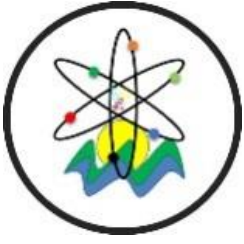


Black Sea Journal of Engineering and Science





**BLACK SEA JOURNAL OF ENGINEERING AND SCIENCE
(BSJ ENGIN SCI)**



Black Sea Journal of Engineering and Science (BSJ Eng Sci) is a double-blind peer-reviewed, open-access international journal published electronically 4 times (January, April, July and October) in a year by since January 2018. It publishes, in English and Turkish, full-length original research articles, innovative papers, conference papers, reviews, mini-reviews, rapid communications or technical note on advances in a wide range of scientific disciplines from all fields of engineering and science and from any source.

ISSN 2619 - 8991

Phone: +90 362 408 25 15

Fax: +90 362 408 25 15

Email: bsjsci@blackseapublishers.com

Web site: <http://dergipark.gov.tr/bsengineering>

Sort of publication: Periodically 4 times (January, April, July and October) in a year

Publication date and place: July 01, 2022 - Samsun, TURKEY

Publishing kind: Electronically

OWNER

Assoc. Prof. Uğur ŞEN

DIRECTOR IN CHARGE

Prof. Dr. Hasan ÖNDER

EDITOR BOARDS

EDITOR IN CHIEF

Prof. Dr. Hasan ÖNDER, Ondokuz Mayıs University, TURKEY

Assoc. Prof. Uğur ŞEN Ondokuz, Mayıs University, TURKEY

SECTION EDITORS*

Prof. Dr. Erkan YALÇIN, Ondokuz Mayıs University, TURKEY

Prof. Dr. Hasan TANAK, Amasya University, TURKEY

Prof. Dr. Hasan TEMİZ, Ondokuz Mayıs University, TURKEY

Prof. Dr. Mustafa ŞAHİN, Kahramanmaraş Sutcu Imam University, TURKEY

Prof. Dr. Berna KILIÇ, Ege University, TURKEY

Assoc. Prof. Dr. Kadyrbay CHEKİROV, Kyrgyz Turkish Manas University, KYRGYZSTAN

Assoc. Prof. Dr. Özgür Hakan AYDOĞMUŞ, Social Sciences University of Ankara, TURKEY

Assoc. Prof. Dr. Roswanira Binti AB WAHAB, University of Technology, MALAYSIA

Asst. Prof. Dr. Sedat KARADAVUT, Trakya University, TURKEY

* The ranking is arranged alphabetically within the academic title

EDITORIAL - ADVISORY BOARD*

Prof. Dr. Aglaia (Litsa) LIOPA-TSAKALIDI, Institute of Western Greece, GREECE

Prof. Dr. Ercan EFE, Kahramanmaraş Sutcu Imam University, TURKEY

Prof. Dr. Mohammad Masood TARIQ, University of Balochistan, PAKISTAN

Prof. Dr. Mustafa Çağatay TUFAN, Ondokuz Mayıs University, TURKEY

Prof. Dr. Özkan GÖRGÜLÜ, Ahi Evran University, TURKEY

Assoc. Prof. Dr. Taner TUNÇ, Ondokuz Mayıs University, TURKEY

Asst. Prof. Dr. Emil OMURZAK, Kyrgyz-Turkish Manas University, KYRGYZSTAN

Asst. Prof. Dr. Yılmaz KAYA, Ondokuz Mayıs University, TURKEY

* The ranking is arranged alphabetically within the academic title

STATISTIC EDITOR

Prof. Dr. Mehmet TOPAL, Kastamonu University, Turkey

ENGLISH EDITOR

Asst. Prof. Dr. Betül ÖZCAN DOST, Ondokuz Mayıs University, TURKEY

TURKISH EDITOR

Prof. Dr. Serkan ŞEN, Ondokuz Mayıs University, TURKEY

REVIEWERS OF THE ISSUE*

Prof. Dr. Ali ÇELİK, Aydın Adnan Menderes University, TÜRKİYE

Prof. Dr. Cihan DARCAN, Bilecik Seyh Edebali University, TÜRKİYE

Assoc. Prof. Dr. B. Devrim ÖZCAN, Çukurova University, TÜRKİYE

Assist. Prof. Dr. Aziz Cumhur KOCALAR, Niğde Ömer Halisdemir University, TÜRKİYE

Assist. Prof. Dr. Fahriye ZEMHERİ NAVRUZ, Bartın University, TÜRKİYE

Assist. Prof. Dr. Mediha Demet OKUDAN ALTINDAŞ, Health Science University, TÜRKİYE

Assist. Prof. Dr. Merve KESKİN, Nevşehir Hacı Bektaş Veli University, TÜRKİYE

Assist. Prof. Dr. Muhammed Fatih CAN, Gazi University, TÜRKİYE

Assist. Prof. Dr. Umut KÖKBAŞ, Nevşehir Hacı Bektaş Veli University, TÜRKİYE

Assist. Prof. Dr. Yeliz GENÇ BEKİROĞLU, Ondokuz Mayıs University, TÜRKİYE

Dr. Arda ACEMİ, Kocaeli University, TÜRKİYE

Dr. Onur GÜLER, Karadeniz Technical University, TÜRKİYE

Dr. Özlem AKSOY, Liv Hospital, TÜRKİYE

* The ranking is arranged alphabetically within the academic title


Table of Contents

Research Article

1. CREATING A BASIC LEVEL DIGITAL HEIGHT MODEL WITH UNMANNED AERIAL VEHICLE IN ORE FIELDS, HARPUT EXAMPLE 

(Cevher sahalarında insansız hava aracı ile temel düzeyde sayısal yükseklik modeli oluşturma, Harput örneği)

Selim TAŞKAYA.....87-97

2. ANTIOXIDANT AND ANTIMICROBIAL ACTIVITIES OF EXTRACTS OBTAINED FROM DIFFERENT ORGANS OF *HELIOTROPIMUM MYOSOTOIDES* AND *HELIOTROPIMUM SUAVEOLENS* (BORAGINACEAE) 

(*Heliotropium myosotoides* ve *heliotropium suaveolens* (boraginaceae)'in farklı organlarından elde edilen ekstraktların antioksidan ve antimikrobiyal aktiviteleri)

Nezahat KANDEMİR, Şevket KANDEMİR, Emine ÇELİKOĞLU, Umut ÇELİKOĞLU, Önder İDİL.....98-108

3. HAZARD IDENTIFICATION AND RISK ANALYSIS IN REBAR ROLLING PLANT 

(İnşaat haddeleme tesisinde tehlike tanımı ve risk analizi)

Ayşenur USLU, Gül USLU.....109-115

4. PHYLOGENETIC RELATIONSHIP WITHIN THE GENUS *CARCHARHINUS* ON THE BASIS OF LEMON SHARK (*N. BREVIROSTRIS*) POSITION 

(*Carcharhinus* cinsinden limon köpekbalığının (*N. Brevirostris*) konumuna göre filogenetik ilişkisi)

Mine DOSAY AKBULUT.....116-123

Review Article

5. SINGLE-CELL C_4 PHOTOSYNTHESIS 

(Tek hücre C_4 fotosentezi)

Buse ÇÖKMEZ, Yasemin ÖZDENER KÖMPE, Fazıl ÖZEN.....124-129

6. BIOCHEMICAL FUNCTIONS OF NESFATIN-1 

(Nesfatin-1'in biyokimyasal fonksiyonları)

Nedim Murat YAVUZ.....130-136



CEVHER SAHALARINDA İNSANSIZ HAVA ARACI İLE TEMEL DÜZEYDE SAYISAL YÜKSEKLİK MODELİ OLUŞTURMA, HARPUT ÖRNEĞİ

Selim TAŞKAYA^{1*}

¹Artvin Çoruh Üniversitesi, Artvin Meslek Yüksek Okulu, Mimarlık ve Şehir Planlama Bölümü, 08200, Artvin, Türkiye

Özet: İHA (İnsansız Hava Aracı), ilerleyen teknolojiyle beraber özellikle inşaat, maden ve haritacılık sektöründe de yerini almıştır. Zaman, iş gücü ve maliyet gibi parametrelerin külfetini en aza indirmesine yol açmıştır. İHA görüntülerinden ilgili alanının konum koordinatları ile beraber Z adı verilen yüksekliklerin farkından dengeleme sayesinde üzerinde uçuş yapılan bölgenin üç boyutlu modellenmesi, eğim ve kübaj (hacim) hesaplarına erişmek son derece kolay olmaktadır. Açık maden ocak sahalarında olası hacim hesapları da İHA fotogrametrisi ile mümkündür. Çalışmamız, Elazığ İli Harput Mahallesi Alayaprak denilen mevki de seramik işlerinde kullanılmak üzere çıkarılan kırmızı toprak cevherinin sayısal yükseklik modeli oluşturulmaya çalışıldı. Basit düzeyde SYM(Sayısal Yükseklik Modeli) oluşumu hakkında irdeleme yapıldı. Toplam, 20 yer kontrol noktasından öncelikle RTK (Gerçek Zamanlı Kinematik) yersel ölçümle noktalarının koordinatları belirlendi. Sonra 45 metre yükseklikten irtifa alınarak RTK sız bir İHA ile kolonlar taranarak karesel ortalama sapmaları değerlendirildi. Ortalama dengeleme ile 17443.839 nokta elde edilerek nokta bulutu oluşturularak DEM (Digital Yükseklik Modeli) verisi elde edildi. Yer ölçek aralığı 4,78 cm/piksel alınarak ne kadar metre küp cevher olabilirliği araştırıldı.

Anahtar kelimeler: İHA (İnsansız hava aracı), Cevher sahası, Sayısal yükseklik modeli


Creating a Basic Level Digital Height Model with Unmanned Aerial Vehicle in Ore Fields, Harput Example

Abstract: UAV (Unmanned Aerial Vehicle) has taken its place especially in the construction, mining and cartography sectors with the advancing technology. It has led to the minimization of the burden of parameters such as time, labor and cost. It is extremely easy to access the three-dimensional modeling, slope and cubage (volume) calculations of the region on which the flight is made, thanks to the balancing from the location coordinates of the relevant area from the UAV images, as well as the difference of the heights called Z. Possible volume calculations in open mining sites are also possible with UAV photogrammetry. In our study, it was tried to create a numerical elevation model of the red soil ore extracted to be used in ceramic works in the location called Alayaprak in the Harput District of Elazığ. A discussion was made about the formation of DEM (Digital Elevation Model) at a simple level. First of all, the coordinates of the points were determined by RTK (Real Time Kinematics) ground measurement from a total of 20 ground control points. Then, by taking an altitude of 45 meters, the columns were scanned with a UAV without RTK and their mean square deviations were evaluated. DEM (Digital Elevation Model) data was obtained by creating a point cloud by obtaining 17443.839 points with average balancing. By taking the ground measure range of 4.78 cm/pixel, the possibility of how many cubic meters of ore was investigated.

Keywords: UAV (Unmanned aerial vehicle), Ore field, Digital elevation model

*Sorumlu yazar (Corresponding author): Artvin Çoruh Üniversitesi, Artvin Meslek Yüksek Okulu, Mimarlık ve Şehir Planlama Bölümü, 08200, Artvin, Türkiye

E mail: selim_taskaya@artvin.edu.tr (S. TAŞKAYA)

Selim TAŞKAYA  <https://orcid.org/0000-0002-4290-3684>

Gönderi: 10 Şubat 2022

Kabul: 06 Nisan 2022

Yayınlanma: 01 Temmuz 2022

Received: February 10, 2022

Accepted: April 06, 2022

Published: July 01, 2022

Cite as: Taşkaya S. 2022. Creating a basic level digital height model with UAV in ore fields, Harput example. BSJ Eng Sci, 5(3): 87-97.

1. Giriş

Gelişen teknolojiye paralel olarak, son yıllarda Global Positioning System (GPS), ve çözünürlüğü yüksek kameralar entegre edilerek kullanılmaya başlanan İHA'lar, uzaktan algılama (UA), sayısal harita üretimi ve fotogrametri amaçlı bilimsel çalışmalarda da kullanılmaya başlanmıştır (Öztürk ve ark., 2017).

İHA sistemleri ile harita yapımı yersel yöntemler ve havadan harita yapımı yöntemleri arasında bütünleştirilmiş bir yöntemdir (Çallı, 2021). Detay alımını gerektiren bütün ölçü ekipmanları uydu veya uçaktan farklı olarak düşük irtifada uçan İHA'lara entegre edilmektedir. Konumsal verilerin tamamı yer kontrol

noktaları hariç olmak üzere güvenli bir şekilde havadan gerçekleştirilmektedir (Ağca ve ark., 2020). Uydu ve insanlı hava araçları ile 20-50 cm/pixel bandında yüksek çözünürlükte konumsal veriler elde edilebilmesine karşın İHA'lar daha düşük irtifalardan uçabildikleri için 1 cm/pixel yüksek çözünürlükte veri elde edebilmek mümkündür (Çallı, 2021).

Uzaktan algılanan görüntülerin geometrik düzeltmesindeki YKN (Yer Kontrol Noktaları) seçimi ile örnekleme tasarımının ilişkisini araştırmak amacıyla hem bir simülasyon deneyi hem de gerçek görüntü analizleri gerçekleştirmiştir. Çalışmada basit rastgele örnekleme, uzaysal kapsama örnekleme ve evrensel



kriging model tabanlı örnekleme karşılaştırılmıştır (Wang ve ark., 2012). Sonuçlar, örnekleme tasarımının YKN'lerdeki geometrik düzeltmenin doğruluğunu güçlü bir şekilde etkilediğini göstermektedir. Ayrıca çalışmaya göre evrensel kriging model tabanlı örnekleme YKN optimizasyonu, hem simülasyon hem de gerçek görüntü deneylerinde en iyi sonucu ortaya koymuştur. Bu sonuçlara ek olarak çalışmada, YKN'lerin daha dağınık olmasının geometrik düzeltme doğruluğunu artırdığı belirtilmiştir (Çallı, 2021).

İnsansız hava aracı ile yapılan fotogrametrik çalışmalar sonucu elde edilen fotoğraflar ile yapılan değerlendirme sonucunda, kazı-dolgu ve kübaj hesaplarında, arazi ve saha çalışmalarının izlenmesinde ve doğruluğunun mühendislik projelerinde kullanılabilirliği araştırılmıştır. Değerleme sonucunda üretilen ortofoto, sayısal yüzey modeli (SYM), SAM 5 santimetre çözünürlüğündedir (Gençerk, 2016).

Sonuç ürünleri üzerinde kübaj hesabı çıkarımı, en kesit-boy kesit alımı ve analizi ile maliyet, zaman ve doğruluk açısından değerlendirerek mühendislik projelerinde kullanılabilirliğini göstermiştir (Numan, 2020).

İHA'lar farklı mühendislik alanlarındaki uygulamaları üzerinde çalışmalar yapmıştır. Beş farklı uygulamada yapılan çalışmalar sonucunda İHA'nın kullanılabilirliği ve sonuç ürünleri açısından değerlendirilebilirliği karşılaştırılmıştır. Birinci uygulamada mühendislik projelerinde kullanılmak üzere hali hazır haritaların yapımında doğruluk analizleri irdelenmiştir. İkinci uygulamada bir alanın hacim hesabı yapılarak doğruluk analizi yapılmıştır. Üçüncü ve dördüncü uygulamalarda arkeolojik çalışmalar ve kültürel mirasın belgelenmesi açısından doğruluk analizleri yapılmıştır. Beşinci uygulamada ise İHA'dan elde edilmiş görüntülerden fotogrametrik değerlendirme programları yardımı ile üretilen ortofotonun doğruluk analizi yapılmıştır. Bu uygulamalar sonucunda İHA'nın Büyük Ölçekli Harita ve Harita Bilgileri Üretim Yönetmeliğinde belirtilen hassasiyet ve doğrulukta veriler üretilmiştir (Toprak, 2014).

Jeobilimde önemli bir uygulama olan yüksek çözünürlüklü topografya (HRT) verilerinin üretilmesi (yani, nokta bulutlar, dijital yüzey modelleri - DSM'ler - veya dijital yükseklik modelleri - DEM'ler) 2-boyutlu görüntülerin kullanılması, hareket yapısından (SfM) ve çoklu görüş stereo (MVS) fotogrametrisinin kullanılması önemli hal almıştır (James ve Robson, 2012; Eltner ve ark., 2016).

2. Teorik Çerçeve ve Kapsam

Teknolojinin günümüz hayatına kattığı birçok yenilik bulunmaktadır. Bu yeniliğin en popüler olanlarından biri insansız hava araçları (İHA)'dır. İHA'lar insan hayatı için az risk taşımaları ve özel görevleri yerine getirebilmeleri nedeniyle askeri veya sivil bütün kullanıcı kesimine hitap etmektedir. Dolayısıyla, İHA'ların kullanımı yaygınlaşmış ve farklı amaçlara hizmet etmeye başlamışlardır. İHA'ların yaygınlaşmasıyla birlikte birçok tasarımcı ve araştırmacı bu konuya yönelmiştir. Bunun sonucunda,

askeri ve sivil havacılık kullanımı için birçok hava araçları tasarlanmıştır. İHA'larda askeri amaçlı kullanım alanları; savunma, haritalama ve saldırı vb. iken, sivil amaçlı kullanım alanları; tarım arazileri ilaçlamada, acil durumlarda arama ve kurtarma, trafik kontrolü, yük nakliye, yangın söndürme vb. gibidir. Bu uygulama alanlarının günümüzde en yaygın olanları; kargo taşıma, haritalandırma, savunma, trafik denetimi ve film sektörüdür (Austin, 2010; Bilgin, 2021). Günümüzdeki teknolojik gelişmeler İHA'lar üzerine yapılan çalışmaları artırmış ve İHA'ları popüler bir mühendislik uygulama sahası haline getirmiştir. İHA'lar meteoroloji, havadan mayın tespiti, dijital haritalama, elektronik harp, radar doygunluk ve karıştırma, kurtarma, havadan fotoğraf ve video çekimi, trafik gözetleme, küçük paket taşıma, bilimsel araştırmalar vb. birçok askeri ve sivil uygulamalar ile günlük hayattaki durumların gözlem ve analizini hızlı ve güvenli bir şekilde gerçekleştirmektedir (Austin, 2010; Akyürek ve ark., 2012; Bilgin, 2021). İHA'lar ile ilgili farklı pek çok sınıflandırma mevcuttur. Bu sınıflandırma türlerine göre bir İHA birden fazla sınıflama modeli içinde bulunabildiği gibi aynı sınıflandırma modeli içerisinde birden fazla kategoriye ait özellikleri de içerisinde barındırabilmektedir. Bu sınıflamalar büyüklük, irtifa, uçuş süresi, faydalı yük kapasitesi, faydalı yük türü, yakıt türü, kullanım amacı ve komuta biçimi gibi farklı modeller ile ayrılmaktadır. Ülkemizde İHA sınıflandırılmasında temel kriter irtifa iken NATO ve AB ülkelerinde İHA'nın ağırlığına göre sınıflandırılmaktadır (Bilgin, 2021). İnsansız Hava Aracı (İHA); içinde aracı kontrol eden bir pilotun veya herhangi bir canlının olmadığı, sadece kullanıldığı işleve uygun kamera, fotoğraf makinesi, lazer tarama makinesi veya GNSS gibi ekipmanların kullanıldığı bir çeşit uçaktır. Uçağın yönetimi uzaktan kumanda veya otomatik olarak sağlanmaktadır. İHA'ların askeri, sivil (hobi ve ticari) ve bilimsel amaçlı kullanımları günden güne yaygınlaşmasından dolayı bu konunun gelecekte iyi bir yer edineceği söz konusu olmaktadır. Bu ilginin başlıca temel nedenleri arasında sivil amaçlı İHA'ların çok geniş kullanım alanlarının olması kadar yüksek doğruluk, zaman ve maliyet tasarrufunun elde edilmesi de bu nedenler arasında dâhil edilebilir (Konar, 2020; Bilgin, 2021). İnsansız hava araçları, uçuş esnasında içerisinde pilot olmayan, uzaktan komuta ya da kendi taşıdıkları denetleyicilerle kontrol edilebilen hava araçlarıdır.

İHA'lar farklı amaçlar için tasarlanmakta ve üretilmektedir. Kullanım amacına yönelik olarak farklı İHA modelleri günümüzde pek çok sektörde kullanılmaktadır. Farklı model İHA'ların ortaya çıkmasında en önemli unsurlar maliyet ve kullanım amacına yönelik gereksinimlerdir. Bu nedenle İHA'lar uçuş prensiplerine göre sabit kanatlı ve döner kanatlı olarak üretilmektedir. Ayrıca son yıllarda gelişmekte olan hibrit tip İHA'lar hem döner kanatlı hem de sabit kanatlı İHA'ların özelliklerine sahip olduğu için farklı bir sınıf olarak incelenir (Macheret ve ark., 2011). Bilişim alanındaki teknolojik yenilikler, yapay zekâ ve ileri

mühendislik disiplinlerinde yaşanan hızlı gelişmeler, insansız sistemlerin ilerlemesinde basamak taşı olmuştur. Böylece bu sistemler 21. yüzyılda yoğun biçimde askeri ve sivil alanlarda kullanılmaya başlanmıştır. Bu araçlar içinde en çok kullanılan ve gelişen araçlar ise İHA sistemleridir. Bu araçlar başlangıçta farklı görevlere yönelik olarak askeri alanlarda sıklıkla kullanılmıştır. Ancak geçtiğimiz 20 yılda sivil pek çok alanda başarılı olarak kullanılmıştır. Her geçen gün yeni beceri ve kabiliyetler kazanan İHA'lar, yangın söndürme, haritalama, tarımsal ilaçlama, havadan video çekimleri ve kargo taşımacılığı gibi alanlarda yaygın olarak kullanılmaktadır (URL-1; Bilgin, 2021). Döner kanatlı İHA'lar farklı boyut ve özelliklerde tasarlanabilmektedir. Tek rotorlu helikopterler ile birlikte üç, dört, altı ve sekiz rotorlu konfigürasyonları en çok kullanılan döner kanatlı İHA türleridir. Döner kanatlı İHA modellerinin avantajları olduğu gibi birçok dezavantajları da mevcuttur. Fakat döner kanat yapısının dikey iniş kalkış yapabilme, havada askıda kalabilme ve düşük hızda uçuş yapabilme, küçük boyutları ve daha iyi manevra kabiliyeti olması nedeniyle sabit kanatlı İHA'lara göre daha avantajlıdır. Farklı döner kanatlı İHA'lar günümüzde askeri amaçlarla birlikte sivil alanlarda da kullanılmaktadır. Bu sivil alanların başında yüksek gerilim hatları denetiminde, sınır güvenliği için devriyelerde, arama-kurtarma faaliyetlerinde, petrol ve doğalgaz aramalarında, yangın takibi ve söndürme işlemlerinde, topografya ve tarımsal faaliyetlerde sıklıkla kullanılmaktadır (Şengül, 2016; Bilgin, 2021).

3. Materyal ve Yöntem

Temel nokta için ölçek değişmez özellik dönüşümü (SIFT) operatörünü uygulandı. Fotoğraflardan 3B nokta bulutları oluşturmak için algılama, belli araştırmalar, bu operatörün en güçlü ve en sağlamlardan biri olduğu sonucuna vardı. Görüntü varyasyonları (Remondino ve El-Hakim, 2006; Juan ve Gwun, 2009). Titizlik gerektiren klasik hava fotogrametrisinin aksine, kameraların uçuş planlaması ve ön kalibrasyonu (Kamal ve Samar, 2008), SfM süreçte basitlik sağlıyor, kameraların ayrıntılı planlaması veya kalibrasyonundan, görüntüler farklı olsa bile farklı kameralardan kullanılabilir. SfM algoritmasından türetilen kamera konumları, Yer kontrol koordinatlarının sağladığı ölçek ve yönlendirme puanıdır (GCP'ler). Georeferencing bu modelin genellikle az sayıda kullanarak gerçekleştirilir. GCP'ler fotoğrafların hem yerde hem de her yerde net bir şekilde görülebilen yerlerde bulunur (Martínez-Carricondo ve ark., 2018). Elde edilen ürünler ihraç edildikten sonra, fotogrametrik projede elde edilen doğruluğu değerlendirir. Doğruluk değerlendirmesi genellikle istatistiksel ortalamaya dayanır. Son yıllarda çok sayıda çalışma yapılmıştır. İHA tarafından elde edilen ürünlerin doğruluğunu değerlendirmeye yönelik fotogrametride en iyi hesaplama yöntemi karesel ortalama hata (RMSE) dengelemesidir. Birçok yazar kesin etkilerini araştırmıştır. Uçuş rakımı, arazi morfolojisi ve Dijital

Yüzey Modelinde (DSM) bulunan GCP sayısı ve ortofoto doğruluğu gibi parametreler, ortaya çıkan ürünlerin doğruluğuna sahiptir (Aguera-Vega ve ark. 2016).

Buradan hareketle yer kontrol noktalarından kesin olarak nokta koordinatları değeri bulunan noktalar üzerine İHA gönderilmek suretiyle alınan görüntüler işlenerek görüntülerden elde edilen, hesaplanan koordinatların farkının karesel ortalama hataları (Denklem 1, 2 ve 3) (Martínez-Carricondo ve ark, 2018) giderildikten sonra SYM adını verdiğimiz digital yükseklik belirleme işlemi ile Z kot farklarından da ilgili bölgede kübaj (hacim) hesaplanması yapılabilir.

$$RMSE_x = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_{Oi} - X_{GNSSi})^2}{n}} \quad (1)$$

$$RMSE_y = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (Y_{Oi} - Y_{GNSSi})^2}{n}} \quad (2)$$

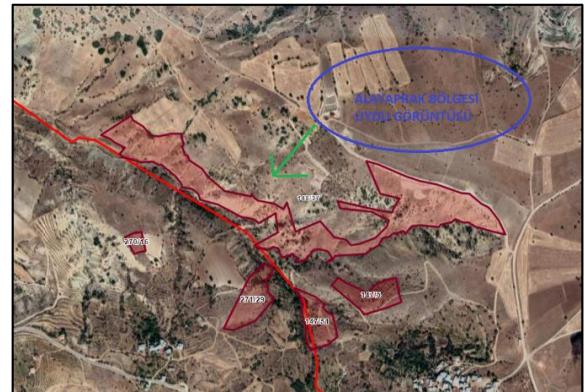
$$RMSE_{xy} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n [(X_{Oi} - X_{GNSSi})^2 + (Y_{Oi} - Y_{GNSSi})^2]}{n}} \quad (3)$$

Y-X koordinatları ve Z kot farkları aynı bu aradan dengelemesi yapılarak yaklaşık değeri bulunur. Sayısal yükseklik modeli bu şekilde hareketle belirlenir.

4. Bulgular ve Tartışma

Çalışma alanı olarak Elazığ İlinin kuzey bölgesinde bulunan Harput Mahallesi Alayaprak mevki seçilmiştir. Burada özellikle seramik alanında ham madde olarak iş görebilecek nitelikte kırmızı toprak cevheri mevcuttur. Amaç olarak en kısa şekilde bu bölgede bulunması olası cevher miktarının yaklaşık kestirimini hesaplayabilmektir.

Şekil 1'de Alayaprak bölgesinde yer alan kırmızı toprak alanının görüntüsünden dağınık şekilde birden fazla parsel şeklinde cevherin yer aldığı gözükmemektedir. Sonra bu bölgede öncelikle homojen şekilde 20 adet yer kontrol noktası belirlenip arazi üzerine aplikesi yapıldı



Şekil 1. Alayaprak bölgesi parsel sorgu görüntüsü (URL-2).

Yer Kontrol Noktaları aynen Şekil 2'de görüldüğü cevher bölgesini içerisine alacak şekilde şevin bitim noktalarına yol kenarlarına tepe kameradan bakılınca görülecek şekilde döşendi.



Şekil 2. YKN işaretlerinin arazideki görünümü.

Tablo 1’de de görüleceği üzere İHA ortofoto görüntülerinin enine ve boyuna bindirme oranları %70 ve %60 şeklinde belirlenerek bölge üzerinde otomat olarak İHA 45 metre irtifadan uçurularak 189 adet fotoğraf elde edildi.

Tablo 1. Uçuşa ait bilgiler

Uçuş bilgileri	Değerler
Enine Bindirme Oranı (%)	70
Boyuna Bindirme Oranı (%)	60
Uçuş Yüksekliği (m)	45
Çekilen Fotoğraf Sayısı (adet)	189

Tablo 2’de yer kontrol noktaları RTK (Gerçek Zamanlı Kinematik) adı verilen yersel ölçü sistemi ile ölçülerek homojen şekilde yerleri belirlenen noktaların Elazığ İl orta meridyeni girilerek Y-X konum koordinatları ve Z kot farkları belirlendi.

