeni enzimlerin keşfedilmesi veya halihazırda mevcut enzimlerin istenilen özelliklere uygun şekilde değiştirilmesi. Bu yöntemler arasında, doğal enzimleri moleküler düzeyde değiştirilmesi ihtiyacı protein mühendisliği alanının ortaya çıkmasına zemin hazırlamıştır (Xiong ve ark., 2016). Protein mühendisliği uygulamaları genel olarak iki ana yaklaşımı ve bir de bunların kombinasyonu olan bir yaklaşımı içermektedir. Bunlar sırası ile yönlendirilmiş evrim, rasyonel tasarım ve kombinatoryal yaklaşımdır.

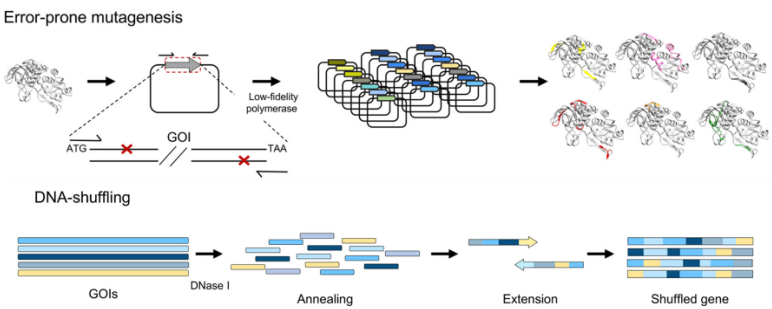
3.1 Yönlendirilmiş evrim

Yönlendirilmiş evrimde yapay ve rastgele mutasyonlar gerçekleştirilerek en iyi varyantların elde edilmesi hedeflenmektedir. Yönlendirilmiş evrim, enzimin yapısı, fonksiyonu veya katalitik mekanizması hakkında önceden bilgi gerektirmeden rastgele mutasyonlar eklenmesine olanak tanıdığı için son derece verimli bir yöntemdir. Enzim kodlayan genler üzerinde rastgele mutasyonların gerçekleştirilebilmesi için PZR (hataya meyilli PZR) veya rekombinasyon (DNA shuffling, ITCHY, SHIPREC) temelli yöntemler uygulanabilmektedir (Caldwell ve ark., 1992; Kikuchi ve ark., 2000; Hu ve ark., 1997; Sieber ve ark., 2001).



Şekil 1: Yönlendirilmiş evrimin prensibi (Wang ve ark., 2021)

PZR temelli yaklaşımda parental DNA çoğaltılırken rastgele mutansyonların oluşması için reaksiyon koşulları üzerinde manipülasyonlar yapılmaktadır. Hata okuma aktivitesi olmayan bir DNA polimeraz enzimi ile gerçekleştirilen reaksiyonda enzimin hata yapmasını sağlayıcı koşullar oluşturulmaktadır. Rekombinasyon temelli yaklaşımlar ise hem *in vivo* hem de *in vitro* gerçekleştirilebilirken, kimi durumlarda diziler arasında homoloji olması gerekmektedir (DNA shuffling). ITCHY ve SHIPREC gibi tekniklerde ise diziler arasında benzerlik veya homoloji olması gerekmemektedir (Vidal ve ark., 2023). Şekil 2.'de yönlendirilmiş evrim yaklaşımının en çok uygulanan iki tekniği olan epPCR ve DNA shuffling yöntemlerine ait Vidal ve ark. (2023) kaynağından alınan görseller verilmektedir.



Şekil 2: epPCR ve DNA shuffling (Vidal ve ark., 2023)

Yönlendirilmiş evrim ile elde edilen mutantlardan oluşturulan kütüphaneler sayıca fazla diziyi barındırmaktadır. Sekans uzayında ulaşılabilecek varyantların oldukça yüksek sayıda olması sebebiyle, bu sekans uzayı içerisinde istenilen özelliklere sahip enzimleri kodlayan dizilerin tespit edilebilmesi için tarama yöntemlerinin etkili olması gerekmektedir. Bu amaçla yüksek kapasiteli tarama (HTS) uygulanmaktadır. Literatürde, büyük kütüphanelerdeki varyantlarının taranması için agar bazlı ve mikrotitre bazlı olmak üzere iki tür HTS yöntemi yaygın olarak

kullanılmaktadır. İlk yöntemde substrat doğrudan agara eklenmekte ve tarama süreci, belirli istenen fiziksel koşullar altında oluşan kolonilerin aktivitesinin belirlenmesine dayanmaktadır. Mikrotitre plakası taramasında ise tarama işlemi ham ekstrakt kullanılarak gerçekleştirilir. Ayrıca, plaka/mikrotitre bazlı yüksek verimli tarama için gelişmiş robotik platformlar da geliştirilmiştir (Vardar-Yel ve ark., 2024).

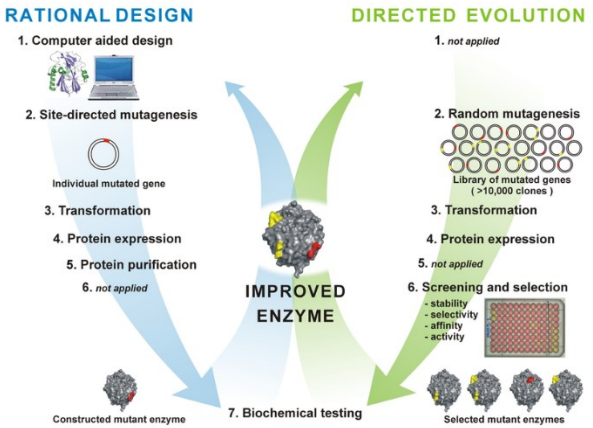
3.2 Rasyonel tasarım

Rasyonel tasarım ile enzimler üzerinde yapılacak değişikliklerin belirlenmesi için proteinlerin yapısal özelliklerinin ayrıntılı olarak biliniyor olması veya en azından yapısı bilinen ve hedef proteinin yüksek benzerlik gösterdiği bir proteinin mevcut olması gerekmektedir. Rasyonel tasarımın dayandığı bu temel aslında yaklaşımın uygulanabilirliğini de sınırlandıran bir faktör olarak karşımıza çıkabilmektedir. Örneğin rasyonel tasarımda aktif bölgelerin ve substrat bağlanma ceplerinin belirlenmesi bu bölgeler üzerinde uygun değişikliklerin yapılabilmesi için gereklidir. Ancak birçok enzimin 3 boyutlu yapısı belirlenmiş değildir ve dizileri de genellikle kristal yapıları belirlenmiş enzimler ile düşük homoloji gösterirler (Zhou ve Huang, 2024). Böyle durumlara bir çözüm olarak son yıllarda hayatımıza giren AlphaFold2 ve RoseTTAFold gibi derin öğrenme tabanlı protein yapı tahmin araçları, proteinlerin 3D yapılarının tahmin edilmesinde büyük başarı göstermiştir (Jumper ve ark., 2021; Baek ve ark., 2021). Ligand bağlanma yapıları ve protein komplekslerinin dinamik özellikleri ise moleküler yanaştırma (docking) ve moleküler dinamik simülasyonları ile çok daha yüksek doğrulukta tahmin edilebilir hale gelmiştir (Zhou ve Huang, 2024).

Rasyonel tasarımın gerçekleştirildiği teknik olarak adlandırılan bölge spesifik mutagenezde ilk olarak hedeflenen özelliği proteine kazandırabilecek (veya istenmeyen özelliğin kaybolmasını sağlayacak) belirli sıcak noktalar tanımlanır. Tahmin edilebileceği üzere bu noktada bilgisayar temelli hesapsal çalışmaların katkısı oldukça önemlidir. Belirlenen bölgelerdeki

aminoasitler istenilen özelliği sağlayacak şekilde uygun aminoasitler ile değiştirilir. Bunun için PZR temelli mutasyon çalışmaları yapılabildiği gibi, sentetik gen teknolojisinin gelişmesine bağlı olarak tasarlanan genlerin sentezi de yapılabilmektedir. İlgili gen moleküler biyolojik teknikler ile bir konak organizmaya aktarıldıktan sonra rekombinant olarak ifade edilmekte ve karakterizasyon çalışmaları yapılmaktadır (Şekil 3).

Rasyonel tasarımda en kritik nokta enzimin 3 boyutlu yapısının doğru tahmin edilmesi ve protein üzerinde yapılacak değişikliğin enzimin istenilen özelliği kazanmasına katkı sağlayabileceğinin deneysel çalışma öncesi hesapsal olarak belirlenmesidir. Şekil 3.'de rasyonel tasarım ile yönlendirilmiş evrimin karşılaştırmalı olarak görselleri verilmektedir (Dvorak, 2007).



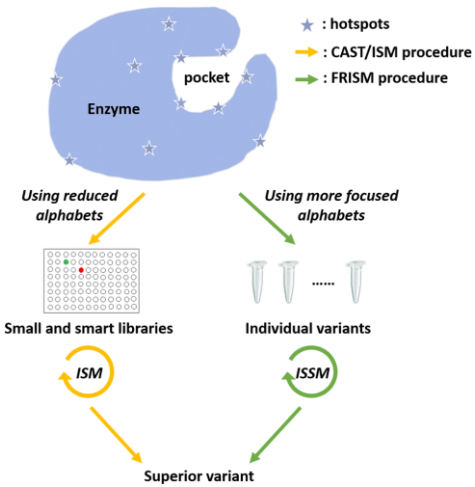
Şekil 3: Rasyonel tasarım ve yönlendirilmiş evrimin karşılaştırılması (Dvorak, 2007).

3.3 Kombinatoryal yaklaşım

Rasyonel tasarım ve yönlendirilmiş evrim kimi zaman bir kombinasyon halinde uygulanmaktadır. Bu sayede her iki yaklaşımın sınırlılıkları da kısmen giderilerek daha başarılı sonuçlar elde edilebilmektedir. Yaygın olarak kullanılan bölge doyurma

mutagenez tekniği (SSM) ile bir amino asidin kendisi haricindeki diğer 19 farklı amino asit ile değiştirilmesi mümkün hale gelmektedir. Bu yöntem sonucunda, hedeflenen pozisyonda her biri farklı bir kodona sahip klonlardan oluşan bir koleksiyon elde edilir ve bu nedenle bu koleksiyon "doymuş" olarak adlandırılır. Bölge doyurma mutagenez yöntemi, bölge spesifik mutageneze göre tüm olası değişimleri içermesi sebebiyle daha avantajlıdır. Bu da hem hedef pozisyondaki orijinal amino asidin işlevini daha kapsamlı bir şekilde analiz etmeye olanak tanır hem de daha iyi varyantların oluşma ihtimalini arttırır (Siloto ve ark., 2012).

SSM'nin yanısıra, iteratif doygunluk mutagenezi (ISM), kombinatoryal aktif bölge doygunluk testi (CAST) ve odaklanmış rasyonel iteratif doygunluk mutagenezi (FRISM) gibi yöntemler de bulunmaktadır (Bao ve ark., 2024). Bu yöntemler de SSM ile benzer prensipler üzerine kurulmakla birlikte, gerçekleştirilen mutasyonların birbirini takip eden aşamalarda yapılması ve her seferinde daha iyi mutantların elde edilmesi ile SSM'den biraz farklılaşır. Bu yöntemler ile ilgili diyagram Şekil 4.'te gösterilmektedir.



