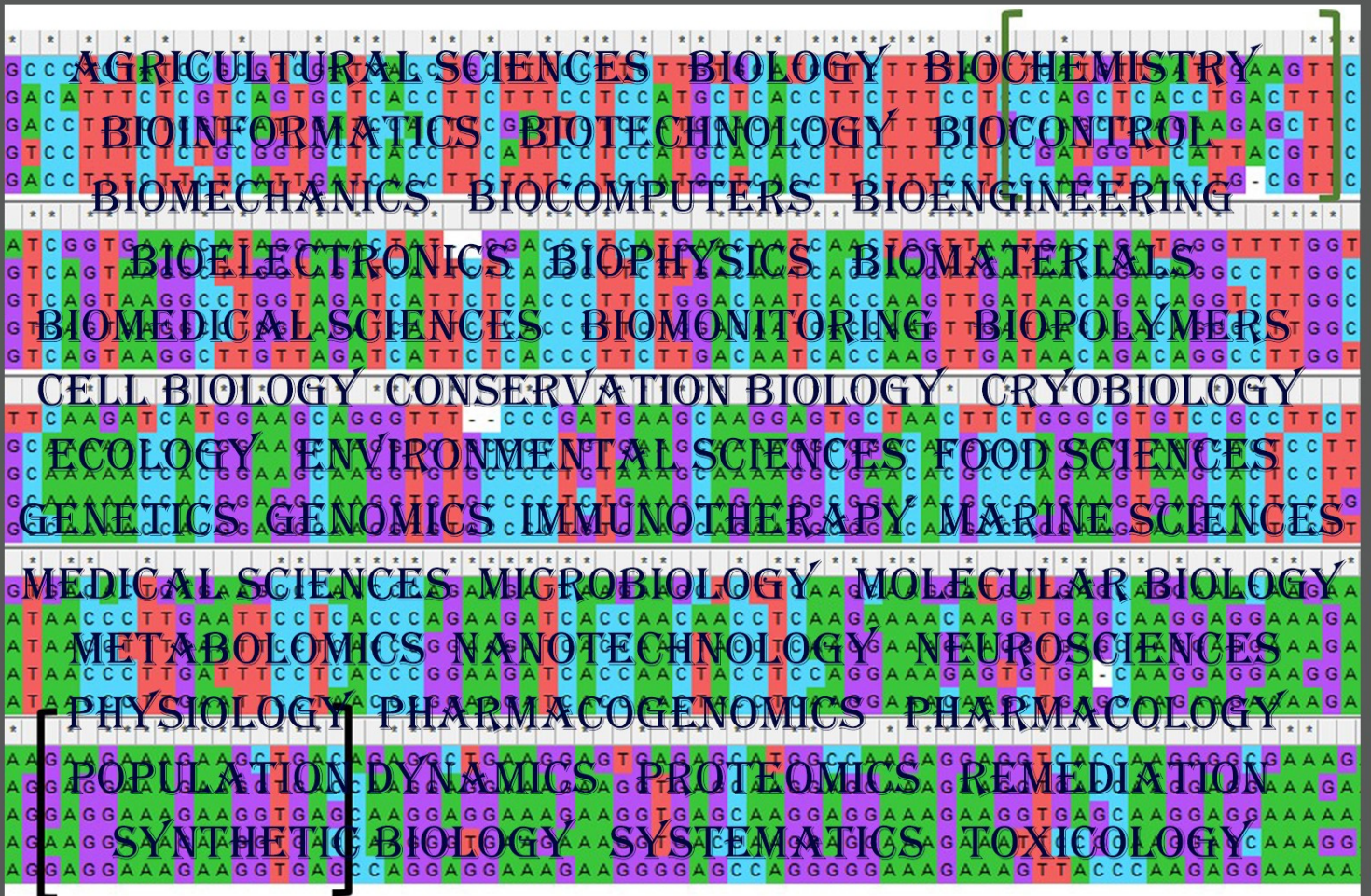


FRONTIERS IN LIFE SCIENCES AND RELATED TECHNOLOGIES



SCIENCE
AND
TECHNOLOGY



DECEMBER, 2021, VOLUME 2, ISSUE 3

Contents

Research Articles

- **Metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) enfeksiyonu için hızlı uyarı sistemi**
- **A rapid alert system for methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infection**

Ayfer CETİN, Ahmet KOLUMAN

Pages: 75-84

- **A new species as a member of the Flora of Turkey: *Persicaria hydropiperoides* (Polygonaceae)**

Mustafa KESKIN, Zeki SEVEROGLU

Pages: 85-91

- **Estimation of infection risk using symptoms of COVID-19: an approach based on fuzzy expert system**

Serhat OZBEY, Ahmet KOLUMAN, Sezai TOKAT

Pages: 92-102

- **Why lncRNAs were not conserved? Is it for adaptation?**

Elif KARLIK

Pages: 103-110

Review Articles

- **Karaciğer hücreleri ve organoidlerin üç boyutlu kültürlerinde kullanılmak üzere geliştirilmiş biyomalzemeler**
- **Developed biomaterials for use in three dimensional cultures of liver cells and organoids**

Gamze DEMIREL

Pages: 111-119

Issue Editorial Board

Prof. Dr. Fahrul Zaman HUYOP
Institution: Universiti Teknologi Malaysia

Assist. Prof. Dr. Ebru HACIOSMANOGLU
Institution: Bezmialem Vakif University

Prof. Dr. Memet Vezir KAHRAMAN
Institution: Marmara University

Assist. Prof. Dr. Naser A. ANJUM
Institution: Aligarh Muslim University

Prof. Dr. Ugur YAHSI
Institution: Marmara University

Dr. Faruk KARAHAN
Institution: Hatay Mustafa Kemal University

Editor

Prof. Dr. Ibrahim Ilker OZYIGIT

Co-Editor

Ibrahim Ertugrul YALCIN



Research article / Araştırma makalesi

Metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) enfeksiyonu için hızlı uyarı sistemi

Ayfer Cetin¹ , Ahmet Koluman^{*1} ¹ Pamukkale University, Faculty of Technology, Biomedical Engineering Department, 20160, Denizli, Turkey

Öz

Bu çalışma, farklı kontaminasyon seviyelerindeki MRSA'nın tespit süresi üzerine tasarlanmıştır ve çalışmada fırsatçı patojen hastane enfeksiyonları arasında yer alan MRSA tespitine yönelik hızlı bir tespit sistemi oluşturulmuştur. MRSA tespiti yüksek ve orta yoğunluklu üremenin olduğu sıvı besiyerlerinde sekiz saatin sonunda gerçekleştirilmiştir. Tüm yoğunluklardaki üremenin olduğu sıvı besiyerlerindeki MRSA tespiti ise on saatin sonunda gerçekleştirilmiştir. Eppendorf'lar deneyden 24 saat sonra tamamen renk değiştirmiştir. Çalışmada kalitatif ve kantitatif sonuçlara bu tespit sistemiyle ulaşılmıştır. RGB sensörü kalitatif sonuç tespitinde pozitif sonuçta yeşil yanarken negatif sonuçta ise sensörün kırmızı yandığı gözlemlenmiştir. Sonuçların kantitatif verileri Arduino Programı'nın Seriport ekranı aracılığıyla izlenmiştir. Çalışmada tasarısı yapılan sistemin MRSA tespiti hızlı, spesifik, tutarlı, düşük maliyetli, tecrübeli teknik eleman gerektirmeyen ve aynı zamanda PCR testi yapılmadan önce tarama testi olarak kullanılabilircek bir sistem olarak kabul edilmiştir.

Anahtar kelimeler: Arduino Programı; biyosensör; hızlı tespit yöntemi; metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA)

A rapid alert system for methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infection

Abstract

This study was designed on the detection time of MRSA at different contamination levels and in this study, a rapid alert system was established for the detection of MRSA, which is among the opportunistic pathogen nosocomial infections. MRSA detection was realized in broths with high and moderate growth at the end of eight hours. However, MRSA detection in broths with growth at all densities was performed after ten hours. After 24 hours of the experiment, colors of the Eppendorf's were completely changed. In the study, qualitative and quantitative results were achieved with this detection system. It was observed that the RGB sensor was lit in green for the positive result in the qualitative result detection, while the sensor was lit red for the negative result. The quantitative data of the results were monitored through the Seriport screen of the Arduino Program. The MRSA detection of the system designed in the study was accepted as a fast, specific, consistent, cost-effective and non-experienced technical staff required system that can be used as a screening test before the PCR test is performed.

Keywords: Arduino Program; biosensor; methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA); rapid detection method

* Sorumlu yazar.

E-mail: akoluman@pau.edu.tr (A. Koluman).

<https://doi.org/10.51753/flsrt.990547> Yazar katkıları

Geliş tarihi 03 Eylül 2021; Kabul tarihi 22 Ekim 2021

Çevrimiçi yayın 15 Aralık 2021

2718-062X © 2021 This is an open access article published by Dergipark under the [CC BY](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/) license.

1. Giriş

Hayvanların ve insanların üriner sistem, yumuşak doku, deri ve kemik yapılarında *Staphylococcus* cinsinde sınıflandırılan bakterilerin enfeksiyonlara sebep olduğu belirlenmiştir. *Staphylococcus* gram pozitif bir bakteri olup, yaşam alanlarımızda da oldukça yaygındır (Appelbaum 2006; Cadena ve ark., 2016). Hastane enfeksiyonu (HE) olarak tabir edilen nozokomiyal enfeksiyonların en önemli nedenlerinden biri olduğu kabul edilmektedir.

Hastane koşullarında bulaşan mikroorganizma kaynaklı oluşan enfeksiyonlar “Hastane Enfeksiyonu” olarak adlandırılmaktadır. Enfeksiyonların sebep olduğu hastalıklar göz önüne alındığında, bu hastalıkların en fazla hastane enfeksiyonlarından kaynaklandığı belirlenmiştir. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) hastane enfeksiyonunu hastanın hastaneye yattığı anda inkübasyon süresinde olmadığı, enfeksiyon bulguları taşımadığı ve hastane ortamında enfekte olduğu durum olarak tanımlamıştır. Hastane enfeksiyonlarının genellikle hastanın hastane yatışından 48-72 saat sonrasında ortaya çıkabileceği, ya da hastanın taburcu olmasından 10 gün sonrasına kadar belirlenebileceği bildirilmiştir (Vincent 2003; Sousa ve ark., 2011).

Küresel olarak bakıldığında, hastane enfeksiyonlarının hasta kaybına yönelik problem teşkil ettiği belirlenmiştir. Gelişmiş ülkelerde, hastanedeki hastaların %5-10’unda hastane enfeksiyonu oluşabilmektedir. Bu oran gelişmemiş ülkelerde ise %25’e kadar çıkabilmektedir (Fridkin ve ark., 1997).

Hastane enfeksiyonları sadece hastayı değil, refakatçi ve sağlık çalışanlarını da etkiler. Morbidite ve mortalitede artış, yaşam kalitesinde düşüş, maliyet ve üretkenlik kaybı, hastanede kalış süresinde uzama gibi birçok sorun hastane enfeksiyonu ile ortaya çıkmaktadır (Fridkin ve ark., 1997; Vincent, 2003).

Vakaların çoğunun tedavisi kolaydır. Ancak vakaların bir kısmında osteomyelit, toksik şok sendromu, bakteriyemi, septik artrit ve endokardit gibi bazı invaziv enfeksiyonlar tetiklenebilir ve ortaya çıkabilecek komplikasyonlar hastanın yatarak tedavi olmasına sebep olabilir. Vücutta ortaya çıkan patojen enfeksiyonlar antibiyotik tedavisiyle giderilebilir (Appelbaum, 2006; Becker ve ark., 2015; Cadena ve ark., 2016).

Staphylococcus aureus penisilin direncinin penisilin tedavide kullanılmaya başlanmasıyla geliştiği belirlenmiştir. Metisilin gibi penisilinaza dirençli antibiyotikler penisilin direncini yenmek üzere kullanılmaya başlansa da, *S. aureus* suşlarında metisiline karşı direnç ortaya çıkmıştır. Raporlara bakıldığında, metisilin direncine bağlı olarak *Staphylococcus* enfeksiyonlarının tedavisinde beta laktam antibiyotiklerinin kullanılmadığı anlaşılmaktadır. Glikopeptid olan vankomisin MRSA (metisilin dirençli *Staphylococcus aureus*) enfeksiyonlarının tedavisinde uygulanmıştır. 2002 yılı itibarıyla *S. aureus* vankomisine direnç göstermeye başlamıştır. Bu bilgiler ışığında *Staphylococcus* enfeksiyonları tedavisinin daha da güçleştiği bildirilmiştir (Weems, 2001; Becker ve ark., 2015).

MRSA enfeksiyonlarında çoklu antibiyotik direncinin oluşması tedavi süresini uzatmaktadır. MRSA enfeksiyonu genellikle hastane ortamında yayılmaktadır. Hastalar veya sağlık çalışanları MRSA enfeksiyonunu hastane ortamına taşımaktadırlar. MRSA enfeksiyonuna sebep olarak, kişinin hastanede yatması, hastayla temasının olması, ya da kronik hastalık öyküsü riski arttırmaktadır (Weems, 2001).

Hastane ortamında MRSA mücadelesinde tedavi sürecinin hemen başlanması bu tür nedenlerden kaynaklı önemli bir adım oluşturmaktadır. Erken tespit ile MRSA enfeksiyonunda

tedavinin hemen başlatılması, insidanda da azalma yaratmaktadır (Hidron ve ark., 2005).

Bu çalışmada, MRSA için hızlı tespit sisteminin geliştirilmesi amaçlanmıştır. MRSA taramasına yönelik besiyeri kullanılan kültüre dayalı yöntemlerin iki ve dört gün arasında sonuçlandığı bilinmektedir (Cadena ve ark., 2016). Bu süre uzun olduğundan, kontrole yönelik bulunacak önlemler gecikmektedir. Bu çalışma kapsamında bakterilerin gelişme düzeyleri metisilin içeren özel besi ortamlarında gözlenmiştir. Veriler yardımıyla yapılan hızlı tespit sistem optimizasyonunun ardından, söz konusu sistem içerisinde hastane örneklerinin analiz etmek üzere bir sistem düzeneği kurulmuştur.

2. Gereç ve yöntemler

Önceden hazırlanan BHI (Brain Heart Infusion) brothun içine *S. aureus* (ATCC 29213) ekilerek üretilmiş BP (Baird Parker) agardan tek koloni edinilerek pasajlama yapılmış, üreme için 37 °C etüvde 24 saat bekletilmiştir. BHI besi ortamına pasajlanan tüplerden mevcut zenginleştirmeden Şekil 1’de gösterilen seri dilüsyonlar yapılarak suşun logaritmik seviyesi tespit edilmiştir. Ekimler yirmi dört saat etüvde bekletildikten sonra, sayılmak üzere siyah zeminde ters olarak yerleştirilmiş, aynı numaralar altı üstlü ayarlanmış ve koloniler sayılmıştır. Farklı şeker içeren tüpler önceden hazırlanmış bu tüplere pasajlama işlemi yapıldıktan sonra etüvde inkübasyona bırakılmıştır. Bu amaçla kullanılan şekerler ayrı ayrı hazırlanmış olup ayrıntılı bilgi aşağıda verilmiştir;

- %1 glikoz (Sigma G8270-100G), galaktoz (Sigma G0750-100G), fruktoz (Sigma F0127-100G)
- %2 glikoz, galaktoz, fruktoz
- %3 glikoz, galaktoz, fruktoz

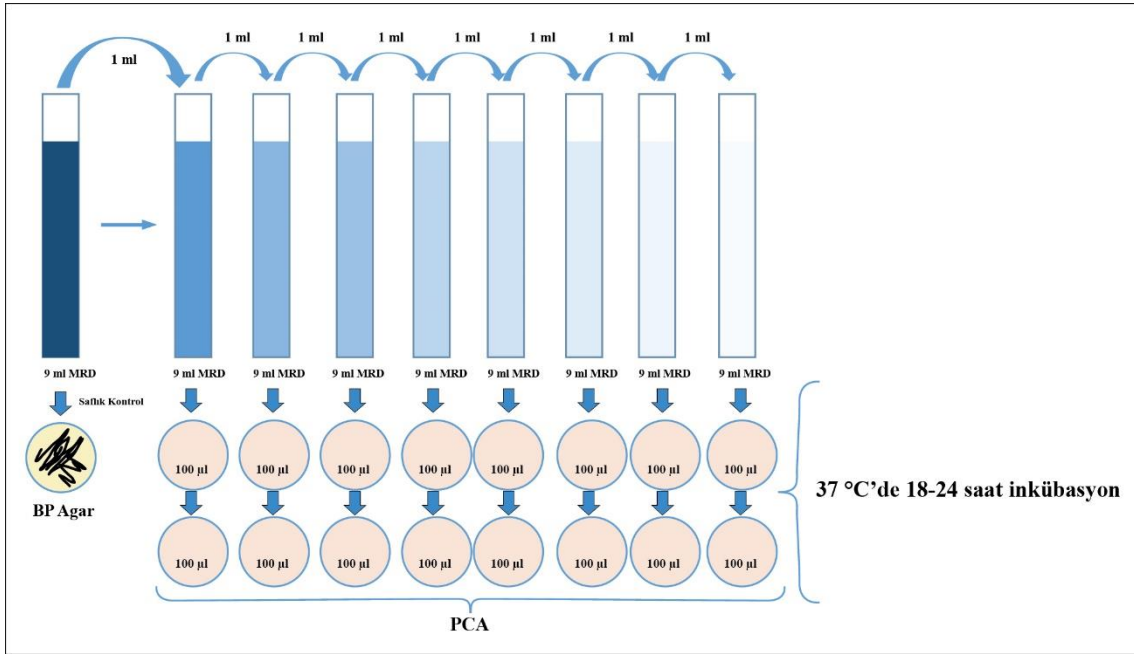
Toplam 9 grup oluşturulmuştur.

Öncelikle %1, %2 ve %3 oranında fruktoz içeren sekizer adet peptonlu su hazırlanmıştır. Seri dilüsyonlar yapılmıştır. Laminar kabinde yüzdelik oranlar için 16 tane PCA çift sıralı olacak şekilde sekiz sulandırma seviyesine kadar numaralandırılmış ve dizilmiştir.

İlk petriye ekim yapılmak için bir numaralı %1 fruktoz solüsyonundan 100 mikrolitre alınmıştır. Daha sonra 100 mikrolitre daha alınıp 2. sıradaki 1 numaralı petriye ekim yapılmıştır. Her numara için işlem tekrarlanmıştır. Bu işlemin tamamı %2 fruktoz, %3 fruktoz, %1 galaktoz, %2 galaktoz, %3 galaktoz, %1 glikoz, %2 glikoz ve %3 glikoz şeker testleri için ayrı ayrı yapılmıştır.

Belirlenen uygun şeker karışımına renk indikatörü eklenmiştir. İçerik 100 ml distile su için %0,33 glikoz, %0,33 fruktoz, 3,7 gr BHI, %0,33 galaktoz, 0,01 gr Fenol Red veya Brom Creosol Purple olarak belirlenmiştir. Homojenizasyonu takiben Eppendorf’lara mikroorganizmalar eklenerek etüvde inkübasyona bırakılmıştır.

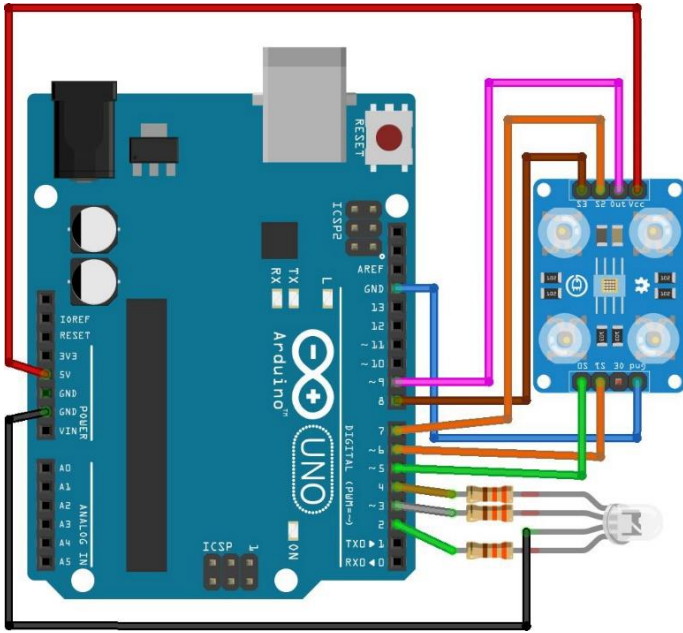
Bu amaçla sekiz farklı mikroorganizma hazırlanan broth ortama konulmuştur. Bakteriler 37 °C’de inkübasyona bırakılmışlardır ve bakterilerin 2 saatte bir sistemden ölçümü alınmıştır. Seçilen bakteriler aşağıdaki şekildedir; *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 24853, *Escherichia coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 29213, *Staphylococcus epidemidis* ATCC 12228, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Listeria monocytogenes* ATCC 19115 ve *Proteus mirabilis* ATCC 1245.



Şekil 1. Seri dilüsyonlar ve suşun gücünün belirlenmesi.

2.1. Optik donanımın tasarımı ve programlanması

Şekil 2' de devre bağlantıları görülmektedir.



Şekil 2. Devrenin şeması.

Çalışmadaki TCS3200 sensörü, bir frekans-akım dönüştürücüsü ve fotodiyotlar sayesinde renklerde ayırım oluşturur. Sensör, yansıyan ışığın şiddetiyle orantılı bir frekansta kare dalga üretir ve bu kare dalga kullanılarak veriler alınır. RGB ledinin çalışma prensibi aşağıdaki şekildedir. Pozitif ucuna 5 V bağlanınca mavi, kırmızı ve yeşil uçlarından yakmak istediğimizin yolu nötr ile tamamlanır. Böylece + kutbundan nötre doğru giden elektronların yolları tamamlanır ve nötr bağlanan led yanar.

Ölçüler kumpas kullanarak alınıp kutu tasarımı Solid Works ile yapılmıştır. Kutu tasarlanıp 3D yazıcı ile bastırılmıştır. Elde edilen ölçümler aşağıda verilmiştir.

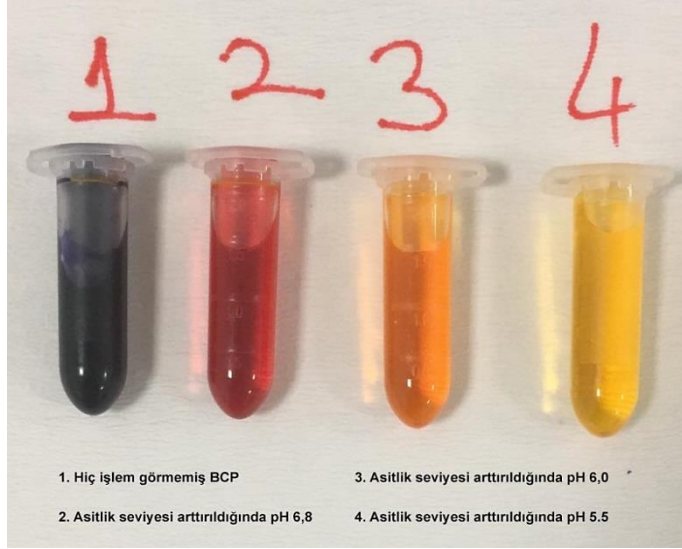
Kutu: 70x70x70 mm
 Pencere: 24,21x31,04x12,90 mm
 Orta bölüm: 62x4x38 mm
 Orta Kısıma yerleşecek parça 66x66 mm
 Eppendorf deliği: 11,50 mm
 Kapak Boyu: 70,50x70,50 mm
 Kapak Alt Kısım: 65,85x65,85 mm

Kutu ölçüleri Şekil 3'te gösterilmiştir.



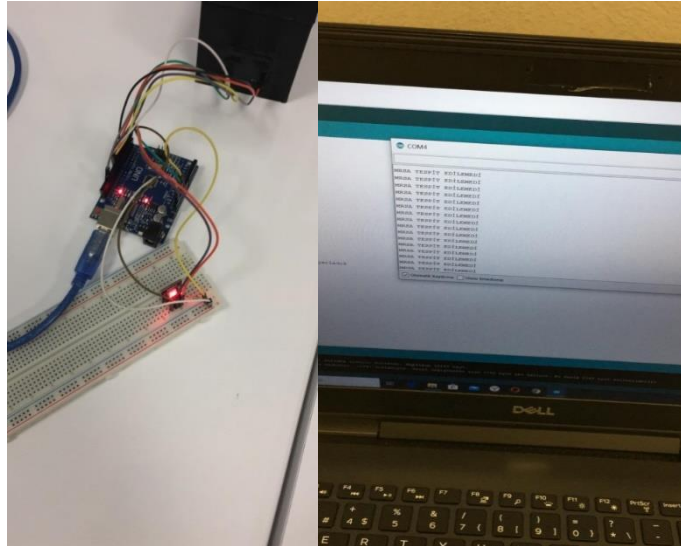
Şekil 3. Solid Works'te kutu çizimi.

ISO 13485 standardına uygun bir şekilde Validasyon işlemi yapılmıştır. Broth tasarlanıp gerekli hazırlıklardan sonra 4 adet Eppendorf'a alınmıştır. Broth içine damlalar şeklinde eklenen HCl ile renk skalası oluşturulmuştur. Elde edilen renkler birbiri arkasından sistemde test edilmiştir. Ölçüm sonuçlarına göre, RGB sensöründen ve Arduino Seriport ekranından alınan sonuçlar tutarlı ve doğrudur. Şekil 4'te validasyon işleminde kullanılan renkler verilmiştir.



Şekil 4. Renk skalası.

1 numaralı Eppendorf ölçümünde bakterisine rastlanmamıştır. 1 numaraya sahip örnek kutuya koyulup ölçümü alındığında, RGB sensörü kırmızıdır ve Seriport ekranında “MRSA TESPİT EDİLEMEDİ” yazısı belirir. Sonuçlar Şekil 5’de gösterilmektedir.



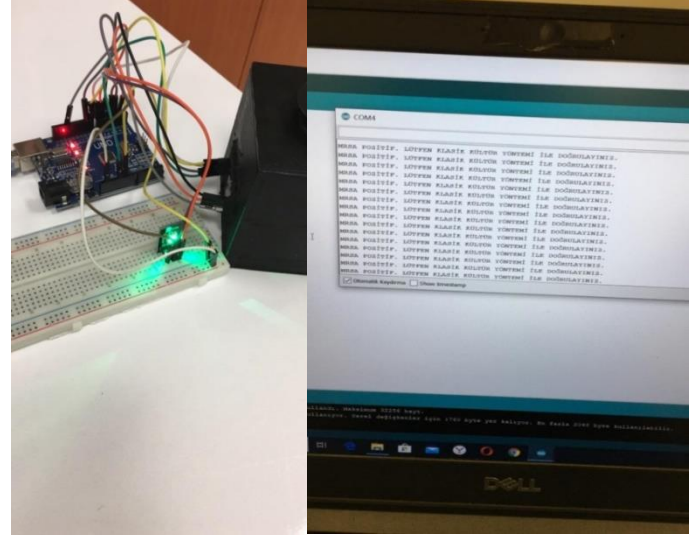
Şekil 5. Bakterisiz renk skalasında sistem cevabı.

İki numaraya sahip Eppendorf örneğinde düşük yoğunluğa sahip MRSA dönüşüm rengindedir. Kutuya konulduğunda RGB sensörü yeşil yanmış ve Seriport ekranında “MRSA TESPİT EDİLDİ. LÜTFEN KLASİK KÜLTÜR YÖNTEMİ İLE DOĞRULAYINIZ” yazısı görülmüştür. Sisteme ait sonuçlar Şekil 6’da verilmiştir.

Üç numarada orta yoğunluklu MRSA renk değişimindeyken teste alınmış, RGB sensörü yeşil Seriport

ekranında “MRSA POZİTİF. LÜTFEN KLASİK KÜLTÜR YÖNTEMİ İLE DOĞRULAYINIZ” yazısı belirmiştir.

Dört numarada yüksek yoğunluklu MRSA içermektedir. Dört numara test edildiğinde RGB sensörü yeşil Seriport ekranında “MRSA POZİTİF. LÜTFEN KLASİK KÜLTÜR YÖNTEMİ İLE DOĞRULAYINIZ” uyarısı gözlemlenmiştir.



Şekil 6. Bakterinin düşük yoğunlukta olduğu renk skalasında sistem cevabı.

2.2. Verifikasyon

Broth hazırlandıktan sonra 6 adet Eppendorf'a dağıtılmıştır. Eppendorf'lar yoğunluklarına göre düşük, orta, yüksek yoğunluklu olarak 2'şerli olarak sınıflandırılmıştır. Brothlara bakteri bulaştırma oranları Tablo 1’de bulunmaktadır.

Tablo 1

Brothlara bakteri bulaştırma düzeyleri.

Bulaştırma Düzeyi	Koloni Oluşturan Birim Sayısı	Logaritmik Bulaştırma Düzeyi (Kob/mL)
Düşük	20	1,3
Orta	300	2,47
Yüksek	1000	3

Brothlar daha sonra 37 °C’de etüvde üremeleri için inkübasyona bırakılmıştır. Renk değişimi İki saatte bir ölçülmüş ve MRSA’nın bulaştırılmış tespiti yapılmıştır. Deney sabah 9:00’da başlamış, deneyin ölçümleri ise 11:00, 13:00, 15:00, 17:00, 19:00, 21:00 ve 24 saatin sonunda ertesi gün 9:00’da alınmıştır.

3. Bulgular

Bu çalışmanın amacı *S. aureus* özellikle MRSA için hızlı tespiti yönelik bir sistem oluşturulmasıdır.

3.1. Sayımın yapılması

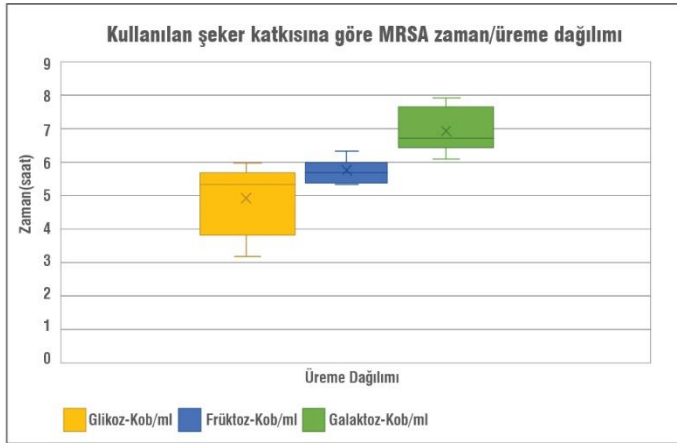
Sayımlar yayma plak tekniği kullanılarak seri dilüsyonlar aracılığıyla yapılmıştır. 24 saatin sonunda ekimler etüvden alınarak, sayım için siyah zemin üzerine ters bir şekilde ve aynı numaralar altı üstlü getirilerek yerleştirilmiştir.

Arkasından koloniler sayılmıştır. Sayım sonucu Tablo 2’de verilmiştir.

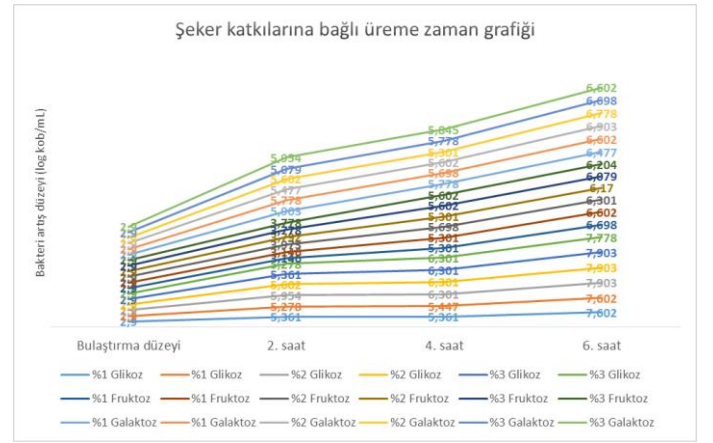
Tablo 2

Bakteri cinsi ve enerji kaynağına göre tespit süreleri sonuç özeti.