Tablo 2. Yer kontrol noktalarının koordinatları

Nokta Numarası	Y (Sağ Değer)	X (Yukarı Değer)	Z (Yükseklik)
1	544861,103	4265912,561	1252,807
2	544861,687	4265979,452	1248,745
3	545069,482	4265830,752	1263,916
4	545162,381	4265684,089	1275,329
5	544766,791	4265828,857	1261,502
6	544720,556	4265885,660	1265,103
7	544780,494	4265723,773	1279,421
8	544903,918	4265710,450	1200,693
9	545021,581	4265941,552	1242,365
10	544937,412	4266171,111	1223,125
11	544763,513	4268825,445	1292,512
12	544662,623	4267722,566	1268,842
13	544789,136	4267982,986	1245,452
14	544563,233	4268762,197	1253,645
15	544231,965	4269512,598	1264,847
16	544989,566	4268872,598	1254,322
17	544976,233	4267921,486	1278,634
18	544785,644	4265524,589	1230,632
19	544567,522	4265752,276	1230,556
20	544786,563	4263772,816	1254,222

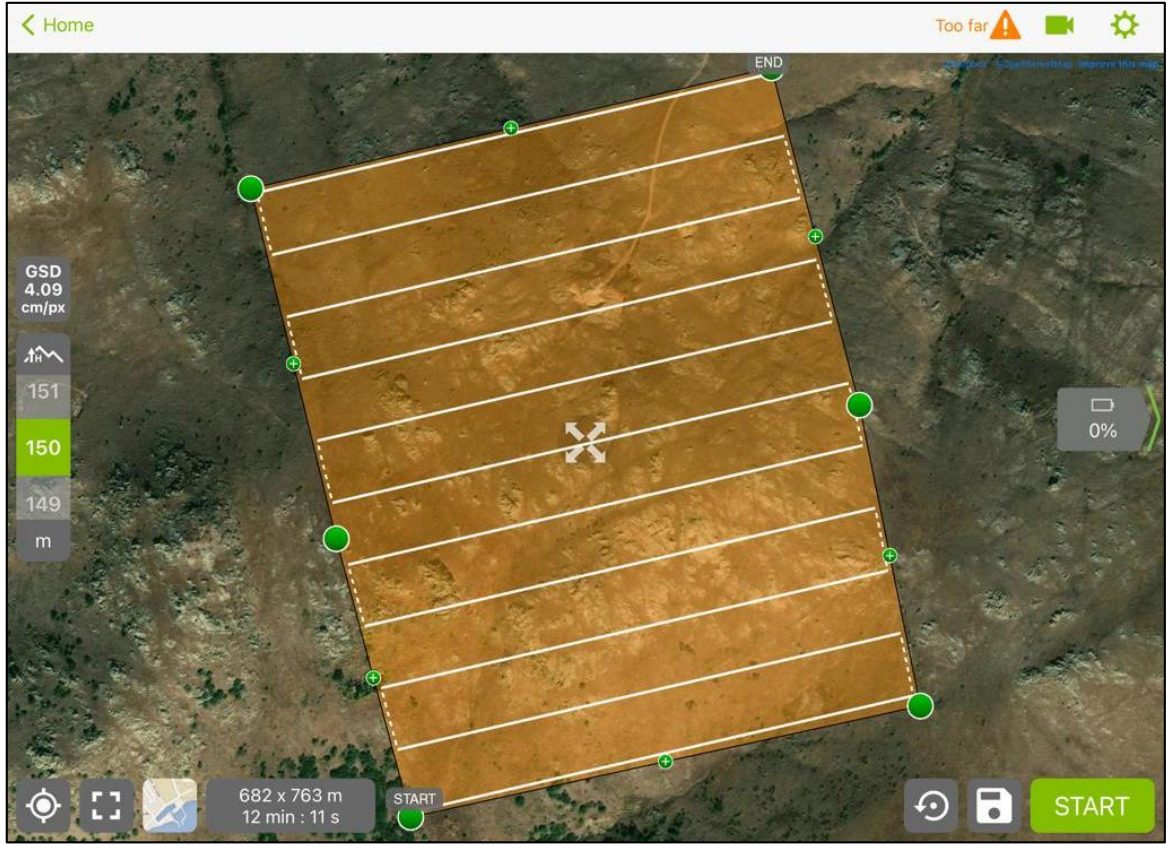
Şekil 3’de 20 nokta üzerinde RTK’sı olmayan yani aynı anda sadece uçuş esnasında fotoğraf görüntüleri alabilen İHA dan güneybatı istikametinden uçuşla ileri geri dikdörtgen şeklinde kolonlar meydana getirerek görevini yapmış şekilde 45 metre irtifadan yerine göre eğimin doğrultusunda azalma veya artma yaparak başladığı noktaya gelmiştir.

Şekil 4 ve Şekil 5’de oluşturulan uçuş planı neticesinde Pix4DCapture, GoogleEarth ve Netcad 8 programlarında oluşturulan uçuş güzergâhları verilmiştir. Cevher sahasında %70 boyuna, %60 enine bindirme oranlarında alınan görüntüler Workflow > Add Photos komutu ile programa aktarılmıştır. Bu aşamada eklenen fotoğraflara Elazığ dilim orta meridyenine ait (TUREF / TM33) koordinat sistemi tanımlanmıştır. Import > Reference

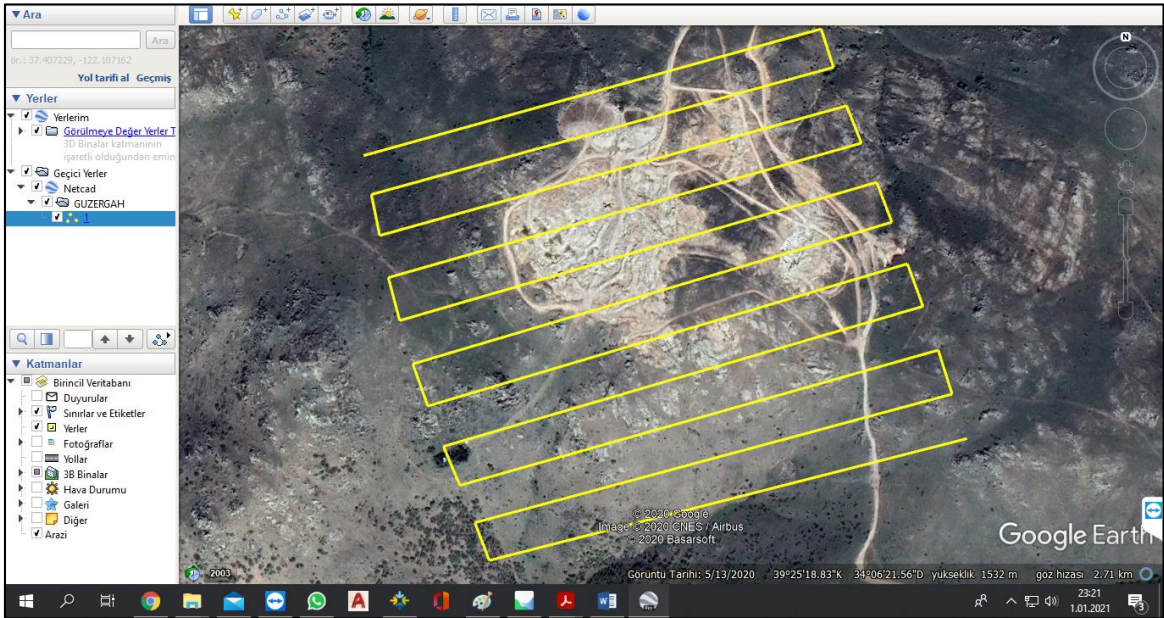
komutu ile YKN’ a ait koordinatlar projeye aktarılmıştır. Projeye eklenen yer kontrol noktalarını Şekil 6’da verilmiştir. Mevcut noktaların saha üzerindeki dağılımı ise Şekil 7’de gösterilmiştir.

Şekil 7’de, Workflow > Align Photos ile fotoğrafların birbirine hizalama işlemi yapılır. Burada oluşan hizalı fotoğraflardan Tie Points (bağlantı noktaları) oluşturulur. Yer Kontrol Noktalarının eşleme işlemi fotoğraflar üzerinden yapılır. Ardından Nokta bulutu oluşturmak için Workflow > Build Dense Cloud komutu izlenir.

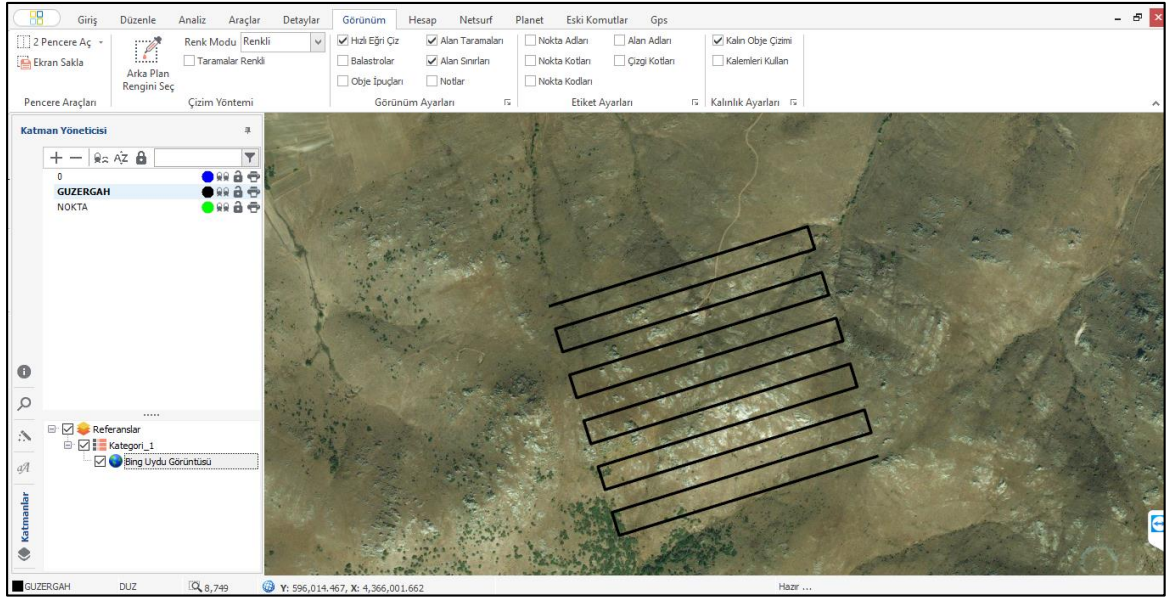
Tablo 3’de ise, görüntülerin programa aktarılması ile birlikte karesel ortalama hata dengelemelerinden $m_y = +/-1,89$, $m_x = +/-2,12$ ve $m_z = +/-0,089$ parametreleri elde edilmiştir.



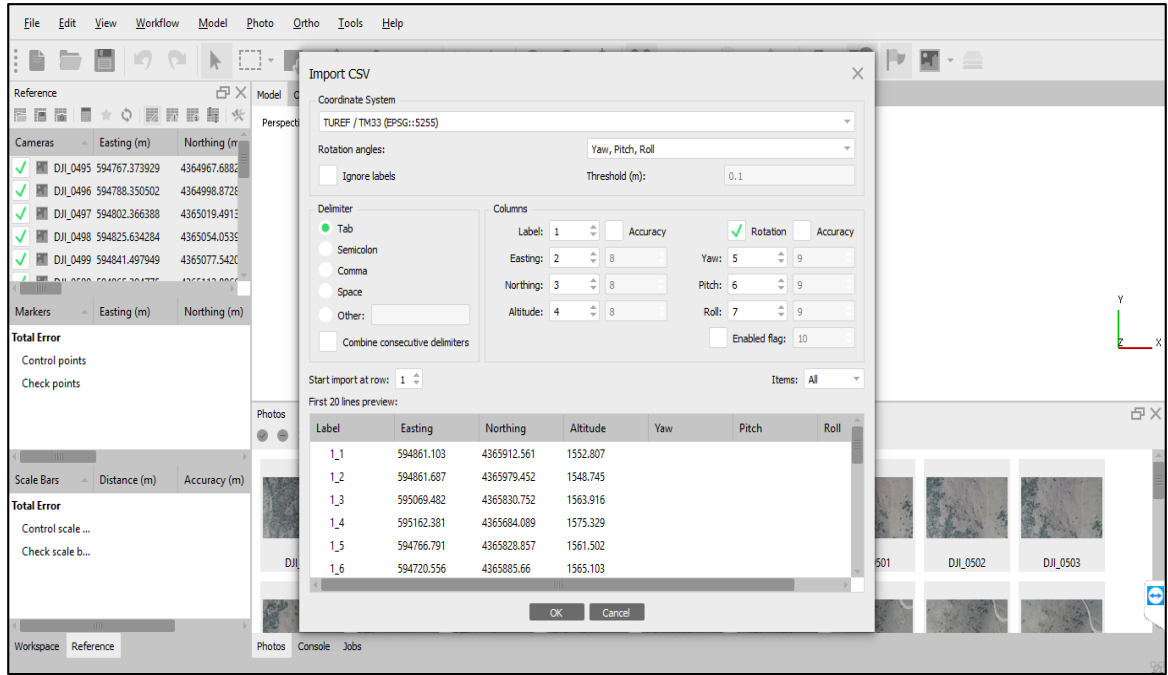
Şekil 3. Pix4DCapture üzerinden alınan uçuş güzergahı.



Şekil 4. GoogleEarth üzerinden alınan uçuş güzergahı.



Şekil 5. Netcad 8 üzerinden alınan uçuş güzergahı.



Şekil 6. Yer kontrol noktalarının eklenmesi.



Şekil 7. Yer kontrol noktalarının arazideki dağılımı.

Tablo 3. Resim görüntülerinin koordinatları

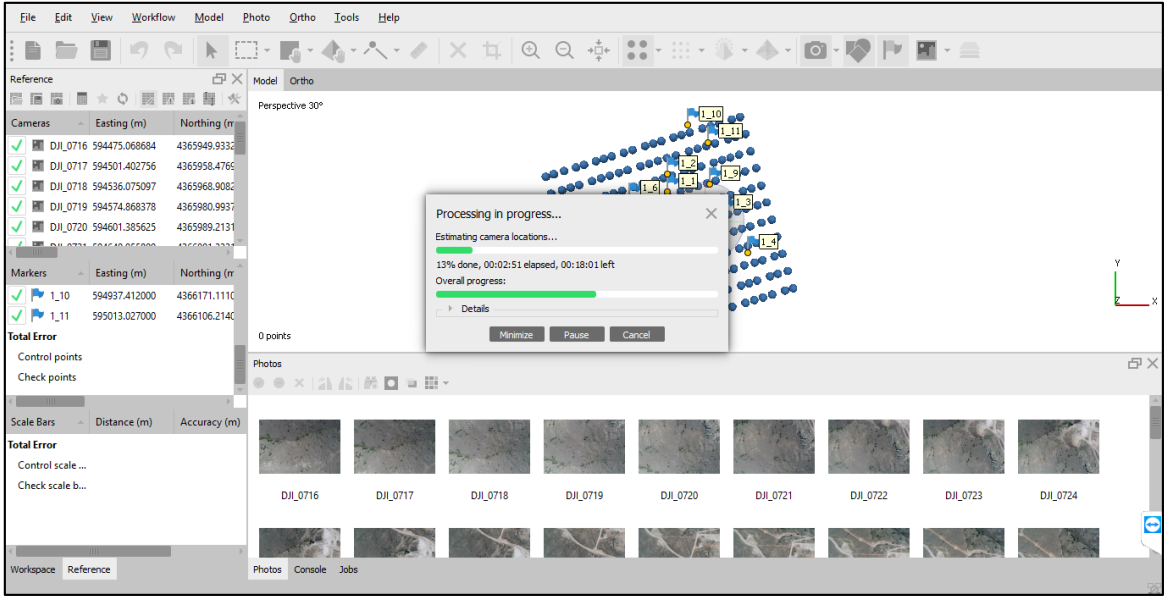
Nokta Numarası	Y (Sağ Değer)	X (Yukarı Değer)	Z (Yükseklik)
1	544861,231	4265912,552	1252,807
2	544861,542	4265979,463	1248,745
3	545069,363	4265830,755	1263,916
4	545162,448	4265684,087	1275,329
5	544766,617	4265828,845	1261,502
6	544720,233	4265885,656	1265,103
7	544780,522	4265723,781	1279,421
8	544903,122	4265710,456	1200,693
9	545021,333	4265941,563	1242,365
10	544937,522	4266171,184	1223,125
11	544763,465	4268825,432	1292,512
12	544662,786	4267722,545	1268,842
13	544789,522	4267982,987	1245,452
14	544563,335	4268762,142	1253,645
15	544231,265	4269512,555	1264,847
16	544989,855	4268872,574	1254,322
17	544976,422	4267921,417	1278,634
18	544785,586	4265524,555	1230,632
19	544567,415	4265752,241	1230,556
20	544786,585	4263772,821	1254,222

Şekil 8 ve 9'da, nokta bulutu oluşturma aşamasına ait ekran görüntüsü verilmiştir. Agisoft Metashape programı üzerinden hava fotoğrafları işlenerek 3 boyutlu nokta bulut verisi elde edilmiştir. 3B nokta bulut verisi üzerinden ortofoto ve sayısal yüzey modeli oluşturulmuştur. Bu işlemler için Workflow > Build DEM ve Workflow > Build Orthomosaic komutları kullanılmıştır. Sayısal Yüzey Modeli üretiminin ardından ortofoto üretimi gerçekleştirilmiştir. 4,93 cm/pixel YÖM (Yer Önlem Mesafesi) sahip olan ortofoto şekil 10 ve 11'de

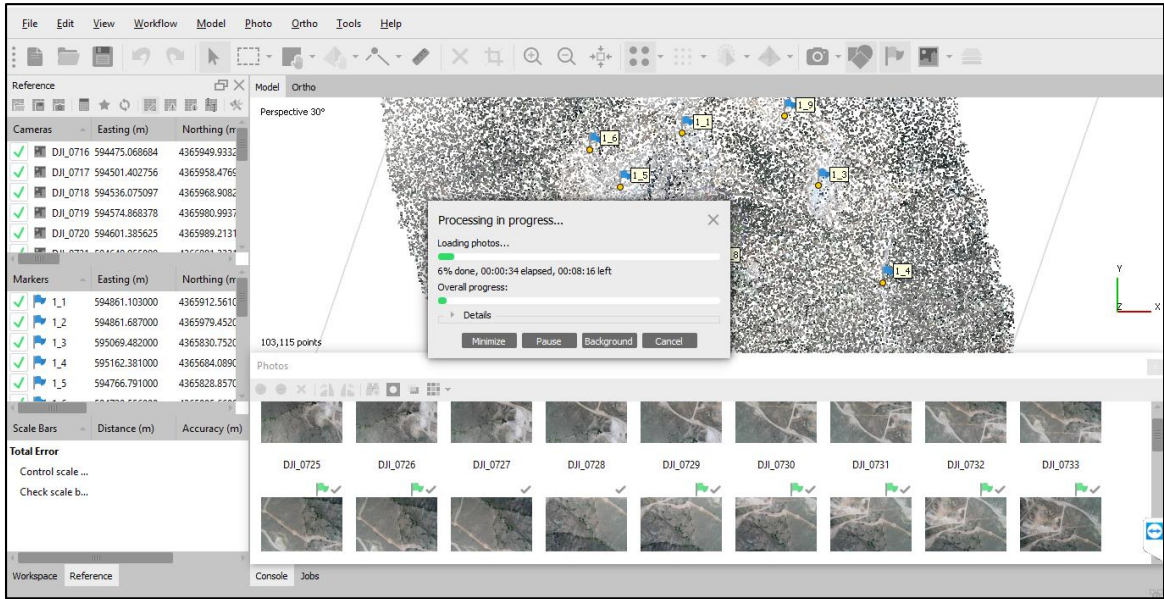
verilmiştir.

Ortofoto görüntüleri ile beraber toplamda 17 binin üzerinde nokta elde edilerek nokta bulutu meydana getirildi. Yer Önlem Mesafesi ise 4,78 cm/piksel aralığında sonuç ürün verdi. Sonrasında Z kot farkları ışığında hacimsel boyutu incelendi.

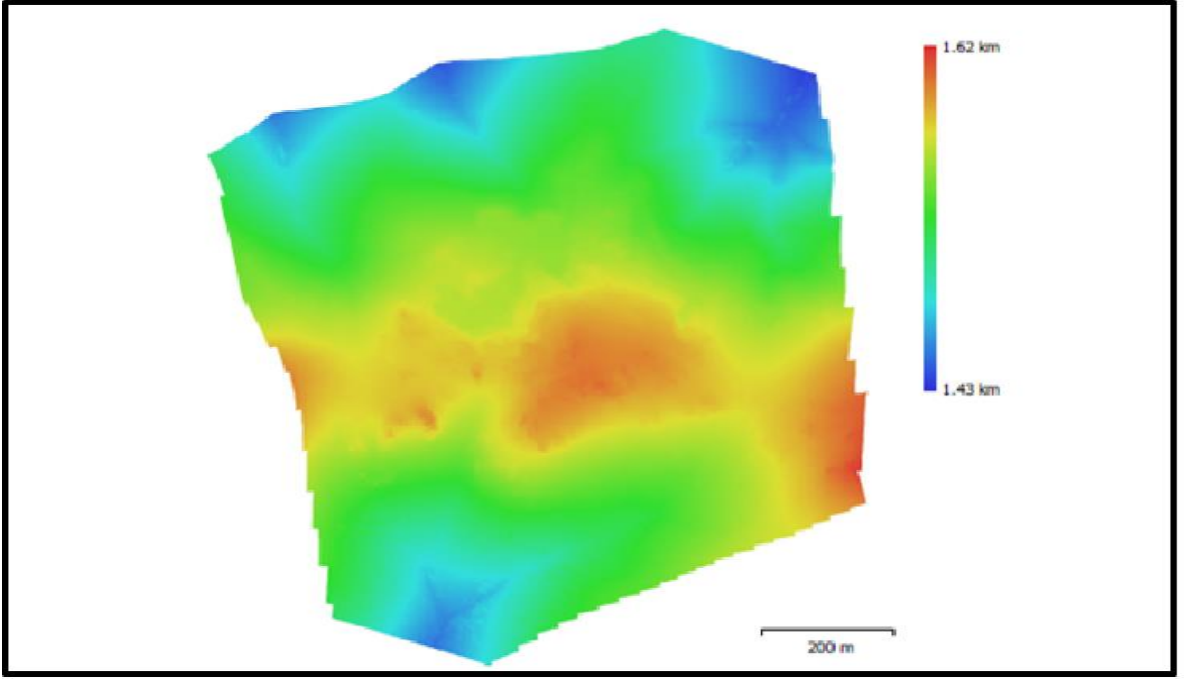
Çeşitli hacim kestirimlerinden yapılarak toplam cevher miktarının 2 milyon metreküp üzerinde olabileceği sonucuna varıldı. Çeşitli geometrik şekiller sonucunda hacim hesapları Şekil 12'de verilmiştir.



Şekil 8. Fotoğrafların birbirine hizalanması, align photos işlemi.



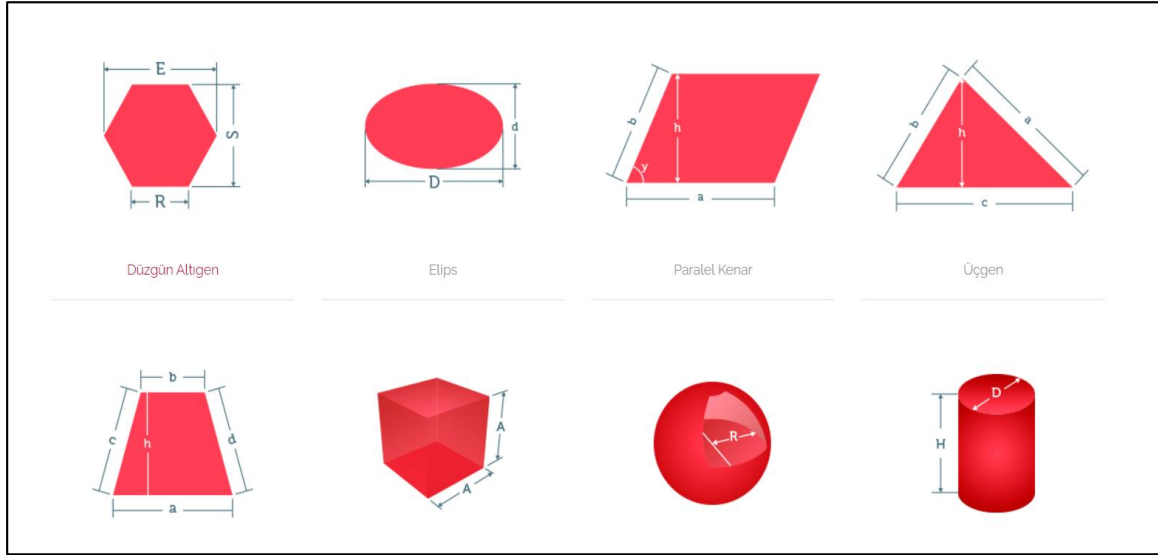
Şekil 9. Nokta bulutu oluşturma aşaması.



Şekil 10. DEM görüntüsü (Digital yüksekli modeli).



Şekil 11. Ortofoto görüntü.



Şekil 12. Çeşitli geometrik şekiller sonucunda hacim hesapları (URL-3).

İHA teknolojisi beraberinde kullanılabilir teknolojiler ile önemli bir araç haline gelmiştir. Diğer tüm alanlarda olduğu gibi, haritacılık alanında da ihtiyaç duyulan zaman, maliyet, insan gücü gibi etkenlerin minimuma indirilmesi ihtiyacı, kullanılması planlanan İHA'nın seçilmesinde önemli rol oynamaktadır. Dolayısıyla satın alınması planlanan İHA'nın sahip olduğu donanımsal özelliklerin, konumsal doğruluğa etki edebileceği göz önünde bulundurularak fayda-maliyet ilişkisi gözetilerek seçilmesi gerektiği düşünülmektedir (Çallı, 2021).

5. Sonuç

İHA teknolojisi ile birlikte günümüzde yersel olarak ölçüm yapılamayacak özellikteki arazilerde güvenli şekilde halihazır modellemesi yapılabilmektedir. RTK'lı ya da RTK'sız olarak fotoğraf görüntüleri elde edilebilir. RTK sistemi olmayan İHA ile elde edilen resimler ve uçuş öncesi çalışma alanına tesis edilen 20 adet YKN kullanılarak uygulanmıştır. Değerlendirme sonrasında oluşan veriler Pix4D yazılımında 5,17 cm/piksel değeri ile üretilmiştir. Bu değerlendirme sonucu oluşan verilerde yatayda konum doğruluğu yukarı değer= $\pm 2,73$ cm, sağa değer= $\pm 3,55$ cm ve yükseklikte doğruluğu yükseklik= $\pm 3,17$ cm olarak bulunmuştur. Agisoft yazılımında ise değeri 4,78 cm/piksel olarak elde edilmiştir. Bu verilerin yatay konum doğruluğu yukarı değer= $\pm 1,33$ cm, sağa değer=1,21 cm olarak, yükseklikte doğruluğu yükseklikte=0,53 cm olarak bulunmuştur. 17443,839 nokta ile elde edilen sayısal yükseklik modelinden Yaklaşık maliyet stok oranı hesaplanarak İHA yardımıyla doğruluk farkı yersel ölçülerden nasıl olabileceği İHA'nın maden sahalarındaki kullanıma elverişliliği incelenmeye sağlanmıştır. Önerimiz, açık maden olan ocak alanlarında yersel ölçüm işlemlerinin zaman ve maliyet açısından yükü fazla olacağından dolayı, her hacim sorgulama işleminde İHA sistemleri ile kısa zamanda ve az insan gücü ile hacim (kübaj) hesaplamalarının yapılması büyük fayda sağlayacaktır.

Katkı Oranı Beyanı

Tüm işlemler eserin tek yazarı olan S.T. (%100) tarafından yapılmıştır. Yazar makalenin son halini inceleyip onaylamıştır.

Çatışma Beyanı

Yazar bu çalışmada hiçbir çıkar ilişkisi olmadığını beyan etmektedirler.

Destek ve Teşekkür Beyanı

Çalışmamızda, yer kontrol noktalarının belirlenmesi ve İHA uçuş işlemlerinde yardımlarından dolayı Metalurji ve Malzeme Yüksek Mühendisi Semih TAŞKAYA'ya teşekkürü borç bilirim.