Şekil 4: Kombinatoryal yaklaşıma örnekler (Qin ve ark., 2024)

4. Makine Öğrenmesi

Geçtiğimiz son birkaç on yılda, makine öğrenmesi hayatımızın içine entegre olmuş durumdadır. Makine öğrenimi, veriler üzerine öngörücü modeller kurma veya veriler içinde anlamlı gruplamalar belirleme sürecini ifade etmektedir. Makine öğrenmesi özellikle analiz edilmek istenen veri kümesi çok büyük (çok sayıda veri noktası içeriyor) veya çok karmaşık (çok sayıda değişken barındırıyor) olduğunda ya da veri analizinin otomatikleştirilerek tekrarlanabilir ve zaman açısından verimli bir süreç haline getirilmesi gerektiğinde oldukça etkilidir.

Günümüzde gerek yeni ve ileri nesil DNA dizileme teknolojilerinin gelişmesi, gerekse omik teknolojilerin daha ulaşılabilir ve uygulanabilir olması sebebiyle biyolojik veri setleri yukarıda sayılan özellikleri taşımaktadır. Bu verilerin rasyonel ve karşılaştırmalı analizi geleneksel tekniklerden ziyade makine öğrenmesi gibi daha yeni teknikler ile yapılabilir hale gelmiştir. Bir başka deyişle, biyolojik veri bolluğunu anlamlandıracak pratik yöntemlere sahip olmak ve kullanılan teknikleri derinlemesine anlamak giderek daha kritik hale gelmektedir (Greener ve ark., 2022).

Makine öğrenmesi verilerin tanımlanması, analiz edilmesi ve verilerden çıkarımlar yapılması için algoritmalar kullanan bir hesapsal araçlar kümelerinden oluşmaktadır. Makine öğrenmesi algoritmaları, enzimler, diziler, aktif bölgeler veya ilgili verilerin diğer bileşenleri arasındaki ilişkileri veya enzim patern ve motiflerini tanımlayabilir; tahminlerde bulunabilir ve belirli bir akademik veya endüstriyel hedefe ulaşmak amacıyla uygun aksiyonların gerçekleştirilmesine yardımcı olabilir. Yaşam bilimlerinde ML'nin dikkat çeken uygulamaları arasında ilaç keşfi, yeni tıbbi tedavilerin geliştirilmesi, enzim tasarımı ve sentezi ile belirli enzimatik özelliklerin ve yeteneklerin hedeflenmesi yer almaktadır (Markus ve ark., 2023). ML’in gerçekleştirilebilmesi için gerekli olan veritabanları oldukça fazla sayıda biyolojik bilgi içermektedir. Bunlar kimi zaman deneysel olarak elde edilen

sonuçlara ait veriler olabildiği gibi kimi zaman da deneysel veriler kullanılarak tahminlenen ve otomatik oluşturulan verilerdir. Tablo 3'de bu amaçla en yaygın olarak kullanılan veritabanları gösterilmektedir.

Tablo 3: Makine Öğrenmesi ile enzim mühendisliğinde kullanılan bazı veritabanları ve özellikleri (Mazurenko ve ark., 2019)

Veritabanı	**Özellik**
InterPro	Protein aileleri ve domainleri veritabanları konsorsiyumu
UniProtKB	Protein dizileri
Protein Data Bank	Protein yapıları
Brenda	Reaksiyon, spesifisite, kinetik parametreler, genomik diziler, yapı ve stabilite gibi fonksiyonel veri
EzCatDb	Reaksiyon, kofaktörler, ara ürünler, katalitik domainler ve yapılar ile ilgili fonksiyonel veri
M-CSA	Katalitik aminoasitler, kofaktörler ve reaksiyon mekanizması
FireProtDB	Mutasyonlar sonrası termostabilite değişimi
ProTherm	Mutasyon sonrası termostabilite değişimi
eSOL	Protein çözünürlüğü
SoluProtMut DB	Mutasyon sonrası çözünürlük değişimi
TargetTrack	Çözünürlük
ProtaBank	Her türlü protein mutasyonel veri

Enzim mühendisliğinde makine öğrenmesi uygulamaları yönlendirilmiş evrim veya rasyonel tasarıma bir alternatif olmaktan çok, onların gerçekleştirilmesinde ve istenilen özelliklere sahip enzimlerin elde edilmesinde daha başarılı sonuçlar alınması için yeni nesil teknolojiler olarak görülmektedir. Biyoinformatik ve makine öğrenmesi algoritmaları enzim mühedisliği uygulamaları için hızlı ve ucuz bir başlangıç noktası bulunmasını sağlarken, bir yandan da tamamen yeni enzimlerin tasarlanmasına olanak sağlamaktadır (Markus ve ark., 2023).

Enzim mühendisliğinde makine öğrenmesi uygulamalarına yönelik literatürde yer alan araçlar Feehan ve ark. (2022) tarafından derlenmiş olup, ayrıntılı olarak Tablo 4.'te gösterilmektedir.

Tablo 4: Enzim çalışmalarında kullanılan makine öğrenmesi araçlarından bazıları (Feehan ve ark., 2022)

ML araç adı	**Uygulama amacı**	**Referans**
DeepEC	Tam EC numarası tahmini	Ryu ve ark., 2019
ECPred	Tam veya kısmi EC numarası tahmini	Dalkiran ve ark., 2018
PREvaIL	Protein yapısında katalitik bölgelerin tahmin edilmesi	Song ve ark., 2018
3DCNN	Enzim reaksiyon bölgesinin tahmin edilmesi	Torng ve Altman, 2019
MAHOMES	Proteine bağlı metal iyonlarının tahmini	Feehan ve ark., 2021
POOL	Protein yapısında katalitik bölgelerin tahmin edilmesi	Somarowthu ve ark., 2011
SoluProt	*E. coli* ekspresyon sisteminde enzim çözünürlüğünün tahmin edilmesi	Hon ve ark., 2021
innov'SAR	Epoksit hidrolaz enzimlerinin streoselektivitesi için yönlendirilmiş evrim uygulamasında mutant kütüphanelerin boyutunun azaltılması	Cadet ve ark., 2018

Yukarıdaki listelenen veritabanları ve ML araçları kullanılarak enzimlerin stabilite, aktivite, streoselektivite, pH/termal stabilite gibi özelliklerinin iyileştirilmesine yönelik çalışmalar gerçekleştirilebilmektedir. Tablo 5'te ise ML ve enzim mühendisliğinin kesiştiği yakın zaman çalışmalarına örnekler verilmiştir.

Tablo 5: ML ile enzim mühendisliği uygulamalarına örnekler (Zhou ve Huang, 2024)

Enzim	Hedeflenen/Geliştirilen Özellik	Veri Seti	Referans
Transpeptidaz	Aktivitenin iyileştirilmesi	80 varyant dizisi	Saito ve ark., 2021
PET hidrolaz	Hidrolitik aktivitenin ve termostabilitenin iyileştirilmesi	PDB'den 19000'in üzerinde 3 boyutlu yapı	Lu ve ark., 2022
Ksilen monooksigenaz	2-6 ksilenol degradasyonu için substrat spesifisitesinin arttırılması	126 varyant dizisi	Ogawa ve ark., 2023
Sitokrom P450	Substrat kanal esnekliğinin ve katalitik performansın artırılması	165 varyant dizisi	Liu ve ark., 2023
Epoksit hidrolaz	Enantioselektivitenin arttırılması	37 varyant dizisi	Cadet ve ark., 2018
Hidrolazlar	Kinetik çözülme (resolution) sonuçlarının tahminlenmesi	672 hidrolaz-substrat kompleksi	Ran ve ark., 2023
Proteaz	Enzim spesifisitesinin tahmin edilmesi	Proteaz varyantlarının oluşturduğu peptitlerin analizi	Lu ve ark., 2023
-	Enzimlerde kofaktör spesifisitesinin dönüşümünde etkili aminoasitlerin belirlenmesi	Farklı kofaktör spesifisitelerine sahip 952 enzim	Sugiki ve ark., 2022
Lipaz	Metanol toleransının arttırılması	266 varyant dizisi	Ma ve ark., 2023
-	Enzim-substrat ilişkisinin tahmin edilmesi	18351 anote edilmiş enzim-substrat kompleksi	Kroll ve ark., 2023
-	Enzimlerin optimum katalitik sıcaklığını ve erime sıcaklığını tahmin etme	3 milyon enzim dizisi	Li ve ark., 2022

5. Sonuç

Enzimler ilaç, gıda, tarım, tekstil, deterjan ve biyoenerji gibi birçok sektörde biyokimyasal dönüşümleri gerçekleştirebilen, önemli bir pazar payına sahip olan biyolojik katalizörlerdir. Her ne kadar uzun yıllardan beri kullanılıyor olsalar da spesifiklik,

selektivite, termostabilite, pH stabilitesi, organik solventlere karşı direnç, katalitik aktivite gibi bazı özelliklerin iyileştirilmesi veya enzimlerin yeni reaksiyonları katalizleyebilir hale getirilmesi amacıyla protien mühendisliği çalışmaları yapılmaktadır. Yönlendirilmiş evrim, rasyonel tasarım veya bunların kesişiminde konumlanan teknikler ile sadece enzimlerin belirli özellikleri geliştirilmekle kalmayıp aynı zamanda proteinlerin yapısı ve yapı-fonksiyon ilişkisi hakkında oldukça kapsamlı bilgiler edinilmiştir. Günümüzde -omik teknnolojilerin de gelişimine bağlı olarak biyolojik veri eldesi daha kolay hale gelmiş, proteinlere ait verilerin depolandığı veritabanları oluşturulmuştur. Son yıllarda hayatımızın her alanına giren makine öğrenmesi araçları ile de bu büyük verilerin analizi mümkün hale gelmektedir. Bu sayede proteinlere büyük veri setlerinden elde edilen bilgiler doğrultusunda istenilen özelliklerin kazandırılmasına yönelik çalışmalar hız kazanmıştır. Veritabanlarında yer alan bilgilerin güvenirliğinin arttırılması, daha büyük veri setleri ile oluşturulan ML araçlarının kullanılması ve bu algoritmaların moleküler dinamik/kuantum mekanik simülasyon gibi diğer hesapsal araçlar ile kombine şekilde kullanılması ve belki de en önemlisi oluşturulan araçların araştırmacıların kullanımına kullanıcı dostu bir arayüz ile sunulması ile çok daha etkili ve verimli sonuçların alınabileceği beklenmektedir.

6. Kaynaklar

Baek, M., DiMaio, F., Anishchenko, I., Dauparas, J., Ovchinnikov, S., Lee, G. R., ... & Baker, D. (2021). Accurate prediction of protein structures and interactions using a three-track neural network. *Science*, *373*(6557), 871-876.

Bao, Y., Xu, Y., & Huang, X. (2024). Focused rational iterative site-specific mutagenesis (FRISM): a powerful method for enzyme engineering. *Molecular Catalysis*, *553*, 113755.