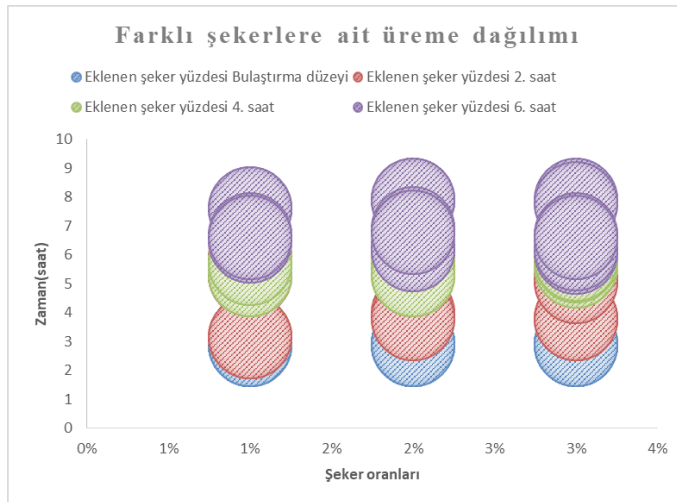
Kullanılan Şeker	Eklenen Şeker Yüzdesi	Ekim Sonuçları $\log_{10} \text{kob/mL}$	Zaman		
			2. Saat	4. Saat	6. Saat
Glikoz	1%	2,903	5,361	5,361	7,602
	1%	2,903	5,278	5,447	7,602
	2%	2,903	5,954	6,301	7,903
	2%	2,903	5,602	6,301	7,903
	3%	2,903	5,361	6,301	7,903
	3%	2,903	5,278	6,301	7,778
Fruktoz	1%	2,903	3,146	5,301	6,698
	1%	2,903	3,146	5,301	6,602
	2%	2,903	3,973	5,698	6,301
	2%	2,903	3,792	5,301	6,176
	3%	2,903	3,778	5,602	6,079
	3%	2,903	3,778	5,602	6,204
Galaktoz	1%	2,903	5,903	5,778	6,477
	1%	2,903	5,778	5,698	6,602
	2%	2,903	5,477	5,602	6,903
	2%	2,903	5,602	5,301	6,778
	3%	2,903	5,079	5,778	6,698
	3%	2,903	5,954	5,845	6,602



Şekil 7. Kullanılan şeker yüzdesine göre standart sapma grafiği.



Şekil 9. Kullanılmış şeker yüzdesine bağlı ayrıntılı üreme grafiği.



Şekil 8. Kullanılan şekerin yüzdesine bağlı üreme grafiği.



Şekil 10. Renk indikatörlerinin 24 saat sonundaki değişimi.

Tablo 3
BCP indikatörünün süre ve yoğunluğa bağlı renk değişimleri.

İndikatör Çeşidine Bağlı Renk Değişimi										
Süre	Bromcreosol Purple									
	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁸	10 ⁹	
0. Saat	Mevcut değil	Mevcut değil	Mevcut değil	Mevcut değil	Mevcut değil	Mevcut değil	Mevcut değil	Mevcut değil	Mevcut değil	Mevcut değil
2. Saat	Mevcut değil	Mevcut değil	Mevcut değil	Mevcut değil	Mevcut değil	Mevcut değil	Mevcut değil	Mevcut değil	Mevcut değil	Mevcut değil
4. Saat	Mevcut değil	Mevcut değil	Mevcut değil	Mevcut değil	Mevcut değil	Mevcut değil	Mevcut değil	Mevcut değil	Mevcut değil	Mevcut değil
6. Saat	Mevcut değil	Mevcut değil	Mevcut değil	Mevcut değil	Mevcut değil	Mevcut değil	Mevcut değil	Mevcut değil	Mevcut değil	Mevcut değil
24. Saat	Mevcut	Mevcut	Mevcut	Mevcut	Mevcut	Mevcut	Mevcut	Mevcut	Mevcut	Mevcut

Tablo 4
Phenol red indikatörünün süre ve yoğunluğa bağlı renk değişimleri.

İndikatör Çeşidine Bağlı Renk Değişimi										
Süre	Phenol Red									
	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁸	10 ⁹	
0. Saat	Mevcut değil	Mevcut değil	Mevcut değil	Mevcut değil	Mevcut değil	Mevcut değil	Mevcut değil	Mevcut değil	Mevcut değil	Mevcut değil
2. Saat	Mevcut değil	Mevcut değil	Mevcut değil	Mevcut değil	Mevcut değil	Mevcut değil	Mevcut değil	Mevcut değil	Mevcut değil	Mevcut değil
4. Saat	Mevcut değil	Mevcut değil	Mevcut değil	Mevcut değil	Mevcut değil	Mevcut değil	Mevcut değil	Mevcut değil	Mevcut değil	Mevcut değil
6. Saat	Mevcut değil	Mevcut değil	Mevcut değil	Mevcut değil	Mevcut değil	Mevcut değil	Mevcut değil	Mevcut değil	Mevcut değil	Mevcut değil
24. Saat	Mevcut	Mevcut	Mevcut	Mevcut	Mevcut	Mevcut	Mevcut	Mevcut	Mevcut	Mevcut

Tablo 5
Spesifite test sonuçları.

Bakteri Adı	İnkübasyon Süreleri									
	2. Saat		4. Saat		6. Saat		8. Saat		24. Saat	
	Renk Değişimi	Donanım Ölçümü	Renk Değişimi	Donanım Ölçümü	Renk Değişimi	Donanım Ölçümü	Renk Değişimi	Donanım Ölçümü	Renk Değişimi	Donanım Ölçümü
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Renk değişimi yok	MRSA gözlemlenmedi	Renk değişimi yok	MRSA gözlemlenmedi	Renk değişimi yok	MRSA gözlemlenmedi	Renk değişimi yok	MRSA gözlemlenmedi	Renk değişimi yok	MRSA gözlemlenmedi
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	Renk değişimi yok	MRSA gözlemlenmedi	Renk değişimi yok	MRSA gözlemlenmedi	Renk değişimi yok	MRSA gözlemlenmedi	Renk değişimi yok	MRSA gözlemlenmedi	Renk değişimi yok	MRSA gözlemlenmedi
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	Renk değişimi yok	MRSA gözlemlenmedi	Renk değişimi yok	MRSA gözlemlenmedi	Renk değişimi yok	MRSA gözlemlenmedi	Renk değişimi yok	MRSA gözlemlenmedi	Renk değişimi yok	MRSA gözlemlenmedi
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19115	Renk değişimi yok	MRSA gözlemlenmedi	Renk değişimi yok	MRSA gözlemlenmedi	Renk değişimi yok	MRSA tespit edilmedi	Renk değişimi yok	MRSA tespit edilmedi	Renk değişimi yok	MRSA gözlemlenmedi
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	Renk değişimi yok	MRSA gözlemlenmedi	Renk değişimi yok	MRSA gözlemlenmedi	Renk değişimi yok	MRSA tespit edilmedi	Renk değişimi yok	MRSA tespit edilmedi	Renk değişimi yok	MRSA gözlemlenmedi
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 12453	Renk değişimi yok	MRSA gözlemlenmedi	Renk değişimi yok	MRSA gözlemlenmedi	Renk değişimi yok	MRSA tespit edilmedi	Renk değişimi yok	MRSA tespit edilmedi	Renk değişimi yok	MRSA gözlemlenmedi
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 24853	Renk değişimi yok	MRSA gözlemlenmedi	Renk değişimi yok	MRSA gözlemlenmedi	Renk değişimi yok	MRSA gözlemlenmedi	Renk değişimi yok	MRSA gözlemlenmedi	Renk değişimi yok	MRSA gözlemlenmedi

Farklı şekerlerin üremelerinin dağılımının özet grafiği Şekil 8’de, kullanılan şeker katkılarının ve zamana bağlı dağılımın detaylı grafiği Şekil 9’da verilmektedir.

Tablo 2, Şekil 8 ve Şekil 9 göstermektedir ki, zamana bağlı üreme eğrisi 6 saatte belirgin olarak yüksektir ve istatistiki anlamda önemli düzeyde ($p<0.05$) artmıştır.

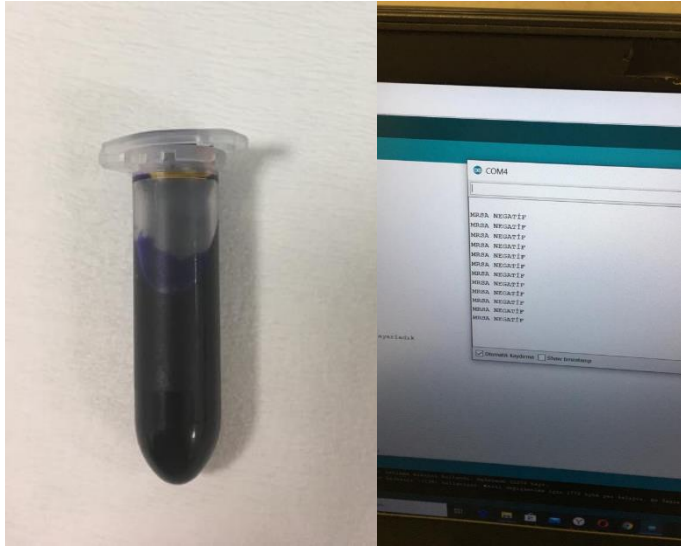
Tablo 3’te BCP indikatörünün zamansal olarak belirli yoğunluklarda bakteri üreme sonuçları, Tablo 4’te ise phenol red zamansal olarak belirli yoğunluklardaki bakteri üreme sonuçları verilmiştir.

Renk değişimleri incelendiğinde, BCP indikatörünün daha hızlı renk değişimine sebep olduğu gözlemlenmiştir. Şekil 10’da inkübasyon işleminden sonra renk indikatörlerindeki değişimler görülmektedir.

3.2. Özgüllük (spesifite) testi sonuçları

Özgüllük testi yapıldığında, hiçbir bakteri 24 saat içinde görsel olarak donanımın okuyabileceği seviyede ve renkte değişikliği tetiklememiştir. Bununla ilgili bulgular Tablo 5’de özetlenmiştir.

Şekil 11’de spesifite için gerekli bakterilerin görüntüleri ve sistem cevabı (inkübasyon işleminden sonra) bulunmaktadır.



Şekil 11. Yirmi dört saatte spesifite için yapılan testte kullanılan *S. epidermidis*'e ait görüntü (tüm bakterilerde aynı olduğu için temsilen eklenmiştir).

3.3. Verifikasyon uygulaması

Verifikasyon uygulamasının saatleri ve sonuçları Tablo 6’da verilmiştir.

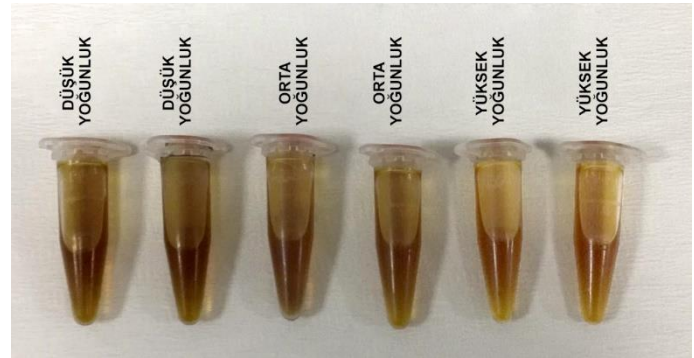
Saat 9:00’da, 24 saatin sonunda, renkler tüm yoğunluklarda tamamen dönmüştür. Sistem tekrarlandığında tüm yoğunluklar için RGB sensörü yeşildir. “MRSA POZİTİF. LÜTFEN KLASİK KÜLTÜR YÖNTEMİ İLE DOĞRULAYINIZ” uyarısı Seriport ekranında belirlemiştir.

MRSA üremesi sayesinde tüm yoğunluktaki brothlarda 24 saatin sonunda renklerin sarıya döndüğü gözlemlenmiştir. Şekil 12’de brothlarda oluşan renk değişimleri bulunmaktadır.

Yaptığımız çalışmanın amacı, MRSA tespitine yönelik hızlı bir sistem kullanılmasıdır. Kurulan düzende, farklı şeker katkılarıyla oluşturulan besi yerlerinde MRSA üremesiyle bağlantılı pH değişikliğine yanıt veren renk indikatörlerinin optik bir donanımla algılanması hedeflenmiştir.

Tablo 6
Verifikasyon uygulama sonuçları.

Ölçüm Saati	Bulaştırma Düzeyi		
	Düşük Yoğunluk	Orta Yoğunluk	Yüksek Yoğunluk
09:00	Tespit edilemedi	Tespit edilemedi	Tespit edilemedi
11:00	Tespit edilemedi	Tespit edilemedi	Tespit edilemedi
13:00	Tespit edilemedi	Tespit edilemedi	Tespit edilemedi
15:00	Tespit edilemedi	Tespit edilemedi	MRSA tespit edildi
17:00	Tespit edilemedi	Tespit edilemedi	MRSA tespit edildi
19:00	Tespit edilemedi	MRSA tespit edildi	MRSA tespit edildi
21:00	MRSA tespit edildi	MRSA tespit edildi	MRSA tespit edildi
09:00 (24. Saat)	MRSA tespit edildi	MRSA tespit edildi	MRSA tespit edildi



Şekil 12. Brothlarda bakteri üremesine bağlı oluşan renk değişimleri.

ISO 6888-1 kapsamındaki referans olan malzeme çalışmalarında 5000 kob/mL içeren sertifikalı referans malzeme kullanılmış ve standart sapma 1,76 oranında belirlenmiştir. Bu çalışmadaki $\pm 0,193$ sonucu, standartla belirlenmiş olan standart sapmanın altındadır ve %95 güven aralığıyla sonuç alınabileceğini göstermektedir (ISO-6888, 1999).

Farklı şeker katkılarındaki paralel ekim sonuçları, altıncı saat itibariyle 6,079-7,903 \log_{10} kob/mL seviyesindedir. Zaman odaklı üreme eğrisi 6 saat içerisinde belirgin şekilde yüksektir ve istatistiki anlamda önemli ölçüde ($p<0.05$) artmıştır. *Staphylococcus* türlerindeki pentoz şekerlerin tümünden enerji dönüşümünün elde edildiği literatürde bildirilmiştir (Strasters ve Winkler, 1963). Başka bir çalışma *Staphylococcus* türlerinin şeker alımı açısından benzersiz bir transport sistemleri olduğu ve şekerlerden maksimum düzeyde yarar sağladıklarını göstermektedir (Grosser ve ark., 2016). Bu sonuç, çalışmamızın sonunda bütün şeker türlerinden benzer olarak cevap almamızı açıklamaktadır.

Çalışmamızdaki renk değişimleri incelediğinde, Brom Creosol Purple (BCP) indikatörünün renk değişimini daha erken başlattığı gözlemlenmiştir. BCP pH göstergesi niteliğinde kullanılmıştır. pH 5,2’nin altında olursa, BCP’de sarı renk görülmektedir. BCP içerisinde pH 6,8’in üzerinde olduğunda ise, mor renk alır. Phenol red diğer renk indikatörü olarak kullanılmıştır ve pH 6,6’nın altındayken sarı, pH 8’in yukarısında kırmızı renk görünmektedir. Farklı bir çalışmada ise bu indikatörlerden dolayı herhangi bir farklılık

gözlemlenmediği belirtilmiştir (Chesney, 1922). Çalışmamızda gözlediğimiz bu farkın muhtemel nedeninin kullanılan şeker ekleri ve bakterinin farklılığı olduğu düşünülmektedir.

Verifikasyon işlemi sabah 9:00'da başlamıştır. Ardından, sistematik olarak belirli saatlerde sistem optimizasyonu yapılmıştır. Bulaştırmanın altıncı saatinde (saat 15:00) ilk pozitif cevap ölçülmüş ve yüksek konsantrasyonda olduğu gözlemlenmiştir. Yapılan bir çalışmada, hastaların çevreleri ve ellerinden alınan sayım göstermektedir ki, hastanın ellerinde ve temas ettiği yüzeylerde bulaşma 0-6 log arasında değişmektedir. Özellikle el örnekleri, 6 log₁₀kob/cm² seviyesinde bulaşma olduğunu göstermişlerdir. Çalışmamızda 6. saat itibarıyla yüksek bulaşma ile alınan cevabın hız açısından yeterli olabileceği düşünülmektedir (Kamiya ve ark., 2007).

Yaptığımız optik sistemde hassasiyet göz önüne alındığında 2 log₁₀kob/mL bulaştırma seviyesinde en geç 8 saat içinde sonuç alındığı gözlemlenmiştir. Bu bilgiler ışığında klasik kültür tekniklerinde tespit süreleri ve tespit sınırları ISO 6888-1 içerisinde 4 gün içerisinde sonuç vermiştir. 3,27 log₁₀kob/mL seviyesinde bu sonucun alındığı bildirilmiştir. Diğer çalışmalarda kültür tekniği kullanıldığında disk difüzyon testlerinin duyarlılığının 48 saat sonrasında güvenilir olduğu anlaşılmıştır. Kültür yöntemi olarak kullanılan mikrodilüsyon yönteminde 24 saat sonunda veri alınmaktadır (Velasco ve ark., 2005). Diğer bir yöntem olan oksasilin agar tarama yöntemleri ve oksasilin disk yöntemi MRSA tanımlanmasında kullanılmıştır. Bu iki yöntemde de inkübasyon için 24 saat beklenmektedir. Bu sürecin sonunda agar tarama yönteminin duyarlılığı %91,7 iken, oksasilin disk difüzyon yönteminin duyarlılığı %83,5 olarak bildirilmiştir (Cavassini ve ark., 1999). Benzer sonuçlara ISO ile de ulaşılmıştır. Bir *S. aureus* ile ilgili olarak toplam pozitif 91 kan kültürünün 40'ı MSSA, 51'i MRSA örneği olmak üzere PBP (penisilin bağlayan protein) testi ne uygulanmıştır. Özgüllük ve duyarlılık değerleri %97,5 ve %94,1 olarak belirlenmiştir (Gold ve ark., 2010). Yaptığımız optik sistemde brothların içerisindeki şeker oranları ve kullanılan renk indikatörünün etkilediği düşünülmüştür. Ayrıca, sistemimizde renk hassasiyetinin yüksek olmasına da katkısı olduğu kanaatine varılmıştır.

Yapılan bir çalışmada ELISA testinin inkübasyon için minimum 16 saat beklenmesi gerektiği bildirilmiştir. Test süresi uzun olan ELISA sisteminin yüksek hassasiyet ve özgüllüğe sahip olduğu belirlenmiştir. Bu test sisteminde örnek alımı teknisyen tarafından yapıldığı için yanlış sonuçların belli bir bölümünü teknisyen hatası oluşturmaktadır (Boutonnier ve ark., 1989). ELISA birçok basamaktan oluştuğu için teknisyenin özenli bir şekilde çalışma yapması gerekmektedir. ELISA aynı zamanda yüksek maliyetli bulunmuştur (Hicks ve ark., 1994; Le Blay ve ark., 2004).

Eklenen şeker katkılarının MRSA tarafından enerjiye dönüştürülmesinin sonucu ortamda pH değişiminin tetiklediği indikatörde renk değişimi olmasından dolayı, kurulan sistemin PCR gibi hassas bir yöntemden önce tarama testi olarak kullanılması düşünülmektedir. PCR ile yapılan çalışmalar göstermektedir ki PCR'nin hassasiyeti çok yüksektir, fakat maliyetin de yüksektir. Ek bir donanım ve ayrı analiz protokolleri gerekmektedir.

PCR analizinden elde edilen sonuçlar üzerinde inhibitörlerin etkin olduğu belirlenmiştir (Monteiro ve ark., 1997; Braid ve ark., 2003; Schrader ve ark., 2012).

Polimeraz zincir reaksiyonu enzimatik bir reaksiyondur ve inhibitör maddeler karşısında duyarlılık göstermektedir. PCR inhibitörlerinin yapılan testlerin farklı aşamalarında farklı

mekanizmalarla etkileşen maddeler oldukları belirlenmiştir. PCR inhibitörleri organik veya inorganik maddelerdir ve sıvı veya katı formda bulunabilirler. İmmünoglobulin (IgG), laktoferrin, hemoglobin, kollajen, proteinler, miyoglobin ve proteinazlar organik inhibitörlere örnek olarak gösterilebilirler. Etanol, fenol humik asitler, tanik, safra tuzları, üre ve melanin ise inorganik inhibitörlere örnektir. Bu inhibitörler ile PCR testinin sonucu olumsuz olarak etkilenebilir. Bununla birlikte, PCR testinin duyarlılığını da negatif yönde etkileyebildikleri görülmüştür (Kim ve ark., 1992; Löfström ve ark., 2004).

PCR testi ile MRSA tespiti 4 saatten daha az sürmektedir ve oldukça yüksek hassasiyete sahiptir (Baby ve ark., 2017). Real-time PCR testleri geleneksel kültür yöntemlerine kıyasla MRSA'yı daha hızlı tespit etmektedir. MRSA tespitinde PCR'nin özgüllüğünün saf koloniler için %100 oranında olduğu belirlenmiştir. PCR testlerinin hassasiyet ve özgüllük değeri diğer tespit sistemlerine nazaran daha yüksektir ve bu testler 10-15 dk. arasında sonuç vermektedir (Warren ve ark., 2004). Öte yandan PCR'nin uygulanmasında eğitilmiş teknisyen olma zorunluluğu ve PCR'nin yüksek maliyetli olması, tarama yöntemi olarak tercih edilmesini güçleştirmektedir.

Optik donanımlarla hazırlanmış olan cihazlar göstermektedir ki, çalışmamızda kullanılan TCS 3200 ile yaptığımız analiz sonuçları güvenilir ve elde edilen sonuçların doğruluğu uygulamada da kanıtlanmıştır (Fitriyah ve ark., 2018).

Literatürdeki bir çalışma kapsamında biyosensör içerisinde bulunan algılama platformuna altın kaplama yapılmış, nonobead yardımıyla *S. aureus* proteaz olan spesifik substrat kaplanmıştır. *S. aureus* tanısız algılama platformudur ve proteazların proteolitik aktivitesini ölçer. Ortaya çıkan enzimatik reaksiyon altın tabakasında bir renk değişimine sebep olmaktadır. Bir hassasiyet testi farklı yoğunluklarda bulunan bakteri yardımıyla yapılmıştır. Bu sensörden 10⁵ yoğunluğunda %36, 10⁴ yoğunluğunda %28 ve 10³ yoğunluğunda %22 oranında sonuç elde edildiği için, sensörün yeterli hassasiyete sahip olduğu kabul edilmiştir. Çalışmamızda kalitatif (çıplak gözle yapılmıştır) ve kantitatif (görüntüleme yazılımı) yöntemlerle sensörün hassasiyeti test edilmiştir (Suaifan ve ark., 2017). Çalışmamızın renk indikatöründeki renk değişimi kalitatif olarak, RGB renk sensörü renk değişimi kalitatif olarak yazılım ile uyarı sistemlerinden meydana gelmektedir. Literatürdeki bir başka çalışma, IgG'nin *S. aureus* ile Fc bölgesi arasında spesifik etkileşime dayalı elektromilüminesan (ECL) biyosensörü geliştirilmesi ile ilgilidir. Bu biyosensör 10³ yoğunluğunda %2,5, 10⁵ yoğunluğunda %2,6 ve 10⁹ yoğunluğunda %5,9 değerindedir ve biyosensörün özgüllüğü test edilmiştir (Yue ve ark., 2016).

Çalışmamızda kurmuş olduğumuz optik sistemde temel parametre pH değişimidir. Brothlarda değişen pH, hem serbest iyon sayısında, hem de ortam renginde değişim yaratır. Serbest iyon değişimi de sistem için baz alınabilir. Serbest iyon değişiminin ortamdaki akım üzerinde etkisi olduğu belirlenmiştir. Bu akımda oluşan değişim baz alınarak amperometrik hızlı tespit sistemi kurulabilir. Bu sistemde akım değişimi ölçülüp bakterinin varlığı belirlenebilir. Brothlar içerisinde meydana gelen pH değişimi ve serbest iyonlar ortamın voltajı üzerinde etkilidirler. Voltmetrik hızlı tespit sistemi ile bakterinin varlığı tespit edilebilmesi için bu voltajda oluşan değişimi baz almak gereklidir.

Brothlar içerisinde değişen pH değeri ile ilgili renk değiştirmesi ve sistemdeki renk değişimini test etmesi bakımından, kurduğumuz optik sistemin büyük bir avantajı

vardır. Hiçbir elektrota ve kimyasal maddeye bu donanımda ihtiyaç doğmamaktadır. Kullanım ömürleri kısadır; zira elektrotlarda besiyerleriyle etkileşim oluşmaktadır.

Çalışmamızda uyguladığımız sisteme yönelik bir diğer avantaj, sistemin taşınabilir yani ergonomik olmasıdır. Güç devresi optik sisteme dâhil edileceğinden, ebat ölçüsünün 6x13 cm olması planlanmaktadır.

4. Sonuç

Çoklu antibiyotik direncine bağlı olarak, MRSA hastane enfeksiyonunun en önemli etkenlerindendir. Bu etken tespit edildiği taktirde, enfeksiyon kontrolünde önemli bir basamak kat edilecektir.

Çalışmamız kapsamında tasarlanan hızlı tespit sisteminin amacı, MRSA tespitinde süregelen teşhis yöntemlerinin dezavantajlarını aza indirmektir. Elde ettiğimiz sonuçlar göstermektedir ki, sistemimizden kısa bir sürede sonuç alınmaktadır. Alışılmış enfeksiyon kontrol stratejilerinde daha çok klasik kültür tekniği uygulanmaktadır. Bu tekniklerle süre

Kaynaklar

- Appelbaum, P. C. (2006). MRSA the tip of the iceberg. *Clinical Microbiology and Infection*, 12, 3-10.
- Baby, N., Faust, A. C., Smith, T., Sheperd, L. A., Knoll, L., & Goodman, E. L. (2017). Nasal MRSA PCR testing reduces duration of MRSA-targeted therapy in patients with suspected MRSA pneumonia. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61(4), 1-8.
- Becker, K., Skov, R. L., & von Eiff, C. (2015). Staphylococcus, Micrococcus, and other catalase-positive cocci. *Manual of Clinical Microbiology*, 354-382.
- Cavassini, M., Wenger, A., Jaton, K., Blanc, D. S., & Bille, J. (1999). Evaluation of MRSA-Screen, a simple anti-PBP 2a slide latex agglutination kit, for rapid detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(5), 1591-1594.
- Boutonnier, A., Nato, F., Bouvet, A., Lebrun, L., Audurier, A., Mazie, J. C., & Fournier, J. M. (1989). Direct testing of blood culture for detection of the serotype 5 and 8 capsular polysaccharides of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 27(5), 989-993.
- Braid, M. D., Daniels, L. M., & Kitts, C. L. (2003). Removal of PCR inhibitors from soil DNA by chemical flocculation. *Journal of Microbiological Methods*, 52(3), 389-393.
- Cadena, J., Thinwa, J., Walter, E. A., & Frei, C. R. (2016). Risk factors for the development of active methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infection in patients colonized with MRSA at hospital admission. *American Journal of Infection Control*, 44(12), 1617-1621.
- Chesney, A. M. (1922). The use of phenol red and brom-cresol purple as indicators in the bacteriological examination of stools. *The Journal of Experimental Medicine*, 35(2), 181.
- Fitriyah, L. A., Indahwati, E., & Wardana, H. K. (2018). Measurement of Non-Invasive Blood Glucose Level Based Sensor Color TCS3200 and Arduino. IOP Conference Series: *Materials Science and Engineering*, 336(1), 1-6.
- Fridkin, S. K., Welbel, S. F., & Weisten, R. A. (1997). Magnitude and prevention of nosocomial infection in Intensive Care Unit. *Infectious Disease Clinics of North America*, 11, 479-496.
- Gold, H. S., Kirby, J. E., Qian, Q., Venkataraman, L., & Yamazumi, T. (2010). Direct detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* in blood culture broth by use of a penicillin binding protein 2a latex agglutination test. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(4), 1420-1421.
- Grosser, M. R., Khatri, D., Lance, T. R., Richardson, A. R., & Vitko, N. P. (2016). Expanded glucose import capability affords *Staphylococcus aureus* optimized glycolytic flux during infection. *American Society for Microbiology*, 7(3), 1-10.
- Hicks, C. R., Eberhart, R. J., & Sischo, W. M. (1994). Comparison of microbiologic culture, an enzyme-linked immunosorbent assay, and determination of somatic cell count for diagnosing *Staphylococcus*

olarak müdahalede gecikilebileceği gibi, hayatta kalım da riske atılabilir.

Çalışmamız kapsamında MRSA tespiti için tasarlanan sistemin PCR tekniğinden önce tarama sistemi olarak kullanılacağını ve bu sistemin MRSA enfeksiyon kontrolünde önemli bir role sahip olacağını öngörüyoruz.

Hastanelerde enfeksiyon yayılımını takip edebilmek için bu optik temelli sistemin kullanılabilceğini düşünüyoruz.

Teşekkür: Bu çalışma Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomedikal Mühendisliği Anabilim Dalı yüksek lisans programı kapsamında yazılan yüksek lisans tezinden hazırlanmıştır.

Çıkar çatışması: Yazarlar herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan eder.

Etik beyanı: Bu çalışmada, yazarlar, hiç bir insan ya da hayvan denek kullanılmadığını ve Etik Kurul iznine gerek olmadığını beyan eder.

- aureus* mastitis in dairy cows. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 204(2), 255-260.
- Hidron, A. I., Kourbatova, E. V., Halvosa, J. S., Terrell, B. J., McDougal, L. K., Tenover, F. C., ... & King, M. D. (2005). Risk factors for colonization with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in patients admitted to an urban hospital: emergence of community-associated MRSA nasal carriage. *Clinical Infectious Diseases*, 41(2), 159-166.
- ISO-6888. (1999). Microbiology of food and animal feeding stuffs – horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species) – part 1: technique using Baird-Parker agar (ISO 6888-1). 1sted. ISO-Microbiology. Geneva (Switzerland). pp. 1-11.
- Kamiya, A., Oie, S. Sawa, & A. Suenaga, S. (2007). Association between isolation sites of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in patients with MRSA-positive body sites and MRSA contamination in the surrounding environmental surfaces. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 60(6), 367-369.
- Kim, H., Pernille, N., Rasmussen, O. F., & Rossen, L. (1992). Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions. *International Journal of Food Microbiology*, 17(1), 37-45.
- Le Blay, G., Fliss, I., & Lacroix, C. (2004). Comparative detection of bacterial adhesion to Caco-2 cells with ELISA, radioactivity and plate count methods. *Journal of Microbiological Methods*, 59(2), 211-221.
- Löfström, C., Knutsson, R., Axelsson, C. E., & Rådström, P. (2004). Rapid and specific detection of *Salmonella* spp. in animal feed samples by PCR after culture enrichment. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(1), 69-75.
- Monteiro, L., Bonnemaion, D., Vekris, A., Petry, K. G., Bonnet, J., Vidal, R., ... & Mégraud, F. (1997). Complex polysaccharides as PCR inhibitors in feces: *Helicobacter pylori* model. *Journal of Clinical Microbiology*, 35(4), 995-998.
- Schrader, C., Schielke, A., Ellerbroek, L., & Johne, R. (2012). PCR inhibitors—occurrence, properties and removal. *Journal of Applied Microbiology*, 113(5), 1014-1026.
- Sousa, C., Brandão, M., Ribeiro, O., & Cardoso, T. (2015). Community-acquired severe sepsis: a prospective cohort study. *Open Journal of Internal Medicine*, 5(03), 37.
- Strasters, K. C., & Winkler, K. C. (1963). Carbohydrate metabolism of *Staphylococcus aureus*. *The Journal of General Microbiology*, 33, 213-229.
- Suaifan, G. A., Alhogail, S., & Zourob, M. (2017). Rapid and low-cost biosensor for the detection of *Staphylococcus aureus*. *Biosensors and Bioelectronics*, 90, 230-237.
- Velasco, D., del Mar Tomas, M., Cartelle, M., Beceiro, A., Perez, A., Molina, F., ... & Bou, G. (2005). Evaluation of different methods for

- detecting methicillin (oxacillin) resistance in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 55(3), 379-382.
- Vincent, J. L. (2003). Nosocomial infections in adult intensive-care units. *The Lancet*, 361(9374), 2068-2077.
- Warren, D. K., Liao, R. S., Merz, L. R., Eveland, M., & Dunne Jr, W. M. (2004). Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* directly from nasal swab specimens by a real-time PCR assay. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(12), 5578-5581.
- Weems Jr, J. J. (2001). The many faces of *Staphylococcus aureus* infection: recognizing and managing its life-threatening manifestations. *Postgraduate Medicine*, 110(4), 24-36.
- Yue, H., Zhou, Y., Wang, P., Wang, X., Wang, Z., Wang, L., & Fu, Z. (2016). A facile label-free electrochemiluminescence biosensor for specific detection of *Staphylococcus aureus* utilizing the binding between immunoglobulin G and protein A. *Talanta*, 153, 401-406.