Kaynaklar

- Agüera-Vega F, Carvajal-Ramírez F, Martínez-Carricondo P. 2016. Accuracy of digital surface models and orthophotos derived from unmanned aerial vehicle photogrammetry. J Surv Eng, 143(2): 4016025.
- Ağca M, Kaya E, Yılmaz H. 2020. Yersel ve fotogrametrik yöntemler ile kaya bloklarının hacimlerinin hesaplanması: selime örneği, Aksaray. Afyon Kocatepe Üniv Fen Müh Bil Derg, 20(3): 465-473.
- Akyürek S, Yılmaz MA, Karakaya M, Taşkiran M. 2012. İnsansız hava araçları muharebe alanında ve terörle mücadelede devrimsel dönüşüm. Bilge Adamlar Stratejik Araş Merk, 1(53): 4-12.
- Austin R. 2010. Unmanned aircraft systems. Wiley & Sons, New York, US, pp: 368.
- Bilgin M. 2021. İnsansız hava araçlarının dış yüzeylerinin akıllı aydınlatılması ile gözden kaybolmasının incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Sivil Havacılık Anabilim dalı, Kayseri, Türkiye, pp: 61.
- Çallı R. 2021. İHA sistemleri ile elde edilen ortofoto haritalarının doğruluk değerlendirmesi. Yüksek Lisans Tezi, Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Harita Mühendisliği Anabilim dalı, Tokat, Türkiye, pp: 143.
- Eltner A, Kaiser A, Castillo C, Rock G, Neugirg F, Abellán A. 2016. Image-based surface reconstruction in geomorphometry -

- merits, limits and developments, *Earth Surf Dynam*, 4: 359-389. doi: 10.5194/esurf-4-359-2016.
- Gençerk EY. 2016. İnsansız hava aracı fotogrametrisi uygulaması ile inşaat projesi imalat durumunun araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Geomatik Mühendisliği Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye, pp: 101.
- James MR, Robson S. 2012. Straightforward reconstruction of 3-D surfaces and topography with a camera: Accuracy and geoscience application. *J Geophys Res-Earth*, 117: 1-17.
- Juan L, Gwon O. 2009. A comparison of sift, pca-sift and surf. *Int. J Image Process*, 3: 143-152.
- Kamal WA, Samar R. 2008. A mission planning approach for UAV applications. *Proceedings of the IEEE Conference on Decision and Control*, 3101-3106. URL: <http://dx.doi.org/10.1109/CDC.2008.4739187> (erişim tarihi: 09 Ocak 2022).
- Konar M. 2020. Simultaneous determination of maximum acceleration and endurance of morphing uav with abc algorithm-based model. *Aircraft Eng Aerospace Technol*, 92(4): 579-586.
- Macheret J, Teichman J, Kraig R. 2011. conceptual design of low-signature high endurance hybrid-electric UAV. *Defense Technical Information Center*, Virginia, US, pp: 63.
- Martínez-Carricondo P, Agüera-Vegaa F, Carvajal-Ramírez F, Mesas-Carrascosab FJ, García-Ferrerb A, Pérez-Porras FJ. 2018. Assessment of UAV-photogrammetric mapping accuracy based on variation of ground control points. *Int J App Earth Observ Geoinf*, 72: 1-10. doi: 10.1016/j.jag.2018.05.015.
- Numan AB. 2020. Geleneksel fotogrametri ve insansız hava aracı (İHA) sonuç ürünlerinin karşılaştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Harita Mühendisliği Anabilim dalı, Zonguldak, Türkiye, pp: 87.
- Öztürk O, Bilgilioğlu B, Çelik M, Bilgilioğlu S, Uluğ R. 2017. İnsansız hava aracı (İHA) görüntüleri ile ortogörüntü üretiminde yükseklik ve kamera açısının doğruluğa etkisinin araştırılması. *Geomatik*, 2(3): 135-142.
- Remondino F, El-Hakim S. 2006. Image-based 3D modelling: a review. *Photogramm Rec*, 21(115): 269-291.
- Şengül B. 2016. Döner kanatlı İHA'lar ile sabit kanatlı İHA'ların karşılaştı. URL: https://prezi.com/y_6abbpq2r-w/doner-kanatli-ihalar-ile-sabitkanatli-ihalar-ile-karsilast (erişim tarihi: 10 Mart 2020).
- Toprak AS. 2014. Fotogrametrik tekniklerin İHA ile mühendislik projelerinde kullanılabilirliğinin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Harita Mühendisliği Anabilim Dalı, Konya, Türkiye, pp: 173.
- URL-1. Firefighting drone infographic <https://www.dronefly.com/firefighting-drones-drones-in-the-field-infographic> (erişim tarihi: 01 Mart 2021).
- URL-2: <https://parselorgu.tkgm.gov.tr/> (erişim tarihi: 10 Mart 2020).
- URL-3: <https://www.maliyetbul.com/geometrik-sekil-alan-hacim-hesaplamalari.php> (erişim tarihi: 10 Mart 2020).
- Wang J, Gea Y, Heuvelink GBM, Zhou C, Brus D. 2012. Effect of the sampling design of ground control points on the geometric correction of remotely sensed imagery. *Int J App Earth Observ Geoinf*, 18(1): 91-100.



HELİOTROPIUM MYOSOTOİDES VE HELİOTROPIUM SUAVEOLENS (BORAGINACEAE)'İN FARKLI ORGANLARINDAN ELDE EDİLEN EKSTRAKTLARIN ANTİOKSİDAN VE ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTELERİ

Nezahat KANDEMİR^{1*}, Şevket KANDEMİR¹, Emine ÇELİKOĞLU², Umut ÇELİKOĞLU³, Önder İDİL⁴

¹Amasya Üniversitesi, Eğitim Fakültesi, Matematik ve Fen Eğitimi Bölümü, 05100, Amasya, Türkiye

²Amasya Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 05000, Amasya, Türkiye

³Amasya Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, 05000, Amasya, Türkiye

⁴Amasya Üniversitesi, Eğitim Fakültesi, Temel Eğitim Bölümü, 05100, Amasya, Türkiye

Özet: Bu makalede, *Heliotropium suaveolens* ve *Heliotropium myosotoides*'in farklı organlarından elde edilen ekstraktların antioksidan, antimikrobiyal aktiviteleri ve DNA hasarı üzerine etkileri değerlendirildi. *H. suaveolens*'in vejetatif ve generatif gelişme periyotlarındaki farklı organlarına, *H. myosotoides*'in generatif ve vejetatif gelişme periyodundaki topraküstü ve toprakaltı organlarına hekzan, etanol ve etil asetat uygulanmıştır. Daha sonra bitki ekstraktları DMSO içerisinde çözülerek antioksidan, antimikrobiyal ve plazmit DNA çalışmalarında kullanılmıştır. *H. suaveolens*'in vejetatif gelişme periyodunda yaprak, generatif gelişme periyodunda ise yaprak ve çiçek etanol ekstraktlarında yüksek antioksidan aktivite görülmüştür. Ancak *H. suaveolens*'in vejetatif gelişme periyodunda gövde, generatif gelişme periyodunda kök ve gövde etanol ekstraktlarının zayıf antioksidan aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. *H. suaveolens*'in hekzan ekstraktlarında ise antioksidan aktivite vejetatif ve generatif gelişme periyotlarındaki bütün organlarında bulunmuştur. *H. myosotoides*'in generatif büyüme periyodundaki topraküstü ve toprakaltı organlarının etanol ve hekzan ekstraktlarının zayıf antioksidan aktiviteye sahip olduğu görülmüştür. Ancak bu iki türün etanol, hekzan ve etil asetat ekstraktlarının antimikrobiyal aktivite ve DNA hasarı göstermediği belirlenmiştir. *H. suaveolens*'in antioksidan aktivite gösteren organlarının parfümeri ve kozmetik sanayisinde değişik preparatların hazırlanmasında ve içerdiği glikozitlerden dolayı bal üreticileri tarafından kullanılabilirliği önerilmiştir.

Anahtar kelimeler: *Heliotropium* taksonları, Antioksidan, Antimikrobiyal, Plazmit DNA


Antioxidant and Antimicrobial Activities of Extracts Obtained from Different Organs of *Heliotropium Myosotoides* and *Heliotropium Suaveolens* (Boraginaceae)

Abstract: In this article, antioxidant, antimicrobial activities and effects on DNA damage of extracts obtained from different organs of *Heliotropium suaveolens* and *Heliotropium myosotoides* were evaluated. Hexane, ethanol and ethyl acetate were applied to the different organs in vegetative and generative growth periods of *H. suaveolens*, to the above-below-grounds organs in the vegetative and generative growth periods of *H. myosotoides*. Later, plant extracts were dissolved in DMSO and used in antioxidant, antimicrobial and plasmid DNA studies. Strong antioxidant activity was seen in the ethanol extracts of the leaves in the vegetative growth period and in the leaf and flowers in the generative growth period of *H. suaveolens*. In hexane extracts of *H. suaveolens*, antioxidant activity was found in all organs in the vegetative and generative growth periods. However, it was determined that the stem in the vegetative growth period and the root and stem ethanol extracts in the generative growth period of *H. suaveolens* showed weak antioxidant activity. The ethanol and hexane extracts of the above-below ground organs in the generative growth period of *H. myosotoides* were seen to have weak antioxidant activity. However, it was determined that ethanol, hexane and ethyl acetate extracts of these two species did not show antimicrobial activity and DNA damage. It has been suggested that the organs displaying antioxidant activity of *H. suaveolens* can be used in the preparation of various preparations in the perfumery and cosmetics industry and by honey producers due to the glycosides it contains.


Keywords: *Heliotropium* Taxa, Antioxidant, Antimicrobial, Plazmid DNA


*Sorumlu yazar (Corresponding author): Amasya Üniversitesi, Eğitim Fakültesi, Matematik ve Fen Eğitimi Bölümü, 05100, Amasya, Türkiye


E mail: nezahat.kandemir@amasya.edu.tr (N. KANDEMİR)

Nezahat KANDEMİR  <https://orcid.org/0000-0002-5428-4139>

Şevket KANDEMİR  <https://orcid.org/0000-0001-6781-0057>

Emine ÇELİKOĞLU  <https://orcid.org/0000-0002-5956-0008>

Umut ÇELİKOĞLU  <https://orcid.org/0000-0003-0995-8154>

Önder İDİL  <https://orcid.org/0000-0003-1744-4006>

Gönderi: 07 Mart 2022

Kabul: 29 Nisan 2022

Yayınlanma: 01 Temmuz 2022

Received: March 07, 2022

Accepted: April 29, 2022

Published: July 01, 2022

Cite as: Kandemir N, Kandemir Ş, Çelikoğlu E, Çelikoğlu U, İdil Ö. 2022. Antioxidant and antimicrobial activities of extracts obtained from different organs of *Heliotropium Myosotoides* and *Heliotropium Suaveolens* (Boraginaceae). BSJ Eng Sci, 5(3): 98-108.



1. Giriş

Türkiye’de *Heliotropium* L. cinsinin 17 türü bulunmaktadır (Güner ve ark., 2012). Bu cins tek ve çok yıllık, genellikle otsu nadiren çalı türleri içermektedir. Genellikle türler tropikal ve subtropikal bölgelerde, yarı-kurak ve sıcak alanlarda yayılış göstermektedir. *Heliotropium* türleri özellikle topraküstü kısımlarında pirolizidin alkaloitleri, terpenoitler, flavonoitler, tanenler, saponinler, fenoller ve steroidler gibi kimyasal maddeleri taşımaktadır (Singh ve ark., 2002; Goyal ve Sharma, 2014; Santhosha ve ark., 2015; Roy, 2015). Pirolizidin alkaloitlerinin önemli farmakolojik, biyolojik ve kemotaksonomik özellikleri bulunmaktadır. Bu alkaloitlerin 200’den fazla çeşidi bu cinsin türlerinin çeşitli organlarından izole edilmiştir. Pirolizidin alkaloitlerinden dolayı bazı araştırmacılar *Heliotropium* türlerinin doğal ilaçlarda iyi kaynak oluşturacaklarını rapor etmişlerdir (Graser ve ark., 1988; Ghori ve ark., 2016).

Heliotropium türleri antibakterial, antitumor, antiviral, anti-enflamatuvar, yara iyileştirici, sitotoksik ve fitotoksik özelliklerinden dolayı, dünyanın pek çok yerinde enflamasyon, gut, romatizma, cilt hastalıkları, menstrual bozukluklar ve zehirli hayvan ısırıklarının tedavisinde kullanılmaktadır (Shoge ve ark., 2011; Gaffari ve ark., 2013; Yesmin, 2014; Roy, 2015; Ahmad ve ark., 2015). Literatürde tıbbi özellik taşıyan değişik bitki türleri üzerinde antioksidan, antimikrobiyal ve anatomik çalışmalar bulunmaktadır (Herken ve ark., 2012; Arslan ve Çelik, 2013; Ayar ve ark., 2020; Kandemir ve ark., 2020; Candela ve ark., 2021; Darcan ve ark., 2021). Bu tıbbi bitkilerinin içerdikleri sekonder metabolitlerden dolayı değişik hastalıklarının tedavisinde özellikle geleneksel tıp alanında yaygın olarak kullanılabilirlerdir bildirilmiştir.

İnceleme türlerinden *Heliotropium myosotoides* Banks & Sol. 15-55 cm boyunda, otsu, tek yıllık bir bitkidir. Temmuz-Ekim aylarında çiçeklenmektedir. Çiçek durumu seyrek ve kısa saplı çiçeklerden oluşur. Kaliks yaklaşık 2 mm boyunda, korolla 2,5 mm, subsilindirik, kaba tüylü, kısa dik loplu ve küçük dişlidir. Stigma subsesil ve disk benzeri tabanlı, nutletler küçük siğilli ve çukurcuklu, tüysüzdür. Bu tür halk arasında “kaya bambulu, dermane ve mize” isimleri ile tanınır. Tür,

ülkemizde endemik olup Gaziantep, Şanlıurfa ve Hatay çevresinde kireçtaşı kayalık alanlarda ve 100 m. yüksekliklerde yayılış göstermektedir.

Heliotropium suaveolens M. Bieb. 20-60 cm boyunda, otsu, tek yıllık bir bitkidir. Haziran-Ekim aylarında çiçek açmaktadır. Kimoza çok kısa, kaliks loplari çiçekte 2,5-3 mm, meyvada 4 mm boyunda, linear-lanseolat şekilli ve diktir. Korolla 4-5 mm eninde, tüylü, stigma subsesil, akut ve tüysüz, nutletler ovoid şekilli, siğilli ve tüysüz. Bu tür halk arasında “ıtırılı bambul veya ballı bitki” olarak bilinmektedir. Bitki genellikle nadasa bırakılmış tarlalarda, kuru, tahrip edilmiş yamaçlarda 0-1300 m. yüksekliklerde bulunmaktadır. Tür, ülkemizde geniş bir yayılışa alanına sahiptir. Bu türün topraküstü organlarında lesiokarpın, ekinatin, heliotrin ve öropin gibi pirolizidin alkaloitleri tespit edilmiştir (Güner, 1986; Shazly ve Wink, 2014). Bu çalışmanın amacı, ülkemizde doğal yayılışa sahip *H. myosotoides* ve *H. suaveolens*’in farklı organlarından elde edilen ekstraktların antioksidan, antimikrobiyal aktivitelerini ve plazmit DNA hasarı üzerindeki etkilerini tespit etmektir.

2. Materyal ve Yöntem

2.1. Bitkilerin Toplanması ve Teşhis Edilmesi

H. myosotoides ve *H. suaveolens*’e ait örnekler türlerin doğal olarak yayılış gösterdikleri lokaliteden 2019 yılında vejetatif ve generatif gelişme peryotlarında (Mayıs-Ekim) toplanmıştır. Türlerin toplandığı doğal yayılış alanları Tablo 1’de verilmiştir. Türlerin taksonomik tanımlaması Davis (1978)’e göre yapılmıştır. Bitki örneklerinin taksonomik tanımlamasında “Stereo Zoom” ışık mikroskobu kullanılmıştır. Taze bitki örneklerinin vejetatif ve generatif gelişme dönemlerine ait farklı organları ayrı ayrı küçük parçalara bölünerek gölgede kurutulmuştur. Kurutulmuş bitki örnekleri değirmende öğütülmüştür. Öğütülmüş bitki materyalleri ekstraksiyon işlemlerine tabi tutulmuştur. Daha sonra farklı organların antioksidan, antimikrobiyal özellikleri ve plazmit DNA hasarı üzerine etkileri belirlenmiştir. Bitkilere ait örneklerinin bir kısmı da herbaryum örneği (*H. myosotoides* herbaryum numarası: 1236 ve *H. suaveolens* herbaryum numarası: 1237) haline getirilip araştırma laboratuvarında saklanmıştır.

Tablo 1. *H. myosotoides* ve *H. suaveolens*’in lokalite bilgileri

Bitki İsimleri	Lokaliteler
<i>H. myosotoides</i>	Şanlıurfa: Bilecik-Halfeti yolu, Yukarı İncirli Köyü yol kenarları
<i>H. myosotoides</i>	Gaziantep-Şanlıurfa çıkışı, yol kenarları
<i>H. suaveolens</i>	Amasya: Taşova-Mülkbükü çevresi kuru yokuşlu alanlar
<i>H. suaveolens</i>	Amasya: Borabay Gölü çevresi açık step alanlar

2.2. Bitki Ekstraktlarının Hazırlanması

Toz hale getirilen 10 gr bitki 500 ml çözücü kullanılarak sokslet ekstraktöründe sırasıyla hekzan, etanol ve etil asetat ile ekstrakte edilmiştir. Çözücüler evaporatörde uzaklaştırıldıktan sonra elde edilen bitki ekstraktları

DMSO içerisinde çözülerek antioksidan, antimikrobiyal ve plazmit DNA çalışmalarında kullanılmıştır.

2.3. Bitki Ekstraktlarının Antioksidan Özelliklerinin Belirlenmesi: DPPH Yöntemi

Ekstraktların DPPH serbest radikali giderme aktivitesi

Galvez (2015)'e göre yapılmıştır. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan bitki ekstraktlarının (3 ml) üzerine 1 ml DPPH stok solüsyonundan (6×10^{-5} M) eklenerek oda sıcaklığında karanlıkta 30 dk inkübasyona bırakılmıştır. Köre karşı 517 nm'de absorbanları ölçülüp serbest radikal süpürme aktivitesi absorbanstaki azalışla gösterilmiştir. Standart antioksidan olarak Gallik asit kullanılmıştır.

2.4. Bitki Ekstraktlarının Toplam Fenolik İçeriklerinin Belirlenmesi

Ekstraktlardaki fenolik bileşiklerin toplam içerikleri, gallik asit eşdeğerleri (GAE) cinsinden Folin-Ciocalteu yöntemi kullanılarak belirlenmiştir (Mavi ve ark., 2004). Bu amaçla, 96 kuyulu düztabanlı bir mikropalakada ekstraktların 10 μ L'si 10 mikrolitre Folin-Ciocalteu fenol reaktifi ile karıştırılıp üzerine 30 μ L % 2'lik Na_2CO_3 'ün sulu çözeltisi ilave edilmiştir. Karışıma 250 μ L dH_2O ilave edilip 30 dk oda sıcaklığında ve karanlıkta inkübe edildi ve mikropalaka okuyucuda (Multiskan Go, Thermo) 760 nm'de absorbanı ölçülmüştür. Kontrol olarak ekstrakt yerine etanol kullanılmıştır. Ekstraktların toplam fenolik derişimi gallik asit kalibrasyon eğrisi kullanılarak hesaplanmıştır. Deneyler her bir ekstrakt ve gallik asit için üç kez tekrarlanmıştır. Sonuçlar $\text{mg}_{(\text{GAE})}/\text{g}_{(\text{ekstrakt})}$ olarak ifade edilmiştir.

2.5. Bitki Ekstraktlarının Antimikrobiyal Özelliklerinin Belirlenmesi

Elde edilen ekstraktların *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Bacillus cereus* ATCC 10876, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, mayalardan *Candida albicans* ATCC 10231 üzerinde antimikrobiyal aktivitesi agar disk difüzyon yöntemi ile belirlenmiştir (Bauer ve ark., 1966). Test mikroorganizmaları Mueller Hilton broth ve Sabouraud dextrose broth besi ortamında geliştirilip inoculum miktarı McFarland 0,5 türbitide standardına göre ayarlanmıştır. 40 mg/ml konsantrasyonda hazırlanan ekstraktlar steril disklerle emdirildikten sonra test

edilecek mikroorganizma yayılmış olan petri kaplarına konularak, 37 °C de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. 100 mikrolitre ekstrakt disklerle emdirilerek kullanılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda diskler etrafında oluşması beklenen zon çapları ölçülmüştür.

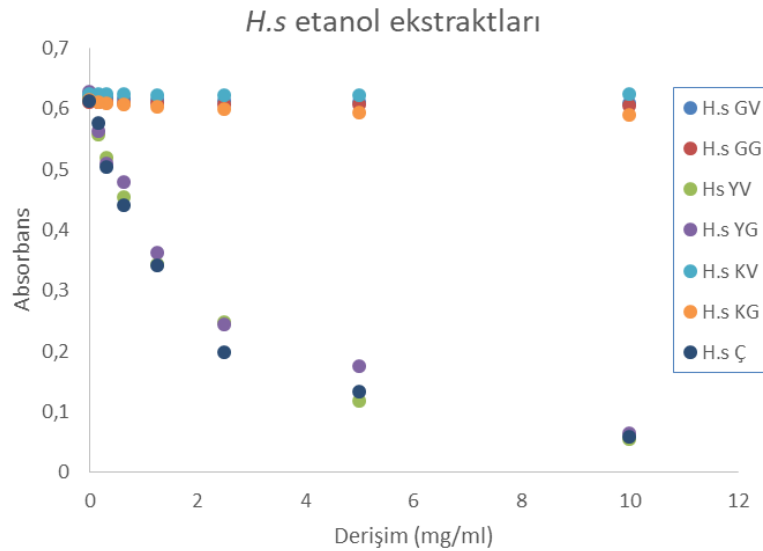
2.6. Bitki Ekstraktlarının Plazmit DNA Üzerine Etkisinin Belirlenmesi

Bitki ekstraktlarının plazmit DNA üzerindeki etkisinin belirlenmesi agaroz jel elektroforez yöntemine göre yapılmıştır (Ayar ve ark., 2020). 120 μ g / ml bitki özleri, pBR322 plazmid DNA ile 2 saat boyunca 37 °C'de etkileşime girmiştir. İnkübasyondan sonra numuneler 6X yükleme boyası ile karıştırılmış ve %1 agaroz jel üzerine yüklenmiştir. Elektroforez, 80 dakika boyunca 100 V gerçekleştirilmiştir. Jel daha sonra EtBr (Etidyum Bromür) ile boyanmış ve bantlar görüntüleme sistemi yardımıyla görüntülenmiştir. Sonuçlar, DNA formlarının parçalanma yüzdesi olarak ifade edilmiştir.

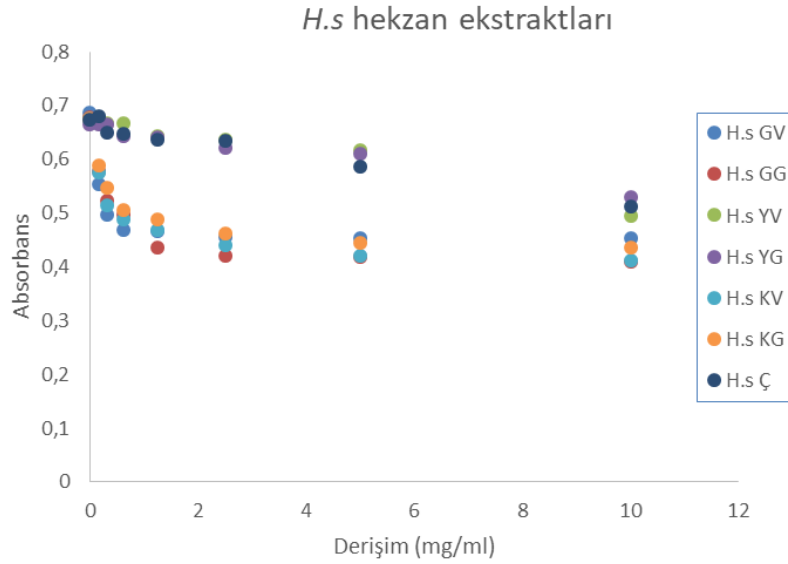
3. Bulgular

3.1. Bitki Ekstraktlarının Antioksidan Aktiviteleri

H. suaveolens türünün vejetatif ve generatif gelişme periyotlarındaki organlarına ait etanol ve hekzan ekstraktlarının antioksidan özellikleri incelendiğinde, vejetatif gelişme periyodunda yaprak ve generatif gelişme periyodunda yaprak ve çiçeklerin etanol ekstraktlarının yüksek antioksidan aktiviteye sahip olurken (Şekil 1), vejetatif gelişme periyodunda gövde, generatif gelişme periyodunda ise kök ve gövde etanol ekstraktlarının düşük seviyede antioksidan aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. Generatif ve vejetatif gelişme periyotlarında kök, generatif gelişme periyodunda gövdenin hekzan ekstraktlarında da yüksek antioksidan aktivite görülmüştür (2). Oysa vejetatif ve generatif gelişme periyotlarındaki yaprak ve çiçeklerin hekzan ekstraktlarında düşük antioksidan aktiviteye rastlanmıştır.



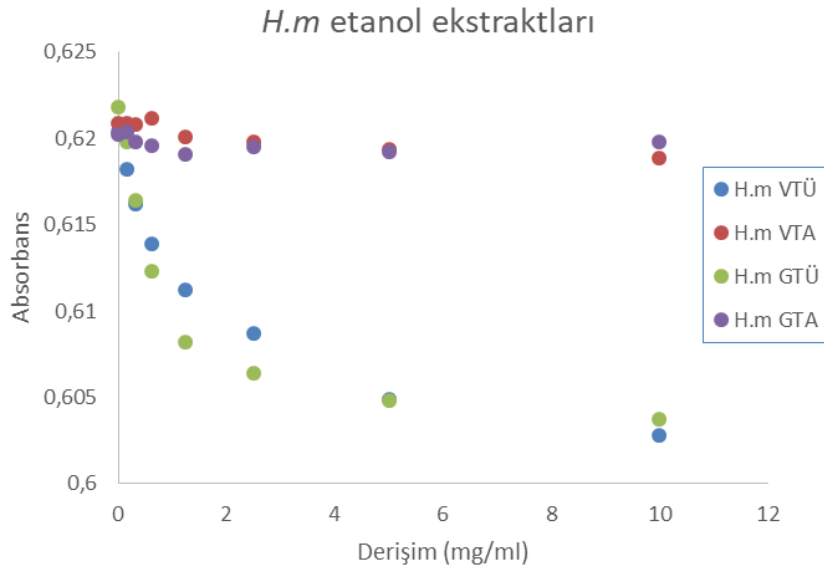
Şekil 1. *Heliotropium suaveolens*'in etanol ekstraktlarının antioksidan aktivitesi. Hs GV= *H. suaveolens* vejetatif gövde, Hs GG= *H. suaveolens* generatif gövde, Hs YV= *H. suaveolens* vejetatif yaprak, Hs YG= *H. suaveolens* generatif yaprak, Hs KV= *H. suaveolens* vejetatif kök, Hs KG= *H. suaveolens* generatif kök, Hs Ç= *H. suaveolens* çiçek.



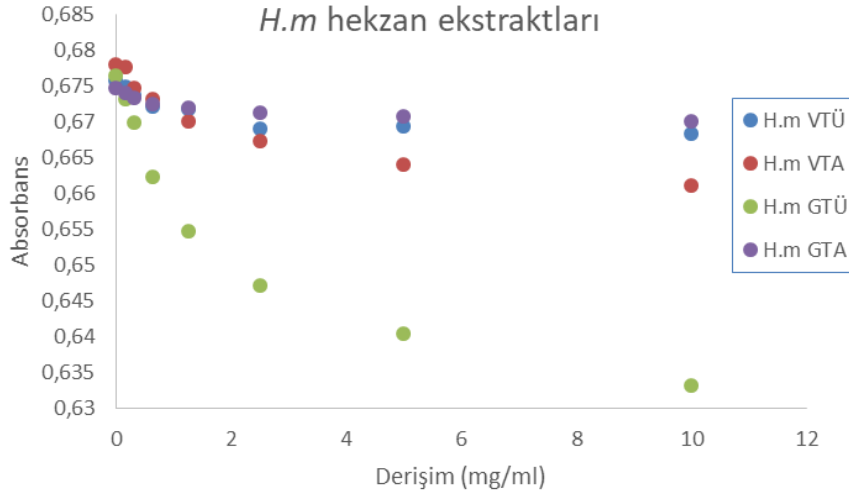
Şekil 2. *Heliotropium suaveolens*'in hekzan ekstraktlarının antioksidan aktivitesi.

H. myosotoides'in topraküstü ve toprakaltı organlarına ait etanol ve hekzan ekstraktlarının antioksidan özellikleri incelendiğinde, hem topraküstü hemde toprakaltı organlarının etanol ve hekzan ekstraktlarının zayıf antioksidan aktiviteye sahip olduğu görülmüştür (Şekil 3 ve 4). Diğer yandan, *H. suaveolens*'in vejetatif ve generatif

gelişme periyotlarındaki kök, gövde, yaprak ve çiçeklerinin, *H. myosotoides*'in vejetatif ve generatif gelişme periyotlarında topraküstü ve toprakaltı organlarının etil asetat ekstraktlarının antioksidan aktiviteye sahip olmadığı tespit edilmiştir.



Şekil 3. *Heliotropium myosotoides*'in etanol ekstraktlarının antioksidan aktivitesi. Hm VTÜ= *H. myosotoides* topraküstü vejetatif peryot, Hm VTA= *H. myosotoides* toprakaltı vejetatif peryot, Hm GTÜ= *H. myosotoides* topraküstü generatif peryot, Hm GTA= *H. myosotoides* toprakaltı generatif peryot.

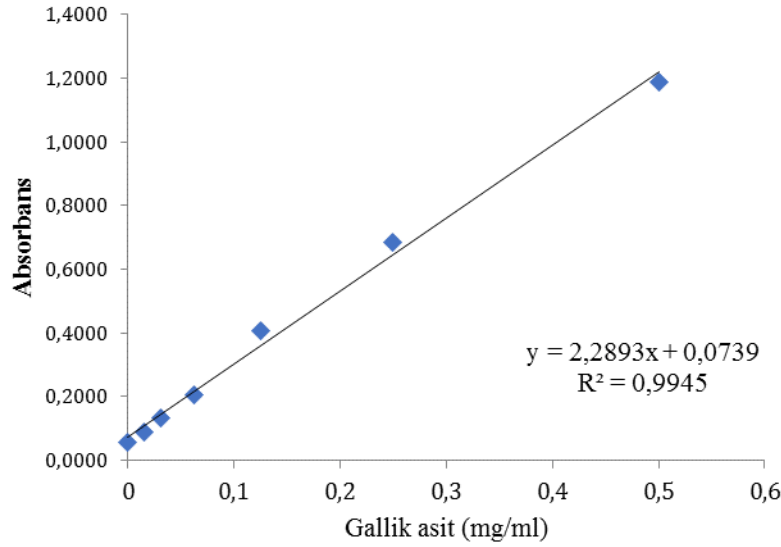


Şekil 4. *Heliotropium myosotoides*'in hekzan ekstraktlarının antioksidan aktivitesi.