Cadet, F., Fontaine, N., Li, G., Sanchis, J., Ng Fuk Chong, M., Pandjaitan, R., ... & Reetz, M. T. (2018). A machine learning approach for reliable prediction of amino acid interactions and its application in the directed evolution of enantioselective enzymes. *Scientific reports*, *8*(1), 16757.

Caldwell, R.C. & Joyce, G.F. (1992). Randomization of genes by PCR mutagenesis, PCR Methods and Applications, 2:28-33.

Dalkiran, A., Rifaioglu, A. S., Martin, M. J., Cetin-Atalay, R., Atalay, V., & Doğan, T. (2018). ECPred: a tool for the prediction of the enzymatic functions of protein sequences based on the EC nomenclature. BMC bioinformatics, 19, 1-13.

Dvorak, P. (2007). Methods Of Directed Evolution: Applications Towards Engineering of Haloalkane Dehalogenases, Masaryk University, Bachelor Thesis.

Enzyme Nomenculature, 2024. 12 Aralık 2024 tarihinde https://iubmb.qmul.ac.uk/enzyme/ adresinden alınmıştır.

Feehan, R., Franklin, M. W., & Slusky, J. S. (2021). Machine learning differentiates enzymatic and non-enzymatic metals in proteins. *Nature Communications*, *12*(1), 3712.

Feehan, R., Montezano, D., & Slusky, J. S. G. (2021). Machine learning for enzyme engineering, selection and design. *Protein Engineering, Design and Selection*, *34*, 1–10.

Hon, J., Marusiak, M., Martinek, T., Kunka, A., Zendulka, J., Bednar, D., & Damborsky, J. (2021). SoluProt: prediction of soluble protein expression in Escherichia coli. *Bioinformatics*, *37*(1), 23-28.

Hu, W. S., Bowman, E. H., Delviks, K. A., & Pathak, V. K. (1997). Homologous recombination occurs in a distinct retroviral subpopulation and exhibits high negative interference. *Journal of virology*, *71*(8), 6028-6036.

Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., ... & Hassabis, D. (2021). Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. Nature, 596(7873), 583-589.

Kikuchi, M., Ohnishi, K., & Harayama, S. (2000). An effective family shuffling method using single-stranded DNA. Gene, 243(1-2), 133-137.

Kroll, A., Ranjan, S., Engqvist, M. K., & Lercher, M. J. (2023). A general model to predict small molecule substrates of enzymes based on machine and deep learning. *Nature communications*, *14*(1), 2787.

Li, G., Buric, F., Zrimec, J., Viknander, S., Nielsen, J., Zelezniak, A., & Engqvist, M. K. (2022). Learning deep representations of enzyme thermal adaptation. *Protein Science*, *31*(12), e4480.

Liu, Y., Li, Z., Cao, C., Zhang, X., Meng, S., Davari, M. D., ... & Liu, L. (2023). Engineering of Substrate Tunnel of P450 CYP116B3 though Machine Learning. *Catalysts*, *13*(8), 1228.

Lu, C., Lubin, J. H., Sarma, V. V., Stentz, S. Z., Wang, G., Wang, S., & Khare, S. D. (2023). Prediction and design of protease enzyme specificity using a structure-aware graph convolutional network. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *120*(39), e2303590120.

Lu, H., Diaz, D. J., Czarnecki, N. J., Zhu, C., Kim, W., Shroff, R., ... & Alper, H. S. (2022). Machine learning-aided

engineering of hydrolases for PET depolymerization. *Nature*, *604*(7907), 662-667.

Ma, R., Li, Y., Zhang, M., & Xu, F. (2023). Methanol tolerance upgrading of Proteus mirabilis lipase by machine learning-assisted directed evolution. *Systems Microbiology and Biomanufacturing*, *3*(3), 427-439.

Markus, B., Andreas, K., Arkadij, K., Stefan, L., Gustav, O., Elina, S., & Radka, S. (2023). Accelerating biocatalysis discovery with machine learning: a paradigm shift in enzyme engineering, discovery, and design. *ACS catalysis*, *13*(21), 14454-14469.

Mazurenko, S., Prokop, Z., & Damborsky, J. (2019). Machine learning in enzyme engineering. *ACS Catalysis*, *10*(2), 1210-1223.

Ogawa, Y., Saito, Y., Yamaguchi, H., Katsuyama, Y., & Ohnishi, Y. (2023). Engineering the substrate specificity of toluene degrading enzyme XylM using biosensor XylS and machine learning. *ACS Synthetic Biology*, *12*(2), 572-582.

Patel, A. K., Dong, C. D., Chen, C. W., Pandey, A., & Singhania, R. R. (2023). Production, purification, and application of microbial enzymes. In Biotechnology of microbial enzymes (pp. 25-57). Academic Press.

Qin, Z., Yuan, B., Qu, G., & Sun, Z. (2024). Rational enzyme design by reducing the number of hotspots and library size. *Chemical Communications*, *60*(76), 10451-10463.

Ran, X., Jiang, Y., Shao, Q., & Yang, Z. J. (2023). EnzyKR: a chirality-aware deep learning model for predicting the outcomes of the hydrolase-catalyzed kinetic resolution. *Chemical Science*, *14*(43), 12073-12082.

Research and Markets, 2024, Enzymes Global Market Report 2024 – Market Size, Trends, And Global Forecast (2024-2033) (12 Aralık 2024 tarihinde https://www.researchandmarkets.com/reports/5733852/enzymes-

global-market report?srsltid=AfmBOoqjf0oIJjEOoP9BKDf4n7D7_k6w9cnODRbLxlv7hhHqB9vSOzLH adresinden ulaşılmıştır).

Ryu, J. Y., Changdai, G. U., Kim, H. U., & Lee, S. Y. (2019). DeepEC: a Computational Framework for Prediction of Enzyme Commission Numbers Using Deep Learning Method. *한국생물공학회 학술대회*, 442-442.

Saito, Y., Oikawa, M., Sato, T., Nakazawa, H., Ito, T., Kameda, T., ... & Umetsu, M. (2021). Machine-learning-guided library design cycle for directed evolution of enzymes: the effects of training data composition on sequence space exploration. *Acs Catalysis*, *11*(23), 14615-14624.

Sieber, V., Martinez, C. A., & Arnold, F. H. (2001). Libraries of hybrid proteins from distantly related sequences. *Nature Biotechnology*, *19*(5), 456-460.

Siloto, R. M. P., & Weselake, R. J. (2012). Site saturation mutagenesis: Methods and applications in protein engineering. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, *1*(3), 181–189. https://doi.org/10.1016/j.bcab.2012.03.010

Singh, R., Kumar, M., Mittal, A., & Mehta, P. K. (2016). Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. 3 Biotech, 6(2), 1–15.

Somarowthu, S., Brodkin, H. R., D'Aquino, J. A., Ringe, D., Ondrechen, M. J., & Beuning, P. J. (2011). A tale of two isomerases: compact versus extended active sites in ketosteroid isomerase and phosphoglucose isomerase. *Biochemistry*, *50*(43), 9283-9295.

Song, J., Li, F., Takemoto, K., Haffari, G., Akutsu, T., Chou, K. C., & Webb, G. I. (2018). PREvaIL, an integrative approach for inferring catalytic residues using sequence, structural, and network features in a machine-learning framework. *Journal of theoretical biology*, *443*, 125-137.

Sugiki, S., Niide, T., Toya, Y., & Shimizu, H. (2022).

Logistic regression-guided identification of cofactor specificity-contributing residues in enzyme with sequence datasets partitioned by catalytic properties. *ACS Synthetic Biology*, *11*(12), 3973-3985.

Torng, W., & Altman, R. B. (2017). 3D deep convolutional neural networks for amino acid environment similarity analysis. BMC bioinformatics, 18, 1-23.

Vardar-Yel, N., Tütüncü, H. E., & Sürmeli, Y. (2024). Lipases for targeted industrial applications, focusing on the development of biotechnologically significant aspects: A comprehensive review of recent trends in protein engineering. *International Journal of Biological Macromolecules*, 132853.

Vidal, L.S., Isalan, M., Heap, J. T., & Ledesma-Amaro, R. (2023). A primer to directed evolution: current methodologies and future directions. RSC Chemical Biology, 4(4), 271–291.

Wang, Y., Xue, P., Cao, M., Yu, T., Lane, S. T., & Zhao, H. (2021). Directed evolution: methodologies and applications. *Chemical reviews*, *121*(20), 12384-12444.

Xiong, W., Liu, B., Shen, Y., Jing, K., & Savage, T. R. (2021). Protein engineering design from directed evolution to de novo synthesis. Biochemical Engineering Journal, 174(February), 108096.

Zhou, J., & Huang, M. (2024). Navigating the landscape of enzyme design: from molecular simulations to machine learning. Chemical Society Reviews, 53(16), 8202–8239.

BÖLÜM XIII

Akciğer Kanserlerinde Yeni Nesil Dizileme

Neslihan KAYA TERZİ[1]

Giriş

Akciğer kanseri patologların hematoksilen eozin (H&E) boyalı slaytları incelemesine göre, Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri (KHDAK) (~%85) ve Küçük Hücreli Akciğer Kanseri (~%15) olarak sınıflandırılmaktadır (Saller&Boyle,2022). KHDAK, akciğer adenokarsinomunun (AAK) en yaygın histolojik tip (~%50) ve skuamöz hücreli akciğer kanserinin (SHAK) ikinci en yaygın (~30%) olduğu heterojen bir kategoridir (Pikor &ark., 2013). Büyük hücreli akciğer karsinomu (BHAK) (~10%) ve adenoskuamöz karsinom (ASK) gibi histolojik fenotiplerin kombinasyonları ve atipik karsinoid (AK), bronşiyal bez karsinomu ve sarkomatoid karsinom gibi nadir histolojik varyantlar birlikte KHDAK tiplerininin kalan kısmını (~10%) oluştururlar (Li &Lu, 2018, Weissferdt, 2018).