Cite as/Atf şekli: Cetin, A., & Koluman, A. (2021). Metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) enfeksiyonu için hızlı uyarı sistemi. *Front Life Sci RT*, 2(3), 75-84.



Research article

A new species as a member of the Flora of Turkey: *Persicaria hydropiperoides* (Polygonaceae)

Mustafa Keskin^{*1} , Zeki Severoglu² 

¹ Marmara University, Institute of Pure and Applied Sciences, Biology Program, 34722, Goztepe, Istanbul, Turkey

² Marmara University, Faculty of Science & Arts, Department of Biology, 34722, Goztepe, Istanbul, Turkey

Abstract

Persicaria genus in Turkish Madımakgiller or Buckwheat family (Polygonaceae) is included in the genus *Polygonum* now. Today, the genus *Persicaria* is separated from the genus *Polygonum*. In this study, *Pe. hydropiperoides* belonging to the genus *Persicaria* is given as a new species for the flora of Turkey. Specimens of *Pe. hydropiperoides* were collected from Sancaktepe/ Paşaköy (Istanbul). Adding this new species, the number of *Persicaria* genus in Turkish Flora reached 12 species (13 taxa). Additionally, a Turkish name, detailed description, locality data, photographs, and geographical distribution information of the species were given in this research.

Keywords: A new record; Istanbul; *Pe. hydropiperoides*; *Persicaria*; Turkey

1. Introduction

Polygonaceae Juss (Buckwheat in English or Madımakgiller in Turkish), which contains around 50 genera and 1200 species worldwide, is usually found in temperate zones of the Northern Hemisphere and is only rarely found in tropical climates (Heywood, 1978; Freeman and Reveal, 2005).

Except for the subfamily Erigonuideoideae Meisner, the most common trait of this family is the presence of the ocrea (a stipule modification that wraps around the stem).

According to recent investigations, the number of taxa grew by 11 in Polygonaceae, the Flora of Turkey, and the Eastern Aegean Islands (Davis et al., 1967; Coode and Cullen, 1967). (Keskin, 2012; Karaer et al., 2020). *Persicaria* (L.) Miller, on the other hand, was originally assessed in *Polygonum* L. in 1754, however, Miller (1754) split it as a new genus. With the splitting of *Persicaria* from *Polygonum* in recent years, Turkey now possesses 12 genera (Brandbyge, 1993; Keskin and Severoglu, 2020).

In *Polygonum*, the ocrea is normally membranous, silvery,

and glabrous, with a two-lobed apex that is typically fibrous and glabrous. The ocrea tube of *Persicaria* is not membranous, but rather fleshy, brown or reddish, rarely silvery, hairy, or glabrous, seldom 2-lobed at the tip, and frequently ripped apart by aging (Webb and Chater, 1964; Davis et al., 1967; Hinds and Freeman, 2020).

2. Materials and methods

Persicaria samples were gathered from the Anatolian side of Istanbul in November 2019 during field investigations conducted by the first author as a part of his doctoral dissertation research.

Examples, the former name *Polygonum hydropiper* at first appearance, the current name *Pe. hydropiper* although it resembles '*hydropiper*', as a result of detailed examination, it is an unknown species from Turkey belonging to the genus *Persicaria*; as a result of the literature study (Webb and Chater, 1964; Small, 1895) and herbarium (E, EGE, ISTE, ISTF, ISTO, ANK, MUFE and NGBB).

* Corresponding author.

E-mail address: trifolium@hotmail.com (M. Keskin).

<https://doi.org/10.51753/flsrt.951412> Author contributions

Received 12 June 2021; Accepted 28 October 2021

Available online 15 December 2021

2718-062X © 2021 This is an open access article published by Dergipark under the [CC BY](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/) license.

The gathered samples are stored at MUFE (Marmara University Faculty of Arts and Sciences Herbarium).

3. Results

Linne named *Persicaria* as a member of the *Polygonum* genus because it looks to have peach (*Persica*) leaves (Linne, 1753). Miller later classified it as a distinct genus (Miller, 1754). With this record, *Persicaria* has 150 species worldwide (Hinds and Freeman, 2020) and 12 species in Turkey.

3.1. *Persicaria hydropiperoides* (Michaux) Small, Fl. S.E. U.S. 378, 1330 (1903). (Fig. 1 and 2).

Basionym: *Polygonum hydropiperoides* Michaux, Fl. Bor.-Amer. 1: 239 (1803).

Synonyms (according to Hinds and Freeman, 2005): *Persicaria opelousana* (Riddell) Small, Fl. S.E. U.S. 378, 1330 (1903). *P. hydropiperoides* subsp. *opelousanum* (Riddell) W.Stone, Pl. S. New Jersey 422 (1912). *P. hydropiperoides* var. *psilostachyum* H.St.John, Proc. Boston Soc. Nat. Hist. 36: 71 (1921). *P. hydropiperoides* var. *digitatum* Fernald, Rhodora 23: 260 (1922). *P. hydropiperoides* var. *asperifolium* Stanford, Rhodora 28: 27 (1926). *P. hydropiperoides* var. *bushmanum* Stanford, Rhodora 28: 27 (1926). *P. opelousanum* var. *adenocalyx* Stanford, Rhodora 28: 28 (1926). *Pe. paludicola* Small, Man. S.E. Fl. 457 (1933). *P. hydropiperoides* var. *breviciliatum* Fernald, Rhodora 42: 448 (1940). *P. hydropiperoides* var. *adenocalyx* (Stanford) Gleason, Phytologia 4: 23 (1952). *Pe. hydropiperoides* var. *euronotorum* (Fernald) C.F.Reed, Phytologia 50(7): 461 (1982). *Pe. hydropiperoides* var. *breviciliata* (Fernald) C. F. Reed, Phytologia 50: 461 (1982). *Pe. hydropiperoides* var. *bushiana* Mohlenbr., Vasc. Fl. Illinois 501 (2014), nom. inval. *Pe. hydropiperoides* var. *bushiana* (Stanford) Mohlenbr, Phytoneuron 2015-67: 3 (2015). *Pe. hydropiperoides* var. *strigosa* (Small) G.Wilh. & Rericha, Michigan Bot. 55(3-4): 95 (2016).

Type locality: in Pennsylvania, Virginia, Carolina.

Life span: Perennials with rhizomes.

Stems: (15-)35-45(-100) cm long; decumbent to ascending, usually branched, without ribs, glabrous; usually branched or single; brownish or colorless, sparsely glandular; the glands are prominent after the central part of the body, reddish-brown in the lower part; the internodium is variable but body-like in structure.

Leaves: Ocrea in the middle of the stem, swollen base, (5-)15-20(-23) mm, brown, at the tip, truncate, ciliated with bristles (2-)4-5(-10) mm, white; ocrea tube 10-nerved, end of each vein with reddish brownish cilia, fragile. Petioles (2-)5-8(-20) mm, glabrous or strigose; blade 40-80(-250) x (4-)10-18(-35) mm, no blotch, linear to lanceolate, acuminate to caudate and obtuse at apex; the main vein evident on the upper face, both the main vein and the lateral veins are prominent on the lower face with strigose on edge.

Inflorescences: (30-)50-100 × 2-5 mm, terminal, sometimes also axillary, erect, or curved. Bracts 8-15 x 1-3 mm, lanceolate, like a leaf. Peduncles 7-40 cm, usually as long as inflorescences; glabrous or strigose; ocreol usually overlapping distally, margins ciliate with bristles to 2-3 mm.

Flowers: Pedicels 1-3.5 mm, shorter than ocrea, and wrapped by ocreol; bisexual or unisexual and staminate, (2-)4-5(-6) per ocreate fascicle. Tepals 5; bisexual flowers 2,1-3,2(4)

mm, and staminate flowers 1.5-2.5 mm greenish with pinkish tips or whitish (sometimes rose colour); at maturity the lobes overlap; surface brownish or colorless glandular, usually rather dense, narrow margins, membranous, blunt tip; the veinless surface is adjacent at the base at approximately 1/3-1/2 of the length of the tepals. Stamen 8, anthers pink or red, elliptic to ovate. Styles 3.

Achenes: Included or apex subexserted, brown to brownish-black or black, 3-gonous, (1.5-) 2.8-3 × 1-2 (-2.5) mm, shiny, smooth.

Flowering time: 7-9 months.

Fruiting time: 9-11 months. Moist roadsides, wet habitats.

Plant Sample Collected:

Turkey: Istanbul, Sancaktepe, Paşaköy, center, in valley, fountain area, wet place, N 41° 03' 49.7" and E 28° 44' 57.4", 23.ix.2019, M. Keskin 7899!

Turkish name: Koca evelek (proposal)

Pe. hydropiperoides were discovered at Sancaktepe/Paşaköy (Istanbul). It is spread throughout semi-natural landscapes, residential areas, valleys, and marshes. This species associated with a wide range of plants in its environment: *Colchicum chalcedonicum* subsp. *chalcedonicum*, *Galatella linoisyris*, *Erica manipuliflora*, *E. arborea*, *Cistus creticus*, *C. salviifolius*, *Prunella vulgaris*, *Salvia forskahlei*, *Paspulum paspoloides*.

3.2. Identification key for perennial *Persicaria* in Turkey

1. Aquatic, rarely terrestrial; stamens longer than tepal
amphibia
1. Terrestrials; stamens shorter than tepal
 2. Stems loosely prickled; loosely rooting at nodes (perennant)
thunbergii
 2. Stems smooth; strongly rooting at nodes (net perennials)
 3. Tepal glabrous
decipiens
 3. Tepal glandular
hydropiperoides

A visual comparison of mentioned perennial *Persicaria* species is given in Fig. 3.

4. Discussion

Although it is expected that *Pe. hydropiperoides* extend across a larger region than the 2-3 km² region where the samples were gathered. It has a wider spread than this single record since it may have been misidentified among similar herbarium specimens. *Pe. hydropiperoides* is one of the species with a great number of (16) synonyms, and it is frequently misnamed due to its high variety and worldwide distribution. The inaccuracy rate increases, especially when identifying without seeing all of the plant's organs (Table).

When a diagnosis is established without removing the subterranean parts, the genus *Persicaria* is frequently referred to as *Pe. maculosa*. *Pe. hydropiperoides* achenes are all triangular prismatic, *Pe. maculosa* achenes are triangular and two-faced, and ocrea have somewhat longer hairs on the borders (Hinds



Fig. 1. *Persicaria hydropiperoides*, (1) Habitus, (2) Internodium, ocrea and base of leaf, (3) Inflorescence and (4) Infructescence.



Fig. 2. *Persicaria hydropiperoides*, (1) General view, (2) Rhizome, (3) Ocrea, (4) Leaf, (5) Inflorescence with staminate flowers, (6) Inflorescence with bracts and upper leaves and (7) Fruiting perianth.

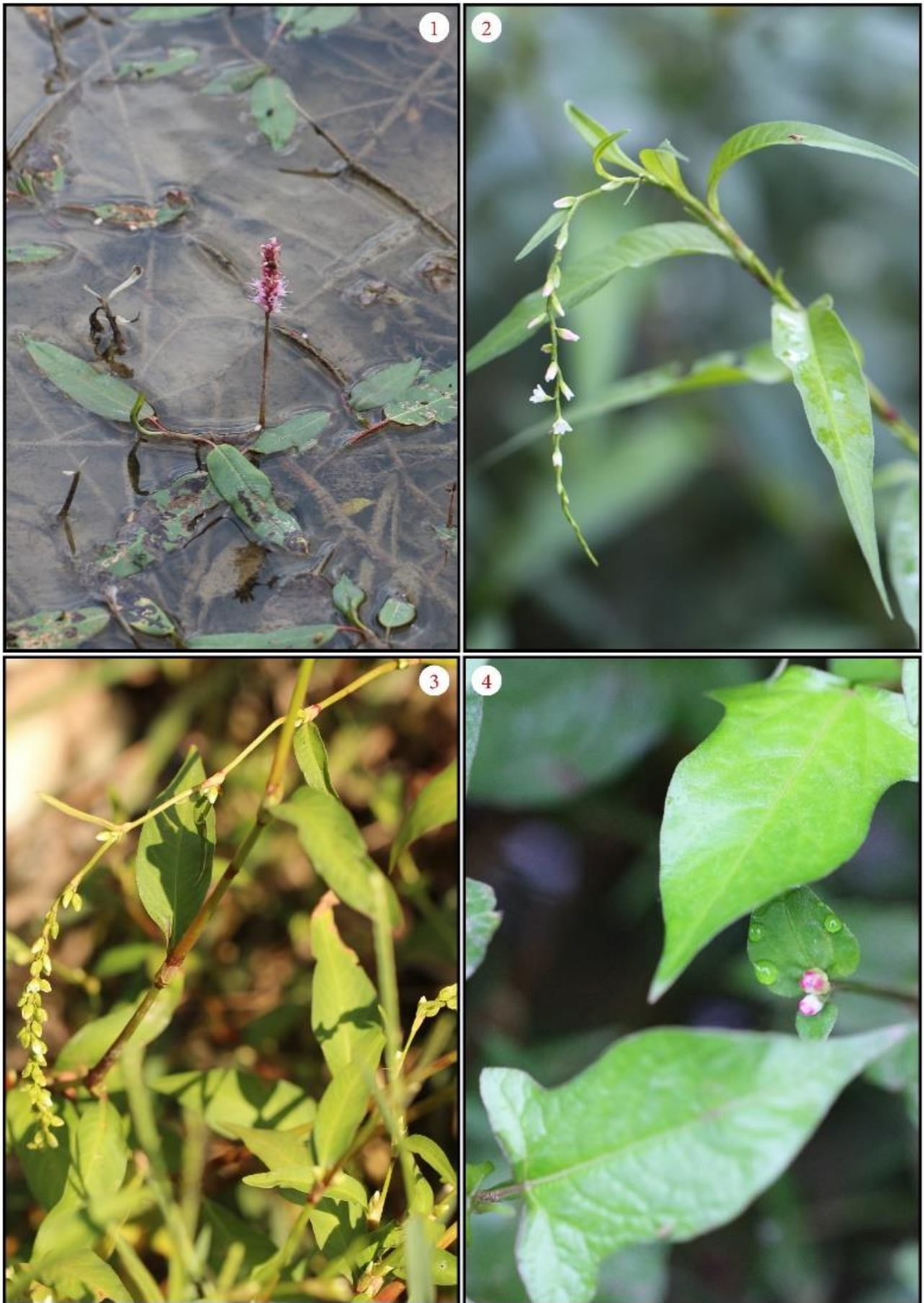


Fig. 3. Perennial *Persicaria* species, (1) *Pe. amphibia*, (2) *Pe. decipiens*, (3) *Pe. hydropiperoides*, (4) *Pe. thunbergii*.

TableA taxonomic comparison of *Pe. hydropiperoides* and its allies.

	<i>hydropiperoides</i> (This Article)	<i>hydropiperoides</i> (Hinds & Freeman 2020).	<i>hydropiper</i> (Hinds & Freeman 2020).	<i>maculosa</i> (Hinds & Freeman 2020).
Life Span	Perennial with rhizomes	Perennial with rhizomes	Annual, rhizomes absent	Annual, rhizomes absent
Stem Length	35-45 cm	15-100 cm	20-100 cm	5-130 cm
Stems	Decumbent to ascending, without ribs, glabrous	Decumbent to ascending, without ribs, glabrous/obscurely strigose distally	Decumbent to ascending/erect, branched, without ribs, glabrous, glandular-punctate	Procumbent, decumbent, ascending, without ribs, glabrous/appressed-pubescent
Ocrea	Brown, base inflated, 10-nerved, 15-20 mm; surface strigose; with bristles 2-4 mm	Brown, base inflated, 5-23 mm; surface glabrous/strigose, with bristles (2-) 4-10 mm	Brown, base somewhat inflated surface glabrous/strigose, usually glandular-punctate.	Light brown, base inflated, 4-10 (-15) mm; surface glabrous/strigose.
Petiole	5-8 mm, glabrous/strigose	2-20 mm, glabrous/strigose	1-8 mm, glandular-punctate	Sessile or 0.1-0.8 cm, glabrous/strigose
Leaves	Blotch absent; lanceolate/linear to lanceolate, 4-8 x 1-2 cm, faces glabrous; margins appressed- hirsute; apex acuminate to caudate	Blotch absent; broadly lanceolate to linear-lanceolate, 5-25 x 0.4-3.7 cm, margins antrorsely appressed-pubescent, apex acuminate	Blotch absent; lanceolate to narrowly rhombic, (1.5-)4-10(-15) x 0.4-2.5 cm, margins antrorsely strigose, apex acute to acuminate	Blotch present; adaxially, lanceolate to narrowly ovate, (1-) 5-10(-18) x (0.2-)1-2.5(-4) cm, margins antrorsely strigose, apex acute to acuminate
Inflorescences	Terminal, sometimes axillary, 50-100 x 2-5 mm	Terminal, sometimes also axillary, 30-80 x 2-5 mm	Terminal and axillary, 30-180 x 5-9 mm	Terminal and axillary, 10-45(-60) x 7-12 mm
Peduncle	7-40 cm	10-30 mm	(0-)10-50 mm	10-50 mm
Pedicels	1-3.5 mm	1-1.5 mm	1-3 mm	1-2.5 mm
Flowers	Bisexual, 3-5 per ocreate fascicle, homostylous	Bisexual/unisexual and staminate, homostylous, 2-6 per ocreate fascicle	1-3(-5) per ocreate fascicle, homostylous	4-14 per ocreate fascicle, homostylous
Perianth	Greenish/white with glandular-punctate on tubes and inner tepals; tepals 5, 2.1-4 mm; staminate flowers 1.5-2.5 mm, veins not visible; margin entire, apex obtuse	Roseate proximally, roseate, White/greenish white distally; tepals 5, 2.5-4 mm in bisexual flowers, 1.5-2.5 mm in staminate flowers; veins prominent/not, margins entire, apex obtuse to rounded.	Greenish proximally, White/pink distally, glandular-punctate; tepals 4-5, obovate, 2-3.5 mm, veins prominent/not, apex obtuse	Greenish white proximally and roseate distally/entirely roseate, not glandular-punctate, scarcely accrescent; tepals 4-5, obovate, 2-3.5 mm, veins prominent, apex obtuse
Stamens	8; anthers pink to reddish, ovate- spheroidal	8; anthers pink/red, elliptic to ovate	6-8; anthers pink/red, elliptic to ovate	4-8; anthers yellow/pink, ovate
Styles	3, connate at base area	3, connate near middle.	2-3, connate proximally.	2-3, connate proximally
Achenes	Brownish to blackish/black, 3-gonous; 2.8-3 mm, shiny, smooth	Brown to brownish black/black, 3-gonous, 1.5-3 mm, shiny, smooth	Brownish black, biconvex/3-gonous, 1.9-3 mm, dull, minutely roughened	Brownish black to black, discoid/biconvex to 3-gonous, (1.9-)2-2.7 mm, shiny, smooth

and Freeman, 2021). However, the inflorescence of *Pe. hydropiperoides* and *Pe. hydropiper* are identical. Mosafere and Keshavarzi (2010) described *Pe. hydropiperoides* as a new record for Iranian flora and conducted a comparative anatomical investigation with species similar to the species. With the registration in Turkey, the distribution of this species from Asia to Europe has been completed. This species is certain to be an invasive species.

Acknowledgments: We kindly thank to the herbarium staff of

References

- Brandbyge, J. (1993). Polygonaceae. In: Kubitzki, K. (ed); Rohwer J.G. and Bittrich V. (vol. eds). *The Families and Genera of Vascular Plants* volume II (pp. 531-544). Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, Germany.
- Coode, M. J. E. & Cullen, J. (1967). *Polygonum* L. In: Davis, P. H. et al. (eds), *The Flora of Turkey and the East Aegean Islands* vol. 2 (pp. 269-281). Edinburgh Univ. Press.
- Davis, P. H., Cullen, J. & Coode, M. J. E. (1967). Polygonaceae. *The Flora of Turkey and the East Aegean Islands* Vol. 2. (pp. 265-293). Edinburgh Univ. Press.
- Freeman, C. C. & Reveal, J. L. (2005). *Flora of North America Polygonaceae*. Vol. 5. (pp. 216-221). Oxford University Press, Oxford.
- Heywood, V. H. (1978). *Flowering Plants of the World* (pp. 1-336). Oxford University Press, Oxford.
- Hinds, H. R. & Freeman, C. C. (2005). *Persicaria* (Linnaeus) Miller. *Flora of North America*. http://www.efloras.org/florataxon.aspx?flora_id=1&taxon_id=250037826. http://flora.northamerica.org/Persicaria_hydropiperoides Last accessed on December 15, 2021.
- Karaer, F., Terzioğlu S., & Kutbay, H.G. (2020). A new genus record for the Flora of Turkey: *Reynoutria* (Polygonaceae). *KSU Journal of Agriculture and Nature*, 23 (3): 606-610.
- Keskin, M. & Severoglu, Z. (2020). The genus *Persicaria* (Polygonaceae) in Turkey with a new taxon record. *EMU Journal of Pharmaceutical Sciences*, 3(2), 97-105.
- Keskin, M. (2012). *Polygonum* L. In: Güner A., Aslan S., Ekim T., Vural M., Babaç M. T. (eds.) *Türkiye Bitkileri Listesi (Damarlı Bitkiler)* (pp.757-764). Nezahat Gökyiğit Bahçesi ve Flora Araştırmaları Derneği Yayını, İstanbul.

E, ISTE, ISTF, ISTO, ANK, NGBB, and MUFE for examining the *Polygonum* and *Persicaria* specimens and the ANG foundation for their financial support to the Edinburgh trip.

Conflict of interest: The authors declare that they have no conflict of interests.

Informed consent: This manuscript did not involve human or animal participants; thus informed consent was not collected.

- Linne, C. (1753). *Species plantarum: exhibentes plantas rite cognitatas ad genera relatas, cum differentiis specificis, nominibus trivialibus, synonymis selectis, locis natalibus, secundum systema sexuale digestas*. Tomus I, Holmiae (pp.1-360).
- Miller, P. (1754). *The Gardeners Dictionary: containing the methods of cultivating and improving all sorts of trees, plants, and flowers, for the kitchen, fruit, and pleasure gardens, as also those which are used in medicine : with directions for the culture of vineyards, and making of wine in England : in which likewise are included the practical parts of husbandry ...4th ed., corrected and enlarged*. London.
- Mitchell, S. (1971) Comparative leaf structure of aquatic *Polygonum* species. *American Journal of Botany*, 58, 342-360.
- Mosaferi, M. & Keshavarzi, M. (2010). Micromorphology and first record of *Persicaria hydropiperoides* (Polygonaceae) in Iran. *Journal of Taxonomy and Biosystematics*, 1(2), 63-72.
- Small, J. K. (1895). *A Monograph of the North American Species of the Genus Polygonum* Lancaster, Pa., The New Era Print.
- Webb, D. & Chater, A. (1964). *Polygonum* L. In: Tutin et al. (eds.). *Flora Europaea* vol. 1. (pp.76-80). Lycopodiaceae to Platanaceae. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

Cite as: Keskin, M. & Severoglu, Z. (2021). A new species as a member of the Flora of Turkey: *Persicaria hydropiperoides* (Polygonaceae). *Front Life Sci RT*, 2(3), 85-91.



Research article

Estimation of infection risk using symptoms of COVID-19: an approach based on fuzzy expert system

Serhat Ozbey^{*1} , Ahmet Koluman¹ , Sezai Tokat² 

¹ Pamukkale University, Faculty of Technology, Department of Biomedical Engineering, 20160, Denizli, Turkey

² Pamukkale University, Faculty of Engineering, Department of Computer Engineering, 20160, Denizli, Turkey

Abstract

According to the published reports and studies, the symptoms of the disease caused by the COVID-19 virus have not yet been fully determined. It is a major stress on clinicians to make a correct and consistent decision about whether to apply the test or not, as many factors with extreme uncertainty need to be evaluated at once. In this study, it is aimed to provide assistance to the clinicians by processing the data using fuzzy logic based decision support system at the time of the decision-making process. In the designed fuzzy logic based decision support system, a fuzzy rule-base was created with linguistic information by interpreting the symptoms that are naturally uncertain by experts. With the help of the obtained fuzzy rule base, the input data of symptoms will be processed and the risk of a person being infected will be obtained as an output. As the results of the estimation module constructed with the existing parameters are examined, it is observed to be compatible with the data published before. In this context, a data set with 50 different patients were designed randomly to evaluate the system. For the analysis of the nonlinear mapping obtained with the Mamdani type fuzzy inference system, random test data is used and infection risk at rates varying between 12.5-83% was determined. The fuzzy logic based decision support system for COVID-19 can be accepted as applicable, flexible, and trustworthy for clinicians. It can be said that this system is not only suitable for COVID-19 but also applicable for future epidemics.

Keywords: COVID-19; decision support systems; epidemic; fuzzy expert systems; fuzzy logic

1. Introduction

Disease is often defined as any impairment, disorder or disability in the functions or physiological, biological structure of the human body (Hunter, 2009). It is diagnosed by physician's interpretation of characteristic signs and symptoms. In general, there are no clear standard case definitions for the diagnosis of a disease. Due to these uncertain signs and symptoms, the decision-making process for a physician becomes more complex. Clinicians try to interpret the patient's condition by requesting more tests in order to make more accurate decisions in the diagnosis process. The complex diagnostic process becomes more complicated by the increasing number of exams that need to be evaluated simultaneously. Computer-aided

systems have been used to assist clinicians in this complex and uncertain disease diagnosis process. It is difficult to determine the nonlinear nature of the symptom, disease, and diagnostic process consisting of uncertainties with the two-valued classical logic. With its adaptation, learning, and reasoning capabilities, artificial intelligence (AI) began to play an increasingly important role in improving the quality of diagnostic effectiveness in healthcare. (Hosseini et al., 2018). In our study, fuzzy logic as a class of AI method has been used to model the aforementioned complexities of the decision process.

Fuzzy logic is necessary in cases where the problem is complex to be solved and expert opinions are needed on this subject or it is difficult for individuals to evaluate and make decisions alone (Sen, 2009). Using linguistic expressions with

* Corresponding author.

E-mail address: sozbey151@posta.pau.edu.tr (S. Ozbey).

<https://doi.org/10.51753/flsrt.1010253> Author contributions

Received 22 October 2021; Accepted 15 December 2021

Available online 24 December 2021

2718-062X © 2021 This is an open access article published by Dergipark under the [CC BY](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/) license.

fuzzy logic, approximate results can be created in a shorter time without the need of a mathematical model (Novak et al., 2016). For instance, Akcam and Takada (2002) designed a fuzzy model to assist dentists in choosing the type of braces labelled as low, medium, and high in terms of pressure according to the mouth structure of the patients. It was observed that a significant part of the decisions made by the model were also approved by experts. Bates and Young (2003) developed a fuzzy model where mean arteriole blood pressure and urine excretion per hour turbid values were taken as inputs, and the amount of drug required to open the intravascular occlusion was estimated to control the intervention to return patients in intensive care units with stopped heartbeat. Stanley et al. (2003) used fuzzy logic to distinguish between malignant facial tumors and benign skin lesions for accurately diagnosing patients.

Grant and Naesh (2005) used fuzzy logic and decision-making systems in the field of anaesthesia where drug dosage and ventilation adjustment were aimed with variables such as respiratory rate and blood pressure. Benecchi (2006) designed a fuzzy model to assist clinicians in the diagnosis of prostate cancer. The intended use of the data presented in these studies and in the system designed in our study is similar. COVID-19, a multisystem infection with pneumonia, is the subject of this study. In their study, Pereira et al. (2004) developed a fuzzy model for the diagnosis of pneumonia for children by using X-ray, shortness of breath and stethoscope auscultation, heart rate, body temperature, toxemia and respiratory rate data. Data from 153 children who were previously diagnosed with pneumonia were used in the discriminant analysis and the designed fuzzy model. They reported that fuzzy logic has a 78.3% correct classification and is a good model for diagnosing diseases with its accuracy when compared with discriminant analysis (Pereira et al., 2004). Nascimento and Ortega (2002) designed a fuzzy model with a Mamdani inference engine to predict the risk of neonatal death in children within 28 days after birth where birth weight and birth age are taken as inputs and neonatal mortality risk was estimated as an output.

In COVID-19 rapid tests and screening tests, false positivity and false negativity rates are not stable. Also, the confidence interval is not clear. Therefore, wrong approaches may occur depending on the test results. At the same time, there may be exposure due to the testing process being carried out in hospitals. Within the telemedicine concept, it is obvious that people have less exposure during the diagnosis and treatment process without going to the hospital remotely. Cismondi et al. (2013) designed a fuzzy logic model with 11 variables as input and the output is used to estimate the patient's condition and to reduce the unnecessary laboratory tests during the treatment process of patients with gastrointestinal bleeding. An accuracy of more than 80% was achieved in the classification of necessary and unnecessary laboratory tests for patients. And thus, an average 50% reduction in the number of laboratory tests was obtained. Blackmore et al. (2011) stated that unnecessary radiological examination procedures have many negative consequences such as exposure to unnecessary radiation and waste of resources of health institutions. Therefore, when requesting a radiological examination, it was investigated whether it is possible to benefit from a decision support system that works integrated with electronic health record (EHR).

As of December 31, 2019, the World Health Organization issued a warning against COVID-19 pneumonia transmission of unknown origin in Wuhan, People's Republic of China. The virus was named as 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) and

was later named SARS-CoV-2 virus by the International Virus Taxonomy Committee (ICTV) in reference to its close similarity with SARS. SARS-CoV-2 is classified within the Betacoronavirus (subgenus Sarbecovirus) of the Coronavirus family. The virus binds to an angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) receptor while inducing infection. SARS-CoV-2 is the seventh coronavirus (HCoV) known to infect humans (Uras, 2021).

The clinical picture of COVID-19 can range from asymptomatic infection to severe disease, depending on age, gender and many other parameters. Mortality rates vary by country. At this time of the pandemic, early laboratory diagnosis of COVID-19 can aid clinical management and outbreak control. Diagnostic testing may involve detecting the virus itself (viral RNA or antigen) or the human immune response to the virus. Although there are differences in approach to the diagnosis of COVID-19 in different countries, as stated in the diagnosis documents reported by WHO, mainly, a patient is deemed to have a COVID-19 infection after evaluation of clinical symptoms by biosensor screening test, verification by PCR and subsequent computerized tomography image of the lungs (Genc, 2020; WHO, 2021).

In our study, the emergence of COVID-19 infection at varying age ranges, varying symptoms, and ambiguity due to changing practices in the test protocols were taken into account. Also, the symptoms of an infected person involved ambiguity in it. Using computer-aided systems to provide support in the decision-making process will provide more consistent and healthier results instead of leaving this decision, which is a process of evaluating many symptoms together, under human control. In this study, the most common symptoms of COVID-19 infection were determined and the obtained data were included in a fuzzy inference system and the probability of a person's being infected that presents the symptoms was taken as an output.

1.1. Fuzzy logic

The concept of fuzzy logic gained meaning in our modern era with the article published by Lotfi A. Zadeh in 1965 who is considered as the modern founder of fuzzy logic (Zadeh, 1965). Fuzzy logic, which did not gain importance after the first published article, started to be used more in the mid-1970s. The articles (Zadeh, 1973; 1975) published by Lotfi A. Zadeh in those years, in which the applicability of fuzzy logic to complex systems were explained, had an effect on the increase of fuzzy logic researches. Since the 1980s, the numerous studies of the Japanese who have increased their interest in fuzzy logic have enabled fuzzy logic to reach its present level. Today, it is possible to use fuzzy logic in most conceivable areas (Shahbazova et al., 2020).

Fuzziness is all the incomplete and uncertain information that is possessed when there is no complete information about the subject being evaluated (Sen, 2009; Novak et al., 2016). The linguistic expressions used in daily life for variables are directly applied to label fuzzy sets and with infinite number of membership degrees and an inference mechanism a crisp output is obtained. With its linguistic elements, the human brain actually acts like a fuzzy logic system in decision making process. Likewise, a fuzzy logic is a system where many uncertain expressions are evaluated as input parameters and the result is reached after passing through fuzzy system processes (Shahbazova et al., 2020).

1.1.1. Fuzzy sets - classic sets

In classical sets, an expression either belongs to one set or to another. On the other hand, in fuzzy sets, an expression may belong to one set to some extent, but also to other sets to different degrees. The difference of a fuzzy set and a classical set is shown in Fig. 1. As can be seen in the representative graphs, a situation in a classical set is either 1 or 0. In a fuzzy set, instead of a sharp distinction, there are degrees of truth or falsehood of that situation. In classical logic, a proposition can be true or false. However, in fuzzy logic everything is a matter of degree (Zadeh, 1965; 1996).