3.2. Bitki Ekstraktlarının Toplam Fenolik İçerikleri

Bitki ekstraktlarının toplam fenolik içeriklerinin hesaplanmasında gallik asit ile hazırlanan standart grafik kullanılmıştır (Şekil 5). Bitki ekstraktlarının toplam fenolik içerikleri ile ilgili veriler Tablo 2'de verilmiştir. Tablo 2'deki sonuçlar incelendiğinde, en yüksek toplam fenolik içeriklere *H.suaveolens*'in vejetatif gelişme

periyodundaki kök ekstraktında (9,851), daha sonra ise *H. suaveolens*'in çiçek (6,506) ve generatif gelişme periyodundaki kök ekstraktlarında (6,350) tespit edilmiştir. *H. myosotoides* de en yüksek toplam fenolik içeriklere vejetatif gelişme periyodundaki topraküstü ekstraktlarda rastlanmıştır (4,675).



Şekil 5. Gallik asit standart grafiği.

Tablo 2. Bitki ekstraktlarının toplam fenolik içerikleri

Bitki ekstraktı	GAE
<i>H. suaveolens</i> gövde vejetatif evre	4,069 (±0,438)
<i>H. suaveolens</i> gövde generatif evre	3,891 (±0,522)
<i>H. suaveolens</i> yaprak vejetatif evre	5,071 (±0,271)
<i>H. suaveolens</i> yaprak generatif evre	4,656 (±0,146)
<i>H. suaveolens</i> kök vejetatif evre	9,851 (±0,476)
<i>H. suaveolens</i> kök generatif evre	6,350 (±0,820)
<i>H. suaveolens</i> çiçek	6,506 (±0,032)
<i>H. myosotoides</i> vejetatif topraküstü	4,675 (±0,310)
<i>H. myosotoides</i> vejetatif toprakaltı	3,147 (±0,039)
<i>H. myosotoides</i> generatif topraküstü	3,109 (±0,089)
<i>H. myosotoides</i> generatif toprakaltı	3,375 (±0,290)

GAE= gallik asit eşdeğeri (mg_{GAE})/g_(ekstrakt)

3.3. Bitki Ekstraktlarının Antimikrobiyal Aktiviteleri

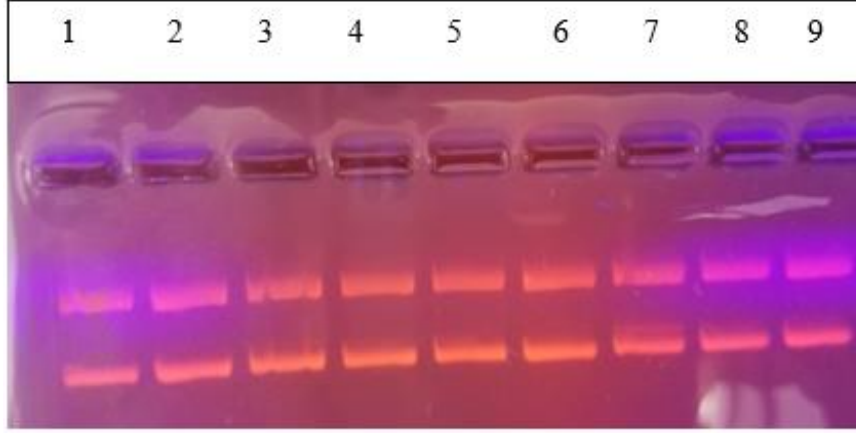
H. suaveolens ve *H. myosotoides*'in vejetatif ve generatif gelişme periyotlarındaki organlarına ait ekstraktları incelendiğinde, hem *H. suaveolens*'in vejetatif ve generatif organlarında hemde *H. myosotoides*'in topraküstü ve toprakaltı organları ile hazırlanan etanol, hekzan ve etil asetat ekstraktlarında disk difüzyon testi ile kayda değer antimikrobiyal aktiviteye rastlanmamıştır.

3.4. Bitki Ekstraktlarının Plazmit DNA Üzerine Etkileri

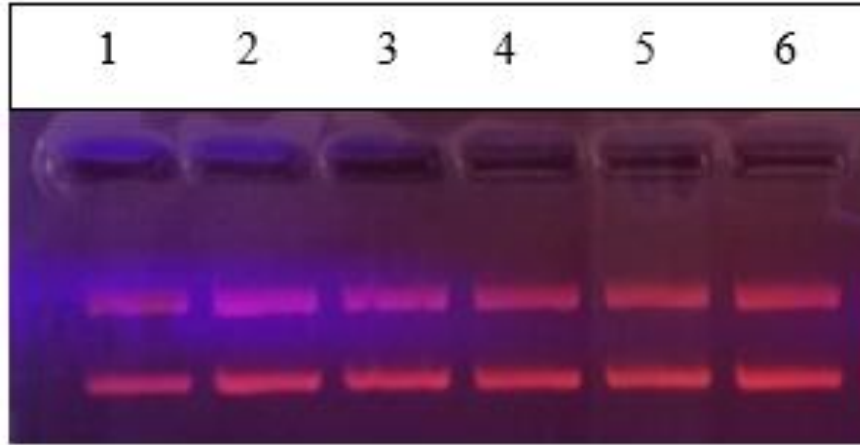
Şekil 6 ve 7'deki 1 ve 2 numaralı hatta bulunan örnekler kontrol gruplarını oluşturmaktadır. Şekil 6 ve 7 incelendiğinde, agaroz jel elektroforezi sonucunda bitki ekstraktları ile muamele edilen DNA'nın kontrol

grubuyla benzer olduğu görülmüştür. Yani her iki türümüzün farklı organları ile hazırlanan etanol, hekzan ve etil asetat ekstraktlarında herhangi bir nükleaz aktivite bulunamamıştır. Bu çalışmadaki her iki türün etanol, hekzan ve etil asetat ekstraktlarının antimikrobiyal dataları ile plazmit DNA üzerine etkisi dataları uyumludur. Yani bitki ekstraktlarının

antimikrobiyal aktivitesi görülmediği gibi plazmit DNA üzerine etkisi de görülmemiştir. Bitki ekstraktlarının plazmit DNA üzerinde herhangi bir etkisi görülmediğinden bu çalışmada, her iki inceleme türümüz için sadece etanol ekstraktlarının agaroz jel elektroforez görüntüleri verilmiştir.



Şekil 6. *Heliotropium suaveolens* etanol ekstraktlarının plazmit DNA üzerine etkisini agaroz jel elektroforez görüntüleri. 1= DNA kontrol, 2= DMSO kontrol, 3= gövde vejetatif evre, 4= gövde generatif evre, 5= yaprak vejetatif evre, 6= yaprak generatif evre, 7= kök vejetatif evre, 8= kök generatif evre, 9= çiçek.



Şekil 7. *Heliotropium myosotoides* etanol ekstraktlarının plazmit DNA üzerine etkisini agaroz jel elektroforez görüntüleri. 1= DNA kontrol, 2= DMSO kontrol, 3= vejetatif topraküstü, 4= vejetatif toprakaltı, 5= generatif topraküstü, 6= generatif toprakaltı.

4. Tartışma

Yapılan araştırmalarda, bitki türlerindeki fenolik bileşiklerin hem miktarlarında hemde çeşitlerinde farklılıklar gözlenmiştir (Santos ve ark., 2008). Bu yüzden farklı bitki türleri farklı antioksidan aktivite göstermektedir. *H. suaveolens* ve *H. myosotoides*'in bazı organlarının yüksek ve düşük antioksidan aktivite göstermesi fenolik bileşiklerin farklı organlarda farklı miktarlarda ve çeşitlerde olmasından kaynaklanmaktadır. En yüksek toplam fenolik içeriklere *H. suaveolens*'in vejetatif ve generatif gelişme periyotlarında kök ve çiçek ekstraktlarında, *H. myosotoides* de ise vejetatif gelişme periyodunda topraküstü ekstraktlarda bulunmuştur. Her iki inceleme

türünün diğer organlarında düşük miktarlarda toplam fenolik içerikler olduğu belirlenmiştir. Gelecek yıllarda özellikle *H. suaveolens*'in yüksek toplam fenolik içeriklere sahip olan vejetatif ve generatif gelişme periyotlarındaki kök ve çiçek ekstraktları doğal antioksidan kaynağı olarak kullanılabilir.

Bizim çalışmamızda elde edilen benzer antioksidan sonuçlara diğer *Heliotropium* türlerinde de rastlanmıştır. Radwan ve El-Shabasy (2020) tarafından birbirine morfolojik olarak benzer olan 5 *Heliotropium* türünün (*H. bacciferum*, *H. zeylanicum*, *H. longiflorum*, *H. pterokarpum* ve *H. jizanense*) biyokimyasal içerikleri ve antioksidan özellikleri karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. İncelenen türlerin farklı fenolik bileşiklere ve antioksidan

aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. En yüksek fenolik bileşikler *H. zeylanicum* ve *H. bacciferum* da bulunmuştur. En düşük fenolik bileşikler ise *H. longiflorum*, *H. pterocarpum* ve *H. jizanense* de tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre, en yüksek antioksidan aktivite *H. zeylanicum* (% 93) ve *H. bacciferum* (% 84) da görülürken, en düşük antioksidan aktivite *H. pterocarpum* da tespit edilmiştir. Bizim inceleme türlerimizden *H. suaveolens*'in vejetatif gelişme periyodundaki yaprak etanol ekstraktları, generatif gelişme periyodundaki yaprak ve çiçek etanol ekstraktlarının, vejetatif ve generatif gelişme periyotlarındaki kök, gövde, yaprak ve çiçek hekzan ekstraktlarının antioksidan aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre, gelecekte *H. suaveolens*'in vejetatif ve generatif gelişme periyotlarındaki yaprakları ve çiçeklerinin etanol ekstraktları, vejetatif ve generatif gelişme periyotlarındaki kök, gövde, yaprak ve çiçek hekzan ekstraktları doğal antioksidan kaynağı olarak daha fazla tercih edilebilir. Ayrıca *H. suaveolens*'in antioksidan özelliğe sahip olan organları parfümeri ve kozmetik sanayisinde değişik preparatların hazırlanmasında kullanılabilir. Al-Shekhany ve Al-Khesraji (2015) tarafından *H. suaveolens* türünün tam topraküstü ve yaprak, çiçek metanol ekstraktlarında 7 glikozit tespit edilmiştir. Bundan dolayı bu türün glikozit taşıyan organları bal üreticileri tarafından da kullanılabilme potansiyeline sahiptir. Diğer taraftan, *H. myosotoides*'in vejetatif ve generatif periyottaki topraküstü ve toprakaltı etanol ve hekzan ekstraktlarının düşük antioksidan aktiviteye sahip olduğu görülmüştür.

H. samolifolium Bunge subsp. *erzurumicum*'un Dönmez toprakaltı ve topraküstü kısımlarına hekzan, kloroform, etil asetat, etanol, etanol+su ve su uygulanmıştır (Sağlam ve Kandemir, 2020). *H. samolifolium* subsp. *erzurumicum*'un en yüksek fenolik madde içeriği topraküstü ve toprakaltı kloroform ve toprakaltı etanol+su ekstraktlarında hesaplanmıştır. En yüksek IC50 değerlerine topraküstü kloroform, etanol+su ve toprakaltı etanol ekstraktlarında rastlanmıştır. Bu sonuçlara göre, bu bitkinin topraküstü ve toprakaltı kloroform ve toprakaltı etanol+su ve etanol ekstraktlarının doğal antioksidan kaynağı olarak kullanılabilceği rapor edilmiştir. Bu çalışmadaki *H. suaveolens* ve *H. myosotoides*'in etanol ekstraktlarındaki antioksidan bulgularımızın Sağlam ve Kandemir (2020)'in antioksidan bulguları ile uyumlu olduğu belirlenmiştir.

Karakaya ve ark. (2019) tarafından Türkiye'de yetişen *H. dolosum*, *H. lasiocarpum* ve *H. hirsutissimum*'un antioksidan ve antikolinesteraz aktiviteleri incelenmiştir. En yüksek toplam fenolik madde içeriğine *H. lasiocarpum*, en düşük toplam fenolik madde içeriğine *H. dolosum* da tespit edilmiştir. Üç *Heliotropium* türünün antioksidan özelliğe sahip olduğu bulunmuştur. Ancak en yüksek aktivite *H. lasiocarpum*'da (69,99 µg/mL) görülmüştür. Ayrıca, *H. lasiocarpum* ekstraktları, sırasıyla

asetilkolinesteraz ve butirilkolinesteraz enzimlerine karşı önemli ölçüde inhibisyon göstermiştir. Araştırmadaki sonuçlara göre, bu üç *Heliotropium* türlerinin, antioksidan ve antikolinesteraz aktivitesine sahip farmasötik ürünler için etkili olabileceği rapor edilmiştir.

H. strigosum'un antioksidan özellikleri araştırılmıştır (Khurm ve ark., 2016). Bu çalışmada bitki ekstraktlarına diklorometan uygulanmıştır. *H. strigosum*'un diklorometan ekstraktlarının önemli antioksidan aktivite göstermediği rapor edilmiştir. Bizim inceleme türlerimiz olan *H. suaveolens* ve *H. myosotoides*'in vejetatif ve generatif periyottaki organlarının etil asetat ekstraktlarında da antioksidan aktiviteye rastlanmamıştır. Bu çalışmada her iki türün etil asetat ekstraktlarının antioksidan bulguları Khurm ve ark. (2016)'nın bulgularına benzerlik göstermektedir.

Al-Shekhany ve Al-Khesraji (2015) tarafından iki *Heliotropium* (*H. lasiocarpum* Fisch. et Mey. ve *H. suaveolens*) türünün antioksidan aktivitesi, alkolit ve glikozit içerikleri incelenmiştir. Bitki ekstraktları metanol ile hazırlanmıştır. Bu iki türün tam topraküstü kısımlarında, yaprak ve çiçek durumunda 8 alkolit ve 7 glikozit belirlenmiştir. Her iki türün çiçek durumunda en yüksek oranda heliotrin alkaloidine rastlanırken, gövde de en yüksek oranda lasiokarpin alkaloidine rastlanmıştır. *H. suaveolens*'in tam topraküstü kısımlarında (gövde, yaprak, çiçek) ise yüksek oranda lasiokarpin, heliotrin ve pirolizidin alkaloidlerinin olduğu tespit edilmiştir. *H. suaveolens*'in tüm topraküstü kısımlarının antioksidan aktivite gösterirken, sadece çiçek durumunun içerdiği ekstraktlarda antioksidan aktiviteye rastlanmamıştır. Bizim incelemede *H. suaveolens*'in çiçek etanol ve hekzan ekstraktlarının antioksidan aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur. Bu durumun, bizim çalışmamızda farklı organik çözücü kullanılmasından ve bitki türünün farklı ekolojik koşullarda yetişmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Çünkü farklı organik çözücüler bitki organlarında farklı sekonder metabolitleri ortaya çıkarmaktadır. Ayrıca farklı ekolojik koşullar bitki türlerinde biyoaktif bileşenlerin hem konsantrasyonunu hemde çeşidinin değişmesine neden olmaktadır. Örneğin; *H. curassavicum* L. da flavonoidlerin iç kısımlarda yayılış gösteren bireylerinde sahilde yayılış gösterenlere göre daha fazla biriktirildiği görülmüştür (Abd-ElGawad ve ark., 2019). Böylece iç kısımlarda yayılış gösteren bitkiler flavonoid ve bazı sekonder metabolitlerini artırarak stres koşullarına daha kolay uyum sağlayabilirler. Diğer taraftan, bitkilerdeki organlarının sekonder metabolit içerikleri onların büyüme dönemlerine bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Darcan ve ark. (2021) çiçeklenme ve tomurcuklanma dönemlerinde bitkilerin sekonder metabolit içeriklerinin nasıl değiştiğini ve mikroorganizmalar üzerinde nasıl etkilediğini incelemişlerdir. Araştırmacılar bitki olarak *Bituminaria bituminosa* L. var. *bituminosa* genotiplerini kullanmışlardır. Araştırmanın sonuçları incelendiğinde,

genotiplerin çiçeklenme aşamasından elde edilen ekstraktların tomurcuklanma aşamasından elde edilen ekstraktlardan bakteriler üzerinde (özellikle Gram pozitif bakteriler) daha etkili olduğu bulunmuştur (Darcan ve ark., 2021).

Fenoller, bitkisel antimikrobiyal ajanların en kalabalık grubunu oluşturmaktadır (Karau ve ark., 2007). Flavonoidler, Gram pozitif ve Gram negatif bakteriler üzerinde farklı etki göstermektedirler. Bu durum Gram pozitif ve negatif bakterilerin hücre duvarının farklı yapıda olmasından kaynaklanmaktadır. Çünkü antimikrobiyal mekanizmanın mikroorganizmaların dış membranında bulunan proteinleri ve iyon kanallarını etkileyerek aktivite göstermektedir. Ayrıca bazı alkaloitlerin bazı bakteriler (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* ve *Bacillus subtilis*) üzerinde geniş spekturumlu antimikrobiyal etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir (Cheesman ve ark., 2012).

Alhassan ve ark. (2018) tarafından Sudan da yayılış gösteren bazı tıbbi bitkilerin (*H. egyptiacium*, *H. sudanicum*, *Mimosa pigra* L., *Solaen stemma argrl* ve *Vangueria madagascariensis*) antimikrobiyal ve fotokimyasal özellikleri incelenmiştir. Bitki kısımları etanol ile ekstrakte edilmiştir. Antimikrobiyal incelemelerde, Gram pozitif (*Bacillus subtilis* NCTC 8236 ve *Staphylococcus aureus* ATCC 25923), Gram negatif bakteriler (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) ve iki fungi (*Apergillus niger* ATCC 9763, *Candida albicans* ATCC 7596) kullanılmıştır. *H. egyptiacium*, *H. sudanicum* etanol ekstraktlarının bakteriler ve funguslar üzerinde çok zayıf bir antimikrobiyal aktivite gösterdiği görülmüştür. Benzer sonuçlar Elegami ve ark. (2001) tarafından *H. egyptiacium*, *H. sudanicum*'un metanol ekstraktlarında da rapor edilmiştir. Ayrıca *H. egyptiacium*, *H. sudanicum* da alkaloitler, flavonoidler, saponinler, triterpenler, steroller, taninler ve kumarinler tespit edilmiştir. Bizim inceleme türlerimiz olan *H. suaveolens* ve *H. myosotoides*'in topraküstü ve toprakaltı organlarında antimikrobiyal aktivite görülmemiştir.

H. strigosum'un antimikrobiyal, sitotosik ve fitotoksik özellikleri araştırılmıştır (Khurm ve ark., 2016). Bu çalışmada bitki ekstraktlarına diklorometan uygulanmıştır. Bitki ekstraktlarının çalışmada kullanılan bakterilerden *Escherichia coli* ve *Pseudomonas aeruginosa* üzerine antibakteriyel aktivitesi görülmezken, *Staphylococcus aureus*, *Shigella flexneri* üzerine zayıf antibakteriyel aktivitesi gözlenmiştir. Ancak bitkinin diklorometan ekstraktları çalışmada kullanılan test fungusları (*T. rubrum*, *A. niger*, *F. solani*, *C. albicans* ve *M. canis*) üzerinde antifungal bir etki gösterememiştir. Sonuç olarak, Khurm ve ark. (2016) *H. strigosum*'un diklorometan ekstraktlarının antimikrobiyal aktiviteye sahip olmadığını rapor etmişlerdir. Bizim çalışmamızda *H. suaveolens* ve *H. myosotoides* ekstraktlarından elde edilen antimikrobiyal sonuçlarımız Khurm ve ark. (2016)'nın antimikrobiyal sonuçları ile uyumlu olduğu

tespit edilmiştir. Ayrıca Khurm ve ark. (2016) *H. strigosum*'dan başta pirolizidin alkaloitleri, terpenoidler ve flavonoidler olmak üzere farklı organik bileşik gruplarının izolasyonu ve saflaştırılması, bu bitkinin antibakteriyel tıbbi ajanlar alanında gelecek yıllarda bir rolünün olabileceğini rapor etmişlerdir. Bu nedenle gelecek yıllarda *H. strigosum* küresel olarak daha güvenli bitki sağlığı kaynağı olarak kullanılacağı belirlenmiştir. Bizim inceleme türlerimizden *H. suaveolens*'in tüm topraküstü kısımların da yüksek oranda lasiokapın, heliotrin ve pirolizidin alkaloitlerinin, yapraklarında lasiokapın, heliotrin, insidin ve çiçek durumunda ise heliotrin alkaloidi olduğu tespit edilmiştir (Radwan ve El-Shabasy, 2020). Bundan dolayı, gelecek yıllarda *H. suaveolens*'in generatif gelişme periyodundaki yaprak ve çiçek durumunda bulunan alkaloitlerin saflaştırılarak bakteri ve mantar kaynaklı hastalıkların tedavisinde kullanılabilceğini düşünüyoruz.

H. samolifolium subsp. *erzurumicum*'un topraküstü ve toprakaltı kısımları hekzan, etanol, etanol+su, su, kloroform, etil asetat gibi çözücülerde ekstrakte edilmiştir. Topraküstü hekzan ekstraktlarının sadece *E. coli*, topraküstü etanol+su ekstresinin *P. aeruginosa*, topraküstü su ekstraktının *M. luteus* ve topraküstü kloroform, etilasetat, etanol ve su ekstraktlarının ise *C. albicans* üzerinde antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu görülmüştür (Sağlam ve Kandemir, 2020). *H. samolifolium* subsp. *erzurumicum*'un bütün toprakaltı ekstraktlarının *C. albicans* üzerinde antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu, toprakaltı etilasetat ekstraktlarının sadece *S. aureus* üzerinde, toprakaltı etanol ekstraktlarının ise *S. aureus*, *P. aeruginosa* ve *M. luteus* üzerinde güçlü bir antimikrobiyal aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Alttürün hem topraküstü hemde toprakaltı ekstraktları *C. albicans* üzerinde önemli bir antimikrobiyal aktivite göstermiştir. Özellikle bitkinin toprakaltı etanol ekstraktı araştırmada kullanılan dört bakteriden sadece *E. coli* üzerinde mikrobiyal aktivite gösteremezken, diğer bakteriler ve maya üzerinde antimikrobiyal aktiviteye sahiptir. Sağlam ve Kandemir (2020) *H. samolifolium* subsp. *erzurumicum*'un özellikle toprakaltı etanol ekstraktının Gram pozitif ve negatif bakteriler ve maya mantarı kaynaklı hastalıkların tedavisinde kullanılabilceğini önermişlerdir.

H. filifolium (Miers) Reiche'dan izole edilen sekonder metabolitler Gram pozitif ve Gram negatif bakterilere uygulanmıştır. Bu sekonder metabolitlerin Gram pozitif bakteriler üzerinde antimikrobiyal aktivite göstermesine rağmen, bu metabolitlerin Gram negatif bakteriler üzerinde inaktif bir aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Urzuva ve ark., 2008). Bu durum Gram pozitif ve negatif bakterilerin hücre duvarı yapılarının farklı olmasından kaynaklanmaktadır (Puupponen ve ark., 2001). Şöyleki, Gram pozitif bakteriler hücre zarında geniş bir peptidoglikan tabakaya sahiptirler. Bu peptidoglikan tabaka mekanik etkilere karşı oldukça dayanıklıdır. Ayrıca Gram pozitif bakterilerin zarında doğal direç de önemli rol oynayan aktif pompa proteinleri de

bulunmaktadır. Gram negatif bakteriler ise ikinci bir dış zara (lipopolisakarit yapıda) ve ince peptidoglikan tabakaya sahiptirler (Navarre ve Schneewind, 1999). Bu lipopolisakarit yapıdaki tabaka Gram negatif bakterilerin ozmotik basınca karşı dayanıklılığını ve patojen etkilerini artırmaktadır (Hasdemir, 2007). İnceleme türlerimizin farklı organlarından elde edilen ekstraktlar çalışmada kullanılan Gram pozitif ve negatif bakteriler ve maya üzerinde herhangi bir antimikrobiyal etki gösterememiştir. Bu durum, çalışmada kullanılan bakterilerin hücre duvarı yapısından, bitki ekstraktlarındaki sekonder metabolitlerin konsantrasyonlarından ve farklılığından kaynaklanabilir. Ayrıca çalışmamızda kullanılan Gram pozitif ve negatif bakterilerin hücre duvar yapıları güçlü olduğundan bu bitki türlerinden elde edilen ekstraktlar bu bakteriler üzerinde antimikrobiyal etki gösterememiştir.

H. dasycarpum L.'un metanol ve diklorometan ekstraktları bazı Gram pozitif ve Gram negatif bakterilere uygulanmış ve bitki ekstraktlarının her ikisinde Gram pozitif ve Gram negatif bakterilerde inaktif bir antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu görülmüştür. Bu bitkinin metanol ekstraktlarının çalışmada kullanılan mantarlardan sadece *Microsporum canis* üzerinde düşük bir antifungal aktivite göstermiştir (Gaffari ve ark., 2013). Bu çalışmada fungus olarak *C. albicans*, *Aspergillus flavus*, *Fusarium solani*, *C. glabrata* kullanılmıştır. Bizim bu çalışmadaki antimikrobiyal bulgularımız Gaffari ve ark. (2013)'nin antimikrobiyal bulguları ile uyum içerisindedir. Bu durum her iki çalışmada benzer organik çözücü kullanılmasıyla kaynaklanabilir.

H. bacciferum Forssk.'un kök, gövde ve yapraklarına metanol, n-hekzan, etil asetat, n-bütanol ve su uygulanarak ekstraktlar hazırlanmıştır (Ahmad ve ark., 2015). *H. bacciferum*'un kök, gövde ve yapraklarında saponinler, alkaloitler, terpenoitler, steroidler, taninler, glikozitler, flavonoidler ve fenollere rastlanmıştır. *H. bacciferum*'un n-hekzan, n-bütanol, etilasetat ve su ekstraktlarının *E. coli*, *S. typhi*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. carotovora*, *K. pneumoniae*, *B. atrophaeus* ve *B. subtilis* üzerinde antimikrobiyal aktivite gösterdiği bulunmuştur. Ancak n-bütanol ekstresi *S. aureus* ve su ekstreside *B. subtilis* üzerinde inaktif özellik göstermiştir. Ayrıca *H. bacciferum*'un yukarıda belirtilen ekstraktları farklı konsantrasyonlarda *C. albicans*, *Fusarium solani*, *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *Trichoderma longibrachiantum* gibi funguslara uygulanmış ve antifungal aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir. *H. bacciferum*'un kök, gövde ve yapraklarından elde edilen ekstraktların bakteri ve funguslar üzerinde antimikrobiyal aktivite gösterip göstermemesi, bu bitkideki sekonder metabolitlerin farklı konsantrasyonlarda ve çeşitlerde olmasından, farklı organik çözücülerin ve metotların kullanılmasıyla kaynaklanmaktadır.

H. bacciferum'un gövde ve yaprak ekstraktları dietil eter, etil asetat ve metanol ile hazırlanmıştır (Najeeb ve ark., 2020). Çalışmada, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *B.*

subtilis bakterileri ve *C. albicans* kullanılmıştır. *H. bacciferum*'un dietil eter yaprak ekstraktları bakterilere karşı yüksek bir antibakteriyal aktivite gösterirken, dietil eter ve etil asetat gövde ekstraktları ise bakterilere karşı antibakteriyal aktivite gösterememiştir. Etil asetat yaprak ekstraktları *E. coli* ve *B. subtilis*'e karşı orta derecede bir antibakteriyal aktiviteye sahip olurken, *P. aeruginosa*, *S. aureus*'a karşı inaktif antibakteriyal aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir. *H. bacciferum*'un metanol yaprak ekstraktları sadece *E. coli* üzerinde antibakteriyal aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Hem yaprak hemde gövde metanol ekstraktları çalışmada kullanılan diğer bakterilere karşı bir antibakteriyal aktivite gösterememiştir. Dietil eter, etil asetat ve metanol yaprak ve gövde ekstraktları *C. albicans* üzerinde değişik antifungal aktivite sergilemiştir. Kısacası, *H. bacciferum*'un etil asetat ve metanol gövde ve yaprak ekstraktları bakterilere karşı iyi bir antibakteriyal aktivite yapmadığı belirlenmiştir. Bizim çalışmamızdaki etil asetat ekstraktlarından elde edilen sonuçlar Najeeb ve ark. (2020)'nin elde ettiği sonuçlarla uyumlu olduğu görülmüştür.

5. Sonuç

H. suaveolens'in antioksidan özelliğe sahip olan organlarından elde edilen etanol ve hekzan ekstraktları doğal antioksidan kaynağı olarak kullanılabilir. Ayrıca *H. suaveolens* içerdiği glikozit ve alkaloitlerden dolayı parfümeri ve kozmetik sanayisinde değişik preparatların hazırlanmasında ve içerdiği glikozitlerden dolayı bal üreticileri için tercih edilebilir.

H. myosotoides'in topraküstü ve toprakaltı organlarındaki sekonder metabolitler en kısa zamanda tespit edilip dolaman mantarının indikatörü olarak kullanılabilir. Çünkü dolaman mantarı toprak altında olduğundan insanların bulması güçleşmektedir. İlaveten bu mantar *H. myosotoides*'in yayılış gösterdiği topraklarda yetişmektedir. *H. suaveolens* ve *H. myosotoides*'in organlarından elde edilen etanol, hekzan ve etil asetat ekstraktlarının antimikrobiyal aktivitesi ve plazmit DNA üzerine etkisi görülmemesine rağmen, bu bitki türlerinin yapısında var olan sekonder metabolitler saflaştırılarak gelecek yıllarda mantar ve bakteri kaynaklı yeni antimikrobiyal ilaçların yapımında etkin rol oynayacaktır. Bütün bunlar ülke ekonomisine önemli katkılar sağlayacaktır. Araştırma materyali olarak seçilen *Heliotropium* türleri üzerinde henüz böyle bir çalışma yapılmadığından dolayı, bu çalışmadan elde edilen bulgular *Heliotropium* cinsi ile yapılacak olan diğer çalışmalara bir basamak oluşturacaktır.