[1] Dr.Öğr.Üyesi, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı, Çanakkale/Türkiye, Orcid: 0000-0001-8184-4691, neslihankaya88@hotmail.com

Rutin klinik uygulamada, akciğer kanseri olan hastalar genellikle H&E'de KHDAK'yi KHAK'den tanısal olarak ayırt edebilecek histomorfolojik özellikler olup olmadığını belirlemek için başlangıçta biyopsiye tabi tutulurlar (Chirieac & Kobzik, 2017). İmmünohistokimya (İHK) genellikle KHDAK alt tiplerini belirlemede yardımcı olur. AAD'de CK7 ve TTF-1 için pozitif ve p63, CK5/6 ve p40 için negatiftir. SHAK'yi destekleyen İHK genellikle p63, CK5/6 ve p40 için pozitif ve TTF-1 ve CK7 için negatiftir (La Salvia &ark.,2024). Birçok patolog, pratikte bazı tümörlerin geleneksel İHK boyama desenleri hakkında 'kitabı okumamış' olabileceğinin farkındadır, bu nedenle tanı vermek zor hale gelebilir. Bu gibi durumlarda, musin gibi diğer özel boyalar yardımcı olabilir (örneğin, musin genellikle AAD için pozitif ve SHAK için negatiftir). ASK'ler nadir görülen iki fazlı tümörlerdir, yani bir AAD bileşeni ve bir SHAK bileşeni vardır. Tanımı gereği, bunların her biri en az %10 oranında kötü huylu skuamöz ve glandüler elemanlara sahiptir. KHAK ve BHAK gibi nöroendokrin karsinomlarda, nöroendokrin İHK belirteçleri (CD56, kromogranin ve sinaptofizin) genellikle pozitiftir. KHDAK için, PD-L1 için İHK tabanlı bir antikor (örneğin, PD-L1 I 22C3 pharmDx), immünoterapiye uygunluğu belirlemede yardımcı olur (Reck, Remon & Hellmann, 2022). Doku Yeni Nesil Dizileme (NGS) için gönderildiğinde, EGFR, KRAS ve BRAF'taki mutasyonlar pirosekanslama gibi hızlı yöntemlerle seçici olarak test edilebilirken, ALK ve ROS1 yeniden düzenlemeleri Floresan insitu hibridizasyon (FISH) ile hızla tanımlanabilir. NGS sonuçları mevcut hale geldikçe, hızlı test sonuçlarını doğrulayabilir ve potansiyel olarak uygulanabilir hedefler olabilecek diğer gen değişikliklerini gösterebilmektedir (Saller&Boyle,2022).

H&E, İHK, hızlı test ve/veya NGS için yeterli doku elde etme ihtiyacı, özellikle akciğer biyopsilerinde iatrojenik pnömotoraks gibi istenmeyen olay riskine karşı dengeli bir şekilde örnekleme yapılmasını gerektirmektedir. Hekim ve hasta, tanısal faydayı ve riskleri dengelemek için hastanın tanısal doku örnekleme

prosedürüne girmek için açık ve bilgilendirilmiş onam verip vermediğini tartışmalıdır (Nooreldeen & Bach, 2021).

İleri evre KHDAK hastalarında daha fazla onkojenik etken belirlendikçe yeni hedefli tedavi seçenekleri ortaya çıkmaya devam etmektedir. Amerikan Klinik Onkoloji Derneği-Ontario Sağlık (ASCO-OH), Ulusal Kapsamlı Kanser Ağı (NCCN), Uluslararası Akciğer Kanseri Çalışmaları Derneği/Amerikan Patologlar Koleji (IASLC/CAP) ve Avrupa Tıbbi Onkoloji Derneği (ESMO) ve ESMO'nun güncellenen kılavuzları, EGFR, ALK, ROS1, BRAF, HER2, KRAS, MET, NTRK ve RET'teki eyleme geçirilebilir değişiklikleri ve PD-L1 için immünohistokimyayı belirlemek üzere NGS platformları kullanılarak kapsamlı testler yapılmasını önermektedir (Tablo 1) (Kuang &ark.,2022, National Comprehensive Cancer Network Version 3.2022, Lindeman &ark.,2018). Eyleme geçirilebilir genomik değişiklikler belirlenirse, hastalar hedefli tedavi seçeneklerine erişebilir ve bu da sitotoksik kemoterapiye kıyasla yanıt oranı, yaşam kalitesi, progresyonsuz sağkalım ve potansiyel olarak genel sağkalım açısından hasta sonuçlarını iyileştirebilir. Bu nedenle, daha geniş NGS platformlarının uygulanması, KHDAK'li hastaların rutin tanısı ve yönetiminde elzem hale gelmiştir. Yönetilen bakım sistemlerinde, daha geniş testlerin maliyetinin ve hasta bakımı üzerindeki etkisinin değerlendirilmesine de ihtiyaç vardır.

Tablo 1: Tümör süpresör gen ve onkogenler

Tümör süpresör genler	BRCA2	CDKN2A	KEAP1	MLL2
	NF1	PTEN	RB1	STK11
	TP53	TSC1	VHL1	
Onkogenler	AKT1, AKT2	ALK	BRAF	DDR2
	EGFR	ERBB2	FGFR1	HRAS
	JAK3	KIT	KRAS	MET
	NRAS	NRF2	NTRK 1,2,3	PIK3CA
	RET	RICTOR	ROS1	SOX2

Biyomedikal araştırmalarda, özellikle kanser teşhisi ve tedavisi bağlamında, genetik ve genomik analizler giderek daha önemli hale gelmiştir. Bu analizlerin çoğu, kanonik bazlar Adenin, Guanin, Timin ve Sitozin'den oluşan belirli bir DNA hedef dizisinin nükleotid çözünürlük bilgilerini karakterize etme süreci olan bir tür DNA dizilemesine dayanmaktadır. Belirli bir hastalık için kritik tanı, prognoz ve/veya öngörü bilgisi, bir hastanın genomunda kalıtılan germ hattı ve/veya edinilmiş somatik varyantları güvenilir bir şekilde tespit ederek elde edilebilir. DNA dizi teknolojisi 1970'lerden beri mevcuttur ve Sanger dizisi altın standart haline gelmiştir (Larson &ark., 2023). Sanger dizilemesinin dizilenebilen genomik içerik açısından sınırlamaları vardır. 2004 yılında, Roche/454 FLX Pyrosequencing Sistemi, artık yaygın olarak NGS olarak bilinen ticari dizileme teknolojilerinin yeni bir dönemini başlattı. NGS, milyonlarca Sanger dizileme deneyini aynı anda yürütmek gibi, DNA'nın büyük çaplı paralel dizilemesini mümkün kılan devrim niteliğinde bir teknoloji sıçramasıdır. Bu yüksek verimli "shotgun" yaklaşımı kullanılarak tüm genomlar hızla dizilenebilir. Bu kadar yüksek verime, maliyette önemli bir düşüş eşlik eder ve kişiselleştirilmiş genomik ve hassas tıbbı modern bir gerçeklik haline getirir. Ancak NGS'nin ürettiği muazzam miktardaki veri, sonuçları anlamlı ve eyleme geçirilebilir kılmak için

büyük bilgi işlem kaynakları ve gelişmiş biyoenformatik yazılımları gerektirir (Shendure &ark., 2005).

NGS, yoğunlaştırılmış bir zaman diliminde ve hasta başına uygun maliyetli bir oranda çok sayıda nükleotidin dizilenmesini sağlar (Mosele &ark., 2020). NGS, sürücü ve/veya hedeflenebilir genomik değişiklikleri belirleme amacıyla, uzun ve karmaşık genlerin yanı sıra tek bir tümör örneğindeki birden fazla geni dizilemek için yakın zamanda klinik ortamlara entegre edilmiştir. Çığır açan araştırmalar, NGS'nin klonal olarak baskın değişikliklerin tespiti için sağlam analitik geçerlilik sağladığını göstermiştir (Pagès &ark., 2017, Frampton &ark., 2013). Bu kanıt ışığında, birçok şirket ve akademik kurum tedavi kararlarını bilgilendirmek için NGS analizini benimsemiştir.

Hedefli tedavilerdeki ilerlemeler nedeniyle birçok gen varyantı için KHDAK tedavi kılavuzları güncellenmiştir. Metastatik KHDAK'de, birinci ve sonraki basamaklardaki sitotoksik kemoterapiyle karşılaştırıldığında, hedefli tedavi ile tedavi yanıt oranında, yaşam kalitesinde, progresyonsuz sağ kalımda ve genel sağ kalımda iyileşme sağlayabilir. Erken evre KHDAK'de adjuvan ortamda hedefli tedavinin rolü klinik çalışmalarda araştırılmaya devam etmektedir. Terapötik etkilerine ek olarak, onkojenik varyantların tanımlanması değerli prognostik ve öngörücü bilgiler sağlar (Trédan &ark., 2019).

Örnek boyutu ve kalitesi testin başarılı sonuç vermesi için önemli olmaya devam etmektedir (Lim &ark., 2017). NGS aynı anda birden fazla gen için sonuçlar sağlayabilir ve bu sayede birden fazla ardışık test için doku kullanılmasına gerek kalmaz. Ancak, dokunun çok küçük olduğu durumlarda, İHK, KHDAK'li hastalarda ALK ve ROS1 yeniden düzenlenmesinin ve PD-L1 ekspresyonunun hızlı değerlendirilmesi için önemli bir yöntem olmaya devam etmektedir (Kuang &ark.,2022, Makarem &ark., 2021, Hwang &ark., 2021). İHK, daha kısa geri dönüş süreleri gerektiğinde ve NTRK gibi

füzyon genlerinin tespiti için NGS'ye göre avantajlara da sahip olabilir. Onkojenik proteinlerin ekspresyonunun İHK tarafından tanımlanması, hedeflenen tedaviye verilen yanıtı da tahmin edebilir. NGS kullanımı, hedeflenen tedaviye uygun nüfusu hızla genişletmektedir. Ancak, özellikle kamu tarafından finanse edilen sistemlerdeki veya özel ilaç sigortası olmayan birçok hasta, yüksek maliyet nedeniyle bu yeni ajanlara erişmekte zorluk çekebilir (Leighl &ark., 2021). Torasik onkolojide tanı ve tedavi ilerlemeleri devam ederken, genomik değişikliklerin tanımlanması, hasta ve sistem sonuçlarını iyileştiren yeni tedavilere erişme yeteneğimiz için kritik öneme sahiptir. Mevcut kılavuzlar, tek nükleotid varyantları, küçük eklemeler/silmeler, füzyonlar ve kopya sayısı varyasyonları dahil olmak üzere birden fazla değişiklik türünün kapsamlı bir değerlendirmesini önermektedir. Klinik sonuçlar üzerindeki etki göz önüne alındığında, bakım standardı moleküler test gereksinimleri geliştikçe kapsamlı ve uygun fiyatlı NGS panellerinin geliştirilmesi esastır.

NGS sistemindeki teknolojik yenilikler kanser genomiklerinde önemli ilerlemelere yol açmıştır ve kanser genomik bilgisi artmaya devam etmektedir (Kunimasa &ark., 2022). KHDAK'de hedeflenebilir sürücü mutasyonlarının tanımlanması ve moleküler olarak hedeflenen tedavilerin geliştirilmesi ve klinik uygulaması hızla ilerlemektedir ve hedeflenebilir sürücü mutasyonlarının sayısı diğer solid tümörlere kıyasla artmaktadır. ALK füzyon geni , ROS1 füzyon geni, BRAF mutasyonu, MET ekzon14 atlanmış mutasyonu, ve RET füzyon geni son on yılda gerçekleşmiştir (Kunimasa &ark., 2022, Peters &ark., 2017). Yeni hedeflenebilir sürücü mutasyonlarının tanımlanması ve ilgili ilaçların geliştirilmesinin devam etmesi beklenmektedir (Middleton &ark., 2020). Sistemik tedaviye başlamadan önce NGS analizi ile kanser genomu hakkında doğru ve hızlı bilgi edinilmesi KHDAK yönetiminde olmazsa olmaz hale gelmiştir.

