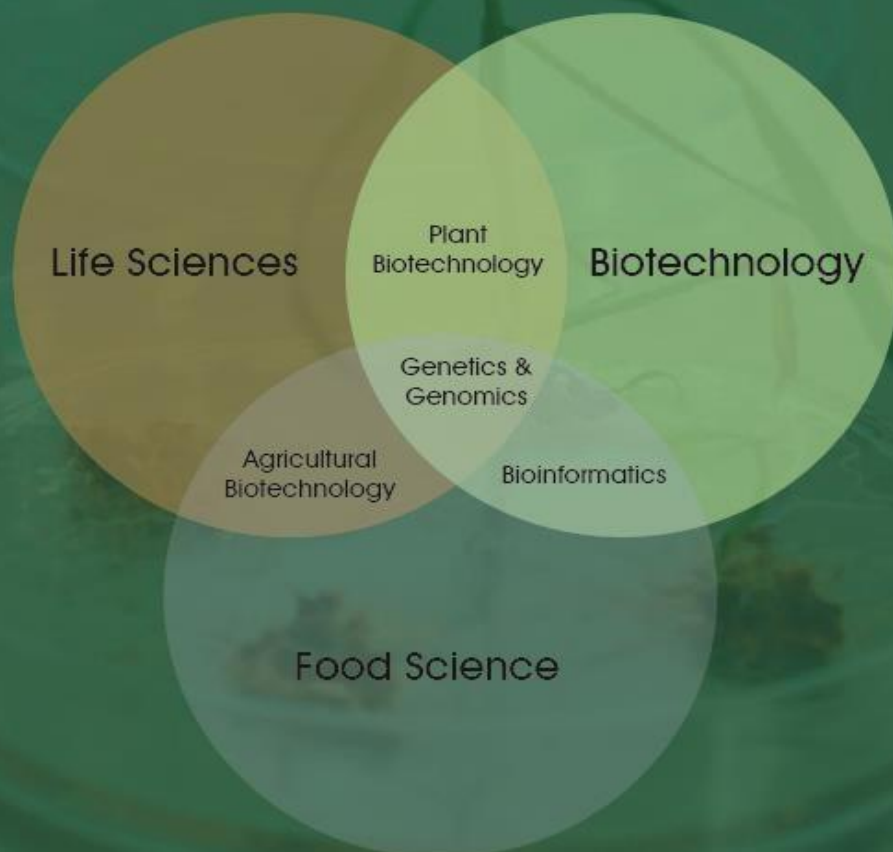


# *International Journal of Life Sciences and Biotechnology*

e-ISSN:2651-4621



**Editor in Chief / Baş Editör****Asst. Prof. Dr. Yılmaz Kaya**

Ondokuz Mayıs University, Turkey

**Section Editors / Bölüm Editörleri\***

\* sıralama akademik unvan içinde alfabetik sıralamaya göre. \* The ranking is arranged alphabetically within the academic title.

Prof. Dr. Ali ASLAN, PhD, Van Yuzuncuyıl University

Prof. Dr. Ercan BURSAL, PhD, Muş Alparslan University

Prof. Dr. Hasan AKAN, PhD, Harran University

Prof. Dr. Nermin GOZUKİRMİZİ, PhD Istinye University

Prof. Dr. Tengku Haziyaamin TENGKU ABDUL HAMİD, PhD, International Islamic University Malaysia

Assoc. Prof. Dr. Ayhan HORUZ, PhD Ondokuz Mayıs University

Assoc. Prof. Dr. Hasan Murat AKSOY, PhD, Ondokuz Mayıs University

**Editorial Board / Editör Kurulu**

Prof. Dr. İsmail KOCAÇALIŞKAN, PhD, Yıldız Technical University

Prof. Dr. Kasim BAJROVIĆ, University of Sarajevo

Prof. Dr. Muhammet KURULAY, PhD, Yıldız Technical University

Assoc. Prof. Dr. Gulbubu KURMANBEKOVA, Kyrgyz-Turkish Manas University

Assoc. Prof. Dr. İsmail ERPER, PhD, Ondokuz Mayıs University

Assoc. Prof. Dr. Muhammad Arshad JAVED, PhD, Universiti Teknologi Malaysia

Assoc. Prof. Dr. Roswanira AB. WAHAB, PhD, Universiti Teknologi Malaysia

Assoc. Prof. Dr. Sevgi MARAKLI, PhD, Amasya University

Asst. Prof. Dr. Abdussamat GÜZEL, PhD, Inonu University

Asst. Prof. Dr. Ali Yuksek, PhD, Ondokuz Mayıs University

Asst. Prof. Dr. Cihan İNAN, PhD, Karadeniz Technical University

Asst. Prof. Dr. Ertan ERMİŞ, PhD, Istanbul Sabahattin Zaim University

Asst. Prof. Dr. Feyza TUFAN, PhD, Halic University

Asst. Prof. Dr. Harun ÖZER, PhD, Ondokuz Mayıs University

Asst. Prof. Dr. Kasım TAKIM, PhD, Harran University

Asst. Prof. Dr. Mohamed EDBEİB, PhD, Baniwalid University, Libya

Asst. Prof. Dr. Muhammed YÜCEER, PhD, Canakkale Onsekiz Mart University,

Dr. Aliyu ADAMU, PhD, Kaduna State University

Dr. Abdulwali ABLAT, University of Malaya

Dr. Lect. Abdulgani DEVLET, PhD, Bilecik Seyh Edebali University

Dr. Nedim UZUN, PhD, Taksim Education and Research Hospital, Turkey

Dr. Res. Asst. Kiran NAWAZ, PhD, University of Arizona

**Advisory Board / Danışma Kurulu**

Prof. Dr. Ahmet OKUMUŞ, PhD, Aydın Adnan Menderes University

Prof. Dr. Didem ÖZÇİMEN, PhD, Yıldız Technical University

Prof. Dr. Fahrul Zaman HUYOP, PhD, Universiti Teknologi Malaysia

Prof. Dr. İbrahim İlker ÖZYİĞİT, PhD, Marmara University

Assoc. Prof. Dr. Funda ARSLANOĞLU, PhD, Ondokuz Mayıs University

Assoc. Prof. Dr. Kadyrbay CHEKİROV, Kyrgyz - Turkish Manas University, Kyrgyzstan

Assoc. Prof. Dr. Sibel YILMAZ, PhD, Yeni Yuzyil University

Assoc. Prof. Dr. Zarina Bt ZAINUDDİN, PhD, International Islamic University Malaysia

**Language Editors/ Dil Editörleri**

Assoc. Dr. Sevgi Maraklı, Amasya University, Turkey

Res. Assist. Bermet Kıdıralyeva, Kyrgyz - Turkish Manas University, Kyrgyzstan

Specialist Nurjamal Omurzakova, Kyrgyz - Turkish Manas University, Kyrgyzstan

**Managing Editor / Yönetici Editör**

Yunus Emre ARVAS, PhD Cand., Yildiz Technical University

**Yönetim Ofisi/ Management Office**

Yildiz Technical University, Faculty of Chemical and Metallurgical Engineering.  
ESENLER/ISTANBUL

**Yasal Sorumluluk**

Yazıların yasal ve hukuki sorumluluğu yazarlara aittir.

Tüm hakları saklıdır. Derginin hiçbir bölümü, yazılı ön izin olmaksızın ve dergi adına referans gösterilmeden herhangi bir formatta çoğaltılamaz veya kullanılamaz.

**Legal Responsibility**

The legal responsibility of the articles belongs to the authors. All rights reserved. No part of this journal may be reproduced or used in any form without the prior written permission and a reference to name of the journal.

## **Editörden;**

### **Değerli okurlar ve yazarlar,**

“International Journal of Life Sciences and Biotechnology” olarak dergimizin on birinci sayısını yayın hayatına sunmaktan mutluluk ve onur duyuyoruz. “International Journal of Life Sciences and Biotechnology” dergisi araştırma- geliştirme ve uygulama ilkeleri baz alınarak yayınlanan uluslararası hakemli açık erişimli akademik bir elektronik dergidir.

“International Journal of Life Sciences and Biotechnology” dergisi Yaşam Bilimleri, Biyoloji, Biyoteknoloji, Biyomühendislik, Ziraat Bilimleri, Gıda Biyoteknolojisi ve Genetik alanlarındaki ilgili araştırmacılara, kurum ve kuruluşlara teorik ve pratik uygulamalarda katkı sağlamayı, tarafsızlık ve bilim etiği ilkelerine bağlı kalarak çözüm temelli, yenilikçi ve katma değeri olan çalışmalara odaklanan, günceli ve geleceği tartışan çalışmaların yayınlanmasını hedeflemektedir.

Bu düşüncelerle 2021 yılı üçüncü sayısını yayınladığımız “International Journal of Life Sciences and Biotechnology” dergisini, makaleleri ile onurlandıran akademisyenlere, Fikir / Görüş / Öneri / Katkı ve Eleştirileri ile değerlendirme süreçlerine katkılarından dolayı hakem ve yayın kurullarında yer alan kıymetli bilim insanlarına yürekten teşekkür ediyoruz. Bir sonraki sayıda görüşmek ümidiyle...

**15.12. 2021**  
**Editör**  
**Dr. Öğrt. Üyesi Yılmaz KAYA**

## **From The Editor;**

**Dear Readers and Authors,**

As “International Journal of Life Sciences and Biotechnology”, we are pleased and honored to present the 11th issue of the journal. "International Journal of Life Sciences and Biotechnology" is an international double peer-reviewed open access academic journal published on the basis of research- development and code of practice.

The aims of this journal are to contribute in theoretical and practical applications in relevant researchers of Life Sciences, Biology, Biotechnology, Bioengineering, Agricultural Sciences, Food Biotechnology and Genetics institutions and organizations in Turkey, and to publish solution based papers depending on the principle of impartiality and scientific ethics principles, focusing on innovative and added value work, discussing the current and future.

With these thoughts, We are especially thankful to academicians honoring with the articles, valuable scientists involved in editorial boards and reviewers for their contributions to the evaluation processes with through their opinions/ideas/contributions/criticisms in the third issue of 2021 "International Journal of Life Sciences and Biotechnology". Hope to see you in the next issue...

**15. 12. 2021**

**Editor in Chief**

**Assist. Prof. Dr. Yilmaz KAYA**

## **Sayının Hakemleri / Reviewers of the Issue\***

\* sıralama akademik unvan içinde alfabetik sıralamaya göredir. \* The ranking is arranged alphabetically within the academic title.

Prof. Dr. Ismail Kocacaliskan, PhD, Yildiz Technical University

Prof. Dr. Ozlem Darcansoy Iseri, PhD, Baskent University

Prof. Dr. Sebahattin Ozcan, PhD, Ankara University

Prof. Dr. Ugur Cakilcioglu, PhD, Munzur University

Assoc. Prof. Dr. Ayhan Horuz, PhD, Ondokuz Mayıs University

Assoc. Prof. Dr. Emre Yoruk, PhD, Istanbul Yeni Yuzyil University

Assoc. Prof. Dr. Harun Kaya, PhD, Malatya Turgut Özal University

Assoc. Prof. Dr. Ismaila Yada Sudi, PhD, Adamawa State University

Assoc. Prof. Dr. Kadyrbay Chekirov, PhD, Kyrgyz - Turkish Manas University

Assoc. Prof. Dr. M. Aydin Akbudak, PhD, Akdeniz University

Assoc. Prof. Dr. Mesut Isik, PhD, Bilecik Şeyh Edebali University

Assoc. Prof. Dr. Muge Sarı Yılmaz, PhD, Yildiz Technical University

Assoc. Prof. Dr. Muhammet Naldan, PhD, Bilecik Şeyh Edebali University

Assoc. Prof. Dr. Nihal Dogruoz Gungor, PhD, Istanbul University

Assoc. Prof. Dr. Sahin Sonmez, PhD, Malatya Turgut Özal University

Assoc. Prof. Dr. Savas İzzetoglu, PhD, Ege University

Assoc. Prof. Dr. Sevgi Marakli, PhD, Yildiz Technical University

Assist. Prof. Dr. Abolfazl Jafari-Sales, PhD, Islamic Azad University

Assist. Prof. Dr. Ayse Feyza Tufan Dulger, PhD, Ondokuz Mayıs University

Assist. Prof. Dr. Elif Karlik, PhD, Istinye University

Assist. Prof. Dr. Emre Taskin, PhD, Karabuk University

Assist. Prof. Dr. Hüseyin Nail Akgül, PhD, Aydın Adnan Menderes University

Assist. Prof. Dr. Onur Bulut, PhD, Konya Food and Agriculture University

Assist. Prof. Dr. Ozge Unlu, PhD, Beykent University

Assist. Prof. Dr. Sabire Yerlikaya, PhD, Karamanoğlu Mehmetbey University

Assist. Prof. Dr. Salih Ozcobanoglu, PhD, Akdeniz University

Assist. Prof. Dr. Seda Demirel Topel, PhD, Antalya Bilim University

Assist. Prof. Dr. Zarina Bt Zainuddin, PhD, International Islamic University Malaysia

Dr. Lecturer Merve Gore, PhD, Ege University

Dr. Lecturer Zulfu Tuylek, PhD, Malatya Turgut Özal University

Dr. Res. Assist. Bermet Kıdıralyeva, PhD, Kyrgyz - Turkish Manas University

Dr. Res. Assist. Cigdem Sevim, PhD, Ataturk University

Dr. Res. Assist. Guney Akinoglu, PhD, Ondokuz Mayıs University

Dr. Res. Assist. Muhammed Abed, PhD, University of Anbar

Dr. Res. Assist. Serap Cetinkaya, PhD, Sivas Cumhuriyet University

Dr. Aslı Hocaoğlu- Ozyigit, PhD, Marmara University

Dr. Esra Duygu Aracier, PhD, Evyap Company, Research and Development Engineer

Dr. Sinem Elmas, PhD, Muğla Sıtkı Koçman University

Dr. Sulaiman Mohammed, PhD, Universiti Teknologi Malaysia

Dr. Taner Sar, PhD, University of Boras

## İçindekiler/ Contents

### Research Articles/ Araştırma Makaleleri

#### Production and Quality Evaluation of Wine from Jackfruit Co-Products

Christian U. Cagasan, Cail A. Lingatong, Kyle M. Pore, Raymond Ramada, Christian D. Restor, Roberta Lauzon ..... 340-352

#### Protective Effects of Folic Acid and Vitamin C Against Iron Overload at the in vitro Blood-Brain Barrier

Belkis A. Arslan, İdil Satıcı, Enes F. Arslan, Ayşegül Yanık, Seda K. Gültekin ..... 353-359

#### Investigation of antioxidant, enzyme inhibition and antiproliferative activities of blackthorn (*Prunus spinosa* L.) extracts

Merve Sönmez, Ferah Cömert Önder, Esra Tokay, Ayhan Celik, Feray Köçkar, Mehmet Ay ..... 360-380

#### Phytochemical screening and in vitro evaluation of the antiarthritic activity of *Nigella sativa* L. seeds extracts

Mohammed Cheurfa, Abdalbasit Marıod, Kaddour Yahya, Benmbarek İslam ..... 381-388

#### Molecular Detection of *Bacillus cereus* in Milk by Polymerase Chain Reaction

Begüm Terzi Aksoy, Elif Bozkurt, Özlem Ateş Sönmezoğlu..... 389-399

#### Aktif Yara Örtülerinin Eldesinde Fotosensitizerlerin Kullanımı

Gül Merve Gençer, Murat Akarsu ..... 400-411

#### Araceae Familyasına Ait Bazı Taksonların Süt Pıhtılaştırma Özelliklerinin Araştırılması

Mehmet Maruf Balos, Hasan Akan, Eda Nur Durmaz, Fatma Zehra Ilgaz ..... 412-419

#### The Effect of Hemp Seed Oil on Skin and Soap Performance

Münevver Şeker, Özlem Esen 420-438 ..... 420-438

#### The Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Response to Different Levels of Organic and Inorganic Fertilizers

Ahmad Yar Ahmadi Mohammad Jan Arain ..... 439-450

#### Investigation of the Exosome-Based Drug Delivery System Potential in the Treatment of Glioblastoma in vitro Experimental Models

Sıdıka Genç, Zeynep Çakır, Ali Taghizadehghalehjoughi, Yeşim Yeni, Kiyumars Jalili, Ahmet Hacımüftüoğlu..... 451-467

### Review Articles / Derleme Makaleler

#### Biyoteknolojide Biyosensör ve Biyoçip Uygulamaları

Zülfü Tüylek ..... 468-490

#### SARS-CoV-2'nin Hızlı Tespiti İçin Tasarlanan Biyosensörler

Tuğba Begüm Karakaş, İlayda Demirdiş ..... 491-506

#### Mesoporous silica nanoparticles, methods of preparation and use of bone tissue engineering

Nurşah Küttük ..... 507-522

#### Bitki Hastalık Dayanıklılık Proteinleri; İmmün Savunma Molekülleri Olarak R-gen Ürünleri

Berna Baş ..... 523-545

#### Fermented Traditional Probiotic Beverages of Turkish Origin: A Concise Review

Oluwaseun Aladeboyeje, Nazmiye Özlem Şanlı ..... 546-564



**Genetiği Değiştirilmiş Doğal Bitkiler: Yatay Gen Transferi**

İskender Tiryaki..... 565-580

**Carbohydrate Based Therapeutics**

Nebiye Pelin Tırker, Elvan Bakar ..... 581-607

**Őnlő Kazak Bilim Adamı okan Valihanov'a Göre Kazaklarda Tarım Faaliyetleri**







Ayşe Bulut, Ayten Can ..... 608-622

**Pollination in the Tropics: Role of Pollinator in Guava Production**

Nurul Alia Omar, Nur Athirah Zariman, A. Nurul Huda..... 623-639

Cagasan, C.U.G., et al., Production and Quality Evaluation of Wine from Jackfruit Co-Products. International Journal of Life Sciences and Biotechnology, 2021. 4(3): p. 340-352.  
DOI: 10.38001/ijlsb.827739

## Production and Quality Evaluation of Wine from Jackfruit Co-Products

Christian Ulysses G. Cagasan<sup>1\*</sup> , Cail Aleksei V. Lingatong<sup>1</sup> , Kyle Miguel T. Pore<sup>1</sup> , Raymond V. Ramada<sup>1</sup> , Christan Daniel D. Restor<sup>1</sup> , Roberta D. Lauzon<sup>1</sup> 

### ABSTRACT

Ripe jackfruit is among the favorite fruits of many people. However, what is usually eaten is the pulp. The other parts, known as co-products like rags, peel, pith, seeds and seed coat are just thrown away as wastes. This study was conducted to find out if jackfruit co-products can be made into a high value product like wine and to determine the physico-chemical and sensory qualities of wine produced from jackfruit co-products. The study had five treatments, with the type of co-products representing the treatments. The wine products from these treatments were evaluated by 10 trained sensory panelists from the Department of Food Science and Technology in the Visayas State University. Results of the study showed that all of the sensory attributes evaluated (i.e., color, taste, aroma, clarity and flavor) did not significantly differ among treatments. After two weeks of fermentation, wine from the five treatments had general mean acceptability ratings ranging from 5.30 (neither like nor dislike) for the wine from jackfruit rags (T3) to 6.2 (like slightly) for the wine from jackfruit peel (T4). In terms of physico-chemical characteristics, the wine from seed coat, pith and peel had acceptable titrable acid (TA) values of 0.53%, 0.5%, and 0.44%, respectively. Wine from all treatments also had reduced TSS, which means that sugar was broken down into alcohol, a sign of successful fermentation of the must into wine. These results suggest that the jackfruit co-products are potential raw materials for the processing of wine.

### ARTICLE HISTORY

**Received**

19 November 2020

**Accepted**

11 January 2021

### KEYWORDS

Jackfruit wine, sensory evaluation, physicochemical, properties

## Introduction

Jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* Lin) is grown throughout Southeast Asia. Originally a native of India, it is now cultivated in the Philippines. In 1996 to 2008 alone, 200 hectares of large-scale jackfruit planting in the islands of Leyte and Samar was made possible through a government scheme called “plant now, pay later” [1]. The jackfruit is the largest edible tree-grown fruit growing to as much as 35 kilograms in weight [2]. The leaves are a glossy, dark green, and 10 to 15 cm long. The fruit grows right off the tree trunk and the main branches [3]. One mature jackfruit tree can produce ten to two hundred fruits [4-8]. The individual weight of the fruits varies between 2 and 20

<sup>1</sup> Visayas State University, Visca, Baybya City, Leyte, Philippines

\*Corresponding Autor: Christian Ulysses G. Cagasan, e-mail: [chanman.cagasan@gmail.com](mailto:chanman.cagasan@gmail.com)

kilograms, and even approximately 50 kilograms fruits have been recorded [7,9,10]. It is a nutritious fruit, rich in vitamin C, B-complex group of vitamins and contains very good amounts of vitamin B6 (pyridoxine), niacin, riboflavin, and folic acid [11,3]. The skin of the fruit is more like a shell, with hard, spiny points all over it. The skin is pale green, ripening to a yellowy-brown. When ripe, the fruit will give a little smell when pressed and quite stinky. It does smell better when you get into it, like a combination of banana and pineapple. When ripe, it should sound hollow, like a melon [12].

According to the Agribusiness and Marketing Assistance Division of the Department of Agriculture, jackfruit has many uses [13]. The fruit of jackfruit can be processed into a variety of products. Ripe jackfruit is mostly used for desserts. But what people eat is only the pulp. The pulp only comprise an average of about 30% of the fruit weight while the other 60% of the fruit are unutilized waste or co-products [6,14]. The co-products (i.e., peel, rags, pith, seeds and seed coat) are just thrown away, adding to the volume of wastes that we need to manage properly. One of the co-products of jackfruit is called rags, [15]. It is the fibrous materials within the fruit which comprise about 30-50% of the whole fruit. Few people use the rags for cooking, or as one of the ingredients in fruit salads. Even if the rags are high in pectin, not everyone bothers to do anything with it. Many people are not aware that when pectin which can be derived from the rags are consumed, it bears important positive effects on human health including reducing cancer development [16], lowering blood cholesterol and blood glucose level [17,18], and stimulating the immune response [19]. They make it a habit to throw the jackfruit rags away. In effect, a lot of jackfruit rags have been found in the garbage areas since many people are unaware of the benefits it can bring. Most jackfruit growers and consumers do not know that we can make several products out of the jackfruit rags and consequently turns waste into useful and profitable one. Other wastes or co-products of jackfruit are the peel, pith, seed coat and seeds. Like the rags, these parts of jackfruit are just thrown away because most of the people do not know that these can be processed into valuable products.

With the present economic crisis that we are facing, we do not want to throw leftovers such as the jackfruit co-products. Hence, this study was conducted to explore the feasibility of using jackfruit co-products or wastes (peel, pith, seed coat, rags and over ripe pulps) into high value products such as wine. Aside from the possible additional

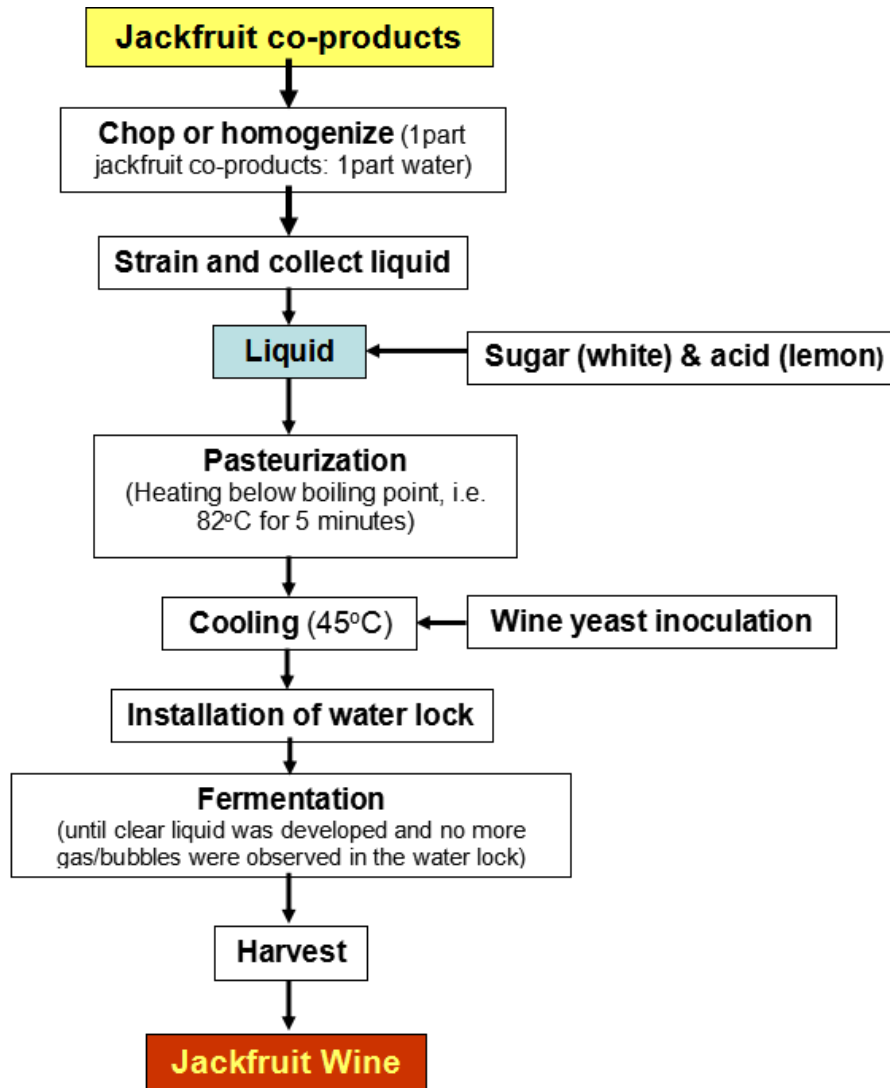
income we can derive from the wine using jackfruit co-products, utilization of jackfruit co-products can also help lessen the wastes in our surroundings and ultimately help in the beautification and care of the environment. Thus this study was conducted to: (1) Find out if jackfruit co-products like rags, peel, pith, seed coat and over ripe pulp could be made into wine; and (2) determine the sensory qualities and physicochemical properties of wine produced from jackfruit co-products.

## **Material and Methods**

The jackfruit co-products were the main materials for the production of dinner wine. These were taken from the Jackfruit Processing Plant of the Department of Food Science and Technology (DFST) in the Visayas State University (VSU), Visca, Baybay City, Leyte. This study had five treatments. What was varied here was the type of co-products used as the main ingredients in the production of sweet wine. Treatments: T1 - seed coat, T2 - pith, T3 – rags, T4 – peel, and T5 – overripe pulp. The amount of the other ingredients (i.e., water, sugar, lemon juice and wine yeast) used for wine production was held constant, or the same in all treatments.

### **Product formulation**

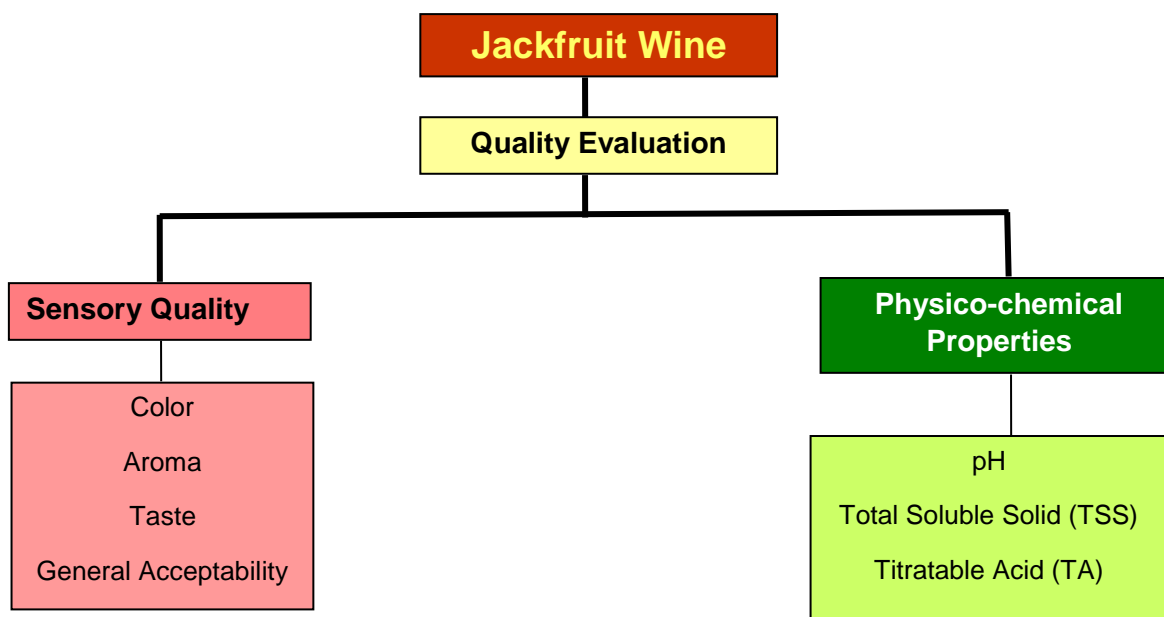
The process of producing wine from jackfruit co-products is presented in Figure 1.



**Fig 1** Process flow in producing wine from jackfruit co-products

### **Product quality evaluation**

The jackfruit wine harvested from the different treatments was subjected to product quality evaluation. The product quality parameters evaluated include sensory quality and physicochemical properties (Fig. 2). The procedures followed in evaluating these parameters are described below.



**Fig 2** Parameters and attributes considered in the evaluation of the quality of the wine produced from jackfruit co-products

### **Sensory quality evaluation**

The jackfruit wine representing the five treatments was evaluated by 10 sensory panelists from the Department of Food Science and Technology (DFST). The sensory attributes considered in the evaluation include the color, taste, aroma and general acceptability of the jackfruit wine. Each attribute was rated by the panelists using the nine-point Hedonic Rating Scale as follows: 1– dislike extremely; 2 – dislike very much; 3 – dislike moderately; 4 – dislike slightly; 5 – neither like nor dislike; 6 – like slightly; 7 – like moderately, 8 – like very much, and 9 – like extremely.

Data were analyzed using descriptive statistics, including totals and means. To determine differences among treatments, the Kruskal-Wallis test was used.

### **Physicochemical properties evaluation**

In addition to evaluating the sensory attributes of the wine from the jackfruit co-products, their physicochemical properties were also determined. The physicochemical properties that were considered in this study include the pH (to measure the acidity of the wine), total soluble solid (TSS), titratable acid (TA) and alcohol content. Standard procedures used in measuring these properties were followed.

## Results and Discussion

### Sensory quality evaluation

#### *Quality description*

Results of the quality evaluation of the wine produced from different jackfruit co-products are summarized in Table 1. As perceived by the sensory evaluators, color of the wine from the different jackfruit co-products ranged from brown to yellow. Among the resulting wine, only that from over ripe pulp (T<sub>5</sub>) got a yellow color. This could be because the pulp when compared to its other parts contains higher amount of carotenoids, a class of natural pigments which makes many fruits and some animals have a yellow-reddish color [20]. According to recent studies the key carotenoids found in jackfruit are all-trans-lutein, all-trans- $\beta$ -carotene, all-trans-neoxanthin, 9-cis-neoxanthin, and 9-cis-vio-laxanthin [21].

Regarding aroma, all of the wine products had slightly perceptible to moderately perceptible jackfruit aroma. For taste, T<sub>3</sub> (wine from rags) was perceived by the sensory panelists to be bitter, while T<sub>1</sub> (wine from seed coat), T<sub>2</sub> (wine from pith) and T<sub>4</sub> (wine from peel) were perceived to have a slightly sour taste. T<sub>5</sub> (wine from over ripe pulp) was considered by the evaluators to have bitter to slightly sour taste.

In terms of the clarity of the wine, all of the treatments were perceived by the evaluators to have cloudy appearance. This could be because of the short aging period which was not enough to allow the sediments to settle and to make the wine clear. For flavor, T<sub>1</sub> (wine from seed coat), T<sub>2</sub> (wine from pith), T<sub>3</sub> (wine from rags) and T<sub>4</sub> (wine from peel) were perceived by the evaluators to have a moderate alcoholic flavor, while T<sub>5</sub> (wine from over ripe pulp) was perceived to have a weak alcohol flavor.

**Table 1** Quality description of wine from different jackfruit co-products

Treatments	QUALITY DESCRIPTIONS				
	Color	Aroma	Taste	Clarity	Flavor
T <sub>1</sub> -Seed coat	Brown	Slightly perceptible	Slightly sour	Moderately to very much cloudy	Moderately alcoholic
T <sub>2</sub> -Pith	Brownish yellow	Slightly perceptible	Slightly sour	Very much cloudy	Moderately alcoholic
T <sub>3</sub> -Rags	Very light brown	Moderately perceptible	Bitter	Slightly cloudy	Moderately alcoholic
T <sub>4</sub> -Peel	Very light brown	Absent	Slightly sour	Slightly cloudy	Moderately alcoholic
T <sub>5</sub> -Over-ripe Pulp	Yellow	Absent to moderately perceptible	Bitter and slightly sour	Slightly to moderately cloudy	Weak

### Sensory acceptability rating

The acceptability ratings of the wine products in terms of their sensory attributes is presented in Table 2.

#### *Color*

Of the five treatments, T<sub>5</sub> (wine from over ripe pulp) had the highest mean color acceptability rating of 6.90, which is equivalent to “like moderately” in the 9 – point hedonic scale. This is possible because of all the co-products used in the study, it is only the pulp that contains beta carotene as exhibited by its dark yellow color [22]. The beta carotene could be the one responsible for the product’s yellow color. Results of the Kruskal-Wallis test (Table 3), however, showed that the mean color acceptability ratings of the treatments were not significantly different from each. This means that in terms of color of the resulting wine, over-ripe pulp could not be considered as significantly better than the other jackfruit co-products.



**Table 2** Mean acceptability ratings of wine from different jackfruit co-products

Treatments	SENSORY ATTRIBUTES *					
	Color	Aroma	Taste	Clarity	Flavor	General acceptability
T <sub>1</sub> - Seed coat	5.50	6.40	5.40	5.90	5.90	5.90
T <sub>2</sub> - Pith	5.90	6.60	5.60	6.50	6.50	5.90
T <sub>3</sub> - Rags	6.40	7.20	5.50	6.60	5.50	5.30
T <sub>4</sub> - Peel	6.30	6.40	5.60	6.50	6.50	6.20
T <sub>5</sub> - Over-ripe Pulp	6.90	6.90	5.00	5.70	5.60	5.60

\*N = 10

**Table 3** Results of the Kruskal-Wallis test showing differences among treatments in terms of their sensory attributes

Sensory Attributes	Chi-Square	df	Assymp. Sig.	Remarks
Color	6.422	4	0.170	ns
Aroma	3.886	4	0.422	ns
Taste	0.474	4	0.976	ns
Clarity	4.111	4	0.391	ns
Flavor	2.741	4	0.602	ns
General acceptability	3.083	4	0.544	ns

*ns – not significant***Aroma**

In terms of aroma, the wine from rags (T<sub>3</sub>) had the highest mean acceptability rating of 7.2, which is equivalent to “liked moderately.” However, as shown in Table 3, this mean acceptability rating was not significantly different from the mean ratings of the other treatments, which ranged from 6.4 to 6.9 (see Table 2). These ratings show that in terms of aroma, the wine from the other jackfruit co-products were also liked slightly to moderately by the evaluators.

**Taste**

As shown in Table 2, wine products from all of the five treatments had considerably low acceptability rating in taste. The sensory panelists’ ratings of the products ranged from 5.0 (for T<sub>5</sub>) to 5.60 (for T<sub>2</sub> and T<sub>4</sub>), which is equivalent to neither like nor dislike in the Hedonic rating scale. This low acceptability rating in taste may be caused two factors. First, due to time limitation, fermentation and aging time of the wine products were shortened. This could be the reason why the wine products in all treatments were still perceived as sour by the sensory evaluators. Second, the sensory evaluators were

students of DFST. Even if they were trained sensory panelists, they are not used to drinking wine, so they could have find it difficult to determine what is an acceptable taste of a wine.

### ***Clarity***

Mean acceptability rating of the wine products from the five treatments did not differ significantly as shown in Tables 2 and 3. The ratings ranged from 5.7 (neither like nor dislike) for the wine from over ripe pulp (T<sub>5</sub>) to 6.6 (like moderately) for T<sub>3</sub> (wine from rags) (Table 2).

### ***Flavor***

Wine from different jackfruit co-products exhibited alcoholic flavor that did not significantly differ from each other (Table 3). As shown in Table 2, the mean acceptability ratings for flavor ranged between 5.50 (neither like nor dislike) for the wine from rags (T<sub>3</sub>) to 6.50 (like slightly) for T<sub>2</sub> (wine from pith) and T<sub>4</sub> (wine from peel).

### ***General acceptability***

Among the treatments, T<sub>4</sub> (wine from peel) got the highest mean acceptability rating of 6.20, equivalent to like slightly. The other treatments (T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub>, T<sub>3</sub> and T<sub>5</sub>) got a general mean acceptability rating that ranged between 5.30 to 5.90, which fall under the “neither like nor dislike” to “like slightly” categories of the Hedonic rating scale. Result of the Kruskal-Wallis test (Table 3), however, showed that the mean general acceptability ratings of the wine from the different jackfruit co-products did not differ significantly from each other. Based on the results of the sensory evaluation, jackfruit co-products are potential materials for wine making since the resulting wine were already liked even slightly by the sensory evaluators even if the fermentation and aging time were only short due to time limitation.

## **Physicochemical properties evaluation**

### ***Total soluble solids***

Total soluble solids (TSS) measures the percent sugar as well as other dissolved solids in solutions. It is measured using the Brix scale or degrees Brix. In producing certain alcoholic beverages, the sugar concentration of the initial solution often affects the alcohol content after the fermentation process [23].

In this study, it was observed that the TSS values of all treatments decreased (Table 4). All treatments had initial TSS values of 14, but after two weeks of fermentation the resulting TSS values ranged only from 4.3 to 6.0.

**Table 4** Physicochemical properties of the wine from jackfruit co-products

Treatments	Total Soluble Solids (TSS)		pH of the must (Initial)	Titrable Acid (TA) (Final)
	Initial	Final		
T <sub>1</sub> - Seed coat	14	6.0	4	0.53%
T <sub>2</sub> - Pith	14	4.9	4	0.50%
T <sub>3</sub> - Rags	14	4.9	4	0.13%
T <sub>4</sub> - Peel	14	5.1	5	0.44%
T <sub>5</sub> - Over-ripe Pulp	14	4.3	5	0.08%

This means that the fermentation was successful because the microorganisms in the fermented solution were able to degrade the sugar and convert it into alcohol, which is the desired outcome in wine making.

### *pH*

The pH value measures the acidity of the wine. Solutions with a pH below 7 are acidic whereas solutions with a pH above 7 are alkaline. In wine tasting, excessive acidity leads to a sourness perception while low acidity decreases the flavor harmony [24]. In this study, only the pH values of the must (liquid for fermentation) of all treatments were determined. The pH values of the treatments after two weeks of fermentation were not determined because the pH meter was out of order. As shown in Table 4, all treatments had pH values below 7 indicating that the solutions were acidic. The researchers, however, could not determine if there was increase in the level of wine acidity after the fermentation process using pH value as the determinant [25].

### *Titrateable acid*

Wines contain organic acids which come from its fruit source. However, many other acids are formed during and after the alcoholic fermentation [26]. To determine the quantity of titrateable acid (TA) in the wines produced from jackfruit co-products, a procedure known as acid-base titration was performed. In the wine making industry, the regulations dictate the minimum acid levels of 0.5 percent in table wines if the must or wine is ameliorated. Most of the commercially produced wines contain acid levels in the

range of 0.6 to 0.9 percent [27]. In this study, results showed that wines from seed coat (T<sub>1</sub>) and pith (T<sub>2</sub>) had acceptable titratable acid values of 0.53% and 0.50%, respectively. Wine from the peel (T<sub>4</sub>) even had a TA value of 0.44%, which is already near the minimum acceptable level. These results suggest that the seed coat, pith and peel of jackfruit are potential materials in the production of wine [28].

## **Conclusion**

Based on the results of the study, it can be concluded that:

1. The jackfruit co-products are potential materials that can be processed into wine because even only after two weeks of fermentation, the wine products already got mean general acceptability ratings above 5.0.
2. The sensory qualities of the jackfruit wine were not influenced by the type of co-products used for the processing of wine. Thus, any of the jackfruit co-products are potential materials for the processing of wine.
3. Wine from jackfruit co-products had acceptability ratings between 5.0 (neither like nor dislike) to 6.2 (like slightly), which indicates that there is still a need to improve the process of wine production to improve its acceptability.

## **Recommendation**

This study focused on the production and quality evaluation of wine from jackfruit co-products (seed coat, pith, rags, peel, and over ripe pulp), which are not the usual materials used in producing wine. This suggests that there is still a need to study further the following aspects to improve the quality of the wine from jackfruit co-products:

1. Duration of the fermentation and aging process;
2. Production of wine from a mixture of jackfruit co-products;
3. Evaluation of the wine's sensory qualities by experts in wine tasting.

## **Acknowledgements**

We sincerely thank the faculty and staff of the Department of Food Science and Technology, Visayas State University for their assistance and support in this study.

## **Funding**

This study is not funded by any organization.

## **Availability of data and material**

Please contact the corresponding author for any data request.

## References

1. Borines, L. M., et al., Jackfruit decline caused by *Phytophthora palmivora* (Butler). *Australasian Plant Pathology*, 2013. 43 (2): p. 123–129.
2. Prakash, O., et al., *Artocarpus heterophyllus* (Jackfruit): An Overview. *Phcog Rev*, 2009. 3 (6): p. 353-358
3. Mushumbusi, D. G., Production and Characterization of Jackfruit Jam. [Master of Science in Food Science Thesis], Sokoine University of Agriculture, Morogoro, Tanzania, 2015.
4. Alagiapillai, O. A., et al., "PPI-I jack: A new high yielding, regular bearing jack variety for Tamil Nadu," *Madras Agricultural Journal*, 1996. 83: p. 310–312.
5. Haq, N., "Jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*)," *Tropical Fruit Trees*. 2006, Southampton Centre for Underutilised Crops, University of Southampton, Southampton, UK.
6. Narasimham, P., "Breadfruit and jackfruit," *Fruits of Tropical and Subtropical Origin: Composition. Properties and Uses*. 1990, Florida Science Source, Lake Alfred, Florida, USA.
7. Reddy, B. M. C., et al., "Studies on physico-chemical characteristics of jackfruit clones of south Karnataka, Karnataka," *Journal of Agricultural Science*, 2004. 17 (4): p. 279–282.
8. Sammadar, H. M., "Jackfruit," *Fruits of India: Tropical and Subtropical*. 1985, Naya Prokash, Calcutta, India.
9. Mitra, S. and Mani, D., "Conservation and utilisation of genetic resources in jackfruit (*artocarpus heterophyllus* lam.) - a potential underutilised fruit," *Acta Horticulturae*, 2000. 523: p. 229–232.
10. Selveraj, Y. and Pal, D. K., "Biochemical changes during ripening of jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* Lam)," *Journal of Food Science and Technology*, 1989. 26: p. 304–307.
11. Swami, S. B., et al., "Jackfruit and its many functional components as related to human health: a review," *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2012. 11 (6): p. 565–576.
12. Morton, J., *Jackfruit, Fruits of Warm Climates*. 1987, Miami, FL.
13. Department of Agriculture, *Jackfruit: A Commodity Profile*, 2010. Tacloban City, Philippines: Agribusiness and Marketing Assistance Division, Department of Agriculture.
14. Subburamu, K., et al., *A Study on the Utilization of Jack Fruit Waste*. Short communication. *Bioresource Technology*, 1992. 40: p. 85-86.
15. Mortensen, E. L., et al., Better psychological functioning and higher social status may largely explain the apparent health benefits of wine: a study of wine and beer drinking in young Danish adults. *Arch Intern Med*, 2001. 161: p. 1844-1848
16. Jackson, C.L., et al., Pectin Induces Apoptosis in Human Prostate Cancer Cells: Correlation of Apoptotic Function with Pectin Structure. *Glycobiology*, 2007. 17: p. 805–819.
17. Behall, K., and Reiser, S., Effects of Pectin on Human Metabolism, in "Chemistry and Functions of Pectins", American Chemical Society, 1986. p. 248–265.
18. Brown, L., et al., Cholesterol Lowering Effects of Dietary Fiber: A Meta-Analysis. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 1999. 69: p. 30–42.
19. Inngjerdingen, K. T., et al., Immunological and Structural Properties of a Pectic Polymer from *GlinusOppositifolius*. *Glycobiology*, 2007. 17: p. 1299–1310.
20. De Faria, A. F., de Rosso, V. V., and Mercadante, A. Z., Carotenoid Composition of Jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*), Determined by HPLC-PDA-MS/MS. *Plant Foods for Human Nutrition*, 2009. 64 (2): p. 108–115.
21. Baliga, M. S., et al., "Phytochemistry, nutritional and pharmacological properties of *Artocarpus heterophyllus* Lam. (jackfruit): A review," *Food Research International*, 2011. 44 (9): p. 1800–1811.
22. Chandrika, U. G., Jansz, E. R., and N. D. Warnasuriya, "Analysis of carotenoids in ripe jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) kernel and study of their bioconversion in rats," *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2004. 85 (2): p. 186–190.

23. Ball, D. W., Concentration Scales for Sugar Solutions. *Journal of Chemical Education*, 2006. 83(10), p. 1489.
24. Moreno-Arribas, M. V. M. and Polo, M. C., *Wine Chemistry and Biochemistry*. Springer Science and Business Media, 2008.
25. Kumoro, A. C., et al., Preparation of Wine from Jackfruit (*Artocarpus heterophyllus lam*) Juice Using Baker yeast: Effect of Yeast and Initial Sugar Concentrations. *World Applied Sciences Journal*, 2012. 16: p. 1262-1268.
26. Nielsen, S., *Food Analysis*. Springer Science and Business Media, 2003.
27. Amerine, M. A. and C. S. Ough., *Methods for analysis of musts and wines*. John Wiley and Sons, New York, 1980.
28. Bhavya, H. T., Transformation of polyphenols in fruits during fermentation: Wine from passion fruit (*Passiflora edulis*). 2009, CFTRI, Mysore, India.

Arslan, B.A., et al., Protective effects of Folic acid and Vitamin C against iron overload at the *in vitro* Blood-Brain Barrier. International Journal of Life Sciences and Biotechnology, 2021. 4(3): p. 353-359. DOI: 10.38001/ijlsb.886008

## Protective effects of Folic acid and Vitamin C against iron overload at the *in vitro* Blood-Brain Barrier

Belkis Atasever Arslan<sup>1\*</sup> , Enes Furkan Arslan<sup>1</sup> , Idil Satici<sup>1</sup>  Ayşegül Yanik<sup>1</sup> , Seda Kusoglu Gultekin<sup>1</sup> 

### ABSTRACT

Brain iron accumulation increases with age and this is more common in patients with neurodegenerative diseases such as Parkinson's disease. Also iron overload in addition to zinc accompanies with plaques containing  $\beta$ -amyloid (AP) of Alzheimer's Disease. The blood-brain barrier (BBB) is a dynamic interface between the blood and the brain that plays an important role in maintaining central nervous system (CNS) homeostasis.

In our study, protective effects of vitamin C and folic acid against iron overload in the *in vitro* blood-brain barrier model were investigated. Four different groups were created for the experimental procedure: 1) Control, 2) FeSO<sub>4</sub>, 3) FeSO<sub>4</sub> + Vit C, 4) FeSO<sub>4</sub> + Folic acid for toxicity experiments. After iron overload, permeability differences of Vitamin C and folic acid *in vitro* BBB model were assayed using Bovine Serum Albumin (BSA) Bradford protein assay. Both substances were found to have a protective effect against iron sulphate-induced damage. Also, vitamin C and folic acid significantly decrease the permeability after increasing caused by iron sulfate in BBB model. Considering the toxic effects of high concentrations of vitamin C, systemic effects of folic acid should also be investigated by *in vivo* studies to compare with vitamin C in ageing.

### ARTICLE HISTORY

#### Received

24 February 2021

#### Accepted

30 March 2021

### KEY WORDS

Vitamin C,  
folic acid,  
iron overload,  
blood brain barrier

## Introduction

The blood-brain barrier (BBB) is a dynamic interface between the blood and the brain that plays an important role in maintaining central nervous system (CNS) homeostasis. Endothelial cells are interconnected by tight junctions that are critical both for the control of BBB vascular permeability and for the protection of the brain from various circulating toxins and other harmful molecules [1, 2]. Astrocytes and pericytes also contribute to the formation and maintenance of BBB [3].

The major functions of BBB are: (1) maintaining different ionic composition required for neuronal function, (2) special neurotransmitter pool, (3) low protein concentration, (4)

<sup>1</sup> Department of Molecular Biology and Genetics, Faculty Engineering and Natural Sciences, Üsküdar University, İstanbul / Turkey

\*Corresponding Author: Belkis ATASEVER ARSLAN, e-mail: [belkisatasever.arslan@uskudar.edu.tr](mailto:belkisatasever.arslan@uskudar.edu.tr)

preventing toxin exposure leading to neuronal damage, (5) reducing the traffic of molecules and inflammatory cells to prevent local inflammation [4, 5].

Iron ions serving as transition metal molecules that catalyze hydroxyl radical production through the Fenton reaction and Haber-Weiss cycle, accumulate in neurons, astrocytes and microglia, causing neuron death [4]. It is known that damage due to reactive oxygen species (ROS) and nitric oxide (NO) causes diseases such as cancer and Alzheimer's disease (AD) [3, 6].

Vitamin C, which cannot be physiologically synthesized by humans and primates, can be synthesized endogenously by some mammals (e.g., mouse and rat) [7]. Vitamin C, a water-soluble vitamin, should be taken in a daily diet. Vitamin C is involved in critical pathways for the body, such as protecting the integrity of vascular and connective tissue, inhibition of lipid peroxidation and acts as a scavenger of free radicals in the brain [7, 8]. Folate plays an important role as a cofactor or coenzyme in the maintenance and repair of the genome, regulation of gene expression, amino acid metabolism, myelin formation and neurotransmitter synthesis [8]. Folate is hydrophilic vitamin of the B complex, deficiency of which results in some disease such as hyperhomocysteinaemia, cerebral folate deficiency syndrome [8].

In our study, protective effects of vitamin C and folic acid against iron overload in the *in vitro* blood-brain barrier model were investigated.

## **Materials and Methods**

### ***in vitro* Blood-Brain Barrier**

ECV304 (ATCC<sup>®</sup> CRL-1998<sup>™</sup>) human umbilical vein endothelial cell line was used for the *in vitro* blood-barrier model. DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium/High Glucose, DMEM/High, Gibco 41966) including 10% fetal bovine serum (Gibco 10270106) and 1% penicillin-streptomycin (Gibco 15070063) was used as ECV304 medium. To produce monolayer-barrier models,  $5 \times 10^4$  ECV304 cells were seeded in 1 ml of DMEM into the top well of the transwell plate (Costar 3450, 6-well polyester filter). 3 ml of DMEM was added to the bottom well of the plate [9].

### **Toxicity Studies**

Four different groups were created for the experimental procedure: 1) Control, 2) FeSO<sub>4</sub>, 3) FeSO<sub>4</sub> + Vit C, 4) FeSO<sub>4</sub> + Folic acid. For first group, ECV304 cells incubated with



only medium. On the other groups, 250  $\mu$ l from 1mM FeSO<sub>4</sub> solution and 750  $\mu$ l DMEM were added and incubated with ECV304 cells during o/n. While in the third group firstly 100  $\mu$ g/ml Vitamin C (Selenovita-C) for 24 hours then FeSO<sub>4</sub> were added, in the last group after 100 $\mu$ g/ml folic acid (Folbiol (5 mg) resolved in 1 ml DMSO and diluted with DMEM medium) 24 hours incubation, FeSO<sub>4</sub> was added. All group were incubated 24 hours.

### **Trypan Blue Cell Viability**

All groups were washed with serum-free medium. Then incubated with trypan blue solution for 5–15 min. Cells were then washed three times with DMEM with 0.1% BSA, and the number of dead cells staining blue was counted under a phase-contrast microscope [10].

### **Permeability Measurement**

After iron overload, permeability differences of Vitamin C and folic acid *in vitro* BBB model were assayed using Bovine Serum Albumin (BSA) Bradford Protein Assay Kit protocol according to manufacturer instructions (Bio Basic Inc, SK3031). After creating the BSA standard curve, 110  $\mu$ g/ml BSA, serum free medium solution was added to the upper well of the transwell. In the 30<sup>th</sup> and 60<sup>th</sup> minutes, 20  $\mu$ l sample was collected from both the upper and lower wells to the eppendorfs. 200  $\mu$ l of Bradford Reagent (BioBasic) was added to each sample. It was also turned in a shaker for 30 seconds and incubated for 10 minutes at room temperature. After incubation, their absorbances were measured in 595 nm.

Permeability was analyzed according to the formula below [11].

$$Papp \text{ (cm/s)} = \frac{\text{Concentration of basal compartment } ([C]_B) \times \text{Volume of basal compartment } (V_B)}{\text{the surface area available for permeability } (A) \times \text{Concentration of apical compartment } ([C]_A) \times t}$$

## **Results and Discussion**

In this study, protective effects of vitamin C and folic acid against iron sulfate-induced damage in the blood-brain barrier model were investigated. Trypan blue cell viability results of 4 groups were shown in Figure 1. As shown in Figure 1B by the arrows on the barrier model after FeSO<sub>4</sub> exposure, decreased cell adhesion and dead cell density stained with trypan blue indicate the damage caused by FeSO<sub>4</sub>.

Lockman et al. showed that iron causes oxidative damage and destruction in the *in vitro* blood-brain barrier model [12]. Another effect of oxidative stress on BBB decreases matrix metalloproteinases (MMP-1, -2 and -9) inhibitors and protein tyrosine kinase (PTK) inhibitors. It is known that the increase in MMPs and PTK activities is parallel to the disruption in tight junction (TJ) proteins [13]. Decreasing of intercellular tight junctions increases the permeability in blood-brain barrier.

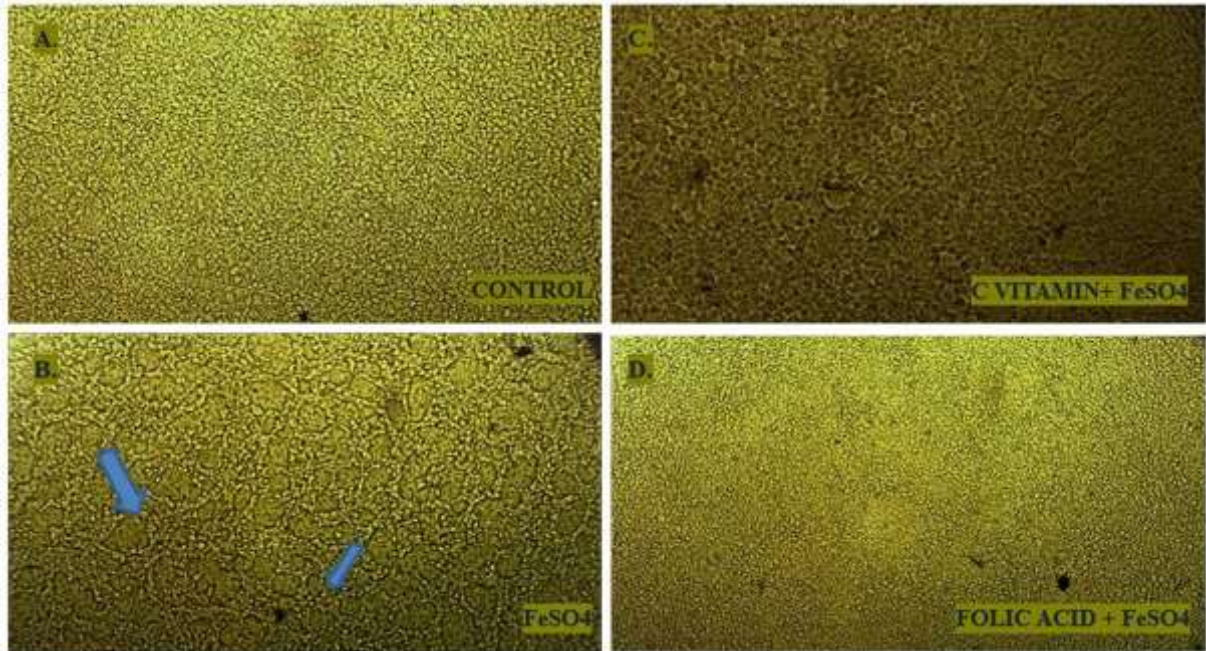
Brain iron accumulation increases with age and this is more common in patients with neurodegenerative diseases such as Parkinson's disease [14]. Parkinson's patients have been shown that their iron levels in the substantia nigra increase in the patients compared to controls [3]. The elevation of chronic ferritin has been shown to result in age-related progressive neurodegeneration of neurons containing midbrain dopamine. Iron overload in addition to zinc accompanies with plaques containing  $\beta$ -amyloid (AP) of AD [3].

In addition to Parkinson's Disease, it has been observed that oxidative stress leads and aggravates the course of the disease in diseases such as Alzheimer's, ALS, and MS. It has been reported that brain damage is triggered by increased damage and permeability in the BBB [15].

Regulation of iron homeostasis includes many steps that control iron transport, storage and regulation. Although iron ion plays an important role in many biochemical processes such as neurotransmitter synthesis, myelination, oxygen transport and cell division, it is known to cause toxic effects at high doses [15]. Increased amount of iron ions in cells contributes to the production of reactive oxygen species (ROS) through Fenton reaction [4].

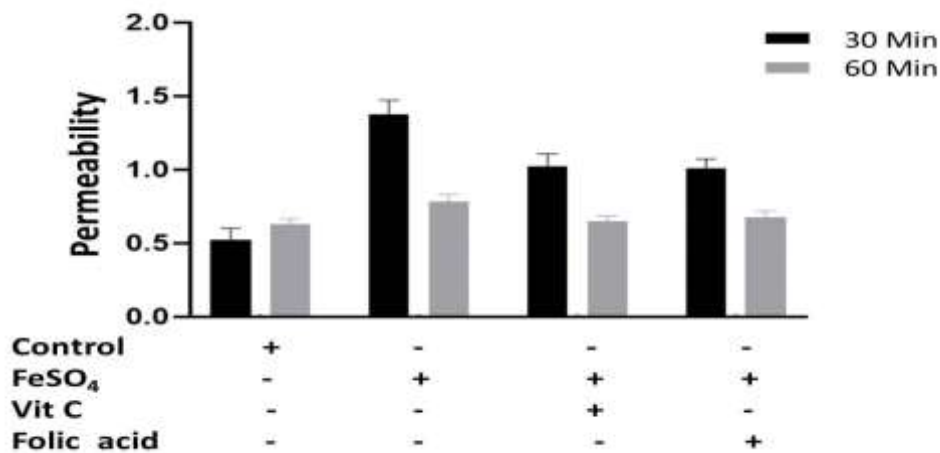
Vitamin C has been shown to have a protective effect on the blood-brain barrier [16]. Vitamin C, in the form of deascorbic acid, is known to increase the antioxidant capacity in the central nervous system by crossing the blood-brain barrier via glucose transporter protein 1 (GLUT1) [17]. Folic acid, a water-soluble vitamin, is essential for DNA synthesis, repair and methylation in the cell. It is known that folic acid has anticancer, cardiovascular and neuroprotective effects. Folic acid deficiency can affect various processes in the body, including loss of extracellular matrix component collagen and disruption of the blood-brain barrier [18].

In Figure 1C and 1D, barrier models that are exposed to metal after 24 hours incubation with vitamin C and folic acid, respectively, are shown. Compared to the damage seen in Figure 1B, both substances have protective effects against iron sulphate-induced damage.



**Fig 1** A. Microscope image of a monolayer blood-brain barrier model after trypan blue staining, B. ECV304 cells incubated with  $\text{FeSO}_4$ , C. After vitamin incubation for 24 hours,  $\text{FeSO}_4$  was added. D. Folic acid incubation for 24 hours then  $\text{FeSO}_4$  was added

As seen in the graph given in Figure 2, iron sulfate increases barrier permeability. Increased BSA transition indicates reducing cell-cell interactions and barrier damage. Also it is seen that vitamin C and folic acid significantly decrease the permeability after increasing caused by iron sulfate. Both folic acid and Vitamin C were found to have similar protective effects compared to each other.



**Fig 2** Effects of iron overload, vitamin C and folic acid on BSA permeability in a monolayer blood-brain barrier model

## Conclusion

Vitamin C accumulates in the central nervous system and its level in the brain is much higher than in plasma or other organs. Plasma vitamin C levels are lower in AD patients than healthy individuals. Vitamin C has been shown to have a protective effect on the blood-brain barrier. However, mechanisms of folic acid against iron overload in blood-brain barrier are unknown. It has been shown *in vitro* that folic acid supplementation may have a protective effect against increasing Fe concentration in the brain with aging. Considering the toxic effects of high concentrations of vitamin C, systemic effects of folic acid should also be investigated by *in vivo* studies to compare with vitamin C in ageing.

## Abbreviations

AD: Alzheimer's disease; BBB: The blood-brain barrier; BSA: Bovine Serum Albumin

## References

1. Lin, J.L., et al., Ascorbic Acid Prevents Blood-Brain Barrier Disruption and Sensory Deficit Caused by Sustained Compression of Primary Somatosensory Cortex. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 2010. 30(6): p. 1121-1136.
2. Tudisco, C., et al., Comparison Between Folic Acid and gH625 Peptide-Based Functionalization of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Magnetic Nanoparticles for Enhanced Cell Internalization. *Nanoscale Research Letters*, 2018. 13(1): p. 45.
3. Skjørringe, T., L.B. Møller and T. Moos, Impairment of Interrelated Iron- And Copper Homeostatic Mechanisms in Brain Contributes to the Pathogenesis of Neurodegenerative Disorders. *Frontiers in Pharmacology*, 2012. 3: p. 169.

4. Won, S.M., et al., Iron Mediates Endothelial Cell Damage and Blood-Brain Barrier Opening in the Hippocampus After Transient Forebrain Ischemia in Rats. *Experimental & Molecular Medicine*, 2011. 43(2): p. 121-129.
5. Varatharaj, A. and I. Galea, The Blood-Brain Barrier in Systemic Inflammation. *Brain, Behavior, and Immunity*, 2017. 60: p. 1-12.
6. Emoto, M.C., et al., Synthesis and Evaluation as a Blood-Brain Barrier-Permeable Probe of 7-N-(Proxyl-3-yl-methyl) theophylline. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 2018. 66(9): p. 887-891.
7. Agus, D.B., et al., Vitamin C Crosses the Blood-Brain Barrier in the Oxidized Form Through the Glucose Transporters. *Journal of Clinical Investigation*, 2017. 100(11): p. 2842-2850.
8. Gordon, N., Cerebral Folate Deficiency. *Developmental Medicine and Child Neurology*, 2009. 51(3): p. 180-182.
9. Yang, S., et al., Identification of two immortalized cell lines, ECV304 and bEnd3, for *in vitro* permeability studies of blood-brain barrier. *PLoS One*, 2017. 12(10): e0187017
10. Lagrange P, et al., Transendothelial Permeability Changes Induced by Free Radicals in an *in vitro* Model of the Blood-Brain Barrier. *Free Radical Biology and Medicine*, 1999. 27(5-6): p. 667-72.
11. Veszelka, S., et al., Comparison of a Rat Primary Cell-Based Blood-Brain Barrier Model With Epithelial and Brain Endothelial Cell Lines: Gene Expression and Drug Transport. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 2018. 11: p. 166.
12. Lockman, J.A., et al., Differential effect of nimodipine in attenuating iron-induced toxicity in brain-and blood-brain barrier-associated cell types. *Neurochemical Research*, 2012. 37(1): p. 134-142.
13. Haorah, J., et al., Oxidative stress activates protein tyrosine kinase and matrix metalloproteinases leading to blood-brain barrier dysfunction. *Journal of Neurochemistry*, 2007. 101(2): p. 566-576.
14. Zheng, W., Monnot, A.D., Regulation of Brain Iron and Copper Homeostasis by Brain Barrier Systems: Implication in Neurodegenerative Diseases. *Pharmacology & Therapeutics*, 2012. 133(2): p. 177-188.
15. Mohammed, M. A., et al., Factors controlling permeability of the blood-brain barrier. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2016. 73: p. 57-77.
16. Kook, S.Y., et al., High-dose of Vitamin C Supplementation Reduces Amyloid Plaque Burden and Ameliorates Pathological Changes in the Brain of 5XFAD Mice. *Cell Death & Disease*, 2014. 5(2): e1083.
17. Agus, D. B., et al., Vitamin C crosses the blood-brain barrier in the oxidized form through the glucose transporters. *Journal of Clinical Investigation*, 1997. 100(11): p. 2842-2848.
18. Smith, A. D., et al., Is folic acid good for everyone? *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2008. 87(3): p. 517-533.

Sönmez, M., et al., Investigation of Antioxidant, Enzyme Inhibition and Antiproliferative Activities of Blackthorn (*Prunus spinosa* L.) Extracts. International Journal of Life Sciences and Biotechnology, 2021, 4(3): p. 360-380. DOI: 10.38001/ijlsb.851220

## Investigation of Antioxidant, Enzyme Inhibition and Antiproliferative Activities of Blackthorn (*Prunus spinosa* L.) Extracts

Merve Sönmez<sup>1</sup> , Ferah Cömert Önder<sup>1,2</sup> , Esra Tokay<sup>3</sup> , Ayhan Çelik<sup>4,A</sup> ,  
Feray Köçkar<sup>3</sup> , Mehmet Ay<sup>1,\*</sup> 

### ABSTRACT

Natural products have a key role for drug discovery in pharmacology and medicine. *Prunus spinosa* L. (blackthorn) grown in Çanakkale province in western Turkey, is known as a medicinal plant, a rich source of biologically active compounds such as phenolics, flavonoids and anthocyanidins. The flower and fruit extracts of the plant are subjects of many studies, but they usually lack details of its potential for bio-inhibition studies. Thus, this study aimed to investigate the antioxidant, enzyme inhibition and antiproliferative activity studies of the methanol, ethyl acetate, dichloromethane, and *n*-hexane extracts of the plant. The ethyl acetate and methanol extracts showed better antioxidant activity with DPPH, FRAP, CUPRAC, and TEAC assays. Enzyme inhibition studies of the extracts were performed using  $\beta$ -lactamase, proteases and tyrosinase. The methanol (FL) and ethyl acetate (FL and L) extracts at the concentration of 10 mg/mL, displayed better inhibition against  $\alpha$ -chymotrypsin, trypsin, and papain with values of 22.6%, 34.7% and 92.1%, respectively. Furthermore, the methanol and ethyl acetate extracts have displayed higher cytotoxic effect against cancer cells such as Hep3B and HT29 compared to healthy cells (HUVEC) using MTT assay. The findings suggest that *P. spinosa* L. extracts and their components may be potential for further investigations of novel drug candidates from natural sources.

### ARTICLE HISTORY

**Received**  
05 January 2021  
**Accepted**  
18 March 2021

### KEY WORDS

*Prunus spinosa* L.,  
enzyme inhibition,  
proteases,  
cytotoxicity,  
antioxidant

## Introduction

Medicinal plants that are generally used in the health area, are the most important primary sources of naturally occurring bioactive compounds in the pharmaceutical industry [1]. There is an increasing interest to use these plants to prevent and treat chronic diseases like cardiovascular (CVD) [2,3]. Therefore, searches must continue to find valuable lead compounds from medicinal and aromatic plants [4]. Up to now, it was calculated that

<sup>1</sup>Department of Chemistry, Faculty of Arts and Science, Natural Products and Drug Research Laboratory, Çanakkale Onsekiz Mart University, 17020 Çanakkale, Turkey

<sup>2</sup>Department of Medical Biology, Faculty of Medicine, Çanakkale Onsekiz Mart University, 17020 Çanakkale, Turkey

<sup>3</sup>Department of Molecular Biology and Genetics, Faculty of Sciences and Arts, Balıkesir University, 10145 Balıkesir, Turkey

<sup>4</sup>Department of Chemistry, Faculty of Science, Gebze Technical University, 41400 Gebze-Kocaeli, Turkey

<sup>A</sup>AÇ left from GTU in 2016

\*Correspondence: [mehmetay06@comu.edu.tr](mailto:mehmetay06@comu.edu.tr)

about 40% drugs in the pharmaceutical markets are derived from plant bioactive components [5]. There are numerous medicinal plants that have not been investigated by the researchers. Among those plants, *Prunus spinosa* L. possesses effective and valuable secondary metabolites [5,6] for which limited information is available. *P. spinosa* L. (Blackthorn or sloe, and also its name is “çakal eriği” in Turkish) which belongs to the Rosaceae family, is growing worldwide [6,7]. The taxonomy of the genus is complicated due to polymorphism and wide ecological tolerance of the species. There has been no taxonomic study of genus *Prunus* in Turkey since Browicz’s work, so it is indicated that the studies are not enough to understand its genus and species [8,9]. It is widely used as a source of natural bioactives which have an important role to prevent diseases such as cardiac, hypertensive etc. [3]. It has reported that its leaves and flowers are used for constipation and diuretic and also flowers are used as laxatives in Turkey [7]. According to ethnopharmacological sources, the researchers have been interested in the flowers of this plant due to its medicinal usages such as vasoprotective, diuretic, anti-inflammatory and, spasmolytic activities [5,10,11]. The fruits of the plant have also been used for mild inflammation of oral and pharyngeal mucosa [3,5,6]. Based on the literature reports, highly rich biologically active compounds such as flavonoids, a large group of secondary metabolites, have been identified in *P. spinosa* L. extracts. Especially anthocyanins are present in the fruits and flowers of the plant. The active extracts were demonstrated for its importance on human health [10,12,13]. The proanthocyanidins that are known with their antioxidant activity, anti-inflammatory, and enzyme inhibition, have been investigated in blackthorns [14]. Furthermore, total phenolics and antioxidant activities of the fruit and flower extracts from some *Prunus* species including *P. spinosa* L. have been investigated in several studies by Folin-Ciocalteu (FC) method and DPPH, ABTS and, FRAP assays.

The enzyme inhibitory potentials of the compounds in the extracts can be determined with the therapeutically important enzymes to find the new inhibitors for drug discovery program. For instance, proteases can be given as an example due to their over activity in diseases such as cancer and relationship with neurodegenerative disorders, inflammatory, cardiovascular, and viral diseases [15-17]. The cellular roles of proteases make them prime targets in drug developments. Such important roles have been highlighted in previous works [15-17]. Inhibitors of serine proteases derived from various plants have

been reported for their roles as repressors in tumor cell growth [18-20]. Another example is tyrosinase that possesses a role in melanin synthesis. In hyperpigmentation, hydroxylation from *L*-tyrosine to 3,4-dihydroxyphenylalanine (*L*-DOPA) is catalyzed by tyrosinase and tyrosinase like enzymes [21]. The overproduction of melanin results in discoloration. Therefore, finding effective tyrosinase inhibitors is of prime importance for developing skin whitening agents [22,23]. Recently, the researchers have focused on the determination of new tyrosinase inhibitors from natural sources like plants for medicinal, cosmetic and food industries due to their bioavailability and non-toxic properties on human health [24-27]. Different extracts obtained from leaves of *Prunus* species were investigated for their tyrosinase enzyme inhibition activities and compared to other plant extracts [28]. Anti-tyrosinase activities at low doses of valuable plant bioactive components including coumarins, anthocyanidins, chalcones, flavanols etc. were reviewed in the latest study [29]. Lastly,  $\beta$ -lactam antibiotics including penicillin derivatives are well known antibiotic drugs.  $\beta$ -Lactamases that hydrolyzes  $\beta$ -lactam rings are important enzymes whose inhibitors like clavulanic acid, tazobactam and sulbactam are preferred for the studies of drug discovery and development [30,31]. Therefore, identification of natural inhibitors or synthetic derivatives and their combination with  $\beta$ -lactamase inhibitors have gained an interest to prevent infectious diseases. To determine new bioactive inhibitors from medicinal plants such as leaves of *P. africana*, anti  $\beta$ -lactamase activity of the extracts was investigated in the literature [32]. As stated, plant components could be proposed as an important source for enzyme inhibition studies [21]. Consequently, there are much needed novel enzyme inhibitors from medicinal plants for prevention of those diseases and to be used in the food and cosmetic industry and biotechnological applications. Antitumor potential of *P. spinosa* L. was also investigated and associated with the enriched phenolic compounds in the fruit extracts [33,34]. In addition, water extract obtained from the fruit of *P. spinosa* was investigated for its apoptotic effect against human colon carcinoma cell line (HT29) with dose- and time-response studies [33]. It is considered that *P. spinosa* L. extracts especially isolated from flower gains importance for the treatment of cancer due to these limited, but promising *in vitro* results.

In the light of these explanations, this study aimed to investigate the biologically active extracts such as flowers, fruits and leaves of *P. spinosa* L growing in Turkey (Fig. 1). The



content of total phenolics and antioxidant activities of the extracts were evaluated by using Folin Ciocalteu method and DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl), CUPRAC (Cupric Reducing Antioxidant Capacity), FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) and TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity with ABTS radical cation) assays. Enzyme inhibitory potentials of the extracts were performed against selected enzymes including proteases (trypsin,  $\alpha$ -chymotrypsin, and papain), tyrosinase and  $\beta$  –lactamase. Antiproliferative activities of the extracts on Hep3B (human hepatoma cell line), HT29 (human colon carcinoma cell line) and HUVEC (primary human umbilical vein endothelial cells) were successfully carried out. To our knowledge, this is the first study that is based on the combination of antioxidant, enzyme inhibition and antiproliferative activities of valuable *P. spinosa* L extracts.



**Fig 1** Flowers, fruits and leaves of *Prunus spinosa* L.

## **Materials and methods**

### **Chemicals and reagents**

HPLC grade solvents including *n*-hexane, dichloromethane, ethyl acetate, methanol, DMSO were purchased from Sigma-Aldrich and Merck. Biological activity reagents were indicated in our previously reported study; the reference was given in the experimental section. Additionally, human hepatoma carcinoma (Hep3B) and human colon carcinoma (HT-29) cell lines were provided from Cardiff University and Animal Cell Culture Collection (HUKUK, Ankara, Turkey), respectively. HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) was provided from Bilkent University, Ankara, Turkey). Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), L-Glutamine, trypsin/ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) solution and, Fetal Calf Serum (FCS) were from Gibco (USA). Silica gel plates (0.25 mm, 60GF 254 ) were used to perform qualitative analysis with DPPH spraying.

### **Plant material and preparation of the extracts**

*Prunus spinosa* L. was collected from Panayır place-Ayvacık which is a town and district of Çanakkale in Turkey. The geographic coordinates of Ayvacık are 39° 36' 4" North, 26° 24' 17" East. All parts were identified in the Herbarium Application Research Center and Botanic Garden of Çanakkale Onsekiz Mart University. Taxon's name was recorded as *P. spinosa* L. subsp. *dasyphylla* (Schur) Domain and the altitude was defined as 270 m. It spreads in the bushes and under the forest. It scatters up to 1700 m above sea level. To prepare the plant extract, all parts that were dried without sunlight in the air, were grinded by a blinder and stored at +4 °C in the refrigerator. The extraction was performed with different solvents including *n*-hexane, dichloromethane, ethyl acetate and methanol, respectively, by Soxhlet extraction. The solvents were removed by using a rotary evaporator under vacuum and stored at +4 °C for further analysis.

### **Phenolic content determination**

To determine the total phenolics, the most known method was applied to plant samples by using Folin-Ciocalteu (F-C) reagent. The details were reported in our previous studies [35,36]. The concentration of the extracts was prepared as 1 mg/mL. Ferulic acid was used for preparing a standard calibration curve. Total phenolic contents of the extracts were measured at 725 nm by spectrophotometrically using the Perkin Elmer lambda 25 UV spectrophotometer. The data was expressed as mg ferulic acid/100 g extract.

### **Determination of antioxidant activity**

#### ***Qualitative analysis***

Firstly, plant extracts were analyzed qualitatively using thin layer chromatography (TLC). To detect the active extracts, DPPH solution (4 mg/50 mL in methanol) was prepared. Then, each extract was run on silica gel plates in the mix of proper solvents using *n*-hexane/ethyl acetate and dichloromethane/methanol and sprayed by DPPH solution. The changings of color from purple to yellow were observed at 254 nm following 30 min (Camag UV Cabinet 4). Hereby, active extracts were successfully determined with this assay [36,37].

#### ***Quantitative analysis***

For antioxidant activity studies, we used DPPH, CUPRAC, FRAP and TEAC assays. DPPH radical scavenging activity was carried out with small modifications by the method of Shoeb *et al.* 2007 as described in our previous work [36,38]. For this purpose, the serial

dilutions (1-0.001 mg/mL) were prepared to be used in the assays. Then, sample solution (500  $\mu$ L) was treated with DPPH solution (500  $\mu$ L; 8 mg/100 mL in methanol) for half an hour and the absorbance values were determined at 517 nm spectrophotometrically. IC<sub>50</sub> values for each solution were determined and then, scanning using a DPPH solution was performed in the range of proper concentrations to identify the most active value. Quercetin was used as a positive standard. CUPRAC assay was implemented according to the literature [39]. Briefly, freshly prepared samples at 0.1 mg/mL concentrations were reacted with copper (II) chloride, alcoholic solution of neocuproine and buffer solution with ammonium acetate for half an hour at the room temperature. The measurement of the absorbances was performed at 450 nm. Quercetin was used as a standard. The data was determined as quercetin equivalent flavonoid concentration. FRAP assay was performed with small modifications [40]. In brief, freshly prepared working solution using TPTZ, ferric chloride, acetate buffer was reacted with 500  $\mu$ L sample (0.1 mg/mL) and stood at 37 °C for 10 min and then, the absorbance values were determined at 593 nm. To prepare the standard curve, FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O was used. FRAP values were identified as mmol Fe<sup>+2</sup>/g of sample. Finally, TEAC assay was applied to the prepared solutions of the extracts according to the literature [41]. In this assay, the experiment was performed using ABTS radical cation. The absorbances for different volumes (50, 75 and 100  $\mu$ L) of the solutions (1 mg/mL) were determined at 734 nm to calculate the percentage of inhibitions.

#### **Determination of enzyme inhibitory potentials of the extracts**

To evaluate the enzyme inhibitory potentials with various enzymes containing proteases ( $\alpha$ -chymotrypsin, trypsin and, papain), tyrosinase and  $\beta$ -lactamase (penicillinase), the experiment was performed by the method of Rahman *et al.* 2001 [42]. Detailed procedure was also given in our reported study [43]. Stock (10 mg/mL) and diluted (1 mg/mL) solutions for all the parts of the plant were used in the assays. The experiment was conducted in a 96-well plate and total volume was determined as 200  $\mu$ L. The absorbances were measured by using Molecular Devices Spectramax Plus 384 ELISA microplate reader. Control reactions using PMSF as a positive control were run without inhibitors.

Protease inhibition assay was applied to the extracts using  $\alpha$ -chymotrypsin, trypsin and, papain with their specific chromogenic substrates [43]. The optimized volumes for  $\alpha$ -

chymotrypsin, trypsin and papain were determined as enzyme (50  $\mu$ L), Tris-HCl buffer (pH 7.5) (40  $\mu$ L), sample (10  $\mu$ L and 30  $\mu$ L for papain) and substrate (100  $\mu$ L). The absorbances of the mixtures incubated at 37 °C were measured at 410 nm. Tyrosinase inhibition assay was applied like protease inhibition assay. Briefly, the experiment was carried out using a dopachrome method in which L-DOPA was used as a substrate. The reaction was held at 25 °C for 10 min and activity of tyrosinase was measured spectrophotometrically at 475 nm.  $\beta$ -Lactamase inhibition assay that was similar to protease assay, was performed by using penicillinase and nitrocefin. The conditions for 1 mg/mL solutions of the plant extracts were optimized as enzyme (10  $\mu$ L), Tris-HCl buffer (pH 7.5) (160  $\mu$ L), sample (10  $\mu$ L) and substrate (20  $\mu$ L) for this assay. The volume of the sample (10 mg/mL) was increased from 10  $\mu$ L to 50  $\mu$ L. After 10 min incubation at 30 °C, the absorbance was determined at 495 nm.

### **Cell viability**

To investigate the antiproliferative activities of the extracts, the most-known method (MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide)) was applied. Firstly, Hep3B, HT29 and, HUVEC cells were used (50.000 cells in each 96-well) and, cultured overnight at 37 °C in a humidified incubator (5% (v/v) CO<sub>2</sub> in air). Then, the cells were treated with different concentrations (1000  $\mu$ g/mL, 500  $\mu$ g/mL, 250  $\mu$ g/mL, 125  $\mu$ g/mL, 62.5  $\mu$ g/mL in DMSO) of the extracts for 24 h and 48 h. According to our study, the method was carried out [43].

## **Results**

### **Phenolic contents in the extracts**

The total phenolics of *P. spinosa* L. for all extracts was calculated for the first time according to Velioglu's method as equivalent to ferulic acid [35]. The higher amounts of phenolics were found in the extracts of methanol (FR) (19.00  $\pm$  0.01 mg FAE/100 g extract), ethyl acetate (FL) (15.00  $\pm$  0.01 mg FAE/100 g extract), and methanol (FL) (12.70  $\pm$  0.12 mg FAE/100 g extract). On the other hand, dichloromethane extracts obtained from flowers and leaves of the plant possessed the lower phenolics (Table 2). In this study, total phenolic content possessed the highest value following Soxhlet extraction with methanol due to the efficiency of the solvent polarity. Table 1 shows that the total phenolics in *n*-hexane extracts (FL, FR and L) were significantly higher than

dichloromethane extracts that were found between  $0.40 \pm 0.03$  mg FAE/g and  $2.50 \pm 0.08$  mg FAE/g.

### **Antioxidant activity**

#### ***Qualitative analysis***

Before investigation of the extracts in biological studies, the method is based on the reduction of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl free radical, the active extracts including strong antioxidants give the yellow spots on the TLC plates, was successfully applied to the extract solutions obtained from *P. spinosa* L. and changings of the colors were observed following the spray with DPPH solution. According to our observations, the spots on TLC plates for active extracts such as ethyl acetate and methanol extracts of flower, leaves and fruit and *n*-hexane extract (L) of the plant changed from purple to white and yellow.

#### ***Quantitative analysis***

Determining the radical scavenging activities of the *P. spinosa* L. extracts, well-known SET based methods such as DPPH, ABTS, FRAP and CUPRAC were used. The alterations of the solvent polarity, extraction method and the type of assay can affect the results of antioxidant activities (Table 1). Following the qualitative analysis of plant extracts using DPPH, inhibitory concentrations ( $IC_{50}$ ) of the different concentrations prepared from extracts were determined as mg/mL by the measurement of absorbances at 517 nm. According to the results of DPPH assay, the highest antioxidant capacity was provided by ethyl acetate extracts (FR =  $327 \pm 0.13$   $\mu$ g/mL, FL =  $387 \pm 0.08$   $\mu$ g/mL, L =  $463 \pm 0.08$   $\mu$ g/mL) and methanol extracts (FL =  $476 \pm 0.06$   $\mu$ g/mL, FR =  $480 \pm 0.05$   $\mu$ g/mL), except methanol extract (L =  $830 \pm 0.02$   $\mu$ g/mL) that was determined with its highly phenolic content. Then, it was followed by dichloromethane and *n*-hexane extracts. In CUPRAC assay, the highest activity as quercetin equivalent flavonoid concentration was observed in ethyl acetate (FR) ( $0.36 \pm 0.01$ ) and *n*-hexane (FL) ( $0.34 \pm 0.05$ ) extracts, respectively. However, increasing activity between CUPRAC values of methanol flower and fruit extracts have not been determined. As given in the results of FRAP assay, methanol (L) ( $666.30 \pm 0.01$  mM  $Fe^{+2}$ ) and dichloromethane (FR) ( $651.00 \pm 0.06$  mM  $Fe^{+2}$ ) extracts displayed better scavenging activity. According to ABTS assay, the similar results have been determined in methanol (FR) and ethyl acetate extracts (FR). The values were between  $151.03 \pm 7.90$  and  $136.87 \pm 9.71$  mM Tr/g. The highest percentage of

inhibition values for sample volume (100  $\mu$ L) were obtained with methanol and ethyl acetate extracts, 48.94% and 54.16%, respectively. In conclusion, methanol and ethyl acetate extracts showed higher antioxidant activity as a dose-dependent manner, compared to other extracts. The ability of scavenging free radicals and reduction of metal ions of active extracts has been explained clearly by the synergic effects of the components. These results were shown in Table 1. It should be noted that antioxidant assay may not generally correlate with each other.

**Table 1** Total phenolic content and antioxidant activities of *P. spinosa* L. extracts

Extracts	TPC (mg FAE/100 g extract)	DPPH (IC <sub>50</sub> = $\mu$ g/mL)	CUPRAC (QERFC)	FRAP (mM Fe <sup>2+</sup> /g extract)	ABTS/TEAC (mM TR/g extract)
M-FL	12.70 $\pm$ 0.12	476 $\pm$ 0.06	0.16 $\pm$ 0.01	518.20 $\pm$ 0.01	142.19 $\pm$ 2.39
M-FR	19.00 $\pm$ 0.01	480 $\pm$ 0.05	0.18 $\pm$ 0.02	273.80 $\pm$ 0.01	149.46 $\pm$ 15.11
M-L	9.00 $\pm$ 0.01	830 $\pm$ 0.02	0.30 $\pm$ 0.01	666.30 $\pm$ 0.01	136.87 $\pm$ 9.71
EAA-FL	15.00 $\pm$ 0.01	387 $\pm$ 0.08	0.25 $\pm$ 0.02	423.30 $\pm$ 0.01	144.57 $\pm$ 9.66
EAA-FR	1.25 $\pm$ 0.04	327 $\pm$ 0.13	0.36 $\pm$ 0.01	570.90 $\pm$ 0.03	151.03 $\pm$ 7.90
EAA-L	12.50 $\pm$ 0.07	463 $\pm$ 0.08	0.27 $\pm$ 0.02	378.50 $\pm$ 0.02	144.62 $\pm$ 5.16
DCM-FL	0.40 $\pm$ 0.02	580 $\pm$ 0.01	---	---	142.17 $\pm$ 16.81
DCM-FR	2.50 $\pm$ 0.08	670 $\pm$ 0.04	0.09 $\pm$ 0.01	651.00 $\pm$ 0.06	138.59 $\pm$ 11.45
DCM-L	0.40 $\pm$ 0.03	800 $\pm$ 0.02	0.17 $\pm$ 0.02	320.00 $\pm$ 0.01	45.64 $\pm$ 10.30
H-FL	0.80 $\pm$ 0.00	850 $\pm$ 0.01	0.34 $\pm$ 0.05	235.50 $\pm$ 0.01	73.33 $\pm$ 4.89
H-FR	0.80 $\pm$ 0.01	1000 $\pm$ 0.02	---	---	15.52 $\pm$ 3.64
H-L	3.80 $\pm$ 0.01	970 $\pm$ 0.03	---	---	22.36 $\pm$ 3.99

M-FL: Methanol Flower; M-FR: Methanol Fruit; M-L: Methanol Leave; EAA-FL: Ethyl Acetate Flower; EAA-FR: Ethyl Acetate Fruit; EAA-L: Ethyl Acetate Leave; DCM-FL: Dichloromethane Flower; DCM-FR: Dichloromethane Fruit; DCM-L: Dichloromethane Leave; H-FL: n-Hexane Flower; H-FR: n-Hexane Fruit; H-L: n-Hexane Leave. Total Phenolic Content (TPC). Data is expressed as mg of ferulic acid equivalent (FAE)/100 g of extract. <sup>b</sup>Data is expressed as the value of percentage of DPPH inhibition (%). <sup>c</sup>Data is expressed as the IC<sub>50</sub> value of DPPH ( $\mu$ g/mL) <sup>d</sup>CUPRAC (QERFC) (Quercetin equivalent of flavonoid concentration). <sup>e</sup>Data is expressed as mM Fe<sup>2+</sup>/g extract. <sup>f</sup>Data is expressed as mM of Trolox equivalent per gram of sample. The results are expressed as mean  $\pm$  standard error

### Enzyme inhibition studies

In this study, proteases, tyrosinase and  $\beta$ -lactamase enzymes inhibitory potentials of the extracts of *P. spinosa* L. were determined via using different reaction temperatures (25  $^{\circ}$ C and 37  $^{\circ}$ C) and different wavelengths in a microplate reader. Among the reactions, maximal velocity (V<sub>max</sub>) values as milliunits per min for each of extracts were

determined and inhibition values (%) were calculated by using these values. According to protease enzyme inhibition results as given in Table 3, methanol extract (L) demonstrated that the highest inhibition (20.77%) against  $\alpha$ -chymotrypsin when compared to methanol extract (FL) (0.39%) at 1 mg/mL solutions on the contrary of 10 mg/mL dose of the same extracts. In the reaction rate graph, Vmax values obtained with trypsin enzyme were determined as 74.22 (inhibition of 9.50%) and 183.30 (inhibition of 34.70%) for 1 and 10 mg/mL doses of flower methanol and ethyl acetate extracts, respectively. This correlation was similar to the inhibition of papain enzyme with methanol (FR) and ethyl acetate (FL) extracts in papain enzyme inhibition study.

**Table 2** Proteases enzyme inhibition of *P. spinosa* L. extracts

Proteases												
Extracts	$\alpha$ -Chymotrypsin				Trypsin				Papain			
	1 mg/mL		10 mg/mL		1 mg/mL		10 mg/mL		1 mg/mL		10 mg/mL	
	Vmax	% Inh	Vmax	% Inh	Vmax	% Inh	Vmax	% Inh	Vmax	% Inh	Vmax	% Inh
M-FL	38.06	0.39	43.61	22.67	74.22	9.50	359.00	-	32.92	5.15	13.08	77.34
M-FR	35.32	5.34	69.54	14.25	80.64	1.68	285.00	-	21.07	39.29	34.95	39.45
M-L	30.40	20.77	71.55	11.78	76.62	6.58	289.00	-	27.01	22.18	19.29	66.58
EAA-FL	39.32	-	21.66	20.36	77.45	5.57	183.30	34.70	28.29	18.49	-	-
EAA-FR	36.60	4.61	21.15	22.24	94.08	-	220.70	21.34	32.52	6.30	20.67	64.19
EAA-L	38.88	-	21.60	20.58	89.00	-	221.20	21.20	27.55	20.62	4.56	92.10
CT		-		-		-		-	34.82	-	57.74	-

M-FL: Methanol Flower; M-FR: Methanol Fruit; M-L: Methanol Leave; EAA-FL: Ethyl Acetate Flower; EAA-FR: Ethyl Acetate Fruit; EAA-L: Ethyl Acetate Leave; CT-Control; Inh: Inhibition; - (dashed line) indicates no inhibition. Asterisk (\*) indicates the volume of sample as 10  $\mu$ L in the reaction. Control includes (enzyme + substrate + DMSO + buffer solution). Extract includes (enzyme + sample solution + substrate + buffer solution)

In tyrosinase enzyme assay, the major inhibition was determined with methanol (FR and L) extracts for 1 and 10 mg/mL doses, respectively. Although some of the extracts obtained higher Vmax values at 1 mg/mL, there was no inhibition against penicillinase enzyme ( $\beta$ -lactamase), the inhibition by all the extracts was provided with changing values from 7.79% to 12.85%. When *n*-hexane extracts (FL, FR and L) were applied to the reaction media containing enzyme and its chromogenic substrate, *n*-hexane extract (FL) showed inhibitory activity against proteases, tyrosinase and penicillinase enzymes at 1 and 10 mg/mL doses (Table 2,3). According to the literature, enzyme inhibitory abilities of blackthorns can be associated with proanthocyanidins [31].

**Table 3** Tyrosinase and penicillinase enzyme inhibition of *P. spinosa* L. extracts

Extracts	Tyrosinase				$\beta$ -Lactamase (Penicillinase)			
	1 mg/mL		10 mg/mL		1 mg/mL		10 mg/mL	
	Vmax	% Inh.	Vmax	% Inh.	Vmax	% Inh.	Vmax	% Inh.
<b>M-FL</b>	73.01	-	44.15	16.14	68.63	3.66	68.59	8.35
<b>M-FR</b>	57.87	13.53	43.36	17.64	80.99	-	67.68	9.56
<b>M-L</b>	61.33	8.36	33.02	37.28	76.19	-	67.86	9.32
<b>EAA-FL</b>	61.42	8.23	36.31	31.03	69.15	2.93	65.22	12.85
<b>EAA-FR</b>	61.55	8.03	39.38	25.20	73.68	-	66.82	10.71
<b>EAA-L</b>	64.67	3.38	36.82	30.06	72.11	-	69.01	7.79
<b>H-FL</b>	62.21	7.05	56.86	-	72.60	-	44.38*	15.20*
<b>CT</b>	66.94	-	65.00	-	71.25	-	71.25	-

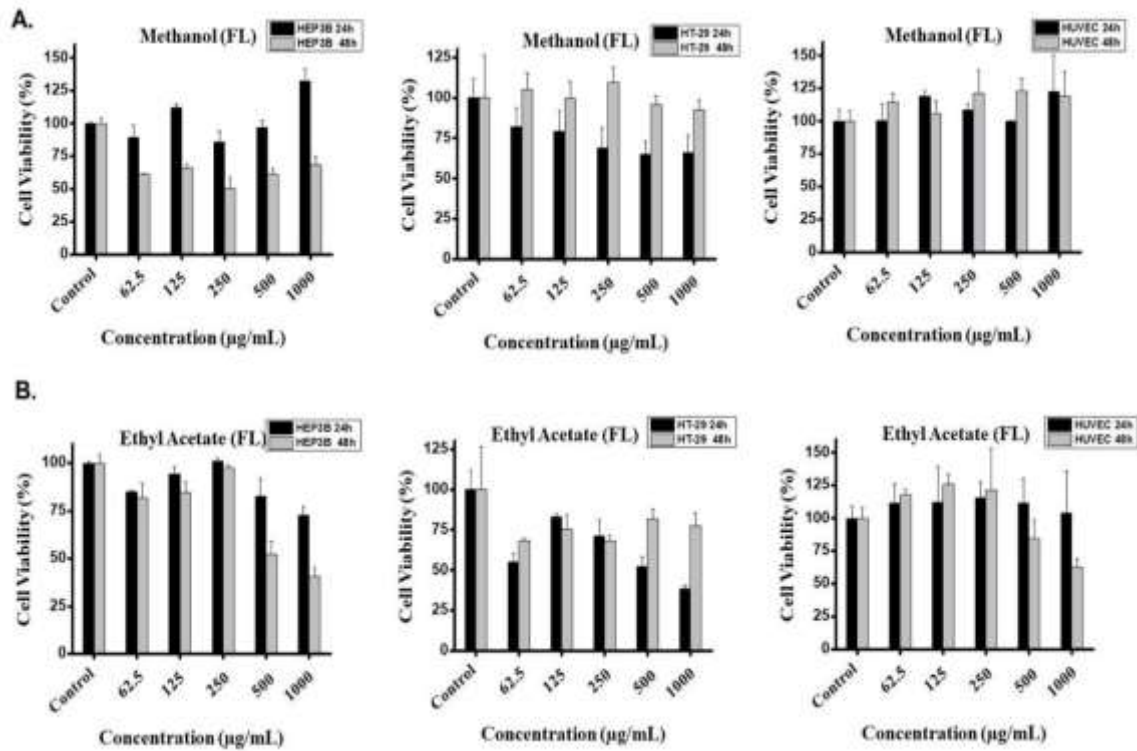
M-FL: Methanol Flower; M-FR: Methanol Fruit; M-L: Methanol Leave; EAA-FL: Ethyl Acetate Flower; EAA-FR: Ethyl Acetate Fruit; EAA-L: Ethyl Acetate Leave; Hexane Flower; CT-Control; Inh: Inhibition; - (dashed line) indicates no inhibition. Asterisk (\*) indicates the volume of sample as 50  $\mu$ L in the reaction. Control includes (enzyme + substrate + DMSO + buffer solution). Extract includes (enzyme + sample solution + substrate + buffer solution)

### Antiproliferative activity of *P. spinosa* L. extracts

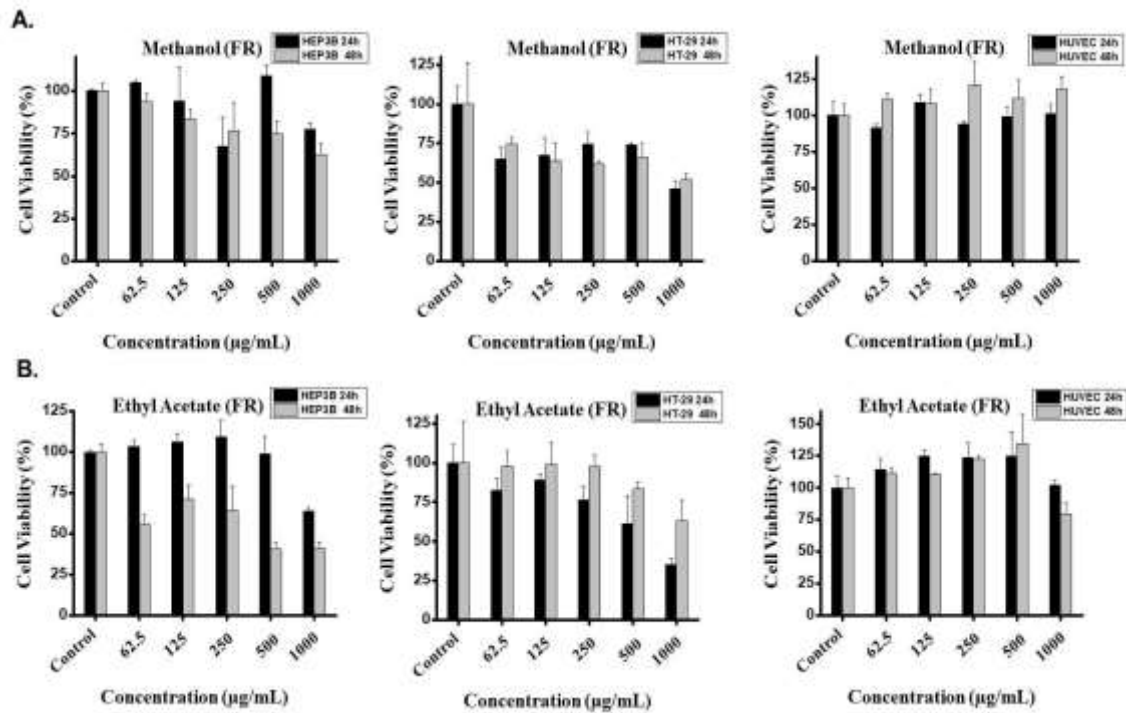
To investigate the antiproliferative activities of *P. spinosa* L. extracts on Hep3B and HT29 cancer cells and HUVEC cells at various concentrations for the treatment of 24 h and 48 h. For this reason, we evaluated *in vitro* cell growth of the cancer cells at increasing doses of each extracts. When the extracts were applied to the cells at five different concentrations that were changing from 62.5 to 1000  $\mu$ g/mL, the cell growth was inhibited at proper dose of the extracts. For instance, although the cytotoxicity of all methanol extracts on HT29 cancer cells was observed for all doses at two different time points, the components of methanol (FL and L) extracts inhibited the cell growth as a dose-dependent (between 250 and 1000  $\mu$ g/mL) for 24 h compared to DMSO as a positive control. However, the effect of methanol (FR) extract on HT29 cancer cells significantly reduced the cell viability at 1000  $\mu$ g/mL for 24 h and 48 h treatments. Also, the percentage of cell viability of methanol extracts (FR) was found as approximately 60% and 50% on HT29 cancer cells at 62.5 and 1000  $\mu$ g/mL doses in time-response manner study, respectively. Whereas methanol extracts displayed different effects on Hep3B cells. The



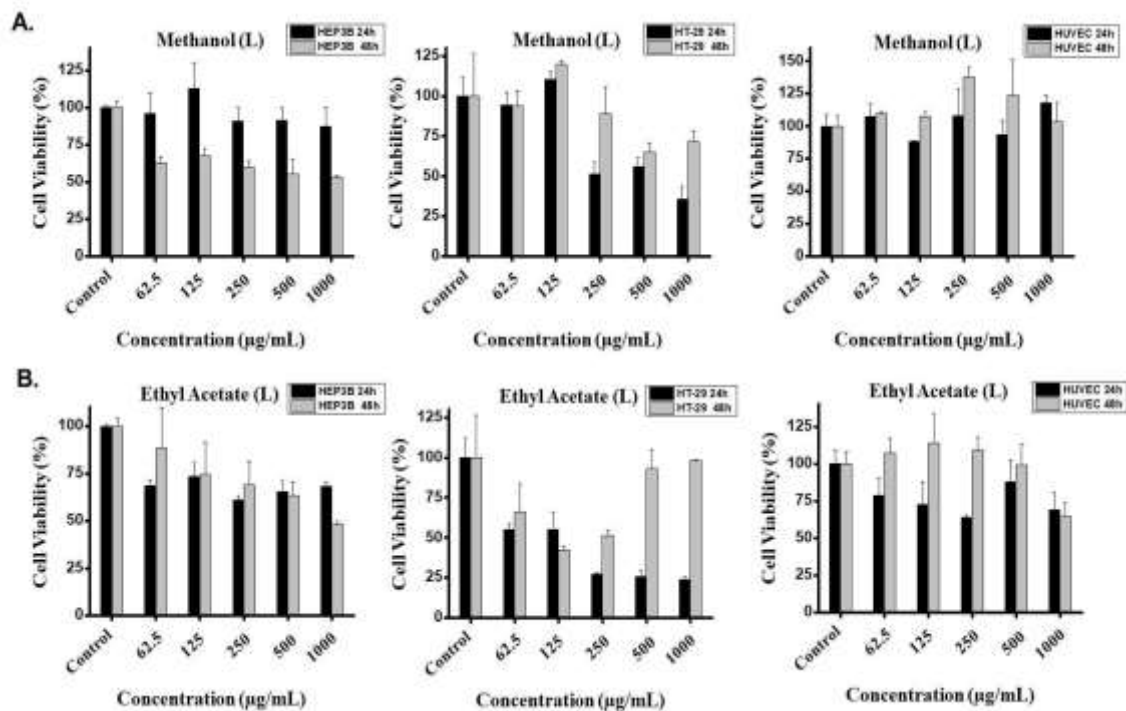
antiproliferative effect was observed at an active time points, especially for 48 h. The methanol extract of fruit decreased the cell viability on Hep3B cells nearly 65% at 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  dose for 48 h. Most strikingly, methanol (L) extract showed dramatically inhibition on cell viability of Hep3B cells for all doses for 48 h and the percentage of cell viability was determined as 55% at 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  and 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  doses. The methanol extracts did not show any proliferative effect on healthy HUVEC cells. The inhibition profiles of methanol and ethyl acetate extracts on HT29, Hep3B and HUVEC cells were given in Fig 2-4.



**Fig 2 A.** Antiproliferative effect of methanol extract (FL) on Hep3B and HT29 cancer cells and HUVEC healthy cells. **B.** Antiproliferative effect of ethyl acetate extract (FL) on Hep3B and HT29 cancer cells and HUVEC healthy cells

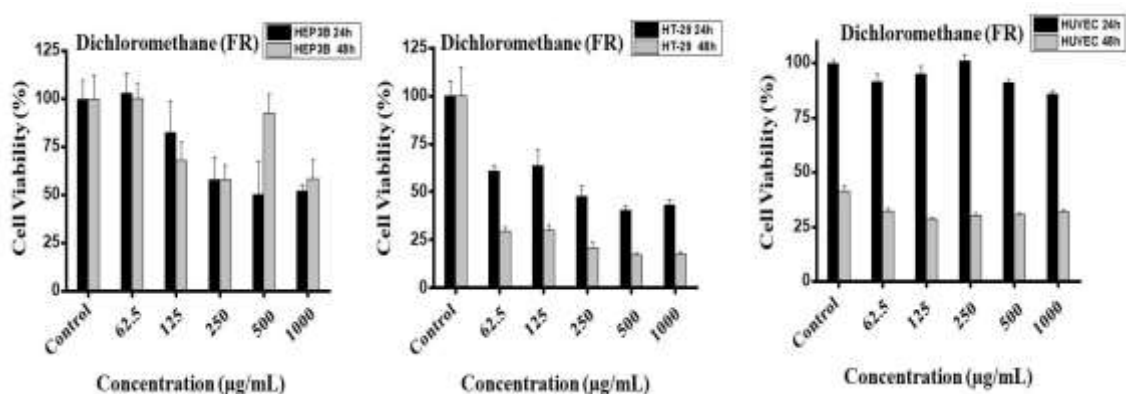


**Fig 3 A.** Antiproliferative effect of methanol extract (FR) on Hep3B and HT29 cancer cells and HUVEC healthy cells. **B.** Antiproliferative effect of ethyl acetate extract (FR) on Hep3B and HT29 cancer cells and HUVEC healthy cells



**Fig 4 A.** Antiproliferative effect of methanol extract (L) on Hep3B and HT29 cancer cells and HUVEC healthy cells. **B.** Antiproliferative effect of ethyl acetate extract (L) on Hep3B and HT29 cancer cells and HUVEC healthy cells

In the cytotoxicity results of ethyl acetate extracts for all parts of *P. spinosa* L., there was a major inhibition on cell viability of cancer cells. Although the ethyl acetate extract (L) displayed linearly inhibition on HT29 cells from changing doses 62.5 to 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for 24 h, the inhibition correlation was observed at 250, 500 and 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  doses on Hep3B cells for 48 h. The ethyl acetate extract (FR) at 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  verified the cytotoxicity on HT29 cells for 24 h and 48 h. Furthermore, the ethyl acetate extract (FL) showed the antiproliferative effect on HT29 and Hep3B cells at 500 and 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  doses in time response manner study with MTT assay (Fig. 2). When HT29 and Hep3B cells were exposed to dichloromethane extract (FR) of *P. spinosa* L., significant inhibition was determined at 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (approximately 50%) for 24 h (Fig. 5).



**Fig 5.** Antiproliferative effect of dichloromethane extract (FR) on Hep3B and HT29 cancer cells and HUVEC healthy cells. The decrease of cell viability on HT29 cancer cells was observed at both 24 h and 48 h treatments between 62.5 and 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  doses. Whereas dichloromethane extract displayed toxicity on healthy cells for 48 h. The cell viability on HUVEC cells at related doses was remarkably decreased. These results may contribute to short time treatment like 24 h

Additionally, although *n*-hexane extracts (FL and L) reduced the cell viability of both cancer cells at different doses, we observed the toxic effect on healthy cells. The methanol and ethyl acetate extracts have a greater cytotoxic potential on studied cancer cells than dichloromethane extracts (FL and L) and *n*-hexane extracts. Consequently, the decreasing of cell viability on cancer cells were observed with dose- and time-dependent studies.

## Discussion

Plant phenolics are known with their benefits to human health. They play an important role for antioxidant activity. F-C reagent is used for determining the amount of phenolics [44]. According to the literature findings, total phenol contents of *P. spinosa* L. extracts

(FR and FL) were investigated by several researchers and the results were generally expressed as equivalent to gallic acid [34,45-47]. In the literature, the total amounts of phenolics in the extracts of *P. spinosa* L. have been indicated in alternative equivalents. For instance, in one of the studies, the researchers reported the content of phenolics of methanol extract prepared from fruits of the plant as equivalent to mg gallic acid ( $2548 \pm 18$  mg GA/100 g extract) [47]. In the another study, the extracts including dichloromethane, ethyl acetate, ethanol and water obtained from branches, leaves and fruits of *P. spinosa* L. have been studied for determining antioxidant capacities and the amount of total phenolics. The findings showed that the ethanol and ethyl acetate extracts of branches ( $732.24 \pm 6.41$  mg GA/g and  $499.23 \pm 1.99$  mg GA/g) and ethanol extract of fruit ( $359.11 \pm 2.54$  mg GA/g) had rich phenolic components. Some of the researchers reported that the total phenolic amount of *P. spinosa* L. fruit samples obtained from different solvents such as acetone, ethanol and water determined as changing values from  $26.78 \pm 4.44$  to  $19.98 \pm 1.28$  GAE/g dry weight [34]. Although the results were calculated at different equivalents in this study, the phenolic content of methanol extract (FR) was determined as  $19.00 \pm 0.01$  FAE/100 g that was nearly similar to literature found expressed as GAE [34]. However, synergism in the components of the extract may affect results in the increasing values. Based on the obtained data, active extracts were investigated with *in vitro* enzyme inhibition and cytotoxicity studies on cancer cells to continue analyzing phytochemical behavior and anticancer potentials. To identify qualitative analysis of antioxidant activity in the extracts, TLC that is a simple, easy, and known method was carried out [36,37]. Indeed, the activity depends on the solvent extraction changing polarity of the solvents and it is related with the studied parts of the plant. When the different types of solvents were used, increasing activity was observed on the results in *in vitro* applications. In conclusion, as it is understood from the qualitative analysis, the methanol and ethyl acetate extracts of *P. spinosa* L. might contribute to the major radical scavenging capacities with DPPH. In the previously reported study, it was indicated that the extracts obtained from *P. spinosa* L. showed changing antioxidant activity from low to moderate in the qualitative analysis with DPPH [48]. Hydrogen Atom Transfer (HAT) and Single Electron Transfer (SET) have a role in deactivation of radicals by antioxidants. To obtain more comparison results, the antioxidant capacity was measured by using SET based methods in this study [49,50]. In

one of the studies, the ethyl acetate extract (FL) of *P. spinosa* L. was identified with its highly antioxidant activity in DPPH and FRAP assays compared to methanol extract [3]. Whereas the ethanol extract (FR) of *P. spinosa* L. possessed the good antioxidant activity in DPPH ( $257.84 \pm 6.57 \mu\text{g/mL}$ ), FRAP ( $0.10 \pm 0.01 \text{ Fe}^{+2}$ ) and ABTS ( $184.43 \pm 3.88 \mu\text{g/mL}$ ) assays than water and acetone extracts in a reported study [34]. The phenolic compounds and DPPH scavenging activity correlation have been confirmed in one of the reported studies [45]. Additionally, although blackthorn fruits have not been preferred to be used as food products due to their properties such as acidity and bitter taste, rich components having antioxidant properties have been determined in the studies [51]. These results may be led for further studies of *P. spinosa* L. extracts and/or its constituents.

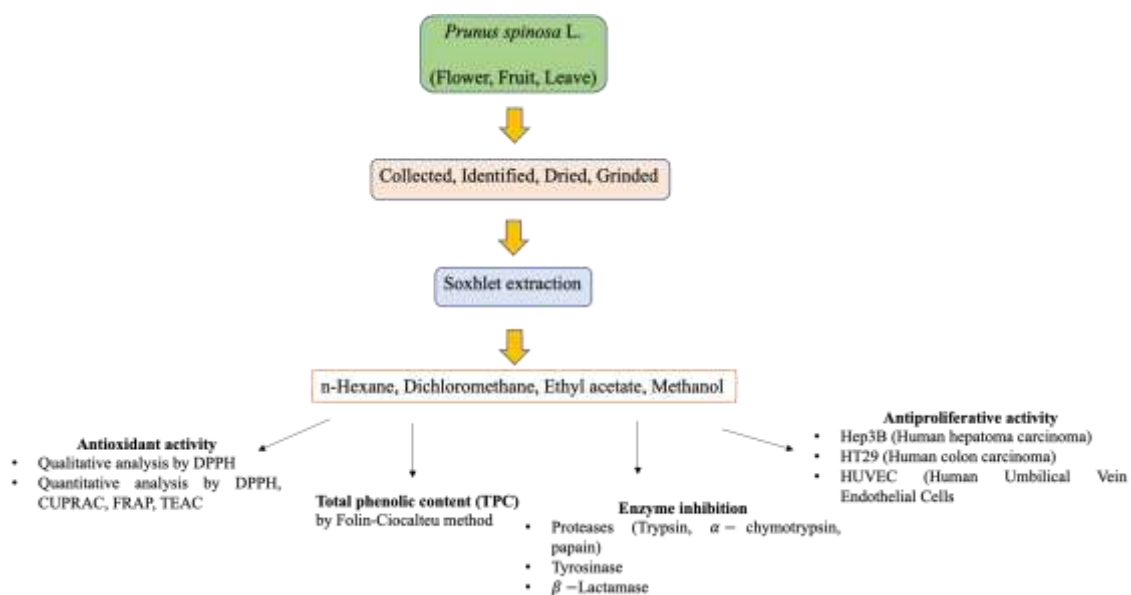
Several studies have been performed to identify the naturally occurring active compounds from the plants and to be used for biological applications. For instance, coumarin based two compounds isolated from the plants have been reported for its tyrosinase inhibitory activity [52,53]. Therefore, showing of *in vitro* enzyme inhibition studies performed with plant extracts may lead to the new concepts for the discovery of plant-based therapeutics. In the literature, there are several studies performed with the medicinal plants to inhibit these selected enzymes [29]. One of the studies suggested that the highest tyrosinase inhibitory activity had been provided by white tea extract compared to green and black tea extracts [21]. Most of the plant protease inhibitors have been determined in preclinical studies. For instance, *Solanum tuberosum* L. inhibited proteases such as trypsin,  $\alpha$ -chymotrypsin, and papain at 0-20 mg/mL dose. In addition, *Vigna unguicalata* L. had been determined as a potent inhibitor for trypsin at  $2 \mu\text{g/mL}$  [17]. Valuable proteases inhibitors isolated from plants like *Bauhinia rufa* trypsin inhibitor that inhibited trypsin at 2.9 nM, tested for various diseases [17]. The antioxidant activity of the plant samples can specify the tyrosinase inhibition potential [25,54]. However, in our study, methanol extracts (FR and L) of *P. spinosa* L. exhibited remarkable inhibition against tyrosinase enzyme (13.53% and 37.48%) compared to other studied extracts. These *in vitro* results of methanol fruit extract could be related with its higher total phenolic content ( $19.00 \pm 0.01 \text{ mg FAE}$ ).

Our preliminary data from *P. spinosa* L. extracts could be shown potential anticancer effects for further studies. Thus, in addition to antioxidant activity and enzyme inhibition

studies, cell viability results were evaluated with time- and dose-response manner studies. We were interested in studying liver and colon cancers, because the liver is a detoxifying organ, colon cancer is also chosen because it is a part of the digestive system when taken as a supplement. Herein, these obtained preliminary results may contribute to determine the anticancer potential of *P. spinosa* L. active components. The extracts including phenolics have gained an interest because of some activities including antioxidant, anticancer etc. According to previously reported study, *P. spinosa* Trigno ecotype extract investigated on human colon cancer cells such as HCT116 and SW480 cells for its cytotoxic and apoptotic activities, the promising results were obtained [55]. According to our study, the results demonstrate a higher cytotoxicity against HT29 cancer cells with methanol extracts (FL and FR) than ethanol extract (L) at the decreasing doses. It was reported that chlorogenic and caffeic acids decreased the cell proliferation on colon cancer cell lines [56,57]. In the literature, the results generally were associated with the bioactive components of the plant. Therefore, it is pointed out the contents of the extracts and synergic effects of the compounds. *P. spinosa* L. active extracts may be potential candidates for further pharmaceutical research.

## **Conclusion**

The findings reveal that methanol and ethyl acetate extracts of *P. spinosa* L. growing in Çanakkale/Turkey seem to have antioxidant activity, enzyme inhibition and antiproliferative properties. The workflow was given in Fig. 6. Solvent extraction affects the isolation of the compounds from the plant. Therefore, the active extracts may have potential for use by related industries for the preparation of natural-based products. We hope that this study may lead to new investigations of *P. spinosa* L. to be used in pharmaceutical applications.



**Fig 6** The workflow applied to our study

As stated above, the studies on this medicinal plant have been increasing day by day. Thus, a future prospect of *P. spinosa* plant is the isolation of active components that can be used in the treatment of various cancers and other diseases. Thus, the studies will show a new avenue as well as synergic effect of the components in the extracts. We also thought that the further investigations of the plant against different types of therapeutic enzymes and on human cancer cells may keep light to determination of effect mechanism.

#### **Conflict of interest**

The authors declare no conflicts of interest.

#### **Acknowledgments**

This work was supported by Çanakkale Onsekiz Mart University, The Scientific Research Coordination Unit, Project number: FYL 2014/222 as MSc Thesis of MS. We thank Çanakkale Onsekiz Mart University for financial support. The authors also thank Ersin Karabacak for the identification of the plant.