The human life and linguistic information mostly involve vagueness that make it impossible to have sharp or precise distinctions in the world. Fuzzy sets and fuzzy logic theory provides us to use human expert knowledge and linguistic information (Zadeh, 1973; 1975; 1996).

1.1.2. Fuzzy logic system structure

The fuzzy logic system is based on linguistic information. It is based on finding the approximate non-linear mapping of a non-linear uncertain system input-output relation with a simple software process and without the need of mathematical system model. While developing a model for a fuzzy system, the input parameters of the problem are determined first. Then the input parameters are defined using fuzzy sets. Different membership functions can be used when defining fuzzy terms. Membership functions are explored in detail in (Zhao & Bose, 2002). Output parameters corresponding to the inputs are also determined and defined using fuzzy terms. After that, the rule base is created with "IF-THEN" structure. In this process, a list of rules is created with verbal expressions based on expert knowledge about the problem. Fig. 2 shows the general structure of a fuzzy logic system.

In Fig. 2; the inputs are all the information (numerical and verbal) about the problem entries and the outputs are all the information (numerical and verbal) corresponding to the input parameters of the problem. The fuzzification block is the step of defining a precise input variable with the specified membership functions. Membership degrees of the input variable to sets are determined between 0 and 1. At the end of this step, exact values are converted into fuzzy values (Kayacan & Mojtaba, 2016). At the fuzzy rule base block, by using inputs and outputs, a rule list is created with the linguistic information of the expert knowledge in "IF-THEN" structure. The fuzzy inference system (FIS) engine works integrated with the rule base. At this step, all rules are evaluated separately and a decision is made for each fired rule. As a result, fuzzy output sets are obtained (Ross, 2004). The defuzzification is the last step in which the obtained fuzzy outputs are converted to a precise value. It is the opposite process of the fuzzification phase. Many methods are used in the defuzzification process. The most commonly used methods can be listed as: center of gravity, maximum average, weighted average, and area center (Ewald & Mohammad, 2015).

1.1.3. Mamdani fuzzy inference system

FIS is also known as rule-based fuzzy systems, fuzzy expert systems, and fuzzy models (Sivanandam et al., 2007). FIS is the process of formulating the mapping from a given input to an output in which a decision is made based on information defined in the "IF-THEN" rule structure. In many areas, FIS can

make predictions in decision-making processes (Liu, et al., 2019). In the literature, various FIS engines were developed that can solve specific problems better than the others. However, the two most popular methods in FIS can be listed as Mamdani and Takagi-Sugeno-Kang. Mamdani FIS engine is the most widely used inference method which is intuitive, suitable for human linguistic knowledge, and has an interpretable rule base (Mamdani & Assilian, 1975). Mamdani FIS, as the output sets are also fuzzy, some operations need to be done later in this method. We can list all the operations of the method as: fuzzification, inferring from rules triggered on the rule base, merging and defuzzification after output clusters.

1.1.4. Fuzzy rule base

The fuzzy rule base was created in the form of an "IF-THEN" structure with linguistic information, using expert knowledge according to the considered symptoms and age data. When creating rules, the minimum method will be used for the AND operator and the maximum method will be used for the OR operator.

1.1.5. Fuzzification

Fuzzification is the calculation of membership degree of fuzzy sets to crisp input values. Triangular and trapezoidal membership functions are the most common types of membership functions as they are easier to represent (Pedrycz, 1994). Each rule is fired separately to a degree that is a function of the match between its antecedents and the crisp input.

1.1.6. Aggregation

In this study, for the composition of fuzzy relations Max-Min composition is used. It is necessary to collect all the triggered rules after the fuzzification process. Thus, the defuzzification process will be started for the sum of the fuzzy clusters formed as a result of all the collected rules. In the designed model, the maximum method is used for the combination process.

Thus, the largest of the smallest (max-min) method was used in the fuzzy model. The largest of the results obtained at the same input value will be taken as the basis for the defuzzification process. Representational graphics of fuzzification and defuzzification processes are shown in F. 3.

1.1.7. Defuzzification

At this stage of the FIS, a single crisp output will be obtained in the summation of all the triggered fuzzy clusters. The center of gravity (centroid), which is one of the most widely used defuzzification methods, was chosen. In this method the geometric center of gravity of the sum of the obtained fuzzy clusters is found. The crisp output obtained with center of gravity method can be given as follows:

$$y_{center} = \frac{\int \mu(y_i)ydy}{\int \mu(y)dy}$$

1.1.8. Decision support systems

Human beings have to make decisions for the problems they face in most of their lives. Human decisions emerges as a

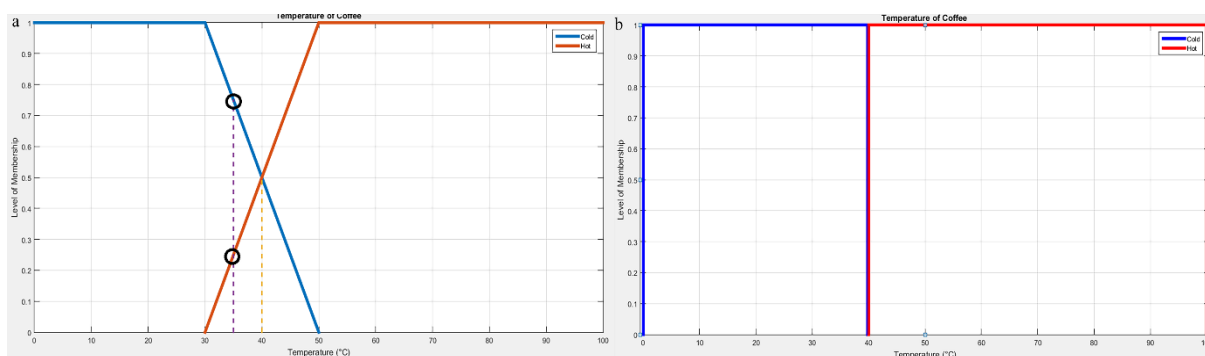


Fig. 1. (a) Fuzzy set representation plot. As an example, the value of 35°C belongs to the first set at a rate of 80%, while 20% belongs to the second set, (b) Classical set representation plot. A certain value belongs either to the first set or to the second set.

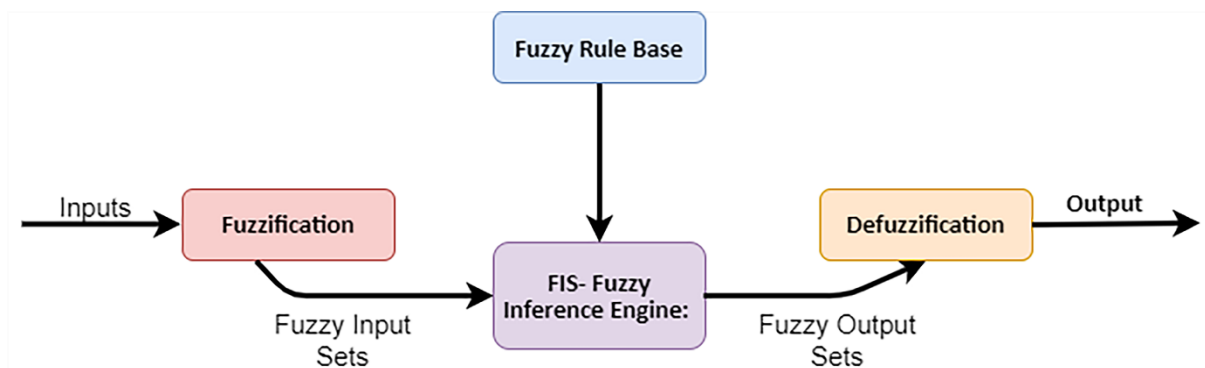


Fig. 2. General structure of fuzzy logic system.

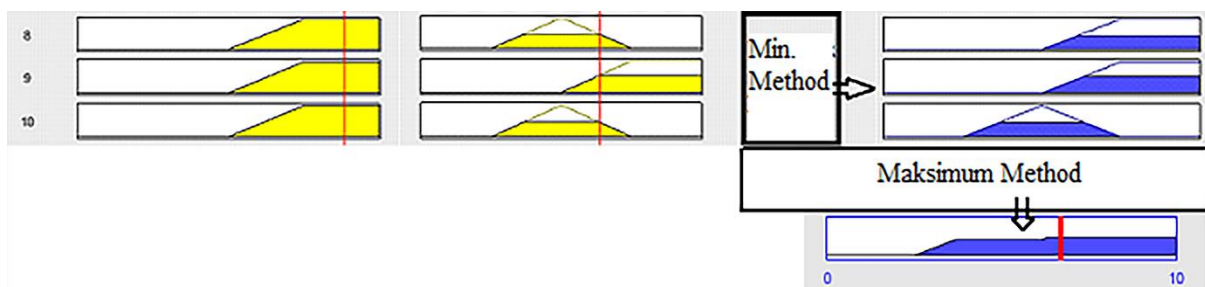


Fig. 3. A fuzzy system using the minimum (min) method for firing rules and using the largest (maximum) method for the combining process.

careful assessment of alternative choices in terms of the likelihood and value of the outcomes associated with these choices, and is always expected to end with a correct, true, right decision (Hickson & Khemka, 2014). Many environmental factors and personality are effective in the decision-making and problem solving process.

Decision support systems are computer-aided systems that assist human decision makers by evaluating the whole data acquired in the complex decision-making process. As mentioned before, many factors are involved in the decision-making process and these factors direct the result. Decision support systems, on the other hand, provide selection forecasting and decision support to the decision-making mechanism by simultaneously evaluating environmental factors, similar choices previously experienced and all written, verbal, visual and audio data related to the problem. Decision support systems have emerged and developed in line with requirements (Musen et al., 2006).

Formerly, the developers of decision-making mechanisms had main difficulty in finding information about the problem. Presently, much more information about the problem can be reached, but the main problem now is to evaluate all data objectively and simultaneously. Decision support systems are

user interactive systems for healthier, more consistent, accurate and effective decisions without ignoring the decision maker. It aims to assist the decision maker in accessing, summarizing, analyzing and concluding data (Miller et al., 1982; Musen et al., 2006).

1.1.8. Clinical decision support systems

Clinical decision support systems are computer-aided systems that assist healthcare administrators, doctors, nurses and experts in decision-making in their fields. The benefits of clinical decision support systems in the field of health are increasing progressively (Miller et al., 1982; Musen et al., 2006).

Clinical decision support systems offer many opportunities in the healthcare field (Kohli & Piontek, 2008) and have begun to be used in many areas such as the management of increasing healthcare costs, determining the treatment services to be applied to the patient, laboratory management, hospital management, and interpretation of test results.

We can classify clinical decision support systems under 3 titles; (Musen et al., 2006).

a) Tools for knowledge management; Clinical decision support systems for information management in healthcare

institutions enable the storage of information and data that will be needed by managers and clinicians and present the information to decision makers in a meaningful way at any time (Miller et al., 1982).

b) Systems for warning and focusing on one area; In such systems, the abnormalities are defined, and the user is notified of abnormal situations encountered. It also tries to prevent abnormal situations that arise from escaping the user’s eye. For example, if a treatment is applied to the patient, the physicians will list the possible results regarding the treatment result. It informs the physician about the answers to the questions on how the drug may affect the patient’s condition when drug therapy is applied. In general, it can be called a warning and reminder system (Miller et al., 1982; Musen et al., 2006).

c) Expert systems; in such systems, with the knowledge base created by the experts, patient data are processed and diagnosis or comments are made about the patient. Expert systems reduce the cost of services in the medical field or provide decision support in diagnosis and treatment processes. For instance, estimating the diagnosis of various diseases from the symptoms of the patient has been previously conducted with the Internist-1 project (Miller et al., 1982).

2. Materials and methods

In this study, the estimation of the risk of being infected according to the age and the most common symptoms during the COVID-19 epidemic, which the whole world is currently passing through, was made by using a fuzzy logic system having a Mamdani FIS.

The literature published in the determination of the most common symptoms of infected patients, as well as the reports of World Health Organization (WHO), Republic of Turkey Ministry of Health and other countries have been taken as a source (RTMH, 2021; WHO, 2021).

Symptoms and age data determined in the study were taken as an input for the fuzzy model and the probability of people being infected was taken as an output data. After the input and output data were determined, fuzzification was performed. Later, the probability of a person being infected is obtained by applying defuzzification to the fuzzy output of the fuzzy rule base and Mamdani FIS. The data processed according to Mamdani FIS, selected fuzzification and defuzzification methods were obtained. The designed fuzzy model was made with Matlab R2015a scientific package program and Fuzzy Logic Toolbox environment therein.

2.1. Identification of symptoms

The literature published while determining the symptoms of COVID-19 and the statements of WHO, Republic of Turkey Ministry of Health, US Department of Health and Human Services and the UK National Health Service were used (NHS, 2021; RTMH, 2021; WHO, 2021). Symptoms are broadly classified into main (common) symptoms, rare symptoms, and severe symptoms.

Table 1

Examples of the rules created by expert knowledge.

Fever (°C)	Age	Shortness of Breath	Dry Cough	Joint-Muscle Pain	Risk of Infection
High	80+	High	0 (not presented)	Moderate	Medium
High	80+	High	0 (not presented)	Not Presented	Low
High	80+	High	0 (not presented)	Very Much	Very High
High	80+	High	0 (not presented)	Moderate	High

There are differences in the published literature and reports because the exact risk factors and severity of the symptoms are still unknown (Genc, 2020; Guan et al., 2020).

Since the COVID-19 outbreak has such an imprecise and vague expression, it was requested to evaluate the risk of infection with a fuzzy modeling. Generally, main symptoms are listed as fever, cough, and joint pain-fatigue. Rare symptoms include diarrhea, headache, loss of taste and smell. Shortness of breath is listed as a severe symptom (CDC, 2020; Guan et al., 2020; NHS, 2021; TRMH, 2021; WHO, 2021). In this study, main symptoms and the severe symptom listed above were decided to be used as an input data. The fever data, joint pain-fatigue level and shortness of breath of the person to be informed will be entered into the model as between 0 and 10 (0: very bad, 10: very good) and if there is a dry cough, it will be entered into the model as 1, if not 0.

The incidence of COVID-19 disease also varies according to age groups. According to the reports of World Health Organization and Republic of Turkey Ministry of Health (TRMH, 2021; WHO, 2021), it is seen that the majority of the infected patients are in the 25-49 age group.

According to the current reports of the Republic of Turkey Ministry of Health, 7.3% in children aged 15 and under, 13.7% between 15-24 years old, 49.4% in the 25-49 age group, 18.5% between the ages of 50-64, 8.4% occurred in the 65-79 age group, and 2.6% were 80 years old and above.

In this study, the risk of people being infected will be taken as the output data to be obtained as a result of the input data and the fuzzy rules. The risk of being infected is divided into 5 groups.

From symptoms entered as input data fever graph is shown in Fig. 4 (a), joint pain and fatigue graph (b), dry cough graph (c) and shortness of breath graph (d).

In the model made in the study, age data were examined in 4 groups to obtain more meaningful data. Age data groups are: 0-24, 25-49, 50-79, 80+. The age data graph created in the model is shown in Fig. 5.

Output data in the study were grouped as: very low, low, medium, high and very high. Triangle and trapezoidal membership functions are used when defining output data in the model. In the model, the risk of infection is given in percentage (%). The graphic created with selected membership functions is shown in Fig. 6.

2.2. Fuzzy rule base

Some of the rules created by expert knowledge in the study are shown in Table 1. A total of 216 rules were created.

In the designed model, after entering the age of the person, the condition of joint-muscle pain, shortness of breath, the presence of cough and the fever level the risk of infection were taken as outputs. After a few data entries, the results of the model are shown in the Fig. 7.

The figure shows the rule viewer display, the data fired according to the input data, and the sum of the fuzzy rules combined with the clarification process.

Input data:

Fever: 37.9.

Age: 42.

Breath Condition: 7 (0: very bad to 10: very good).

Dry Cough: 1 (Yes) (0: not present, 1: present),

Joint-Muscle Pain Condition: 6 (Between 0: very much and 10: not present).

Results: Person's risk of becoming infected: 74.9%.

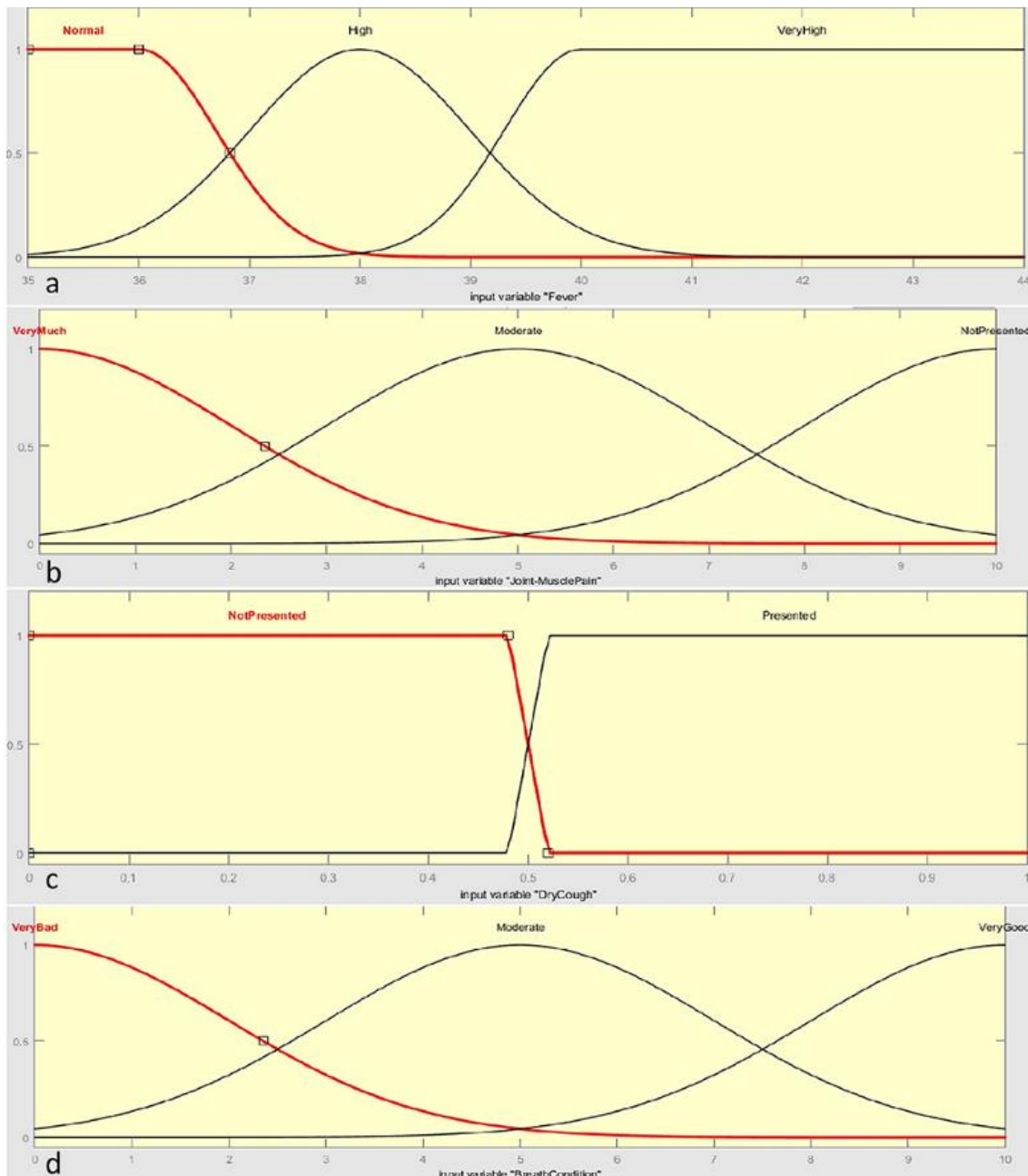


Fig. 4. Graphics of input variables. (a) Fever data, (b) Joint pain and fatigue, (c) Dry cough, (d) Shortness of breath.

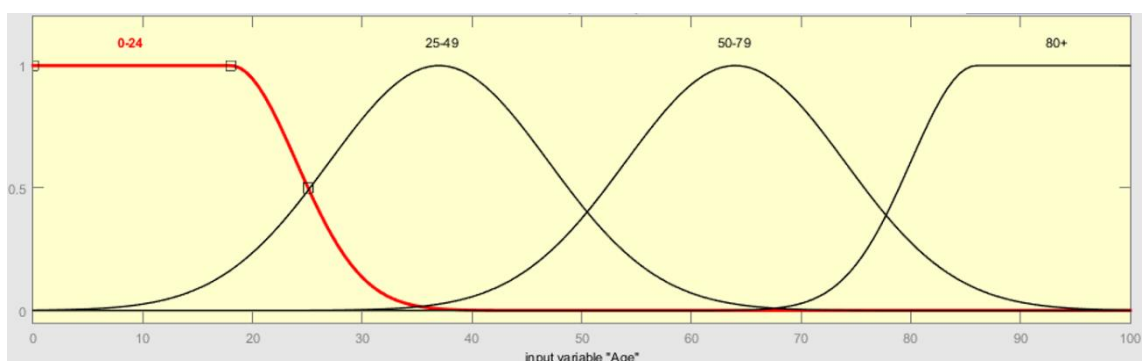


Fig. 5. Age data graphic.

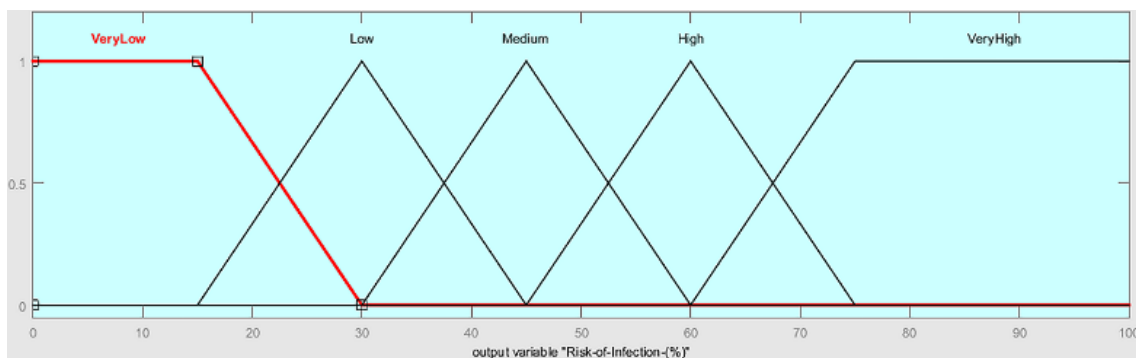


Fig. 6. Infection risk graphic as an output data.

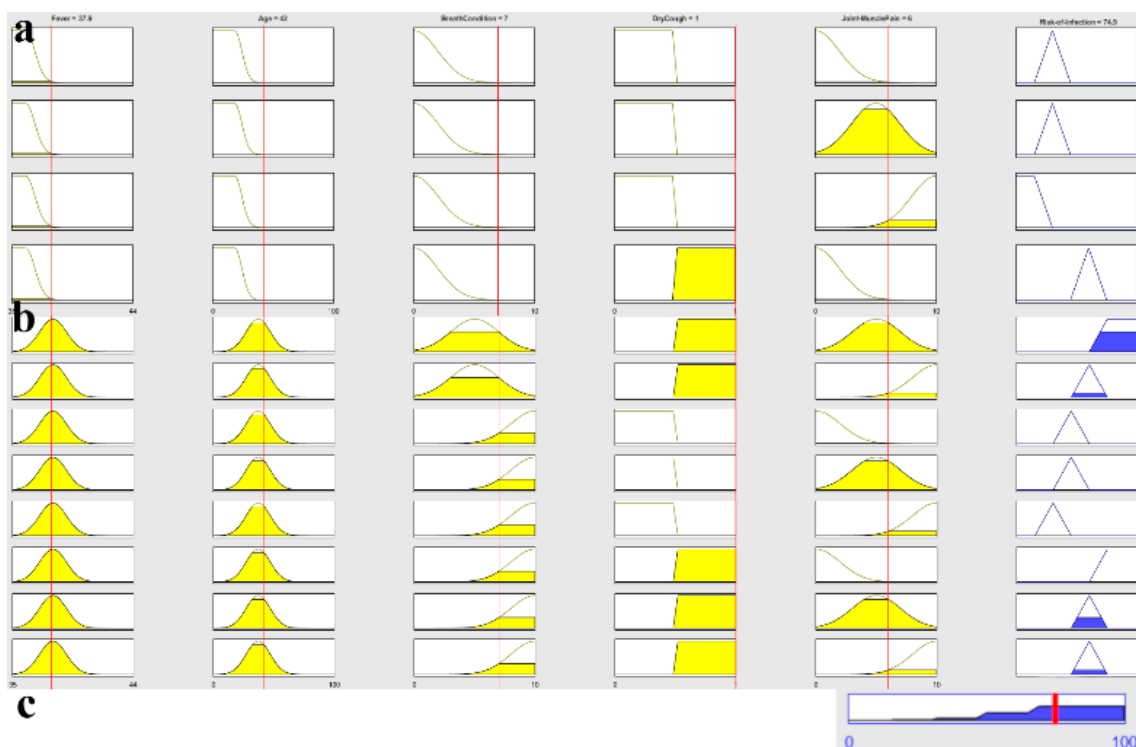


Fig. 7. Rule viewer display. (a) The rule viewer displays on the Fuzzy Logic Toolbox, (b) Some fired rules, (c) Results graphic after fuzzification and defuzzification processes.

3. Results and discussion

Outputs of the model are shown in Table 2. Model outputs as risk of infection are ranked (%) from low to high.

3D graphics of the designed model were drawn according to variables such as age-fever, age-shortness of breath, age-joint and muscle pain. 3D graphics created on Fuzzy Logic Toolbox are shown in Fig. 8, Fig. 9 and Fig. 10.

In this study, it was aimed to make predictions based on the symptoms of the disease by using fuzzy logic with the data of the pandemic COVID -19 that affected many people globally. In the first learning stage of the study, when the results of the estimation module constructed with the existing parameters in Fig. 4 a, b, c and d are examined, it is observed how the model will accommodate the estimate when taken from the real-life scenario.

Similarly, age data were observed to be compatible with the conducted studies and published hospital admissions. Model outputs as the percentage of infection were obtained by using a fuzzy rule base designed with expert knowledge and a proper defuzzification operation. In this context, 50 different patients set were formed depending on the experimentally applied data.

The fever, age, breathing condition, the presence of dry cough, joint and muscle pain belonging to these patients were added to these data sets and the risk of infection calculated as a result. As a result of randomly entered data with fuzzy logic created by us, infection risk at rates varying between 12.5-83% was determined. It is generally observed that the prediction deviation is less in studies conducted with fuzzy logic. In the fuzzy system designed by us, it is predicted that exposure and laboratory consumables will decrease, and it is in line with the studies mentioned in literature survey.

4. Conclusion and recommendations

There are almost no areas where software technology does not enter the human life. It is obvious that software support is required in order to ensure uniformity in the variations that occur in treatment approaches depending on the variability of experience despite the sample of information in the health sector.

Fuzzy logic makes it available to effectively deal with uncertainties in the decision-making process of electronic health records. In our study, a fuzzy logic based clinical decision.

Table 2

The outputs of the fuzzy decision support system.

Data No.	Outputs of the Model					
	Fever (°C)	Age	Breath Condition	Dry Cough	Joint-Muscle Pain	Risk of Infection (%)
1	36.0	8	10	0 (not presented)	10	12.5
2	36.1	18	10	0 (not presented)	9	17.3
3	35.9	77	10	0 (not presented)	10	17.8
4	36.5	23	8	0 (not presented)	5	25.3
5	39.2	13	9	0 (not presented)	7	27.5
6	37.5	21	10	0 (not presented)	7	28.3
7	39.0	14	8	0 (not presented)	7	30.5
8	36.2	41	6	0 (not presented)	9	30.6
9	36.8	71	7	0 (not presented)	4	30.6
10	37.0	49	4	0 (not presented)	8	30.7
11	36.6	28	4	0 (not presented)	7	30.8
12	38.3	86	9	0 (not presented)	3	34.6
13	38.9	28	8	0 (not presented)	8	36.0
14	38.1	32	7	0 (not presented)	8	38.2
15	36.7	35	9	0 (not presented)	3	38.9
16	36.8	57	4	0 (not presented)	3	39.9
17	37.0	30	8	0 (not presented)	2	41.3
18	35.9	77	7	1 (presented)	9	41.3
19	38.0	64	6	0 (not presented)	6	42.2
20	37.4	40	9	0 (not presented)	4	43.3
21	36.3	36	1	0 (not presented)	2	43.5
22	40.0	58	9	0 (not presented)	6	44.6
23	38.7	64	6	0 (not presented)	4	45.0
24	38.5	28	7	0 (not presented)	3	45.9
25	37.9	37	6	0 (not presented)	4	46.1
26	37.5	11	8	1 (presented)	6	50.1
27	36.8	26	6	1 (presented)	9	50.9
28	36.7	17	7	1 (presented)	3	51.5
29	37.9	35	6	0 (not presented)	1	55.8
30	38.3	26	3	1 (presented)	9	58.9
31	38.7	26	9	1 (presented)	10	59.0
32	37.1	61	2	1 (presented)	4	60.4
33	37.2	47	3	1 (presented)	9	61.3
34	37.3	37	2	1 (presented)	9	62.0
35	37.6	25	9	1 (presented)	3	62.0
36	39.6	53	7	1 (presented)	9	65.0
37	36.4	29	4	1 (presented)	4	65.7
38	39.6	67	8	1 (presented)	7	66.0
39	37.2	36	8	1 (presented)	4	66.4
40	39.9	70	8	1 (presented)	8	67.8
41	38.1	53	2	1 (presented)	8	70.2
42	39.5	82	3	1 (presented)	4	70.8
43	37.2	41	7	1 (presented)	5	72.0
44	39.8	57	6	1 (presented)	7	74.7
45	37.7	42	7	1 (presented)	6	74.9
46	38.7	43	6	1 (presented)	7	75.1
47	39.2	31	6	1 (presented)	3	76.8
48	38.9	29	3	1 (presented)	5	78.1
49	38.6	34	5	1 (presented)	5	81.8
50	40.0	37	1	1 (presented)	1	83.0

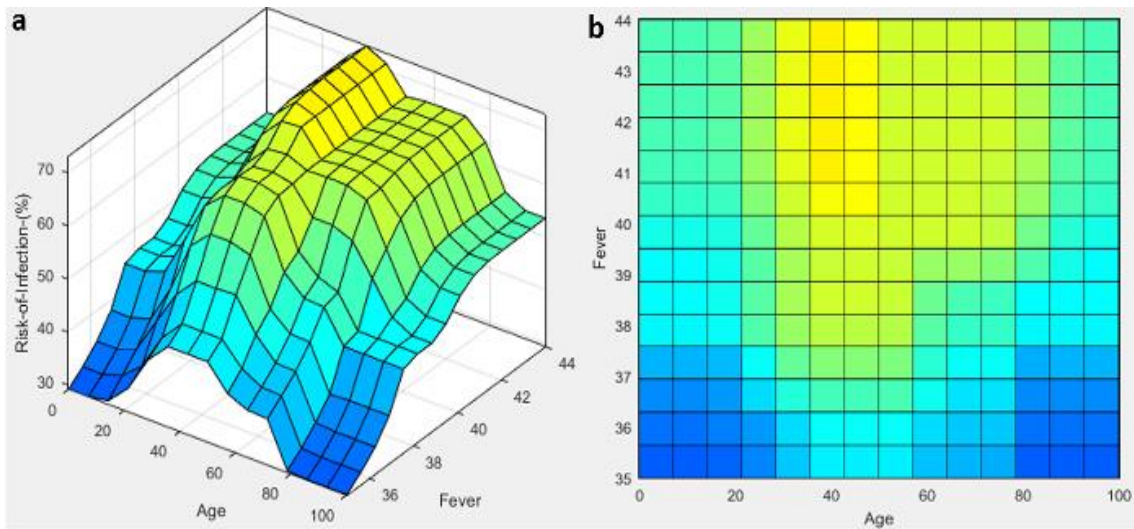


Fig. 8. (a) Output age-fever plot of the designed model, (b) Distribution of the age-fever according to the colored map.