NGS’nin kullanımı daha uygun maliyetli ve yaygın olarak kullanılabilir hale geldikçe, ek eyleme dönüştürülebilir genomik değişiklikler ortaya çıkmıştır. NGS'nin daha geleneksel yöntemlerle uyumlu veya hatta onlardan üstün olan doğru bir teknoloji olduğuna dair kanıtlar birikmektedir (Saller&Boyle,2022). Kapsamlı genomik profillemeden (CGP) eyleme dönüştürülebilir genomik değişikliklere ilişkin artan bilgi, hedefli tedaviler için genomik değişikliklerin kanıta dayalı yorumlanmasını sağlamak üzere hassas tıbbı ilerletmiştir (Coco&ark., 2015). Akciğer kanserinde eyleme dönüştürülebilir olarak tanımlanan gen değişikliklerinin çeşitliliği, NGS tarafından kapsanan gen ve gen değişikliklerinin sayısındaki artışla artmıştır. Sürücü belirlenemeyen akciğer kanseri vakalarının sayısı, ileri akciğer kanserinde NGS tabanlı testlere geçişle azalmıştır. Giderek artan sayıda vaka raporu, yalnızca etkin nokta tabanlı paneller tarafından değerlendirilmiş olsalardı tanımlanamayacak olan, NGS tarafından tanımlanan yeni sürücülere sahip hastaları tanımlamaktadır (Capelletti &ark., 2014).

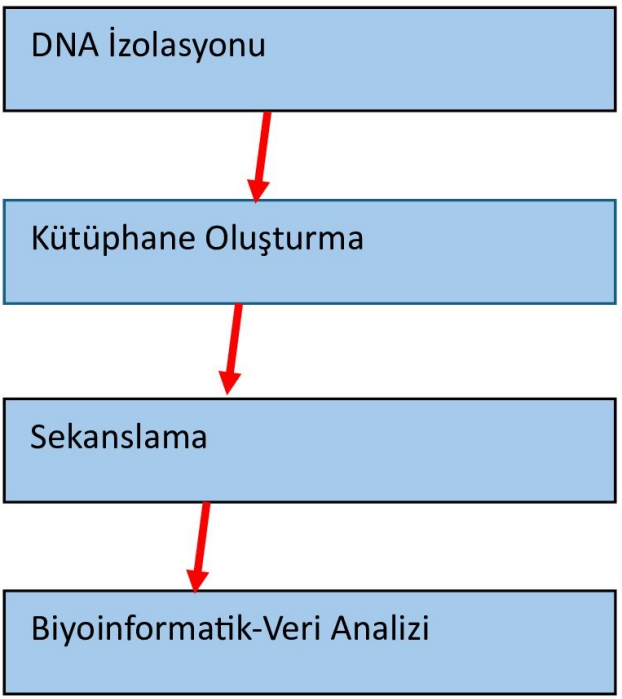
NGS tabanlı DNA dizilemesinin kullanılabilirliği arttıkça, genetik biyobelirteçlerin ötesinde potansiyel olarak eyleme geçirilebilir olan ve FDA onaylı hedefli tedavilerle ilişkili farklı mutasyon tiplerine ilişkin bilgi genişledi (Chan & Hughes, 2015). Bir onkogen, aktive edici mutasyonların nihayetinde onkogenezi teşvik eden bir gene işlev kazandırdığı bir gendir. Tümör baskılayıcı genler (TSG'ler) durumunda, inaktive edici mutasyonlar işlev kaybına yol açar ve nihayetinde kanser gelişimini teşvik eder.

Akciğer kanserinin moleküler özellikleri hasta bakımı için kritik öneme sahiptir ve NCCN yönergelerinde (NCCN 2021) yer almaktadır. Ayrıca genom çapında ilişki çalışmaları (GWAS) gibi epidemiyolojik çalışmalar için de önemlidir (Tam&ark., 2019). Hasta bakımında klinik olarak ilgili genetik değişikliklerin artan kullanımı, kanıta dayalı çalışmalar ve klinik denemelerin sonucudur. Belirli akciğer kanseri genotiplerine dayalı olarak belirli tedavilere yanıt olasılığını belirlemeye yönelik klinik ihtiyaç, akciğer

kanserinde tekrarlayan şekilde gözlemlenen genetik değişiklik çeşitliliğini karakterize etme çabalarını yönlendirmiştir (Shim&ark., 2017).

Yaygın bir sınıf olarak, tirozin kinaz inhibitörleri (TKI'ler), çeşitli KHDAK genotipleri için hedefli tedaviler olarak etkili olmuştur. EGFR, ERBB2 (HER2), BRAF'taki mutasyonlar ve ALK, RET ve ROS1'deki yeniden düzenlemeler, farklı TKI'ler tarafından özel olarak hedeflenir (Saller&Boyle,2022).

NGS sisteminin çalışma şeması Şekil 1'de gösterildiği gibidir.



Şekil 1: Yeni Nesil Dizileme çalışma akış şeması.

DNA İzolasyonu

Dizilemeden önce, büyük ölçüde paralel NGS teknolojileri için gereken birkaç ilk örnek hazırlama adımı vardır. Bu adımlar doğrudan biyoenformatikle ilgili değildir. Ancak, kullanılan biyoenformatik algoritmaları üzerinde aşağı yönlü bir etkiye sahip olabilirler. İlk adım, giriş doku örneğinden DNA'nın izole edilmesidir. Dizileme uygulamasına ve doku türüne bağlı olarak, DNA ekstraksiyonu için gereken örnek miktarı değişir. Katı doku örnekleri için, dokuyu elde etmek ve korumak için kullanılan yöntemler (yani, taze dondurulmuş veya formalinle sabitlenmiş parafine gömülmüş [FFPE]) de önemlidir. Genellikle, her iki koruma yönteminden 8 mm3'lük bir doku hacmi, tipik DNA giriş gereksinimleri 10 ila 1000 ng4,5 arasında değiştiği için çoğu dizileme uygulaması için yeterlidir. Çıkarılan DNA, kalite, verim ve konsantrasyon dahil olmak üzere çeşitli parametreler açısından test edilecektir. FFPE dokusundan elde edilen DNA, taze dondurulmuş dokuya göre fiksasyon ve koruma işlemlerinden kaynaklanan hasara karşı daha hassastır (Larson&ark., 2023).

Saflık Tahmini

Tümör dizilemesi için, başlangıç örneğinin patolojik özellikleri, özellikle tümör hücresi saflığının bazı kaba tahminleri önemlidir. Daha düşük tümör saflığı, örnekte somatik mutasyonların daha düşük yaygınlığına yol açacağından, bunun somatik değişiklikleri tespit etmek için kullanılan diğer dizileme deneyi parametreleri için etkileri vardır. Patoloji tabanlı saflık tahmini, uygun eşikler uygulamaya ve dizileme koşullarına bağlı olarak değişebileceğinden, önemli bir dizileme öncesi kalite güvence adımıdır. Bazı yaklaşımlar, dizileme çıktısından tümör saflığını tahmin etmek için de kullanılabilir ve bu daha sonra patoloji tabanlı tahminlerle karşılaştırılabilir. Bununla birlikte, bu tahminler farklı koşullar altında (örneğin, yüksek genomik instabilite) hataya

eğilimli olabilir ve dikkatli bir şekilde yorumlanmalıdır (Gupta&ark., 2020).

Kütüphane Hazırlığı

Çıkarım ve izolasyondan sonra, DNA'nın NGS için hazırlanması gerekir, buna yaygın olarak "kütüphane hazırlığı" denir. İlk adım, girdi DNA'sını dizilemeye uygun daha küçük parçalara ayırmaktır; bu, mekanik yollarla veya enzimatik bir reaksiyonla yapılabilir. Bunu, DNA parçalarının her iki ucuna belirli kısa adaptör dizilerinin veya oligomerlerin bağlanması izler, bunlara artık ekler denir (yani, adaptörler arasına "yapıştırılan" genetik dizi). Belirli NGS uygulaması için tekdüze ve uygun bir ek boyutu sağlamak ve herhangi bir adaptör dimerinin varlığını azaltmak için, bu adımı genellikle ek boyutu seçimi izler. Son olarak, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) tabanlı amplifikasyon genellikle dizilemeden önce toplam DNA konsantrasyonunu artırmak için uygulanır. Bu işleme adımlarının çıktısı daha sonra dizilemeye hazır olan girdi kütüphanesi olarak adlandırılır (Malapelle&ark., 2022).

Hedef Gen Dizileme

Hedeflenmemiş tüm genom dizilemesinin (WGS) aksine, hedeflenen gen panelleri gibi genomun seçilmiş bölgelerinin dizilenmesine sıklıkla ilgi duyulur. Genom, tüm protein kodlayan genlerin (yani ekzonların) kodlama bölgelerinden oluşur ve toplam genomun yaklaşık %1,5'ini temsil eder. Bu nedenle, tüm ekzon dizilemesi (WES) keşif tabanlı araştırmalar için potansiyel olarak yüksek etkili genetik varyasyonu yakalamak için oldukça etkili bir strateji olabilir. Gen panelleme, ilgi duyduğunuz genler hakkında kapsamlı önceki biyolojik bilginiz varsa da çok faydalı olabilir. Tasarımın dışındaki bölgelerin karakterize edilmemiş olması ve genetik bağlamlarının bilinmemesi, genel olarak hedeflenen dizilemenin içsel bir sınırlamasıdır. Dahası, yapısal varyasyonlar gibi diğer DNA değişikliği türlerinin tanımlanması genellikle daha

zordur. Hibridizasyon yakalama ve amplikon bazlı dizileme, hedeflenen dizileme için iki ana stratejidir. Bu problar, ilgi duyduğunuz DNA parçalarını zenginleştirmek için dizileme kütüphanesindeki eklerdeki tamamlayıcı DNA dizilerine bağlanmak üzere tasarlanmıştır. Amplikon bazlı zenginleştirme ise dizileme için genomun belirli bölgelerinin çoğaltılmasıyla sonuçlanan yan PCR primer dizilerinin tasarımına dayanır (Yin, Butler& Zhang, 2021).

Birden fazla örnek kütüphanesini bir araya getirip hepsini aynı anda dizilemek verimli ve uygun maliyetlidir. Buna multipleksleme denir ve dizileme sırasında örnek kimliklerini korumanın bir yolunu da gerektirir. Bu, her örnek için benzersiz olan ek parçaya bağlı ek bir oligonükleotidin (genellikle 8 ila 12 baz uzunluğunda) kullanılmasıyla yapılır. Dizin dizileri, ham dizi çıktısını da multiplekslemek ve her örneğe yeniden atamak için bir mekanizma sağlar (Larson&ark., 2023).

Şu anda farklı üreticilerden birçok özel NGS teknolojisi mevcuttur ve uygun platform genellikle örnek özelliklerine ve nihai analitik hedeflere bağlıdır. Örnekleme amacıyla, en yaygın kullanılan NGS platformlarından biri olduğu ve yaygın olarak uygulanabildiği için Illumina Sekanslama Tabanlı Sentez (SBS®) teknolojisi (Illumina, San Diego, CA) hakkında daha fazla bilgi sağlamaktayız. Illumina SBS işlemi, hazırlanan kütüphanenin, kütüphane hazırlamada kullanılan adaptör dizisine karşılık gelen küçük oligomerlerle kaplanmış katı bir substrat veya akış hücresine yüklenmesini içerir. Farklı dizileme deneylerine uyum sağlamak için birden fazla şerit, genellikle akış hücresinin fiziksel tasarımına dahil edilir. Kütüphaneler akış hücresine yüklendikten sonra, köprü PCR bağlı DNA parçalarını çoğaltır ve bunun sonucunda binlerce DNA parçası kopyasından oluşan klonal dizi kümeleri oluşur (Bestard-Cuche&ark., 2024).