#### **Abbreviations**

1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), Quercetin equivalent of flavonoid concentration (QERFC), FAE (ferulic acid equivalent), Total Phenolic Content (TPC), Cupric Reducing Antioxidant Capacity (CUPRAC), Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP), Trolox Equivalent Antioxidant Capacity with ABTS radical cation (TEAC), Hydrogen Atom Transfer (HAT), Single Electron Transfer (SET)

#### **References**

1. Albertini, M., et al., Bioeffects of *Prunus spinosa* L. fruit ethanol extract on reproduction and phenotypic plasticity of *Trichoplax adhaerens* Schulze. *PeerJ*, 1983. <https://doi.org/10.7717/peerj.6789>.
2. Yuan, H., et al., The traditional medicine and modern medicine from natural products. *Molecules*, 2016. 21: p. 559.

3. Marchelak, A., et al., Bioactivity potential of *Prunus spinosa* L. flower extracts: phytochemical profiling, cellular safety, pro-inflammatory enzymes inhibition and protective effects against oxidative stress in vitro. *Frontiers in Pharmacology*, 2017. 8: p. 1-14.
4. Ghorbanpour, M., et al., Importance of medicinal and aromatic plants in human life. In: Ghorbanpour M., Varma A. (eds) *Medicinal plants and environmental challenges*. Springer, Cham. 2017. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-68717-9\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-68717-9_1)
5. Murati, T., et al., Comparative assessment of *Prunus spinosa* L. flower extract in non-neoplastic hepatocytes and hepatoblastoma cells. *South African Journal of Botany*, 2019. 123: p. 36–42.
6. Pozzo, L., et al., Wild italian *Prunus spinosa* L. fruit exerts in vitro antimicrobial activity and protects against in vitro and in vivo oxidative stress. *Foods*, 2020. 9(5): p. 2-15.
7. Karakaş, N., et al., *Prunus spinosa* L. Ekstresinin Çeşitli Kanser Hücre Soylarındaki Antioksidan ve Sitotoksik Etkileri. *Medeniyet Medical Journal*, 2019. 34: p. 297-304.
8. Dönmez, A.A., and Ş. Yıldırım, Taxonomy of the Genus *Prunus* L. (Rosaceae) in Turkey. *Turkish Journal of Botany*, 2000. 24: p. 187-202.
9. Browicz, K. *Flora of Turkey and The East Aegean Islands*, 1972. 4: p. 6-28, (edited by P. H. Davis).
10. Olszewska, M. and M. Wolbiś, Flavonoids from the flowers of *Prunus spinosa* L. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 2001. 58(5): p. 367-372.
11. Barros, L., et al., Strawberry-tree, blackthorn and rose fruits: Detailed characterisation in nutrients and phytochemicals with antioxidant properties. *Food Chemistry*, 2010. 120: p. 247–254.
12. Irizar, A.C. and M.F. Fernandez, Constituents of *Prunus spinosa*. *Journal of Natural Products*, 1992. 55(4): p. 450-454.
13. Ştefănuţ, M.N., et al., Anthocyanins HPLC-DAD and MS characterization, total phenolics, and antioxidant activity of some berries extracts, *Analytical Letters*, 2011. 44(18): p. 2843-2855.
14. Veličković, J.M., et al., Phenolic composition, antioxidant and antimicrobial activity of the extracts from *Prunus spinosa* L. fruit. *Hemijaska Industrija*, 2014. 68(3): p. 297-303.
15. Benoit, C.Y.R., Plant extracts and compositions comprising extracellular protease inhibitors. WO/2002/069992.
16. López-Otín, C. and J.S. Bond, Proteases: Multifunctional Enzymes in Life and Disease. *Journal of Biological Chemistry*, 2008. 283(4): p. 30433–30437.
17. Srikanth, S. and Z. Chen, Plant protease inhibitors in therapeutics-focus on cancer therapy. *Frontiers Pharmacology*, 2016. 7: p. 470.
18. Kim, J.Y., et al., Protease inhibitors from plants with antimicrobial activity. *International Journal of Molecular Science*, 2009. 10(6): p. 2860-2872.
19. Rakashanda, S., et al., Antiproliferative activity of *Lavatera cashmeriana*- protease inhibitors towards human cancer cells. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 2013. 14(6): p. 3975-3978.
20. Divya, C., et al., Identification of plant extracts expressing trypsin inhibitor. *Acta Biologica Indica*, 2014. 3(1): p. 522-526.
21. Kim, Y.J. and H. Uyama, Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: Structure, inhibition mechanism and perspective for the future. *CMLS, Cellular and Molecular Life Sciences*, 2005. 62: p. 1707–1723.
22. Parvez, S., et al., Naturally occurring tyrosinase inhibitors: mechanism and applications in skin health, cosmetics and agriculture industries. *Phytotherapy Research*, 2007. 21: p. 805–16.
23. Korkmaz, N., et al., Investigation of antioxidant, cytotoxic, tyrosinase inhibitory activities, and phenolic profiles of green, white, and black teas. *Turk Journal of Biochemistry*, 2019. 44(3): p. 278–288.
24. Ozer, O., B. Mutlu, and B. Kıvçak, Antityrosinase activity of some plant extracts and formulations containing ellagic acid. *Pharmaceutical Biology*, 2007. 45(6): p. 519–524.



25. Muddathir, A.M., et al., Anti-tyrosinase, total phenolic content and antioxidant activity of selected Sudanese medicinal plants. *South African Journal of Botany*, 2017. 109: p. 9–15.
26. Bonesi, M., et al., Advances in the Tyrosinase Inhibitors from Plant Source. *Current Medicinal Chemistry*, 2019. 26(18): p. 3279-3299
27. Hae, G.D., et al., Tyrosinase inhibitors from natural sources as skin-whitening agents and the application of edible insects: A Mini Review. *International Journal of Clinical Nutrition*, 2019. 5: p. 141.
28. Kim, M., et al., Screening of plant extracts for human tyrosinase inhibiting effects. *International Journal of Cosmetic Science*, 2012. 34(2): p. 202-208.
29. Zolghadri, S., et al., A comprehensive review on tyrosinase inhibitors. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 2019. 34(1): p. 279-309.
30. Shahwar, D., et al., An efficient assay to screen  $\beta$ -lactamase inhibitors from plant extracts. *Asian Journal of Chemistry*, 2011. 23(7): p. 3183-3186.
31. Drawz, S.M., K.M. Papp-Wallace, and R.A. Bonomo, New  $\beta$ -lactamase inhibitors: a therapeutic renaissance in an MDR world. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 2014. 58(4): p. 1835-1846.
32. Gangoué-Piéboji, J., et al., Screening of some medicinal plants from cameroon for lactamase inhibitory activity. *Phytotherapy Research*, 2007. 21: p. 284–287.
33. Qipa, E. and F. Dilek Gokalp, Apoptotic effect of *Prunus spinosa* fruit extract on HT-29 colon cancer cell line. *Journal of Cancer Science and Therapy*, 2017. 9: p. 50.
34. Veličković, I., et al., Examination of the polyphenol content and bioactivities of *Prunus spinosa* L. fruit extracts. *Archives of Biological Sciences*, 2020. 72(1): p. 105-115.
35. Velioglu, Y.S., et al., Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1998. 46: p. 4113–4117.
36. Cömert Önder, F., M. Ay, and S.D. Sarker, Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of the extracts of *Humulus lupulus* L. and quantification of bioactive components by LC–MS/MS and GC–MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2013. 61: p. 10498–10506.
37. Kumarasamy, Y., et al., Biological activity of moschamindole from *Centaurea moschata*. *Pharmaceutical Biology*, 2002. 4: p. 307–310.
38. Shoeb, M., et al., Bioactivity of two Turkish endemic *Centaurea* species and their major constituents. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 2007. 17: p. 155–159.
39. Apak, R., et al., Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay. *Molecules*, 2007. 12: p. 1496–1547.
40. Benzie, I.F.F. and J.J. Strain, The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power” the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 1996. 239: p. 70–76.
41. Re, R., et al., Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 1999. 26: p. 1231–1237.
42. Rahman, A., I.M. Choudhary, and J.W. Thomsen, *Bioassay techniques for drug development*. Holland: Harwood Academic Publishers, 2001. 124–30: p. 136–8.
43. Cömert Önder, F., et al., Antiproliferative activity of *Humulus lupulus* extracts on human hepatoma (Hep3B), colon (HT-29) cancer cells and proteases, tyrosinase,  $\beta$ -lactamase enzyme inhibition studies. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 2016. 31(1): p. 90-98.
44. Aryal, S., et al., Total phenolic content, flavonoid content and antioxidant potential of wild vegetables from Western Nepal. *Plants (Basel)*, 2019. 8(4): p. 96.
45. Pinacho, R., et al., Phenolic compounds of blackthorn (*Prunus spinosa* L.) and influence of in vitro digestion on their antioxidant capacity. *Journal of Functional Foods*, 2015. 19: p. 49-62.
46. Tahirovic, A., N. Basic, and A. Copra-Janicijevic, Effect of solvents on phenolic compounds extraction and antioxidant activity of *Prunus spinosa* L. fruits. *Bulletin of the Chemists and Technologists of Bosnia and Herzegovina*, 2018. (50): p. 19-24.

47. Popović, B.M., et al., Comparison between polyphenol profile and bioactive response in blackthorn (*Prunus spinosa* L.) genotypes from north Serbia-from raw data to PCA analysis. *Food Chemistry*, 2020. 302: p. 125373.
48. Kumarasamy, Y., et al., Comparative studies on biological activities of *Prunus padus* and *P. spinosa*. *Fitoterapia*. 2004. 75: p. 77–80.
49. Prior, R.L., X. Wu, and K. Schaich, Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005. 53(10): p. 4290-4302.
50. Liu, Y., et al., Comparative analysis of phenolic compound metabolism among tea plants in the section *Thea* of the genus *Camellia*. *Food Research International*, 2020. 135: p. 109276.
51. Sikora, E., M. Bieniek, and B. Borczak, Composition and antioxidant properties of fresh and frozen stored blackthorn fruits (*Prunus spinosa* L.). *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 2013. 12(4): p. 365-372.
52. Fais, A., et al., Tyrosinase inhibitor activity of coumarin-resveratrol hybrids. *Molecules*. 2009. 14: p. 2514–20.
53. Matos, M.J., et al., Design and discovery of tyrosinase inhibitors based on a coumarin scaffold. *RSC Advances*, 2015. 5: p. 94227–35.
54. Kim, Y., K. Kang, and T. Yokozawa, The anti-melanogenic effect of pycnogenol by its anti-oxidative actions. *Food Chemical Toxicology*, 2008. 46: p. 2466–2471.
55. Meschini, S., et al., Cytotoxic and apoptotic activities of *prunus spinosa* trigono ecotype extract on human cancer cells. *Molecules*. 2017. 22(9): p. 1578.
56. Hou, N., et al., Chlorogenic acid induces reactive oxygen species generation and inhibits the viability of human colon cancer cells. *Anticancer Drugs*, 2017. 28(1): p. 59–65.
57. Sadeghi Ekbatan, S., et al., Chlorogenic acid and its microbial metabolites exert anti-proliferative effects, S-phase cell-cycle arrest and apoptosis in human colon cancer Caco-2 cells. *International Journal of Molecular Science*, 2018. 19(3): p. 723.

Cheurfa, M., et al., Phytochemical screening and evaluation of anti-arthritic activity in vitro of black cumin (*Nigella sativa* L.) seed extracts. International Journal of Life Sciences and Biotechnology, 2021. 4(3): p. 381-388. DOI: 10.38001/ijlsb.868282

## Phytochemical screening and evaluation of anti-arthritic activity in vitro of black cumin (*Nigella sativa* L.) seed extracts

Mohammed Cheurfa\*<sup>1,2</sup> , Yahya Kaddour<sup>1</sup> , Islam Benbarek<sup>1</sup> ,  
Abdalbasit Mariod\*<sup>3,4</sup> 

### ABSTRACT

This research work aims to investigate the anti-arthritic activity as well as the phytochemical screening of black cumin seed extracts (aqueous and hydroalcoholic) *in vitro*. The dosage of flavonoids has shown that the content found in the hydroalcoholic extract ( $134.7 \pm 0.289$  mg QE/g) was significantly higher compared to the aqueous extract ( $48.495 \pm 0.035$  mg QE/g). The photochemical tests of the studied seed extracts showed the presence of tannins, saponins and reducing compounds and absence of alkaloids. The results of anti-arthritic activity, showed an important impact of the aqueous and hydroalcoholic extracts inflammation inhibition. This research work revealed that the seed extracts exhibited an important anti-inflammatory effect.

### ARTICLE HISTORY

Received

25 January 2021

Accepted

10 May 2021

### KEY WORDS

*Nigella Sativa* L.,  
Inflammation,  
Aqueous extract,  
Hydroalcoholic

## Introduction

Rheumatoid arthritis is the most common chronic inflammatory rheumatism (between 0.4 and 0.8% of the general population). It is also the most serious of rheumatism in particular by the risk of developing irreversible joint destruction, joint deformities and sometimes significant handicap [1]. Current treatment for inflammation involves steroidal anti-inflammatory drugs (Glucocorticoids) and non-steroidal (Diclofenac sodium). These molecules, although effective from 15 to 20% [2]. The very wide uses of medicinal plants for centuries by humans for treating various common pathologies prompted researchers to study the activities and pharmacological properties of different plant metabolites to confirm its properties on the one hand and on the other hand to

<sup>1</sup>Department of Biology, Faculty of Nature, Life and Earth Sciences, University of DjillaliBounaama-KhemisMiliana, Road TenietElhad, KhemisMiliana 44225.

<sup>2</sup>Laboratory of Natural Bioresources, Faculty of Sciences of Nature and Life, Department of Biology, H.B.Chlef University, Bp 151, Chlef 02000, Algeria.

<sup>3</sup> College of Sciences and Arts-Alkamil, University of Jeddah, Alkamil, Saudi Arabia

<sup>4</sup> Indigenous Knowledge and Heritage Centre, Ghibaish College of Science & Technology, Ghibaish, Sudan.

\* Correspondence author: [basitmariod58@gmail.com](mailto:basitmariod58@gmail.com) , [mohammed.cheurfa@univ-dbkm.dz](mailto:mohammed.cheurfa@univ-dbkm.dz)

identify the active ingredients at the origin of these virtues and consequently the use of these natural medicines wisely in primary care systems [3–5].

Some plants can be a major source of drugs due to their richness in secondary metabolites, these make and remain the subject of many researches, in particular the research of new natural constituents such as phenolic compounds, saponosides, alkaloids and essential oils [6,7]. Black cumin is a herbal plant belonging to *Ranunculaceae* family, the seed is well known as black seed [8]. It's widely utilized in traditional medicine, because of the various properties of its different parts including its seed. Black seed is used in the treatment of many health problems such as digestive problems, liver, respiratory system, heart disease, and immune problems [9,10]. The seed also has been used to fight intestinal worms [11]. This research work aim to test the efficacy of black cumin seed aqueous and hydroalcoholic extracts on rheumatoid arthritis by the determination of anti-arthritic activity *in vitro* and the phytochemical screening of the prepared extracts.

## **Material and Methods**

### **Plant material**

The seeds of black cumin were bought from an herbalist located in Ain defla (Algeria). The seeds were crushed with an electric grinder to obtain a powder. The powder was then stored away from light and moisture.

### **Aqueous extract preparation**

Ten grams of *Nigella Sativa* seed powder were macerated in 100 ml of distilled water to obtain an aqueous extract. After stirring, the mixture was left for 72 hours. Then the mixture was filtered and dried in an oven at forty Celsius.

### **Preparation of the hydroalcoholic extract**

Ten grams of *Nigella Sativa* seed powder were macerated in 100 ml hydroalcoholic solution. After contact for 72 hours, the mixture was filtered and dried in an oven at forty Celsius [12].

### **Phytochemical analyzes**

One of the essential goals of a phytochemical analysis is the detection of different groups of secondary metabolites existing in the studied part of the plant by qualitative reactions. These reactions are based on precipitation or coloring phenomena using reagents specific for each group [13]. In this part the presence of the following groups

"Alkaloids, Tannins, Flavonoids, Sterols, Triterpenes, Saponoids and Reducing compounds" was tested using the standard techniques described by [14–16].

#### **Determination of flavonoids content**

The method used to estimate the flavonoid content was that described by [17], who added 0.1 ml of each extract to 1.0 ml of 2.0% aluminum chloride solution (AlCl<sub>3</sub>). After incubation for 60 minutes at 25°C, UV-visible spectrophotometer was used to measure the absorbance at 420nm. The amount of flavonoids contained in the samples was determined from the quercetin calibration curve and they were expressed in milligram of quercetin equivalent per gram of extract (mg QE/g extract). The concentrations of flavonoids contained in the extracts were calculated from the calibration curve obtained by quercetin and they were expressed in milligram of quercetin equivalent per gram of extract (mg QE/g extract).

#### ***In vitro* anti-arthritic activity**

##### *Inhibition of protein denaturation*

The reaction mixture was prepared by adding black seed extracts at specific concentrations with diclofenac sodium and bovine serum albumin at a rate of 1% and the pH was adjusted using hydrochloric acid at a temperature of 37. The mixture was incubated at 37 ° C for 20 minutes for a short period of minutes after cooling, 2.5 ml of phosphate was added and then the absorbance was measured at 660 nm [18]. Percent inhibition of protein denaturation was calculated according to the following equation:

$$\text{Percent inhibition (\%)} = (A_C - A_t / A_C) \times 100$$

Where,

A<sub>t</sub>: Absorbance of the test sample,

V<sub>C</sub>: Absorbance of control.

##### *Inhibition of Albumin denaturation test*

The reaction mixture (5 ml) consisted of 0.2 ml of egg albumin, 2.8 ml of phosphate buffer saline (PBS, pH 6.4) and 2 ml of different concentrations of the extracts or the standard drug (Diclofenac sodium). Then the mixtures were incubated at 37 ± 2°C in a BOD incubator for 15 minutes then heated to 70°C for five minutes. Aftercooling, absorbance was measured at 660 nm [19]. The percent inhibition of albumin denaturation was calculated using thefollowing formula:

$$\% \text{ inhibition} = 100 \times [A_t / A_C - 1]$$

Where,

$A_t$ : Absorbance of the test sample,

$V_c$ : Absorbance of control.

### **Statistical analysis**

The information introduced in this investigation was examined utilizing XL Stat Pro 7.5 statistical software. The tests were done in triplicate. Results were introduced as mean and standard deviation. One-way ANOVA procedure was used for multiple comparison at a  $P < 0.05$  significance level.

## **Results and Discussion**

### **Phytochemical screening**

#### ***Extraction yields***

From the results obtained, we found that the hydroalcoholic extract of black cumin seed presented as significantly ( $p < 0.05$ ) high yield compared to the aqueous extract whose yields are  $12.62 \pm 0.2$  and  $8.02 \pm 0.2$  % respectively. For yield results, it is difficult to compare extraction results with those in the literature, because the yield is only relative and seems to be related to the properties genetics of the seeds as well as the geographical origin, and the conditions and duration of storage of the crop and also the extraction methods applied.

#### ***Phytochemical analyzes***

The results of the phytochemical tests are shown in Table 1. The phytochemical tests carried out on the various extracts of *Nigella sativa* seed, revealed the presence of tannins, flavonoids, sterols and triterpenes, while reducing compounds are found only in the aqueous extract. Saponoids were detected in the hydroalcoholic extract. The alkaloid test was negative with the aqueous and hydroalcoholic extract (Table 1).

#### ***Flavonoids content***

The hydroalcoholic extract showed the highest content relative to the aqueous extract, the contents of which are  $134.7 \pm 0.28$  and  $48.495 \pm 0.03$  mg QE / g of extract respectively (Table 2). Our results did not agree with the result found by [20], who found a content of  $16.66 \pm 0.48$   $\mu$ gQE / g of extract in total oil of *Nigella sativa* L, on the other hand, the content found in the neutral fraction was  $0.59 \pm 0.06$   $\mu$ g QE / g of extract.

**Table1** Phytochemical tests results

Extracts	Aqueous extract	Hydroalcoholic extract
Tannins	+	+
Flavonoids	+	+
Sterols	+	+
Triterpenes	+	+
Reducing compounds	+	-
Saponoids	-	+
Alkaloid	-	-

### **Inhibition of protein denaturation**

The IC<sub>50</sub> found with the hydroalcoholic extract was  $52.74 \pm 1.86$  mg/ml and the IC<sub>50</sub> of Diclofinac sodium was  $48.55 \pm 1.09$  mg/ml, There is no obvious difference was found between the IC<sub>50</sub> of the hydroalcoholic extract and the IC<sub>50</sub> of Diclofinac sodium (Table 2). On the other hand, the aqueous extract of *N. sativa* showed significantly ( $p < 0.05$ ) the highest inhibitory effect with an IC<sub>50</sub> of  $37.79 \pm 0.67$  mg/ml (Table 2). According to the results found by [19], the *Oryza sativa* sample from India with the concentrations of 100, 250 and 500 mg/ml showed a percent inhibition of 39.29; 52.78 and 60.47% respectively, while Diclofenac sodium has showed inhibition of 93.20, 95.41 and 96.91% with the same concentrations respectively.

### **Inhibition of albumin denaturation**

For the test of inhibition of albumin denaturation, the aqueous extract of *N. sativa* showed significantly ( $p < 0.05$ ) the highest inhibitory activity with an IC<sub>50</sub> of  $34.09 \pm 1.26$  mg/ml, from the other side, there are no statistically significant differences between the IC<sub>50</sub> of Diclofinac sodium and hydro-alcoholic extract of *N. sativa* with an IC<sub>50</sub> of  $48.55 \pm 1.09$  and  $46.75 \pm 1.74$  mg/ml respectively (Table 2). The study by [21] on the methanolic extract of *Rhizophora mucronata* leaves showed that the methanolic extract with the concentrations of 100, 200, 300 and 400 mg/ml were able to inhibit the albumin denaturation with percent inhibition of 67.90, 81.48, 87.65 and 90.12% respectively.

**Table 2** Results of flavonoid content and inhibition of protein and albumin denaturation

Extracts	Flavonoids content (mg QE/g of extract)	Inhibition of protein denaturation (IC <sub>50</sub> mg/ml)	Inhibition of Albumin denaturation (IC <sub>50</sub> mg/ml)
Hydroalcoholic extract	134.7 ± 0.28 <sup>a</sup>	52.74 ± 1.86 <sup>b</sup>	46.75 ± 1.74 <sup>b</sup>
Aqueous extract	48.495 ± 0.03 <sup>b</sup>	37.79 ± 0.67 <sup>a</sup>	34.09 ± 1.26 <sup>a</sup>
Diclofinac sodium	/	48.55 ± 1.09 <sup>b</sup>	48.55 ± 1.09 <sup>b</sup>

The results found showed that the aqueous and hydroalcoholic extracts of *Nigella sativa* L seeds have an anti-inflammatory action which is mainly based on three mechanisms: inhibition of eicosanoids production; inhibition of synthesis of prostaglandins and decreased production of nitric oxide. In addition, the extracts from *Nigella Sativa* L seeds induced an anti-inflammatory effect comparable to that of Diclofinac sodium. This activity is probably due to the presence of compounds which inhibit inflammation such as thymoquinone. Several studies have reported that thymoquinone is the essential active ingredient responsible for the anti-inflammatory effect of *Nigella sativa* extracts; thymoquinone was proved as a good inhibitor of thromboxane B2 and leukotrienes B4 by forbidding of cyclooxygenase and lipoxygenase respectively [22,23]. It is also an effective inhibitor of the production of leukotrienes by inhibition of Leukotriene-C4-synthase (LT4 synthase) [24]. Several authors have studied the anti-inflammatory activity of extracts or pure compounds derived from black cumin seed. The study carried out by [25] showed that the production of NO was reduced due to the dose with the aqueous extract of *Nigella Sativa* which causes the inhibition of the NO synthesis which is a pro-inflammatory mediator of inflammatory diseases especially in rheumatism.

## Conclusion

According to the results of the anti-arthritis activity of black cumin seed extracts, perhaps this activity is a result of bioactive compounds such as polyphenols which inhibit rheumatoid arthritis progress using the inflammatory, the oxidative, and the apoptotic pathways. The first one controlled by polyphenols through the MAPK



pathway and through regulation of gene in osteoblasts, where thymoquinone is an antiinflammatory inhibitor of several enzymes involved in inflammation and certain mediators of the inflammatory reaction. In the future, it's interesting to carry out other *in vivo* research to investigate how these extracts work and to test and develop other work, especially on the effects of black cumin for the Covid-19 treatment.

#### **Conflicts of interest**

The author declares that there is no conflict of interests.

#### **Availability of data and material**

Please contact the corresponding author for any data request.

#### **References**

1. Combe B, Krause E, Sany J. Treatment of chronic knee synovitis with arthroscopic synovectomy after failure of intraarticular injection of radionuclide. *Arthritis Rheum.* 1989. 32(1):p. 10–4.
2. Segnou, F., et al.. Studies on the reproductive biology of white yam (*Dioscorea rotundata* Poir.). *Euphytica* 1992. 64(3): p. 197–203.
3. Abdul, N. H., et al. Plants as Potential Repellent Against *Oryzaephilus* Species. *Int J Life Sci Biotechnol.* 2019. 2(3):243–68.
4. Ahmed, M., Arise, R. O., Sudi, I. Y. Evaluation of the Antidiarrhoeal Activity of Aqueous Root and Stem Bark Extract of *Annona Senegalensis*. *Int J Life Sci Biotechnol.* 2020. 3(1):p. 1–17.
5. Subramaniam, Y., et al. Antimicrobial Activity of *Musa acuminata* Peel Extract against Gram-Positive Bacteria. *Int J Life Sci Biotechnol.* 2020. 3(2):p. 191–6.
6. Kaya, Y., et al. *Sambucus ebulus* L.: Past, present and future. *AIP Conf Proc* 2019;2155:20030. Available from: <https://doi.org/10.1063/1.5125534>
7. Guignard, J-L, and Henry, M. L., *Abrégé de phytochimie*, Jean-Louis Guignard, Louis Cosson, Max Henry, Masson, *Abrégés de pharmacie*, 9782225804366 - Librairie Dialogues [Internet]. 1985. p. 121–4.
8. Ökmen, G., et al. Antimicrobial And Antioxidant Activities Of Different Spice Extracts. *Eur. J. Sci. Technol.* 2021. (22):421–9.
9. Kara, N., et al., Effect on Yield and some Quality Characteristics of Seed Harvest at Different Stages of Maturity in *Nigella sativa* L. *Tarım Bilim Derg.* 2021. 1(2):p. 1-15.
10. Ahmad, A., et al. A review on therapeutic potential of *Nigella sativa*: A miracle herb. *Asian Pac J Trop Biomed.* 2013. 3(5):p. 337–52.
11. Ghedira, K., and Le Jeune, R. Huile de nigelle cultivée, *Nigella sativa* L. (Ranunculaceae). *Phytotherapie.* 2010, 8: p. 124–8.
12. Cheurfa, M., and Allem, R. Evaluation of antioxidant activity of different extracts of *Aloysia triphylla* leaves (L'Herit.) from Algeria in vitro. *Phytotherapie.* 2016;14(3): p. 181-187
13. Hagerman, A., Muller-Harvey, I., and Makkar H. Quantification of tanins in analysis. Third Edit. 2000.
14. EVANS, William Charles. 1989. Trease GE, Evans W. *Pharmacognosy : 13th Edition (1989)* | Sappho Books Bailliere Tindall. p. 302.
15. Harborne, J. *Phytochemical Methods A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis* | A.J. Harborne | Springer. 1998.
16. Bruneton, J. *Pharmacognosie: Phytochimie& Plantes médicinales.* 3<sup>e</sup> édition. éditions médicales internationales, editor. Lavoisier, Paris, France.; 1999.
17. Mbaebie, B.O., Edeoga, H. O., and Afolayan, A. J. Phytochemical analysis and antioxidants activities of aqueous stem bark extract of *Schotia latifolia* Jacq. *Asian Pac J Trop Biomed.* 2012.

- 2(2):p. 118–24.
18. Eduardo, M. and Tania, S. Additional evidence of acute anti-inflammatory effects of cyclosporine in a murine model of pleurisy. *Trans immunol.* 2004.12:p. 151–4.
  19. Rahman, H., Eswaraiyah, M.C., and Dutta, A. M. In-vitro Anti-inflammatory and Anti-arthritis Activity of *Oryza sativa* Var . Joha Rice (An Aromatic Indigenous Rice of Assam). *Am J Agric Environ Sci.* 2015. 15(1):p. 115–21.
  20. Ramadan, M. F., Kroh, L. W., and Mörsel, J. T. Radical Scavenging Activity of Black Cumin (*Nigella sativa* L.), Coriander (*Coriandrum sativum* L.), and Niger (*Guizotia abyssinica* Cass.) Crude Seed Oils and Oil Fractions. *J Agric Food Chem.* 2003. 51(24):p. 6961–9.
  21. Kumari, C. S., et al. In vitro anti-inflammatory and anti-arthritis property of *Rhizopora mucronata* leaves. *Int J Pharma Sci Res.* 2015. 6(3):p. 482–5.
  22. El-Dakhakhny, M, etal. . Effects of *Nigella sativa* oil on gastric secretion and ethanol induced ulcer in rats. *J Ethnopharmacol* 2000. 72(1–2):p. 299–304.
  23. Hajhashemi, V., Ghannadi, A., and Jafarabadi, H. Black Cumin Seed Essential Oil, as a Potent Analgesic and Antiinflammatory Drug . *Phytotherapy Research. Phytother Res;* 2004.18: p. 195–9.
  24. Mansour, M., Tornhamre, S. Inhibition of 5-lipoxygenase and leukotriene C4 synthase in human blood cells by thymoquinone. *J Enzyme Inhib Med Chem.* 2004. 19(5):431–6.
  25. Mahmood, M. S., The in vitro effect of aqueous extract of *nigella sativa* seeds on nitric oxide production. *Phyther Res.* 2003.17(8):p. 921–4.

Aksoy, B.T., E. Bozkurt, and Ö.A. Sönmezoglu, Molecular Detection of *Bacillus cereus* in Milk by Polymerase Chain Reaction. International Journal of Life Sciences and Biotechnology, 2021. 4(3): p. 389-399. DOI: 10.38001/ijlsb.912415

## Molecular Detection of *Bacillus cereus* in Milk by Polymerase Chain Reaction

Begüm Terzi Aksoy<sup>1\*</sup>, Elif Bozkurt<sup>1</sup>, Özlem Ates Sönmezoglu<sup>1</sup>

### ABSTRACT

It is a valuable and good food source with the ingredients it contains in milk, but if hygienic conditions are not ensured during milking, storage and processing, diseases related to milk and dairy products are likely to occur. More than 90% of these diseases are of bacterial origin. *B. cereus*, found in the *Bacillaceae* family, is a significant source of contamination in milk and dairy products due to the presence of psychrotrophic strains. In recent years, it has been reported that milk and milk products contaminated with *B. cereus* have adverse effects on human health, and toxic substances are formed during the storage of contaminated milk and milk products.

This study, it is aimed to molecularly identify the *B. cereus* bacteria species that cause adverse effects such as food poisoning and loss of quality in milk. In this study, the DNA of *Bacillus cereus*, one of the microorganisms found in raw milk, was isolated and toxic gene regions were determined at the molecular level by PCR method using specific primers to the gene regions *Bacillus cereus*. Six primers specific for nheA, nheB, nheC, hblA, hblC, hblD and 16S rRNA gene regions were used for molecular detection of *B. cereus* in milk samples. At the end of the study, *Bacillus cereus* bacteria were detected in 8 of the 13 milk samples. It has been revealed that *B. cereus* can be detected quickly and reliably in milk and dairy products by molecular species identification using specific primers.

### ARTICLE HISTORY

Received

09 April 2021

Accepted

26 May 2021

### KEY WORDS

*Bacillus cereus*, non-hemolytic enterotoxin (Nhe), milk, molecular species detection, PCR

## Introduction

Foodborne pathogenic microorganisms cause severe losses such as disease and death, leading to public health problems that can reach epidemics by contaminating the food at any stage of the process from food production to consumption [1]. It is known that raw milk and its products are one of the main causes of foodborne diseases associated with *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O157: H7, *Bacillus cereus*, *Salmonella spp.*, *Campylobacter spp.*, *Clostridium botulinum* [2,3]. Since milk is a nutrient-rich food, it has a great place in human nutrition. Although the milk in healthy breast cells is reported to be sterile, high water activity and neutral pH conditions may

<sup>1</sup> Karamanoglu Mehmetbey University, Faculty of Engineering, Department of Bioengineering, Karaman/Turkey

\*Corresponding Author: Begüm Terzi Aksoy, e-mail: [begumterzi19@gmail.com](mailto:begumterzi19@gmail.com)

cause contamination of the milk by microorganisms if the production processes and storage conditions are not under hygienic conditions. This situation poses a threat to human health [4,5]. The enzyme production of psychrophilic, lipolytic and proteolytic bacteria and changes in milk are the results of long-term storage of raw milk before pasteurization. Therefore, problems are expected to occur during milk processing and in maintaining the quality of dairy products [6,7].

*Bacillus cereus* bacteria cause foodborne illnesses due to their enterotoxin and emetic toxin content [8]. Non-hemolytic enterotoxin (*Nhe*), hemolysis BL (*Hbl*) and Cytotoxin K (*CytK*), which are enterotoxins originating from *B. cereus*, have caused food-borne poisoning [9,10]. The emetic toxin is a peptide cereulide, a thermostable and acid-resistant dipeptide. *Nhe* complex consists of 3 subunits, namely *nheA*, *nheB* and *nheC*. The subunits of the *Hbl* complex are *hblA*, *hblC* and *hblD* [11].

Protease enzymes secreted by *B. cereus*, which is one of the psychrophilic bacteria, can maintain their stability during the processing of raw milk and causes clotting in processed milk products in a short time depending on the amount and activity of the enzyme. *B. cereus* is a rod-shaped, gram-positive, facultative anaerobe, a spore bacterium [12,13] and causes many different health problems, especially food poisoning, in terms of food safety. Its spores show high resistance to other environmental conditions such as humidity, pH and temperature. *B. cereus* has hydrophobic properties. They can adhere to surfaces (tool-equipment) very quickly [14]. Diseases from *B. cereus* can be classified as non-gastrointestinal and gastrointestinal diseases. Gastrointestinal diseases can be seen in two different ways. One is diarrhea, and the other is the emetic form [15]. Different enterotoxins from the diarrhea form, while the emetic form is formed by the heat-resistant toxin (Cereulide).

Determination of foodborne pathogens is important for accurate and standardized clinical diagnosis in the food industry and monitoring food hygiene [16]. Protocols for existing traditional biochemical studies are routinely used to detect *B. cereus* require labour and time consuming [17].

Recently, polymerase chain reaction (PCR), ELISA, commercial kits and tests based on different cell cultures are used to diagnose and identification *B. cereus* toxins in foods [18]. The proposed RAPD-PCR procedure for detecting large-scale *Bacillus cereus* was reported by Nilsson et al. (1998) [19]. Hansen et al. (2001) reported a PCR analysis using

16S rRNA as a target to identify the *B. cereus* group. Specific primers were selected for 16S rRNA detection of *B. cereus* group bacteria. It was used with consensus primers for 16S rRNA as a control in PCR [20].

The specificity and sensitivity of its identification, such as *B. cereus*, using the PCR test were evaluated with different food samples types. As a result, the proposed multiplex PCR is stated as a reliable and facile method for the simultaneous identification of the *B. cereus* group in food samples in one tube [21].

Razei et al. (2017) used the multiplex PCR technique for the simultaneous detection of *Campylobacter jejuni*, *Bacillus cereus* and *Listeria monocytogenes* bacteria, which are foodborne microorganisms that produce toxins in food (milk). As a result, the new multiplex PCR method is introduced to detect simultaneous *B. cereus*, *L. monocytogenes* and *C. jejuni*, and it has been reported that these results can be used for the detection of other toxin-producing bacteria in food [22].

Banykó et al. (2009) made species identification in raw and pasteurized milk for *Bacillus licheniformis* and *Bacillus cereus*. It has been determined that *B. cereus* and *B. licheniformis* both contaminate with the same strains in raw and pasteurized milk and cause contamination with different strains (raw milk and yoghurt/pasteurized milk and yoghurt). As a result, PCR analysis has been reported to be a useful method for characterizing *Bacillus* populations in the dairy environment [23].

In another study, the presence of *B. cereus* toxins was determined by PCR in raw and pasteurized dairy products. For that reason, PCR conditions were optimized for molecular identification of *Listeria monocytogenes* and *Brucella abortus* strains in bovine milk. Lesley et al. (2017) investigated the presence of *B. cereus* in formula and UHT milk samples; As a result, *B. cereus* was detected in 41.7% formula milk and 30% UHT milk samples, respectively [24].

Meena et al. (2019) identified *B. cereus* in dairy products and milk. In the molecular analyzes, while the *gyrB* gene was detected in all isolates, the presence of *cytK* and *hblA* was noted in 60% and 40% of the isolates, respectively. According to the study results, it was emphasized that the presence of enterotoxigenic genes (*cytK*, *hblA*) in the isolates should cause a potential health threat so that more samples should be studied from different regions [25].

A study conducted in 2019 that obtained the toxigenic profile of *B. cereus* strains in cheeses was molecularly detected [26]. PCR technique was used to investigate *Hbl*, *Nhe* and *cytotoxin K* toxic genes in the samples. According to study results, at least one gene associated with enterotoxins has been identified in most strains (21/23), highlighting the high toxigenic potential of examined cheeses.

This study aims to molecularly determine *Bacillus cereus*' presence in milk by using the PCR method and primers specific to *Bacillus cereus* gene regions.

## **Materials and Methods**

### **Production of bacteria and culture conditions**

As a positive control, *B. cereus* (ATCC 11778 strain) was used. The spreading plate method was applied using the MYP (Mannitol Egg Yolk Polymyxin) agar for bacterial cultivation of *Bacillus cereus*. The bacterial culture was placed in an incubator at 37 °C and left for two days of incubation. Bacterial colonies observed breeding was detected morphologically. The morphologically selected bacterial colony was taken into the LB broth medium and incubated at 37 °C for 150 rev/min overnight. DNA isolation was made from colonies that multiplied after one night.

### **DNA extraction**

The sample containing the bacterial colony was incubated the night before collected by centrifugation. DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Shanghai, China) was applied according to the manufacturer's instructions for bacterial colonies' DNA isolation. After DNA isolation, purified DNA samples were stored at -20 ° C in the elution buffer for reuse.

### **Polymerase Chain Reaction**

The polymerase Chain Reaction (PCR) process was performed using BIO-RAD C1000 Touch Thermal Cycler. PCR was performed by optimizing reaction conditions for each primer and the PCR reactions were performed in a total volume of 25 µl containing 0,4 (*IAC*, *16S rRNA*) or 0,6 (*hblA*, *hblC*, *hblD*, *nheA*, *nheB/nheC*) µM of each primer, 2.5 µl 10X *Taq* Buffer with KCl, 1,6 (*IAC*, *16S rRNA*) or 0,4 (*hblA*, *hblC*, *hblD*, *nheA*, *nheB/nheC*) mM of each dNTP (Thermo Scientific, USA), DNA *Taq* polymerase (*IAC*, *16S rRNA* 2,5 U; *hblA*, *hblC*, *hblD*, *nheA*, *nheB/nheC* 1 U; Thermo Scientific, USA), MgCl<sub>2</sub> (*IAC*, *16S rRNA* 4 mM; *hblA*, *hblC*, *hblD*, *nheA*, *nheB/nheC* 2 mM) and 2 µl DNA preparation. The PCR cycle reactions are as follows: 10 minutes in the first denaturation

at 95 °C, then 94 °C for 60 seconds, 50-60 °C for 60 seconds (the annealing temperatures changing for each primer), 72 °C for 60 seconds and 72 °C is completed with a final extension step of 10 minutes in. Thermo Scientific EC 1000 XL Power Supply Electrophoresis system was used to execute DNA samples. BIO-RAD ChemiDOC MP Imaging system (UV transilluminator) was used for imaging the gels where DNA and PCR products were operated. PCR fragments were run for 30 min at 100 volts in 0.5 x TBE buffer solution with 2% agarose gel electrophoresis added with ethidium bromide and visualized under UV light. Agarose gels (120 ml of 2%) were prepared to contain 24 ml 5 x TBE, 96 ml ddH<sub>2</sub>O, 2.4 g Agarose and 5 µl Ethidium Bromide (10 mg/ml). The sequence of primer sets (IAC-F IAC-R, 16S-F 16S-R, 45c1 45c2, *nheBC1* *nheBC2*, *HblA1* *HblA2*, L1a-F L1a-R, L2a-F L2a-R) used in this study and targeting specific gene regions information, expected band sizes (bp) for *B. cereus*, and target gene regions are given in Table 1.

**Table 1** Expected band sizes and sequences information of primers used

Primer Name	Primer Sequences (5'--- 3')	Expected Band Sizes (bp) for <i>B. cereus</i> (bp)	Target Region	Reference
AC-F AC-R	GCAGCCACTGGTAACAGGAT GCAGAGCGCAGATACCAAAT	118	<i>IAC</i>	[27]
<i>HblA1</i> <i>HblA2</i>	GCTAATGTAGTTTCACCTGTAGCAAC AATCATGCCACTGCGTGGACATATAA	874	<i>hblA</i>	[28]
6S-F 6S-R	GCGGCGTGCCTAATACTGC CTCAGGTCGGCTACGCATCG	267	16S rRNA	[29]
5c1 5c2	GAGGGGCAAACAGAAGTGAA TGCGAACTTTTGATGATTCG	186	<i>nheA</i>	[27]
<i>nheBC1</i> <i>nheBC2</i>	ACATTGCGAAAGATAGCTGGA TGTTCTGCTGCAAAAGGATG	300	<i>nheB</i> / <i>nheC</i>	[30]
L1a-F L1a-R	AGGTCAACAGGCAACGATTC CGAGAGTCCACCAACAACAG	205	<i>hblD</i>	[28]
L2a-F L2a-R	CGAAAATTAGGTGCGCAATC TAATATGCCTTGCGCAGTTG	411	<i>hblC</i>	[28]

## Results and Discussion

In this study, primers specific to *IAC*, 16S rRNA, *nheA*, *nheB* / *nheC*, *hblA*, *hblC* and *hblD* gene regions were used for molecular screening *Bacillus cereus* in DNA samples

taken from milk samples. For this purpose, *Bacillus cereus* determination was performed on 13 milk samples collected using six primers (16S-F 16S-R, 45c1 45c2, nheBC1 nheBC2, HblA1 HblA2, L1a-F L1a-R, L2a-F L2a-R) specific to different toxin genes. For all primers, 50 bp ladder (L), positive control (PC) and milk samples 1-13 were loaded into the gel, respectively. The internal amplification control (IAC) is a non-targeted DNA sequence used to prevent false-negative PCR results and eliminate the inhibitory effect. It is amplified with the target sequence and takes part in the same reaction as the sample [31]. Although the IAC design may vary, a general guideline for using IAC in the PCR applications of pathogens has been proposed by the European Standardization Committee. For this reason, IAC-F / IAC-R primers [27]. were used in this study. The band results of the gel images of the molecular screening performed with the primers used in the study are given in Table 2.

**Table 2** PCR results of the primers used in the study

Milk Sample Numbers	Primer Name						
	IAC-F IAC-R	16S-F 16S-R	45c1 45c2	nheBC1 nheBC2	L1a-F L1a-R	L2a-F L2a-R	HblA1 HblA2
<b>PC</b>	+	+	+	+	+	+	+
<b>1</b>	+	+	+	+	+	+	+
<b>2</b>	+	-	-	-	-	-	-
<b>3</b>	+	+	+	+	+	+	+
<b>4</b>	+	-	-	-	-	-	-
<b>5</b>	+	+	+	+	+	+	+
<b>6</b>	+	+	+	+	+	+	+
<b>7</b>	+	-	-	-	-	-	-
<b>8</b>	+	-	-	-	-	-	-
<b>9</b>	+	+	+	+	+	+	+
<b>10</b>	+	+	+	+	+	+	+
<b>11</b>	+	+	+	+	+	+	+
<b>12</b>	+	-	-	-	-	-	-
<b>13</b>	+	+	+	+	+	+	+

PC: Positive Control, + and – represent the positive and negative result, respectively

Differentiation between the subtypes can be determined by PCR and can be concluded quickly without pre-enrichment in clinical samples [31]. Ogawa et al. (2015) developed multiplex PCR that allows the detection of *B. anthracis* virulence plasmids and can distinguish genetically related strains of *B. anthracis* from other *B. cereus* group species [32]. They designed six primer sets targeting similar strains, one chromosome of *B.*



*anthracis*, two virulent plasmids (pXO1 and pXO2), a bacterial gene (16S rRNA gene) and a mammalian gene (actin-beta gene). These primers have been used to identify genetically relevant clinical strains of *B. anthracis* and *B. cereus* isolated from outbreaks of nosocomial infections in Japan. That study found that the newly developed primers are an accurate and valuable method for detecting *B. cereus* and *B. anthracis* [32]. In this study, primers designed specifically for the 16S rRNA gene region were used for the molecular detection of *B. cereus*. The band profiles obtained as a result of the PCR are shown in Fig 1.



**Fig 1** Molecular characterization with 16S-F 16S-R primer (L: 50 bp, PC: Positive Control)

In food microbiology, it is crucial to characterize suspicious isolates in terms of pathogenicity and species identification to identify the toxigenicity of strains isolated by molecular techniques.

In this study, it was determined that 62% of the milk samples resulting from molecular screening performed with primers of 45c1 and 45c2 contained the *nha* toxic gene region of *Bacillus cereus* Non-haemolytic enterotoxin (*nhe*) caused food poisoning in an organization in Norway in 1995, causing 152 people to get sick due to diarrhea. The *nhe* operon system, consisting of 3 protein subunits, was 90% or more in *B. cereus* cultures in molecular biology studies [18, 33].

In a different study, Moravek et al. (2004) observed that the samples isolated from baby food based on diarrhea type food poisonings of *B. cereus* gave a 186 bp size band in the gene region-specific studies of *B. cereus* 45c1 45c2 primers (*nheA*). According to our research, the expected band size of samples including *B. cereus* was confirmed by using 45c1 45c2 primers in milk samples [28].

Dierick et al. (2005) screened a total of 50 different strains with *nheBC1* *nheBC12* primers to detect *B. cereus* by PCR method specific to *nheB* / *nheC* gene regions. In this

study, according to these gene regions (nheB / nheC), the molecular size screening for nheBC1 nheBC2 primer set was obtained in which 8 of 13 samples in total were used [30].

Hbl is an enterotoxin and was first described in 1984 by isolating *B. cereus* F837 / 76 strain [34]. The enterotoxin complex Hbl with hemolytic effect; consists of three large proteins synthesized by three polycistronic genes consisting of hblA, hblC and hblD. Molecular screening in this study using the L2a-F L2a-R primer revealed that 62% of 13 samples had the *B. cereus* hblC toxic gene. Similarly, due to molecular screenings with the L1a-F L1a-R primer, 8 of the milk samples examined in this study were found to have the HblD toxic gene region of *B. cereus*.

This study obtained that milk samples containing hblC and hblD toxin gene regions are also positive for the hblA gene (Fig 2). Another study conducted a PCR study to detect *B. cereus* isolates in cheese samples and used hblA and bal genes for molecular detection [35]. As a result of the study, although the presence of *B. cereus* was low in cheese samples, all isolates were found positive for genes encoding hblA enterotoxin.



**Fig 2** Molecular characterization with HblA1 HblA2 primer (L: 50 bp, PC: Positive Control)

Yang et al. (2005) characterized one emetic and five different enterotoxins *Bacillus cereus* toxin. Polymerase chain reactions were performed with 12 primer pairs to replicate the enterotoxin and emetic specific sequences of the species in the *B. cereus* group. Screening tests with the developed primers have been successfully applied to analyze 162 food poisoning and toxigenic potential of food-related strains. The results contained at least one toxin gene among all *B. cereus* strains, and ten toxigenic patterns were identified for all test strains. The two species are closely related, but the toxin profiles of *B. mycooides* strains were significantly different from *B. cereus* ( $P < 0.05$ ). As a result of the study, the

molecular detection of the species in the *B. cereus* group, along with the importance of detecting toxin genes, was also indicated [36].

In another study, Ngamwongsatit et al. (2008) designed eight new PCR primer pairs specific for eight toxin genes (*nheA*, *nheB*, *nheC*, *hblC*, *hblD*, *hblA*, *entFM* and *cytK*). They used these primers in molecular screening on 205 *B. Thuringiensis* (43 serovars, 152 soil and ten food isolates) and 411 *B. cereus* strains (290 soil and 121 food isolates). With the detection of these eight toxin genes, a total of 616 isolates were divided into four groups [37].

Zhang et al. (2016) used multiplex PCR to investigate enterotoxin distribution in 62 enterotoxin-producing strains in milk powder, noodles, and rice to selectively detect *Bacillus cereus*, which is responsible for various toxin outbreaks of foodborne diseases. The specificity of the enterotoxin (*cytK*, *nheA* and *hblD*) genes of *B. cereus* was verified using a single PCR [38].

## Conclusion

In this study, a molecular determination was made using the PCR method and primers specific to the gene regions of *Bacillus cereus* bacteria that cause negative effects in raw and pasteurized milk samples. For this purpose 6 primers (16S-F 16S-R, 45c1 45c2, *nheBC1* *nheBC2*, *HblA1* *HblA2*, *L1a-F* *L1a-R*, *L2a-F* *L2a-R*) used that specific to 7 toxin gene regions (16S rRNA, *nheA*, *nheB* / *nheC*, *hblA*, *hblC* and *hblD*) of *Bacillus cereus* bacteria was performed molecular screening. *Bacillus cereus* bacteria were detected molecularly in 13 milk samples examined due to the study.

Microbiological properties in Turkey mainly do determination of microorganisms in milk, but morphologically identified species do not always give accurate results. In this study, *B. cereus* bacteria were detected molecularly, which causes adverse effects such as food poisoning and loss of quality in milk. It is predicted that the results obtained and the methods used will also help future studies for the detection of *B. cereus* bacteria in milk and dairy products.

### Abbreviations

PCR: Polymerase Chain Reaction, *Nhe*: Non-hemolytic enterotoxin, *Hbl*: hemolysis BL, *CytK*: Cytotoxin K, MYP: Mannitol Egg Yolk Polymyxin, IAC: internal amplification control

### Acknowledgements

We would like to thank Dr Sabire YERLİKAYA for providing *Bacillus cereus* strain.

### Funding

This research was supported by the Scientific Research Projects Commission of the Karamanoğlu Mehmetbey University (Project No: 16-YL-18).

## References

1. Fusco, V., et al., Microbial quality and safety of milk and milk products in the 21st century. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2020. 19(4): p. 2013-2049.
2. Aadil, R.M., et al., Influence of different pulsed electric field strengths on the quality of the grapefruit juice. *International Journal of Food Science & Technology*, 2015. 50(10): p. 2290-2296.
3. Shabbir, M.A., Effect of non-thermal processing techniques on pathogenic and spoilage microorganisms of milk and milk products. *Food Science and Technology*, 2021. 41(2): p. 279-294.
4. Addis, M.F., et al., The bovine milk microbiota: Insights and perspectives from-omics studies. *Molecular Biosystems*, 2016. 12: p. 2359-2372.
5. Liu, Z., et al., Evaluation of machine learning models for predicting antimicrobial resistance of *Actinobacillus pleuropneumoniae* from whole genome sequences. *Frontiers in microbiology*, 2020. 11: p. 48.
6. Burdova, O., et al., Hygiene of pasteurized milk depending on psychrotrophic microorganisms. *Bulletin-Veterinary Institute In Pulawy*, 2002. 46(2): p. 325-330.
7. Hamid, T.H.T.A. and N.F.A.M. Fuzi, Lactic Acid Bacterium with Antimicrobial Properties from Selected Malay Traditional Fermented Foods *International Journal of Life Sciences and Biotechnology*, 2021. 4(1-2): p. 13-24.
8. Subramaniam, Y., et al., Antimicrobial Activity of *Musa acuminata* Peel Extract against Gram-Positive Bacteria. *International Journal of Life Sciences and Biotechnology*, 2020. 3(2): p. 191-196.
9. Berthold-Pluta, A., et al., The effect of selected factors on the survival of *Bacillus cereus* in the human gastrointestinal tract. *Microbial pathogenesis*, 2015. 82: p. 7-14.
10. Fagerlund, A., Lindbäck, T., and Granum, P.E., *Bacillus cereus* cytotoxins Hbl, Nhe and CytK are secreted via the Sec translocation pathway. *BMC microbiology*, 2010. 10(1): 1-8.
11. Bonerba, E., et al., Detection of potentially enterotoxigenic food-related *Bacillus cereus* by PCR analysis. *International journal of food science & technology*, 2010. 45(6): p. 1310-1315.
12. Zhang, S.D., et al., Evolution and divergence of SBP-box genes in land plants. *BMC genomics*, 2015. 16(1): p. 1-10.
13. Abdeen, E.E., et al., Prevalence of Virulence Determinants among *Bacillus cereus* Isolated from Milk Products with Potential Public Health Concern. *Pakistan journal of biological sciences: PJBS*, 2020. 23(3): p. 206-212.
14. Faille, C., et al., Occurrence of *Bacillus cereus* spores with a damaged exosporium: consequences on the spore adhesion on surfaces of food processing lines. *Journal of food protection*, 2007. 70(10): p. 2346-2353.
15. Lindbäck, T., and Granum, P.E., *Bacillus cereus*. *Food Microbiology: Fundamentals And Frontiers*, 2019. p. 541-554.
16. Garrido, A., et al., A new multiplex real-time PCR developed method for *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* detection in food and environmental samples. *Food Control*, 2013. 30(1): p. 76-85.
17. Zhang, Z., et al., Detection of non-emetic and emetic *Bacillus cereus* by propidium monoazide multiplex PCR (PMA-mPCR) with internal amplification control. *Food control*, 2014. 35(1): p. 401-406.
18. Wehrle, E., et al., Comparison of multiplex PCR, enzyme immunoassay and cell culture methods for the detection of enterotoxinogenic *Bacillus cereus*. *Journal of microbiological methods*, 2009. 78(3): p. 265-270.
19. Nilsson, J., et al., A RAPD-PCR method for large-scale typing of *Bacillus cereus*. *Letters in applied microbiology*, 1998. 27(3): p. 168-172.
20. Hansen, B.M., Leser, T.D., and Hendriksen, N.B., Polymerase chain reaction assay for the detection of *Bacillus cereus* group cells. *FEMS Microbiology Letters*, 2001. 202(2): p. 209-213.

21. Park, S. H., et al., Simultaneous detection and identification of *Bacillus cereus* group bacteria using multiplex PCR. *Journal of microbiology and biotechnology*, 2007. 17(7): p. 1177-1182.
22. Razei, A., et al., Presenting a rapid method for detection of *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* and *Campylobacter jejuni* in food samples. *Iranian journal of basic medical sciences*, 2017. 20(9): p. 1050.
23. Banykó, J., and Vyletělová, M., Determining the source of *Bacillus cereus* and *Bacillus licheniformis* isolated from raw milk, pasteurized milk and yoghurt. *Letters in applied microbiology*, 2009. 48(3): p. 318-323.
24. Lesley, M.B., et al., Detection of *Bacillus cereus* in formula milk and ultra high temperature (UHT) treated milk products. *International Food Research Journal*, 2017. 24(3).
25. Meena, S.C., et al., Isolation and Identification of *Bacillus cereus* from Milk and Milk Products in Udaipur, Rajasthan, India. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci*, 2019. 8(9): p. 2783-2787.
26. Adame-Gómez, R., et al., Prevalence of the strains of *Bacillus cereus* group in artisanal Mexican cheese. *Foodborne pathogens and disease*, 2020. 17(1): p. 8-14.
27. Fricker, M., et al., Diagnostic real-time PCR assays for the detection of emetic *Bacillus cereus* strains in foods and recent food-borne outbreaks. *Applied and environmental microbiology*, 2007. 73(6): p. 1892-1898.
28. Moravek, M., et al., Colony immunoblot assay for the detection of hemolysin BL enterotoxin producing *Bacillus cereus*. *FEMS microbiology letters*, 2004. 238(1): p. 107-113.
29. Zhang, Z., et al., Detection of non-emetic and emetic *Bacillus cereus* by propidium monoazide multiplex PCR (PMA-mPCR) with internal amplification control. *Food control*, 2014. 35(1): p. 401-406.
30. Dierick, K., et al., Fatal family outbreak of *Bacillus cereus*-associated food poisoning. *Journal of clinical microbiology*, 2005. 43(8): p. 4277-4279.
31. Sachse, K., Specificity and performance of PCR detection assays for microbial pathogens. *Molecular biotechnology*, 2004. 26(1): p. 61-79.
32. Ogawa, H., et al., A novel multiplex PCR discriminates *Bacillus anthracis* and its genetically related strains from other *Bacillus cereus* group species. *PLoS One*, 2015. 10(3): p. e0122004.
33. Ehling-Schulz, M., et al. Toxin gene profiling of enterotoxic and emetic *Bacillus cereus*. *FEMS microbiology letters*, 2006, 260(2): p. 232-240.
34. Beecher, D.J., and MacMillan, J.D. A novel bicomponent hemolysin from *Bacillus cereus*. *Infection and immunity*, 1990. 58(7): p. 2220-2227.
35. Molayi Kohneshahri S, et al., Detection of hblA and bal Genes in *Bacillus cereus* Isolates From Cheese Samples Using the Polymerase Chain Reaction. *Avicenna J Clin Microbiol Infect*. 2016.
36. Yang, I.C., et al., Establishment of a novel multiplex PCR assay and detection of toxigenic strains of the species in the *Bacillus cereus* group. *Journal of food protection*, 2005. 68(10): p. 2123-2130.
37. Ngamwongsatit, P., et al., Broad distribution of enterotoxin genes (hblCDA, nheABC, cytK, and entFM) among *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* as shown by novel primers. *International journal of food microbiology*, 2008. 121(3): p. 352-356.
38. Zhang, Z., et al., Detection of viable enterotoxin-producing *Bacillus cereus* and analysis of toxigenicity from ready-to-eat foods and infant formula milk powder by multiplex PCR. *Journal of dairy science*, 2016. 99(2): p. 1047-1055.

## Aktif Yara Örtülerinin Eldesinde Fotosensitizerlerin Kullanımı

Gül Merve Gençer<sup>1,2\*</sup> , Murat Akarsu<sup>1,3</sup> 

### ÖZET

Işıkla aktive olan fotodinamik tedavi (FDT), uzun zamandan beri dermatoloji, kanseroloji, kulak burun boğaz, jinekoloji, gastroenteroloji, üroloji vb. Çeşitli hastalıklar için onaylanmış bir tedavi türüdür. FDT'de kullanılan FS, uygun dalga boyunda ışığı absorblayarak reaktif oksijen türlerini (ROS) oluşturabilen bir maddedir. ROS, hedef hücrelerde mutajenik veya genotoksik etki olmadan sitotoksik etkiler üreterek antimikrobiyal aktivite göstermektedir. Ek olarak, bu süreçte mikroorganizmalar da direnç geliştiremezler. Fotosensitizer maddede bulunan kromofor gruplar spesifik dalga boyundaki ışığa maruz kalmasıyla hücreleri öldürme yeteneğine sahip olan reaktif oksijen türleri (ROS) ve reaktif azot (RNS) gibi zararlı radikallerin üretimi; ışığın dalga boyuna, şiddetine, kullanılan PS'nin miktarına ve çeşidine bağlıdır. Bu çalışmada oluşan bu reaktif türlerin konsantrasyonu çeşitli faktörler ile ayarlanarak vücut dokularına zarar vermeden hasarlı dokuda enfeksiyona neden olabilecek iç ve dış kaynaklı mikroorganizmalardan arındırması öngörülmektedir. Ayrıca fotosensitizer boyar maddenin içerisine sabitlendiği hidrojel yara örtüsünün; yaranın nem dengesini koruması, doku oluşumunu artırıcı etki göstermesi, yarayı soğutarak acıyı azaltması, gaz geçişini optimum düzeyde tutarak ortam kaynaklı kontaminasyonu engellemesi, matriks sisteminin emici özelliği sayesinde hasarlı doku üzerindeki fazla sıvıyı emerek yaranın daha çabuk iyileşmesine katkı sağlaması gibi fiziksel özelliklere sahip olması hedeflenmiştir.

### MAKALE GEÇMİŞİ

Geliş

01 Mayıs 2021

Kabul

11 Haziran 2021

### ANAHTAR KELİMELER

Antimikrobiyal, fotodinamik terapi, fotosensitizer, hidrojel, yara örtüsü

## The Use of Photosensitizers in the Production of Active Wound Dressings

### ABSTRACT

Light-activated photodynamic therapy (PDT) has long been used in dermatology, carcinology, otolaryngology, gynecology, gastroenterology, urology, etc. and it's a type of treatment that approved for various diseases. PS used in PDT is a substance that can absorb light with the suitable wavelength and form reactive oxygen species (ROS). ROS shows antimicrobial activity by producing cytotoxic effects in target cells without mutagenic or genotoxic effects. In addition, microorganisms cannot develop resistance in this process. The light-induced formation of the harmful radicals such as reactive oxygen (ROS) and reactive nitrogen (RNS) species that are capable of killing cells depends on the intensity and the wavelength of the light and the type and amount of the PS used. It is envisaged that the concentration of these reactive species studied in the study will be adjusted by various factors so as to eliminate the internal and external microorganisms that can cause infection in the damaged tissue without causing harm to healthy tissues. Furthermore, the hydrogel dressings containing a fixed photosensitizer dye in the matrix are synthesized so as to protect the moisture balance on the wound area, to promote tissue formation, to reduce pain by cooling the wound area, to prevent the contamination of the wound while being permeable to gases and to contribute to the healing of the wound by absorbing excess liquid formed by the damaged tissue.

### ARTICLE HISTORY

Received

01 May 2021

Accepted

11 June 2021

### KEY WORDS

Antimicrobial, hydrogel, photodynamic therapy, photosensitizer, wound dressing

<sup>1</sup> Akdeniz University, Faculty of Science, Department of Chemistry, Antalya / Turkey

<sup>2</sup> BelenMed R&D Ltd., Antalya Technopolis, Akdeniz University Campus, Antalya, Turkey

<sup>3</sup> NANOen R&D Ltd., Antalya Technopolis, Akdeniz University Campus, Antalya, Turkey

\*Corresponding Author: Gül Merve GENÇER, e-mail: [gulmervekurtbelen@gmail.com](mailto:gulmervekurtbelen@gmail.com)

## Giriş

Günümüze kadar yapılan sayısız araştırma ile yara iyileşmesinin aşamaları sınıflandırılarak, iyileşme sürecinde meydana gelen değişiklikler belirlenmiştir [1, 2]. İltihap ve koagülasyon oluşumu yara iyileşmesinin ilk aşamalarında görülmektedir. İlk aşamada inflamatuvar cevabı, dermal ve epidermal hücrelerin proliferasyonunu, migrasyonunu ve ardından yara boşluğunu doldurmak ve cilt bariyerini yeniden kurmak için matris sentezi ile devam etmektedir [3, 4]. Yara iyileşmesinin son aşamasında doku onarımı ve farklılaşma süreci ile cilt dokusunun tam olarak iyileşmesi ve cilt estetiğinin restorasyonu sağlanmaktadır [5]. Özetle yara iyileşme sürecinde aşamalı olarak, önce boşluğun derhal doldurulması, ardından epitelizasyon ve cilt bariyeri fonksiyonunun yeniden kurulması gözlenmektedir [6]. Yaranın yeri, etiyojisi, büyüklüğü ve eşlik eden hastalıkların varlığı gibi birçok faktör iyileşme aşamasında önemlidir. Örneğin yara bölgesinde bakterilerin varlığı, çeşidi ve yoğunluğu hasta için oldukça hayati önem taşımaktadır. Yaralanmamış bir ciltte, patojenik organizmaların kolonizasyonu ve büyümesi, düşük yüzey pH, sebum ve yağ asitleri tarafından inhibe edilmektedir [7]. Fakat bakteriler hayatta kalmak için kendilerini açık yaralar gibi ekolojik olarak uygun oyuklara (nişlere) sabitlemeye çalışırlar. Bu nedenle enfeksiyon kutanöz yaralarda sık görülen bir problemdir ve yara iyileşmesinin durmasına bile neden olur. Bu durum hastada morbidite ve hatta mortalite riskinin artmasına neden olmaktadır. Antibiyotiklerin keşfi, enfeksiyonların tedavisinde devrim yaratmaktadır. Fakat patojenik bakterilerin antibiyotiklere gösterdiği dirençteki artış, lokalize enfeksiyonlar için alternatif tedavilerin araştırılmasına olan ilginin artmasına neden olmuştur [8]. Yara iyileşme sürecinin hızını ve kalitesini yönetmede tüm bu faktörler göz önüne alınarak tedavi yöntemleri önerilmekte ve çeşitli malzemeler üretilmektedir. Bu amaçla yara tedavisinde yaygın olarak yara sargı malzemeleri kullanılmaktadır.

Yara sargısı malzemeleri, nem ve oksijeni geçiren, mikroorganizmaların geçişini engelleyerek onlara karşı koruyucu bariyer oluşturan materyallerdir [9]. Pasif sargılar olarak bilinen türleri; gazlı bezler, hidrojeller, köpükler, hidrokolloidler (karboksimetil-selüloz), alginat, kollajen, selüloz, pamuk / rayon, şeffaf filmler (poliüretan), sargılar vb. yaralarda lokal hücrel yanıt üzerinde etkileri nedeniyle pasif olarak sınıflandırılmıştır [10, 11]. Bu yara örtüleri; yaralı cildi korumak, yara yüzeyinde uygun nemi sağlamak, mikrobiyal biyofilmleri önlemek veya kontrol altına almak, yaralanmış dokuları temizlemek, ağrıyı ortadan kaldırmak veya en aza indirmek, ölü alanları ve yaşayamayan dokuları kaldırmak, yara kaynaklı kokuları kontrol etmek gibi amaçlar için kullanılır. Aktif sargılar ise, yara örtülerine antimikrobiyaller

(topikal antibiyotik ve antifungal ürünler), kollajen veya enzimatik debridman ajanları emdirilerek elde edilir. Özellikle kronik yaralarda lokal enfeksiyonun önlenmesi için gümüş sülfadiazin, metilen mavisi, kristal viyole, bal, polihegzametilen biguanid (PHMB) ve kadeksomer iyodin antimikrobiyaller olarak yaygın olarak kullanılmaktadır [12, 13, 14]. Bu ürünler yara örtüleri dışında, macun, krem, toz formülasyonda da hazırlanmaktadır. Aktif sargılar sınıfında moleküler emici filtreler veya tuzaklar gibi davranan koku kontrollü pansumanlar da mevcuttur. Koku kontrollü pansumanlar yapılarında aktif kömür vb. malzemeleri barındırırlar ve yaraların ve yanık kokularının tedavisinde önerilmektedir. Aktif yara örtülerinin nem ve kollajen ağı tutunmasını arttırması, mikrobiyal biyofilm tabakasının oluşumunu önlemesi, eksüdatları (atıkları) azaltması ve epitelizasyon süresinin (hücre oluşum süresi) kısılmasını sağlaması gibi birçok avantajı bulunmaktadır [15]. Bu örtülerinin üretilmesinde doğal, sentetik veya hibrit polimer yapıları tercih edilebilir. Sentetik polimerler kullanılarak yara üzerine suni dermal bir tabaka örtüsü elde etmeyi amaçlayan sistemler olduğu gibi, doğal-biyouyumlu polimer yapıları ağırlıklı olarak kollajen ve tohumlanmış hücrelerden veya kollajen ve kondroitin sülfattan yapılan sistemler de mevcuttur [16]. Ek olarak, dokuların tamamen yenilenebilmesi için seçilen doğal veya sentetik polimerik malzemelerin, biyouyumlu bir ekstrasellüler matriks (ECM) yapısı sağlaması gerekmektedir. Doğal polimerik malzemelere kolajen, fibrinojen, elastin, sentetik polimerik malzemelere ise poliglikatik asit, polilaktik asit, polidioksanon, poli-ε-kaprolakton, polivinilpirolidon, polivinil alkol, polietilen glikol örnek olarak verilebilir. Doğal makromoleküller sentetik polimerlere kıyasla nispeten düşük bir mekanik mukavemet göstermektedir [17]. Bu sebeplerden dolayı araştırmada, fiziksel dayanımı yüksek, şişme davranışları iyi olan en uygun matriks sisteminin eldesi için çeşitli sentetik ve doğal polimer kombinasyonları çalışılmıştır.

Yara tedavisi amacıyla üretilmiş olan ve yaranın evresi, derinliği, salgı miktarı, bakteriyel kontaminasyonu gibi yaranın bazı fizyolojik özelliklerine bağlı olarak kullanılabilen yara örtüleri piyasada uzun zamandır satılmaktadır. Bu ürünlerin amacı var olan enfeksiyonu gidermekten çok enfeksiyon oluşum riskini azaltmak ve yaranın iyileşme sürecini nispeten hızlandırmaktır [18]. Bu yara örtülerine enfeksiyonu gidermek için çeşitli antibiyotiklerin veya gümüş gibi inorganik yapıların emdirildiği sistemler yaygındır [19, 20, 21]. Fakat tedavi amacıyla kullanılan antibiyotiklerin mikroorganizmalar üzerinde selektif toksisite göstermesi ve mikroorganizmalarda bulunan hedef spontan kolaylıkla mutasyonlar ile değişerek dirençli hale gelebilmesi, bu yara örtülerinin etkinliklerini sınırlamaktadır. Farklı bir şekilde içerisinde gümüş gibi inorganik maddeleri barındıran sistemler ise yüksek antimikrobiyal aktivite göstermelerine ve mikroorganizmaların mutasyon geçirerek dirençli hale gelmelerine fırsat



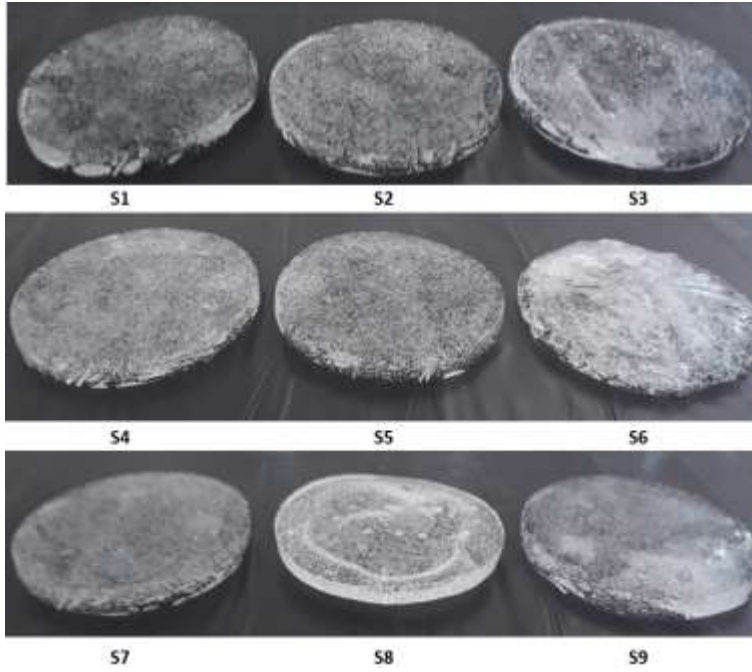
vermeden etki edebilmelerine karşın yara dokusunun kendisine de tahribat verebilmektedir [22]. Bu gibi sorunlardan dolayı hasarlı dokunun tedavisi için ekstrasellüler matriksi destekleyebilecek ve lokalize enfeksiyonlar için kullanılabilir alternatif tedavilerin bulunması amacıyla literatür taramaları yapılmış, yapılan araştırmalar sonucunda fotodinamik terapinin yara tedavisinde etkili olabileceği sonucuna varılmıştır.

Işıkla aktive olarak etki gösteren fotodinamik terapi (PDT), uzun zamandan beri dermatoloji, kanseroloji, kulak burun boğaz, jinekoloji, gastroenteroloji, üroloji vb. Çeşitli hastalıklar için onaylanmış bir tedavi türüdür [23, 24]. PDT'de kullanılan fotosensitizör (PS), uygun dalga boyunda ışığı absorblayarak reaktif oksijen türlerini (ROS) oluşturabilen bir maddedir [25, 26]. ROS, hedef hücrelerde mutajenik veya genotoksik etki olmadan sitotoksik etkiler üreterek antimikrobiyal aktivite gösterir [27, 28]. Ek olarak, bu süreçte mikroorganizmalar da direnç geliştiremezler. Fotosensitizör boyar maddede bulunan kromofor gruplar spesifik dalga boyundaki ışığa maruz kalmasıyla hücreleri öldürme yeteneğine sahip olan reaktif oksijen türleri (ROS) ve reaktif azot (RNS) gibi zararlı radikallerin üretimi; ışığın dalga boyuna, şiddetine, kullanılan PS'ün miktarına ve çeşidine bağlıdır [29]. Oluşan bu reaktif türlerin vücut dokularına zarar vermeden hasarlı dokuda enfeksiyona neden olabilecek iç ve dış kaynaklı mikroorganizmalardan arındırması hedeflenmiştir [30]. Yapılan araştırmalarda hasarlı dokuda mikroorganizma kaynaklı biyofilm oluşsa dahi reaktif oksijen türlerinin yüksek antimikrobiyal etki gösterdiği saptanmıştır [31]. Ayrıca literatür taramalarında fotosensitizör ajanları aktifleştirmek için kullanılacak ışınların aynı zamanda doku oluşumunu uyarıcı role sahip olduğu ile ilgili bazı çalışmalara rastlanılmıştır [32]. Bu çalışmanın amacı; ışık ile aktive olarak biyoaktif özellik sergileyen, farklı bir katman gerektirmeksizin kendiliğinden yara yüzeyine tutunabilen, sıvı emici özelliği sayesinde nem dengesini koruyabilen hidrojel yara örtülerinin geliştirilmesidir.

## **Materyal ve Metot**

Yara tedavisinde kullanılacak fotosensitizer ajan yüklenmiş hidrojel eldesinde öncelikle matriks sistemlerin yapısının belirlenmesi üzerine çalışmalar yapıldı. Çalışmada; Sigma-Aldrich firmasından temin edilen molekül ağırlığı 125.000 civarında olan polivinil alkol (PVA, Mowiol 20-98), PEG 600, Gliserin, Toluidin Mavisi (TBO) ve Rose Bengal (RB), Merck firmasından temin edilen Disodyum tetraborat dekahidrat (DTBT) ve Metilen Mavisi (MB) saflaştırılmadan kullanıldı. Fotosensitizörleri aktive etmek amacıyla 520 adet LED, 130W, 12V Dc, maksimum ışık gücü=9720 lümen olan LED cihazı özel olarak üretildi. PVA:DTBT oranı ağırlıkça 10:0.5, 10:1 ve 10:1.5 olacak şekilde sırasıyla S-1, S-2 ve S-3

sistemleri hazırlandı. Bu sistemlere ayrıca PEG 600 katkılanarak, PVA:DTBT:PEG oranı ağırlıkça 10:0.5:1, 10:0.5:2.5, 10:0.5:5, 10:1:1, 10:1:2.5 ve 10:1:5, olacak şekilde sırasıyla S-4, S-5, S-6, S-7, S-8 ve S-9 sistemleri hazırlandı. Matriks sistemlerin katı oranı ağırlıkça %12-16 aralığında sabit tutuldu. Elde edilen matriks sistemlerinin jelleşme yüzdesi tayini, şişme davranış tayini (farklı zaman, sıcaklık ve pH parametreleri denendi), fiziksel dayanımını saptamak için de görsel olarak çekme kopma testleri yapıldı. Şekil 1’de elde edilen dokuz farklı hidrojel sisteminin görünümü yer almaktadır.



**Şekil 1** Farklı PVA:DTBT:PEG oranlarına sahip hidrojel sistemlerin görünümü

### **Hidrojellerin jelleşme ve çözünürlük yüzdelerinin incelenmesi**

Farklı polimer oranlarına sahip hidrojellerden belirli bir miktar tartılarak ( $w_0$ ) etüvde  $80^\circ\text{C}$ 'de sabit tartıma gelinceye dek kurutuldu ( $w_1$ ). Ardından hidrojeller, ortam koşullarında (ortam sıcaklığı:  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ , bağıl nem değeri:  $\% 45 \pm 10$ ) ve kapalı bir kaptaki saf su içerisinde (saf su belirli aralıklar ile tazeleni) 48 saat süresince bekletildi. Süre sonunda hidrojeller etüv içerisinde tekrar kurularak sabit tartıma getirildi ( $w_{jel}$ ). Jelleşme ve çözünürlük yüzdeleri sırasıyla (1) ve (2)'de belirtilen eşitlikler kullanılarak hesaplandı. Deneyler üçerli şekilde tekrarlanıp, verilerin ortalaması alındı.

$$\text{Jelleşme Yüzdesi: } w_{jel} / w_1 \times 100 \quad (1)$$

$$\text{Çözünürlük Yüzdesi: } [(w_1 - w_{jel}) / w_1] \times 100 \quad (2)$$

**Tablo 1** Hidrojellerin jelleşme ve çözünürlük yüzdeleri

PVA:DTBT:PEG		w <sub>0</sub> değeri (g)	w <sub>1</sub> değeri (g)	w <sub>jel</sub> değeri (g)	Jelleşme Yüzdesi (%)	Çözünürlük Yüzdesi (%)
10:0.5:0	S-1	6.061	0.712	-	-	-
10:1:0	S-2	6.069	0.677	-	-	-
10:1.5:0	S-3	6.007	0.759	-	-	-
10:0.5:1	S-4	6.067	0.767	0.626	81.617	18.383
10:0.5:2.5	S-5	6.057	0.876	0.672	76.712	23.288
10:0.5:5	S-6	6.048	1.029	0,668	64.917	35.083
10:1:1	S-7	6.032	0.762	-	-	-
10:1:2.5	S-8	6.014	0.848	0.422	49.764	50.236
10:1:5	S-9	6.000	0.991	0,447	45.106	54.894

### Hidrojellerin su tutma kapasitelerinin incelenmesi

Sabit tartıma gelinceye dek etüvde kurutulmuş hidrojeller (w<sub>1</sub>) 48 saat süresince ortam koşullarında saf su içerisinde bekletildi. Süre sonunda suyu emmiş olan hidrojeller bir filtre kağıdı üzerine hafifçe tutularak yüzeydeki aşırı su tahliye edildi, hassas terazide tartıldı (w<sub>2</sub>). 3'te belirtilen eşitlik kullanılarak su tutma kapasiteleri belirlendi.

$$\text{Su Tutma Kapasitesi: } (w_2 - w_1) / w_1 \times 100 \quad (3)$$

Hidrojellerin su tutma kapasitesini etkileyen dinamikler temel olarak kimyasal yapıya ek olarak çapraz bağlama oranını, çözücü konsantrasyonunu ve çözücünün yapısını içermektedir [33]. Düşük şişme dereceli hidrojeller %20-50, orta şişme dereceli hidrojeller %50-90, yüksek şişme dereceli hidrojeller %90-99,5, süper absorbant hidrojeller ise %99,5 ve üstü su absorbe edebilen hidrojellerdir. Tablo 2'de hidrojellerin su tutma kapasiteleri belirtilmiştir.

**Tablo 2** Hidrojellerin su tutma kapasiteleri

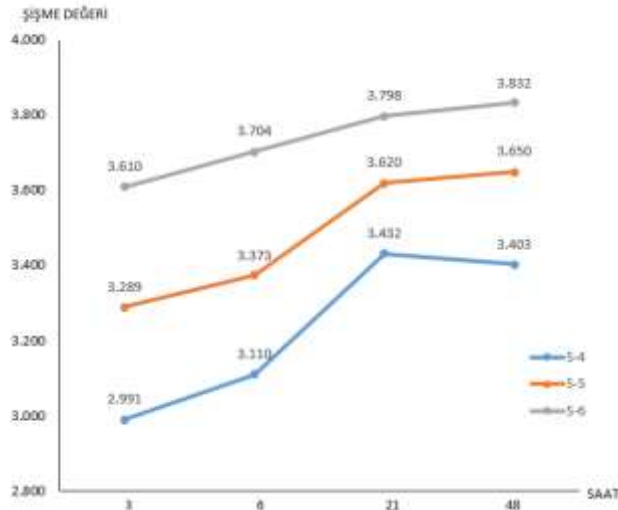
PVA:DTBT:PEG		w <sub>0</sub> değeri (g)	w <sub>1</sub> değeri (g)	w <sub>2</sub> değeri (g)	Su Tutma (%)
10:0.5:0	S-1	6.061	0.712	-	-
10:1:0	S-2	6.069	0.677	-	-
10:1.5:0	S-3	6.007	0.759	-	-
10:0.5:1	S-4	6.067	0.767	5.012	553.455
10:0.5:2.5	S-5	6.057	0.876	4.128	371.233
10:0.5:5	S-6	6.048	1.029	4.431	330.612
10:1:1	S-7	6.032	0.762	-	-
10:1:2.5	S-8	6.014	0.848	14.135	1566.863
10:1:5	S-9	6.000	0.991	14.369	1349.949

Yapılan çalışmalar sırasında S-1, S-2 ve S-3 örneklerinin saf su içerisinde tamamen çözülmesi, S-7, S-8 ve S-9 örneklerinin ise tutarsız sonuçlar vermesi sebebiyle sonraki çalışmalarda S-4, S-5 ve S-6 sistemleri ile çalışıldı.

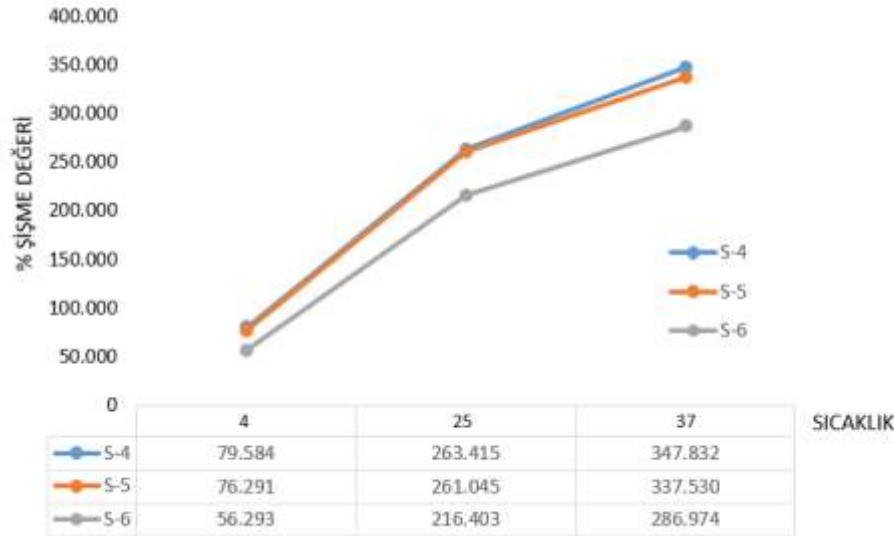
### Hidrojellerinin şişme davranışlarının incelenmesi

Hidrojellerin şişme davranışları zamana, sıcaklığa ve pH değerlerine karşı incelenmiştir.

- Zamanla değişimi; 48 saat süresince, pH değeri 7.4'e ayarlanmış simüle vücut sıvısı (SBF) içerisinde (şekil 2),
- Sıcaklığa göre değişimi; 48 saat süresince, pH=7.4'e ayarlanmış fosfat tamponu içerisinde 4°C, 25 °C ve 37 °C sıcaklıklarda (şekil 3),
- Farklı pH değerleri; 48 saat süresince, pH değerleri 1 (0,1M HCl çözeltisi - simüle gastirik sıvısı), 5,5 (10 mM Asetad tamponu - simüle cilt pH değeri) ve 7.4 (SBF sıvısı) olan sıvılarda, Bekletilerek incelendi.



Şekil 2 Hidrojellerin şişme değerlerinin zamanla değişimi



Şekil 3 Hidrojellerin farklı sıcaklıklardaki şişme davranışları

Tablo 3 Farklı pH değerlerinde hidrojellerin şişme davranışları

PVA: DTBT:PEG	w <sub>pH=1</sub> şişme değeri (%)	w <sub>pH=5.5</sub> şişme değeri (%)	w <sub>pH=7.4</sub> şişme değeri (%)

<b>10:0.5:1</b>	<b>S-4</b>	230.105	247.643	338.531
<b>10:0.5:2.5</b>	<b>S-5</b>	221.269	243.934	329.418
<b>10:0.5:5</b>	<b>S-6</b>	220.659	230.000	278.282

### Fotosensitizör ajanların matriks sisteme yüklenmesi ve antibakteriyel aktivite testleri

Fiziksel denemeler sonucunda optimum sonuçlar elde edilen S-5 hidrojel sistemine Toluidin mavisi (TBO), metilen mavisi (MB) ve rose bengal (RB) fotosensitizerleri, hidrojinin toplam kültesinde fotosensitizer miktarı sırasıyla 5, 10, 20, 40 ve 80 ppm olacak şekilde ilave edildi. Antibakteriyel aktivite testleri gram negatif *Escherichia coli* (ATCC 11775) ve gram pozitif *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) kültürleri kullanılarak, JIS Z 2801 standardı modifiye edilerek gerçekleştirildi.

Toluidin mavisi (TBO), metilen mavisi (MB) ve rose bengal (RB)'in maksimum absorpsiyon değerleri sırasıyla 630nm (turuncu), 666nm (kırmızı) ve 550nm (sarı)'dır. Bakteri analizinde her boyar madde için belirtilen dalga boylarına tekabül eden renk aralığına yakın ışık kullanılarak kapalı kabin içerisindeki LED cihazına yerleştirildi. Örnekler belirli dalga boyu aralığındaki ışık altında 6 saat süresince ışınlandırdıktan sonra 24 saat 37°C'de inkübe edildi. Kontrol amacıyla aynı formülasyona sahip farklı örnekler karanlıkta 6 saat süresince bekletilerek, ışık görmeden direk 24 saat 37°C'de inkübasyona alındı.

**Tablo 4** Antibakteriyel aktivite sonuçları

Sistemler	Bakteriyel yükte % azalma*		Logaritmik azalma miktarları	
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
<b>S-5 + TBO</b>				
0 ppm	0	0	-	-
5 ppm	0	0	-	-
10 ppm	30.82	25.53	0.16	0.13
20 ppm	90.00	90.00	1	1
40 ppm	99.90	99.90	3	3
<b>S-5 + MB</b>				
5 ppm	0	0	-	-
10 ppm	35.43	35.10	0.19	0.19
20 ppm	98.71	90.00	1.89	1
40 ppm	99.90	99.90	3	3
<b>S-5 + RB</b>				
5 ppm	76.01	66.25	0.62	0.47
10 ppm	99.26	99.00	2.13	2
20 ppm	99.90	99.90	3	3

\*Petri kabına uygulanan bakteri yükü yaklaşık =  $2 \times 10^3$

## Tartışma

Çalışmada öncelikli olarak fotosensetizör maddelerin depolanacağı uygun fiziksel özelliklere sahip polimer sistemin eldesi üzerine çalışmalar yapılmıştır. Saf su içerisinde 48 saat bekletilen örneklerden S-4 ve S-5 %75 ve üstü jelleşme özelliği sergilemiştir. Yapıya PEG katılmasının jelleşmeye olumlu yönde etki ettiği fakat PEG miktarındaki fazla artışın jelleşmeyi azalttığı görülmüştür. Aynı zamanda çapraz bağ oluşturma amacıyla kullanılan disodyum tetraborat dekahidrat'ın yapılan denemeler sonucunda PVA ile ağırlıkça oranının 1/20 olduğu örneklerin yüksek performans gösterdiği sonuncuna varılmıştır. Bu polimer oranlarındaki değişimin jelleşme/çözünürlüğe etkisinin; optimum polimer oranları dışında çalışıldığında polimer zincirlerinin küçük kümelenmeler oluşması ve zincirlerin birbiri arasında zayıf fiziksel bağlar yapmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Hidrojellerin su tutma kapasiteleri, elde edilen çözünürlük yüzdeleri ile tutarlıdır. S-4 hidrojel kuru ağırlığının 721.58 katı (çözünürlüğü yüksek ve kolay bozulan yapıda), S-5 hidrojel kuru ağırlığının 423.78 katı ve S-6 hidrojel kuru ağırlığının 321.294 katı saf su absorbe etmiştir. S-6 sisteminde S-4'ten 5 kat, S-5 sisteminde S-4'ten 2.5 kat daha fazla PEG kullanılmıştır. PEG yapıya esneklik kazandırmasının yanı sıra polimer zincirleri arasında daha fazla fiziksel bağ oluşumunu sağladığından dolayı saf su tutma kapasitesini azaltmıştır. Nitekim S-8 ve S-9 sistemlerinde de bu durum görülmektedir. S-5 sisteminin farklı ortamlarda, sıcaklıklarda ve koşulda sıvıyı tutma yeteneğinin optimum düzeyde olmasından dolayı fotosensitizerler bu hidrojel sisteminde kullanılmıştır. Antibakteriyel etkinliğin belirlenmesi amacıyla kullanılan *E. coli* gram negatif, *S. aureus* ise gram pozitif bakteri türleri arasındadır. Gram-pozitif bakteriler, çoğunlukla besin maddelerinin, glikopeptitlerin, polisakkaritlerin ve fotosensetizörlerin geçirgenliğine izin veren yapıdadır. Dış zarlarının gözenekliliği nedeniyle daha kolay fotoaktif hale getirilebilmektedir. Gram-negatif bakteriler ise, sadece düşük moleküler ağırlıklı moleküllerin porin kanallarından geçişine izin vermektedir. Fakat gram negatif bakterilerin hücre duvarının yapısındaki lipopolisakkaritler, güçlü bir negatif yük oluşturduğu için katyonik fotosensetizör bileşiklerin kendilerine çekerler, difüzyon sürecini kolaylaştırırlar. Gram pozitif bakterilerin de hücre duvarları negatif yüklüdür [34]. Çalışmada kullanılan TBO ve MB pozitif yüklü olmaları sebebiyle hem gram negatif hem de gram pozitif bakterilere karşı etkilidir. Ayrıca katyonik fotosensetizörler yara dokusundaki ökaryotik hücrelere kıyasla bakteri hücrelerine, bakteri hücrelerinin bu fotosensetizörlere daha hızlı bağlanması nedeniyle çevre dokulara hasar vermeden seçicilik sağlamaktadır [35]. Fakat TBO ve MB, RB'e kıyasla düşük singlet oksijen kuantum verimine sahiptir. Araştırmada RB diğer fotosensetizörlere kıyasla daha yüksek antimikrobiyal etki göstermiştir. RB literatürde gram pozitif bakterilere karşı en çok kullanılan bileşik olmasına rağmen [34] yüksek singlet

oksijen kuantum verimine sahip olmasından dolayı tez çalışmasında iki bakteri türünde de yüksek antimikrobiyal etki gösterdiği düşünülmektedir.

## Sonuç ve Öneriler

Deri patojenlere karşı ilk savunma hattıdır ve mikrobiyal istilaya karşı fiziksel bir engel görevi görmektedir. Birçok nedenden dolayı derinin yapısal bütünlüğü bozularak yara oluşabilir. Oluşan yaraların iyileşmesinde, yaranın çeşidine göre farklı aşamalar mevcuttur ve bu aşamaların sağlıklı bir şekilde sürdürülebilmesi için cilt yüzeyinde patojen olmaması veya patojenlerin minimum düzeye inmiş olması, gerekli nem dengesinin sağlanması, optimum oksijen iletiminin gerçekleştirilebilmesi vb. hususlar gerekmektedir. Yapılan araştırmada yara tedavilerinde kullanılmak üzere hidrojel yapıda yara örtüsü geliştirmiş olup, TBO, MB ve RB fotosensetizör maddeleri elde edilen hidrojel yapıların içerisine hapsedilmiştir. Çalışma sonucunda; PVA:DTBT:PEG oranının ağırlıkça 10:0.5:2.5 olduğu (S-5 sistemi) ve yaklaşık olarak %85 su içeren hidrojel sisteminin uygun olduğu sonucuna varılmıştır. Ayrıca S-5 sistemi için jelleşme yüzdesinin yaklaşık olarak %77 olduğu ve su tutma kapasitesinin %371 olduğu görülmüştür. Fotosensetizörlerin yapı içerisine depolanmasından sonra JIS Z 2801 standardı modifiye edilerek gerçekleştirilen bakteri analizlerinde gram negatif *Escherichia coli* (ATCC 11775) ve gram pozitif *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) kültürlerine karşı TBO için 40ppm, MB için 40ppm ve RB için 20ppm konsantrasyonlarda fotosensetizör içeren S-5 sistemleri için log 3'lük antibakteriyel etki elde edilmiştir. Sonraki çalışmalarda farklı fotosensetizör maddeler ile daha yüksek oranda aktivite göstermesi üzerine çalışmalar yapılabilir ayrıca hidrojel sistemin eldesi için kullanılan polimer sistemleri geliştirilebilir.

### Kısaltmalar

DTBT: Disodyum tetraborat dekahidrat; ECM: Ekstrasellüler matriks; FDT: Fotodinamik tedavi/terapi; FS: Fotosensetizör; MB: Metilen mavisi; PEG: Polietilen glikol; PHMB: Polihegzametilen biguanid; PVA: Polivinil alkol; RB: Rose Bengal; RNS: Reaktif azot türleri; ROS: Radikal oksijen türleri; SBF: Simüle vücut sıvısı; TBO: Toluidin mavisi; W: Ağırlık

### Acknowledgements / Teşekkürler

Akdeniz Üniversitesi personeline ve yönetimine bu çalışmadaki yardımları ve destekleri için içtenlikle teşekkür ederiz.

### Funding / Destekleyen Kurum veya Kuruluş

Bu araştırma Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından 4087 nolu proje ile desteklenmiştir. Desteginden dolayı Akdeniz Üniversitesine teşekkür ederiz.

## Kaynaklar

1. Braiman-Wiksman L., et al., T. Novel insights into wound healing sequence of events. *Toxicol Pathol.*, 2007. 35(6): p. 76-779
2. Shaw, T.J. and Martin, P.J. Wound repair at a glance. *Cell Sci.*, 2009. 122(18):3209-3213.
3. Hackam, D.J. and Ford, H.R. Cellular, biochemical, and clinical aspects of wound healing. *Surg. Infect.*, 2002. 3(1): p. 23-35.
4. Harding, K.G., Moore, K. and Phillips, T.J. Wound chronicity and fibroblast senescence implications for treatment. *Int. Wound J.*, 2005. 2: p. 364-368.
5. Diegelmann, R.F. and Evans, M.C. Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Front. Biosci.*, 2004. 9: p. 283-289.
6. Yamaguchi, Y. and Yoshikawa, K. J. Cutaneous Wound Healing: An Update. *The Journal of Dermatology.*, 2001. 28: p. 521-534.
7. Landis, S.J. Chronic wound infection and antimicrobial use. *Adv. Skin Wound Care.*, 2008. 21(11): p. 531-540.
8. Vecchio, D., et al., Antimicrobial photodynamic therapy with RLP068 kills methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and improves wound healing in a mouse model of infected skin abrasion. *J. Biophotonics.*, 2013. 6(9): p. 733-742.
9. Adamian, A.A., et al., Development of new biologically active dressings and methodology of their use. *Khirurgiia (Mosk)*, 2004. 12: p. 10-14.
10. Livshits, V.S., Polymer dressings for wounds and burns (review). *Pharm. Chem. J.*, 22(7): 1988. p. 515-522.
11. Cornelius, V.J., et al., Preparation of smart wound dressings based on colloidal microgels and textile fibres. *International Symposium on Smart Materials, Nano- and Micro-Smart Systems*, 10-13 December, Adelaide, Australia. 2006. p. 11-13
12. Sawant, S.V., et al., Hydrogel as drug delivery system. *Res. J. Pharm. Technol.*, 2012. 5(5): p. 561-569.
13. Zilberman, M. and Elsner, J.J., Antibiotic-eluting medical devices for various applications. *J. Control Release.*, 2008. 130(3): p. 202-215.
14. Moura, L.I., et al., Recent advances on the development of wound dressings for diabetic foot ulcer treatment : a review. *Acta Biomater.*, 2013. 9: p. 7093-7114.
15. Singh, M.R., et al., Innovative approaches in wound healing: trajectory and advances. *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.*, 2013. 41: p. 202-212.
16. Bala, S.K. and Thangeswaran, P., Biomaterials in medical applications. *Asian Text. J.*, 2005. 14(6): p. 57-61.
17. Zahedi, P., et al., A review on wound dressings with an emphasis on electrospun nanofibrous polymeric bandages. *Polym. Adv. Technol.*, 2010. 21(2): p. 77-95.
18. Han, S. K. *Innovations and Advances in Wound Healing: Interactive Wound Dressings*. Springer, Verlag Berlin Heidelberg, 2016. pp. 39-60.
19. Sawant, S.V., et al., Hydrogel as drug delivery system. *Res. J. Pharm. Technol.*, 2012. 5(5):561-569.
20. Zilberman, M. and Elsner, J.J., Antibiotic-eluting medical devices for various applications. *J. Control Release*, 2008. 130(3):202-215.
21. Moura, L.I., et al., Recent advances on the development of wound dressings for diabetic foot ulcer treatment : a review. *Acta Biomater.*, 2013.9:7093-7114.
22. Jude, E. B., et al., J. Prospective randomized controlled study of Hydrofiber dressing containing ionic silver or calcium alginate dressings in non-ischaemic diabetic foot ulcers. *Diabetic Medicine*, 2007. 24(3), 280-288.
23. Dai T. et al. Photodynamic Therapy for *Acinetobacter baumannii* Burn Infections in Mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.*, 2009. 53(9): p. 929-934.
24. Baumgartner, R., et al., Photodynamic Therapy with ALA: A Clinical Handbook: Basic Principles. In: Pottier, R. (Ed.) *Royal Soc. of Chem. Canada*, 2006. p.79-248.
25. Ackroyd R., Kelty, C., Brown, N. and Reed, M. The history of photodetection and photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol.*, 2001. 74(5): p. 656-669.



26. Wainwright, M. and Crossley, K.B. Photosensitising agents-circumventing resistance and breaking down biofilms : a review. *International Biodeterioration & Biodegradation.*, 2004. 53: p. 119-126.
27. GURSOY, H., et al., Photodynamic therapy in dentistry : a literature review. *Clin Oral Invest.*, 2012. 17(4): p. 1113-1125.
28. Konapka, K. and Goslinski, T. Photodynamic therapy in dentistry. *J Dent Res.*, 2007. 86(8): p. 694-707.
29. Baltazar, L.M., et al., Antimicrobial photodynamic therapy: an effective alternative approach to control fungal infections. *Front. Microbiol.*, 2015. 202(6): p. 1-11
30. Onat H. and Gül T., Diş hekimliğinde fotodinamik tedavi. *Atatürk Üni. Diş Hk. Fak. Derg.*, 2014. 24(1): p. 119-124.
31. Kutlubay, Z., Pehlivan, Ö. and Engin, B. Fotodinamik Tedavi. *Dermatoz*, 2011. 2: p. 391-404.
32. Türsen, B. and Türsen, Ü., Dermatolojide Işık Yayan Diyot. *Dermatoz dergisi*, 2015. 2: p. 1-13 doi: doi: 10.15624.dermatoz15062d3
33. El-Sayed, M., et al., Synthesis and properties of natural polymers -grafted- acrylamide. *World Appl Sci J.*, 2011. 13(2): p. 360-368
34. Spagnul, C., Turner, L.C. and Boyle, R.W., Immobilized photosensitizers for antimicrobial applications. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, 2015. 150: p. 11–30.
35. Vatanserver, F., et al., Antimicrobial strategies centered around reactive oxygen species bactericidal antibiotics, photodynamic therapy, and beyond. *FEMS Microbiol. Rev.*, 2013. 37: p. 955–989.

Balos, M.M., et al., Araceae Familyasına Ait Bazı Taksonların Süt Pıhtılaştırma Özelliklerinin Araştırılması. International Journal of Life Sciences and Biotechnology, 2021. 4(3): p. 412-419.  
DOI: 10.38001/ijlsb.889548

## Araceae Familyasına Ait Bazı Taksonların Süt Pıhtılaştırma Özelliklerinin Araştırılması

Mehmet Maruf Balos<sup>1</sup> , Hasan Akan<sup>2\*</sup> , Eda Nur Durmaz<sup>3</sup> , Fatma Zehra İlgez<sup>3</sup> 

### ÖZET

Bu çalışmanın amacı *Aracea* familyasına ait *Biarum aleppicum*, *Biarum bovei*, *Arum rupicola* gibi bazı bitkilerin yumru ve yapraklarından süt pıhtılaştırma özelliklerinin araştırılarak doğal bir yöntemle yoğurt üretmektir. Yaptığımız çalışmada sütün pıhtılaştırılmasında kullanılan bitkilerin kök yumruları dilimlenerek, yaprakları ise doğranarak doğrudan kullanılmıştır. Mayalama işleminin ikinci kez tekrarlanması ve ikinci işlemde sonra elde edilen yoğurt renginin daha beyaz, akışkanlığının daha katı olduğu, tadının daha tatlı olduğu görülmüştür. Yaptığımız bu çalışma ile daha önce kullanımına rastlanmamış olan *Biarum aleppicum*, *Biarum bovei*, *Arum rupicola* bitkilerinin yumru kök ve yaprakları kullanılarak yoğurt benzeri tatlı süt pıhtısı elde edilmiştir.

### MAKALE GEÇMİŞİ

**Geliş**  
02 Mart 2021  
**Kabul**  
14 Nisan 2021

### ANAHTAR KELİMELER

*Biarum aleppicum*,  
*Biarum bovei*,  
*Arum rupicola*,  
Süt pıhtılaştırma

## Investigation of milk coagulation properties of some taxa belonging to the Araceae family

### ABSTRACT

The aim of this study is to investigate the milk coagulation properties of some plants such as *Biarum aleppicum*, *Biarum bovei* and *Arum rupicola* belonging to the Aracea family, and to produce yoghurt with a natural method. In our study, the root tubers of the plants used in the coagulation of milk were sliced and the leaves were chopped directly. After the second repetition of the fermentation process and the second process, it was observed that the color of the yoghurt obtained was whiter, its fluidity was stronger, and its taste was sweeter. With this study, yoghurt-like sweet milk clot was obtained by using tubers and leaves of *Biarum aleppicum*, *Biarum bovei*, *Arum rupicola* plants, which were not used before.

### ARTICLE HISTORY

**Received**  
02 March 2021  
**Accepted**  
14 April 2021

### KEY WORDS

*Biarum aleppicum*,  
*Biarum bovei*,  
*Arum rupicola*,  
milk coagulation

## Giriş

Yoğurt, eski çağlardan beri kullanılmaktadır. Mayalandırılmış süt mamulleri daha çok göçebe topluluklar tarafından geliştirildiği belirtilmektedir. İlk zamanlardaki insanların

<sup>1</sup>Fatma Zehra Kız Anadolu İmam Hatip Lisesi, Akbayır, 1063. Sk. No:2, 63320 Karaköprü/Şanlıurfa

<sup>2</sup>Harran Üniversitesi, Fen edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Osmanbey kampüsü, 63300. Şanlıurfa

<sup>3</sup>Milli İrade Kız Anadolu İmam Hatip Lisesi, Akpıyar Mahallesi, Gap Blv. 129/A, 63320 Karaköprü/Şanlıurfa

\* Sorumlu Yazar: Hasan Akan, e-mail: [hakan@harran.edu.tr](mailto:hakan@harran.edu.tr)

sütü hayvan derilerinde muhafaza edip, daha sonra ekşime ve pıhtılaşmaya bıraktıkları tahmin edilmektedir. Yoğurt ilk kez Türkler tarafından Anadolu'ya getirilmiş olup, Avrupa'ya da zamanla tanıtılmışlardır [1, 2].

Bitkilerin alışlagelmiş kullanımlarından biri süt pıhtılaşmasıdır. Asidik bileşiklerin ısıtılması ve eklenmesi, iyi kültürlenmiş mikrobiyal maddeler, sütü yoğurt ve peynir gibi pıhtılaştırıcı ürünlere dönüştüren enzimler gibi birçok alternatif vardır. Sütün enzimatik yöntemlerle pıhtılaştırılması, çoğu peynirin üretiminde temel bir adımdır. Öte yandan, süt hayvancılığı çiftliklerinde, iyi kültürlenmiş bakteriler yoğurt yapmak için kullanılır ve süte en sık eklenen iki bakteri *Lactobacillus bulgaricus* ve *Streptococcus thermophiles*'dir. Ev düzeyinde enzimler ve bakteriler gibi pıhtılaştırıcı ajanlar elde etmek zor olduğundan, bazı bölgelerde yöre halkı bunun yerine doğal ortamlarında bulunan bitki özlerini kullanma geleneği geliştirmişlerdir. Belirtilen alanda bu bitkilerin kullanımı çoğunlukla yoğurt oluşumunu kolaylaştıracağı varsayımıyla yapılsa da bitkilerin kimozin gibi davranan enzimleri serbest bırakabildikleri için peynir oluşturma olasılığını da güçlendirmektedir. Öte yandan, bitki özlerinin sentetik ilaçlara ve gıda katkı maddelerine göre daha az risk oluşturduğu düşünülmektedir [3].

Bitkisel pıhtılaştırıcıların kullanılması çok eskiye dayanmaktadır. Son yıllarda ise bitkisel pıhtılaştırıcıların süt teknolojisinde kullanımı dikkat çekici oranda artış göstermiştir. Bazı bitkilerde doğal olarak bulunan, sütü pıhtılaştırma yeteneğine sahip pıhtılaştırıcı enzimlerden yararlanılarak süt pıhtılaştırılabilmektedir. Bu bitkisel kökenli enzimler, bitkilerin kök, gövde, tohum, çiçek ve yaprak gibi kısımlarının kullanılmasıyla veya belirli bölgelerinden elde edilmektedirler [3].

Türkiye zengin bir floraya sahiptir. Türkiye'de 167 familya, 1320 cins ve bu cinslere ait toplam 11707 takson bulunmaktadır. Taksonlardan 3649'u Türkiye için endemiktir [4].

Anadolu bitki bilgeliğinde bazı bitkilerin pıhtılaştırıcı olarak kullanılmaktadır. Süt pıhtılaştırma özelliğiyle bilinen önemli bitkiler arasında incir (*Ficus carica* L.), altın çilek (*Physalis peruviana* L.), teleme otu (*Euphorbia maculata* L.), kenger otu (*Gundelia tournefortii* L.), nohut (*Cicer arietinum* L.) gelmektedir [3]. Bu çalışmada ise Araceae familyasına ait bazı taksonların sütü pıhtılaştırma özellikleri araştırılmıştır.

Araceae (Yılanıyastığıgiller) familyası 105 cins ve 3300 tür içerir [5]. *Araceae* Juss. (Yılanıyastığıgiller) familyasında yer alan *Biarum* Schott (Yılanpancarı) cinsi dünyada 21, ülkemizde 11 tür ve 6 alt türle temsil edilmekte olup, endemik takson sayısı 2'dir.

*Arum* L. dünya genelinde 32, ülkemizde 17 tür ve tür altı taksonla temsil edilmekte olup, 3 taksonu endemiktir [6, 7, 8, 9, 10,11].

Yapılan literatür araştırmasında, ülkemizdeki bazı bitkilerin geleneksel olarak süt pıhtılaştırılmasında kullanıldığı görülmüştür [3, 12, 13, 14, 15].

Bu çalışmada süt pıhtılaştırma özelliğinin olup olmadığı bugüne kadar araştırılmayan *Arum rupicola* Boiss., *Biarum aleppicum* J.Thiébaud ve *Biarum bovei* Blume gibi bazı bitkilerin sütü pıhtılaştırma özelliklerinin araştırılması amaçlanmıştır.

## Materyal ve Metot

### Numunelerin toplanması ve hazırlanması

Çalışmada kullanılan bitkiler, Güneydoğu Anadolu Bölgesinde tarafımızca toplanmış ve Harran üniversitesi herbaryumunda saklanmıştır (Şekil 1). Bitki örnekleri Türkiye Florası [16] isimli eserden yararlanılarak teşhis edilmiştir. Araştırmada kullanılan bitkilerin bilimsel isimleri, yerel ve Türkçe isimleri [4] Tablo 1’de verilmiştir.



Şekil 1 Araştırmada kullanılan bitkilerin genel görüntüsü; A-B. *aleppicum*, B-B. *bovei*, C-A. *rupicola*

**Tablo 1** Süt pıhtılaştırma yapımında kullanılan bitkilerin bilimsel ve yöresel isimleri ile yayılış durumları

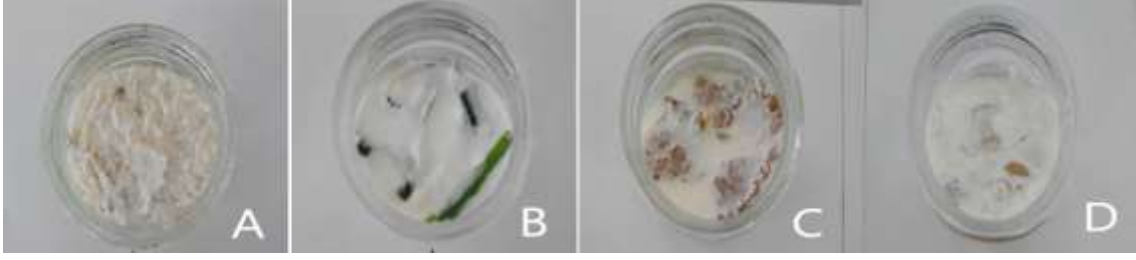
Bitkinin Bilimsel Adı	Bitkinin yöresel isimleri	Ülkemizdeki yayılışı
<i>Arum rupicola</i>	Yılanıyastığı, gavurpancarı, kardi	Akdeniz ve Güneydoğu Anadolu Bölgeleri
<i>Biarum aleppicum</i>	Urfa yılanpancarı, kardi	Güneydoğu Anadolu Bölgesi
<i>Biarum bovei</i>	Özge sucukotu, kardi	Akdeniz, Doğu Anadolu ve Güneydoğu Anadolu Bölgeleri

### Sütün pıhtılaştırma aşamaları

Sütün pıhtılaştırılmasında kullanılan bitkilerin yumruları dilimlenerek doğrudan kullanılmıştır. Kaynatma işlemi uygulanmış taze süt, 38-40°C'ye kadar soğutulmuş üzerine dilimlenmiş yumrular eklenmiştir. Bir tatlı kaşığı şeker ve tuz eklenerek karıştırıldı. Kavanozların üzeri hava ve ışık almayacak şekilde örtüldü. 8 saat sürenin sonunda kavanozlar buzdolabına alınarak 1 gün bekletildi. Mayalanmaya bırakılan süt buzdolabından alınarak içinden bitki yumruları çıkarıldı. Elde edilen pıhtı vizkozite açısından akışkan olup bir sonraki işlem için maya olarak kullanıldı. Mayalama işlemi ikinci kez tekrarlandı. İkinci işlemden sonra elde edilen yoğurt renginin daha beyaz, vizkozitesinin daha katı ve tadının daha tatlı olmasına dikkat edildi. Kullanılan bitki materyalleri şekil 2'de, ilk mayalanma süreci sonundaki görüntüler şekil 3'te, ikinci mayalanma sürecindeki görüntüler şekil 4'de verilmiştir.



**Şekil 2** Kullanılan bitki materyalleri, A-B. *bovei* yaprak, B-B. *aleppicum* yumru, C- *B. bovei* yumru, D-A. *rupicola* yumru



Şekil 3 İlk mayalanma süreci sonundaki görüntüler, A- *B. bovei* yumru, B- *B. bovei* yaprak, C- *B. aleppicum* yumru, D- *A. rupicola* yumru



Şekil 4 İkinci mayalanma süreci sonundaki görüntüler A- *A. rupicola* yumru, B- *B. aleppicum* yumru, C- *B. bovei* yumru, D- *B. bovei* yaprak

## Bulgular

Elde edilen süt pıhtıları için duyuşsal analiz formu (Ek-1) düzenlenmiş ve sonuçlar Tablo 2'de verilmiştir.

Tablo 2 Duyuşsal analiz değerlendirmesi sonuçları

Numune	1.gün				7.gün				14.gün			
	Görünüş	Kıvam	Koku	Tat	Görünüş	Kıvam	Koku	Tat	Görünüş	Kıvam	Koku	Tat
<i>Biarum aleppicum</i>	10	8	6	6	8	6	6	5	6	6	5	4
<i>Biarum bovei</i>	10	10	7	7	8	7	6	5	6	8	5	4
<i>Arum rupicola</i>	10	9	6	6	8	6	6	5	6	8	5	4

Elde edilen pıhtıların görünüş, kıvam (vizkozite), koku ve tatları istenilen özellikte çıkmıştır. pH ölçümleri ortalama 5.30-4.80 arasında değerler ile ölçülmüş ve istenilen pH aralığında olduğu görülmüştür. Örnekler içerisinde en çok beğenilen numunenin *Biarum bovei*'nin olduğu görülmüştür. Değerlendirme sonucunda örneklerin bir haftalık muhafaza süresince görünüş ve diğer özelliklerinde fazla bir değişkenlik olmadığı görülmüştür. Muhafaza süresinin sonu olan 14. günde yapılan analizlerde ise görünüş ve diğer özelliklerin bozulduğu gözlenmiştir.

## **Sonuç ve Tartışma**

Bitkisel pıhtılaştırıcıların kullanılması çok eskiye dayanmaktadır. Dünyada bitkisel pıhtılaştırıcılar İtalya, İspanya, Portekiz, Hindistan, İsrail ve Fas gibi birçok ülkede peynir ve yoğurt yapımında kullanılmaktadır. Düşük maliyete sahip bu bitkisel enzimlerin endüstride kullanımına yönelik araştırmaların artırılması gerekmektedir [3].

Fermente ürünlerin üretiminde problemlerle karşılaşmamak için ülkemiz süt sanayiinde genetik olarak tanımlanmış ve teknolojik özellikleri belirlenmiş starter kültürler (maya) kullanılmaktadır. Tüm fermente ürünlerde kullanılan starter kültürler yurt dışından alınmaktadır. Bu da ülke ekonomisine yük getirmektedir.

Yapılan deneylerde gerek *Arum* gerekse *Biarum* bitkilerinden elde edilen yoğurdun diğer yoğurtlara oranla daha tatlı olduğu görülmüştür, yoğurdun tadına bakan kişilerde tatlı bir izlenim bırakmıştır. Daha önce denenmemiş bir yöntemle tamamen doğal bir yoğurt yapılmıştır. Ayrıca yoğurdun tatlı oluşunun çocuklar için cezbediciliği bulunmaktadır.

Say ve Güzeler [3] tarafından yapılan diğer bir çalışmada sütü pıhtılaştırma özelliğine sahip önemli bitkiler arasında incir (*Ficus carica*), altın çilek (*Physalis peruviana*), teleme otu (*Euphorbia maculata*), kenger otu (*Gundelia tournefortii*) ve nohut (*Cicer arietinum*) gibi bitkilere rastlanmıştır. Yaptığımız bu çalışmada ise Aracea familyasına ait bazı taksonların daha önce kullanımına rastlanmamış olup, bu bitkilerin yumru kök ve yaprakları kullanılarak yoğurt benzeri tatlı süt pıhtısı elde edilmiştir. Düşük maliyete sahip bu bitkisel enzim ve bakterilerin endüstride kullanımına yönelik araştırmaların artırılması gerekmektedir. Etnobotanik kullanımı olan başka türler üzerinde de araştırmaların yapılması önerilmektedir. Bu çalışma ve bundan sonra yapılacak benzeri çalışmaların ülke ekonomisine katkı sağlayacağını ümit etmekteyiz.