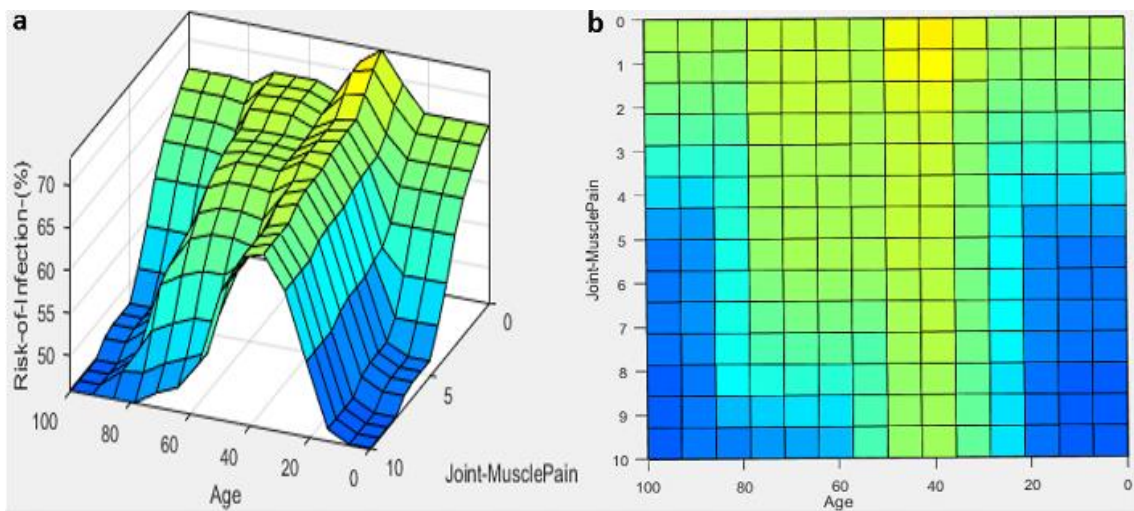


Fig. 9. (a) Output of the designed model, age-joint, muscle pain, (b) distribution of age-joint, muscle pain according to the colored map.

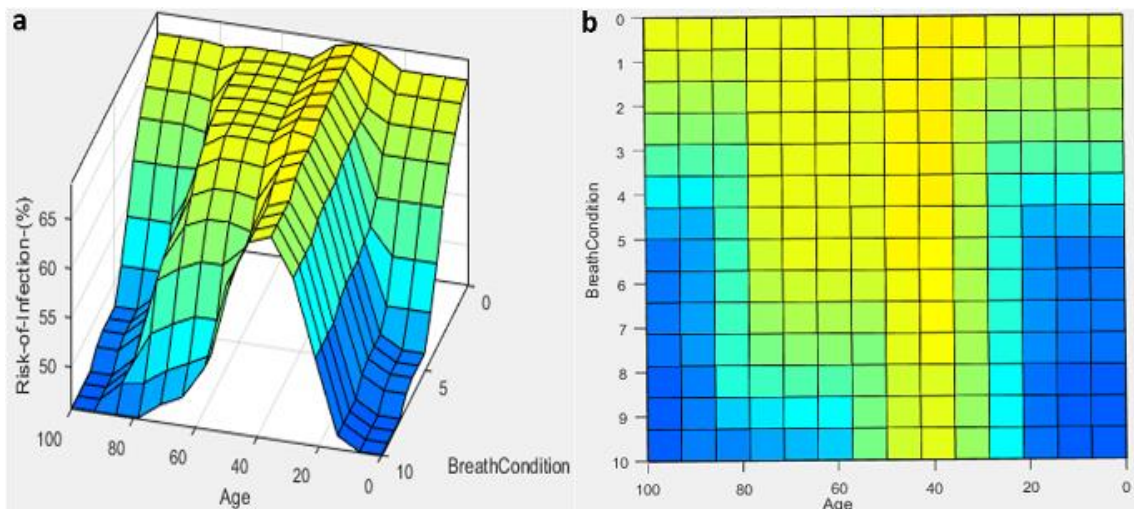


Fig. 10. (a) Output of the designed model, age-shortness of breath, (b) distribution of the age-shortness of breath according to the colored map.

support system is obtained as a pretest of COVID-19 for obtaining a risk scale to ensure that tests are directed to the right people.

It is difficult to break the resistance of the physicians related to artificial intelligence based decisions. However, the proposed fuzzy logic based system never replaces a physician;

on the contrary, it is thought to contribute to the public health and health economy by supporting the physician's decisions. In addition to the rise of virtual communication in the COVID-19 pandemic, which occurred during the current decade and changed the world, it is observed that the effectiveness of software-supported prediction modules also became prominent

and the concept of home healthcare services increased.

In addition to the insidious and changing symptoms of COVID-19, its fatal course continues without clear information about the public health risks. Considering the analysis of the fuzzy logic decision support system designed in this study, it is seen that positive results in estimation can be obtained using five different symptoms as input.

If new symptoms are decided to be appended to the proposed system, this can be easily obtained by adding new rules and revising the current rules to adapt to other symptoms. Therefore, the proposed system could support the clinicians and doctors in the diagnosis processes of COVID-19 by manually adapting as the disease change. When the results of our study are analyzed, it is observed that the related literature also has compatible results with our estimation results and that it is a

References

- Akcam, M. O., & Takada, K. (2002). Fuzzy modelling for selecting headgear types. *The European Journal of Orthodontics*, 24(1), 99-106.
- Bates, J., & Young, M. (2003). Applying fuzzy logic to medical decision making in the intensive care unit. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 167(7), 948-952.
- Benecci, L. (2006). Neuro-fuzzy systems for prostate cancer diagnosis. *Urology*, 68(2), 357-361.
- Blackmore, C. C., Mecklenburg, R. S., & Kaplan, G. S. (2011). Effectiveness of clinical decision support in controlling inappropriate imaging. *Journal of the American College of Radiology*, 8(1), 19-25.
- CDC. (2020). United States of America Centers for Disease Control and Prevention. Retrieved from Centers for Disease Control and Prevention: <https://web.archive.org/web/20200302201644/https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/hcp/clinical-guidance-management-patients.html>, Last accessed on December 4, 2020.
- Cismondi, F., Celi, L. A., Fialho, A. S., Vieira, S. M., Reti, S. R., Sousa, J. M., & Finkelstein, S. N. (2013). Reducing unnecessary lab testing in the ICU with Artificial Intelligence. *Internal Journal of Medical Informatics*, 82(5), 345-358.
- Ewald, F., & Mohammad, A. (2015). Optimal Placement and Sizing of Shunt Capacitor Banks in the Presence of Harmonics. In E. F. Mohammad A.S. Masoum, *Power Quality in Power Systems and Electrical Machines (Second Edition)* (pp. 887-959). Elsevier Inc.
- Genç, B. N. (2020). Critical management of Covid-19 pandemic in Turkey. *Frontiers in Life Sciences and Related Technologies*, 1(2), 69-73.
- Grant, P., & Naesh, O. (2005). Fuzzy logic and decision-making in anaesthetics. *Journal of Royal Society of Medicine*, 98(1), 7-9.
- Guan, W., & et al. (2020). Clinical characteristics of Coronavirus. *The New England Journal of Medicine*, 382(18), 1708-1720.
- Hickson, L., & Khemka, I. (2014). Chapter Six - The Psychology of Decision Making. In Hodapp R.M. (eds) *International Review of Research in Developmental Disabilities*. Volume 47, (pp. 185-229), Academic Press.
- Hossein, A., Gholamzadeh, M., & Shahmoradi, L. (2018). Diseases diagnosis using fuzzy logic methods: A systematic and meta-analysis review. *Computer Methods and Programs in Biomedicine*, 161, 145-172.
- Hunter, L. E. (2009). *The Processes of Life: An Introduction to Molecular Biology*. MIT Press.
- Kayacan, E., & Mojtaba, A. (2016). Fundamentals of Type-1 Fuzzy Logic Theory. In M. A. Erdal KAYACAN, *Fuzzy Neural Networks for Real Time Control Applications* (pp. 13-24). Oxford: Elsevier.
- Kohli, R., & Piontek, F. (2008). DSS in Healthcare: Advances and Opportunities. In C. W. Frada Burstein, *International Handbook on Information Systems* (pp. 483-493). Springer.
- Liu, K., Chen, Z., Wu, J., Tan, Y., Wang, L., Yan, Y., . . . Long, J. (2019). "Big Medical Data Decision-Making Intelligent System Exploiting Fuzzy Inference Logic for Prostate Cancer in Developing Countries. *IEEE Access*, 7, 2348-2363.
- Mamdani, E. H., & Assilian, S. (1975). An experiment in linguistic synthesis with a fuzzy logic controller. *International Journal of Man-Machine Studies*, 7(1), 1-13.
- Miller, R., Pople Jr, H., & Myers, J. (1982). INTERNIST-1: An experimental model for the diagnosis of infection.
- This study was done by using a Mamdani-type fuzzy inference system which obtains a nonlinear mapping between the input values and the output. Thus, it has been tried to show that it is possible to predict COVID-19 with a Mamdani-type fuzzy logic-based decision support system. The results obtained against 50 randomly generated patient data were found to be successful by experts and doctors in this field.
- Conflict of interest:** The authors declare that they have no conflict of interests.
- Informed consent:** This manuscript did not involve human or animal participants; therefore informed consent was not collected.
- mental computer - based diagnostic consultant for general internal medicine. *New England Journal of Medicine*, 307(8), 468-76.
- Musen, M., Shahar, Y., & Shortliffe, E. (2006). Clinical Decision-Support Systems. In: Shortliffe E.H., Cimino J.J. (eds) *Biomedical Informatics. Health Informatics*. (pp. 698-736). New York: Springer.
- Nascimento, L., & Ortega, N. (2002). Fuzzy linguistic model for evaluating the risk of neonatal death. *Rev Saude Publica*, 36(6), 686-692.
- NHS. (2021). United Kingdom National Health Service, Symptoms of Coronavirus. Retrieved from NHS: <https://www.nhs.uk/conditions/coronavirus-covid-19/symptoms/>, Last accessed on December 4, 2020.
- Novak, V., Dvorák, A., & Perfilieva, I. (2016). *Insight into Fuzzy Modeling*. John Wiley & Sons.
- Pedrycz, W. (1994). Why triangular membership functions?. *Fuzzy Sets and Systems*, 64(1), 21-30.
- Pereira, J., Tonelli, P., Barros, L., & Ortega, N. (2004). Clinical signs of pneumonia in children: association with and prediction of diagnosis by fuzzy sets theory. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 37(5), 701-709.
- Ross. (2004). *Fuzzy Logic with Engineering Applications*. 2nd ed. West Sussex: John Wiley & Sons Ltd.
- Shahbazova, S. N., Sugeno, M., & Kacprzyk, J. (Eds.). (2020). *Recent Developments in Fuzzy Logic and Fuzzy Sets: Dedicated to Lotfi A. Zadeh* (Vol. 391). Springer Nature.
- Sen, Z. (2009). *Bulanık Mantık İlkeleri ve Modelleme (Mühendislik ve Sosyal Bilimler)*, İstanbul: Su Vakfı Yayınları.
- Sivanandam, S., Sumathi, S., & Deepa, S. (2007). *Introduction to Fuzzy Logic using MATLAB*. Berlin: Springer.
- Stanley, R., Moss, R., Van Stoecker, W., & Aggarwal, C. (2003). A fuzzy based histogram analysis technique for skin lesion discrimination in dermatology clinical images. *Computerized Medical Imaging and Graphics*, 27(5), 387-396.
- RTMH. (2021). Republic of Turkey Ministry of Health, COVID-19 Information Bulletin. Retrieved from <https://covid19.saglik.gov.tr>, Last accessed on October 7, 2021.
- Uras, M. E. (2021). In silico comparative analysis of SARS-CoV-2 nucleocapsid (N) protein using bioinformatics tools. *Frontiers in Life Sciences and Related Technologies*, 2(1), 1-9.
- WHO. (2021). World Health Organization. Coronavirus disease 2019 (COVID-19) Situation Report – 89; Diagnostic testing for SARS-CoV-2. Retrieved from <https://www.who.int/health-topics/coronavirus>, Last accessed on October 7, 2021.
- Zadeh, L. (1965). Fuzzy set, *Information and Control*, 8(3), 338-353.
- Zadeh, L. (1973). Outline of a new approach to the analysis of complex systems and decision processes. *IEEE Transactions on Systems, man, and Cybernetics*, 3(1), 28-44.
- Zadeh, L. (1975). The concept of linguistic variable and its application to approximate reasoning. *Information Sciences*, 8(3), 199-249.
- Zadeh, L.A. (1996). Fuzzy logic= computing with words, *IEEE Trans. On Fuzzy Systems*, 2, 103-111.
- Zhao, J., & Bose, B. (2002). Evaluation of membership functions for fuzzy logic controlled induction motor drive. *28th Annual Conference of the Industrial Electronics Society* (pp. 229-234). Sevilla: IEEE.

Cite as: Ozbey, S., Koluman, A., & Tokat, S. (2021). Estimation of infection risk using symptoms of COVID-19: an approach based on fuzzy expert system. *Front Life Sci RT*, 2(3), 92-102.



Research article

Why lncRNAs were not conserved? Is it for adaptation?

Elif Karlik¹ 

¹ *Istinye University, Faculty of Engineering and Natural Science, Department of Molecular Biology and Genetics, 34010, Istanbul, Turkey*

Abstract

Plants are sessile organisms affected by changing environment, especially biotic and abiotic stress. Long non-coding RNAs (lncRNAs) became prominent as crucial regulators in diverse biological mechanisms, including developmental processes and stress responses such as salinity. In this study, salinity related lncRNAs were sequenced and analyzed according to homology based on rice and maize lncRNA sequences. After sequencing, 72HASATROOT and 72TARMROOT were identified as 568 bp, additionally, 72HASATSHOOT and 72TARMSHOOT were also 568 bp according to reference sequence which are the member of the natural-antisense lncRNA with 565 bp. Besides, 77HASATROOT and 77TARMROOT were identified as 676 and 644 bp, additionally, 77HASATSHOOT and 77TARMSHOOT were 666 bp according to reference sequence alignment that reference sequence was 667 bp and the sno-lncRNA member. Sequencing studies demonstrated sequence alterations resulted in secondary structure changes which may affect the adaptation of varieties in response to stress. As a conclusion, rapid evolution of lncRNAs may be another force for adaptation to changing environment in plants.

Keywords: *Barley, Hordeum vulgare L., long non-coding RNAs, sequence analysis*

1. Introduction

Long non-coding RNAs (lncRNAs) are more than 200 nucleotides (nt), opening a new branch for RNA studies, while the eukaryotic genomes were constituted only a small portion of the protein-coding genes. lncRNAs mainly has no coding sequence (CDS) or open reading frame (ORF) (Ulitsky and Bartel, 2013; Chekanova, 2015). lncRNAs are produced approximately from whole genome parts, including sense and antisense strands of a protein-coding genes, intergenic regions, and introns (Mattick and Rinn, 2015).

The functions of lncRNAs are still mystery and under investigation. However, the studies are point to fact that they became prominent as important regulators in gene expression at the transcriptional, post-transcriptional and post-translational levels (Flynn and Chang, 2014; Ren et al., 2021; Statello et al., 2021). Functional analysis of lncRNAs demonstrated they are involved in nuclear structure integrity process by controlling the

chromatin remodeling complexes and regulating the expression of either nearby genes or genes elsewhere in cells (Rinn and Chang, 2012; Goff and Rinn, 2015; Song et al., 2019; Grossi et al., 2020).

In recent years, reports on the plant lncRNAs have demonstrated they act as key regulatory elements in nearly all developmental process, including root organogenesis (Ganguly et al., 2021), flowering time (Heo and Sung 2011; Ghorbani et al., 2021), photo morphogenesis (Wang et al., 2014), and reproduction (Zhang et al., 2014; Fang et al., 2019). The studies reported plant lncRNAs with diverse biological mechanisms played in developmental process, biotic and abiotic stress responses (Swiezewski et al., 2009; Heo and Sung, 2011; Wang et al., 2014).

Evolutionary conservation has been considered as useful metric for evaluating the functional importance of genes, although lack of sequence conservation does not imply the opposite (Johnsson et al., 2013; 2014). lncRNAs are found to

* Corresponding author.

E-mail address: elif.karlik@istinye.edu.tr (E. Karlik).

<https://doi.org/10.51753/flsrt.1027595> Author contributions

Received 23 November 2021; Accepted 22 December 2021

Available online 24 December 2021

2718-062X © 2021 This is an open access article published by Dergipark under the [CC BY](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/) license.

evolve rapidly based on the comparison of lncRNA exons or mRNA untranslated regions or protein-coding sequences or (Marques and Ponting, 2009; Young et al., 2012; Ramírez-Colmenero et al., 2020).

Interestingly, processing and localization of conserved lncRNAs are not conserved, indicating that these processes contribute the rapid evolution of function (Ulitsky and Bartel, 2013; Guo et al., 2020). While some lncRNAs are syntenically conserved across multiple species, some of them only share low level of sequence homology (Tsagakis et al., 2020). Additionally, tissue specificity of lncRNAs is found to be conserved compared to mRNAs (Hezroni et al., 2015). However, expression levels of the same lncRNAs are distinctly regulated in different tissues (Karlik and Gozukirmizi, 2018). Additionally, lncRNA promoters are strongly conserved, indicating that selective limitations may act at the transcriptional level (Necsulea et al., 2014; Tsagakis et al., 2020).

In our previous study, the expression levels of maize (CNT0018772) and rice (CNT0031477) lncRNAs were evaluated in four different barley cultivars (Beyşehir 99, Hasat, Konevi 98 and Tarm 92) under salt stress conditions. Our study showed the expression levels of both lncRNAs were down-regulated compared to control. However, one of these barley cultivars, Tarm92, showed up-regulation for rice (CNT0031477) lncRNA (Karlik and Gozukirmizi, 2018). In this study, both lncRNAs sequences were retrieved from barley cultivars (Hasat and Tarm 92) according to sequence homology. Sequences from both root and shoots of lncRNAs were analyzed for secondary structure and splicing events to understand the processing of RNA.

2. Materials and methods

The PCR products of CNT0018772 and CNT0031477 were used for sequence analysis and then re-sequenced. By using BLASTN, the sequence homology search was conducted in barley genome retrieved from the Ensembl website (Ensembl Plants, 2021). The nucleotide sequences of lncRNAs of barley were submitted to GenBank (accession numbers CNT0018772 for 72HASATROOT MK369941, 72HASATSHOOT MK369942, 72TARMROOT MK369943, 72TARMSHOOT MK369944, and CNT0031477 for 72HASATROOT MK369945, 72HASATSHOOT MK369946, 72TARMROOT MK369947, 72TARMSHOOT MK369948).

To validate lncRNAs, the sequences were ≥ 200 bp were selected as lncRNAs. The NCBI ORF Finder was utilized to ensure that transcripts encode no ORFs or incomplete ORFs were considered as lncRNA candidates (NCBI, 2021). For coding potential evaluation, the Coding Potential Calculator 2 (CPC2) (Kang et al., 2017) and Coding-Potential Assessment Tool (CPAT) (Wang et al., 2013) were used that they are relied on the detection of quality, completeness, and sequence similarity of the ORF to protein in current protein databases.

The excision of introns or alternative splicing events (AS) were analyzed by ACESCAN2 (Yeo et al., 2004) and NetGene2 databases (Hebsgaard, 1996). The bioinformatics tools were used to identify to exonic/intronic splicing enhancers. ESE Finder 3 was used to define (ESE Finder, 2021) putative ESEs associated with common serine/arginine-rich splicing factors (Cartegni, 2003; Smith et al., 2006). The secondary structure of lncRNAs were predicted by using Vienna RNA package RNAfold bioinformatics tool (Lorenz et al., 2011; RNAfold, 2021).

3. Results

To obtain barley lncRNA sequences, PCR analysis was performed using probe-primers of CNT0018772 and CNT0031477 indicated in probe design and used Hasat and Tarm cDNA as a template. To validate the two new putative barley lncRNA, PCR products were re-sequenced, which were ~120 bp and ~95 bp for CNT0018772 (maize) and CNT0031477 (rice), respectively. According to sequencing results, the sequence homology search was conducted to isolate new lncRNAs in barley genome retrieved from the Ensembl website by using BLASTN (Altschul et al., 1990; Ensembl Plants, 2021). After re-sequencing, homolog sequences of maize CNT0018772 lncRNAs were obtained as 1370 and 1393 bp in. Hasat for roots and shoots respectively, additionally, as 1303 and 1350 bp in. Tarm for roots and shoots, respectively. However, re-sequencing results showed that homolog sequence of rice CNT0031477 lncRNAs were found to be as 2496 and 1451 bp in. Hasat for roots and shoots respectively, additionally, as 1378 and 1345 bp in. Tarm for roots and shoots, respectively. Also, coding potential of the re-sequenced regions of Hasat and Tarm barley lncRNAs were analyzed by using CPC2 (Kang et al., 2017) and CPAT (Wang et al., 2013) programs, resulting in no coding potential.

4. Discussion

The evolutionary history of lncRNAs may contribute to understand their functionality. Plenty of lncRNAs exhibited rapid evolution process in terms of sequence and expression levels, while tissue specificities were often conserved. However, evolutionarily conserved lncRNAs tend to demonstrate stable and critical functions across species, despite their low number (Necsulea et al., 2014; Andergassen et al., 2019). Studying with lncRNAs includes serious research challenges, such as the lack of the strong statistical signals associated with protein coding genes, ORF, G+C content and codon-usage biases, also the lack of the 2D or 3D structure information (Rivas and Eddy, 2000).

Recently, lncRNA:DNA triplex formation was used to reveal the general mechanism of lncRNAs directing gene regulation and mediating 3D chromatin organization (Soibam and Zhamangaraeva, 2021). In this study, two barley lncRNAs were re-sequenced which were homologous with maize and rice lncRNAs. Barley lncRNAs CNT0018772 for—MK369941, MK369942, MK369943 and MK369944—revealed that these sequences were associated with barley CNT20168342 lncRNA according to CANTATAdb (Szczeniński et al., 2016). Obtained re-sequencing data CNT20168342 were resulted with 1370 (MK369941), 1393 (MK369942), 1303 (MK369943) and 1350 (MK369944) bp, while CNT20168342 lncRNA was 443 bp. Additionally, re-sequencing studies demonstrated MK369945, MK369946, MK369947 and MK369948, which are homolog with rice lncRNA CNT0031477 were found to be 2496, 1451, 1378 and 1345 bp, respectively. Homology and RNA processing analysis showed that both these two lncRNAs were possibly under processing, indicating that these lncRNAs undergo the excision of introns or AS due to ACESCAN2 (Yeo et al., 2004) and NetGene2 databases (Hebsgaard, 1996). Characterization of splicing enhancers of these two lncRNAs were exhibited in Fig. 1. Studies indicated that AS is a mechanism which is now not only creating multiple protein isoforms. Moreover, AS produces and regulates small and long non-coding RNAs (Ulitsky and Bartel, 2013). After analyzing of sequences 72HASATROOT

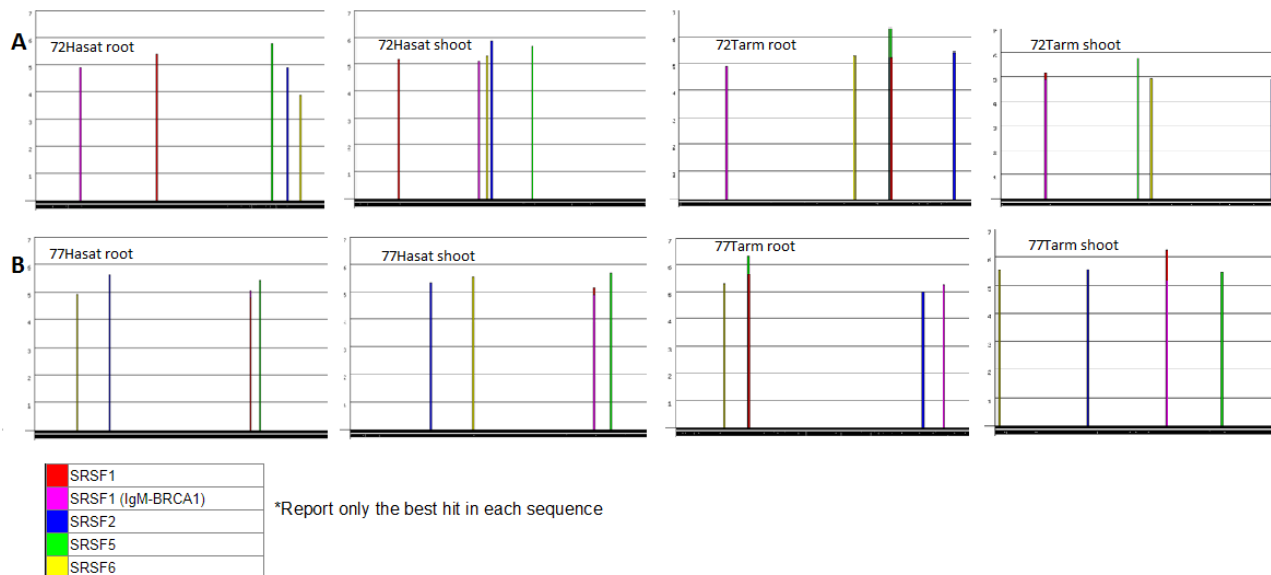


Fig. 1. Characterization of splicing enhancers of re-sequenced barley lncRNAs. (A) Representative display of ESE elements in 72 barley lncRNAs sequences, (B) Representative display of ESE elements in 77 barley lncRNAs sequences.

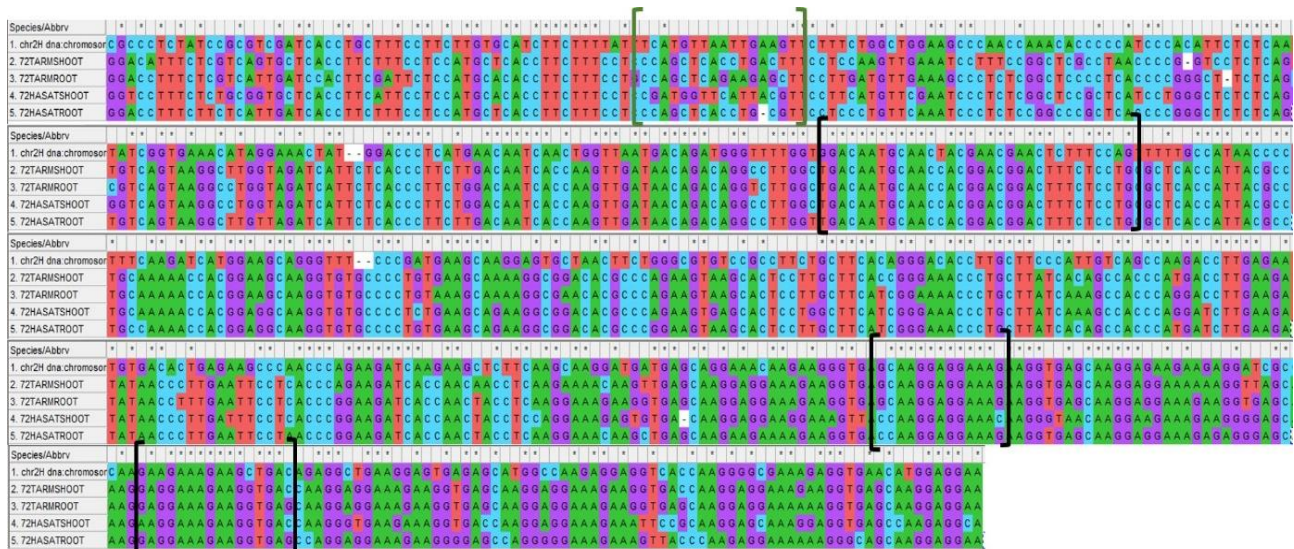


Fig. 2. The re-sequencing analysis of *CNT0018772* comparing with reference barley genome (The letters in dark rectangles are highly conserved, while the letters in green rectangles are not conserved).

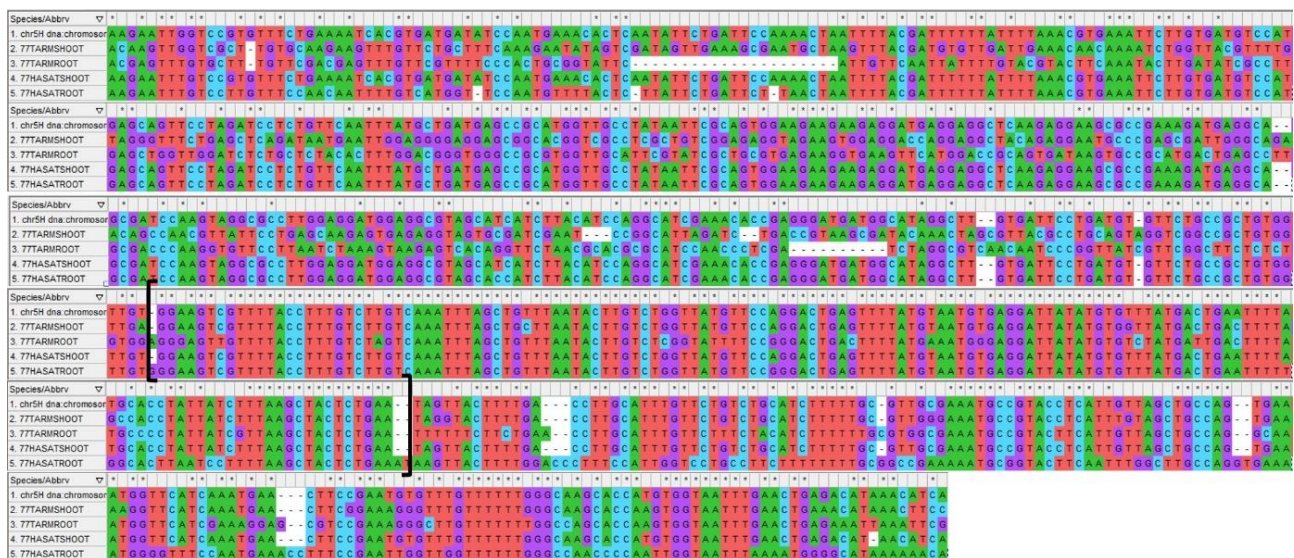


Fig. 3. The re-sequencing analysis of *CNT0031477* comparing with reference barley genome (The letters in dark rectangles are highly conserved).

and 72TARMROOT were identified as 568 bp, additionally, 72HASATSHOOT and 72TARMSHOOT were also 568 bp according to reference sequence alignment that reference sequence (chr2H:21427685:21430889:-1) was 565 bp. Also, sequence alignment with reference barley genome demonstrated that these lncRNA was not conserved and may have rapid evolutionary turnover in barley genotypes (Fig. 2). However, the majority of lncRNAs can be transcribed from different part of the genome, including intergenic regions, promoters, enhancers or even introns (Guttman et al., 2009; Khalil et al., 2009; Yang et al., 2011; Salzman et al., 2012), indicating that this event may be regulated by alternative forms of lncRNAs or different lncRNA interactions which needs further studies to validate. Regulation of CNT0018772 lncRNA by AS may influence gene expression under salinity stress conditions according to our previous gene expression study results. Our previous expression studies demonstrated that expression levels of CNT0018772 lncRNA were down-regulated. After sequence analysis, 77HASATROOT and 77TARMROOT were identified as 676 and 644 bp, additionally, 77HASATSHOOT and 77TARMSHOOT were 666 bp according to reference sequence alignment that reference sequence (chr5H:612797513:612800868:-1) was 667 bp. Also, sequence alignment with reference barley genome demonstrated that only small part of this lncRNA was conserved (Fig. 3), suggesting these lncRNA was not conserved, and may have rapid evolutionary turnover in barley genotypes. Besides in our previous expression studies, expression analysis of CNT0031477 lncRNA indicated these lncRNA could be expressed both shoot and root tissues under 150 mM salt treatment and control condition, suggesting that these lncRNA may not be tissue specific (Karlik and Gozukirmizi, 2018).

In plants, as more forms and functions of AS are considered to modulate diverse biological mechanisms, including flowering time, circadian rhythms, and response to stress (Simpson et al., 2016; Ling et al., 2017; Verhage et al., 2017; Zhang and Xiao, 2018; Dikaya et al., 2021). lncRNAs in plants influence the gene expression and regulation both in direct and indirect ways. For example, COLDAIR effects flowering time based on chromatin state and structure or APOLO effects on auxin action by chromatin looping (Heo and Sung, 2011; Ariel et al., 2014).