Katkı Oranı Beyanı

N.K. (%100) araştırmayı planladı, bitki örneklerini teşhis etti ve (%50) makalenin yazma işlemini gerçekleştirdi. Ş.K. (%100) bitki örneklerini yayılış gösterdikleri alanlardan topladı ve kurutma işlemlerini yapmıştır. E.Ç. (%50) bitki örneklerini analizlere hazırladı ve (%100) örneklerin antimikrobiyal özellikleri ile ilgili deneyleri

yapmıştır. U.Ç. (%50) bitki örneklerini analizlere hazırladı ve (%100) örneklerin antioksidan özellikleri ile ilgili deneyleri yürütmüştür. Ö.İ. (%100) bitki örneklerinin DNA analizlerini yaptı ve (%50) makalenin yazılmasında yardımcı olmuştur. Yazarlar makalenin son halini inceleyip onaylamıştır.

Çatışma Beyanı

Yazarlar bu çalışmada herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan etmektedirler.

Teşekkür

Bu çalışmada kullanılan veriler Amasya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenen FMB-BAP 19-0390 nolu projeden alınmıştır.

Etik Beyanı

Bu çalışmada, “Yükseköğretim Kurumları Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesi” kapsamında uyulması gerekli tüm kurallara uyulduğunu, bahsi geçen yönergenin “Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiğine Aykırı Eylemler” başlığı altında belirtilen eylemlerden hiçbirinin gerçekleştirilmediğini taahhüt ederiz.

Kaynaklar

Abd-ElGawad AM, Elshamy AI, Al-Rowaily SL, El-Amier YS. 2019. Habitat affects the chemical profile, allelopathy, and antioxidant properties of essential oils and phenolic enriched extracts of the invasive plant *Heliotropium curassavicum*. *Plants*, 8: 482-494.

Ahmad S, Ahmad S, Bibi I, AbdEl-Salam N M, Hussain H, Ishaq M S, Adnan M, Tariq A, Ullah R. 2015. Antibacterial and antifungal activities of the extract and fractions of aerial parts of *Heliotropium bacciferum*. *Afr J Tradit Complement Altern Med*, 12: 32-35.

Alhassan MS, Koko WS, Khalid HS. 2018. Evaluation of antimicrobial, antioxidant and phytochemical screening of some Sudanese medicinal plants. *Int J Multidiscip Res Dev*, 5: 35-39.

Al-Shekhany YNM, Al-Khesraji TO. 2015. Alkaloid and glycoside contents and antioxidant activity of two *Heliotropium* species (Boraginaceae) from Kurdistan Region-Northern Iraq. *J Garmian Uni*, 963-979.

Arslan I, Çelik A. 2013. Saponin Rich Fractions (SRPs) from Soapwort Show Antioxidant and Hemolytic Activity. *APCBEE Procedia*, 7: 103-108

Ayar E, Kandemir N, Kandemir Ş, Çelikoğlu U, İdil Ö. 2020. Investigation of Some Biological Activities of Extracts *Centranthus longiflorus* subsp. *longiflorus*. *Int J Second Metab*, 7: 253-265.

Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol*, 45: 493-496.

Candela RG, Roselli S, Bruno M, Fontana G. 2021. A review of the phytochemistry, traditional uses and biological activities of the essential oils of genus *Teucrium*. *Planta Med*, 87: 432-479.

Cheesman L, Nair JJ, Van-Staden J. 2012. Antibacterial activity of crinane alkaloids from *Boophone disticha* (Amaryllidaceae). *J Ethnopharmacol*, 140: 405-408.

Darcan C, Kaygusuz Ö, Leblebici S, Gülümser E, Acar Z. 2021. Antimicrobial activity of leaf extracts of *Bituminaria* sp.

genotypes at different growth stages. *Indian J Exp Biol*, 59: 302-309.

Davis PH. 1978. Flora of Turkey and the east Aegean Island. In: Rield H, editor. *Heliotropium* L. Edinburg University, Edinburg, 6th ed., pp. 248-255.

Elegami AA, Almagboul AZ, Omer MEA, El Tohami MS. 2001. Sudanese plants used in folkloric medicine: Screening for antibacterial activity. Part X. *Fitoterapia*, 72: 810-817.

Gaffari MA, Bano S, Hayat K. 2013. Antimicrobial and phytotoxic effects of the plant *Heliotropium dasycarpum* L. *Int. J Pharma Bio Sci*, 4: 339-345.

Galvez M A. 2015. Evaluation of DPPH Free Radical Scavenging Activity and Phytochemical Screening of Selected Folkloric Medicinal Plants in Tinoc, Ifugao, Cordillera Administrative Region, Philippines. *Int J Sci Res Publ*, 5: 440-445.

Ghori MK, Ghaffari MA, Hussain SN, Manzoor M, Aziz M, Sarwer W. 2016. Ethnopharmacological, Phytochemical and Pharmacognocic Potential of genus *Heliotropium* L. *Türk J Pharm Sci*, 13: 259-280.

Goyal N, Sharma S Kr. 2014. Bioactive phytoconstituents and plant extracts from genus *Heliotropium*. *Int J Green Pharm*, 16: 217-225.

Graser G, Witte L, Robins DJ, Hartmann T. 1988. Incorporation of chinally deterated putrescines into pyrrolizidine alkaloids: A reinvestigation. *Phytochemistry*. 47: 1017.

Güner N. 1986. Alkaloids from *Heliotropium suaveolens*. *J Nat Prod*, 49: 369.

Güner A, Aslan S, Ekim T, Vural M, Babaç M T. 2012. Türkiye Bitkileri Listesi (Damarlı Bitkiler). In: Güner A, Aslan S, Ekim T, Vural M, Babaç M T, editors. *Heliotropium* L. Nezahat Gökyiğit Botanik Bahçesi ve Flora Araştırmaları Derneği, İstanbul, pp. 227-228.

Hasdemir U. 2007. Çoklu ilaç direncinde bakteri hücre duvarı organizasyonu ve aktif pompa sistemlerinin rolü. *Mikrobiyol Bül*, 41: 309-327.

Herken EN, Çelik A, Aslan M, Aydınlık N. 2012. The constituents of essential oil: antimicrobial and antioxidant activity of *Micromeria congesta* Boiss. & Hausskn. Ex Boiss. from East Anatolia. *J Med Food*, 5: 835-839.

Kandemir N, Çelik A, Shah SN, Razzaq A. 2020. Comparative micro-anatomical investigation of genus *Heliotropium* (Boraginaceae) found in Turkey. *Flora*, 262, 151495.

Karakaya S, Koca M, Kılıç CS. 2019. Antioxidant and anticholinesterase activities of *Heliotropium dolosum*, *H. lasiocarpum* and *H. hirsutissimum* growing in Turkey. *Erzincan Üniv Fen Bilim Enst Derg*, 12: 1381-1391.

Karau D, Nadembega W M C, Ouattara L, Ouattara L, Ilboudo DP, Canini A, Nikiema J B, Simpore J, Colizzi V, Traore AS. 2007. African ethnopharmacology and new drug discovery. *Med Aromat Plant Sci Biotechnol*, 1: 560-569.

Khurm M, Chaudhry BA, Uzair M, Janbaz KH. 2016. Antimicrobial, Cytotoxic, Phytotoxic and Antioxidant Potential of *Heliotropium strigosum* Willd. *Medicines*, 3: 20-30.

Mavi A, Terzi Z, Özgen U, Yıldırım A, Coşkun M. 2004. Antioxidant properties of some medicinal plants: *Prangos ferulacea* (Apiaceae), *Sedum sempervivoides* (Crassulaceae), *Malva neglecta* (Malvaceae), *Cruciata taurica* (Rubiaceae), *Rosa pimpinellifolia* (Rosaceae), *Galium verum* subsp. *verum* (Rubiaceae), *Urtica dioica* (Urticaceae). *Biol Pharm Bull*, 27: 702-705.

Najeeb TM, Musa AE, Khider TO. 2020. Antibacterial and antifungal activities of *Heliotropium bacciferum* Forssk leaves and stem. *Adv Biol Res*, 14: 1-7.

Navarre WW, Schneewind O. 1999. Surface proteins of Gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell

- Wall envelope. *Microbiol Mol Biol Rev*, 63: 174-179.
- Puupponen PR, Nohynek L, Meier C, Kahkonen M, Heinonen M, Hopia A, Oksman-Caldentey KM. 2001. Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. *J Appl Microbiol*, 90: 494-507.
- Radwan DE, El-Shabasy AE. 2020. Comparative Analysis of Five *Heliotropium* species in Phenotypic Correlations, Biochemical Constituents and Antioxidant Properties. *Catrina*, 21: 1- 8.
- Roy A. 2015. Pharmacological activities of Indian Heliotrope (*Heliotropium indicum* L.): A review. *J Pharmacogn Phytochem*. 4: 101-104.
- Sağlam G, Kandemir N. 2020. Comparison of Biological and Antioxidant Activities of Above and Below-Ground Extracts of Endemic *Heliotropium samolifolium* subsp. *erzurumicum*. *KSU J Agric Nat*, 23: 1054-1063.
- Santhosha D, Ramesh A, Hemalatha E, Nagulu M. 2015. Phytochemical screening and anti-oxidant activity of ethanolic extract of *Heliotropium indicum*. *Int Res J Pharm*, 6: 567-572.
- Santos LDT, Thadeo M, Iarema L, Meira RMSA, Ferreira FA. 2008. Foliar anatomy and histochemistry in seven species of *Eucalyptus*. *Rev Árvore*, 32: 769-779.
- Shazly A El, Wink M. 2014. Diversity of pyrrolizidine alkaloids in the Boraginaceae structures, distribution and biological properties. *Divers*, 6: 188-282.
- Shoge MO, Ndukwe GI, Amupitan J. 2011. Phytochemical and antimicrobial studies on the aerial parts of *Heliotropium indicum* Linn *Ann Biol Res*, 2: 129-136.
- Singh B, Sahu PM, Singh S. 2002. Antimicrobial activity of pyrrolizidine alkaloids from *Heliotropium subulatum*. *Fitoterapia*, 73: 153-155.
- Urzúa A, Echeverría J, Rezende MC, Wilkens M. 2008. Antibacterial Properties of 3 H-Spiro [1-benzofuran-2, 1'-cyclohexane] Derivatives from *Heliotropium filifolium*. *Molecules*, 13: 2385-2393.
- Yesmin B. 2014. Antibacterial, antioksidant and cytotoxic activities of *Heliotropium indicum*. *Experiment*, 23: 1564-1569.



HAZARD IDENTIFICATION AND RISK ANALYSIS IN REBAR ROLLING PLANT

Ayşenur USLU¹, Gül USLU^{2*}

¹Sinop University, Health Science Faculty, Occupational Health and Safety Department, 57000, Sinop, Türkiye


²ISO 45001 Baş Denetçisi, İş Güvenliği Uzmanı, 57000, Sinop, Türkiye


Abstract: Employees are constantly in action for the production of goods and services in workplaces. These workplace activities affect the physical and mental health of the employees and cause occupational accidents. Elimination of these negativities is possible with the implementation of occupational health and safety services. Safety organisation is also very important in steel rolling mills so that employees are not exposed to danger. As in any other industry, steel rolling mill workers work with dangerous machinery that causes injury, disability and death. Safe working is an integral part of risk management. Risk management is the process of taking and implementing action to reduce the possibility of an assessed risk occurring. Therefore, known or tolerable risks are managed. In safe workplaces, productivity is high, work accidents and occupational diseases are low. Safe workplaces are only possible with risk management. In this study, the rolling mill area of a workplace producing rebar with the Fine-Kinney Method was analysed and the necessary precautions were listed. These measures are generally listed as; implementation of control protocols for the routine operation of the process, providing necessary occupational health and safety training for the personnel, providing the necessary information, repeating the training at regular intervals, following up the protective clothing and equipment to be used in the process, maintenance/repair of the units and the tools used. As a result of these measures, the degree of risk will be reduced to acceptable levels.

Keywords: Rebar, Steel rolling mill, Occupational health and safety, Fine kinney method, Risk management

*Corresponding author: ISO 45001 Baş Denetçisi, İş Güvenliği Uzmanı, 57000, Sinop, Türkiye

E mail: gulluslu@gmail.com (G. USLU)

Ayşenur USLU  <https://orcid.org/0000-0001-5103-9405>

Gül USLU  <https://orcid.org/0000-0002-3691-2111>

Received: April 12, 2022

Accepted: May 10, 2022

Published: July 01, 2022

Cite as: Uslu A, Uslu G. 2022. Hazard identification and risk analysis in rebar rolling plant. BJS Eng Sci, 5(3): 109-115.

1. Introduction

Due to its high strength, steel is used in all construction works (infrastructure and superstructure), transportation vehicles (ships, trains, cars, etc.), electrical devices and machines, and the weapon industry. The steel used in the construction industry is used as the skeleton of the structure in order to increase the strength of the concrete. While concrete is being used, it remains under tensile and compressive forces. Although the compressive strength of concrete is high, its tensile strength is quite low. Therefore, the concrete that cannot withstand the tensile force cracks. In order to prevent the formation of these cracks and to increase the resistance against tensile strength, steel rods called reinforcement are placed in the concrete. This new element formed is called reinforced concrete. In reinforced concrete, concrete and steel must work together; otherwise the structural element will crack and collapse will occur. Steel has another advantage in the reinforced concrete element; The expansion coefficients of concrete and steel are very close to each other and thermal stresses will not occur in the building element in case of temperature change (Chevreau, 2008). The steel rods used in reinforced concrete are called passive reinforcement, and the steel used in prestressed concrete is called active

reinforcement since the structure is stretched before being subjected to loading. Passive reinforcement should be high in tension and ductile in order to be easy to form. Rebars used in the construction industry are obtained by rolling billets. These billets are obtained from iron ore through blast furnace converters or by melting scrap materials in crucibles. Rebars are produced as round or ribbed with intrusions on the surface. The main purpose of the intrusion is to increase the adherence with the concrete. This adherence is vital for structures against large impact loads during an earthquake (Hafida et al., 2017).

Two common processes are used in steel production: basic oxygen steelmaking (BOS) and electric arc furnace (EAF) steelmaking. In the BOS process, iron ore is first melted in a smelting furnace and transferred to the converter to become steel. After high-speed spraying of oxygen, impure elements are removed and conversion to steel occurs. Because the investment cost is very high, the BOS process is used in large steelmaking businesses with an annual output of several million tons (Hammi and Bouacheria, 2015).

The EAF process, in which scrap is used as raw material for steel production, is a preferred production process today due to its contribution to the environment. Scrap



metal is first cut to be melted and brought to the furnace. In the furnace, the scrap is melted by giving heat through the electrodes. Since 0.5-1 million tons of steel is produced annually with the EAF process, it is especially ideal for small-scale production processes where rebar is produced. The EAF process is linked to a specialist rolling

mill capable of producing reinforced concrete bars (Kumar, 2021). As a result of such production, the rebar cooled in the cooling beds is packed for delivery and sent to the area to be built. It is installed in the area where the concrete will be poured by cutting and shaping in accordance with the project by the employees (Figure 1).

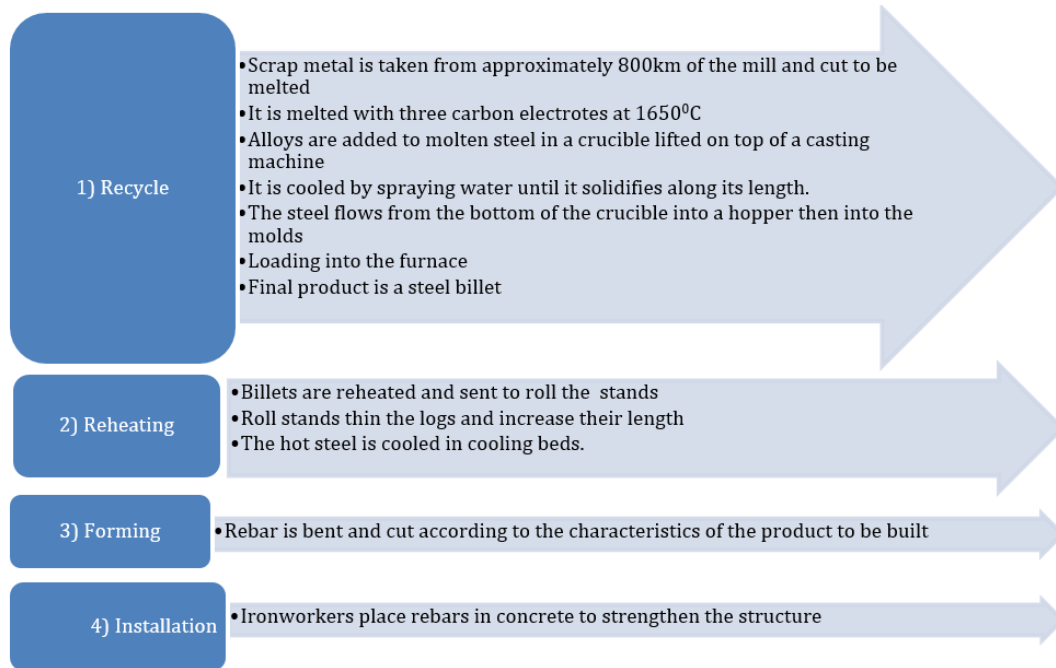


Figure 1. Process flow chart for rebar obtained from steel scraps.

1.1. Definition of Rolling Process

Rolling is used to shape ferrous and non-ferrous metals. The rolled shapes of metals can be like a plate, beam, channel, rail, angle iron, flat and ribbed bar. In the rolling process, the steel is passed between rotating cylindrical rollers (rolls) and plastic deformation is provided (Seuren et al., 2014). There is a fixed distance between the rollers and the system is rotated by the drive system consisting of motor, gearbox, shaft and coupling (Caprilli et al., 2021). The distance between the rolls is less than the thickness of the entering material, and the material entering from one side comes out thinner from the other side. In order for the material to take the desired final shape, it may be necessary to pass it through the rolls several times (Groche et al., 2010).

Hot and Cold Rolling Processes: According to the processing temperature, rolling is classified into two categories as (i) hot rolling and (ii) cold rolling:

Hot rolling: During this process, the material is rolled above its recrystallization temperature. This has two advantages. Since the deformation capacity of the material will increase at the specified temperature, less force will be applied and a smaller rolling stand will be enough. The second advantage is that the desired deformation can be obtained without hardening (Utsunomiya et al., 1998).

Cold rolling: In cold rolling, in contrast to hot one, the material is formed below the recrystallization temperature or at room temperature. Since strain

hardening occurs during this process, the degree of deformation of the material increases, while its strength also increases. This type of rolling is used to produce flat products such as plates, sheets and strips (Ray, 2016).

1.2. Hazards in Steel Production Workplaces

The steel production sector contains many hazards and risks such as crushing, injury and burning. Therefore, safe working procedures are important. Especially in recent years, many steel companies have adopted a zero work accident and occupational disease policy (Basu et al., 2004). The reason for this is not only the result of a conscientious responsibility or awareness. This is also a legal requirement. Therefore, many steel production companies are in search of excellence in occupational safety. The aim is to achieve zero accidents, zero occupational disease, zero loss of working days, and zero economic loss points (Zhang and Bay, 1997).

The current hazards to which workers in the iron and steel industry are exposed are generally as follows:

1. Physical hazards (noise, vibration, extreme temperatures, ionising and non-ionising radiation, insufficient lighting, insufficient ventilation)
2. Chemical hazards (vapours, gases, dusts and fumes, exposure to carbon monoxide (CO) gas, exposure to asbestos, contact with irritants, solvents, sensitizers and volatile organic carbon).
3. Ergonomic hazards (manual lifting and repetitive work)
4. Falling from high (slips, trips, falling from high and

- from the same level, falling objects)
- 5. Electrical hazards (receive electric shock)
- 6. Fire hazard (burns due to accidental contact with hot molten metal, unprotected machinery, fire and explosion)
- 7. Hazards due to lack of organization and supervision (lack of effective supervision regarding the use of personal protective equipment (PPE), inadequate workplace inspections and accident/incident prevention programs, inadequate occupational health and safety training, and lack of effective communication and coordination between various occupational groups)
- 8. Hazards related to cooling water quality (algae, exposure to pathogens (legionella) (Vivek et al., 2015).

In this study, a risk analysis was carried out using the Fine-Kinney Method for risk assessment in the rolling mill section of a facility that produces construction equipment by hot rolling. The scores obtained according to the risk analysis were ordered from high to low and suggestions were made in order to provide a safe working environment for the employees. If the suggestions presented are carried out, the value at which the risk score will decrease has been recalculated.

2. Material and Methods

2.1. Workspace and Workflow Chart

In the facility chosen as the working area, the drawing-rolling of the reinforcements used in the constructions is carried out. The facility has approximately 1500 employees. The facility has a daily production capacity of approximately 6000 tons of steel billets in its foundry and 4000 tons of ribbed and flat round rebar in its rolling mill. Flat and ribbed reinforcing steel with a diameter of 8 - 40 mm is produced at the facility.

In the production of flat and ribbed rebar with a diameter of 8-40 mm; 130x130, 140x140, 150x150 mm steel billets are used. Iron billets, which have been calculated and cut according to their quality and length, are subjected to the annealing process in the furnace using natural gas as fuel. During this process, the oven is heated up to 1150°C-1300°C. The furnace is a push type furnace; (the logs are stacked side by side and pushed towards the exit with a hydraulic pusher) the annealing time is between 2.5 and 3 hours on average for a billet. In order to obtain the necessary heat for this, natural gas and the air coming from the furnace fan are combined in the burner to burn.

The billets coming to the rolling mill with trucks are brought to the area to be stacked with gantry cranes. Lifting magnets are used in cranes to lift billets. The fact that the magnets have been preferred in such a way as to prevent the deterioration of their magnetism even if the electric current is cut off, is very important for the safety of the log and the safety of the employees. There is a very strong electromagnet field around the magnet and in this way the billets are lifted by the gantry crane and brought

to the annealing furnace (Bluff, 2014).

Billet irons, which became incandescent in the annealing furnace in the rolling mill, undergo crushing, drawing and elongation deformation in various rolling stands. Since the width of the annealing furnaces in the rolling mills is usually 6 m; the 12 m long billets coming from the steel mills or through imports must be cut to length. This cutting process is done with an oxy-LPG cutting apparatus if the billet is cold, and with hydraulic shears if it is directly incandescent in connection with the steelworks. The cut logs are pushed into the annealing furnace with the help of a mechanism (Lohmar et al., 2014).

The flattened material is then drawn in the system with 6 rolling stands. After leaving this system, there is an intermediate group rolling stand, which consists of two stands. Intermediate group pre-bench material again enters the cutting shears. After the intermediate group stand, there is the finishing rolling stand group. After this group rolling stand, the construction rods take their final shape (Ikumapayi et al., 2020).

The rods, which take their final shape, enter the Thermex unit, where the outer surface hardens and the core part retains its hardness. Pressurised water with a temperature of about 20°C circulates in this unit. After the Thermex unit, there are flying shears. The flying shears allow the material to be cut in accordance with the length of the cooling platform. The cooling platform is a scalloped mechanism in which the rolled and brought to the desired diameter construction bar is cooled (Jenkouk et al., 2012).

The material coming to the cooling platform goes through quality control. Various tests are made on the material and its dimensions are checked (Figure 2). The irons coming out of the platform are cut in 12 m lengths by cold shears. From here, the irons coming to the transfer table are counted and the number that should be in the package is adjusted. The irons are packed in flat or hairpins and brought to the stock area or shipped directly for sale (Hirt and Senge, 2014).

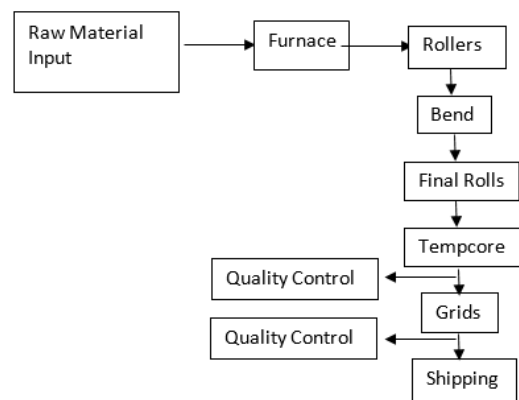


Figure 2. 8-40 mm diameter straight and reformed rebar work flow chart.

2.2. Fine-Kinney Method

In this study, the precautions that can be taken by carrying out a risk analysis study were evaluated in order to prevent work accidents and occupational diseases that may occur in rolling mills during the production of rebars used in rebar structures. Fine-Kinney method was used for risk analysis. This method was first suggested by Fine in 1971 (Fine, 1971), then it was reconsidered by Kinney and Wiruth in 1976 and turned into a more detailed risk analysis method (Kinney and Wiruth, 1976).

Much as these resources are old, it is still a method that experts and analysts use actively. In the method, the risk score (R) is obtained by multiplying the three risk factors; these are Frequency (F), Probability (P) and Intensity (I). its formula is: $R = F * P * I$.

The greater the exposure to a potentially hazardous situation, the greater the risk, of the factors required for calculating the risk score in Table 1, Table 2, Table 3 and Table 4. To ensure this, a value of 1 is assigned to an extremely rare exposure, perhaps only a few times a year. A value of 10 is assigned for continuous exposure (Table 1).

For Probability factors, they range from a value of 10 for an almost impossible event to a value of unity for an unexpected but remotely probable event, and a value of 10 for an expected event (Table 2).

Damage from a dangerous event can range from minor damage that is barely noticeable to catastrophic. This very wide range is accepted as a range exceeding twenty years in numerical values. Thus, a reference value of 1 for detectable and 100 for disaster is assigned (Table 3).

Risk score 20 represents an accepted low-risk situation. Such a risk is much less than the risks we normally accept in everyday situations, for example, when driving to work, mowing the lawn with a lawn mower or riding a bicycle for exercise. A condition with a risk score between 70 and 200 is a condition with significant risk for which correction is necessary. A risk score between 200 and 400 indicates that correction is urgently needed. A very high risk score above 400 indicates a situation so risky that stopping the operation should be considered, at least until temporary measures are taken to remedy the deficiency or if the operation cannot be made safe, perhaps permanent shutdown may be necessary (Table 4).

Table 1. Frequency classification

Frequency (F)	F Value
Continually	10
Frequently (Once a day)	6
Occasionally (Once a week)	3
Not Often (Once a month)	2
Infrequent (several times a year)	1
Very Rare (Annually or less frequently)	0.5

Table 2. Probability classification

Probability (P)	P Value
Expected / Certain	10
Quite possible (50%-50%)	6
Infrequent but possible	3
Low probability but possible	1
Very unlikely, not expected	0.5
Practically Impossible	0.2
Almost impossible	0.1

Table 3. Severity classification

Severity (S)	S Value
A Disaster with Many Deaths	100
Accident involving multiple death	40
Very Serious Injury which may cause Death.	15
Serious injury (limb loss, permanent health problems/incapacity)	7
Significant Injury (external first aid required)	3
Minor Injury, need first aid	1

Table 4. Risk classification

Risk (R)	R Value
Very Big Risk: Necessary measures should be taken immediately and stopping the process should be considered.	$R > 400$
Fundamental Risk: Immediate action must be taken	$200 \leq R \leq 400$
Significant Risk: Needs precaution	$70 \leq R < 200$
Possible Risk: Process should be implemented under supervision	$20 \leq R < 70$
Minor Risk: Prevention Is Not Priority	$R < 20$

2.3. Risk Assessment

2.3.1. Identification of hazards and degrees of risk

The risk analysis of the mill rolling section of the study area was made according to the Fine-Kinney method. Rolling department consists of 4 units, namely Rolling Mill, Mechanical Maintenance and Repair, Workshop and Quality Control Department. The risk levels of these units were determined according to the probability, frequency and severity values (Han-Kai and Jong-Ning, 2019). In the rolling mill unit, there are 23 fields of activity in total;

1. Working in the environment,
2. Used Hand Tools and Other Devices,
3. Stacking the billet in the stock area,
4. Charging the billet from the grid to the furnace,
5. Movement and annealing of the billet in the furnace,
6. Discharge of the billet from the furnace,
7. Programmed Stop (stopping the process),
8. Transfer of the Billet to the Workbench,
9. Rolling the Billet,
10. Pass Change,
11. Runner, Drinker Change,
12. Rolling mill bend,
13. Thermex Process,

14. Sending the rod to the Cooling platform,
15. Rod coming from the cooling platform,
16. Transfer of the Rod to the Cold Shears,
17. Transfer of the Rod from the Cold Shears to the Tying Machine,
18. Hairpin Making,
19. Loading the Product to the Vehicles,
20. Stacking of the Products,
21. Dyeing the Ends of Irons,
22. Storage of Dye Beck,
23. Loading Packages to the Vehicle

According to these fields of activity, 29 hazards have been identified. Of these hazards, 11 were identified as “No Tolerance Risk”, 15 as “Major Risk” and 3 as “Significant Risk” ([Supplementary Table 5](#)).