## Kaynaklar

1. Baysal, A., Yoğurt: Küreselleşen Türk Besini, Türk Mutfak Kültürü Üzerine Araştırmalar, Türk Halk Kültürünü Araştırma ve Tanıtma Vakfı Yayınları, 2002. 30: p.1-8.
2. Şireli, U. ve B. Onaran, Yoğurt ve yoğurdun İnsan sağlığı açısından yararları. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 2012: p. 1-4.
3. Say, D., M. Soltani, N. Güzeler, Süt ürünlerinde kullanılan bitkiler. III. Geleneksel Gıdalar Sempozyumu, 10-12 Mayıs, 2012: p. 390-391.
4. Güner, A. ve ark., Türkiye bitkileri listesi (damarlı bitkiler). 2012, İstanbul: Nezahat Gökyiğit Botanik Bahçesi ve Flora Araştırmalar Derneği Yayını.
5. Mayo, S.J., J. Bogner, and P.C. Boyce, The Genera of Araceae. 1997, UK: Kew Royal Botanic Gardens.
6. Akan, H., and M.M. Balos, Check-list of the genus *Biarum* Schott in the Flora of Turkey, with a new record for Turkey: *Biarum syriacum* (Spreng.) H. Riedl. Turkish Journal of Botany, 2008. 32(4):305-310.
7. Yıldırım, H., ve ark., *Biarum aleppicum* J. Thiébaud (Araceae): Türkiye için yeni bir tür kaydı. Bağbahçe Bilim Dergisi, 2016. 3(1): p. 41-46.
8. Yıldırım, H., Arum. Şu eserde: Resimli Türkiye Florası 2: 545-574. Güner, A, Kandemir, A, Menemen, Y, Yıldırım, H, Aslan, S, Ekşi, G, Güner, I. ve Çimen, AÖ (edlr.). 2018, ANG Vakfı Nezahat Gökyiğit Botanik Bahçesi Yayınları, İstanbul, Türkiye.
9. Güner, A., ve ark., Resimli Türkiye Florası Cilt 2. 2018, ANG vakfı Nezahat Gökyiğit Botanik Bahçesi Yayınları, İstanbul.
10. Çeçen, C., H. Akan, ve M. M. Balos, Şanlıurfa yöresinde doğal yayılış gösteren *Biarum* Schott (Araceae Juss.) cinsine ait taksonların anatomik ve morfolojik yönden incelenmesi. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tarım ve Doğa Dergisi, 2019. 22: p. 69-83.
11. Çeçen, C., H. Akan, ve M. M. Balos, Şanlıurfa yöresinde doğal yayılış gösteren *Arum upicola* Boiss. var. *rupicola* ve *Arum dioscoridis* Sm. taksonlarının anatomik ve morfolojik yönden incelenmesi. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tarım ve Doğa Dergisi, 2020. 23(1): p. 135-147.
12. Konar, A., A. Düzenli, Z. Uygun, Bitkisel bazı enzimlerin çeşitli sütlere pıhtılaştırıcı etkileri. Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 1990. 5(1): p. 149-159.
13. Serteser, A., V. Gök, Süt pıhtılaştırıcıları olarak bazı doğal bitki türlerinin kullanılması. Süt Endüstrisinde Yeni Eğilimler Sempozyumu, 22-23 Mayıs, 2003. 325-328, Bornova, İzmir.
14. Levent, H., Ö. Algan-Cavuldak, Geleneksel kenger kahvesi ve sakızı. III. Geleneksel Gıdalar Sempozyumu, 10-12 Mayıs, 2012: p. 618-619.
15. Saydam, İ.B., N. Güzeler, Bazı bitkisel pıhtılaştırıcıların sütü pıhtılaştırma kuvvetleri. III. Geleneksel Gıdalar Sempozyumu, 10-12 Mayıs, 2012. 701-703, Konya.
16. Davis, P.H. (ed), Flora of Turkey and The East Aegean Islands. 1965-1985, Edinburgh: Edinburgh Univ. Press.



**EK.1 YOĞURT DUYUSAL ANALİZ FORMU**

Birazdan size Yoğurt örnekleri servis edilecek ve size ürünün bazı kriterleri hakkındaki düşünceleriniz sorulacaktır. Lütfen;

1-Size verilen Yoğurt örneklerini aşağıda verilen sıraya göre renk-görünüş, tat-aroma, kıvam ve genel beğeniniz yönünden değerlendiriniz.

2-Ürünün sizde bıraktığı etkiye göre, aşağıdaki skalayı kullanarak 1 ile 10 arasında bir numarayı daire içerisine alınız.

Puanlandırmada, 1= Çok çok kötü, 5= Ne iyi ne kötü, 10= Çok çok iyi'ye eşittir.

3- Ürün ile ilgili varsa yapmak istediğiniz önerileri aşağıda ayrılan kısma yazınız.

4-Her ürünü tattıktan sonra, diğerine geçmeden önce ağızınızı su ile çalkalayınız.

Sizin yapacağımız dürüst bir puanlama bizlerin çalışmasına yön verecektir.

**RENK-GÖRÜNÜŞ***Biarum aleppicum*

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

*Biarum bovei*

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

*Arum rupicola*

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

**TAT-AROMA***Biarum aleppicum*

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

*Biarum bovei*

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

*Arum rupicola*

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

**KIVAM***Biarum aleppicum*

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

*Biarum bovei*

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

*Arum rupicola*

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

**GENEL KABUL EDİLEBİLİRLİK**

Ürün hakkındaki diğer düşünceleriniz: .....

Not: Lütfen örnekleri tercihinize göre sıralayınız.

Ürün hakkındaki diğer düşünceleriniz: .....

Not: Lütfen örnekleri tercihinize göre sıralayınız.

## The Effect of Hemp Seed Oil on Skin and Soap Performance

Münevver Şeker<sup>1\*</sup> , Özlem Esen<sup>1\*</sup> 

### ABSTRACT

The cannabis plant is essentially a variety of the Cannabis Sativa L. plant. It is used in the textile, energy, automotive and cosmetics. The use of oil derived from hemp seeds has become widespread in cosmetics. Hemp seed oil does not contain  $\Delta 9$ -tetrahydrocannabinol ( $\Delta 9$ -THC) and it is used in the production of food, biodiesel and polymers as well as cosmetics. In this study, different concentrations of hemp seed oil were used in cream and soap formulations, which are among the cosmetic products, and effect on skin hydration, sebum and transepidermal water loss (TEWL) on the skin was investigated. At the same time, the foaming test was applied to soaps containing different concentrations of hemp seed oil to see effects of soap foam performance. To analyse these, a rinse-off and leave-on product were selected. In soap formulations, there is positive effect on skin hydration and TEWL with sebum decrease. The most important change in cream formulations with respect to bar soap formulations is the increases in sebum. The effects of hemp seed oil on soap foam performance were examined. As a result of the study, its effect on the foam of the soap base which is used in this study is positive.

### ARTICLE HISTORY

**Received**

3 May 2021

**Accepted**

7 October 2021

### KEYWORDS

Hemp seed oil, skin hydration, TEWL, sebum, foam performance.

## Introduction

The seeds of cannabis plant are used in cosmetics. Hemp seeds contain 20-25% protein, 20-30% carbohydrates, 25-35% fat, and 10-15% insoluble fibers and a rich range of minerals [1]. Hemp seeds are completely free of  $\Delta 9$ -THC and can be used in the production of food, cosmetics, biodiesel and polymers [2].

The use of oil derived from hemp seeds has recently become widespread in the cosmetics industry. It has been suggested that hemp seed oil is perfectly balanced in terms of the ratio of two essential polyunsaturated fatty acids (linoleic and linolenic acid (3: 1)). Due to this property and the presence of  $\gamma$ -linolenic acid, oil is used as an ideal ingredient for light body oils and lipid-enriched creams known for their high penetration into the skin [3]. Table 1. shows the percentage presence of fatty acids in hemp seed oil.

<sup>1</sup> Evyap Sabun Yağ Gliserin San. ve Tic. A.Ş., Istanbul, Turkey

\*Corresponding Author: Münevver Şeker, e-mail: [mseker@evyap.com.tr](mailto:mseker@evyap.com.tr)

**Table 1** Hemp Seed Oil Fatty Acid Ratio [4]

Hempseed Oil Fatty Acid		Percentage (%)
C16:0	Palmitic	5,98 ± 0,02
C18:0	Stearic	2,41 ± 0,09
C18:1n9 <i>cis</i>	Oleic	9,15 ± 0,17
C18:2n6 <i>trans</i>	Linolelaidic	0,86 ± 0,15
C18:2n6 <i>cis</i>	Linoleic	55,64 ± 1,21
C18:3n6	gamma-Linolenic	5,30 ± 0,12
C18:3n3	α-Linolenic (cis 9)	18,02 ± 0,19
C20:0	Arachidic	0,93 ± 0,01
C20:1n9	Eicosenoic	1,71 ± 0,17
unsaturated fatty acids		90,68 ± 0,51

Hemp seed oil has been reported to be effective as a sunscreen, skin repairment, anti-allergy and anti-aging, which is high-quality raw material for skin care products [5] and some of its characteristics and properties have been studied. As far as the cosmetic properties are concerned, some of the studies did not provide any particularly interesting result. There have been studies related to the formulations, characterization and antibacterial properties of hemp seed oil. One study evaluated the degree of oxidation of hot pressed and cold pressed hemp seed oil stored in five different environments. The results showed that long chain unsaturated fatty acids were oxidized. The oxidation products of hemp seed oil were analysed by headspace solid phase micro-extraction gas chromatography-mass spectrometry (HS-SPME-GC / MS) and high performance liquid chromatography (HPLC).

It has been found that seed oils stored at low temperature, protected from light and the external environment, contain aldehydes, ketones and alcohols, which have a negative impact on the health of consumers [5].

Hemp seed oil and its emulsions were tested against the growth of selected bacteria (*Micrococcus luteus* and *Staphylococcus aureus* subsp.) using disk diffusion and broth microdilution methods. It has been suggested that the formulation in the study does not exhibit antibacterial activity due to hemp seed oil addition [6]. On the other hand, cannabis seed emulsions were prepared with different HLB values. After 2 months 25 °C and 4 °C, it

was observed that the hemp seed oil emulsion showed good stability without phase separation [6].

In spite of the not promising results quoted above, it might be considered that hemp seed oil can have some positive effects on skin properties. Cannabidiol (CBD), a non-psychoactive compound from the cannabis plant, has garnered significant attention in recent years for its anecdotal therapeutic potential for various pathologies, including skin and cosmetic disorders. Though a body of preclinical evidence suggests topical application of CBD may be efficacious for some skin disorders, such as eczema, psoriasis, pruritis, and inflammatory conditions, confirmed clinical efficacy and elucidation of underlying molecular mechanisms have yet to be fully identified. [7].

One of these is transepidermal water loss (TEWL), one of the most reliable indicators of epidermal barrier function; TEWL refers to the amount of water loss from a specific skin area in a given time period [8]. The use of soap and harsh detergents causes xerosis and exacerbates atopic dermatitis (AD) by a mechanism involving skin barrier breakdown [9]. Occlusive agents serve to reduce transepidermal water loss (TEWL) by forming a hydrophobic barrier film over the skin surface to prevent evaporation of water from the SC, trapping water in the skin's uppermost layers [10]. Creams can have a delaying effect on transepidermal water loss thanks to the occlusive oils they contain. Another effect of creams is to increase skin hydration.

And another reason for using skin products such as soaps and creams is to reduce sebum. Most people think that excess facial sebum causes a shiny or oily looking face and want to reduce facial sebum using cosmetics. Also, oxidized sebum or free fatty acids derived from sebum can irritate the skin and cause skin problems such as seborrheic dermatitis and acne [11].

## **Materials And Methods**

Hemp seed oil was supplied from a local market in Tuzla, Istanbul, Turkey and used in the moment of purchase without any pretreatment. GC and FTIR tests of the supplied hemp seed oil have been completed by the Evyap® laboratories. 0.50, 1.00 and 1.50 w/w% of hemp

seed oil was added to the soap and cream. Formulation of the products are formed by Evyap Sabun Yağ Gliserin San. ve Tic. A.S.®

### **Skin base measurement**

20 volunteers with different genders and age groups and with different skin types were kept in conditional room at 18 °C with 8% relative humidity for 15 minutes. The samples were applied on a 25 cm<sup>2</sup> square on the forehead of the volunteers. Before the soaps and creams were applied, the hydration value of the skin was taken from 3 points with Courage + Khazaka electronic GmbH Corneometer® CM 825 and the averages were recorded. Transepidermal water loss was recorded by averaging 10 values with Courage + Khazaka electronic GmbH Tewameter® TM 300 in the same 25 cm<sup>2</sup> square area. Finally, with the Courage + Khazaka electronic GmbH Sebumeter® SM 815, the sebum value was measured 3 times from the same area and the averages were calculated.

### **Soap measurement on skin**

After having measured the base values on the untreated skin, 5 mg soap foam which is including hemp seed oil was applied to the same 25 cm<sup>2</sup> area in forehead of the same volunteers. After 30 seconds later, soap foam was rinsed from the skin using tap water.

After the soap was rinsed from the skin, there was no drying process and the skin was allowed to dry naturally in the conditioned environment. TEWL and hydration and sebum were measured 15 minutes, 30 minutes and 60 minutes after removal of the foam. The steps were exactly the same for soaps containing 0.00%, 0.50%, 1.00% and 1.50% by weight. Results are recorded as a negative expression indicates a decrease in the specified time interval, while a positive expression indicates an increase.

### **Cream measurement on skin**

1.00 gram of the cream containing hemp seed oil was taken and applied to the forehead in a 25 cm<sup>2</sup> square of the same volunteers. The hydration value of the skin was taken from 3 points with Courage + Khazaka electronic GmbH Corneometer® CM 825 respectively, from the applied area and the averages were recorded. Transepidermal water loss was recorded by averaging 10 values with Courage + Khazaka electronic GmbH Tewameter® TM 300 from the applied area. Finally, the sebum value was measured 3 times with Sebumeter® SM 815 from Courage + Khazaka electronic GmbH, and their average was recorded. Corneometer

and tewameter measurements were repeated for cream formulations of 0.00%, 0.50 %, 1.00%, 1.50% w/w hemp seed oil concentrations. After the application of the creams, the same measurements were performed as 15 minutes, 30 minutes and 60 minutes, respectively, and the results were recorded. Results are recorded as a negative expression indicates a decrease in the specified time interval, while a positive expression indicates an increase.

### Measurement of soap foaming performance

To determine the foaming performance of soaps, foam test method was applied to soap samples. The 0.40 g soap sample was weighed and placed in a beaker. It was homogenized for 5 minutes at 3600 rpm by adding 1000 mL of deionized water on it. After 5 minutes, samples were poured into 3 measuring cylinders of 50 mL. Each of the metering cylinders was rotated for 30 seconds on the spinner to determine the amount of foam per unit volume. After 30 seconds the initial volume value of the foam was recorded. After 15 minutes and 30 minutes, foam volumes were measured and recorded as well. ,

## Results

### Characterization of hemp seed oil

When the GC results graphed in Figure 1. are compared with the hemp seed oil content in Figure 2, the results largely overlap. The difference in the ratio of fatty acids in hemp seed oil is due to the different structure of each plant. Detailed results of the graph in Figure 2 are shown in Table 2. FT-IR analysis results are shown in Figure 2.

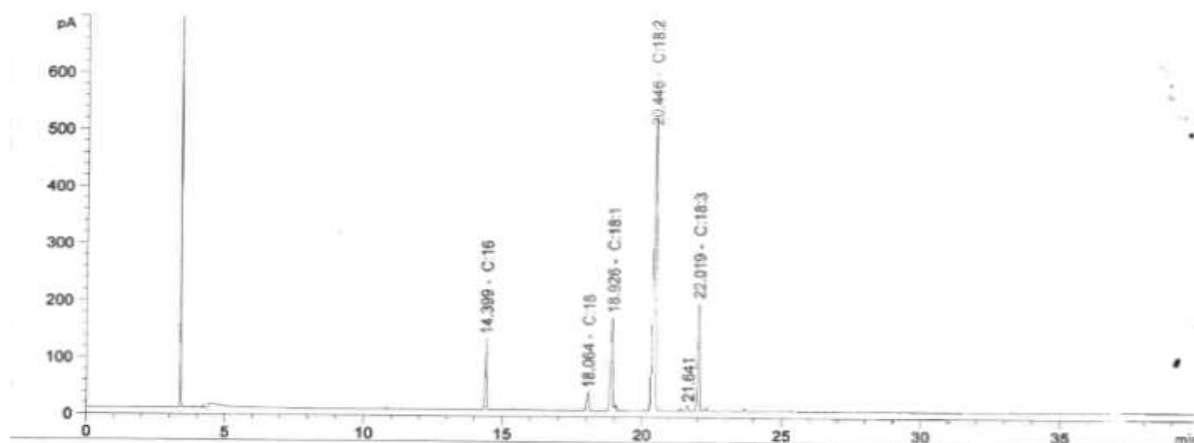
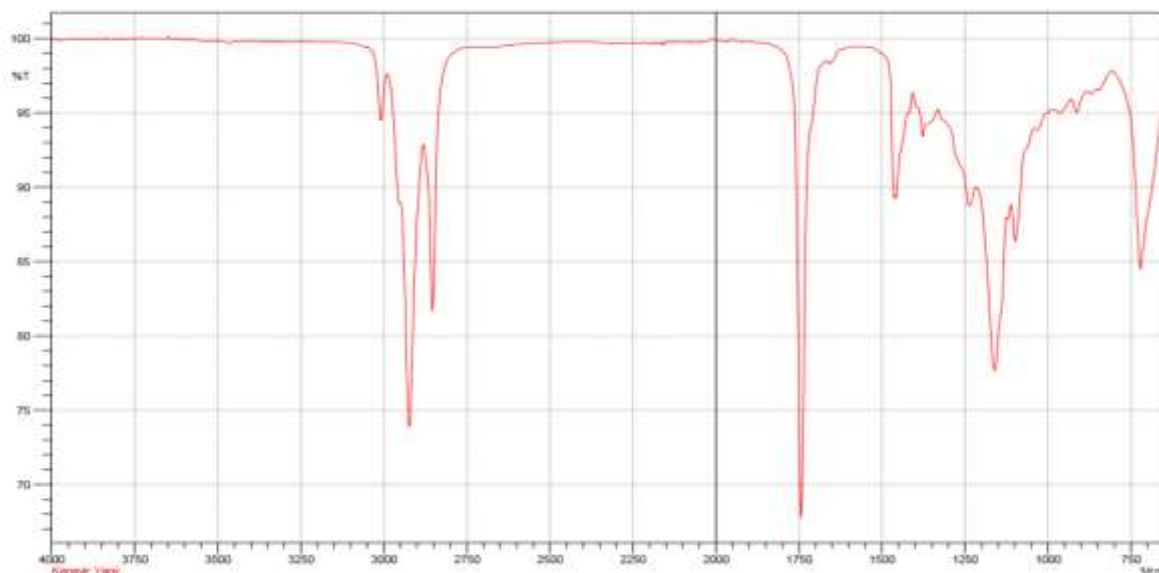


Fig 1 GC Analysis Result of Hemp Seed Oil

**Table 2** Hemp Seed Oil GC Analysis Results

Peak	Retime [Min]	Width [Min]	Area [pA*s]	Area %	Name
1	5.3	0.0	0.0	0.0	C:8
2	6.0	0.0	0.0	0.0	C:10
3	8.0	0.0	0.0	0.0	C:12
4	11.0	0.0	0.0	0.0	C:14
5	14.4	0.0	487.1	8.8	C:16
6	18.1	0.1	170.2	3.1	C:18
7	18.9	0.1	1020.4	18.4	C:18:1
8	20.4	0.1	3106.6	56.1	C:18:2
9	22.0	0.0	756.5	13.7	C:18:3



**Fig 2.** FT-IR Result of Hemp Seed Oil

### Chemical analysis

Heavy metal ion analysis of the water used at this stage was performed by SGS Istanbul - Food Control & Agriculture® using EPA 200.8 analysis method. The pH, conductivity and hardness analysis of the same water sample was carried out. Heavy metal values were given in Table 3. The pH analysis result of the same water is 8,001; conductivity analysis result is 767.1. The water hardness analysis result is stated as 21 dH (hard).

**Table 3** Heavy Metal Ions Analysis Results of Soap Rinse Water

Analysis	Result / Uncertainty	LOQ	Unit
Antimony (Sb)	Not Detected	1	µg/L
Cadmium (Cd)	Not Detected	1	µg/L
Chromium (Cr)	Not Detected	1	µg/L
Cobalt (Co)	Not Detected	1	µg/L
Nickel (Ni)	Not Detected	1	µg/L
Copper (Cu)	Not Detected	1	µg/L
Arsenic (As)	Not Detected	1	µg/L
Mercury (Hg)	Not Detected	1	µg/L
Lead (Pb)	Not Detected	1	µg/L

### Soap measurements

Soap removes lipids in the skin's barrier and modifies trans-epidermal water loss and skin hydration. The results for the control without hemp oil are reported in Table 4. A negative expression indicates a decrease in the specified time interval, while a positive expression indicates an increase.

**Table 4** Skin hydration, TEWL, Sebum Measurement Values of Soap Containing 0.00 % Hemp Seed Oil

Hemp Seed Oil (%)	Volunteers	Skin Hydration [g/min]			TEWL (g/ hm <sup>2</sup> )			Sebum
		0-15 Min	15-30 Min	30-60 Min	0-15 Min	15-30 Min	30-60 Min	0-60 Min
0.00	1	-18.2	-19.1	-15.7	-14.1	-12.6	-1.5	33.0
	2	-3.2	-11.7	-2.6	-6.7	-9.2	-3.2	-97.0
	3	-4.1	-0.8	0.0	-0.9	-9.1	-5.3	-21.0
	4	-22.2	-20.5	-18.3	-3.2	-7.9	-5.3	-28.0
	5	-0.4	-15.7	-4.5	-7.1	-5.6	-4.1	7.0
	6	-10.2	-15.9	-5.5	-9.1	-11.1	-10.5	-18.0
	7	-19.9	-17.3	-14.7	-0.8	-8.2	-4.2	-34.0
	8	-9.0	-5.4	-5.3	-12.3	-10.2	-7.7	18.0
	9	-21.2	-2.8	-1.2	-2.4	-13.4	-11.2	-45.0
	10	-12.3	-7.6	-5.4	-18.6	-20.6	-13.4	22.0
	11	-15.8	-3.9	-2.5	-15.3	-12.5	-3.4	38.0
	12	-17.1	-5.2	-4.3	-2.8	-3.3	-0.2	-2.0
	13	-0.8	-0.1	-0.2	-4.7	-5.8	-4.2	-45.0



<b>14</b>	-4.2	-9.4	-9.8	-0.2	-2.9	-1.1	-31.0
<b>15</b>	-13.6	-7.4	-3.6	-0.6	-7.8	-6.9	-54.0
<b>16</b>	-5.7	-12.2	-10.4	-3.5	-12.4	-5.3	-94.0
<b>17</b>	-7.4	-8.1	-14.3	-0.7	-2.2	-0.2	43.0
<b>18</b>	-20.3	-19.5	-18.4	-11.4	-14.3	-9.9	-65.0
<b>19</b>	-2.1	-2.6	-2.2	-3.3	-8.3	-2.7	-67.0
<b>20</b>	-3.3	-0.3	-0.4	-1.4	-10.6	-3.8	-32.0
<b>Average</b>	-10.5	-9.3	-7.0	-6.0	-9.4	-5.2	-23.6

Table 5 shows the skin hydration, TEWL and sebum data of soap with 0.50% hemp seed oil content for 20 people in detail. Data were taken as the average change between specified minutes. Based on the mean values of 7 volunteers, the use of hemp seed oil appears to have a positive effect on skin hydration. Although there was a decrease of -6.2 in skin hydration between 0 and 15 minutes, an increase in hydration was seen in the following measurements. When the same results were evaluated for TEWL, soap containing 0.50% hemp seed oil was not shown significant results during 60 minutes. The value of TEWL was quite small. 0.50% concentration will not cause a change for TEWL.

The change in sebum values were evaluated for the first 60 minutes and are reflected in Table 5. It has been observed that hemp seed oil reduces sebum with a value of -31.8.

**Table 5** Skin hydration, TEWL, Sebum Measurement Values of skin treated with foam from Soap Containing 0.50 % Hemp Seed Oil

Hem P Seed Oil (%)	Volunteer s	Skin Hydration [g/min]			TEWL (g/ hm <sup>2</sup> )			Sebum
		0-15 Min	15-30 Min	30-60 Min	0-15 Min	15-30 Min	30-60 Min	0-60 Min
0.50	<b>1</b>	-8.3	3.1	12.7	-4.1	2.0	-1.5	18.0
	<b>2</b>	-0.4	-14.7	8.9	-0.4	5.0	-1.7	-70.0
	<b>3</b>	-0.5	-1.9	4.0	2.9	-0.1	-1.6	-31.0
	<b>4</b>	-16.7	2.0	3.3	-0.2	-2.5	-2.5	-32.0
	<b>5</b>	4.8	-13.7	-1.5	-0.2	1.7	-2.2	-3.0
	<b>6</b>	-6.1	-5.4	2.9	0.0	-1.4	-0.8	-36.0
	<b>7</b>	-17.9	10.3	11.4	-0.8	4.4	-2.4	-65.0
	<b>8</b>	-6.4	-2.3	4.4	-0.1	2.3	-3.5	-21.0
	<b>9</b>	-18.2	-9.2	2.7	-4.4	1.2	-2.4	-18.0
	<b>10</b>	-4.3	-2.3	7.6	-2.1	-2.5	-1.6	-34.0

<b>11</b>	-12.5	-8.8	-2.4	2.3	-1.2	-3.2	-42.0
<b>12</b>	-11.7	-4.9	6.3	-4.9	3.4	-1.9	12.0
<b>13</b>	-0.3	0.0	7.7	3.6	4.2	-2.6	-27.0
<b>14</b>	-3.2	-2.7	4.6	-2.7	1.9	-0.2	-39.0
<b>15</b>	-9.8	-2.6	5.0	-0.1	-2.6	-1.2	-43.0
<b>16</b>	-2.9	-2.3	5.1	-2.5	3.6	-2.1	-56.0
<b>17</b>	-5.6	-1.4	2.9	-3.1	0.8	-4.2	-28.0
<b>18</b>	0.0	0.0	6.6	-2.6	-1.3	-0.1	-19.0
<b>19</b>	-1.9	-1.1	13.5	3.5	-0.3	-2.5	-34.0
<b>20</b>	-2.8	-1.2	18.9	0.0	3.9	-0.7	-67.0
<b>Average</b>	-6.2	-3.0	6.2	-0.8	1.1	-1.9	-31.8

Table 6. shows the data of soap with 1.00% hemp seed oil content as hydration, TEWL and sebum. Considering the data as the mean change between the specified minutes, it is seen that the mean values of 20 subjects showed an incredible effect when soap containing hemp seed oil increased from 0.50% to 1.00%. Although there was a decrease in skin hydration in the first 15 minutes, it was increased dramatically between 15-30 minutes. Skin hydration tended to return to its original state after 30 minutes. At the end of 60 minutes, there was almost no change in skin moisture with respect to initial values. There was a steady decrease in TEWL. Although the soap increased TEWL when first applied to the skin, there was a decrease in water loss with the effect of hemp seed oil.

The change in sebum have been evaluated for the first 60 minutes and are reflected in Table 6. It has been observed that hemp seed oil reduces sebum with a value of -36.7 with respect to 0.50% hemp seed oil. There was 17% decrease in sebum after 60 minutes.

**Table 6** Skin hydration, TEWL, Sebum Measurement Values of Soap Containing 1.00 % Hemp Seed Oil

<b>Hem p Seed</b>	<b>Volunteer s</b>	<b>Skin Hydration [g/min]</b>			<b>TEWL (g/ hm<sup>2</sup>)</b>			<b>Sebum</b>
		<b>0-15 Min</b>	<b>15-30 Min</b>	<b>30-60 Min</b>	<b>0-15 Min</b>	<b>15-30 Min</b>	<b>30-60 Min</b>	<b>0-60 Min</b>

<b>Oil (%)</b>								
<b>1.00</b>	<b>1</b>	-16.9	12.2	5.4	-1.7	2.3	-3.0	-97.0
	<b>2</b>	2.6	-3.1	-5.9	3.7	2.0	2.4	-125.0
	<b>3</b>	-2.2	-6.9	-3.3	2.0	0.3	-1.3	65.0
	<b>4</b>	-21.7	2.7	3.8	-0.2	6.3	12.5	-39.0
	<b>5</b>	-10.0	13.8	-9.5	3.1	0.1	-0.4	-16.0
	<b>6</b>	3.4	0.7	3.0	2.6	-2.9	-0.4	-28.0
	<b>7</b>	19.9	8.4	0.1	1.9	1.6	-3.3	-16.0
	<b>8</b>	-8.7	5.7	6.3	3.2	2.5	11.5	-23.0
	<b>9</b>	2.3	6.4	4.2	5.7	1.8	-0.2	-53.0
	<b>10</b>	-1.2	2.5	3.1	0.4	1.5	-0.8	-61.0
	<b>11</b>	-10.9	-5.2	-2.4	1.2	4.4	-11.2	-38.0
	<b>12</b>	-7.4	-3.3	-15.7	-3.7	0.0	-1.1	-78.0
	<b>13</b>	2.4	5.9	4.8	-2.9	1.1	3.6	-18.0
	<b>14</b>	-1.7	2.1	1.2	2.2	1.3	3.7	-43.0
	<b>15</b>	-5.4	-2.4	-7.1	6.1	2.6	0.0	-27.0
	<b>16</b>	-1.7	3.9	-4.4	3.9	-3.1	-0.2	-19.0
	<b>17</b>	-3.3	7.9	3.2	8.2	0.5	3.1	-27.0
	<b>18</b>	-5.6	4.8	6.1	-5.1	0.3	2.9	-30.0
	<b>19</b>	-1.1	12.3	-11.3	3.9	1.5	2.2	-21.0
	<b>20</b>	-1.4	9.9	2.2	1.1	1.6	-1.2	-39.0
<b>Average</b>	-3.4	3.9	-0.8	1.8	1.3	0.9	-36.7	

Table 7. shows the data of soap with 1.50% hemp seed oil content as moisture, TEWL and sebum. The data were interpreted as the average change between the specified minutes, and by looking at the average values of 20 volunteers, it can be said that by increasing the ratio of hemp seed oil to 1.50%, the skin moisture decreased considerably in the first 15 minutes, but then it started to increase rapidly until 60 minutes.

When the same results were evaluated for TEWL, although it was observed that it increased based on the value of 2.4 in the first 15 minutes, there was a significant decrease between 15 and 30 minutes. Within 30-60 minutes the skin tended to return to its initial state.

The change in sebum were evaluated for the first 60 minutes and were reflected in the Table 7. It has been observed that hemp seed oil significantly reduces sebum with a value of -44.29.

**Table 7** Skin hydration, TEWL, Sebum Measurement Values of Soap Containing 1.50 % Hemp Seed Oil

Hemp Seed Oil (%)	Volunteers	Skin Hydration [g/min]			TEWL (g/ hm <sup>2</sup> )			Sebum
		0-15 Min	15-30 Min	30-60 Min	0-15 Min	15-30 Min	30-60 Min	0-60 Min
1.50	1	-11.1	-6.7	4.8	-1.3	-0.2	-2.2	-59.0
	2	-1.2	-7.6	-1.7	9.4	-2.0	2.4	-85.0
	3	-10.7	-2.3	7.1	0.6	1.4	-0.5	-10.0
	4	12.6	-2.4	-6.6	2.0	-3.9	-2.0	-7.0
	5	-2.1	-2.7	2.0	2.5	-0.9	-2.5	-6.0
	6	-26.7	-1.6	5.9	0.4	-5.7	4.1	-35.0
	7	-17.2	3.3	7.9	4.0	-3.4	0.4	-108.0
	8	-9.5	-2.5	1.4	2.3	1.2	1.9	-34.0
	9	-13.7	-4.7	-2.4	3.1	1.6	1.5	-67.0
	10	-24.1	-12.8	-6.3	3.5	-2.4	-3.4	-73.0
	11	-13.1	-3.6	2.1	5.2	3.1	1.2	-32.0
	12	-1.4	4.4	3.7	2.3	-3.6	-6.2	-96.0
	13	-2.1	2.6	2.9	1.7	-2.8	2.3	-54.0
	14	-7.9	1.1	3.5	-1.9	-3.4	1.1	-41.0
	15	-4.4	-2.9	2.4	2.5	-5.8	1.5	-35.0
	16	-11.1	-5.6	-1.9	3.1	-1.4	2.7	-28.0
	17	-1.6	4.8	5.2	4.7	4.4	-1.6	-29.0
	18	-2.1	-1.3	3.6	-3.2	-7.1	-5.1	-24.0
	19	-3.2	-2.8	4.6	3.6	-1.5	3.4	-49.0
	20	-5.6	-4.5	7.8	3.8	-6.8	2.5	-51.0
	<b>Average</b>	-7.8	-2.4	2.3	2.4	-2.0	0.1	-46.2

It has seen 0.50%, 1.00% and 1.50% hemp seed oil content data in Table 8. As can be seen, the highest level was observed at 0 minutes. Subsequently, it has gradually decreased and reached the minimum level in 30 minutes.

**Table 8** Soap Foaming Test Results with Hemp Seed Oil Ratio Variation

Hemp Seed Oil (%)	0. Min	15. Min	30. Min
0.00	2.28	1.35	1.12
0.50	2.24	1.65	1.28
1.00	1.88	1.57	1.28

1.50	2.43	2.08	1.48
------	------	------	------

Hemp seed oil has been observed to yield only 1.50% effective results at minute 0, based on the soap base measurement according to Table 8. However, considering the 15th and 30th minutes, it was observed that the amount of soap foam increased with the increase in the concentration of hemp seed oil.

### Cream measurements

Cream formulation is contained emollients and humectants. Emollients are created a barrier on the skin. Hydration, TEWL and sebum for the skin treated with cream without hemp oil are reported in table 9.

**Table 9** Skin hydration, TEWL, Sebum Measurement Values of Cream Containing 0.00 % Hemp Seed Oil

Hem P Seed Oil (%)	Volunteer s	Skin Hydration [g/min]			TEWL (g/ hm <sup>2</sup> )			Sebum
		0-15 Min	15-30 Min	30-60 Min	0-15 Min	15-30 Min	30-60 Min	0-60 Min
0.00	1	-3.5	-2.2	13.9	3.5	1.5	-2.3	120.0
	2	-28.9	-23.3	-13.7	9.0	-6.8	4.5	87.0
	3	-4.5	0.2	2.3	-2.3	-5.4	3.9	34.0
	4	-23.8	-12.4	0.1	-11.2	-12.1	-9.5	27.0
	5	-2.3	3.5	3.0	0.8	-2.3	2.0	45.0
	6	-29.5	-21.5	-8.1	3.8	-1.7	1.2	129.0
	7	-23.2	-12.0	-1.9	4.6	-2.5	2.7	134.0
	8	-27.3	-22.3	-18.4	3.1	-2.5	4.8	137.0
	9	-31.6	-18.4	7.1	2.6	-3.1	2.5	32.0
	10	-17.3	-12.8	-8.2	4.2	-5.7	6.5	76.0
	11	-19.3	-11.5	0.5	6.8	-2.5	0.1	98.0
	12	-8.2	-6.6	-2.1	11.3	2.9	0.4	79.0
	13	-2.1	3.5	0.1	4.2	-4.4	3.7	73.0
	14	-5.9	0.4	6.5	-8.9	-5.1	-4.1	44.0
	15	-29.4	-17.3	2.5	-2.1	0.3	1.1	60.0
	16	-32.9	-3.6	-1.9	3.6	-3.5	0.9	45.0
	17	-11.1	-8.8	-2.6	-1.5	-2.1	5.7	54.0
	18	-7.2	-1.4	11.7	-5.1	-8.9	-2.6	111.0
	19	-3.7	-5.3	2.4	2.8	-1.2	-5.5	134.0

	<b>20</b>	-18.5	-13.9	-1.5	0.4	-9.4	-2.1	76.0
	<b>Average</b>	<b>-16.5</b>	<b>-9.3</b>	<b>-0.4</b>	<b>1.5</b>	<b>-3.7</b>	<b>0.7</b>	<b>79.8</b>

Table 10. contains skin hydration, TEWL and sebum data of the cream with a 0.50% hemp seed oil content. There was a significant reduction in skin hydration in the first 15 minutes. However, as the absorption level increased, the hydration level increased over time.

There was an increase in water loss in the first 15 minutes for cream with a 0.50% hemp seed oil content. The water loss decreased significantly in the following minutes because the moisture was too much at the beginning and the rate of water loss was very fast. As the absorption occurred on the skin, the moisturization level increased. Transepidermal water loss in 30-60 minutes increased slightly compared to 15-30 minutes and reached -3.3.

Sebum values were evaluated for the first 60 minutes and reflected in Table 10. Hemp seed oil was found to increase sebum with a value of 114.7.

**Table 10** Skin hydration, TEWL, Sebum Measurement Values of Cream Containing 0.50 % Hemp Seed Oil

Hem P Seed Oil (%)	Volunteer s	Skin Hydration [g/min]			TEWL (g/ hm <sup>2</sup> )			Sebum
		0-15 Min	15-30 Min	30-60 Min	0-15 Min	15-30 Min	30-60 Min	0-60 Min
0.50	1	-5.6	-4.2	5.4	-2.4	-5.6	-3.4	134.0
	2	-3.6	1.1	2.7	5.6	2.5	5.1	89.0
	3	-12.8	-3.1	6.8	-4.2	1.5	-2.8	45.0
	4	-18.9	-11.1	1.0	-7.9	-9.6	-4.6	76.0
	5	-21.4	-8.9	-3.7	0.4	-3.1	-1.1	82.0
	6	-12.5	-12.4	-1.1	3.7	-6.4	-6.7	187.0
	7	-6.8	-6.3	-2.3	1.1	-7.2	-2.5	145.0
	8	-21.6	-12.1	-4.9	3.6	1.1	4.9	165.0
	9	-2.1	-6.6	0.9	2.1	2.8	4.4	56.0
	10	-6.1	2.5	7.7	6.9	-3.9	3.4	85.0
	11	-21.5	-12.4	-3.0	2.7	4.6	5.1	101.0
	12	-17.4	-9.8	-2.9	-2.9	-9.1	-7.8	132.0
	13	-20.6	-2.5	0.1	0.8	-3.6	-2.1	108.0
	14	-7.7	-3.2	-1.3	-15.9	-13.4	-11.4	112.0

<b>15</b>	-19.4	-11.6	-7.4	-9.0	0.4	0.2	134.0
<b>16</b>	-18.1	-12.5	-10.2	2.6	-0.1	-4.9	126.0
<b>17</b>	-16.3	-8.4	8.5	3.1	-4.4	-7.3	103.0
<b>18</b>	-11.1	-10.9	5.2	0.3	-7.5	-4.2	176.0
<b>19</b>	-21.9	-13.5	3.3	-1.9	-1.2	-0.9	102.0
<b>20</b>	-20.1	-16.2	0.1	2.5	-3.2	-9.1	136.0
<b>Average</b>	<b>-14.3</b>	<b>-8.1</b>	<b>0.2</b>	<b>-0.4</b>	<b>-3.3</b>	<b>-2.3</b>	<b>114.7</b>

Table 11. contains the skin hydration, TEWL and sebum data of the cream with 1.00% hemp seed oil content. The cream containing 0.50% hemp seed oil had the same effect on skin hydration as the cream containing 1.00% hemp seed oil. While there was a significant decrease in the first 15 minutes, the penetration of the oil into the skin increased the skin hydration as 2.7 at the end.

Considering cream containing 1.00% hemp seed oil. During 60 minutes, there is no significant change in TEWL. It does not affect the water loss on the skin.

Sebum values were evaluated for the first 60 minutes and are reflected in Table 11. as the average value per minute. Hemp seed oil was found to increase sebum by 123.8.

**Table 11** Skin hydration, TEWL, Sebum Measurement Values of Cream Containing 1.00 % Hemp Seed Oil

Hem p Seed Oil (%)	Volunteer s	Skin Hydration [g/min]			TEWL (g/ hm <sup>2</sup> )			Sebum
		0-15 Min	15-30 Min	30-60 Min	0-15 Min	15-30 Min	30-60 Min	0-60 Min
1.00	<b>1</b>	<b>-1.6</b>	<b>-1.3</b>	<b>-1.4</b>	<b>1.1</b>	<b>5.0</b>	<b>-8.9</b>	<b>204.0</b>
	<b>2</b>	<b>-19.2</b>	<b>5.2</b>	<b>-9.5</b>	<b>5.2</b>	<b>-10.0</b>	<b>0.4</b>	<b>145.0</b>
	<b>3</b>	<b>-1.8</b>	<b>-4.6</b>	<b>-2.0</b>	<b>-7.6</b>	<b>-0.5</b>	<b>1.6</b>	<b>71.0</b>
	<b>4</b>	<b>-16.2</b>	<b>-8.1</b>	<b>12.7</b>	<b>-16.2</b>	<b>-13.6</b>	<b>-11.1</b>	<b>125.0</b>
	<b>5</b>	<b>1.7</b>	<b>-15.4</b>	<b>12.0</b>	<b>5.6</b>	<b>-7.1</b>	<b>5.2</b>	<b>45.0</b>
	<b>6</b>	<b>-22.1</b>	<b>-2.3</b>	<b>9.8</b>	<b>2.9</b>	<b>-6.1</b>	<b>0.7</b>	<b>175.0</b>
	<b>7</b>	<b>-17.9</b>	<b>2.3</b>	<b>-2.8</b>	<b>7.7</b>	<b>-1.8</b>	<b>3.9</b>	<b>174.0</b>
	<b>8</b>	<b>-12.2</b>	<b>-8.7</b>	<b>4.3</b>	<b>4.6</b>	<b>-2.5</b>	<b>1.7</b>	<b>68.0</b>
	<b>9</b>	<b>-8.9</b>	<b>-2.5</b>	<b>3.8</b>	<b>2.7</b>	<b>-3.1</b>	<b>1.8</b>	<b>87.0</b>
	<b>10</b>	<b>-16.5</b>	<b>-11.4</b>	<b>1.7</b>	<b>-2.6</b>	<b>-5.9</b>	<b>-3.6</b>	<b>99.0</b>

<b>11</b>	<b>-2.7</b>	<b>3.7</b>	<b>6.9</b>	<b>-1.2</b>	<b>-3.3</b>	<b>1.7</b>	<b>112.0</b>
<b>12</b>	<b>-13.7</b>	<b>1.6</b>	<b>3.5</b>	<b>6.8</b>	<b>2.6</b>	<b>5.1</b>	<b>153.0</b>
<b>13</b>	<b>-16.9</b>	<b>-6.2</b>	<b>-4.5</b>	<b>-8.9</b>	<b>-11.8</b>	<b>-6.9</b>	<b>89.0</b>
<b>14</b>	-4.7	0.5	3.1	-1.5	-9.6	-4.7	93.0
<b>15</b>	-21.7	-3.8	8.6	0.4	1.7	3.1	79.0
<b>16</b>	-19.7	-11.4	1.9	5.2	3.9	5.9	110.0
<b>17</b>	-3.1	4.6	11.6	4.8	2.1	2.2	121.0
<b>18</b>	-2.6	0.9	-2.3	-1.5	-8.3	-7.2	142.0
<b>19</b>	-4.7	-1.8	0.2	-4.8	-12.8	-5.3	197.0
<b>20</b>	-11.1	-5.4	-3.9	-6.2	-7.1	-11.0	187.0
<b>Average</b>	<b>-10.8</b>	<b>-3.2</b>	<b>2.7</b>	<b>-0.2</b>	<b>-4.4</b>	<b>-1.3</b>	<b>123.8</b>

Table 12. contains the skin hydration, TEWL and sebum data of the cream with 1.50% hemp seed oil content. As 0.50% and 1.00% hemp seed oil content; 1.50% hemp seed oil the same effect on skin hydration in cream formulation. It decreased in first 15 minutes. When the data are considered as the average change between the determined minutes, it is possible to say that the hydration is not different from the other dosages and decreases in the first 15 minutes, but increased over time. It reached the 5.8 in the 30-60 minutes range.

An increase of 2.5 was observed in the first 15 minutes, the transepidermal water loss decreased significantly in 15-30 minutes and reached -3.00 However, it increased a slightly more in 30-60 minutes and the value was recorded as -7.5.

Sebum values were evaluated for the first 60 minutes and reflected in Table 12. Hemp seed oil was found to increase sebum by 155.0.

**Table 12** Skin hydration, TEWL, Sebum Measurement Values of Cream Containing 1.50 % Hemp Seed Oil

<b>Hem P Seed Oil (%)</b>	<b>Volunteer s</b>	<b>Skin Hydration [g/min]</b>			<b>TEWL (g/ hm<sup>2</sup>)</b>			<b>Sebum</b>
		<b>0-15 Min</b>	<b>15-30 Min</b>	<b>30-60 Min</b>	<b>0-15 Min</b>	<b>15-30 Min</b>	<b>30-60 Min</b>	<b>0-60 Min</b>
<b>1.50</b>	<b>1</b>	-13.8	12.0	0.9	-1.9	4.6	-2.8	199.0
	<b>2</b>	1.1	-4.6	3.4	28.2	-27.8	-3.3	146.0



<b>3</b>	-2.9	-8.6	5.8	1.1	-4.1	6.8	76.0
<b>4</b>	-31.1	-4.0	13.3	-4.2	-28.6	-11.4	160.0
<b>5</b>	-7.4	-4.9	10.8	2.5	-3.6	3.4	148.0
<b>6</b>	-20.3	-1.7	7.5	-1.3	-3.0	-1.4	196.0
<b>7</b>	-6.7	1.3	0.3	-4.8	1.5	-0.3	192.0
<b>8</b>	-8.5	-6.2	3.6	-3.6	-9.7	-4.9	78.0
<b>9</b>	-12.5	-3.7	2.1	2.5	-12.4	-9.7	98.0
<b>10</b>	-11.6	-1.8	4.8	-1.8	-6.3	-3.1	112.0
<b>11</b>	-21.7	-3.9	6.6	-6.7	-16.9	-11.1	143.0
<b>12</b>	-8.9	-2.4	11.4	-2.1	-2.2	0.4	211.0
<b>13</b>	-1.5	3.7	2.2	-3.4	-4.1	0.8	98.0
<b>14</b>	-9.6	-1.1	15.0	1.9	-3.6	3.6	102.0
<b>15</b>	-3.6	-4.6	1.1	5.3	-9.4	-1.7	167.0
<b>16</b>	-6.4	-1.7	2.2	2.8	2.1	7.9	175.0
<b>17</b>	-10.9	-4.4	6.8	7.7	-3.8	9.2	198.0
<b>18</b>	-11.1	-2.3	1.5	8.1	-5.7	-2.6	174.0
<b>19</b>	-13.7	1.8	8.9	5.5	-14.9	-2.8	226.0
<b>20</b>	-21.7	-5.2	7.2	14.9	-1.5	0.1	201.0
<b>Average</b>	<b>-11.1</b>	<b>-2.1</b>	<b>5.8</b>	<b>2.5</b>	<b>-7.5</b>	<b>-1.1</b>	<b>155.0</b>

## Discussion

As can be seen from the results of the analysis in Table 2., palmitic acid in hemp seed oil is 8.8%. When the values compared to the literature values in Table 1., hemp seed oil which was used in this study is greater than literature value. The same applies to stearic acid, oleic acid, linoleic acid. However linolenic acid is less in hemp seed oil which was used in this experiment. Contrary to literature, arachidic and eicosenoic acid were not found in the hemp seed oil which was used.

FT-IR analysis results are shown in Figure 2. The peak in the range of 2500-3300 refers to carboxylic acids [12]. As can be seen from the results of the analysis, between 2500 and 3300 peaks were found. Likewise, FT-IR results prove the presence of fatty acids. Also, no heavy metals were found in the tap water used for rinsing.

By using hemp seed oil at different rates of 0.00, 0.50, 1.00 and 1.50 %, the effect on the subjects was examined and the change in skin hydration was compared in Table 4, 5, 6 and 7. It was clearly demonstrated that soap containing hemp seed oil significantly reduced skin

hydration in the first 15 minutes, increased skin hydration in the next 15 minutes, and continued to increase skin hydration except soap containing 1.00% hemp seed oil between 30-60 minutes. Therefore, soap containing 1.00% hemp seed oil had a quick effect, but it lost its effect quickly. It has been observed that hemp seed oil increases skin hydration.

The effect of hemp seed oil in terms of transepidermal water loss is given in Table 4,5,6 and 7. Looking at the average data of the volunteers, there was an increase in transepidermal water loss in the first 15 minutes, except for soap containing 0.50% hemp seed oil. While increasing hemp seed oil in the same minute interval caused an increase in transepidermal water loss, the same result was not valid for the other minute intervals. Soap with 1.50% hemp seed oil was most effective at intervals of 15-30 minutes. The skin tended to return to its normal state at 30-60 minute intervals.

The reduction of sebum is generally considered a good factor for skin health. The sebum must be in balance. As can be seen in Table 4,5,6 and 7; the rate of sebum decreased significantly in the first 60 minutes with the increase in the ratio of hemp seed oil. The recorded value of -31.8 at 0.50% was recorded as -36.7 at 1.00%, and finally the least sebum was provided with a value of -46.2 at 1.50%. The effect of hemp seed oil on soap foam has been studied. Table 8. shows the results of the study conducted with a base that does not contain hemp seed oil. The volume of soap foam in 1 mL was read as 2.28 at 0 minutes. Afterwards, it gradually decreased to 1.12 in the 30th minute.

When the effect of hemp seed oil used in cream in different proportions on the subjects was examined. Skin hydration decreased for the first 15 minutes, but then increased depending on time. After 15 minutes skin moisture increased significantly compared to the first 15 minutes. It can be said that the dosage of hemp seed oil used on a general basis is proportional to the skin hydration according to Table 9, 10, 11 and 12.

Hemp oil 0.50% and 1.50% increased transepidermal water loss, but the cream containing 1.00% hemp seed oil reduced it negligibly. The cream worked between 15-30 minutes and reduced transepidermal water loss. After 30 minutes, the skin tended to return to normal, but it had a positive effect on the skin by reducing transepidermal water loss at three dosages of the initial level. 0.50% hemp seed oil increased the TEWL at 0-15 min. The decrease of TEWL was seen at 15-30 and 30-60 min. However the most effective skin barrier function

was seen at 15-30 minutes measurement. Therefore, depending on the hemp oil concentration and formulation, the duration of hemp seed oil efficacy may change.

When the proportion of sebum with hemp seed oil is examined, it increases with increasing hemp seed oil concentration. Depending on the cream formulation, these sebum values may change. For instance, for lower sebum values, cream formulations with lower oil phase can be prepared.

## Conclusions

Hemp seed oil has effect on skin hydration, TEWL and sebum. To analyse these, a rinse-off and leave-on product were selected. In soap formulations, there is positive effect on skin hydration and TEWL with sebum decrease. The most important change in cream formulations with respect to bar soap formulations is the increases in sebum.

The effects of hemp seed oil on soap foam performance were examined. As a result of the study, its effect on the foam of the soap base which is used in this study is positive.

## Acknowledgments

The authors thank Evyap Sabun Yağ Gliserin San. ve Tic. A.Ş. for the financial support.

## References

1. Oomah, B.D., M. Busson, D.V. Godfrey and J.C.G. Drover, Characteristics of hemp (*Cannabis sativa* L.) seed oil. *Food Chemistry*, 2002. 1 (76): p. 33-43.
2. Grijó, D.R., G.K. Piva, IV. Osorio and L. Cardozo-Filho, Hemp (*Cannabis sativa* L.) seed oil extraction with pressurized n-propane and supercritical carbon dioxide. *J Supercrit Fluids*, 2019. 74: p. 143-268.
3. Hilton, L., Hemp for skin health, *Dermatologytimes*, Available from: <https://www.dermatologytimes.com/view/hemp-skin-health>, 2019.
4. Mungure, T., and E. Birch, Analysis of intact triacylglycerols in cold pressed canola, flax and hemp seed oils by HPLC and ESI-MS. *SOP Trans Anal Chem*, 2014. 1 (1): p. 48-61.
5. Leyva-Gutierrez, F.M.A., J.P. Munafo and T. Wang, Characterization of By-Products from Commercial Cannabidiol Production. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*, 2020. 68(29): p. 7648-7659.
6. Mikulcová, V., V. Kašpárková, P. Humpolíček and L. Buňková, Formulation, characterization and properties of hemp seed oil and its emulsions. *Molecules*, 2017. 22(5): p. 1-13.
7. Baswan, S.M., A.E. Klosner, K. Glynn, A. Rajgopal, K. Malik, S. Yim and N. Stern, Therapeutic Potential of Cannabidiol (CBD) for Skin Health and Disorders. *Clin Cosmet Investig Dermatol*, 2020. 13: p. 927-942.
8. Karabulut, A.A., Yenidoğanda deri fizyolojisi ve topikal ilaç kullanımı. *Turkderm Deri Hast ve Frengi Ars.*, 2011. 45(2): p. 60-7.
9. Danby, S. G., A. Wigley, N. Tierney, K. Martin, G. Stamatias and M. J. Cork, Soap-induced damage to the stratum corneum arises as a result of elevated proteolytic degradation of corneodesmosomes. The Academic Unit of Dermatology Research, Department of Infection and Immunity, The University of Sheffield Medical School, Johnson & Johnson Consumer Companies Inc.

10. Spada, F., T. M Barnes, K. A. Greive, Skin hydration is significantly increased by a cream formulated to mimic the skin's own natural moisturizing systems. *Clin Cosmet Investig Dermatol*, 2018. 11: p. 491–497.
11. Yokoi, A., K. Endo, T. Ozaw, M. Miyaki, K. Matsuo, K. Nozawa, M. Manabe and Y. Takagi, A cleanser based on sodium laureth carboxylate and alkyl carboxylates washes facial sebum well but does not induce dry skin. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 2014.13(4): p. 245-252.
12. Deepashree, C., J. Lingegowda, A.G.D.P. Komal Kumar and S.G. Mahsa Zarei, FTIR Spectroscopic Studies on Cleome Gynandra – Comparative. *Rom J Biophys*, 2013.22: p. 137–43.

Ahmadi, A.Y. and M.J. Arain, The Response of Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) to Different Levels of Organic and Inorganic Fertilizers. International Journal of Life Sciences and Biotechnology, 2021. 4(3): p. 439-450. DOI: 10.38001/ijlsb.981373

## The Response of Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) to Different Levels of Organic and Inorganic Fertilizers

Ahmad Yar Ahmadi<sup>1\*</sup> , Mohammad Jan Arain<sup>2</sup> 

### ABSTRACT

The high cost and excess use of inorganic fertilizers are the important concerns for high and beneficial yield of common bean and at the same time the integrated crop management practices are the universal demands for agriculture and environment. Therefore, the research was carried out from June to September of 2018 in the botanical garden of Agriculture Faculty, Kabul University, Afghanistan to evaluate the influence of sole and combine application of diammonium phosphate (DAP) and Poultry Manure (PM) with different concentrations on the growth, yield and yield components of common bean. According to the results achieved, it was found that combination of 80 kg DAP ha<sup>-1</sup> + 5 ton PM ha<sup>-1</sup> improved the performance of common bean, with respect to 2272.33 kg grain yield (GY) ha<sup>-1</sup> over the alone used of DAP and PM (10 ton PM ha<sup>-1</sup>, 130 kg DAP ha<sup>-1</sup>, respectively) and control. In addition, the application of 5 ton PM + 80 kg DAP ha<sup>-1</sup> showed positive effects on growth and yield attributes while no significant effects were observed on control (without any fertilizer application) for any trait of common bean. There were also strong positive correlations within the growth and yield components which indicate the importance for common bean GY. The present research showed that integrated application of DAP + PM is a good source of Phosphorus and other primary elements for the growth and yield performance of common beans.

### ARTICLE HISTORY

Received  
11 August 2021  
Accepted  
4 October 2021

### KEYWORDS

Common bean,  
DAP fertilizer,  
poultry manure,  
yield

## Introduction

The genus *Phaseolus* has about 80 cultivated species, but common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is the most cultivated once worldwide [1]. There are other synonyms for common beans like dry bean, French bean and green bean [2, 3, 4]. *Phaseolus vulgaris* is an annual self – pollinated crop that belongs to the family of *Fabaceae* [5, 6] and domesticated in Mesoamerica and Andes about 7000 years ago [5]. In developing countries common bean is very important in the nutrition of an increasing population where they deliver a fairly cheaper source of protein in the diet [7], fodder for animals [8] and source of elements for plant nutrition are the other benefits of common beans [9, 10]. It is broadly cultivated all over the world with a total global production of about 25 million metric ton with a productivity of 792 kg ha<sup>-1</sup> [11]. The top five countries that export more

<sup>1</sup> Shaikh Zayed University, Faculty of Agriculture, Department of Agronomy, Khost, Afghanistan

<sup>2</sup> Wardak University, Faculty of Agriculture, Department of Agronomy, Wardak, Afghanistan

\*Corresponding Author: Ahmad Yar Ahmadi, e-mail: [ahmadyar1367@gmail.com](mailto:ahmadyar1367@gmail.com)

dry bean are Myanmar, China, United States of America, Argentina and Canada, respectively. Afghanistan is also the country which produced about 20.25 thousands metric tons dry bean annually [12]. By 2050, an increase in cereal food supply is required to feed the predicted world population of 9.8 billion people [13]. Common bean like other crops, its yield affected by many external and internal factors (soil fertility degradation, less input of fertilizers, soil properties, irrigation, weed and pest control, genetic improvements etc.), that decrease its yield [14, 15]. For soil fertility and nutritional management there is need for new strategies in fertilizer formulation and application techniques [16]. To raise and improve the yields of common bean, there are different adopted management practices. The use of an integrated organic and inorganic fertilizers is practice that often lead to increase organic matter (OM) in soil, improved soil structure, increase water holding capacity, improved nutrient cycling and helps to biological activities of living beings in soil [17]. For better crop productivity, it is important to input inorganic fertilizers, but for a long period the use of an inorganic fertilizer is associated with decline in some soil properties and crop yields [18]. Worldwide, the requirement to use recharge forms of energy and reduce expense of fertilizing crops has revitalized the use of organic amendment [19].

Organic amendments can be used for improving and availability of soil Phosphorus (P) to crop growth [20] among them, Poultry Manure (PM) is the concentrated basis of P and other elements for improving crop growth [21]. Microorganisms in soil act and decompose organic molecules and release inorganic P by phosphate energy, thus improving the phosphorus availability for crops growth in soil [22].

Phosphorus is the primary essential element for plant growth that makes up approximately 0.2% dry weight of plant [23]. Phosphorus (P) is vital to plant growth and is found in every living plant cell. It is involved in several key plant functions, including energy transfer, photosynthesis, transformation of sugars and starches [24]. Phosphorus as a plant-essential nutrient plays a dynamic role from germination to maturity viz., root development, flower and seed formation, strengthening of stem and stalk, fixation of nitrogen in legume crop and crop resistance to diseases [25, 26]. Phosphorus deficiency is a major abiotic stress that limits plant growth and crop productivity [27] and it also results in establishment of small leaves and a reduction in stem diameter of crops [28]. Phosphorus levels are high in most soils. [29] but the chemical nature and nutritive status

of soil reaction may be limited the availability of P to crop plants[30, 31]. Farmers use large amount of P fertilizer but it become unavailable to the crops due to the fixation with soil mineral [32] and there is need for P management to get optimum yield and reduce the P fixation with soil particles. Therefore, an integrated use of both inorganic fertilizers with organic manures is an ecological approach for nutrient use efficiency and reducing nutrient losses [33].

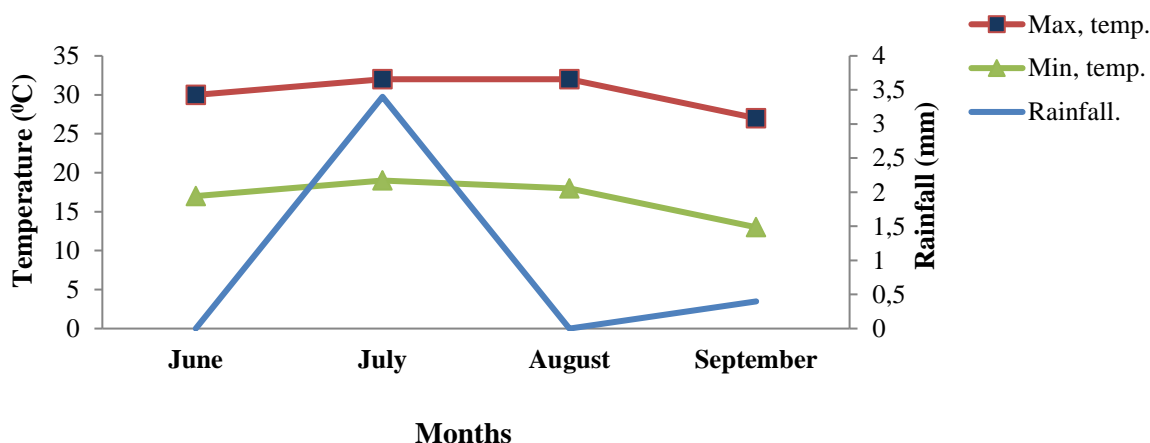
Based on the results of investigations, it was found that the combine application of organic and inorganic fertilizer significantly increased the crops yield compare to isolat application of them[17, 34, 35, 36], but Santosa et al. [37] founded in his research that the use of 50: 150: 50 kg ha<sup>-1</sup> dose of NPK, produced the high value of plant height (PH), pods per plant (PP) and growth attributes on grean bean against to the application of cow manure and control.

The sufficient use of PM can enhance the growth of legumes compared to inorganic fertilizers[38, 39, 40]. The foliar spray of NPK can increase the grain yield of *Phaseolus vulgaris* compared to PM and DAP [6]. Thus, the current research was projected to study the influence of DAP and PM ( alone and in combination) application on the growth and yield of common bean and to find the correlations among the growth and yield attributes to common bean grain yield (GY).

## **Material and Methods**

### **Study area**

This research was conducted on an experimental field at the botanical garden, Agriculture Faculty, Kabul University (altitude of 1791 m above sea level, latitude 34° 54' 44" N and longitude 70° 10' 09" E) from June to September, 2018. The soil (0–25 cm) texture is sandy loam, pH of 8.4, with a soil organic matter (SOM) of 0.90%. In addition, the total nitrogen content, available phosphorus and potassium contents of the soil are 2.2%, 6.9 mg kg<sup>-1</sup> and 190 mg kg<sup>-1</sup>, respectively. Temperature and rainfall for the growing season are presented in Fig 1.



**Fig 1** Rainfall and temperature during the study year, 2018

### Experimental design, treatments and plant material

The treatments contained different levels of diammonium phosphate (DAP) and poultry manure (PM), alone and combined including the control for comparison (Table 1). Randomized Complete Block Design (RCBD) with three replications was used for the experiment. Local variety of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by the name of Capsuly was cultivated.

**Table 1** Treatments list used in this study

Treatments	Description
T0	Control( without any fertilizer use)
T1	DAP 130 kg ha <sup>-1</sup>
T2	PM 5 ton ha <sup>-1</sup>
T3	PM 10 ton ha <sup>-1</sup>
T4	DAP 30 kg ha <sup>-1</sup> + PM 10 ton ha <sup>-1</sup>
T5	DAP 80 kg ha <sup>-1</sup> + PM 5 ton ha <sup>-1</sup>

### Sowing and data collection

The land for trail was ploughing a depth 20- 25 cm along the decay poultry manure (PM ) before planting to mix with soil for fast decomposition. Individual plot size was 2 x 3m (6m<sup>2</sup>) and space between blocks and plot was 1 M. The common bean crop was grown by hand on both ridges of the furrow, space between the ridge was 40 cm and apart from the crop was 20 cm. Some agriculture practices (weeding and irrigation) were done by the need of common bean during the growing season. The data were collected for plant



height (PH), number of leaves per plant (NLP), number of branches per plant(NBP), number of pods per plant( NPP), Hundred seed weight (HSW) and grain yield( GY) parameters.

### **Statistical Analysis**

Collected data were subjected to analysis of variance (ANOVA), using Statistical Tool for Agriculture Research (STAR) software (version 2.0.1). To separate significant differences in the means of the treatments, Tukey's Honest Significant Difference (HSD) test was used at  $p < 0.05$  % probability level.

## **Results and Discussion**

### **Growth of common bean**

The growth responses of common bean (Capsuly bean) that were applied by inorganic and organic fertilizers were significant for Plant height (PH), number of leaves plant<sup>-1</sup> (NLP)and number of branches plant<sup>-1</sup> (NBP), Table 2.

The data in Table 2 show that there are significant difference ( $p < 0.01$ ) among the treatments. The high mean value of PH was produced in T5 treatment (39.13a) while the T0 (control) produced the minimum value (28.91d), but the effects on non-combined applications were insignificant {Table 3 and fig. 2 (a)}. The greater PH might be attributed to the gradual release of essential nutrients needed by beans from PM fertilizer and the availability of P and N elements from DAP manure during the growing time. Our finding is confirmed by Baghdadi et al. [41] who reported that 50% of NPK + 50% PM ha<sup>-1</sup> resulted the same PH which was produced by 100% NPK used and also confirm by Saleem et al. [35] and Mitchell et al. [42] , who stated that, 50%PM + 50% inorganic fertilizer resulted in the tallest corn plants in corn-legume cropping system against to control. Similarly the combine application of PM and DAP in T5, responded well to NLP and NBP (55.89a and 18.42a respectively) followed by alone and unamended (control) treatments by producing the lowest means {Table 3 and Fig 2 (b) and (c)}. It is harmony with Saha et al. [17] who founded that the integrated use of PM and NPK produced better growth in maize crop compared to alone and combined used of NPK and other FYM and also agreement by Lima et al. [43] who reported that due to the application of organic amended the yield of crop is increased and soil properties are improved.

**Table 2** Analysis of Variance (ANOVA) for the bean observed parameters: Plant height (PH), number of leaves plant<sup>-1</sup> (NLP), number of branch plant<sup>-1</sup> (NBP), number of pod plant<sup>-1</sup>, number of seed plant<sup>-1</sup>, 100 seed weight (HSW) and grain yield (GY)

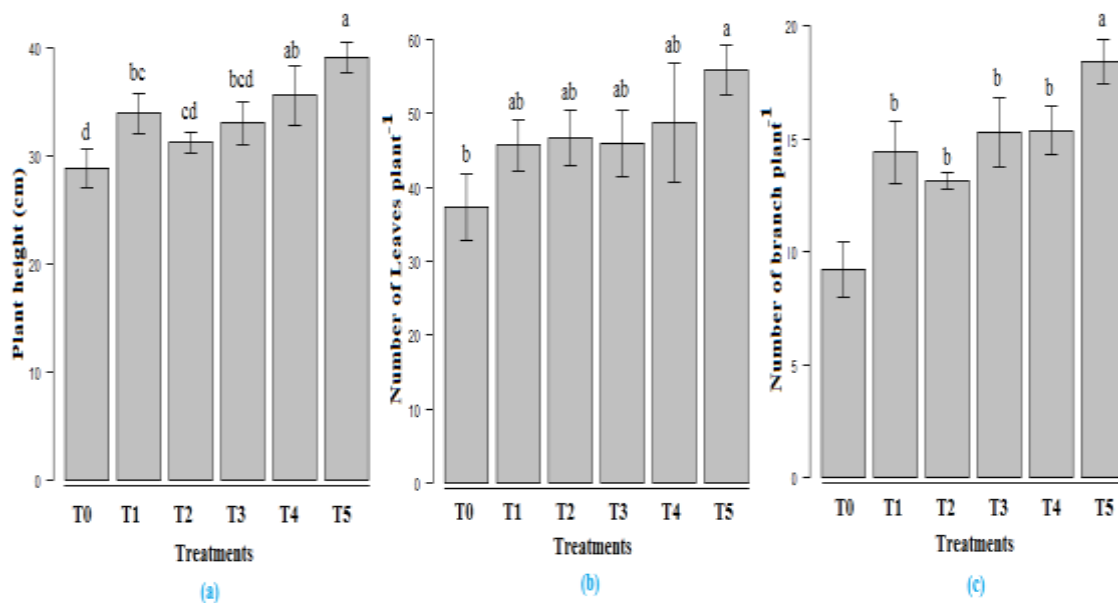
Source of Variance	df	Mean Square						
		PH	NLP	NBP	NPP	NSP	HSW	GY
<b>Replication</b>	2	4.80	1.80	2.25	0.85	0.16	3.50	27376.22
<b>Treatments</b>	5	37.71**	107.84*	27.68**	12.25**	1.24*	73.83**	254209.82**
<b>Error</b>	10	2.29	21.90	0.80	1.34	0.23	10.63	70852.62
<b>CV%</b>		4.50	10.02	6.27	6.79	11.52	6.13	13.90

\*\*Significant difference at 1%, \*significant difference at 5%, CV: coefficient of variation, df: degrees of freedom

**Table 3** Response of growth, yield and yield components of common bean to DAP and PM

Treatments	PH(cm)	NLP	NBP	NPP	NSP	HSW(g)	GY(kg)
<b>T0</b>	28.91d	37.25b	9.23c	14.41c	3.13b	46.67c	1600.00bc
<b>T1</b>	33.97bc	45.72ab	14.41b	17.79ab	4.11ab	52.67abc	1779.00ab
<b>T2</b>	31.30cd	46.64ab	13.16b	15.71bc	4.03ab	48.67bc	1635.33b
<b>T3</b>	33.08bcd	45.95ab	15.27b	16.38bc	4.16ab	54.33abc	2062.33ab
<b>T4</b>	35.66ab	48.80ab	15.38b	18.17b	4.43ab	56.67ab	2136.67a
<b>T5</b>	39.13a	55.89a	18.42a	20.12a	5.12a	60.00a	2272.33a
<b>LSD</b>	4.29**	13.27*	2.54**	3.29**	1.36*	9.24**	484.25**

\*\*Significant difference at 1%, \*significant difference at 5%, LSD: least Significant Difference , PH: Plant height, NLP: Number of leaves plant<sup>-1</sup>, NBP: Number of branches plant<sup>-1</sup>, NPP: Number of pods plant<sup>-1</sup>, NSP: Number of seed pod<sup>-1</sup>, HSW: Hundred seeds weight and GY: Grain yield

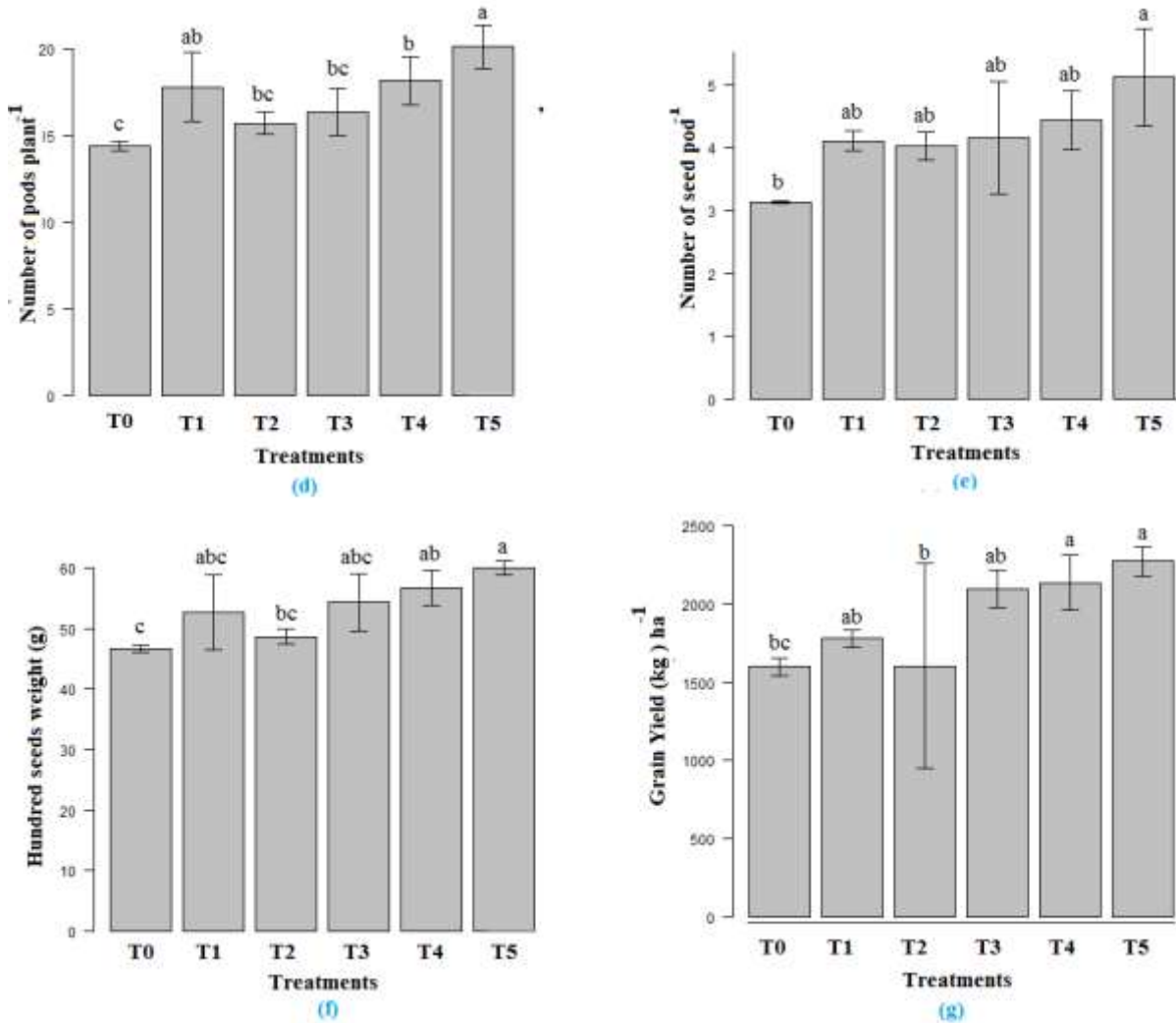


**Fig 2** Effects of organic and inorganic fertilizers on (a) plant height, ( b) number of leaves plant<sup>-1</sup> and ( c) number of branches plant<sup>-1</sup>. Upright bars sharing a letter in common are not significantly different at  $p < 0.05$ . Treatments description are same as in table 3

### Yield and yield components of common bean

The yield components of common bean which play major roles in yield production are NPP, NSP and HSW. In the present research, these attributes were significantly high (20.12a, 5.12a and 60.00a, respectively) on T5 while the lowest were noted (14.41c, 3.13b and 46.67c, respectively) on T0 (control), {Table 2 and Fig 3. (d), (e), (f)}. The data on GY of common bean are also indicated highly significant differences in results by combining application of PM and DAP from all other isolated applications. The treatments consisted of sole application showed non-significant variation as compared to combined while both of them showed significance from control (Table 2). The Maximum GY was recorded on T5 and T4 (2272.33a and 2136.67a), respectively. While minimum GY was documented in control (1600.00bc) as shown in Fig 3 (g). The findings of this study confirm with the results of Zafar et al. [34], Maman et al. [36] and Baghdadi et al. [38] who reported that the integrated application of organic and inorganic fertilizer produced better yield and yield components compare to individual use. Mohamed et al. [44] and Timsina [45] also observed that increase in the yield components might be associated with the release of essential micro and macro soil nutrients by the PM. Similar reports were also made by Dorahy et al. [23] who reported significant increases in the maize yield biomass and other yield components with the application of

PM + NPK but Rahman et al. [6] reported that the foliar application of NPK result better in yield compare to DAP and PM.

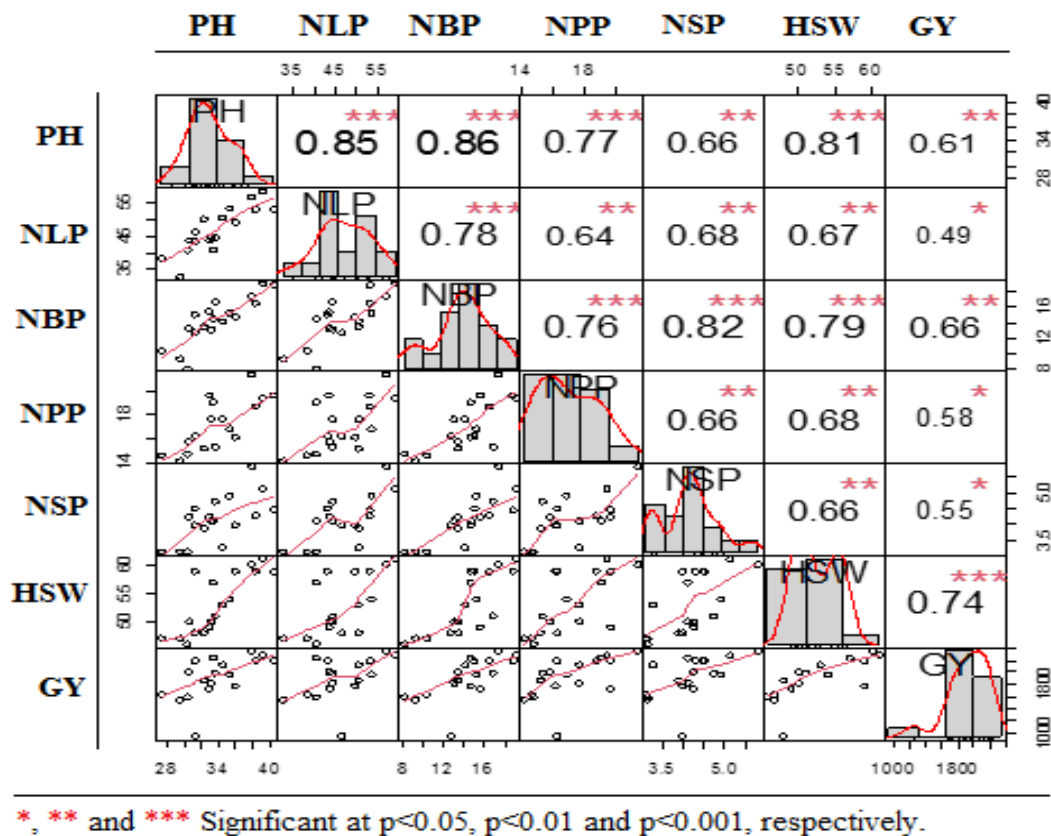


**Fig 3** Effects of organic and inorganic fertilizers on (d) number of pods plant<sup>-1</sup>, (e) number of seed pod<sup>-1</sup>, (f) hundred seeds weight) and (g) grain yield of common bean. Upright bars sharing a letter in common are not significantly different at  $p < 0.05$ . Treatments description are same as in table 3

### Correlation among the growth and yield components

The correlation between growth, yield and yield components of common bean in this research is given in Fig 5. It is seen from the figure that there are positive correlations within all growth, yield and yield components. There are strong positive correlation among the PH and NLP ( $r = 0.85^{***}$ ), PH and NBP ( $r = 0.86^{***}$ ), PH and NPP ( $r = 0.77^{***}$ ), PH and HSW ( $r = 0.81^{***}$ ), NLP and NBP ( $r = 0.78^{***}$ ), NBP and NPP ( $r = 0.76^{***}$ ), NBP and NSP ( $r = 0.82^{***}$ ), NBP and HSW ( $r = 0.79^{***}$ ) and HSW and GY ( $r = 0.74^{***}$ ). Our result is harmony with Zafar et al. [34], who founded positive correlation among the yeild and

yield components within the treatments which were applied by DAP + poultry manure compared to sole applications.



**Fig 5** Correlations and distribution of the growth (PH: Plant height, NLP: number of leaves, NBP: number of branch plant<sup>-1</sup>), yield components (NPP: Number of pods plant<sup>-1</sup>, NSP: Number of seed pod<sup>-1</sup>, HSW: Hundred seeds weight) and GY: Grain yield of common bean

## Conclusion

From the findings of the current research it can be concluded that integrated application of PM and DAP showed outstanding effects on the growth, yield and yield components of common bean. The combined application of DAP + PM produced better GY (2272.33a and 2136.67a) on T5 and T4, respectively while the use of DAP and PM alone effects were low on growth, yield and yield attributes. Therefore, PM can be applied with DAP together to increase the bean productivity. Additional investigation should be conducted on DAP + Poultry manure application to study the duration of its effects on environment and economic benefits for soils fertility and crops.

## Acknowledgements

We thank Engineer Banat, research farm manager and his staff of Agriculture Faculty, Kabul University, for supporting this research in the field.

### Availability of data and material

Please contact the corresponding author for any data request.

### References

1. Porch, T. G., et al., Use of wild relatives and closely related species to adapt common bean to climate change. *Agronomy*, 2013. 3(2): p. 433-461. <http://dx.doi.org/10.3390/agronomy3020433>.
2. Petry, N., et al., The potential of the common bean (*Phaseolus vulgaris*) as a vehicle for iron bio fortification. *Nutrients*, 2015. 7 (2): p. 1144-1173. <http://doi.org/10.3390/nu7021144>.
3. Câmara, C. R.S., C. A. Urrea, and V. Schlegel, Pinto beans (*Phaseolus vulgaris* L.) as a functional food: implications on human health. *Agriculture*, 2013. 3 (1): p. 90-111. <http://doi.org/10.3390/agriculture3010090>.
4. Swegarden, H. R., C. C. Sheaffer, and T. E. Michaels, Yield stability of heirloom dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivars in Midwest organic production." *Hort Science*, 2016. 51(1): p. 8-14. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.51.1.8>.
5. Hordofa, G.D., Effect of Lime and Compost Application on the Growth and Yield of Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *International Journal of Nutrition Science & Food Technology*, 2018. (4): p. 7-54. DOI:10.33552/aomb.2018.01.000512.
6. Rahman, I. Ur., et al., Growth and yield of *Phaseolus vulgaris* as influenced by different nutrients treatment in Mansehra. 2014. <https://www.researchgate.net/publication/272789365>.
7. Tagoe, S. O., T. Horiuchi, and T. Matsui, Effects of carbonized chicken manure on the growth, nodulation, yield, nitrogen and phosphorus contents of four grain legumes. *Journal of Plant Nutrition*, 2010. 33(5): p. 684-700. DOI: 10.1080/01904160903575915.
8. Sarhadi, W. A., et al., Assessment of Adaptation and Cultivation Methods of Three Local Varieties of Bean in Kabul Climatic Conditions. *International Journal of Science and Research*, 2015. DOI: 10.21275/ART20171554.
9. Bello, S. K., A. A. Yusuf, and M. Cargele, Performance of cowpea as influenced by native strain of rhizobia, lime and phosphorus in Samaru, Nigeria. *Symbiosis*, 2018. 75 (3): p.167-176. DOI: 10.1007/s13199-017-0528-x.
10. Tatanah, L., et al., Short-term benefits of grain legume fallow systems on soil fertility and farmers 'livelihood in the humid forest zone of Cameroon). *International Journal*, 2019. 6 (4): p. 213-223. doi: 10.18488/journal.70.2019.64.213.223.
11. FASOSTAT (Food and Agricultural Organization of the United Nations). 2013. <http://faostat2.org/home/index/html>. Accessed on May 18, 2013.
12. FASOSTAT (Food and Agricultural Organization of the United Nations) 2019. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/TCL/visualize>.
13. Ngosong, C., et al., Effect of poultry manure and inorganic fertilizer on earthworms and soil fertility: implication on root nodulation and yield of climbing bean (*Phaseolus vulgaris*)." *Fundamental and Applied Agriculture*, 2020. 5(1): p. 88-98. Doi: 10.5455/faa.76612.
14. Mahmood, F., et al., Effects of organic and inorganic manures on maize and their residual impact on soil physic-chemical properties. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 2017. 17(1): p. 22-32.
15. Rurangwa, E., V. Bernard and KE. Giller, The response of climbing bean to fertilizer and organic manure in the Northern Province of Rwanda. *Experimental Agriculture*, 2020. (56): p. 722- 737. doi:10.1017/S0014479720000277
16. Aslani, M., and M. K. Sour, Growth and quality of green bean (*Phaseolus vulgaris* L.) under foliar application of organic – chelate fertilizers, *Open Agriculture*, 2018. (3): p. 146 – 154. <https://doi.org/10.1515/opag-2018-0015>
17. Saha, S., et al., Organic amendments affect biochemical properties of a sub temperate soil of the Indian Himalayas. *Nutrient cycling in Agro Ecosystems*, 2008. 80 (3): p. 233-242.

18. Hepperly, P., et al., Compost, manure and synthetic fertilizer influences crop yields, soil properties, nitrate leaching and crop nutrient content. *Compost Science & Utilization*, 2009. 17 (2); p. 117-126. <https://doi.org/10.1080/1065657X.2009.10702410>.
19. Ramesh, P., et al., Impact of organic-manure combinations on the productivity and soil quality in different cropping systems in central India. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 2009. 172 (4): p. 77-585. <https://doi.org/10.1002/jpln.200700281>
20. Wolkowski, R. P., Nitrogen management considerations for land spreading municipal solid waste compost. *Journal of environmental quality*, 2003. 32 (5): p. 844-1850. <https://doi.org/10.2134/jeq2003.1844>.
21. Boateng, S.A., J. Zickermann, and M. Kornahrens, Poultry manure effect on growth and yield of maize. *West African Journal of Applied Ecology*, 2006. 9 (1). DOI: 10.4314/wajae.v9i1.45682.
22. Browne, P., et al., Superior inorganic phosphate solubilization is linked to phylogeny within the *Pseudomonas fluorescens* complex. *Applied soil ecology*, 2009. 43 (1): p.131-138. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2009.06.010>.
23. Dorahy, C. G., I. J. Rochester, and G. J. Blair, Response of field-grown cotton (*Gossypium hirsutum* L.) to phosphorus fertilization on alkaline soils in eastern Australia. *Soil Research*, 2004. 42 (8): p. 913-920.
24. Achal, V., V. V. Savant, and M. Sudhakara Reddy, Phosphate solubilization by a wild type strain and UV-induced mutants of *Aspergillus tubingensis*. *Soil Biology and Biochemistry*, 2007. 39 (2): p. 695-699. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2006.09.003>.
25. Gyaneshwar, P., et al., Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. *Plant and Soil*, 2002. 245 (1): p. 83. DOI: 10.1023/A: 1020663916259.
26. Hao, X., et al., Chemical retardation of phosphate diffusion in an acid soil as affected by liming. *Nutrient Cycling in Agro Ecosystems*, 2002. 64 (3): p. 213-224.
27. Raghothama, K. G., and A. S. Karthikeyan, Phosphate acquisition, *Plant and Soil*, 2005. 274 (1): p. 37-49.
28. Ranjan, A., M. R. Mahalakshmi, and M. Sridevi, Isolation and characterization of phosphate-solubilizing bacterial species from different crop fields of Salem, Tamil Nadu, India. *International Journal of Nutrition, Pharmacology, Neurological Diseases*, 2013. 3 (1): p. 29. <https://www.ijnpnd.com/text.asp?2013/3/1/29/106982>.
29. El-Yazeid, A. A., and H. E. Abou-Aly, Enhancing growth, productivity and quality of tomato plants using phosphate solubilizing microorganisms. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 2011. 5 (7): p. 371-379. <http://www.insipub.com/.../371-379.pdf>.
30. Iqbal, H., et al., Impact of phosphate solubilizing bacteria on growth and yield of maize. *Soil & Environment*, 2013. 32 (1).
31. Hourz, A., et al., Effects of phoshogypsum waste application on corn (*Zea mays* L.) yield and nutrient conditions. *Fresenius Environmental Bulletin*, 2019. 28(11): p. 8814-8822. <https://www.researchgate.net/publication/336881393>
32. Mittal, V., et al., Stimulatory effect of phosphate-solubilizing fungal strains (*Aspergillus awamori* and *Penicillium citrinum*) on the yield of chickpea (*Cicer arietinum* L. cv. GPF2). *Soil Biology and Biochemistry*, 2008. 40 (3): p. 718-727. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.10.008>.
33. Schoebitz, M and G. Vidal, Microbial consortium and pig slurry to improve chemical properties of degraded soil and nutrient plant uptake (Schoebitz and Vidal, 2016). *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 2016. 16 (1): p. 226-236.
34. Zafar, M., et al., Influence of integrated phosphorus supply and plant growth promoting rhizobacteria on growth, nodulation, yield and nutrient uptake in *Phaseolus vulgaris*. *African Journal of Biotechnology*, 2011. 10 (74): p. 16781-16792. DOI: 10.5897/AJB11.1395.
35. Saleem, R., Economic feasibility of integrated nutrient management for sustainable rainfed maize-legume based intercropping systems. PhD diss., Pir Mehr Ali Shah Arid Agriculture University Rawalpindi, Pakistan, 2010. <http://173.208.131.244:9060/xmlui/handle/123456789/2406>.

36. Maman, N., and Stephen Mason, Poultry manure and inorganic fertilizer to improve pearl millet yield in Niger. *African Journal of Plant Science*, 2013. 7 (5): p. 162-169. DOI: [10.5897/AJPS12.010](https://doi.org/10.5897/AJPS12.010).
37. Santosa, M., M. D. Maghfoer, and H. Tarno, The influence of organic and inorganic fertilizers on the growth and yield of green bean, *Phaseolus vulgaris* L. grown in dry and rainy season. *AGRIVITA, Journal of Agricultural Science*, 2017. 39(3): p. 296-302. <http://doi.org/10.17503/agrivita.v39i3.646>.
38. Sitinjak, L., and E. Purba, Response to growth and production of green beans (*Vigna radiata* L.) in various cropping spots and fertilizer provision of layer chickens. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 2018. 122 (1): p. 012053. doi :[10.1088/1755-1315/122/1/012053](https://doi.org/10.1088/1755-1315/122/1/012053)
39. Ngosong, C., et al., Effect of poultry manure and inorganic fertilizer on earthworms and soil fertility: implication on root nodulation and yield of climbing bean (*Phaseolus vulgaris*). *Fundamental and Applied Agriculture*, 2020. 5 (1): p. 88-98. doi: [10.5455/faa.76612](https://doi.org/10.5455/faa.76612).
40. Mainul, M.I., et al., Influence of levels of poultry manure on yield and NPK content in seed of Mungbean. *International Journal of Experimental Agriculture*, 2014, 4 (3): p. 12 -15. <https://www.researchgate.net/publication/268074641>
41. Baghdadi, A., et al., Impact of organic and inorganic fertilizers on the yield and quality of silage corn intercropped with soybean. *Peer J*, 2018. 6: e5280. DOI: [10.7717/peerj.5280](https://doi.org/10.7717/peerj.5280)
42. Mitchell, C. C., and S. Tu, Long-term evaluation of poultry litter as a source of nitrogen for cotton and corn. *Agronomy Journal*, 2005. 97 (2): p. 399-407. DOI [10.2134/agronj2005.0399](https://doi.org/10.2134/agronj2005.0399)
43. Lima, D. LD., et al., Effects of organic and inorganic amendments on soil organic matter properties. *Geoderma*, 2009. 150 (1-2): p. 38-45. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2009.01.009>
44. Amanullah, M. M., S. Sekar, and P. Muthukrishnan, Prospects and potential of poultry manure. *Asian Journal of Plant Sciences*, 2010. 9 (4): p. 172-182. <https://doi.org/10.3923/ajps.2010.172.182>.
45. Timsina, J., Can organic sources of nutrients increase crop yields to meet global food demand? *Agronomy*, 2018. 8 (10): p. 214. <https://doi.org/10.3390/agronomy8100214>.



Genc, S, et al., Investigation of the Exosome-Based Drug Delivery System Potential in the Treatment of Glioblastoma *in vitro* Experimental Models. International Journal of Life Sciences and Biotechnology, 2021. 4(3): p. 451-467. DOI: 10.38001/ijlsb.990646

## Investigation of the Exosome-Based Drug Delivery System Potential in the Treatment of Glioblastoma *in vitro* Experimental Models

Sidika Genc<sup>1</sup> , Zeynep Cakir<sup>2\*</sup> , Ali Taghizadehghalehjoughi<sup>1,3</sup> , Yesim Yeni<sup>1</sup> , Kiyumars Jalili<sup>4</sup> , Ahmet Hacimuftuoglu<sup>1</sup> 

### ABSTRACT

In our study, it was aimed to create a new drug delivery system by loading the chemotherapeutic drugs into exosome vesicles. This system act as a Trojan horse to targeting GBM cancer. Exosomes were isolated from the T-98G cell line, and characterized. Exosomes were encapsulated with Temozolomide. Then, the effectiveness of this new delivery system was evaluated by using MTT, LDH, TAC, TOS, GR. MTT results show a dose-dependent decrease in the TMZ, and Exolimer+TMZ groups. But this rate decreased significantly in the Exolimer+TMZ groups. The lowest viability was observed at the Exolimer+TMZ 800 ng/ml concentration. Our results in LDH, GR, TAS, and TOS analyzes shows correlation with MTT. Based on this study, we think that targeting the exosome to cancer by combining with special molecules, and nanotechnology will bring a new perspective to cancer treatment.

### ARTICLE HISTORY

**Received**  
3 September 2021  
**Accepted**  
10 October 2021

### KEYWORDS

Exosome,  
glioblastoma,  
TEM,  
temozolomide

### Introduction

Glioblastoma Multiforme (GBM) is the most common primary malignant brain tumor, comprising 16% of all primary brain, and central nervous system neoplasms [1]. The incidence rate is 3.2 individuals per 100,000 population. In these individuals, cancer as location; is seen in all four lobes of the brain, frontal (25%), temporal (20%), parietal (13%), , and occipital (30%), , and sometimes in the brain stem, cerebellum , and spinal cord (12%) [2].

Exosomes are secreted by various cell types, including immune, and tumor cells. These vesicles are produced within multivesicular endosomes , and are released through the plasma membrane [3]. The diameter of exosomes released from cancer cells ranges from 30 to 100 nm. Released exosomes as content; proteins (including oncoproteins) [4], lipids [5], DNA [6] , and RNAs [7, 8], microRNAs [miRNAs (including resistance genes)] , and

<sup>1</sup> Ataturk University, Faculty of Medicine, Department of Medical Pharmacology, 25240 Erzurum, Turkey

<sup>2</sup> Ataturk University, Faculty of Medicine, Department of Emergency Medicine, 25240 Erzurum, Turkey

<sup>3</sup> Ataturk University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Pharmacology and Toxicology, 25240 Erzurum, Turkey

<sup>4</sup> Sahand University of Technology, Faculty of Polymeric Materials, 51335-1996, Tabriz, Iran

\*Corresponding Author: Zeynep Cakir, e-mail: [zeynepgcaakir@gmail.com](mailto:zeynepgcaakir@gmail.com)

other non-coding RNAs It carries a variety of bioactive molecules such as [ncRNAs] [9]. In addition, tumor-derived exosomes promote tumor progression by regulating drug resistance. These drug resistance mechanisms; (1) tumor cells can use exosome secretion to metabolize anticancer drugs; (2) reducing therapeutic effects of anticancer drugs by competing with exosome (3) exosomes transmit resistance from drug-resistant cells to drug-sensitive cells [10].

Nanoscale drug delivery systems, which are used to increase the therapeutic effectiveness of chemical , and biomolecular drugs, are of great importance today [11]. However, these transport systems have some limitations. Besides of small capacity, the cancer exosome shows the cytotoxic effects, and rapidly was removed by the reticuloendothelial system (RES) or the mononuclear phagocyte system (MPS) [12]. In recent studies, it is emphasized that these vesicles can be used as a drug delivery system as a result of modification, and that the drug delivery system developed with this method will be more advantageous than other methods. However, studies on the use of exosomes as a drug delivery system are very few in the literature. These studies, on the other h, and, are mostly in the form of compilations [13, 14].

Based on this information, and this deficiency in the literature, we are planning to create a new drug delivery system by loading chemotherapeutic agents into exosome vesicles used as Trojan horses *in vitro*. However, with the help of the new drug-immuno-active transport system developed, it is thought to eliminate drug resistance, and increase treatment efficacy.

## **Material Method**

### **Chemical and reagent**

Temozolomide, High glucose Dulbecco eagle medium, Fetal Bovine Serum (FBS), Antibiotic, Hanks Balanced Salt Solution (HBSS) were obtained from Sigma, USA.

### **Exosome isolationand characterization**

#### ***Exosome isolation***

Exosomes isolated from T98G cells. For this aim T98G cells were seeded in a fresh medium (High glucose DMEM, FBS %10, Antibiotic %1). After reaching 70% confluency ratio. The cells were kept in FBS free medium for 48 hours. At the end of the 48<sup>th</sup> hour, the liquid in the flask was obtained and various centrifugation processes were

done. The supernatant was taken and ultracentrifugation was performed. All centrifugation processes were carried out at 4 °C.

### **Exosome characterization**

#### ***Transmission electron microscope (TEM)***

TEM results were obtained from Ataturk University DAYTAM center. Briefly, exosomes were mounted on grids, and after adding 1% glutaraldehyde it washed in sterile distilled water for 5 minutes at pH 7. More cellulose was removed, and the samples were dried for permanent protection. TEM was used to image exosome samples at a voltage of 80 kV.

#### **Temozolamide Exolimer loading**

For the bulk synthesis of nanocapsules (NCs), a solution of PDMS-PEG in THF was prepared under appropriate conditions. Nanoprecipitation, and formation of NCs were accomplished by adding this solution dropwise to water under vigorous stirring.

For drug-loaded NCs, Temozolamide was dissolved in CDCL<sub>3</sub> (Deuterated chloroform), and mixed with polymeric (PDMS-PEG, and Pluronic® F-127) solution.

For the microfluidic synthesis of nanocapsules (NCs), a solution of PDMS-PEG/Pluronic in THF was prepared under stirred conditions, and then fed to the microchip as the mainstream. The water flows act as a non-solvent, and the lateral flow ensures self-assembly during mixing. The flow rate between polymer, and water streams can be easily adjusted using Syringe Pumps to change the degree of focus, and thus mixing time.

For drug-loaded NCs, TMZ was dissolved in THF at four different initial loadings of 5, 10, 15, and 20% by weight mixed with the polymeric solution. A mixture of Pluronic F127, and TMZ (10 wt% initial loading weight) without polymer at a constant flow rate of 0.076 was used as control samples.

### **Cell culture**

T98 cell line for our study was obtained from Ataturk University (Erzurum, Turkey) Medical Pharmacology Department. Briefly, the cell suspension was centrifuged at 1200 rpm for 5 minutes. Cells were resuspended in a fresh medium (DMEM, FBS 15%, and antibiotic 1%), and seeded in flask (stored in an incubator 5% CO<sub>2</sub>; 37 °C). When 80% of the flask was covered with cells, it was removed with Trypsin- EDTA (0.25% trypsin-0.02% EDTA) to 96 well plate.

### **Cytotoxicity analysis**

### ***MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) analysis***

To determine the cytotoxicity of the materials, the 'direct contact test method' was applied, and an evaluation was made with the MTT substance (Sigma Aldrich inc, St. Louis, USA) containing 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium bromide. To determine cytotoxicity with the MTT test, a mixture of 5 mg MTT powder in 1 ml of PBS was prepared, passed through a sterile 0.20 µm filter (Corning, Wiesbaden, Germany), and kept at +4 °C until the time of use after its outer surface was covered with aluminum foil. After the medium liquids of the incubated cells were withdrawn, the previously prepared samples were placed in each well and incubated again for 24 , and 72 hours at 37 °C in an environment containing 5% CO<sub>2</sub>. Thus, the cytotoxic effects of the materials used at the end of 24, and 72 hours were evaluated.

To solubilize the formazan crystals formed as a result of the application of MTT, 99.4 ml dimethylsulfoxide (DMSO), 0.6 ml (HCl), and 10 g sodium lauryl sulfate (SDS) were added to the mixture as 100 µl/well and incubated again for 4 hours. After this process, absorbance (optical density) was measured in a spectrophotometer (µQuant, Bad Friedrichshall, Biotek) at a wavelength of 570 nm. The data are presented as graphs after SPSS analysis [15].

### ***Measurements of lactate dehydrogenase (LDH) activities***

Ready-made elisa was taken as a kit from Elabscience (Houston, Texas, USA). Cells lysed with the help of the kits were prepared in accordance with the protocol, and the results were determined by spectrophotometric method

### ***Measurements of glutathione reductase (GR) activities***

Ready-made elisa was taken as a kit from Elabscience (Houston, Texas, USA). Cells lysed with the help of the kits were prepared in accordance with the protocol, and the results were determined by spectrophotometric method.

### ***Oxidant and antioxidant activity analysis***

#### ***Detection of total antioxidant capacity (TAC), total oxidant number (TOS) and presence of oxidative stress in the cell***

The determination of total antioxidant capacity (TAC) level , and Total Oxidant Status (TOS), were determined by commercial kits produced by Rel Assay Diagnostics® (Gaziantep, Turkey)[16].

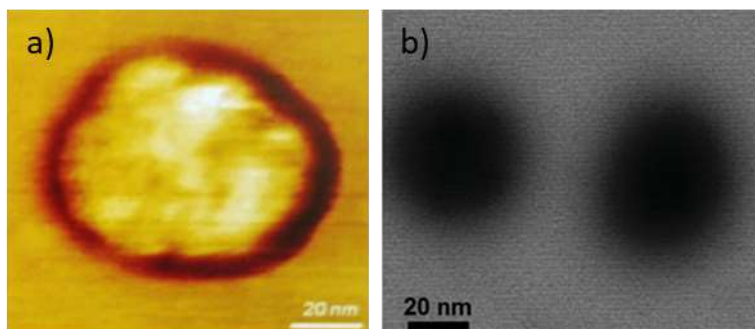
By adding Reagent 1 solution TAC, and TOS first absorbance were read at 660 nm and 530 nm respectively. Then the second read was done after adding the Reagent 2 solution. Absorbance value was read at the same wavelength as the first reading. TAC levels in were determined as Trolox Equiv./L<sup>-1</sup> , and mmol TOS levels were determined as H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Equiv./L<sup>-1</sup>[17].

## Results

### Exosome, and Exolymer+TMZ characterization

#### TEM

TEM images showed that the size of the exosomes, and Exolimer. Using TEM imaging, a well-accepted technique for nanoparticle validation, we observed that the diameters of our particles were in the expected range for exosomes (40-150 nm). In addition, in the direction of the data obtained from the image, it was determined that the exosomes were spherical, and circular structures. (Fig 1).

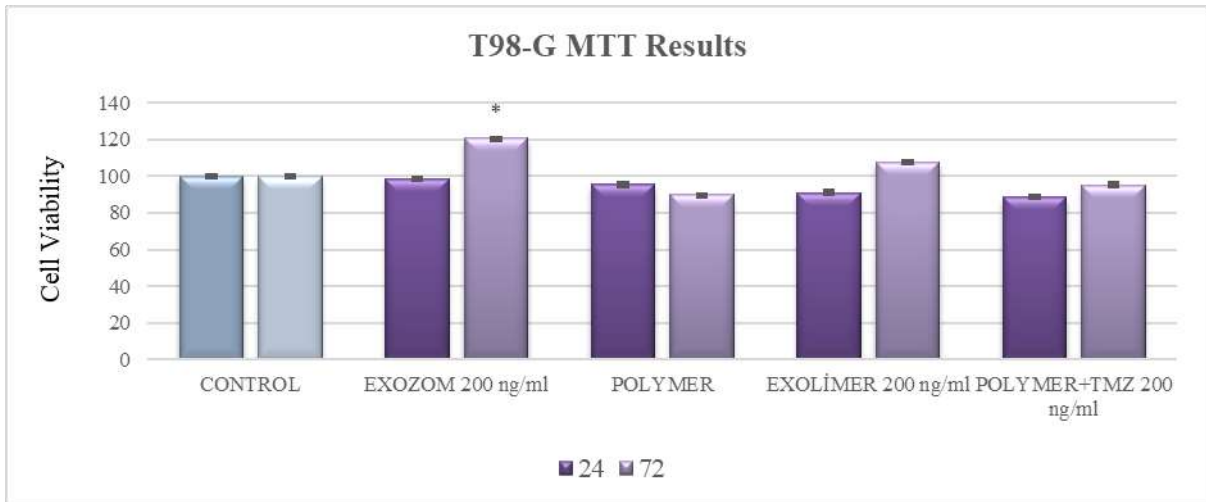


**Fig 1** TEM image a) Exosome b) Exolimer

### Cytotoxicity analysis

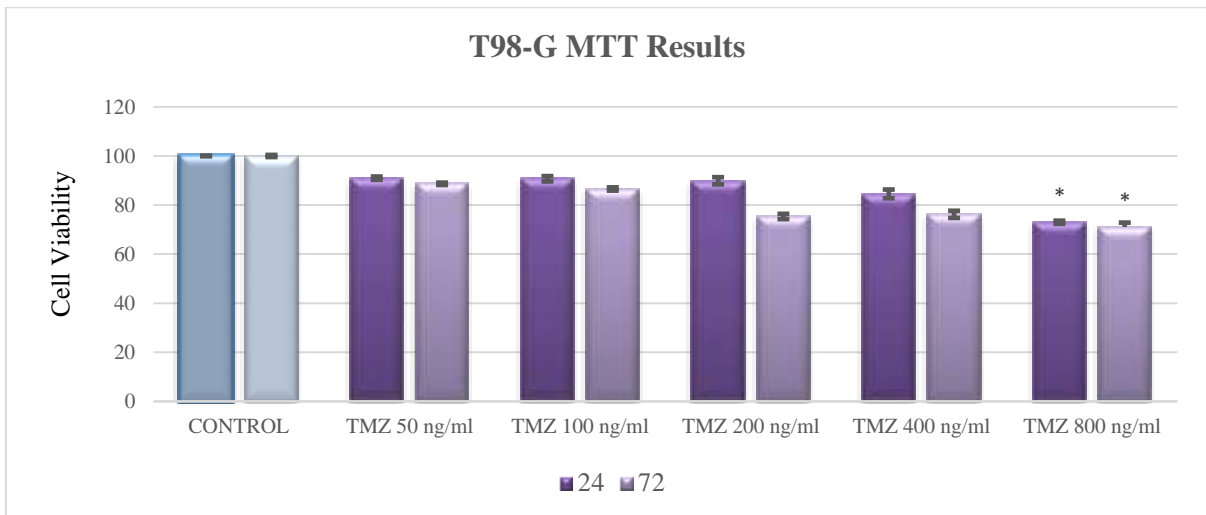
#### MTT results of T98-G cells

At the end of T 98-G 24, and 72 hours, the cytotoxicity results of the application groups (Exosome, Polymer, Polymer-TMZ, Exolimer, TMZ, and Exolimer-TMZ) are given in Fig. 2-4. Cell viability was increased by %21 in the Exosome 200 ng/ml group compared to the control group. According to our results, we observed that T98-D cancer cells increase the proliferation of cancer exosomes. Studies are showing that exosomes belonging to the cell in which they have secreted increase cell proliferation, and cell migration.[18]. Our results show a correlation with the literature.



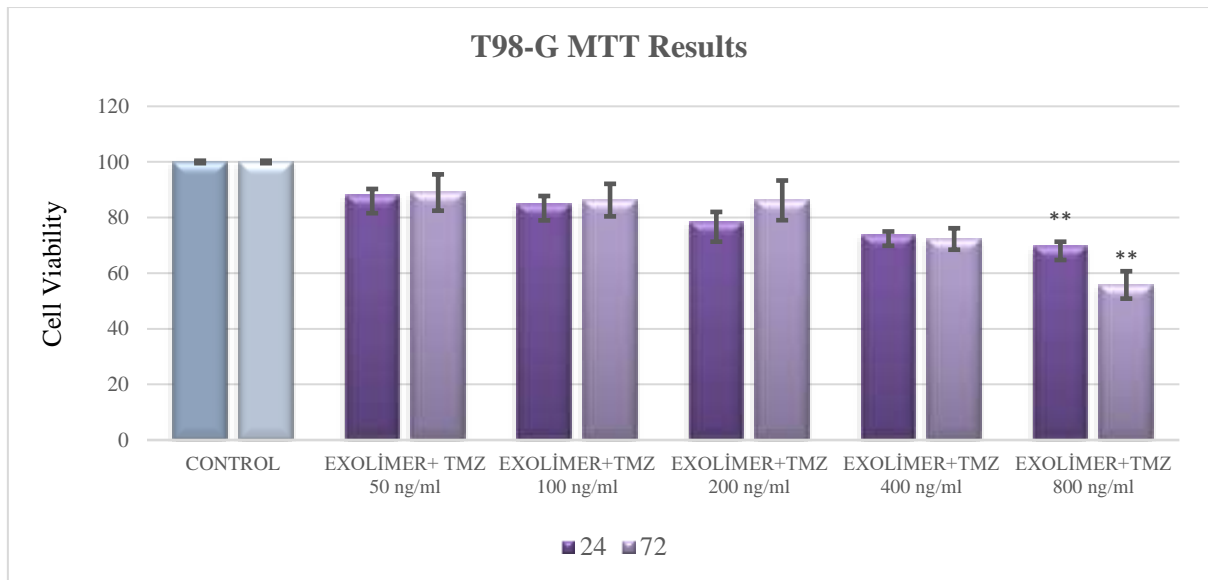
**Fig 2** MTT results of control, and positive controls (exosome, polymer, exosome, and polymer exosome (200 ng/ml)). (The data in Fig. are expressed as percent (%) values compared to the control group. Only the Exosome group was found to be statistically significant in the data obtained. ( $P < 0.05$ ))

According to the MTT results of TMZ applied at different doses, the viability rate decreased in both hours depending on the dose (Fig. 5). After 24, and 72 hours of application, the viability rate decreased the most (%29) at TMZ 800 ng/ml, and was determined as  $72.99 \pm 1.78$ , and  $71.06 \pm 0.6438$ , respectively. The results of the TMZ 800 ng/ml group were found to be significant when compared to the control ( $P < 0.05$ ).



**Fig 3** MTT results of control, and different doses of TMZ (50,100,200,400, and 800 ng/ml) are expressed as percent (%). (\*  $P < 0.05$  values are marked as significant, \*\*  $P < 0.001$  values are marked as very important).

The Exolimer+TMZ group significantly decreased cell viability in both hours compared to the control group. Cell viability at Exolimer+TMZ 50 ng/ml was found to be  $88.11 \pm 2.1776$ , and  $89.34 \pm 6.5328$  at 24, and 72 hours, respectively. Cell viability was found to be  $84.83 \pm 2.925$ , and  $86.27 \pm 5.85$  at Exolimer+TMZ 100 ng/ml, to be  $78.46 \pm 3.56$ , and  $86.19 \pm 7.13$  at Exolimer+TMZ 200 ng/ml. It was found to be  $73.70 \pm 1.28$ , and  $72.29 \pm 3.86$  at 400 ng/ml. Exolimer+TMZ 800 ng/ml group caused the most cytotoxicity in both hours. Cell viability decreased by %39, and %45, respectively. The values obtained were  $69.66 \pm 2.33$ , and  $55.77 \pm 6.99$ . The results were statistically significant at  $P < 0.05$ , and  $P < 0.001$ .

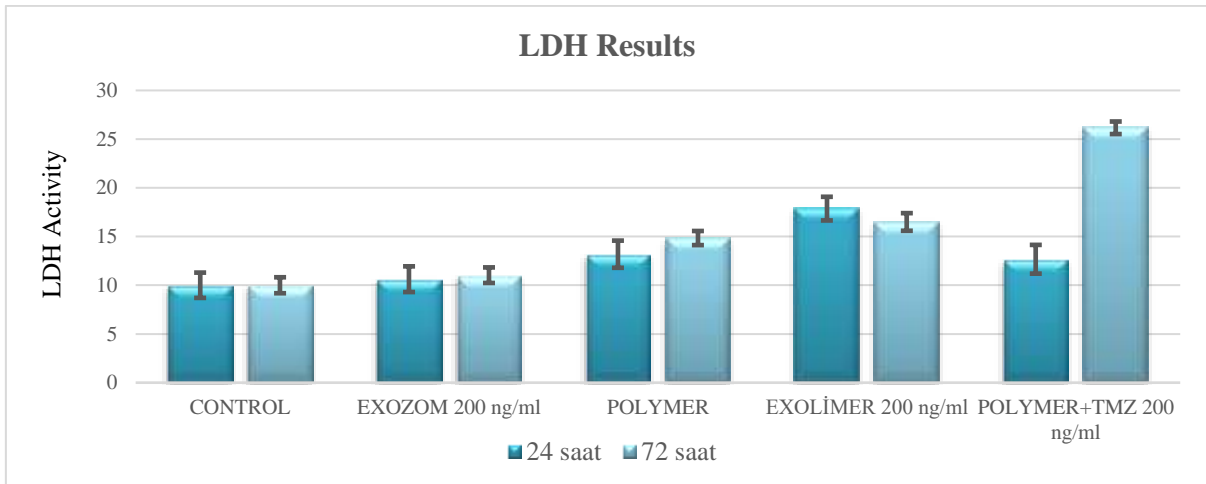


**Fig 4** MTT results of control, and different doses of Exolimer+TMZ (50,100,200,400, and 800 ng/ml) are expressed as percent (%) values. (\*  $P < 0.05$  values marked as significant, (\*  $P < 0.05$  values marked as significant, \*\*  $P < 0.001$  values marked as very important)

Our MTT analysis results of T98-G cells show that the Exolimer carrier system has a cytotoxic effect on cancer cells.

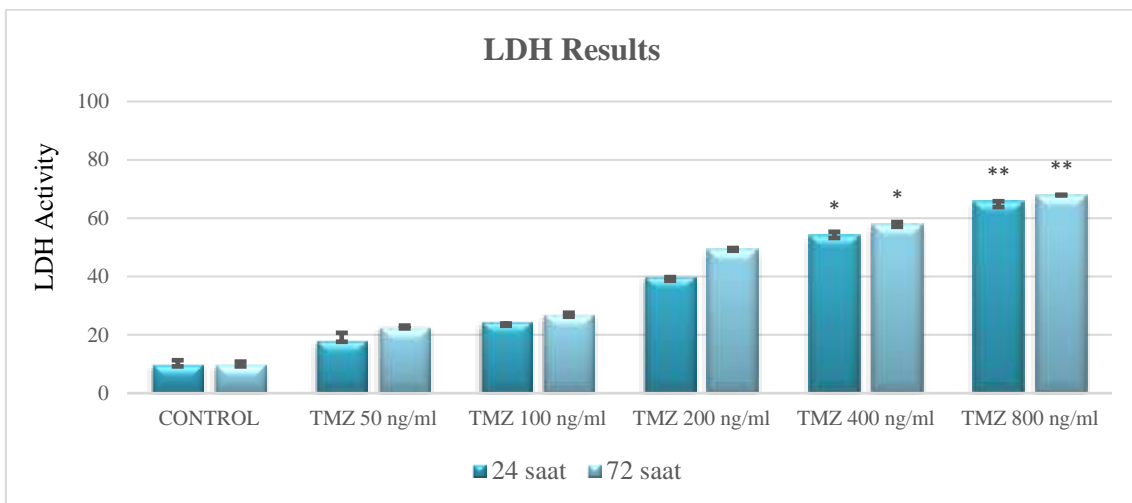
#### LDH results of T98-G cell

In the T 98-G cell line, it was found that the Exosome 200 ng/ml, Polymer, Exolimer 200 ng/ml, and Polymer + TMZ 200 ng/ml groups increased lactate dehydrogenase activity compared to the control group, but no significant difference emerged. Despite this, a slight difference was observed in the Polymer + TMZ 200 ng/ml (72h) group compared to the control. However, this observed difference was statistically significant (Fig 5).



**Fig 5** LDH results of Control (Negative Control), Positive Control (Exosome 200 ng/ml, Polymer, Exolimer 200 ng/ml, Polymer + TMZ 200 ng/ml) groups at 24, and 72 hours

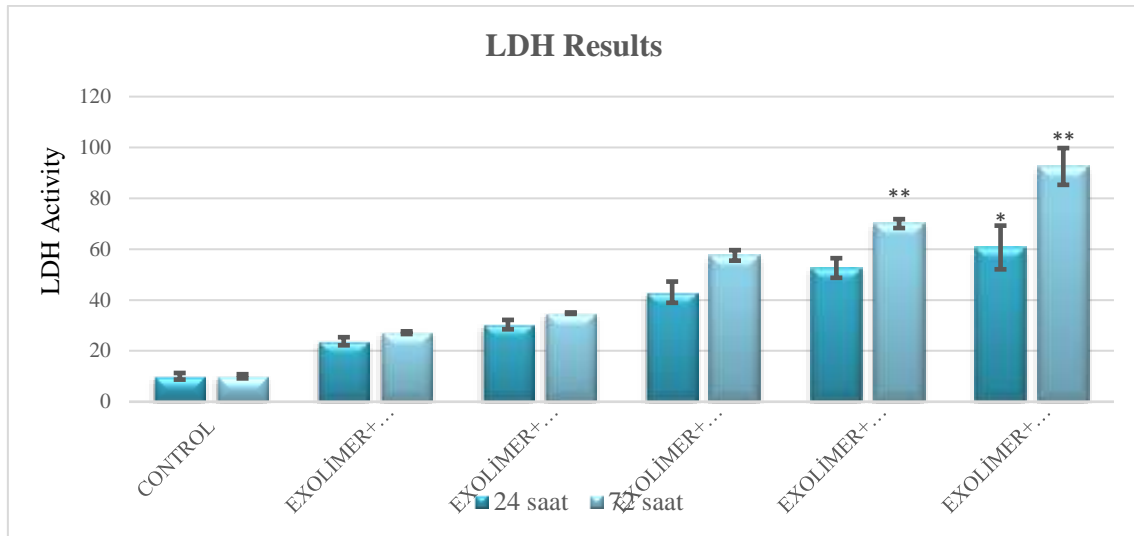
Similar to MTT results, significant groups were observed at TMZ 400, and 800 ng/ml doses . It was observed to be three times more cytotoxic than the control at both 24, and 72 hours ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.001$ ).