In our previous study, expression levels of maize lncRNA CNT0018772 interacting with maize 40S ribosomal protein S6 (RPS6) (Szcześniak et al., 2016; Karlik and Gozukirmizi, 2018), which phosphorylates eukaryotic ribosomes, initiating the translation was observed. Sequence analysis of re-sequenced these barley lncRNA was located on chr2H:108632412-108644592 (-), while this barley genome region comprises HORVU2Hr1G010890 and HORVU2Hr1G010870 protein-coding genes homolog with 40S ribosomal protein S6 (RPS6) in barley, suggesting these barley lncRNAs may be antisense lncRNA which may also be paired with RPS6 as a natural antisense-coding protein pairs lncRNA (NAT-lncRNA). This study suggests that CNT0018772 lncRNA may regulate RPS6 expression by AS based on RNA-RNA interaction database (Szcześniak et al., 2016). Moreover, homology analysis among two —Hasat and Tarm— and Morex revealed that these barley lncRNA exhibited low sequence conservation. Diederichs (2014) evaluated the lncRNA evolution at four dimensions, including sequence, structure, function and syntenic expression adds up to lncRNA conservation. Although there are a few experimental cases showed sequence conservation levels of

lncRNAs, most lncRNAs demonstrated weak or untraceable primary sequence conservation (Nitsche and Stadler, 2017; Tavares et al., 2019), suggesting that secondary structures among lncRNA homolog may be more conserved than the sequences.

Chen and Carmichael groups (2009; 2010) identified a class of lncRNAs named as small nucleolar RNA-related long noncoding RNAs (sno-lncRNAs) which are produced from introns and have a unique structure (Yin et al., 2012). snoRNAs are conserved nuclear RNAs (about 70-200 nt), modifying small nuclear (snRNAs) or ribosomal RNA (rRNA) or involving in the processing of rRNA during ribosome subunit maturation (Kiss, 2001; Boisvert et al., 2007; Matera et al., 2007). snoRNAs are classified into two main groups: box C/D and box H/ACA snoRNAs. The processing of snoRNAs differs based on the sequence content among introns (the number of encoded snoRNA genes) that some introns are used to produce lncRNAs, whereas others are used to generate snoRNAs (Wilusz, 2016). Re-sequencing analysis of CNT0031477 lncRNA revealed that these lncRNAs were at chr5H:612799183-612799474 (-) and chr5H:612921653-612921944 (+). Additionally, according to Ensemble data, chr5H:612799183-612799474 (-) genome region contains one transcript named as HORVU5Hr1G101570.1 which is no protein coding gene, and there snoRNAs (ENSRNA050017778, ENSRNA050017798 and ENSRNA050017792). Chr5H:612921653-612921944 (+) genome region was also found to be contained one transcript named as HORVU5Hr1G101650.2 and three snoRNAs (ENSRNA049476433, ENSRNA049476461 and ENSRNA049476383), indicating these lncRNA might be a member of sno-lncRNA class. To date, at least 19 tissue- and species-specific sno-lncRNAs have been determined in different studies (Zhang et al., 2014). In human chromosome 15, most known sno-lncRNA, which regulate AS and many other post-transcriptional events, is produced from the 15q11-q13 region is exposed to genomic imprinting and involved in Prader-Willi Syndrome (PWS) (Sahoo et al. 2008; Yin et al., 2012). However, sno-lncRNAs have not been identified yet and, their functions are still unknown. Moreover, sequence analysis among other lncRNAs have also uncovered that these sno-lncRNAs are semi-conserved on the contrary the idea of most lncRNAs undergo rapid sequence evolution and may play important roles (Ulitsky et al., 2011; Ramírez-Colmenero et al., 2020). Due to their tissue specific expression nature, products of sno-lncRNAs, which could be snoRNA or lncRNA, should be investigated in further studies, also depending on condition matter.

To date, there has a passing acquaintance with lncRNA's secondary structure and the interaction between structure and function. In mammals, conservation of lncRNAs in primary sequence, and gene structure are rare at orthologous, indicating lncRNAs undergone rapid turnover during evolution (Kutter et al., 2012; Wood et al., 2013; Ramírez-Colmenero et al., 2020). Some mutations could favor evolutionarily positive selection by stabilizing RNA structures within lncRNAs. However, Parallel Analysis of RNA Structures (PARS) study showed that physiological stimuli mostly altered RNA structures in yeast (Wan et al., 2012). While they compared the RNA structure stability, ncRNAs including, rRNA, tRNA, snoRNA and snRNA exhibited more stability than protein coding mRNAs. In this study, Vienna RNA package RNAfold bioinformatics tool was used to create the predicted secondary structure of eight lncRNA transcripts sequences (Fig. 4). The results demonstrated primary sequence alterations resulted in secondary structure

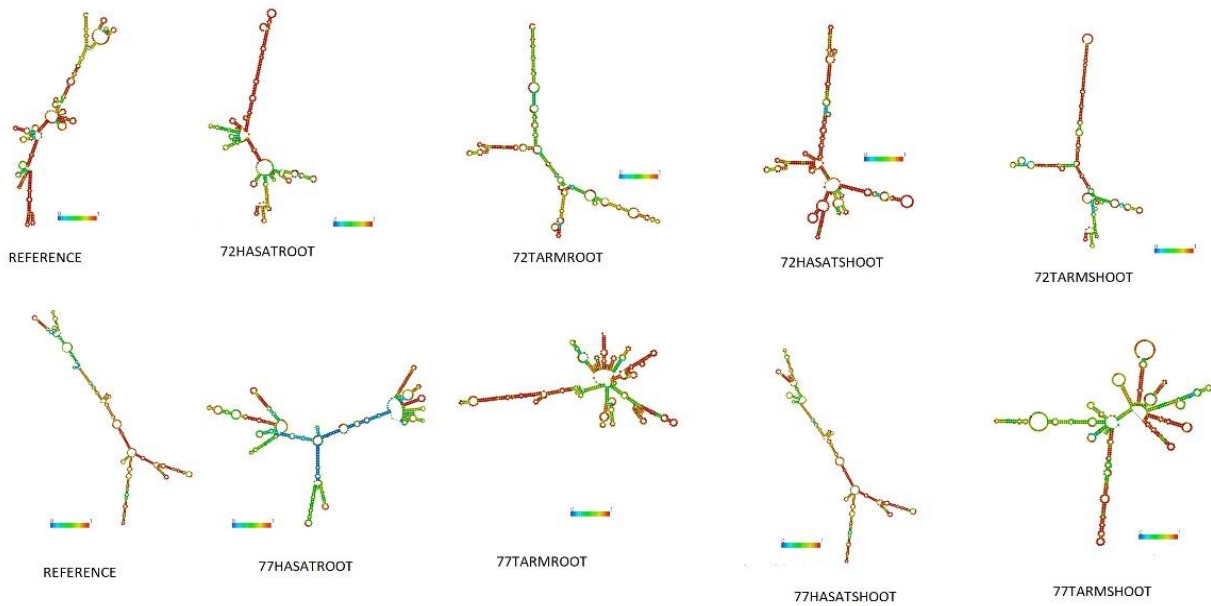


Fig. 4. The re-sequencing analysis of *CNT0031477* comparing with reference barley genome. The letters in dark rectangles are highly conserved.

changes. As known, these secondary structures can affect the higher-order of tertiary structures which can be associated with the interaction of RNA-binding proteins (RBPs), direct catalysis functions, formation of scaffolds, and regulation of posttranscriptional modifications (Cruz and Westhof, 2009; Qi et al., 2021). Interestingly, RNA secondary structure may be a significant mark for sensing a signal. Specifically, RNA folding can be conformationally altered in response to fluctuations in temperature, covalently modified nucleotides, cellular osmolarity or other signals (Narberhaus, 2010; Kortmann and Narberhaus, 2012; Qi et al., 2021), indicating that secondary structure of these lncRNAs studied in this study may be altered by sensing of osmotic stress. However, I determined the expression levels of *CNT0018772* and *CNT0031477* were found to be down-regulated in our previous study, suggesting that secondary structure alterations may not influence functions of these lncRNAs.

Understanding the structure of lncRNAs which are considered as emerging regulatory elements will be crucial to fully comment the evolution, form, and function (Johnsson et al., 2014; Fanucchi et al., 2019; Soibam and Zhamangaraeva, 2021).

Identification of conserved lncRNAs is one of the problems for evaluating the origin of the lncRNAs which is still unknown. According to low level of sequence conservation, lncRNAs may not evolve by using the gene duplication event in comparison with protein-coding genes. However, it is assumed that protein-coding genes lose their original function and become lncRNAs (Hezroni et al., 2017; Tsagakis et al., 2020). Another possibility of emerging lncRNAs is non-coding parts of the genome such as promoters might eventually gain function as a lncRNA (Tsagakis et al., 2020). However, plants

are sessile organisms and need to cope with changing environmental conditions throughout their life cycles. Genotypic and phenotypic plasticity are the main components for coping with this variability and unpredictability of stress occurrence (Hilker and Schmülling, 2019; Ramírez-Colmenero et al., 2020). Rapid evolution of lncRNAs may be another force for adaptation to changing environment in plants. Changing the regulation of themselves and playing important roles in gene regulation may contribute the adaptation of plants in response stress.

4. Conclusion

RNA processing analysis in this study indicated lncRNAs undergone rapid evolution, however, similarly the function of most lncRNAs remains largely mystery. Today, the functional characterization of lncRNAs is still challenging. Studies indicated lncRNA functions basically depend on structure and protein interaction repertoire of lncRNAs. Our findings suggest that RNA processing of lncRNAs is important for determining the functions of lncRNAs under control and stress conditions.

Funding: The author received no financial support for the research, authorship, and/or publication of this article.

Conflict of interest: The author declares that he has no conflict of interests.

Informed consent: This manuscript did not involve human or animal participants; therefore informed consent was not collected.

References

- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403-410. [https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(05)80360-2)
- Andergassen, D., Muckenhuber, M., Bammer, P. C., Kulinski, T. M., Theussl, H.-C., Shimizu, T., Penninger, J. M., Pauler, F. M., & Hudson, Q. J. (2019). The Airn lncRNA does not require any DNA elements within its locus to silence distant imprinted genes. *PLOS Genetics*, 15(7), e1008268. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008268>
- Ariel, F., Jegu, T., Latrasse, D., Romero-Barrios, N., Christ, A., Benhamed, M., & Crespi, M. (2014). Noncoding transcription by alternative RNA polymerases dynamically regulates an auxin-driven chromatin loop. *Molecular Cell*, 55(3), 383-396. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.06.011>
- Boisvert, F. M., van Koningsbruggen, S., Navascués, J., & Lamond, A. I.

- (2007). The multifunctional nucleolus. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(7), 574-585. <https://doi.org/10.1038/nrm2184>
- Cartegni, L. (2003). ESEfinder: a web resource to identify exonic splicing enhancers. *Nucleic Acids Research*, 31(13), 3568-3571. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg616>
- Chekanova, J. A. (2015). Long non-coding RNAs and their functions in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 27, 207-216. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2015.08.003>
- Chen, L. L., & Carmichael, G. G. (2010). Long noncoding RNAs in mammalian cells: what, where, and why? *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 1(1), 2-21. <https://doi.org/10.1002/wrna.5>
- Chen, L. L., & Carmichael, G. G. (2009). Altered nuclear retention of mRNAs containing inverted repeats in human embryonic stem cells: functional role of a nuclear noncoding RNA. *Molecular Cell*, 35(4), 467-478. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.06.027>
- Cruz, J. A., & Westhof, E. (2009). The dynamic landscapes of RNA architecture. *Cell*, 136(4), 604-609. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.02.003>
- Diederichs, S. (2014). The four dimensions of noncoding RNA conservation. *Trends in Genetics*, 30(4), 121-123. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2014.01.004>
- Dikaya, V., El Arbi, N., Rojas-Murcia, N., Nardeli, S. M., Goretti, D., & Schmid, M. (2021). Insights into the role of alternative splicing in plant temperature response. *Journal of Experimental Botany*, 72(21), 7384-7403. <https://doi.org/10.1093/jxb/erab234>
- Ensembl Plants, (2021). The Official Website of Ensembl Plants, <http://plants.ensembl.org/barley>, Last accessed on December 15, 2021.
- ESE Finder, (2021). The Official Website of ESEfinder 3.0, http://rulai.cshl.edu/cgi-bin/tools/ESE3/ese_finder.cgi?process=home, Last accessed on December 15, 2021.
- Fang, J., Zhang, F., Wang, H., Wang, W., Zhao, F., Li, Z., ... & Chu, C. (2019). Ef-cd locus shortens rice maturity duration without yield penalty. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(37), 18717-18722. <https://doi.org/10.1073/pnas.1815030116>
- Fanucchi, S., Fok, E. T., Dalla, E., Shibayama, Y., Börner, K., Chang, E. Y., ... & Mhlanga, M. M. (2019). Immune genes are primed for robust transcription by proximal long noncoding RNAs located in nuclear compartments. *Nature Genetics*, 51(1), 138-150. <https://doi.org/10.1038/s41588-018-0298-2>
- Flynn, R. A., & Chang, H. Y. (2014). Long noncoding RNAs in cell-fate programming and reprogramming. *Cell Stem Cell*, 14(6), 752-761. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2014.05.014>
- Ganguly, P., Roy, D., Das, T., Kundu, A., Carteaux, F., Ghosh, Z., & DasGupta, M. (2021). The natural antisense transcript DONE40 derived from the lncRNA ENOD40 locus interacts with SET domain protein ASHR3 during inception of symbiosis in *Arachis hypogaea*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 34(9), 1057-1070. <https://doi.org/10.1094/mpmi-12-20-0357-r>
- Ghorbani, F., Abolghasemi, R., Haghghi, M., Etemadi, N., Wang, S., Karimi, M., & Soorni, A. (2021). Global identification of long non-coding RNAs involved in the induction of spinach flowering. *BMC Genomics*, 22(1). <https://doi.org/10.1186/s12864-021-07989-1>
- Goff, L. A., & Rinn, J. L. (2015). Linking RNA biology to lncRNAs. *Genome Research*, 25(10), 1456-1465. <https://doi.org/10.1101/gr.191122.115>
- Grossi, E., Raimondi, I., Goñi, E., González, J., Marchese, F. P., Chapaprieta, V., Martín-Subero, J. I., Guo, S., & Huarte, M. (2020). A lncRNA-SWI/SNF complex crosstalk controls transcriptional activation at specific promoter regions. *Nature Communications*, 11(1), 1-16. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-14623-3>
- Guo, C. J., Ma, X. K., Xing, Y. H., Zheng, C. C., Xu, Y. F., Shan, L., ... & Chen, L. L. (2020). Distinct processing of lncRNAs contributes to non-conserved functions in stem cells. *Cell*, 181(3), 621-636. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.03.006>
- Guttman, M., Amit, I., Garber, M., French, C., Lin, M. F., Feldser, D., ... & Lander, E. S. (2009). Chromatin signature reveals over a thousand highly conserved large non-coding RNAs in mammals. *Nature*, 458(7235), 223-227. <https://doi.org/10.1038/nature07672>
- Hebsgaard, S. (1996). Splice site prediction in *Arabidopsis thaliana* pre-mRNA by combining local and global sequence information. *Nucleic Acids Research*, 24(17), 3439-3452. <https://doi.org/10.1093/nar/24.17.3439>
- Heo, J. B., & Sung, S. (2011). Vernalization-mediated epigenetic silencing by a long intronic noncoding RNA. *Science*, 331(6013), 76-79. <https://doi.org/10.1126/science.1197349>
- Hezroni, H., Ben-Tov Perry, R., Meir, Z., Housman, G., Lubelsky, Y., & Ulitsky, I. (2017). A subset of conserved mammalian long non-coding RNAs are fossils of ancestral protein-coding genes. *Genome Biology*, 18(1), 1-15. <https://doi.org/10.1186/s13059-017-1293-0>
- Hezroni, H., Koppstein, D., Schwartz, Matthew G., Avrutin, A., Bartel, David P., & Ulitsky, I. (2015). Principles of long noncoding RNA evolution derived from direct comparison of transcriptomes in 17 species. *Cell Reports*, 11(7), 1110-1122. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.04.023>
- Hilker, M., & Schmölling, T. (2019). Stress priming, memory, and signalling in plants. *Plant, Cell & Environment*, 42(3), 753-761. <https://doi.org/10.1111/pce.13526>
- Johnsson, P., Ackley, A., Vidarsdottir, L., Lui, W.-O., Corcoran, M., Grandér, D., & Morris, K. V. (2013). A pseudogene long noncoding RNA network regulates PTEN transcription and translation in human cells. *Nature Structural & Molecular Biology*, 20(4), 440-446. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2516>
- Johnsson, P., Lipovich, L., Grandér, D., & Morris, K. V. (2014). Evolutionary conservation of long non-coding RNAs; sequence, structure, function. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1840(3), 1063-1071. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.10.035>
- Kang, Y.-J., Yang, D.-C., Kong, L., Hou, M., Meng, Y.-Q., Wei, L., & Gao, G. (2017). CPC2: a fast and accurate coding potential calculator based on sequence intrinsic features. *Nucleic Acids Research*, 45(W1), W12-W16. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx428>
- Karlik, E., & Gozukirmizi, N. (2018). Evaluation of barley lncRNAs expression analysis in salinity stress. *Russian Journal of Genetics*, 54(2), 198-204. <https://doi.org/10.1134/s1022795418020096>
- Khalil, A. M., Guttman, M., Huarte, M., Garber, M., Raj, A., Morales, D. R., ... & Rinn, J. L. (2009). Many human large intergenic noncoding RNAs associate with chromatin-modifying complexes and affect gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(28), 11667-11672. <https://doi.org/10.1073/pnas.0904715106>
- Kiss, T. (2001). New embo member's review: Small nucleolar RNA-guided post-transcriptional modification of cellular RNAs. *The EMBO Journal*, 20(14), 3617-3622. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.14.3617>
- Kortmann, J., & Narberhaus, F. (2012). Bacterial RNA thermometers: molecular zippers and switches. *Nature Reviews Microbiology*, 10(4), 255-265. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2730>
- Kutter, C., Watt, S., Stefflova, K., Wilson, M. D., Goncalves, A., Ponting, C. P., Odom, D. T., & Marques, A. C. (2012). Rapid turnover of long noncoding RNAs and the evolution of gene expression. *PLoS Genetics*, 8(7), e1002841. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002841>
- Ling, Y., Alshareef, S., Butt, H., Lozano-Juste, J., Li, L., Galal, A. A., ... & Mahfouz, M. M. (2017). Pre-mRNA splicing repression triggers abiotic stress signaling in plants. *The Plant Journal*, 89(2), 291-309. <https://doi.org/10.1111/tpj.13383>
- Lorenz, R., Bernhart, S. H., Höner zu Siederdissen, C., Tafer, H., Flamm, C., Stadler, P. F., & Hofacker, I. L. (2011). ViennaRNA Package 2.0. *Algorithms for Molecular Biology*, 6(1). <https://doi.org/10.1186/1748-7188-6-26>
- Marques, A. C., & Ponting, C. P. (2009). Catalogues of mammalian long noncoding RNAs: modest conservation and incompleteness. *Genome Biology*, 10(11), 1-12. <https://doi.org/10.1186/gb-2009-10-11-r124>
- Matera, A. G., Terns, R. M., & Terns, M. P. (2007). Non-coding RNAs: lessons from the small nuclear and small nucleolar RNAs. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(3), 209-220. <https://doi.org/10.1038/nrm2124>
- Mattick, J. S., & Rinn, J. L. (2015). Discovery and annotation of long noncoding RNAs. *Nature Structural & Molecular Biology*, 22(1), 5-7. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2942>
- Narberhaus, F. (2010). Translational control of bacterial heat shock and virulence genes by temperature-sensing mRNAs. *RNA biology*, 7(1), 84-89. <https://doi.org/10.4161/rna.7.1.10501>
- NCBI, (2021). The Official Website of National Center for Biotechnology Information, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder>, Last accessed on December 15, 2021.
- Necsulea, A., Soumillon, M., Warnefors, M., Liechti, A., Daish, T., Zeller, U., Baker, J. C., Grützner, F., & Kaessmann, H. (2014). The evolution of lncRNA repertoires and expression patterns in tetrapods. *Nature*, 505(7485), 635-640. <https://doi.org/10.1038/nature12943>

- Nitsche, A., & Stadler, P. F. (2017). Evolutionary clues in lncRNAs. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 8(1), e1376. <https://doi.org/10.1002/wrna.1376>
- Qi, Y., Zhang, Y., Zheng, G., Chen, B., Zhang, M., Li, J., Peng, T., Huang, J., & Wang, X. (2021). In vivo and in vitro genome-wide profiling of RNA secondary structures reveals key regulatory features in *Plasmodium falciparum*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11, 673966. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.673966>
- Ramirez-Colmenero, A., Oktaba, K., & Fernandez-Valverde, S. L. (2020). Evolution of genome-organizing long non-coding RNAs in metazoans. *Frontiers in Genetics*, 11(589697). <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.589697>
- Ren, J., Jiang, C., Zhang, H., Shi, X., Ai, X., Li, R., Dong, J., Wang, J., Zhao, X., & Yu, H. (2021). LncRNA-mediated ceRNA networks provide novel potential biomarkers for peanut drought tolerance. *Physiologia Plantarum*, e13610. <https://doi.org/10.1111/ppl.13610>
- Rinn, J. L., & Chang, H. Y. (2012). Genome Regulation by Long Noncoding RNAs. *Annual Review of Biochemistry*, 81(1), 145-166. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-051410-092902>
- Rivas, E., & Eddy, S. R. (2000). Secondary structure alone is generally not statistically significant for the detection of noncoding RNAs. *Bioinformatics*, 16(7), 583-605. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/16.7.583>
- RNAfold Server. (2021). The Official Website of RNAfold Web Server, <http://rna.tbi.univie.ac.at>, Last accessed on December 15, 2021.
- Sahoo, T., del Gaudio, D., German, J. R., Shinawi, M., Peters, S. U., Person, R. E., Garnica, A., Cheung, S. W., & Beaudet, A. L. (2008). Prader-Willi phenotype caused by paternal deficiency for the HBII-85 C/D box small nucleolar RNA cluster. *Nature Genetics*, 40(6), 719-721. <https://doi.org/10.1038/ng.158>
- Salzman, J., Gawad, C., Wang, P. L., Lacayo, N., & Brown, P. O. (2012). Circular RNAs are the predominant transcript isoform from hundreds of human genes in diverse cell types. *PLoS ONE*, 7(2), e30733. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030733>
- Simpson, C. G., Fuller, J., Calixto, C. P. G., McNicol, J., Booth, C., Brown, J. W. S., & Staiger, D. (2016). Monitoring alternative splicing changes in *Arabidopsis* circadian clock genes. *Methods in Molecular Biology*, 1398, 119-132. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3356-3_11
- Smith, P. J., Zhang, C., Wang, J., Chew, S. L., Zhang, M. Q., & Krainer, A. R. (2006). An increased specificity score matrix for the prediction of SF2/ASF-specific exonic splicing enhancers. *Human Molecular Genetics*, 15(16), 2490-2508. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddl171>
- Soibam, B., & Zhamangaraeva, A. (2021). LncRNA:DNA triplex-forming sites are positioned at specific areas of genome organization and are predictors for Topologically Associated Domains. *BMC Genomics*, 22(1), 1-10. <https://doi.org/10.1186/s12864-021-07727-7>
- Song, Y., Wang, R., Li, L. W., Liu, X., Wang, Y. F., Wang, Q. X., & Zhang, Q. (2019). Long non-coding RNA HOTAIR mediates the switching of histone H3 lysine 27 acetylation to methylation to promote epithelial-to-mesenchymal transition in gastric cancer. *International Journal of Oncology*, 54(1), 77-86. <https://doi.org/10.3892/ijo.2018.4625>
- Statello, L., Guo, C.-J., Chen, L. L., & Huarte, M. (2021). Gene regulation by long non-coding RNAs and its biological functions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 22(2), 96-118. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-00315-9>
- Swiezewski, S., Liu, F., Magusin, A., & Dean, C. (2009). Cold-induced silencing by long antisense transcripts of an *Arabidopsis* Polycomb target. *Nature*, 462(7274), 799-802. <https://doi.org/10.1038/nature08618>
- Szcześniak, M. W., Roskiewicz, W., & Makołowska, I. (2016). CANTATAdb: a collection of plant long non-coding RNAs. *Plant and Cell Physiology*, 57(1), e8-e8. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcv201>
- Tavares, R. C. A., Pyle, A. M., & Somarowthu, S. (2019). Phylogenetic analysis with improved parameters reveals conservation in lncRNA structures. *Journal of Molecular Biology*, 431(8), 1592-1603. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.03.012>
- Tsagakis, I., Douka, K., Birds, L., & Aspden, J. L. (2020). Long non-coding RNAs in development and disease: conservation to mechanisms. *The Journal of Pathology*, 250(5), 480-495. <https://doi.org/10.1002/path.5405>
- Ulitsky, I., & Bartel, D. P. (2013). lincRNAs: genomics, evolution, and mechanisms. *Cell*, 154(1), 26-46. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.06.020>
- Ulitsky, I., Shkumatava, A., Jan, Calvin H., Sive, H., & Bartel, David P. (2011). Conserved function of lincRNAs in vertebrate embryonic development despite rapid sequence evolution. *Cell*, 147(7), 1537-1550. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.11.055>
- Verhage, L., Severing, E. I., Bucher, J., Lammers, M., Busscher-Lange, J., Bonnema, G., ... & Immink, R. G. (2017). Splicing-related genes are alternatively spliced upon changes in ambient temperatures in plants. *PLoS One*, 12(3), e0172950. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172950>
- Wan, Y., Qu, K., Ouyang, Z., Kertesz, M., Li, J., Tibshirani, R., ... & Chang, H. Y. (2012). Genome-wide measurement of RNA folding energies. *Molecular Cell*, 48(2), 169-181. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.08.008>
- Wang, L., Park, H. J., Dasari, S., Wang, S., Kocher, J. P., & Li, W. (2013). CPAT: Coding-Potential Assessment Tool using an alignment-free logistic regression model. *Nucleic Acids Research*, 41(6), e74-e74. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt006>
- Wang, Y., Fan, X., Lin, F., He, G., Terzaghi, W., Zhu, D., & Deng, X. W. (2014). *Arabidopsis* noncoding RNA mediates control of photomorphogenesis by red light. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(28), 10359-10364. <https://doi.org/10.1073/pnas.1409457111>
- Wilusz, J. E. (2016). Long noncoding RNAs: re-writing dogmas of RNA processing and stability. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, 1859(1), 128-138. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2015.06.003>
- Wood, E. J., Chin-Inmanu, K., Jia, H., & Lipovich, L. (2013). Sense-antisense gene pairs: sequence, transcription, and structure are not conserved between human and mouse. *Frontiers in Genetics*, 4, 183. <https://doi.org/10.3389/fgene.2013.00183>
- Yang, L., Duff, M. O., Graveley, B. R., Carmichael, G. G., & Chen, L.-L. (2011). Genomewide characterization of non-polyadenylated RNAs. *Genome Biology*, 12(2), R16. <https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-2-r16>
- Yeo, G., Holste, D., Kreiman, G., & Burge, C. B. (2004). Variation in alternative splicing across human tissues. *Genome Biology*, 5(10), 1-15. <https://doi.org/10.1186/gb-2004-5-10-r74>
- Yin, Q. F., Yang, L., Zhang, Y., Xiang, J. F., Wu, Y. W., Carmichael, Gordon G., & Chen, L. L. (2012). Long noncoding RNAs with snoRNA ends. *Molecular Cell*, 48(2), 219-230. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.07.033>
- Young, R. S., Marques, A. C., Tibbit, C., Haerty, W., Bassett, A. R., Liu, J. L., & Ponting, C. P. (2012). Identification and properties of 1,119 candidate lincRNA loci in the *Drosophila melanogaster* genome. *Genome Biology and Evolution*, 4(4), 427-442. <https://doi.org/10.1093/gbe/evs020>
- Zhang, Y. C., Liao, J. Y., Li, Z. Y., Yu, Y., Zhang, J. P., Li, Q. F., ... & Chen, Y. Q. (2014). Genome-wide screening and functional analysis identify a large number of long noncoding RNAs involved in the sexual reproduction of rice. *Genome Biology*, 15(12), 1-16. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0512-1>
- Zhang, Z., & Xiao, B. (2018). Comparative alternative splicing analysis of two contrasting rice cultivars under drought stress and association of differential splicing genes with drought response QTLs. *Euphytica*, 214(4), 1-16. <https://doi.org/10.1007/s10681-018-2152-0>

Cite as: Karlik, E. (2021). Why lncRNAs were not conserved? Is it for adaptation?. *Front Life Sci RT*, 2(3), 103-110.



Review article / Derleme

Karaciğer hücreleri ve organoidlerin üç boyutlu kültürlerinde kullanılmak üzere geliştirilmiş biyomalzemeler

Gamze Demirel¹ ¹ Maltepe University, Cancer and Stem Cell Research and Application Center, 34854, Istanbul, Turkey

Öz

Doku mühendisliği ve biyomühendislik çalışmaları başta olmak üzere biyoloji ve kimya gibi temel bilimlerin son zamanlarda üzerinde odaklandığı disiplinlerarası bir çalışma olan 3 boyutlu (3B) biyobasım tekniği en yenilikçi teknolojilerden biridir. 3 boyutlu biyobasım, yaralı veya hastalıklı doku ve organları biyolojik olarak taklit edebilecek (biomimetik) doku ve organların yapımında çeşitli uygulamalara sahip gelişmekte olan bir teknolojidir. Bu yöntemde hücreler, büyüme faktörleri ve biyomalzemeler birleştirilir ve hibrit bir biyomalzeme elde edilir. Biyomalzemeler vasıtasıyla canlı hücreler ile katman katman, istenilen şekil, miktar ve fonksiyonda hücre iskeletleri (scaffold) üretilebilir. Özellikle karaciğer gibi karmaşık dokuları oluşturmak için biyobasım tekniği ile doku iskeleleri oluşturmak oldukça önemli bir yaklaşımdır. Hem doğal hem de sentetik kökenli polimerlerden yapılan biyo bağlantılar, karaciğer gibi yumuşak dokulara baskı uygulanması noktasında avantaja sahiptir. Bu derlemede özellikle hepatositler üzerine yapılan çalışmalar incelenmiş ve derlenmiştir.

Anahtar kelimeler: 3 boyutlu (3B) biyobasım; biyomalzemeler; doku mühendisliği; karaciğer hücreleri; organoidler

Developed biomaterials for use in three dimensional cultures of liver cells and organoids

Abstract

The 3D bioprinting technique, which is an interdisciplinary study on which basic sciences such as biology and chemistry, especially tissue engineering and bioengineering studies, has recently focused on, is one of the most innovative technologies. 3D bioprinting is an emerging technology with various applications in the construction of tissues and organs that can biologically mimic injured or diseased tissues and organs (biomimetic). In this method, cells, growth factors and biomaterials are combined and a hybrid biomaterial is obtained. By means of biomaterials, cell scaffolds of desired shape, quantity and function can be produced layer by layer with living cells. Creating tissue scaffolds with bioprinting technique is a very important approach, especially to create complex tissues such as liver. Biolinks made from polymers of both natural and synthetic origin have the advantage of applying pressure to soft tissues such as the liver. In this review, studies on hepatocytes were examined and compiled.

Keywords: 3 dimensional (3D) bioprinting; biomaterials; liver cells; organoids; tissue engineering

* Sorumlu yazar.

E-mail: gamzedemirel@maltepe.edu.tr (G. Demirel).<https://doi.org/10.51753/flsrt.982821> Yazar katkıları

Geliş tarihi 14 Ağustos 2021; Kabul tarihi 27 Kasım 2021

Çevrimiçi yayın 24 Aralık 2021

2718-062X © 2021 This is an open access article published by Dergipark under the [CC BY](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/) license.

1. Giriş

Karaciğer, kandan amonyağın uzaklaştırılması ve metabolik işlevlerin yerine getirilmesinde rol oynayan önemli bir organdır (Wells, 2008). Karaciğer aynı zamanda parankimal (hepatositler) ve parankimal olmayan hücreleri de içeren kompleks bir yapıdadır. Hepatositler, karaciğer fonksiyonlarının çoğunu yerine getiren farklılaşmış epitel hücrelerdir. Karaciğer hücreleri hem homotipik hem de heterotipik hücre-hücre ve hücre-ekstraselüler matriks (ECM) etkileşimleri sergilemektedir. Hepatositler, boşluk bağlantıları, sıkı bağlantılar, ara bağlantılar ve dezmozomlar yoluyla birbirleriyle yoğun bir şekilde etkileşime girerler. Hepatositlerin diğer parankimal olmayan hücrelerle etkileşimi, normal karaciğer fonksiyonunun sürdürülmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Bu etkileşimlere esas olarak parakrin sinyalleme aracılığıyla gerçekleşmektedir (Elvevold ve ark., 2008; Turner ve ark., 2011). ECM, hepatositlerin ve parankimal olmayan hücrelerin farklılaşmış fenotiplerinin ekspresyonunu kontrol etmektedir. ECM bileşenleri, hücre yapışması ve mimarisi için olduğu kadar hücre iskelet yapısının bakımı için de oldukça önemlidir. Hastalıklı karaciğer durumunda, ECM normalden sirotik aşamaya doğru sertleşir ve karaciğer hastalığının tespiti için bir belirteç olarak işlev görür (Bogert ve LaRusso, 2007). Karaciğer hastalıkları ya kalıtsaldır ya da sonradan edinilmiştir. Bu gibi karaciğer hasarları ve karaciğerin sınırlı rejenerasyon kapasitesi biyo-yapay organ üretiminin geliştirilmesine yol açmıştır. Bu alanda çalışmak doku mühendisliği stratejilerinin entegrasyonunu gerektirir ve bu da üç boyutlu (3B) basım teknolojilerinden büyük ölçüde etkilenir.