Illumina SBS kimyası, rastgele iplik sonlandırma PCR'sine dayanan Sanger dizilemesine benzer şekilde çalışmaktadır. Sanger

dizilemesi, tasarlanmış bir primerin tek bir DNA ipliğine bağlanmasına izin vermek için hedef DNA dizisinin denatüre edilmesini ve soğutulmasını içerir. Daha sonra DNA polimeraz, şablon DNA'nın tamamlayıcı ipliğini tamamlanana kadar uzatır. DNA polimerazının tamamlayıcı ipliği daha fazla uzatmasını engelleyen az miktarda floresanla etiketlenmiş dideoksinükleotidler (ddNTP'ler), dizinin kendisini karakterize etmek için eklenir. Birden fazla PCR döngüsü ve ddNTP'lerden rastgele zincir sonlandırma, her nükleotid pozisyonunda sonlanan ve jel elektroforezi ve sonraki analizle ayrılıp okunabilen, değişen uzunluklarda parçalar üretir (Crossley&ark., 2020).

Illumina SBS ile NGS ayrıca daha fazla sentezi engellemek için floresan ddNTP'leri kullanır. Floresan yoğunluklarının kümesi daha sonra otomatik odaklı bir lazer sistemi tarafından tespit edilir ve klonal DNA parçasının başlangıç tabanını temsil eder. Sanger dizilemesinin aksine, SBS'deki zincir sonlandırma geri döndürülebilirdir. Bu, DNA şablonunun tek bazlı sentezinin kontrollü bir şekilde ilerlemesini sağlar. Floresan etiket ve bloker kaldırılır ve dizileme, döngü adı verilen adımlarla ilerler ve döngü sayısı parçada dizilenen baz sayısına karşılık gelir (tipik olarak 75-150 baz). Diziler, ek parçanın bir veya her iki ucunun dizilenmesine bağlı olarak tek veya eşlidir. Bunlara gelişmiş okuma eşleme doğruluğu, daha fazla genom kapsamı ve genetik füzyonlar gibi genom yeniden düzenlemelerini belirleme potansiyeli dahildir. Sonuç olarak, eşleştirilmiş uç dizileme çoğu NGS uygulaması için standart haline gelmiştir. Genomdaki karmaşık yapısal değişiklikleri belirlemeye yönelik ilgi olduğunda, daha büyük ek boyutlarının (örneğin, 2 ila 5 kilobaz [kb]) eşleştirilmiş uç dizilemesi gerçekleştirilebilir (eş-çift dizilemesi olarak adlandırılır), ancak kütüphane hazırlama ve biyoenformatik analizleri standart eşleştirilmiş uç dizilemesinden önemli ölçüde farklıdır (Hu&ark., 2021).

NGS dizilemesinin genel verimi, akış hücresinin sabit sayıda şeridi olduğundan, kütüphanelerin verim özellikleri, çoklama derecesi ve döngü sayısı tarafından kontrol edilir. Bu verim, genellikle hedef bazın belirli bir nükleotidini örtüşen benzersiz okumaların ortalama sayısı olan beklenen örnek kapsamına göre ayarlanır. Bu sayının ardından genellikle teknik dokümantasyonda bir "X" gelir. Kapsamın önemli biyoenformatik etkileri vardır, çünkü belirli bir genomik pozisyonu örtüşen daha fazla sayıda dizileme okuması, genetik varyasyon için daha yüksek duyarlılık ve özgüllükle sonuçlanacaktır. Daha düşük kapsam, benzer maliyetle daha benzersiz örneklerin dizilenmesine olanak tanıyabilir. Illumina, WGS ile 30 ila 50 kat ve WES ile 100 kat kapsam önermektedir. Hedeflenen gen panelleri, özellikle somatik varyantlarda, örneğin >500X'te varyant çağırma güvenini artırmak için çok daha yüksek kapsama sahip olabilir.

Dizileme Çıktı Verileri

Küme floresan yoğunluklarına dayalı temel çağrılar ve karşılık gelen öznitelikleri içeren büyük dosyalar olan Binary Base Call (BCL) görüntü dosyaları, Illumina dizicisinin birincil çıktısıdır. BCL dosyaları demultiplekslenecek ve DNA dizilerine veya "okumalara" ve karşılık gelen temel kalite dizelerine dönüştürülecek ve yapılandırılmış FASTQ dosya biçiminde kaydedilecektir. FASTQ dosyaları genellikle "ham" çıktı dizileme veri biçimi olarak kabul edilir, çünkü BCL dosyaları genellikle yalnızca geçici olarak saklanır ve çoğu alt akış analizi girdi olarak FASTQ dosyaları gerektirir (Lee &Song, 2022).

Dizileme Hizalaması

Genomik varyantların tanımlanması ve genomik özelliklerin kantifikasyonu rutin dizileme tabanlı analizlerdir. FASTQ dosyalarındaki dizileme okumaları, bu analizler gerçekleştirilmeden önce "okuma eşleme" adı verilen bir işlem olan bir referans genoma

hizalanmalıdır. Yani, referans genomu belirli bir okumanın en olası kaynak dizisi için aranırken doğal genetik varyasyon ve dizileme hatalarına izin verilir. İnsan referans genomunun en son sürümü Genome Reference Consortium Human Build 38'dir (GRCh38 veya hg38), ancak birçok klinik laboratuvar hala daha önceki hg19 yapısını kullanmaktadır (Lansdon&ark., 2022).

Yanlış bir okuma hizalaması olasılığı ihmal edilebilir değildir çünkü dizileme okumaları tüm insan genomuna göre kısadır. Düşük kaliteli bazlar ve ekzojen diziler (ör. dizileme adaptörleri) yanlış pozitif hizalamaları azaltmak için kırpılmalıdır. İnsan kromozomlarından kaynaklanmayan okumaları 'emmek' için, hileli diziler (ör. insan genomuna entegre edilmiş mitokondriyal ve viral diziler) de referans genomuna eklenebilir. Kısa okuma eşleştirme algoritmaları (Langmead&Salzberg, 2012) daha sonra potansiyel olarak yüz milyonlarca okumayı referans genomuna verimli bir şekilde eşler. Dizi hizalama çıktısı genellikle düz metin SAM (dizi hizalama haritası) biçiminde veya ikili sürümünde (BAM) saklanır (Li&ark., 2009). BAM, kısa okuma hizalamalarını depolamak için hızla en popüler dosya biçimi haline geldi ve 2009'daki ilk sürümünden bu yana varyant çağrısı ve gen ifadesi kantifikasyonu gibi çoğu NGS analiz görevi için başlangıç noktası olarak kabul ediliyor. SAM ve diğer düz metin biçimleriyle karşılaştırıldığında, BAM biçiminin birkaç avantajı vardır. İlk olarak, sıkıştırılmış olmaları, bunların iletilmesini ve depolanmasını kolaylaştırır. Satır yönelimlidirler, tüm hizalama bilgilerini tek bir satırda düzenlerler, bu da onları daha yönetilebilir hale getirir. Ayrıca, tüm BAM dosyasını belleğe yüklemeden bölgesel bilgileri "dilimlemenize" olanak tanıyan rastgele erişimi de destekler. Son olarak, BAM dosyaları görselleştirilebilir, bu da Integrative Genomics Viewer (IGV) veya University of California Santa Cruz Genome Browser (https://genome.ucsc.edu/) gibi araçlar kullanılarak belirli bir varyant çağrısının manuel nitel değerlendirmesi için yararlı olabilir (Robinson&ark., 2011).

CRAM, yalnızca okunan dizi ile referans genom arasındaki farkları kaydeden bir referans destekli sıkıştırma dosya biçimidir. Daha kompakt boyutu (yani dosya boyutunda %50-80 azalma) nedeniyle, BAM'ın tüm avantajlarını korurken, CRAM veri depolama için giderek daha popüler hale geliyor. Ancak, bazı CRAM dosyaları kayıplı sıkıştırma kullanır. Bu nedenle, bazı CRAM dosyaları orijinal BAM kaynak verilerinden tam olarak kurtarılamaz.

Varyant Çağrısı

Belirli bir örnekten hizalanmış okumalar ile eşleşen bir referans genom dizisi arasındaki genetik farklılıkları tespit etme süreci ve ilişkili algoritmalar genellikle varyant çağırıcıları olarak adlandırılır. Tek nükleotid polimorfizmleri/varyantları (SNP'ler/SNV'ler), kısa (<20 bp) eklemeler/silmeler (INDEL'ler) ve kopya sayısı varyantları/değişiklikleri (CNV'ler/CNA'lar) en yaygın ilgi varyant tipleridir. SNP'ler, belirli bir popülasyonda sıklıkla görülen germ hattı DNA'sındaki tek nükleotid polimorfizmlerini ifade eder. Bazı SNP'lerin çoklu alelleri vardır, yani bir kişi herhangi bir alel kombinasyonunu taşıyabilir. SNV daha genel bir terimdir. Herhangi bir nokta mutasyonunu ifade edebilir. Genellikle 'kısa varyantlar' olarak adlandırılan SNV'ler ve INDEL'ler genellikle aynı biyoenformatik algoritmaları tarafından birlikte adlandırılır (Larson&ark., 2023).

CNV'ler genomun büyük bölümlerinin kopyalanması veya silinmesini içerir. CNV'ler ile INDEL'ler arasındaki fark, bölüm uzunluğu, değişim mekanizması ve dizi içeriği açısından tanımlanmıştır (Pos&ark., 2021). CNV genellikle DNA kopya sayısındaki değişiklikleri ifade ederken, CNA daha çok edinilmiş somatik kopya sayısı değişikliklerini ifade etmek için kullanılır, özellikle kanserde. Bunlar, inversiyonları ve translokasyonları da içeren daha büyük bir yapısal varyantlar (SV'ler) sınıfının bir

parçasıdır. Kısmi veya tam kromozomal kopyalar/silinmeler, büyük kopya sayısı olaylarına dahil edilebilir.

Ön işleme

Kısa okuma hizalayıcıları tarafından üretilen BAM'ler varyant keşfi için doğrudan kullanılamaz ve varyant çağrısı için bunları hazırlamak için bazı ön işlemeler gerekir. İlk adım, PCR ve dizileme gibi bazı yapay yöntemler kullanılarak aynı orijinal DNA'dan türetilen okumalar olan kopyaları tanımlamaktır. Bu gereklidir çünkü kopyalar orijinal dizinin bağımsız ölçümleri değildir ve varyantlar (veya dizileme hataları) tüm kopyalara yayılabilir ve VAF tahminlerini etkileyebilir. WGS veya WES veri analizinde, ancak PCR tabanlı amplikon dizileme uygulamalarında değil, kopyaların kaldırılması önerilir. İkinci adım, temeldeki kalite puanlarındaki herhangi bir sistematik önyargının veya hatanın yeniden kalibre edilmesidir. BAM dosyası, bu ön işleme adımlarından sonra SNP/SNV, INDEL ve CNV/CNA tespiti için hazırdır (Manimekalai&ark., 2022). Ayrıca, kaliteyi değerlendirmek için harici varyant çağrısı verilerini ve/veya popülasyon alel sıklığı bilgilerini kullanabilen VerifyBamID gibi araçları kullanarak örnek kontaminasyonunu değerlendirmek için bu BAM dosyasını kullanmak da mümkündür.