**Fig 6** LDH results of the control, TMZ 50 ng/ml, TMZ 100 ng/ml, TMZ 200 ng/ml, TMZ 400 ng/ml, TMZ 800 ng/ml groups at 24, and 72 hours. (\*  $P < 0.05$  values are marked as significant, \*\*  $P < 0.001$  values are marked as very important)

Although significant results were found in TMZ 800 ng/ml, the results were  $52.6 \pm 3.8$ , and  $60.7 \pm 1.74$  hours at 24, and 72 hours, respectively, in the TMZ group encapsulated with Exolimer (Exolimer+TMZ 400-800 ng/ml), and  $70.0 \pm 8.59$ , and  $92.5 \pm 7.23$ , and the result was observed to increase almost 10 times compared to the control (Fig. 7). The data obtained were found to be statistically significant ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.001$ )

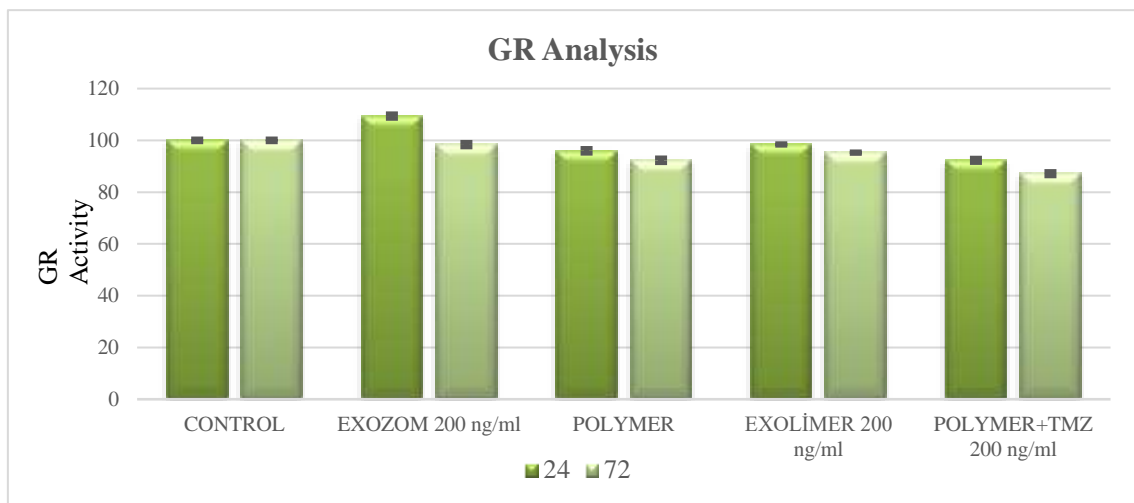




**Fig 7** LDH results at 24, and 72 hours for Control, Exolimer+TMZ (50 ng/ml, 100 ng/ml, 200 ng/ml, 400 ng/ml, 800 ng/ml groups. (\* P<0.05 values) significant), \*\* P<0.001 values marked as very important)

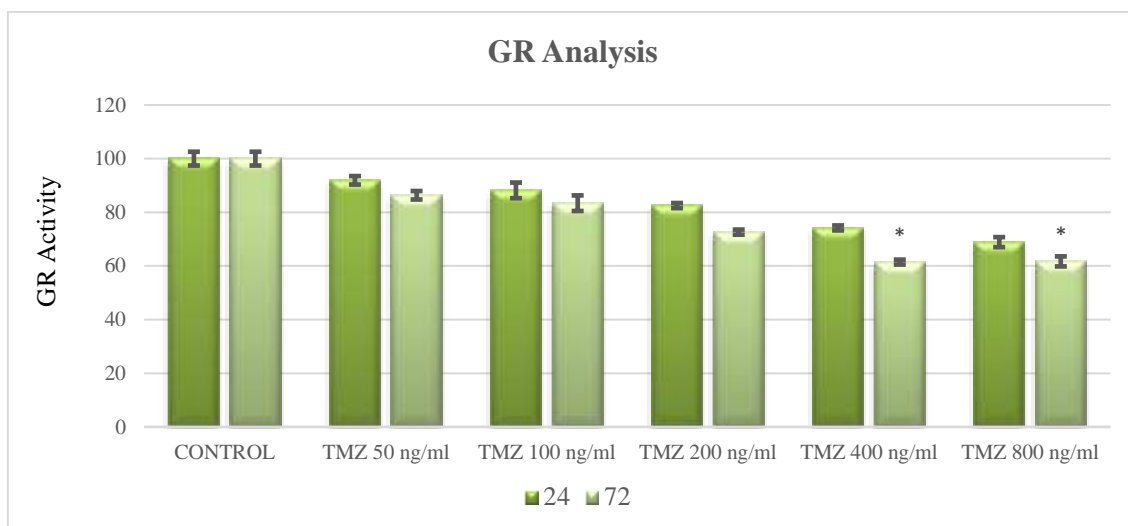
### GR results of T98-G cells

There was no significant change in GR level in positive controls compared to control in T98-G cells, with almost similar results with control (Fig 8).



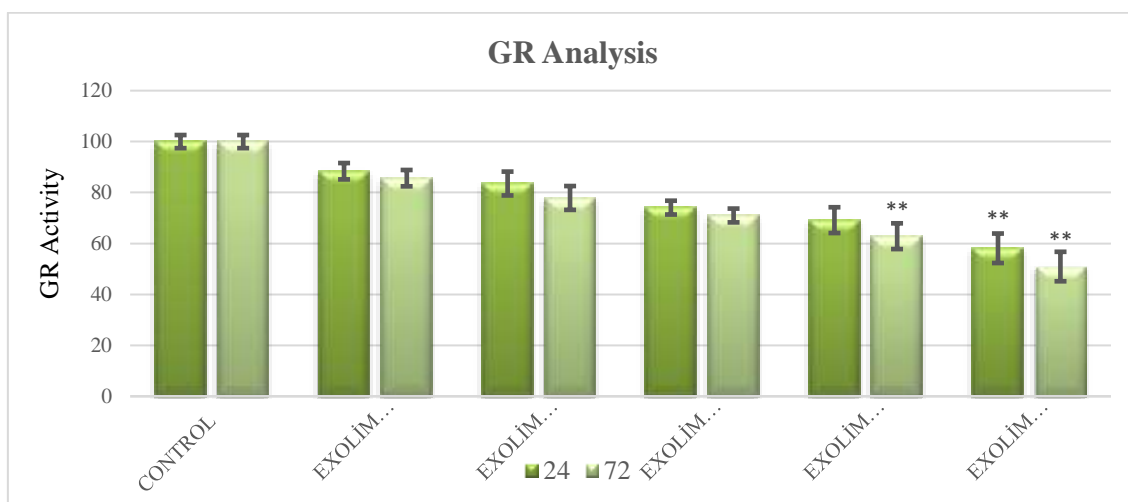
**Fig 8** GR results of Control (Negative Control), Positive Control (Exosome 200 ng/ml, Polymer, Exolimer 200 ng/ml, Polymer + TMZ 200 ng/ml) groups at 24, and 72 hours

Contrary to positive controls, both hours of the TMZ high dose decreased the GR level to  $61.43 \pm 0.921$ , and  $61.69 \pm 1.868$ , and statistical significance was found only in this group (P<0.05).



**Fig 9** GR results at 24 , and 72 hours for the control, TMZ (50 ng/ml, 100 ng/ml, 200 ng/ml, 400 ng/ml, 800 ng/ml groups. (\* P<0.05 values significant, \*\* P<0.001 values marked as very important)

As a result of the GR of the T98-G cell line, MTT, and LDH levels decreased considerably. Especially at the 72nd hour, the viability level at Exolimer+TMZ 400, and 800 ng/ml concentrations was determined as  $58.125 \pm 6.66$ , and  $50.95 \pm 5.79$ , respectively, and it was found to be statistically significant ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.001$ ).



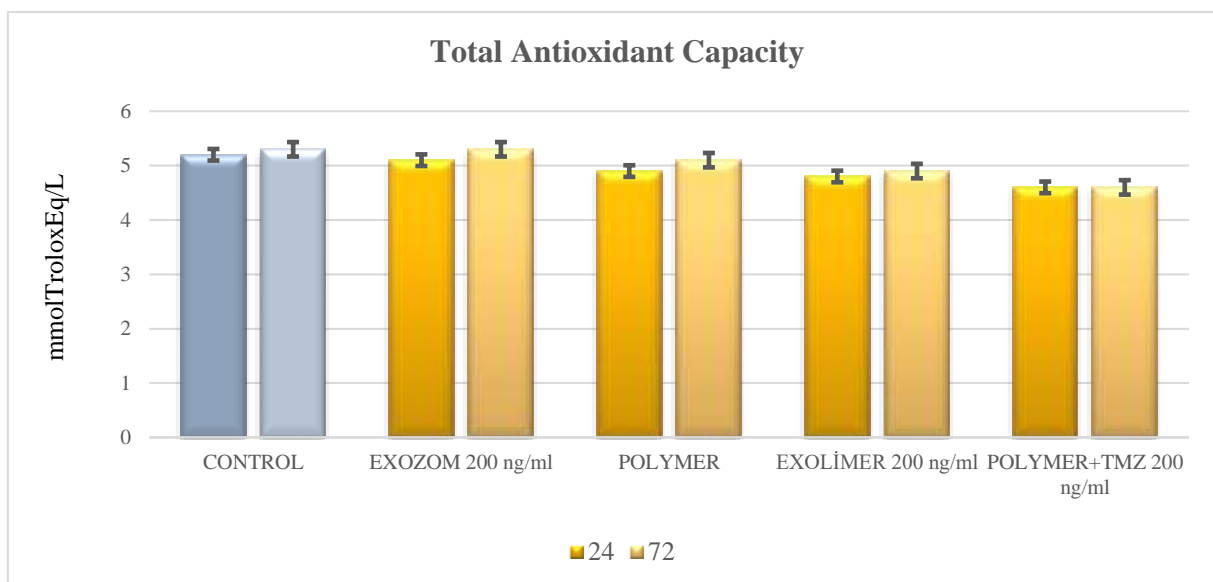
**Fig 10** GR results at 2, and 72 hours for Control, Exolimer+TMZ (50 ng/ml, 100 ng/ml, 200 ng/ml, 400 ng/ml, 800 ng/ml groups. (\* P<0.05 values are significant, \*\* P<0.001 values are marked as very important)

## Antioxidant Activity Measurement

### Total Antioxidant Capacity (TAC) of T98-G Cell

T98-G is given in Fig 11-13. Control and positive control values have close values and have no statistical significance. While the TAC value of the control group was  $5.2 \pm 0.31$

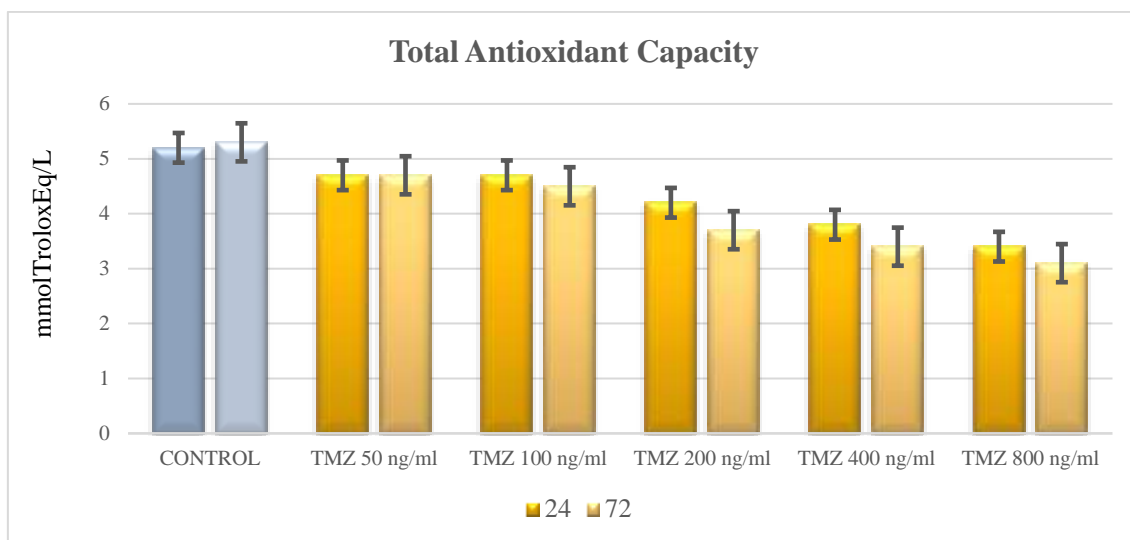
at the end of 24 hours, it was  $5.3 \pm 0.01$  at the end of 72 hours. The lowest value in the positive group belonged to the Polymer+TMZ 200 ng/ml group, and the value was the same in both hours, and was found to be  $4.6 \pm 0.111$ , and  $4.6 \pm 0.032$ , respectively. No significant difference was found among the controls ( $P > 0.05$ ).



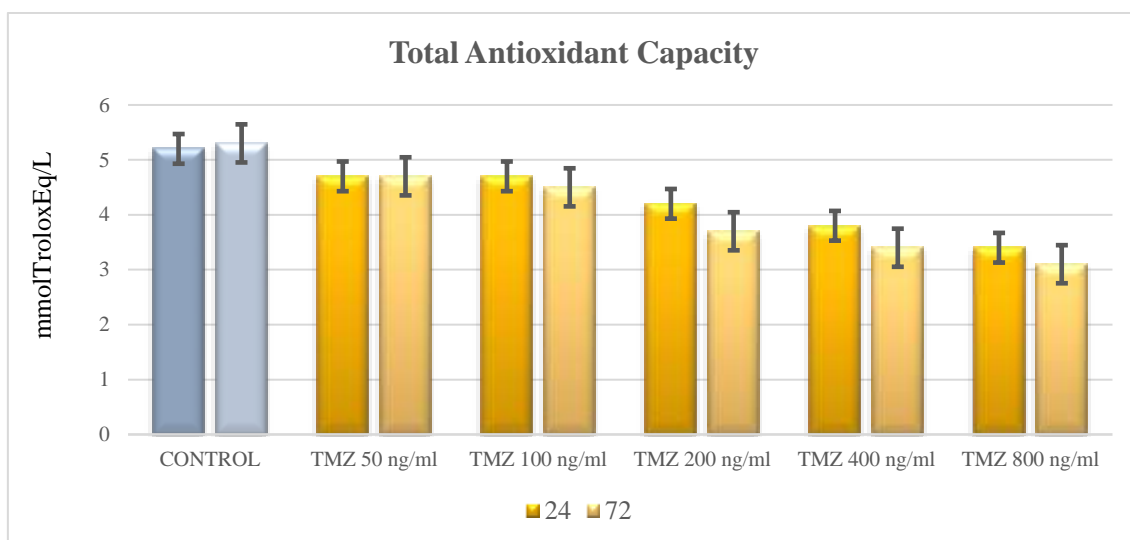
**Fig 11** TAC test results of the control and positive control groups. The data in Fig are expressed as values in  $\text{mmol Trolox Eq/L}^{-1}$  compared to the control group. \*  $p < 0.05$  values are marked as important, \*\*  $p < 0.001$  values are marked as very important

Although the TMZ group created a significant difference on the T98-G cancer line in correlation with MTT, and other cytotoxicity tests, it showed less effect than the Exolimer encapsulation formulation applied at the same dose. When the TMZ 400 ng/ml and TMZ 800 ng/ml values are compared with the control, significant results are obtained. TAC level was found to be  $3.8 \pm 0.125$ , and  $3.4 \pm 0.09$  at 24 hours, respectively, and  $3.4 \pm 0.056$ , and  $3.1 \pm 0.21$  after 72 hours ( $p < 0.05$ ).

Values obtained at the end of 24 hours from low dose to high dose in the Exolimer+TMZ group, respectively, were  $4.8 \pm 0.1$ ,  $4.4 \pm 0.04$ ,  $4.1 \pm 0.06$ ,  $3.1 \pm 0.3$ , and 2.8. Despite this, it was determined as  $4.4 \pm 0.21$ ,  $4.1 \pm 0.032$ ,  $3.3 \pm 0.43$ ,  $2.9 \pm 0.12$ , and  $2.5 \pm 0.076$  after 72 hours. According to the results obtained, it was observed that the TAC level decreased almost half as much as the control. The results obtained were statistically significant ( $p < 0.05$ , and  $p < 0.001$ ).



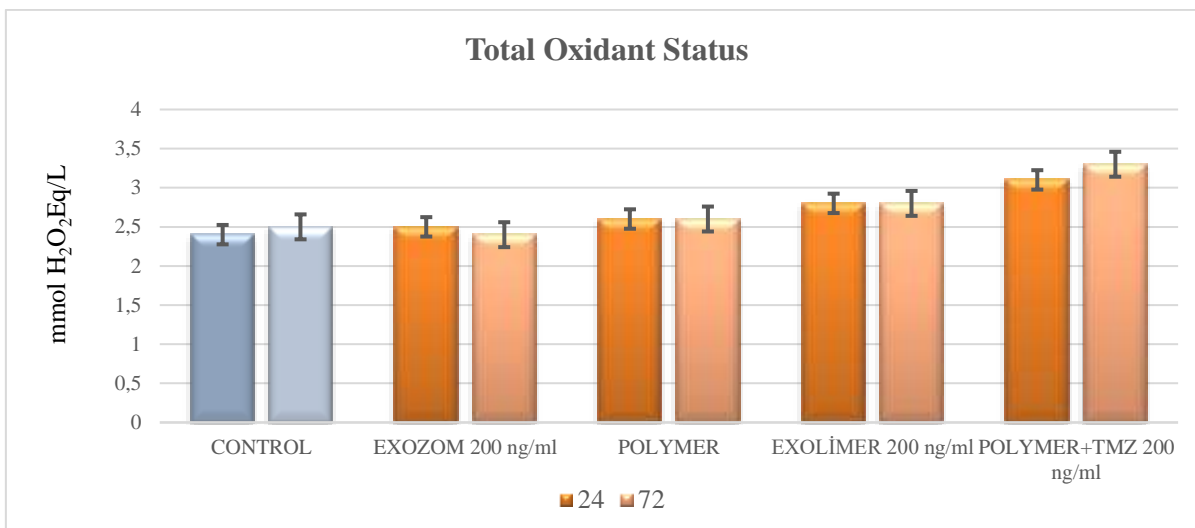
**Fig 12** TAC results of the control, and TMZ group. The data in Fig. are expressed as values in mmol Trolox Eqiv/L<sup>-1</sup> compared to the control group. \* p<0.05 values are marked as important, \*\* p<0.001 values are marked as very important



**Fig 13** TAC results of the control, and Exolimer+TMZ groups. The data in Fig. are expressed as values in mmol Trolox Eqiv/L<sup>-1</sup> compared to the control group. \* p<0.05 values are marked as important, \*\* p<0.001 values are marked as very important

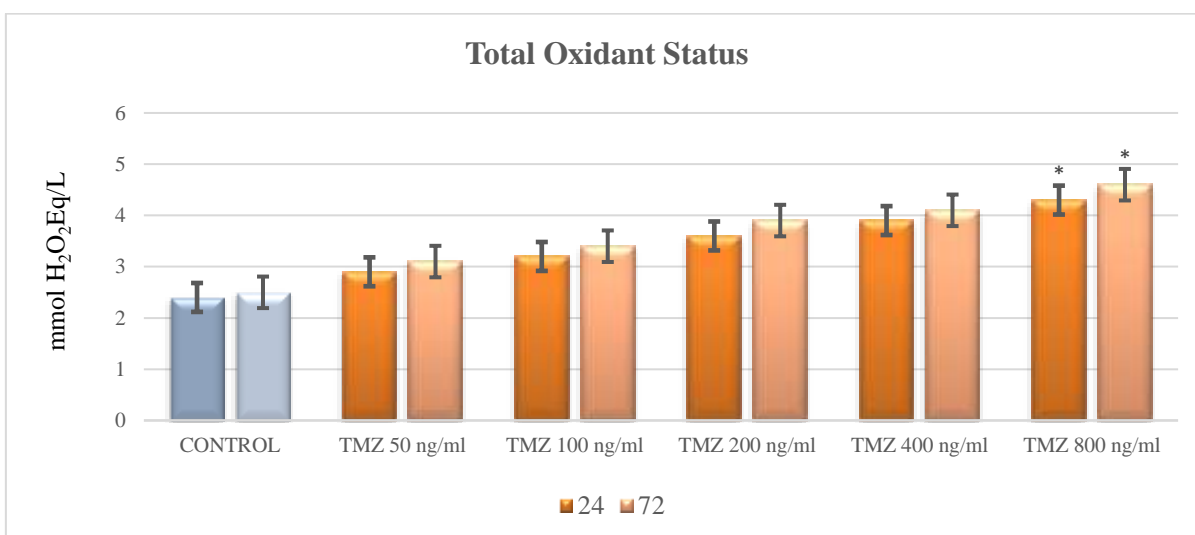
### ***TOS values of T98-G cells***

Compared to the control group, exosome 200 ng/ml, polymer, and Exolimer 200 ng/ml groups increased oxidative stress in T-98G cell line at both 24, and 72 hours, but no significant difference was observed.



**Fig 14** TOS test results of control, and positive control groups. The data in Fig. are expressed as values in mmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Eq/L compared to the control group. \* p<0.05 values are marked as important, \*\* p<0.001 values are marked as very important

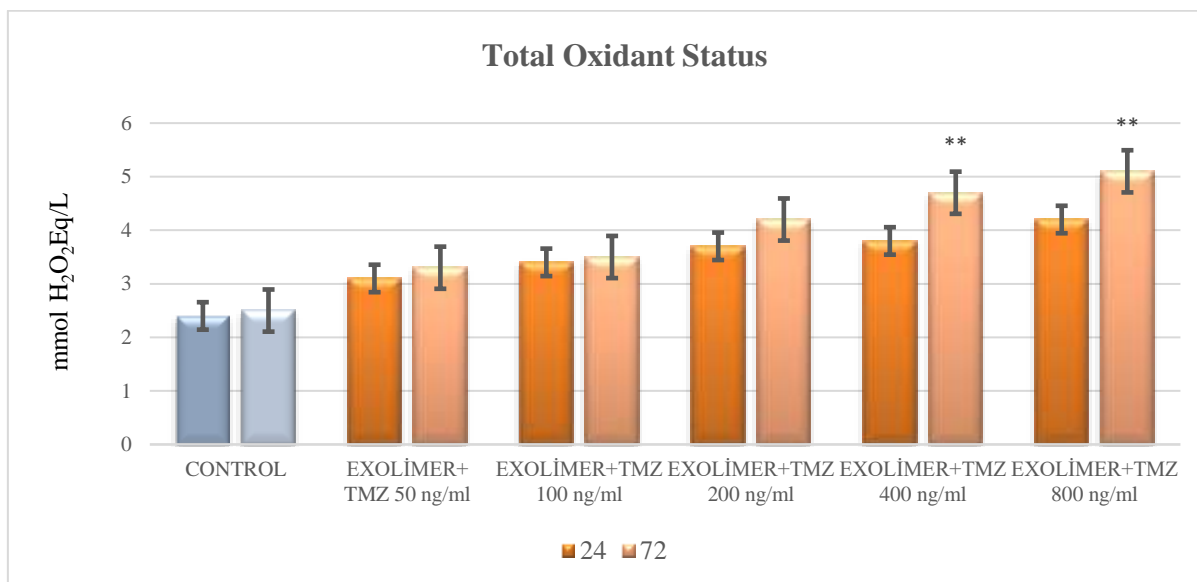
It was concluded that TMZ groups (50, 100, 200, 400, and 800ng/ml) compared to the control group increased oxidative stress at both 24, and 72 hours depending on the increasing dose. Compared to the control group, the most significant result after 72 hours was detected in the TMZ 400, and TMZ 800ng/ml groups, which increased oxidative stress by 1.64, and 1.84 times, respectively.



**Fig 15** TOS test results of the control, and TMZ groups. The data in Fig. are expressed as values in mmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Eq/L compared to the control group. \* p<0.05 values are marked as important, \*\* p<0.001 values are marked as very important

Fig 16 showed that the Exolimer + TMZ (50, 100, 200, 400, and 800 ng/ml) groups increased oxidative stress at 24, and 72 hours depending on the increasing dose, negatively affected T-98G cell viability, and led to cellular death. These results we

obtained reveal that the Exolimer positively increases the TMZ efficiency depending on the increasing dose. The most significant result compared to the control group was found in the Exolimer + TMZ 800ng/ml group, which increased oxidative stress by 2.04 times at the end of the 72<sup>nd</sup> hour.



**Fig 16** TOS test results of the control, and Exolimer+TMZ groups. The data in Fig. are expressed as values in mmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>Eqiv/L<sup>-1</sup> compared to the control group. \* p<0.05 values are marked as important, \*\* p<0.001 values are marked as very important

Considering its effectiveness on T98-G, encapsulation of the drug with the Exolimer offered many advantages together as it was predicted. These two systems, which also have many disadvantages, came together, and increased each other's power, thus increasing the effectiveness of the drug in parallel.

## Discussion

Exosomes take an active role in different cancer physiopathology. Exosomes released from GBM cancer play a role in many important tasks such as suppression of the immune response against cancer, cancer spread, and metastasis. Today, with the advancement of biotechnology, the use of exosome-based drug delivery systems against cancer is increasing rapidly [19-21]. For this reason, the use of these vesicles as carriers has gained importance in new studies. However, the low carrying capacity of exosomes, and the difficulty of elimination of various bioactive substances they carry limit the effective use of these vesicles. In our study, we produced new carrier molecules, which we call Exolimers, by combining these vesicles with new nanotechnological methods. In order to investigate the anticancer activity of these carrier nanocargoes, after characterizing the

particles obtained at different stages, we designed *in vitro* experiments to evaluate them in terms of anticancer activity. The aim of our study is to target cancer cells such as trojan horse of the Exolimers produced. Thus, we plan to increase the potency of the TMZ drug, which is widely used in the classical treatment of GBM, by ensuring that it is more effectively transported to cancer cells. For this purpose, we examined the effectiveness of our encapsulated drug with cytotoxic analysis, oxidant, and antioxidant analyzes at the end of the experiment.

Its use as an exosome transporter has been shown in different studies, and it has been used especially as a miRNA transporter in these studies. Jianxing Yin et al.[22] used exosomes to reduce drug resistance to temozolomide in their study in 2019. In this study, cancer cells were transfected by loading the exosomes obtained from the TMZ-resistant glioblastoma line. Their findings showed that as a result of transfection, the amount of mir1238 increased in target cells, and became sensitive to TMZ drug. Thanks to the data obtained, it has been proven that the Exosome transport system effectively penetrates the cancer microenvironment, and cancer cell more easily [22]. In our study, a mixture of polymer, and exosome was used instead of the pure form of different exosomes. In this way, the content of exosomes is discharged, and the carrying capacity is increased. In addition, the small amount of pure exosome obtained would cause the obtained material to be limited, so a higher amount of carrier material was obtained with the newly formed encapsulation with the polymer. When we look at the MTT result graphs in our experiment, the pure TMZ effect is weaker than the Exolimer-TMZ. The reason for this is that TMZ transported by the Exolimer is more effectively transported into the cell.

Munoz JL et al. [23] showed in their study in 2014 that high doses of TMZ led to an increase in LDH levels, and a decrease in GR values in cancer cells, leading to cell death. However, studies have also shown that resistance to TMZ causes a decrease in cell death rate, and LDH levels. In our study, the highest LDH activity in the TMZ group was observed between the TMZ 400-800 ng/ml groups. The 24-hour result was  $58.9 \pm 1.37$ , and  $68.8 \pm 1.68$ , while the 72-hour result was  $75.5 \pm 6.02$ , and  $85.3 \pm 6.88$ . At the highest dose, LDH activity increased almost 6-fold. However, it was determined that the absence of resistance in our Exolimer groups increased cytotoxicity, and cellular stress.

In the treatment of glioblastoma, oxidative stress caused by the damage of anticancer drugs in cancer cells has been shown in many studies. In their study conducted in 2018,

Emsen B et al. [24] showed that the total oxidant , and antioxidant ratios of anticancer drugs were correlated with the mortality rate. In addition, Tuzgen S et al [25] investigated total antioxidant levels in their study in glioblastoma patients in 2007. The data obtained in both studies reported that the oxidant level increased, and the antioxidant capacity decreased depending on the effectiveness of the treatment against cancer cells. The data obtained in both studies reported that the oxidant level increased, and the antioxidant capacity decreased depending on the effectiveness of the treatment against cancer cells [25]. Similar results were obtained in our study. However, in this study, the use of pure drug was compared with Exolimer+TMZ , and it was foun that the oxidant level increased , and the antioxidant level decreased in the Exolimer+TMZ groups compared to the equivalent dose.

Recently, targeted studies in cancer treatment have become widespread. Exosomes have an important role in cellular signal transmission, thanks to the biomarkers they carry. With these features, it is seen as a new hope in the treatment of many diseases, including cancer.

#### **Abbreviations**

GBM: Glioblastoma Multiforme; GR: Glutathione Reductase; LDH: Lactate Dehydrogenase; MTT: (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-Yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) Analysis; RES: Reticuloendothelial System; MPS: Mononuclear Phagocyte System; TAC: Total Antioxidant Capacity (TAC); TOS: Total Oxidant Number, TMZ: Temozolomide TEM: Transmission Electron Microscope.

#### **Acknowledgements**

We sincerely thank the staff, and administration of Atatürk University for their assistance, and support in this thesis study.

#### **Funding**

As the authors, we thank Atatürk University for supporting this study with the Bap project numbered TDK-2020-8442.

## **References**

1. Thakkar, J.P., et al., Epidemiologic and molecular prognostic review of glioblastoma. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 2014. 23(10): p. 1985-96.
2. Blissitt, P.A., Clinical practice guideline series update: care of the adult patient with a brain tumor. *Journal of Neuroscience Nursing*, 2014. 46(6): p. 367-8.
3. Raposo, G. and W. Stoorvogel, Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *Journal of Cell Biology*, 2013. 200(4): p. 373-83.
4. Al-Nedawi, K., et al., Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells. *Nature Cell Biology*, 2008. 10(5): p. 619-24.
5. Chen, Y., et al., Protein content and functional characteristics of serum-purified exosomes from patients with colorectal cancer revealed by quantitative proteomics. *International Journal of Cancer*, 2017. 140(4): p. 900-913.
6. Balaj, L., et al., Tumour microvesicles contain retrotransposon elements and amplified oncogene sequences. *Nature Communications*, 2011. 2: p. 180.



7. Valadi, H., et al., Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature Cell Biology*, 2007. 9(6): p. 654-9.
8. Sato-Kuwabara, Y., et al., The fusion of two worlds: non-coding RNAs and extracellular vesicles-diagnostic and therapeutic implications (Review). *International Journal of Oncology*, 2015. 46(1): p. 17-27.
9. Taylor, D.D. and C. Gercel-Taylor, MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer. *Gynecologic Oncology*, 2008. 110(1): p. 13-21.
10. Sousa, D., R.T. Lima, and M.H. Vasconcelos, Intercellular Transfer of Cancer Drug Resistance Traits by Extracellular Vesicles. *Trends in Molecular Medicine*, 2015. 21(10): p. 595-608.
11. Liu, D., et al., The Smart Drug Delivery System and Its Clinical Potential. *Theranostics*, 2016. 6(9): p. 1306-23.
12. Haque, S., et al., Disposition and safety of inhaled biodegradable nanomedicines: Opportunities and challenges. *Nanomedicine*, 2016. 12(6): p. 1703-24.
13. Luan, X., et al., Engineering exosomes as refined biological nanoplatforams for drug delivery. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 2017. 38(6): p. 754-763.
14. Tomic, N., et al., Delphinidin, Luteolin and Halogenated Boroxine Modulate CAT Gene Expression in Cultured Lymphocytes. *International Journal of Life Sciences and Biotechnology*, 2021. 4(1): p. 25-32.
15. Taghizadehghalehjoughi, A., et al., Vincristine combination with Ca(+2) channel blocker increase antitumor effects. *Molecular Biology Reports*, 2019. 46(2): p. 2523-2528.
16. Taghizadehghalehjoughi, A., et al., Combination of Pycnogenol and Melatonin Reduce PC-3 and HT29 Cell Migration: Comparison to the Actions of Cisplatin. *Acta Scientific Pharmaceutical Sciences*, 2020. 4(12): p. 176-188.
17. Taghizadehghalehjoughi, A., et al., Melatonin receptors increase Momordica's anticancer effects against PC-3 and HT-29. *Journal of Contemporary Medicine*, 2021. 11(2): p. 166-173.
18. Huang, J., et al., Cancer cell-derived exosomes promote cell proliferation and inhibit cell apoptosis of both normal lung fibroblasts and non-small cell lung cancer cell through delivering alpha-smooth muscle actin. *American Journal of Translational Research*, 2019. 11(3): p. 1711-1723.
19. Saadatpour, L., et al., Glioblastoma: exosome and microRNA as novel diagnosis biomarkers. *Cancer Gene Therapy*, 2016. 23(12): p. 415-418.
20. Kalluri, R. and V.S. LeBleu, The biology, function, and biomedical applications of exosomes. *Science*, 2020. 367(6478).
21. Chevillet, J.R., et al., Quantitative and stoichiometric analysis of the microRNA content of exosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 2014. 111(41): p. 14888-93.
22. Yin, J., et al., Exosomal transfer of miR-1238 contributes to temozolomide-resistance in glioblastoma. *EBioMedicine*, 2019. 42: p. 238-251.
23. Munoz, J.L., et al., Temozolomide resistance in glioblastoma cells occurs partly through epidermal growth factor receptor-mediated induction of connexin 43. *Cell Death & Disease*, 2014. 5: p. e1145.
24. Emsen, B., A. Kaya, and A. Aslan, Cytotoxic, Genotoxic and Oxidative Effects of *Cladonia furcata* (Huds.) Schrad. on Human Peripheral Lymphocytes. *Cumhuriyet Science Journal*, 2018. 39(1): p. 169-180.
25. Tuzgen, S., et al., Relationship between DNA damage and total antioxidant capacity in patients with glioblastoma multiforme. *Clinical Oncology*, 2007. 19(3): p. 177-81.

## Biyoteknolojide Biyosensör ve Biyoçip Uygulamaları

Zülfü Tüylek<sup>1\*</sup> 

### ÖZET

Biyosensörler esas itibarıyla, bir biyo algılama materyali ve bir transdüser içerir. Biyolojik ve kimyasal etken maddelerin tespitinde kullanılır. Enzimler, antikorlar, nükleik asit çalışmaları, hücreler, dokular ve organelleri içeren biyolojik algılama malzemeleri, elektrokimyasal, optik, piezoelektrik, termal ve manyetik cihazlar gibi hedef analitleri ve transdüserleri seçici olarak tespit edebilir ve nicel olarak görüntüleyebilir. Biyoçipler, biyolojik olarak kullanılabilen mikroişlemciler olarak tanımlanır. Bir biyoçip, ultraminyatürize test tüpleri seti olarak algılanabilir. Bu sistem pek çok testin aynı anda ve çok hızlı bir biçimde yapılabilmesine imkân sağlar. Biyoçip aynı zamanda, bir numuneden birçok farklı bölgeye bakabilme avantajı da sunar. Son yıllarda biyomedikal uygulamalarında biyosensör ve biyoçipler sıklıkla tercih edilmektedir. Çünkü biyosensörler ve biyoçipler hastalıkların erken tanısında ve yaşam kalitesinin yükseltilmesinde önemli bir yere sahiptir. Nanoteknoloji veya chip teknolojisi kullanılarak geliştirilen yeni nesil biyosensörler, sonuçların daha kolay izlenmesi ve değerlendirilmesini sağlamaktadır. İnsanlar atomları anlamaya, atomları yeniden düzenlemeye, birçok yapıyı atomik (mikro, nano vb. Ölçeklere) boyutlara indirgemeye çalışırken birçok icat ortaya çıkmıştır. Bunlardan biri şüphesiz MEMS teknolojisidir. Bu çalışmada, biyosensör ve biyoçip uygulamaları üzerine yapılan çalışmalar incelenmiştir. Yeni teknolojinin kullanım alanları araştırılmıştır. Biyosensör ve biyoçip alanında yapılan uygulamalar incelenmiştir.

### MAKALE GEÇMİŞİ

Geliş

07 Şubat 2021

Kabul

17 Mart 2021

### ANAHTAR KELİMELER

Biyosensör,  
Biyoçip,  
Biyomalzeme,  
Sağlık

## Biosensor and Biochip Applications in Biotechnology

### ABSTRACT

The biosensors essentially comprise a biosensing material and a transducer. It is used in the determination of biological and chemical active substances. Biosensing materials including enzymes, antibodies, nucleic acid studies, cells, tissues and organelles can selectively identify and quantitatively display target analytes and transducers such as electrochemical, optical, piezoelectric, thermal and magnetic devices. Biochip, at the same time offers the advantage looking at many different regions from one sample. In recent years biosensors and biochips have been frequently preferred in biomedical applications. Because biosensors and biochips have an important place in the early diagnosis of diseases and the promotion of quality of life. New generation biosensors, developed using nanotechnology or chip technology, provide easier monitoring and evaluation of results. Many inventions have arisen as people try to understand atoms, rearrange atoms, and reduce many structures to atomic (micro, nano, etc.) dimensions. One of them is undoubtedly MEMS technology. In this study, studies on biosensor and biochip applications are examined. The areas of use of the new technology have been researched. Biosensor and biochip applications have been examined.

### ARTICLE HISTORY

Received

07 February 2021

Accepted

17 March 2021

### KEY WORDS

Biosensor,  
Biochip,  
Biomaterial,  
Health

<sup>1</sup> Malatya Turgut Özal University, Yeşilyurt MYO, Electronics and Automation Department, Malatya / Turkey

\*Corresponding Author: Zülfü Tüylek, e-mail: [zulfu.tuylek@ozal.edu.tr](mailto:zulfu.tuylek@ozal.edu.tr)

## **Giriş**

Günümüzde biyosensör teknolojileri üzerine yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen gelişmeler dikkat çekmektedir. Dikkat çekici gelişmeler incelendiğinde biyolojik ve kimyasal ajanların tarımsal üretimi, gıda işleme ve çevresel izlenmesi yanında klinik teşhisler, ilaç testi, biyolojik işleme ve biyolojik savaş gibi faaliyetlerin yürütüldüğü görülmektedir [1]. Canlıların ekolojik sistemdeki değişiklikleri algılamaları ve bunlara cevap vermeleri, biyosensörlerin gelişiminde ana çalışma alanını oluşturmuştur. Biyolojik bir tepkiden bir sinyal formu üretmek için bir araç olarak görev görür [2]. Canlılar, yaşadıkları ortamdaki değişiklikleri algılama ve yaşamlarını devam ettirebilmek için değişime ayak uydurmak zorundadır. Bu algılama mekanizması, laboratuvarında biyosensörlerin (yapay koşullarda) geliştirilmesi için temel oluşturmuştur. Yapılan araştırmalar sonucu mikroelektronik alanında elde edilen gelişmeler ve biyolojik yapıların olağan üstü duyarlılıkta cevap verme kapasiteleri keşfedilmiştir. Bu sayede biyosensör teknolojisi hızla gelişmeye başlamıştır. Biyosensör teknolojisi, moleküler tanımlama ve çoğu biyokimyasal reaksiyonun sinyal işleme ve iletimini güçlendirmek için elektronik ve optik teknolojinin yeteneği ile entegrasyonunu mümkün kılmıştır [3]. Bu hızlı gelişme sayesinde birçok farklı tipte biyosensör geliştirildi ve üretim aşamasına geçildi. Günümüzde biyosensörlerin farklı alanlarda kullanılan birçok uygulaması karşımıza çıkmaktadır. Bu geliştirilen biyosensörler, tıp, eczacılık, gıda güvenliği, çevre kirliliği, askeri uygulamalar gibi birçok alanda kullanım imkânı bulmaktadır. Örneğin nanotıp alanında, biyosensörler ve minyatür yapılar (biyoçip) geliştirilmiş ve erken teşhis (nanodiagnostik) uygulamalarında kullanılmaya başlanmıştır. Bu teknolojilerin geliştirilmesi sayesinde tanı testleri, tıbbi tanı alanında yakın gelecekte teşhis amaçlı olarak kullanılacak birçok biyoçiplerin yaygınlaşmasına neden olacaktır. Araştırmalar sonucunda biyoçipler, karmaşık yapıları genetik bilgileri kısa sürede çözümleyebilecek hale geleceklerdir. Günümüzde nükleik asit prob sensörler, bir bireyin genetik yapısını araştırmak ve genetik hastalıklarla ilişkili genlerin veya mutant genlerin görünümünü sunmak için kullanılmaktadır [4]. Biyoçiplerde elde edilen ilerlemeler sayesinde idrarda, kanda ve tükürükte bulunan DNA ile etkileşime giren belli bir virüsü, bakteriyi ya da belli bir hastalığa ilişkin kalıtsal öğeleri belirlemek çok daha kolaylaşacaktır. Günümüzde kullanılan DNA biyosensörleri ile DNA-ilaç etkileşimleri başarıyla gerçekleştirilmektedir. Bu gerçekleştirme işlemi DNA'nın elektroaktif baz (guanin/adenin) sinyali veya analiz edilecek ilacın elektrokimyasal sinyali yoluyla

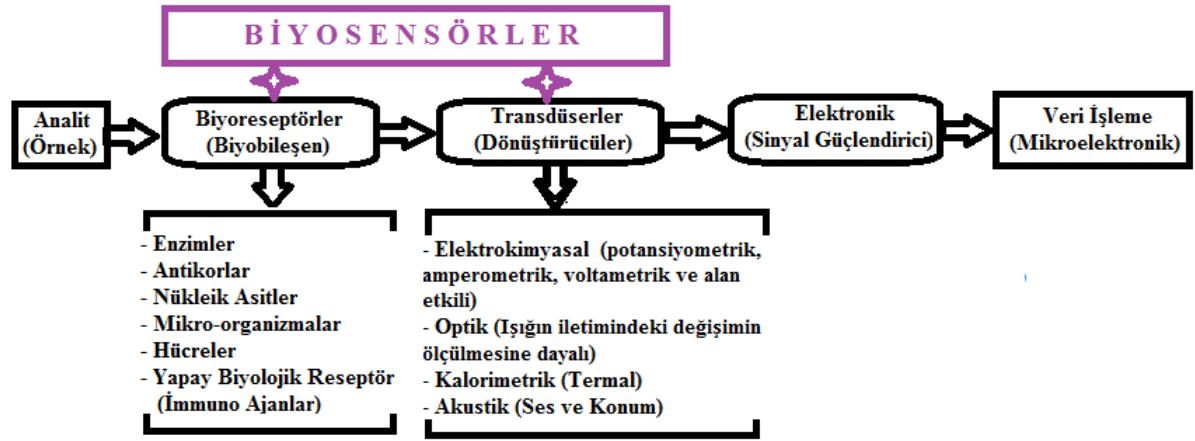
sağlanmaktadır. Sinyallerde gözlenen değişimler sonucu DNA-ilaç etkileşimi hakkında veriler elde edilebilmektedir [5]. Biyosensör gelişimi için reseptör seçimine, farklı transdüksiyon tekniklerinin kullanımına ve biyosensörün gıdalardaki uygulamaları için hızlı tarama stratejilerine ve çevresel güvenlik ve izlemeye özel vurgu yapmak önemlidir. Bu nedenle biyosensör üretimi, uygulama çeşitliliğini sağlamak için önemlidir [6]. Biyosensör immobilizasyonunu geliştirmek için altın, gümüş, silikon ve bakır nanopartiküller, grafit, grafen ve karbon nanotüpler gibi karbon bazlı malzemelerden geniş bir yelpazede nanomateryaller kullanılmaktadır. Ek olarak, nanopartikül bazlı malzemeler elektrokimyasal ve diğer biyosensör türlerini geliştirmek için büyük hassasiyet ve özgüllük sağlar. Metalik nanopartiküller arasında, altın nanopartiküller, oksidasyona karşı stabiliteleri nedeniyle potansiyel kullanıma sahiptir [7].

Farklı alanlardan bilim adamlarının katkılarıyla kimya, fizik, biyoloji, bilgisayar ve mühendislik gibi yeni çok disiplinli alanlarda geniş ölçekli yaratıcı biyosensör geliştirme fırsatları ortaya çıktı. Biyoteknoloji şirketlerinin bu alanla ilgili birçok Ar-ge çalışması yürütmekte oldukları görülmektedir. Öncelikle klinik teşhisler, kan örneklerinin analizi, bulaşıcı hastalıkların teşhisi, tarımsal üretim, gıda analizi ve çevresel izleme gibi birçok alanda biyolojik ve kimyasal maddelerin tespitinde çalışmaların yoğunlaştığı görülmektedir [8]. Yapılan çalışmalarda göze çarpan amaçlardan birisi tek kullanımlık biyoçiplerin üretilmesidir. Günümüzde farklı alanlarda kullanılan tek kullanımlık birçok biyoçiplerin üretildiği ve kullanım kolaylığı sağladığını görmekteyiz. Örneğin kanda bulunan hepatit gibi birçok virüsün tanısını yapmaya yönelik üretilen biyoçipler bunlardan sadece bir tanesidir. Canlı vücudunun önemli öğelerinden olan görme, duyma, koku alma, tatma, dokunma gibi algılama sistemleri en mükemmel doğal biyolojik sensörler olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu biyolojik sensörler, biyosensör ve biyoçip araştırmaları için güzel örnekler teşkil edecek uygulamalar içermektedir. Makalemizde biyosensör ve biyoçip uygulamaları üzerinde durulacaktır.

## **Biyosensör Teknolojisi ve Uygulama Alanları**

Canlılar ekolojik sistem içerisindeki değişimleri anında algılar ve yaşamlarını sürdürebilmek için bu değişimlere ayak uydurmaya çalışırlar. Yapılan araştırmalara bakıldığında canlıların hayal bile edilemeyecek ölçüde duyarlık performansı sergiledikleri tespit edilmiştir. Örneğin köpeklerde koku alma duyarlık performansının insanlara göre 100.000 kat daha fazla olduğu görülmüştür [9]. Kelebeklerin, eşlerinin

yaydığı birkaç molekölü algıladıkları saptanmıştır. Alglerin zehirli maddelere karşı oldukça duyarlı oldukları görölmüştür. Yılan balıkları tonlarca suda, birkaç damla yabancı maddeyi anında tespit ederler. Bu örnekleri saymakla bitirmemiz mümkün değildir. Canlılarda bu uyarıları tespit etmeyi mümkün kılan biyolojik maddelerin analiz sistemlerinin bir araya getirilmesi sayesinde biyosensör yapılar geliştirilerek kullanılmaya başlanmıştır [10]. Biyosensörlerle ilgili bir tanımlama yaparken parçalayıp anlamlandırma yöntemini kullanmak yerinde olacaktır. Biyo kelimesi biyolojik sistemler ve objeler, canlılık ya da yaşam anlamına gelmektedir. Sensör kelimesi ise algılama, algılayıcı anlamına gelmektedir. Şimdi bu iki kelimeyi bir araya getirdiğimizde biyolojik sistem ve objelerin algılanması anlamı ortaya çıkmaktadır. Bu da biyosensörlerin tanımına karşılık gelmektedir. Biyosensörler, biyoaktif bileşenin seçici olarak analiz edilecek element ile etkileşimi sonucu üretilen sinyalin, bir algılayıcı tarafından birleştirilmesi ve ölçülmesi olarak tanımlanır. International Union of Pure and Applied Chemistry (Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği) tarafından yapılan tanım ise bir kimyasal bileşiğe verilen biyolojik bir yanıtı optik, termal ya da elektrik sinyallerine dönüştüren cihazlar şeklinde yapılmıştır [11]. Biyosensörler temelde biyoaktif tabaka (biyoreseptör), dönüştürücü (transduser) ve elektronik parçalardan oluşur. Biyoaktif katman genellikle analiz edilecek madde (analit, örnek) ile seçici olarak etkileşime giren biyoaktif bir bileşenden oluşur. Dönüştürücüler, gerçekleşen etkileşimden kaynaklanan biyokimyasal veya fizikokimyasal sinyalleri elektrik sinyallerine dönüştürmek ve verici sistemlere iletmek için tasarlanmıştır. Elektronik bölümde iletilen sinyal, amplifikatörler, sinyal işleme, kaydediciler ve göstergeler gibi sistemlerden oluşur ve elde edilen veriler okunabilir bir şekilde görüntülenir [12]. Bu yapılarda hücreler, bir dönüştürücünün kaydedip iletebileceği elektrokimyasal tepkiyi gösteren çok çeşitli analitlerle etkileşime girebilir (tüm hücre tabanlı biyosensör ilkesi). İyi hassasiyetleri, yüksek seçicilikleri ve algılama yetenekleri sayesinde bu biyosensörler, çevresel izleme, gıda analizi, farmakoloji, ağır metallerin tespiti, pestisit, organik kirleticiler ve ilaç taramasında başarıyla kullanılmaktadır [13]. Biyoaktif katman, dönüştürücü ve elektronik bileşen yapılarını incelediğimizde Şekil 1'in oluşturulması yerinde olacaktır.



Şekil 1 Biyosensör bileşenleri

Biyosensörleri tanıyıcı, çevirici ve elektronik bölüm şeklinde tanımlamak yerinde olacaktır. Tanıyıcı bölüm, tanıyan (ligand) ile tanınanın (analit) etkileştiği bölümdür. Yani biyoaktif tabakadır. Çevirici, gerçekleşen etkileşim sonucu oluşan değişimi elektrik sinyaline dönüştürür. Bu işlemi gerçekleştiren sistemler ise dönüştürücülerdir. Elektronik bölüm ise oluşan elektrik sinyalinin değerlendirme işlemini yaparak sinyali okunabilir veriye dönüştürür. Tanıyıcı bölümde, immobilize edilmiş ligandların varlığı söz konusudur. Bu ligandlar biyolojik materyal olduğunda (enzim, antikor/antijen, oligopeptit, mikroorganizma) sistemler biyosensör olarak adlandırılır [14]. Canlıların çevrelerindeki değişimi algılamaları ve bunlara yanıt vermeleri için altyapı olarak kullandıkları biyolojik sistemler, biyosensörlerin geliştirilmesi için temel oluşturmuştur. Bunun yanında kimya, biyokimya, biyoloji, mühendislik gibi (şekil 2) birçok bilim dalındaki bilgi birikiminden faydalanılmıştır. Böylece biyolojik sistemlerin seçicilik özellikleri ile mikroelektronik tekniklerin işlem yeteneklerinin birleştirilmesi sonucu geliştirilmiş biyoanalitik cihazlar elde edilmiştir.



Şekil 2 Biyosensörler alanında gerçekleşen etkileşim

Biyosensör tasarımı ilk olarak kandaki glukoz seviyesinin ölçümüyle başlamıştır. Sonrasında biyosensörlerde elektron alıcı olarak elektron alış-verişinin gerçekleştiği

kimyasal tepkimeler kullanılmıştır. Daha sonraki çalışmalarda enzimin indirgenme yükseltgenme merkezi ile elektrot yüzeyi arasında doğrudan elektriksel iletişim sağlanmıştır. Biyosensörlerde gelinen bu son nokta sayesinde indirgenme yükseltgenme araçlarına gereksinim kalmamıştır. Biyosensörlerde biyobileşenlerde, doku kültürleri, mikroorganizmalar, organeller, antikorlar ve nükleik asitler ile enzimler kullanılmaya başlanmıştır. Geliştirilen bu yeni yapılar, ölçme yöntemlerine göre amperometrik, potansiyometrik, termal, piezoelektrik, akustik ya da optik sensör olarak sınıflandırılmıştır. Günümüze kadar yaklaşık 180'in üzerinde farklı madde için biyosensör hazırlanmıştır. Bunların içerisinde ancak bugün yaklaşık 25 tanesi ticari amaçlı olarak üretim aşamasına geçmiştir. Örneğin genetiği değiştirilmiş organizmaları yeni biyoteknolojik yöntemlerle bitkilere aktararak, bu bitkileri bu alanlarda en temel anlamda yetiştirmek mümkündür. Bu çalışmalarda, canlı organizmaların çeşitliliği, yani biyoçeşitlilik ortaya çıkmaktadır. Tarımdaki biyoçeşitlilik, biyoçeşitliliğin tüm gıda ve tarımla ilgili bileşenlerini içerir [15]. Biyosensörlerde tanıyıcı olarak hayvan ve bitki hücreleri kullanılmaktadır. Ayrıca soğuğa adapte olmuş bazı organizmalar, mikrobiyal kontaminasyonu önlemek, hücre dokularının dondurularak korunmasını artırmak ve dondurulmuş gıdaların dokusunu ve lezzetini korumak için gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır [16]. Karaciğer hücre fonksiyonları birçok biyokimyasal başka türlere çevirdiğinden biyosensörler için en ideal uygulama alanı olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu hücrelerdeki ilk uygulama karaciğer dokusu arjininin tanısında kullanılmıştır. Karaciğer hücreleri arjini sensör yüzeyine konularak önce ornitin ve üreye çevrilmiş, sonra üre üreaz ile amonyağa dönüştürülmüş ve amonyak elektrodu ile ölçüm gerçekleştirilmiştir. Yüksek özelliğe sahip biyosensörler, renkli ve bulanık çözeltilerde geniş derişim aralığı içerisinde doğrudan ölçüm yapabilme imkân sağlar. Fakat biyobileşenlerde pH, sıcaklık, iyonik güç gibi çevresel şartlar biyosensörlerin kullanım ömrünü kısaltmaktadır. Biyosensör uygulama alanları tıp, eczacılık, tarım, gıda, çevre kirliliği, savunma sanayi gibi birçok endüstriyel kullanıma sahiptir [17]. Otomasyon ve kalite kontrolü gibi çalışmalarda önemli rol oynamaktadır. Sensör alanında en iyi pazara sahip olan biyomedikal cihaz biyosensörlerdir. İlk uygulanan biyosensörler enzim sensörlerdir. İlk olarak şeker hastalığını teşhisinde, kan ve idrarda glukoz tayininde kullanılmıştır. Ayrıca vücuttaki glukoz, üre, şeker gibi biyolojik ürünlerin takibi yapılmakta ve kanserlerin izlenmesi ve mikrobiyal ajanların tespiti amacıyla da

kullanıldığı görülmektedir [18]. Enzim elektrodlarının tıbbi analizörlere takılmasıyla yoğun bakım ünitelerinde kullanılmaya başlanmıştır. Biyoteknolojide kullanılan enzim biyosensörleri başta glukoz olmak üzere monosakkaritler, amino asitler, organik asitler, üre ve alkol tayininde kullanılır. Kötü amaçlı kullanılan ilaçlar ve uyuşturucu maddelerle mücadelede biyosensör uygulamalarına da rastlanmaktadır [19]. Sensörlerde bulunan biyobileşenler; enzimler, mikoorganizmalar, organeller, doku bölümleri, antikorlar, nükleik asitler ve biyolojik zarlara gömülü kimyasal reseptörler olarak kullanılır. Uygun enzimin bulunmaması ya da enzimin kararsız olması durumunda bir maddenin tayini için hücre sistemleri ve mikroorganizmalar kullanılır. Dönüştürücüler, reseptörlerin biyolojik tepkisini ölçerek fiziksel sinyale dönüştürür. Biyokimyasal reaksiyon düşünülerek dönüştürücü seçimi yapılır. Elektrodlar ise amperometrik ve potansiyometrik ölçüm sırasında kullanılır ve burada hedef analittir [15]. Günümüzde piyasada kullanılan biyosensörlerin çoğu amperometrik enzim biyosensörlerdir. Amperometrik biyosensörler referans elektroda sabit bir potansiyel uygular ve elektrod yüzeyindeki akımın ölçülmesi işlemi sırasında kullanılır. Amperometrik biyosensörler redoks enzim tabanlıdır. Tercih edilmelerindeki en büyük nedeni yağ asitleri, şekerler, amino asitler, aldehitler ve fenoller üzerinde etkileşebilen oksidoredüktaz enziminin kolay şekilde temin edilebilmesidir. Potansiyometrik biyosensörler ise membran boyunca oluşan potansiyel farkı analiz eder ve derişimi hakkında bilgi taşımakta kullanılır [20]. Günümüzde biyosensörlerin çok farklı kullanım alanları mevcuttur. Biyosensörler, biyolojik veya kimyasal etken maddeye seçici, hızlı ve sürekli olarak bağlanarak reaksiyona girmelidir. Bunu sağlayabilmesi için ise şu özelliklere sahip olması gerekmektedir.

- Biyoaktif ve biyoalgılama materyalinin bulunması gerekmektedir.
- Bu materyaller ilgilenilen öğeleri ya da analitleri tanıyabilmelidir.
- Biyoalgılama malzemesi dönüştürücü ile yakın temas içerisinde bulunmalıdır.

Genel olarak, bir biyosensör biyolojik, kimyasal ya da biyokimyasal sinyali ölçer ve işlenebilir elektrik sinyaline dönüştürür. Sonra elektriksel sinyal kimyasal veya fiziksel dönüştürücüyle birleştirilir. Algılama materyali içeren görüntüleme cihazı yardımıyla sonuçlar gösterilir [21]. Bu nedenle biyosensörlerin özellikleri ve kullanıldığı ortamda bulunan şartlar önemlidir. Ayrıca algılayıcı seçiminin de göz önünde bulundurmamak gerekmektedir. Biyosensörlerdeki işlem basamakları, veri temini ve kontrolü, veri tabanı ve modelleme, ağ bağlantısı ve kablosuz iletişim gibi birimlere ihtiyaç duyar.



Biyogölleme materyallerinin dönüştürücülere bağlanması aşamasında etkin sabitleme tekniği kullanılır [22]. Örnekleme akışı, belirli ve tespit edilebilen sinyallerin alınması esnasında hedef analitin ayrıştırılması ve konsantrasyonu kritik önem taşır. Daha minyatür (biyoçip) biyosensörlere doğru gidildikçe, gelişmiş mikro ve nano üretim tekniklerine ve yazılımlara ihtiyaç duyulmaktadır. Biyosensörler örnekleme, algılama, çevirme ve hesaplama içeren yapılara sahiplerdir. Bu teknolojik yapılar biyoloji, kimya ve mühendislik yaklaşımları üzerine bina edilmiştir [23]. Nanotellerin ince yapısı, çevreyi ve ayrıca vücut içi algılamayı incelemek için uzak nanobiyosensörleri geliştirmek için önemli bir faktör olmaya devam ediyor [24]. Günümüzde nanoteknoloji ya da chip teknolojisi kullanılarak geliştirilen ve modern zaman biyosensörleri olarak adlandırılan yeni nesil biyosensörlerin kullanıldıkları görölmektedir. Bu biyosensörler sayesinde sonuçların daha kolay izlenmesi ve değerlendirilmesi mümkün olmaktadır. Gelişmiş teknolojiler kullanılarak bir objeye biyoçip yerleştirildiğinde, tespit aşamasında ortaya çıkan değişimleri hastaneye gitmeye gerek kalmadan takibi mümkün olmaktadır. Örneğin nanoteknoloji alanında nükleotit çoğaltma ve görüntüleme tekniklerinde elde edilen gelişmeler sayesinde, günümüzde nükleotit temelli biyosensörler yaygın bir şekilde kullanılmaktadır [25, 26].

Biyosensörlerin gelecekte önemli iletişim kurma teknikleri içerisinde süperoksit ve nitrik oksit (NO) bileşenleri yer alacaktır. Böylece kısa ömürlü hormonlar ve nörotransmitterler (uyarıcılara tepki) sayesinde, doğal ortamlardaki düşük konsantrasyonlu maddelerin tayini mümkün olacaktır. Ayrıca biyolojik ya da biyolojik kökenli materyaller kullanıldığı büyük ölçekli üretim süreçlerin nükleik asit düzeyinde izlenmesi, ilaçların alıcılara etkisi ve özellikle alıcı / verici etkileşimi gelecekte biyosensörlerin önemli tıbbi uygulamaları arasında yer alacaktır [27]. Aynı zamanda biyolojik sistemler kullanılarak, proteinler arası ilişkilerin anlaşılması ve insan genom projesinin devamı olan protein analizi çalışmalarında kullanılan biyosensörlerin geliştirilmesi ve çeşitliliğinin artırılması da hedeflenmektedir. Genom projesi çerçevesinde, hastalığa sebep olan bakteri ve mikroorganizmaların genetik kodları ilaç geliştirme aşamasında kullanıldığında bazı ilaçların ilaç yerine zehir oluşumuna sebep olduğu görölmüştür [28].

Belirtmiş olduğumuz bu araştırma/geliştirme çalışmaları günümüzde birçok biyosensör özelliğinin geliştirilmesinde basamak teşkil ettiği görölmektedir. Bu çalışmalar sayesinde günlük hayatta yaşam kalitesini artıracak birçok uygulama ve araştırma yönelik

çalışmalar yapılmaktadır. Bunun sonucu olarak yeni biyosensörler geliştirilmekte ve kullanım izinleri alınmaktadır. Ticari boyut kazandığında ise yaygın olarak birçok alanda kullanıma sunulmaktadır. Araştırmalar sonucu geliştirilen katyonik polimerler, esneklik ve kolay sentez dahil olmak üzere benzersiz özellikleri nedeniyle genleri iletmek için viral olmayan vektörler için bir araç olarak kullanılmaya değer kabul edilir. Fizyolojik olarak elektrostatik kuvvet çekimi yoluyla DNA gibi makromoleküllerle temas halindedir [29]. Yarı iletken kuantum noktalarının, makromoleküller (DNA-RNA protein) ve insan hücreleri için iyi duyarlı, basit, seçici ve hızlı büyüyen biyosensörlerin sentezi için başlangıç araçları olarak yaygın şekilde kullanıldığı görülmektedir [30]. Ancak biyosensörlerin üretimini engelleyen bazı faktörler vardır. Bunlar biyoreseptörlerin, antikörlerin ve enzimlerin uzun vadeli stabilizasyon sorunları, sensörlerin mikroptan arındırılabilmesi, canlı yapılardaki uygulamalarda biyouygunluk sorunları, diğer maddelerle spesifik olmayan adsorbsiyonlar, enzim bazlı biyosensörlerde immobilizasyon ve mediatör sorunları, gıdalardaki diğer bileşenlerden kaynaklanan etkileşimin azaltılmasındaki sorunlar, sensörlerin küçültülmesindeki sorunlar sayılabilir. Biyosensörlerde ortaya çıkan olumsuzlukları gidermek amacıyla multidisipliner yaklaşım yöntemine gerek duyulmaktadır. Bunun içinde biyologlar, kimyagerler, fizikçiler, elektrik-elektronik mühendisleri ve tasarım mühendisleri arasında işbirliği yürütülmektedirler. Yine de bu teknolojinin arzu edilen düzeyde yaygınlaşması çok uzak değildir [31]. Biyosensörlerde sterilizasyon işlemi birçok açıdan önemlidir. Korumasız olan sensör bölümünde analitten kontamine olabilecek mikroorganizma ya da enzimlerin oluşturacağı sorunlar dikkate alınmak zorundadır. Diğeri ise biyosensör materyalinden oluşan sızıntı ya da kontaminasyon etkisi ile ortaya çıkabilir. Ayrıca biyosensör hazırlığının uzun sürmesi, moleküler biyolojik süreçler hakkında yetersiz bilgi gibi sorunlar biyosensör kullanımının yaygınlaşmasının önünde önemli bir engeldir [32]. Son yıllarda, moleküler biyolojideki biyoteknolojik gelişmeler, ilk RT amplifikasyon adımını takiben döngü aracılı izotermal amplifikasyon (LAMP) gibi hızlı testlerin geliştirilmesini mümkün kılmıştır. Umut verici bir ticari LAMP tabanlı hızlı tespit testi olan ID NOWTM COVID Testi, pozitif sonuç için 5 dakika ve negatif sonuçlar için 13 dakika gibi kısa bir sürede hızlı sonuç geri dönüşü olmaktadır [33].

## **Biyochip Teknolojisi ve Uygulama Alanları**

Son yıllarda, mikroakışkanların analitik teşhis alanında yapılan birçok uygulamasının bulunduğu görülmektedir. Farklı seviyelerde disiplinlerarası çalışan araştırmacılar için mikroakışkan çip teknolojisinin yaygınlaşması ve kolay ulaşılabilir olması önemlidir. Bunun için viskozite ve elastisiteyi bir arada barındıran PDMS (Polydimethylsiloxane), organik ve hidrofobik yapılara ihtiyaç duyulur [34]. Bu yapılar günümüz teknolojisinde en çok tercih edilen mikroakışkan çip malzemesi olarak kullanılmaktadır. Bu tip mikrofabrikasyon cihazları Lab-on-a-chip (çip üzerinde laboratuvar) olarak tanımlanmaktadır. Bu entegre sistemler “Lab-on-a-chip” (LOC) veya “mikro toplam analiz sistemleri” ( $\mu$ TAS) olarak da bilinir. Mikroakışkan bazlı LOC cihazları genellikle biyomedikal araştırma ve yaşam bilimlerinde bir dönüm noktası olarak kabul edilmektedir [35]. Basit bir alt tabaka üzerinde kimyasal ve biyokimyasal laboratuvara ait önemli bileşenler yer almaktadır. Lab-on-a-chip teknolojiler, çip üzerinde aktif duylulara hakim olan yapıların tam işlevsel örneği olduğu için etken madde taşıyıcı sistemler (ilaç taşıyıcı sistemler) içerisinde önemli yere sahiptir [36]. Dünya üzerinde sağlık kaynaklarının sınırlı olması nedeniyle düşük maliyetli, taşınabilir, hızlı teşhis, kullanımı için uzman personel gerektirmeyen analitik cihazlar tercih edilmektedir. Bu gerekçeler göz önünde bulundurularak Lab-on-a-chip uygulamalarında ve diğer biyolojik analiz kullanımlarında mikroakışkan cihazlar; cam, PDMS (polidimetilsilokzan), silikon, plastik ve diğer polimerler üzerine kanallar kalıplanarak ya da aşındırılarak üretilir. Günümüzde, bu tür uygulamalarda kâğıt tabanlı mikroakışkan teşhis cihazları kullanılmaktadır. Kâğıt bazlı mikroakışkan cihaz tasarımında genellikle yüzey olarak emici, soğurucu özelliğe sahip kromatografi kâğıdı kullanılmaktadır [34]. Günümüzde biyoçipler, farklı amaçlar için birçok biyolojik analitin hızlı taranmasında kullanılan, küçük, katı destek yüzeyler üzerinde küçültülmüş test bölgeleri içeren ve sinyalin iletilmesi amacıyla yarıiletken yapıları DNA, protein, antikor gibi biyolojik maddeler kullanan eşzamanlı biyokimyasal tepkimeler gerçekleştiren tümleşik elektronik ya da mikromekanik cihaz kısımlarından oluşan bir donanıma sahiptir. Etkin yüzey alanı yaklaşık birkaç  $\text{cm}^2$  büyüklüğünde olan ve binlerce gen analizini yapabilme özelliğine sahip olan bir teknolojidir. Elektronik alanında kullanılan çipler örnek alınarak geliştirilmiştir. Bu nedenle hazırlanması esnasında kullanılan malzemeler ve kullanılan teknikler benzerlik göstermektedir. Biyoçip teknolojisini kararlı bir şekilde yanıt

vermesini sağlamak için elektronik kısmın ayarlanması iyi yapılmalı ve sistemin takip edilmesinin sağlanması gerekir [37].

Canlılardaki biyokimyasal olayları yürüten protein ve birçok biyomolekülün (Polisakkarit ve nükleik asitler gibi) tanınması, sahip oldukları fonksiyon ve etkileşimlerin açığa çıkarılması için yeni yöntem ya da tekniklere ihtiyaç duyulmaktadır. Bu amaçla geliştirilen Biyoçip/biyosensör teknolojisi en önemli alanlardan sayılsa da henüz kendisinden istenilen ölçümleri kolay, hızlı, duyarlı ve ekonomik boyutta yerine getirmek için yeterli sayıda yöntem ve cihazları kapsayacak düzeye ulaşamamıştır [38]. Günümüzde biyoçip hazırlama yöntemlerinden biri olan ve kendiliğinden düzenlenen tek tabakalı (self assembled monolayers) farklı yüzeyler üzerinde gerçekleştirilen nanoboyutlu tasarımlara ait araştırmalar yapıldığı görülmektedir. Herhangi bir çevresel değişimin etkisi olmaksızın kendi kendine oluşabilen düzenleme yöntemleri, biyoçip teknoloji uygulamalarında önemli bir kıstas olarak karşımıza çıkmaktadır. Yüzey üzerine yapılan çeşitli uygulamalarda izlenecek yolun ortam etkilerinden uzak olması gerekmektedir. Ayrıca işlemlerin kolay gerçekleşmesi, kullanılan yöntemin ucuzluğu, moleküle ilgili düzenlemeler ve istenilen tasarımlar diğer dikkat edilmesi gereken unsurlardır [39]. Bu yeni teknoloji üzerindeki ilk uygulamanın, meme kanseri üzerinde yapıldığını görmekteyiz. Çünkü meme kanseri bugün kadınlar arasında en sık görülen kanser çeşididir. Yaklaşık olarak her on kadından biri, yaşamının belli bir periyodunda meme kanserine yakalanma riski taşımaktadır. Bu sebeple, meme kanseri tanısında alışıl gelen düzen içinde yapılan fiziksel muayene, ultrasonografi ve mamografi gibi tetkikler önemlidir [40].

Biyoçip teknolojisinde gerçekleştirilen ilk ticari ürün Gene Chip ® adlı Affymetrix firmasının Lipshutz ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışma üzerine kurularak geliştirilen DNA çip'idir. Günümüzde hem DNA hem de protein çipleri üreten birçok şirket faaliyet göstermektedir. Bu firmaların elektronik alanı için ürettikleri çiplerde biyoçip malzemesi olarak uzun yıllardır silikon kullandıkları görülmektedir. Ayrıca, cam, silisyum dioksit (SiO<sub>2</sub>) ve plastik gibi malzemelerin kullanımları da söz konusudur. Çip yüzeyinde bulunan moleküllerin özelliklerini ve kimyasal tepkimeleri belirlemek amacıyla tespit edilebilen moleküler yapılar kovalent bağlarla bağlanmaktadır [41]. Biyoçiplerin oluşturulması esnasında takip edilen diğer bir adım ise tespit edilebilen moleküllerin yüzeye yerleştirilmesidir. Bunun için çeşitli kimyasal ajanlar

(Biyolojik, kimyasal ya da fiziksel değişiklik yapma becerisine sahip) içinde buldukları moleküllerin karakteristik kimyasal reaksiyonlarından sorumlu belli atom gruplarını aktif ederler ve tespiti yapılabilen moleküllerin kimyasal tepkimeyle yüzeye kovalent bağlanmasını sağlarlar. Çip yüzeyinde herhangi bir aynalı araçla ekran üzerinde oluşturulan yüzlerce görüntü bölgesi (spot) bulunur. Her bir spot da binlerce aynı tür tespiti yapabilen oligo elementler bulunmaktadır. Oligo element (demir, bakır, iyot, çinko, mangan, selenyum, krom, kobalt ve molibden) türü sadece noktadan noktaya (spottan-spota) değişir. Örneğin, bir DNA çipinde böyle bir yapıyı oluşturmak için önemli üç teknik kullanılır. Birinci teknik fotolitografi yöntemidir. Bu yöntem elektronik mikroçip hazırlamada yaygın olarak kullanılan bir tekniktir. İkincisi mikrosptlama diğeri ise mürekkep püskürtme (ink jet) yöntemidir [42]. Tespit edilebilir oligoları taşıyan çiplerin hazırlanması son işlem basamağı ise ölçüm yapacak düzeneğin hazırlanmasıdır. Bunun için tanısı yapılacak DNA molekülleri önce açılan DNA zincirlerinin tekrar birleşmesini engelleyen tek sarmal zincirler haline dönüştürülür ve daha sonra işaretlenir. Bu işlemler için yaygın olarak lazere duyarlı fluorasan maddeler kullanılır. Tanısı yapılacak olan yapay olarak çoğaltılmış ve DNA problemleri olarak hazırlanmış özel DNA karışımı çip üzerine konur, niteliği araştırılacak olan hedef DNA molekülü ile birleştirme süreci gerçekleştirilir. Bu işlem sonucu DNA yüzeyde eşleniği bulunduğunda, tam hibridizasyon işlemi gerçekleşmiş olur. Daha sonra elde edilen veriler belirli bir işlemi yapmak üzere hazırlanmış programlar yardımıyla kullanıma hazır hale getirilir [43]. Lazerin, mikroçip teknolojisinde kullanılmasıyla geliştirilen teknoloji sayesinde, biyopsi analizlerinde hücre yüzey markırları profili tespit edilmektedir. Bu sayede hücre yüzeyinde yer alan peptid ve küçük moleküler yapılar dinamik olarak incelenebilmektedir. Tüm bu veriler incelendiğinde, hücre hatlarında farklı evrelerde birçok hücre membranına ait moleküllerin dinamik incelenmesi mümkün olduğu görülmektedir [44]. DNA yapısında bulunan genler ve bunların dizilimleri biyoçipler yardımıyla bulunabilir. Kriminolojik araştırmalarda çok hızlı olarak DNA testi yapılabilir ve suçlu belirlemede kullanılabilir. Hastalıklarda ortaya çıkacak olan mutasyonlar incelenerek tanı koyulabilir. Gen ekspresyon kontrolü ve düzenlemesi zaman içerisinde nasıl değiştiiği incelenerek hastalığın gelişmesi/gerilemesi takip edilebilir. Geliştirilen yeni ilaçların olası toksik etkileri hızlı bir şekilde izlenebilir. İlaçların farmakolojik etkilerinin tespiti kolayca çip üzerinde yapılabilir.

Günümüzde RNA bazında da önemli araştırmalar yapılmaktadır. RNA bazında yapılan çalışmalarda gen ekspresyonuna ait çalışmalar ön plana çıkmaktadır. Doğum öncesi ya da doğum sonrası tanı gibi rutin genetik uygulamalarda kullanılmaktadır. Günümüzde tüm genom polimorfik belirteçlere bakılarak uniparental dizomi (bir kromozom çiftinin her 2 üyesinin de bir ebeveynden gelmesi) tespit edilmektedir. Genomic imprinting (Genomik baskılanma), genin anneden ve babadan gelmesine bağlı farklı hastalıkların görölmesine yardımcı olmaktadır. Tüm bu bulgular, halen tüm rutin uygulamalara girmese de, proteinlerin analizinde biyoçiplerin önemli bir rolü olacağının habercisidir. Özellikle, oklu markırların çalışılacağı panellerin, birçok hastalığın tanı ve tedavisinin takibinde önemli ipuçları ortaya koyacağı açıktır [45].

Bir organizma ya da dokunun genomu tarafından ifade edilen protein araştırmalarda kullanılmak üzere protein çipler geliştirilmiştir. Gelişmiş teknolojiler kullanılarak çipler oluştururken tespit edilebilir olarak yüzeye yerleştirilen proteinlerin üç boyutlu yapıları bozulmamalıdır. Çünkü proteinin tamamının bir ligand olarak kullanmak yerine, aktif bölgeleri, yani oligopeptidlerin yapay olarak yapılması, peptit kütüphanelerinin oluşturulması ve protein çiplerinde kullanılması söz konusudur. Biyoçipler tasarlanırken mikrofabrikasyon teknikleri kullanılarak mikrokanallar cam, silikon ya da polimer üzerinde oluşturulur. Oluşturulan bu mikrokanallar sayesinde ip içindeki sıvıların hareketi, karıştırılması ve işlenmesi gibi yöntemlerle gerçekleştirilir. Biyoçip içerisine elektronik yapılar monte edilerek analitik ölçümlerin yapılması sağlanır. Elektronik yapılar optik metodlar kullanılarak ip üzerine yerleştirildiğinde, gerçekleşen olaylar gözlemlenir ve ölçümler yapılabilir. Biyoçipler sayesinde kimyasal ayrıştırmalar (elektroforez, kromatografi gibi) yapılabildiği gibi, klinik analizi, DNA analizi, protein analizi, kimyasal maddelerin sentezi ve analizi, toksik (zehirli) yapıların tespiti gibi birçok işlem yapılabilir [46].

Bu teknolojilerin en önemli uygulamaları, hastalıkların teşhis ya da ilerleyişinde kullanılan pratik ve hızlı testler geliştirilmesidir. Günümüzde biyoiplerle çok hızlı ve ucuz bir şekilde DNA testleri yapılmaktadır. Hızlı, pratik, ucuz, seçici ve yüksek hassasiyetle ölçme imkân sunan iyi bir alternatif teknoloji olarak karşımıza çıkmaktadır. Son yıllarda triptamin tayini için yapılan çalışmalarda ise, karbon nanomateryallerin kullanımına dayalı çalışmalar yapılmaktadır [47]. Nanomalzemelerin, viral antijenlerin veya DNA veya RNA gibi moleküllerin doğrudan uygulanması dahil olmak üzere, aşılama

bağlamında immün hedefli nanoterapötikler yoluyla, antijene özgü bir şekilde bağışıklık sisteminin düzenlenmesine yardımcı olabileceği farklı stratejiler vardır [48]. Örneğin, SARS-CoV-2 S-glikoprotein ile birleştirilmiş nanopartiküllerin kullanımının, bir fare modeli kullanılarak bu patojene karşı kesin bir antikor tepkisi oluşturabileceği öne sürülmüştür [49]. Biyoçip teknolojisi sayesinde binlerce gen tahlili, yapılabilmektedir. Geliştirilen bu yeni teknolojinin amacı tek çip üzerinde tüm genomun izlenmesi ve aralarındaki etkileşimin belirlenmesidir. Sağlık alanında kullanılan bu teknolojinin esası biyosensör yapıları dayanmaktadır. Biyoçip teknolojilerinden önce yapılan çalışmalar sonucu birçok farklı biyosensör üretimi gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalar biyoçip teknolojisinin alt yapısını teşkil etmektedir. Klinik uygulamalar için küçük boyutlarda tasarlanıp üretimi gerçekleştirilen cihazlara ait ilk çalışmalar, Amerika Birleşik Devletlerindeki Clinical Micro Sensors (CMS) adlı Amerikan şirketi S. Mikkelsen'in kullandığı teknolojinin lisansını alması ile başlamıştır. Böylece DNA mikroçiplerinin klinikte kullanımının ilk adımları atılmış ve kullanıma sunulmuştur [50]. Tüm bu çalışmalar çok yakın bir gelecekte elektrokimyasal DNA mikroçiplerinin kullanımını daha yaygın bir hale getirecektir. DNA çipler sayesinde genomics kapsamında çalışmalar yapmak mümkün olacaktır. Hastalık esnasında ortaya çıkan mutasyonları izlemek, tanı koymak, gen görünümünün zamanla nasıl değiştiği (gelişmesi/gerilemesi) kontrol etmek mümkün olacaktır [51].

Mikroorganizmaların neden olduğu olaylarda kullanılmak üzere oluşturulan DNA problu çipler üretildiğinde çoğu bulaşıcı hastalıkların tanısı kolaylaşacaktır. Bu tür çipler sayesinde tüm bakteriyel ilaç direnç genleri hazırlanabilecek, patojen ve konakçı kromozomal hastalıklar belirlenecek ve hasta ile uyumlu en elverişli ilaç listesi oluşturabilecektir. Ayrıca tedaviye verilen yanıtı değerlendirme özelliğine sahip biyoçip tasarım çalışmaları yapıldığı da görülmektedir. Mikroorganizmanın belirlenme süresinin kısalması sonucu klinik mikrobiyolojik acil durumlar artık sorun olmaktan çıkacaktır. Bu moleküler laboratuvarlar otomatik olarak mikropompalar, mikro mikserler ve sensörler ile filtreler ve optik dedektörler içeren Micro Total Analysis System (mikro toplam analiz sistem) adı verilen yeni analiz sahası fikrini geliştirmiştir [52].

Günümüzde kullanılan diğer bir mikroçip ise protein mikroçiplerdir. Protein mikroçip teknolojisinde temel amaç, özel hazırlanmış bir lam üzerindeki protein bilgilerinin, uygun yöntemler ile bir bilgisayar yazılımına aktarılması ve ekranda görüntülenmesidir. Bu

teknoloji geliştirilerek kullanılan yöntemler iki grup ayrılmaktadır. Birincisi tek bir protein ürününe özgün olarak geliştirilen sistemler diğeri ise tüm proteinlerin birlikte kullanıma alınmasına özgün kullanımlar. Kullanılan proteinlere ait bilgiler, uygun bilgisayar yazılımları sayesinde işlenir ve elde edilen veriler farklı hastalık uygulamalarında ne gibi değişiklikler göstereceği incelenir [53]. Belli bir proteini bulmak için hazırlanan protein dizisi yönteminde biyolojik materyal, çoğunlukla bir idrar ya da kan olmaktadır. Uygun koşullarda hazırlanan örnek lamlardaki proteinlerin varlığı, mikroarray teknolojisi kullanılarak araştırılmaktadır. Özellikle çip teknolojisi ve mikroakış sistemlerinin gelişmesi ile öne çıkan mikroarrayler (mikrodiziler), birden fazla örneği aynı anda analiz etme yeteneğinden dolayı tıbbi tanı alanında kullanılmaya başlanmıştır. Yüksek spesifik özelliklerinden dolayı DNA-RNA veya spesifik bir hedef moleküle bağlanan yapılar (oligonükleotid veya peptit molekülleri) ile kombine edilen mikroarrayler, birçok genetik hastalığın, nokta mutasyonunun, ilaç ve zehrin belirlenmesinde yaygınca kullanımı söz konusudur [54]. Bulunmak istenen proteinlere yüksek oranda bağlanabilme özelliği sağlayan moleküller elde edilmektedir. İyi bir molekül, istenen proteine bağlanmalı ve yıkanmadan etkilenmemelidir. Bu işlem için en uygun antikor seçimi yapılmalıdır [55]. Hala kendini kanıtlama aşamasında olan yeni bir teknolojidir. Günümüzde mikroçip teknolojisi sayesinde 3 boyutlu yazıcılar geliştirilmiştir. Geliştirilen bu 3 boyutlu yazıcıların hayatımızın her noktasına girmesiyle köprüden bina yapımına, makine parçasından implant malzeme üretimine kadar birçok alanda kullanılmaya başlanmıştır. Özellikle sağlık alanında birçok uygulaması mevcuttur. Bu teknoloji geliştiği takdirde medikal alanda birçok yeniliğin öncüsü olacağı düşünülmektedir. Günümüzde kullanılan pek çok implant malzemesinin 3 boyutlu yazıcıdan çıktısı alınarak üretimleri yapılmaktadır. Yapılan üretim çalışmaları sayesinde hastalara özel titanyum kemik parçaları, ortodontik kullanıma uygun malzemeler ve protezler daha kullanışlı hale gelecektir. Aynı şekilde kulak, burun ve benzeri organların daha mükemmel olacak şekilde yapımı da mümkün olmaktadır. Üç boyutlu yazıcılar ile üretilen hastaya özgü sentetik biyoürünlerin kullanılması ilgi çekici ve heyecan uyandırıcı örneklerdir [56]. Günümüzde 3 boyutlu yazıcı teknolojileri sayesinde doku mühendisliği ve tıp alanında yaşanan gelişmeler sonucu yapay hücre iskeleti, yapay doku ve organ oluşturulması gibi araştırmalar yoğun çalışmalara sahne olmaktadır. Bu alandaki uygulamalar incelendiğinde kemik, karaciğer ve yapay deri üretimi gibi birçok dokuya



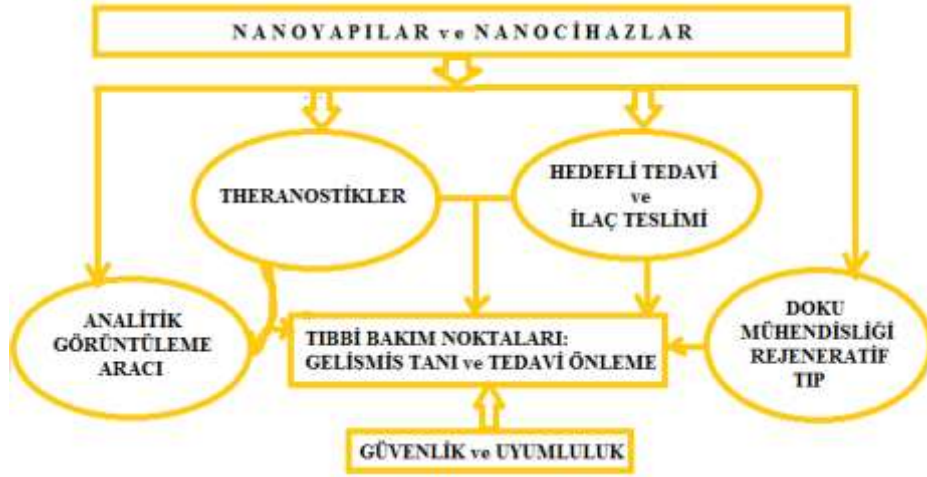
başarıyla uygulandığı görülmektedir. 3 boyutlu yazıcılardaki tüm süreç robotik olarak yapıldığından laboratuvarında istediğiniz organın tomografi verisinin işlenmesi, robotik sistemle kan alınması, diş hekimliğinde robotik uygulamalar gibi birçok akıllı sistem yakın gelecekte sağlık alanında daha fazla yer alacaktır. Hastalığımızla ilgili birçok bulgu vücudumuzla ilişkilendirilmiş bulunan mikro robotlar aracılığıyla ilacın zamana bağlı olarak otomatik dozu belirlenerek uygun miktarlarda salınabilmektedir. Günümüzde kullanılan gelişmiş ilaç tarayıcılar sayesinde ciltteki yara analiz edilmekte ve zarar görmüş deriyi kaplamak için 3D (3 boyutlu) yazıcıdan suni bir deri oluşturma çalışmaları yapılabilmektedir. Yakın gelecekte savaş alanında yaralanan askerlerin tedavisi için kullanılacak bir boyut kazanacağı düşünülmektedir. Oxford Üniversitesi'nde çalışan araştırmacılar gelecekte organ oluşturmak için kullanılacak insan kök hücrelerini 3D yazıcı kullanarak üretmek için çalışmalar yapmaktadır. Bu, yakın gelecekte insanların ihtiyaç duyduğu organların insan vücudu ile uyumlu olarak 3D yazıcılarla üretilbileceği anlamına gelmektedir [57, 58].

MEMS cihazları, küçük boyutları, kısa süreli çalışabilme yetenekleri ve fizyolojik olarak ilgili koşullar altında hareket etme kabiliyetleri nedeniyle, biyolojik uygulamalar için özellikle çekici olan analitik platformların üretimi için benzersiz bir fırsat sağlar. MEMS'ler için en popüler malzeme yarı iletkenler için kullanılan fiziksel ve ticari özelliklerinden dolayı silikondur. Genellikle MEMS teknolojisi ortak bir silikon yüzey üzerinde mekanik elemanlar, sensörler, motorlar ve elektrik-elektronik cihazlardan oluşmaktadır. MEMS sensörleri; mekanik, termal, biyolojik, kimyasal, optik, manyetik vb. ölçümlerle çevreden verilerin toplamasında günümüzün vazgeçilmez teknolojileri arasındadır. Tehlikeli kimyasal ve biyolojik ajanları tespit etmek için biyoçiplerde, yüksek verimli ilaç tarama ve seçim için mikro sistemlerde ve vücut içi veya dışı implantlarda kullanılır. BioMEMS, biyolojik veya biyomedikal uygulamalara sahip MEMS'in bir alt kümesidir. Bu minyatürleştirilmiş cihazlar, mikrofabrikasyon teknolojisinden esinlenen üretim tekniklerini kullanır. Biyolojik veya kimyasal örneklerin işlenmesi, dağıtımı, manipülasyonu ve analizi ve / veya yapımı bu mikro cihazlarda yer almaktadır [59]. DNA ve protein mikro dizilerindeki teşhisler, mikroakışkan platformları, kalp pilleri, biyosensörler, ilaç dağıtım sistemleri vb. Gibi BioMEMS uygulamalarına ilgi çok hızlı bir şekilde artmaktadır [60]. Uyarıcı nöral implantlar, kör hastaların tedavisi için retina implantları ve fiziksel ağrıdan muzdarip

olmayı önlemek için aşılama için mikroığneler BioMEMS uygulamalarının bazı örnekleridir. BioMEMS teknolojisinin biyoteknolojideki son gelişmelerle (ör. genomik, proteomik, doku mühendisliği) birleşmesiyle birlikte, BioMEMS cihazlarının uygulamalarını geliştirmek için heyecan verici fırsatlar sağlar. BioMEMS tespit (örn, Antikor tespiti, bakteri tespiti, viral tespit), analiz (örn. bakteri ve antibiyotik duyarlılığının belirlenmesi), teşhis (örn. kanser ve otoimmün hastalıklar), izleme (şeker hastalarında kan şekeri izleme), ilaç dağıtımı (örneğin, antibiyotiklerin uygulanması), hücre kültürü (örneğin, OOC platformları), mikroteknolojilerdeki gelişmelerle elde edilen pratik uygulamalardan bazılarıdır [61]. Tıpkı bilgisayar devrimlerinde mikroişlemcilerin önemli rolü gibi, BioMEMS cihazları da biyomedikal biliminin geleceğinde önemli bir role sahiptir. BioMEMS teknolojisi, çeşitli biyomedikal uygulamalara sahip minyatür cihazlar geliştirmek için doktorların, biyolojik bilimcilerin, elektrik, mekanik, kimya ve malzeme mühendislerinin yenilikçi yeteneklerini bir araya getirir [62].

Hastalıkların moleküler ve hücresele biyolojisinin iyi anlaşılması sayesinde yeni ligantların (ilaç taşıyıcı sistemleri) kullanılması sonucu hastalıkların etkin ve akılcı bir şekilde tedavileri yapılabilecek teknolojiler geliştirilmektedir. Teknoloji ve malzeme bilimindeki gelişmeler sayesinde ilaçların mikroçiplerde depolanması ve bu ilaçların dış sinyaller sonucunda vücutta salınması gibi işlemler daha güvenli bir şekilde gerçekleştirilecektir. Bu mikroçiplerin küçük rezervuarlarında depolanabilen sınırlı miktardaki ilaçlar nedeniyle fazla miktarlarda ilaç gerektiren tedaviler için yeterli değildir. Bu istenmeyen durumun aşılması için çalışmalar günümüzde tüm hızı ile devam etmektedir. Biyoçip tarafında erken salınan ya da geciktirilen bir ilaç sağlık açısından riskler oluşturabilir. Daha kullanışlı ve gelişmiş biyoçip yapılar elde edebilmek için yoğun çalışmalar yapılmaktadır. Bu çalışmalardaki gelişmeler ivme kazandıkça önemli birçok hastalığın tedavisi yapılabilecektir. İlaç salım mikroçipleri Biyo MEMS denilen biyolojik mikroeletromekanik sistemlerdir. Salım mekanizması katı, sıvı ya da jel formundaki kimyasallarla doldurulmuş mikrodepoların ince bir altın membranla kaplanması sonucu elde edilirler. Bu minyatür yapılı cihazlar Lab-on-a- chip olarak tanımlanır [63]. İlacın hedeflenen bölgeye taşınması farmasötik ve biyoteknolojik alanların en büyük sorunlarından biridir. Bu nedenle ilaç dağıtım sistemleri her zaman araştırmacıların ilgisini çekmiştir. Biyoteknoloji alanındaki yeni gelişmeleri diğer bilim dallarındaki araştırmalar etkilemiş, bu sayede birçok yeni ilaç bulunmuş ve kullanılacağı

ortam için elverişli bir şekilde tasarlanarak üretimi gerçekleştirilmiştir. Vücudun dışına yerleştirilen ve buradan vücutla etkileşime giren farklı özelliklere sahip farmasötik ürünler ve biyoteknolojik cihazlar biyomalzeme olarak sıklıkla kullanılmaktadır [64]. Geliştirilen ilaçların çoğu, zayıf çözünürlük, zayıf çözünürlük nedeniyle ilaç birikimi, yüksek toksisite, yüksek doz, spesifik olmayan taşıma, in vivo degradasyon ve kısa yarılanma ömrü nedeniyle kullanımları sınırlandırılmıştır. Günümüzde, ilaçların kullanım problemlerini en aza indirmek ve yeni gelişmeleri klinik etkinliğe dönüştürmek için birçok araştırmacı belirli yeni ilaç dağıtım sistemleri geliştirme çabası içerisine girmişlerdir. Günümüz hedeflendirilmiş ilaç dağıtım sistemlerde ilaçlar daha etkilidir. Bu teknoloji sayesinde ilaçlar vücudun istenilen bölgesine daha pratik bir şekilde ulaştırılır, hasta uyumu artırılır, ilacın yarı ömrü uzatılır ve sağlık bakım maliyetleri düşürülür. Bu nedenle, patolojik hücre, doku veya organ ilaçları seçici olarak taşıyabilen tekniklerin geliştirilmesi ilaç araştırmalarında en önemli alanlardan biri haline gelmiştir [65]. İlaç taşıyıcı sistemlerde oluşabilecek arızalar dikkat edilmesi gereken hususlardan birisidir. Sonuçta bu sistem bir biyoçip yapılı elektronik cihazdır. Zaman içerisinde hatalı çalışma riski olabilir. Bununla birlikte, bu cihaz bir ilaç taşıyorsa erken veya aşırı dozda ilaç salınımı çok ciddi sorunların ortaya çıkmasına neden olabilir. İlaç taşıyıcı sistemler vücutta çözünemeyen bir malzemedan yapılmış olduğundan işlevleri bittiğinde dışarı çıkarılmaları gerekmektedir. İlaç rezervlerini boşaltmış bir ilaç taşıyıcı sistemin vücut içerisinden çıkarılması gerekir. Bu da ikinci bir cerrahi operasyon anlamına gelmektedir [66]. Günümüzde bu süreci önlemek için vücutta zararlı kalıntı bırakmayan biyolojik olarak parçalanabilen cihazların üretimi konusunda çalışmalar yapılmaktadır. Bu gerçekleştiğinde sorun ortadan kalkacaktır. Nanoteknoloji alanındaki gelişmeler sonucu birçok uygulaması bulunan nanopartiküllerin ilaç sektöründeki kullanımı artacaktır. Nanoteknoloji nanopartiküller, nanokapsüller, miseller ve dendrimerler içindeki tedavi ile ilgili genel özelliklerin bilinmesine odaklanır. Bu yapılar, hastalıklı bölgeye hedeflenen ilaç dağıtımına izin verir. Nanopartiküller, birçok hastalığın teşhis ve tedavisinde kullanılma potansiyeline sahiptir [67]. Nanotıpın farklı biyomedikal araştırma alanlarında uygulanması ve hedefleri şekil 3'de gösterildiği gibidir.



Şekil 3 Nanotıp hedefleri [68]

İlaç taşıyıcı sistem teknolojisi çok yakın zamanda hayatımızda daha fazla yer alacaktır. Sağlık alanındaki çeşitli bilim dallarının nanoteknoloji uygulamaları için yaptıkları çalışmalar yaygınlaştıkça yeni ilaçlar geleneksel ilaçların yerini alacaktır. Tüm bu gelişmeler, halen rutin kullanıma girmese de, hastalıkların analizinde ve ilaçların salınımında biyoçiplerin önemli bir rolü olacaktır. Bu süreçte çeşitli etken maddelerin parçalanmasını ve kaybını en aza indirmek, zararlı yan etkilerini önlemek, biyoyararlanımını ve biyoyumluluğunu artırmak, çeşitli etken madde salım sistemlerini ve hedefleme sistemlerini geliştirmek kaçınılmaz olacaktır [69]. Biyoçiplerin uygulanacağı bölgeye yerleştirilebilmesi için bir cerrahi operasyona (ameliyat) ihtiyaç duyulacaktır. Bu da enfeksiyon riskini beraberinde getirmektedir. Bu nedenle hijyen koşulları ve cerrahın yeterliliği son derece önemlidir. Ayrıca biyoçip cihazın yerleştirme işleminin başarısı en üst seviyede olmalıdır. Çünkü cihazın uygulandığı bölgede hastaya rahatsızlık vermemesi gerekmektedir. Hasta uygulamaların yan etkisinden en asgari seviyede etkilenmelidir. Kullanılan malzemenin uygulandığı bölgedeki uyumu da önemlidir. Vücut içerisinde istenmeyen yan etkilere yol açmayan, biyoyumlu malzemeler kullanılmalıdır. Uzun süre vücutta kalacak olan bu mikroçipler biyoyumlu malzemelerden yapılmış olması gerekmektedir. Aksi takdirde sağlık açısından riskler ortaya çıkabilir. Bu nedenle çiplerle birinci dereceden ilgilenen biyomalzeme bilimi kurulmuştur. Bu alanda daha uyumlu biyomateryal üretilmesi için çalışmalar devam etmektedir [70].

## Sonuç ve Öneriler

Bugün bütün insanların dâhil olduğu bir teknoloji çağında yaşıyoruz. Öyle ki çocukların elektronik aletlere olan yatkınlıkları hayret uyandıracak düzeydedir. Dolayısıyla elektronik cihaz kültürü toplumlarda hızla gelişmektedir. Elektronik cihazlarla her geçen gün daha fazla içli dışlı oluyoruz. Örneğin cep telefonlarımıza o kadar güveniyoruz ki artık ödemelerimizi bile onlar üzerinden yapıyoruz. Bu anlamda geleceğe bakarsak bir sonraki adımın bedenlerimizi elektronik cihazlara emanet etmek olacağı öngörüsü yanlış olmayacaktır.

Biyosensör ve biyoçip teknolojileri bazı temellere dayanmaktadır. Bu temelleri inceleyen disiplinlerdeki gelişmeler, biyosensörlerin ve biyoçiplerin geliştirilmesine de imkân sağlamaktadır. Araştırmalarda yapılan gözlemlerin elde edilebilirliği, zamanında müdahaleye imkân sağladığından, sağlık alanında büyük çaplı üretimler esnasında oluşan risklerin en aza indirilmesinde, iş gücü ve hammadde kaybının önlenmesi önemlidir. Sağlık alanında kısa sürede spesifik ve hassas sonuçlara ulaşılması, genel olarak kullanımı kolay, kullanım için fazla eğitime gerek duyulmaması, gelecekte yoğun bir şekilde kullanılacağı anlamına gelmektedir. Gelecekte hasta başında ya da doktor gözetiminde daha hızlı, daha güvenilir ve daha ucuz analizlerin yapılmasına imkân sağlayacak önemli adımlar atılmaktadır. Analizlerine dayalı tasarlanan ya da yeni sentezlenecek olan antibiyotik, antiviral, antikanser ilaç ve ilaç taşıyıcı sistem çalışmaları önem kazanacaktır. İlaç hammaddesinin daha duyarlı olarak tayinini yapmak amacıyla geliştirilecek biyosensör ve biyoçip teknolojileri yoğun gelişmelere sahne olacaktır.

Bugün bu teknolojiler; klinik teşhis ve tıbbi uygulamalarda, gıda kalite kontrollerinde, ilaç üretiminde, atık su kontrolünde ve askeri savunma sanayinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca yaşam kalitesini yükseltmek amacıyla birçok uygulama ve araştırmada vazgeçilmez bir analiz ve tayin cihazı olarak kullanılmaktadırlar. Minyatür yapılar oluşturulması amacıyla nanoteknoloji alanındaki çalışmalar ivme kazanacaktır. Nanopartiküllerin tedavi amaçlı kullanımları ve karşılaşılan sorunlar kapsamlı olarak ele alınacaktır. En etkin tedavi yöntemlerinin oluşturulabilmesi için bilim dünyasında ar-ge çalışmaları tüm hızıyla devam etmektedir. Lab-on-a- chip cihazlar, bir çip üzerinde aktif duylara sahip sistemlerin tam işlevsel bir örneği oldukları için etken madde taşıyıcı sistemlerde daha verimli kullanım alanlarına kavuşacaktır. Biyomalzeme biyosensör ve

biyoçip alanında yerimizi almamız ülkemiz açısından oldukça önemlidir. Bu çalışmaların gerisinde kalmak yaşam standardımızı açısından oldukça önemlidir.

### Kaynaklar



1. Coulet, P.R., What is a biosensor? Biosensor Principles and Applications. L. J. C. Blum, ed. New York, NY: Marcel Dekker, 1991.
2. Malhotra, S., et al., Biosensors: principle, types and applications. Int. J. Adv. Res. Innov. Ideas Educ. 2017. 3 (2):3639-3644.
3. Turner, APF., Current trends in biosensor research and development. Sensors Actuators 1989. 17:433-450.
4. Rajendran, M., and A.D., Ellington. Chapter 12: Nucleic acids for reagentless biosensors. Optical Biosensors-Present & Future, 369-396. F. S. Ligler, and C. A. R. Taitt, eds. Amsterdam, Netherlands: Elsevier. 2002.
5. Erdem, A., and Ozsoz, M., Electrochemical DNA biosensors based on DNA drug interactions. Electroanalysis, 2002. 14,965-974.
6. Verma, N., and Bhardwaj, A., Biosensor technology for pesticides - a review. Appl. Biochem. Biotechnol. 2015. 175, 3093-3119.
7. Sang, S., et al., The development of new unlabeled techniques for biosensors: a review. Critical. Rev. Biotechnol. 2015. 15, 1-17.
8. Nakamura, H., and Karube, I., Current research activity in biosensors. Anal. Bioanal. Chem. 2003. 377:446-468.
9. Lorenzo, N., et al., Laboratory and field experiments used to identify *Canis lupus var. Familiaris* active odor signature chemicals from drugs, explosives, and humans. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2003. 376:1212-1224.
10. Su, L., et al., Microbial biosensors: a review. Biosens Bioelectron. 2011. 26:1788-99.
11. Fritz, J., et al., Biosensorbased label-free assays of amyloid growth. Science. 2000. 288:316-318.
12. Rasooly, A., Biosensor Technologies, 2005. 37(1):1-3.
13. Berepiki, A., Kent, R., Machado, L.F.M., Dixon, N., Development of high- performance whole-cell biosensors aided by statistical modeling. ACS Synth. Biol. 2020, 9, 576-589
14. Pişkin, E., Sağlık için biyoteknoloji, Biotek, 2002. 6,1.
15. Arvas Y., Kaya Y., Genetiği Değiştirilmiş Bitkilerin Biyolojik Çeşitliliğe Potansiyel Etkileri. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi. 2019; 29(1): 168-177.
16. Kırkinci, SF., Maraklı, S., Aksoy, HM., Özçimen, D., Kaya, Y., Antarktika: Yaşam Bilimleri ve Biyoteknoloji Araştırmalarının Gözden Geçirilmesi. International Journal of Life Sciences and Biotechnology, 2021. 4(1):158-177. doi: 10.38001/ijlsb.853472.
17. Tang, X., et al., Carbon Nanotube DNA Sensor and Sensing Mechanism. Nano Letters, 2006. 6(8): pp. 1632-1636.
18. Pan, Y., et al., Electrochemical immunosensor detection of urinary lactoferrin in clinical samples for urinary tract infection diagnosis. Biosens Bioelectron, 2010. 26, 649-54.
19. Lobo, MJ., et al., Review, Amperometric Biosensors Based on NAD(P)-Dependent Dehydrogenase Enzymes. Electroanalysis, 1997. 9(3): pp. 191-202.
20. Mulchandani, A., Enzim and microbial biosensors techniques and protocols, Methods in Biotechnology, Ed: Mulchandani, A., Rogers, K.R., Humana press Inc, Totowa, 1998, 3-11.
21. Wangner, G., and Guibault, G.G., Food Biosensor Analysis. New York, NY: Marcel Dekker. 1994.
22. Clark, JrLC., and Lyons, C., Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. Ann. N.Y. Acad. Sci. 1962, 105: 20-45.
23. Akyılmaz, E., et al., Investigation of metal activation of a partially purified polyphenol oxidase enzyme electrode. Int J Environ Anal Chem, 2007. 87,755-61.
24. Touhami A., Biosensors and nanobiosensors: design and applications. Nanomed. 2014. 15,374-403.
25. Noh, J., et al., Nanoporous platinum solid-state reference electrode with layer-by-layer polyelectrolyte junction for pH sensing chip. Lab Chip, 2011. 11,664-71.
26. Arlett, J.L., et al., Comparative advantages of mechanical biosensors. Nat Nanotechnol, 2011. 6,203-15.
27. Turna, Ö., Aminoasit biyosensörlerinin geliştirilmesi. (Y.Lisans Tezi), Ondokuz Mayıs Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü, Samsun. 2005.

28. Zhang, S., et al., Materials and techniques for electrochemical biosensor design and construction. *Biosens Bioelectron*, 2000. 15,273-282.
29. Rai, R., et al., Polymeric nanoparticles in gene therapy: new avenues of design and optimization for delivery applications. *Polym*. 2019. 11 (4): 745.
30. Ma, F., et al., Development of quantum dot-based biosensors: principles and applications. *Mater. J., Chem, B* ., 2018. 6(39): 6173-6190.
31. Deshpande, S.S., and Rocco, R.M., Biosensors and their potential use in food quality control. *Food Technology*, 1994. 146-150.
32. Prodromidis, M.I., and Karayannis, M., Enzyme based amperometric biosensors for food analysis. *Electroanalysis Vol*, 2002. 14(4):241-261.
33. Hogan, CA., Garamani, N., Lee, AS., Tung, JK., Sahoo, MK., Huang, C., Stevens, B., Zehnder, J., Pinsky, BA., Comparison of the accurate SARS-CoV-2 test with a laboratory-developed assay for detection of SARS-CoV-2 RNA in clinical nasopharyngeal specimens. *J Clin Microbiol*. 2020. 58(8):e01072-e1120. <https://doi.org/10.1128/JCM.01072-20>
34. Li ,X., et al., Thread as a Versatile Material for Low-Cost Microfluidic Diagnostics. *Applied Materials and Interfaces*, 2010. 2(1): 1-6.
35. Convery, N., and Gadegaard N., 30-year microfluidics. *Micro Nano Eng*. 2019. 2, 76-91.
36. Razzacki, SZ., et al., Integrated microsystems for controlled drug delivery. *Adv. Drug. Deliv. Rev*, 2004. 56,185-198.
37. Silindir, M., et al., Liposomes and their applications in molecular imaging. *J Drug Target*. 2012. 20:401-16.
38. Nikhil, B., et al., Introduction to biosensors. *Essays in Biochemistry*, 2016. 60(1):1-8.
39. Demirel, G., Si (100) yüzeyler üzerine kendiliğinden düzenlenen biyolojik aktiviteye sahip tabakaların tasarımı. *Doktora Tezi, Gazi Üniv. Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara*, 2006. 4, 75.
40. Vo-Dinh, T., DNA Chips: technology and applications, *Clinical Laboratory International*. 2001. 45:12-5.
41. Venkatesan, M., and Jolad, B., Nanorobots in cancer treatment, *Emerging Trends in Robotics and Communication Technologies*. 2010. 258-8.
42. Lucchini, S., et al., Microarrays for microbiologists, *Microbiology*. 2001. 147:1403-13.
43. Li, J., et al., Proteomix and bioinformatics approaches for identification of serum biomarkers to detect breast cancer. *Clin Chem*, 2002. 48, 1296-1304.
44. Falsey, J.R., et al., Peptide and small molecule microarray for high throughput cell adhesion and functional assays. *Bioconjug Chem*, 2001. 12, 346-353.
45. Sassanfar, M., and Walker, G., DNA Microarray Technology. *What Is It and How Is It Useful*, MIT, *Biology Science Outreach*. 2003. 6, 1-14.
46. Borsting, C., et al., Multiplex PCR, amplicon size and hybridization efficiency on the Nano Chip electronic microarray. *Int J Legal Med*, 2004. 118, 75-82.
47. Costa, D.J.E., et al., Determination of tryptamine in foods using square wave adsorptive stripping voltammetry, *Talanta*, c. 2016. 154, 134-140.
48. Weiss, C., Carriere, M., Fusco, L., Capua, I., Regla-Nava, JA., Pasquali, M., Mattevi, C., Toward nanotechnology-enabled approaches against the COVID-19 pandemic. 2020. *ACS Nano*. <https://doi.org/10.1021/acsnano.0c03697>.
49. Nasrollahzadeh, M., Sajjadi, M., Souf, GJ., Irvani, S., Varma, RS., Nanomaterials and nanotechnology-associated innovations against viral infections with a focus on coronaviruses. *Nanomaterials*. 2020. 10(6):1072. <https://doi.org/10.3390/nano10061072>.
50. Liu, S., et al., Voltammetric determination of sequence-specific DNA by electroactive intercalator on graphite electrode, *Anal. Chim. Acta*, 1996. 335, 239-243.
51. Olivera-Brett, A.M., et al., Electrochemistry of nanoscale DNA surface films on carbon *Medical Engineering & Physics*, 2006. 28, 963-970.
52. Tso Liu, W.T., and Liang, Z., Environmental microbiology on-a-chip and its future impacts. *Trends Biotechnol*, 2005. 23, 1-6.
53. Chapman, K., The protein chip biomarker system from ciphergen biosystems: a novel proteomics platform for rapid biomarker discovery and validation. *Biochem Soc Trans*, 2002. 30, 82-87.
54. Jia, X., Dong, S., Wang, E., *Biosensors and Bioelectronics*, Elsevier BV. 2016. 76, 80-90.
55. Kodadek, T., Development of protein detecting microarrays and related devices. *Trends Biochem Sci*, 2002. 27, 295-300.
56. Schubert, C., et al., Innovations in 3D printing: a 3D overview from optics to organs. *Br J Ophthalmol*. 2014. 159-161.

57. Ozbolat, I.T., and Yu, Y., Bioprinting toward organ fabrication: challenges and future trends. *IEEE Trans Biomed Eng.* 2013. 691-699.
58. Lueders, C., et al., Rapid manufacturing techniques for the tissue engineering of human heart valves. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2014. 46, 593-601.
59. Bashir, R., BioMEMS: State-of-the-art in detection, opportunities and prospects. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2004. 56:1565-1586.
60. Dittrich, P.S., and Manz, A., Lab-on-a-chip: Microfluidics in drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2006. 5,210.
61. Grayson, A.C.R., et al., A BioMEMS review: MEMS technology for physiologically integrated devices. *Proc. IEEE.* 2004. 92:6–21.
62. Bhatia, S.N., and Ingber, D.E., Microfluidic organs-on-chips. *Nat. Biotechnol.* 2014. 32,760–772.
63. Tao, S.L., and Desai, T.A., Microfabricated drug delivery systems; from particles to pores *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2003. 55, 315-328.
64. Singh, R., and Lillard, J.W., Nanoparticle-based targeted drug delivery, *Experimental and Molecular Pathology*, 2009. 86, 215-223.
65. Alkaya, A., et al., *Biyomateryal Kaynakları ve Kullanım Alanları*, First International Conference on Environment, Technology and Management ICETEM, 2019. 27-29.
66. Dash, A.K., and Cudworth, G.C., Therapeutic applications of implantable drug delivery systems. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, 1998. 40: 1-12.
67. Kurek Nicholas, S., and Cahndra Sathees, B., “Genetik Bakış Açısıyla Nörolojik Hastalıklarda Nanoteknolojiye Dayalı Tedaviler”, *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 2013. 22(1):12-32.
68. Ding, C.Z., and Li, Z.B., A review of drug release mechanisms from nanocarrier systems. *Mater Sci Eng.* 2017. 76,1440–53.
69. Parveen, S., et al., Nanoparticles: a boon to drug delivery, therapeutics, diagnostics and imaging. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 2012. 8,147-166.
70. Ning, C., “Biomaterials for bone tissue engineering,” in *Biomechanics and Biomaterials in Orthopedics*, Second Edition, 2016.



## SARS-CoV-2'nin Hızlı Tespiti İçin Tasarlanan Biyosensörler

Tuğba Begüm Karakaş<sup>1\*</sup> , İlayda Demirdiş<sup>1</sup> 

### ÖZET

Şiddetli akut solunum sendromu koronavirüs 2'nin (SARS-CoV-2) dikkat çekici bir hızla yayılması sonucunda 2019 yılında dünya çapında "salgın" olarak nitelendirilmeye başlanmıştır. COVID-19 hastalarına yapılan testlerde yanlış negatif ve yanlış pozitif sonuçlar, geniş bir popülasyona yapılan tespit testlerinin uzun süre alması ayrıca yüksek maliyeti ve sağlık personellerinin yaşadığı sıkıntılar göz önüne alındığında dünyanın daha hızlı hareket etmesi gerekmektedir. Bu yüzden COVID-19 virüsünü kontrol altına alabilmek için etkili, hızlı ve son derece hassas yöntemlere ihtiyaç duyulmaya başlanmıştır. SARS-CoV-2 ile enfekte olan hastaların teşhisi ve izolasyon süreçlerinin başlamasıyla birçok şirket ve enstitü başta SARS-CoV-2'nin proteinleri olmak üzere antikorlar, antijenler üzerinde çalışarak virüsün hızlı tespitine yönelik testler geliştirmeye başlamıştır. Bu derlemede SARS-CoV-2 virüsünün yapısını, SARS-CoV-2 için yapılan tespit testleri, tespit testlerinde yaşanan problemleri ve SARS-CoV-2'nin hızlı tespiti için tasarlanan biyosensörleri tartışmaktayız.

### MAKALE GEÇMİŞİ

**Geliş**

23 Ocak 2021

**Kabul**

02 Nisan 2021

### ANAHTAR KELİMELELER

SARS-CoV-2,  
hızlı tespit,  
biyosensör,  
COVID-19,  
bakım-noktası testi

## Biosensors Designed for Rapid Detection of SARS-CoV-2

### ABSTRACT

Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) started to be described as "epidemic" worldwide in 2019 because of the remarkable rapid spread. Considering the false negative and false positive results in the tests performed on COVID-19 patients, the long duration of the detection tests performed on a large population beside the high cost and the difficulties experienced by the healthcare personnel, the world should move faster. Therefore, effective, fast, and highly sensitive methods are needed to control the COVID-19 virus. With the diagnosis and isolation processes of patients infected with SARS-CoV-2, many companies and institutes have started to develop tests for rapid detection of the virus by working on antibodies and antigens, especially proteins of SARS-CoV-2. In this review, we discuss the structure of the SARS-CoV-2 virus, detection tests for SARS-CoV-2, problems encountered in detection tests, and biosensors designed for rapid detection of SARS-CoV-2.