Biyolojik basım, hücreleri hücre uyumlu malzemelerle (örn. polimerler veya hidrojel) ve sertleştirme işlemleriyle (örn. foto çapraz bağlama) birlikte eşzamanlı olarak yazdırılan bir 3 boyutlu basım işlemi olarak tanımlanabilir (Lauschke ve ark., 2016). Biyomalzemeler, hücreler ve biyoaktif molekülleri, canlı ve işlevsel doku yapılarını oluşturmak için istenen tasarım ve konumu sağlayabilir. 3B biyobasım teknikleri, karmaşık dokuların geliştirilmesi için umut verici niteliklere sahiptir. Üç boyutlu basım teknolojileri ile hepatik yapılar üretilebilir. Sentezlenen bu ürünler uzun süreli canlılık, işlevsellik ve mekanik stabilite sağlayabilir (Wells, 2008). Bu derlemede, üç boyutlu hepatorganoidler için kullanılan biyomalzemelere, doğal ve sentetik basım tekniklerine ve farklı polimerlere kısa bir giriş yapılmıştır. Üç boyutlu biyobasım ile ilgili son yapılan çalışmalara odaklanılarak güncel yayınlar derlenmiştir.

2. 3 boyutlu biyobasım ve ön koşulları

Üç boyutlu basım, bilgisayar programları aracılığı ile X, Y ve Z koordinat düzlemlerinde farklı malzemelerin katman katman eklenmesiyle karmaşık formların yüksek hassasiyetle üretilmesini sağlar (Murphy ve Atala, 2014; Munaz ve ark., 2016). Üç boyutlu biyobasım, hasarlı doku ve organları onarmak veya değiştirmek için doku iskeleleri üretmek amacıyla kullanılır. Farklı 3B basım teknikleri türleri mevcuttur. Genel olarak ekstrüzyon biyobasım, mükrekkep püskürtmeli basım, lazer destekli basım ve stereolitografik basım olarak sınıflandırılabilir (Tamay ve ark., 2019). Ekstrüzyon biyoyazıcı, en yaygın kullanılan 3B biyobasım yöntemidir. Piston, sürekli bir kuvvetle uygulandığında, ayrı damlacıklar yerine kesintisiz silindirik çizgileri çıkarabilir. Yüksek viskoziteli malzemeler için uyumluluk sağlar. Neredeyse tüm biyo-bağlantılar çeşitli malzemeleri aynı anda makul bir maliyetle yazdırabilir. Bu

yöntemin temel avantajı, herhangi bir viskoz malzeme kullanarak büyük 3 boyutlu yapılar üretebilmesidir. Dezavantajı ise işlem sırasında yüksek mekanik strese maruz kalınması nedeniyle hücre canlılığının engellenmesidir (Murphy ve Atala, 2014).

Kullanılacak polimer ile biyo-basım yapılabilmesi için uyulması gereken belirli kriterler vardır. En önemlisi her tür biyomalzeme için geçerli olan polimerin biyoyuumluluğudur. Polimer, hücre için toksik olmamalıdır, hücrelerin basım sonrası proliferasyonu ve/veya genişlemesi için yapısal destek ve yüzey sağlamak üzere polimerin sito-yapışkan olması önemli olabilir. Diğer önemli özellik ise polimer çözeltisinin viskoelastik veya reolojik özelliklerinden büyük ölçüde etkilenen polimerin basılabilirliğidir ve bu da çözelti içindeki polimer konsantrasyonuna bağlıdır (Wang ve ark., 2015; 2018; Wang, 2019a). Genel anlamda, yüksek viskoziteye sahip bir polimer çözeltisinin daha kararlı ürünler sentezlemesi beklenmektedir. Biyomalzemenin bir diğer önemli özelliği ise bozunma kimyası ve basılı yapının sertliğidir. Çünkü her ikisi de istenilen ilgili dokunun özelliklerine uygun olmalıdır (Blaeser, 2016; Panwar ve Tan, 2016). Biyolojik bozunabilirlik, doku fonksiyonlarının yenilenmesi ile bağlantılıdır. Sertlik ise proliferasyon ve farklılaşma gibi çoklu hücrel aktiviteyle ilişkilidir ve böylece ilgili dokunun yenilenmesine katkıda bulunur (Kolesky ve ark., 2016).

3. Karaciğer hücrelerinde biyomalzeme olarak kullanılan polimerler

Polimerler, kovalent bağlarla bağlanmış tekrar eden monomer birimlerini oluşturan büyük zincirlerdir (Causa ve ark., 2006). Kökenlerine göre polimerler ya doğal ya da sentetiktir (Tablo 1). Doğal polimerler, bitki ve hayvan hücre dışı matrislerinde bol miktarda bulunur ve bu nedenle dokuların/organların hücre dışı matrisine büyük oranda benzerlik gösterir. Bu benzerlik biyomalzemelerin birincil tercih sebebidir. Tercih sebepleri sırasıyla biyoyumlu olması, biyolojik olarak parçalanabilir olması, toksik olmaması, nemi muhafaza etmesi ve belirli fizyolojik koşullar altında anjiyogenez, nörojenez, lenfogenez, organojenez ve doku/organ olgunlaşmasını desteklemesidir (Hospodiuk ve ark., 2017; Gopinathan ve Noh, 2018).

Doğal polimerler, biyolojik olarak sentezlenen, sentetik polimerler ise laboratuvarlarda ve çeşitli endüstriyel iş kollarında insan yapımı üretilen malzemelerdir. Özelliklerini önceden tanımlanmış koşullar gösterir. Sentetik polimerlerin temel avantajı, örneğin dokuların/organların belirli özelliklerini taklit etmek gibi uygulamanın ihtiyacına göre tasarım yapma imkânı sağlamasıdır. Ayrıca, biyomalzemelerin fizikokimyasal özelliklerinin belirli kimyasal modifikasyonlarla uyarlanmasına ve ayarlanmasına da izin verirler (Wang, 2019b). Bu avantajlar, monomerlerin zincir uzunluğu, moleküler ağırlığı, dallanması, geometrisi ve dağılımı üzerinde kontrol sağlar ve böylece polimere istenen özellikler kazandırılabilir.

4. Doğal polimerler

Doğal polimerler, özellikleri nedeniyle yumuşak dokularda kolay çalışılabilmesi ile sıklıkla tercih edilir. Pek çok doğal polimer hepatorganoidlerde biyomükrekkep olarak kullanılmaktadır. Jelatin ve aljinat, 3B hepatik biyobasım için yaygın olarak kullanılır. Tek zincirli bir polimer olan jelatin, balık, sığır veya domuz gibi farklı hayvanların dokularından ekstrakte edilen

Tablo 1

Karaciğer hücrelerinin 3B biyobasımı için kullanılan temel biyomalzemeler (Wang ve ark., 2015; Panwar ve Tan, 2016; Sarkar ve ark., 2020).

Polimer	Biyomolekül Sınıfı	Hücre ile Bağlanma	Suda Çözünürlük	Biyobozunurluk	Diğer Önemli Özellikler
Doğal Polimerler					
Jelatin	Protein/Peptit	Evet	Çözünür	Evet	Daha düşük sıcaklıklarda kendi kendine jelleşme
Aljinat	Polisakkarit	Hayır	Çözünür	Evet	Katyonik jelleşme
Agaroz	Polisakkarit	Hayır	Yüksek sıcaklıkta çözünür	Evet	Olağanüstü mekanik destek sağlar
Kolajen	Protein	Evet	Düşük pH'ta çözünür	Evet	37 ° C'de yüksek jelleşme süresi
Selüloz	Polisakkarit	Hayır	Çözülmez	Hayır	Uzun süreli uygulama için verimli
Kitosan	Polisakkarit	Hayır	Düşük pH'ta çözünür	Evet	Zayıf jelleşme ve mekanik mukavemet
Sentetik Polimerler					
¹ PEG	Polieter	Hayır	Çözünür	Hayır	Mekanik mukavemet üzerinde etkili kontrol
² PCL	Polyester	Hayır	Çözülmez	Evet	Sert yapılar üretir
³ PLGA	Polyester	Hayır	Suda bozulur	Evet	-
Hücreleştirilmiş Matris					
Karaciğer ⁴ dECM	Proteinler, polisakkaritler, glikoproteinler, proteoglikanlar	Evet	Çözünür	Evet	Doğal kimyasal yapıyı ve mikro geometriyi korur

¹PEG: polietilen glikol, ²PCL: polikaprolakton, ³PLGA: poli (laktik asit-ko-glikolik asit), ⁴dECM: hücreleştirilmiş hücre dışı matris.

kolajenin üçlü sarmal yapısının kısmi hidrolizinden ve kırılmasından elde edilmektedir. Jelatin, biyolojik tamponlarda ve hücre kültürü ortamında yüksek oranda çözünür olup, 3B baskı için hücre ve biyoaktif madde yüklü biyolojik bağlantıların hazırlanmasına destek verir (Panwar ve Tan, 2016). Doğal polimer olan jelatinin yüksek düzeyde biyoyumlu ve sitoyumlu olması ve immünojenik olmaması ideal bir polimer olduğunu gösterir. Jelatin, tüm hücre tipleri için tamamen toksik değildir ve *in vivo* ortamda sitokin aktivasyonu ve inflamasyon gibi ters bir immün yanıtı neden olmaz (Liu ve ark., 2018). Aynı zamanda, bağlanma için hücre zarı üzerindeki integrinler tarafından tanınan tripeptid motifi Arg-Gly-Asp içerir. Colosi ve ark. (2016), yaptıkları çalışmada jelatin ve aljinat bazlı biyomürekkep ile basılan üç boyutlu hücre iskeleleri üzerine HUVEC hücreleri mükemmel yapışma sergilemiştir ve ayrıca oluşturulan hücre iskelesinde kullanılan aljinat bazlı biomürekkep hücre göçünü ve hizalanmasını desteklediğini göstermiştir.

Wang ve ark. (2008) ve yanı sıra Gaetani ve ark. (2015), sırasıyla jelatin bazlı hidrojel ve basılı yapı üzerine karaciğer ve kardiyak progenitör hücrelerin daha iyi yapıştığını gösteren çalışmalar yapmışlardır. Jelatin biyolojik olarak parçalanabilir ve biyoyazıcılar ile basılabilir. Bu durum jelatini biyoink seçiminde mükemmel bir polimer yapar. Xiao ve ark. (2011), yaptıkları çalışmada ise jelatin bazlı hidrojelilerin %80'lik degradasyon oranına sahip olduğunu göstermişlerdir.

Biyobasım için jelatin çözeltisinin basılabilirliği viskozite oranı ile belirlenir ve bu da polimer konsantrasyonuna ve çözelti için bazı katkı maddelerine bağlıdır. Bu kriterler hücreler, biyoaktif maddeler, diğer biyomateryaller (karışımlar ve kompozitler için) vb. olabilecek diğer çeşitli maddelere bağlıdır (Gauvin ve ark., 2012).

Kang ve ark. (2016) tarafından üretilen hücre iskelesi ise biyomürekkep olarak kullanılan biyomalzemeler jelatin, hyaluronik asit, fibrinojen, gliserol ve hücrelerin bir kompozitini içermiştir. Bu çalışmada daha düşük jelatin konsantrasyonu, basılı yapının stabilitesinin azalmasına rağmen daha iyi hücre yaşayabilirliği sergilemiştir. Baskı sonrası hücre iskelesinin stabilitesi hem fiziksel jelleşmeye hem de kullanılan kimyasalın çapraz bağlanma derecesine bağlıdır.

Jelatin, zayıf fiziksel çapraz bağlanma ile düşük sıcaklıklarda kendi kendine jelleşme yeteneğine sahiptir, ancak basıldığında zayıf mukavemetli yapılar oluşturur. Basılı yapıları stabilize etmek için bazı kimyasal çapraz bağlama yöntemleri kullanılabilir. En yaygın örneklerden biri, jelatinin amino asit yan zincirleri ile Schiff'in baz oluşumu yoluyla glutaraldehit ile çapraz bağlanmadır. İdeal bir jelatin konsantrasyonu ve çapraz bağlama yöntemi, istenen mekanik mukavamiyet ve biyoyumluluğa sahip hepatik hücre iskeleleri oluşturulmasını sağlayacaktır (Gauvin ve ark., 2012). Bu gibi çapraz bağlanma yöntemlerinin yanı sıra, foto çapraz bağlama ayrıca jelatinin metakrilolasyonu ile jelatin metakrilatı (GelMA) oluşturur. Metakriloil grupları, jelatinin amino asit yan zincirlerinin amin ve hidroksil gruplarına dahil edilir. GelMA'nın çapraz bağlanması, suda çözünür bir foto başlatıcı eklenmesi ve ardından UV ışınına maruz bırakılmasıyla sağlanabilir (Wang, 2019a).

En yaygın kullanılan foto başlatıcılar, 5 mg/ml'lik bir sulu çözünürlüğe sahip olan 2-hidroksi-1-[4-(2-hidroksietoksi)fenil]-2-metil-1-propanon içerir (Yue ve ark., 2015). Biyobasım ile elde edilen hücre iskeleleri, GelMA yapısının sertliği ve hücre canlılığına, polimer konsantrasyonuna, foto başlatıcı konsantrasyonuna ve UV ışığın yoğunluğuna bağlıdır. Bu parametrelerin doğruluğu için yapılan bir çalışmada, düşük UV yoğunluklarının hem düşük hem de yüksek foto başlatıcı konsantrasyonlarında daha iyi hücre canlılığı sergilediği ortaya konulmuştur. Bununla birlikte, oluşturulan hücre iskelelerinin de düşük sertliğe sahip olduğu gösterilmiştir. Bu çalışma ayrıca, optimum özelliklere sahip bir hücre iskelesi elde etmek için UV ışığı ile maruz kalma süresinin de göz ardı edilebileceğini göstermiştir (Pepelanova ve ark., 2018).

Aljinat, algin veya alginik asit, kahverengi deniz yosunu alglerinden elde edilen doğal, negatif yüklü veya anyonik bir polisakkarittir. Polimer, sırasıyla jelleşmeye katılan ve malzemeye esneklik kazandıran $\beta(1-4)$ -D- mannuronik asit ve $\alpha(1-4)$ -L- guluronik asitten oluşur (Murphy ve Atala, 2014). Aljinat da jelatin gibi suda oldukça çözünürdür, ancak jel geçiş sıcaklığı 0 °C'nin altındadır. Bu durum oda sıcaklığı veya fizyolojik sıcaklıkta baskı yaparken herhangi bir fiziksel jelleşme durumunu ortadan kaldırır. Bununla birlikte, aljinat,

Ca²⁺ gibi katyonlarla iyonik olarak çapraz bağlanabilir (Wang, 2019b). Polimerin karboksilat grupları hem zincir içi hem de zincir dışı şelatlanarak biyobasım ile elde edilen hücre iskelelerine stabilite kazandırmak için kullanılır (Liu ve ark., 2018). Park ve ark. (2017), CaCl kullanılarak katyonik çapraz bağlama ile düşük ve yüksek molekül ağırlıklı aljinat mezle biomürekkep elde etmişlerdir.

Aljınatın biyoyumluluğu jelatine göre daha düşüktür, ancak *in vivo* uygulandığında ters immünolojik reaksiyonlara neden olmaz. Ayrıca aljinat biyolojik anlamda parçalanabilir ve hücreye yapışmaz. Baskı sonrası elde edilen hücre iskelelerinin stabilitesi büyük ölçüde iki değerlikli katyon tarafından çapraz bağlanma oranına bağlıdır, ancak polimer ve iyon arasındaki iyonik etkileşimi kesintiye uğratabilen ortamın pH'ına oldukça duyarlıdır (Liu ve ark., 2018). Uygulamalarda, aljinat çözeltisi önce hücre ve/veya biyoaktif moleküller ile birlikte yüklenir, basılır ve daha sonra Ca²⁺ püskürtülerek veya ısıtılarak çapraz bağlama katyonlarının devreye girmesi sağlanır (Wang, 2019b). Uygulamanın dezavantajı ise katyonlar zamanla hücre iskelelerinden sızıntı yapabilir, çapraz bağlanma tersine çevrilebilir ve elde edilen yapı uzun vadeli işlevsellik için katyonlar ile yeniden işlem gerektirebilir (Stanton ve ark., 2015). Aljınatta basılan yapının işlevselliği, polimer konsantrasyonuna, hücre yoğunluğuna ve çapraz bağlanma derecesine bağlıdır. Aljinat, karaciğer, kalp, kemik ve kıkırdak gibi birçok farklı dokunun biyobasımında başarıyla kullanılmıştır (Lee ve Mooney, 2012).

Agaroz, denizde yaşayan kırmızı deniz yosunu alglerinden elde edilen başka bir doğal polisakarittir. β-D galaktopiranoz ve 3,6-anhidro-α-L-galaktopiranoz bloğu olan tekrarlanan agarobiozdan oluşur (Wang, 2019a). Hücre iskelelerinde kullanılmak için oluşturulan modele oldukça iyi mekanik destek sağlar ve yaklaşık 30-45 °C jelleşme sıcaklığına sahiptir (Liu ve ark., 2018). Fan ve ark. (2016), matrigel ve agarozun hibrit bir biyo-bağlantısını geliştirmişlerdir. Agarozun temelde kullanım amacı mürekkebin basılabilirliğini iyileştirmek ve basılı yapıların mekanik özelliklerini arttırmaktır. Bahsi geçen çalışmada da bu amaçla kullanılmıştır. Jelleşme sıcaklığı ise polimerin konsantrasyonuna bağlıdır. Agaroz yüksek düzeyde biyoyumlu olmasına rağmen sitoyapışkan değildir (Mao ve ark., 2017).

Diğer önemli doğal polimer, tüm doku ECM'sinin ana bileşeni olan, oldukça biyoyumlu ve sito-yapışkan bir malzeme olan kolajendir (Elvevold ve ark., 2008). Jelatin gibi, kolajen de hücre yapışmasını, çoğalmasını, göçünü ve farklılaşmasını destekleyen Arg-Gly-Asp motifini içerir (Liu ve ark., 2018). Kolajenin biyo-bağa dâhil edilmesi biyobasımlı yapının anjiyogenezini ve vaskülarizasyonunu arttırdığı gösterilmiştir (Kreimendahl ve ark., 2017; Yang ve ark., 2018). Kolajenin çapraz bağlanma özelliği pH ve sıcaklıktaki değişiklikler ile kolayca sağlanabilir. Ancak fizyolojik sıcaklıkta jelleşme süresi yaklaşık olarak 30 dakika sürebilir. Kolajenin en önemli özelliği ise özellikle *in vivo* ortamda yüksek oranda biyolojik olarak parçalanabilir olmasıdır (Stratosteffen ve ark., 2017). Bu özelliği, 3 boyutlu hepatorganoid oluşturulurken kolajen kullanımında bir kısıtlamaya neden olabilir (Gopinathan ve Noh, 2018).

Doğrusal bir polisakarit olan selüloz da biyomürekkep olarak iki farklı biçimde kullanılmaktadır. Birincisi, metilasyon derecesine bağlı olarak son derece ayarlanabilir özelliklere sahip olan ve fizyolojik sıcaklığın altında jel oluşturabilen karboksimetil selülozdur. İkincisi, temelde nano yapıli selüloz

olan ya kristal ya da elyaf biçiminde olan nanoselüloz (Muller ve ark., 2017). Nanoselüloz, kıkırdak rejenerasyonu için yapıların biyolojik olarak yazdırılmasında kapsamlı ve başarılı bir şekilde kullanılmıştır.

Agaroz gibi selüloz da biyoyumludur ancak sito-yapışkan değildir. En önemli avantajı ise selülozun biyolojik olarak parçalanmamasıdır ve bu da onu uzun süreli uygulama için verimli kılar (Markstedt ve ark., 2017). Karaciğerin 3 boyutlu biyobasımında kullanılan bir diğer önemli polimer de kitosandır. Kitosan, kabuklu deniz canlılarından elde edilen kitinin deasetilasyonu ile elde edilen bir polisakarittir. Biyoyumludur fakat sito-uyumlu değildir, biyolojik olarak parçalanabilir ve antibiyotik özelliği gösterir. Bununla birlikte, yetersiz mekanik özellikler (örn. kırılabilirlik) ve jelleşme yeteneği 3 boyutlu biyobasım için kullanımında dezavantaj oluşturur (Liu ve ark., 2018).

5. Sentetik polimerler

Birçok üç boyutlu basım için uygun sentetik polimer mevcuttur. Özellikle polietilen glikol (PEG), polikaprolakton (PCL) ve poli (laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) esas olarak hepatik yapıların biyobasımı için kullanılır. En çok karaciğer yapılarında kullanılan ise PEG hidrojelleridir, PCL ve PLGA ise daha çok yumuşak dokulara benzer yüksek su tutma kapasitesi gösteren dokularda kullanılır. Bu polimerler ayarlanabilir mekanik özelliklere sahiptirler ve bu nedenle hem sert (örn. kemik) hem de yumuşak (örn. karaciğer) dokuları tasarlamak için kullanılabilir (Gopinathan ve Noh, 2018).

Karaciğerin biyobasımı için en yaygın olarak kullanılan sentetik polimer, poli etilen oksit (PEO) olarak da bilinen PEG'dir. PEG, suda mükemmel çözünürlüğe sahip, Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) onaylı bir polimerdir (Wang, 2019a). Aynı zamanda biyoyumludur ve immünojenik değildir. Sito-yapışkan olmasa bile PEG'in terminal hidroksil grupları, polimerin çapraz bağlanmasını sağlamak için kimyasal olarak akrilat, karboksilat ve/veya tiyol şeklinde tasarlanabilir. Mekanik mukavemet, çapraz bağlanma derecesi ile kontrol edilebilir. PEG çözeltisinin viskozitesi yalnızca moleküler ağırlığa bağlıdır. Bundan dolayı ekstrüzyon esaslı baskı ve mürekkep püskürtmeli baskıda kullanılacak PEG çözümleri ile yüksek viskozite elde edilemez (Gopinathan ve Noh, 2018). Diğer bir popüler sentetik polimer ise non-toksik, biyoyumlu, hidrofobik, sito-yapışkan olmayan ve yavaş biyolojik bozunma gösteren PCL'dir. PCL kloroform, benzen ve toluen gibi organik çözücüler ile çözülebilir ve bu nedenle hücre yüklü yapıların doğrudan basılmasında kullanımı sınırlıdır (Gopinathan ve Noh, 2018). Dahası, yapıların sertliği nispeten yüksektir ve bu da karaciğer için uygun olmayabilir. Bunların dışında, laktik asit ve glikolik asidin lineer bir poliesteri olan PLGA da hepatik yapıların 3 boyutlu baskısı için kullanılmıştır. PLGA oldukça başarılı biyoyumluluk gösterir ve biyolojik olarak parçalanabilirliğe sahip FDA onaylı bir polimerdir (Wang, 2019a).

Polimerin bozunabilirliği, kopolimerdeki laktik ve glikolik asit içeriği değiştirilerek ayarlanabilir. Ayrıca glikolik asit oranı ne kadar yüksekse bozunma süresi de o kadar düşük olacaktır. Bununla birlikte, suyun PLGA için bir çözücü olarak kullanımını sınırlayan su içindeki ester bağlarının hızlı hidrolizine maruz kalır (Gopinathan ve Noh, 2018). Bu durum PLGA ile hücre yüklü yapıların ve hücre iskelelerinin oluşturulmasını sınırlar.

Tablo 2

Son 5 yılda 3 boyutlu hepatik biyoyazıcı ile ilgili önemli çalışmaların özeti (Panwar ve Tan, 2016; Lewis ve ark., 2018; Sarkar ve ark., 2021).

Kullanılan Biyoinkler	Kullanılan Hücre/ler	Biyolojik Baskı Süreci	Bastlı Yapılar	Uygulama	Önemli Bulgular
Karaciğer ¹ dECM jelatin	NIH3T3, HUVEC	Mürekkep püskürtmeli	2D ve 3B karaciğer şekilli yapılar	Yapay doku/organ yenilenmesi	Gelişmiş basılabilirlik ve mekanik özelliklere sahip dECM toz bazlı biyoink
Pluronic F127-Aljinat	HepG2 / C3A	Ekstrüzyon esaslı	3B kare yapı	İlaç taraması için <i>in vitro</i> model	Öğretici sinyaller olmadan biyobasımda 3B hepatik model
Jelatin	Huh7	Ekstrüzyon esaslı	Farklı dikme açılmasına sahip 3B kafes	Gelişmiş işlevselliğe sahip <i>in vitro</i> hepatik model	60° dikme açısına sahip iskeleler artmış karaciğer fonksiyonları gösterdi
² PCL Karaciğer dECM; kolajen	HepG2, BMMSC'ler	Ekstrüzyon esaslı	2B ve 3B desenler	Hepatik doku mühendisliği	Optimum mukavemet ve farklılaştırma kapasitesine sahip biyoink baskı yapıları
Aljinat-selüloz nanokristaller	Fibroblastlar, insan hepatom hücreleri	Ekstrüzyon esaslı	3B petek yapısı	Hepatik doku mühendisliği	Mükemmel basılabilirliğe sahip yeni selüloz bazlı biyoink
³ PLGA	Aselüler	Ekstrüzyon esaslı	Tek kanallı kübik, silindirik, dallı üç kanallı yarım küre	Karaciğer rejeneratif iskeleler	Düşük sıcaklıkta biriktirme üretim cihazı kullanan PLGA çok kanallı iskeleler
Jelatin-aljinat	Birincil hepatoselüler karsinom hücreleri	Ekstrüzyon esaslı	3B küp	Kişiselleştirilmiş tıp	Tümerojenitenin korunmasıyla <i>in vitro</i> olarak kültürlen 3B baskılı birincil hücreler
Jelatin-aljinat-matrigel	Birincil intrahepatik kolanjiokarsinom hücreleri	Ekstrüzyon esaslı	3B küp	Kişiselleştirilmiş tıp	Antikanser ilaç testi için hastaya özel 3B biyo baskılı model
⁴ GelMA	HepG2 / C3A sferoidleri	Mürekkep püskürtmeli	Sıvı damlacık	Çipte organ	Doğrudan biyoreaktör kültür hazinesinde basılmış hepatik sfero yüklü biyonik
Kolajen I-hyaluronan	Lx2, birincil fetal aktive hepatik yıldız hücreleri	Ekstrüzyon esaslı	Dört kollu tekerlek yapısı	<i>In vitro</i> ilaç taraması, hastalık modellemesi	Ek işlevsellik için diğer bileşenleri birleştirme becerisine sahip ayarlanabilir biyoink
Aljinat-selüloz nanokristal-GelMA	NIH3T3, HepG2	Ekstrüzyon esaslı	3B petek yapısı	Hepatik doku mühendisliği	İki hücrenin hassas konumlandırılmasıyla iki hücreli karaciğer lobül-mimetik yapıları
Karaciğer dECM-GelMA	İnsan kaynaklı hepatositler	Dijital ışık işleme	İç dişli benzeri yapı	Karaciğer ikamesi	Yüksek çözünürlüklü dijital ışık işlemeli baskı ile uyumlu yeni biyoink
Kolajen	İnsan yağından türetilmiş kök hücreler (hASC'ler)	Ekstrüzyon esaslı	3B küp	Biyoyapay karaciğer	hASC kaynaklı hepatosit benzeri hücreler karaciğer rejenerasyonuna müdahale eder
Aljinat	Fare birincil hepatositleri, mezenkimal kök hücreler	Ekstrüzyon esaslı	3B küp	Hepatik doku mühendisliği	3B biyobasımlı yapıda hepatik ve kök hücrelerin birlikte kültürü
Aljinat	Fare kaynaklı hepatositler	Ekstrüzyon esaslı	3B küp	Biyo yapay organlar	Hepatik hücre kaynağı olarak fare kaynaklı hepatositler
Galaktosile aljinat	Fare birincil hepatositleri	Mürekkep püskürtmeli	Jel levha	Hepatik doku mühendisliği	Baskı sırasında hücrelerin kontrollü 3B geometrik düzenlemesi
Aljinat	Fare birincil hepatositleri	Ekstrüzyon esaslı	3B küp	Hepatik doku mühendisliği	Birincil hepatositlerin uzun vadeli canlılığı ve işlevselliği
Aljinat	HepG2	Ekstrüzyon esaslı	3B küp	Rejeneratif tıp	HepG2'nin geliştirilmiş karaciğer fonksiyonları
Atelocollagen	Sıçan birincil hepatositleri, HUVEC, insan akciğer fibroblastı	Ekstrüzyon esaslı	3B küp	Rejeneratif tıp	Parankimal ve parankimal olmayan hücrelerin ortak kültürü, anjiyogenez
Karaciğer dECM-GelMA	HepLL, Çakı-1	Litografi	Mikroakışkan cihaz	Tümör ilerleme modeli	Böbrek kanseri hücrelerinin karaciğere göçü için çip üzerinde metastaz
İnsan akciğer dECM-aljinat-jelatin	HepaRG	Ekstrüzyon esaslı	3B küp	Enfeksiyon ve bulaşma çalışmaları	Baskılı doku modeli, aksi takdirde sferoid modellerde elde edilemeyen kapsamlı transdüksiyona izin verdi
NovoGel	Birincil kriyoprezerve insan hepatositleri, hepatik yıldız hücreleri, HUVEC	Ekstrüzyon esaslı	İki bölmeli düzlemsel geometri	<i>In vitro</i> hepatik model	Her hücre tipinin belirlenen yerlere hassas bir şekilde iletilmesi, doğal doku yapısının tekrarlanması

¹dECM: hücresizleştirilmiş hücre dışı matris, ²PCL: polikaprolakton, ³PLGA: poli (laktik asit-ko-glikolik asit), ⁴GelMA: jelatin metakrilat.

6. Hücreleştirilmiş matris

Hücreleştirilmiş karaciğer ekstraselüler matrisi, karaciğerin kimyasal ve/veya enzimatik olarak hücreleştirilmesiyle elde edilen doğal biyomalzemelerin ve moleküllerin bir karışımıdır (Pati ve ark., 2014). Bu şekilde elde edilen hücreleştirilmiş ECM (dECM) liyofilizasyon ile toz haline getirilebilir ve hücre yüklü yapıların basılması için biyolojik tamponlar veya farklı biyomalzemeler ile çözülebilir (Jang ve ark., 2016). Hücreleştirme yöntemi doğal kimyasal bileşimi, mikrogeometrisi ve karaciğerin büyüme faktörleri gibi biyomoleküllere sahip olması ve ayrıca *in vitro* hepatik hücrelere *in vivo* benzeri bir ortam sağlayabilen bir biyomalzeme olması ile güvenli bir mikroçevre sunar. Genellikle dECM, fizyolojik pH ve sıcaklıkta jelleşmeye başlar ve bu da 3 boyutlu baskıda kullanımı için uygun olduğunu gösterir. Ancak dECM solüsyonlarının düşük viskozitesi de dezavantajı olarak söylenebilir (Pati ve ark., 2014).

Karaciğerin ekstraselüler matrisi, Glisson kapsülünü, merkezi damarları, portal yollarını ve sinüzoid duvarlarını oluşturan yalnızca %3'lük bir karaciğer alanını kapsar. Karaciğer ekstraselüler matrisinde en çok bulunan bileşen, tip I, III ve V'in de mevcut olduğu kolajen IV'tür (Jang ve ark., 2016; Pati ve ark., 2015). Bunun dışında glikoproteinler (fibronektin, laminin vb.) ve proteoglikanlar (heparin, hyaluronik asit, kondroitin sülfat vb.) da karaciğer ekstraselüler matrisinin ana bileşenleridir. Karaciğer dECM, biyomalzeme olarak mükemmel bir aday gibi görünse de zayıf şekil koruma özelliği ve hızlı biyolojik bozunma gibi nedenlerden dolayı büyük yapıları basmak ve uzun vadeli denemeler için kullanımını kısıtlar. Dahası, dECM'nin en yaygın kaynağı ksenojeniktir yani *in vivo* çalışmalarda immünojenik bir tehdit oluşturabilir (Wang, 2019b; Jang ve ark., 2017). Bu da, hücreyel yapılar arasında immünojenik reaksiyon ortaya çıkarabileceği anlamına gelir. Bu verilere rağmen, hücreleştirilmiş karaciğer matrislerinin hücre yüklü 3 boyutlu hepatik yapıları oluşturmak için mükemmel bir biyomalzeme adayı olduğu yadsınmaz.