Çıktı Dosyaları

Varyant Çağrı Biçimi (VCF) dosyalarıgenellikle çağrılan kısa varyant genotiplerini depolamak için kullanılır. Tek bir VCF dosyası, bir veya daha fazla örnekten çağrılan varyantları içerebilir. gVCF dosyası, genomun hem varyant hem de varyant olmayan bölgelerini depolamak için geliştirilmiştir. VCF dosyaları yalnızca bir referansa göre varyant pozisyonları içerdiğinden, gVCF dosyaları aynı referansla tek örnek verilerinin doğru genotip çağrılarına hızlı bir şekilde birleştirilmesine olanak tanır. VCF'leri ve gVCF'leri BAM dosyalarıyla aynı şekilde dizinleyebilirsiniz. MAF dosyası,

somatik mutasyonların depolanması için TCGA projesi tarafından geliştirilen sekmeyle ayrılmış bir metin dosyasıdır. MAF'ler, proje tarafından oluşturulan bir veya daha fazla VCF'den mutasyon bilgilerinin birleştirilmesiyle oluşturulur (Danecek&ark., 2011).

Sonuç

NGS araştırmalarının planlanmasında, örneğin niteliği, veri depolama, maliyetler ve belirli amaçlar dahil olmak üzere dikkate alınması gereken çok çeşitli konular vardır. Hastalık riskiyle ilgili hipotezler genellikle germ hattı DNA özelliklerine odaklanır ve kan veya yanak sürüntüsü gibi tümör dışı örnekler kullanır. Tümör moleküler karakterizasyon hipotezleri genellikle tümör blokları kullanılarak somatik DNA'ya odaklanır. Daha önce belirtildiği gibi, NGS yöntemleri taze veya FFPE örneklerdeki çoğu moleküler veri türü için kullanılabilir, ancak farklı performans özelliklerine sahiptirler. Prospektif çalışmalar, örnek saflığı, kalitesi ve işlenmesi üzerinde bir miktar kontrol sağlarken, bankalanmış örneklerin retrospektif çalışmaları araştırmacıların kontrolü dışındadır. Ek olarak, biyolojik ve deneysel etkilerin ayırt edilebilmesini sağlamak için, NGS analizleri, ilgi duyulan biyolojik etkilerin analiz çalışması boyunca dağıtıldığı şekilde gerçekleştirilmelidir.

Akciğer kanserlerinde NGS çalışmaları sayesinde hedefe yönelik tedaviler için gerekli gen değişiklikleri daha hızlı ve daha geniş kapsamlı tespit edilebilmektedir. Bu çalışmalardaki maliyet azaldıkça tanı ve tedavide her hastanın ulaşabileceği bir test haline gelecektir.

Kaynaklar

Bestard-Cuche, N., Munro, D. A. D., Beniazza, M., Priller, J., Williams, A., & Corsinotti, A. (2024). Illumina SBS Sequencing and DNBSEQ Perform Similarly for Single-Cell Transcriptomics. Genes, 15(11), 1436. https://doi.org/10.3390/genes15111436

Capelletti, M., Dodge, M. E., Ercan, D., Hammerman, P. S., Park, S. I., Kim, J., Sasaki, H., Jablons, D. M., Lipson, D., Young, L., Stephens, P. J., Miller, V. A., Lindeman, N. I., Munir, K. J., Richards, W. G., & Jänne, P. A. (2014). Identification of recurrent FGFR3-TACC3 fusion oncogenes from lung adenocarcinoma. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research, 20(24), 6551–6558. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-1337

Chan, B. A., & Hughes, B. G. (2015). Targeted therapy for non-small cell lung cancer: current standards and the promise of the future. Translational lung cancer research, 4(1), 36–54. https://doi.org/10.3978/j.issn.2218-6751.2014.05.01

Coco, S., Truini, A., Vanni, I., Dal Bello, M. G., Alama, A., Rijavec, E., Genova, C., Barletta, G., Sini, C., Burrafato, G., Biello, F., Boccardo, F., & Grossi, F. (2015). Next generation sequencing in non-small cell lung cancer: new avenues toward the personalized medicine. Current drug targets, 16(1), 47–59. https://doi.org/10.2174/1389450116666141210094640

Crossley, B. M., Bai, J., Glaser, A., Maes, R., Porter, E., Killian, M. L., Clement, T., & Toohey-Kurth, K. (2020). Guidelines for Sanger sequencing and molecular assay monitoring. Journal of

veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc, 32(6), 767–775. https://doi.org/10.1177/1040638720905833

Danecek, P., Auton, A., Abecasis, G., Albers, C. A., Banks, E., DePristo, M. A., Handsaker, R. E., Lunter, G., Marth, G. T., Sherry, S. T., McVean, G., Durbin, R., & 1000 Genomes Project Analysis Group (2011). The variant call format and VCFtools. Bioinformatics (Oxford, England), 27(15), 2156–2158. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr330

Dohyeon Lee, Giltae Song, FastqCLS: a FASTQ compressor for long-read sequencing via read reordering using a novel scoring model, Bioinformatics, Volume 38, Issue 2, January 2022, Pages 351–356, https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btab696

Frampton, G. M., Fichtenholtz, A., Otto, G. A., Wang, K., Downing, S. R., He, J., Schnall-Levin, M., White, J., Sanford, E. M., An, P., Sun, J., Juhn, F., Brennan, K., Iwanik, K., Maillet, A., Buell, J., White, E., Zhao, M., Balasubramanian, S., Terzic, S., … Yelensky, R. (2013). Development and validation of a clinical cancer genomic profiling test based on massively parallel DNA sequencing. Nature biotechnology, 31(11), 1023–1031. https://doi.org/10.1038/nbt.2696

Gupta, P., Saha, K., Vinarkar, S., Banerjee, S., Choudhury, S. S., Parihar, M., Midha, D., Mukherjee, G., Lingegowda, D., Chatterjee, S., ArunsinghS, M., Shrimali, R., Ganguly, S., Dabkara, D., Biswas, B., Mishra, D. K., & Arora, N. (2020). Next generation sequencing in lung cancer: An initial experience from India. Current

problems in cancer, 44(3), 100562. https://doi.org/10.1016/j.currproblcancer.2020.100562

Hu, T., Chitnis, N., Monos, D., & Dinh, A. (2021). Next-generation sequencing technologies: An overview. Human immunology, 82(11), 801–811. https://doi.org/10.1016/j.humimm.2021.02.012

Hwang, D. M., Albaqer, T., Santiago, R. C., Weiss, J., Tanguay, J., Cabanero, M., Leung, Y., Pal, P., Khan, Z., Lau, S. C. M., Sacher, A., Torlakovic, E., Cheung, C., & Tsao, M. S. (2021). Prevalence and Heterogeneity of PD-L1 Expression by 22C3 Assay in Routine Population-Based and Reflexive Clinical Testing in Lung Cancer. Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer, 16(9), 1490–1500. https://doi.org/10.1016/j.jtho.2021.03.028

J Saller, J., & Boyle, T. A. (2022). Molecular Pathology of Lung Cancer. Cold Spring Harbor perspectives in medicine, 12(3), a037812. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a037812

Kuang, S., Fung, A. S., Perdrizet, K. A., Chen, K., Li, J. J. N., Le, L. W., Cabanero, M., Karsaneh, O. A. A., Tsao, M. S., Morganstein, J., Ranich, L., Smith, A. C., Wei, C., Cheung, C., Shepherd, F. A., Liu, G., Bradbury, P., Pal, P., Schwock, J., Sacher, A. G., … Leighl, N. B. (2022). Upfront Next Generation Sequencing in Non-Small Cell Lung Cancer. Current oncology (Toronto, Ont.), 29(7), 4428–4437. https://doi.org/10.3390/curroncol29070352

Kunimasa, K., Matsumoto, S., Nishino, K., Honma, K., Maeda, N., Kuhara, H., Tamiya, M., Inoue, T., Kawamura, T.,

Kimura, T., Maniwa, T., Okami, J., Goto, K., & Kumagai, T. (2022). Comparison of sampling methods for next generation sequencing for patients with lung cancer. Cancer medicine, 11(14), 2744–2754. https://doi.org/10.1002/cam4.4632

Larson, N. B., Oberg, A. L., Adjei, A. A., & Wang, L. (2023). A Clinician's Guide to Bioinformatics for Next-Generation Sequencing. Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer, 18(2), 143–157. https://doi.org/10.1016/j.jtho.2022.11.006

Langmead, B., & Salzberg, S. L. (2012). Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. Nature methods, 9(4), 357–359. https://doi.org/10.1038/nmeth.1923

Lansdon, L. A., Cadieux-Dion, M., Herriges, J. C., Johnston, J., Yoo, B., Alaimo, J. T., Thiffault, I., Miller, N., Cohen, A. S. A., Repnikova, E. A., Zhang, L., Farooqi, M. S., Farrow, E. G., & Saunders, C. J. (2022). Clinical Validation of Genome Reference Consortium Human Build 38 in a Laboratory Utilizing Next-Generation Sequencing Technologies. Clinical chemistry, 68(9), 1177–1183. https://doi.org/10.1093/clinchem/hvac113

La Salvia, A., Meyer, M. L., Hirsch, F. R., Kerr, K. M., Landi, L., Tsao, M. S., & Cappuzzo, F. (2024). Rediscovering immunohistochemistry in lung cancer. Critical reviews in oncology/hematology, 200, 104401. https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2024.104401

Leighl, N. B., Nirmalakumar, S., Ezeife, D. A., & Gyawali, B. (2021). An Arm and a Leg: The Rising Cost of Cancer Drugs and Impact on Access. American Society of Clinical Oncology

educational book. American Society of Clinical Oncology. Annual Meeting, 41, 1–12. https://doi.org/10.1200/EDBK_100028

Li, C., & Lu, H. (2018). Adenosquamous carcinoma of the lung. OncoTargets and therapy, 11, 4829–4835. https://doi.org/10.2147/OTT.S164574

Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G., Durbin, R., & 1000 Genome Project Data Processing Subgroup (2009). The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. Bioinformatics (Oxford, England), 25(16), 2078–2079. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp352

Lim, C., Sekhon, H. S., Cutz, J. C., Hwang, D. M., Kamel-Reid, S., Carter, R. F., ... & Leighl, N. B. (2017). Improving molecular testing and personalized medicine in non-small-cell lung cancer in Ontario. Current Oncology, 24(2), 103-110.