### ARTICLE HISTORY

**Received**

23 January 2021

**Accepted**

02 April 2021

### KEY WORDS

SARS-CoV-2,  
rapid detection,  
biosensor,  
COVID-19,  
point-of-care testing

## Giriş

Aralık 2019'da şiddetli akut solunum sendromuna sebep olan korona virüsün (SARS-CoV-2) neden olduğu salgın Çin'in Wuhan kentinden rapor edilmiştir. Enfekte olan hastaların bronkoalveolar lavaj sıvısından metagenomik RNA sekanslaması gerçekleştirilmiştir. Yeni tipte bir RNA virüsü olduğu tespit edilmiştir. Yapılan filogenetik ve genomik analizler sonucunda virüsün koronavirüs gibi SARS ile

<sup>1</sup> Başkent Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Ankara / Turkey

\*Corresponding Author: Tuğba Begüm Karakaş, e-mail: [tugbabkarakas@gmail.com](mailto:tugbabkarakas@gmail.com)

yakın bir genetik benzerliğe sahip olduğunu ortaya koymuştur [1]. Uluslararası Virüs Taksonomisi Komitesi (ICTV) yeni tespit edilebilen bu virüsü Şiddetli Akut Solunum Sendromu Koronavirüs 2 (SARS-CoV-2) olarak isimlendirerek literatürde yerini almasını sağlamıştır. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından SARS-Cov-2 Uluslararası Öneme Sahip Halk Sağlığı Acil Durumu (PHEIC) olarak ilan edip, dünyayı yeni tip koronavirüse karşı duyarlı olmaya çağırmıştır [1, 2]. Dünya Sağlık Örgütü'nün verilerine göre dünya çapında kaydedilen 127.877.462 vaka sayısı ve 2.796.561 ölüm sayısı kayda geçmiştir [3]. Virüs, kişiye solunum damlacıkları, aerosoller ve abiyotik yüzeyle temas yoluyla yayılabileceği gibi dışkıdan da bulaşma ihtimali olduğu bilinmektedir [4]. SARS-CoV-2'nin kişide enfeksiyona sebep olmadan önce 2–7 günlük bir inkübasyon süresi olduğu bilinmektedir ancak daha da önemlisi inkübasyon süresi boyunca görülen asemptomatik durumlar nedeniyle daha da bulaşıcı bir hal almasıdır. Asemptomatik olan kişilerin sağlıklı kişilere virüsü bulaştırma ihtimali bu nedenle artmaktadır. Yapılması gereken uygun izolasyon koşulları altında tedavilerin gerçekleştirilmesidir. Enfekte kişileri tarayıp, izole etmek ve hemen tedavi altına almak bu noktada kritik öneme sahiptir [4, 1]. SARS-CoV-2'nin tespitinde yaygın olarak kullanılan 3 temel strateji mevcuttur. Bunlar: Bilgisayar tomografisi taraması, Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu tekniği ile ribonükleik asit (RNA) saptaması ve yanak akış immünokromatografik şerit ya da enzim bağlı immünosorbent deneyi ile antikor saptanmasıdır [4]. En çok uygulanan yöntem RT-Qpcr'dır ancak bu yöntem de dahil olmak üzere sonuçları almanın oldukça uzun sürmesi (1-3 gün arası) ve yüksek yanlış negatif sonuç oranının fazla olması yeni yöntem arayışları getirmiştir. Ayrıca, örnek hazırlama ve saflaştırma ihtiyacı, yüksek maliyetli cihazlar ve cihazların bakımları, nitelikli personel gereksinimi ve düşük hassasiyet nedenleriyle tarama aşamasının hassas, doğru, hızlı ve düşük maliyetli olması noktasında yeni teşhis araçlarının geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaya başlanmıştır [1, 2, 4]. Bu yöntemlerin sahip olduğu dezavantajlar nedeniyle kitlesel nüfusu tarayıp, teşhis etmek bizlere kesin doğru sonuçlar vermemektedir. Bu derlemenin amacı viral solunum yolu enfeksiyonlarının teşhisinde kullanılan farklı biyosensör türlerinin incelenmesi, SARS-CoV-2'nin hızlı tespiti için tasarlanmış olan yeni tip biyosensörlerin tasarımını ve biyosensörlerin kitlesel sorunu çözmedeki hızlı teşhis performans beklentilerini ve geleceğe yönelik perspektiflerini tartışmaktır [1, 2].

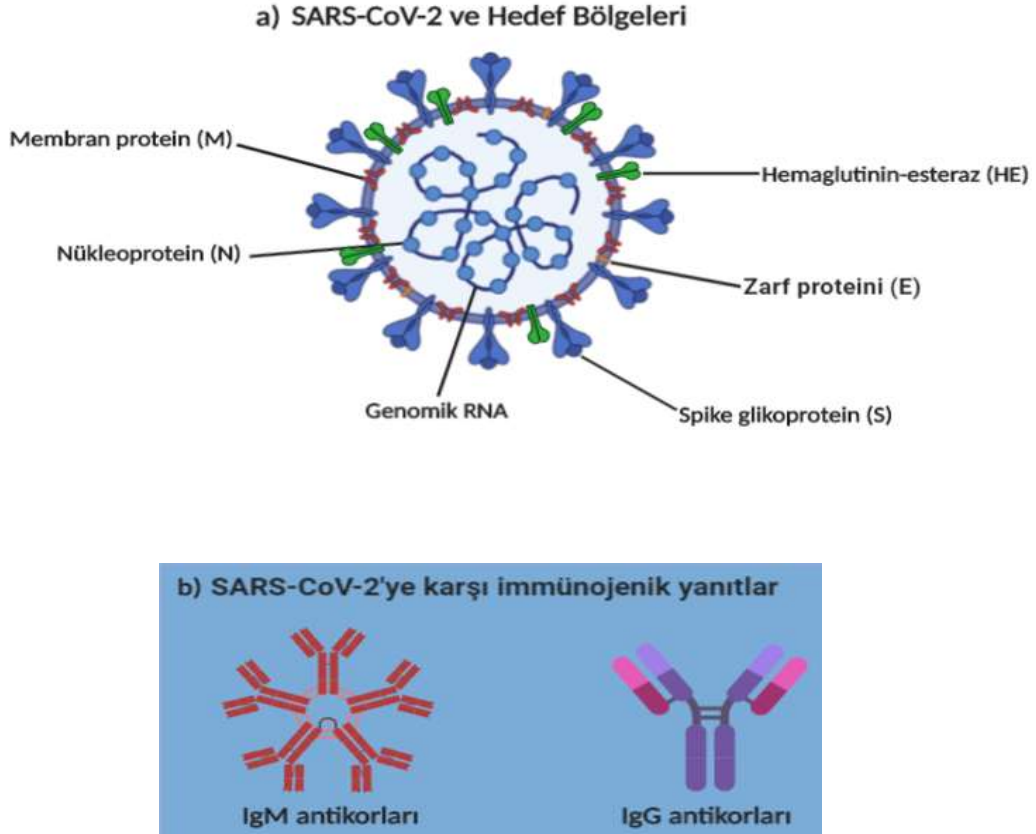
## SARS-CoV-2'ye Genel Bakış

İlk olarak Aralık 2019'da Çin'in Wuhan kentinde ortaya çıkan virüs 2020 Ocak ayı başlarında SARS-CoV-2 (şiddetli akut solunum sendromu koronavirüs 2) olarak adlandırılmıştır. Kontrol altına alınamayan virüs, tüm dünyaya yayılmıştır ve Mart 2020'de, COVID-19 olarak isimlendirilmiştir [5]. SARS-CoV-2, zarflı, pozitif ve tek sarmallı RNA (+ssRNA) virüslerindedir ve  $\beta$ -koronavirüs cinsine aittir [6]. SARS-CoV-2'nin de içerisinde bulunduğu CoV (Koronavirüsler)'in ortak özelliklerine bakıldığında insanların, kuşların ve diğer memelilerin solunum sistemlerini, gastrointestinal sistemlerini ve merkezi sinir sistemlerini enfekte edebilen zarflı, tek sarmallı pozitif RNA (+ssRNA) virüsleri olduğu bilinmektedir [7]. Bilinen birçok koronavirüs enfeksiyonu insanlarda sadece soğuk algınlığına neden olurken, SARS (şiddetli akut solunum sendromu) ile ilişkili koronavirüsler (SARS-CoV)'de yeni bir beta koronavirüs ajanı ortaya çıkmaktadır. Ortaya çıkan yeni beta koronavirüs ajanı ise birçok önemli insan hastalıklarına sebep olabilmektedir [7]. Nidovirales takımında bulunan, *Coronaviridae* ailesinden gelen ve *Coronavirinae* alt ailesinde bulunan koronavirüsler, viral yüzey proteinlerini gömülü halde bulduran ve konakçı hücreden türetilmiş bir lipid membrana sahip zarflı virüslerdir [8]. Nidovirales takımında bulunan tüm koronavirüslerin genomları pozitif polariteye sahip tek sarmallı bir ribonükleik asit (RNA) biçimindedir. RNA'nın baz dizisi 5'→3' yönelimindedir ve sonraki haberci RNA (mRNA)'ya karşılık gelmektedir [9]. Corona virüs genomu, 26,4-31,7 kilobaz uzunluğuyla bilinen tüm RNA virüsleri arasındaki en büyük RNA genomudur [10]. Koronavirüs genomunun organizasyonu, 5'-lider-UTR-replikaz-S(Spike)-E(Zarf)-M(Membran)-N(Nükleokapsid)-3'UTR-poli(A) kuyruğunu içermektedir [11]. Viral RNA, RNA genomunu çevreleyen nükleokapsid (N) ve 3 zar proteinini; S-glikoprotein, Matris (M) protein, zarf protein (E)'yi kodlamaktadır [6].

Sarmal bir nükleokapsid oluşturmak amacıyla nükleokapsid protein, genom RNA'yı paketlemektedir. Nükleokapsid protein, lider sekans ve viral membranın iç yüzünde bulunan M proteinleri aracılığıyla genomik RNA'ya bağlanmaktadır. Nükleokapsid proteini aynı zamanda koronavirüste en çok bulunan proteindir. Nükleokapsid proteini fazlasıyla immünojenik bir fosfoproteindir ve bu protein koronavirüsün teşhis tahlillerinde bir belirteç olarak kullanılmaktadır [12].

Koronavirüsler, diğer virüslerin aksine içerisinde RNA polimeraz enzimini içermezler çünkü koronavirüsler gibi pozitif polariteli, tek iplikli RNA (+ ssRNA) virüslerinde RNA, mRNA ya benzer bir aktivite göstermektedir. Böylece, viral genom doğrudan konak hücrenin ribozomları tarafından translasyona uğramaktadır. Zarf (E) proteini enfekte hücrelerde çekirdek çevresinde ve hücre yüzeyinde bulunmaktadır. Membran (M) proteinleri iç tarafta bulunan nükleoproteinlere bağlanarak, çekirdek yapısını oluşturmaktadırlar [13]. Spike (S) protein, virüse antijenik özellik kazandırmaktadır. Spike (S) protein, membran proteinlerine bağlandığında, CoV'ların yüzeyindeki viral zarfta bulunan S-glikoprotein, insan hücrelerinin yüzeyindeki reseptörlere ve anjiyotensin dönüştürücü enzim 2'ye (ACE2) bağlanabilmesini sağlamaktadır [14]. ACE2, insanların alt solunum yolunda bulunmaktadır ve hem insanlar arasındaki bulaşmayı hem de türler arasındaki bulaşmayı düzenlemektedir [15].

Spike protein konak hücre yüzeyinde bulunan sialik asite bağlandığında, virüs hemaglutinasyon yeteneğini kazanmış olmaktadır [11]. Hemaglutinin-esteraz (HE) proteini bazı  $\beta$ -CoV'ların yapısında bulunmaktadır. Bu protein sialik asitleri yüzey glikoproteinlerine bağlayabilmektedir. HE, protein aktivitelerini, S proteini aracılı hücre girişini ve mukozadan yayılan virüsleri arttırabilmektedir [16]. CoV'ların, sahip olduğu RdRp genetik bilginin kopyalanmasından sorumludur ve hata oranı fazlasıyla yüksektir. Bu nedenle de CoV'ler yüksek bir mutasyon oranına sahiptir [17]. Ayrıca, homolog rekombinasyonlar büyük çoğunlukla CoV'larda meydana gelmektedir [18]. Bu özellikleri nedeniyle virüsün evrimi ve yeni suşlarının oluşması sıklıkla gerçekleşmektedir. Bu nedenle, doğada büyük bir CoV çeşitliliği bulunmaktadır [18]. İnsanda koronavirüs enfeksiyonuna karşı oluşan IgM ve IgG antikorları humoral yanıtta, COVID-19 hastalığını tespit etmekte ve plazma tedavisinde kullanılmaktadır [19]. Şekil 1'de yukarıda kısaca bahsedilen SARS-CoV-2'nin hedef bölgeleri ve IgM, IgG antikorları gösterilmiştir.



Şekil 1 a) SARS-CoV-2 ve hedef bölgeleri b) IgM ve IgG antikorları (BioRender.com (2020), web sitesinden adapte edilmiştir.)

## SARS-CoV-2 Tespit Testleri

Hastalardan başarıyla izole edilen SARS-CoV-2 virüsünün izole edilmesinden sonra genom dizileme tekniği kullanılarak virüsün genom dizisi tanımlanmıştır. Sonrasında ise, SARS-CoV-2'yi saptamak amacıyla pek çok yöntem ve kit geliştirilmiştir [20]. SARS-CoV-2'de tespit edilecek hedef bölgeye bağlı olarak, COVID-19 tanıl testleri ve COVID-19 taraması ile ilgili üç ana yaklaşım vardır [21]. İlki nükleik asit testleridir. Bu testler viral RNA'yı hedeflemektedir ve viral genomun nükleik asit amplifikasyon testleri (NAAT'ler) olarak tanımlanmaktadır. Tespit için RT-PCR'ye dayalı bir amplifikasyon yöntemi kullanılmaktadır [21]. İkinci test antijen testleridir. Virüsün yapısal proteinlerinin tanımlanmasıyla viral bir antijenin varlığı tespit edilebilmektedir [21]. Üçüncü olarak serolojik test olarak bilinen antikor testleri bulunmaktadır. Antikor testleri, SARS-CoV-2'ye karşı üretilen antikorların varlığını tespit edebilen bir yöntemdir. En

çok kullanılan antikor testleri arasında enzime bağlı immünosorbent tahlilleri (ELISA), kemoluminesans tahlilleri (CLIA) ve yanal akış tahlilleri (LFA) bulunmaktadır [22].

### **Nükleik Asit Amplifikasyonuna Dayalı Yöntemler**

Nükleik asit amplifikasyonu (NA) viral ajanların tespiti için en yaygın olarak kullanılan yöntemdir. Bu yöntem sayesinde, MERS ve SARS-CoV gibi koronavirüslerin neden olduğu salgınların tespiti için kapsamlı şekilde tarama yapılabilmektedir [22]. Nükleik Asit Amplifikasyon Testleri (NAAT), nükleik asitlerin özgül dizilerinin amplifikasyonun ve nükleik asitlerin saptanmasında kullanılan bir tekniktir. NAAT tekniği kullanılarak, ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ile aktif SARS-CoV-2 enfeksiyonları belirlenmektedir. RT-PCR tekniği genel hatlarıyla dört basamakta gerçekleşmektedir. Öncelikle sürüntü ile örnekler alınmaktadır. Viral RNA'nın saflaştırılmasından sonra revers transkriptaz enzimi yardımıyla tamamlayıcı DNA sentezi gerçekleştirilmektedir. Son olarak da tamamlayıcı DNA'nın sentezi ile gen ekspresyon analizleri yapılabilmektedir. Kısa bir süre önce literatüre geçen SARS-CoV-2 virüsü için yapılması tasarlanan RT-PCR testlerinin daha özgül olabilmesi için virüsün genom dizilemesinin, primerlerin ve problemlerin tasarımının geliştirilmesi gerekmektedir. Bu boşluğu doldurabilmek için farklı primer/prob setlerini kullanan çeşitli RT-PCR testleri geliştirilmiştir. Bu doğrultuda tasarlanacak primer/prob testleri SARS-CoV-2 virüsünün farklı bölgelerini hedeflemelidir [23]. Washington Üniversitesi'nin çalışmasında, primer/prob setleri [23] virüsün E genini hedeflerken, N2 gen primer/prob setlerinin SARS-CoV-2 tespiti için daha yüksek hassasiyete sahip olduğunu rapor edilmiştir.

Dünya Sağlık Örgütü tarafından primer/prob setlerini kullanarak RT-PCR testlerini gerçekleştirilen klinikler, primer/prob seçimine bağlı olarak testin duyarlılığında önemli farklılık bulgularını bildirmişlerdir. Tespit ettikleri fark düşük viral yüke sahip numunede daha da belirgin düzeydedir. SARS-CoV-2'nin genetik sürüklenmeye uğramasından ve tespit sırasında koronavirüslerin diğer koronavirüs türleri ile çapraz reaksiyonundan kaçınmak için en az iki moleküler hedef seçerek RT-PCR yapılması önerilmektedir. Bununla beraber hedeflenecek olan bölgelerden birinin evrimsel süreçte korunmuş bir bölge olmasına dikkat çekilmektedir. RT-PCR tekniği her ne kadar kullanışlı bir metot gibi görünse de aslında dezavantajları bulunmaktadır. Öncelikle bu testi gerçekleştirebilmek için teknik anlamda eğitilmiş elemana ihtiyaç vardır [23]. Yapılan tespit testleri geniş bir popülasyona yapıldığı için oldukça maliyetlidir. Aynı zamanda

tespit için kullanılan PCR cihazları da maliyetlidir. RT-PCR, COVID-19'un kesin teşhisinde kullanılmasına rağmen, duyarlılığının göğüs BT incelemelerinden daha düşük bir orana sahip olduğu da bilinmektedir. Bu dezavantajlardan kaynaklı olarak RT-PCR'a alternatif olarak Döngü Aracılı İzotermal Amplifikasyon (DAİA) reaksiyonu olan başka bir moleküler yöntem gelecek vaat etmektedir. LAMP tekniği, izotermal amplifikasyonda, sabit sıcaklık altında gerçekleştirilebilen ve DNA'yı hızlı ve yüksek seçicilik ile çoğaltabilen bir tekniktir. Ayrıca, LAMP tekniği, özel ekipmana ve eğitimli kişilere ihtiyaç duymadan COVID-19 tespitini daha yüksek amplifikasyon verimliliği ve RT-PCR'e göre daha hızlı gerçekleştirdiğinden daha avantajlıdır [24].

### **Antijen Tespitine Dayalı Yöntem**

COVID-19 pandemisinin yarattığı küresel sonuçlar göz önüne alındığında, daha hızlı ve ucuz tespit yöntemlerinin ihtiyacı doğmuştur. Geliştirilen antijen bazlı testler bir immünolojik test formunda olmakla beraber, virüsün S (spike) proteinini, HE proteinini (hemaglutinin glikoprotein), nükleokapsidini, zarf veya zar proteinlerini hedeflemektedir. Viral antijen özgül olarak antikora bağlandığında enzime bağlı immünosorbent tahlilleri (ELISA) veya immünofloresan boyama gibi geleneksel yaklaşımların yanı sıra optik, manyetik, elektrokimyasal ve yüzey plazmon rezonansına dayalı teknikler ile virüs tespiti gerçekleştirilmektedir [21]. RT-PCR tekniğine göre daha hızlı ve ucuz olmasının yanında bazı dezavantajları da bulunmaktadır. Çok özgül bir test olmasına rağmen bu testi yapabilmek için oldukça eğitimli personele ihtiyaç vardır. Bu testin en büyük zorluklarından biri SARS-CoV-2 virüsünün, özgül proteinler için antikor eksikliği problemi ile karşı karşıya kalmasıdır [21, 24]. Viral yükün, COVID-19 hastalarında hastalığın başlangıç zamanı ile örnek toplama zamanı arasında geçen süre ile, örneğin tipi ve kalitesi ile, hastalığın şiddeti ile ve hastanın yaşı gibi faktörlerle değişebileceği rapor edilmiştir. Antijen testleri, RT-PCR ile yapılan testlere göre daha az duyarlıdır. Yukarıda belirtilen faktörlere bağlı olarak, azalan viral yükte COVID-19 tespiti, güvenilir sonuçlar vermemektedir. Bu dezavantajı yok etmek için, SELEX yöntemiyle sentezlenen SARS-CoV-2'ye özgü aptamerler kullanımı amaçlanmaktadır. Aptamerler, SARS-CoV-2 virüsünün spike proteininin reseptör bağlanma alanını hedeflemektedir. Aptamerlerin üretimi antikorlara göre daha ucuz, daha kolay ve virüse karşı daha özgüldür. Aptamerlerin kullanımı ile antijen tespitine dayalı testlerin geliştirilmesi sağlanmalıdır [21, 24].

## **Serolojik Testler**

Serolojik testler viral antijenleri test etmek yerine test içerisinde bulunan virüse karşı geliştirilen antikorları (immünoglobulin G (IgG) ve M (IgM)) tespit etmektedir. Virüs enfeksiyonunun dolaylı olarak tespit edilmesini sağlayan bir yöntemdir. Virüs organizmadan temizlendikten sonra antikorlar genellikle birkaç yıl daha kan dolaşımında varlığını sürdürmeye devam etmektedir. Bu yaklaşım teşhis açısından avantaj sağlamaktadır. Çünkü iyileştikten sonra bile kanda uzun süre kalabilen IgG konsantrasyonu, geçmiş enfeksiyonun bir göstergesidir. Serolojik testler, SARS-CoV-2'nin hastadaki enfeksiyon geçmişine dair bilgi vermekle beraber geçirilen enfeksiyon sayısının ve boyutunun belirlenmesine dair de bilgi elde edilmesini sağlamaktadır [2, 21].

## **SARS-CoV-2 Tespitinde Karşılaşılan Problemler**

### **SARS-CoV-2 RNA Tespitinde Karşılaşılan Problemler**

SARS-CoV-2'nin RNA bakım noktası testi, düşük algılama hassasiyetine sahiptir [26]. Düşük viral yüklere sahip pre-septomatik ve asemptomatik hastalarda ve RNA ekstraksiyonu bulunmayan numunelerde yanıltıcı sonuçlar verebilmektedir [26, 27]. Bunun dışında uzun süre gerektiren SARS-CoV-2'nin RNA tespit süresi, şüpheli COVID-19 hastaları ve sonrasında etkileşimde bulunabilecekleri insanlar için büyük problemlere neden olabilmektedir.

### **SARS-CoV-2 NP Antijeni ve Virüs Partikül Tespitinde Karşılaşılan Problemler**

Testlerin yapıldığı klinik ortamlarda, bazı COVID-19 hastalarının düşük virüs yüklerine sahip olduğu sıklıkla gözlenmiştir [26, 27]. Güncel kullanılan SARS-CoV-2 testlerinin de virüs partikül tespit yönteminde eksiklikleri bulunmaktadır [25]. Virüs tespit yöntemlerindeki eksikliğe ek olarak NP ekspresyonunun, SARS-CoV-2 ile enfekte olmuş hücrelerde, SARS-CoV ve MERS-CoV ile enfekte olmuş hücrelere oranla daha düşük çıktığı gözlenmiştir. Bu da SARS-CoV-2 hastalarının vücut sıvısındaki NP konsantrasyonunun daha düşük olduğunu düşündürmektedir [28]. Bu yüzden de NP antijeni ve virüs partikül tespitinde daha güvenilir ve net sonuçlar almak için son derece hassas tespit teknolojilerine acil ihtiyaç duyulmaktadır.

### **SARS-CoV-2 Antikorlarının Tespitinde Karşılaşılan Problemler**

Bazı koronavirüs ile enfekte olmuş hastalarda virüs vücuda girdikten sonra ölçebileceğimiz bir antikor düzeyi oluşturamaz yani bazı hastalar serokonversiyona sahip değildir ve düşük bir anti-SP antikor seviyesine sahiptir [29]. Bu enfekte hastaların doğru



bir şekilde tanımlanması gerekmektedir, bunun içinde daha hassas bir tespit yöntemine ihtiyaç bulunmaktadır. Bunların yanında, anti-RBD ve anti-NP antikollarının seviyelerinin, hastalığın erken aşamalarında çok düşük çıktığı gözlenmiştir [25]. Dolayısıyla aslında pozitif çıkması gereken birçok enfekte hastanın pozitifliğinin anlaşılabilmesi gibi sorunlar ortaya çıkabilmektedir. COVID-19'un inkübasyon süresinin 5-6 gün olduğu bilinmektedir [30]. Bu yüzden de, pre-semptomatik ve asemptomatik hastaların taşıdığı virüs, hastaların anti-RBD ve anti-NP antikolları kullanılarak tanımlanmasından önce yakınlarında temas ettikleri insanlara yaymaları fazlasıyla olasıdır. SARS-CoV-2 antikollarının tespitinde kullanılmak üzere acilen daha hassas, daha ucuz ve daha hızlı tespit yöntemleri geliştirilmelidir.

## **SARS-CoV-2 Tespitinde Geliştirilen Potansiyel Biyosensörler**

### **P-FAB: Covid-19 Tespiti için Geliştirilen P-FAB Biyosensör Cihazları**

Taşınabilir plazmonik fiber optik absorban biyosensörü olan P-FAB teknolojisi SARS-CoV-2 virüs partiküllerini minimum düzeyde ön işlem ile doğrudan tükürük numunesi ile çalışan tek adımlı biyosensör tipidir [31]. P-FAB ile antijenler ve endotoksinler de dâhil olmak üzere çeşitli analit gruplarını test edebilecek kadar geniş tanıma özelliğine sahiptir. P-FAB teknolojisi temelde bir çift yeşil LED ve fotodetektör kullanarak U-bükülmüş optik fiber proba sahip bir sistemdir. Fiber optik prob içinde yayılan ışıktaki yoğunluk sayısındaki değişikliğe dayanan bir sistem sayesinde ölçüm gerçekleştirilmektedir. Biyosensörde altın nanoparçacıkları, ışıktaki artan ya da azalan güç kaybının ölçümünü daha fazla güçlendirmek için kullanılmaktadır. Etiketli altın nanoparçacıklar içeren biyosensör, numunenin 25 µL'sinde birkaç yüz analit molekülü tespiti gerçekleştirilebilmektedir. Tasarlanan bu algılama stratejisi, idrar örneğinden tüberküloz teşhisini 15 dakikada gerçekleştirebilen testin çalışma prensibine dayanmaktadır [31]. Fiber optik probun biyo işlevsizleştirilmiş ve U şeklinde bükülmüş algılama bölgesi, numune içerisindeki hedeflenen N-proteinini tespit ederek ve biyosensör matrisinde dalga emilimine yol açarak SARS-CoV-2 tespitini gerçekleştirmektedir [31]. P-FAB teknolojinin N-protein tayini gerçekleştirebilmesi için iki farklı yöntem geliştirilmiştir. İlk yöntem etiketsiz biyoanaliz, ikinci yöntem etiketli biyoassay yöntemidir [31].

Etiketsiz biyoanaliz yönteminde, biyosensör matrisi, altın nanoparçacık içeren U şeklinde bükülmüş fiber optik prob üzerinde hareketsizleştirilmektedir. Ardından anti-N protein monoklonal antikolları uygun bir kimyasal olan tiyol-PEG-NHS'e kovalent

konjugasyonu gerçekleştirilmektedir [31]. Afinitesi yüksek olan aptamerler, SPR ve ELISA testleri ile değerlendirilmektedir. Antikorlar, hareketsizleştirilmiş problara, sıgır serumu içeren albümin ile muamele edilmektedir. Burada, özgül olmayan bağlamaları engellemek için BSA kullanılmaktadır. Bu şekilde biyofonksiyonelleştirilmiş problar ile numune içerisindeki N proteinlerin 15 dakika içinde tespiti gerçekleştirilmektedir. Etiketli biyoassay yöntemi, sandviç immunoassay yönteminden baz almaktadır. Bu yöntemde, altın nanoparçacıklar kullanılarak etiketleme yapılmaktadır ve yakalama-detektör antikorları kullanılmaktadır. Öncelikle, biyosensör matrisinin, anti-N protein monoklonal antikorlarının (yakalama antikorlarının) U-bükülmüş fiber-optik prob üzerinde hareketsizleştirilmiştir. Özgül olmayan bağlamaları engellemek için sıgır albümini kullanılmaktadır. Sonraki aşamada ise, enfekte olmuş bir hastadan elde edilen numune örneği, anti-N protein monoklonal antikorları ve konjuge altın nanoparçacıklar ile 5 dakika karıştırılmaktadır. Karışım, kompleksin bükülmüş probunun algılama bölgesine eklenmektedir. Numune içerisindeki N proteinlerinin 15 dakika içinde tespiti gerçekleştirilmektedir [31].

### **Transistör Tabanlı Biyosensör Kullanımı ile İnsan Nazofarengal Sürüntü Örneklerinde COVID-19 Virüsünün (SARS-CoV-2) Hızlı Tespiti**

Klinik örneklerde SARS-CoV-2 tespiti gerçekleştirebilmek için etkili transistör (FET) tabanlı biyosensör cihazı geliştirilmiştir. FET tabanlı biyosensör cihazı kullanımı ile az miktardaki numunelerde son derece hassas ve hızlı virüs tespiti hedeflenmektedir [32]. Grafen kaplı biyosensör sayesinde, yüzeydeki değişikliklere immünolojik olarak hassasiyetle tanı konulmaktadır. FET tabanlı biyosensör, grafen kaplı yüzeyin SARS-CoV-2 spike proteinine karşı özgül bir antikorla kaplanmasıyla üretilmiştir. Biyosensör tasarımında yüzeyi grafenle kaplayarak grafenin altıgen şeklinde iki boyutlu karbon atom yapısından dolayı, yüksek elektronik iletkenlik, yüksek taşıyıcı hareketliliği ve geniş özel alan özelliklerinden faydalanılmaktadır [32]. SARS-CoV-2 spike antikoru, grafen kaplı biyosensörün yüzeyine verimli bir arayüz birleştirme ajanı olan 1-pirenebutirik asit N-hidroksisüksinimid ester (PBASE) aracılığıyla immobilize edilmektedir. FET tabanlı biyosensörün algılama sınırı 1 fg/mL düzeyindedir. Biyosensörün SARS-CoV-2'yi tespit sınırı LOD:  $1,6 \times 10^1$  pfu/mL ve klinik örneklerde tespit sınırı LOD:  $2,42 \times 10^2$  kopya/mL düzeyindedir [32]. Sensörün performansının değerlendirilmesi hastalardan alınan antijen proteini, kültürlenmiş virüs örneği ve nazofarengal sürüntü örnekleriyle

belirlenmektedir. Geliştirilen sensör klinik örneklerde SARS-CoV-2 virüsünü tespit etmekte oldukça başarılı olmuştur. FET tabanlı biyosensörün sağladığı en büyük avantajlardan biri; SARS-CoV-2 antijen proteini ile MERS-CoV'un antijen proteinini birbirlerinden ayırabiliyor oluşudur. Başarılı şekilde üretimi gerçekleştirilen FET tabanlı biyosensörün numune ön işleme veya etiketleme gerektirmiyor oluşuyla oldukça hassas bir şekilde SARS-CoV-2 tespit edilebildiği kanıtlanmıştır [32].

### **eCovSens-Ultrahassas Yeni Devre Kart Tabanlı Elektrokimyasal Biyosensör Cihazı**

Tasarımı bir şirket tarafından yapılmış olan iki tip eCovSens biyosensörü mevcuttur. eCovSens biyosensörleri tükürük numunelerinden nCovid-19 spike protein antijeninin (nCovid-19 Ag) tespiti için tasarlanmış olan ticari potansiyostat cihazlarıdır [33]. İlk eCovSens biyosensör modeli olan FTO tabanlı immünosensör, spike edilmiş tükürük örneklerinde nCovid-19 spike antijeninin (nCovid-19Ag) tespiti için Altın nanoparçacıklı (AuNPs) flor katkılı kalay oksit elektrot (FTO) kullanılarak potansiyostat bazlı bir sensördür. Elektriksel iletkenlikte meydana gelen değişiklikleri ölçmek için nCovid-19 monoklonal antikor (nCovid-19Ab) ile hareketsizleştirilmiştir. İkinci eCovSens biyosensör ise SPCE bazlı biyosensördür. SPCE biyosensörü, nCovid-19 Ab'yi ekran baskılı karbon elektrot (SPCE) üzerinde hareketsiz hale getirerek elektriksel iletkenlikte meydana gelen değişikliği ölçmek için tasarlanmıştır [33]. Her iki tipteki biyosensörün performansı nCovid-19 Ab'nin kendine özgü nCovid-19 Ag ile etkileşimine dayanmaktadır. Optimum koşullar altında FTO tabanlı immünosensör ve önerilen SPCE bazlı biyosensör cihazı test edilmiştir. Test sırasında 1 fM ila 1µM arasında değişen nCovid-19 Ag'nin tespiti için her iki biyosensör modeli de erken tespitinde oldukça başarılı ve hızlı sonuçlar vermiştir. Aynı zamanda biyosensörlerin yüksek hassasiyetli ölçümleri de rapor edilmiştir [33].

### **Taşınabilir Yüzey Plazmon Rezonans Algılamalı Biyosensör Cihazı ile SARS-CoV-2 Antikorları İçin Hızlı ve Kantitatif Serum Testi:**

Yüzey plazmon rezonans (SPR) sensörü, seyreltilmemiş insan serumunda SARS-CoV-2'ye özgü olan nükleokapsid antikorlarının tespitini gerçekleştirebilen yeni bir biyosensör cihazıdır. Taşınabilir bir SPR cihazı 3-MPA-LHDLHD-COOH tabakasıyla modifiye edilen SPR yüzeyi SARS-CoV-2 nükleokapsid rekombinant protein ile işlevselleştirilerek nanomolar aralıkta anti-SARS-CoV-2 antikorlarını tespit

edilebilmektedir [34]. SPR sinyalinin suda stabilizasyonu gerçekleştirildikten sonra yüzey 1:1 sulu 100 mM N-hidroksisüksinimid (NHS) ve 400 mM N-etil-N'- (3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidroklorür (EDC) solüsyonu ile modifiye edilerek hareketsizleştirme tamponuyla 20 saniye durulanmaktadır. SARS-CoV-2 nükleokapsid rekombinant (rN) proteini (MBS569934, MyBioSource, ABD) ile 20 dakika reaksiyona konulmaktadır. SARS-CoV-2 antikorlarının saptanması için ELISA testindeki performansını gösteren son raporlar nedeniyle de kullanıma uygunluk açısından seçilmiştir [34]. SPR tabanlı sensör ile numune/sensör temasından sonraki 15 dakika içinde sonuçlar çıkmaktadır. Bu tespit yöntemi genel olarak diğer SARS-CoV-2 antijenlerine uygulanabildiğinden bir dizi antikor sensörünün klinik örneklerde analizini gerçekleştirebilmek için uygundur. SPR cihazının taşınabilirliği ve hızlı sonuç verebilmesi ile kısa sürede sahada kullanılması beklenmektedir [34].

### **Optik Biyosensörler**

SARS-CoV-2 tespiti için geliştirilen optik biyosensörler, plazmonik fototermal (PPT) etki kullanılarak ve LSPR'nın algılama şemasında bulunan transdüksiyon ilkeleriyle beraber kullanılmıştır. Böylece COVID-19 hastalığının doğru teşhisi için optik bir biyosensör geliştirilmiştir [35]. Nanoparçacıkların ve ışığın LSPR algılamasında kullanımıyla, plazmonik rezonans frekansında daha önce de iyi sonuç alındığı bilinen termoplazmonik nesil bulunmaktadır. Yapılan bir çalışmada, termoplazmonik ısı kullanılarak *in situ* hibridizasyon sıcaklığının yükseltilebileceğini ve böylece de iki benzer gen dizisinin ayrımının doğru bir şekilde yapılabileceği düşünülmektedir. Gerçekten de tasarlanan bu LSPR biyosensörünün çok sayıda gen içeren bir karışımda, seçilen SARS-CoV-2 sekanslarına karşı yüksek bir hassasiyet sergilediği görülmüştür [36]. Nanofabrikasyon teknikleriyle [36] ve mikroakışkanlarla kombine edilen LSPR'ın [35] geliştirilmesiyle duyarlılığın daha da artırılacağı ve taşınabilir formatlarda kullanılacağı düşünülmektedir [36, 38]. Bahsedilen nedenlerden ötürü, LSPR'nin nanomalzemelerle kullanımıyla birlikte teşhis doğruluğunu arttırmakta büyük bir potansiyeli olduğu vurgulanmıştır. Viral enfeksiyonu doğrulayan analitlerin doğrudan algılanmasının yanında, optik biyosensörlerin ayrıca SARS-CoV-2 virüsünün yüksek çözünürlükte görüntülenmesinde de büyük rol oynayabileceği planlanmaktadır [36]. Wei ve ark. [39] yaptığı bir çalışmada, lazer diyot uyarımına bağlı olarak virüs görüntülenmesinde optik biyosensörlerin kullanımına dayalı bir sistem geliştirilmiştir.

Geliştirilen bu sistem, akıllı bir telefonun kamera modülüne kolaylıkla entegre edilebilen bir optomekanik bağlantı formuna dayanmaktadır. Görüntüleme platformunun çözünürlüğü 50 nm'den az olup, kişilerin virüs tespitlerinde akıllı telefonların kullanımının sağlanmasını içermektedir [39].

## **Sonuç**

Sonuç olarak, antikor saptama testleri ve nükleik asit saptama testleri SARS-CoV-2 enfeksiyonunu tanımlamak ve virüsün yayılmasını azaltmak adına enfekte hastaların izole edilmesinde önemli rol oynamaktadır. Bununla birlikte, şu anda güncel kullanılmakta olan SARS-CoV-2 RNA saptama testlerinin uzun süreleri, düşük hassasiyet göstermesi, sadece klinik örneklerden RNA özütlemeye ihtiyacı, bu testlerin klinik uygulamasını sınırlandırmaktadır ve hatalı sonuçlara yol açabilmektedir [25]. Düşük virüs yüklerine sahip hastalarda ve ayrıca enfekte hastalarda erken dönemde gözlenen kandaki düşük antikor seviyesi hastalığın daha fazla yayılmasına neden olabilmektedir. Bunun nedeni ise tespit testlerinin hassasiyetinin düşük olması nedeniyle verilen yanlış negatif sonuçlarla birlikte, enfekte hastalar virüsü daha da yayabilmektedirler [40]. Bu nedenle, hızlı, ucuz, yüksek hassasiyetli ve taşınabilir taramayla laboratuvarlardan bağımsız, kişiselleştirilmiş ve bakım noktası tanı yaklaşımları geliştirmek fazlasıyla önemlidir.

## **Gelecek Perspektifleri**

Bu yazımızda, biyosensörlerin hızlı, yüksek hassasiyetli ve klinik çalışmalarda SARS-CoV-2 RNA tespiti için büyük potansiyellere sahip olduğu vurgulanmıştır. Ayrıca SARS-CoV-2 RNA tespitiyle ilgili olarak, doğrudan amplifikasyon için klinik örneklerden elde edilecek SARS-CoV-2 RNA'ların daha basit ve daha hassas algılanması için daha fazla çalışma yapılmasına ve geliştirilmesine ihtiyaç bulunmaktadır. SARS-CoV-2 RNA'nın hızlı, gerçek zamanlı ve oldukça hassas tespiti için birçok teknolojinin ve disiplinler arası çalışmaların gerekliliği açıktır. Ayrıca, biyosensörlerin, nanoteknolojiyle birleştirilmesiyle gelecekte daha hızlı ve daha hassas tespit stratejilerinin geliştirilmesi açısından oldukça önemlidir. Bizi gelecekte hangi viral veya patojenik mikrobiyal salgınların beklediğini bilemiyoruz fakat elimizdeki teknolojiyi kullanarak ve bunu daha da geliştirerek en azından yeterli önlemleri alabilme şansımız bulunmaktadır. Moleküler biyoloji ve sentetik biyolojideki ilerleme sayesinde, nanobodiler ve aptamerler gibi yeni

bağlayıcı ajanların keşfi gerçekleştirilecektir. Bu ajanların biyomühendislikte kullanılması ile de virüsleri tespit etmekte yüksek seçicilik sağlanacaktır. Biyosensörlerle birlikte kullanılacak yapay zekâ ve yeni algılama stratejileri herhangi bir potansiyel hastalığın kontrolsüz yayılmasının önüne geçebilmek ve kontrol altına alabilmek için büyük kolaylık sağlayacaktır [41].

## Kaynaklar

1. Samson, R., G. Navale, and M. Dharne, Biosensors: frontiers in rapid detection of COVID-19. 3 Biotech, 2020. 10(9): p. 385-394.
2. Santiago, I., Trends and Innovations in Biosensors for COVID-19 Mass Testing. Chembiochem : A European Journal of Chemical Biology, 2020. 21(20): p. 2880-2889.
3. WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard, 2021; Available from: <https://covid19.who.int>. [Erişim Tarihi: 20.06.2021]
4. Cui, F. and H.S. Zhou, Diagnostic methods and potential portable biosensors for coronavirus disease 2019. Biosensors and Bioelectronics, 2020. 165: 112349.
5. *Timeline: WHO's COVID-19 response*. 2021; Available from: [Timeline of WHO's response to COVID-19](#). [Erişim Tarihi: 15.06. 2021]
6. Fehr, A.R. and S. Perlman, Coronaviruses: An Overview of Their Replication and Pathogenesis. In: Maier H., Bickerton E., Britton P. (eds) Coronaviruses. Methods in Molecular Biology, 2015. 1282: p. 1-23
7. Weiss, S. R. and J. L. Leibowitz, Coronavirus pathogenesis. Advances in virus research, 2011. 8: p. 85–164.
8. Cui, J., F. Li, and Z.L. Shi, Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. Nature Reviews Microbiology, 2019. 17: p. 181–192.
9. Ludwig, S. and A. Zarbock, Coronaviruses and SARS-CoV-2: A Brief Overview. Anesthesia and Analgesia, 2020. 131(1): p. 93–96.
10. Woo, P. C., et al., Coronavirus diversity, phylogeny and interspecies jumping. Experimental Biology and Medicine, 2009. 234(10): p. 1117–1127.
11. SARS-Cov-2 (2019-NCov) Antigen Reagents. 2021; Available from: <https://www.sinobiological.com/research/virus/2019-ncov-antigen>. [Erişim Tarihi: 19.06.2021]
12. Hurst, K. R., C. A. Koetzner, and P. S Masters, Identification of in vivo-interacting domains of the murine coronavirus nucleocapsid protein. Journal of Virology, 2009. 83(14): p. 7221–7234.
13. Escors, D., et al., The membrane M protein carboxy terminus binds to transmissible gastroenteritis coronavirus core and contributes to core stability. Journal of Virology, 2001. 75(3): p. 1312–1324.
14. Tortorici, M. A. and D. Veessler, Structural insights into coronavirus entry. Advances In Virus Research, 2019. 105: p. 93–116.
15. Jia, H.P., et al., ACE2 receptor expression and severe acute respiratory syndrome coronavirus infection depend on differentiation of human airway epithelia. Journal of Virology, 2005. 79(23): p. 14614– 14621.
16. SARS-CoV-2 (COVID-19) research reagents. 2021; Available from: <https://www.prosci-inc.com/covid-19/>. [Erişim Tarihi: 15.06.2021]
17. Duffy, S., L. Shackelton, and E. Holmes, Rates of evolutionary change in viruses: patterns and determinants. Nature Reviews Genetics, 2008. 9: p. 267–276.
18. Lai M. M., RNA recombination in animal and plant viruses. Microbiological Reviews, 1992. 56(1): p. 61–79.

19. Chen, L., et al., Convalescent plasma as a potential therapy for COVID-19. *The Lancet. Infectious Diseases*, 2020. 20(4): p. 398–400.
20. Rabiee, N., et al., Point-of-use rapid detection of SARS-CoV-2: Nanotechnology-Enabled Solutions for the COVID-19 Pandemic. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020. 21(14): 5126.
21. Soler, M., et al., How nanophotonic label-free biosensors can contribute to rapid and massive diagnostics of respiratory virus infections: COVID-19 Case. *ACS sensors*, 2020. 5(9): p. 2663–2678.
22. Woo, P., et al., Rapid detection of MERS coronavirus-like viruses in bats: potential for tracking MERS coronavirus transmission and animal origin. *Emerging Microbes and Infections*, 2018. 7(1): 18.
23. Mathuria, J. P., R. Yadav, and Rajkumar, Laboratory diagnosis of SARS-CoV-2 - A review of current methods. *Journal of Infection and Public Health*, 2020. 13(7): p. 901–905.
24. Zhen, W., et al., Clinical evaluation of three sample-to-answer platforms for detection of SARS-CoV-2. *Journal of Clinical Microbiology*, 2020. 58(8): e00783-20.
25. Ji, T., et al., Detection of COVID-19: A review of the current literature and future perspectives. *Biosensors and Bioelectronics*, 2020. 166: 112455.
26. Pan, L., et al., Clinical characteristics of COVID-19 patients with digestive symptoms in Hubei, China: A descriptive, cross-Sectional, multicenter Study. *The American Journal of Gastroenterology*, 2020. 115(5): p. 766–773.
27. Pan, Y., et al., Potential false-negative nucleic acid testing results for severe acute respiratory syndrome Coronavirus 2 from thermal inactivation of samples with low viral loads. *Clinical Chemistry*, 2020. 66(6): p. 794–801.
28. Lv, L., et al., Transcriptional difference between SARS-COV-2 and other human coronaviruses revealed by sub-genomic RNA profiling. Cold Spring Harbor Laboratory, 2020.
29. Togay, A. and N. Yılmaz, Laboratory diagnosis of SARS-CoV-2. *The Journal of Tepecik Education and Research Hospital*, 2020. 30(2): p. 70-75
30. Backer, J. A., D. Klinkenberg, and J. Wallinga, Incubation period of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) infections among travellers from Wuhan, China, 20-28 January 2020. *Euro surveillance : European Communicable Disease Bulletin*, 2020. 25(5): 2000062.
31. Murugan, D., et al., P-FAB: A Fiber-optic biosensor device for rapid detection of COVID-19. *Transactions of the Indian National Academy of Engineering*, 2020. 5: p. 211–215.
32. Seo, G., et al., Rapid detection of COVID-19 causative virus (SARS-CoV-2) in human nasopharyngeal swab specimens using field-effect transistor-based biosensor. *ACS Nano*, 2020. 14(4): p. 5135–5142.
33. Mahari, S., et al., eCovSens-ultrasensitive novel in-house built printed circuit board based electrochemical device for rapid detection of nCovid-19 antigen, a spike protein domain 1 of SARS-CoV-2. Cold Spring Harbor Laboratory, 2020.
34. Djaileb, A., et al., A rapid and quantitative serum test for SARS-CoV-2 antibodies with portable surface plasmon resonance sensing. *ChemRxiv*, 2020. 12118914.v1.
35. Qiu, G., et al., Dual-functional plasmonic photothermal biosensors for highly accurate severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 detection. *ACS Nano*, 2020. 14(5): p. 5268–5277.
36. Bhalla, N., et al., Opportunities and challenges for biosensors and nanoscale analytical tools for pandemics: COVID-19. *ACS Nano*, 2020. 14(7): p. 7783–7807.
37. Roether, J., et al., Real-time monitoring of DNA immobilization and detection of DNA polymerase activity by a microfluidic nanoplasmonic platform. *Biosensors and Bioelectronics*, 2019. 142: 111528.
38. Rampazzi, S., et al., A localized surface plasmon resonance-based portable instrument for quick on-site biomolecular detection. *IEEE Transactions on Instrumentation and Measurement*, 2016. 65(2): p. 317– 327.

39. Wei, Q., et al., Fluorescent imaging of single nanoparticles and viruses on a smart phone. *ACS Nano*, 2013. 7(10): p. 9147–9155.
40. Xu, L., et al., Facile biosensors for rapid detection of COVID-19. *Biosensors and Bioelectronics*, 2020. 170: 112673.
41. Jeong, H., J.A. Rogers, and S. Xu, Continuous on-body sensing for the COVID-19 pandemic: Gaps and opportunities. *Science Advances*, 2020. 6(36): eabd4794.



Kütük, N., Mesoporous silica nanoparticles, methods of preparation and use of bone tissue engineering International Journal of Life Sciences and Biotechnology. 2021. 4(3): p. 507-522.  
DOI: 10.38001/ijlsb.880711

## Mesoporous Silica Nanoparticles, Methods of Preparation and Use of Bone Tissue Engineering

Nurşah Kütük<sup>1\*</sup> 

### ABSTRACT

Biomaterials are a large group of vitally important materials with many different inorganic and organic types. Biocomposites are produced by using materials such as polymer, metal, and ceramics. Bone tissue engineering deals with materials that can mimic the real bone structure found in the body. These materials used in the human body must be capable of many aspects such as their mechanical strength related to the area where they are used, as well as their properties such as biocompatible, biodegradable, and non-toxic. If the material is intended to treat the bone structure, it should be biodegradable, but it should be resistant to degradation if intended to be used for a long time. With the advance in technology, nanoparticles have become appealing in bone tissue engineering due to their many unique properties. In recent years, mesoporous silica nanoparticles (MSNs) have been prominent biomaterials in the medical field due to their properties such as alterable size structure, large pore volume, and surface area. This study aims to give information about the biomedical properties, synthesis methods, and importance of MSNs with unique properties in bone tissue engineering applications. This study is compiled by examining many studies in the literature.

### MAKALE GEÇMİŞİ

Geliş

15 February 2021

Kabul

15 April 2021

### KEYWORDS

Silica nanoparticles, mesoporous, tissue engineering, biomaterials

## Introduction

Nanotechnology science includes different fields such as physics, chemistry, biology, environment, engineering and medicine. Developments in nanotechnology and the use of nanoparticles that emerged in the diagnosis, imaging, and therapy of diseases have provided benefits in the medical field [1, 2, 3]. Materials with at least one dimension and particle sizes between 1 and 100 nm are called nanomaterials [4, 5]. They exhibit properties such as good mechanical strength, superior bioactivity and resorbability. In addition, the decrease in particle size causes a significant increase in particle boundaries and changes the general physicochemical properties [5]. Nanoscale materials are a suitable structure for the transport and distribution of related drugs in the treatment of diseases such as cancer, Alzheimer's, and Parkinson's. Nanomaterials can reduce interaction with healthy tissues by targeting sick cells to alleviate the harmful effects of

<sup>1</sup> Sivas Cumhuriyet University, Faculty of Engineering, Chemical Engineering Department, Turkey, Sivas

\*Corresponding Author: Nurşah KÜTÜK, e-mail: [nkutuk@cumhuriyet.edu.tr](mailto:nkutuk@cumhuriyet.edu.tr)

chemotherapy [4, 6]. There are many nanoparticles (NPs) used in biomedical applications. Table 1 shows these and their application areas.

Amorphous silica is one of the basic materials that can be produced by sponges, diatoms, and plants, which are abundant in nature, and are widely used in modern industry. It is used in a variety of applications such as cosmetics, heterogeneous catalysis, coatings, bio-imaging and drug delivery, especially due to its morphological controllability [7, 8, 9]. Silica is essentially the largest component of sand and can be produced synthetically. Due to its porous structure, it is suitable for the adsorption of various water-soluble elements. Thanks to its adsorption and photocatalytic properties, silica nanoparticles can be used in the field of concrete and ceramics [10]. In recent years, bioactive glass particles and silica nanoparticles have been used in biomaterials for the development of some biomedical properties. It has been reported that with the addition of bioactive silica phase, mechanical strength improves, biocompatibility of osteoblasts and bone formation of polymers are greatly increased [11].

Silica nanoparticles used in the biomedical field can be found in mesoporous (2-50 nm pore size) [12] and non-porous (solid) or a mixture of both, which is amorphous. Porous ones carry their active charges by physical adsorption or chemical bonding, while non-porous ones carry their charges through encapsulation or drug-silane conjugation [13, 14]. The pores and nano size of silica nanoparticles enable the drug release rate to control in order to make the continuous drug delivery effect efficient [15]. It has been pointed out that silica is non-toxic and does not show any side effects in rats even at concentrations as high as 50.000 mgL<sup>-1</sup> [16]. Silica has been classified as generally considered safe by the Food and Drug Administration (FDA) [17, 18, 19].

**Table 1** Biomedical application examples of some nanoparticles

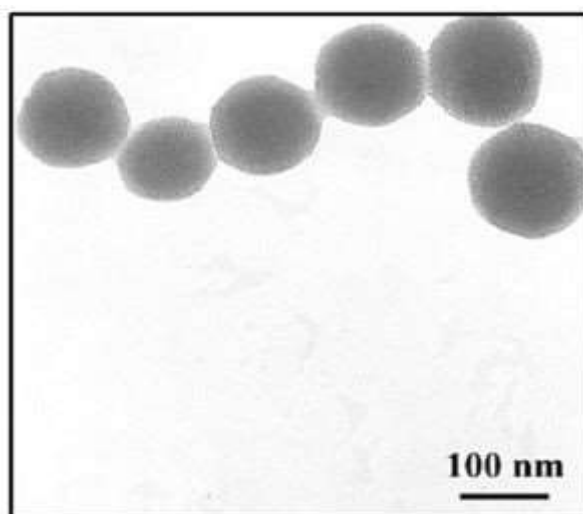
<b>Nanoparticles</b>	<b>Application</b>	<b>Reference</b>
Gold	Bone filler and its treatment Drug release	[20, 21]
TiO <sub>2</sub>	Bone tissue engineering	[22]
Silver	Colon cancer therapy, Bioimaging	[23, 24]
ZnO	Breast cancer therapy	[25, 26]
CuO	Bone tissue engineering, Drug delivery	[27, 28, 29]
CeO <sub>2</sub>	Cancer therapy	[30, 31, 32]
Calcium phosphate	Bone regeneration, Cancer therapy	[33, 34, 35]
Magnetic nanoparticles	Drug targeting, Tissue scaffold	[36, 37]
Mesoporous silica nanoparticles (MSNs)	Drug delivery, Bone tissue engineering, Cell monitoring	[38, 39, 40]

While studies on the use of mesoporous silica nanoparticles (MSNs) in drug release have increased rapidly in recent years, studies on its use in bone tissue engineering are increasing at an interesting level. However, studies on the use of MSN in bone tissue engineering are limited. In this study, silica and mesoporous silica nanoparticles with unique biomedical properties and their synthesis methods are discussed. Differently, bone loss, treatment and features of bone structure are briefly examined. In recent years, the usability, healing effect and importance of MSNs in bone tissue engineering applications have been investigated in the light of the literature.

### **Mesoporous Silica Nanoparticles (MSNs)**

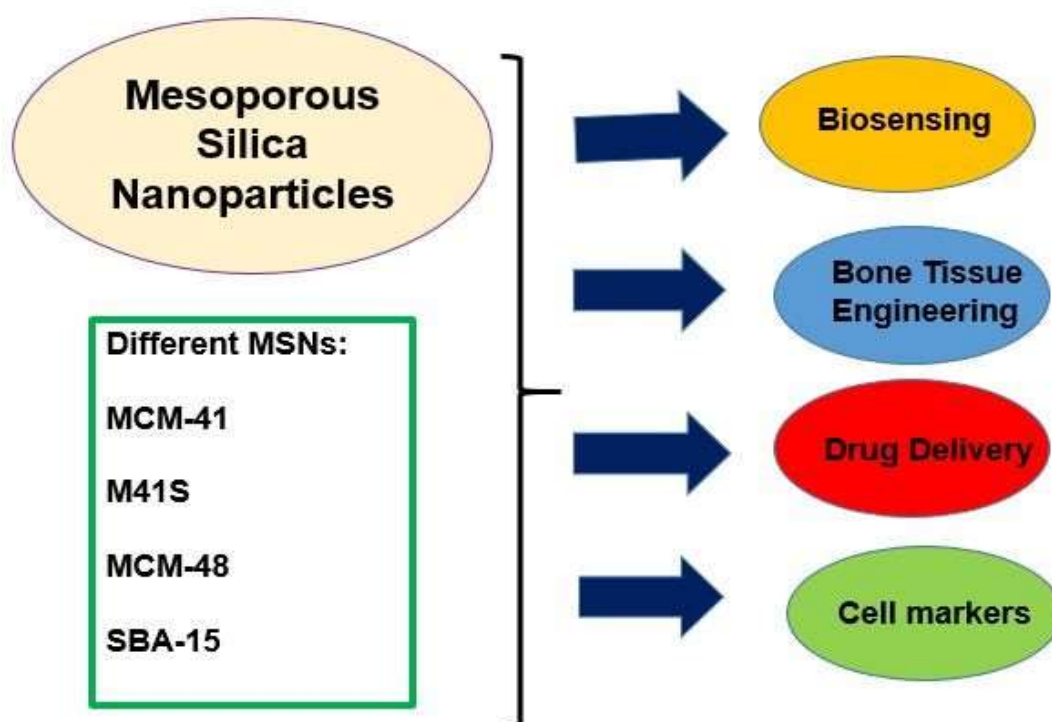
Amorphous silica was first recognized as a drug carrier in 1983 [18]. In 1992, Kresge [41] synthesized sequential mesoporous molecular sieves. This breakthrough paved the way for silica-based nanocarriers. In 2001, a mesoporous silica nanoparticle called MCM-41 (mobile crystalline material) [42] was developed for the first time as a drug delivery system for the encapsulation of ibuprofen drug [18]. According to the molar composition of the reaction environment, the pores were reported to be hexagonal (MCM-41, 2D or SBA-15), cylindrical (M41S) [43] or cubic (MCM-48, 3D) structure [42, 44, 45, 46]. TEM image of MSNs in microsphere structure is given in the Fig.1.

Although the pores are in a crystalline structure, the pore walls are amorphous [47]. Amorphous silica shows better biocompatibility, unlike crystalline silica [48]. By 2003, MSNs were functionalized with cadmium sulfide and used for controlled drug release. This study revealed that MSNs have high biocompatibility and high drug delivery efficiency [18].



**Fig 1** TEM image of MSNs [49]

Thanks to their many unique properties such as high surface area ( $1000 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$ ) [45, 49] adjustable particle shape, easy functionalization of the inner and outer surface, pore volume ( $1 \text{ cm}^3\text{g}^{-1}$ ) [45], which allows high drug loading, high thermal and chemical stability [50], high adsorption capacity [51] strength [52] and biocompatibility [19], MSNs have become an interesting material in medicine [1, 6, 53, 54, 55, 56]. In recent years, applications in the field of adsorption, catalysis, chemical separation, imaging, targeted anti-cancer agent, drug release, cell monitoring [40] biosensor, and solar cell [57] have been increasing rapidly (Fig. 2) [50, 54, 58].



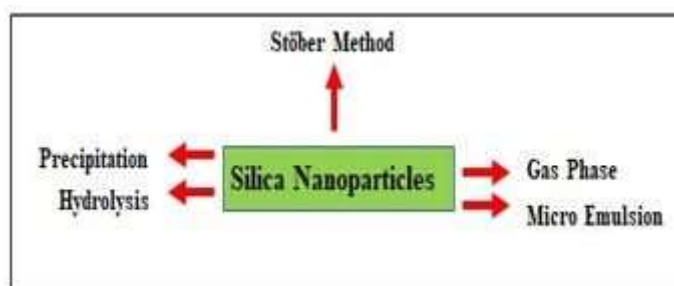
**Fig 2** Some common medical applications for MSNs

Hollow mesoporous silica nanoparticles (H-MSNs) attract the attention of researchers due to their large pore volume. Hollow mesoporous silica nanoparticles (H-MSNs) with uniquely sized internal cavities and mesoporous shells are used in fields such as drug release, cancer treatment, bioimaging, and catalysis due to their rare properties such as low density, large surface area, adjustable size, good biocompatibility, and presence of Si-OH bond on the surface [59, 60, 61]. The drug loading capacity and mass transfer properties of the H-MSNs structure are more improved compared to MSNs [55, 61, 62].

Hollow mesoporous silica nanoparticles (H-MSNs) can be produced by a variety of methods, including hard templating (using polymers and metal oxides among others) and soft templating (vesicles, micelles, and emulsions) [63, 64].

### Synthesis methods of silica nanoparticles

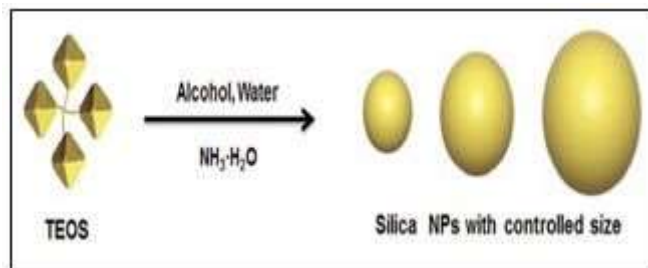
The formation of silica nanoparticles has two parts, nucleation and particle growth [65]. Silica occurs in nature by condensation of silicic acid. However, in synthetic production, obtained by hydrolysis of alkoxy silanes and subsequent condensation of the hydrolysis products. Cationic or modified cationic surfactant template methods can be used [66, 8]. Stöber method (sol-gel method) [19], reverse microemulsion method, hydrolysis, polycondensation, thermal annealing, spray drying, template method are some of the methods used in the preparation of silica nanoparticles [13]. Since silica nanoparticles are generally produced by flame pyrolysis in dental applications, they have a non-porous structure [48]. Some of the commonly synthesized types of silica nanoparticles and the synthesis methods are given in Table 2.



**Fig 3** The common methods used in silica nanoparticle production

With the Stöber method, a sequential pore system can be created with structure-regulating agents [48]. Some studies have been reported in which spherical mesoporous silica nanoparticles were synthesized synthetically by using sodium silicate instead of tetraethyl orthosilicate (TEOS) as a source of silica by Stöber method [9]. Generally, TEOS is chosen as the silica source, distilled water or ethanol for the solvent requirement, and ammonia as the catalyst [65, 9]. Nucleation occurs when soluble TEOS monomers in homogeneous liquid form solid particles. TEOS hydrolyzes to silicic acid, silicic acid condenses to produce silica particles with siloxane bridges (Si-O-Si) [65]. This method offers advantages such as controlling size (Fig. 4), shape, and surface area [19]. Reaction temperature, pH, surfactant, and silica source are factors for controlling these parameters

[67]. Another method used to produce silica nanoparticles is the hydrothermal method. TEOS or sodium silicate can be used as a source of silica. However, the hydrothermal method has defects such as cost and high energy consumption that prevent large-scale production [57].



**Fig 4** The schematic reaction of MSNs synthesis by using TEOS as silica raw material with Stöber method [14]

**Table 2** Common production methods of silica nanoparticles and silica sources used

Silica Nanoparticles	Method	Silica source	Referans
SiO <sub>2</sub> NPs	Sol-gel process	TEOS	[68]
MSNs	modified interfacial synthesis procedure	TEOS	[38]
MSNs	Sol-gel process	Sodium silicate	[9]
MCM-41	Sol-gel process	TEOS	[43]
Silica NPs	Stöber method	TEOS	[69]
H-MSNs	modified hard template and etching routes	TEOS	[62]
Silica NPs	Stöber	TEOS	[70]
MCM-41	Non-hydrothermal gelation	TEOS	[57]
H-MSNs	One pot synthesis	TEOS	[59]
MCM-41 and MCM-48	Direct hydrothermal	TEOS, Sodium silicate	[47]
SiO <sub>2</sub> NPs	Stöber method	TEOS	[19]
MSNs	Sol-gel	TEOS	[71]
MCM-48	Sol-gel	TEOS	[45]
MSNs	Modified Stöber	TEOS	[52]

## Bone Structure and Mesoporous Silica Nanoparticles

A bone, an essential tissue in the human body, protects other tissues and organs in the body by structurally supporting it and provides the mechanical support that the body needs by storing hematopoiesis and minerals (Ca<sup>+2</sup> and PO<sup>4-</sup>) [72, 73, 74]. Bone tissue has a complex and compatible structure consisting of many organic and inorganic components in the macro and nanoscale range [75]. The bone organ consists of calcium

phosphate and is a hard mineralized structure containing hydroxyapatite ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ), bone marrow, collagen, cartilage, endosteum, periosteum, blood vessels, nerves, osteoblasts, osteoclasts, osteocytes, osteogenic cells and water. The composition of bone tissue, which performs many mechanical functions, may vary depending on factors such as age, gender, and anatomical location of an individual [54, 76, 77, 78, 79]. Differences in the chemical composition of hydroxyapatite change the physical properties and solubility of the structure. The amount of mineral phase is 60-70% by weight, and the amount of water is between 5 and 10% by weight. The remaining is an organic composition of collagen and other proteins [79]. In the skeletal system, there are more than 206 bones in the limbs (cylindrical shape and providing movement), short bones in the wrists (supporting), flat bones in the skull (flat and with a large surface area), and irregular bones in the pelvis and vertebrae. Bones are either in a compact or spongy form [72, 80].

Tissue engineering is a discipline that includes many sciences that study bone structure and bone mechanics [81], involving the clinical sciences, engineering, and biology sciences, which includes osteoconductive scaffolds for organs or bones that have lost their function and the formation of osteogenic agents [77, 82]. Tissue transplantation is performed for many organs worldwide, and bone ranks second in this order [71]. Although bone has the ability to repair itself, bone deficiency or defect may occur due to severe traumatic injury, surgical removal of tumors, cancer, inflammation, age-related bone diseases [83], or congenital diseases and can be repaired with bone graft [73, 84]. Bone deficiency and defects are an important, serious, and social problem all over the world and there is a need for further research and development of biomaterials used for bone tissue therapy [73]. The treatment of bone defects can be difficult due to limited bone grafts. Therefore, metals, polymers, bioceramics, polymer-ceramic composites [75] are used in the treatment of bone defects [71, 84]. These materials, especially polymers and ceramics, have the ability to form a suitable environment for mechanical strength, cell proliferation, and attachment, and to mimic extracellular matrix [84]. Although metallic scaffolds seem to be suitable materials for treatment, they cause some limitations due to toxic ion release and lack of bioactivity [71]. An ideal material used in artificial bone applications should be biocompatible, biodegradable, osteoconductive [11] non-toxic, easy to manufacture and purchase [85]. It should show a direct degradation and

preserve its structural integrity, taking into account the healing rate of the tissue in the area where it is used [86]. Studies have shown that the viscoelasticity and time-dependent behavior of bone should be taken into account and play an important role in implant design optimization [74]. In addition, the biomaterial should be porous enough to allow the tissue to develop, vascularize and neuronize within the material [86]. Bones can be of different structures. For example, bone marrow is present in the trabecular bone canals and the level of porosity ranges from 50% to 90% [87]. Inorganic and organic composite materials aim to mimic the structure of a real bone. Therefore, creating bioactive materials by combining the hardness of a polymer phase with the compressive strength of an inorganic phase improves the strength and resistance properties [80].

Frequently used ceramic biomaterials are inorganic materials with high biocompatibility, non-toxic or non-carcinogenic properties, stable and light structure, thus used as implants and filling materials. However, their mechanical strength is low [88]. Researchs have focused on mesoporous structures that can also be used as drug delivery agents and have high biocompatibility [89]. Although there are many studies explaining the high biocompatibility of MSNs, studies on toxicity are limited. The reason for this may be that the structure and composition of the MSN used have different properties, surface areas, surface loads, and differences in the cell type and tissues studied [1]. It is a suitable material for targeted drug release and controlled drug release due to its shape, size and easy functionality [71]. However, MSN needs surface modification to deliver drugs in a targeted and controlled manner [49].

The biodegradability of MSN is affected by particle size and shape, porosity, physiological environment components and duration [90]. Yamada et al. reported small size amorphous silica particles dissolve more easily than colloidal silica. However, small size silica has been reported to increase cell toxicity. Particles that are not very small and have a large surface area increase their degradability as their contact surface with water increases. In addition, it has been concluded that the outer surface width is more important in degradability [91]. Many studies have attempted to improve the biodegradation of MSN. It is thought that MSN doped with metals degrades faster. This is because the Si-O-Si bond is stronger than the Si-O-M (M: metal elements) bond. Si-O-Si network structure makes the biodegradability of MSN difficult. Therefore metal modified MSN can break down more easily. Further studies are needed to improve MSN's degradability



[53]. Hao et al. reported that changing PEG to MSN affected the rate of degradation. As MSN started to degrade from the particle surface, MSN-PEG facilitated degradation through the particle. It was also seen that the spherical MSN deteriorated faster than the rod-shaped MSN [90].

A bone structure is a living mineral filled with cells [78]. Silicium is an important material for bone formation [92]. Silicium has been used in the treatment of teeth and bones for half a century due to its properties such as strength and biocompatibility [19]. Amorphous silicate network-based materials can link to bone matrix [93]. Silicates stimulate type I collagen formation and osteoblastic differentiation. Silicates are needed for the formation and calcification of bone tissue in metabolic processes [69]. In bone, it links to glycosaminoglycans and plays an important role in the formation of crosslinks between collagen and proteoglycans. Although present in all tissues in the body, it is mostly found in bone structure later in skin, hair, arteries, and nails [92]. Studies have shown that silica nanoparticles improve bone mass to modulate the differentiation of osteoblasts in mice and culture and also inhibit the differentiation of osteoclasts [19]. It has been reported that Si ions released from the MSNs structure support mineralized nodule formation, collagen synthesis, and osteoblast expression of osteogenic related genes [12]. Also, thanks to the adjustable size of MSNs, they can easily match the size range of natural bone fragments (such as hydroxyapatite crystals). This makes them promising candidates for bone tissue repair [54].

For bone treatment, silica nanoparticles can be used like bioceramic particle [70]. However, the bioactivity and osteogenesis ability of MSNs used alone is limited. The polymer matrix can be used to increase the specific surface area and pore volume [48], or the bone-forming bioactivity of MSNs can be increased by adding nutrients important for the human body such as calcium and magnesium [12]. Silica nanoparticles consist of two surface groups, hydrophobic siloxane and hydrophilic silanol group [48]. Silanol-containing surfaces can be functionalized with appropriate organic molecules that provide better control in the release of bioactive substances that bind to the mesoporous channels and organic coatings of MSNs [82]. Since the larger the pore volume, the better biological degradation, it is also possible to determine the type of interactions that occur in its contact with the cell [67]. Therefore, those with unique surface properties and porosity emerged as bioactive materials for bone regeneration [42]. It is also known that the silicate

used as an additive improves the mechanical properties and structure of the final product [69].

Beck and his working group investigated the relationship between 50 nm sized silica nanoparticles with bone metabolism. The results revealed that osteoblast differentiation and mineralization occurs and they reduce osteoclast differentiation. In studies conducted on mice, it has been determined that injected nanoparticles are beneficial in increasing bone mineral density [16]. Another study using polymeric scaffolds for bone regeneration used MSNs for drug release. Qui et al. designed the aminated MSNs they synthesized as the delivery vehicle for dexamethasone (DEX). Polylactic acid/poly ( $\epsilon$ -Caprolactone) (PLA/PCL) was used as a nanofibrous scaffold and composite with DEX loaded MSNs. This drug-loaded composite scaffold presented significant osteogenic differentiation and mineralization [82].

In a study where MSN was synthesized using TEOS as a source of silica, peptide release was tested in vitro. Adsorption results have shown that MSNs have superior loading capacity and long duration peptide release rate. It has been observed that the functionalization of MSNs with peptide increases bone matrix mineralization [12]. MSNs can also be used to reinforce biomedically used polymers. Mechanical strength of some polymer membranes used in bone therapy needs improvement. For example, by adding MSNs to the electrospun poly ( $\epsilon$ -caprolactone) membrane, it can be used as a composite for bone treatment. The addition of MSNs has been shown to improve the tensile properties of the material [70].

Wang et al. used the synthesized H-MSNs for bone tissue regeneration. When the in vitro release properties of H-MSNs loaded with Ibuprofen (IBP) were examined, it was determined that there was rapid release for the first 12 hours, and then the drug release slowed down and continued for 60 hours. Hydroxyapatite formation was observed by examining the bioactivity of the SBF (simulated body fluid) solution. Experiments were continued with in vivo studies. H-MSNs and IBP-H-MSNs were implanted in the bone defects. New bone tissue formation was observed in both of them 4 weeks after the procedure [89].

In a study focusing on bone therapy, functionalized MSNs loaded with Alendronate and Ibuprofen was used. Bone tissue treatment was performed by delivering drugs with MSNs

[38]. In another study, poly-lactide-co-glycolide as a biodegradable polymer was used to create the MSNs-polymer scaffold [39]. Both studies had positive results.

Martinez-Carmona et al. have synthesized MSNs using the Stöber method. MSNs have been used for bone cancer treatment. Doxorubicin (DOX) used as anticancer drug loaded on MSNs. In the results, it was determined that it has approximately 100% antitumor activity against osteosarcoma cells [52]. Kanniyappan et al. (2021) have investigated the biocompatibility and bioactivity for bone tissue engineering in vitro (fibroblast cells and osteosarcoma cells) and in vivo (in zebrafish), using a very high concentration of MSNs. As a result of extensive biological studies, MSNs have been reported to be non-toxic and biocompatible, as well as osteogenic and angiogenic. These biomedical properties of MSNs make them an important material for bone tissue engineering [71].

## **Conclusion**

In recent years, nanomaterials are used frequently in bioengineering. Despite its nanoscale dimensions, it has paved the way for its use in medical research due to its large surface area, quantum effects and porous structure. Bone loss or treatment of bone defects is a vital and serious issue in terms of quality of life. There is a need for porous, biocompatible and non-toxic materials in bone tissue engineering. MSNs have become an important material in bone tissue engineering due to their adjustable pore size, particle shape and functionality. It is promising due to its use as an implant material and its therapeutic properties. As a result of this evaluation, the fact that MSNs can both treat the bone organ and mimic bone tissue thanks to its porous structure proves to be an important biomaterial. Research is needed on the improvement of biodegradability and toxicity. However, biodegradability can be improved by modifying MSNs with metals or polymers. It is predicted that MSNs will be a more used material in bone tissue engineering in the future.

### **Funding / Destekleyen Kurum veya Kuruluş**

No financial support was received from any institution or organization for this review study.

## **Kaynaklar**

1. Bhavsar, D., V Patel and K. Sawant, Systematic investigation of *in vitro* and *in vivo* safety, toxicity and degradation of mesoporous silica nanoparticles synthesized using commercial sodium silicate. *Microporous and Mesoporous Materials*, 2019. 284: p. 343–352.

2. Jia, Y., et al., Regeneration of large bone defects using mesoporous silica coated magnetic nanoparticles during distraction osteogenesis. *Nanomedicine, Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 2019. 21: 102040.
3. Çetinkaya, S. and N. Kütük, Green Synthesis of Iron Oxide Nanoparticles Using Black Tea Extract and Investigation of Its Properties. *Materials Focus*, 2018. 7: p. 316-320.
4. Kütük, N. and S. Çetinkaya, Yeşil Sentez ile Nanomalzeme Üretiminin İncelenmesi ve Kullanım Alanları. 5. Uluslararası Mimarlık Mühendislik ve Tasarım Kongresi. 21-22 Aralık, 2019, İstanbul
5. Tsamesidis, I., et al., Effect of ion doping in silica-based nanoparticles on the hemolytic and oxidative activity in contact with human erythrocytes. *Chemico-Biological Interactions*, 2020. 318: 108974.
6. Moreira, A., F., D.A. Dias and I., J. Correia, Stimuli-responsive mesoporous silica nanoparticles for cancer therapy, A review. *Microporous and Mesoporous Materials*, 2016. 236: p. 141-157.
7. Perry, C., C. An Overview of Silica in Biology, Its Chemistry and Recent Technological Advances, *Biosilica in Evolution. Morphogenesis, and Nanobiotechnology*, 2009. p. 295-313.
8. Carcouet C., C., M., C. et al., Nucleation and Growth of Monodisperse Silica Nanoparticles. *Nano Letters*, 2014. 14(3): p. 1433-1438.
9. Hwang, J., J., H. Lee and J., Chun, Facile approach for the synthesis of spherical mesoporous silica nanoparticles from sodium silicate. *Materials Letters*, 2021, 283: 128765.
10. Mohanraj, R., et al., Decolourisation efficiency of immobilized silica nanoparticles synthesized by actinomycetes. *Materials Today, Proceedings*, 2020. In Press
11. Li Y., et al., In situ silica nanoparticles-reinforced biodegradable poly(citrate-siloxane) hybrid elastomers with multifunctional properties for simultaneous bioimaging and bone tissue regeneration. *Applied Materials Today*, 2017. 10: p.153-163.
12. Luo, Z., et al., Peptide-laden mesoporous silica nanoparticles with promoted bioactivity and osteo-differentiation ability for bone tissue engineering. *Colloids and Surfaces B, Biointerfaces*, 2015, 131: p. 73–82.
13. Pandey P. And M. Dahiya, A Brief Review On Inorganic Nanoparticles. *Journal of Critical Reviews*, 2016. 3(3): p. 18-26.
14. Xu, Z., et al., Multifunctional silica nanoparticles as a promising theranostic platform for biomedical applications. *Material Chemistry Frontiers*, 2017. 7: 1257-1272.
15. Zhang, R., et al., How to design nanoporous silica nanoparticles in regulating drug delivery, Surface modification and porous control. *Materials Science and Engineering B*, 2021. 263: 114835.
16. Beck, G., R., et al., Bioactive silica-based nanoparticles stimulate bone-forming osteoblasts, suppress bone-resorbing osteoclasts, and enhance bone mineral density in vivo. *Nanomedicine, Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 2012. 8: p. 793–803.
17. Uyanıkgil E., Ö., Ç. and D., S. Salmanoğlu, Metalik nanopartiküllerin hedeflendirilmesi. *Ege Tıp Dergisi*, 2020. 59(1): p. 71-81.
18. Huang, R., et al., Mesoporous silica nanoparticles, facile surface functionalization and versatile biomedical applications in oncology. *Acta Biomaterialia*, 2020. 116: p. 1-15.
19. Ha, S., et al., Bioactive effects of silica nanoparticles on bone cells are size, surface, and composition dependent. *Acta Biomaterialia*, 2018. 82: p. 184-196.
20. Lee, D., et al., Injectable hydrogel composite containing modified gold nanoparticles, implication in bone tissue regeneration. *International Journal of Nanomedicine*, 2018. 13: p. 7019–7031.
21. Ross, R., D., L., E. Cole and R., K. Roeder, Relative binding affinity of carboxylate-, phosphonate-, and bisphosphonate-functionalized gold nanoparticles targeted to damaged bone tissue. *Journal of Nanoparticle Research*, 2012. 14: 1175.
22. Kumar, P., Nano-TiO<sub>2</sub> Doped Chitosan Scaffold for the Bone Tissue Engineering Applications. *International Journal of Biomaterials*, 2018. 6576157.

23. El-Deeb, N., M., et al., Novel Trend in Colon Cancer Therapy Using Silver Nanoparticles Synthesized by Honey Bee. *J Nanomed Nanotechnol*, 2015. 6(2): 1000265.
24. Sankar, R., et al., Facile synthesis of Curcuma longa tuber powder engineered metal nanoparticles for bioimaging applications. *Journal of Molecular Structure*, 2017. 1129: p. 8-16.
25. Vimala, K., et al., Synergistic effect of chemo-photothermal for breast cancer therapy using folic acid (FA) modified zinc oxide nanosheet. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2017. 488: p. 92–108.
26. Sadhukhan, P., et al., Targeted delivery of quercetin via pH-responsive zinc oxide nanoparticles for breast cancer therapy. *Materials Science & Engineering C*, 2019. 100: p. 129–140.
27. Sahmani, S., et al., Effect of copper oxide nanoparticles on electrical conductivity and cell viability of calcium phosphate scaffolds with improved mechanical strength for bone tissue engineering. *The European Physical Journal Plus*, 2019. 134(7).
28. Gholamali, I., et al., Preparation and Characterization of Oxidized Starch/CuO Nanocomposite Hydrogels Applicable in a Drug Delivery System. *Starch*, 2018. 71, 3-4.
29. Ahmadian, Y., et al., Synthesis of polyvinyl alcohol/CuO nanocomposite hydrogel and its application as drug delivery agent. *Polymer Bulletin*, 2019. 76: p. 1967–1983.
30. Lin, W., et al., Toxicity of Cerium Oxide Nanoparticles in Human Lung Cancer Cells. *International Journal of Toxicology*, 2006. 25: p. 451–457.
31. Pesic, M., et al., Anti-cancer effects of cerium oxide nanoparticles and its intracellular redox activity. *Chemico-Biological Interactions*, 2015. 232: p. 85–93.
32. Sack, M., et al., Combination of Conventional Chemotherapeutics with Redox-Active Cerium Oxide Nanoparticles-A Novel Aspect in Cancer Therapy. *Small Molecule Therapeutics*, 2014. 13(7): p. 1740-1749.
33. Nie, L., et al., Development of chitosan/gelatin hydrogels incorporation of biphasic calcium phosphate nanoparticles for bone tissue engineering. *Journal of Biomaterials Science. Polymer Edition*, 2019. 30(17): p. 1636-1657.
34. Ding Y., et al., Encapsulation of cisplatin in a pegylated calcium phosphate nanoparticle (CPNP) for enhanced cytotoxicity to cancerous cells. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2017. 493: p. 181–189.
35. Zhao, J., et al., Calcium phosphate nanoneedle based gene delivery system for cancer genetic immunotherapy. *Biomaterials*, 2020. 250: 120072.
36. Xia, Y., et al., Magnetic field and nano-scaffolds with stem cells to enhance bone regeneration. *Biomaterials*, 2018. 183: p. 151-170.
37. Huang, W. and I. Chu, Injectable polypeptide hydrogel/inorganic nanoparticle composites for bone tissue engineering. *Plos One*, 2019. 14(1): 0210285.
38. Pasqua, L., et al., Mesoporous silica-based hybrid materials for bonespecific drug delivery, *Nanoscale Advances*, 2019. 1: p. 3269–3278.
39. Kaliraj, R., et al., A biomimetic mesoporous silica–polymer composite scaffold for bone tissue engineering. *J Porous Mater*, 2018. 25: p. 397–406.
40. Kempen, P., J., et al., Theranostic mesoporous silica nanoparticles biodegrade after pro-survival drug delivery and ultrasound/ magnetic resonance imaging of stem cells. *Theranostics*, 2015. 5: 631.
41. Dang, Y. and J. Guan, Nanoparticle-based drug delivery systems for cancer therapy. *Smart Materials in Medicine*, 2020. 1: p. 10–19.
42. Wang, Y., et al., Mesoporous silica nanoparticles in drug delivery and biomedical applications, *Nanomedicine, Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 2015. 11: p. 313–327.
43. Martin, P., et al., MCM-41-based composite with enhanced stability for Cr(VI) removal from aqueous media. *Solid State Sciences*, 2020. 106: 106300.
44. Möller, K. and T. Bein, Talented Mesoporous Silica Nanoparticles. *Chemistry of Materials*, 2016, 29(1): p. 371-388.

45. Pajchel, L. and W. Kolodziejski, Synthesis and characterization of MCM-48/hydroxyapatite composites for drug delivery. Ibuprofen incorporation. location and release studies. *Materials Science and Engineering C*, 2018. 91: p. 734–742.
46. Prokowsiz, M., et al., Surface-Activated Fibre-Like SBA-15 as Drug Carriers for Bone Diseases. *AAPS PharmSciTech*, 2019, 20(17).
47. Güçbilmmez, Y., Production And Characterization Of MCM-41 And MCM-48 Type Catalysts. *Journal of Engineering and Architecture Faculty of Eskişehir Osmangazi University*, 2010. XXIII(1): p. 63-81.
48. Timpe, N., et al., Nanoporous silica nanoparticles with spherical and anisotropic shape as fillers in dental composite materials. *BioNanoMat*, 2014. 15(3-4): p. 89–99.
49. Tang H., et al., Facile synthesis of pH sensitive polymer-coated mesoporous silica nanoparticles and their application in drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 2011. 421: p. 388–396
50. Wang, L., et al., Biofunctionalized Phospholipid-Capped Mesoporous Silica Nanoshuttles for Targeted Drug Delivery, Improved Water Susceptibility and Decreased Nonspecific Protein Binding. *ACS Nano*, 2010. 4(8): p. 4371-4379.
51. Lu, Z., et al., Reactive mesoporous silica nanoparticles loaded with limonene for improving physical and mental health of mice at simulated microgravity condition. *Bioactive Materials*, 2020. 5: p. 1127–1137.
52. Martinez-Carmona, M., et al., Lectin-conjugated pH-responsive mesoporous silica nanoparticles for targeted bone cancer treatment. *Acta Biomaterialia*, 2018. 65: p. 393–404.
53. He, Y., et al., Redox and pH dual-responsive biodegradable mesoporous silica nanoparticle as a potential drug carrier for synergistic cancer therapy. *Ceramics International*, 2020. 47(4): p. 4572-4578.
54. Zhou, X., et al., BMP-2 Derived Peptide and Dexamethasone Incorporated Mesoporous Silica Nanoparticles for Enhanced Osteogenic Differentiation of Bone Mesenchymal Stem Cells. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 2015. 7(29): p. 15777–15789.
55. Xu, H., et al., A facile route for rapid synthesis of hollow mesoporous silica nanoparticles as pH-responsive delivery carrier, *Journal of Colloid and Interface Science*, 2015. 451: p. 101–107.
56. Feng J., et al., The impact of ethanol and chlorobenzene in the structure regulation of dendritic mesoporous silica Nanoparticles. *Microporous and Mesoporous Materials*, 2020. 307: 110504.
57. Lu C., et al., Utilization of iron tailings to prepare high-surface area mesoporous silica materials. *Science of the Total Environment*, 2020. 736: 139483.
58. Yakin, F., E., M. Barisik and T. Sen, Pore Size and Porosity Dependent Zeta Potentials of Mesoporous Silica Nanoparticles. *Journal of Physical Chemistry C*, 2020. 124: p. 19579–19587.
59. Karaman E., Ş., et al., One-pot synthesis of pore-expanded hollow mesoporous silica particles. *Materials Letters*, 2015. 143: p. 140-143.
60. Qiu Q., et al., pH-triggered sustained drug release of multilayer encapsulation system with hollow mesoporous silica nanoparticles/chitosan/polyacrylic acid. *Materials Letters*, 2020. 260: 126907.
61. Yan, T., et al., Chitosan capped pH-responsive hollow mesoporous silica nanoparticles for targeted chemo-photo combination therapy. *Carbohydrate Polymers*, 2020. 231: 115706.
62. Nguyen T., N., T., et al., Surface PEGylation of hollow mesoporous silica nanoparticles via aminated Intermediate. *Progress in Natural Science, Materials International*, 2019. 29: p. 612–616.
63. Perez-Garnes M., et al., Engineering hollow mesoporous silica nanoparticles to increase cytotoxicity. *Materials Science and Engineering C*, 2020. 112: 110935.
64. Deng S., et al., A facile and controllable one-pot synthesis approach to amino-functionalized hollow silica nanoparticles with accessible ordered mesoporous shells. *Chinese Chemical Letters*, 2021. 32(3): p. 1177-1180.
65. Ways, T., M., M., et al., Silica Nanoparticles in Transmucosal Drug Delivery. *Pharmaceutics*, 2020. 12: 751.

66. Pang, X. And F. Tang, Morphological control of mesoporous materials using inexpensive silica sources. *Microporous and Mesoporous Materials*, 2005. 85: p. 1–6.
67. Ortega, E., et al., Improvement of mesoporous silica nanoparticles, A new approach in the administration of NSAIDS. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 2020. 58: 101833.
68. Faaliyan, K., et al., Magnetite-silica nanoparticles with core-shell structure, single-step synthesis, characterization and magnetic behavior. *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, 2018. 88: p. 609-617.
69. Lagarrigue, P., et al., Well-defined polyester-grafted silica nanoparticles for biomedical applications, Synthesis and quantitative characterization. *Polymer*, 2020. 211: 123048.
70. Castro, A., G., B., et al., Development of a PCL-silica nanoparticles composite membrane for Guided Bone Regeneration. *Materials Science & Engineering C*, 2018. 85: p. 154–161.
71. Kanniyappan, H., et al., Evaluating the inherent osteogenic and angiogenic potential of mesoporous silica nanoparticles to augment vascularized bone tissue formation. *Microporous and Mesoporous Materials*, 2021. 311: 110687.
72. Black, J., D., J. and B., J. Tadros, Bone structure, from cortical to calcium, *Orthopaedics and Trauma*, 2020. 34(3): p. 113-119.
73. Gao, C., et al., Bone biomaterials and interactions with stem cell. *Bone Research*, 2017. 5: 17059.
74. Aththapreyangkul, A., M., Hoffman and G. Pearce, Effect of geometrical structure variations on the viscoelastic and anisotropic behaviour of cortical bone using multi-scale finite element modelling. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 2020. 113: 104153.
75. Erol, M., M., et al., Copper-releasing, boron-containing bioactive glass-based scaffolds coated with alginate for bone tissue engineering. *Acta Biomaterialia*, 2012. 8: 792–801.
76. Parwani, R., et al., Morphological and Mechanical Biomimetic Bone Structures. *ACS Biomater. Sci. Eng.*, 2017. 3: p. 2761–2767.
77. Oyar, P., Osseointegrasyon Ve Kemik Rejenerasyonunda Kemik Doku Mühendisliğinin Yeri. *Atatürk Üniv. Diş Hek. Fak. Derg.* 2016. 15: p. 87-95.
78. Wittig, N., K., et al., Bone Biomineral Properties Vary across Human Osteonal Bone. *ACS Nano*, 2019. 13: p. 12949–12956.
79. Velasco, M., A., C., A. Narvaez-Tovar and D., A. Garzon-Alvarado, Design, Materials, and Mechanobiology of Biodegradable Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *BioMed Research International*, 2015. 729076.
80. Stevens, M., M., Biomaterials for bone tissue engineering. *Materials Today*, 2008. 11(5): p. 18-25.
81. Amini, A., R., C., T. Laurencin and S., P. Nukavarapu, Bone Tissue Engineering, Recent Advances and Challenges. *Crit Rev Biomed Eng.*, 2012. 40(5): p. 363–408.
82. Qiu, K., et al., Electrophoretic Deposition of Dexamethasone-loaded Mesoporous Silica Nanoparticles onto Poly(L-lactic acid)/Poly(ε-caprolactone) Composite Scaffold for Bone Tissue Engineering. *ACS Applied Materials Interfaces*, 2016. 8(6): p. 4137-4148.
83. Zhu, W., et al., Injectable and assembled 3D solid structure for free-to-fixed shape in bone reconstruction. *Applied Materials Today*, 2020. 21: 100823.
84. Koons, K., L., M. Diba and A., G. Mikos, Materials design for bone- tissue engineering. *Nature Review Materials*, 2020. 5: p. 584-603.
85. Zhou, P., et al., Organic/Inorganic Composite Membranes Based on Poly(L-lactic-coglycolic acid) and Mesoporous Silica for Effective Bone Tissue Engineering. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2014. 6: p. 20895–20903.
86. Huri, Y., P., N. Hasırcı and V. Hasırcı, Kemik Doku Mühendisliği. *Arşiv*, 2010. 19: p. 206-219.
87. Qi, Q., et al., Mechanically robust and thermally insulating polyarylene ether nitrile with a bone-like structure. *Materials and Design*, 2020. 196: 109099.

88. Özkan, A., N. Şişik and U. Öztürk, Kompozit Malzemelerin Ağız, Yüz, Çene Cerrahisinde Kullanımı ve Malzeme Uygunluklarının Belirlenmesi. *Düzce Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 2016. 4: p. 227-242.
89. Wang, Y., H. Pan and X. Chen, The Preparation of Hollow Mesoporous Bioglass Nanoparticles With Excellent Drug Delivery Capacity for Bone Tissue Regeneration. *Frontiers in Chemistry*, 2019. 7: 283.
90. Hao, N., et al., In Vitro Degradation Behavior of Silica Nanoparticles Under Physiological Conditions. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 2012. 12: p. 6346–6354.
91. Yamada H., et al., Preparation of Colloidal Mesoporous Silica Nanoparticles with Different Diameters and Their Unique Degradation Behavior in Static Aqueous Systems. *Chemistry of Materials*, 2012. 24: p. 1462-1475.
92. Price, C., T., K., J. Koval and J., R. Langford, Silicon, A Review of Its Potential Role in the Prevention and Treatment of Postmenopausal Osteoporosis. *International Journal of Endocrinology*, 2013. 2013: 316783.
93. Oudadesse, H., et al., MAS-NMR studies of geopolymers heat-treated for applications in biomaterials field. *J Mater Sci*, 2007. 42: p. 3092–3098.



## Bitki Hastalık Dayanıklılık Proteinleri: İmmün Savunma Molekülleri Olarak R-gen Ürünleri

Berna Baş<sup>1\*</sup> 

### ÖZET

Çoğu bitkinin NBS-LRR proteinlerini kodlayan hastalık dayanıklılığı ile ilgili R genleri, sistemik olarak kazanılmış immünitede işlevseldir, kısaca ETI olarak bilinir. Patojen organizmalar hücre yüzey reseptörleri ile harekete geçirilen PTI immüniteyi bertaraf ettikten sonra, daha sonraki aşamada ETI immünite aktif hale geçmektedir. Aynı zamanda patojen organizmaların efektörleri direkt sitoplazmaya ulaşınca, efektörleri tanıyan R proteinleri aracılığı ile PTI'nin etkisinden daha hızlı ve güçlü bir ETI immün tepki gelişmektedir. Patojen efektörlerinin çoğu, epitop-paratop ilişkisindeki yapısal interaksiyona benzer şekilde direkt veya indirekt olarak R-gen proteinleri ile reaksiyona girerler. Bilinen bütün biyotik faktörlere, birbirine benzer tepki veren bitkiler ne tür mekanizmalarla çok çeşitli patojen efektörlerini tanımaktadırlar? Ancak bitkilerdeki hücre içi örnek-tanım reseptörlerinin moleküler mekanizmalarıyla ilgili birçok yaklaşım mevcut olmakla beraber, her mekanizmaya ait sonuçlar, kişisel olarak araştırmacıların kendi özel çalışmalarından elde edilmiştir. Çok çeşitli efektör-reseptör tanımanın moleküler interaksiyonunda geçerli olan toplam kaç farklı strateji modelinin işlevsel olduğu bilinmemektedir. Bu nedenle sunulan derlemede, birçok farklı efektörler ile intraselüler reseptörleri arasındaki fiziki bağlantının moleküler mekanizma çeşitlerine odaklanılmıştır.

### MAKALE GEÇMİŞİ

**Geliş**

18 Mayıs 2021

**Kabul**

15 Temmuz 2021

### ANAHTAR KELİMELER

Bitki hastalık dayanıklılığıyla ilgili proteinler, R-gen proteinleri, Efektör-reseptör interaksyonları, NB-LRR proteinleri

## Plant Disease Resistance Proteins: R-gene Products as Immune Defense Molecules

### ABSTRACT

Disease resistance-related R genes encoding NBS-LRR proteins are functional in systemic acquired immunity, briefly referred as ETI, in plant pathology. Upon infection of pathogens at first stage of plant immune responses, if plant pathogens subvert PTI immunity that activated by cell membrane surface receptor, then ETI immunity is initiated the relay to second step of defense. Also when pathogen effectors are directly translocated into cell cytoplasm across host membranes where can be faced with plant R proteins, ETI immunity develops faster and stronger than PTI efficacy. A great number of pathogen effectors are directly or indirectly reacted with R-gene proteins in similar to epitope-paratope structural interaction. With what kind of mechanisms do the plants that show similar immune responses to all known biotic agents recognize the effectors of a wide variety of pathogenic organisms? However, many approaches are available involved in molecular mechanisms of intracellular pattern-recognition receptors in plants, findings for each mechanism have been obtained from specific workings of personally researchers. It is not known how many different strategy models prevailing in molecular interaction of a wide variety of effector-receptor recognition are functional. So in the presented review article is focused just to molecular mechanism kinds of physical connection between many different effectors and intracellular receptors.

### ARTICLE HISTORY

**Received**

18 May 2021

**Accepted**

15 July 2021

### KEY WORDS

Proteins related with plant disease resistance, R-gene proteins, Effector-receptor interactions, NB-LRR proteins

<sup>1</sup> Gaziantep Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Gaziantep/ TÜRKİYE

\*Corresponding Author: [bas@gantep.edu.tr](mailto:bas@gantep.edu.tr) Tel: +90 (342) 3171924

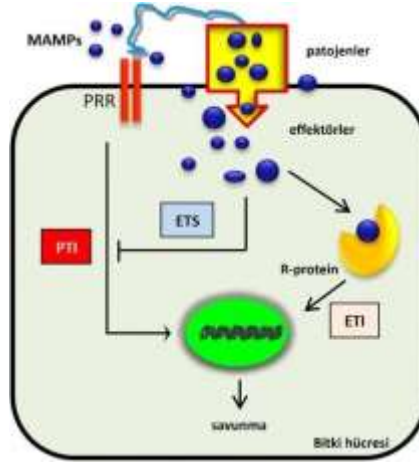
## Giriş

Çeşitli patojen mikroorganizmaların saldırısına sürekli maruz kalan bitkilerin, patojenlerle aralarındaki amansız savaş durmaksızın sürmektedir. Tarımın başlangıcından itibaren bitkisel hastalıklar nedeniyle meydana gelen ürün kayıpları açlık, yetersiz beslenme gibi sorunları da beraberinde getirmektedir [1, 2]. Bu nedenlerle bitki hastalık kontrolünün ıslah araştırmalarında, fitopatoloji ve tarımsal kimya endüstrisi büyük bir öneme sahiptir. Bitkilerin hastalık kontrol mekanizmaları tarafından neden olunan seleksiyon baskısını patojen organizmalar çok hızlı ekarte etmekte, bunun sonucunda da bitki hastalık dayanıklılığı ve pestisidlerin etkinliği sürekli olamamaktadır [2, 3]. Son yıllarda moleküler bitki-patojen interaksyonlarında yeni anlayışlar ortaya çıkaran temel araştırmalar üzerinde yoğun çalışmalar yapılmakta olup, "fitopatojen organizmaların bitki immünitesini nasıl devre dışı bıraktığı, patojeni tanıyan bitki hücre reseptörleriyle, patojene ait efektör-elisitör biyolojisi, bitkisel hücrelerin sinyal yolakları" gibi konular ilgi odağı olmaya başlamıştır [4, 5, 6]. Besin güvenliği ve bitki hastalık dayanıklılığını artırmak için bitki sinyal yolaklarında işlevsel olan hücresel olayların açığa çıkarılması, genetik olarak bitki korumada ıslah amaçlı yeni yaklaşımların geliştirilmesinde önemli bir potansiyele sahiptir. Bitki patojenlerinin infeksiyon stratejilerini anlamak için sadece bitki savunmasında görev alan bileşenlerin (veya moleküllerin) ortaya çıkarılması yeterli değildir. Aynı zamanda efektörlerin virülenslik mekanizmasının da bilinmesi gereklidir. Bitki hücrelerinin biyotik bir sinyali hücre yüzey reseptörleriyle algıladıktan sonra sitosolik reseptörlerle bağlantılı olarak karmaşık bir ağ mekanizmasıyla nükleusa kadar ilettiği bilinmektedir [7]. Bu sinyaller yoluyla bitkiler kendi hücrelerinde önceden mevcut olan sekonder antimikrobiyal kimyasalları kullanarak ve savunma tepkimelerini teşvik ederek, patojen saldırılarına karşı koymaktadırlar [8]. Bitkiler çok özel patojen ırklarının infeksiyon sırasında ürettiği proteinleri tayin edebilen karmaşık tanıma sistemleri geliştirmişlerdir. Efektör olarak isimlendirilen patojene ait bu proteinler, bitki hastalık dayanıklılık (R; Resistance) proteinleri aracılığı ile son derece özel olarak tanınmaktadırlar [9]. Günümüze kadar bitki immün sistemlerine ait yaklaşık olarak 600 farklı R geni rapor edilmiştir [10]. Bu derlemede, reseptör olarak işlev gören farklı R gen ve ürünlerinin, fiziki olarak reseptör-efektör bağlanma modeli ve dolayısıyla da fizyolojisini ilgilendiren örnekler son gelişmelerle birlikte verilerek bitkilerde hastalık kontrolünün yeni uygulamaları ve gelecekteki potansiyelleri özetlenmiştir. Önce temel

savunma ve teşvik edilen savunma arasındaki farklara kısaca değinilmesi daha yararlı olacaktır.

## **Bitki Hastalık Dayanıklılığında Temel Savunma**

Bitkiler, immün reseptörleriyle patojenleri algılayacak birçok stratejiler geliştirmişlerdir. Klasik olarak bitkiler, başlıca iki temel hastalık dayanıklılık modeline sahiptirler, bunlar 1) temel savunma ve 2) R-gen aracılığı ile gelişen savunmadır [11, 12]. Temel savunma hem konukçuya özel (host-specific) hem de konukçuya özel olmayan (non-host specific) dayanıklılık şeklerinden ibaret olup, “konukçuya özel olmayan dayanıklılık” modeli çok fazla patojen takımı ile meydana getirilir ve infeksiyonlara karşı savunmanın ilk aşamasını oluşturan bitkiler için genel bir dayanıklılıktır [13, 14, 15]. Eğer hastalık dayanıklılığı bitki çeşidine özgü ise “konukçuya özel dayanıklılık” olarak ifade edilir ve özel organizmalar tarafından teşvik edilir [16]. Bitkiyi istila eden patojenlerin salgıladığı hidrolitik enzimlerle parçalanan bitki hücre duvarından açığa çıkan fragmentlerden lipopolisakkaritler, kitin, glukan, flagellin gibi bitkiye zarar veren moleküller PAMP (Pathogen-Associated Molecular Patterns; Patojenle İlgili Moleküler Örnekler) grubunda yer alır ve bunlar bitki temel savunmasının elisitörleridirler [17, 18, 19]. Patojen organizmalar gibi apatojen organizmalar da yukarıda adı geçen elisitör (yani PAMP/MAMP gibi; MAMP Microbe- Associated Molecular Patterns; Mikropla İlgili Moleküler Örnekler) grubu moleküler bileşenlere sahip oldukları için bitkilerde temel savunmayı teşvik edebilmektedirler [20, 21]. Epitop görevi yapan PAMP/MAMP molekülleri genellikle bitki hücrelerinin hücre dışı yüzey reseptörleri ile algılanmakta olup, bakteriyel soğuk şok proteini, translasyon elongasyon faktör-Tu gibi bazı PAMP’lar da hücre dışı moleküllerdir [18]. PAMP molekülleri bitkide PTI (PAMP-Triggered Immunity = Patojenle İlgili Moleküler Örnekler ile Uyarılan İmmünite) savunmayı teşvik ederken, hücre içi patojen efektörleri de özel R proteinleri ile tayin edilir ve ETI (Effector-Triggered Immunity = Efektör ile Uyarılan İmmünite) immüniteyi teşvik ederler [22]. Şekil 1’de özet olarak verildiği gibi eğer patojen PTI savunmanın üstesinden gelirse, ardından ETI immünite aktiflenmeye başlar. Ancak sadece bitkiye adapte olabilen mikroorganizmaların efektörleri, bitkinin R-gen ürünü olan proteinlerini açığa çıkarabilmektedir. Böylece bitki R-gen protein reseptörleri yardımıyla patojen efektörleri algılanarak bitkide güçlü bir savunma tepkisi oluşmaktadır [20].



**Şekil 1** Elisitör/efektör-reseptör interaksiyonunun genel şeması [23]

Şekil 1'e göre PTI, bitki hücrelerinin sitoplazma membran yüzeyinde lokalize olan reseptörlerin (PRRs; **P**attern **R**ecognition **R**eceptors = Örnek Tanıma Reseptörleri) aktivasyonu ile tetiklenir, bu reseptörler genellikle reseptör-kinaz proteinleri veya reseptör-benzeri proteinlerden ibarettir (RLPs/RLKs reseptör benzeri proteinler/kinazlar olarak da bilinirler). ETI tepki ise, sitoplazmik NB-LRR yapıda olan dayanıklılık veya R gen proteinleri ile başlatılır [24, 25].

### **Teşvik Edilen Savunma: Bitki R-gen Dayanıklılığı**

Bitkiler, kendilerini istila eden fitopatojen organizmaların avirülenslik (*Avr*) faktörleri olarak salgıladıkları efektör proteinleri tayin edecek olan R-genleri tarafından kodlanan reseptörler sayesinde algılanan ve sonuçta bitki immün tepkiyi uyandıracak savunma modeline de sahiptirler. Eğer patojen *Avr* (Antivirülens) genine sahip değilse, bitkideki ilgili R-gen de etkin olamaz. Fitopatojen bakteriler salgı sistemleri (T3 SS) aracılığıyla, avirülens genleri (*Avr*) tarafından kodlanan diğer ismi ile "efektör gen" olarak isimlendirilen gen ürünü moleküllerini direkt olarak bitki hücresinin sitoplazmasına bırakarak bitkiyi infekte ederler [26]. Bu efektörler sayesinde bitkinin fizyolojisi, ya patojenin konukçu bitkiyi kolonize etmesine yardımcı olmak için ya da konukçu bitkinin savunma reaksiyonlarına engel olmak amacıyla patojenin amacına uygun olarak değiştirilir. Buna karşın bitkiler de, patojen dayanıklılığında fonksiyonel olan R-gen aracılı dayanıklılık proteinlerini üreterek immün tepki geliştirirler [27]. Gen-İçin-Gen ilişkisi içinde ele alınan bu dayanıklılık modelinde, sadece hastalık dayanıklılık geni taşıyan bitkiler belli efektörlere sahip olan patojen ırklarına engel olmaktadır. Bakteri,

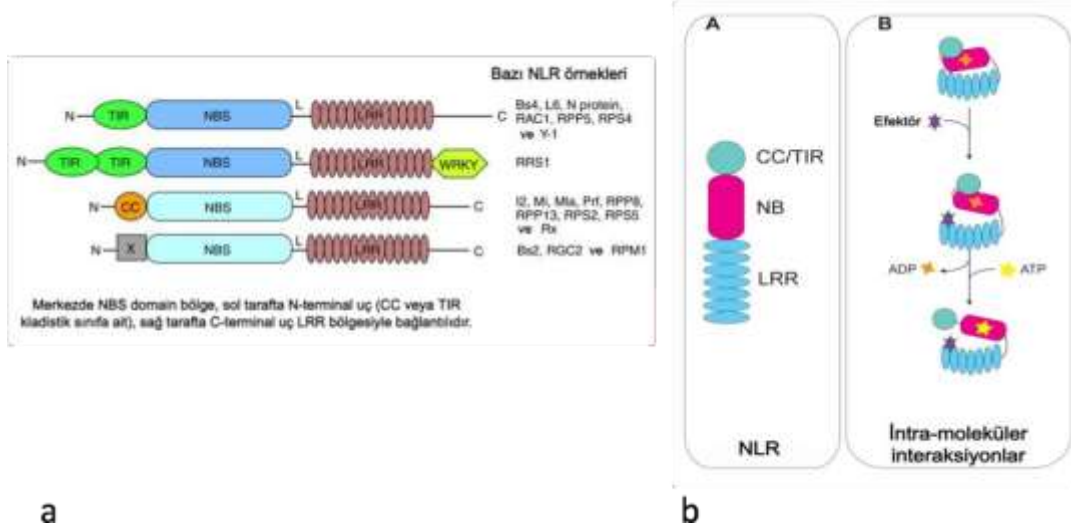
virüs, fungus, oomiset, böcek gibi çeşitli organizmalarda bulunan efektörler sayesinde bu zararlı ajanlar, konukçu oldukları bitkide dayanıklılık tepkisini harekete geçirmektedirler. Bu tarz bitki dayanıklılık tepkimeleri; programlı hücre ölümleriyle (PCD) sonuçlanan Hipersensitif Reaksiyon (HR) ve HR'nin geri planında bulunan sinyal mekanizmalarının harekete geçmesiyle hücre dışı alandan hücre içine  $Ca^{+2}$  girişi, anyon miktarındaki artışla oksidatif stres artışı, savunma genlerinin aktiflenmesi, sonuç olarak da lokal ve sistemik dayanıklılık yani kalitatif dayanıklılık gelişmektedir [28]. Pas funguslarına ait efektörler de, infeksiyon sırasında haustoriumlar vasıtasıyla konukçu bitkinin sitoplazmasına taşınmaktadır [29]. Tipik örnekler RTP1 ve AvrM efektörleridir, virülenslik fonksiyonları bilinmemekle beraber bu efektörlerden RTP1'in reseptörü henüz rapor edilmemiştir [30, 31, 32].

### **Bitki R-gen Protein Sınıfları**

Bitki R gen grubunda yer alan dayanıklılık gen proteinlerinin sınıflandırılma temeli standart olmayıp, molekül içindeki amino asit dizilimi, hücre membranıyla bağlantılı protein domain alanları, referans alınan bitki çeşitleri, dayanıklılığın moleküler mekanizmaları gibi çeşitli özelliklere dayalı sınıflandırılma örnekleri bulunmaktadır [20, 24, 25, 33, 34]. Angiosperm bitkilerin R-gen proteinleri domain alanları ve protein organizasyon yapıları esas alınarak sınıflandırılmaktadır [35, 36].

Bitki hastalık dayanıklılığındaki R-genleri; çok büyük ve çok çeşitli bir protein sınıfını kodlar ve bakteri, virüs, fungus, nematod, böcek gibi çeşitli biyotik organizmaların tayin edilmesinde görev yaparlar. R-gen proteinleri yapısal olarak NBS-LRR (Nucleotide-Binding Site Leucine-Rich Repeat; bazen kısaca NLRs olarak da ifade edilmektedir) molekülleridir [37]. Bitki NLR grubu moleküllerin hepsi sensör veya dedektör görevi yapan, bitkilerde bol miktarda bulunan, moleküler ağırlığı büyük olan ve çeşitli fitopatojen mikroorganizmaları tanıyan proteinlerdir [38]. Şekil 2'de NLR'nin genel modüler yapısı verilmiştir [39]. Bir NLR molekülü dört farklı domain alana sahip olup bu domainler linker moleküller ile birbirlerine bağlıdır. Domain alanları değişken olan bir N-terminal domain, NBS domain, LRR domain alan ve değişken olan bir C-terminal domain alana sahiptir [37]. Her alan immüniteyi harekete geçirmede önemli rollere sahiptir. Kapsamlı bitki genom analiz sonuçları NLR'lerin çok çeşitli olduğunu göstermiş olup, bütün R gen proteinleri sınıfında yer alan reseptörlerin domain alanlarının önemli bir yüzdesi NLR yapıdadır (Şekil 2). Bu NLR dedektör molekülleride DNA baz dizi

yapısına bağlı olarak ekzon-intron yapılarına göre TNL, CNL ve RNL şeklinde kladistik sınıflara ayrılmaktadır [34, 35, 40]. TNL; N-terminal Toll-interleukin NBS-LRR (TIR-NBS-LRR) CNL; Coiled-coiled-NBS-LRR (non TNL); RNL; Resistance powdery mildow8 (RPW8)-NBS-LRR (non TNL).



**Şekil 2** NLR'nin basit modüler yapısı [37] (a), NLR'nin aktif duruma geçişi [39](b)

Şekil 2'ye göre reseptör-efektörün tanınması üç adımda gerçekleşir: **1)** mikrobiyel molekül, efektör veya efektörün konukçuda değişime uğrattığı konukçunun molekülü direkt ya da indirekt olarak NLR aracılığı ile fiziksel bağlantı kurar. Bu tanıma olayı ile ilk moleküler düzenlenme gerçekleşir ve NB domain bölgesinden LRR domain bölgesi serbest hale geçer. Böylece LRR'nin de inhibitör etkisi ortadan kalkar. **2)** NB domain alanı inter- veya intra-moleküler olarak karşılıklı nükleotit değişimleri için hazır hale gelir ve ardından NLR aktif hale geçer. **3)** Bu döngü devam ederken ikinci bir konformasyon değişimi ile N-terminal domain bölge serbest kalır. Ardında da savunma olayları gelişir.

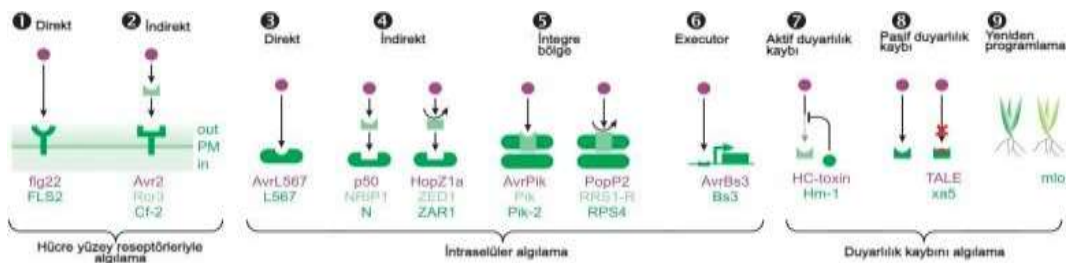
### Sitoplazmik NLR'nin Yapısı ve İşlevi

Belirli CC ve TIR domain yapılarının varlığıyla beraber N-terminal bölgesinin, bekçi hipotezine (guard hypothesis) göre hücre içinde gözlenen yabancı proteinlerle veya epitop-paratop bağlantısından sonraki gelişen olaylarda yer alan sinyal molekülleriyle protein-protein interaksyonlarında yer aldığı düşünülmektedir [41]. NBS domain bölgesi; \*NB-ARC domain olarak da isimlendirilir [42, 43, 44, 45]. Bu domain alan farklı motif yapılarına sahiptir ve hastalık sinyal yollarında ATP'nin bağlanması/hidrolizi ile

aktif-inaktif dönüşümle şalter görevi yapmaktadır. Hayvansal NB domain alan, oligomerizasyon için gereklidir [40]. C-terminal'de bulunan LRR domain alan ise, efektörün tanınmasından sorumlu bölgedir ve oto-inhibitör olarak görev yapar. Yani reseptör-efektör bağlantısından sonraki gelişmesi gereken olaylara ait sinyallerin otomatik olarak kendi kendine aktif hale geçmesine engel olur [46]. Bazı NLR'lerin LRR bölgelerinin silinmesi otoimmünitenin sürekli olarak teşvik edilmesine neden olmaktadır [47, 48]. C-terminal domain alan, farklı N-terminal domain alanlarına sahip NBL'lerde de farklılık göstermektedir [37]. \*NB-ARC: Nucleotide-Binding Adaptor Shared by APAF1 (Apoptotic Protease- Activating Factor 1), R proteinleri ve CED-4).

### R Proteinlerinin Hücre-içi Algılama Mekanizmaları

Bitki hücreleri, sitoplazmalarında mikrobiyel efektörlerin algılanmasından sorumlu çeşitli mekanizmalar geliştirmişlerdir. Genel olarak bu mekanizmalar aşağıda özetle açıklandığı şekildedir (Şekil 3). Konukçu bitkinin sitoplazmasında bulunan patojene ait bazı efektörler, bitki R proteinleriyle direkt interaksyona girebilmektedir. Bazı efektörler ise konukçu bitkideki fizyolojik değişimlerden sorumlu olup indirekt olarak algılanmaktadır. Transkripsiyon aktivatör-benzeri efektörler (TALEs: Transcription Activator-Like Effectors) de executor genleri (yönetici gen olarak düşünülebilir) aktif hale getirerek bitki duyarlılık genlerinin transkriptlerini değişime uğratarak fonksiyonel olmaktadır. Bir kısım bitkilerde patojen efektörlerine karşı direkt veya indirekt duyarlılık kayıpları meydana gelmek suretiyle veya resesif olan dayanıklılık genleri aktif hale gelerek dayanıklılık kazanılmaktadır. Bazı efektörler de APR (Adult Plant Resistance) genleri ile olgun bitkilerde kısmi dayanıklılık sağlamaktadır.



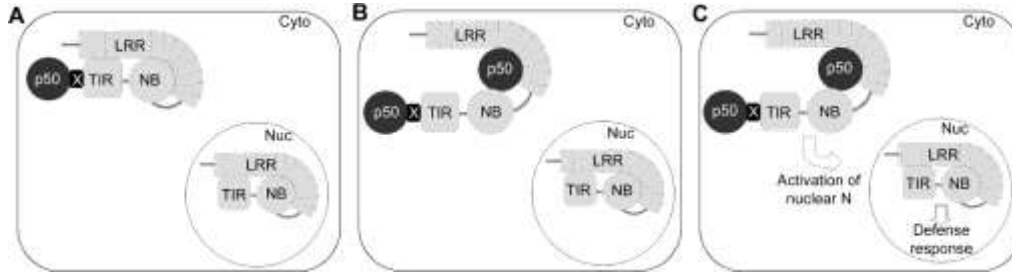
**Şekil 3** R proteinlerinin şematik moleküler mekanizması [33]. Şemada 1 ve 2 nolu: mekanizma bitki membran yüzey reseptörlerinin ekstraselüler algılaması ile ilgili olup, 3-9 arası mekanizma ise hücre içi algılamayı ilgilendirmektedir

***Bitkide bazı hücre içi efektörler bitki R proteinleriyle direkt olarak algılanmaktadır.*** Efektörlerin sitoplazmik NLR'lere direkt bağlanmasıyla direkt algılamanın fiziki yapısı da ortaya çıkmakta, bu da algının moleküler mekanizmasına ulaşılmasını kolaylaştırmaktadır. Konuyla ilgili birçok çalışmalar mevcut olup ketene ait L5/L6/L7 reseptörleri efektörle bağlandığı zaman reseptörün açık-kapalı pozisyonunda nasıl stabilize olduğu aşağıda örneklenmiştir [49]. Bu reseptör proteinler, pas fungusu *Melampsora lini*'nin polimorfik AvrL567 efektörlerinin özgül yapısıyla ayırt edilmektedir. L5 ve L6 proteinleri, ilgili efektörle direkt olarak interaksiyona girerek dayanıklılık reaksiyonlarını tetiklemektedir. Polimorfik olan L6 ve L7'nin moleküler-içi ve -arası interaksiyonla, AvrL567 efektörlerinin reseptörlere bağlanması ya teşvik edilmekte veya engel olunmaktadır. Böylece gereksiz bir şekilde immün olayların tetiklenmesi de önlenmektedir. Dolayısıyla ortamda efektör varsa ilgili immün genlerin aktivasyonu, inhibisyonu veya otoinhibisyonu gelişmektedir, efektör yoksa L reseptörünün büyük bir kısmı inaktif olmakta az miktarda kısmı da muhtemel bir efektöre karşı aktif pozisyonda hazır bulunmaktadır. Sonuçta L gen bölgesinde sinyal vermeden sorumlu olan bölgede görülen polimorfizm ortaklaşa bir etkileşimle kümülatif bir etki yaratabilir.