7. 3 boyutlu baskılı karaciğer yapılarında son çalışmalar

Polimerlerin neredeyse hepsi biyo-bağ oluşturmak için istenen tüm özellikleri sergileyemez. Dolayısıyla, 3 boyutlu hepatik baskı üzerine yapılan çalışmaların çoğu, optimum şartları sağlama için iki ya da daha çok biyomalzemenin uygun formlarda birleştirilmesi ile kullanılır (Jang ve ark., 2016). Son 5 yılda yayınlanan 3 boyutlu hepatik biyobasım ile ilgili başlıca çalışmaların özeti Tablo 2'de sunulmuştur.

Biyobasım hepatik yapıların biyoyumlu yapılar olması için gelişiminde birçok yaklaşım kullanılmıştır. Kim ve ark. (2020), dECM toz temelli biyomalzemesi, domuz dECM mikropartiküllerinin hyaluronik asit, fibrinojen ve biyoaktif bileşenler içere jelatine karıştırılmasıyla hazırlanmıştır. dECM biyomalzemesinin yüksek viskozite ve kesme inceliği özellikleri hem daha kolay izlenebilir olmasını hem de ECM mikropartiküllerinin eşit dağılımını sergileyebilir.

Biyomalzemenin üç boyutlu basılabilirliğini sergileyen ve bu zamana kadar yapılan en büyük oranlarına sahip yapı elde edilmiş oldu. Ayrıca, elde edilen biyomalzeme insan karaciğeri ve endotel hücreler ile sito-uyumluydu. Bu nedenle çok hücreli karaciğer yapısı için potansiyel bir kullanım alanı oluşturdu.

Gori ve ark. (2020), termoreponsif ve biyo inert yarı sentetik aljinat-pluronik biyomalzemeyi bir pluronik şablon

tarafından sağlanan yüksek şekil uygunluğuna sahip hepatik yapıları basmak ve ısı tepkisel yapı ile jelleşmeyi kontrol etmek için kullanmışlardır. Ortaya çıkan hepatik yapı, asetaminofene karşı gelişmiş hepatik işlevsellikler ve duyarlılık sergilemiş, böylece fizyolojik olarak daha ilgili özellikler göstermiştir. Lewis ve ark. (2018), jelatin biyomalzemesi ile baskılı yapının geometrik mimarisi ve gözenek boyutunun sıralı olmasını dikkate almışlardır. Yapı, farklılaşmış hepatositler olarak bilinen Huh7 hücrelerinin proliferasyonunda duraklama sergilememiş, ancak albümin sekresyonu ve MRP2 protein ekspresyonu gibi gelişmiş hepatik özellikler sergilemiştir. Lee ve ark. (2016) ise karaciğer dECM kullanılarak bir biyomalzeme ile yüksek doğrulukta yapılar hazırlamışlardır. Yapı, mezenkimal kök hücrelerin (MSC'ler) hepatik kökene farklılaşmasını sergilemesinin yanı sıra ticari olarak temin edilebilen kolajen ile karşılaştırıldığında insan hepatoselüler karsinom, HepG2 hücrelerinin daha fonksiyonel özelliklerini sergilemiş oldu. Bu çalışma, sadece dECM'yi biyomalzemenin bir bileşeni olarak kullanarak kararlı ve fonksiyonel hepatik yapılar üretilmesine olanak sağladığı için çığır açan bir çalışma olarak kabul edilmiştir. Wu ve ark. (2018), kolaylıkla şekil verebilme özelliği gösteren selüloz nanokristaller ve aljinattan oluşan bir hibrit biyo-bağ geliştirmişlerdir. Elde edilen hibrit biyomalzeme, ekstrüzyon temelli bioprinter ile 100 µm çapındaki bir nozuldaki rahatlıkla ekstrüde edilebilmektedir. Biyomalzeme ile hepatik hücrelerin ve fibroblastların ortak kültür koşullarında basılabildiği gösterilmiştir. Wang ve ark. (2017), farklı baskı parametrelerinin optimizasyonunu çalışmışlardır. PLGA tabanlı 3B baskılı iskeleler için polimer konsantrasyonu, nozül hızı ve ekstrüzyon hızı istenilen şekilde hazırlanmasına rağmen, duvar kalınlığı ve şekillendirmeye sahip karaciğer yapılarının sentezi noktasında başarılı bulunmamıştır. Çalışma, üç boyutlu yapının kalitesiyle ümit verici, fakat performansı ve hücrelerle uyumluluğu noktalarında istenilen doğrulukta olmadığı anlaşılmıştır.

Doku mühendisliği ile elde edilen karaciğer yapılarının *in vitro* temel uygulaması için polimerik biyo-bağlantılar sayesinde 3 boyutlu yazdırılmış hepatik yapılar oluşturularak oldukça önemli adımlar atılmaktadır. Xie ve ark. (2021) tarafından yakın zamanda yapılan bir çalışmada, hepatoselüler karsinom hücreleri farklı hastalardan izole etmişlerdir ve jelatin-aljinat mürekkepler kullanılarak biyobasım yapıları üzerinde uzun süreli kültür oluşturulmuştur. Biyolojik olarak basılmış yapılar, hastaların genetik özelliklerini korumaktadır ve böylece kişiselleştirilmiş tıp için önemli bir adım atılmıştır. İnvazif ve metastatik özellikler ile antikanser ilaçlara yanıt üzerine yapılan çalışmalar, kişiselleştirilmiş tıbbın geliştirilmesi için umut verici sonuçlar göstermiştir (Mao ve ark., 2020a). HepG2/C3A sfero yüklü GelMA biyoink kullanılarak bir çip üzerinde karaciğeri yazdırmak için bir biyo yazıcı ile ara yüzü oluşturulmuş bir perfüzyon biyoreaktör kullanılmıştır Platform, *in vivo* hayvan çalışmalarında kullanılarak karşılaştırılabilir ilaç yanıtının incelenmesinde karaciğere özgü işlevsellikler ve gen ekspresyonu göstermiştir. Kollajen I-hyaluronik asit hibrit biyo-bağlayıcısı, birincil insan hepatositlerinin ve karaciğer yıldız hücrelerinin ortak kültürünü oluşturmak için kullanılmıştır. Yapı, uzun süreli kültür süresi, artmış albümin salgısı ve üre sentezinin yanı sıra asetaminofene karşı değiştirilmiş yanıt sergilemiştir. Kişiselleştirilmiş ilaç için oluşturulan yapı faydalı olabilir, ancak detaylı araştırmaya ve doğrulama gereklidir (Gaetani ve ark., 2015; Bhise ve ark., 2016).

3B baskılı karaciğer yapılarındaki kayda değer gelişmelerin her biri rejeneratif tıp uygulamalarıdır. Aşırı

karaciğer hasarı durumunda rejenerasyonu için dış müdahale gereklidir. Ya karaciğer yenilenene kadar karaciğer fonksiyonlarını yerine getirmek için bir *ex situ* biyo-yapay karaciğer destek cihazı sağlanabilir ya da doku mühendisliği ile yapılmış bir karaciğer yapısının *in vivo* implantasyonu gerçekleştirilebilir (Bhise ve ark., 2016). Son zamanlarda oldukça önemli veriler sunan HepG2 hücre hattında yapılan bir çalışmada, aljinat, nanokristalin selüloz ve GelMA kullanılarak fibroblast ve hepatositlerin ortak kültürüne izin veren bir hibrit üç boyutlu hepatik yapı geliştirilmiştir. Fare embriyo fibroblastı (NIH/3T3), sert bir matris oluşturan %1 aljinat, %3 nanokristalin selüloz ve %5 GelMA'dan (135ACG) oluşan hibrit bir biyo-bağ üzerine yüklenmiştir. %4 GelMA üzerine yüklenen HepG2 daha sonra hepatik yapıya benzer bir hücre iskeletini yazdırmak için kullanılmıştır. NIH/3T3 ve HepG2 sferoidleri, hem homotipik hem de heterotipik bağlantılar oluşturması için sınırlandırılmıştır. Karaciğer hücreleri artmış karaciğer işlevselliği ile proliferasyonda tutukluk sergilemiştir (Wu ve ark., 2020).

Rejeneratif tıpta karaciğer benzeri yapının varlığı için yapılan çalışma bilim dünyasını oldukça heyecanlandırmıştır. Çalışmada, üç boyutlu bir biyobasım cihazı kullanılarak ve dijital ışık işleminden faydalanarak hepatik yapıyı basmak için GelMA-dECM polimer karışımı kullanılmıştır. İnsan kaynaklı hepatositler (HiHep), iç dişli benzeri bir yapı ve hücrel aktivite için yüksek bir yüzey alanı ile karaciğer mikro dokusuna basılmış hücre yüklü biyo-bağ oluşturmak için GelMA'ya ve domuz dECM bileşimine ilave edilmiştir. dECM, biyomalzemenin basılabilirliğini geliştirmiş ve ayrıca albümin sentezi ve kan üre nitrojen salgılanması ile ölçülen hücre canlılığı ve işlevselliğini geliştirerek umut verici sonuçlar sergilemiştir (Mao ve ark., 2020b).

Lee ve ark. (2017) tarafından yapılan bir çalışmada ise hepatik bloklar, insan adipoz hücrelerinin kolajen I biyomalzemesi ile 3 boyutlu yapı oluşturmuştur ve hepatosit benzeri hücrelere farklılaştırılmıştır. Akut karaciğer yetmezliği için indüklenen bir sıçanın implantasyonunda hücreler basılı yapıdan çıkarıldı ve 4 hafta sonra hepatik portal venlere yer değiştirmiştir. Serumda artan karaciğere özgü parametreler değerlendirildiğinde sıçanın karaciğer yetmezliği sorununda ortadan kalktığı bulunmuştur. Geliştirilen model, yapay karaciğer modellerine potansiyel bir alternatif olarak ortaya çıkmıştır. Kim ve ark. (2018) tarafından düşünülen üç boyutlu yapıda ise uzun süreli kültür koşulları gelişmiş hepatik işlevsellik (albümin salgısı ve üre sentezi) ve ilacın metabolik aktivitesinin birincil hepatositleri ve mezenkimal kök hücreleri (MSC'ler) kullanabilmek için aljinat biyomalzemesinin olumlu sonuçlar verebileceği düşünülmüştür. MSC'ler tarafından salgılanan parakrin molekülleri karaciğer fonksiyonlarını iyileştirdi ve 3 boyutlu yapı sferoidlere/organoidlere kıyasla daha az hipoksik stres göstermiştir. Fakat doku mühendisliği örneği olan bu çalışmanın ilaç taraması veya rejeneratif tıp uygulamaları için daha detaylı çalışmalar ile doğrulanması gerekmektedir. Kang ve ark. (2018), fare kaynaklı hepatosit benzeri hücreler (miHeps) ile çalışmışlardır. Aljinat kullanılarak elde edilen model bir hafta süreyle *in vitro* olarak kültürlendi ve daha sonra karaciğer fonksiyonlarının restorasyonunu sergileyen bir fare, karaciğer hasarı modeline *in vivo* implante edilmiştir.

Farklı bir çalışmaya imza atan Arai ve ark. (2017), baskılı birincil hepatositlerin polaritesini korumak için galaktosile-aljinat biyo-bağının kullanımını deneysel çalışmalar ile göstermişlerdir. Aljinat veya hepatositlerin ortak kültürü, insan

umbilikal ven endotel hücreleri ve bir PCL çerçevesinde kollajen ile basılmış insan akciğer fibroblastları ile basılan primer hepatositlerin ve HepG2 hücreleri ile elde edilen verilerde bildirilmiştir. Hepsi uzun süreli kullanılabilir ve gelişmiş hepatik özelliklere sahiptir, ancak yapıların entegrasyonu için doğrulanması gerekir (Lee ve ark., 2016; Kim ve ark., 2017).

Hepatik doku mühendisliği için önemli uygulamalar arasında yer alan dECM-GelMA hibrit bileşimi ile elde edilen basılı mikro doku kullanılarak böbrek kanserinin karaciğere ilerlemesini incelemek için bir çip üzerinde metastatis modeli geliştirilmiştir (Wang ve ark., 2020). Platform, tümör ilerlemesinin farklı aşamalarında antikanser ilaç dozajını tahmin etmek için kullanılabilir. Başka bir durumda, HepaRG hücrelerinin aljinat-jelatin-dECM bileşenleri ile bir biyoink oluşturulup basılmasıyla bir viral enfeksiyon modeli geliştirilmiştir. İnsan dECM'sinin eklenmesi, hücre yüklü biyoinkin basılabilirliğini ve HepaRG hücrelerinin hepatik işlevselliğini büyük ölçüde arttırmıştır. Biyolojik olarak basılmış hepatik yapı, insan adenovirüs 5'in yanı sıra adeno bağlantılı virüs tarafından transdüksiyon üzerine RNA müdahalesi ile istenilen şekilde susturulan bir hedef gen olan siklofilin B tarafından başarıyla geliştirilmiş ve enfekte edilmiştir (Hiller ve ark., 2018). Bu nedenle, geliştirilen yapı, virüs enfeksiyonunun yanı sıra virüs aracılı gen terapisinin incelenmesinde de ikili bir platform görevi görmüştür.

8. Sonuçlar

Doğal ya da sentetik polimerlerin 3 boyutlu baskıda kullanılması, basılı yapının mekanik özelliklerini ve sertliğini kontrol etmek için çok iyi veriler sunmuştur. Ayrıca hücre yüklü biyo-bağlantıların hazırlanmasına izin vererek canlı yapıların üretilmesine yol açmıştır. Karaciğer gibi düşük sertliğe sahip yumuşak dokuların geliştirilmesinde büyük bir avantaj sağlamış ve karaciğerin karmaşık ve ayrıntılı yapısının neredeyse kopyalanmasına olanak sağlamıştır.

Doğal polimerler, biyolojik uyumluluğun en iyi sergilendiği polimerler olması nedeniyle doku mühendisliği çalışmaları için birçok fayda sağlar. 3 boyutlu hepatik yapılar için en yaygın kullanılan polimerler ise jelatin ve hücreleştirilmiş matrislerdir. Bir organın doğal yapısında bulunan sayısız hücre ve ECM bileşeni, yapının yeniden yapılandırılmasında en büyük zorluklardan biridir. Bu nedenle biyomateryal seçiminde dikkat edilmesi gereken bu sınırlama çalışmaların en büyük sorunudur. Polimerlerin tek başına kullanılması, mekanik mukavemet, sitoadherans ve farklı hücre tiplerinin işlevlerini destekleme ve geliştirme yeteneği gibi istenen tüm özellikleri sağlayamamaktadır. Bu nedenle farklı polimerlerin ve diğer biyomateryal türlerinin karışımları ve kompozitleri kullanılarak istenilen özellikler elde edilmeye çalışılmaktadır. Buna rağmen, çözünürlük 3 boyutlu yapının elde edilmesinde en büyük engeldir, çünkü doku inceliklerini sergileyen yapı elde etmek oldukça zordur.

En yaygın olarak kullanılan baskı yönteminin ekstrüzyon esaslı olduğu bilinmektedir. Stereolitografi ve lazer destekli baskı gibi diğer 3 boyutlu baskı yöntemleri, aynı anda uzamsal çözünürlüğü iyileştirerek yüksek viskoziteli biyomürekkep ve yüksek hücre yoğunluğunu işlemek için araştırılabilir. Çalışmalar esas olarak hepatik karsinom, endotelial ve fibroblast hücreleri ile çalışmanın sınırlı olduğunu iddia etmektedir. Daha fazla hücre çeşidinin dâhil edilmesi için daha fazla karaciğer hücresine ihtiyaç vardır.

Bu derlemede öncelikle karaciğerin üç boyutlu biyobasımı ile elde edilen yapıların stabilitesini arttırmak daha sonra ise çeşitli doku mühendisliği uygulamaları için hepatik yapıları imal edebilmek başlıkları üzerinde durulmuştur. Kararlı ve dayanıklı yapıların basılmasında birçok başarı elde edilmiş olsa da, homotipik ve heterotipik hücre-hücre ve hücre-ekstraselüler matris etkileşimlerini teşvik eden ekstraselüler matris bileşenleri ve hücreler için karaciğerin ayrıntılı yapısını basmak için daha fazla araştırma ve geliştirmeye ihtiyaç vardır.

Doku mühendisliği uygulamaları temel olarak *in vitro* ilaç taraması ve hastalık modellerinin yanı sıra *ex situ* biyo yapay karaciğer desteği ve *in vivo* implante edilebilir yapılar ile rejeneratif tıbbi içerir.

Kaynaklar

- Arai, K., Yoshida, T., Okabe, M., Goto, M., Mir, T. A., Soko, C., ... & Nakamura, M. (2017). Fabrication of 3D-culture platform with sandwich architecture for preserving liver-specific functions of hepatocytes using 3D bioprinter. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 105(6), 1583-1592.
- Bhise, N. S., Manoharan, V., Massa, S., Tamayol, A., Ghaderi, M., Miscuglio, M., ... & Khademhosseini, A. (2016). A liver-on-a-chip platform with bioprinted hepatic spheroids. *Biofabrication*, 8(1), 014101.
- Blaeser, A., Duarte Campos, D. F., Puster, U., Richtering, W., Stevens, M. M., & Fischer, H. (2016). Controlling shear stress in 3D bioprinting is a key factor to balance printing resolution and stem cell integrity. *Advanced Healthcare Materials*, 5(3), 326-333.
- Bogert, P. T., & LaRusso, N. F. (2007). Cholangiocyte biology. *Current Opinion in Gastroenterology*, 23(3), 299-305.
- Causa, F., Sarracino, F., De Santis, R., Netti, P. A., Ambrosio, L., & Nicolais, L. (2006). Basic structural parameters for the design of composite structures as ligament augmentation devices. *Journal of Applied Biomaterials and Biomechanics*, 4(1), 21-30.
- Colosi, C., Shin, S. R., Manoharan, V., Massa, S., Costantini, M., Barbetta, A., ... & Khademhosseini, A. (2016). Microfluidic bioprinting of heterogeneous 3D tissue constructs using low-viscosity bioink. *Advanced Materials*, 28(4), 677-684.
- Elvevold, K., Smedsrød, B., & Martinez, I. (2008). The liver sinusoidal endothelial cell: a cell type of controversial and confusing identity. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 294(2), 391-400.
- Fan, R., Piou, M., Darling, E., Cormier, D., Sun, J., & Wan, J. (2016). Bio-printing cell-laden Matrigel-agarose constructs. *Journal of Biomaterials Applications*, 31(5), 684-692.
- Gaetani, R., Feyen, D. A., Verhage, V., Slaats, R., Messina, E., Christman, K. L., ... & Sluijter, J. P. (2015). Epicardial application of cardiac progenitor cells in a 3D-printed gelatin/hyaluronic acid patch preserves cardiac function after myocardial infarction. *Biomaterials*, 61, 339-348.
- Gauvin, R., Chen, Y. C., Lee, J. W., Soman, P., Zorlutuna, P., Nichol, J. W., ... & Khademhosseini, A. (2012). Microfabrication of complex porous tissue engineering scaffolds using 3D projection stereolithography. *Biomaterials*, 33(15), 3824-3834.
- Gopinathan, J., & Noh, I. (2018). Recent trends in bioinks for 3D printing. *Biomaterials Research*, 22(1), 1-15.
- Gori, M., Giannitelli, S. M., Torre, M., Mozetic, P., Abbruzzese, F., Trombetta, M., ... & Rainer, A. (2020). Biofabrication of hepatic constructs by 3D bioprinting of a cell-laden thermogel: An effective tool to assess drug-induced hepatotoxic response. *Advanced Healthcare Materials*, 9(21), 2001163.
- Hiller, T., Berg, J., Elomaa, L., Röhrs, V., Ullah, I., Schaar, K., ... & Kurreck, J. (2018). Generation of a 3D liver model comprising human extracellular matrix in an alginate/gelatin-based bioink by extrusion bioprinting for infection and transduction studies. *International journal of molecular sciences*, 19(10), 3129.
- Hospodiuk, M., Dey, M., Sosnoski, D., & Ozbolat, I. T. (2017). The bioink: A comprehensive review on bioprintable materials. *Biotechnology advances*, 35(2), 217-239.
- Jang, J., Kim, T. G., Kim, B. S., Kim, S. W., Kwon, S. M., & Cho, D. W. (2016). Tailoring mechanical properties of decellularized extracellular matrix bioink by vitamin B2-induced photo-crosslinking. *Acta Biomaterialia*, 33, 88-95.
- Jang, J., Park, H. J., Kim, S. W., Kim, H., Park, J. Y., Na, S. J., ... & Cho, D. W. (2017). 3D printed complex tissue construct using stem cell-laden decellularized extracellular matrix bioinks for cardiac repair. *Biomaterials*, 112, 264-274.
- Kang, H. W., Lee, S. J., Ko, I. K., Kengla, C., Yoo, J. J., & Atala, A. (2016). A 3D bioprinting system to produce human-scale tissue constructs with structural integrity. *Nature Biotechnology*, 34(3), 312-319.
- Kang, K., Kim, Y., Jeon, H., Lee, S. B., Kim, J. S., Park, S. A., ... & Choi, D. (2018). Three-dimensional bioprinting of hepatic structures with directly converted hepatocyte-like cells. *Tissue Engineering Part A*, 24(7-8), 576-583.
- Kim, M. K., Jeong, W., Lee, S. M., Kim, J. B., Jin, S., & Kang, H. W. (2020). Decellularized extracellular matrix-based bio-ink with enhanced 3D printability and mechanical properties. *Biofabrication*, 12(2), 025003.
- Kim, Y., Kang, K., Jeong, J., Paik, S. S., Kim, J. S., Park, S. A., ... & Choi, D. (2017). Three-dimensional (3D) printing of mouse primary hepatocytes to generate 3D hepatic structure. *Annals of Surgical Treatment and Research*, 92(2), 67-72.
- Kim, Y., Kang, K., Yoon, S., Kim, J. S., Park, S. A., Kim, W. D., ... & Choi, D. (2018). Prolongation of liver-specific function for primary hepatocytes maintenance in 3D printed architectures. *Organogenesis*, 14(1), 1-12.
- Kolesky, D. B., Homan, K. A., Skylar-Scott, M. A., & Lewis, J. A. (2016). Three-dimensional bioprinting of thick vascularized tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(12), 3179-3184.
- Kreimendahl, F., Köpf, M., Thiebes, A. L., Duarte Campos, D. F., Blaeser, A., Schmitz-Rode, T., ... & Fischer, H. (2017). Three-dimensional printing and angiogenesis: tailored agarose-type I collagen blends comprise three-dimensional printability and angiogenesis potential for tissue-engineered substitutes. *Tissue Engineering Part C: Methods*, 23(10), 604-615.
- Lauschke, V. M., Hendriks, D. F., Bell, C. C., Andersson, T. B., & Ingelman-Sundberg, M. (2016). Novel 3D culture systems for studies of human liver function and assessments of the hepatotoxicity of drugs and drug candidates. *Chemical Research in Toxicology*, 29(12), 1936-1955.
- Lee, J. S., Yoon, H., Yoon, D., Kim, G. H., Yang, H. T., & Chun, W. (2017). Development of hepatic blocks using human adipose tissue-derived stem cells through three-dimensional cell printing techniques. *Journal of Materials Chemistry B*, 5(5), 1098-1107.
- Lee, J. W., Choi, Y. J., Yong, W. J., Pati, F., Shim, J. H., Kang, K. S., ... & Cho, D. W. (2016). Development of a 3D cell printed construct considering angiogenesis for liver tissue engineering. *Biofabrication*, 8(1), 015007.
- Lee, K. Y., & Mooney, D. J. (2012). Alginate: properties and biomedical applications. *Progress in Polymer Science*, 37(1), 106-126.
- Lewis, P. L., Green, R. M., & Shah, R. N. (2018). 3D-printed gelatin scaffolds of differing pore geometry modulate hepatocyte function and gene expression. *Acta Biomaterialia*, 69, 63-70.
- Liu, F., Chen, Q., Liu, C., Ao, Q., Tian, X., Fan, J., ... & Wang, X. (2018).

- Natural polymers for organ 3D bioprinting. *Polymers*, 10(11), 1278.
- Mao, B., Divoux, T., & Snabre, P. (2017). Impact of saccharides on the drying kinetics of agarose gels measured by in-situ interferometry. *Scientific Reports*, 7, 41185.
- Mao, Q., Wang, Y., Li, Y., Juengpanich, S., Li, W., Chen, M., ... & Cai, X. (2020a). Fabrication of liver microtissue with liver decellularized extracellular matrix (dECM) bioink by digital light processing (DLP) bioprinting. *Materials Science and Engineering: C*, 109, 110625.
- Mao, S., He, J., Zhao, Y., Liu, T., Xie, F., Yang, H., ... & Sun, W. (2020b). Bioprinting of patient-derived *in vitro* intrahepatic cholangiocarcinoma tumor model: establishment, evaluation and anti-cancer drug testing. *Biofabrication*, 12(4), 045014.
- Markstedt, K., Escalante, A., Toriz, G., & Gatenholm, P. (2017). Biomimetic inks based on cellulose nanofibrils and cross-linkable xylans for 3D printing. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 9(46), 40878-40886.
- Munaz, A., Vadivelu, R. K., John, J. S., Barton, M., Kamble, H., & Nguyen, N. T. (2016). Three-dimensional printing of biological matters. *Journal of Science: Advanced Materials and Devices*, 1(1), 1-17.
- Muller, M., Ozturk, E., Arlov, Ø., Gatenholm, P., & Zenobi-Wong, M. (2017). Alginate sulfate–nanocellulose bioinks for cartilage bioprinting applications. *Annals of Biomedical Engineering*, 45(1), 210-223.
- Murphy, S. V., & Atala, A. (2014). 3D bioprinting of tissues and organs. *Nature Biotechnology*, 32(8), 773-785.
- Panwar, A., & Tan, L. P. (2016). Current status of bioinks for micro-extrusion-based 3D bioprinting. *Molecules*, 21(6), 685.
- Park, J., Lee, S. J., Chung, S., Lee, J. H., Kim, W. D., Lee, J. Y., & Park, S. A. (2017). Cell-laden 3D bioprinting hydrogel matrix depending on different compositions for soft tissue engineering: Characterization and evaluation. *Materials Science and Engineering: C*, 71, 678-684.
- Pati, F., Ha, D. H., Jang, J., Han, H. H., Rhie, J. W., & Cho, D. W. (2015). Biomimetic 3D tissue printing for soft tissue regeneration. *Biomaterials*, 62, 164-175.
- Pati, F., Jang, J., Ha, D. H., Kim, S. W., Rhie, J. W., Shim, J. H., ... & Cho, D. W. (2014). Printing three-dimensional tissue analogues with decellularized extracellular matrix bioink. *Nature Communications*, 5(1), 1-11.
- Pepelanova, I., Kruppa, K., Scheper, T., & Lavrentieva, A. (2018). Gelatin-methacryloyl (GelMA) hydrogels with defined degree of functionalization as a versatile toolkit for 3D cell culture and extrusion bioprinting. *Bioengineering*, 5(3), 55.
- Sarkar, J., Kamble, S.C., Kashikar, N.C. (2021). Polymeric Bioinks for 3D Hepatic Printing. *Chemistry*, 3(1), 164-181.
- Sarkar, J., Kamble, S.C., Patil, R., Kumar, A., Gosavi, S.W. (2020). Gelatin Interpenetration in Poly N-isopropylacrylamide Network Reduces the Compressive Modulus of the Scaffold: A Property Employed to Mimic Hepatic Matrix Stiffness. *Biotechnology and Bioengineering*, 117, 567–579.
- Stanton, M. M., Samitier, J., & Sanchez, S. (2015). Bioprinting of 3D hydrogels. *Lab on a Chip*, 15(15), 3111-3115.
- Strateffeffen, H., Köpf, M., Kreimendahl, F., Blaeser, A., Jockenhoel, S., & Fischer, H. (2017). GelMA-collagen blends enable drop-on-demand 3D printability and promote angiogenesis. *Biofabrication*, 9(4), 045002.
- Tamay, D. G., Dursun Usal, T., Alagoz, A. S., Yucel, D., Hasirci, N., & Hasirci, V. (2019). 3D and 4D printing of polymers for tissue engineering applications. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 7, 164.
- Turner, R., Lozoya, O., Wang, Y., Cardinale, V., Gaudio, E., Alpini, G., ... & Reid, L. M. (2011). Human hepatic stem cell and maturational liver lineage biology. *Hepatology*, 53(3), 1035-1045.
- Wang, X. (2019a). Advanced polymers for three-dimensional (3D) organ bioprinting. *Micromachines*, 10(12), 814.
- Wang, X. (2019b). Bioartificial organ manufacturing technologies. *Cell Transplantation*, 28(1), 5-17.
- Wang, X., Rijff, B. L., & Khang, G. (2017). A building-block approach to 3D printing a multichannel, organ-regenerative scaffold. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 11(5), 1403-1411.
- Wang, X., Yu, X., Yan, Y., & Zhang, R. (2008). Liver tissue responses to gelatin and gelatin/chitosan gels. *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, 87(1), 62-68.
- Wang, Y., Di Wu, G. W., Wu, J., Lu, S., Lo, J., He, Y., ... & Wang, S. (2020). Metastasis-on-a-chip mimicking the progression of kidney cancer in the liver for predicting treatment efficacy. *Theranostics*, 10(1), 300-311.
- Wang, Z., Abdulla, R., Parker, B., Samanipour, R., Ghosh, S., & Kim, K. (2015). A simple and high-resolution stereolithography-based 3D bioprinting system using visible light crosslinkable bioinks. *Biofabrication*, 7(4), 045009.
- Wang, Z., Kumar, H., Tian, Z., Jin, X., Holzman, J. F., Menard, F., & Kim, K. (2018). Visible light photoinitiation of cell-adhesive gelatin methacryloyl hydrogels for stereolithography 3D bioprinting. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 10(32), 26859-26869.
- Wells, R. G. (2008). Cellular sources of extracellular matrix in hepatic fibrosis. *Clinics in Liver Disease*, 12(4), 759-768.
- Wu, Y., Lin, Z. Y. W., Wenger, A. C., Tam, K. C., & Tang, X. S. (2018). 3D bioprinting of liver-mimetic construct with alginate/cellulose nanocrystal hybrid bioink. *Bioprinting*, 9, 1-6.
- Wu, Y., Wenger, A., Golzar, H., & Tang, X. S. (2020). 3D bioprinting of bicellular liver lobule-mimetic structures via microextrusion of cellulose nanocrystal-incorporated shear-thinning bioink. *Scientific Reports*, 10(1), 1-12.
- Xiao, W., He, J., Nichol, J. W., Wang, L., Hutson, C. B., Wang, B., ... & Khademhosseini, A. (2011). Synthesis and characterization of photocrosslinkable gelatin and silk fibroin interpenetrating polymer network hydrogels. *Acta Biomaterialia*, 7(6), 2384-2393.
- Xie, F., Sun, L., Pang, Y., Xu, G., Jin, B., Xu, H., ... & Mao, Y. (2021). Three-dimensional bio-printing of primary human hepatocellular carcinoma for personalized medicine. *Biomaterials*, 265, 120416.
- Yang, X., Lu, Z., Wu, H., Li, W., Zheng, L., & Zhao, J. (2018). Collagen-alginate as bioink for three-dimensional (3D) cell printing based cartilage tissue engineering. *Materials Science and Engineering: C*, 83, 195-201.
- Yue, K., Trujillo-de Santiago, G., Alvarez, M. M., Tamayol, A., Annabi, N., & Khademhosseini, A. (2015). Synthesis, properties, and biomedical applications of gelatin methacryloyl (GelMA) hydrogels. *Biomaterials*, 73, 254-271.

Cite as/Atıf şekli: Demirel, G. (2021). Karaciğer hücreleri ve organoidlerin üç boyutlu kültürlerinde kullanılmak üzere geliştirilmiş biyomalzemeler. *Front Life Sci RT*, 2(3), 111-119.