2.3.2. Corrective/preventive actions

The risks that may occur in the rolling unit during the production of rebar have been determined in the table above. Corrective/preventive actions that can be taken against these risks are listed below:

1. Due to the hot working environment, the working hours of the employees in this environment will be reduced, local ventilation fans will be placed in some areas, and air-cooled warm environment clothes will be provided to the employees when necessary. The climate value of the environment will be kept under constant control.
2. Worn out hand tools and all other equipment will be replaced with new ones and periodic controls will be made.
3. The rotating parts of the machines will be enclosed, the machines will not be approached as much as possible during the production flow, they will be surrounded by barricades and warning signs will be placed, and necessary training will be given on the subject.
4. The cables of power tools will not be attached and exposed, they will be enclosed.
5. In order to prevent the billets brought to the stock area from falling from the truck, a fall prevention protection will be provided to the truck chassis, the surrounding of the truck will be closed to human entrance, and necessary training will be given on the subject.
6. The crane carrying the billets will be carried by those who have an operator certificate, and one person will be assigned to control the billet during transportation.
7. During the loading of the billet onto the furnace loading platform, the protruding tie wires remaining on the billets will be cut from the bottom and corrected with a hammer to prevent snagging.
8. A person will be assigned to ensure that the billet is properly placed on the grid.
9. In order to prevent unbalanced annealing of the billet in the furnace, the annealing temperature will be controlled from the control panel and training will be given on the subject.
10. Since it may cause injuries when the billet is loaded in the furnace exit, guards will be made on the edges of the belt at the furnace exit, the employees will stay at a certain distance and the necessary training will be given.
11. According to the intensity of the light emitted by the furnace, a screen protector of appropriate darkness will be placed on the glass, and eye protection will be provided for the furnace workers.
12. During the programmed stop of the process, warning signs will be posted and unauthorized persons will be prevented from entering this area.
13. In order to prevent the billets from falling on the relay path, a guarded passageway will be established on the relay path.
14. During the whole process, employees will stay at a certain distance from the process, personal protective equipment will be used, and rolling mill operating instructions will be communicated to all employees.
15. Heavy runners will not be allowed to be carried by hand, they will be carried with mechanical equipment and experienced people will be assigned for this job.
16. At the rolling mill bend, the area where the embers can spread by whipping will be surrounded by mobile barricades and warned.
17. Railings in accordance with the standards will be built around the water pits on the sides of the Thermex unit, which reduces the temperature of the outer surface of the iron and causes it to harden by giving pressurised water to the hot rolled and ember rebar.
18. After the Thermex unit, the irons cut in the desired sizes by flying shears come to the cooling platform. Metal armour of a certain height should be used to prevent the splashing of iron coming at high speed on the railway leading to the cooling platform, and there should be no openings at the joints of these metal armours. Openings will be repaired immediately.
19. One person works continuously on the cooling platform. This person takes the curved and short irons on the platform by pulling them with the iron clamp. The curved ones are cut into small pieces by cutting them with iron cutters. These iron cutters will be checked frequently, worn cutters will be replaced with new ones to prevent the compressing of fingers.
20. While the irons coming from the cooling platform and falling to a certain temperature are cut in 6 m length in the cold shears, the leftover irons are poured into the boiler under the cold shears. While this boiler is being transported by crane, employees will be prevented from being under load and it will be ensured that the iron that splashes around during cutting will be collected

frequently in terms of ground safety.

21. Separation of the irons that are counted automatically with the help of an automatic counting machine is made by automatic separators with triangular cross sections that suddenly rise from bottom to top. Employees will be warned to prevent these separators from hitting the people there.
22. Dyeing masks will be provided to the employees in order to prevent occupational diseases during the dyeing of the ends of the listed irons before they are packaged, and their working hours will be shortened.
23. It will be ensured that the paint cans are not left open and the lighting system of the room where they are stored will be ex-proof.
24. During the loading of the prepared iron packages to the truck, the driver of the truck will not be in the vehicle and will work in accordance with the instructions.

3. Results and Discussion

In order for steel rolling mill employees not to be exposed to work accidents at work and not to get occupational disease, it is important to identify and recognize the existing hazards, risks such as injuries and health problems that they may be exposed to. In this study, a risk analysis of the rolling mill of a facility that produces construction iron in Mersin was conducted. As a result of the risk analysis, a total of 29 risks were observed, 11 of which are intolerable risks, 15 of which are fundamental risks, and 3 of which are significant risks. Risks with a score of less than 70 that should be monitored and determined as acceptable are not considered here. Considering the risks that may arise from the existing hazards in the facility, the cause of the problem is that the operating instructions of the rolling mill were not communicated to the employees and that the employees were not given sufficient information and occupational health and safety training about the risks of their work. However, the reason for providing occupational health and safety training to employees in workplaces is to obtain noticeable results in minimizing work accidents and occupational diseases as well as to create a safety culture in the workplace. Therefore, in workplaces with a high degree of risk, such as rolling mills, the guards of moving or rotating machines are attached. It is very important to cover the edges of the process path and passageways with a protector, to keep the personnel at a certain distance, to place the necessary warning signs, to ensure the use of personal protective equipment, and to provide information and training to employees about occupational health and safety risks. Even if the necessary precautions are taken for the risks in the workplace examined within the scope of this study, the risks will not be reduced to the level of possible or insignificant risk. Implementation and monitoring of corrective/preventive actions will continue.

Author Contributions

A.U. (50%) and G.U. (50%) design of study. A.U. (50%) and G.U. (50%) data acquisition and analysis. A.U. (50%) and G.U. (50%) writing up. A.U. (50%) and G.U. (50%) submission and revision. All authors reviewed and approved final version of the manuscript.

Conflict of Interest

The authors declared that there is no conflict of interest.

References

- Basu PC, Shyamoni P, Roshan AD. 2004. Characterisation of steel reinforcement for RC structures: An overview and related issues. *Indian Concrete J*, 78(1): 19-30.
- Bluff E. 2014. Safety in machinery design and construction: Performance for substantive safety outcomes. *Safety Sci*, 66: 27-35.
- Caprili S, Mattei F, Salvatore W, Ascanio C, Luvarà G. 2021. Industrial and techno-economic feasibility of concrete structures reinforced with DP rebars. *Const Build Mater*, 283: 122793.
- Chevreau FR. 2008. Mastery of industrial and safety culture risks: the case of pharmaceutical chemistry. National School of Mines de Paris. Paris, France.
- Fine WT. 1971. Mathematical evaluation for controlling hazards. *J Safety Res*, 3(4): 157-166.
- Groche P, Mirtsch M, Hirt G, Dávalos D, von Rohren H. 2010. Mit flexiblem Wanddickenverlauf durch Walzprofilieren von bandgewalztem Vormaterial. *FOSTA Abschlussbericht*, Germany.
- Hafida K, Rachid C, Ahmed B. 2017. Hazard identification and risk analysis for a reinforced concrete rolling mill. *World J Eng*, 14(1): 1-6.
- Hammi R, Bouacheria N. 2015. Hazard Identification and Risk Analysis: case steel complex El-Hadjar, Annaba unit LRB; industrial hygiene and safety license. PhD thesis, Department of Engineering of Transport, University Mentouri Constantine, Constantine, Algeria.
- Han-Kai H, Jong-Ning A. 2019. The mechanism of position-mode side guide in correcting camber in roughing process of a hot strip mill. *Metals*, 9(5): 504, DOI: 10.3390/met9050504.
- Hirt G, Senge S. 2014. Selected processes and modeling techniques for rolled products. *Procedia Eng*, 81: 18-27.
- Ikumapayi OM, Akinlabi ET, Onu P, Abolusoro OP. 2020. Rolling operation in metal forming: Process and principles—A brief study. *Mater Today*, 26: 1644-1649.
- Jenkouk V, Hirt G, Franzke M, Zhang T. 2012. Finite element analysis of the ring rolling process with integrated closed-loop control. *CIRP Annals Manufac Technol*, 61(1): 267-270.
- Kinney GF, Wiruth AD. 1976. Practical risk analysis for safety management. NWC Tech Pub 5865, China Lake, CA, USA.
- Kumar M. 2021. Experimental study of fiber reinforced rigid pavement. *Mater Today*, 37: 3520-3522.
- Lohmar J, Bambach M, Hirt G, Kiefer T, Kotliba D, Jochum M, Seuren S. 2014. Fast and accurate force prediction for high quality heavy plates by a state of the arte rolling model calibrated from mill data via inverse techniques. *ESTAD*.
- Ray S. 2016. Principles and applications of metal rolling. Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp: 298.
- Seuren S, Seitz J, Krämer A, Bambach M, Hirt G. 2014. Accounting for shear deformation in fast models for plate rolling. *Product Eng*, 8: 17-24.
- Utsunomiya H, Tokimoto Y, Mabuchi H, Osada K, Yamagata T,

- Ohta M, Schmitt RP. 1998. Strongly-suppressed post-Coulomb acceleration in non-resonant breakup of 7Li. *Physics Let B*, 416(1-2): 43-49.
- Vivek S, Karthikeyan N, Balan AV. 2015. Risk Assessment and Control Measures for Cold Rolling Mill in Steel Industry. *Int J Mech Eng Res*, 5(1): 63-71.
- Zhang W, Bay N. 1997. Cold welding - theoretical modeling of the weld formation. *Welding Res, Sup*: 417-420.



PHYLOGENETIC RELATIONSHIP WITHIN THE GENUS *CARCHARHINUS* ON THE BASIS OF LEMON SHARK (*N. BREVIROSTRIS*) POSITION

Mine DOSAY AKBULUT^{1*}


¹Afyon Kocatepe University, Veterinary Faculty, Medical Biology and Genetics Department, 03200, Afyon, Türkiye

Abstract: Many doubts have not been answered about the phylogenetic relationship of the sharks. The morphological models and molecular studies, frequently used these days, can put some species into different order or suborder. The sharks contain about 1% of all fishes, separated into 8 orders. Within these, the largest group is the genus *Carcharhinus*, which includes economically important sharks. A lot of different analyses were done to determine the relationship among these genera. Most of them indicate that phylogenetic relationships at most taxonomic levels remain mysterious for this genera. This study was applied to determine the interrelationship between *Carcharhinus* and *Negaprion* genera based on the lemon shark position and to find out the possible paraphyletic situation of genus *Carcharhinus*, via using ribosomal ITS2 region and mtDNA D-loop for comparison and to get more reliable findings. As a result, based on the ribosomal ITS2 analyses, the lemon shark is placed within the genus *Carcharhinus*, on the other hand, the lemon shark finds a place outside of the genus *Carcharhinus* according to the mtDNA D-loop analyses results. Different findings regarding the position of the lemon shark indicate that it is necessary for more accurate results of the study by using more samples and more gene data.

Keywords: *Carcharhinus*, Evolution, Interrelationship, *N. brevirostris*, Systematics

*Corresponding author: Afyon Kocatepe University, Veterinary Faculty, Medical Biology and Genetics Department, 03200, Afyon, Türkiye

E mail: minedosay@aku.edu.tr (M. DOSAY-AKBULUT)

Mine DOSAY-AKBULUT  <https://orcid.org/0000-0001-6571-7852>

Received: April 04, 2022

Accepted: May 30, 2022

Published: July 01, 2022

Cite as: Dosay-Akbulut M. 2022. Phylogenetic relationship within the genus *Carcharhinus* on the basis of lemon shark (*N. brevirostris*) position. BSJ Eng Sci, 5(3): 116-123.

1. Introduction

There are 350 species of shark within Chondrichthyes class. Other known as Cartilaginous fishes include batoid elasmobranchs and Holocephalii as well. Their body was made from cartilaginous tissue instead of bone. But this cartilaginous tissue was supported in someplace with calcium, resembled bone tissue.

The members of this group developed different mechanism, that adapts their body against to the negativity, especially a rich fossil record of them dated back more than 400 million years, providing a lot of information for phylogenetic hypotheses, reached today. This information can be used as an information source of the Chondrichthyans, fishes, and in more general vertebrates' development (Castro, 1983).

The morphological similarities between the shark and batoid elasmobranchs are more than their closeness to the Holocephalii. Especially the Squatiniformes order sharks have similarities with batoids based on their structural similarities. But the classification of these 3 groups (sharks, batoid elasmobranchs, and holocephalii) within and between can change and give different results according to the different criteria. The classification model, that accepted and always gives the same result, is not applied to the practice. The morphological models

and molecular studies, frequently used these days, can put some species into different order or suborder (Maisey, 1984).

Members of cartilaginous fish ensure continuity in their species by increasing their resistance to factors that may cause fatigue, as seen in dinosaurs. Taking advantage of their specially shaped upper jaws and teeth, they can be very competent hunters, and with their advanced sensory systems and brains, they can successfully survive attacks from other predators.

All these indicate that they adapted successfully against life's selector characteristics (Compagno, 1990; Tricas, 1997; Taylor, 1997).

So far, about evolution in vertebrates, most of the work had been done mostly in mammals. It cannot forget that there are about 40000 extant species of vertebrates and about 10000 of them are fishes (Martin, 1992).

The sharks contain about 1% of all fishes, separated into 8 orders as 1-Squatiniformes, 2-Pristiophoriformes, 3-Squaliformes, 4-Heterodontiformes, 5-Hexaniformes, 6-Lamniformes, 7- Orectolobiformes, 8- Carcharhiniformes respectively (5). The largest order is Carharhiniformes with 200 species, consist almost 55% of all shark species. Family Carcharhinidae: known as Requiem sharks, which is the largest family in this order, includes 50 species



with division into 12 genera. They are *Galeocerdo*, *Glyphis*, *Isogomphodon*, *Lamiopsis*, *Loxodon*, *Nasolamia*, *Negaprion*, *Prionace*, *Rhizoprionodon*, *Scoliodon*, *Triaenodon*, and the largest genus *Carcharhinus*, with 30 species of them belong to it (McDiarmid, 1996).

Carcharhiniform sharks, like other sharks, have a very well preserved fossil tooth record. According to these records, the first identification took place in the lower Eocene for *Rhizoprionodon* and in the lower Miocene for *Sphyrna*. It has been shown that the differentiation between *Sphyrna*, *Carcharhinus*, and *Negaprion* occurred around 38 Mya at the end of the Eocene (Naylor, 1989; Naylor, 1992).

Different hypotheses were suggested based on some different genus possible inclusion to genus *Carcharhinus* and determine the real interrelationship with genus *Carcharhinus* and others. Some of them indicate a possible sister position of the lemon shark (*N. brevirostris*) to genus *Carcharhinus*.

For example; Cytochrome oxidase I (COI) gene sequences were used to get a more correct answer to the phylogenetic relationship between genus *Carcharhinus* and to others. According to COI gene sequence analysis; *Prionace* and *Negaprion*; it is placed as a separate genus outside of *Carcharhinus*, while *Sphyrna* and *Triaenodon* are classified together with the genus *Carcharhinus*.

In a related study by the same author; 561 bp Cytochrome b sequence data, were obtained from *Galeocerdo* and 18 additional species of sharks. In all analyses, *C. falciformis* and *Negaprion* grouped together and at the base of the genus *Carcharhinus* (Martin, 1992). Another study consists mt sequences and the nRAG1 sequences. This molecular phylogenetic study aimed to better understand relationships within Carcharhiniformes. mtDNA data set included complete Valine tRNA and 16S rRNA and partial 12S rRNA genes for 45 species. According to MP tree analysis, calculated from the mtDNA data set; *Negaprion* was obtained as the sister group of *Carcharhinus*, though; Compagno's suggestion, based on morphologic characters (Compagno, 1988) and Lavery's in his allozyme research (Lavery, 1992) found *Negaprion* placed within the genus *Carcharhinus* (Iglésias et al., 2005).

ITS region sequences can be used with useful information for the determining of the species origins or the phylogenetic relationships at different levels. Nuclear ribosomal RNA cistron (rDNA) or some parts of it are frequently used in phylogenetic studies. The rRNA genes are in sequential copies in cistron and express a family of genes that have undergone a rapid and harmonious evolution. Particularly the ITS2 region, which is among the parts within this cistron, has a great advantage in terms of being a locus that has a rapid evolution feature in terms of revealing the phylogenetic relationships between closely related species.

On the other hand, mtDNA D-loop, which representing relatively slowly evolving, also was used in this study to get the results with the minimum of the effect of the

evolving rate.

Based on the different studies' findings related to lemon shark (*N. brevirostris*) position, this study was designated to reveal the phylogenetic relationship among the species of genus *Carcharhinus*, to find out the possible paraphyletic situation of genus *Carcharhinus* and interrelationship between *Carcharhinus* and *Negaprion* genera based on lemon shark position, via using ribosomal ITS2 region and mt D-loop for comparison and to get more reliable result.

2. Material and Methods

DNA Sources: For ITS2, 17 species were used. 11 of them from genus *Carcharhinus*, 3 species belongs to genus *Prionace*, 1 species from genus *Negaprion*, 1 of them from *Rhizoprionodon* and the last one from genus *Galeocerdo* were amplified. For mtDNA D-loop; 11 species were used. 6 of them from genus *Carcharhinus*, and other 5 of them, 1 each from genus *Prionace*, *Negaprion*, *Rhizoprionodon*, *Sphyrna*, and *Galeocerdo* were amplified (Table 1 and 2).

All species belong to the genus *Carcharhinus*, except Blue shark, Atlantic sharpnose, scalloped hammerhead, Lemon shark and Tiger shark.

Table 1. The used ridge-backed and smooth-backed species listed (Dosay, 2000)

Ridge-backed species	Smooth-backed species
Caribbean reef	Bull
Sandbar	BlacknoseBignose
Finetooth	
Silky	Spinner
Dusky	Smalltail
	Blacktip
	Blue
	Lemon
	Atlantic sharpnose

Table 2. List of species that were used in this study (Compagno, 1984)

Species name	Common name
<i>C. altimus</i>	Bignose
<i>C. brevipinna</i>	Spinner
<i>C. acronotus</i>	Blacknose
<i>C. falciformis</i>	Silky
<i>C. isodon</i>	Finetooth
<i>C. leucas</i>	Bull
<i>C. limbatus</i>	Blacktip
<i>C. obscurus</i>	Dusky
<i>C. plumbeus</i>	Sandbar
<i>C. perezii</i>	Carib. reef
<i>C. porosus</i>	Smalltail
<i>C. R. terraenovae</i>	Atshnose
<i>C. P. glauca</i>	Blue
<i>C. N. brevirostris</i>	Lemon
<i>C.S. lewini</i>	Scalloped hammerhead
<i>C. G. cuvier</i>	Tiger

2.1. DNA extraction, PCR amplification, and sSequencing

DNA extraction was carried out in two methods. One of them is a phenol/water/chloroform method, on the basis of ABI manual DNA extraction kit or QIAamp tissue kit was used from QIAGEN Company. In the first method 0.2 to 0.5 g. tissue; in the second method, where 0.2-1.2 mg DNA was reached with each mg of isolation, 25 mg of tissue was used each time. The finally obtained genomic DNA was kept in refrigerator.

The ribosomal internal transcribed spacer ITS2 and mtDNA D-loop were amplified via using the polymerase chain reaction (PCR) with below indicated primers.

The PCR amplification primers for ribosomal ITS2 region and mt D-loop within this study are shown below;

ITS2F L	CTACGCCTGTCTGAGTGTC
ITS2R H	ATATGCTTAAATTCAGCGGG
D-loop F:	CCACATACTACCCTCATTC
D-loop R:	GTATATTAAGGGGAGGGGG

Primers were designed from a fish sequence that was obtained from Genbank. All PCR amplification was completed via using Perkin Elmer DNA Thermal Cycler 480 or PTC-100TM Programmable Thermal Controller (MJ Research, Inc.).

The sequences were entered into the Eyeball sequence editor (Cabot and Beckenbach, 1989). The best alignment with the lowest parsimony score was used in tree construction. Total about, 1400 bp nucleotide for ITS2 and 2000 bp nucleotide for D-loop were aligned.

The analysis were carried out with using neighbor-joining (NJ) and maximum parsimony (MP) methods within the PHYLIP 3.5c (Felsenstein, 1993) and maximum likelihood (DNAML) from PUZZLE (Strimmer and von Haeseler, 1996) quartet-puzzling approach. Both analysis authenticity were tested with using bootstrapping (Felsenstein, 1985) on the basis of 1000 replications of the data. The kimura-2- parameter distance matrix model was applied to Parsimony analysis with a transition / transversion ratio of 2:0 as well as in DNAML analysis, with 10 times randomizing of the input order.

3. Results

This study's molecular data included ribosomal ITS2 and the mitochondrial D-loop region. The sequence alignment of 1590 bp for the ITS2 region from 17 species data and 2068 bp of the mitochondrial D-loop region from 11 species were used in tree construction. In all data *Galeocerdo cuvier* (tiger shark) was chosen as an outgroup (Table 3 and 4).

Table 3. Maximum likelihood sequence divergence matrix for ribosomal ITS2 region (Dosay, 2000).

Bull	0.0553	0.0440	0.0626	0.0591	0.0617	0.0960	0.0899	0.0819	0.0733	0.0992	0.0790	0.0763	0.1996	0.3125	0.1523	0.2631
Spinner	0.0530	0.0517	0.0491	0.0562	0.0790	0.0751	0.0722	0.0639	0.0817	0.0874	0.0672	0.1886	0.3003	0.1420	0.2458	
Blacknose	0.0494	0.0468	0.0572	0.0765	0.0694	0.0712	0.0643	0.0817	0.0730	0.0650	0.1762	0.2899	0.1455	0.2416		
Blacktip	0.0438	0.0526	0.0683	0.0618	0.0619	0.0558	0.0693	0.0842	0.0525	0.1841	0.2955	0.1291	0.2307			
Bignose	0.0128	0.0438	0.0398	0.0363	0.0426	0.0594	0.0766	0.0367	0.1826	0.2910	0.1251	0.2178				
Sandbar	0.0546	0.0513	0.0406	0.0477	0.0647	0.0823	0.0467	0.1897	0.3005	0.1346	0.2277					
Blue3	0.0174	0.0201	0.0675	0.0839	0.1000	0.0492	0.1999	0.3156	0.1403	0.2407						
Blue2	0.0165	0.0621	0.0781	0.1023	0.0463	0.1992	0.3042	0.1447	0.2432							
Blue1	0.0574	0.0733	0.1022	0.0437	0.2040	0.3052	0.1417	0.2343								
Dusky	0.0597	0.0933	0.0570	0.2032	0.3047	0.1402	0.2453									
Silky	0.1176	0.0706	0.2225	0.3346	0.1645	0.2498										
Lemon	0.0689	0.1978	0.3534	0.1260	0.2583											
Caribreef	0.1803	0.3280	0.1166	0.2294												
Smalltail	0.4291	0.2488	0.3544													
Sharpnose	0.3803	0.3831														
Finetooth	0.2518															
Tiger																

Table 4. Maximum likelihood sequence divergence matrix for mitochondrial D-loop region data (Dosay, 2000)

Sharpnose	0.0743	0.0978	0.0978	0.0899	0.1030	0.1049	0.1488	0.1136	0.1870	0.1663
Smalltail	0.0564	0.0629	0.0585	0.0547	0.0578	0.1172	0.0868	0.1949	0.1514	
Blacknose	0.0520	0.0496	0.0320	0.0417	0.1052	0.0807	0.2053	0.1411		
Blacktip	0.0475	0.0435	0.0487	0.1088	0.0790	0.1977	0.1466			
Caribreef	0.0411	0.0408	0.1047	0.0779	0.1989	0.1434				
Finetooth	0.0333	0.1005	0.0801	0.1936	0.1393					
Spinner	0.0955	0.0736	0.2029	0.1444						
Blue	0.1308	0.2071	0.1798							
Lemon	0.2013	0.1539								
Scalhammer	0.2261									
Tiger										

ITS2 data MP and NJ analysis placed *N. brevirostris* with the genus *Carcharhinus* with 100% and 98% bootstrap value respectively, even classified in a different genus. Lemon shark position within the genus *Carcharhinus* was supported by ITS2 DNAML and transversion analysis also. In almost all ITS data analysis; lemon shark placed with finetooth shark, which both a member of Smooth-backed species, within genus *Carcharhinus* clade (Table 5).

Table 5. Bootstrap support from various analyses for the inclusion of lemon shark within the genus *Carharhinus* (Dosay, 2000)

Phylogenetic loci	Lemon sh as <i>Carcharhinus</i>	Lemon outside <i>Carcharhinus</i>
ITS2		
MP	100	0
TVMP	99	0
NJ	98	2
PUZZLE	77	0
D-loop		
MP	38	60
TVMP	8	75

Mitochondrial D-loop region The Maximum Likelihood (DNAML) puzzle analysis, puts lemon shark into *Carharhinus* clade with 73% bootstrap value. Other analyses (NJ, MP, and TVMP) also support lemon shark position within the genus *Carcharhinus* with little lower bootstrap support compare to ITS values. But mtDNA D-loop analysis gave different indications than ITS analysis based on lemon shark nearest species. Mostly, smalltail

shark was obtained as closest to the lemon shark, which also both a member of Smooth-backed species, according to mt D-loop analysis.

Table 5 of the sequence divergence of the ITS2 region indicates, the sequence divergence between the genus *Carcharhinus* and lemon sharks from genus *Negaprion* the range about 6-12 %, while within the genus *Carcharhinus* range about 4-7.5 %, which is a little high sequences differences were obtained from inside the genus *Carcharhinus*.

Table 5 of the sequence divergence of the mitochondrial D-loop region indicates that the sequence divergence is, between genus *Carcharhinus* and *N. brevirostris* is 7-8 %, while within the genus *Carcharhinus* is about 3-7 %. This means *N. brevirostris* much closer species to the genus *Carcharhinus* and got almost similar divergence value to within *Carcharhinus* species. The data point that; the most divergent species is *S. lewini*.

3.1. Internal Transcribed Spacer 2

The monophyly of the smooth-backed forms (inclusive of lemon), and a possibility of the lemon shark, is a derived carcharhinid, was a quite well-supported result with especially internal transcribed spacer 2 (ITS2) data. But D-loop DNAML puzzle analysis only supports this finding. The other analysis of D-loop; did not give enough bootstrap value for lemon shark position within genus *Carcharhinus*.

Almost all analyses of molecular data agreed that *N. brevirostris* has a position within the genus *Carcharhinus*. Also, the sequence divergence values, supports this place as well.

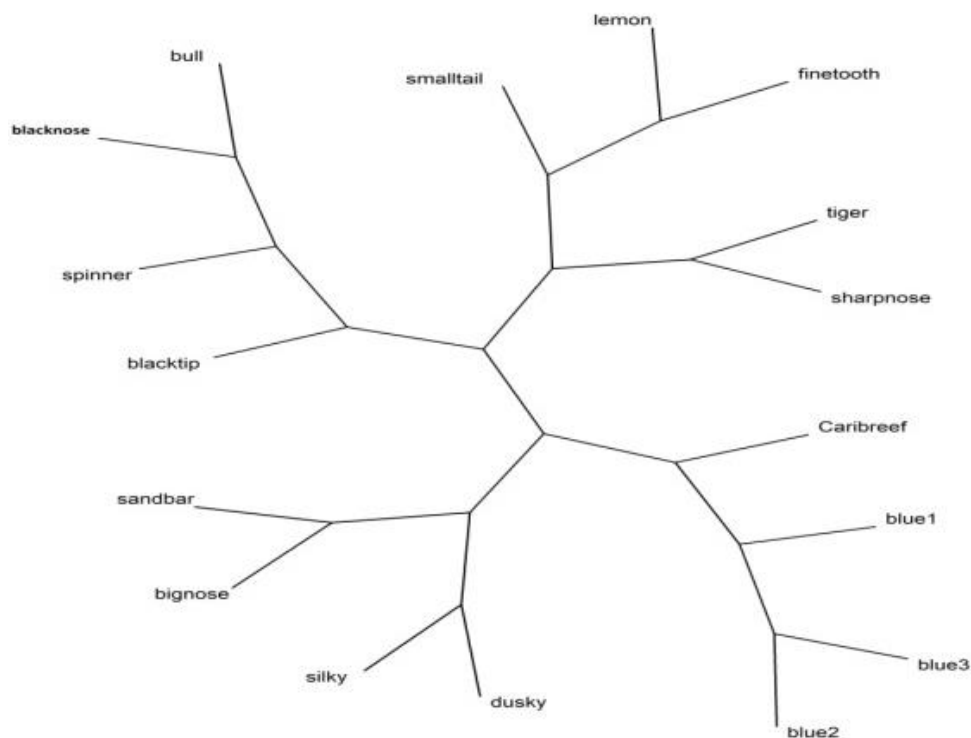


Figure 1. The majority consensus Neighbour Joining (NJ) Bootstrap tree for the ribosomal ITS2 (Dosay, 2000).

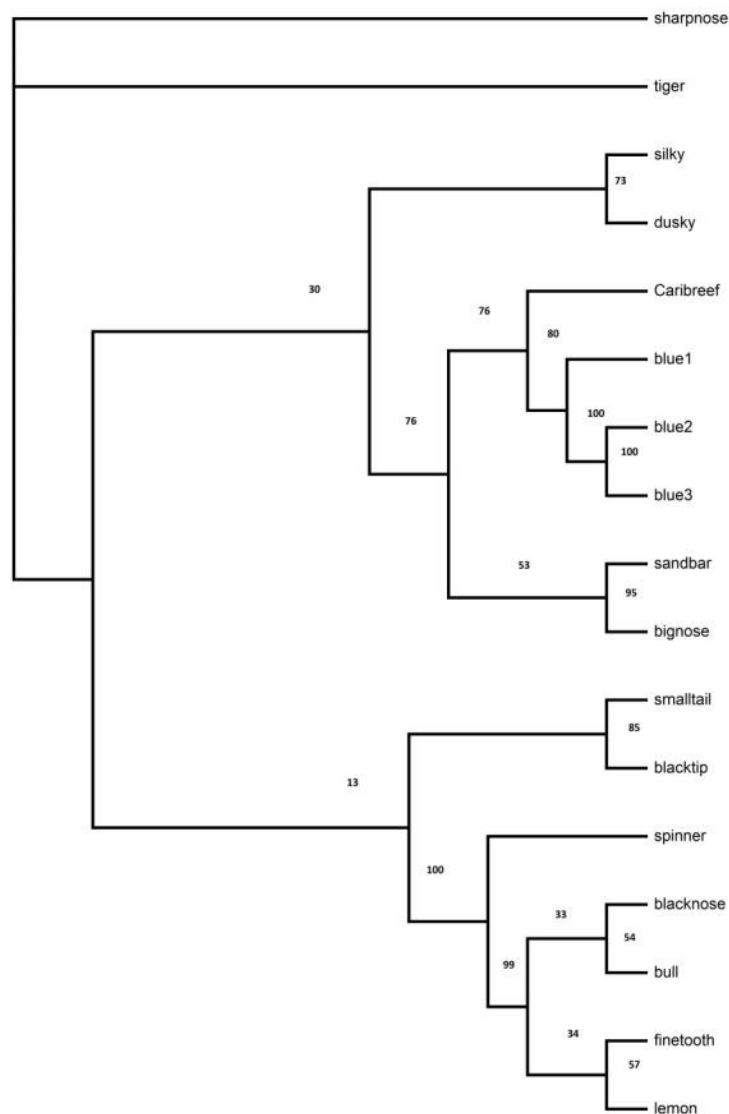


Figure 2. The Majority consensus Transversion Parsimony Bootstrap tree of ribosomal ITS2 (Dosay, 2000).