***Patojen efektörlerinin çoğu konukçu bitki sitoplazmik NLRs'lerle indirekt olarak algılanmaktadır.*** Efektörlerin konukçu tarafından indirekt algılanması üç şekilde gelişebilir; ya konukçu proteinleri ile efektörlerin interaksiyonları konukçuya ait diğer aracı moleküllerle gözlemlenerek veya konukçu proteinlerinde gözlenen enzimatik değişimlerle ya da hücrel homeostaz değişimleri gözlenerek bitki immün tepkisi gelişmektedir [33]. Her üç mekanizmaya ait örnekler aşağıda verilmiştir. Konukçu bitki proteinlerinde meydana gelen konformasyonel değişimler yoluyla yaratılan yeni proteinler ya efektörü hedeflemekte ya da efektör hedefinin taklitçiliği yoluyla etki göstermektedir. Burch-Smith ve ark. [50], yaptığı çalışmada tütünde bir R geni olan N proteini ile tütün mozaik virüsünün replikaz molekülünün (p50 olarak isimlendirilir) indirekt bağlantısını rapor etmiştir. Hem bitki N proteini hem de virüs p50 proteini sitoplazmada da nükleusta da bulunabilmektedir. Virüsün p50 efektörü nükleusta yer alsa da bir immün tepki gelişmemektedir. Aşağıdaki şekil 4'te görüldüğü gibi viral p50 efektörü, bitkinin sitoplazmik N proteininin TIR-NB bölgesine bağlanınca oligomerize olan N proteini konformasyonel değişim geçirmektedir. Ardından da N proteininin NB- LRR



domain alanı ilgili efektöre bağlanmaya hazır hale gelmektedir. Bu değişimin nükleusta yer alan N proteinine bilinmeyen bir mekanizmayla iletilerek N'nin aktif hale geçmesinin sağlandığı ve böylece konukçu savunma tepkimeleri harekete geçirildiği bildirilmiştir [50].



**Şekil 4** Virüse ait p50 efektörüyle bitki N proteininin interaksyonu sonucu reseptörün aktiflenmesi [50]

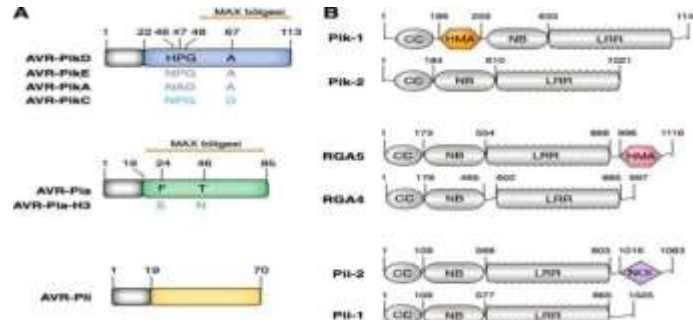
*Arabidopsis* R proteini olan ZAR1'in aktiflenmesiyle konukçuda gözlenen proteinlerin enzimatik değişimlerden dolayı efektör indirekt algılanmaktadır. Bu model sisteme göre, fitopatojen *Pseudomonas syringae*'nin efektörü olan HopZ1a, *Arabidopsis*'in sitoplazmik reseptörü ZAR1 (HopZ-Activated Resistance) proteini tarafından dolaylı olarak tanınmaktadır [51]. Efektör HopZ1a, avirülenslik fonksiyonu için direkt olarak *Arabidopsis*'e ait ZED1 (HopZETI-Deficient) proteinini hedef alır. Bitkiye ait ZED1 ise gerçek bir katalitik kinaz etkinliği olmayan bir pseudokinaz proteini olup efektör HopZ1a tarafından asetile edilir. [52, 53]. ZED1 asetile olduktan sonra bir bitki R proteini olan ZAR1 tarafından tanınmaktadır [53]. Böylece efektör HopZ1a, bitki proteini ZED1 aracılığı ile tuzağa düşürülerek ZAR1 yoluyla immün tepki harekete geçirilmektedir.

Bazı NLR molekülleri ise hücre homeostazını takip etmektedir. Çeşitli biyolojik olaylarda görev alan MAP Kinazlar bitkilerde biyotik ve abiyotik streslere tepki olarak hormonal faaliyetler, hücre bölünmesi, bitki gelişimi ile ilgili olayların düzenlenmesinde karşımıza çıkmaktadır [54]. MAP Kinaz yolağında yer alan MEKK1, MKK1/MKK2 ile MPK4 MAP kinazlar hem pozitif hem negatif düzenleyici olarak bitki immünesinde çift fonksiyona sahiptirler [55]. Tipik örneklerden *P. syringae*'nin HopAI efektörü, konukçu MPK4'ün aktivitesine engel olur ve MKK1 MKK2 2'nin baskılanmasına bağlı olarak immün olaylar başlar [56].

**Bazı bitkiler, patojen efektörlerini tanımak için NLR reseptörlerine entegre olan ilave domain alanlarına sahiptirler** [57, 58]. *Arabidopsis* RRS1 [59] ve çeltik RGA5 ile Pik NLR [9] reseptörlerinin sahip oldukları entegre domain alanları detaylı olarak

çalışılmıştır. Bunlardan çeltik NLR'lerinden olan RGA4 ile RGA5 gen bölgeleri çalışılmış [9] ve *Magnaporthe oryzae*'dan Avr-Pia [60], AVR-Pita [61], AVR-Pik ile AVR-Pii [60], AVR-Piz-t [62] ve AVR1-CO39 [63] efektörleri ise klonlanmıştır. Yukardaki efektörlerden AVR-Pia ve AVR-CO39 efektörleri, reseptör RGA4/RGA5 çifti tarafından tanınmaktadır. Şekil 5'te görüldüğü gibi bu tanıma olayı da patojen efektörünün çeltik R geni olan NLR RGA5 bölgesine entegre olan HMA (**H**ea**v**y-**M**et**A**ssociated) domain alan ile direkt bağlanmak suretiyle gerçekleşmektedir [64, 65]. Konukçu hücrede AVR-Pia efektörü yoksa RGA4 ve RGA5 fiziki olarak interaksiyona girerek hücre ölümüne engel olmakta, efektörün varlığında ise bu interaksiyon son bulmaktadır [9]. Yine çeltik NLR Pik-1/Pik-2'de AVR-Pik'i tanımakta ve HMA domain alanı ile bağlantı kurmaktadır [60, 66]. Patojen izolat ile çeltik varyetelerindeki nükleotit polimorfizmi evrim süresince silahlanma yarışında, konukçu-patojenin birlikte evrimleşmesi sonucuna götürebilir [67, 68, 69, 60]. Böylece patojene ait çeşitli AVR proteinleri, konukçunun bir tek NLR bölgesinin ortak domain alanı ile direkt bağlantı kurabilmektedir. Bu da göstermektedir ki, birçok efektörlerle konukçuya ait bir tek hedef üzerinde kantitatif etki oluşturulmaya çalışılmıştır (Şekil 5a).

Fujisaki ve ark. [70]'ın yaptıkları çalışmanın sonuçlarına göre yine çeltikte NBL Pii reseptörü, patojene ait Avr-Pii efektörünü indirekt algılamaktadır. Bir entegre domain bölge olan NOI (NOI; Nitrate ( $\text{NO}_3$ ) Induced Domain, NOI domain içeren proteinle nitrojen metabolizmasının bağlantısı yoktur) çeltik bitkisi Pii-2 reseptör bölgesi içinde yer alır. Avr-Pii efektörünün esas hedefi olan çeltik proteinlerinden OsExo70-F3 ile direkt bağlantı kurduktan sonra Pii-NOI ile interaksiyona girebilmektedir. Ardından konukçu immün savunması gelişmektedir (Şekil 5b). NOI-domaine sahip olan protein ailesinin bitkilerde biyotik savunma (patojen bakteriler gibi) olaylarını kontrol ettiği bildirilmiştir [71]. AvrRpt2 tarafından da hedeflenen NOI içeren proteinlerin amacı PTI'yi düzenlemek suretiyle virülens hedefleri aşmak olabilir [72].



**Şekil 5** NLR reseptörlerine entegre olan domain alanları [73]. *Magnaporthe oryzae* efektörleri (A), ve bitkideki ilgili NLR proteinleri. **A)** *M. oryzae*'nin AVR-Pik, AVR-Pia, AVR-Pii efektörlerine ait allellerin polimorfik pozisyonları gösterilmektedir. AVR-Pik ve AVR-Pia efektörleri MAX efektör ailesinden olup farklı sekanslara sahip olsa da ana çekirdek yapısı olan MAX (*Magnaporthe* Avr ve ToxB-Like) bölgesi evrimsel olarak korunmuştur. **B)** Çeltik R gen ürünleri olan Pik, Pia (RGA4 ve RGA5) ve Pii proteinlerine entegreolan HMA domain alanları vurgulanarak gösterilmektedir. NOI domain bölgesi de entegre domain bir alandır

Bitkilerde stresle ilgili gen promotör bölgelerinde bulunan W-box bir DNA cis- regülatör elementi olup, WRKY transkripsiyon faktörleriyle tanınır ve patojen efektörleriyle interaksiyona girerek immün tepki uyanmasını sağlar [74]. *Arabidopsis*'te bir NLR olan RRS1'in WRKY domain bölgesi patojen efektörüyle etkileşir ve RPS4- bağlı immün reaksiyonu teşvik eder, böylece WRKY transkripsiyon faktör domain bölgesi promotöre entegre olmuş bir çeşit tuzak olarak çalışmaktadır [59]. Arpa da WRKY transkript elementlerinin varlığını gösteren bir çalışmada *Fusarium culmorum* ile infeksiyon sonrası 8 WRKY gen transkript düzeylerinin yükseldiği bildirilmiştir (75). Bitki immünolojisi henüz keşfedilmemiş birçok aracı molekül ve mekanizmayı barındırmaktadır. Entegre domain bölgeleri (IDs; **I**ntegrated **D**omains) aracılığı ile patojen tanıma olaylarına ait çalışılan örnek sayısı şimdilik birkaç adet ile sınırlıdır. Sinyal yolak olaylarının moleküler düzeyde açığa çıkarılmasıyla efektörün direkt ve/veya indirekt hedefine uygun antagonist etkili bitki koruma ilaçlarının geliştirilmesi yeni araştırma alanlarına da öncülük yapacaktır.

**Bir R gen çeşidi olan executor genler (E genes), transkripsiyon aktivatör-benzeri efektörler (TALEs: Transcription Activator-Like Effectors) ile aktif hale getirilmektedir** [33].

TALE'ler *Xanthomonas* ve *Ralstonia* türlerine ait efektör molekülleri olup [76, 77, 78, 79] ayrıca endosimbiyont tür olan *Burkholderia rhizoxinica*'da da rapor edilmiştir [80, 81]. TALE'ler, biber ve domates patojeni olan *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria* (Xcv)'nin AvrBs3 efektör proteininin genetik ve yapısal özelliklerinin ortaya çıkarılmasıyla keşfedilmeye başlanmıştır [82]. Patojene ait olan TALE proteinleri, bitkinin duyarlılık



Dayanıklılık alleline sahip çeltik varyeteleri *Xoo* ile infekte olduğu zaman uyumsuz (incompatible) bitki-patojen interaksyonu sonucunda R proteini ifade olmakta (expression) ve sonuçta bitki hastalık dayanıklılığı gelişmektedir. Duyarlılık allelerine sahip çeltik varyetelerinin polimorfik olan promotör bölgelerindeki özel TALE sekansları aracılığıyla bilinmeyen bir mekanizmayla hastalık dayanıklılığı konstitütif olarak gelişmektedir. Promotör ile ilgili transgenik varyete analiz çalışmalarından elde edilen sonuçlara göre, *Xa27* promotörünün null allel bölgesi *Xoo* için hem uyumlu ve hem de uyumsuz konukçu-patojen ilişkisi içinde *Xa27*'nin ektopik ekspresyonuna neden olmaktadır. Böylece bitkiye uyumlu konukçu-patojen için hastalık oluşumuna konstitütif bir dayanıklılık sağlamaktadır. Promotöre bağlı bu dayanıklılığın, transkripsiyon sonrası değişimlerden kaynaklı olabileceği vurgulanmıştır. Ancak patojen AvrXa27 efektörü çeltik *Xa27*'nin promotörüne direkt mi veya indirekt mi etki ettiği bilinmemektedir. Önemli bir diğer sonuçta indüksiyon sonrası dayanıklı bitkide ilgili gen ifadesi artarken duyarlı varyetelerin ektopik ifadesi süreklidir. Duyarlılık alleline sahip olan bitkiler promotör taklitçiliği geliştirerek evrimleşmişler ve efektörün bitkide hedef aldığı substratı engelleyecek şekilde savunma tepkimeleri tetiklenmekte ve patojen bertaraf edilmektedir (Şekil 6).

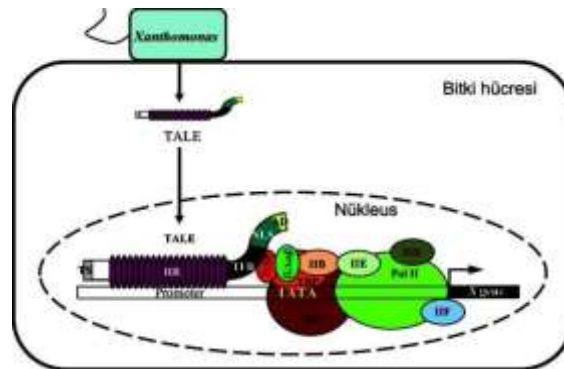
Römer ve ark. [90] biber, çeltik ve *Xanthomonas* türlerinde yaptığı çalışmada, TALEs efektörü AvrBs3'ün biberde bir R geni olan *Bs3*'ün promotör bölgesinde bulunan ve sadece TALE efektörlerine ait özel olan UPT kutusu (*UP regulated by TAL effectors*) ile etkileşimi sonucunda tanındığını bildirmiştir. Ancak çeltik *Xa27* R geninin bağlantılı olduğu TALEs ile interaksyonun tanımlanmadığını rapor etmişlerdir. Mono- ve di-kotiledonlarda UPT kutusu ile TALEs'in kodlanan baz dizilerinde bir homoloji bulunamamış olup böylece mono- ve di-kotiledon bitki türlerinde TALEs ile ilgili dayanıklılık mekanizmalarının birbirlerinden bağımsız evrimleştiği düşünülmektedir [90]. Patojen TALEs efektörlerinin konukçu DNA'sında TALEs'e özgül baz dizilerine bağlanma özelliğinin anlaşılmasıyla, *Xanthomonas* türlerine karşı sentetik executor genler aracılığı ile immün dayanıklılık geliştirme araştırmaları da dikkat çekmeye başlamıştır [90, 91, 92].

***Bitki R genlerinin sahip olduğu diğer bir mekanizma bitkide aktif duyarlılık kaybı olup, bitki patojenin istila stratejisini etkin olarak kesmekte ve patojeni direkt etkisizleştirmektedir*** [33]. Bu mekanizmaya ait çeşitli fikirler ileri sürülebilir. Örneğin,

bitkiye ait immün sinyal mekanizmaları ya sürekli ifade olmakta veya ifade miktarı artmaktadır. Bitki, mantar ve bakteriler ribozomları inaktif eden proteinlere (**RIP: Ribosome-Inactivating Proteins**) sahiptirler [93, 94, 95, 96]. Çeltik genomuna, DNA'nın ektopik pozisyonunda yerleştirilen bir genin aşırı eksprese olması sonucunda genç çeltik varyetelerinin kuraklık, tuzluluk gibi koşullara dayanıklı olduğu rapor edilmiştir [97]. Dayanıklılığın mekanizması bilinmemekle beraber, RIP'le teşvik edilen protein sentez mekanizmasının engellenmesiyle proteinler biyotik ve abiyotik streslere karşı tekrar organize olmaktadır [98]. Protein replikasyonunu hedefleyen dayanıklılık sistemi birçok konukçu bitki-virüs sistemlerinde mevcuttur. Konu ile ilgili son yıllarda yapılan çalışmalardan olan *Phytolacca americana* L. bitkisinin ürettiği PAP (**Pokeweed Antiviral Protein**) proteini ve bunun birçok izoformları antiviral-antifungal olup ribozom aktivitesine engel olmaktadır, ayrıca ribozomdaki pürinleri de hidrolize etmektedir [99]. Domashevskiy ve ark. [100]'da TEV (Tobacco Etch Virus) RNA pürinlerinin, bitki PAP proteini ile hidroliz edildiğini bildirmiştir. Böylece bitkide immün sistem daha harekete geçmeden virüsler ekarte olmuştur. Resesif dayanıklılığa diğer örnek ise; *eIF4E* genin bir izoformu olan *eIFiso4E* geni mutanlı olan *A. thaliana* bitkisi Tobacco Etch Virüs (TEV)'ne karşı dayanıklılık göstermiştir [101]. *A. thaliana*'da bol miktarda bulunan *eIF4E*, translasyona başlama faktör proteinlerindedir. Benzer şekilde domates hücrelerinin hücre içi membranında *Tm-1* gen ürünü, tütün mozayik virüsünün RNA'sı üzerinde yer alan replikasyon protein genlerine bağlanarak virüsün replikasyonunu önlemekte ve böylece bitki dayanıklılık kazanmaktadır [102, 103]. *Tm-1*, domates mozayik virüsü (ToMV)'ne karşı dayanıklılık genidir. Domates mozayik virüsü (ToMV) de pozitif-kolonlu bir RNA virüsüdür.

***Bazı bitkiler resesif R genleriyle, patojenin konukçudaki esas hedefinde interaksiyon kaybı yaratarak indirekt (veya pasif) duyarlılık kaybına neden olmaktadır.*** Transkripsiyon Aktivatör-Benzeri Efektörler (TALEs: **T**ranscription **A**ctivator-**L**ike **E**ffectors), *Xanthomonas* cinsi fitopatojen bakterilerde bulunan önemli efektörlerdir [104]. Çeltikte bakteriyel yanıklık etmeni *Xoo*'nın TALEs proteinleri, konukçu bitkileri infeksiyon için gerekli olup aynı zamanda konukçuya ait resesif duyarlılık gen transkripsiyonunu aktifleyen bir faktördür. Şekil 7'de görüldüğü gibi patojen bakteri *Xoo*, TALEs proteinlerini tip III bakteriyel salgı sistemi aracılığı ile konukçu bitki çeltiğe injekte ettikten sonra konukçuya ait bazal bir transkripsiyon faktörü olan TFIIA $\gamma$ 5 ile

direkt interaksyon kurmaktadır. Bu interaksyon duyarlılık genlerini çalıştırarak bitkiyi hastalığa teşvik etmektedir [105]. Aynı araştırmacılar çalışmalarında, transkripsiyon faktöründe yaratılan mutasyonla RNAi aracılığıyla *Xoo*'ya dayanıklılığın artırıldığını da göstermişlerdir. Sonuçta konukçunun TFIIA $\gamma$ 5 gen ekspresyonu azaldığı zaman bitki duyarlılığı da azalarak hastalığa dayanıklı hale gelmektedir. Böylece bakteri TALEs proteinlerinin konukçudaki hedefi ile oluşan interaksyon kaybı bitkiyi hastalığa dayanıklı yapmaktadır. Yukarıda açıklamalarda ele alınan TALEs ile farkı kısaca şu şekilde özetlenebilir; *Xoo*-çeltik interaksyonlarında TFIIA $\gamma$ 5 faktörü çift fonksiyona sahiptir, birincisi *Xoo*'nun bitkiyi hastalandırması için TALE efektörü gereklidir. Patojene ait TALE ile bitki transkripsiyon faktörü TFIIA $\gamma$ 5 interaksyon kurduktan sonra duyarlılık genleri çalışarak bitkiyi hastalığa hazır hale getirmektedir. İkinci fonksiyonu ise konuyla ilgili çeltik R geninin promotör bölgesinde TALE'yi bağlayan özgül baz dizileri sayesinde bitki hastalığa karşı korunmaktadır. Ancak mekanizmanın biyokimyasal ve genetik detayları henüz bilinmemektedir. Kısaca TALE'ler konukçu bitkide R gen allellerine bağlı olarak ya direkt promotöre bağlanarak bitkiye dayanıklılık sağlamaktadır ya da konukçu transkripsiyon faktörleri ile bağlantı kurarak duyarlılık kaybı yaratmak suretiyle bitkiyi hastalığa teşvik etmektedir. Bu iki durumdan hangisinin gelişeceği, TALEs efektörlerinin özel özelliği ile bitkinin ilgili R gen alleline bağlı olarak belirlenmektedir. Tarımsal biyoteknolojide TALEs taşıyan patojenlere karşı, bitki duyarlılık genlerinin aktivitesini azaltacak bitki koruma ile ilgili ilaç çalışmaları, doğal seleksiyonla veya moleküler biyolojik yöntemlerle ıslah çalışmaları yeni bir uygulama stratejisinin geliştirilmesinde önemli potansiyellere sahiptir.



**Şekil 7** *Xanthomonas* bakterisi ile infekte olan çeltik bitkisinin hastalık eğilimi bitkinin özel bir transkripsiyon faktörü ile teşvik edilir [105]. Bakterinin TALE efektörü, bitkinin bir transkripsiyon faktörü olan TFIIA $\gamma$ 5 aracılığıyla bitki duyarlılık genini teşvik yoluyla infeksiyon için promotör üzerinde özel bir bölgeye bağlanır

*Bazı konukçu bitkiler R genlerinden farklı genlerle patojene karşı kısmi dayanıklılık sağlayarak belli oranda hastalık gelişimine olanak vermektedirler* [106]. Bu grupta yer alan genler “**Adult Plant Resistance**” (APR) genleri olarak isimlendirilir [106]. Hastalığa karşı duyarlılığı azalan genlerle ilgili stratejiye göre patojen efektörlerini hedef alan bitki proteinlerinin gen fonksiyonlarında değişimler veya kayıplar meydana gelmektedir. Bitki gen fonksiyonlarında ki kayıplar ve hasarlar bitkiyi genetik olarak hastalığa dayanıklı kılmakta olup geniş spektrumlu bir dayanıklılık şekli olan bu duyarlılık kaybı resesif bir karakterdir [107, 108]. Ancak bu mekanizmada dominant negatif alleller de dahil olabilir [33]. Mekanizması tam olarak bilinmemekle beraber bu grupta yer alan dayanıklılık genleri bitki yaşamının daha geç evrelerinde etkilidir [106]. Mono- ve di-kotiledon bitkilerde geniş olarak dağılım gösteren MLO alleli (MLO; Mildew Locus O), bitkiye ait özel bir integral membran proteini kodlamaktadır, arpada külleme etmeninin penetrasyonu için kritik öneme sahiptir [109]. Buna göre arpa MLO allellerinde meydana gelen fonksiyon kaybı, bazı ascomycetes fitopatojenlerine karşı konukçu bitkiye özel olmayan geniş ölçekli bir dayanıklılık sağlamaktadır [109]. Yani MLO gen ailesinin belli homologları, külleme hastalığının duyarlılık faktörleridir ve MLO’da görülen fonksiyon kayıpları birçok bitki türlerinde sürekli sürdürülebilir MLO dayanıklılığı sağlamaktadır [110].

## **Sonuç ve Öneriler**

Efektör-reseptör ilişkisinin biyolojik sonuçları tarımsal ıslah ve bitki koruma mücadelesinde önemli ve yeni bir konudur. Hala bilinmeyenleri çok fazla olan ve keşfedilmeyi bekleyen bitki sinyal yollarına ait efektör biyolojisinin alt araştırma konuları olan NLR moleküllerinin kofaktör gereksinimleri, NLR aktivasyonunda sekonder ara olaylar gibi çalışmalar da sürekli genişlemektedir. Biyotik bir canlıya ait olan ve konukçu bitkiye yabancı bir kimyasal madde, reseptör olarak isimlendirilen bitki hücre sensörleri aracılığı ile fiziksel kontak kurar ve hemen ardından konukçu hücre içinde bir dizi moleküler olaylar serisinin harekete geçmesiyle meydana gelen hücresel tepkiye neden olan işlemler toplamı sinyal yolları (signal transduction) olarak isimlendirilmektedir. Bu yolda işlevsel olan moleküller, bir bilgisayarın iletişim ağına benzer şekilde, birbirleriyle etkileşerek koordineli olarak bir kombinasyon ağı oluştururlar. Patojen organizmalar, sinyal yollarının herhangi bir ara aşamasında karşısına çıkan engelleri alt etmek için sürekli olarak evrimleşmektedir. Benzer şekilde



bitkilerde yeni savunma stratejileri geliştirmektedirler. Böylece bitki immunitesi dāhilinde bitki korumaya yönelik yeni stratejilerin geliştirilmesi dezorunlu hale gelmektedir. zet olarak bitki immunitesinin yeni savunma strateji hedeflerinin ana hatları aşağıdaki şekilde değerlendirilebilir;

1) Patojen efektörleri veya analogları tek veya efektörler kokteyli şeklinde bitkiye önceden uygulanmak suretiyle bitkinin immunitesi teşvik edilebilir böylece kısmi dayanıklılık sağlanabilir. Örneğin *Rhizobium* sp. türü nodozite bakterilerinin baklagil köklerinde bitkilerle simbiyotik bir ilişki içinde yařadđı bilinmektedir. Nodlasyon için çeşitli efektörleri bitkilere gönderen rhizobiyumların bazı efektörleri bitki savunma tepkimelerini de harekete geçirebilmektedir, bazı efektörleri ise savunmayı baskılamaktadır. Ayrıca rhizobiumlar marul, kanola, *Arabidopsis* gibi baklagil familyasından olmayan bitki türlerinin köklerini de kolonize edebilmektedirler [111]. Bitki korumada biyolojik pestisit olarak kullanılan *Bacillus thuringiensis* modeline benzer sistemler geliştirilerek *Rhizobium* gibi patojenik olmayan mikroorganizmalar da sentetik kimyasallar yerine doğal kimyasallar olarak bitki immün savunmayı harekete geçirmede öneri olarak sunulabilir.

2) Yine bitki korumaya yönelik genel ilaçlama yerine direkt efektörleri hedef olarak bunların etkisini zayıflatacak veya inaktif edecek kimyasal/biyolojik mücadele yöntemleri geliştirilebilir. Mikroorganizmaların kendi aralarındaki antagonistik mekanizmalara dayalı birbirlerine zıt etkili efektörlerin araştırılması gerekmektedir.

3) Patojenler tarafından efektörler bitki sitoplazmasına injekte edildikten sonra sitoplazmik R-gen proteinleriyle dolaylı veya dolaysız bağlantı kurmaktadır. Bu bağlantı yolları ortaya çıkarılıp kimyasal/biyolojik uygulamalarla bloke edilebilir veya reaksiyona gireceği bitki R-gen proteinleri kimyasal yolla manipule edilebilir böylece efektörle interaksiyon engellenebilir.

4) Bitkilerin duyarlılık gen fonksiyonları değerştirilerek bitkiye dayanıklılık sağlanabilir. Bazı patojen efektörleri bitki R-gen transkriptleriyle interaksiyona girerek bitkinin hastalık duyarlılığını artırmaktadır. Bu R-gen transkriptleri kimyasal/biyolojik uygulamalarla inaktif edilerek efektörle bağlantısı fiziki olarak kesilirse, bitki dolaylı dayanıklılık kazanabilir.

5) Patojen efektörlerinin etkisini bitkiler tarafından doğal azaltacak mekanizmalar teşvik edilebilir. Örneğin bazı bitkiler ribozom-inaktif eden proteinlere

(RIP protein) sahiptir, bu proteinler antiviral ve antifungal özelliindedir ve organizmaların nükleik asitlerine ya da ribozomlarına zarar vererek patojeni etkisizleştirmektedir. Böylece bitki immünitesi harekete geçmeden bu tarz mekanizmalar ve indüksiyonla teşvik yolları araştırılabilir.

Bitki R-gen promotörleri patojen efektörlerle interaksiyona girebilmektedir. TALEs efektör örneğinde olduğu gibi bitkinin R gen allel özelliğine bağılı olarak bazı TALE efektörleri duyarlılık genlerinin promotörüne bağlanır. Bu promotör bölgeler aslında bitki tarafından geliştirilen TALE'leri tuzağa düşürme yöntemidir. Böylece promotör taklitçiliğiyle tuzağa düşürülen efektörler bitkinin dayanıklılık genlerini çalıştırmaya başlar. Bitkiler de TALE bağlayan gen bölgelerinin varlığı tespit edilirse, promotöre uygun analog efektörlerle dayanıklılık genleri çalıştırılabilir.

Efektör-reseptör biyolojisi, fizyoloji, biyokimya, moleküler biyoloji, genetik, biyoinformatik gibi interdisipliner alanlardan elde edilecek bilgiler ışığında aydınlanacaktır. Ama en önemli konu ise buradan elde edilecek kümülatif sonuçların ülkemizde bitki koruma ıslahına uygulanabilirliği, bu teknolojilerden ne gibi sonuçlar üretileceği, nasıl yarar sağlanacağı ve gıda güvenliği mutlaka temin edilmelidir. Bu doğrultuda sürdürülebilir yeni bitki koruma planları oluşturularak, bitki-patojen interaksiyonlarının hangi aşamasında ve nasıl etkili mücadele yöntemleri geliştirilmesi gerekliliği konusuna zemin hazırlanacaktır.

Bitki immünitesi, bitkilere gen nakilleri yapılmadan bitkinin mevcut sistemleri harekete geçirilerek kısmen veya tam dayanıklılık sağlama olasılıkları sunmaktadır. İndüksiyon için çok çeşitli kimyasallarla uygulanabilir, sürdürülebilir, pahası makul olan ve insan/çevre zararını minimumda tutacak doğal, sentetik/yarı sentetik maddelerin keşfi ya da biyolojik yolla uygulamayı mümkün hale getiren projeler geliştirilmesi gerekir. Sonuç olarak bitki hastalık dayanıklılık ıslahı amaçlı araştırmalarda bitkisel sinyal transdüksiyon olayları çok büyük bir potansiyel taşımaktadır.

## **Kaynaklar**

1. Dong, O.X. and P.C. Ronald, Genetic engineering for disease resistance in plants: Recent Progress and Future Perspectives. *Plant Physiology*, 2019. 180(1): p. 26-38.
2. Yin, K. and J.L. Qiu, Genome editing for plant disease resistance: applications and perspectives. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 2019. 374(1767): p. 20180322.
3. Engelhardt, S., R. Stam, and R. Hüchelhoven, 2018. Good Riddance? Breaking Disease

- Susceptibility in the Era of New Breeding Technologies. *Agronomy*, 2018. 8(7): p. 114.
4. Franceschetti, M., et al., Effectors of filamentous plant pathogens: Commonalities amid diversity. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2017. 81(2): p. e00066-16.
  5. Kubicek, C.P., T.L. Starr, and N.L. Glass, Plant cell wall-degrading enzymes and their secretion in plant-pathogenic fungi. *Annual Review of Phytopathology*, 2014. 52: p. 427-451.
  6. Wang, M.B., et al., RNA silencing and plant viral diseases. *Molecular Plant Microbe- Interactions: MPMI*, 2012. 25(10): p. 1275-1285.
  7. Giese, W., et al., Spatial modeling of the membrane-cytosolic interface in protein kinase signal transduction. *PLoS Computational Biology*, 2018. 14(4): p. e1006075.
  8. Silva, M.S., et al., Review: Potential biotechnological assets related to plant immunity modulation applicable in engineering disease-resistant crops. *Plant Science: an International Journal of Experimental Plant Biology*, 2018. 270: p. 72-84.
  9. Césari, S., et al., A novel conserved mechanism for plant NLR protein pairs: the "integrated decay" hypothesis. *Frontiers in Plant Science*, 2014. 5: p. 606.
  10. Jatwa, T.K., M. Sharma, and A.K. Malav, R gene and its role in disease managements in plants. *International Journal of Current Research in Biosciences and Plant Biology*, 2017. 4(5): p. 61-64.
  11. Nepal, M.P., et al., Comparative Genomics of Non-TNL Disease Resistance Genes from Six Plant Species. *Genes*, 2017. 8(10): p. 249.
  12. Zhang, Y., T. Lubberstedt, and M. Xu, The genetic and molecular basis of plant resistance to pathogens. *Journal of Genetics and Genomics = Yi chuan xue bao*, 2013. 40(1): p. 23-35.
  13. Heath, M.C., Nonhost resistance and nonspecific plant defenses. *Current Opinion in Plant Biology*, 2000. 3(4): p. 315-319.
  14. Staskawicz, B.J., et al., Molecular genetics of plant disease resistance. *Science(New York, N.Y.)*, 1995. 268(5211): p. 661-667.
  15. Heath, M.C., Evolution of plant resistance and susceptibility to fungal invaders. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 1987. 9(4): p. 389-397.
  16. Heath, M. C., 2003. Nonhost resistance in plants to microbial pathogens, in *Innate immunity. Infectious disease*, R.A.B. Ezekowitz and J.A. Hoffmann, Editors. 2003, Humana Press Totowa, NJ. p. 47-57.
  17. Nie, J., et al., A small cysteine-rich protein from two kingdoms of microbes is recognized as a novel pathogen-associated molecular pattern. *The New Phytologist*, 2019. 222(2): p. 995-1011.
  18. Schwessinger, B. and C. Zipfel, News from the frontline: recent insights into PAMP-triggered immunity in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 2008. 11(4): p. 389-395.
  19. Zipfel, C., Pattern-recognition receptors in plant innate immunity. *Current Opinion in Immunology*, 2008. 20(1): p. 10-16.
  20. Gururani, M.A., et al., Plant disease resistance genes: Current status and future directions. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 2012. 78: p. 51-65.
  21. Freeman, B.C. and G.A. Beattie, An overview of plant defenses against pathogens and herbivores. *Plant Health Instructor*, 2008. <http://dx.doi.org/10.1094/PHI-I-2008-0226-01%20> [Erişim Tarihi: 17. 05. 2021].
  22. Monaghan J. and C. Zipfel, Plant pattern recognition receptor complexes at the plasma membrane. *Current Opinion in Plant Biology*, 2012. 15(4): p. 349-357.
  23. Kazan, K. and R. Lyons, Intervention of Phytohormone Pathways by Pathogen Effectors. *The Plant Cell*, 2014. 26(6): p. 2285-2309.
  24. Macho, A.P. and C. Zipfel, Plant PRRs and the activation of innate immune signaling. *Molecular Cell*, 2014. 54(2): p. 263-272.
  25. Jones, J. D. and J.L. Dangl, The plant immune system. *Nature*, 2006. 444(7117): p. 323-329.
  26. Chang, J.H., D. Desveaux, and A.L. Creason, ABCs and 123s Bacterial Secretion Systems in Plant Pathogenesis. *Annual Review of Phytopathology*, 2014. 52: p. 317-345.
  27. MacQueen, A. and J. Bergelson, Modulation of R-gene expression across environments. *Journal*

- of Experimental Botany, 2016. 67(7): p. 2093-2105.
28. Zhang, H. and S. Wang, Rice versus *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae*: a unique pathosystem. Current Opinion in Plant Biology, 2013. 16(2): p. 188-195.
  29. Petre, B., D.L. Joly, and S. Duplessis, Effector proteins of rust fungi. Frontiers in Plant Science, 2014. 5: p. 416.
  30. Kemen, E., et al., A novel structural effector from rust fungi is capable of fibril formation. The Plant Journal, 2013. 75(5): p. 767-780.
  31. Rafiqi, M., et al., Internalization of flax rust avirulence proteins into flax and tobacco cells can occur in the absence of the pathogen. The Plant Cell, 2010. 22(6): p. 2017-2032.
  32. Kemen, E., et al., Identification of a protein from rust fungi transferred from haustoria into infected plant cells. Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI, 2005. 18(11): p. 1130-1139.
  33. Kourelis, J. and R. van der Hoorn, Defended to the nines: 25 years of resistance gene cloning identifies nine mechanisms of R protein function. The Plant Cell, 2018. 30(2): p. 285-299.
  34. Neupane, S., et al., Genome-Wide Identification of NBS-Encoding Resistance Genes in Sunflower (*Helianthus annuus* L). Genes, 2018. 9(8): p. 384.
  35. Shao, Z.Q., et al., Large-scale analyses of angiosperm nucleotide-binding site-leucine-rich repeat genes reveal three anciently diverged classes with distinct evolutionary patterns. Plant Physiology, 2016. 170(4): p. 2095-2109.
  36. Meyers, B.C., et al., Genome-wide analysis of NBS-LRR-encoding genes in *Arabidopsis*. The Plant Cell, 2003. 15(4): p. 809-834.
  37. McHale, L., et al., Plant NBS-LRR proteins: adaptable guards. Genome Biology, 2006. 7(4): p. 212.
  38. Baggs, E., G. Dagdas, and K.V. Krasileva, NLR diversity, helpers and integrated domains: making sense of the NLR identity. Current Opinion in Plant Biology, 2017. 38: p. 59-67.
  39. Bonardi, V. and J.L. Dangl, How complex are intracellular immune receptor signaling complexes?. Frontiers in Plant Science, 2012. 3: p. 237.
  40. Kapos, P., K.T. Devendrakumar, and X. Li, Plant NLRs: From discovery to application. Plant Science: an international journal of experimental plant biology, 2019. 279: p. 3-18.
  41. Belkhadir, Y., R. Subramaniam, and J.L. Dangl, Plant disease resistance protein signaling: NBS-LRR proteins and their partners. Current Opinion in Plant Biology, 2004. 7(4): p. 391-399.
  42. Williams, S.J., et al., An autoactive mutant of the M flax rust resistance protein has a preference for binding ATP, whereas wild-type M protein binds ADP. Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI, 2011. 24(8): p. 897-906.
  43. Tameling, W.I., et al., Mutations in the NB-ARC domain of I-2 that impair ATP hydrolysis cause autoactivation. Plant Physiology, 2006. 140(4): p. 1233-1245.
  44. Riedl, S.J., et al., Structure of the apoptotic protease-activating factor 1 bound to ADP. Nature, 2005. 434(7035): p. 926-933.
  45. Tameling, W.I., et al., The tomato R gene product I-2 and MI-1 are functional ATP binding proteins with ATPase activity. The Plant Cell, 2002. 14(11): p. 2929-2939.
  46. Hu, Z., et al., Crystal structure of NLRC4 reveals its autoinhibition mechanism. Science (New York, N.Y.), 2013. 341(6142): p. 172-175.
  47. Tameling, W.I., et al., RanGAP2 mediates nucleocytoplasmic partitioning of the NB-LRR immune receptor Rx in the solanaceae, thereby dictating Rx function. The Plant Cell, 2010. 22(12): p. 4176-4194.
  48. Ade, J., et al., Indirect activation of a plant nucleotide binding site-leucine-rich repeat protein by a bacterial protease. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS), 2007. 104(7): p. 2531-2536.
  49. Ravensdale, M., et al., Intramolecular interaction influences binding of the Flax L5 and L6 resistance proteins to their AvrL567 ligands. PLoS Pathogens, 2012. 8(11): p. e1003004.
  50. Burch-Smith, T.M., et al., A novel role for the TIR domain in association with pathogen-derived

- elicitors. *PLoS Biology*, 2007. 5(3): p. e68.
51. Lewis, J.D., et al., Allele-specific virulence attenuation of the *Pseudomonas syringae* HopZ1a type III effector via the *Arabidopsis* ZAR1 resistance protein. *PLoS Genetics*, 2010. 6(4): p. e1000894.
  52. Jayaraman, J., et al., A bacterial acetyltransferase triggers immunity in *Arabidopsis thaliana* independent of hypersensitive response. *Scientific Reports*, 2017. 7(1): p. 3557.
  53. Lewis, J.D., et al., The *Arabidopsis* ZED1 pseudokinase is required for ZAR1-mediated immunity induced by the *Pseudomonas syringae* type III effector HopZ1a. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)*, 2013. 110(46): p. 18722-18727.
  54. MAPK Group., Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: a new nomenclature. *Trends in Plant Science*, 2002. 7(7): p. 301-308.
  55. Zhang, Z., et al., Disruption of PAMP-induced MAP kinase cascade by a *Pseudomonas syringae* effector activates plant immunity mediated by the NB-LRR protein SUMM2. *Cell Host & Microbe*, 2012. 11(3): p. 253-263.
  56. Zhang, Z., et al., The NLR protein SUMM2 senses the disruption of an immune signaling MAP kinase cascade via CRCK3. *EMBO Reports*, 2017. 18(2): p. 292-302.
  57. Kroj, T., et al., Integration of decoy domains derived from protein targets of pathogen effectors into plant immune receptors is widespread. *The New Phytologist*, 2016. 210(2): p. 618-626.
  58. Sarris, P.F., et al., Comparative analysis of plant immune receptor architectures uncovers host proteins likely targeted by pathogens. *BMC Biology*, 2016. 14: p. 8.
  59. Sarris, P.F., et al., A plant immune receptor detects pathogen effectors that target WRKY transcription factors. *Cell*, 2015. 161(5): p. 1089-1100.
  60. Yoshida, K., et al., Association genetics reveals three avirulence genes from the rice blast fungal pathogen *Magnaporthe oryzae*. *The Plant Cell*, 2009. 21(5): p. 1573-1591.
  61. Orbach, M.J., et al., A telomeric avirulence gene determines efficacy for the rice blast resistance gene Pi-ta. *The Plant Cell*, 2000. 12(11): p. 2019-2032.
  62. Li, W., et al., The *Magnaporthe oryzae* avirulence gene AvrPiz-t encodes a predicted secreted protein that triggers the immunity in rice mediated by the blast resistance gene Piz-t. *Molecular Plant-Microbe Interactions (IS-MPMI)*, 2009. 22(4): p. 411-420.
  63. Ribot, C., et al., The *Magnaporthe oryzae* effector AVR1-CO39 is translocated into rice cells independently of a fungal-derived machinery. *The Plant Journal: for cell and molecular biology*, 2013. 74(1): p. 1-12.
  64. Césari, S., et al., The rice resistance protein pair RGA4/RGA5 recognizes the *Magnaporthe oryzae* effectors AVR-Pia and AVR1-CO39 by directing binding. *The Plant Cell*, 2013. 25(4): p. 1463-1481.
  65. Okuyama, Y., et al., A multifaceted genomics approach allows the isolation of the rice Pia-blast resistance gene consisting of two adjacent NBS-LRR protein genes. *The Plant Journal: for cell and molecular biology*, 2011. 66(3): p. 467-479.
  66. Ashikawa, I., et al., Two adjacent nucleotide-binding site-leucine-rich repeat class genes are required to confer Pikm-specific rice blast resistance. *Genetics*, 2008. 180(4): p. 2267-2276.
  67. Wu, W., et al., Stepwise arms race between AvrPik and Pik alleles in the rice blast pathosystem. *Molecular Plant-Microbe Interactions (IS-MPMI)*, 2014. 27(8): p. 759-769.
  68. Zhai, C., et al., Function and interaction of the coupled genes responsible for Pik-h encoded rice blast resistance. *PloS One*, 2014. 9(6): p. e98067.
  69. Kanzaki, H., et al., Arms race co-evolution of *Magnaporthe oryzae* AVR-Pik and rice Pik genes driven by their physical interactions. *The Plant Journal*, 2012. 72(6): p. 894-907.
  70. Fujisaki, K., et al., An unconventional NOI/RIN4 domain of a rice NLR protein binds host EXO70 protein to confer fungal immunity. *bioRxiv*, 2017. 239400. <https://doi.org/10.1101/239400>[Erişim Tarihi: 17. 05. 2021]
  71. Afzal, A.J., J.H. Kim, and D. Mackey, The role of NOI-domain containing proteins in plant immune signaling. *BMC Genomics*, 2013. 14:p. 327.

72. Chisholm, S.T., et al., Molecular characterization of proteolytic cleavage sites of the *Pseudomonas syringae* effector AvrRpt2. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS), 2005. 102(6): p. 2087-2092.
73. Bialas, A., et al., Lessons in Effector and NLR Biology of Plant-Microbe Systems. Molecular Plant-Microbe Interactions: (IS-MPMI), 2018. 31(1): p. 34-45.
74. Uluhan, E., E.N. Keleş, and F. Tufan, Analysis of WRKY Transcription Factors in Barley Cultivars Infected with *Fusarium culmorum*. International Journal of Life Sciences and Biotechnology, 2019. 2(3): p. 165-174.
75. Rushton, P.J., et al., WRKY transcription factors. Trends in Plant Science, 2010. 15(5): p. 247–258.
76. Heuer, H., et al., Repeat domain diversity of avrBs3-like genes in *Ralstonia solanacearum* strains and association with host preferences in the field. Applied and Environmental Microbiology, 2007. 73(13): p. 4379-4384.
77. Salanoubat, M., et al., Genome sequence of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum*. Nature, 2002. 415(6871): p. 497-502.
78. De Feyter, R., Y. Yang, and D.W. Gabriel, Gene-for-genes interactions between cotton R genes and *Xanthomonas campestris* pv *malvacearum* avr genes. Molecular Plant-Microbe Interactions (IS-MPMI), 1993. 6(2): p. 225-237.
79. Hopkins, C.M., et al., Identification of a family of avirulence genes from *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae*. Molecular Plant-Microbe Interactions (IS-MPMI), 1992. 5(6): p. 451-459.
80. Juillerat, A., et al., BurrH: a new modular DNA binding protein for genome engineering. Scientific Reports, 2014. 4: p. 3831.
81. de Lange, O., et al., Programmable DNA-binding proteins from Burkholderia provide a fresh perspective on the TALE-like repeat domain. Nucleic Acids Research, 2014. 42(11): p. 7436-7449.
82. Bonas, U., R.E. Stall, and B. Staskawicz, Genetic and structural characterization of the avirulence gene avrBs3 from *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria*. Molecular and General Genetics, 1989. 218(1): p. 127-136.
83. Bogdanove, A.J., S. Schornack, and T. Lahaye, TAL effectors: finding plant genes for disease and defense. Current Opinion in Plant Biology, 2010. 13(4): p. 394-401.
84. Zhang, J., Z. Yin, and F. White, TAL effectors and the executor R genes. Frontiers in Plant Science, 2015. 6: p. 641.
85. Gu, K., et al., R gene expression induced by a type-III effector triggers disease resistance in rice. Nature, 2005. 435(7045): p. 1122-1125.
86. Tian, D., et al., The rice TAL effector-dependent resistance protein XA10 triggers cell death and calcium depletion in the endoplasmic reticulum. The Plant Cell, 2014. 26(1): p. 497-515.
87. Wang, C., et al., XA23 is an executor R protein and confers broad-spectrum disease resistance in rice. Molecular Plant, 2015. 8(2): p. 290-302.
88. Römer, P., et al., Plant pathogen recognition mediated by promoter activation of the pepper Bs3 resistance gene. Science (New York, N.Y.), 2007. 318(5850): p. 645-648.
89. Strauss, T., et al., RNA-seq pinpoints a *Xanthomonas* TAL-effector activated resistance gene in a large-crop genome. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS), 2012. 109(47): p. 19480-19485.
90. Römer, P., S. Recht, and T. Lahaye, A single plant resistance gene promoter engineered to recognize multiple TAL effectors from disparate pathogens. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS), 2009. 106(48): p. 20526-20531.
91. Zeng, X., et al., Genetic engineering of the Xa10 promoter for broad-spectrum and durable resistance to *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae*. Plant Biotechnology Journal, 2015. 13(7): p. 993-1001.
92. Hummel, A.W., E.L. Doyle, and A.J. Bogdanove, Additional of transcription activator-like

- effector binding sites to a pathogen strain-specific rice bacterial blight resistance gene makes it effective against additional strains and against bacterial leaf streak. *New Phytologist*, 2012. 195(4): 883-893.
93. Puri, M., et al., Ribosome-inactivating proteins: current status and biomedical applications. *Drug Discovery Today*, 2012. 17(13-14): p. 774-783.
  94. Stirpe, F. and M.G. Battelli, Ribosome-inactivating proteins: progress and problems. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 2006. 63(16): p. 1850-1866.
  95. Girbés, T., et al., Description, distribution, activity and phylogenetic relationship of ribosome-inactivating proteins in plants, fungi and bacteria. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 2004. 4(5): p. 461-476.
  96. van Damme, E.J., et al., Ribosome-inactivating proteins: a family of plant proteins that do more than inactivate ribosomes. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 2001. 20: p. 395-465.
  97. Jiang, S.Y., et al., Over-expression of OSRIP18 increases drought and salt tolerance in transgenic rice plants. *Transgenic Research*, 2012. 21(4): p. 785-795.
  98. Stirpe, F., Ribosome-inactivating proteins: from toxins to useful proteins. *Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology*, 2013. 67: p. 12-16.
  99. Musidlak, O., R. Nawrot, and A. Goździcka-Józefiak, 2017. Which Plant Proteins Are Involved in Antiviral Defense? Review on In Vivo and In Vitro Activities of Selected Plant Proteins against Viruses. *International Journal of Molecular Sciences*, 2017. 18(11): p. 2300.
  100. Domashevskiy, A.V., et al., Plant Translation Initiation Complex eIFiso4F Directs Pokeweed Antiviral Protein to Selectively Depurinate Uncapped Tobacco Etch Virus RNA. *Biochemistry*, 2017. 56(45): p. 5980-5990.
  101. Lellis, A.D., et al., Loss-of-susceptibility mutants of *Arabidopsis thaliana* reveal an essential role for eIF(iso)4E during potyvirus infection. *Current Biology: CB*, 2002. 12(12): p. 1046-1051.
  102. Ishibashi, K. and M. Ishikawa, Mechanisms of tomato mosaic virus RNA replication and its inhibition by the host resistance factor Tm-1. *Current Opinion in Virology*, 2014. 9: p. 8-13.
  103. Ishibashi, K., et al., Structural basis for the recognition-evasion arms race between Tomato mosaic virus and the resistance gene Tm-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)*, 2014. 111(33): p. E3486-E3495.
  104. Boch, J., et al., Breaking the code the DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science*, 2009. 326(5959): p. 1509-1512.
  105. Yuan, M., et al., A host basal transcription factor is a key component for infection of rice by TALE-carrying bacteria. *eLife*, 2016. 5: p. e19605.
  106. Ellis, J.G., et al., The past, present and future of breeding rust resistance wheat. *Frontiers in Plant Science*, 2014. 5: p. 641.
  107. Lyngkjær, M.F. and T.L.W. Carver, Conditioning of cellular defence responses to powdery mildew in cereal leaves by prior attack. *Molecular Plant Pathology*, 2000. 1: p. 41-49.
  108. Jørgensen, I. H., Discovery, characterization and exploitation of Mlo powdery mildew resistance in barley. *Euphytica*, 1992. 63: p. 141-152.
  109. Hüchelhoven, R. and R. Panstruga, Cell biology of the plant-powdery mildew interaction. *Current Opinion in Plant Biology*, 2011. 14(6): p. 738-746.
  110. Andolfo, G., et al., Evolutionary conservation of MLO gene promoter signatures. *BMC Plant Biology*, 2019. 19: p. 150.
  111. Gkarmiri, K., Interactions of fungal pathogens and antagonistic bacteria in the rhizosphere of *Brassica napus*. Faculty of Forest Sciences Department of Forest Mycology and Plant Pathology, Doctoral thesis, 2018. Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden 125 pp.

Aladeboyeje, O.T. and N.O. Sanli, Fermented Traditional Probiotic Beverages of Turkish Origin: A Concise Review. *International Journal of Life Sciences and Biotechnology*, 2021. 4(3): p. 546-564.  
DOI: 10.38001/ijlsb.936982

## Fermented Traditional Probiotic Beverages of Turkish Origin: A Concise Review

Oluwaseun Temitope Aladeboyeje<sup>1\*</sup> , Nazmiye Ozlem Sanli<sup>2</sup> 

### ABSTRACT

The fact that foods can provide additional medicinal health benefits beyond basic energy requirements and nutritional needs for survival, has been proven through rigorous scientific researches over the years. Although Turkey is historically believed to be the ancient origin of a decent number of fermented probiotic foods and beverages, there is still little awareness amongst the overall populace regarding the usefulness of these medicinal products also known as functional foods. Hence, the current review article discusses probiotics as a top notch variety of functional foods and encapsulates their history as well as some proven beneficial effects of some known probiotic microorganisms on human health. More importantly, greater emphasis is placed on elucidating scientific data on seven fermented traditional probiotic beverages of Turkish origin namely boza, kefir, ayran, shalgam, hardaliye, koumiss and gilaburu juice. The paper concisely describes their main characteristics, probiotic microbiota composition, production techniques as well as nutritional properties and some potential health benefits derivable from their consumption.

### ARTICLE HISTORY

**Received**

13 May 2021

**Accepted**

08 June 2021

### KEYWORDS

Turkish, fermented, probiotics, beverages, functional foods.

### Probiotics concept: An overview

The term “probiotic” has its roots in the Greek word “probios” meaning “For Life”. After knowledge of the existence of probiotics came to the forefront, several definitions have been proposed by various experts and scientists [1, 2, 3].

The most widely accepted definition given by the World Health Organization (WHO) and currently in use today describes probiotics as “Live microorganisms which, when administered in adequate amounts, confer a health benefit on the host.” [4].

### Prebiotics and synbiotics

Prebiotics and synbiotics are the two terms that usually appear to play a complementary role wherever probiotics are mentioned or used. Prebiotics are non-digestible food components

<sup>1</sup> Institute of Graduate Studies in Science, İstanbul University, 34116, İstanbul, Turkey

<sup>2</sup> Section of Biotechnology, Department of Biology, İstanbul University, İstanbul, 34126, Turkey

\* Corresponding Author: Oluwaseun Temitope Aladeboyeje, E-mail:

[oluwaseuntemitope.aladeboyeje@ogr.iu.edu.tr](mailto:oluwaseuntemitope.aladeboyeje@ogr.iu.edu.tr)



which improve the health condition of a host via stimulation of the activity and/or growth of a limited number of microorganisms resident in the gastrointestinal tract (GIT) [5]. Prebiotics are also described by experts as non-viable food constituents that impart a benefit to the host's health through the modulation of gut microbiota [6]. Although prebiotics are found in natural products, they may also be added to foods in order to improve their health and nutritional values. Several foods viz. asparagus, banana, chicory roots, onions, garlic, tomato, alliums and Jerusalem artichoke are very rich in the prebiotics fructo-oligosaccharides (FOS) and lactulose whereas raffinose and stachyose are naturally present in beans and peas [7].

The term "Synbiotic" refers to a combination of probiotics and prebiotics acting synergistically to improve the host's health [5]. They are also defined further as mixtures of prebiotics and probiotics which beneficially impart the host's health by improving the implantation and survival of live microbial dietary supplements in the host's GIT [8].

Typical examples of synbiotic combinations used in nutrition include: *Lactobacillus* + inulin; *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* + inulin; *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* and *Streptococcus* + FOS; *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* + oligofructose [9].

### **History of probiotics at a glance**

The knowledge of the benefits of lactic acid fermentation on man's health dates back to prehistoric times. The Bible has records of sour milk consumption by our forefathers, and in fact, it is believed by Persian traditions that Abraham owed his longevity and fecundity to habitual yogurt consumption [70]. The Bible in Genesis 18:8 also reveals further that Abraham did not only consume fermented sour milk but also customarily entertained guests with it. Furthermore, several records have shown that between 2000 and 3000 BC, fermented milk products (milk, butter and cheese) were commonly used in different civil establishments such as Egyptians, Indians, Greeks and Romans [10]. In ancient Greece and Rome, fermented milk consumption was recommended for children and convalescents. The Roman naturalist Pliny the Elder also suggested the consumption of fermented milk for the treatment of intestinal problems [10].

Even though the term "probiotics" which is currently being used today to describe bacteria associated with beneficial health effects, was not coined until mid-1960, the unprecedented works done by Henry Tissier and Eli Metchnikoff in the beginning of the twentieth century

had already given some inspiring shreds of scientific evidence towards the probiotics concept. A French pediatrician at the Pasteur Institute in Paris, Henry Tissier in 1906 reported that infants with abundant bifidobacteria in their intestinal system had minimal gastrointestinal troubles, as evidenced by low diarrheal problems. On the contrary, stool samples of children suffering from diarrhea were found to have a very low amount of these “bifidobacteria” [11]. Tissier, therefore, suggested the administration of these bifidobacteria to patients suffering from diarrhea in order to help restore a healthy gut microflora. In the same vein, in 1908, Eli Metchnikoff, a Russian immunologist and scientist also at the Pasteur Institute in Paris, won the Nobel Prize for medicine for his research revealing that destructive microbes could be substituted by beneficial ones to treat intestinal disorders and illnesses. Metchnikoff had observed that the countryside residents of Bulgaria lived long in spite of severe poverty and unfavourable climatic conditions. They had an average lifespan more than the richer Europeans, and he reported that they consumed fermented milk products heavily populated with lactic acid bacteria (LAB). He hypothesized that those LAB offered a special kind of protection against intestinal autointoxication. Metchnikoff, therefore, concluded that the LAB present in the fermented milk products had antiaging health benefits [12]. The pioneering works of these two scientists - Henry Tissier and Eli Metchnikoff are known to be the studies that established scientific hypotheses regarding the existence and use of probiotic microbes.

### **History of probiotics at a glance with the Turkish and Turkic People**

The ancient Turkish people who dwelt as nomads in Asia were the first to make yogurt which was called “yoghurut” (Turkish: yoğurt) [64]. Hence, the name “yogurt” as popularly known today is widely documented to have originated from the Turkish word “yoğurmak”, meaning “to coagulate, thicken, or curdle” [65]. The Turkish-originated *yogurt* which had been invented in modern day eastern Anatolia (Eastern Turkey) - a part of the erstwhile Mesopotamia - dates back to five thousand years ago. Furthermore, the use of yogurt by medieval Turks was also recorded in the books *Diwan Lughat al-Turk* and *Kutadgu Bilig* which were both written in the 11th century [66, 67, 68]. The word “yogurt” was mentioned in the texts and its use by nomadic Turks was reported. The Turks were also reported as the

first to evaluate the medicinal use of yogurt for various illnesses and disease symptoms, such as diarrhea and cramps, and for alleviation of the discomfort from sunburnt skin [68].

### Probiotics as an ideal and typical functional food

The term "Functional Food" refers to special foods that have curing and/or preventive effects beyond their nutritional value. In other words, functional foods are substances or supplements which are consumed to obtain a specific result [13].

There are varieties of functional foods recently developed many of which are being produced all around the world. These include foods enriched with prebiotics, probiotics, synbiotics, anthocyanins, phytosterols, antioxidants, and isoflavones as well as other functional foods like salt-reduced, fat-reduced, and sugar-reduced foods. The first choice to exert beneficial effects on human health among these foods are functional probiotic foods [14].

Table 1 highlights the proven beneficial health effects of some globally studied probiotic strains.

**Table 1** Beneficial effects of some probiotics on human health\*

Probiotic Group	Probiotic Species	Proven Benefits on Human Health
<b>Lactobacilli</b>	<i>Lactobacillus casei</i> Shirota	. Treatment of lactose intolerance; . Treatment of antibiotic, bacteria and virus-associated diarrhea (i.e. rotavirus, <i>Clostridium difficile</i> ).
	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG	. Remediation of inflammatory conditions via the modulation of GIT microbiota; . Reduction of the duration of antibiotic- (erythromycin) induced diarrhea; . Downregulation of the immune-inflammatory response in milk hypertensive subjects.
	<i>Lactobacillus casei</i>	. Stimulation of the immunity of the GIT; . Alleviates the symptoms of Crohn's disease; . Reduction of the severity and duration of diarrhea; . Exhibition of strong antimicrobial activities.
<b>Bifidobacteria</b>	<i>Bifidobacterium breve</i>	. Inhibition of enteropathogen-cell interactions by adhering to human intestinal epithelial cells; . Augmentation of anti-rotavirus or anti-influenza virus IgA production; . Activation of the humoral immune system.

	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>. Reduction of the incidence of diarrhea;</li> <li>. Prevention of infectious diarrhea (by a small protective effect which is observed as reduced shedding of rotavirus);</li> <li>. Competing successfully for nutrients and space against putrefactive or pathogenic bacteria;</li> <li>. Increases seroconversion rates and antibody responses;</li> <li>. Secretion of acetic and lactic acids (which help the inhibition of invasive pathogens like <i>Candida</i> spp. and <i>Escherichia coli</i>).</li> </ul>
	<i>Bifidobacterium animalis</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>. Reduction of the risk of acute diarrhea in human;</li> <li>. Normalization of the intestinal motility of obstipated subjects.</li> </ul>
<b>Yeasts</b>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Boulardii	<ul style="list-style-type: none"> <li>. Reduction of the risk and the duration of antibiotic associated diarrhea (AAD);</li> <li>. Prevention of traveler's diarrhea. It alters the GIT microbiota in a healthy mode and treats AAD or <i>Clostridium difficile</i> diarrhea;</li> <li>. Inhibition of the development of pathogenic colitis and enterocolitis.</li> </ul>

\*Adopted and modified from [15]

## Fermented traditional probiotic beverages of Turkish origin

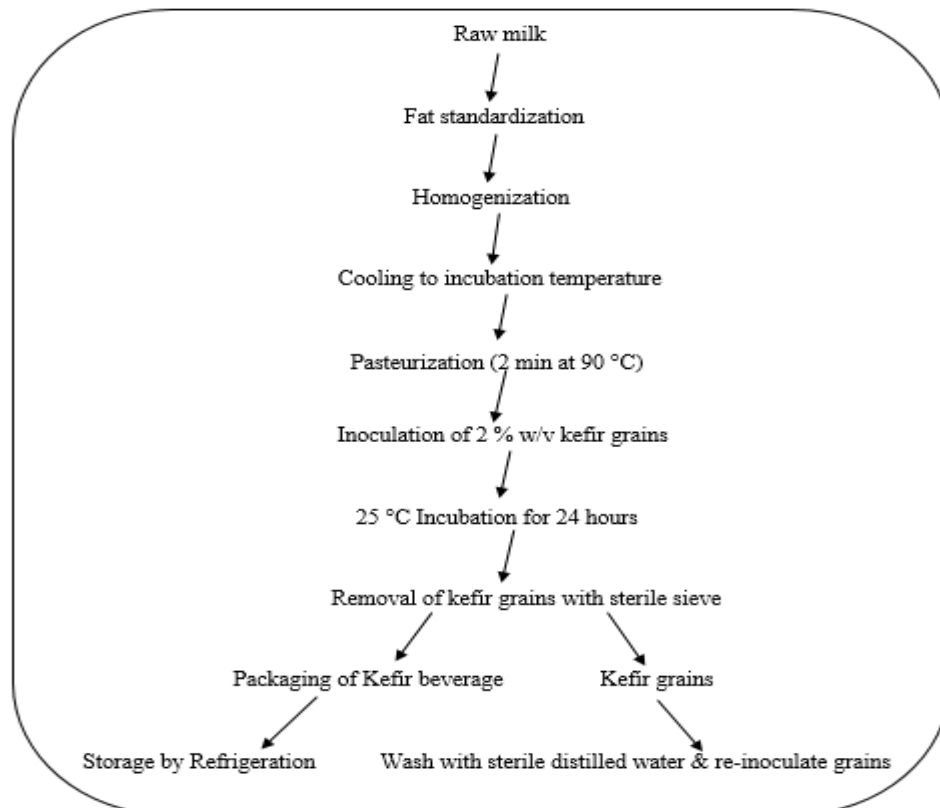
Up to date, there are only a few individual reports on each fermented traditional Turkish beverage encountered in the literature [16, 17, 18, 19, 20] and two reviews highlighting some popular products [21, 25]. Thus, the current paper aims to fill in the existing knowledge gap by combining reports of individual studies in a clear, concise and unprecedented manner, and holistically reviewing all the major fermented traditional probiotic drinks (kefir, ayran, boza, hardaliye, shalgam, gilaburu juice, and koumiss) produced and consumed in different regions of Turkey. The study provides concise information with regards to their characteristics, production techniques, probiotic microbiota composition, nutritional data and health benefits.

### Kefir

Kefir is a slightly acidic mildly alcoholic fermented beverage which is widely consumed in Turkey, and it has been described as the 21<sup>st</sup> century yoghurt [22]. The name “kefir” originates from the Turkish word “Keyif” which means “Joy/Pleasure” and it is used to describe the contentment experienced from drinking this beverage [23, 24]. Kefir can be produced by the fermentation of milk from cow, goat, ewe, or other sources [25]. For example, milk derived from plants such as coconut has been used to produce kefir in India and some other parts of the world [26]. Traditionally, it is produced by inoculating the starter culture “kefir grains” (i.e. a consortium of bacteria and yeasts in a polysaccharide matrix) to

pasteurized milk [24, 27]. The microbial constituents of kefir grains include lactic acid bacteria (LAB), lactose-fermenting yeasts (produce ethanol and CO<sub>2</sub>), acetic acid bacteria (AAB), and non-lactose fermenting yeasts. The LAB are mainly responsible for lactose conversion into lactic acid, resulting in a pH drop and enhancing preservation [28]. Kefir's main fermentation products include ethanol, lactic acid and CO<sub>2</sub>, which confer on the beverage low alcohol content, acidity and viscosity. Some minor components such as amino acids, acetaldehyde, diacetyl and ethyl may also be produced, contributing to its flavor composition [28]. The microbiological quality and physicochemical properties of kefir are influenced by the microbial property of used kefir grains, the grains to milk ratio, incubation temperature and time, storage temperature and sanitation conditions [29]. Kefir has been reported to exhibit antimicrobial activity which is attributable to lactic acid, bacteriocins, hydrogen peroxide, acetaldehyde, volatile acids, diacetyl, and/or carbon dioxide produced by the bifidobacteria and the LAB present in the drink [30].

The traditional procedure for kefir production is described in figure 1 below.



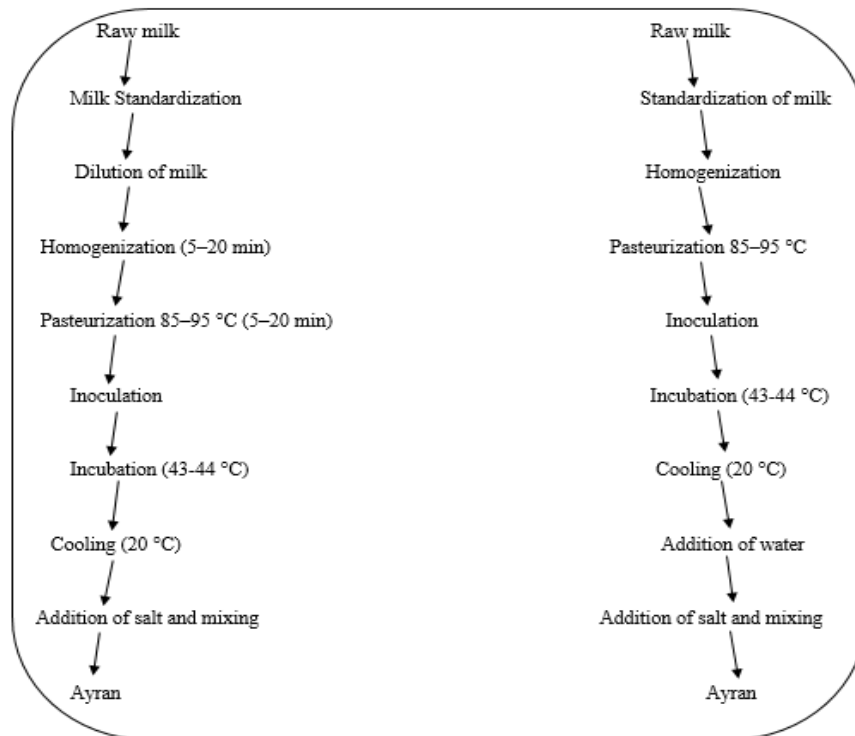
**Fig 1** Traditional method of kefir production [29]

## Ayran

Ayran otherwise known as yoghurt drink is a delicious fermented milk beverage. It is produced by either the addition of water to yoghurt or by inoculation of starter cultures containing *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* to pasteurized and standardized milk [31]. In other words, the blending of yoghurt with 30–50 % of water and 0.5–1 % of salt results in the generation of the beverage called ayran [32]. Ayran is consumed widely as a national drink across the length and breadth of Turkey. It is a highly valuable and readily digestible drink that is rich in calcium and vitamin. The chemical composition of ayran depends on the kind of milk used, the efficiency of fat removal and the dilution rate [25].

It has been proven that by using inulin as prebiotic and *L. acidophilus* and *Bifidobacterium* spp as the probiotic strains, the improvement of ayran's functional and probiotic properties is possible. This improved product was reported to have a better taste and higher *Lactobacillus* count [33].

The two different methods of ayran production are highlighted in figure 2 as follows.



**Fig 2** Two industrial techniques for ayran production [25, 34]

## Boza

Boza is a fermented traditional non-alcoholic Turkish beverage manufactured by a combination of yeast and lactic acid fermentation of cereals or grains such as maize, millet, rice semolina, rye or wheat, and mixed with sugar or saccharine. It is consumed widely in Turkey and many Balkan countries owing to its pleasant flavor, taste and nutritional properties [35].

The two kinds of fermentation that occur in boza production are lactic acid fermentation by LAB as well as alcoholic fermentation by yeasts. Antimicrobial metabolites such as lactic acids are produced by the LAB and these increase acidity which imparts a preservative effect whereas the metabolites produced by the alcoholic fermentation of the yeasts bring about the odor and mouthfeel of boza [25, 37, 38]. The utilization of different kinds and amounts of cereals and/or cereal products as raw materials as well as the uncontrolled fermentation conditions can result in different compositional variations in boza drinks [35, 36].

The production technique of boza is briefly described in figure 3 below.



**Fig 3** Industrial production of boza [37, 38]

## **Hardaliye**

Hardaliye is a red grape-based fermented traditional non-alcoholic beverage produced in the Thrace region (the European side of Turkey) [39]. Hardaliye has been classified as a non-dairy probiotic beverage due to its rich LAB flora [40].

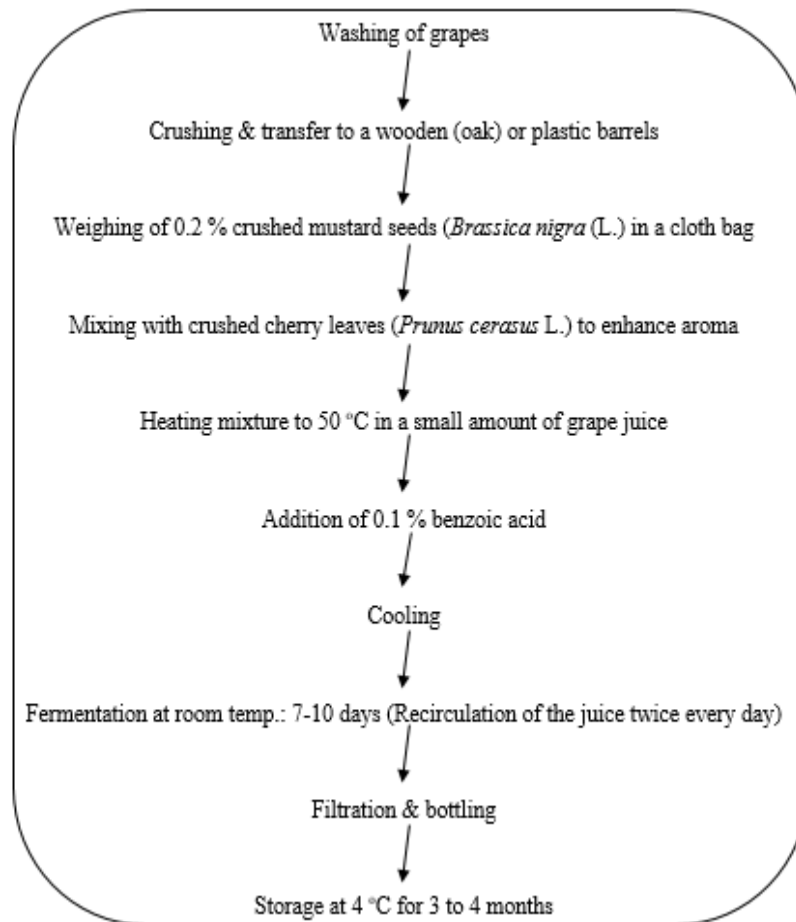
The nutritional value of hardaliye emerges from grapes and the fermentation process. The functional properties and health benefits of hardaliye are attributable to its ingredients i.e. grapes, mustard seeds (contain etheric oils, allyl isothiocyanate and sinigrin which is a carcinogenesis-suppressing agent). Grapes are known to be very rich in phenolic contents, thus hardaliye provides high antioxidant effects, thereby preventing oxidative stress and contributing to the inhibition of carcinogenesis. Furthermore, hardaliye's high phenolic content and strong antioxidant capacity also decreases serum homocysteine concentrations [41]. Besides its nutritional value, hardaliye also aids digestion system and helps in the prevention of coronary heart disease [40]. In addition, mustard oils have been found to exert medicinal effects on circulatory disorders, common cold and bronchitis, and possess antimicrobial properties [41]. One glass of hardaliye contains 39 g of carbohydrates and supplies 170 kcal of energy. Owing to its palatable, salt-free, nonalcoholic, low-fat and non-dairy characteristics, it is suitable for consumption by vegetarians, children, hypertensive, dairy intolerant, and people with high cholesterol levels [41].

The traditional technique of producing hardaliye is described in figure 4 below.

## **Shalgam (Şalgam)**

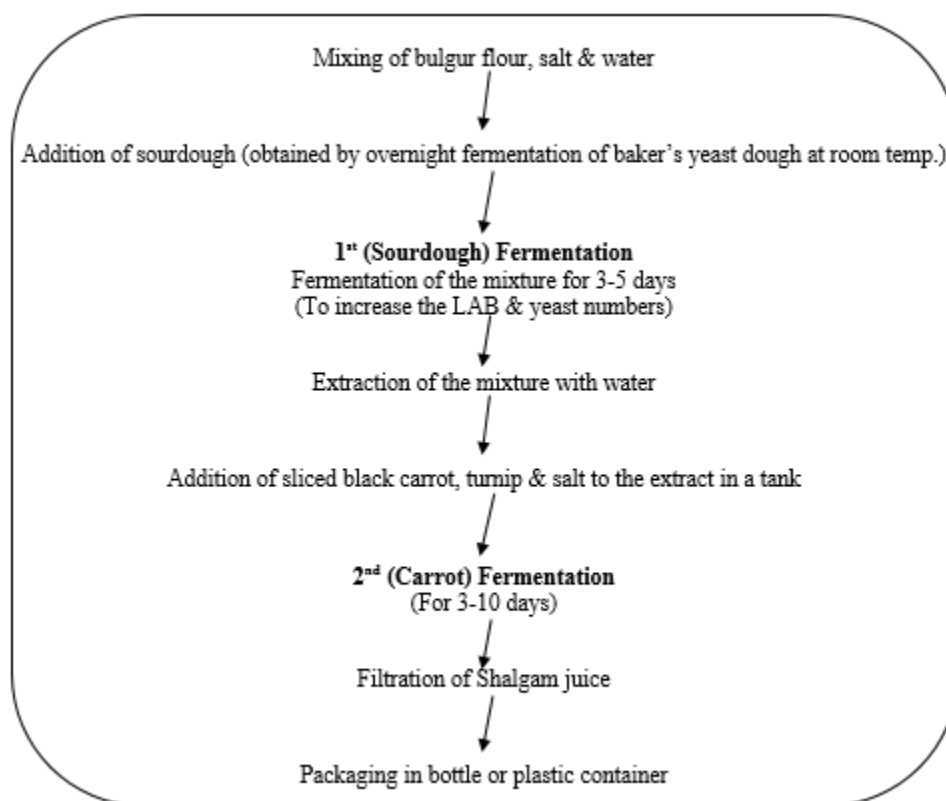
Shalgam is a cloudy, red-colored and sour black carrot juice that is produced by lactic acid fermentation of a mixture of black carrot, bulgur (broken wheat) flour, turnips, salt and water. The raw materials of shalgam juice are rich in sugars that can be fermented by yeasts and LAB. Shalgam juice is a highly nutritional beverage due to its high mineral, amino acid, polyphenol, and vitamin contents [44, 45]. It is reported to possess 88.3–114.1 mg/L of the anthocyanin called cyanidin-3-glycoside. The extraction of this compound from black carrot into the shalgam juice occurs during processing [46].





**Fig 4** Industrial production of hardaliye [42, 43]

According to Yilmaz-Ersan and Turan's study, the mineral contents of shalgam juices obtained from domestic markets in Bursa, Turkey comprise calcium, phosphorus, magnesium, potassium, and sodium as the major elements, with about 1 mg/L of heavy metals [47]. The traditional technique of shalgam production is briefly explained in figure 5 below.



**Fig 5** Traditional method of shalgam production [45, 48, 49]

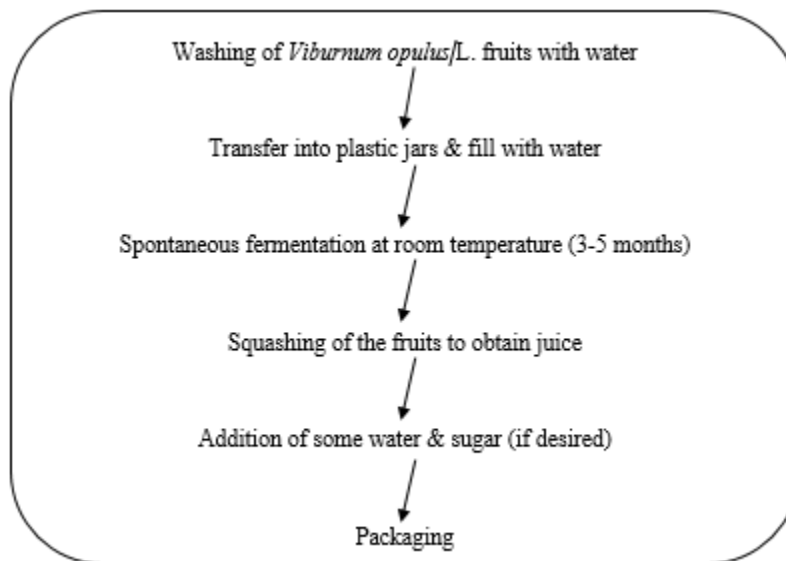
### **Gilaburu juice**

Gilaburu juice is a fermented fruit juice made from the European cranberry bush (*Viburnum opulus* L.) which is the fruit of a deciduous shrub belonging to the family Caprifoliaceae. It is mainly grown indigenously in the Central Anatolia Region of Turkey, and traditionally the fruits are collected at the end of autumn. The barks and fruits of European cranberry bush tree have wide use in pharmacology. Its antispasmodic properties were independently discovered by European, Asian and Native American people. In addition, it is also being used for relief from asthma, fever, cold, menstrual cramps, stomach ache, nervousness, cough, blood pressure, water retention problems, infertility and uterine infections [50].

Fermented gilaburu (European cranberry bush) juice may be considered as a potential functional food as it contains a couple of antioxidants such as anthocyanins, ascorbic acid, flavonoids and phenolic acids at high levels. Furthermore, considering the large amounts of

LAB species present in the fermented fruit juice, it may also be regarded as a potential probiotic product [16]. Owing to its astringent taste, this juice has low acceptability but it is however believed that the local consumers can suppress its extremely sour and bitter taste by a longer fermentation period [51].

The traditional method of gilaburu juice production is summarized in figure 6 as shown below.

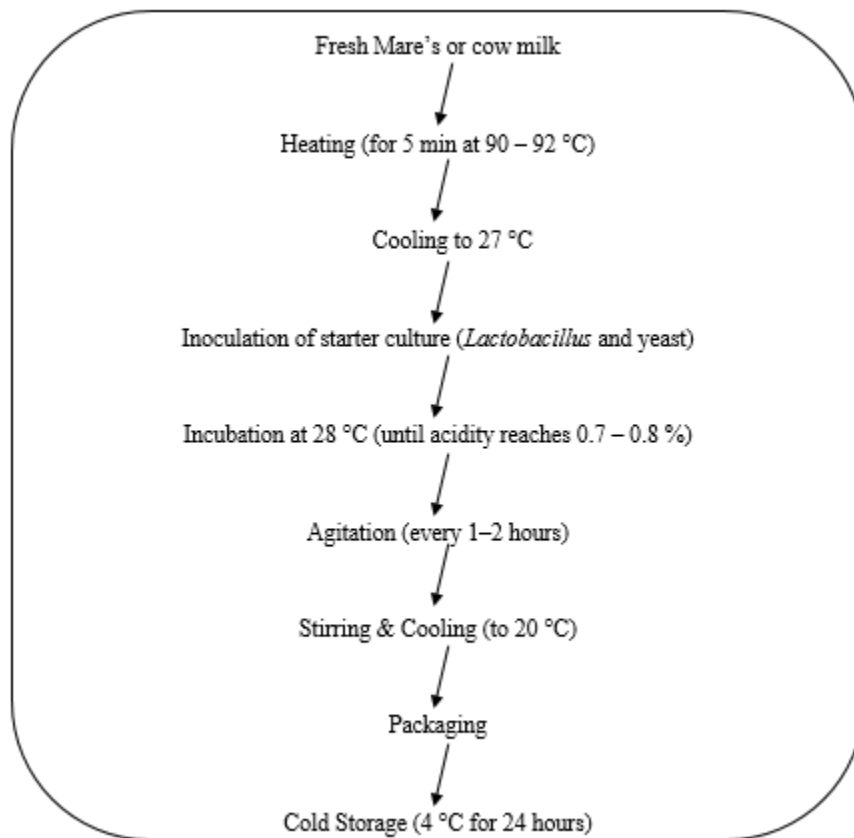


**Fig 6** Traditional method of gilaburu juice production [51]

### **Koumiss**

Koumiss also known as “Kımız” in Turkish is a mildly alcoholic and sour traditional dairy product which is produced from the fermentation of mare’s milk. Koumiss which is believed to have first originated from the Central Asian nomads possesses a smell similar to that of sour buttermilk or sour cheese and gives foamy appearance when shaken. The name “koumiss” is also mentioned in Divan-Lugat at-Turk where it is described by Kashgari Mahmut as “soured mare's milk” and it is found in Turkish dialects till today [66]. Even though it is a significant beverage especially for Turkish, Bulgar and Mongol peoples, it is also valuable for the people of Kazakhs, Kyrgyz, Uygurs and Yakuts origin [60]. It is especially widely consumed in Mongolia as a national drink and in Russia for its therapeutic

values. Slightly similar to kefir but in contrast to the solid kefir starter, i.e. “kefir grains”, koumiss is made from a liquid starter and has a sharp acidic and alcoholic taste [69]. Owing to the limited availability of mare’s milk, cow milk which is richer in fat and protein content but lower in lactose than mare’s milk, is now being used for the commercial manufacture of koumiss [52]. Koumiss is a long-lasting drink, thus it has been consumed for many years by nomadic Turks both for quenching thirst and for health improvement [69]. The production technique of koumiss is described in figure 7 as follows.



**Fig 7** Steps involved in the production of koumiss [52]

Lastly, table 2 summarizes the available scientific data on the seven major fermented traditional probiotic beverages of Turkish origin giving concise information about their sensory or organoleptic properties, raw materials, nutritional data and probiotic microbiota composition.

**Table 2** Summary of fermented traditional probiotic beverages of Turkish origin\*

Beverage	Nutrition Data	Sensory Property and Nature	Substrate	Microbiota/Probiotics Composition	References
Kefir	Per 100 g: fat 1.5 g, protein 3.0–3.4 g, and lactose 2.0–3.5 g, lactic acid 0.6–1.0ml/100 ml(19), vitamins B1, B12, B6, K, ascorbic, folic acid, amino acids, Mg, Ca, P	Effervescent milk, Sour, acidic and slightly alcoholic, viscous, self-carbonated, elastic consistency, and uniform creamy, perceivable yeast aroma, tart flavour, slightly foamy body with white/yellowish colour	All kinds of milk (cow, goat, camel, sheep, buffalo) and milk substitutes, e.g. soya milk, coconut and rice milk	<i>Lactobacillus brevis</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. kefir</i> , <i>L. bulgaricus</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. kefiranofaciens</i> , <i>L. helveticus</i> , <i>L. buchneri</i> , <i>L. caucasicus</i> , <i>Strep. thermophilus</i> , <i>S. durans</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Lactococcus lactis</i> , <i>L. cremoris</i> , <i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>Pediococcus acidilactici</i> , <i>Kluyveromyces marxianus</i> K. <i>lactis</i> , <i>Candida inconspicua</i> , <i>C. kefir</i> , <i>S. cerevisiae</i> , <i>Cryptococcus humicolus</i>	[21, 25, 29, 53, 54, 55, 56]
Ayran	Total DM (1.07–11 %), fat (0.1–3 %), protein (1.44–3.48 %), salt (0.17–1.75 %) and high content of vitamins and Ca	Low viscosity and non-alcoholic	Cow Milk or others	<i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>Bulgaricus</i>	[21, 25, 34, 53]
Boza	Lactic acid, carbohydrate, protein, vitamins and fibre such as pyridoxine, riboflavin, thiamine, and nicotinamide	Colloid suspension, Viscous liquid, slightly sweet or sour flavour, pale yellow, acidic and alcoholic odour	Millet flour, maize, rye, oat, and barley flour or Wheat and rice semolina	<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. coprophilus</i> , <i>Lactococcus</i> sp., <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Lc. reffinolactis</i> , <i>Pediococcus</i> sp., <i>Sacch. cerevisiae</i> , <i>Candida glabrata</i> , <i>Candida tropicalis</i> , <i>Geotrichum candidum</i> and <i>Geotrichum penicillatum</i>	[21, 25, 36, 37, 40, 53, 57, 58]
Hardaliye	Antioxidants, phenolic content, Sinigrin (from mustard seeds)	Acidic, non-alcoholic, original colour of the grapes	Red grape juice and Pomace	<i>Lactobacillus paracasei</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. acetotolerans</i> , <i>L. casei</i> ssp. <i>Pseudopantarum</i> ; <i>L. pontis</i> , <i>L. sanfranciscensis</i>	[25, 39, 40, 42, 43]
Shalgam	Vitamins (A, C, and B), minerals (Ca, K, and Fe), amino acid and polyphenol content	Red-coloured, cloudy, sour, non-alcoholic	Black (purple) carrot ( <i>Daucus carota</i> ), turnip ( <i>Brassica rapa</i> )	<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>L. brevis</i> ; <i>L. paracasei</i> , <i>L. delbrueckii</i> , <i>L. buchneri</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> ssp. <i>cremoris</i> , <i>L. mesenteroides</i> ssp. <i>Mesenteroides</i> , <i>Pediococcus pentosaceus</i> , Yeasts	[44, 45, 49, 59, 61]
Gilaburu juice	Antioxidants e.g. flavonoids, anthocyanins, ascorbic acid, and phenolic acids	Non-alcoholic and astringent without the addition of sugar	Cranberry bush ( <i>Viburnum opulus</i> L.)	<i>Lactobacillus brevis</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. buchneri</i> , <i>L. harbinensis</i> , <i>L. pantheris</i> , <i>L. parabuchneri</i> , <i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	[16]
Koumiss	Ash 0.4–0.5%, Ethanol 0.6–2.5%, CO2 0.5–0.9%, Lactose 3.5–4.3%, Lactic acid 0.7–1.8%, Protein 1.7–1.9%, Lipid 0.6–1.3%, Total solid 10.6–11.3%, Ca, P, Mg	Milky gray colour, acidic, mildly alcoholic and sour, slightly carbonated fermented dairy beverage	Mare's milk or cow milk	<i>Lactobacillus casei</i> , <i>L. bulgaricus</i> <i>L. acidophilus</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. salivarius</i> , <i>L. buchneri</i> , <i>L. heveticus</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. kefiranofaciens</i> <i>Torula koumiss</i> , <i>Saccharomyces lactis</i> , <i>Streptococcus lactis</i>	[23, 60, 62, 69].

\*Adopted and modified from [63]

## Conclusion

Taking into account the numerous historical records describing the various health benefits that have been derived by man from the consumption of fermented foods, it goes without saying that probiotics have an ancient history, and particularly so with the Turkish and Turkic people. It can also be inferred that the long lifespan of people in prehistoric age is attributable partly or wholly to their regular consumption of health-promoting fermented probiotic products as encapsulated in this review. Furthermore, considering the many scientific researches that have been published worldwide over the years, there is sufficient data to show that probiotics are unarguably gaining more popularity than other functional foods. More importantly, it has been established in the current paper that Turkey is an origin country for several probiotic-containing functional beverages such as yogurt, kefir, boza, ayran, shalgam, hardaliye, gilaburu juice and koumiss, which have been concisely discussed in order to stir up deeper academic research interest. Owing to the fact that there is already more than enough data in the literature about yogurt globally, it has not been separately discussed in detail in the current review, rather the paper has focused on highlighting the other seven major beverages which seem not to have gained as much popularity as does yogurt. In conclusion, further research and publications especially aimed at demonstrating the medicinal health benefits of these indigenous Turkish beverages are recommended in order to promote more awareness about them and also encourage their habitual consumption by the populace.

## References

1. Lilly, D.M. and R.H. Stillwell, Probiotics: Growth-promoting factors produced by microorganisms. *Science*, 1965. 147: p. 747-748.
2. Parker, R.B., Probiotics, the other half of the antibiotic story. *Anim. Nutr. Health*, 1974. 29: p. 4-8.
3. Salminen, S., et al., Demonstration of safety of probiotics – A review. *Int. J. Food Microbiol*, 1998. 44: p. 93-106.
4. Food and Agriculture Organization/World Health Organization (FAO/WHO), Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria, Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. 2001, Córdoba, Argentina ([http://www.who.int/foodsafety/publications/fs\\_management/en/probiotics.pdf](http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/en/probiotics.pdf)).
5. Gibson, R.G. and M.B. Roberfroid, Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. *J. Nutr.*, 1995. 125: p. 1401–1412.

6. FAO/WHO, Food and Agriculture Organization Technical Meeting on Prebiotics: Food Quality and Standards Service (AGNS), Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO); FAO Technical Meeting Report. 2007, FAO: Rome, Italy, 15–16 September.
7. Das, L., et al., Role of nutraceuticals in human health. *J Food Sci Technol*, 2012. 49: p. 173–183.
8. Andersson, H., et al., Health effects of probiotics and prebiotics: A literature review on human studies. *Scand J Nutr*, 2001. 45: p. 58-75.
9. Olveira, G. and I. González-Molero, An update on probiotics, prebiotics and symbiotics in clinical nutrition. *Endocrinol. Nutr*, 2016. 63: p. 482–494.
10. Caramia, G., A. Atzei, and V. Fanos, Probiotics and the skin. *Clinics in dermatology*, 2008. 26(1): p. 4-11.
11. Tissier, H., Traitement des infections intestinales par lam' ethode de la flore bact' erienne de l'intestin. *CR Soc Biol*, 1906. 60: p. 359–361.
12. Metchnikoff, E., *The Prolongation of Life: Optimistic Studies*. 1908, Springer Publishing Company, London.
13. Homayouni, A., *Therapeutical effects of functional probiotic, prebiotic and symbiotic foods*. (1st ed.). 2008, Tabriz: Tabriz University of Medical Sciences.
14. Homayouni, A., et al., Factors influencing probiotic survival in ice cream: A Review. *International Journal of Dairy Science*, 2012. 7: p. 1-10.
15. Figueroa-González, I., A. Cruz-Guerrero, and G. Quijano, The Benefits of Probiotics on Human Health. *J Microbial Biochem Technol*, 2011. doi:10.4172/1948-5948.S1-003. S1-003.
16. Sagdic, O., I. Ozturk, and N. Yapar, Diversity and probiotic potentials of lactic acid bacteria isolated from gilaburu, a traditional Turkish fermented European cranberry bush (*Viburnum opulus L.*) fruit drink. *Food Res Int*, 2014. 64: p. 537–545.
17. Songür, A.N., F.P. Çakıroğlu, and G. Hakkı, From Tradition to Functionality: Boza. *The Journal of Academic Social Science*, 2016. 4(35): p. 492-500.
18. Coskun, F., Review: A Traditional Turkish Fermented Non-Alcoholic Grape-Based Beverage, “Hardaliye”. *Beverages*, 2017a. 3(2): doi:10.3390/beverages3010002.
19. Coskun, F. Review: A Traditional Turkish Fermented Non-Alcoholic Beverage, “Shalgam”. *Beverages*, 2017b. 3(49): doi:10.3390/beverages3040049.
20. Dogan, M. and H. Ozpinar, Investigation of Probiotic Features of Bacteria Isolated from Some Food Products. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 2017. 23(4): p. 555-562.
21. Altay, F., et al., A review on traditional Turkish fermented non-alcoholic beverages: Microbiota, fermentation process and quality characteristics. *International J. of Food Microbiology*, 2013. 167: p. 44–56.
22. Gorski, D., Kefir: 21st century yogurt? *Dairy Foods*, 1994. 95: p. 49.
23. Tamime, A.Y., *Production of Kefir, Koumiss and Other Related Products, in Fermented Milk*, A.Y. Tamime, Editor. 2006, Blackwell Science Ltd. Oxford, UK. p. 174-216.
24. Lopitz-Otsoa, F., et al., Kefir: A symbiotic yeasts-bacteria community with alleged healthy capabilities. *Rev. Iberoam. Micol.*, 2006. 23: p. 67-74.
25. Kabak, B. and A.D.W. Dobson, An introduction to the traditional fermented foods and beverages of Turkey. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2011. 51: p. 248–260.
26. Lakshmi, T.S. and A. Mary-Pranela, Coconut milk kefir: Nutrient composition and assessment of microbial quality. *Int. J. Food Sci. Nutr.*, 2018. 3(1): p. 141-144.
27. Simova, E., et al., Lactic acid bacteria and yeasts in kefir grains and kefir made from them. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol*, 2002. 28: p. 1-6.
28. Rattray, F.P. and M.J. O’Connell, Fermented Milks Kefir, in *Encyclopedia of Dairy Sciences* (2nd ed.), J. W. Fukay, Editor. 2011, Academic Press. San Diego, USA. p. 518-524.

29. Guzel-Seydim, Z., T. Kök-Tas, and A.K. Greene, Kefir and koumiss: Microbiology and technology, in *Development and Manufacture of Yogurt and Functional Dairy Products*, F. Yildiz, Editor. 2010, CRC Press. Boca Raton, U.S. p. 143–163.
30. Cetinkaya, F. and T. Elal-Mus, Determination of microbiological and chemical characteristics of kefir consumed in Bursa. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi (Veterinary Journal of Ankara University)*, 2012. 59: p. 217–221.
31. TFC, Fermented milk products. *Turkish Food Codex Regulations, Regulation No: 2009/25*, Republic of Turkey Ministry of Food, Agriculture and Livestock, 2009. Ankara, Turkey.
32. Köksoy, A. and M. Kilic, Effects of water and salt level on rheological properties of ayran, a Turkish yoghurt drink. *International Dairy Journal*, 2003. 13(10): p. 835–839.
33. Kök-Tas, T. and Z. Guzel-Seydim, Determination of effects of using fat replacers and probiotic on ayran quality. *Gida (Food)*, 2010. 35(2): p. 105–111 (in Turkish).
34. Kocak, C. and Y.K. Avsar, Ayran: Microbiology and Technology, in *Development and Manufacture of Yogurt and Functional Dairy Products*, F. Yildiz, Editor. 2009, CRC Press. Boca Raton, U.S. p. 123–141.
35. Gotcheva, V., S.S. Pandiella, and A. Angelov, Monitoring the fermentation of the traditional Bulgarian beverage boza. *Int J Food Sci Technol*, 2001. 36: p. 129–134.
36. Gotcheva, V., et al., Microflora identification of the Bulgarian cereal-based fermented beverage boza. *Process Biochemistry*, 2000. 36: p. 127–130.
37. Arici, M. and O. Daglioglu, Boza: a lactic acid fermented cereal beverage as a traditional Turkish food. *Food Reviews International*, 2002. 18(1): p. 39–48.
38. Yegin, S. and M. Fernandez-Lahore, Boza: A traditional cereal-based, fermented Turkish beverage, in *Handbook of Plant-based Fermented Food and Beverage Technology*, Y.H. Hui and O.E. Evranuz, Editors. 2012, CRC Press. Boca Raton, U.S. p. 533–542.
39. Aydogdu, H., et al., A study on production and quality criteria of hardaliye: A traditional drink from Thrace Region of Turkey. *Gida*, 2014. 39: p. 139–145. (In Turkish).
40. Prado, F.C., Trends in non-dairy probiotic beverages. *Food Research International*, 2008. 41: p. 111–123.
41. Aktas, S., A. Haskoylu, and F.E. Gunes, Nutritional properties of hardaliye, in *Proceedings of the 3rd International Symposium on Traditional Foods from Adriatic to Caucasus*, Sarajevo, Bosnia and Herzegovina. 2015, 1–4 October.
42. Arici, M. and F. Coskun, Hardaliye: fermented grape juice as a traditional Turkish beverage. *Food Microbiology*, 2001. 18: p. 417–421.
43. Coskun, F. and M. Arici, The effects of using different mustard seeds and starter cultures on some properties of hardaliye. *Ann. Microbiol.*, 2006. 56: p. 335.
44. Incedayi, B., V. Uylaser, and U. Copur, A traditional Turkish beverage shalgam: manufacturing technique and nutritional value. *J. of Food, Agriculture & Environment*, 2008. 6: p. 31–34.
45. Erten, H., H. Tangüler, and A. Canbas, A traditional Turkish lactic acid fermented beverage: Shalgam (shalgam). *Food Reviews International*, 2008. 24: p. 352–359.
46. Kammerer, D., R. Carle, and A. Schieber, Quantification of anthocyanins in black carrot extracts (*Daucus carota* ssp. *sativus* var. *atrorubens* Alef.) and evaluation of their color properties. *European Food Research and Technology*, 2004. 219: p. 479–486.
47. Yilmaz-Ersan, L. and M.A. Turan, Major and minor element concentrations in fermented shalgam beverage. *International Journal of Food Properties*, 2012. 15: p. 903–911.
48. Canbas, A. and H. Fenercioglu, A study on the production of shalgam. *Gida (Food)*, 1984. 9: p. 279–286 (in Turkish).



49. Tangüler, H., and H. Erten, Occurrence and growth of lactic acid bacteria species during the fermentation of shalgam (salgam), a traditional Turkish fermented beverage. *LWT — Food Science and Technology*, 2012a. 46: p. 36–41.
50. Nellessen, J.E., *Viburnum opulus* L. var. *americanum* (Mill.) Ait. (American cranberrybush): A technical conservation assessment. Prepared for the USDA Forest Service, Rocky Mountain Region, species conservation project, May 8, 2006.
51. Sedat-Velioglu, Y., L. Ekici, and E.S. Poyrazoglu, Phenolic composition of European cranberrybush (*Viburnum opulus* L.) berries and astringency removal of its commercial juice. *International Journal of Food Science & Technology*, 2006. 41(9): p. 1011–1015.
52. Dhewa, T., et al., *Koumiss: The Nutritional and Therapeutic Values. Fermented Foods and Beverages Series. Fermented Milk and Dairy Products*. 2015, CRC Press, p. 483-494.
53. Marsh, A.J., C. Hill, and R.P. Ross, Fermented beverages with health-promoting potential: past and future perspectives. *Trends Food Sci Technol*, 2014. 38: p. 113–124.
54. Kesmen, Z. and N. Kacmaz, Determination of lactic microflora of kefir grains and kefir beverage by using culture-dependent and culture-independent methods. *Journal of Food Science*, 2011. 76: p. 276–283.
55. Yuksekdog, Z.N., Y. Beyatli, and B. Aslim, Determination of some characteristics coccoid forms of lactic acid bacteria isolated from Turkish kefir with natural probiotic. *LWT—Food Science and Technology*, 2004. 37: p. 663–667.
56. Özdestan, O. and A. Üren, Biogenic amine content of kefir: a fermented dairy product. *European Food Research and Technology*, 2010. 231: p. 101–107.
57. Blandino, A., Cereal-based fermented foods and beverages. *Food Research International*, 2003. 36: p. 527–543.
58. Todorov, S., M. Botes, and C. Guigas, Boza, a natural source of probiotic lactic acid bacteria. *J Appl Microbiol.*, 2008. 104(2): p. 465–477.
59. Arici, M., Microbiological and chemical properties of a drink called shalgam. *Ernahrungs Umschau*, 2004. 51(1): p. 10-12.
60. Wang, J., Identification of lactobacillus from koumiss by conventional and molecular methods. *European Food Research and Technology*, 2008. 227(5): p. 1555–1561.
61. Tangüler, H. and H. Erten, Chemical and microbiological characteristics of shalgam (salgam): a traditional Turkish lactic acid fermented beverage. *Journal of Food Quality*, 2012b. 35: p. 298–306.
62. Hao, Y., et al., Identification of the bacterial biodiversity in koumiss by denaturing gradient gel electrophoresis and species-specific polymerase chain reaction. *Journal of Dairy Science*, 2010. 93(5): p. 1926–1933.
63. Baschali, A., et al., Traditional low-alcoholic and non-alcoholic fermented beverages consumed in European countries: a neglected food group. *Nutrition Research Reviews*, 2017. 30: p. 1–24.
64. Rasic, J.L. and J.A. Kurmann, *Yoghurt—Scientific Grounds, Technology, Manufacture and Preparations*. Copenhagen: Technical Dairy Publishing House, 1978.
65. "Yogurt". *Collins English Dictionary – Complete & Unabridged 10th Edition*. HarperCollins, 2012. Retrieved 21 March 2017.
66. Kashgari, M., *Divan-Lugat at-Turk*. Tranlated by R. Dankoff with J. Kelley as *A Compendium of Turkish Dialects*, 1984. Vol 2, Cambridge University Press. Cambridge, MA.
67. Yusuf, K.H., *Wisdom of Royal Glory (Kutadgu Bilig): A Turko-Islamic Mirror for Princes*, translated with an introduction and notes by Robert Dankoff, 1983. University of Chicago Press. Chicago.
68. Mauro, F. and M. Rachel, History of yogurt and current patterns of consumption. *Nutrition Reviews*, 2015. 73(1): p. 4–7. <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuv020>

69. Danova, S., et al., Isolation and characterization of *Lactobacillus* strains involved in koumiss fermentation. *Int. J. Dairy Technol.*, 2005. 58: p. 100–105.
70. Farnworth, E.R., *Handbook of fermented functional foods*. Taylor and Francis, 2008. p. 114. ISBN 978-1-4200-5326-5.

## Genetiği Değiştirilmiş Doğal Bitkiler: Yatay Gen Transferi

İskender Tiryaki<sup>1\*</sup> 

### ÖZET

Günümüzde genom dizileme ve biyoinformatik alanında elde edilen başarılar daha önce tek hücreli organizmalar ile sınırlı olduğu düşünülen yatay gen transferlerinin (YGT), bitkiler dahil çok sayıda gelişmiş organizmada da yaygın bir şekilde var olduğunun anlaşılması genetiği değiştirilmiş organizma (GDO)'lar kapsamında yapılan tartışmalara farklı bir bakış açısı sunmaktadır. Özellikle biyoteknoloji alanında ortaya konan genom düzeltme ve nanobiyoteknoloji gibi yeni metodolojik yaklaşımlar ile yakın gelecekte bunlara ait tarımsal ürünlerin GDO özelinde yapılan tartışmalardaki yeri ve bu ürünlerin doğal ürün kategorisinde değerlendirilip değerlendirilmeyeceği büyük bir merak konusudur. Alglerden yüksek bitkilere kadar farklı organizmalar arasında DNA, RNA ve organel genomu gibi değişik boyutlarda ortaya çıkan genetik materyal transferlerinin bitki ıslahı açısından ele alınması ve ortaya çıkan yeni bilgiler ışığında bitkilerde dayanıklılık mekanizmalarının geliştirilmesi kendi içerisinde önemli bir potansiyel barındırmaktadır. Ancak güncel metodolojik yaklaşımlar kullanılarak yakın gelecekte ortaya çıkacak ürünlerin de GDO kapsamındaki tartışmalara dahil edilmesi hem ilgili teknolojilerin gelişmesine hem de ürünlerinin potansiyel kullanımlarının sınırlandırılmasına neden olabilecektir. Bu nedenle genetik modifikasyonlar ile GDO kavramlarının farklı bir bakış açısı ile ele alınarak yeniden değerlendirilmesi gerekmektedir. Bu çalışmanın amacı bitkilerde doğal olarak meydana gelen YGT ve genetik modifikasyon kavramını GDO bakış açısı ile yeniden ele almak ve ilgili alanda yetersizliği ve eksikliği olduğu düşünülen tanımlayıcı bir GDO terminolojisini ortaya koymaktır. Bu nedenle ayrıştırıcı ve daha tanımlayıcı olması için GDO teriminin Evrimsel GDO, (eGDO), Tarımsal GDO (tGDO) ve Biyoteknolojik GDO, (bGDO) şeklinde sınıflandırılması ilgili alanda yapılan tartışmalara önemli katkılar sunacaktır.

### MAKALE GEÇMİŞİ

Geliş

28 Nisan 2021

Kabul

07 Haziran 2021

### ANAHTAR KELİMELER

GDO,  
Genetik  
modifikasyon,  
bitki,  
terminoloji

<sup>1</sup> Department of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agriculture, Canakkale Onsekiz Mart University, Terzioğlu Campus, 17000 Canakkale/TURKEY

Correspondence Author: [tiryaki46@yahoo.com](mailto:tiryaki46@yahoo.com)

# Genetically Modified Natural Plants: Horizontal Gene Transformation

## ABSTRACT

Current achievements on genome sequencing and bioinformatics revealed that horizontal gene transformation (HGT) is not limited to single cellular organisms and is very common in several developed organisms as well, including plants which brought a new perspective on debate about genetically modified organisms (GMOs). There is a big curiosity whether or not agricultural products of new methodological approaches such as genome editing and nanobiotechnology will be classified as natural products or as GMOs. Transduction of genetic materials such as DNA, RNA or organelle genomes among various organisms brings its own potential to develop resistant/tolerant mechanisms under the light of new knowledges when it is considered with plant breeding perspectives. However, including the products of new methodological approaches into GMO discussions will limit both development of related technologies and the potential use of their products. Therefore, concepts of genetic modifications and GMOs need to be reevaluated with a new perspective. The aims of this study are to evaluate the concepts of HGT and GMOs with plant perspective and to provide a more descriptive terminology for GMOs which are currently insufficient to reveal all type of genetic modifications. To be parser and more descriptive, GMOs term can be classified as Evolutionary GMOs (eGMOs), Agricultural GMOs (aGMOs) and Biotechnological GMOs (bGMOs). This new classification can make a significant contribution to GMOs dilemma.

## ARTICLE HISTORY

**Received**  
28 April 2021  
**Accepted**  
07 June 2021

## KEY WORDS

GMO,  
genetic modification,  
plant,  
terminology

## Giriş

Ülkemiz dahil tüm dünya genelinde genetiği değiştirilmiş organizmalar (GDO) kapsamında yapılan tartışmalarda bilimsel içerikleri birbirlerinden çok farklı olan doğal bitki, atasal bitki, genetiği korunmuş bitki ve organik bitki gibi ifadelerin aynı kavramlar gibi ele alınıp tartışıldığı görülmektedir. Bu tartışmaların odak noktasında ise hali hazırda tarımı yapılan hibrit bitkiler dahil tüm kültür bitkilerinin genetiğinin değiştirildiği, bu bitkilerin insan ve hayvan sağlığı ile doğal vejetasyonun korunması adına bazı riskler taşıdıkları belirtilmekte [1-5] ve bunun çözümüne yönelik olarak da genetiği değişmemiş olduğu düşünülen yabani bitkiler ya da atasal tohumlardan elde edilen bitkilerin tüketilmesi gerektiği ifade edilmektedir [6-8]. Bu tartışmalara yakın zamanda uygulanmaya başlanan genom düzeltme [9, 10] ve nanobiyoteknoloji [11-13] gibi yeni metodolojik yaklaşımlar ile bunların ürünlerinin de dahil edilmesi yukarıda belirtilen tartışma konusunu daha da karmaşık hale getirmektedir. Söz konusu tartışmalarda hem genetik değişikliğin kendisinin ve hem de bu değişikliklerin kimin tarafından yapıldığının çok önemli olduğu görülmektedir. Özellikle genetik değişikliğin kendisinin önemli olduğu durumlarda bitkiler ile virüs, bakteri, fungus, parazit bitki ve böcekler arasında, insan müdahalesi olmadan gerçekleşen yatay ya da diğer ifade ile lateral gen transferlerinin nasıl değerlendirilmesi gerektiği büyük bir merak konusudur. Bitki ıslahı açısından değerlendirildiğinde biyoteknoloji, nanobiyoteknoloji ya da genom düzeltme

yöntemlerine ait bitki ve bu bitkilere ait ürünlerin hem terminolojik hem de içerik bakımından sadece GDO üzerinden değerlendirilmesinin yeterli olmadığı/olmayacağı, konunun yasal düzenlemeler dahil güncel bir bakış açısı ile yeniden ele alınması ve değerlendirilmesi gerektiği şüphe götürmeyen bir gerçektir. Bu çalışma bitkilerin evrimleşme sürecinde doğal olarak kendiliğinden meydana gelen kalıtsal genetik değişiklikler ile canlı organizmalar arasında meydana gelen genetik materyal alış-verişleri, özelde GDO genelde ise tüm tarımsal biyoteknolojik ürünler kapsamında yapılan tartışmalara ve ilgili alanda kullanılan terminolojiye farklı bir bakış açısı getirmek amacıyla hazırlanmıştır.

### **Bitkilerde Doğal Yollarla Meydana Gelen Dikey ve Yatay Gen Transferleri**

Dikey gen transferi (DGT) eşeyssel üreme yoluyla bir jenerasyondan diğerine (örneğin, ebeveynlerden yavru döllere) meydana gelen gen, gamet hücreleri düşünüldüğü zaman genom(ların) geçişleri olarak tanımlanırken yatay gen transferi (YGT) evrimsel süreç içerisinde filogenetik olarak birbirinden uzak canlı türleri arasında ya da sitoplazmik organeller arasında meydana gelen gen ya da genetik materyal transferlerini ifade etmek için kullanılmaktadır [14, 15]. Bitki ıslahı açısından bakıldığında DGT'nin ağırlıklı olarak aynı bitki türü içerisinde yer alan bitki çeşitleri, hat ya da genotipleri arasında, daha düşük oranlarda ise türler arası hatta cinsler arasında (wide crosses) doğal ya da farklı araçlar yoluyla meydana gelen melezlemeleri kapsadığı görülmektedir [16]. Nitekim patojenlere karşı dayanıklı bir bitki çeşidinde dayanıklılık genini hedef bitki çeşidine aktarmak için yapılan melezleme ve devamında uygulanan geriye melezleme çalışmaları tür içi melezlemelerin pratikte uygulanan en yaygın örneğini oluşturmaktadır [17-20]. Diğer taraftan türler arası meydana gelen DGT'ne ise kolza türleri arasında hem doğal hem de insan eliyle gerçekleş(tiril)en melezlemeler [21], cinsler arasında meydana gelen DGT'ne ise özellikle son yıllarda dayanıklılık genlerinin buğday genomuna transferi amacıyla yapılan melezleme çalışmaları örnek olarak gösterilebilir [22, 23]. Bu açıdan değerlendirildiğinde ister doğal ister insan eliyle yapılsın tüm melezleme ürünlerinin aslında bir gen transferi ya da diğer bir ifade ile genetik modifikasyon uygulaması olduğu açıktır. Hatta söz konusu melezlemelerin bir sonucu olarak genler arasındaki bağıllık (linkage) durumları göz önüne alındığında dikey gen transferi kavramında adı geçen "gen" ifadesinin boyut değiştirerek daha büyük DNA parçalarını ve hatta bir adım öteye

giderek kromozom ya da genom boyutunda meydana gelebilen genetik modifikasyonlara neden olabileceği bilimsel bir gerçektir [24]. Örneğin, klasik ıslah uygulamalarında genom katlanma çalışmaları sonucu oluşturulan allo- ve auto-poliplloid bitkiler [25-27] ile kromozom ve bu kromozomlar üzerinde yer alan genlerin genom içerisindeki fonksiyonlarının anlaşılmasına yönelik olarak ortaya konan yer değiştirilmiş kendilenmiş hatlar [28-31] ya da kromozom eliminasyon çalışmaları [32] bu uygulamalara örnek olarak gösterilebilir [33-35]. Diğer taraftan melezleme yoluyla sitoplazmik erkek kısır bitkiler geliştirmek amacıyla özellikle polen alıcısı hatlarda yapılan mitokondriyal organel transferlerinin de bu kapsamda değerlendirilmesi gerektiği açıktır [36, 37].

Gerek prokaryot ve gerekse ökaryotların evrimsel süreçleri göz önüne alındığında YGT'nin biyoçeşitliliğin oluşması ve mevcut canlıların değişen çevre şartları ile biyotik ve abiyotik stres faktörlerine uyum sağlayabilmeleri açısından çok önemli bir yer tuttuğu görülmektedir [38, 39]. Günümüzde artan sayıdaki ökaryot genomuna ait genom dizisinin varlığı, güncel genomik ve biyoinformatik yaklaşımlarla birlikte değerlendirildiğinde YGT'nin ortak yaşama alanlarında yaygın olarak birlikte bulunan canlı türleri arasında meydana gelme olasılığının uzak habitatlardaki canlı organizmalara göre çok daha yüksek olduğunu göstermektedir [40]. Bu nedenle, parazit (virüs, fungus, bakteri ve parazit bitkiler) ve bitki hücreleri arasında doğrudan meydana gelen temasın bitkilerde ortaya çıkan doğal gen transferlerinin oluşmasında önemli bir mekanizma olduğu kabul edilmektedir [14, 15, 41]. Örneğin, heterotrof ve tam parazit olan bitkiler emeç (haustoria) adı verilen yapılarla konaklarına bağlanmaları sadece ihtiyaç duydukları besin elementlerini değil aynı zamanda fonksiyonel genetik materyale ait ara ürünler (mRNA ve miRNAs) ile genetik materyalin kendisinin de transferine imkân sunduğu anlaşılmaktadır [42-45]. Gerek parazit bitkiler ile onların konakları arasında meydana gelen tek yönlü ilişkide gerekse baklagil bitkileri ile *Rhizobium* spp. bakterileri arasında meydana gelen simbiyotik yaşam formlarında ortaya çıkan YGT'nin temelinde hem konak hem de organizma arasında ortaya çıkan esansiyel besin ihtiyaçlarının giderilmesinin belirleyici olduğu [46, 47] ve evrimsel süreçte bu ihtiyaçların uzun vadede garanti altına alınmasını sağlayabilmek amacıyla karşılıklı olarak konak ve parazitler arasında doğal gen ya da genetik materyal transformasyonlarının meydana geldiği anlaşılmaktadır [48]. Nitekim yapılan birçok çalışma canavar otu ve küsküt gibi tam parazit bitkilerde mRNA gibi transkripsiyon ürünlerinin geçiş yaptığını ve bu durumun

yatay gen transferinin ara bir formu olabileceğine işaret etmektedir [44, 49, 50]. Daha sonra yapılan çalışmalar ise söz konusu genetik materyal geçişlerinin transkriptom ürünlerinden daha ziyade doğrudan genomik DNA parçaları olduğunu göstermiştir [43]. Hatta ökse otu gibi parazit bitkilerde bu genetik materyal geçişlerinin mitokondriyal transferi boyutunda olduğu belirlenmiştir [51, 52]. Bu bitkilerde YGT'ne konu olan genetik materyalin özellikleri ve çeşitliliği incelendiğinde, transfer olan genlerin aynı gen ailesinden geldikleri ve söz konusu gen geçişlerinin tesadüfi olmaktan daha ziyade canlının değişen çevre şartlarına adaptasyonuna yönelik dinamik modifikasyonlar ve uyarlamalar olduğu anlaşılmaktadır [14].