Lindeman, N. I., Cagle, P. T., Aisner, D. L., Arcila, M. E., Beasley, M. B., Bernicker, E. H., Colasacco, C., Dacic, S., Hirsch, F. R., Kerr, K., Kwiatkowski, D. J., Ladanyi, M., Nowak, J. A., Sholl, L., Temple-Smolkin, R., Solomon, B., Souter, L. H., Thunnissen, E., Tsao, M. S., Ventura, C. B., … Yatabe, Y. (2018). Updated Molecular Testing Guideline for the Selection of Lung Cancer Patients for Treatment With Targeted Tyrosine Kinase Inhibitors: Guideline From the College of American Pathologists, the International Association for the Study of Lung Cancer, and the Association for Molecular Pathology. Archives of pathology & laboratory medicine, 142(3), 321–346. https://doi.org/10.5858/arpa.2017-0388-CP

Makarem, M., Ezeife, D. A., Smith, A. C., Li, J. J. N., Law, J. H., Tsao, M. S., & Leighl, N. B. (2021). Reflex ROS1 IHC Screening with FISH Confirmation for Advanced Non-Small Cell Lung Cancer-A Cost-Efficient Strategy in a Public Healthcare System. Current oncology (Toronto, Ont.), 28(5), 3268–3279. https://doi.org/10.3390/curroncol28050284

Malapelle, U., Pepe, F., Pisapia, P., Sgariglia, R., Nacchio, M., Barberis, M., Bilh, M., Bubendorf, L., Büttner, R., Cabibi, D., Castiglia, M., De Andrea, C. E., de Biase, D., Dumur, C. I., Fontanini, G., Freire, J., Gristina, V., Hofman, P., Ilie, M., Lozano, M. D., … Troncone, G. (2022). TargetPlex FFPE-Direct DNA Library Preparation Kit for SiRe NGS panel: an international performance evaluation study. Journal of clinical pathology, 75(6), 416–421. https://doi.org/10.1136/jclinpath-2021-207450

Manimekalai, R., Suresh, G., Govinda Kurup, H., Athiappan, S., & Kandalam, M. (2020). Role of NGS and SNP genotyping methods in sugarcane improvement programs. Critical reviews in biotechnology, 40(6), 865–880. https://doi.org/10.1080/07388551.2020.1765730

Middleton, G., Fletcher, P., Popat, S., Savage, J., Summers, Y., Greystoke, A., Gilligan, D., Cave, J., O'Rourke, N., Brewster, A., Toy, E., Spicer, J., Jain, P., Dangoor, A., Mackean, M., Forster, M., Farley, A., Wherton, D., Mehmi, M., Sharpe, R., … Billingham, L. (2020). The National Lung Matrix Trial of personalized therapy in lung cancer. Nature, 583(7818), 807–812. https://doi.org/10.1038/s41586-020-2481-8

Mosele, F., Remon, J., Mateo, J., Westphalen, C. B., Barlesi, F., Lolkema, M. P., ... & André, F. (2020). Recommendations for the use of next-generation sequencing (NGS) for patients with metastatic cancers: a report from the ESMO Precision Medicine Working Group. Annals of Oncology, 31(11), 1491-1505.

National Comprehensive Cancer Network Non-Small Cell Lung Cancer. Version 3.2022. Mar 16, 2022. [(accessed on 13 May 2022)]. Available online: https://www.nccn.org/login?ReturnURL=https://www.nccn.org/professionals/....

Nooreldeen, R., & Bach, H. (2021). Current and Future Development in Lung Cancer Diagnosis. International journal of molecular sciences, 22(16), 8661. https://doi.org/10.3390/ijms22168661

Pagès, A., Foulon, S., Zou, Z., Lacroix, L., Lemare, F., de Baère, T., Massard, C., Soria, J. C., & Bonastre, J. (2017). The cost of molecular-guided therapy in oncology: a prospective cost study alongside the MOSCATO trial. Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics, 19(6), 683–690. https://doi.org/10.1038/gim.2016.174

Peters, S., Camidge, D. R., Shaw, A. T., Gadgeel, S., Ahn, J. S., Kim, D. W., Ou, S. I., Pérol, M., Dziadziuszko, R., Rosell, R., Zeaiter, A., Mitry, E., Golding, S., Balas, B., Noe, J., Morcos, P. N., Mok, T., & ALEX Trial Investigators (2017). Alectinib versus Crizotinib in Untreated ALK-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. The New England journal of medicine, 377(9), 829–838. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1704795

Pikor, L. A., Ramnarine, V. R., Lam, S., & Lam, W. L. (2013). Genetic alterations defining NSCLC subtypes and their therapeutic implications. Lung cancer (Amsterdam, Netherlands), 82(2), 179–189. https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2013.07.025

Pös, O., Radvanszky, J., Buglyó, G., Pös, Z., Rusnakova, D., Nagy, B., & Szemes, T. (2021). DNA copy number variation: Main characteristics, evolutionary significance, and pathological aspects. Biomedical journal, 44(5), 548–559. https://doi.org/10.1016/j.bj.2021.02.003

Reck, M., Remon, J., & Hellmann, M. D. (2022). First-Line Immunotherapy for Non-Small-Cell Lung Cancer. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology, 40(6), 586–597. https://doi.org/10.1200/JCO.21.01497

Robinson, J. T., Thorvaldsdóttir, H., Winckler, W., Guttman, M., Lander, E. S., Getz, G., & Mesirov, J. P. (2011). Integrative genomics viewer. Nature biotechnology, 29(1), 24–26. https://doi.org/10.1038/nbt.1754

Shendure, J., Porreca, G. J., Reppas, N. B., Lin, X., McCutcheon, J. P., Rosenbaum, A. M., Wang, M. D., Zhang, K., Mitra, R. D., & Church, G. M. (2005). Accurate multiplex polony sequencing of an evolved bacterial genome. Science (New York, N.Y.), 309(5741), 1728–1732. https://doi.org/10.1126/science.1117389

Shim, H. S., Choi, Y. L., Kim, L., Chang, S., Kim, W. S., Roh, M. S., Kim, T. J., Ha, S. Y., Chung, J. H., Jang, S. J., Lee, G. K., Korean Cardiopulmonary Pathology Study Group, & Korean

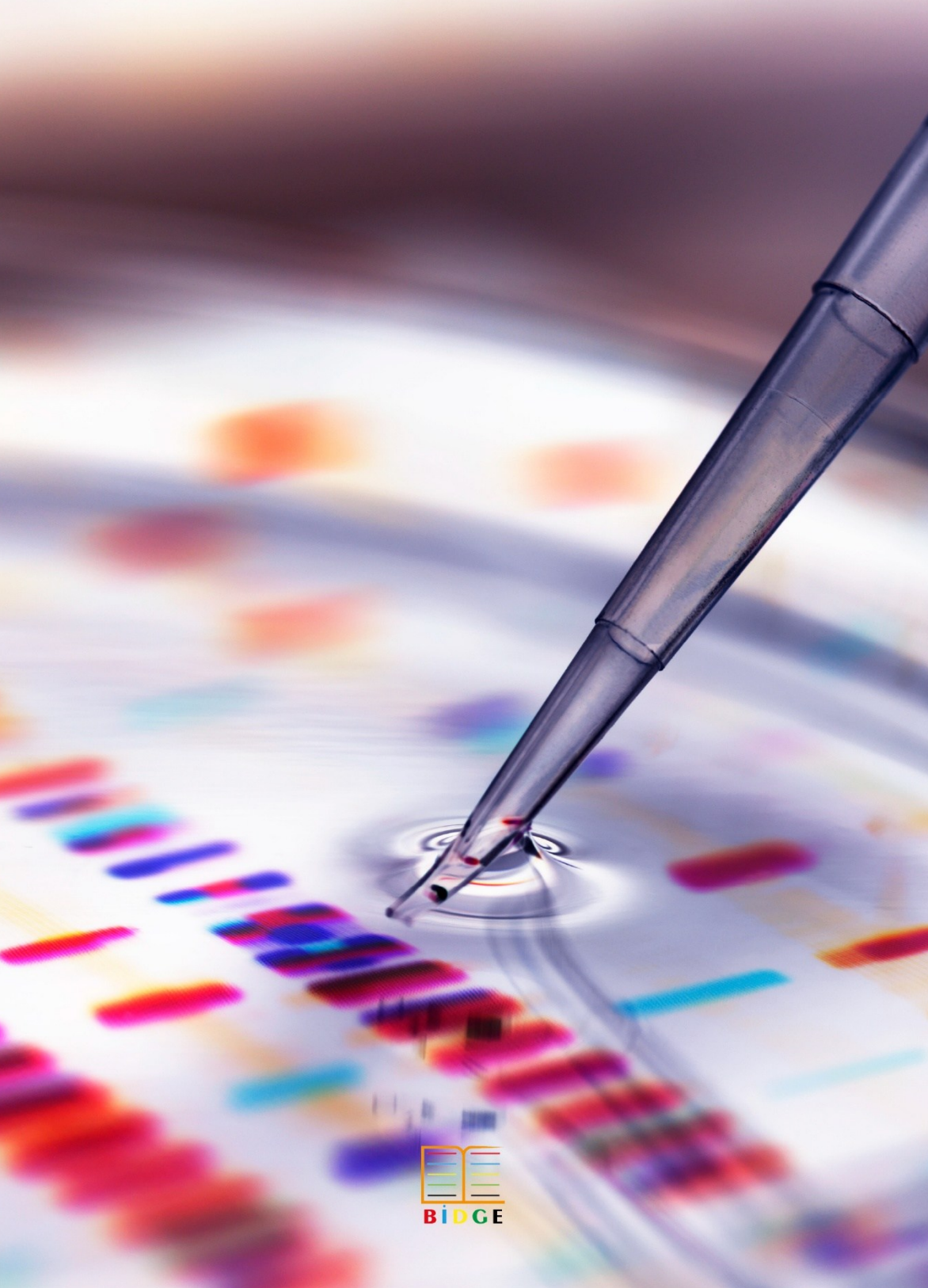
Molecular Pathology Study Group (2017). Molecular Testing of Lung Cancers. Journal of pathology and translational medicine, 51(3), 242–254. https://doi.org/10.4132/jptm.2017.04.10

Tam, V., Patel, N., Turcotte, M., Bossé, Y., Paré, G., & Meyre, D. (2019). Benefits and limitations of genome-wide association studies. Nature reviews. Genetics, 20(8), 467–484. https://doi.org/10.1038/s41576-019-0127-1

Trédan, O., Wang, Q., Pissaloux, D., Cassier, P., de La Fouchardière, A., Fayette, J., ... & Blay, J. Y. (2019). Molecular screening program to select molecular-based recommended therapies for metastatic cancer patients: analysis from the ProfiLER trial. Annals of Oncology, 30(5), 757-765.

Weissferdt A. (2018). Pulmonary Sarcomatoid Carcinomas: A Review. Advances in anatomic pathology, 25(5), 304–313. https://doi.org/10.1097/PAP.0000000000000202

Yin, Y., Butler, C., & Zhang, Q. (2021). Challenges in the application of NGS in the clinical laboratory. Human immunology, 82(11), 812–819. https://doi.org/10.1016/j.humimm.2021.03.011


BIDGE