ITS2 data findings indicate the inclusion of lemon shark inside the carcharhinid clade. This is an arrangement that had been previously suggested by the morphological studies of Compagno (1988) but was not supported in Naylor's allozyme analyses. Support for the inclusion of lemon along with the rest of the carcharhinids is considerable, with 100 and 98% bootstrap support for the monophyly of *Carcharhinus* + lemon, for almost all ITS2 analyses respectively.

Interestingly, maximum likelihood (DNAML) analysis of the ITS2 data splits the ridge-back (+blue) and the smooth-back (inclusive of lemon) into two monophyletic groups.

3.2. D-loop

The other analysis of D-loop; did not give enough bootstrap value for lemon shark position within genus *Carcharhinus*.

4. Discussion and Conclusion

There are uncertainties in the elasmobranchs' classifications and the phylogenetic relationships within and between the class Chondrichthyes. A lot of different

studies are carried out to find the relationship within the genus *Carcharhinus*. Different hypotheses were suggested for the possible paraphyletic situation of *Carcharhinus* with the inclusion of lemon shark. *N. brevirostris* position and relation to genus *Carcharhinus* was searched for different criteria.

In the morphological and anatomical comparison; In terms of reproductive characteristics, *Negaprion* and *Carcharhinus* breeds are similar in terms of live birth, matrotropic and having placenta (Dulvy, 1998).

Supporting the findings of this study related to a possible lemon shark position within the genus *Carcharhinus*, Irschick et al. (2017) carried out another study. For comparison; 12 morphometric values and body measurements of 8 different individuals from Carcharhinidae and Ginglymostomatidae families were obtained and used in the calculation of this study. In terms of the general shape of the pectoral fin or the dorsal fin, the first four PC values obtained as a result of the harmonic analysis for each fin were found to be close to each other for these 4 species (lemon, blacktip, nurse and sandbar) (Irschick et al., 2017).

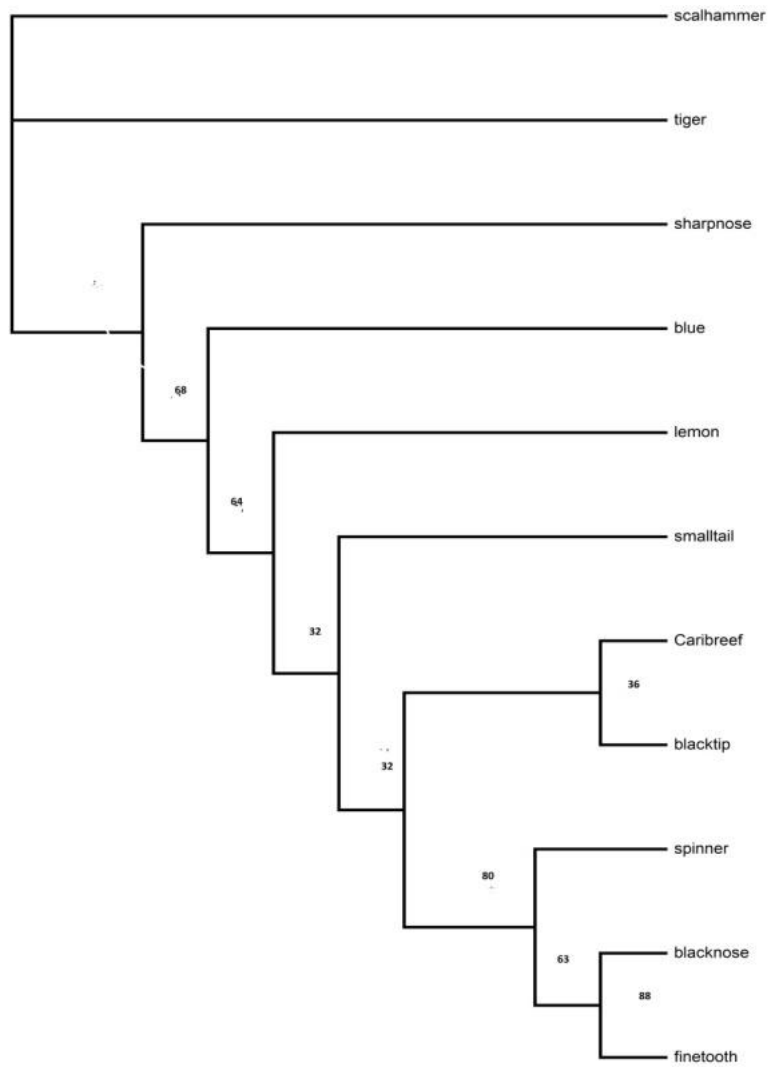


Figure 3. The majority consensus NJ Bootstrap tree for the mtDNA D-loop (Dosay, 2000).

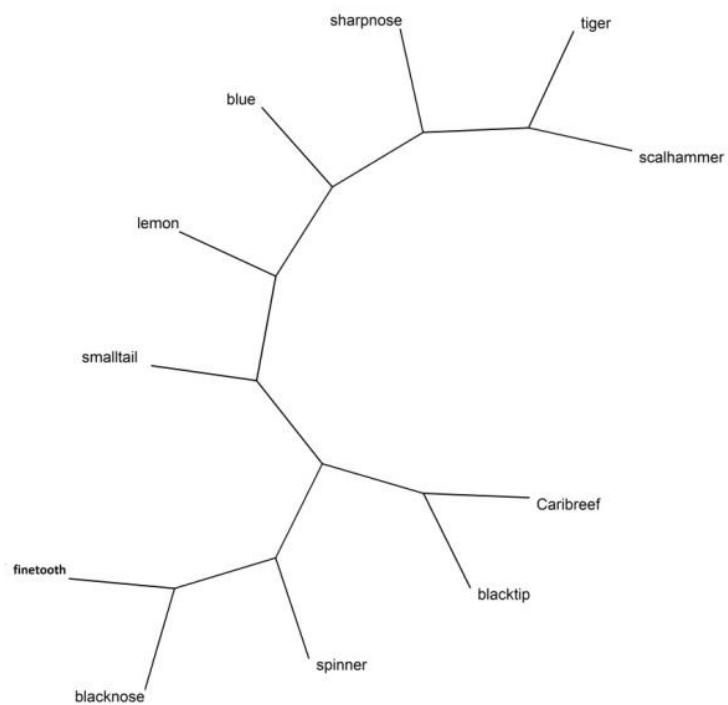


Figure 4. The Maximum Likelihood (DNAML) Tree with branch length of the mtDNA D-loop (Dosay, 2000).

Lavery study based on allozyme data analysis. This study included carcharhinid sharks and 4 related species collected from Australia. The most parsimonious tree was not supported in his study of the genus *Carcharhinus* with monophyly. This genus, as a result of the analysis; It was obtained paraphyletically with the participation of *Negaprion acutudiens* and *Galecerdo cuvier* from other genera and *Hemipristis elongatus* from different families (Lavery, 1992).

Molecular phylogenetic studies with mtDNA data set and nuclear RAG1 sequences have been recently introduced by Iglésias to reveal relationships within Carcharhiniformes. The mtDNA data set (partial 12S rRNA, full Valine tRNA and 16S rRNA genes) was used in the study. As a result of the analysis, *Negaprion* is the sister group of *Carcharhinus*, whereas Compagno's suggestion according to teeth fossil found *Negaprion* nested within *Carcharhinus* (Iglésias et al., 2005).

In Swift study, transcriptome statistics for nine viviparous shark species were obtained from Atlantic sharpnose shark (*Rhizoprionodon terraenovae*), Blacknose shark (*Carcharhinus acronotus*), Blue shark (*Prionace glauca*), Bull shark (*Carcharhinus leucas*), Caribbean reef shark (*Carcharhinus perezi*), Dusky smoothhound (*Mustelus canis insularis*), Lemon shark (*Negaprion brevirostris*), Sand tiger shark (*Carcharias taurus*) and Tiger shark (*Galeocerdo cuvier*). In the result of 1,197 orthologue alignments' phylogenetic analysis, the lemon shark was placed with bull shark and Blacknose shark from genus *Carcharhinus*, indicating a possible genus *Carcharhinus* paraphyletic situation with lemon shark inclusion (Swift et al., 2016).

Martin's Ph.D. thesis provided some evidence from the perspective of molecular sequence for the possible inclusion of blue shark and lemon shark within the genus *Carcharhinus*. But his other studies carried out with 12S ribosomal gene, cytochrome. b gene and cytochrome oxidase I gene sequence analysis, the lemon shark position and the phylogenetic relationship among the Carcharhinidae sharks were not cleared (Martin, 1992; Martin, 1993; Martin, 1995).

37 species of carcharhiniform sharks were involved to identify protein variation, in Naylor's study. Evolution trees were created with cladistic character and distance Wagner analysis based on these data. In both analyses, *Galeocerdo*, *Sphyrna*, *Rhizoprionodon*, *Loxodon*, *Negaprion* and *Triaenodon* were located outside of *Carcharhinus* (Naylor, 1992).

Different results from different studies show different positions for the place of the lemon shark (*N. brevirostris*) in the classification. Some classify the lemon shark within the genus *Carcharhinus*, while others put it in a position outside of this genus.

Also, our molecular findings gave similar indications, that ribosomal ITS2 all analysis placed lemon shark within the genus *Carcharhinus*, while mtDNA D-loop analysis support mostly lemon shark outside of genus *Carcharhinus*. The lack of congruence in regards to this

positioning of lemon shark suggests that a more firm conclusion will have to await further sampling of species and molecular loci.

Author Contributions

All task made by M.D.A. (100%) data acquisition and analysis, writing up, submission and revision. The author reviewed and approved final version of the manuscript.

Conflict of Interest

The author declared that there is no conflict of interest.

Acknowledgements

This study was prepared from corresponding author's PhD thesis.

Ethical Consideration

Ethics committee approval was not required for this study because of there is no animal or human study.

References

- Cabot EL, Beckenbach AT. 1989. Simultaneous editing of multiple nucleic acid and protein sequences with ESEE. *Comput Appl Biosci*, 5: 233-234.
- Castro JI. 1983. The Sharks of the North American waters. Texas A&M University Press, College Station, Texas, US, pp: 80-85.
- Compagno LJV. 1984. Sharks of the world: Carcharhiniformes. *FAO*, 4: 250-655.
- Compagno LJV. 1988. Sharks of the order Carcharhiniformes. Princeton University Press, Princeton, New Jersey, US, pp: 100-110.
- Demirsoy A. 1998. Yaşamın temel kuralları. 3 (1): Omurgalılar: Anamniyota. *Meteksan Yayınları*, Ankara, Türkiye, pp: 250-280.
- Dosay M. 2000. A molecular view of various issues in shark phylogenetics and the evolution of shark rRNA ITS. PhD thesis, The Queen's University of Belfast, Belfast, UK, pp: 120.
- Dulvy NK. 1998. Life histories and conservation of sharks and rays. PhD thesis, University of East Anglia, Norwich, UK, pp: 105.
- Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evol*, 39: 783-791.
- Felsenstein J. 1993. PHYLIP: Phylogeny inference package, Version 3.5c. Distributed by the author, University of Washington, Seattle, US.
- Iglésias SP, Lecointre G, Sellos DY. 2005. Extensive paraphyly within sharks of the order Carcharhiniformes inferred from nuclear and mitochondrial genes. *Mol Phylogenet Evol*, 34: 569-83.
- Irschick DJ, Fu A, Lauder G, Wilga C, Kuo CY, Hammerschlag N. 2017. A comparative morphological analysis of body and fin shape for eight shark species. *Biol J Linn Soc*, 122: 589-604.
- Lavery S. 1992. Electrophoretic analysis of phylogenetic relationships among Australian Carcharhinid sharks. *Aust J Mar Freshwater Res*, 43: 97-108.
- Maisey JG. 1984. Higher elasmobranch phylogeny and biostratigraphy. *Zool J Linn Soc*, 82: 33-54.
- Martin A. 1992. Tempo and mode of mitochondrial DNA evolution in sharks and rays. PhD Dissertation, University of Hawaii, Honolulu, HI, US, pp: 200.
- Martin AP. 1993. Hammerhead shark origins. *Nature*, 364: 494.

- Martin AP. 1995. Mitochondrial DNA sequence evolution in sharks: Rates, patterns, and phylogenetic inferences. *Mol Biol Evol*, 12: 1114-1123.
- McDiarmid M. 1996. Shark attack. Parrogon Books Limited, Bristol, UK, pp: 70-80.
- Naylor GJP. 1989. The phylogenetic relationships of Carcharhiniform sharks inferred from electrophoretic data. Ph.D. Dissertation, University of Maryland, College Park, US, pp: 250.
- Naylor GJP. 1992. The phylogenetic relationships among Requiem and Hammerhead sharks: Inferring phylogeny when thousands of equally most parsimonious trees result. *Cladistic*, 8: 295-318.
- Soltis DE, and Kuzoff RK. 1995. Discordance between nuclear and chloroplast phylogenies in the Heuchera group (Saxifragaceae). *Evol*, 49: 727-742.
- Strimmer K, von Haeseler A. 1996. Quartet puzzling: Quartet maximum likelihood method for reconstructing tree topologies. *Mol Biol Evol*, 13: 964-969.
- Swift DG, Dunning LT, Igea J, Brooks EJ, Jones CS, Noble LR, Ciezarek A, Humble E, Savolainen V. 2016. Evidence of positive selection associated with placental loss in tiger sharks. *BMC Evol Biol*, 16: 126.
- Tricas TC, Deacon K, Last P, McCosker JE, Walker TI, Taylor LR. 1997. *Sharks & Rays*. Nature Company Guides, Time Life Education Publishers, Weldon Owen, Sydney, Australia, pp: 150-170.



TEK HÜCRE C₄ FOTOSENTEZİ

Buse ÇÖKMEZ^{1*}, Yasemin ÖZDENER KÖMPE¹, Fazıl ÖZEN²

¹Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Anabilim Dalı, 55200, Samsun, Türkiye

²Kocaeli Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Anabilim Dalı, 41380, Kocaeli, Türkiye

Özet: Tek hücre C₄ fotosentezi moleküler, biyokimyasal, anatomik özelliklerin bir bütünüdür. C₄ fotosentezinin yaklaşık 25-30 milyon önce Oligosen'de CO₂ seviyesindeki azalmaya bağlı olarak ortaya çıktığı tahmin edilmektedir. Yüksek yapılı bitkilerde, yüksek sıcaklıklarda fotosentezin verimliliği, Rubisco (Ribuloz 1,5 bisfosfat karboksilaz/oksijenaz) enziminin oksijenaz aktivitesi ile sınırlanmaktadır. Karasal bitkilerin bazıları fotorespirasyon ile kaybedilen karbon miktarını en aza indirmek için Rubisco'nun CO₂ tutması için artırıcı mekanizmalar geliştirmiştir ve tek hücre C₄ fotosentezi Kranz anatomi olarak isimlendirilen mezofil ve demet kını adı verilen iki farklı hücre tipinde evrimleşmiştir. C₄ fotosentezi dimorfik kloroplast yapısı, Kranz anatomi ve C₄ yolunun biyokimyası olarak çeşitlilik göstermektedir. Karasal bitkilerde tek hücre C₄ fotosentezi 1960'ların ortalarında Chenopodiaceae familyasına ait dört türde (*Bienertia aralospica*, *Bienertia cycloptera*, *Bienertia sinuspersici*, *Bienertia kavirense*), sucul ve fakültatif (hem oksijenli hem de oksijensiz ortamda yaşayan) tek çenekli bir bitki olan *Hydrilla verticillata*' da keşfedilmiştir. Son yıllarda C₄ bitkilerinin özelliklerinin ortaya konması için birçok çalışma yapılmaya devam edilmektedir. Bu derlemede, karasal ve sucul bitkilerde tek hücre C₄ fotosentezi, C₄ fotosentezinin mekanizması, kimyası gibi konuların incelenmesi amaçlanmıştır.

Anahtar kelimeler: Tek hücre C₄ fotosentezi, Rubisco, C₄ bitkileri


Single-cell C₄ Photosynthesis


Abstract: Single-cell C₄ photosynthesis is a set of molecular biochemical, molecular, anatomical features. Single C₄ photosynthesis is estimated to have occurred in the Oligocene about 25-30 million ago due to decreased CO₂ levels. In higher plants, the efficiency of photosynthesis at high temperatures is limited by the oxygenase activity of the Rubisco (Ribulose 1,5 bisphosphate carboxylase/oxygenase) enzyme. Some terrestrial plants have developed enhancing mechanisms for Rubisco's CO₂ retention to minimize the amount of carbon lost by photorespiration, and single-cell C₄ photosynthesis has evolved in two different cell types called mesophyll and bundle sheath cells. C₄ photosynthesis dimorphic chloroplast structure varies in Kranz anatomy and biochemistry of the C₄ pathway. Single-cell C₄ photosynthesis in terrestrial plants in the mid-1960s in four species belonging to the family Chenopodiaceae (*Bienertia aralospica*, *Bienertia cycloptera*, *Bienertia sinuspersici*, *Bienertia kavirense*) was also discovered. Single-cell C₄ photosynthesis in *Hydrilla verticillata*, an aquatic and facultative (living in both an oxygenated and oxygen-free environment) monocot plant, has been discovered. In recent years, many studies have continued to be carried out to determine the properties of C₄ plants. In this review, it is aimed to examine the subjects such as Single-cell C₄ photosynthesis in terrestrial and aquatic plants, mechanism and chemistry of C₄ photosynthesis.


Keywords: Single-cell C₄ photosynthesis, Rubisco, C₄ plants

*Sorumlu yazar (Corresponding author): Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Anabilim Dalı, 55200, Samsun, Türkiye

E mail: buse.ckmez@gmail.com (B. ÇÖKMEZ)

Buse ÇÖKMEZ  <https://orcid.org/0000-0002-9268-5929>

Yasemin ÖZDENER KÖMPE  <https://orcid.org/0000-0003-1649-4298>

Fazıl ÖZEN  <https://orcid.org/0000-0001-9293-908X>

Gönderi: 18 Ekim 2021

Received: October 18, 2021

Kabul: 27 Nisan 2022

Accepted: April 27, 2022

Yayınlanma: 01 Temmuz 2022

Published: July 01, 2022

Cite as: Çökmez B, Özdener Kömpe Y, Özen F. 2022. Single-cell C₄ photosynthesis. BSJ Eng Sci, 5(3): 124-129.

1. Giriş

Tropik, sıcak ve kurak bölgelerde yaşayan bitkiler fotosentez reaksiyonları için özel bir yol geliştirmişlerdir ve oluşan ilk ara ürün 4C'lu bir bileşik olan oksaloasetat olduğu için bu metabolik yol C₄ yolu ya da Hatch ve Slack metabolik yolu olarak adlandırılmaktadır (Hatch, 1987). CO₂'nin iki molekül 3-Fosfogliseraldehit (3-PGA) oluşturmak için alıcı bir molekül olan ribuloz-1,5 bifosfata (RuBP) bağlanması Rubisco enzimi tarafından katalize edilmektedir (Andersson ve Backlund, 2008). Bu enzimin dünyadaki karbon fiksasyonunun büyük bir kısmından sorumlu olduğu ve dünyada en bol bulunan protein olduğu iddia edilmektedir (Bar-On ve Milo,

2019). Rubisco CO₂ ve O₂ konsantrasyonuna bağlı olarak RuBP aracılığı ile hem karboksilaz hem de oksijenaz işlevi görmektedir (Edwards ve ark., 2004). Fotorespirasyon, Rubisco enziminin oksijenaz aktivitesi ile 2-Fosfogliserat (2-PG) üretimi olan bir süreçtir ve CO₂ salınımına neden olmaktadır (Busch, 2020). C₄ fotosentezi mekanizmasında CO₂, Rubisco tarafından yakalanır ve fotorespirasyon seviyesini azaltarak fotosentezin verimliliğini artırır (Sage, 2004). Roell ve ark., 2021 yılında *Arabidopsis thaliana*' da yaptıkları çalışmada fotorespirasyonun olumsuz etkilerini azaltmak için yakın zamanda keşfedilen β-hidroksiaspartat [BHAC] döngüsü yoluyla glikolatın C₄ bileşiğine

dönüştürülmesini sağlamışlardır.

Tek hücre C₄ fotosentezinin metabolik yolu ilk kez 1960'lı yıllarda keşfedilmiş ve yapılan deneyler sonucunda biyokimyasal temelleri araştırmacılar tarafından açığa kavuşturulmuştur (Hatch, 1987; Hatch, 1992; Sage, 1999; Furbank, 2016). C₄ fotosentezi dikotiledon ve monokotiledonlarda çok sayıda cinste görülmektedir (Sage ve ark., 1999). Karasal bitkilerde tek hücre C₄ fotosentezi günümüzde Amaranthaceae familyası içinde sınıflandırılan Chenopodiaceae alt familyasının Kranz tipi anatomi gösteren dört üyesinde (*Bienertia cycloptera*, *Bienertia sinuspersici*, *Bienertia kavirense* ve *Suaeda aralocaspica*) bulunur (Akhani ve ark., 2012). Sucul bitkilerde ise C₄ fotosentezi muhtemelen karasal bitkilerde ortaya çıkmadan önce ortamda çözünmüş CO₂ miktarındaki yetersizliğe yanıt olarak ortaya çıkmıştır (von Caemmerer ve ark., 2014; Bowes, 2002). C₄ türleri dünya tarımında da önemli bir yere sahip olup, mısır, *Sorghum*, şeker kamışı gibi bitki türleri hem gelişmekte olan hem de gelişmiş ülkelerde dünya gıda üretiminde büyük katkıda bulunmaktadır (von Caemmerer ve ark., 2017).

2. C₄ Metabolik Yolunun Evrimi ve Adaptasyonu

C₄ fotosentezi, bitkilerin Rubisco etrafında CO₂'nin konsantrine edilmesine olanak veren bir dizi biyokimyasal ve çeşitli anatomik modifikasyonları içermektedir (Drozak ve ark., 2012). C₄ fotosentezi 19 yüksek yapılı bitki familyasında 45 bağımsız kökünde meydana gelmektedir. C₄ fotosentezi yaklaşık olarak 7500 bitki türü ve tahmini olarak 250.000 kara bitkisinin yaklaşık olarak % 3'ünde bulunmaktadır (Sage ve ark., 1999). Fotosentetik organizmaların tümünde Rubisco enzimi CO₂'i fikse eden enzim olup Rubisco ve C₃ fotosentezi yaşamın başlarında gelişmiştir (Hayes, 1994). Bitki türlerinin bazıları C₃, bazıları da C₄ metabolik yolunu kullanır ve C₃-C₄ metabolik yolunu kullanan *Flaveria* spp. gibi bazı bitki türleri de vardır (McKown ve Dengler, 2007). C₄ metabolik yolu son 35 yıldır gelişmiş olup dünya üzerinde evrimsel sürecin en iyi örneklerinden biri haline gelmiştir (Sage ve ark., 2011; Grass, 2012). C₃-C₄ ara metabolik yolunun oluşması için C₃ yolundan C₄ ve C₃-C₄ yoluna geçişin evrimsel süreçte kademeli olarak gerçekleştiği görülmektedir (Sage ve ark., 2012; Heckmann ve ark., 2013; Garner ve ark., 2016).

3. C₄ Fotosentezinin Kimyası

Demet kını hücrelerinde C₄ asitlerinin dekarboksilasyonu için kullanılan enzime göre sınıflandırılan C₄ biyokimyasının nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADP)-Malik enzim, nikotinamid adenin dinükleotit (NAD)-Malik enzim ve PEP-karboksikinas (PCK) olmak üzere üç metabolik yolu mevcuttur (Hatch, 1987, Furbank, 2011; von Caemmerer ve Furbank, 2016; Fan ve ark., 2022). C₄ bitkilerin üç grubu demet kını hücrelerine (DKH) taşınmakta olan 4C'lu asitlerin doğasında farklılık

göstermektedir (Hatch, 2005; Sage ve ark., 2012). C₄ bitkilerinin tümünde mezofil (M) hücrelerinde oksaloasetik asit (OAA) eldesi, fosfoenolpiruvat karboksilaz (PEPK) tarafından katalize edilir (Sage, 2004). NADP-Malik enzim, OAA'dan üretilen malatı, DKH'a aktarmak için metabolik olarak yerleştirmekte ve piruvat dekarboksilasyon reaksiyonu sırasında oluşup M hücrelerine geri dönmektedir. Malatın sentezi M'de DKH kloroplastlarında NADP-Malik enzim ile dekarboksilasyon sonucunda meydana gelmektedir (Rao ve ark., 2016).

NADP-Malik enzim tipinde DKH hücreleri ve vasküler demet arasında hücre tabakası bulunmamaktadır ve suberin maddesi DKH hücre duvarında biriktirilmektedir. İndirgenmiş granaya sahip olan DKH kloroplastlar monokotiledonlarda ve dikotiledonlarda merkezi olarak düzenlenir (Gutierrez ve ark., 1974, Hattersley ve Watson, 1976; Prendergast ve ark., 1987; Lundgren ve ark., 2014). Piruvat karboksikinas tipi (PKT) bir çok bitki dokusunda sadece sitozolde bulunmaktadır ve C₄ fotosentezinin CO₂ konsantrine mekanizmalarında ve CAM metabolizmasında bu bitkilerde PCK malat /ve /veya asparttan elde edilen OAA'yı dekarboksile ederek Calvin döngüsü için CO₂ sağlamaktadır (Ku ve ark., 1980; Chapman ve Hatch, 1983; Dittrich ve ark., 1973; Leegood ve Rees, 1978; Benedict ve Beevers, 1961).

4. Kranz Anatomiye Sahip Türlerde C₄ Fotosentezi

C₄ bitkileri morfolojik ve fonksiyonel olarak iki farklı fotosentetik hücre tipinden oluşan Kranz anatomi olarak adlandırılan kendine özgü yaprak anatomisine sahiptir. Bunlar vasküler merkezi çevreleyen DKH ve yaprak epidermisi altında demet kını hücrelerini saran M hücrelerinden oluşur (Garner ve ark., 2016). C₄ fotosentetik yolu iki fotosentetik hücre tipinin koordineli olarak aktivitesini gerektirmektedir; karbon asimilasyon hücreleri (KAH; M hücrelerinin eşdeğeri) ve fotosentetik karbon indirgeme hücreleri (FKI hücreleri, genellikle demet kını hücrelerinin konumsal eşdeğeri). Her hücre tipi, C₄ yolunun bölümlenmesini yansıtan farklı ince ve benzersiz bir enzim tamamlayıcısına sahiptir (Soros ve Dengler, 2001).

C₄ fotosentezi esnasında Kranz anatomi yapısına sahip olan türlerde CO₂ ilk önce M hücrelerinde karbonik anhidraz (KA) ile HCO₃'e dönüştürülmekte ve sonra C₄ asitlerini üretmek için fosfoenolpiruvat karboksilaz (PEPC) ile sabitlenmektedir (von Caemmerer ve ark., 2014). 3C' lu olan fosfoenolpiruvatın (PEP) ilk karboksilasyonu C₄ asitlerini oluşturur ve C₄ asitleri daha sonra M hücrelerinden DKH'ye taşınır CO₂'yi serbest bırakmak için dekarboksile edilir (Garner ve ark., 2016). Yapılan çalışmalarda NADP-Malik enzim C₄ asit dekarboksilasyonu kloroplastta, NAD-Malik enzim tipi dekarboksilasyon mitokondride, PCK tipi dekarboksilasyon ise hem sitozol hem de mitokondri de gerçekleştiği bildirilmiştir (Burnell ve Hatch, 1988).

KKM'nin yüksek CO₂ seviyelerine karşı gaz difüzyonunu sınırlaması en önemli özelliğidir. KKM karasal bitkilerin aksine sucul bitkilerde daha yaygın olarak görülmektedir (Maberly ve Gontero, 2017). Araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda C₄ fotosentezinin karasal bitkilerde verimli çalışması için KAH ve FKI hücrelerini ayıran modifiye edilmiş duvar mevcut olduğu ve duvarın geniş plazmodezmata ağı üzerinden KAH ve FKI hücreleri arasında hızlı metabolit difüzyonuna izin verirken CO₂ kaybına karşı direnç gösterdiği bulunmuştur (Dengler ve Nilson, 1999; Leegood ve Walker, 1999).