Ortak yaşam alanları temelinde parazit bitkiler dışında, bitkiler ile doğrudan ilişkili olan patojen bakteriler arasında meydana gelen YGT'nin en iyi örneklerden birini *Agrobacterium* spp. ile bitkiler arasında meydana gelen doğal gen transferleri gösterilebilir. Toprak bakterileri olan *Agrobacterium tumefaciens* ve *Agrobacterium rhizogenes* türlerinin patojen ırkları kendilerinin sentezleyemedikleri, ancak ihtiyaç duydukları karbon ve azotça zengin bileşikler (opinler) bitki hücrelerinde sentezletirmek ve sonrasında sentezlenen bu bileşikler kendi ihtiyaçları doğrultusunda kullanabilmek amacıyla plasmid DNA'larında yer alan çok sayıda geni (onkogenler) bitki hücresine aktararak bitki genomuna entegre etmektedir [53, 54]. Bu tür doğal gen transferlerinin varlığı başta tütün (*Nicotiana* spp.) ve nevrus otu (*Linaria vulgaris*) olmak üzere doğrudan insan gıdası olarak tüketilmeyen birçok bitki türünde doğal olarak meydana gelen genetik mühendisliğine örnek olarak gösterilmektedir [54-56]. Nitekim bitkilerde ilgili gen transferinin nasıl gerçekleştiğinin anlaşılması, günümüzde genetik mühendisliği yolu ile arzu edilen gen(ler)in hedef bitkiye transfer edilerek transgenik ya da diğer bir ifade ile genetiği değiştirilmiş (GD) bitkilerin elde edilmesi imkanı doğmuştur [57]. Yakın zamanda yapılan metagenomik analizler ise *A. tumefaciens* ve *A. rhizogenes* türlerine ait iki farklı transfer DNA (T-DNA) dizi homologunun (*IbT-DNA1* ve *IbT-DNA2*) kültürü yapılan tatlı patates bitkisinde (*Ipomoea batatas* [L.] Lam.) hem var olduğunu hem de farklı bitki dokularında işlevsel olduğunu göstermiştir [58]. Bu bulgular günümüzde insanlar tarafından doğrudan tüketilen ve doğal olarak kabul edilen diğer birçok bitki türünde de doğal genetik mühendisliği ürünlerinin bulunabileceğini ve bu durumun GDO kavramına farklı bir bakış açısı sunacağı değerlendirilebilir. Karşılıklı etkileşim halinde olan ve ortak yaşam alanlarını paylaşan organizmalar arasında meydana gelen YGT'nin

diğer örneklerini ise nematodlar ile toprak bakterileri arasında [59-62] ve insan mide florasında yer alan mikroorganizmaların kendi aralarında ortaya çıkan YGT'leri gösterilebilir [62]. Tüm bu sonuçlar yatay gen transferinin olabilmesi için ilgili organizmalar arasında fiziksel temasın bir gereklilik olduğunu, YGT'nin heterotrofik bitkilerde ototrofik bitkilere göre çok daha yüksek oranlarda gerçekleştiğini ve bu bitkilerin konaklarına ait çok sayıda geni paylaşabildiklerini göstermektedir [63].

Diğer taraftan hem meyve hem de sebze türleri arasında çok uzun süreden beri geleneksel olarak yapılan aşılama uygulamaları bitkiden bitkiye doğal yollarla gerçekleşen ve hücresel teması gerektiren YGT'nin diğer bir örneğini oluşturmaktadır. Temelinde dayanıklı uzak akraba türler ile ticari çeşitler arasında gerçekleştirilen bu uygulamalarda doğrudan hücresel temasın bir sonucu olarak genomik, organel DNA parçaları ya da transkripsiyon ürünlerinin (mRNA, RNAi) hücreler arasındaki mikroskobik boşluklar (plasmodesmata channel) ve mikrokesecekler yolu ile karşılıklı paylaşıldığı belirlenmiştir [64, 65]. Ancak güncel literatür bilgileri özellikle söz konusu YGT'ne yönelik geçişlerin sadece aşı bölgesindeki hücreler ile sınırlı olduğunu, bu taşınımların apikal meristem hücrelerine ve dolayısıyla çiçek tomurcuklarındaki generatif hücrelere ulaşmadığı ve bu nedenle sonraki döllere aktarılmadıklarını göstermiştir [66]. Aşı noktasındaki hücreler arasında meydana gelen genetik materyal transferleri sonucu ortaya çıkan kimerik genlerin ne kadar süreli ve hangi seviyede işlevsel oldukları, aktarılan genetik materyalin lokal hücre genomlarına entegre olup olmadıkları hali hazırda cevaplanması gereken sorular arasında yer almaktadır.

### **YGT ile Aktarılan Genetik Materyalin İşlevselliği**

YGT ile aktarılan çoğu genetik materyalin işlevsel (fonksiyoner) olmadığı belirtilmekle birlikte, işlevsel olan genlerin ise kendi içerisinde iki ana grup altında değerlendirilebileceği rapor edilmiştir [48]. Bunlardan birincisi alıcı organizmada daha önce var olmayan ve aktarılan gen ile yeni bir fonksiyon kazanılmasını sağlayan genler (innovative transfers)'dir. Diğeri ise alıcı organizmada mevcut bir genin fonksiyonunu üstlenen veya genomda daha önce var olan ancak fonksiyonunu kaybeden bir genin işlevini yerine getiren ve böylece hücre içindeki devamlılığın sağlanmasına imkan sunan sürdürücü (maintenance transfer) genler [48]. Yenilikçi gen fonksiyonu kazanan genlerin genelde alıcı organizmanın biyotik ya da abiyotik stres şartlarından korunma ve adaptasyon kabiliyetlerinin artırılmasında etkili olduğu belirlenmiştir [48]. Bu nedenle,



YGT ile yapılan ve işlevsel olan birçok genin bu kapsamda yer alan genler olduğu görülmektedir [48, 67]. Yapılan çalışmalar YGT ile aktarılan yabancı DNA'nın hedef genom içerisine doğrudan entegre olmadığı, bir seleksiyona ya da kontrole tabi tutulduktan sonra RNA seviyesinde transkripsiyona uğrayarak işlevsellik kazandığı yönündedir [48]. Bunun en güzel örneğini küsküt genomuna YGT ile aktarılan genlerin yabancı DNA gibi algılanarak siRNAs mekanizması ile sessizleştirilmeleri gösterilebilir [68]. Diğer taraftan protein kodlayan genlerin transkripsiyon ve devamında translasyonu sonucunda genom seviyesinde bir işlevsellik kazandıkları ve kazanılan işlevselliğin organizmanın hayatta kalması bakımından bir avantaj sağladığı anlaşılmaktadır. Nitekim yüksek otlak ayrığı (*Thinopyrum elongatum*) genomuna funguslardan YGT ile aktarılan *Fb7* (*Fusarium* başak yanıklığı 7) geninin kodladığı glutathione S-transferaz (GST) enzimi sayesinde bu bitkiler *Fusarium* patojenleri tarafından üretilen trichothecene toksinlerinin zararlı etkilerinden (detoksifikasyon) korunarak patojene karşı tolerant hale gelebildikleri belirlenmiştir [69]. Buğday üretiminde büyük kayıplara neden olan bu patojene karşı ekmeklik buğdaya aktarılan aynı genin buğdayda da aynı patojene karşı toleranslık sağladığı gösterilmiştir [69]. Bunun tam tersi bir durum ise çok yakın zamanda tütün beyaz sineğinde (*Bemisia tabaci*) gösterilmiştir. Tütün beyaz sineğinin genomunda bulunan bitki spesifik *BtPMT1* (*Bemisia tabaci* fenolik glukozit melonyl transferaz 1) geninin kodladığı fenolik glikozit melonyl transferaz enzimi sayesinde, bitkilerde yaygın olarak bulunan ve tütün beyaz sineğine toksik olan fenolik glikozitlerin zararlı etkisinden korunabildikleri tespit edilmiştir [70]. Aynı çalışmada *BtPMT1* geninin ters transkripsiyonuna ait dizinin domates bitkisine aktarılması sonucunda elde edilen transgenik domates ile beslenen böceklerde *BtPMT1* genin sessizleştiği ve bunun sonucu olarak böceklerde fenolik glikozitlere dayanıklılığın kalktığı ve böceklerde %100'lere varan ölümlerin meydana geldiği gösterilmiştir [70]. Bu bilgi ve bulgular YGT'leri ile parazit organizmalardan bitki genomlarına ya da bitki genomlarından parazit organizmalara doğal yollarla aktarılan işlevsel genlerin bitki ıslahı programlarında yenilikçi yaklaşımlarla ele alınarak dayanıklılık ıslahı açısından etkili bir şekilde kullanılabilmesine işaret etmektedir. Günümüzde bitki dahil çok sayıda organizmaya ait genom dizi bilgisi kullanılarak yapılacak biyoinformatik analizler çok sayıda yeni işlevsel genin belirlenmesini ve bu genlerin bitki ıslahı açısından doğrudan kullanımlarına imkân sunacaktır.

Diğer taraftan YGT ile aktarılan genetik materyal hedef organizma genomuna entegre olamaz ise bu durumda söz konusu DNA ya konak hücrenin genetik kontrol mekanizmaları ile yabancı genetik materyal olarak algılanarak parçalanmakta ve böylece zararsız hale getirilmekte ya da mutasyona neden olan bir DNA dizisi olarak genoma entegre olmaktadır [48, 71]. Bu tip bir entegrasyona örnek olarak neredeyse tüm canlı genomlarında yaygın olarak bulunan ancak oransal olarak ökaryot genomlarının büyük bir bölümünü oluşturan hareketli (transposable) DNA elementleri (TEs) gösterilebilir [72, 73]. Bu nedenle, TEs ökaryot genomlarının hem yapısal hem de fonksiyonel modifikasyonlarında büyük önem taşırlar. Ancak daha ziyade epigenetik düzenlemelerle ve dikey gen geçişi ile ilişkili olan TEs, yatay gen geçişlerine konu olan işlevsel genlerdeki gibi konağına avantaj sağlayabilecek önemli bir görev üstlenmedikleri belirlenmiştir [72].

Prokaryotlardan ökaryotlara doğru olan YGT'lerinde aktarılan genetik materyalin işlevsellik kazanması daha kompleks ve anlaşılması daha güç bir durumdur. Zira prokaryotlara ait genlerin transkripsiyon ve translasyon mekanizmaları ökaryotlara göre önemli farklılıklar göstermektedir [74]. Prokaryotlardan ökaryotlara doğru kalıtsal olarak meydana gelebilecek başarılı bir YGT'nde aktarılan genin işlevsel olabilmesi için ökaryot gen yapılarında yer alan intron-ekzon ve GC içerikleri yanında aynı zamanda ökaryotik promotor ve terminatör gen bölgelerinin de entegrasyonu gerekmektedir [48, 75]. Bu nedenle, YTG ile transfer edilen DNA parçasında intronların olması onların ökaryot genomlarında işlevsellik kazanmasında etkili olabileceğine işaret etmektedir [40, 76, 77]. Nitekim YGT ile aktarılan ve işlevsel olan birçok gende intronların varlığı yaygın olarak görülen bir durumdur [75]. Ancak bu intronların bazılarının genin kendisinden daha ziyade genin işleyişini kontrol eden 5'-UTR ya da 3'-UTR gen bölgelerinde lokalize olduğu belirlenmiştir [78]. Tüm bunlar YGT ile aktarılan genetik materyalin gen özelliğinde aktive edilmesinin engellenmesi ya da işlevsel olmasında belirleyici olmaktadır. Ayrıca YGT ile aktarılan genlerin hedef genoma entegrasyonlarının tesadüfi olmadığı, genellikle daha az korunaklı ve TEs'lerce zengin ya da daha az işlevsel gen bulunduran kromozom bölgelerine entegre oldukları gösterilmiştir [79].

## **YGT ile İşlevsel Genlerin Belirlenmesi**

Her ne kadar güncel yaklaşımlar ile genetik materyal geçişlerinin tespit edilmesi geçmişe göre daha kolay olsa da hedef organizmanın dizi bilgilerinin elde edilmesi sırasında

meydana gelebilecek genetik materyal bulaşmalarının (kontaminasyonların) biyoinformatik analiz sonuçlarının hatalı bir şekilde yorumlanmasına neden olabileceği göz ardı edilmemesi gerekmektedir [80, 81]. Bu açıdan YGT sonucu transfer olan genetik materyale ait kaynağın doğru bir şekilde belirlenmesi oldukça önemlidir [82]. YGT'ne konu olan genetik materyalin belirlenmesinde iki temel problem ile karşılaşmaktadır. Bunların başında bakteri genomunun farklı organizmalardan köken alan çok sayıda DNA parçasına sahip olması gelmektedir [75]. Bu nedenle, YGT ile aktarılan gen aynı evrimsel süreç içerisinde diğer organizmalardan bakteri genomuna aktarılan ve dolayısı ile testin yapıldığı anda bakteriyel genomu olarak kabul edilen genetik materyalin tespit edilmesi sorunudur [80, 81]. İkinci sorun ise, filogenetik analizlerde kullanılan farklı yöntemsel yaklaşımlar, farklılaşmış gen kayıpları ve uygun olmayan taksonların bu amaçla seçilmesi genin kaynağının belirlenmesinde başka önemli sorunların yaşanmasına neden olabilmektedir [81]. Örneğin, *Escherichia coli* yatay gen geçişleri ve kayıplarının yaşandığı iyi bir model organizma olarak değerlendirilmektedir. Yaklaşık 5.000 adet protein kodlayan gene sahip olan bakterinin bütün tür ve suşları dikkate alındığında (pan-genome) bu organizmanın sahip olduğu gen sayısının 15.700'lere çıktığı, ancak bunların sadece %6'sının tüm *E. coli* ırklarında ortaklaşa paylaşıldığı rapor edilmiştir [38]. Yukarıda verilen örnekler genom dizilemesi ve biyoinformatik yaklaşımların etkin kullanılmaya başlandığı günümüzde YGT'ne konu olan genetik materyalin bitki ıslahı açısından ele alınarak ayrıca değerlendirilmesinin dayanıklılık ıslahı açısından çok önemli olabileceğine işaret etmektedir. Sonuçlar aynı zamanda YGT'ne konu olan ve bitki ıslahı açısından değerlendirmeye alınacak olan hedef genlerin belirlenmesinde çok dikkatli olunması gerektiğini de ortaya koymaktadır.

## **Genetik Modifikasyon, YGT ve GDO Terminolojisi**

Terminolojik olarak “gen transferi” genetik materyalin bir yerden başka bir yere taşınması, bir organizmadan başka bir organizmaya doğrudan ya da farklı araçlar (vektörler) kullanılarak (canlı ya da cansız) aktarılması ve aktarılan genetik materyalin hedef canlı organizmanın genomuna kalıcı şekilde entegre olması anlamına gelmektedir. Genetik mühendisliğinde söz konusu genetik alış-veriş aracı olma laboratuvar şartlarında modern biyoteknolojik yaklaşımlar kullanılarak gerçekleştirilirken, klasik bitki ıslahı uygulamalarında genetik alış-veriş aracı olma tarla, sera ya da iklim odası/kabini gibi fiziki mekanlar kullanılarak melezleme ya da mutasyon gibi metodolojik

yaklaşımlar kullanarak gerçekleştirilmektedir. Özellikle klasik ıslah uygulamalarında hali hazırda kullanılabilir bir genetik materyal yoksa ya da arzu edilen bitki materyali mevcut değilse genetik tabanı birbirinden çok uzak olan bitkiler melezlenmekte ve devamında açılım gösteren F<sub>2</sub> jenerasyonlarında seleksiyon uygulamaları ile istenilen özelliğe sahip bitkiler belirlenmeye çalışılmaktadır [83-85]. Hatta bu uygulamalarda, melezlemede kullanılacak ebeveyn bitkiler bazen doğada uyumsuz oldukları ve normalde verimli döllere veremedikleri halde kontrollü şartlarda (*in vitro* tozlanma ve döllenme, embryo kurtarma, türler arası melezleme vb) melezlemeler yapılarak döl verebilir hale getirilebilmektedirler [86-88]. Ancak eğer melezlemeye girebilecek ebeveyn bitki materyali yoksa bu durumda fiziksel ya da kimyasal mutajenler kullanılarak hedef bitki genomunda tesadüfi kalıcı mutasyonlar oluşturulmakta ve bu mutantlar arasından arzu edilen özellikleri taşıyanlar mutant bitkiler tespit edilmeye çalışılmaktadır [89-91]. Yukarıda belirtilen gerek melezleme ve gerekse mutasyon uygulamaları sonucu elde edilen bitkilerin, hedef bitkinin DNA yapısında meydana gelen genetik değişiklikler esas alındığında “genetiği değiştirilmiş” bitki (GD bitki), yaygın olarak kullanılan diğer bir ifade ile GDO olarak tanımlanabileceği muhakkaktır. Ancak hedef bitkinin DNA yapısında meydana gelen genetik değişiklik ya da farklılıklar esas alınarak ortaya konan bu bilimsel gerçeğin GDO karşılığına, özellikle de klasik ıslah uygulamaları olan melezleme (örneğin, hibrit tohum) ve mutant bitkiler özelinde yapılan tartışmalara bir kaynak ya da dayanak noktası oluşturulmaması gerektiği, tam aksine yukarıda bilimsel esaslarla ortaya konan YGT ve DGT örneklerinde olduğu gibi günümüzde insanlar tarafından “doğal” ya da “genetiği değiştirilmiş” olduğu varsayılarak tüketilen birçok bitkinin aslında ne kadar “doğal” olduğunun sorgulanmasına ve bu yönüyle toplumun GDO algı ve bakışına yeni bir yaklaşım getiren bir durum tespiti olduğu tekrar vurgulanması gereken önemli bir konudur. Diğer taraftan eğer konu nihai ürün ya da canlı organizmanın “DNA yapısındaki değişiklik”ten daha ziyade değişikliğin elde edilmesinde kullanılan yöntemin kendisi (modern ya da klasik metotlar), genetik değişikliğin meydana getirildiği fiziki mekan (tarla, sera, laboratuvar) veya genetik değişikliğin oluşmasını sağlayan vektörün/aracının (virüs, fungus, bakteri, parazit bitki ve insan) özellikleri esas alınarak yapılacak bir değerlendirmede ise “GDO” kavramının bütün bu değişkenleri tek başına tanımlamak ve açıklamak için yeterli olmadığı, günümüzde konu ile yapılan bilimsel içerikten uzak tartışmalara kaynak teşkil ettiği ve etmeye devam edeceği görülmektedir. Bu nedenle,

GDO terminolojisinde kullanılacak genetik alış-verişe aracı olma ya da müdahale etmede kullanılan yöntemin, aracının nitelikleri ve meydana gelen genetik değişikliğin oluş mekanizmaları da dikkate alınarak birden fazla GDO tanımlamasının yapılması gerekliliği kendiliğinden ortaya çıkmaktadır. Yapılacak ayrıştırmada hedef organizmanın DNA yapısında meydana gelen değişikliğin “değiştirilmiş” ya da “değişmiş” olduğu da göz önüne alınarak ilgili alanda kullanılacak terminolojiyi buna göre uyarlamak daha da yerinde bir yaklaşım olacaktır. Zira nihai organizmanın DNA yapısındaki değişim “değişmiş” olarak kendiliğinden ortaya çıkabildiği gibi bu makale çerçevesinde ele alındığı üzere çoğu zaman insan ya da insanın dışındaki araçlar (virüs, fungus, parazit ya da böcekler) ile “değiştirilmiş” olarak da meydana gelebilmektedir. Yukarıda konu edilen bakış açısı ile güncel terminolojik kavramlar da göz önüne alındığında GDO terminolojisinin daha ayrıştırıcı ve daha tanımlayıcı olması bakımından Evrimsel GDO (eGDO), Tarımsal GDO (tGDO) ve Biyoteknolojik GDO (bGDO) şeklinde kullanılmasının daha yerinde olacağı değerlendirilmiştir. Her bir terminolojik ifadenin kapsam ve içeriği aşağıda ayrıca belirtilmiştir.

#### **Evrimsel GDO (eGDO)**

Geçmişten günümüze evrimsel süreç içerisinde kendiliğinden ortaya çıkan genetik modifikasyonları tanımlamak için kullanılacaktır. Yatay (horizontal) ya da lateral gen transferleri ile dikey (vertical) gen transferleri sonucu ortaya çıkan her türlü genetik modifikasyon ya da değişiklik eGDO kapsamında değerlendirilecektir. Bu kapsamda dikey gen transferi eşeyli üremenin bir sonucu olarak geçmişten günümüze genetik materyalin ebeveynden yavru döllere geçişi, tür içi ya da türler arası kendiliğinden (doğal) ortaya çıkan genetik modifikasyonları ifade ederken yatay gen transferi filogenetik olarak birbirlerinden uzak canlı organizmalar arasında aracısız ya da insan dışındaki canlı organizmalar aracılığı ile ortaya çıkan doğal genetik modifikasyonları tanımlamak için kullanılacaktır. Dikey gen transferleri genelde doğal bariyerler (tür içi vb) ile kontrol edilerek sınırlandırılırken, yatay gen transferlerinde böyle bir sınırlamanın olmadığı, çok farklı canlı türü arasında sadece oluş mekanizmaları bakımından değişebilecek genetik modifikasyonları içermektedir.

#### **Tarımsal GDO (tGDO)**

Tarımsal açıdan önemli olan bitki, hayvan, su ürünleri, böcek ya da mikroorganizmaların insan eliyle geliştirilmesi ya da kültüre alınması amacıyla klasik ya da geleneksel

yöntemler kullanılarak yapılan tüm gen transferi ya da genetik modifikasyonları ifade etmek için kullanılacaktır. Genetik modifikasyonun gerçekleştiği fiziksel mekanlardan (tarla, sera, laboratuvar vb.) bağımsız insan eliyle yapılan melezleme, mutasyon ve klonlama amacıyla yapılan doku kültürü uygulamalarının kendisi ve ürünleri bu çerçevede değerlendirilecektir. Bu kapsamda tGDO kavramı ve içeriği günümüzdeki GDO tartışmalarının üzerinde tarımsal açıdan önemli olan bitki, hayvan, su ürünleri, böcek ya da mikroorganizmaların DNA yapısında ıslahçılar tarafından oluşturulan genetik değişiklik ya da farklılıkları ifade etmek için kullanılacaktır.

### **Biyoteknolojik GDO (bGDO)**

Genom düzeltme, nanobiyoteknoloji ve rekombinant DNA teknolojileri dahil laboratuvar ortamında modern biyoteknolojik metotlar kullanılarak elde edilen, insan dışındaki tüm genetik modifikasyonlar ve onların ürünlerini ifade etmek için kullanılacaktır. Doku kültürü uygulamaları ile elde edilecek somatik hibridizasyon ürünleri de bu kapsamda değerlendirilecektir.

### **Sonuç**

Oluş şekli (metodolojisi) ve oluşmasına aracı olan vektör organizmadan (insan, virüs, bakteri, parazit bitki) bağımsız olarak kalıtım materyali olan DNA'da (tek bir nükleotit, gen, genler, kromozom, çekirdek genomu ya da organel genomları dahil) meydana gelen tüm modifikasyonların (ekleme, çıkarma, yer değiştirme ya da kopya sayısının artırılması) esasen kalıtsal bir genetik değişiklik ya da modifikasyon olduğu bilimsel bir gerçektir. Ancak transgenik bitkilerin elde edilmesinden itibaren günümüze kadar kullanılmaya devam edilen GDO kavramının genetik materyal üzerinde meydana gelen modifikasyonların kendisinden daha ziyade kullanılan metodolojik yaklaşımların ve insan aracılı olup olmadığı esasına dayandırılarak yapılması GDO kapsamında yapılan tartışmaları sonuçsuz bırakmaktadır. Bu tartışmalara günümüzde kullanılmaya başlanan genom düzeltme ve nanobiyoteknolojik ürünlerin de dahil edilmesi tartışmaları daha da içinden çıkılmaz bir hale sokmaktadır. Bu makale çerçevesinde terminolojik olarak ortaya konan eGDO, tGDO ve bGDO yaklaşımının GDO tartışmalarına farklı bir bakış açısı getirmesi ve genetik modifikasyon kavramının ayrıştırılarak tartışılmasına katkı sunması beklenmektedir.

## Kısaltmalar

GDO: Genetiği Değiştirilmiş Organizmalar; DGT: Dikey Gen Transferi; YGT: Yatay Gen Transferi; DNA: DeoxyriboNükleik Asit; mRNA: mesajcı RiboNükleik Asit; miRNAs: mikro RiboRükleik Asitler; T-DNA: Transfer-DNA; GD: Genetiği Değiştirilmiş; RNAi: RNA interferaz; siRNAs: küçük interferaz RNAs; *Fb7*: fusarium başak yanıklığı 7 geni; GST: Glutathione S-Transferaz; *BtPMT1*: *Bemisia tabaci* Fenolik Glukozit Melonyl Transferaz 1 geni; *IbT-DNA1* ve *IbT-DNA2*: *Ipomoea batatas*T-DNA1 ve *Ipomoea batatas*T-DNA2; TEs: taşınabilir elementler; UTR: ifade edilmeyen bölge; eGDO: Evrimsel GDO; tGDO: Tarımsal GDO; bGDO: Biyoteknolojik GDO

## Kaynaklar

1. de Vendomois, J.S., et al., Debate on GMOs health risks after statistical findings in regulatory tests. *Int J Biol Sci*, 2010. 6(6): p. 590-8.
2. Keese, P., Risks from GMOs due to horizontal gene transfer. *Environ Biosafety Res*, 2008. 7(3): p. 123-49.
3. Steinhauser, K.G., Environmental risks of chemicals and genetically modified organisms: a comparison. Part I: Classification and characterisation of risks posed by chemicals and GMOs. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2001. 8(2): p. 120-6.
4. Firn, R.D. and C.G. Jones, Secondary metabolism and the risks of GMOs. *Nature*, 1999. 400(6739): p. 13-4.
5. Yoshimatsu, K., et al., [Current status in the commercialization and application of genetically modified plants and their effects on human and livestock health and phytoremediation]. *Yakugaku Zasshi*, 2012. 132(5): p. 629-74.
6. Duguma, H.T., Wild edible plant nutritional contribution and consumer perception in Ethiopia. *Int J Food Sci*, 2020. 2020: p. 2958623.
7. Magnusson, M.K., [Genetically modified plants; a threat to human health?]. *Laeknabladid*, 2012. 98(11): p. 577.
8. Key, S., J.K. Ma, and P.M. Drake, Genetically modified plants and human health. *J R Soc Med*, 2008. 101(6): p. 290-8.
9. Buyel, J.F., E. Stoger, and L. Bortesi, Targeted genome editing of plants and plant cells for biomanufacturing. *Transgenic Res*, 2021.
10. Bhat, M.A., et al., Mechanistic insights of CRISPR/Cas-mediated genome editing towards enhancing abiotic stress tolerance in plants. *Physiol Plant*, 2021.
11. Demirer, G.S., et al., Nanotechnology to advance CRISPR-Cas genetic engineering of plants. *Nat Nanotechnol*, 2021. 16(3): p. 243-250.
12. Kumari, P., S. Luqman, and A. Meena, Application of the combinatorial approaches of medicinal and aromatic plants with nanotechnology and its impacts on healthcare. *Daru*, 2019. 27(1): p. 475-489.
13. Ocoy, I., et al., Nanotechnology in plants. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 2018. 164: p. 263-275.
14. Bock, R., The give-and-take of DNA: Horizontal gene transfer in plants. *Trends Plant Sci*, 2010. 15(1): p. 11-22.
15. Chen, R., et al., Adaptive innovation of green plants by horizontal gene transfer. *Biotechnol Adv*, 2021. 46: p. 107671.
16. Mavi, K., Biberlerde türler arası melezleme. *International Journal of Life Sciences and Biotechnology*, 2020. 3(3): p. 386-706.
17. Bimpong, I.K., et al., Improving salt tolerance of lowland rice cultivar 'Rassi' through marker-aided backcross breeding in West Africa. *Plant Sci*, 2016. 242: p. 288-299.
18. Ellur, R.K., et al., Improvement of Basmati rice varieties for resistance to blast and bacterial blight diseases using marker assisted backcross breeding. *Plant Sci*, 2016. 242: p. 330-341.
19. Jugulam, M., et al., Transfer of dicamba tolerance from *Sinapis arvensis* to *Brassica napus* via embryo rescue and recurrent backcross breeding. *PLoS One*, 2015. 10(11): p. e0141418.
20. Vogel, K.E., Backcross breeding. *Methods Mol Biol*, 2009. 526: p. 161-9.
21. Wang, X., et al., Breeding histories and selection criteria for oilseed rape in Europe and China identified by genome wide pedigree dissection. *Sci Rep*, 2017. 7(1): p. 1916.
22. Li, H. and X. Wang, *Thinopyrum ponticum* and *Th. intermedium*: the promising source of resistance to fungal and viral diseases of wheat. *J Genet Genomics*, 2009. 36(9): p. 557-65.

23. Wulff, B.B. and M.J. Moscou, Strategies for transferring resistance into wheat: from wide crosses to GM cassettes. *Front Plant Sci*, 2014. 5: p. 692.
24. Jia, Y., et al., Indica and japonica crosses resulting in linkage block and recombination suppression on rice chromosome 12. *PLoS One*, 2012. 7(8): p. e43066.
25. Huang, G. and Y.X. Zhu, Plant polyploidy and evolution. *J Integr Plant Biol*, 2019. 61(1): p. 4-6.
26. Jiao, Y. and A.H. Paterson, Polyploidy-associated genome modifications during land plant evolution. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2014. 369(1648).
27. Sattler, M.C., C.R. Carvalho, and W.R. Clarindo, The polyploidy and its key role in plant breeding. *Planta*, 2016. 243(2): p. 281-96.
28. Reddy, K.R., et al., High-temperature and drought-resilience traits among interspecific chromosome substitution lines for genetic improvement of upland cotton. *Plants (Basel)*, 2020. 9(12).
29. Li, P.T., et al., Comparative transcriptome analysis of cotton fiber development of upland cotton (*Gossypium hirsutum*) and chromosome segment substitution lines from *G. hirsutum* x *G. barbadense*. *BMC Genomics*, 2017. 18(1): p. 705.
30. Wu, J., et al., Genetic effects of individual chromosomes in cotton cultivars detected by using chromosome substitution lines as genetic probes. *Genetica*, 2010. 138(11-12): p. 1171-9.
31. Saha, S., et al., Genetic dissection of chromosome substitution lines of cotton to discover novel *Gossypium barbadense* L. alleles for improvement of agronomic traits. *Theor Appl Genet*, 2010. 120(6): p. 1193-205.
32. Zhao, X., et al., Fertilization and uniparental chromosome elimination during crosses with maize haploid inducers. *Plant Physiol*, 2013. 163(2): p. 721-31.
33. Galbraith, D.W., et al., Analysis of nuclear DNA content and ploidy in higher plants. *Curr Protoc Cytom*, 2001. Chapter 7: p. Unit 7 6.
34. Suda, J. and P. Travnicek, Reliable DNA ploidy determination in dehydrated tissues of vascular plants by DAPI flow cytometry-new prospects for plant research. *Cytometry A*, 2006. 69(4): p. 273-80.
35. Zhang, Y., C. Zheng, and D. Sankoff, Pinning down ploidy in paleopolyploid plants. *BMC Genomics*, 2018. 19(Suppl 5): p. 287.
36. Melonek, J., et al., The genetic basis of cytoplasmic male sterility and fertility restoration in wheat. *Nat Commun*, 2021. 12(1): p. 1036.
37. Zhang, B., et al., Transcriptome analysis implicates involvement of long noncoding RNAs in cytoplasmic male sterility and fertility restoration in cotton. *Int J Mol Sci*, 2019. 20(22).
38. Danchin, E.G., Lateral gene transfer in eukaryotes: tip of the iceberg or of the ice cube? *BMC Biol*, 2016. 14(1): p. 101.
39. Emamalipour, M., et al., Horizontal gene transfer: from evolutionary flexibility to disease progression. *Front Cell Dev Biol*, 2020. 8: p. 229.
40. Soucy, S.M., J. Huang, and J.P. Gogarten, Horizontal gene transfer: building the web of life. *Nat Rev Genet*, 2015. 16(8): p. 472-82.
41. Yue, J., X. Hu, and J. Huang, Horizontal gene transfer in the innovation and adaptation of land plants. *Plant Signal Behav*, 2013. 8(5): p. e24130.
42. Zhang, Y., et al., Parasitic plant dodder (*Cuscuta* spp.): A new natural *Agrobacterium*-to-plant horizontal gene transfer species. *Sci China Life Sci*, 2020. 63(2): p. 312-316.
43. Zhang, D., et al., Root parasitic plant *Orobancha aegyptiaca* and shoot parasitic plant *Cuscuta australis* obtained Brassicaceae-specific strictosidine synthase-like genes by horizontal gene transfer. *BMC Plant Biol*, 2014. 14: p. 19.
44. Yoshida, S., et al., Horizontal gene transfer by the parasitic plant *Striga hermonthica*. *Science*, 2010. 328(5982): p. 1128.
45. Ying, S.Y., D.C. Chang, and S.L. Lin, The microRNA (miRNA): overview of the RNA genes that modulate gene function. *Mol Biotechnol*, 2008. 38(3): p. 257-68.
46. Ling, J., et al., Plant nodulation inducers enhance horizontal gene transfer of *Azorhizobium caulinodans* symbiosis island. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016. 113(48): p. 13875-13880.
47. Li, X., et al., A novel strategy for detecting recent horizontal gene transfer and its application to *Rhizobium* strains. *Front Microbiol*, 2018. 9: p. 973.
48. Husnik, F. and J.P. McCutcheon, Functional horizontal gene transfer from bacteria to eukaryotes. *Nat Rev Microbiol*, 2018. 16(2): p. 67-79.
49. Kim, G., et al., Plant science. Genomic-scale exchange of mRNA between a parasitic plant and its hosts. *Science*, 2014. 345(6198): p. 808-11.



50. Westwood, J.H. and G. Kim, RNA mobility in parasitic plant - host interactions. *RNA Biol*, 2017. 14(4): p. 450-455.
51. Petersen, G., et al., Massive gene loss in mistletoe (*Viscum*, Viscaceae) mitochondria. *Sci Rep*, 2015. 5: p. 17588.
52. Zervas, A., G. Petersen, and O. Seberg, Mitochondrial genome evolution in parasitic plants. *BMC Evol Biol*, 2019. 19(1): p. 87.
53. Lacroix, B. and V. Citovsky, Pathways of DNA Transfer to plants from *Agrobacterium tumefaciens* and related bacterial species. *Annu Rev Phytopathol*, 2019. 57: p. 231-251.
54. Nester, E.W., *Agrobacterium*: nature's genetic engineer. *Front. Plant Sci.*, 2015 8: p. 730.
55. Matveeva, T.V., et al., Horizontal gene transfer from genus *Agrobacterium* to the plant *Linaria* in nature. *Mol Plant Microbe Interact*, 2012. 25(12): p. 1542-51.
56. Matveeva, T.V. and L.A. Lutova, Horizontal gene transfer from *Agrobacterium* to plants. *Front Plant Sci*, 2014. 5: p. 326.
57. Hwang, H.H., M. Yu, and E.M. Lai, *Agrobacterium*-mediated plant transformation: biology and applications. *Arabidopsis Book*, 2017. 15: p. e0186.
58. Kyndt, T., et al., The genome of cultivated sweet potato contains *Agrobacterium* T-DNAs with expressed genes: An example of a naturally transgenic food crop. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015. 112(18): p. 5844-9.
59. Danchin, E.G.J., et al., The transcriptomes of *Xiphinema index* and *Longidorus elongatus* suggest independent acquisition of some plant parasitism genes by horizontal gene transfer in early-branching nematodes. *Genes (Basel)*, 2017. 8(10).
60. Haegeman, A., J.T. Jones, and E.G. Danchin, Horizontal gene transfer in nematodes: a catalyst for plant parasitism? *Mol Plant Microbe Interact*, 2011. 24(8): p. 879-87.
61. Wu, B., et al., Interdomain lateral gene transfer of an essential ferrochelatase gene in human parasitic nematodes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013. 110(19): p. 7748-53.
62. Sitaraman, R., Prokaryotic horizontal gene transfer within the human holobiont: ecological-evolutionary inferences, implications and possibilities. *Microbiome*, 2018. 6(1): p. 163.
63. Yang, Z., et al., Convergent horizontal gene transfer and cross-talk of mobile nucleic acids in parasitic plants. *Nat Plants*, 2019. 5(9): p. 991-1001.
64. Hao, J., et al., Direct visualization of horizontal gene transfer in cotton plants. *J Hered*, 2014. 105(6): p. 834-6.
65. Stegemann, S. and R. Bock, Exchange of genetic material between cells in plant tissue grafts. *Science*, 2009. 324(5927): p. 649-51.
66. Hertle, A.P., B. Haberl, and R. Bock, Horizontal genome transfer by cell-to-cell travel of whole organelles. *Sci Adv*, 2021. 7(1).
67. Sun, D., Pull in and Push Out: Mechanisms of horizontal gene transfer in bacteria. *Front Microbiol*, 2018. 9: p. 2154.
68. Kleiner, M., J.M. Petersen, and N. Dubilier, Convergent and divergent evolution of metabolism in sulfur-oxidizing symbionts and the role of horizontal gene transfer. *Curr Opin Microbiol*, 2012. 15(5): p. 621-31.
69. Wang, H., et al., Horizontal gene transfer of *Fhb7* from fungus underlies *Fusarium* head blight resistance in wheat. *Science*, 2020. 368(6493).
70. Xia, J., et al., Whitefly hijacks a plant detoxification gene that neutralizes plant toxins. *Cell*, 2021. 184(7): p. 1693-1705 e17.
71. Gao, C., et al., Horizontal gene transfer in plants. *Funct Integr Genomics*, 2014. 14(1): p. 23-9.
72. El Baidouri, M., et al., Widespread and frequent horizontal transfers of transposable elements in plants. *Genome Res*, 2014. 24(5): p. 831-8.
73. Panaud, O., Horizontal transfers of transposable elements in eukaryotes: The flying genes. *C R Biol*, 2016. 339(7-8): p. 296-9.
74. Baltrus, D.A., Exploring the costs of horizontal gene transfer. *Trends Ecol Evol*, 2013. 28(8): p. 489-95.
75. Da Lage, J.L., et al., Gene make-up: rapid and massive intron gains after horizontal transfer of a bacterial alpha-amylase gene to Basidiomycetes. *BMC Evol Biol*, 2013. 13: p. 40.
76. Slomka, S., et al., Experimental evolution of *Bacillus subtilis* reveals the evolutionary dynamics of horizontal gene transfer and suggests adaptive and neutral effects. *Genetics*, 2020. 216(2): p. 543-558.
77. Keeling, P.J. and J.D. Palmer, Horizontal gene transfer in eukaryotic evolution. *Nat Rev Genet*, 2008. 9(8): p. 605-18.

78. Tiwari, P. and H. Bae, Horizontal gene transfer and endophytes: An implication for the acquisition of novel traits. *Plants (Basel)*, 2020. 9(3).
79. Oliveira, P.H., et al., The chromosomal organization of horizontal gene transfer in bacteria. *Nat Commun*, 2017. 8(1): p. 841.
80. van Passel, M., et al., Phylogenetic validation of horizontal gene transfer? *Nat Genet*, 2004. 36(10): p. 1028.
81. Douglas, G.M. and M.G.I. Langille, Current and promising approaches to identify horizontal gene transfer events in metagenomes. *Genome Biol Evol*, 2019. 11(10): p. 2750-2766.
82. Koonin, E.V., K.S. Makarova, and L. Aravind, Horizontal gene transfer in prokaryotes: quantification and classification. *Annu Rev Microbiol*, 2001. 55: p. 709-42.
83. Bhering, L.L., et al., Comparison of methods used to identify superior individuals in genomic selection in plant breeding. *Genet Mol Res*, 2015. 14(3): p. 10888-96.
84. Bresseghello, F. and A.S. Coelho, Traditional and modern plant breeding methods with examples in rice (*Oryza sativa* L.). *J Agric Food Chem*, 2013. 61(35): p. 8277-86.
85. Crossa, J., et al., Genomic selection in plant breeding: methods, models, and perspectives. *Trends Plant Sci*, 2017. 22(11): p. 961-975.
86. Zhang, L., et al., Regulation of maize kernel weight and carbohydrate metabolism by abscisic acid applied at the early and middle post-pollination stages in vitro. *J Plant Physiol*, 2017. 216: p. 1-10.
87. Sosnowska, K. and T. Cegielska-Taras, Application of in vitro pollination of opened ovaries to obtain *Brassica oleracea* L. x *B. rapa* L. hybrids. *In Vitro Cell Dev Biol Plant*, 2014. 50: p. 257-262.
88. Leduc, N., G.C. Douglas, and M. Monnier, Methods for non-stigmatic pollination in *Trifolium repens* (Papilionaceae): seed set with self- and cross-pollinations in vitro. *Theor Appl Genet*, 1992. 83(6-7): p. 912-8.
89. Yamaguchi, H., Mutation breeding of ornamental plants using ion beams. *Breed Sci*, 2018. 68(1): p. 71-78.
90. Tanaka, A., N. Shikazono, and Y. Hase, Studies on biological effects of ion beams on lethality, molecular nature of mutation, mutation rate, and spectrum of mutation phenotype for mutation breeding in higher plants. *J Radiat Res*, 2010. 51(3): p. 223-33.
91. Yan, S., et al., Research progress on mutation by spaceflight in medicinal plants breeding. *Chinese. PMID*, 2010. 35(3): p. 385-8.

## Karbohidrat Bazlı Terapotikler

Nebiye Pelin Türker<sup>1\*</sup> , Elvan Bakar<sup>2</sup> 

### ÖZET

Yaşam bilimlerinde karbohidratların önemi giderek artmaktadır. Karbohidratlar çok farklı biyolojik rollere sahiptir. Bu rollerden bir tanesi de onların tedavideki etkinlikleridir. Karbohidrat bazlı terapötikler, enflamatuvar hastalıklar ve anti-trombotik tedavilerden yara iyileşmesine kadar değişen kardiyovasküler ve hematolojik hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Heparin, en yaygın bilinen karbohidrat bazlı ilaçtır. Karbohidrat bazlı terapötikler; polisakarit ve oligosakarit içerikli anti-enflamatuvarlar, antikoagulan ve antitrombotik ajanları, doğal ve sentetik kaynakları içermektedir. Bu bileşiklerin bazıları, artrit ve anti-HIV aktiviteler gösteren biyolojik etkilere sahiptir. Son yıllarda hem doğal hem de sentetik monosakkaritler, in vivo anti- kardiyoprotektif ve enflamatuvar özellikleri açısından araştırılmaya başlanılmıştır. Bu derlemenin amacı karbohidrat bazlı terapötiklerin, hastalıkların tedavisindeki önemini vurgulamaktır.

### MAKALE GEÇMİŞİ

#### Geliş

05 Şubat 2021

#### Kabul

26 Nisan 2021

### ANAHTAR KELİMELER

Karbohidrat, terapötik hastalık glikan

## Carbohydrate Based Therapeutics

### ABSTRACT

The importance of carbohydrates has been increased in life sciences. Carbohydrates have very different biological roles. One of these roles is their activities in therapy. Carbohydrate-based therapeutics are used in the treatment of cardiovascular and hematological diseases ranging from inflammatory diseases and anti-thrombotic therapies to wound healing. Heparin is the most widely known carbohydrate-based drug. Carbohydrate-based therapeutics include polysaccharide and oligosaccharide-containing anti-inflammatories, anticoagulant and antithrombotic agents, natural and synthetic sources. Some of these compounds have biological effects showing arthritic and anti-HIV activities. In recent years, both natural and synthetic monosaccharides have been investigated for in vivo anti-cardioprotective and inflammatory properties. The purpose of this review is to emphasize the importance of carbohydrate-based therapeutics in the treatment of diseases.

### ARTICLE HISTORY

#### Received

05 February 2021

#### Accepted

26 April 2021

### KEY WORDS

Carbohydrate, therapeutic, disease, glycan

## Giriş

Karbohidratlar, pek çok hücrel moleküle veya hücre yüzeyi reseptörlerine sinyal gönderen hücrel etkileşimde önemli rol oynayan kompleks biyomoleküllerdir [1]. Glikoproteinler, glikolipidler ve glikosile doğal ürünler başta olmak üzere temel

<sup>1</sup> Trakya Üniversitesi, Teknoloji Araştırma Geliştirme Uygulama ve Araştırma Merkezi, Edirne, Türkiye

<sup>2</sup> Trakya Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Eczacılık Temel Bilimleri AD, Edirne, Türkiye

\*Corresponding Author: Nebiye Pelin TÜRKER, e-mail: [npelinturker@trakya.edu.tr](mailto:npelinturker@trakya.edu.tr)

glikokonjugatlar oluşturmak için çok çeşitli monosakkarid ve oligosakkarid kalıntıları glikosidik bağlarla bağlanırlar. Hücre yüzeyi glikanlarının yapısındaki herhangi bir değişim, hastalığın ilerlemesi için gerekli olan bilgileri kodlamalarını sağlar. Bu nedenle, glikan aracılı etkileşimleri indükleyebilen karbohidratlar, çeşitli patolojik hastalıkları tedavi etmeyi amaçlayan farmasötik terapötik ajanlar olarak hedeflenmektedir [2]. Doğal olarak izole edilmiş birçok karbohidrat başlangıçta kanser teşhis araçlarının geliştirilmesi için kullanılmıştır. Zaman içerisinde bilim insanları, Ulusal Sağlık Enstitüleri tarafından, kanser prognozunun önemli biyobelirteçleri olarak kaydedilen, tümörle ilişkili karbohidrat antijenlerini (TACA) sentezlemeye yönelmiştir. Bazı durumlarda, TACA'ların tek başına zayıf bir şekilde immünojenik olduğu, T hücrelerine bağlı bir bağışıklık tepkisini indükleyemediği ve kanser terapisi için kritik olduğu sonucuna varılmıştır[3]. Başlangıçta, bu aşılarda tepkileri umut verici olmakla birlikte, daha ileri çalışmalarla, bu protein taşıyıcılarının kendi kendine immünojenik olarak hareket ettikleri ve antijene özgü immünojeniteyi baskıladıkları görülmüştür. Sonraki süreçte TACA'lar kısmen geliştirilerek zwitteriyonik polisakkarit, prostat spesifik antijen (PS A1), Toll benzeri reseptör 2 (TLR2) ligand, Pam3CysSerK4 ve T-hücreleri peptid epitopları ile birleştirilmiştir. Bu şekilde geliştirilen aşılarından bazıları, klinik deneylerin farklı aşamalarına ulaşabilmiştir, örneğin GM2, globo H, Ley, kümelenmiş Thomsen nouveau (Tn), kümelenmiş Thomsen-Friedenreich (TF) ve glikosile edilmiş müsin1 (MUC1) antijenleri, Faz II prostat kanseri hastalarının tedavisi için kullanılmıştır [4-7]. Karbohidrat bazlı tümör antijenlerinin yanı sıra, kanser hücreleri ayrıca membran yüzeylerinde sırasıyla karbohidrat kısımlarını taşıyabilen veya bağlayabilen artan sayıda glikoz taşıyıcıları (GLUT'lar) ve lektinleri içermektedir. Kanser hücrelerinin çoğalmasında artan enerji talebi, normal hücrelerden daha yüksek oranda glikoz alımının artmasına izin veren GLUT'lar tarafından karşılanır [8]. Karbohidrat dayalı hedefli ilaç dağıtımını pek çok bilim insanı tarafından tasarlanmıştır. Karbohidratlar, glufosamid, klorambusil, busulfan, dosetaksel, paklitaksel gibi çeşitli sitotoksik maddeler ile glikokonjuge edilmiş ve ana aglikonlara göre sağlıklı hücrelerde daha az toksik oldukları bulunmuştur. Bu şeker ön ilaçlarının çeşitli hücre içi glikosidazlar tarafından parçalandığı düşünülmektedir. Karbohidrat bazlı ön ilaçların çoğu farmakokinetik özellikleri iyileştirmek için kullanılmaktadır. Bu ilaçların glikosidaz etki bölgesi tipik olarak hücre dışıdır ve aktif ilaçların salınmasına izin vermektedir. Bununla birlikte, bu ilaçların

GLUT aracılı hücre sel alımı veya GLUT inhibisyonunu doğrulamak için daha fazla araştırma gereklidir. Değiştirilmiş glikosilasyon ile N-glikanlar gibi belirli glikanların biosentezi de kanser ilerlemesi için iyi bilinen ayırt edici bir özellik olarak kabul edilmektedir. N-asetilglukosaminiltransferaz V gibi çeşitli glikosiltransferazların ekspresyonu, tümör hücrelerinde artan N-glikanlardan sorumludurlar [9-11].

Sonuç olarak, ilaç tasarımında uygun polivalent karbohidrat dizilerinin geliştirilmesi için yoğun çalışmalar sürdürülmektedir. Karbohidrat bazlı ilaç örnekleri arasında heparin bazlı antikoagülanlar, polisakkarit aşılı ve aminoglikozit antibiyotikler bulunmaktadır [12, 13].

#### **Antikoagülan: Heparin**

Heparin (veya heparin sülfat), (L-iduronat ( $\alpha$ 1-4) GlcNAc2-6disülfat ( $\alpha$ 14) ilk olarak 1935'te bir antikoagülan olarak kullanılan karbohidrat temelli bir ilaçtır. Proteoglikan heparinin etkinliği, pıhtı oluşumunu inhibe etme aktivitesi, yapısında basit bir pentasakkaritin varlığına dayanır. Diğer proteaz pıhtılaşma faktörlerini inhibe eden bir serin proteaz heparin bağlanması trombin ve Faktör Xa inaktivasyonunu hızlandırır [12, 14, 15].

#### **Antidiyabetik: Azasugarlar**

Diyabette, yemekten sonra bağırsak duvarından emilen glikoz akışının azaltılması amaçlanmaktadır. Glikoz emiliminin azaltılması, diyet karbohidratlarının glikoza dönüşümünü yavaşlatarak, diyabetik tedavide başarılı olduğunu kanıtlamış akarboza benzeyen azasugarlar gibi glikoz hidrolaz inhibitörleri ile gerçekleştirilebilir. Miglitol, maltaz ve sükrazın bir başlatıcısı olan 1-deuximmojirimisin türevidir ve diyabet tedavisinde de etkilidir [12, 15].

#### **Diüretik: Mannitol**

Mannitol, vücut tarafından metabolize edilen ve intravenöz olarak verildiğinde öncelikle böbrekler tarafından hızla atılan ve ağızdan alındığında zayıf bir şekilde emilen altı karbonlu, doğrusal, basit bir şekerdir. Mannitol; kafa içi basıncını ve beyin kütlesini azaltmak, göz içi basıncını düşürmek, akut böbrek yetmezliğini tedavisinde diürezi arttırmak ve toksik maddelerin ve metabolitlerin atılımını teşvik etmek için kullanılır [16].

#### **Anemi tedavisi: Eritropoietin**

Rekombinant glikoproteinin klasik bir örneği, eritroid progenitör hücrelerde kemik iliği baskılanmasının neden olduğu anemiyi tedavi etmek için uygulanan eritropoetindir.

Doğal olarak oluşan eritropoetin 4 sialil kompleks N-bağlı oligosakkarittir. Rekombinant eritropoetinde doğru glikolizasyon, biyolojik aktivite için gereklidir ve yanlış glikosile moleküller, tam biyolojik aktivitenin sadece %10'una sahiptir. Bunun nedeni, doğru glikosile olmayan moleküllerin hepatositler ve makrofajlarda Gal/GlcNAc/Man reseptörleri tarafından dolaşımdan ferentiasyon tropoietini hızla uzaklaştırmasıdır [17, 18].

### **Antibakteriyeller: Glikokonjugat antibiyotikler**

Hücre yüzeyindeki karbohidratların aşı geliştirme için, optimal hedefler olduğu kanıtlanmıştır. Polisakaritlerin bir taşıyıcı proteine konjugasyonu, glikan kısmına T hüresine bağlı bir bağışıklık tepkisini tetikler. Ruhsatlı glikokonjugat aşılar, meningokok, pnömokok ve *Haemophilus influenzae tip b*'nin neden olduğu menenjit önlemek için kapsüler polisakaritlerin kimyasal konjugasyonu ile üretilmektedir. Bununla birlikte, O-antijenler, ekzopolisakaritler, hücre duvarı yapısında yer alan teikoik asit gibi biyomoleküller, aşuların geliştirilmesi için önemli hedefler olarak görülmektedir. Aşılama, geniş spektrumlu antibiyotik kullanımının azaltılmasına yardımcı olabilmekte ve aşılammamış bireylere de sürü bağışıklığı ile koruma sağlayabilmektedir [19]. Günümüzde birçok antibiyotik glikokonjugattır. Bunlar, aerobik Gram (-) basillere ve *Staphylococcus aureus* ve *Enterococcus spp.* Gram (+) bakterilere karşı etkili olan streptomisin, gentamisin, tobramisin, netilmisin ve abekasin gibi aminoglikozit türevi antibiyotikleri kapsamaktadır. Antibiyotiklerde molekül glikosilasyonunun değiştirilmesi daha faydalı veya zararlı etkilere yol açabilir. Antibiyotiklerin glikosilasyonunun değiştirilmesi, ortaya çıkan antibiyotik direnci karşısında yeni ve aktif bileşiklerin geliştirilmesi için yararlı bir yöntem olarak kanıtlanmıştır. Örneğin, vankomisin glikosilasyonunun değiştirilmesi, daha önce dirençli *Enterococcus* suşlarına etkili olan bir ürün ortaya koymuştur. Everninomisinler, metisiline dirençli *Staphylococcus* ve vankomisine dirençli *Enterococcus*'u tedavi etmek için kullanılan ortosomisin ailesine ait yeni glikokonjugat antibiyotiklerdir. Bazı glikozit antibiyotikler kanser tedavisinde anti-neoplastik ajanlar olarak da kullanılır. Daunorubisin ve doksorubisin, bir O-glikosidik bağ yoluyla tetrasikline bağlanan, alışılmadık bir amino şeker olan daunosamine kovalent olarak bağlı tetrasiklin halka yapıları içerir. Daunosamin, DNA bağlanmasında önemli bir rol oynar. Daunorubisin esas olarak hematolojik neoplazilerde etkilidir. Doksorubisin ayrıca akut lösemilerde ve lenfomalarda etkilidir ancak ek olarak bir dizi katı neo-

plazmada da (örn. meme kanseri, sarkomlar, akciğer kanseri, nöroblastomlar) aktiftir. Bleomisin ve türevleri aynı zamanda anti-kanser ajanlar olarak kullanılan antibiyotiklerdir. Bleomisinler suda çözünür glikopeptidlerdir. Farklı bleomisinler alternatif terminal amin bakiyeleri taşır. Hücre döngüsünü bloke ederler ve tedavi edilmesi zor olan bazı tümörlere, örneğin Jung'un yassı epitel hücreli karsinomuna ve baş ve boyun kanserlerine karşı etkilidirler. İstenmeyen bir yan etki olarak pulmoner fibrozise neden oldukları için akciğerler için toksiktirler. Mithramycin, kanser tedavisinde kullanılan başka bir antibiyotiktir. Bununla birlikte, ciddi yan etkileri kullanımını sınırlar. Birçok antibiyotik glikokonjugattır, bu antibiyotiklerin glikosilasyonlarını değiştirmek patojenik bakteriler tarafından geliştirilen antibiyotik direncinin üstesinden gelmek için yeni antibiyotikler üretmenin bir yolu olabilir. Bazı antibiyotikler anti-proliferatif ajanlar olarak işlev görürler ve bu nedenle anti-kanser ilaçları olarak da kullanılırlar [13].

#### **Nörolojik bozuklukların tedavisinde glikokonjugatlar**

Topiramet, geleneksel anti-konvülsan ilaçlar ile birlikte kullanılır ve epilepsinin tedavisinde etkili olan d-fruktozun bir türevidir. Gama aminobutiratın (GABA) nöronlar üzerindeki inhibitör seçilmesini artırır ve  $\alpha$ -amino-3-hidroksi-metilzoksazol-4-propionik asit (AMP'A) tipi glutamat reseptörünün uyarıcı etkisini engeller. SygenTM adı verilen bir ilaç formülasyonu GM1 gangliosidine dayanır. İnme, omurilik yaralanması ve kronik nörolojik hastalıklar, örneğin Parkinson hastalığı gibi akut travmayı tedavi etmek için kullanılmakla birlikte etkinliği tam olarak bilinmemektedir [20, 21].

#### **Hyaluronan ve diğer glikozaminoglikanların elasto-viskoz özellikleri**

Hyaluronan, benzersiz fizyolojik özellikleri nedeniyle biyomedikal ve farmasötik uygulamalar için çekici bir biyomateryal olarak kapsamlı bir şekilde araştırılmıştır. Omurgalı glikosaminoglikanların bir bileşeni olan doğal olarak oluşan bir polisakkarittir ve elasto-viskoz özelliklere sahiptir. Hyaluronan, polimerin elastik ve kayganlaştırma özelliklerinin yararlı olduğu cerrahide başarıyla kullanılmıştır. Dehidrasyonu ve dolayısıyla doku hasarını önledikleri için göz cerrahisinde hyaluronik asit ürünleri kullanılmaktadır. Hyaluronan ve kolesterolit sülfat, keratan sülfat ve dermatan sülfat gibi diğer hücre dışı matris (ECM) bileşenlerinin kaybı, gözdeki osteoartrit ve maküler dejenerasyon gibi birçok kronik duruma yol açar. Bu gibi durumlarda, bileşenleri değiştirmeyi veya rejenerasyonlarını uyarmayı amaçlayan karbohidrat bazlı maddeler

kullanılabilir. Özellikle hyaluronan, normal diz eklemlerindeki sinoviyal sıvının önemli bir bileşenidir ve sinoviyal sıvıya viskoelastik özellikler sağlar. Osteoartrit eklemlerde sinoviyal sıvı, benzersiz viskoelastik ve kayganlaştırma özelliklerini kaybeder. Osteoartrit diz eklemlerine eklem içi HA enjeksiyonunun, sinoviyal sıvıya viskoelastisite ve yağlama yeteneklerini geri kazandırdığına inanılmaktadır [22].

### **Görüntüleme çalışmalarında karbohidratlar**

Radyoetiketli 2-deoksi-2-floro-d-glikoz, pozitron emisyon tomografisi (PET taraması) için bir görüntüleme maddesi olarak kullanılır ve özellikle merkezi sinir sisteminin görüntülenmesinde yararlıdır. Maddenin kötüye kullanımından kaynaklananlar da dahil olmak üzere yaralanma bölgelerinin ve nörolojik bozuklukların teşhisini ve ayrıca beyin fonksiyonlarını araştırmayı sağlamaktadır. Nöronlar tarafından alınır. Glikoz yerine, metabolize edilmez ve böylece beynin yüksek düzeyde nöronal aktivitesinin olduğu bölgelerde birikir. Primer tümörleri ve metastazlarını görüntülemek için kanserlerin oligosakaritlerine karşı yönlendirilen monoklonal antikorlar kullanılmaktadır. Potansiyel hedef çalışmaları arasında Tn epitopu ve MUC1 müsin bulunmaktadır [23, 24].

### **İlaç dağıtımında karbohidratlar**

#### ***Bağlayıcılar, dolgu maddeleri ve kaplamalar gibi polisakkaritler***

En bol bulunan doğal polimerlerden biri olan polisakkaritler, hayvanlarda, bitkilerde ve mikroorganizmalarda yaygın olarak bulunmaktadır. Oligosakaritlerden farklı olarak, polisakkaritler genellikle glikosidik bağlarla bağlanan on veya daha fazla monosakkaritten oluşur. En yaygın bulunan polisakkaritler, selüloz, hemiselüloz, pektin, nişasta, kitosan, sodyum aljinattır. Farklı kategorilerine ve kaynaklarına bağlı olarak, polisakkaritler, kendilerine benzersiz biyolojik aktiviteler ve fonksiyonel özellikler sağlayan farklı monosakkarit bileşimlerine ve glikosidik bağlara sahiptir. Örneğin, kitosanın antibakteriyel özelliklerinden yapısında bulunan amino grupları sorumludur ve sülfat grupları, sodyum aljinatın antioksidan özelliğinin ana nedenini oluşturmaktadır [25, 26].

#### ***Yeni nesil ilaç uygulama bileşikleri***

İlaç uygulama sisteminin, verimli ve kesin bir şekilde, gerekli miktarda ilacı, hedeflenen bölgeye, gerekli süre boyunca vermesi beklenir. İlaç moleküllerinin istenmeyen özelliklerinin aza indirilmesi için sürekli olarak farklı taşıyıcı malzemeler geliştirilmektedir [27]. Bunların arasında siklodekstrinler (CD), oluşum yoluyla konuk



moleküllerin fiziksel, kimyasal ve biyolojik özelliklerini değiştirme kabiliyetleri nedeniyle potansiyel adaylar olarak bulunmuştur [28]. CD'ler kimyasal olarak,  $\alpha$ -(1,4) glukosidik bağlarla bağlanmış en az 6D (+) glukopiranoz birimi içeren siklik oligosakaritlerdir. Lipofilik iç boşluklara ve hidrofilik dış yüzeylere sahip CD'ler, kovalent olmayan inklüzyon kompleksleri oluşturmak için çok çeşitli konuk moleküller ile etkileşime girebilirler. CD'ler ve bunların türevleri olan diğer sakkaritler, hidrofilik bir iç çekirdeğe sahip olan, çözünürlüğü arttıran, özellikle zayıf çözünürlüğü olan ilaçlar, yeni ilaç verme bileşikleri olarak ilacın kendisi ile kompleks oluşturmak için, büyük umut vaat etmektedir [29, 30].

### ***Biyo yapışkan maddeler***

Bir polisakkarit olan kitosan,  $\alpha$ -(1-4) bağlı 2-asetomid-2-deoksi- $\beta$ -D-glukopiranoz ve 2-amino- $\beta$ -D-glikopiranoz birimlerinden oluşur. Sadece bir mukoadhesif polimer değil, aynı zamanda mukozal epitelyumda bir emilim arttırıcı fonksiyona sahiptir. Kitosanın N-deasetillenmiş türevleri de bu amaçla kullanılmaktadır [31]. Biyo-yapışkan vezikül olarak kullanılan bir başka polisakkarit, hyaluronattır (HA). Doğal olarak oluşan bir polisakkarit olan HA, mükemmel biyouyumluluk, viskoelastisite, biyolojik olarak parçalanabilirlik ve higroskopik özellikleri nedeniyle bozulmamış haliyle eklem yağlama ve oküler tedavi için kullanılmaktadır. HA, karboksil ve hidroksil gruplarının kimyasal modifikasyonu yoluyla kolayca işlevselleştirilebilir. Son zamanlarda, HA'nın çeşitli biyolojik işlevleri ve HA ile biyolojik dokular arasındaki etkileşimin avantajlarından yararlanılarak bir dizi özelleştirilmiş uygulamalar üzerinde yoğunlaşmıştır. HA, vücuttaki HA reseptörlerine hedef spesifikliğı olan ilaçların kan dolaşım süresini arttırmak ve doku mühendisliğinde hidrojel iskeleleri hazırlamak için kullanılmaktadır [32]. Erken aşamada, HA insan göbek kordonundan ve horoz taraklarından izole edilmiştir. [33, 34]. HA, büyük ölçekli bir mikrobiyal fermentasyon süreci yoluyla verimli bir şekilde üretilebildiğinden , çeşitli biyomedikal alanlara kapsamlı bir şekilde uygulanmaktadır [35]. HA, göz cerrahisi sırasında vitreus takviyesi ve osteoartritik eklemlerin sinovyal sıvısına bir takviye olarak kullanılmaktadır Çeşitli terapötik uygulamalar için tıbbi ihtiyaçlara göre, HA türevleri, hidrojjeller, nanopartiküller, ilaç konjugatları ve benzerleri dahil olmak üzere farklı platformlar oluşturmak için geliştirilmiştir. HA'nın kimyasal olarak modifikasyonu ile polimerler, mikroküreler, süngerler, filmler gibi çeşitli formlarda mevcuttur. Günümüzde bu polimerlerin klinik etkinliğini göstermek için, (osteoporozu önlemek amacıyla

menopoz sonrası kadınlarda kalsitoninin vajinal yolla uygulanmasında olduğu gibi) tedavi edici ajanlar olarak kullanılmasına yönelik çalışmalar devam etmektedir [32].

### ***Epitelyal hücre zarlarında taşıma***

Vesikül aracılı transselüler taşıma veya basitçe "transitoz", lipoproteinler, antikorlar ve albümin gibi makromolekülleri polarize bir hücrenin bir yüzeyinden diğerine taşımak için kullanılan hücresel bir taşıma sistemidir. Bu mekanizma, alım, sitozol yoluyla difüzyon ve salım yoluyla meydana gelen anyonlar, katyonlar ve amino asitler gibi küçük moleküllerin geçişine zıttır ve ayrıca hücreler arasındaki paraselüler sızıntıdan farklıdır. Daha da önemlisi, transsitoz, makro molekülleri çok hücreli bir organizma içindeki komşu ancak benzersiz iki mikro ortam arasında seçici olarak hareket ettirmek için bir süreç olarak gelişmiştir. Lipoproteinlerin dolaşım sisteminden dokulara hareketi ve immünoglobulinlerin mukozal yüzeylere taşınması örnek olarak verilebilir. Taşınmanın endotelyal veya epitelyal hücreler tarafından gerçekleştirilip gerçekleştirilmediğine bakılmaksızın, transitoz genellikle bir ligandın bir endositik vezikül içine reseptör aracılı alımını, taşıyıcının sitoplazma içinden düzenlenmiş geçişini ve bir ekzositik olay yoluyla yükün salınmasını içerir. İlaç emiliminde çok yaygın problemler arasında, birçok ilacın makromolekül olması, zayıf lipid ve ya kolayca bozunmaları sayılabilir. Bu yönler, onların hücre zarları gibi biyolojik bariyerler üzerinden taşınmasında sorun yaratır. Altın-karbohidrat kompleksler, hücre membran stabilizasyonu arttırıcı etkilerinden dolayı artrit tedavisinde kullanılmaktadırlar [36].

### ***Lipozom hedefleme ve ilaç uygulamalarında lektinler***

İlaçların, genellikle oral veya nazal yollarıyla başarılı bir şekilde uygulama girişimlerinde birçok yaygın sorunla karşılaşmaktadır. En temel olanlardan biri, ilaç emilimi için mevcut zamanın çok kısa olabileceğidir. Bu gibi durumlarda, ilaç emilmeden önce bozulabilmekte veya mekanik olarak uzaklaştırılmaktadır. İlacın, hedef hücrenin membranına yapışan bir taşıyıcı moleküle bağlandığı geliştirilmiş biyo-yapışkan ilaç dağıtımını mümkün kılan bir yaklaşım sunabilir. Lektinler, hücre yüzeyinde bulunan glikokonjugatların tanınması yoluyla spesifik olarak bağırsak veya nazal mukoza hücrelerine bağlanmaktadır. Bu yapışma, ilacın plazma membranını başarılı bir şekilde geçmesine izin verebilmektedir. İlaç dağıtımını iyileştirmenin başarılı bir yolu ilacı bir lipozom içine dahil etmektir. Lipozomlar, bir lipid çift tabakasını (tek tabakalı lipozomlar) veya sulu bir boşluğu çevreleyen birkaç eş merkezli lipid çift tabakasını (çok tabakalı

lipozomlar) içerir. Hem hidrofobik hem de hidrofilik ilaçların verilmesi için kullanılabilirler. Lektine yönelik ilaç dağıtımı, lipozomların kullanımı ile de ittifak edilebilir. Bu durumda, lektin, bir proteo-lipozom üretmek için doğrudan lipozomun yüzeyine konjüğe edilir. Bu, lektinlerin bağırsak veya burun mukozası gibi hedef hücrelerin sakkaritlerine spesifik bağlanma özelliğini kullanır [37]. Lektin-sakkarit etkileşimi, lipozomun plazma zarına bağlanmasını kolaylaştırır. Deneysel olarak, lektinler lipozomları tavuk kriyositleri, fare dalak hücreleri, HeLa hücreleri, fare fibroblastları ve bakteri hücreleri gibi bir dizi farklı hücre tipine hedeflemek için başarıyla kullanılmıştır. Lektinlerin bir başka uygulaması, ilaçları, hastalıklardan sorumlu bakterilerin yüzeyine yönlendirmektir. Gram (+) bakterilerin hücre duvarları peptidoglikanlar açısından, Gram (-) bakterilerin ise lipopolisakkaritler açısından zengindir. Bu hücre yüzeyi glikokonjugatları, lektinler için potansiyel bağlanma bölgeleridir ve bu nedenle hedefli bir ilaç dağıtımı olabilmektedirler. Lektinler çeşitli şekillerde ilaç tedavisi için yararlı olabilir. Biyo-yapışkanlar olarak bakteri hücre yüzeyi glikanlarını hedeflemek için proteolizozomlarda kullanılabilirler [37, 38].

#### **Antienflamatuar tedaviler**

Karbohidrat bazlı veya modifiye edilmiş terapötikler, enflamatuar hastalıklar ve anti-trombotik tedavilerden yara iyileşmesine kadar değişen kardiyovasküler ve hematolojik tedavilerde yaygın olarak kullanılmaktadır. Karbohidrat bazlı terapötikler, polisakkarit ve oligosakarit anti-enflamatuarları, doğal ve sentetik kaynaklardan elde edilenler ile yapı-fonksiyonel ilişkilere göre tasarlanmış olan antikoagülan ve anti-trombotik ajanları içerir. Bu bileşiklerin bazıları, yapışma önleyici, anti-HIV ve artritlik aktiviteler gösteren çoklu biyolojik etkilere sahiptir. Kompleman inhibitörlerinin küçük molekülleri, türevleri veya mimetikleri, iskemi/reperfüzyon yaralanmalarının sınırlandırılmasında kullanılmak üzere detaylandırılmıştır. Hem doğal hem de sentetik monosakkaritler, in vivo anti-enflamatuar ve kardiyoprotektif özellikleri açısından araştırılmıştır. Doğal ürünlerin glikosilasyonu ile modifikasyon veya glikosilasyonu taklit eden modifikasyon, plazma yarı ömrünün artması ve istenen fonksiyonların iyileştirilmesi veya artırılması dahil olmak üzere ana molekül üzerinde önemli bir etkiye sahiptir [39].

#### ***Selektin-ligand etkileşiminin engellenmesi***

Kanser metastazı, uzak dokulardaki kanser hücreleri ve endotel hücreleri arasındaki hücre-hücre etkileşimleriyle kolaylaştırılır. Ek olarak, trombositler ve lökositlerle kanser

hücreleri etkileşimleri, kanser hücreleri yapışmasına, ekstrasvazasyona ve metastatik lezyonların oluşumuna katkıda bulunmaktadır. Selektinler, sialillenmiş, fukosile glikan yapılarına bağlanan ve endotel hücrelerinde, trombositlerde ve lökositlerde bulunan karbohidrat bağlayıcı moleküllerdir. Aktive trombositler ve endotel hücreleri üzerinde eksprese edilen P-selektin, lökositler üzerinde bulunan L-selektin ve aktive edilmiş endotel hücrelerinde eksprese edilen E-selektin olmak üzere selektin ailesinin üç üyesi vardır. Enflamasyon, immün yanıt ve hemostaz gibi fizyolojik süreçlerde selektinlerin kabul edilen rollerinin yanı sıra, selektinlerin kanser metastazı da dahil olmak üzere bir dizi patofizyolojik sürece katkıda bulunma potansiyeline ilişkin kanıtlar bulunmaktadır. Selektinlerle kanser hücreleri etkileşimleri, karbohidrat belirleyicilerinin çeşitli kanser türlerinden tümör hücrelerinin hücre yüzeyindeki selektin ligandlarının mevcudiyeti nedeniyle mümkündür. Kanser hücreleri tarafından selektin ligand ekspresyonunun derecesi, kanser hastaları için metastaz ve kötü prognoz ile ilişkilidir. Selektinlerle kolaylaştırılan kanser hücrelerinin ilk adhezyon olayları, integrinlerin aktivasyonu, kemokinlerin salımı ile sonuçlanır ve bu durum muhtemelen metastatik mikro ortamın oluşumu ile ilişkilidir. E-selektin, metastaz sırasında başlayan adhezyon olaylarından biri olarak değerlendirilirken, P-selektin ve L-selektin aracılı etkileşimlerin de bu sürece önemli ölçüde katkıda bulunduğu bilinmektedir [40]. Lökosit alımına ve enflamatuvar yanıtta dahil olan her üç selektin (E-, P- ve L-selektin) ligand olarak tanınmaktadır ve bu nedenle inhibitör sakkaritler selektin aracılı etkileşim için umut verici görünmektedir. sLe<sup>x</sup> türevleri, enflamatuvar yanıtın potansiyel inhibitörleri olarak test edilmiş ve düşük konsantrasyonlarda bile hem akut hem de kronik inflamasyonun hayvan modellerinde umut verici sonuçlar vermiştir. En iyi bilinenlerden biri Cylexin'dir (CYL). CYL, bir P-selektin ve E-selektin ligandı olan sLe<sup>x</sup> oligosakaridinin sentetik bir analogudur. CYL, P-selektin için benzer afiniteyi paylaşarak, miyokardiyal reperfüzyon hasarı ve travmatik şokta nötrofillerin endotele yapışmasını engelleyebilmektedir. Hiperakut reddi, önceden duyarlı hale getirilmiş allogreft ve ksenograftlarda ana sorundur. Endotel hücreleri, hiperakut reddinde ana hedeftir [41, 42]. Bu nedenle CYL, klinik çalışmalarda hayal kırıklığı yaratan sonuçlar vermiştir ve kullanımı durdurulmuştur.

#### ***sLe<sup>x</sup> gliko-mimetikleri***

Gliko-mimetikler, bir sakkarit yapısının minimum fonksiyonel alanına dayanan küçük moleküllerdir. Gliko-mimetikler, potansiyel olarak, doğal olarak oluşan glikan üzerinde

gelişmiş stabiliteye veya serum yarılanma ömrüne sahiptir. E-selektin için doğal olarak oluşan oligosakkaritten daha yüksek afiniteye sahip bir gliko-mimetik geliştirilmiştir. Diğer sakaritlerin gliko-mimetikleri geliştirilme aşamasındadır ve çeşitli hastalıkların tedavisinde faydalı olacağı düşünülmektedir. sLe<sup>x</sup> ve sLe<sup>a</sup> gibi biyolojik olarak önemli oligosakaritlerin aktif özelliklerini işlevsel olarak taklit etmeye hizmet eden kimyasal ve fizyolojik olarak stabil glikomimikler veya glikoepitoplar formunda bir dizi bileşik sağlar. Bu yapısal Glikomimetiklerin, akut ve kronik hastalıkların tedavisinde ve ayrıca astım tedavisinde faydalı olduğu gösterilmiştir. Bu bileşiklerden ayrıca enflamasyon, kanser, diyabet, obezite, akciğer vaskülit, kalp ve reperfüzyonhasarı, tromboz, doku reddi, artrit, enflamatuar bağırsak hastalığı ve pulmoner enflamasyon gibi selektin aracılı diğer bozuklukların tedavisinde de faydalanılmaktadır [43].

#### ***Glikosiltransferazların downregülasyonu***

Kronik enflamatuar bozuklukların tedavisine alternatif bir yaklaşım, Fuc-TVII glikosiltransferaz gibi sLe<sup>x</sup> sentezinde yer alan glikosiltransferaz enzimlerinin üretimini aşağı regüle etmektir.

#### ***Mannoz-6-fosfat***

Mannoz-6-fosfat; artrit, sedef hastalığı, diyabet ve multipl skleroz tedavisi için bir anti-enflamatuar ajan olarak umut vermektedir. Lökositlerin vasküler baz membranlardan geçişini sağlayan ve bu nedenle enflamatuar durumların alevlenmesinde rol oynayan bozunur lizozom enzimlerini (örn. Heparanaz) inhibe ettiği düşünülmektedir. Bu enzimler, mannoz-6-fosfat reseptörü yoluyla bazal membrana yapışabilmektedir ve bu nedenle çözünür mannoz-6-fosfat ile yer değiştirebilirler.

#### ***Bir anti-enflamatuar ajan olarak (β1-4)-D-Mannan***

(β1-4)-D-Mannan, *Aloe vera* bitkisinden izole edilmiştir. Makrofaj mannan reseptörünün aktivasyonu yoluyla immün sistemi uyarıcı özelliklere sahiptir. Yara iyileşmesini teşvik etmek, ülseratif kolit ve enflamatuar bağırsak hastalığı gibi enflamatuar durumları tedavi etmek için kullanılır [43]. Canlı sistemler ve tıpta karbohidratların önemi konusundaki farkındalık, biyolojik ve farmakolojik uygunluklar ile artmaktadır [39]. Karbohidrat bazlı bazı terapotikler ve kullanım alanları Tablo 1'de özetlenmiştir.

**Tablo 1** Karbohidrat bazlı terapötikler ve kullanım alanları

<b>Kullanım Alanı</b>	<b>Bazı Karbohidrat Bazlı Terapötikler</b>
Antikoagülan	Heparin
Antidiyabetik	Miglitol
Diüretik	Mannitol
Anemi tedavisi	Eritropoietin
Antibakteriyel	Streptomisin, Gentamisin, Tobramisin, Netilmisin, Abekasin, Everninomisin, Daunorubisin, Doksorubisin, Bleomisin, Mithramycin
Anti-neoplastik	Daunorubisin, Doksorubisin, Bleomisin, Mithramycin, Etoposid, Siklofosamid, İzofosfotamid
Antienflamatuar	( $\beta$ 1-4)-D-Mannan, Mannoz-6-fosfat, sLe <sup>x</sup> inhibitörleri
Nörolojik Hastalıklar	Topiramet
Görüntüleme Ajanı	2-deoksi-2-floro-d-glikoz (Tn epitopu ve MUC1 adaylar molekülleridir)
Artrit	Hyaluronan, n-glukozamin, kondroitin sülfat

### **Mikrobiyal, viral ve paraziter enfeksiyon inhibitörleri**

Birçok bakteri ve virüs; hücre bağlanması, kolonizasyon veya istilaya aracılık etmek için sakkarit-reseptör etkileşimlerini kullanır. İstila ettikleri organların hücre yüzeyinde bulunan oligosakkarit yapılarını tanıyan, adhezinler adı verilen lektin benzeri moleküller üretirler. Birçok parazit tarafından da enfeksiyona lektin-sakkarit etkileşimleri aracılık eder [12]. Adhezinler tarafından tanınan ligandlarla özdeş veya benzer yapıdaki çözünebilir oligosakkaritler kullanılarak rekabetçi inhibisyon ile bakteriyel bağlanmanın engellenmesi mümkündür. Bununla birlikte, büyük miktarlarda glikokonjugatların izole edilmesinin zor olduğu kanıtlanmıştır. Yapışma önleyici farmasötik ajanları test etmek amacıyla çok büyük miktarlarda ilgili oligosakkaritlerin sentezini kolaylaştırmak için glikosiltransferazların bakteriyel hücrelerin içine klonlanması gelecek vaad eden bir tekniktir. Bir oligosakkaritin genellikle bu durumda etkinliğini arttırdığından oligodendromerlerin gelişimine çok ilgi duyulmaktadır [13, 44].

Viral proteinler üzerindeki glikanların en kritik işlevlerinden biri konağın bağışıklık sisteminin manipülasyonudur. Patojen adaptasyonu dinamik bir süreçtir ve yanıt olarak glikosilasyondaki değişiklikleri içerir. İlginç bir şekilde, yeni glikosilasyon bölgelerinin

eklenmesi, sadece uyumu iyileştirmekle kalmayacak, aynı zamanda dengeleyici bir mekanizma olarak giriş reseptörüne olan bağlanmayı modüle edecektir [45]. Viral fonksiyon için gerekli bölgeye özgü glikanlar sıklıkla korunur. Bu nedenle, hızlı mutasyon geçiren virüsler arasında korunmuş glikosilasyon şablonlarının tanımlanması, etkili aşuların geliştirilmesi için yüksek önceliğe sahiptir. Örneğin, influenza suşu H5'in kök bölgesindeki korunmuş glikozitlerin tanımlanmasıyla yeni aşı adayları oluşturulmuştur. Bazı korunmuş glikozitlerin mutasyonu, homolog, heterolog ve heterosubtipik virüslerin nötralizasyonunun artması ve B hücresi yanıtı ile sonuçlanan bir aşının geliştirilmesi mümkün olmuştur [46]. İmmünojenler üzerindeki glikan yoğunluğunu modüle etmek, aşı tasarımında kullanılan yaklaşımlardan biri olmuştur [47, 48]. N-glikan sayısının artışı, hepatit virüs küçük yüzey antijeninin immünojenitesini arttırmıştır [49]. Buna karşılık, HIV-1 zarflı glikoprotein trimer üzerindeki N'ye bağlı çoklu glikosilasyon alanlarının silinmesi, deneysel kanıtların önemini vurgulayarak glikan korumasının genel bütünlüğünü sağlamıştır [47].

Glikana bağımlı epitoplara tanıyan HIV-1'e karşı geniş ölçüde nötralize edici bir dizi antikör izole edilmiştir [50]. Sonuç olarak, bu tür antikörlerin indüksiyonu için sentetik karbohidrat antijenleri araştırılmıştır. Ne yazık ki, bu aşılama stratejileri gp120'ye karşı zayıf reaktiviteye yol açmış ve nötralizasyon sağlamamıştır [51, 52]. HIV envelo-1 zarf glikoproteininin doğal glikosilasyonu hakkında önemli kanıtlar olmasına rağmen az sayıda çalışma doğal trimerler ile aşılama odaklanmıştır [53, 54].

### ***Grip insan influenza virüsü***

İnsan influenza virüs A ve B, lipozomlar ve neoglikoproteinler dahil çok değerlikli siallenmiş glikokonjugatlar, insan solunum yollarının epiteline bağlanmalarını sağlayan Sia ( $\alpha$ 2-6) Gal bağlayıcı hemagglutininler üretir.

Epitel doku hücrelerine viral bağlanmayı bloke edebilen polimerler, lipozomlar ve neoglikoproteinler dahil çok değerlikli sialile glikokonjugatlar geliştirilmiştir. Diğer benzer enfeksiyon işlemlerine uygulanabilecek bir yaklaşım, büyük ölçüde hidrofobik, karbohidrat olmayan yapılara ek olarak sialik asit kalıntıları ile süslenmiş polimer kütüphanelerinin üretilmesidir. Bunların, influenza virüsü bağlanmasını bloke etmede etkinlik açısından taranmış olması, virüsün bağlanma bölgesi ile ilgili olarak sialik asitlerin ve karbohidrat olmayan bileşenlerin düzenlenmesi nedeniyle, son derece etkili olduğu görülmüştür. Sialidaz inhibitörleri, viral replikasyonu önlediği ve enfeksiyonun

şiddetini/süresini azalttığı için influenza virüsü enfeksiyonuna karşı terapötik araçlardır. İnhalasyon maddesi olarak uygulanan sialik asit analogu Relenza™ (Glaxo SmithKline tarafından üretilir), sialidaz ve bağlanma yoluyla tanınır, influenzayı inaktive eder [12, 55].

### ***Helicobacter pylori enfeksiyonu***

*Helicobacter pylori* enfeksiyonu, kronik gastrit ve mide ülseri ile ilişkilidir. Bağlanma, *H. pylori* bakteriyel adezinin tanındığı gastrointestinal sistemin epitel hücreleri üzerindeki Lewis b (Le<sup>b</sup>) antijeni aracılığıyla gerçekleşir. Çeşitli serbest şekerler ve sialilasyon ve fukosilasyon glikokonjugatları bakımından zengin olan anne sütü, bebeklerin enfeksiyondan korunmasında rol oynayabilir. *H. pylori* enfeksiyonunun önlenmesi ve tedavisi için karbohidrat bazlı profilaktikler geliştirme fikri bir olasılıktır, ancak klinik araştırmalar ikna edici faydalı sonuçlar verememiştir. Geçmişte, sadece bir insan patojeni olduğu ve hiçbir hayvan modeli bulunmadığı için *H. pylori* enfeksiyonunu incelemek zor olmuştur. Son zamanlarda, mide epitelinde insan Lewis α<sub>1</sub>, 3/4 Fuc-T'yi eksprese eden transgenik fareler üretilmiştir. *H.pylori*, bu hayvanların mukozasına Le<sup>b</sup> bağımlı bir şekilde bağlanır. Normal ve transgenik farelerin midesinden izole edilen *H. pylori* organizmalarının sayısı eşdeğerdir. Transgenik hayvanlarda *H. pylori* hem mukusta hem de mukozal hücrelerin yüzeyi ile ilişkili gastrik çukurda bulunmuştur ancak normal farelerde *H. pylori* sadece mukusla ilişkilendirilmiştir [12, 13, 55]. Bakterilerin hücresel bağlanması, *H. pylori* hücre yüzeyi Le<sup>b</sup> yapılarına karşı yönlendirilmiş antikörlerin üretilmesi de dahil olmak üzere bir bağışıklık sisteminin aktivasyonu ile sonuçlanmıştır.

### ***İnsan immün yetmezlik virüsü-1 (HIV) enfeksiyonu***

İnsan immün yetmezlik virüsü-1 (HIV-1) çoğu hücrede CD4'ü tanımaktadır. Ek olarak, bazı CD4 negatif hücreler, örneğin nöronlar ve kolon epithelyum üzerinde bir sakkarit ligandını işaret etmektedir. Deneysel bir sistemde, bu sakkaridin yapı analogları, HIV enfeksiyonunu bloke edebilmektedir. Bunun, HIV enfeksiyonunun önlenmesi veya kontrol edilmesi için yeni yaklaşımların geliştirilmesinde gelecekteki araştırma çabaları için umut verici bir alan olacağı düşünülmektedir [56].

### ***Antiviral ajanlar olarak imino şeker türevleri***

İmino şekerler N-butildeoksinojirimisin (NB-DNJ) ve N-nonil-denxynojirimisin (DNJ), bazı proteinlerin yanlış katlanmasına ve endoplazmik retikulum içinde tutulmasına neden



olur. Bu ajanlar, sıgır viral ishal virüsü ve hepatit B virüsü de dahil olmak üzere çeşitli virüslere karşı antiviral bir etkiye sahiptir. Antiviral etkinin glikosilasyondaki dağılımdan kaynaklanıp kaynaklanmadığı konusunda tartışmalar vardır. Örneğin, hepatit B virüsü (HBV), enfeksiyöz virüs oluşumu için gerekli olan üç adet N-glikosile edilmiş yüzey proteini içerir. NB-DNJ'nin, kronik HBV enfeksiyonu olan bir dağ sıçanı modelinde antiviral aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir [57].

### ***Bakteriyel toksinler***

Bakteriyel toksinlerin sakkarit tanıma yoluyla gastrointestinal epitelyuma bağlanması, kolera gibi hastalıkların ciddi semptomlarının temelini oluşturur. Karbohidrat bileşikleri, salgılanan toksinleri uzaklaştırmak için geliştirilme aşamasındadır ve antibiyotik tedavisi ile birlikte kullanılmak üzere tasarlanmıştır. Antibiyotiklerle tedaviden sonra bakteri ölümü, normalde karbohidrat ilacına bağlanmasıyla zararsız hale getirilebilen bakteri toksinlerinin önemli ölçüde salınmasına neden olur. Bu, binlerce sentetik oligosakkaritten oluşan bir ürün kullanılarak hemolitik üremik sendromun tedavisinde uygulanmıştır. Toksinler taşıyıcı üzerinde mevcut olan oligosakkaritleri bağlar ve taşıyıcı matris, ürünün bağırsağa güvenli bir şekilde geçmesini, gastrointestinal sistemde tutulmasını ve enfeksiyon bölgesinde yüksek konsantrasyonlarda oligosakkaritlerin birikmesini sağlar. Benzer bir yaklaşım, bağırsak mikroflorası antibiyotik tedavisinden sonra değiştiğinde ortaya çıkan *Clostridium difficile* ilişkili ishalin tedavisine de uygulanmıştır. Karmaşık bir oligosakkaritin üç boyutlu yapısını inceleyen karbohidrat grupları taşıyan organik bir moleküler çekirdek olan bir 'karbohidrat' geliştirilmiştir. Aktif karbohidrat grupları kimyasal olarak bir taşıyıcıya bağlanmış ve böylece bakteriyel toksinlerin sakkarit tanıyan reseptörlerini bağlayarak, nötralize etmiştir. Ürün, doğal oligosakkarit ile uyumlu olarak benzerlik göstermiş ancak enzimatik hidrolize karşı daha iyi bir dirence sahip olmuştur. Böylece daha uzun bir yarı ömür ve daha iyi bir etki sağlamıştır [12, 13].

### ***Bakteriyel enfeksiyonlar***

Bakteriyel enfeksiyonlara karşı oligo ve polisakkarit aşılar, hastalığa neden olan mikroorganizmalara karşı bağışıklığı uyarmada büyük potansiyele sahiptir. Bazıları uzun zamandan bu yana başarıyla kullanılmaktadır. Bunlar *Neisseria meningitidis*, *Salmonella typhi* ve *Streptococcus pneumoniae*'ye karşı aşıları içermektedir. Daha fazla antibiyotiğe dirençli bakteri suşunun giderek artan ve endişe verici şekilde ortaya çıkmasıyla birlikte bu yaklaşım gelecekte büyük klinik öneme sahip olacaktır. Karbohidrat bazlı aşılar

genellikle çok küçük çocuklarda ve bağışıklığı zayıflamış hastalarda etkisizdir. Bu durum, glikanın bir immünojenik polipeptit taşıyıcısına konjüge edilmesiyle aşılabilir. Bu tip yaklaşımın başarılı uygulamaları *Haemophilus influenzae* tip b (Hib) ve *Streptococci pneumoniae*'ya karşı bir aşı geliştirilmesini içerir. *Shigella* enfeksiyonuyla (dizanteriye neden olan) mücadele etmek için tamamen sentetik bir glikan-peptit aşısı geliştirilmiştir [12, 13, 55].

### ***Ameliyat sonrası enfeksiyonlar***

$\beta$ -glikan reseptörünü nötrofiller üzerine hedefleyerek bağışıklık sistemini uyaran karmaşık bir karbohidrat ürünü, kolorektal cerrahi hastalarında test edilmiş ve umut verici sonuçlar ile cerrahi sonrası enfeksiyonu önlemeye yeni bir yaklaşım oluşturmuştur.

### ***Anti-fungal ajanlar***

Karbohidratlar, fungusların hücre çeperi yapısında yer alırlar. *Candida* ve *C. neoformans* yüzey polisakkaritlerinin, aşağı akış immün yanıtlarını belirleyen PAMP-patojen tanıma reseptörü (PRR) etkileşimlerinde rol oynadıkları tespit edilmiştir [58]. Buna göre, *Candida* hücre duvarı ve *C. neoformans* kapsül türevi polisakkaritler, ilgili hastalıklara karşı olası aşı hedefleri olarak test edilmiştir. Bakteriyel polisakkarit aşılarının geçmişinden iyi bilindiği gibi, düz poliyor oligosakkaritler T hücresinden bağımsız antijenlerdir ve bebeklerde az olması, varsa immünojenliği, immünolojik hafızayı indükleyememe ve yüksek afiniteli antikorlar gibi ciddi dezavantajlardan yoksundur. Ayrıca tüm yaş sınıflarında uygulanabilirliğini sınırlar. Bu sınırlamalar, yüksek afiniteli antikor üreten plazma hücrelerinde ve bellek B hücrelerinde farklılaşmaları için polisakkaride özgü B hücrelerine T hücresi yardımını tetiklemek için gereken T hücresi epitoplarnı sağlayabilen protein taşıyıcılarına konjugasyon yoluyla çözülmüştür [59]. Buna göre, immünojenisiterini incelemek için birkaç fungal karbohidrat antijeni, seçilmiş protein taşıyıcılarına konjüge edilmiştir. Ayrıca sakkarit tabakasını bozarak ve sporların gelişmesini engelleyerek *Aspergillus*'u hedef almak için tasarlanmış mantar önleyici bir terapi geliştirilmiştir.

### **Kanser tanı ve tedavisinde glikanlar**

Kanser erken teşhisi, risk tahmini ve tedavisi için yeni yaklaşımlara acilen ihtiyaç duyulmaktadır ve glikanlar, yeni invaziv olmayan biyobelirteçlerin gelişimi için umut vaat etmektedirler. Kanser tanısı ve malign ilerlemenin izlenmesi için klinik olarak en sık kullanılan serolojik markörlerin yanı sıra hastalık nüksünün prognostik biyomarkörlerden

bazıları glikoproteindir [60, 61]. Kanser türlerinin teşhisinde mevcut biyobelirteçler Tablo 2’de gösterilmiştir. Bu serolojik biyomarkörlerin hepsinin kanserde anormal bir glikosilasyona sahip oldukları gösterilmiş olsa da tarama stratejileri ve teşhis potansiyeli için kullanımlarını ortadan kaldırarak, düşük özgülükleri nedeniyle sınırlı uygulamaya sahiptirler. Kanserın erken tespiti için bu testlerin özgülüğünün ve duyarlılığının azalması, kanserin erken tespiti için daha yüksek spesifikliğı sahip bir biyomarkörün kurulmasına katkıda bulunabilecek belirli bir proteinin spesifik glikoformlarının saptanmasına ve ölçülmesine dayanan yeni biyobelirteçlerin araştırılmasına neden olmuştur. Bu konuda dikkat çekici örnek, karaciğer hastalıklarının tespiti için kullanılan bir gliko-biyomarkör olan hikâyesidir. AFP, (HCC)' un teşhisi için geniş ölçüde onaylanmış bir proteindir. Bununla birlikte serum AFP seviyeleri HCC ve iyi huylu karaciğer hastalıkları arasında ayırım yapılmasına izin vermez [62]. Bu nedenle, HCC hastalarında kronik karaciğer hastalıklarına kıyasla fukosilasyon indeksinde oldukça anlamlı bir artış gösteren glikosile edilmiş bir AFP formuna (AFP-L3 fraksiyonu) dayanan ek bir tümör markörü önerilmiştir. Fukozillenmiş AFP-L3 fraksiyonu, HCC'nin başlamasından hemen önce, karaciğerde siroz aşamasında, serumda görülen HCC'nin erken saptanması için bir işaretleyici olarak FDA tarafından onaylanmıştır, bu nedenle HCC olan hastalarda en iyi onaylanmış işaretleyici olarak kabul edilir [62].

GP73, kininogen ve haptoglobin gibi diğer karaciğer salgılanan proteinlerin, HCC'nin ve hastalık ilerlemesinin erken tespiti için ümit verici biyobelirteçler olarak işlev gören fukosil olduğu gösterilmiştir. Yeni teknolojilerin ve glikan analizi için yeni yöntemlerin ortaya çıkmasıyla, kanserle ilişkili birçok anormal glikan örneğı keşfedilmiştir [63]. Yüksek verimli kütle spektrometrisi yaklaşımları ile kombine edilen memeli hücre hatlarında son zamanlarda kesin ve stabil glikojen düzenlemesinin uygulanması, yeni biyolojik bilgileri açıklayan ve varsayılan hastalık biyomarkörleri üreten kanser hücrelerinin O-glikoproteomunun karakterizasyonuna katkıda bulunmuştur. Buna ek olarak, yeni geliştirilen yüksek verimli platform teknolojileri ayrıca büyük örnek gruplarının verimli bir şekilde analiz edilmesini sağlamıştır [63].

Son zamanlarda, mide kanseri olan hastalardan alınan serumda CD44 dolaşımında STn antijeni bulunmuştur [64]. Ek olarak, STn, bağırsak metaplazisi ve gastrik karsinomu olan hastalardan alınan serumdaki plazminojende bulunmuştur. Ek çalışmalar PSA'da prostat kanseri için spesifik benign prostat hiperplazisinden ayırt edebilen spesifik bir

biyobelirteç olarak glikosilasyonun (hem fukosilasyon hem de sialilasyon) değiştiğini göstermiştir [65]. Bu nedenle, glikanların protein omurgası ile kombinasyon halinde hedeflenmesinin, klinik uygulamalar için yeterli hassasiyet ve özgüllük ile daha büyük teşhis ve prognostik performans sağlayacağı muhtemeldir.

Ek olarak, bazı glikokonjugatlarda zenginleştirilmiş dolaşımdaki ekzomomlar, kanserin erken tespiti için büyük bir potansiyele sahiptir. Bu, dolaşımdaki pankreatik kanser ekzomomlarını tanımladığı ve bu kanserin erken saptanmasına izin verdiği gösterilen proteoglikan glifikan1 (GPC1) örneğidir.

**Tablo 2** Kanser türü ve biyobelirteçler

Kanser Türü	Biyobelirteçler
Prostat	Prostat spesifik antijen (PSA)
Yumurtalık	Karsinom antijeni-125 (CA125), Musin-16 (MUC16)
Kolon	SLe <sup>a</sup> , CA19-9, Karsinoembriyonik antijen (CEA), Epidermal Büyüme Faktörü (EGFR)
Meme	MUC1 (CA15-3) ER / PR (östrojen reseptörü / progesteron reseptörü) HER-2 / neu
Mide	SLe <sup>a</sup> , CA19-9, CD44, STn, HER-2 / neu
Pankreas	SLe <sup>a</sup> , CA19-9
Hepatosellüler karsinom	$\alpha$ -fetoprotein (AFP), Fukosil
Gastrik karsinom	STn
Akciğer	EGFR, KRAS, EML4/ALK

### ***Kemoterapi ilaçları***

Doksorubisin, etoposid ve bleomisin gibi birçok kemoterapi ilacı gliko-konjügattır. Bazıları antibiyotiktir. Glikosilasyonun manipüle edilmesi, bu bileşiklerin daha etkili formlarını geliştirme potansiyeli ile ilişkilidir. Bu durum, ana bileşiğe dirençli tümörlere karşı etkili olan hem yarı sentetik doksorubisin analogları olan epirubisin ve MEN 10755 için geçerlidir.

Doğal olarak oluşan kemoterapötik ajanların glikosilasyonunun değiştirilmesi, örneğin toksisitelerini veya yan etkilerini azaltarak diğer özellikleri de etkileyebilir. Siklofosamid ve izofosfotamid gibi sitotoksik alkilleyici ajanlara dayanan glikosile edilmiş ön-ilaçlar, ya asit hidroliz ya da enzimatik labil glisidik bağlı in-vivo aktif ilaçlara

dönüştürülür. Glikozidik bağlantılar, kemoterapi ilaçlarının glikosilasyonunun değiştirilmesi etkilerini artırabilir.

### ***Anti-kanser aşuları***

Kanser hücreleri glikosilasyon bozulduğundan kaynaklanan, normalde sağlıklı yetişkin hücrelerde bulunmayan boyutta oligosakkarit zincirlerine sahiptirler. Bu nedenle, kansere bağlı glikotoplara karşı yönlendirilmiş anti-kanser aşuları geliştirme çabaları mevcuttur. Polisakkarit aşuların, özellikle modern konjuge aşuların, bazı hastalıkları önlemede çok etkili olduğu kanıtlanmıştır. Glikosfingolipidler, Tn epitopu (GalNAc-OSer / Thr), sialil Tn ve müsinle ilişkili oligosakkaritler, örneğin MUC1 gibi kesilmiş glikanlar, bu tip müsin yaklaşımı için özellikle güçlü adaylardır. Normal hücrelerden yoksun, ancak birçok kanser (kolon ve meme kanseri) tarafından üretilen bir sakkarit yapısı olan sialil Tn'den oluşan bir aşı, protein taşıyıcı anahtar deliği deniz salyongozu haemosiyanin ile kovalent olarak bağlandı ve meme, pankreas ve kolon kanseri çalışmalarında umut verici sonuçlar verdi. "Theratope" adı altında GMK adı verilen bir aşı, melanom hücrelerinin %95'inin yüzeyinde bulunan glikolit olan GM2 gangliosid kullanılarak geliştirilmiştir [55]. ActHIB/OmniHIB, *Haemophilus influenza* tip b'nin (HiB) neden olduğu çocukluk çağı menenjitini önlemek için kullanılan bir konjuge aşıdır. [66]. Prevnar, kulak ağrısı, menenjit, kan zehirlenmesi ve zatürreye neden olabilen pnömokok enfeksiyonlarını önlemek için kullanılmaktadır. *Typhim Vi*, hijyen ve sanitasyon standartlarının yetersiz olduğu, gelişmekte olan ülkelere seyahat edenler için tavsiye edilmektedir. Aşı, etken madde *Salmonella typhi*'den yapılmakta olup diğer *Salmonella* türleri veya diğer bakterilere karşı koruma sağlamamaktadır. Bu aşuların çoğu, çeşitli kanserlere karşı etkinlikleri açısından analiz edilmektedir ve bu çalışmalar tümörle ilişkili karbohidrat antijenlerine karşı monoklonal antikorların üretilmesi esasına dayanmaktadır [67-69]. Tümörle ilişkili karbohidrat antijenlerinin bağışıklık sistemi tarafından yabancı olarak tanınmasına rağmen, bağışıklık tepkisi nispeten zayıftır ve kanser hücrelerini yok etmede etkisizdir. Kanser hücresi glikanlarının kimyasal modifikasyonunun, karbohidrat antijenlerine karşı daha büyük bir bağışıklık tepkisini uyurabileceği ve dolayısıyla tümörlerin ortadan kaldırılmasını sağlayabileceği varsayılmıştır. Bu nedenle, belirli kanserlere karşı aşuların üretilmesi ve tasarlanması için bir dizi sentetik glikopeptid kullanılmaktadır. Tümörle ilişkili karbohidrat antijenlerinden üretilen monoklonal antikorlar (mAb'ler), anti-kanser ilaçlarını kendi spesifik etki bölgelerine ulaştırmak için

de kullanılabilir. Bu nedenle, lipozomal anti-kanser ilaçlarının ligand aracılı hedeflenmesi yoluyla anti-kanser ilaçlarının terapötik endekslerini arttırmanın mümkün olduğu kanıtlanmıştır. Bu lipozomlar veya fosfolipid iki tabakalı veziküller, hidrofilik sulu iç kısımlarında hapsolmuş veya hidrofobik çift tabakaları ile bağlantılı ilaçları taşımak için kullanılabilir. İlaç paketi, hedef hücrelerine homing antikoru kullanılarak gönderilir ve daha sonra, lipozom-ilaç ünitesinin lizozomal ve endozomal enzimler tarafından parçalanmasından önce aktif ilacı serbest bırakarak içselleştirilir. Doksorubisin ve vinkristin önemli ölçüde bu şekilde kullanılan etken maddelerdir. Son zamanlarda yapılan bir inceleme, ligand hedefli lipozomal terapötiklerdeki yeni gelişmeleri açıklamakta ve bu tür stratejilerde karşılaşılan muazzam avantajları ve birçok sorunu vurgulamaktadır [70, 71].

### **COVID-19'un karbohidrat bazlı teşhisi**

Yeni Koronavirüs hastalığına (COVID-19), Şiddetli Akut Solunum Sendromu Koronavirüs-2 (SARS-CoV-2) neden olmaktadır [72, 73]. Alfa ( $\alpha$ ), beta ( $\beta$ ), gama ( $\gamma$ ) ve delta ( $\delta$ ) gibi dört ana tip koronavirüs tanımlanmış olup bunlar arasında sadece  $\alpha$ - ve  $\beta$ -koronavirüsler insanlar için patojenik suşlardır [74]. COVID-19 semptomları arasında öncelikli olarak ateş, şiddetli solunum problemleri ve zatürre bulunmaktadır. Tüm dünyadaki COVID-19 salgını, bu tehlikeli enfeksiyonun hızlı teşhisi, profilaksisi ve iyileştirilmesinde birçok zorluk yaratmıştır. Yaygın olarak kabul edilen ve kullanılan tanı testi, yani gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) yorucu ve pahalıdır. Ayrıca, SARS-CoV-2'ye karşı aşılar, antikorlar (Abs) ve ilaçlar dahil olmak üzere birleştirilmiş standart tedavi stratejisi henüz keşfedilmemiştir. Şu anda, bilim adamları, virüsü nötralize edebilen Abs üretmeye başlamak için bağışıklık sistemini uyaran çok amaçlı aşılar geliştirmeye çalışmaktadırlar. Bununla birlikte, SARS-CoV-2'nin genomik ve proteomik çeşitliliği, aşı geliştirme için bir zorluk haline gelmektedir [75]. Koronavirüsler, COVID-19 patogeneğinde önemli bir rol üstlenen ve konakçı bağışıklık tepkilerini indükleyen sivri glikoprotein (S-proteini) içeren zarflı tek sarmallı RNA virüsleridir [75, 76]. SARSCoV-2'nin S-proteinin, her biri 10'a kadar farklı glikan tarafından işgal edilebilen 66 glikosilasyon bölgesi içerdiği bulunmuştur. Bu S-protein ve glikanların (karbohidratlar) yeni teşhis tekniklerinin yanı sıra öncelikle aşılar ve sonrasında küçük moleküllü ilaçlar veya biyolojik tedavi stratejilerinin geliştirilmesinde ana hedefler olduğu varsayılmaktadır[77]. Geleneksel Çin bitkisel tıbbında karbohidrat bazlı

biyomoleküllerin daha az toksik, biyo-uyumlu ve immünojenik olduğu bildirilmektedir. Virüs reseptörünü taklit eden sentetik glikan molekülleri, virüslerin teşhisinde umut verici olarak görülmektedir [78]. Kitosan (CS), glukanlar, dekstran, inülin gibi hem bitki hem de mikroorganizmalardan türetilmiş polisakkaritler, hem antikora dayalı hem de hücre sel bağışıklığın uyarılmasıyla immünojenik davranış göstermiştir, bu nedenle bunlar aşuların geliştirilmesinde yardımcı biyomoleküller olarak kullanılmaktadır [79]. CS, aljinat ve karragenan (CRG) gibi çok sayıda karbohidratın çeşitli virüslere karşı etkili olduğu ve antiviral ajanlar olarak kullanıldığı bulunmuştur. Ayrıca antiviral ilaçlar olarak glikan bazlı birçok molekül klinik deneme aşamasındadır [80]. María ve arkadaşları, insan influenza virüsü X31'in (H3N2) tespiti için glikan bazlı bir teknik geliştirmişlerdir. Glikonopartiküller tasarlayarak (tiyollü üç değerlikli  $\alpha$  - 2,6-tiyo bağlantılı SA türevi ile işlevselleştirilmiş AuNP'ler), H3N2 virüsünü başarıyla tespit etmişlerdir [81]. Son zamanlarda, SARS-CoV-2 yüzeyinde bulunan glikanları hedefleyerek COVID-19 tanı yaklaşımı geliştirilmiş ve bu glikanlar mutasyon sırasında değişmeden kalmıştır [77]. Teşhis kitlerinde seçilen karbohidrat moleküllerinin özellikle hedef patojenler (influenza, COVID-19, vb.) tarafından tanındığı ve virüsü tespit etmeye yardımcı olduğunu açıklanmıştır. Bu teşhis tekniği şu anda klinik çalışmalar kapsamındadır. Geliştirilen kitte, yaklaşık 15 dakika içinde nazofarengeal sürüntü alınarak elde edilen bir örnekte viral enfeksiyonun varlığını göstermişlerdir. Böylece, virüsün insan hücreleri boyunca şekerlerle etkileşimini tespit eden doğru ve hızlı bir akış testi sağlanmıştır. Test kitlerinin ana bileşenleri, kağıt düzlemine veya altın nanopartiküllere yerleştirilmiş glikan içermektedir. Bu testin ana çalışma prensibi, virüsün varlığında pozitif sonuçlar gösteren kırmızı bir çizgi oluşturmak için altın NP'leri kaplayan kağıt yüzeyinde bulunan şekerlerle numuneyi bağlayan olmasıdır. Daha önceki birkaç çalışmada da virüslerin tespiti için karbohidratlar (glikan) kullanılmıştır. Hieu ve arkadaşları, virüsün reseptör taklidi olarak bir dizi sentetik glikan geliştirmişler ve daha sonra bu glikan kanallarını, küçük odaklanmış bir mikrodizi oluşturmak için bir ara parçanın ucundaki serbest bir amin aracılığıyla ticari bir cam slayta yazdırarak virüslerin tespitini sağlamışlardır. Bu mikro dizi ile, *Influenza A* virüsünün farklı türlerini tespit etmişlerdir [78].

## **Karbohidrat Bağlayıcı Ajanlar: COVID-19 Terapisi için Yeniden Kullanım Potansiyeli**

SARS-CoV-2 tarafından tetiklenen atipik pnömoniyle mücadele etmek için yeni aday aşılar ve potansiyel antiviraller geliştirme doğrultusunda yaşanan son artış, bu küresel pandemiye çözüme yeni ve keşfedilmemiş yaklaşımlara ihtiyaç duymaktadır. COVID-19'a karşı belirli antivirallerin veya aşuların bulunamamasıyla, kendi kendine mesafe, sıkı hijyen, kendi kendine karantina, seyahat kısıtlamaları ve hasta izolasyonu gibi stratejik kontrol önlemleri, bu enfeksiyonun yayılmasını önlemek için mevcut birkaç seçenektir. Bu nedenle, mevcut ilaçların yeniden kullanılması bir kurtarıcı olarak ortaya çıkmaktadır. Bitki lektinleri gibi karbohidrat bağlayıcı ajanların (CBA'lar) ve lektin benzeri peptidik olmayan taklit Pradimisin-A'nın (PRM-A) koronavirüs dahil zarflı virüslere karşı antiviral aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir [82-84]. Bitkiler, algler ve siyanobakteriler gibi çeşitli kaynaklardan saflaştırılan lektinlerin bu antiviral aktiviteyi sergilediği bilinmektedir. Daha spesifik olarak, *Hippeastrum hibrid lektin* (HHA), *Galanthus nivalis aglutinin* (GNA), *Allium porrum aglutinin* (APA) ve *Narcissus pseudonarcissus aglutinin* (NPA) gibi Mannoza (Man) bağlayıcı lektinlerin SARS-CoV'a karşı antiviral aktivite sergilediği gösterilmiştir. Benzer şekilde, *Urtica dioica aglutinin*'den (UDA) N-asetil glukozamin (GlcNAc) spesifik lektinler ve *Nicotiana tabacum*'un (Nictaba) da SARS-CoV'a karşı güçlü antiviral aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir [83]. CBA'ların gözlemlenen antiviral aktivitesinin, viral glikoproteinlerde Man açısından zengin N-bağlı glikanların varlığına bağlı olduğu bilinmektedir [85, 86].

## **Sonuç**

Son yıllarda karbohidratların biyolojik rollerine ilgi giderek artmıştır ve sonuç olarak karbohidratların çok çeşitli hastalık süreçlerinde rol oynadığı yapılan birçok çalışma ile desteklenmiştir. Örneğin, düşük moleküler ağırlıklı heparin bazlı ürünlerdeki eğilim, ortopedik cerrahiden sonra venöz tromboembolizmi önlemek için sentetik bir pentasakkaridin onaylanmasıyla sonuçlanmıştır. 2019 yılından beri dünya çapında hızla yayılmaya devam eden şiddetli akut solunum sendromu koronavirüs 2 (SARS-CoV-2) virüsünün vücuda girişi, Spike glikoproteininin, konak hücrelerde mevcut anjiyotensin dönüştürücü enzim 2 (ACE2) reseptörü aracılığıyla sağlanmaktadır. Spike glikoproteinini hem reseptör bağlanması hem de viral füzyon için gerekli olduğundan SARS-CoV-2 enfeksiyonunda çok önemli bir rol oynamaktadır. Bu nedenle de antikorları nötralize



etmek için anahtar hedefdir. Spike glikoproteini, önemli rolü nedeniyle aşuların ve terapötiklerin geliştirilmesi için önemli bir hedef olarak durmaktadır. Spike glikoprotein, reseptör bağlanma alanını ve majör B hücresi ve T hücresi epitoplarını taşımaktadır. Bu yüzden, aşular ve terapötikler için potansiyel bir hedef olduğunu göstermektedir. COVID-19 için yaygın olarak kullanılan aşı platformları, alt birim, virüs benzeri parçacıklar (VLP'ler), DNA, RNA ve viral vektör tabanlı platformları içermektedir. Bu aşı adaylarının çoğu, etkili bir bağışıklık tepkisi sağlamak için Spike glikoproteini hedef almaktadır. Şu anda viral enfeksiyonun tedavisinde nöraminidazı bloke eden iki monosakkarit glikomimetik ilaç, grip tedavisi için kullanılmaktadır. Karbohidrat bazlı terapötiklerin öneminin ilaç keşfi için başarılı bir yaklaşım olduğunu gösteren detaylı çalışmaların yapılması gerekmektedir. Aynı şekilde, karbohidrat bazlı terapötiklerin ilaç keşfini nasıl hızlandırabileceğini gösteren örneklere de ihtiyaç vardır. Son on yıldaki karbohidrat bazlı terapötiklerin başarısı için en önemli faktör, glikobiyoloji ve karbohidrat kimyası alanlarında devam eden çalışmalardır ve bu çalışmalar önümüzdeki yıllara için umut vaad etmektedirler.

#### Kısaltmalar

GABA: Gama-aminobutirat; AMP'A:  $\alpha$ -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolepropiyonik asit; ECM: Hücre dışı matris; HA: Hyluronan; sLe: Sialil Lewis; *H.pylori*: *Helicobacter pylori*; HIV-1: İnsan immün yetmezlik virüsü-1; NB-DNJ: N-butildeoksinojirimisin; HBV: Hepatit B virüsü; SARS-COV-2: Şiddetli akut solunum sendromu koronavirüs-2; ACE-2: Anjiyotensin dönüştürücü enzim-2, CYL: Cylexin, CD: Siklodekstrinler, GlcNAc: N-asetil glukozamin, H3N2: *İnsan influenza virüsü X31*, TACA: Tümörle ilişkili karbohidrat antijeni

#### Kaynaklar

1. Brandley, B.K. and R.L. Schnaar, Cell-Surface Carbohydrates in Cell Recognition and Response. *Journal of Leukocyte Biology*, 1986. 40(1): p. 97-111.
2. Fernandez-Tejada, A., F.J. Canada, and J. Jimenez-Barbero, Glycans in Medicinal Chemistry: An Underexploited Resource. *Chemmedchem*, 2015. 10(8): p. 1291-1295.
3. Feng, D.Y., A.S. Shaikh, and F.S. Wang, Recent Advance in Tumor-associated Carbohydrate Antigens (TACAs)-based Antitumor Vaccines. *Acs Chemical Biology*, 2016. 11(4): p. 850-863.
4. Shi, M.C., et al., Sialyl-Tn Polysaccharide A1 as an Entirely Carbohydrate Immunogen: Synthesis and Immunological Evaluation. *Journal of the American Chemical Society*, 2016. 138(43): p. 14264-14272.
5. Lakshminarayanan, V., et al., Immune recognition of tumor-associated mucin MUC1 is achieved by a fully synthetic aberrantly glycosylated MUC1 tripartite vaccine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012. 109(1): p. 261-266.
6. Patronov, A. and I. Doytchinova, T-cell epitope vaccine design by immunoinformatics. *Open Biology*, 2013. p. 3: 120139.
7. Slovin, S.F., et al., A polyvalent vaccine for high-risk prostate patients: "are more antigens better?". *Cancer Immunology Immunotherapy*, 2007. 56(12): p. 1921-1930.

8. Calvaresi, E.C. and P.J. Hergenrother, Glucose conjugation for the specific targeting and treatment of cancer. *Chemical Science*, 2013. 4(6): p. 2319-2333.
9. de Freitas Junior, J.C. and J.A. Morgado-Diaz, The role of N-glycans in colorectal cancer progression: potential biomarkers and therapeutic applications. *Oncotarget*, 2016. 7(15): p. 19395-19413.
10. Wrodnigg, T.M., A.J. Steiner, and B.J. Ueberbacher, Natural and synthetic iminosugars as carbohydrate processing enzyme inhibitors for cancer therapy. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 2008. 8(1): p. 77-85.
11. Hossain, F. and P.R. Andreana, *Developments in Carbohydrate-Based Cancer Therapeutics. Pharmaceuticals*, 2019. 12(2). p. 84-89.
12. Hakomori, S., New directions in cancer therapy based on aberrant expression of glycosphingolipids: anti-adhesion and ortho-signaling therapy. *Cancer Cells*, 1991. 3(12): p. 461-470.
13. Kuberan, B. and R.J. Lindhardt, Carbohydrate based vaccines. *Current Organic Chemistry*, 2000. 4(6): p. 653-677.
14. Jirmo, A.C., et al., Differential expression patterns of glycosphingolipids and C-type lectin receptors on immune cells in absence of functional regulatory T cells. *Immunity Inflammation and Disease*, 2020. 8(4): p. 512-522.
15. Liang, Y.J., et al., Differential expression profiles of glycosphingolipids in human breast cancer stem cells vs. cancer non-stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013. 110(13): p. 4968-4973.
16. Tenny, S., R. Patel, and W. Thorell, Mannitol, in *StatPearls*. 2021. StatPearls Publishing.
17. Inoue, N., et al., The production of recombinant human erythropoietin. *Biotechnol Annu Rev*, 1995. 1: p. 297-313.
18. Zhang, Y., et al., Erythropoietin action in stress response, tissue maintenance and metabolism. *Int J Mol Sci*, 2014. 15(6): p. 10296-10333.
19. Micoli, F., P. Costantino, and R. Adamo, Potential targets for next generation antimicrobial glycoconjugate vaccines. *FEMS Microbiol Rev*, 2018. 42(3): p. 388-423.
20. Schengrund, C.L., Glycoconjugates: roles in neural diseases caused by exogenous pathogens. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 2006. 5(4): p. 381-389.
21. Freeze, H.H., et al., Neurology of inherited glycosylation disorders. *Lancet Neurol*, 2012. 11(5): p. 453-466.
22. Cai, Z.X., et al., Shear-thinning hyaluronan-based fluid hydrogels to modulate viscoelastic properties of osteoarthritis synovial fluids. *Biomaterials Science*, 2019. 7(8): p. 3143-3157.
23. Smith, E.A., et al., Surface plasmon resonance imaging studies of protein-carbohydrate interactions. *J Am Chem Soc*, 2003. 125(20): p. 6140-6148.
24. Yousefi, M., et al., Aptasensors as a new sensing technology developed for the detection of MUC1 mucin: A review. *Biosens Bioelectron*, 2019. 130: p. 1-19.
25. Li, Q., et al., The Application of Polysaccharides and Their Derivatives in Pigment, Barrier, and Functional Paper Coatings. *Polymers (Basel)*, 2020. 12(8) p. 1837.
26. de Jesus Raposo, M.F., A.M. de Moraes, and R.M. de Moraes, Marine polysaccharides from algae with potential biomedical applications. *Mar Drugs*, 2015. 13(5): p. 2967-3028.
27. Aggarwal, S., P.N. Singh, and B. Mishra, Studies on solubility and hypoglycemic activity of gliclazide beta-cyclodextrin-hydroxypropylmethylcellulose complexes. *Pharmazie*, 2002. 57(3): p. 191-193.
28. Agu, R.U., et al., Nasal absorption enhancement strategies for therapeutic peptides: an in vitro study using cultured human nasal epithelium. *Int J Pharm*, 2002. 237(1-2): p. 179-191.
29. Tiwari, G., R. Tiwari, and A.K. Rai, Cyclodextrins in delivery systems: Applications. *J Pharm Bioallied Sci*, 2010. 2(2): p. 72-79.

30. Challa, R., et al., Cyclodextrins in drug delivery: an updated review. *AAPS PharmSciTech*, 2005. 6(2): p. E329-57.
31. Issa, M.M., M. Koping-Hoggard, and P. Artursson, Chitosan and the mucosal delivery of biotechnology drugs. *Drug Discov Today Technol*, 2005. 2(1): p. 1-6.
32. Kim, H., et al., Hyaluronate and its derivatives for customized biomedical applications. *Biomaterials*, 2017. 123: p. 155-171.
33. Jeanloz, R.W. and E. Forchielli, Studies on hyaluronic acid and related substances. I. Preparation of hyaluronic acid and derivatives from human umbilical cord. *J Biol Chem*, 1950. 186(2): p. 495-511.
34. Swann, D.A., Studies on hyaluronic acid. I. The preparation and properties of rooster comb hyaluronic acid. *Biochim Biophys Acta*, 1968. 156(1): p. 17-30.
35. Burdick, J.A. and G.D. Prestwich, Hyaluronic acid hydrogels for biomedical applications. *Adv Mater*, 2011. 23(12): p. 41-56.
36. Fung, K.Y.Y., G.D. Fair, and W.L. Lee, Transcellular vesicular transport in epithelial and endothelial cells: Challenges and opportunities. *Traffic*, 2018. 19(1): p. 5-18.
37. Ballut, S., et al., New strategy for targeting of photosensitizers. Synthesis of glycodendrimeric phenylporphyrins, incorporation into a liposome membrane and interaction with a specific lectin. *Chemical Communications*, 2009(2): p. 224-226.
38. Kimura, S., et al., A novel glycan targeting cancer therapy using lectin modified liposome. *Cancer Research*, 2019. 79(13) p. 2152.
39. Kilcoyne, M. and L. Joshi, Carbohydrates in therapeutics. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem*, 2007. 5(3): p. 186-197.
40. Laubli, H. and L. Borsig, Selectins promote tumor metastasis. *Semin Cancer Biol*, 2010. 20(3): p. 169-177.
41. Park, I.Y., et al., Cylexin: a P-selectin inhibitor prolongs heart allograft survival in hypersensitized rat recipients. *Transplant Proc*, 1998. 30(7): p. 2927-8.
42. Kerr, K.M., et al., The use of cylexin (CY-1503) in prevention of reperfusion lung injury in patients undergoing pulmonary thromboendarterectomy. *Am J Respir Crit Care Med*, 2000. 162(1): p. 14-20.
43. Simard, R.D., et al., Synthesis of Sialyl Lewis(x) Glycomimetics Bearing a Bicyclic 3-O,4-C-Fused Galactopyranoside Scaffold. *Journal of Organic Chemistry*, 2019. 84(11): p. 7372-7387.
44. Joziase, D.H. and R. Oriol, Xenotransplantation: the importance of the Gal $\alpha$ 1,3Gal epitope in hyperacute vascular rejection. *Biochim Biophys Acta*, 1999. 1455(2-3): p. 403-418.
45. Kosik, I., et al., Correction: Influenza A virus hemagglutinin glycosylation compensates for antibody escape fitness costs. *PLoS Pathog*, 2018. 14(6): p. e1007141.
46. Liu, C.C., X.J. Zheng, and X.S. Ye, Broadly Neutralizing Antibody-Guided Carbohydrate-Based HIV Vaccine Design: Challenges and Opportunities. *Chemmedchem*, 2016. 11(4): p. 357-362.
47. Behrens, A.J., et al., Integrity of Glycosylation Processing of a Glycan-Depleted Trimeric HIV-1 Immunogen Targeting Key B-Cell Lineages. *J Proteome Res*, 2018. 17(3): p. 987-999.
48. Ingale, J., et al., Hyperglycosylated stable core immunogens designed to present the CD4 binding site are preferentially recognized by broadly neutralizing antibodies. *J Virol*, 2014. 88(24): p. 14002-14016.
49. Hyakumura, M., et al., Modification of Asparagine-Linked Glycan Density for the Design of Hepatitis B Virus Virus-Like Particles with Enhanced Immunogenicity. *J Virol*, 2015. 89(22): p. 11312-11322.
50. McCoy, L.E. and D.R. Burton, Identification and specificity of broadly neutralizing antibodies against HIV. *Immunol Rev*, 2017. 275(1): p. 11-20.
51. Astronomo, R.D., et al., A glycoconjugate antigen based on the recognition motif of a broadly neutralizing human immunodeficiency virus antibody, 2G12, is immunogenic but elicits

- antibodies unable to bind to the self glycans of gp120. *Journal of Virology*, 2008. 82(13): p. 6359-6368.
52. Wang, Z.Y., et al., Recent advances in synthetic carbohydrate-based human immunodeficiency virus vaccines. *Virologica Sinica*, 2016. 31(2): p. 110-117.
  53. Excler, J.L., M.L. Robb, and J.H. Kim, Prospects for a Globally Effective HIV-1 Vaccine. *Am J Prev Med*, 2015. 49(6 Suppl 4): p. S307-318.
  54. Rubens, M., et al., HIV Vaccine: Recent Advances, Current Roadblocks, and Future Directions. *J Immunol Res*, 2015. 2015: p. 560347.
  55. Mettu, R., C.Y. Chen, and C.Y. Wu, Synthetic carbohydrate-based vaccines: challenges and opportunities. *J Biomed Sci*, 2020. 27(1): p. 9.
  56. Lyu, Y., et al., Human Immunodeficiency Virus (HIV) Infection and Use of Illicit Substances Promote Secretion of Semen Exosomes that Enhance Monocyte Adhesion and Induce Actin Reorganization and Chemotactic Migration. *Cells*, 2019. 8(9): p. 1027.
  57. Chang, J., et al., Novel imino sugar derivatives demonstrate potent antiviral activity against flaviviruses. *Antimicrob Agents Chemother*, 2009. 53(4): p. 1501-1508.
  58. Brown, G.D., et al., Dectin-1 mediates the biological effects of beta-glucans. *J Exp Med*, 2003. 197(9): p. 1119-1124.
  59. Pollard, A.J., K.P. Perrett, and P.C. Beverley, Maintaining protection against invasive bacteria with protein-polysaccharide conjugate vaccines. *Nat Rev Immunol*, 2009. 9(3): p. 213-220.
  60. Kumpulainen, E.J., R.J. Keskikuru, and R.T. Johansson, Serum tumor marker CA 15.3 and stage are the two most powerful predictors of survival in primary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 2002. 76(2): p. 95-102.
  61. Locker, G.Y., et al., ASCO 2006 update of recommendations for the use of tumor markers in gastrointestinal cancer. *J Clin Oncol*, 2006. 24(33): p. 5313-5327.
  62. Sato, Y., et al., Early Recognition of Hepatocellular-Carcinoma Based on Altered Profiles of Alpha-Fetoprotein. *New England Journal of Medicine*, 1993. 328(25): p. 1802-1806.
  63. Adamczyk, B., T. Tharmalingam, and P.M. Rudd, Glycans as cancer biomarkers. *Biochim Biophys Acta*, 2012. 1820(9): p. 1347-1353.
  64. Campos, D., et al., Probing the O-glycoproteome of gastric cancer cell lines for biomarker discovery. *Mol Cell Proteomics*, 2015. 14(6): p. 1616-1629.
  65. Saldoval, R., et al., Core fucosylation and alpha2-3 sialylation in serum N-glycome is significantly increased in prostate cancer comparing to benign prostate hyperplasia. *Glycobiology*, 2011. 21(2): p. 195-205.
  66. Nilsson, M. and T. Norberg, Solid-phase synthesis of an analog of Haemophilus influenzae type B capsular polysaccharide. *Journal of Carbohydrate Chemistry*, 1998. 17(2): p. 305-316.
  67. Bitton, R.J., et al., Cancer vaccines: An update with special focus on ganglioside antigens (review). *Oncology Reports*, 2002. 9(2): p. 267-276.
  68. Cunto-Amesty, G., et al., Strategies in cancer vaccines development. *International Journal for Parasitology*, 2003. 33(5-6): p. 597-613.
  69. Vichier-Guerre, S., et al., Induction of carbohydrate specific antibodies in HLA-DR transgenic mice by a synthetic glycopeptide: a potential anti cancer vaccine for human use. *Journal of Peptide Research*, 2003. 62(3): p. 117-124.
  70. Sapra, P. and T.M. Allen, Ligand-targeted liposomal anticancer drugs. *Progress in Lipid Research*, 2003. 42(5): p. 439-462.
  71. Osborn, H.M.I., et al., Carbohydrate-based therapeutics. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2004. 56(6): p. 691-702.
  72. Zhou, P., et al., A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin (vol 579, pg 270, 2020). *Nature*, 2020. 588(7836): p. E6-E6.
  73. Zhu, N., et al., A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *New England Journal of Medicine*, 2020. 382(8): p. 727-733.

74. Hao, C., Yu G., He Y., Xu C., Zhang G., Marine glycan-based antiviral agents in clinical or preclinical trials. *Reviews in Medical Virology*, 2019. 29(3): e2043.
75. Liu, C., et al., Research and Development on Therapeutic Agents and Vaccines for COVID-19 and Related Human Coronavirus Diseases. *Acs Central Science*, 2020. 6(3): p. 315-331.
76. Anthony, S. J., et al., Further Evidence for Bats as the Evolutionary Source of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus. *Mbio*, 2017. 8(2): e00373-00417.
77. Freeman, B., et al., Validation of a SARS-CoV-2 spike protein ELISA for use in contact investigations and serosurveillance. *bioRxiv*, 2020.
78. Dinh, H., et al., Glycan based detection and drug susceptibility of influenza virus. *Anal Chem*, 2014. 86(16): p. 8238-44.
79. Petrovsky, N. and P.D. Cooper, Carbohydrate-based immune adjuvants. *Expert Rev Vaccines*, 2011. 10(4): p. 523-37.
80. Morokutti-Kurz, M., C. Graf, and E. Prieschl-Grassauer, Amylmetacresol/2,4-dichlorobenzyl alcohol, hexylresorcinol, or carrageenan lozenges as active treatments for sore throat. *Int J Gen Med*, 2017. 10: p. 53-60.
81. Marin, M.J., et al., Glyconanoparticles for the plasmonic detection and discrimination between human and avian influenza virus. *Org Biomol Chem*, 2013. 11(41): p. 7101-7.
82. Lokhande, K.B., et al., Sensing the interactions between carbohydrate-binding agents and N-linked glycans of SARS-CoV-2 spike glycoprotein using molecular docking and simulation studies. *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*, 2020.
83. Keyaerts, E., et al., Plant lectins are potent inhibitors of coronaviruses by interfering with two targets in the viral replication cycle. *Antiviral Research*, 2007. 75(3): p. 179-187.
84. Mitchell, C.A., K. Ramessar, and B.R. O'Keefe, Antiviral lectins: Selective inhibitors of viral entry. *Antiviral Research*, 2017. 142: p. 37-54.
85. van der Meer, F.J.U.M., et al., The carbohydrate-binding plant lectins and the non-peptidic antibiotic pradimicin A target the glycans of the coronavirus envelope glycoproteins. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2007. 60(4): p. 741-749.
86. Gupta, R.K., et al., Carbohydrate-Binding Agents: Potential of Repurposing for COVID-19 Therapy. *Curr Protein Pept Sci*, 2020. 21(11): p. 1085-1096.

Bulut, A. and A. Can, Kazak Bilim Adamı Çokan Valihanov'a Göre XIX. Yüzyılda Kazaklarda Tarımsal Faaliyetler. International Journal of Life Sciences and Biotechnology, 2021. 4(3): p. 608-622.  
DOI: 10.38001/ijlsb.942995

## Kazak Bilim Adamı Çokan Valihanov'a Göre XIX. Yüzyılda Kazaklarda Tarımsal Faaliyetler

Ayşe Bulut<sup>1\*</sup> , Ayten Can<sup>2</sup> 

### ÖZET

Bir ülkenin ana kaynağı olan tarım, ekonomik kalkınmanın en önemli temel taşlarından biridir. Her toplum için hayati öneme sahip olan tarım sektörü, ekonomik gelişmişliğinde önemli bir unsurdur. Türk Dil Kurumu'nun yayınladığı Türkçe Sözlük'te "bitkisel ve hayvansal ürünlerin üretilmesi, kalite ve verimlerinin yükseltilmesi, uygun koşullarda korunması, işlenip değerlendirilmesi ve pazarlanması, ziraat ve kültür" olarak ifade edilmekte olan tarım, ülke ve toplumun kalkınmasında önemli rol oynamaktadır. Ekonomik sistemin küreselleşmesi, rekabet ortamının yoğunlaşması ve piyasa koşullarının hızlı değişmesi ile giderek daha fazla önem kazanmakta, toplumun sağlığı ve gelişimi üzerinde önemli etkilere sahip olmaktadır. Bu çalışmada Sovyet Sosyalist Cumhuriyetleri Birliğinin (SSCB) dağılmasından sonra bölgede kurulan milli devletler içerisinde tarım potansiyeli yüksek, işlenebilir toprakların beşte birine sahip, günümüzde tarımsal ürün üreticisi ve ihracatçısı olan Kazakistan'da tarımın XIX. yüzyılda Kazak toplumunda sosyo-ekonomik açıdan önemi üzerinde durulmuştur. Çalışmanın temelini Kazak bilim adamı ünlü Çokan Çingisoviç Valihanov'un birincil kaynak olan *Sobraniye Soçineniy V Piyatı Tomah* adlı ansiklopedik derlemenin birinci cildinde yer alan "*O Hlebopaşestve-Tarım Hakkında*" adlı eseri oluşturmaktadır. Çalışmanın amacı Rus dilinde yazılmış olan bu eserin XIX. yüzyılda tarımın Kazak toplumu üzerindeki sosyo-ekonomik açıdan önemi ve etkilerini analiz etmektir.

### MAKALE GEÇMİŞİ

Geliş  
26 Mayıs 2021  
Kabul  
24 Eylül 2021

### ANAHTAR KELİMELELER

Tarım,  
Kazakistan,  
tarımsal ekonomi,  
Orta Asya Türk  
Cumhuriyetleri

<sup>1</sup> Kırgızistan- Türkiye Manas Üniversitesi Sosyal Bilimler Enstitüsü Tarih Anabilim Dalı, Bişkek

<sup>2</sup> Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Tarih Bölümü, Aydın

\*Corresponding Author: Ayşe Bulut : [atunali@adu.edu.tr](mailto:atunali@adu.edu.tr)

# Agricultural Activities Of Kazakhs in the 19th Century According To Kazakh Scientist Chokan Valikhanov

## ABSTRACT

Agriculture, which is the main resource of a country, is one of the most important cornerstones of economic development. The agricultural sector, which is vital for every society, is also an important element of economic development. Agriculture is expressed in the Turkish Dictionary published by the Turkish Language Institution as "production of plant and animal products, increasing their quality and yield, preserving under appropriate conditions, processing, evaluating and marketing, agriculture and culture". Agriculture plays an important role in the development of the country and society, and it has become more and more important with the globalization of the economic system, the intensification of the competitive environment and the rapid change in market conditions. It has also had significant effects on the health and development of society. In this study, the socio-economic importance of agriculture in the Kazakh society in the 19<sup>th</sup> century, which has one-fifth of the arable lands with high agricultural potential among the national states established in the region after the collapse of the Union of Soviet Socialist Republics (USSR), and which is also a producer and exporter of agricultural crops today. The basis of the study is Kazakh scientist Çokan Chingisovich Valihanov's work titled "About the Hlebopasth and Agriculture" in the first part of the encyclopedic compilation called Sobraniye Soçiniy V Piyat Tomah. The aim of the study is to analyze the socio-economic importance and effects of agriculture on Kazakh society in the 19th century.

## ARTICLE HISTORY

Received

26 May 2021

Accepted

24 September 2021

## KEY WORDS

Agriculture, Kazakhstan, agricultural economy, Central Asian Turkic Republics

## Giriş

Toplumların sağlıklı beslenmesi ve de ekonomik değere sahip olması açısından tarım sektörü, bu güne kadar ülkelerin ekonomik ve sosyal gelişiminde çok önemli görevler üstlenmiştir. Tarım sektörü, gelecekte de bu görevleri üstlenmeye devam edecektir. Rostov'a göre tarımsal faaliyetler, toplumsal yapılanmada öncelikli konumdadır ve geleneksel toplumların temel faaliyetleridir [1]. Tarım, insanların yeryüzünde görüldüğü ilk dönemlerden itibaren yaşanan coğrafyanın toprak yapısına, iklim koşullarına göre değişim göstermektedir. Tarım üretimi, verimliliği, üretimin devamlılığını ve üretilen ürünlerin pazarlanmasını da gerektirdiği için daha önce göçebe bir yaşam süren toplulukların yerleşik hayata geçmesine neden olmuştur. Toplumun gıda ihtiyacını karşılayacak olan tarımsal faaliyetler ülkelerin önemli bir gelir kaynağıdır. Toplumların tarımsal faaliyetlere başlaması, toprağı ekip biçmesi ve ekili alanları terk edemeyeceklerini anlaması sonrasında toprağı bağımlı bir duruma gelmeleri, yani yerleşik hayata geçmeleri hayvancılıkla uğraşan konar-göçer toplulukları da etkilemiştir. Tarım ve hayvancılık ticari faaliyetleri daha da arttırmış, ticari faaliyetler aracılığı ile kültürler arası etkileşim de gelişmiştir. Ticari faaliyetler şehirleşmeyi de beraberinde getirmiş, şehirleşmeyle birlikte sanayileşme ve hizmet sektörü ön plana çıkmış ve

tarımsal faaliyetler geri planda kalmıştır. Bu durum tarımda üretim azalmasına neden olmuştur [2,3].

Henüz sanayileşme hamlesini tamamlayamamış toplumlarda hayvancılık ve toprağın kalitesine göre tarımsal faaliyetler o toplumların gelişmesi için büyük öneme sahiptir. Tarım sadece temel gıda ihtiyaçlarının karşılanmasında değil aynı zamanda sanayi, hayvancılık gibi diğer sektörlerin ham madde ihtiyacını karşılamada da çok önemlidir. Tarımsal ürünlerin artan nüfusun gıda ihtiyacını karşılayamaması gıda fiyatlarında artışı ve dışa bağımlılığı da beraberinde getirmektedir. Tarım toplumlarının gelişmesi, tarımda verimliliğin artışı aynı zamanda tarım sektöründe teknolojik gelişimleri takip edilmesi ve uygulanması ile mümkün olabilir [4,5,6].

Bu çalışmada Orta Asya’da hayvancılıkla uğraşan, yarı göçebe bir toplum olan Kazaklarda XIX. yüzyılda Kazak bilim adamı Çokan Çingisoviç Valihanov’un birincil kaynak<sup>3</sup> Sobraniye Soçineniy V Piyatı Tomah adlı ansiklopedik derlemenin birinci cildinde yer alan “O Hlebopaşestve-Tarım Hakkında” adlı Rus dilinde aktardığı eserinde Kazakistan’da tarım ürünlerinin çeşitliliği ve tarımsal ekonominin gelişmesi hakkında verdiği bilgiler analiz edilerek aktarılmıştır.

## **Kazakistan Hakkında Genel Bilgi**

Kazakistan, Avrasya kıtasının derinliklerinde, Orta Asya’da ye alan yüz ölçümü 2 724 900 km<sup>2</sup> olup Rusya, Çin, Amerika Birleşik Devletleri, Arjantin, Brezilya, Kanada, Hindistan ve Avustralya’dan sonra dünyada dokuzuncu en geniş topraklara sahip bir ülkedir. Toprak genişliği bakımından BDT (Bağımsız Devletler Topluluğu) ülkeleri arasında ikinci sırada yer alan Kazakistan’ın toprakları, Avrupa Birliği’nin 12 ülkesinin toplam yüz ölçümünden daha büyüktür [7]. Yüz ölçümü bakımından oldukça geniş toprak parçasına sahip olan Kazakistan’ın, özellikle kahverengi ve kestane renkli topraklarının durumu ülke için büyük endişe kaynağıdır [8]. Yoğun tarımsal ekonomik faaliyet alanlarında, doğal verimliliğini koruyan kahverengi ve kestane renkli toprakları önemli oranda erozyona uğramıştır. Toprak bozulması, şu anda Kazakistan Cumhuriyeti’nin çevresel, ekonomik ve ulusal güvenliğine tehdit oluşturan en önemli sosyo-ekonomik

---

<sup>3</sup> Kendi döneminde oluşturulmuş kaynaklara *ana kaynak*; dönemine yakın bir zamanda ve dönemin kaynaklarından faydalanılarak meydana getirilmiş olan kaynaklara ise *birinci elden kaynak* denir. Bkz. Mübahat S. Kütükoğlu, Tarih Araştırmalarında Usûl. Ankara: Türk Tarih Kurumu Basımevi, 2011.



sorunlardan biridir [9]. Kazakistan Cumhuriyeti'nde 90 milyon hektardan fazla erozyona uğramış ve erozyon tehlikesi olan topraklar bulunmaktadır. Ayrıca Akmola, Kostanay, Kuzey Kazakistan, Pavlodar ve Karaganda bölgelerinin koyu kestane topraklarındaki tarım arazilerinde su erozyonu oluşması ve tarım arazilerinde azalma olasılığı oldukça yüksektir [10].

Bölgelerin genişliği ve okyanuslardan uzaklığı, ülkelerin kendine özgü iklim koşullarını belirlemektedir. Kazakistan'ın iklimi, soğuk kışlar ve sıcak yazlar, çöl ve yarı çölden oluşan, eşit olmayan yağış dağılımıyla keskin bir şekilde karasaldir. Kazakistan, ihtiyaç duyduğu su kaynaklarının sadece % 35'ine sahiptir ve topraklarının % 66'sı çölleşmeye maruz kalmaktadır [11].

SSCB'nin dağılmasının ardından BDT (Bağımsız Devletler Topluluğu) içine dahil olan Orta Asya Türk Cumhuriyetleri arasında, gerek iklim gerekse toprak faktörleri ve tarımsal potansiyelleri bakımından, çok çeşitli farklılıklar bulunmaktadır. Bu ülkeler; tarımsal üretimde genel verim düşüklüğü, gıda tüketiminde dışa bağımlılık, sıcaklık-yağış ilişkilerinin genel elverişsizliği nedeniyle tarımda sulamaya bağımlılık gibi ortak sorunlara sahiptir [12].

Tarım, madencilik endüstrisinden sonra Kazakistan ekonomisinin en önemli sektörlerinden biridir. Genel olarak karasal iklimden kaynaklanan risklere rağmen, dünyanın en büyük 10 tahıl ve un ihracatçısı arasında [13] olan Kazakistan tarımsal üretimin geliştirilmesi için büyük bir potansiyele sahiptir. Ülkenin kuzeyindeki iklim koşulları, buğday, yulaf, arpa ve diğer tahıl mahsullerinin yetiştirilmesini kolaylaştırır ve ayrıca sebze, kavun yetiştiriciliğinin ve bir dizi endüstriyel mahsulün (ayçiçeği, keten, tütünün vb.) yetiştirilmesine olanak tanıyarak Kazakistan ekonomisinin kilit sektörünü oluşturur [14].

Kazakistan'ın doğal koşulları, bitki çeşitliliği, hayvancılığın gelişmesi için önemli bir potansiyele sahiptir. Kazakistan'da insanlar geleneksel olarak koyun, at, deve ve sığır yetiştiriciliği ile uğraşır. Kazakistan'ın güneyinde, dağ eteklerinde ve çok sıcak olan vadilerinde yapay sulama yöntemleri ile meyve ve üzüm yetiştiriciliği yapılabilirken, pamuk, şeker pancarı, sarı tütün, pirinçten yüksek verim elde edilir [15].

## **Kazaklarda Tarımın Tarihsel Gelişimi**

Sulama teknolojisinin geliştirilmesi ve Otrar vahasının sulama ağının iyileştirilmesi VII-IX. yüzyıllarda gerçekleşmiştir. Yazılı kaynaklara göre, bu dönemde Orta Asya ve

Kazakistan topraklarında erken feodal devletler kurulmuştur. Orta Asya'nın yerleşik tarımsal vahalarında Batı Türk Kağanlığı'nın siyasi egemenliğinin kurulması, Orta Asya ve Kazakistan halkları arasındaki ekonomik ve siyasi bağların güçlenmesine katkıda bulunmuştur [16]. Moğol istilalarından etkilenen Kazakistan topraklarında XIII. yüzyılın sonu – XIV. yüzyılın başında (Otrar, Türkistan ve diğerleri) tarım kültürünün ve şehirlerin kademeli bir şekilde ekonomik canlanması ve restorasyonu görülmektedir. Bölgede XIV. yüzyıldan itibaren göçebe ve yarı göçebe sığır yetiştirme ekonomisi gelişmiş, hem Kazak topraklarında hem de Orta Asya'nın diğer ülkeleriyle ticari ilişkiler yeniden kurulmuştur [17].

Yazılı kaynaklara göre, Orta Çağ'ın sonlarında Türkistan, geniş bir tarım bölgesi halinde birleşmiş çok sayıda yerleşim yerinin merkezi olmuştur. Bölge sakinleri tahıl yetiştirmenin yanı sıra sulu tarım ve satış için diğer tarımsal ürünlerin ekimiyle uğraşmışlardır. Timur'un vakıfnamesinde XIV-XV yüzyılların başlangıcına bölgede büyük ekili ve iyi sulanan alanların varlığından söz edilmektedir. İki yüzyıl sonra aynı arazi alanlarında Hoca Ahmed Yesevi Türbesi'ne ait oldukları doğrulanan başka bir belgede Türkistan çevresinde önemli arazi alanlarının sulanmasının yapıldığı, bazı arıkların listelendiği hususunda bilgilere rastlanır. Bu belgede sulu tarım yapılması için oluşturulan Yangıç hendeği, Mir-Karasu hendekleri, Sıgnak ve Çornak, Kara-bulak, Sazat-bulak adlarını taşıyan su kaynaklarıdır. Türkistan bölgesinde sulanan bu topraklarda tahıl ürünlerinden özellikle buğday, arpa ve ayrıca kavun, karpuz, meyve, sebze ve üzüm yetiştirilmiştir [18].

XV-XVIII. yüzyıllarda Kazak Hanlığı bağımsız bir ekonomik, politik, sosyal ve kültürel devlet olarak var olmuştur [19]. XV. yüzyılın sonlarında ve XVI. yüzyılın başlarında, Kazak Hanlığı ekonomik olarak güçlenmiş ve Kazakların etnik topraklarının önemli bir kısmı da dahil olmak üzere bölgesel olarak genişlemiştir. Kazak Hanlığı'nın güçlenmesi ve Kazak Hanlığı'na Uysin, Kanlı, Dulat, Kıpçak, Karluk, Tele, Yama, Oğuz kavimlerinin katılmasıyla Kazak adı Hazar Denizi'nden Altay'a, Sırderya'dan Oral sahasına kadar olan coğrafyada yaşayan Türk kavimlerinin ortak adı olarak kullanılmaya başlanmıştır. Bu kavimlerin birleşmesindeki siyasi, sosyal, etnik ve ekonomik faktörlerin yanı sıra ana etken özellikle bölgenin hayvancılığa ve tarıma elverişli arazileri, su kaynakları ve hayvancılık için gerekli olan yaylaklar ve kışlaklardır[20]. Bağımsız bir Kazak Hanlığı'nın kurulması özellikle Kazakistan'ın güneyinde ekonomik ve sosyal

durumun iyileşmesine, tarım ve hayvancılığın gelişmesine de olanak sağlamıştır [21]. Daha sonra Orta Asya bölgesindeki zorlu savaşlar, çekişmeler, nüfusun irili ufaklı göçleri ortamında, Han Kasım yönetiminde, hanlık nüfusu 1 milyon kişiye ulaştı. Kazak nüfusunun hızla arttığı, dolayısıyla artan nüfusun toprak ve otlak ihtiyacından dolayı ilerleyen yıllarda sınırların genişlediği ve XVII. yüzyılın sonlarında neredeyse bugünkü Kazakistan sınırlarına ulaşıldığı bilinmektedir [22]. Nüfusun artması ve daha geniş topraklara ihtiyaç duyulmasını, A. A. Kaufman'a göre: "... tarım sorununun özü, insanların bir sebepten ötürü tahsis edilen arazide sıkışıp kalmasına dayanıyor. İlk, acil ihtiyaç - bu nedenle, köylü topraklarının kullanım hakkını genişletme ihtiyacıydı." [23] diye ifade etmiştir.

Tarihi kaynaklara göre Kazakların 1445-1521 tarihleri arasında yöneticiliğini yapan Kasım Han'ın Kazaklarla ilgili ayrıntılı bir açıklaması bulunmaktadır. Kasım Han Kazakların etnokültürel portresi ile ilgili aktardığı bilgiler XVI. yüzyılın başından XX. yüzyıla kadar birçok tarihi kaynakta da yer almaktadır. Kasım Han'ın, "Biz bozkırın sakinleriyiz; ne ender ne de pahalı şeylere ne de mallara sahibiz, ana servetimiz atlardan oluşur; etleri ve derileri bize en iyi yiyecek ve giyimi sunar ve bizim için en hoş içecek sütleridir ve ondan hazırladığımız olandır (kımız). Toprağımızda bahçe veya bina yok; eğlencemizin yeri sığır otlakları ve at sürüleri ve biz de atların gösterisini hayranlıkla seyretmek için sürülere gidiyoruz." şeklinde ifade ettiği gibi Kazaklar, çoğunlukla et yiyip kımız içen, göçebe bir yaşam tarzı sürdüren ve tarımla uğraşmayan bir halktır [24] diye tanımlanmaktadır. Oysa daha önceki dönemlerde olduğu gibi Orta Çağ'da da Sır Derya'nın alt kesimlerinde yaşayan Kazaklar, esas olarak sığır yetiştiriciliği, sulu tarım ve balıkçılığı birleştiren ilkel yarı yerleşik çiftçilikle uğraşıyorlardı [25].

## **Çokan Valihanov'un Hayatı ve Çalışmaları**

Çingis Han soyundan gelen bir ailenin ferdi olarak 1835 yılında, Rusya İmparatorluğu'na bağlı Batı Sibirya Valiliği sınırları içerisinde yer alan Kuşmurun Bölgesi'nde doğan Çokan Valihanov<sup>4</sup>, Kazakistan tarihi açısından çok önemli bir konumda olup XIX. yüzyılın en seçkin aydını, araştırmacısı, bilim adamı, tarihçi, etnograf ve Kazak

---

<sup>4</sup>Çokan'ın doğduğu Kusmurun bölgesi şimdiki Kostanay bölgesi, Cetigöl (Yedigöl) ilçesi, Şoptigöl köyüdür. Aman-Karagay bölgesinin idari merkezi, 1835 yılında Kuşmurun'a taşındı. Bundan dolayı bu bölge idaresi artık Kuşmurun adıyla anılmaya başlandı. Burada Kuşmurun İstihkâmı inşa edildi. Valihanov ailesi de oraya taşındı. 1853'te Batı Sibirya Çarlık İdaresi Genel Valisi'nin emriyle Kuşmurun Bölgesi İdaresi ilga edildi. Onun yerine İşim Nehri kenarındaki Atbasar'da yeni bir idari bölge kuruldu. Böylece Çingis ailesiyle birlikte ata yurdu Sırimbet'e taşındı. (Valihanov, *a.g.e.*, s. 12-13.)

düşünürüdür. Çokan Valihanov Kazak hanlık sülalesine mensup Abılay Han'ın üçüncü kuşaktan torunudur. Kazak Hanlığının 18. hanı olan Abılay Han Rus Egemenliğine girmeyi kabul etmiş, siyasi ve ekonomik olarak Kazak-Rus işbirliğini savunmuştur. [26]. Valihanov'un eğitimi ve fikri hayatının gelişmesinde ailesinin çok büyük etkisi olduğu bilinmektedir. Erken yaşta Arapça okuma ve yazmayı, ayrıca doğu dilleri, coğrafya, tarih, matematik ve karakalem resim yapmayı öğrenmiştir. Babasının bilim insanları, coğrafyacılar, şarkiyatçılar bu çevrenin ileri gelenlerinden oluşan entelektüel çevresi Çokan'ın gelecekteki şahsiyetini etkilemiştir[27].

1847 tarihinde Omsk Askeri Kadet Okulu'na giren burada Rusça, Fransızca, Türkçe, Moğolca, Arapça, Farsça dil derslerinin dışında coğrafya, edebiyat, felsefe, fizik gibi temel bilimlerde de öğrenim görmüştür[28]. Bu okulda F. M. Dostoyevskiy ve S. F. Durov gibi şahsiyetler ile tanışmış ve entelektüel çevresini genişletmiştir. 1853 tarihinde Omsk Askeri Kadet Okulu'nu bitiren Çokan Batı Sibirya Genel Valisi General Gasfort'un emir komutasında görev almış[29], 1855'te General Gasfort'un Kazakistan, Semireçi, Tarbagatay bölgelerine düzeldiği keşif hareketına katılmış, bu sırada Kazak halkının örf adetleri, gelenek-göreneklere, tarihi-edebi varlığı ve dini yaklaşımı hakkında çok geniş kaynaklara ulaşmıştır. Bu sırada derlediği öykü, destan, şiir gibi eserlerden yola çıkarak Rus kamuoyunun ve dünyanın Kazak tarihi ve edebiyatına ilgisi arttıracak makaleler ortaya koymuştur [30]. Ayrıca Kazak, Kırgız coğrafyası, tarihi, örf ve adetleri konularında sözlü edebi eserleri derlemiş 1857 Aladağ Kırgızları alanında yaptığı saha çalışmaları sonunda Manas destanını yazıya aktarmıştır[31]. Özü itibari ile Kırgız ulusal kahramanı Manas'ın şahsiyetinden yola çıkarak Kırgız toplumunun mitolojik evrenini konu edinen Manas Destanı'nın yayınlanması sonrasında [32] Rus Coğrafya Kurumu'nun üyeliğine seçilmiştir. 1858-59 tarihli Kaşgar seyahatinde de önemli veriler toplamış, "Jungarya Tasvirleri", "Tan-Lu" ve "Altışehir Ülkesinin Vaziyeti" adlı makaleleri yazmıştır. Bu makaleler İngilizceye çevrilerek Batılı bilim insanlarının da erişimine açılmıştır[33]. 1860 tarihinde Petersburg'a çağrılan Valihanov burada Genel Kurmay Askeri Hesap Şubesi, Asya Dairesi ve Coğrafya Kurumu'nda çalışmalar yapmış, haritacılık faaliyetlerinin yanı sıra edebi eserleri tetkik etmiştir. 1864 tarihinde Çernyaev'in Evliya Ata Kalesi askeri hareketına katılan Valihanov bu bölgelerin Rusya'ya katılmasının askeri hareket ile değil diplomasi kanalıyla olması gerektiğini düşündüğü ve Çernyaev'in sivillere yönelik davranışlarını onaylamadığı için tepki olarak

Verniy kalesine çekildi, bu nedenle rütbesi düşürülmüştür. Alban boyunun sultanı Tezek'in köyüne yerleşmiş, sultanın kız kardeşi ile evlenmiştir. Yakalandığı akciğer hastalığının neticesinde 1865 tarihinde burada hayata gözlerini yuman Çokan Valihanov[34] 29 yıllık kısa hayatının büyük bir bölümünü Kazak tarihini, edebiyatını, etnografyasını, coğrafyasını ve ülkesinin manevi zenginliklerini incelemeye adanmış ve bu konuda büyük başarılar elde etmiştir. Bunlar Kazak Halk Ağz Edebiyatı, Kazak Halkının Etnografyası, Kazak Halkının Tarihi, Kırgız Halkının Tarihi, Etnografyası ve Coğrafyası, Doğu Türkistan ve diğer Türk Halkları Hakkındaki çalışmaları olup Orta Asya'daki Türk Halklarının dili, kültürü, tarihi, coğrafyası, yaşam biçimleri gibi konularda önemli bilgiler aktarır.[35].

Valihanov'un ölümünden sonra Rusya Coğrafya Derneği 1867 yılında Valihanov'un eserlerinin bir külliyat halinde yayımlanmasına karar vermiştir. P.P. Semenov ve K.K. Gutkovski derleme çalışmalarına başlamış, fakat Gutkovski'nin ölümü üzerine derleme çalışmasına uzunca bir süre ara verilmiştir. Bu çalışma 1887'de Petersburg Üniversitesi profesörlerinden N. I. Veselovskiy editörlüğünde, Potanin'in desteğiyle tamamlanmıştır. Rusya Coğrafya Derneği'nin süreli yayını olan Araştırma Notları'nın XXIX. cildi *Soçineniya Çokana Çingisoviça Valihanova* adıyla yayımlanmış (Petersburg 1904) ve uzun yıllar Valihanov hakkında temel başvuru kaynağı olmuştur. Büyük bir titizlikle toplanan bilimsel makaleleri, notları, mektupları, elyazmaları ve resim çalışmaları ölümünün 100. yıldönümünde *Sobraniye Soçineniy v Piyati Tomah* adıyla beş ciltlik bir külliyat halinde yayımlanmıştır. Daha sonra (Alma-Ata 1961-1972), bu külliyat, düzeltmeler ve eklemelerle birlikte Kazak bilim adamı Alkey Margulan tarafından derlenerek 1984-1985'te tekrar basılmıştır. Külliyat'a Valihanov hakkında yapılan bütün çalışmaların toplandığı kapsamlı bir bibliyografya cildi de eklenerek altı cilt halinde *Köp Tomdik Şığarmalar Jinağı* ismiyle Almatı'da 2010 yılında Kazak Türkçesine çevrilip yayımlanmıştır. Yapılan bu çalışmaya kaynak teşkil eden Çokan Valihanov'un Sobraniye Soçineniy v Piyati Tomah "Tarım Hakkında" adlı eseridir.

### **Çokan Valihanov'un Sobraniye Soçineniy v Piyati Tomah "Tarım Hakkında" Adlı Eserinde Kırgız Kaysaklarında Tarımsal Faaliyetler**

XIX. yüzyılda Kazaklar arasında gelişen tarım konusunda önemli bilgiler aktaran Kazak bilim adamı, tarihçi, etnograf, folklorcu, seyyah, eğitimci ve oryantalist olan Çokan Valihanov'un Sobraniye Soçineniy v Piyati Tomah adlı eserinin birinci cildinde yer alan

“Tarım Hakkında” adlı çalışmasında Kazakistan’da tarımsal üretim, ürün çeşitliliği, bu ürünlerin ekimden hasada kadar geçen süreçteki işleyişi konusunda ayrıntılı bilgilere yer vermektedir.

Çokan Valihanov’un bu eserinde Kazakların yaşadığı bölgede toprağın durumu, ekim yöntemleri hakkında bilgiler aktarmaktadır. Toprağın verimliliğini, burada tarım yapmanın kolaylığını anlatmak için “...Toprağın yumuşaklığı, burada Sibiry’a olduğu gibi gerçekten bir saban gerektirmez. Çok küçük bir demir parçası, toprağı gerekli bir derinliğe kadar hasat etmek için (sürmek için) yeterlidir. Saban demiri (uç demiri) tahtadan yapılan saban yerine sağlıklı ve masif bir demir çiviye benzer. Sabanın sadece bir kısmı ağaca tutturulur ve iki boğa tarafından çift sürülür.” ifadelerini kullanmıştır. Ayrıca Sibiry Kazakları tarafından kullanılan çekilir tip sabanları (pullukları) Kırgız-Kaysakları’nın<sup>5</sup> nasıl kullanacaklarını bilmediklerini ve bu aletlerden korktuklarını eklemiştir. Valihanov Kırgız Kaysakları’nın yaşadığı Büyük Orda’da, çetin kış şartları nedeniyle süt üretimi olmadığından ağırlıklı olarak sütün yerini tutması için darı yetiştirdiklerini, ayrıca son dönemlerde bölgede özellikle Kırgız zenginleri kendi ihtiyaçları için Çin buğdayı ekimi de yaptıklarını aktarmaktadır.

Valihanov’un aktardığına göre Büyük Orda’da ekilebilir tarım XVII. yüzyılın başlarında Canıs boyu atalarından biri olan Baykibil zamanından beri yapılmaktadır. Baykibil akrabalarından kendisine kaçan bir Kalmık’ın yardımıyla Kırgız-Kaysaklar arasında çiftçilik yapmaya ilk başlayan kişidir. Valihanov’un eserinde Büyük Orda halkının anlatımlarına göre, buğday buradaki ekilebilir araziye XVII. yüzyılın başında Kaşgar’dan Kara Kırgızlar (Burut) yoluyla getirilmiştir. Büyük Orda’da XIX. yüzyılda bilinen tohumlar şunlardır: sonbaharda atları beslemek için ekilen buğday, darı, kunak, daha sonra tohumları Çin’den getirilen musyuy<sup>6</sup>, bezelye, arpa, mercimek, keten, mısır (sorgum) ve yine Çin’den ithal edilen susam ekimi yapılmaktadır. Kimi Kırgız-Kaysaklar tarafından çavdar ve pamuk da yetiştirilmeye çalışılmış, ancak bu bitkilerin yetiştirilme denemeleri bölgenin Ağustos ayında bile soğuk olması nedeni ile başarılı olamamıştır.

Kırgız-Kaysaklar’nda ekimden hasata önemli bilgiler aktaran Valihanov özellikle hububat ürünlerinin hasatında hafifçe bükülmüş, daha çok bir bıçağa benzeyen Kaysak

---

<sup>5</sup> Kazak tabirinin kullanımının XIV. yüzyıla kadar gittiği tesbit edilmiştir. En erken Rus seyyahları Kazaklar’ı önceleri Kırgız-Kazak (Kaisak) olarak adlandırırken XIX. yüzyıldan itibaren sadece Kırgız kelimesini kullanmışlardır.

<sup>6</sup> Tahıl, hububat, tarlada yetişen besleyici bir bitki.

orağı kullanıldığını Kaysakların iyi ve yoğun bir ekin hasadı olduğunda, günde en fazla 25-30 demet büyüklüğünde ekin biçebildiğini, hasat edilen ekinlerin tanelerinin saplarından ayırma işleminin önceden sulanan, ezilen ve tekrar kurutulan killi toprak zemin üzerinde yığılan harmanın öküzlerin çektiği döğenlerle yapıldığını, bir Kaysak'ın ekonomik imkânına bağlı olarak, harman yerinde en az altı öküz bulunduğunu belirtmektedir.

Bölgede darı üretiminin de olduğunu Valihanov'un şu sözlerinden anlamaktayız. "...Soğuk ve uzun geçen kış aylarında ailelerin ihtiyacı için ayrılan darı veya diğer tahılların miktarını hesaplayan Kırgız-Kaysakı, bu ürünleri aıla (köye) ürünlerin işlenmesinden sorumlu olan kadınlara götürür. Darı kadınlar tarafından [uzun süre] bir dökme demir kazanda kızartılır, bir havanla dövülür ve daha sonra bu soyulmuş ve kızartılmış tahıl saklanmak amacıyla hazırlanan özel güçlü yün torbaların içine konur.... Ekilebilir arazideki fazla miktarda ham darı stokunun geri kalanı çukurlara gömülür ve toprakla kaplanır, burada ya bütün kış ya da kışın ilk ihtiyaca kadar depolanır."

Valihanov Kırgız Kaysakları arasında bahçecilik faaliyetlerinin de geliştiğini, bahçecilikle uğraşanların Kırgız-Kaysaklarından daha çok, Çalakazaki<sup>7</sup> olarak adlandırılan bazı Taşkent yerlileri olduğunu, bölgede dikilen üzüm bağları, kayısı, elma ve diğer meyve ağaçlarınının bu endüstrinin iyi geliştiği Taşkent'ten ya da Uygur Doğu Türkistan'ın kadim şehirlerinden Kulca ve Kaşgar gibi şehirlerden Kaysak'a aktarıldığını ifade ederken bahçecilikle uğraşan Kaysakların ise topraklarını bahçecilik işini öğrenmek için Taşkentlilere verdiklerini söylemektedir. Ele aldığımız eserinde bahçecilik konusunda ayrıntılı bilgilere yer veren Valihanov dikimden sulamaya ve gübrelemeye, ne tür ürünlerin ekiminin yapıldığına ve bu ürünlerin türlerine yönelik bilgiler aktarmaktadır. Örneğin bu konuda şu bilgileri aktarmaktadır. "...Taşkentlilerden geçen bahçeciliğin, Kaysaklar arasında daha da geliştiği söylenebilir. Taşkentlilerin dikim için bahçelerde oluşturdukları arıkların boyutları Kazaklardakinden farklı olup uzunluğu iki arşın ve genişliği bir buçuk arşınlık küçük arıklar yaparlar. Sulama, ekilebilir arazilerde olduğu gibi, bahçenin oluklarına izin verilen ve her sırtın zikzaklarını saran arıklarla yapılır. Salatalık ve karpuzun ekildiği topraklarda gübre kullanılmaz, havuç ve fasulye gibi basit bir şekilde ekilir, ...".

---

<sup>7</sup> Kazaklar ve Tatarların, Sartların, Uygurların ve diğer halkların evlilikleri neticesinde ortaya çıkan etnografik bir gruptur. Çala Kazaklar veya çala kazaklar etnik adı 18.-19. yüzyıllarda kullanılmıştır.

Valihanov'un eserinde ekimi yapılan ürünlerin menşei, şekli, büyüklüğü, lezzeti konularında da ayrıntılı bilgilere ulaşılmaktadır. Örneğin tohumları Çin'den gelen salatalığın, on yedi verşok<sup>8</sup> uzunluğuna ulaştığını, şeklinin düzgün olmadığını, tohumlarının nadiren olgunlaştığını ve yerli salatalık kadar lezzetli olmadığını belirtirken, Taşkent, Yarkand, Kokand'dan gelen kavunların ise lezzetli, son derece büyük ve kocaman bir balkabağı şeklinde olduğunu söylemektedir. Ayrıca Tohumları Taşkent'ten ve kısmen Çin'den ithal edilen Karpuzların lezzetli, şekerli, sarı ve 15 ila 45 funt<sup>9</sup> ağırlığında olduğunu, büyük ve dış kabuğunun balkabağına benzediğini, fakat bölgede pembe karpuz görülmediğini aktarmaktadır. Yine Valihanov bölgede diğer ürünlerin yanı sıra uzun boğazlı ve Kırgız-Kaysakları tarafından su kabı olarak kullanılan büyük bir şişeye benzeyen Çin sukabağı; fasulye, pancar, sarı havuç, turp, bezelye, Çin tütününü ve diğerleri de ekildiğini belirtmektedir.[36]

Tarımda sulama konusuna da değinen Valihanov, Kazaklarda tarımın topağın parsellere ayrılması yoluyla yapıldığını, küçük sulama yapılarının olduğunu, sulu tarım yapılan yerlerde sulama amaçlı basit (tekerleksiz) değirmenler inşa edilmesi yöntemi buraya Taşkent'ten getirildiğini aktarmaktadır. Sulama teknolojisinin gelişmesiyle birlikte, su kaldırma mekanizmaları ortaya çıkmaya başladı ve su ile hareket eden "sakiye"(Bahçe ve tarlaları sulamaya mahsus su arkı, su dolabı, su kanalı) Orta Asya'da yaygınlaştı. Ayrıca doğal olarak nemlendirilmiş topraklarda (höyük ve haliç tarımı) da tarım yapılmaktadır. Kırgız-Kaysaklarında temel tarım ürünü darı ekimi olduğunu, bunun dışında başka türde mahsullerin de ekiminin yapıldığını Turgay Askeri Valisi'nin 1903 tarihli raporunda görmekteyiz. Bu raporda "En fazla verimin darı üretiminde olduğunu, ardından buğday, yulaf, çavdar, patates, keten, bezelye, arpa ve kenevir gibi ürünlerin geldiği belirtilmektedir".

Bölgede toprakların su ve rüzgâr erozyonundan korunması için de çiftçilik, bir önceki yıldan kalan anız üzerinde bir pulluk ile gerçekleştirilmektedir[37]. Kazakistan'da XIX. yüzyılda kullanılan tarım aletlerine ilişkin bazı fotoğraflar, çizimleri ve ekilen tohumlarla ilgili görseller aşağıdaki şekillerde paylaşılmıştır.

---

<sup>8</sup> 16. yüzyılın kaynaklarında yer alan eski Rus uzunluk birimidir. Bu ölçü birimine göre 1 verşok = 4,445 cm = 44,45 mm.

<sup>9</sup> D.I Mendeleev tarafından geliştirilen sistem, 30 Nisan 1917 tarihli Geçici Hükümetin zorunlu bir kararı olarak tanıtıldı ve 21 Temmuz 1925 tarihli SSCB Halk Komiserleri Konseyi kararnamesiyle uygulandı. Bu sisteme göre Rus Funtu =0,40951241 Kg.





Suyun kuyulardan çıkarılmasına yarayan sakiye,  
 Çigir(Sakiye)- X-XII yüzyıllarında Otrar vahasında. V.A.Troşev tarafından yeniden yapılanma;  
 sanatçı A.E. Gorbatov



XVI-XVII yüzyıllarda Otrar’da kullanılan tarım aletleri; sırasıyla a. pulluk b. Orak c. Çapa



Güney Kazakistan’ın eski sulama türleri  
 (MÖ V- XVIII. yüzyıllar)



Otrar yerleşiminden darı, arpa, buğday taneleri [38]

Yukarıda aktarılan bilgilerden de anlaşıldığı gibi Kazak toplumunda tarımın az geliştiğine dair ifadeler hem tarihsel gerçekliğe uygun değil hem de doğru değildir. Kazakistan’da bazı bölgelerde tarımın Rus yerleşimciler tarafından yapıldığına dair saptamalar da yanlıştır. Buralarda Rus yerleşimciler gelmeden önce de tarım yapılmaktaydı. Örneğin, XX. yüzyılın başında, Semireçye’nin göçebe ve yarı göçebe Kazak ekonomisini inceleyen P.P. Rummyantsev’in sunduğu bilgileri dikkatlice analiz eden P.G. Galuzo, Kazaklarda tarımın yalnızca köylülerin (Rus yerleşimciler), - göçmenlerin etkisi altında gelişmeye başladığı iddialarını reddeder. Semireçye bölgesindeki Kazakların, sadece içinde Rus Kazak köylü yerleşimlerinin kurulmasından önce değil, aynı zamanda bölge Rusya’ya ilhak edilmeden çok önce de tarımla uğraşmaya başladığına dair bilgiler bulunmaktadır. Bölgede ilk Kazak köylerinde yaşayan toplulukların % 40’ı ile % 50 arasındaki bir bölümü henüz Rus köylülerine ait tarım yerleşimleri kurulmadan önce de tarımla uğraşmaktadırlar. Kuzey bölgelerde yaşayan Kazaklar Rus köylülerinden etkilenerek evler inşa ettiler, ek binalar yaptılar, hayvancılık için kapalı barakalar yaptılar. Ancak Kazakların tarımsal üretim kaynaklı yeni ekonomi biçimlerine geçişini yalnızca Rus kültürünün etkisiyle ilişkilendirmek yanlış olur. Bu geçiş, öncelikle sosyo-ekonomik nedenlerden kaynaklanmış, XIX. yüzyılın ikinci yarısında, ekonominin genel olarak yoğunlaşmasına bağlı olarak tarım, Kazak bozkırında önemli ölçüde gelişmiştir. Tarım Kazaklarda XIX. yüzyılın sonu - XX. yüzyılın başlarında, nüfusun önemli bir kısmının ana geçim kaynağı haline geldi. 1897 nüfus sayımına göre, Türkistan Bölgesi’nin toplam tarımsal nüfusunun %55,4’ünü köylüler-göçmenler ve Kazaklar oluşturuyordu”[39].

## Sonuç

Çokan Valihanov'un Sobraniye Soçineniy v Piyatı Tomah adlı külliyyatın birinci cildinde yer alan "Tarım Hakkında" adlı Rusça eserinin temel alındığı bu çalışmada Çokan Valihanov'a göre XIX. yüzyılda Orta Asya Türk Toplulukları arasında özellikle Kazaklar'da tarımın gelişimi üzerine durulmuştur. Ayrıca Kazaklarda tarımsal üretimin ve tarımsal ekonominin gelişmesi hususunda yazılmış olan Rusça kaynaklardan da yararlanılmıştır. Bu çalışma ile temel amacımız VII-XX. yüzyıllar arasında günümüz Kazakistan'ın tarımsal üretimde kat ettiği yol ve ürün çeşitliliği üzerinde durulmuştur. Görüldüğü üzere Kazaklar hem kendi ihtiyaçları hem de hayvanlarını beslemek için temel besin kaynağı olarak darı ekimi yapmıştır. Darının dışında diğer tarım ürünleri arpa, buğday, keten, kenevir bitkisi, kunak, mercimek, bezelye, fasulye, mısır (sorgum), daha sonra tohumları Çin'den getirilen musyuy<sup>10</sup>, susam, patates, pancar, sarı havuç, turp, Çin sukabağı, kavun, karpuz, salatalık, Çin tütününü ekimlerinin yansıra bağcılık ve bahçecilik alanında da üzüm, elma bu bölgede bol miktarda yetiştirilmektedir.

Kazakistan topraklarının çok önemli bir sorunu olan toprak erozyonunun önlenmesi ve bölgede modern tarımın yapılabilmesi için önemli adımlar atılması gerektiği de göz ardı edilmemelidir.

## Kaynaklar

1. Erbay, R., Ekonomik Kalkınmada Tarımın Rolü: Türkiye Üzerine Bir Değerlendirme. Balkan Sosyal Bilimler Dergisi, 2013. 2 (4):p.0-5.
2. İlgen, A., Bozkır Göçebelerinde Sosyo-Ekonomik Yapı. Sosyal Siyaset Konferansları Dergisi, 2005. 0(49):p. 818-839.
3. Doğan, Z., et al., Türkiye'de Tarım Sektörünün İktisadi Gelişimi ve Sorunları: Tarihsel Bir Bakış. Niğde Üniversitesi İktisadi ve İdari Bilimler Fakültesi Dergisi, 2015. 8 (1):p. 29-41.
4. Aydemir, C. and M. Pıçak, Ekonomik Gelişme Sürecinde Tarım-Sanayi İlişkilerinin Sektörler Arası Bütünleşmeye Etkileri. D. Ü. Ziya Gökalp Eğitim Fakültesi Dergisi, 2008. 10:p.129-147.
5. Demirbaş, N. and D. Tosun, Türkiye'de Tarımın Sanayi İle Entegrasyonu, Ortaya Çıkan Sorunlar ve Çözüm Önerileri. Adü Ziraat Fakültesi Dergisi, 2005. 2(2): p.27-34.
6. Topal, R. Ş., Tarım Sektörünün Topluma Karşı Sorumlulukları. Trakya Üniversitesi Sosyal Bilimler Dergisi, 2010. 12(1):p.1-31.
7. Duysevayeva, K. and A. Akaşeva, Kazakistan Cumhuriyetinin Ekonomik ve Sosyal Coğrafyası. 2011, Almatı.
8. Saray, M., Kazakistan. TDV İslâm Ansiklopedisi, 2002. 25: p.121-125.
9. Timor, A.N. et al., Geçmişten Günümüze Kazakistan'da Tarım Faaliyetleri. Iğdır Üniversitesi Sosyal Bilimler Dergisi, 2018. 15(7): p.233-255.

---

<sup>10</sup> Tahıl, hububat, tarlada yetişen besleyici bir bitki.

10. Vasilchenko, N. I. and G. A. Zvyagin, Proyavleniye agrogennoy transformatsii v počvah suhostepnoy zoni Respubliki Kazahstan. Vestnik Tomskogo Gosudarstvennogo Universiteta Biologiya, 2015. 1(29): p.6–15.
11. Dolgih, A., et al., Analiz Deyatelnosti v Oblasti Adaptatsii k İzmeneniyu Klimata v Tsentralnoy Azii Potrebnosti. Rekomendatsii, Praktiki, 2011, Almatı.
12. Kara, A. and O. Yeşilot, Avrasya'nın Yükselen Yıldızı Kazakistan. 2011, İstanbul.
13. Anonim, Transformatsiya Ekonomiki Kazahstana. 2017, Astana.
14. Grigoruk, V.V., and E.V. Klimov, Razvitie Organiçeskogo Selskogo Hozyaystva v Mire i Kazahstane. 2016, Ankara.
15. Selskoe hozyaystvo v Kazahstane; Available from: <https://www.kazportal.kz/selskoe-hozyaystvo-v-kazahstane/> [Erişim Tarihi: 02/04/2021].
16. Groşev, V. N., İrrigatsiya Yujnogo Kazahstana V Sredniye Beka. 1985, Almatı.
17. Sotsialno-Ekonomiçeskoye İ Politiiçeskoye Polojeniy e Kazahstane V XVI- XVIII Vekah; Available from: <https://stud.kz/ru/referat/show/95453> [Erişim Tarihi: 03/04/2021].
18. Groşev, V. N., İrrigatsiya Yujnogo Kazahstana V Sredniye Beka. 1985, Almatı.
19. Muhatova, O., Bıtoıye Nravı Jiteley Kazahskogo Hanstva. Balcanica Posnaniensia Acta et studia, 2013. 20:p. 85-89.
20. Hizmetli, S., Kazak Ulusu ve Kazak Tarihi Üzerine: Dünü ve Bugünü, İstem, 2019. pp.23-43.
21. Çağlar, A., Kazakistan'ın Ulus İnşa Süreci ve Ekonomi Politiiği. Karabük Üniversitesi, Sosyal Bilimler Enstitüsü Dergisi, 2018. 8 (1): p.60-84.
22. Hitchins, K., Kazaklar. TDV İslâm Ansiklopedisi, 2002. 25: p.131-132.
23. Frizen, D. YA., Traditsionnaya Struktura Agrarnıh Otnoşeniy V Zapadnom Kazahstane İ Eyo Vliyanıye Na Sotsialno-Politiieskoe Razvitie Obşçestva: XIX - Naçalo XX Veka. İstoriieskiye Nauki i Arheologiya Gramota, 2012. 8 (22): p.191-195.
24. Masanov, N. E., et al., İstoriya Kazahstana Narodı i Kulturi. 2000, Almatı.
25. Groşev, V. N., İrrigatsiya Yujnogo Kazahstana v Sredniye Beka. 1985, Almatı.
26. Mukataeva L. K. and G. J. Sultangazı, Rol hana Abılaya v sohranenii i razvitii mejdunarodnih svyazey Kazahskogo hanstv. Pravo i gosudarstvo, 2015. 2 (67), p.19-23.
27. Derviş, L. and K. Devrişeva, 19.yy. Kazak Türklerinin Aydını Çokan Velihanov Hayatı ve Eserleri. SUTAD, 2016. 40:p.128-129.
28. Valihanov, Ç. Ç., Sobraniye Soçineniy v Piyatı Tomah. 1984, Almatı.
29. Masanov, E. A., Nekotorıye Novye Materialy o Ç.Velihanove. 1964, Almatı.
30. Beysenbayuli, C., Şokan Velihanovtın Gılımı- Kırkemdik Dunietanıımı cane Ruhani Kundılıkta. Gılım cane Bilim Gasırı Dergisi, 2010. 7-9:p.87-99.
31. Velihanov, Ç. Ç., Köp Tomdik Şığarmalar Cınağı. 2010, Almatı.
32. Margulan, A., Şokan cane Manas(Çokan ve Manas). Cazuşı, 1971, Almatı.
33. Mantayev, T., Bir Tarih Kaynağı Olarak Muravyev ve Velihanov'un Eserleri, 2010. Yüksek Lisans Tezi, Sosyal Bilimler Enstitüsü, Ege Üniversitesi, İzmir, Türkiye.
34. Bazarbayeva, L., Çokan Velihanov(Eserleri), 2017. Yüksek Lisans Tezi, Sosyal Bilimler Enstitüsü, Ömer Halisdemir Üniversitesi, Niğde, Türkiye.
35. Margulan, A. H., Oçerk jizni i deyatelnosti Ç. Ç. Valihanova, Sobraniye Soçineniy v Pyati Tomah. Glavnaya Redaktsiya Kazahskoy Sovetskoy Entsiklopedii, 1984, Alma-Ata.
36. Valihanov, Ç. Ç., Sobraniye Soçineniy v Piyatı Tomah. 1984, Almatı.
37. Masanov, N. E., et al., İstoriya Kazahstana Narodı i Kulturi. 2000, Almatı.
38. Groşev, V. N., İrrigatsiya Yujnogo Kazahstana V Sredniye Beka. 1985, Almatı.
39. Begaliev, A. K. and K. Kosanbaev, İstoriya İzuçeniya Etnografii Naroda Turkeстана V Trudah Dorevolütsionnih Rossiyskih İssledovateley (V XVIII - Naçale XX VV). 2019, Almatı.

Omar, N.A., N.A. Zariman, and A.N. Huda, Pollination in the Tropics: Role of Pollinator in Guava Production. *International Journal of Life Sciences and Biotechnology*, 4(3): p. 623-639.  
DOI: 10.38001/ijlsb.9076962021.

## Pollination in the Tropics: Role of Pollinator in Guava Production

Nurul Alia Omar<sup>1</sup> , Nur Athirah Zariman<sup>1</sup> , A. Nurul Huda<sup>1\*</sup> 

### ABSTRACT

Pollinators are the key point for successful pollination in most flowering plants where around 90% of plants depend entirely on them. Majority of the pollinating species are wild, comprising bees, certain species of flies, wasps, moths, butterflies, thrips, beetles, bats, birds and other vertebrates, and among them insect pollinators are the most crucial. Fruit crops benefit in an impressive way from insect pollination, where there is a remarkable improvement both in the productivity and the quality of self-fertilized, self-incompatible and cross-cropping crops worldwide. The pollinators are responsible for assisting these flowering plants with their reproduction. However, the crisis of the pollinator's decline (wild and managed pollinators) which could seriously disrupt pollination activities in the ecosystems has attracted the attention of the world. Despite the growing concern about the decline in pollinators worldwide, some issues remain uncertain as data are often limited and undermined. Guava, *Psidium guajava* is a marketable fruit in numerous tropical and subtropical regions around the world. There has been a growing interest in pollination studies on guava because of its great economic importance. In guava, self-pollination is evident, however, it benefits greatly from insect pollination. This article aims to provide an overview of tropical pollination and pollination problems that have occurred around the world with a focus on pollination activities in guava.

### ARTICLE HISTORY

**Received**  
01 April 2021  
**Accepted**  
17 June 2021

### KEYWORDS

*Psidium guajava*,  
insects,  
fruit crops,  
pollination,  
reproduction

## Introduction

Pollination process is the act of pollen transfer to ensure reproduction. The meaning of pollination also includes the allocation of sustainable pollen from the mature anther to the receptive stigma, where the flowers are vector dependent to move pollen [1]. The Convention of Biological Diversity (CBD) has recognized pollination as an important component in the maintenance of biodiversity and plays a role in the ecosystems [2]. Pollinators are essential for the environment in which around the world 90% of the species of angiosperm are reliant on biotic pollination, for the reproduction and maintenance of genetic variability [3]. Pollinators show vital role in our daily lives by pollinating an estimated 35% of overall food volume [4]. Insects like bees are the most familiar

<sup>1</sup> Department of Plant Science, Kulliyyah of Science, International Islamic University Malaysia (IIUM), 25200 Kuantan, Pahang, Malaysia.

\*Corresponding Author: A. Nurul Huda, [anhuda@iium.edu.my](mailto:anhuda@iium.edu.my)

pollinators in the production of fruit. Apart from bees, butterflies, beetles, and flies are important pollinators during the day while bats and moths pollinate during the night [1]. Pollination success can be measured based on the percentage of fruit- and seed-set. Therefore, better quality fruit production can be assessed by studying the pollinator species and their roles in pollination activities [5].

However, the world is facing the decline in both wild and domestic pollinating insects for many reasons that could greatly disrupt pollination activities. The progress of pollination studies and their application in crop production, especially in the tropic are slow and complete study is yet to be carried out to utilize these pollinators to increase crops or horticultural productions. Nevertheless, the factors that lead to pollinator decline need to be clarified first in order to manage the issues. As for guava or goyave (*Psidium guajava* L.) from family Myrtaceae, it is native to tropical America and Mexico and well known as the “apple of tropics” [6]. Guava is now widely dispersed throughout the tropical and subtropical areas of the world where the chief producer of guava fruit is India followed by Pakistan, Mexico, Brazil and other countries such as Thailand, Egypt, Indonesia, Colombia, Sudan, Venezuela, Cuba, Bangladesh, the US, Vietnam and Malaysia [7]. Guava is a cross-pollinated crop but self-pollination also occurred [8,9]. In guava, studies showed that the distribution of cross-pollination by insects is about 35% and it is said that cross-pollination was the most common form of pollination in guava [10].

The present review aims to provide a general overview of the pollination in the tropics and the pollination issues that happened worldwide with emphasized on the pollination activities in guava. This review specifically highlights the guava pollination requirements and the diversity of possible guava pollinators which will be able to help produce better crop and increase productivity. Besides, the potential issues of pollination that occurred all over the world are discussed in order to measure the global crisis of declining pollinators. Finally, the future prospects for research on pollination in guava are analysed.

### **Pollination and Role of Pollinator in Crops Production**

Pollination include transferring pollen to ensure fertilization and reproduction that give rise to fruits and seeds [10]. The pollen grain will germinate and pollen tube grows, developing through the supporting style to the ovary after landing on a receptive stigma [11]. Usually, angiosperms exhibit two types of pollination which are self-pollination or selfing and cross-pollination or outcrossing [12]. Self-pollination takes place within a

flower while cross-pollination occurs when pollen from one flower is passed to the stigma of another flower. The pollen cannot move by itself as it is a non-mobile spore, so it must be transported from the anther to the stigma by some vectors. The vectors include the action of abiotic forces such as water and wind, however, 80% of the flowers count on biotic forces including butterflies, bats, flies, birds, beetle and other insects [11].

Pollinators need to forage on plants or flowers to ensure fruits productions for crop productivity. Report suggested that a sufficient number of pollinators are able to increase the fruit crop productions [13]. Moreover, pollination has economic importance where more than one third of human diet resources are contributed by insect pollinators [14]. Pollinators also play a significant role in most terrestrial ecosystems and represent a fundamental ecosystem service that is mandatory for maintaining both wild plant populations and agricultural yield [15]. The effectiveness and efficiency of pollinators can be measured by the amount of pollen deposited by insects, so it is important to have access to the role of pollinators and species. Besides, pollination success can also be measured based on the percentage of fruit-set and seed-set [5]. Apart from this, plants and pollinator have mutualistic relationships where insects need food such as nectar while plants need these pollinators services for reproduction [14]. Moreover, the productivity and quality could be improved by pollinators, where good pollination activities could improve the stability of agricultural production, reducing yield variability annually, protecting the effects of climate change and changing land use. If there are not enough suitable insects to pollinate the crops that need them, then they will not yield to their full force.

It was mentioned that around 73% of global crops are based on pollination by different types of bees, 19% from flies, 6.5% from bats, 5% from beetles, 5% from wasps, 4% from moths and butterflies and 4% by birds [16]. Research found that the main groups of insects pollinating plants belong to the four largest orders namely Hymenoptera (bees, ants and wasps), Diptera (flies), Coleoptera (beetles), and Lepidoptera (butterflies and moths) [17]. Hymenoptera is a large order of insects which consists of sawflies, wasps, bees and ants. They can be found in most habitats, particularly in tropical and subtropical regions where bees are the most abundant and prosperous pollinators because they depend entirely on flowering plants as they only feed on pollen and nectar

during their lifetime [1,18]. Diptera such as male mosquitoes, pollen-feeding Stryphidae and midges also able to pollinate flowering plants [17]. Meanwhile, some beetles families such as Scarabaeidae, Elateridae and Cerambidae are known to visits flowers and could also pollinated them [19]. As for Lepidoptera, some butterflies are known to visit flowers with a variety of morphologies and colours [20]. The minority of pollinators includes the Orthoptera that feed on pollen and some Heteroptera that visit flowers for nectar as well as the insects that use the flowers as spots to attract their prey. Thrips (Thysanoptera) are found on flowers and frequently fodder on flower tissues and pollen which give more damage than good. Among pollinators, insects are vital in the production of most of the fruits and vegetables consumed and for the regeneration of many fodder crops used by livestock [21].

Bees are the native pollinators that are found abundant in tropical countries including Malaysia that pollinates local crops such as starfruits, guava, citrus, mango, watermelon, durian and coconut [22]. Recent studies reported that pollinators that visited guava flowers consisted of insects that belongs to the family Hymenoptera, Diptera and Lepidoptera [10]. Meanwhile, other researchers stated that guava visitors includes Hymenoptera, Diptera and Coleoptera [23]. Hymenopteran are said to be the most dominant pollinators in guava [10,23]. Study conducted on tropical mango orchard found that insect pollinator services contributed about 53% of total mango fruit production [24]. In addition, Hymenoptera and Diptera order are most dominant pollinators in mango orchards, although other order such as Lepidoptera and Coleoptera were recorded but they are remarkably not so much important pollinators [25]. Other than that, there are about 94% of bees that visited watermelon where out of these, 85% are honeybees and 15% wild bees [26]. In apple fruit crop, solitary bees contributed to more than 50% of pollination service in three out of four varieties (Cox, Gala and Bramley) meanwhile bumblebees contributes about 38% of services in Braeburn and less than 21% in other varieties [27]. In addition to that, honeybees contributed to around 23% to 28% of total crop while hoverflies contributes to less than 3% of pollination to all apple varieties [27]. For avocado and citrus, there are three major pollinator orders found visiting their flowers which are Hymenoptera, Lepidoptera and Diptera with visits that accounted for 42%, 33% and 25%, respectively [28].



## **Pollinator Issues, Status and Impact**

Pollination services are expected to add billion dollars to global crop productivity and contribute greatly to dietary security. Developed countries, such as the United States, Europe, Japan and China count on natural pollinators for crop production, while less advanced regions, such as South Asia, India and Sub-Saharan Africa rely highly on natural pollinators to produce crops that provide essential nutrients [29]. Some studies have shown that number of pollinators is decreasing and eventually lead to a decrease in plant production owing to poor pollination, despite the fact that the global demand for pollination services is high at all times and is likely to grow continuously [30]. However, so far, no complete research has been done on the pollinator's overall performance. Although there are increasing concerns in this regard, data on the current status and population trends of most pollinating species worldwide remain unknown and generally is taxonomic and geographically biased [31]. Furthermore, information on pollinators in other countries outside Europe and the United States is almost inaccessible. Most of the data on the declines of pollinators globally are said to be biased because it is highly restricted to Western countries only. Besides the published evidence of pollinator declines likely to come from Western countries, there is also increasing data on the decline of pollinators in other regions such as Asia, although it is not well established. For example, some researchers have reported a decline in local bee populations such as the loss of *Apis andreniformis* in Thailand and Vietnam, *Apis koschevnikovi* in Malaysia, *Apis dorsata* in Cambodia and *Apis laboriosa* in Vietnam [32]. The pollinating species will disappear with time and the world will lose the key and irreplaceable species for ecosystems. When the pollinators disappear, there will be huge environmental influences and the number and variety of wild plants will decrease and disturb the balance of the ecosystems.

Wild and managed insects provide the pollination services that depended heavily on the number of insects and could be improved by various pollinating communities. However, with the long-term decline in species distributions, pollination services for wild crops and plants are expected to be reduced in the long term. As a society that increasingly dependent on pollinators, the decline in both wild and domestic pollinators could significantly disrupt pollination activities, as pollinators bring significant economic importance to plant production by enhancing the quality and quantity of crops [33].

Research suggested that the decline in pollinators would have an impact on three main crop categories, including edible fruit, vegetables and oilseeds [29]. In the region that is heavily dependent on pollinators for the production of crops, lack of pollinators could result in loss of nutrients such as vitamin A, folate and iron deficiencies [4]. The decline in pollinating populations could lead to a significant increase in preventable diseases associated with nutrient diets, particularly in areas that are vulnerable to nutrient deficiencies. Moreover, simultaneous decline in native and managed pollinators could also affect various ornamental plants, crops for fibers, biofuels, fodder, wood and protection plants that depend on pollinators [34]. Their pollination services are responsible for global biodiversity and the maintenance of human food supply. This pollination crisis can threaten worldwide and native food security, which can exacerbate the existence of species and the flexibility of ecosystems.

The loss of diversity and abundance of pollinators has been debated in many studies and reviewed worldwide [15,35] where there is a significant reduction in the abundance and diversity of wild bees recorded in continental Europe and Britain [36]; Asia [37]; South America [38]; North America [39]; and South Africa [40]. Other pollinators such as honeybees, hoverflies, butterflies, moths, flower-visiting wasps, birds and mammals also have been observed to decline in their diversity and abundance. Study found that the request and intake of insect-pollinated crops is increasing at a higher rate than managed bee colonies [41]. The reduction of the pollination service can lead to inadequate seed formation and reduce the quality of fruits that disrupt food supply in natural communities. This would entail a huge loss for farmers and create an economic gap.

### **Potential Cause of Pollinator Decline**

In year 1998, the first major global conference was held in Sao Paulo, Brazil to discuss any major problems related to the decline of pollinators. This conference was attended by more than 60 pollinators experts representing different countries in the New and Old World [17]. The issues discussed were the documentation on the decline of pollinators; the reasons of the drop and restoration of pollinators; increase study on non-honeybee pollinators; conservation of pollinators and increasing awareness of pollinator services. However, to manage these issues, the factors leading to the reduction of pollinators should first be identified. The causes of the decline of pollinators continue to be widely

discussed. Globally habitat loss due to land use transformation and land management changes following agricultural intensification are the main reasons [30]. However, the reasons for pollinator declines may differ according to each region. Degradation and fragmentation of near and semi-natural habitats could alter pollinating populations and harm insect pollinators communities [42]. In addition, the rate of genetic erosion due to habitat fragmentation and degradation by reducing the genetic flux between demes would increase the probability of extinction in populations and species. Besides, the other possible reason for the decline in pollinators was the loss of significant resources, such as food, foraging ground, nesting area and reproduction because of habitat transformation, fragmentation and degradation for human demand and needs [43]. Since some wild pollinators may need habitat without disturbance to nest and search for food, they are very vulnerable to habitat fragmentation and degradation.

In most parts of the world, the intensification of agriculture appears to be an important factor in the decline of the insect populations. Increase on the use of agrochemicals, leading to possible habitat deprivation within agricultural regions [44] that results in major declines in insect biomass and diversity. The intensification of agriculture leads to misuse of pesticides particularly herbicides and insecticides that may pose as imminent threat to pollinators [15]. Pesticides and herbicides used to control pests and weeds could also cause loss of direction in bees and could have unintended direct and indirect effects on the beneficial pollinators [45]. The use of insecticides may also have killed useful pollinators by direct poisoning [46] and may lead to local changes in the diversity and abundance [47]. Moreover, fertilizers and herbicides may indirectly influence pollinators by reducing the inflorescence availability [48]. All handled or wild pollinators must be protected against excessive use of pesticides and other chemicals that may interrupt reproduction when these chemicals reduce the sources of nectar for pollinators, reduce nesting materials for bees, and destroy host plants of butterflies and moths larvae [45].

The other factor that calls for the decline of pollinators is the inception of invasive alien species including plants, pollinators, parasites and pathogens. The introduced exotic plants can thrive by evading the biological regulation of population size, by possessing or evolving phenotypic characteristics or by occupying a vacant ecological niche in the receiving ecosystem evolving phenotypic traits that confer a competitive advantage to

indigenous plant species [49]. As a result, pollinators may physiologically or behaviorally compensate for spatial and temporal variations in nutrient accessibility due to invasive alien plants, which effects are indirect, chronic and possibly not detected before or when in combination with other stress factors. For example, alien plant *Impatiens glandulifera* in Northwestern Europe increase the persistence of native bumblebees when native nectar were depleted where the alien plants with attractive flowers reduced the reliance of native bees on native plants [50]. Meanwhile, the introduction of managed pollinators for crop pollination and honey production may influence native pollinators through competition for resources. For example, the rivalry of extraterrestrial bees has transformed the behaviour and reproductive success of indigenous pollinators. The possibility is that with little competitive displacement of native pollinators, the super-generalist bee introduced becomes readily incorporated into native pollinator systems by inhabiting a distinct ecological niche [49]. The result of transcontinental transport of pollinating bees beyond their native areas leads to a higher probability of transfer of pathogens and parasites to new hosts that may cause the population of indigenous pollinators to decline. Evidence shows that transferred alien bees can also surge the risk of pathogens spreading, including the spread of *Varroa mites* which is a virus transmitter in hives that affect honeybees [45]. Climate change could also be one of the most damaging threats to pollinating biodiversity that affects the spatial-temporal dynamics of plant-pollinator relationships [51,52]. Most effects of weather on pollinators are on butterflies, although research on other pollinators is still scarce [15]. Bumblebees mainly show adaptations to colder climates due to their thick hair, which is also one of the reasons why they are so good pollinators [53]. Yet, a relationship between the climate niche and the decline in British bees where their population is declining due to closer climate change was observed [54]. The effects of climate change occur at all organizational levels, from the individual level, through the genetics of the population, movement at the species level and at community level. Estimates of the reaction of pollinators to climate change depend to a large extent on the ability of species to adapt to the warmest climate and/or to disperse and colonize new appropriate areas [53]. In addition, climate change causes incompatibility in temporal and spatial coincidence and in morphological and

physiological interdependencies of plants and pollinators that react differently, which could disrupt their interaction [15].

## **Pollination of Flowering Plant with Emphasize on Tropical Guava**

### ***Psidium guajava*; apple of tropic**

The genus *Psidium* has about 150 species [55,7] that are all trees or fruit shrubs originating in tropical and subtropical America and *Psidium guajava* is one of the most important fruits of this genus. Guava (*Psidium guajava* L.) belonging to the Myrtaceae family, originated from southern Mexico and Central America, was already widespread in the American tropics, Asia, Africa and the Pacific Islands a long time ago [56]. Guava is known as *guayabo* or *guayavo* in Spanish, *goyave* or *goyavier* in French, *guyaba* or *goejaaba* in Dutch, *guave* or *goejaba* in Surinamese, *goiaba* or *goaibeira*. in Portugese, *kuawa* in Hawaii, *abas* in Guam and *guava* or *jambu batu* in Malaya [57]. There are a number of marketable varieties of guava worldwide and in Malaysia, the common cultivars include ‘Kampuchea’, ‘Jambu Kapri’, ‘Jambu Biji’, ‘Putih’, ‘Hong Kong Pink’, ‘Bentong Seedless’, ‘Maha 65’, ‘Taiwan Pear’ and ‘Vietnamese’ [7,58].

Guava fruit can weigh about 100-250 g and 5-10 cm in diameter with four or five sepals protruding at the apex. The fruit comes in various forms including spherical and ovoid and surfaces from rough to smooth. Depending on the cultivars, the unripe fruit is usually dark green colour that changes to yellow-green, light yellow and yellow with red flushing at the ripening stage. The seed cavity in the center of the fruit may be small or large with many hard or semi-hard seeds. Due to the presence of stone cells (78%), which have highly lignified cell walls, the outer mesocarp of the fruit of the guava is sandy or thick in texture while the endocarp tissue is high in parenchymatic cells and weak in the stone cells [7]. Guava is widely known as food cultivation and medicinal plant that benefits humans. Apart from being consumed due to its sweet-sour taste and pleasant aroma, guava fruit consists of high vitamins, phenolic compounds, tanins, essential oils, sesquiterpene alcohols, flavonoids and triterpenoid acids which are considered healthy. The guava plant is traditionally used in many countries as a medicinal plant for treatment of variety of diseases as all parts of the tree are considered useful to treat illnesses [59].

### **Pollination requirement of guava**

Pollination requirements needed by guava tree is not commonly known to the public due to insufficient studies published [54]. The authors [54] focused on the pollination of guava cultivar '*paluma*' that widely cultivated in Northeastern Brazil as an important crop. The concept of pollination of the guava flowers such as the time of stigma receptivity, duration of anthesis and the type of pollination that usually occurred in guava flowers was discussed in the paper. The claimed included that the stigma becomes receptive 2 days before anthesis and during pre-anthesis that lasts for 30 hours. They also stated that when anthesis occurs, the stigma becomes receptive, and this occurred 2 to 3 hours after flower opening. Adding to that, the research stated that the maximum set of fruits occurs when the stigmas are pollinated within 2 hours after anthesis and the greatest period of susceptibility to stigma is within 1 hour of flower opening in the wild species of *Psidium* [54]. Nevertheless, for a pollinating agent to be considered effective, their foraging behaviour should favours the pollination requirements, visiting the flowers during the stigma receptivity hours and performing in a way that provides the transport of pollen from the anthers to the stigma of that flower or another flower [60].

In majority of guava cultivars studied in India, the peak opening (anthesis) is between 5.00-7.00 a.m. though anthesis starts at 4.00-10.00 a.m. while the dehiscence of anthers occurs about 15-20 minutes after anthesis [61]. Adding to that, the authors mentioned that in guava even though in the early times of the day, visits made right after the flowers opened, theoretically can lead to better pollination rates [54]. They added that the stigma is more receptive at this period and lasts for about 2 hours before starting to become unreceptive. At this moment, the flower has a pleasant aroma and releases most of the pollen, attracting many floral visitors. This account is strengthened by the fact that the morphology of guava flowers indicates a tendency towards melitofilia as they have white flowers that discharge sweet odour during the day, anthers with a lot of pollen and flowers without depth that ease the access of the pollinators [6]. Guava bears a hermaphrodite flower and can self-pollinate. However, self-pollination are unusual without the help of pollinators [62]. Besides, cross-pollination are considered as the most frequent form of pollination in guava [6].

Moreover, study showed that the distribution of cross-pollination by insects is about 35% where it is said that cross-pollination was the most common form of pollination in guava because of the two appearances/criteria [10,63]. As mentioned earlier, the first criteria include the morphology of the guava inflorescence that points to a tendency towards melitofilia. Moreover, the style is longer than filaments thus self-pollination is uncommon in guava. The second criteria include the fact that guava flowers are likely to be visited by solitary and social bees. Several studies on guava pollination mentioned that bees, especially honey bees are their major pollinators [64–66] that contribute about 25.70 to 41.30 % cross pollination [10]. The authors added that cross pollination in guava could lead to a better fruit yield, higher production of fruit mass and number of seeds. Generally, if flowers are not fertilized early, they may fall early or insufficient pollination may lead to distorted fruits. Even auto-pollinated varieties produce more and better fruits when they are cross pollinated than when auto-pollinated [13]. The studies of pollination in guava is not widely done yet. Nevertheless, the effect of different pollination treatments on guava fruit yield was observed [67]. The authors stated that in the cross-pollination between plants of the same cultivar and between plants of different cultivars followed by free pollination gave the best results in fruit retention. At harvest, cross-pollination treatments of the same cultivar or a different cultivar also produced the highest number of fruits avenged. In guava, different types of pollination were compared and observed which showed that cross-pollination produces significantly more fruits compared to self-fertilization and restricted pollination [67]. Besides, the existence of floral visitors to promote cross-pollination favours increase in fruit production in guava[6].

The viability of pollen is crucial in plant breeding as it marked the fecundation and fertilization efficiency of the male gamete [68]. It is important to control the profitability of pollen in order to ensure possible germination and pollination. The viability of pollen can also be considered as an additional parameter when selecting genotypes in the selection of parents [69]. The most common method to tests for pollen viability is staining method as it ensures rapid results based on colour changes. Pollen viability test can also be done through *in vivo* and *in vitro* germination. Staining methods expressed the germination potential, meanwhile *in vivo* and *in vitro* show the

occurrence of germination. *In vivo* germination will stimulates natural germination and more valid than *in vitro* germination, but, it is requiring considerable time and effort [70]. Other than that, a good nectar content also important for guava production. Flower nectar can influence the type, schedule, and behaviour of pollinator visits and affect both pollen transfer and fitness [71].

In addition, guava harvest is greater in the open pollination treatment, where this could be explained by the pollinators' act, in particular insect pollinators, where several species of bees have been reported visiting guava flowers favouring cross pollination [67]. They found out that the bees *Apis mellifera*, *Trigona spinipes*, *Xylocopa frontalis*, *Melipona subnitida* and *Partamona cupira* are important floral visitors. Aligned with the findings, guava flowers are moderately dependent on bee pollination such as honeybees, bumble bees and wild bees [72]. Research claimed that the first insect that visited guava is the bee where, during the anthesis, it would search for pollen by attacking the petals in order to remove the obstacle and as the daytime where temperature increases, other insect pollinators may appear too. In this context, the role of insect pollinators especially bees in guava production has to be realized and enhanced to attain better yield of fruits [61]. In addition, the abundance and diversity of insect associated with guava plant were observed and they were classified as pests, predators and pollinators [64]. The authors found that the pollinators species range from 1.5% to 30.1% and consisted of 10 species in 8 families and 3 orders (Lepidoptera, Diptera and Hymenoptera) and it was suggested that among the pollinators, house fly showed the highest abundance. Studies also found 3 different insects species that visited organic and conventional guava ecosystems which includes Hymenoptera, Diptera and Lepidoptera species where Hymenoptera species was the most dominant pollinator group that accounted for maximum relative abundance of 95.85% for organic guava ecosystem and 94.42% for conventional guava ecosystem [10]. After fertilization, the flowers will develop into ripe fruits that are berries or capsules, varying in size from 2.5 to 10 cm in diameter and have 4 or 5 outstanding floral remnants at the apex. The form of the fruit may be ovoid, elongated, globose, or pear-in diameter. The surface of the fruits can be smooth or rough. The colour of the skin of some varieties can be pink, salmon, white or yellow [73]. The interior walls of the carpels are lush and variable in thickness and the seeds are incorporated into the pulp.



The fruits may have thick pulp with only a few seeds in a small central cavity, or thin flesh with numerous seeds incorporated in a large mass of pulp [7]. Moreover, most commercial varieties are diploid, while the seedless variety is triploid and crosses have been made between these two varieties to produce a variety with fewer seeds and better yield potential. The seeds are small, bony, kidney-shaped, flattened, light yellow or yellowish brown. Depending on the temperature during the development of the fruit, the days from the anthesis to the harvest may differ from approximately 120 to more than 220 days, where the variation between the different cultivars can be up to 60 days [74].

## **Future Prospect and Conclusion**

Pollination leads to seed production and is important for breeding in many crops around the world. There is less value in improving resistance to crops and diseases if it is not accompanied by high quality, so it is necessary to give priority to the development of good fruit quality. As for guava, its demand is increasing worldwide for fresh and processing purposes, as guava fruits offer the consumers diverse of shape, skin and fresh colour and flavour. Research on the pollination of guava has been conducted over the past decades. Although pollination studies have been conducted all over the world, the available information on the pollination of guava remains limited and focuses mainly on the countries that produce higher guava crops such as India and Brazil. In addition, the use of pollinating insects is not well known in countries producing smaller guava crops. Many of the newly grown species and cultivars require or benefit from insect pollination mostly by bees such as honeybees in guava. The pollination of insects preserves the genetic diversity of plant populations and offers benefits such as increasing the quality and quantity of fruits, seed production and fertility, leading to a better vigour of the next generation. Both community and species-level studies are important for understanding current trends in plant-pollination interactions. Studies on bee pollination are widely studied, however, for non-bee pollinators are clearly underwritten. Pollinators such as butterflies, moths, wasps, flies, mammals and birds may be important for certain plant crops. More studies are required to highlight the importance of these poorly studied pollinators. There are many ways for action to help these issues include collaboration among interested biologists through the management

of habitat protection plans for several threatened species if the land stewards also able to participate along with the stakeholders. In addition, the biologists strive to conserve known areas to naturally host healthy pollinator populations.

Among temperate environments, there is a large number of studies which provides significant evidence that cross pollination between trees is essential for effective pollination and fruit plethora. With regard to guava cultivars, further study should be made of the pollination of wild guavas and native wild-type cultivars. For insect pollinators their places of origin should be investigated to better understand the pollinators that could be used for commercial orchards. Moreover, since tropical insect pollination studies are less compared to temperate countries, the pollination of insects in the tropics should focus more on the search for new effective native pollinators of crops such as guava and the use of their already known pollinators such as honeybees.

In conclusion, this review suggests that understanding pollination requirements and the impact of pollination problems on crops such as guava are fundamental to the success of pollination leading to better crop productivity. Interactions of environmental factors such as temperature, relative humidity, wind speed and their effects on crops and insect behaviour, especially in tropical climate, should also be taken into account. Many types of pollinators, habitats and regions have received little attention, which is why this review is designed to encourage researchers, farmers, horticulturalists and researchers to look more closely at the role of pollination and to identify new innovative ways to produce better crops production in the future.

#### **Acknowledgements**

We sincerely thank the staff and administration of the Kulliyyah of Science, IIUM Kuantan for their assistance and support in this study.

#### **Funding**

This study is funded by research grant (FRGS/1/2019/WAB01/UIAM/02/6) awarded by the Ministry of Higher Education to the corresponding author.

#### **Availability of data and material**

Please contact the corresponding author for any data request.

#### **References**

1. Halder, S., et al., Role of pollination in fruit crops: A review. *Journal of Pharmaceutical Innovation*, 2019. 8: p. 695–702.
2. Partap, U., *The Pollination Role of Honeybees*, in *Honeybees of Asia*, Springer 2011, Berlin, Heidelberg: Germany. p. 227-255.

3. Menz, M.H.M., et al., Reconnecting plants and pollinators: Challenges in the restoration of pollination mutualisms. *Trends Plant Science*, 2011. 16: p. 4–12.
4. Marshman, J, Blay-Palmer, A., and Landman K., Anthropocene crisis: Climate change, pollinators, and food security. *Environments – MDPI*, 2019. 6: p. 1–16.
5. Delaplane, K.S., et al., Standard methods for pollination research with *Apis mellifera*. *Journal of Apicultural Research*, 2013. 52: p. 1-28.
6. Vinod, M. and Sattagi, H.N., Foraging activity of pollinators in guava under organic and conventional farming systems, 2018. 6: p. 865–872.
7. Singh, S.P., Guava (*Psidium guajava* L.). *Postharvest Biology and Technology Tropical and Subtropical. Fruits Cocona to Mango*, Woodhead Publishing Limited, 2011. p. 213–245.
8. Rai, M.K., et al., Biotechnological advances in guava (*Psidium guajava* L.): recent developments and prospects for further research. *Trees*, 2010. 24: p. 1–12.
9. Sarkar, T., Sarkar, S., and Vangaru, S., Effect of Sucrose and Boric Acid on in-vitro Pollen Germination of Guava (*Psidium guajava*) Varieties. *Advances Research*, 2018. 15: p. 1–9.
10. Vinod, M. and Sattagi, H.N., Pollinator Fauna and Their Relative Abundance in Guava. *Journal of Experimental Zoology*, 2018. 21: p. 1173–1179.
11. Calderone, N.W., Insect pollinated crops, insect pollinators and US agriculture: Trend analysis of aggregate data for the period 1992-2009. *PLoS One*, 2012. 7: p. 24–28.
12. Farré-Armengol, G., et al., Pollination mode determines floral scent. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2015. 61: p. 44–53.
13. Pashte, V.V. and Kulkarni, S.R., Role of Pollinators in Qualitative Fruit Crop Production: A Review. *Trends Biosciences*, 2015. 8: p. 3743–3749.
14. Nepi, M., Grasso, D.A. and Mancuso, S., Nectar in plant–insect mutualistic relationships: From food reward to partner manipulation. *Frontiers in Plant Science*, 2018. 9: p. 1–14.
15. Potts, S.G., et al., Global pollinator declines: Trends, impacts and drivers. *Trends Ecology and Evolution*, 2010. 25: p. 345–353.
16. Bashir, M.A., et al., Seasonal variations in abundance and diversity of insect pollinator in forest ecosystems of Southern Punjab Pakistan. *Pure and Applied Biology*, 2015. 4: p. 441–452.
17. Frankie, G. W., & Thorp, R. W. (2009). Pollination and pollinators. *Encyclopedia of Insects (Second Edi)*. Elsevier Inc.
18. Willmer, P., & Finlayson, K. (2014). Big bees do a better job: intraspecific size variation influences pollination effectiveness. *Journal of Pollination Ecology*, 14(23), 244–254.
19. Funamoto, D. (2019). Plant-Pollinator Interactions in East Asia: a Review. *Journal of Pollination Ecology*, 25(6), 46–68.
20. Corlett, R. T. (2001). Pollination in a degraded tropical landscape: A Hong Kong case study. *Journal of Tropical Ecology*, 17(1), 155–161.
21. Kumar, G.R., et al., Beekeeping for poverty alleviation and livelihood security. *Technological aspects of beekeeping*, 2014, 1.
22. Norliyana, A., Ismariah, A., Lim, H.F., Assessing Economic Benefits of Pollination Services by Natural Pollinators. *Plant Productivity and Environmental Conservation*, 2019. p. 132.
23. Kadam, D.M., Kaushik P., and Kumar R., Evaluation of Guava Products Quality. *International Journal of Food Science and Nutrition Engineering*, 2012. 2: p. 7-11.
24. Nurul Huda, A., et al., Pollination Services of Mango Flower Pollinators. *Journal of Insect Science*, 2015. 15: p. 113.
25. Kumar, S., et al., Role of Insects in Pollination of Mango Trees. *International Research Journal of Biological Sciences*, 2016. 5: p. 64–67.
26. Pisanty, G., et al., Watermelon pollinators exhibit complementarity in both visitation rate and single-visit pollination efficiency. *Journal of Applied Ecology*, 2016. 53: p. 360–70.
27. Garratt, M.P.D., et al., Apple pollination: Demand depends on variety and supply depends on pollinator identity. *PLoS One*, 2016. 11: p. 1–15.

28. Mehmood, K., et al., Insect pollinators visiting citrus (*Citrus limon*) and avocado (*Persea americana*) fruit trees. *Asian Journal of Agriculture and Biology*, 2015. 3: p. 23-27.
29. Das, A., et al., A review on: Importance of pollinators in fruit and vegetable production and their collateral jeopardy from agro-chemicals. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 2018. 6: p. 1586–1591.
30. Dicks, L., et al., A global assessment of drivers and risks associated with pollinator decline. *Research Square*, 2020. p. 1–23.
31. Bartomeus, I., et al., Historic collections as a tool for assessing the global pollinator crisis. *Philosophical Transactions of the Royal Society* 2018. 374: p. 1–9.
32. Guerin, E., Native Honey Bees of Southeast Asia and Conservation Challenges. *Heinrich Böll Found*, 2020. p. 1–11.
33. Steele, D.J., et al., Management and drivers of change of pollinating insects and pollination services. *Department of Environment, Food and Rural Affairs, UK* 2019.
34. Van der Sluijs, J.P. and Vaage, N.S., Pollinators and Global Food Security: the Need for Holistic Global Stewardship. *Food Ethics*, 2016. 1: p. 75–91.
35. Gallai, N., et al., Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. *Ecological Economics*, 2009. 68: p. 810–821.
36. Ollerton, J., et al., Extinctions of aculeate pollinators in Britain and the role of large-scale agricultural changes. *Science*, 2014. 346: p. 1360.
37. Oldroyd, B. and Nanork P., Review article Conservation of Asian honey bees. *Apidologie*, 2009. 40: p. 296–312.
38. Morales, C.L., et al., Rapid ecological replacement of a native bumble bee by invasive species. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 2013. 11: p. 529–534.
39. Burkle, L. A., Marlin, J. C., & Knight, T. M. (2013). Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Scienceexpress* (Vol. 10).
40. Pauw, A., Collapse of a Pollination Web in Small Conservation Areas. *Ecology*, 2007. 88: p. 1759–1769.
41. Aizen, M.A. and Harder, L.D. The Global Stock of Domesticated Honey Bees Is Growing Slower Than Agricultural Demand for Pollination. *Current Biology*, 2009. 19: p. 915–918.
42. Cardoso, P., et al., Scientists' warning to humanity on insect extinctions. *Biological Conservation*, 2020. 242: p.108426.
43. Klein, A. M., et al., Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proceedings of the royal society B: biological sciences*, 2007. 274(1608): p. 303-313.
44. Raven, P.H. and Wagner, D.L., Agricultural intensification and climate change are rapidly decreasing insect biodiversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2021. 118: p. 1–6.
45. Kluser, S. and Peduzzi, P., *Global Pollinator Decline : A Literature Review*, UNEP, 2007. UNEP/GRID Europe. ©: Europe. 4.
46. Alston, D.G., et al., Effects of the Insecticide Phosmet on Solitary Bee Foraging and Nesting in Orchards of Capitol Reef National Park, Utah. *Environmental Entomology*, 2007. 36: p. 811–816.
47. Brittain, C.A., et al., Impacts of a pesticide on pollinator species richness at different spatial scales. *Basic and Applied Ecology*, 2010. 11: p. 106–115.
48. Gabriel, D. and Tschardtke, T., Insect pollinated plants benefit from organic farming. *Agriculture, Ecosystem and Environmental*, 2007. 18: p. 43–48.
49. Vanbergen, A.J., Espíndola, A. and Aizen, M.A. Risks to pollinators and pollination from invasive alien species. *Nature Ecology and Evolution*, 2018. 2: p. 16–25.
50. Kleijn, D. and Raemakers, I., A retrospective analysis of pollen host plant use by stable and declining bumble bee species. *Ecology*, 2008. 89: p. 1811–1823.
51. Rhodes, C.J., Pollinator decline – An ecological calamity in the making?. *Science Progress*, 2018. 101: p. 121–160.

52. Mayer C., et al., Pollination ecology in the 21st century: key questions for future research. *Journal of Pollination Ecology*, 2011. 3:p.8-23.
53. Ollerto, J., Pollinator Diversity: Distribution, Ecological Function, and Conservation. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 2017. 48: p. 353–376.
54. Williams, P.H., Araújo, M.B. and Rasmont, P., Can vulnerability among British bumblebee (*Bombus*) species be explained by niche position and breadth?. *Biological Conservation*, 2007. 138: p. 493–505.
55. Menzel CM. Guava: an exotic fruit with potential in Queensland. *Queensl Agric J* 1985;111:73–79.
56. Mahmoud, H.H. and Peter, T.S., Biochemical Screening in Fruits of Guava (*Psidium guajava* L.) Genotypes. *Journal of Emerging Trends in Engineering and Applied Sciences*, 2014. 5: p. 135–144.
57. Dinesh, M.R. and Vasugi, C., Guava improvement in India and future needs. *Journal of Horticulture Sciences*, 2010. 5: p. 94–108.
58. Mitra, S.K. and Thingreingam Irenaeus, K.S., Guava cultivars of the world. *International Symposia on Tropical and Temperate Horticulture*, 2016. 1216: p. 905–910.
59. Barbalho, S.M., *Psidium Guajava* (Guava): A Plant of Multipurpose Medicinal Applications. *Med Aromat Plants*, 2012. 104: p. 2167-2412.
60. Roubik, D.W., Pollination of cultivated plants in the tropics. *Food & Agriculture Org.*, 1995. 118.
61. Pommer, C. V. and Murakami, K.R.N., Breeding guava (*Psidium guajava* L.). *Breeding Plantation Tree Crops. Tropical Species*, 2009, p. 83–120.
62. Kadam, M.D., Kaushik, P. and Kumar, R., Evaluation of Guava Products Quality. *International Journal of Food Science and Nutrition Engineering*, 2012. 2: p. 7–11.
63. Coser, S.M., et al., Assessment of genetic diversity in *Psidium guajava* L. using different approaches. *Scientia Horticulture*, 2012. 148: p. 223–229.
64. Amin, M.R., et al., Abundance and Diversity of Insects on Guava and Foraging Behavior of Pollinators. *Bangladesh Journal of Ecology*, 2019. 1: p.. 31–34.
65. Singh, A.K. and Thakur, R.K., Estimation of optimal pesticide application time on guava (*Psidium guajava*) based on temporal foraging activity of pollinators. *Indian Journal of Ecology*, 2017. 44: p. 375–378.
66. Alves, E. and Magalh, B., Foraging behavior and pollination efficiency of five bee species on guava (*Psidium guajava* L.) flowers. *Revista Ciência Agronômica*, 2006. 37: p. 216–220.
67. Alves, J.E. and Freitas, B.M., Pollination requeriments of guava. *Ciência Rural*, 2007. 37: p. 1281–1286.
68. Coser, S.M., Fontes, M.M.P. and Ferreira, M.F.S., Assessment of pollen viability in guava genotypes. *Acta Horticulture*, 2012. 959: p. 141–144.
69. da Silva, S.N., et al., Genetic parameters of pollen viability in guava (*Psidium guajava* L.). *Australian Journal of Crop Science*, 2017. 11: p. 1–8.
70. Bots, M. And Mariani, C., Pollen viability in the field. *COGEM report 2005*, Radboud Universiteit Nijmegen: Netherlands.
71. Luo, E.Y., Ogilvie, J.E. and Thomson, J.D., Stimulation of flower nectar replenishment by removal: a survey of eleven animal-pollinated plant species. *Journal of Pollination Ecology*, 2014. 12: p. 52–62.
72. Abrol, D.P., *Pollination and Fruit Productivity*. Springer 2015, Springer International Publishing: Switzerland, 1(1): p. 25–58.
73. Pontikis, C.A., *Psidium guajava* L. (Guava). Springer, 1996, Berlin: Heidelberg, 35: p. 308–20.
74. Yusof, S., Guavas. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*, 2003. p. 2985–2992.

*Bir sonraki sayıda grşmek midiyle..*  
*Hope to see you in the next issue..*



## **Author Guidelines**

### General Principles

1. The article should be submitted by the responsible author responsible as Microsoft Word (Doc, Docx).
2. The responsible author is responsible for monitoring all the processes of the article.
3. The main section headings should be bold and the first letter in capital letters, the first letter of the first word in the 2nd-degree headings should be large. If a third-degree title is required, the title should be in italics and only the first letter of the first word should be capitalized. If possible, articles with fourth-degree titles should not be used in our journal.
4. The main headings and sub-headings should not be numbered.
5. Turkish and English titles of the articles should be short, descriptive, and not more than fourteen words (except prepositions).
6. In the Pre-Control and Evaluation processes, the authors must submit the proposed corrections within 30 days at the latest. Otherwise, the article will be rejected.
7. Please click here to see the article written according to the rules of our journal.

Note: The general similarity rate should not exceed 20% except the bibliography part of the submitted articles. It is necessary to inform the journal editor if the rate specified in the necessary cases is exceeded. All articles submitted to the journal are screened with iThenticate plagiarism program.

8. Except for the Turkish and English titles of the work, all remaining parts should be written on the right side.
9. The text should be written on an A4-size page, in 12-font size Times New Roman, and double-spaced.
10. There should be 3 cm margin on the left, right, and top of the page.
- 11 Text should be written in a single column, all pages should be given a page number.  
There is no page limit in publishing an article in our journal.

### **Names Section**

A double-blind peer reviewer system is applied in our journal. Therefore, the names and addresses of authors should not be given in the main text when loading the Manuscript to the system. Author names and contact information should be written on a separate cover page. The cover page is available in the article submission section of our journal.

### **Abstract**

The article can be written in Turkish and English. English and Turkish abstracts should be written at the beginning of the Turkish manuscripts.

The abstract should contain brief and clear information about the purpose, method, and results of the article. 10 font size, single line spacing and maximum 300 words should be written. No reference should be made to the "Abstract".

Keywords: Keywords should be 10 font sizes, minimum 3, and maximum of 5 words. Keywords must be separated with a comma (,) sign and should be in lowercase.



### **Introduction**

The sections of the main part of the study should be written in 14 font sizes; Bold and the first letter should be capitalized; Article should have Introduction, Methods, Results, Discussion, and Conclusion sections. The second level titles should be written in the left, in 12 font sizes, the first letter of the first word should be capitalized, bold, and numbered. A line in the previous paragraph must be separated by a space.

### **Figures and Tables**

In the Turkish article for Figures and Tables;” Şekil“, ”Tablo“; whereas in The English article “Fig”, “Table” should be used (Table 1, Fig 1).

Figure and Table words should be written in bold, and at the end of the description of figures and tables should not have a dot (.)

Figures, graphics, photographs and the like should be written under Figures and written with 11 fonts. Figure and Table should be given in the main document in the relevant places, should not be uploaded as separate files or should not be added to the end of the text.

### **Examples;**

Table 1 Possible effects of genetically modified organisms

Table 2 Methods of tissue culture in tomato plants

Fig. 1 Amount of GMO products in the world

Fig. 2 Countries with the highest number of GM cultivation in the world

### **Citation Inside the Text**

In the text, the author should be numbered. Name and year should not be specified.

Example: Potatoes produced on a global scale are used in many basic areas [1, 2, 3]. Fifty percent of primarily produced potatoes are used for fresh consumption, such as baking, frying, boiling [4, 5, 6, 7].

### **References**

The references section should be written in 10 font sizes and without hanging indentations. In the references section, italics should not be written except in italic words such as “in vivo, in vitro, ex-situ” and species names. References should be written according to the “Chicago style”. Besides, there is an endnote style preparing for "International Journal of Life Sciences and Biotechnology". You can prepare your references using that style. For Endnote style, you can reach it by clicking on the endnote at the bottom right part of the main page of the journal.

Examples

#### **Example of an article with 1 author;**

Marakli, S., A Brief Review of Molecular Markers to Analyze Medicinally Important Plants. International Journal of Life Sciences and Biotechnology, 2018. 1 (1): p. 29-36.

#### **Example of an article with 2 authors;**

Kocacaliskan, I. and I. Tailor, Allelopathic effects of walnut leaf extracts and juglone on seed germination and seedling growth. The Journal of Horticultural Science and Biotechnology, 2001. 76 (4): p. 436-440.

#### **Example of an article with 3 authors;**

Segura-Aguilar, J., I. Hakman, and J. Rydström, The effect of 5OH-1,4-naphthoquinone on Norway spruce seeds during germination. Plant Physiology, 1992. 100 (4): p. 1955-1961.

#### **Example of articles with 4 or more authors**

Arasoglu, T., et al., Synthesis, characterization, and antibacterial activity of juglone encapsulated PLGA nanoparticles. Journal of applied microbiology, 2017. 123 (6): p. 1407-1419.

#### **Example for the book;**

Kocalishkan, I., Allelopathy. 2006, Ankara, Turkey: Our Office Press-In Turkish.

**Example for Book Chapter;**

Kaya, Y., F.Z. Huyop, and M.F. Edbeib, Genetic Diversity in Plants, in Advances in Biosciences, F.Z. Huyop and S. Mohammed, Editors. 2019, Penerbit UTM Press. Malaysia: Malaysia. p. 04-24.

### **Ethical Principles and Publication Policy**

Ethical standards for publication exist to ensure high-quality scientific publications, public trust in scientific findings, and that people receive credit for their ideas. In addition, the authors are encouraged to follow the ethic guidelines of the Committee on Publication Ethics (COPE) which can be viewed on the COPE website.

International Journal of Life Sciences and Biotechnology (Int J. Life Sci. Biotechnol.) is an electronic peer-reviewed international journal trying to have the highest standards of publication ethics. For that, we affirm the following principles of the Publication Ethics and Malpractice Statement.

If malpractice is discovered at any time even after the publication, the articles not in accordance with these standards will be removed from the publication. Int J. Life Sci. Biotechnol. is checking all papers in a double-blind peer-review process. We also check for plagiarisms, research fabrication, falsification, and improper use of any organisms in research. We will also report any cases of suspected plagiarism or duplicate publishing. Int J. Life Sci. Biotechnol. reserves the right to use plagiarism detecting software to screen submitted papers at all times.

**Author's responsibilities:** The author or authors must guarantee that they have written a unique study. Moreover, they must make sure that the article has not been submitted and evaluated elsewhere at the same time. Literature of the other researchers, all contributors and sources (including online sites) should be appropriately credited and referenced. All submitted manuscripts should be edited for language. All references should be cited without been copied or plagiarized. If needed, any financial sources or another conflict of interest should be disclosed. In order to correct the paper, any significant error or inaccuracy in the published works should be notified by the related authors. An author agrees to the license agreement before submitting the article. All articles must be submitted using the online submission procedure. Submitting a paper simultaneously to more than one publication at a time is a violation of publications' ethics.

**Editorial responsibilities:** Editors along with Editor-in-Chief and Editorial Board have publication decisions. Editors must guarantee a fair double-blind peer-review of the submitted articles for publication. They have to prevent any potential conflict of interests between the author and editors and reviewers. They have to guarantee the confidentiality of submitted articles before publishing. Editor-in-Chief will coordinate the work of the editors.

**Peer review/responsibility for the reviewers:** They have to review the manuscripts based on content without regard to ethnic origin, gender, sexual orientation, citizenship, religious belief, or political philosophy of the authors. They have to guarantee the confidentiality of submitted articles before publishing. They have to report any plagiarisms, research fabrication, falsification, and improper use of any organisms in research to the editors and/or the Editor-in-Chief. They have to review the papers objectively and state their opinions clearly in the forms and on the paper. A reviewer having inadequate time or feeling unqualified should notify the editors as soon as possible and excuse her/himself from the review process.

### **Plagiarism**

All journals published by IJLSB are committed to publishing only original material, i.e., material that has neither been published elsewhere nor is under review elsewhere. Manuscripts that are found to have been plagiarized from a manuscript by other authors, whether published or unpublished, will incur plagiarism sanctions.

**Manuscripts are checked by Ithenticate Plagiarism System.**

### **Duplicate Submission**

Manuscripts that are found to have been published elsewhere, or to be under review elsewhere, will incur duplicate submission/publication sanctions. If authors have used their own previously published work or work that is currently under review, as the basis for a submitted manuscript, they are required to cite the previous work and indicate how their submitted manuscript offers novel contributions beyond those of the previous work.

### **Citation Manipulation**

Submitted manuscripts that are found to include citations whose primary purpose is to increase the number of citations to a given author's work or articles published in a particular journal, will incur citation manipulation sanctions.

### **Data Fabrication and Falsification**

Submitted manuscripts that are found to have either fabricated or falsified experimental results, including the manipulation of images, will incur data fabrication and falsification sanctions.

### **Improper Author Contribution or Attribution**

All listed authors must have made a significant scientific contribution to the research in the manuscript and approved all its claims. It is important to list everyone who made a significant scientific contribution, including students and laboratory technicians.

### **Redundant Publications**

Redundant publications involve the inappropriate division of study outcomes into several articles.

### **Sanctions**

In the event that there are documented violations of any of the above-mentioned policies in any journal, regardless of whether or not the violations occurred in a journal published by Int J. Life Sci. Biotechnol., the following sanctions will be applied:

#### **Immediate rejection of the infringing manuscript.**

Immediate rejection of every other manuscript submitted to any journal published by Int J. Life Sci. Biotechnol. by any of the authors of the infringing manuscript.

The prohibition against all of the authors for any new submissions to any journal published by IJLSB, either individually or in combination with other authors of the infringing manuscript, as well as in combination with any other authors. This prohibition will be imposed for a minimum of 36 months. Prohibition against all of the authors from serving on the Editorial Board of any journal published by Int J. Life Sci. Biotechnol.

In cases where the violations of the above policies are found to be particularly egregious, the publisher reserves the right to impose additional sanctions beyond those described above.

### **Publication Charge**

"International Journal of Life Sciences and Biotechnology" is an Open Access Journal and does not charge any printing charges from authors, during article delivery, assessment and printing stages.

### **Aim and Scope**

International Journal of Life Sciences and Biotechnology (Int J. Life Sci. Biotechnol.) is an international peer-reviewed journal that publishes original articles from all biology and molecular biology studies, particularly in the fields of life sciences and biotechnology. The language of publication is Turkish and English. Also the main objective of Int J. Life Sci. Biotechnol. is to provide quality publications to scientists, researchers, and engineers from both academia and industry who want to communicate the latest developments and practices in their field.

Int J. Life Sci. Biotechnol. publishes original papers in various fields of Life Sciences and Biotechnology that covers, but is not limited to, the following areas:

- Agricultural Biotechnology
- Animal (livestock and fish production, physiology, breeding and genetics, biotechnology, etc),
- Animal Biotechnology
- Biochemical Genetics,
- Biochemistry
- Biodiversity and biodiscovery
- Bioinformatics and system biology
- Biology and Molecular Biology,
- Bioremediation and biodegradation
- Biotechnology
- Bioethics (Life Sciences and Biotechnology)
- Botany,
- Evolution and Population Genetics,
- Food Biotechnology
- Genetic engineering and cloning
- Lichens
- Genetics,
- Biotechnological product and Halal Food
- Industrial Biotechnology
- Medical Biotechnology
- Molecular Genetics
- Plant (Plant production, physiology, breeding and genetics, biotechnology, agronomy, horticulture, plant protection, etc.),
- Plant Biotechnology
- Soil (soil ecology, physics, and chemistry, etc)
- Polar Science (Life Sciences and Biotechnology)

**DECLARATION:** This work is part of Gülfidan KUYUMCU's MA thesis. Articles on 27-29 September 2017 held in Bayburt in Turkey was presented as a Oral Presentation I. International Organic Agriculture and Biodiversity Symposium

**Genetic Analysis Related To Organized Genetic Changes in Potato And Processed Potatoes**

Gulfidan Kuyumcu<sup>1\*</sup>, Muhammed Majed Abed<sup>2</sup>

Author Addresses: <sup>1</sup> Samsun Ondokuz Mayıs University, Faculty of Agriculture, Department of Agricultural Biotechnology, Samsun / Turkey

<sup>2</sup> Samsun Ondokuz Mayıs University, Faculty of Agriculture, Department of Agricultural Biotechnology, Samsun / Turkey

\*Corresponding Autor: Gulfidan Kuyumcu, e-mail: [ijlsb@intsa.org](mailto:ijlsb@intsa.org)

Please write the e-mail addresses and Orcid ID numbers of all authors **(required fields)**

Author 1 mail and Orcid ID:

Author 2 mail and Orcid ID:

Author 3 mail and Orcid ID:



## **Ethics Committee Report**

Article If an Ethics Committee Report is required to conduct a research on animals and humans and to conduct this research, it is mandatory that the **Ethics Committee Report be scanned and uploaded as a PDF file**. Otherwise, the article is returned to the author at the preliminary examination and other stages.



**1.REVIEWER SUGGESTION**

**DEGREE:**  
**FIRST NAME:**  
**LAST NAME:**  
**MAIL ADDRESS:**  
**INSTITUTION:**  
**DEPARTMENT:**  
**SUBJECTS:**

**2.REVIEWER SUGGESTION**

**DEGREE:**  
**FIRST NAME:**  
**LAST NAME:**  
**MAIL ADDRESS:**  
**INSTITUTION:**  
**DEPARTMENT:**  
**SUBJECTS:**

**3.REVIEWER SUGGESTION**

**DEGREE:**  
**FIRST NAME:**  
**LAST NAME:**  
**MAIL ADDRESS:**  
**INSTITUTION:**  
**DEPARTMENT:**  
**SUBJECTS:**