5. Karasal Bitkilerde Tek Hücre C₄ Fotosentezi

Karasal bitkilerde tek hücre C₄ fotosentezi ilk kez günümüzde Amaranthaceae içerisinde sınıflandırılan Chenopodiaceae familyasına ait olan *Bienertia araloscaspica* da keşfedilmiştir (Freitag ve Stichler, 2000). Tek hücre C₄ fotosentezi yapan karasal türlerden Basra Körfezi'nin etrafındaki ülkelerde *Bienertia cycloptera*, *Bienertia sinuspersici*, *Bienertia kavirense*, Orta Asya'da ve tuz çöllerinde *Suaeda aralospica* yayılış gösteren yıllık bitkilerdir (Lung ve ark., 2012). *Bienertia araloscaspica* tuzlu göllerde yaşayan halofit bir bitki türüdür (Freitag ve Stichler, 2000). Yapılan çalışmalarda karbon izotop analizleri yaprak gaz değişimi enzim karakterizasyonu ile yapılan ölçümlerde bu türlerin doğada ve normal şartlarda C₄ fotosentezi gerçekleştirdiği gösterilmiştir. İmmunoelektron mikroskopu kullanılarak yapılan çalışmalarda tek bir klorenkima hücresinde, hücre içindeki ayrı sitoplazmik bölmelerde iki biyokimyasal ve ince yapı olarak farklı kloroplast tipinin (yani dimorfik kloroplastların) bölünmesiyle elde edildiği belirlenmiştir (Voznesenskaya ve ark., 2001; Voznesenskaya ve ark., 2002, Voznesenskaya ve ark., 2005; Chuong ve ark., 2006). *Bienertia* klorenkima hücreleri Rubisco içermeyen fakat piruvat fosfat dikinaz (PFDK) içeren kloroplastlara sahip periferik bir sitoplazmik bölmeden (PSB) ve NAD-Malik enzim içeren çok sayıda mitokondriyi çevreleyen Rubisco içeren kloroplastlara sahip merkezi bir sitoplazmik bölmeden (MSB) oluşur (Voznesenskaya ve ark., 2002; Chuong ve ark., 2006). *Suaeda araloscaspica* farklı bir tek hücre C₄ fotosentezine sahiptir. Rubisco içeren kloroplastların ve NAD-Malik enzim içeren mitokondrinin, hücrenin proksimal ucunda vasküler dokulara daha yakın konsantrasyona edildiği ve PFDK içeren kloroplastların, hücrenin distal ucunda vasküler dokulardan uzakta eşit olarak dağıtıldığı uzatılmış palizat klorenkima hücrelerinden oluşmaktadır (Voznesenskaya ve ark., 2001; Chuong ve ark., 2006). Yapılan çalışmalar, organel bölünmesinin tipik bir Kranz düzenlemesinden ve daha sonra hücre duvarı bozulmasından evrimleşmediğini göstermiştir (Voznesenskaya ve ark., 2003). Organellerin dağılımı klorenkima hücresinin zıt uçları ve iki bölgedeki organellerdeki enzimlerin diferansiyel ekspresyonu,

Suaeda araloscaspica klorenkima hücrelerinin olgunlaşması sırasında ortaya çıkar. C₄ metabolik yolağı, Rubisco'nun etrafında CO₂ konsantrasyonunu Kranz anatomi olarak adlandırılan hücre tipi ile artırırken Rubisco'nun oksijenaz aktivitesini engeller. Bu nedenle tek hücreli C₄ modellerinin biyokimyasal ve organellerin bölünmesi Kranz anatomisinin önerilen C₄ fotosentez modellerinde gösterildiği gibi tek bir hücre içerisinde hücre olarak ayrılmasına eşdeğerdir (Edwards ve ark., 2004).

6. Sucul Bitkilerde Tek Hücre C₄ Fotosentezi

Suda yaşayan bazı angiospermlerde (*Hydrilla verticillata* ve *Egeria densa*) ve *Thalassiosira weisslogi* gibi diatomların fotosentetik hücrelerinde C₄ döngüsü olduğu bildirilmiştir (Reiskind, 1991; Reinfelder, 2000). Sucul bitkilerde C₄ fotosentezinin keşfi ilk defa George Bowes tarafından *Hydrilla verticillata*'da gerçekleştirilmiştir (Holaday ve Bowes, 1980; Salvucci ve Bowes, 1981; Salvucci ve Bowes, 1983). Suda yaşayan monokotil bir bitki olan *Hydrilla verticillata* fakültatif bir türdür. (Bowes, 2002). Doğal şartlarda C₃ fotosentezi yapan bu tür çözünmüş CO₂ miktarının düşük olduğu yaz koşullarının benzetildiği laboratuvar koşullarında C₄ fotosentezi yapmaktadır (Rao ve ark., 2006).

Hydrilla verticillata'da C₄ ve Calvin döngüsü aynı hücrede meydana gelmektedir ve C₄ yapraklarının kloroplast hücrelerinde yüksek oranda CO₂ birikir. Deniz yosunları, siyonabakteriler, tatlı su bitkileri fotosentez yaparak suyun pH değerini 10 a kadar yükseltebilir ve serbest CO₂'yi ve HCO₃'ü sıfırlayıp havadaki O₂ dengesini iki katına çıkarabilirler (Brown ve ark., 1974; Van ve ark., 1976; Bowes ve Salvucci, 1989). *Hydrilla verticillata*' da ışık altında hidrojeni abaksial tabakasına salgılayarak, pH'yı 4 e düşürerek HCO₃'in CO₂'ye dönüşümünü ve CO₂'nin yaprakta pasif difüzyonunu artırmaktadır (Van Ginkel ve ark., 2001). *Hydrilla* hem oksijenli hem de oksijensiz solunum yapan tek hücreli NADP-Malik enzim türü olmasına rağmen Kranz tipi NADP-Malik enzim tipi dekarboksilasyon yapan C₄ bitkilerinden farklılık göstermektedir ve tipik olarak C₃ gaz değişimi ve biyokimyasal özellikler sergilerken düşük CO₂ seviyelerinde C₄ temelli karbondioksit konsantrasyonu mekanizması (KKM)'nin indüklendiği bildirilmiştir (Holaday ve Bowes, 1980; Magnin ve ark., 1997).

C₄ metabolik yolunda CO₂ girişi yaprağın yüzeyinden gerçekleşir. CO₂ yaprağa girdiğinde sitozolde bulunan KA tarafından bikarbonata dönüştürülür ve PEPC üreten OAA ile sabitlenir. OAA kloroplasta gönderilir NADPH ile NADP-MDH ile malata dönüştürülür. NADP-Malik enzim tarafından dekarboksile edilen malat CO₂, piruvat ve NADPH üretir, piruvat PFDK tarafından PEP' e dönüştürülür ve PEP, PEPC için substrat sağlayan sitozole gönderilir. Alternatif olarak, sitozolik aminotransferazlar yoluyla, PEPC tarafından sentezlenen OAA, sitozolde aspartata dönüştürülebilir, kloroplastta

elde edilen aspartat, NADP-MDH için substrat sağlayan OAA'ya dönüştürülebilir. (Bowes ve ark., 2002; Bowes ve ark., 2003). Tek hücre C₄ fotosentezi yapan *Egeria densa* hakkında pek fazla çalışma bulunmamaktadır. Çalışmalarda bu türün düşük sıcaklık ve düşük ışık altında C₃ fotosentezi yaptığı buna karşılık yüksek sıcaklık ve yüksek ışıkta ise C₄ fotosentezinin arttığı bildirilmiştir ve C₄ fotosentezi enzimleri PEPC ve NAD-Malik enzim de yüksek sıcaklık ve ışıkta artış göstermektedir (Salvucci ve Bowes, 1981; Casati ve ark., 2000).

Alglerin çoğu ve siyanobakterler inorganik karbonu yoğunlaştırmaktadırlar (Badger ve ark., 2000). Deniz diatomları dünya çapında karbondioksit fiksasyonunun % 20'sinden sorumludur (Falkowski ve Raven, 2013) ve diatomların genel olarak C₃ fotosentezi yaptıkları kabul edilmiş olsa da yapılan son çalışmalar metabolik etiketleme ve genom dizileme verileri bu canlıların C₄ fotosentezi gerçekleştirdiklerini göstermektedir (Roberts ve ark., 2007). Suda yaşayan bazı deniz planktonik diatomlarının C₄ fotosentezi gerçekleştirip gerçekleştirmediği merak edilen bir konu olmuştur. Bu canlıların mekanizmaları tam olarak bilinmemekle birlikte aktif bir şekilde CO₂ biriktirdikleri ve fotorespirasyonu azalttıkları bilinmektedir (Hopkinson ve ark., 2011). Diatom olan *Thalassiosira weissflogii*'de C₄ fotosentezinin işlevi ile ilgili kanıtlar olmasına rağmen bu mekanizmanın biyofiziksel olduğu kabul görmüştür (Reinfelder ve ark., 2004). 14C etiketleme yöntemi *Thalassiosira weissflogii*'de yapılan çalışmalar sonucunda Gliserat 3-fostat ve malat kombinasyonunun, *Thalassiosira weissflogii*' de C₃-C₄ fotosentezi ile birincil ürünler ve ikincil ürünler olarak şeker-fosfat olarak oluştuğunu göstermektedir. Bunun sonucunda C₃-C₄ türü olduğunu *Thalassiosira pseudonana*'da 14C etiketli C₃ bileşiklerinin fraksiyonu *Thalassiosira weissflogii*'dekine benzer sonuçlar vermiş olan C₄ bileşiklerine çok az ya da hiç rastlanmaması *Thalassiosira pseudonana*'nın C₃ fotosentezi yaptığını göstermektedir (Roberts ve ark., 2007).

7. Çeltik (Pirinç) Bitkisinde C₄ Fotosentezi

C₃ fotosentezi yapan çeltik bitkisinde fotosentez verimini artırmak için C₄ metabolik yolağının kullanılması son yıllarda bilim insanlarının araştırma konularından biri olmuştur (von Caemmerer, 2012). Pirinç yapraklarının M hücrelerinin % 90' ından fazlası kloroplast bulundurmasına rağmen C₄ bitkilerinde hem M hem de DKH eşit miktarda kloroplast bulundurmaktadır (Yoshimura ve ark., 2004; Karki ve ark., 2013). Pirinçte düzensiz olarak dağılım gösteren loblu M hücreleri DKH'de bulunmakta ve hücredeki kloroplastlar protoplastın hacminin % 60' ını kaplamakta olup pirinç DKH'de, M'nin aksine daha az kloroplast bulunmakta ve kloroplastlar süreklilik göstermemektedir (Sage ve Sage, 2009; Wang ve ark., 2017). Bugüne kadar yapılan çalışmalarda C₃ türlerinde işlevsel bir C₄ yolu tanımlanmaya başlanmıştır. C₄ metabolik yolunun çeltik

bitkisinde moleküler olarak (Kranz anatomisinin tanıtımı) enzim düzenleyici mekanizmalarının koordineli olarak düzenlenmesinde ve pirinç yapraklarında spesifik olan taşıyıcıların ekspresyonunda değişiklikler gerekmektedir (Burnell, 2011). Yapılan bilimsel çalışmalarda pirinçte bulunan M hücrelerinde C₄ metabolik yolunun ekspresyonuna odaklanılmış ve bazı C₄ genleri yüksek gen ifadesine sahip olan pirinç dahil edilmiştir (Matsuoka ve ark., 2001). DKH'ye bağlı M hücrelerinden oluşan C₃ metabolik yolunu kullanan pirinçte iki hücreli reaksiyon modeli oluşturulmuştur (Wang ve ark., 2017). C₄ verimliliğinin düşük olması pirincin loblu M hücrelerinde plazma membranının yanında bulunan kloroplastlarda CO₂' nin hücreler arası boşluklara sızması ile kloroplasta döngünün dekarboksilasyon fazı meydana geldiğinde olur (von Caemmerer ve ark., 2014). Pirinçte bulunan M hücreleri lobludur ve kloroplastlar hücre duvarının yüksek oranda kaplanmasıyla hücrenin periferinde bulunur. Bu yapı mitokondriyal glisin dekarboksilaz tarafından üretilen fotorespire olmuş CO₂' nin refleksiyonunu artırmaktadır. von Caemmerer ve ark., 2013 yılında yaptıkları çalışmada fotosentezin çeşitli modellerini çıkartmışlardır. *Hydrilla* ile yapılan deneysel çalışmalarda etkili bir KKM üretmek için tek hücreli C₄ fotosentezinin çeltik bitkisinin genlerine dahil edilmesi gerektiği bilim insanları tarafından bildirilmiştir (Bowes ve ark., 2008).

8. Sonuç

C₄ fotosentezinde oluşan ilk ara ürün 4C'lu bir bileşik olan oksalaasetat olduğu için bu yol C₄ yolu olarak adlandırılmakta ve tropik ve sıcak bölgelerde yaşayan bitkiler bu yolu kullanmaktadır (Hatch, 1987). C₄ yolunu kullanan bitkiler Kranz anatomisi olarak adlandırılan mezofil ve demet kını olmak üzere iki hücre tipine sahiptir (Garner ve ark., 2016). Karada ve suda yaşayan bazı bitki türleri tek hücre C₄ fotosentezi olarak adlandırılan özel bir fotosentez mekanizmasına sahiptirler. C₄ fotosentezi aynı zamanda günümüzde gelişmeye devam eden moleküler tekniklerle C₃ fotosentezini kullanan mısır gibi bitki genlerine aktarılarak yüksek fotosentez verimine sahip olan türlerin üretimi açısından avantaj sağlamaktadır. Bu derlemenin tek hücre C₄ fotosentezinin anlaşılması ve yapılacak olan çalışmalara ışık tutması beklenmektedir.

Katkı Oranı Beyanı

B.Ç. (%34), Y.Ö.K. (%33) ve F.Ö. (%33) çalışmanın tasarlanması. B.Ç. (%34), Y.Ö.K. (%33) ve F.Ö. (%33) kaynak araştırma ve düzenleme. B.Ç. (%34), Y.Ö.K. (%33) ve F.Ö. (%33) makalenin yazımı. B.Ç. (%34), Y.Ö.K. (%33) ve F.Ö. (%33) makalenin gönderimi ve revizyonu. Yazarlar makalenin son halini inceleyip onaylamıştır.

Çalışma Beyanı

Yazarlar bu çalışmada hiçbir çıkar ilişkisi olmadığını beyan etmektedirler.

Kaynaklar

- Akhani H, Chatrevoor T, Dehghani M, Khoshravesh R, Mahdavi P, Matinzadeh Z. 2012. A new species of *Bienertia* (*Chenopodiaceae*) from Iranian salt deserts: a third species of the genus and discovery of a fourth terrestrial C₄ plant without Kranz anatomy. *Plant Biosystems-An International J Dealing with all Aspects of Plant Biology*, 146(3): 550-559.
- Andersson I, Backlund A. 2008. Structure and function of Rubisco. *Plant Physiology and Biochemistry*, 46(3): 275-291.
- Badger MR, Spalding MH, Leegood RC, Sharkey TD, von Caemmerer S. 2000. *Photosynthesis: physiology and metabolism*. Switzerland: Springer, 369-397.
- Bar-On YM, Milo R. 2019. The global mass and average rate of Rubisco. *Proceedings of the National Academy of Sci*, 116(10): 4738-4743.
- Benedict CR, Beevers H. 1961. Formation of sucrose from malate in germinating castor beans. I. Conversion of malate to phosphoenol-pyruvate. *Plant Physiology*, 36(5): 540.
- Bowes G, Salvucci ME. 1989. Plasticity in the photosynthetic carbon metabolism of submersed aquatic macrophytes. *Aquatic Botany*, 34(1-3): 233-266.
- Bowes G, Rao SK, Reiskind JB. 2003. Photosynthetic acclimation of rice to global climate change: Will a same-cell C₄ system help? In *Rice Sci: Innovations and impact for livelihood*. Proceedings of the International Rice Research Conference, 16-19 September, Beijing, China, pp. 659-671.
- Bowes G, Rao SK, Estavillo GM, Reiskind JB. 2002. C₄ mechanisms in aquatic angiosperms: comparisons with terrestrial C₄ systems. *Functional Plant Biology*, 29(3): 379-392.
- Bowes, G, Rao, S. K, Reiskind, J. B, Estavillo, G. M, Rao, V. S. 2008. Hydrilla: retrofitting a C₃ leaf with a single-cell C₄ NADP-Malic enzyme system. In *Charting new pathways to C₄ rice* (pp. 275-296).
- Brown JMA, Dromgoole FI, Towsey MW. 1974. Photosynthesis and photorespiration in aquatic macrophytes. *Bull R Soc NZ*.
- Burnell JN, Hatch MD. 1988. Photosynthesis in phosphoenolpyruvate carboxykinase-type C₄ plants: pathways of C₄ acid decarboxylation in bundle sheath cells of *Urochloa panicoides*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 260(1): 187-199.
- Burnell JN. 2011. Hurdles to engineering greater photosynthetic rates in crop plants: C₄ rice. In: Raghavendra, A.S, Sage, R.B. (Eds.): *C₄Photosynthesis and Related CO₂ Concentrating Mechanisms*. Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp. 361-378.
- Busch FA. 2020. Photorespiration in the context of Rubisco biochemistry, CO₂ diffusion and metabolism. *The Plant J*, 101(4): 919-939.
- Casati P, Lara MV, Andreo CS. 2000. Induction of a C₄-Like Mechanism of CO₂ Fixation in *Egeria densa*, a Submersed Aquatic Species. *Plant Physiology*, 123(4): 1611-1622.
- Chapman KS, Hatch MD. 1983. Intracellular location of phosphoenolpyruvate carboxykinase and other C₄ photosynthetic enzymes in mesophyll and bundle sheath protoplasts of *Panicum maximum*. *Plant Sci Letters*, 29(2-3): 145-154.
- Chuong SD, Franceschi VR, Edwards GE. 2006. The cytoskeleton maintains organelle partitioning required for single-cell C₄ photosynthesis in *Chenopodiaceae* species. *The Plant Cell*, 18(9): 2207-2223.
- Dengler NG, Nelson T. 1999. Leaf structure and development in C₄ plants.
- Dittrich P, Campbell, W. H, Black Jr, C. C. 1973. Phosphoenolpyruvate carboxykinase in plants exhibiting crassulacean acid metabolism. *Plant Physiology*, 52(4): 357-361.
- Drozak A, Wasilewska W, Buczyńska A, Romanowska E. 2012. C₄ type photosynthesis. *Postepy Biochemii*, 58(1): 44-53.
- Edwards, G. E, Franceschi, V. R, Voznesenskaya, E. V. 2004. Single-cell C₄ photosynthesis versus the dual-cell (Kranz) paradigm. *Annu. Rev. Plant Biol*, 55, 173-196.
- Falkowski PG, Raven JA. 2013. *Aquatic photosynthesis*. In *Aquatic Photosynthesis*. Princeton University Press.
- Fan Y, Asao S, Furbank RT, von Caemmerer S, Day DA, Tcherkez G, Atkin OK. 2022. The crucial roles of mitochondria in supporting C₄ photosynthesis. *New Phytologist*, 233(3): 1083-1096.
- Freitag H, Stichler W. 2000. A remarkable new leaf type with unusual photosynthetic tissue in a central Asiatic genus of *Chenopodiaceae*. *Plant Biology*, 2(2): 154-160.
- Furbank RT. 2011. Evolution of the C₄ photosynthetic mechanism: are there really three C₄ acid decarboxylation types? *J Experiment Botany*, 62(9): 3103-3108.
- Furbank RT. 2016. Walking the C₄ pathway: past, present, and future. *J Experimental Botany*, 67(14): 4057-4066.
- Garner DM, Mure CM, Yerramsetty P, Berry JO. 2016. *Kranz anatomy and the C₄ pathway*. eLS. Chichester: John Wiley & Sons Ltd. URL: <http://www.els.net> [doi: 10.1002/9780470015902.a0001295.pub3].
- Grass Phylogeny Working Group II. 2012. New grass phylogeny resolves deep evolutionary relationships and discovers C₄ origins. *New Phytologist*, 193(2): 304-312.
- Gutierrez M, Gracen VE, Edwards GE. 1974. Biochemical and cytological relationships in C₄ plants. *Planta*, 119(4): 279-300.
- Hatch MD. 1987. C₄ Photosynthesis: a Unique Blend of Modified Biochemistry, Anatomy and Ultrastructure. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Bioenergetics*, 895:2, 81-106.
- Hatch MD. 1992. C₄ photosynthesis: an unlikely process full of surprises. *Plant and Cell Physiology*, 33.4: 333-342.
- Hatch MD. 2005. C₄ photosynthesis: discovery and resolution. *Discoveries in Photosynthesis*, 875-880.
- Hattersley, PW, Watson, L. 1976. C₄ grasses: an anatomical criterion for distinguishing between NADP-malic enzyme species and PCK or NAD-malic enzyme species. *Australian J Botany*, 24(2): 297-308.
- Hayes JM. 1994. Global methanotrophy at the Archean-Proterozoic transition. *Early life on Earth*, 220-236.
- Heckmann D, Schulze S, Denton A, Gowik U, Westhoff P, Weber AP, Lercher MJ. 2013. Predicting C₄ photosynthesis evolution: modular, individually adaptive steps on a Mount Fuji fitness landscape. *Cell*, 153(7): 1579-1588.
- Holaday AS, Bowes G. 1980. C₄ acid metabolism and dark CO₂ fixation in a submersed aquatic macrophyte (*Hydrilla verticillata*). *Plant Physiology*, 65(2): 331-335.
- Hopkinson BM, Dupont CL, Allen AE, Morel FM. 2011. Efficiency of the CO₂-concentrating mechanism of diatoms. *Proceedings of the National Academy of Sci*, 108(10): 3830-3837.
- Karki S, Rizal G, Quick WP. 2013. Improvement of photosynthesis in rice (*Oryza sativa L.*) by inserting the C₄ pathway. *Rice*, 6(1): 1-8.
- Ku MS, Spalding MH, Edwards GE. 1980. Intracellular localization of phosphoenolpyruvate carboxykinase in leaves of C₄ and CAM plants. *Plant Sci Letters*, 19(1): 1-8.
- Leegood RC, Ap Rees T. 1978. Phosphoenolpyruvate carboxykinase and gluconeogenesis in cotyledons of *Cucurbita pepo*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 524(1): 207-218.
- Leegood RC, Walker RP. 1999. Regulation of the C₄ pathway. In *C₄ Plant Biology* (Sage, R.F. and Monson, R.K, eds): pp. 89-131,

- Academic Press
- Lundgren MR, Osborne CP, Christin PA. 2014. Deconstructing Kranz anatomy to understand C₄ evolution. *J Experimental Botany*, 65(13): 3357-3369.
- Lung SC, Yanagisawa M, Chuong SD. 2012. Recent progress in the single-cell C₄ photosynthesis in terrestrial plants. *Frontiers in biology*, 7(6): 539-547.
- Maberly SC, Gontero B. 2017. Ecological imperatives for aquatic CO₂-concentrating mechanisms. *J Experimental Botany*, 68(14): 3797-3814.
- Magnin NC, Cooley BA, Reiskind JB, Bowes G. 1997. Regulation and localization of key enzymes during the induction of Kranz-less, C₄-type photosynthesis in *Hydrilla verticillata*. *Plant Physiology*, 115(4): 1681-1689.
- Matsuoka, M, Furbank, R. T, Fukayama, H, Miyao, M. 2001. Molecular engineering of C₄ photosynthesis. *Annual Review of Plant Biology*, 52(1): 297-314.
- McKown AD, Dengler NG. 2007. Key innovations in the evolution of Kranz anatomy and C₄ vein pattern in *Flaveria* (Asteraceae). *American J Botany*, 94(3): 382-399.
- Prendergast, H. D. V, Hattersley, P. W, Stone, N. E. 1987. New structural/biochemical associations in leaf blades of C₄ grasses (Poaceae). *Functional Plant Biology*, 14(4): 403-420.
- Rao S, Reiskind J, Bowes G. 2006. Light Regulation of the Photosynthetic Phosphoenol pyruvate Carboxylase (PEPC) in *Hydrilla verticillata*. *Plant and Cell Physiology*, 47(9): 1206-1216.
- Rao, X, Dixon, R. A. 2016. The differences between NAD-ME and NADP-ME subtypes of C₄ photosynthesis: more than decarboxylating enzymes. *Frontiers Plant Sci*, 7, 1525.
- Reinfelder JR, Kraepiel AM, Morel FM. 2000. Unicellular C₄ photosynthesis in a marine diatom. *Nature*, 407(6807): 996-999.
- Reinfelder JR, Milligan AJ, Morel FM. 2004. The role of the C₄ pathway in carbon accumulation and fixation in a marine diatom. *Plant Physiology*, 135(4): 2106-2111.
- Reiskind JB, Bowes G. 1991. The role of phosphoenolpyruvate carboxykinase in a marine macroalga with C₄-like photosynthetic characteristics. *Proceedings of the National Academy of Sci*, 88(7): 2883-2887.
- Roberts K, Granum E, Leegood RC, Raven JA. 2007. C₃ and C₄ pathways of photosynthetic carbon assimilation in marine diatoms are under genetic, not environmental, control. *Plant Physiology*, 145(1): 230-235.
- Roell MS, von Borzyskowski LS, Westhoff P, Plett A, Paczia N, Claus P, Weber AP. 2021. A synthetic C₄ shuttle via the β -hydroxyaspartate cycle in C₃ plants. *Proceedings of the National Academy of Sci*, 118(21).
- Sage RF, Li M, Monson RK. 1999. The taxonomic distribution of C₄ photosynthesis. In: Sage RF and Monson RK (eds) *C₄ Plant Biology*, pp 173-211. Academic Press, San Diego, California
- Sage RF. 1999. Why C₄ photosynthesis. *C₄plant biology*, 3-16.
- Sage RF. 2004. The evolution of C₄ photosynthesis. *New phytologist*, 161(2): 341-370.
- Sage RF, Christin, P. A, Edwards, E. J. 2011. The C₄ plant lineages of planet Earth. *J Experimental Botany*, 62(9): 3155-3169.
- Sage RF, Sage TL, Kocacinar F. 2012. Photorespiration and the evolution of C₄ photosynthesis. *Annual review of plant biology*, 63, 19-47.
- Sage TL, Sage RF. 2009. The functional anatomy of rice leaves: implications for refixation of photorespiratory CO₂ and efforts to engineer C₄ photosynthesis into rice. *Plant and Cell Physiology*, 50(4): 756-772.
- Salvucci ME, Bowes G. 1981. Induction of reduced photorespiratory activity in submersed and amphibious aquatic macrophytes. *Plant Physiology*, 67(2): 335-340.
- Salvucci ME, Bowes, G. 1983. Ethoxycarbonyl repression of the low photorespiration state in two submersed angiosperms. *Planta*, 158(1): 27-34.
- Soros CL, Dengler, N. G. 2001. Ontogenetic derivation and cell differentiation in photosynthetic tissues of C₃ and C₄ Cyperaceae. *American J Botany*, 88(6): 992-1005.
- Van Ginkel, L. C, Bowes, G, Reiskind, J. B, Prins, H. B. 2001. A CO₂-flux mechanism operating via pH-polarity in *Hydrilla verticillata* leaves with C₃ and C₄ photosynthesis. *Photosynthesis Research*, 68(1): 81-88.
- Van TK, Haller WT, Bowes G. 1976. Comparison of the photosynthetic characteristics of three submersed aquatic plants. *Plant Physiology*, 58(6): 761-768.
- Von Caemmerer, S. 2013. Steady-state models of photosynthesis. *Plant, Cell, Environ*, 36(9): 1617-1630.
- Von Caemmerer, S, Ghannoum, O, Furbank R. T. 2017. C₄ photosynthesis: 50 years of discovery and innovation. *J Experiment Botany*, 68: 97-102.
- Von Caemmerer, S, Furbank, R. T. 2016. Strategies for improving C₄ photosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology*, 31, 125-134.
- Von Caemmerer, S, Edwards, G. E, Koteyeva, N, Cousins, A. B. 2014. Single cell C₄ photosynthesis in aquatic and terrestrial plants: a gas exchange perspective. *Aquatic Botany*, 118, 71-80.
- Von Caemmerer S, Quick WP, Furbank RT. 2012. The development of C₄ rice: current progress and future challenges. *Sci*, 336(6089): 1671-1672.
- Voznesenskaya EV, Edwards GE, Kiirats O, Artyusheva EG, Franceschi VR. 2003. Development of biochemical specialization and organelle partitioning in the single-cell C₄ system in leaves of *Borszczowia aralocaspica* (Chenopodiaceae). *American J Botany*, 90(12): 1669-1680.
- Voznesenskaya EV, Franceschi VR, Kiirats O, Artyusheva EG, Freitag H, Edwards GE. 2002. Proof of C₄ photosynthesis without Kranz anatomy in *Bienertia cycloptera* (Chenopodiaceae). *Plant J*, 31(5): 649-662.
- Voznesenskaya EV, Franceschi VR, Kiirats O, Freitag H, Edwards GE. 2001. Kranz anatomy is not essential for terrestrial C₄ plant photosynthesis. *Nature*, 414(6863): 543-546.
- Voznesenskaya EV, Koteyeva NK, Chuong SD, Akhiani H, Edwards GE, Franceschi VR. 2005. Differentiation of cellular and biochemical features of the single-cell C₄ syndrome during leaf development in *Bienertia cycloptera* (Chenopodiaceae). *American J Botany*, 92(11): 1784-1795.
- Wang S, Tholen D, Zhu X. G. 2017. C₄ photosynthesis in C₃ rice: a theoretical analysis of biochemical and anatomical factors. *Plant, Cell, Environ*, 40(1): 80-94.
- Yoshimura Y, Kubota F, Ueno O. 2004. Structural and biochemical bases of photorespiration in C₄ plants: quantification of organelles and glycine decarboxylase. *Planta*, 220(2): 307-317.



NESFATİN-1'İN BİYOKİMYASAL FONKSİYONLARI

Nedim Murat YAVUZ^{1*}

¹Sivas Cumhuriyet Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Biyokimya Anabilim Dalı, 58140, Sivas, Türkiye

Özet: İlk olarak 2006 yılında keşfedilip, beynin hipotalamus bölgesinde salgılanan, beslenme davranışının düzenlenmesinde önemli görevi olan bir molekül olan tanımlanmıştır. Öncüsü NUCB2(pronesfatin) olup, besin alımını baskılayan 82 amino asitlik bir peptittir. Nesfatin-1 hormonu; beyin, kalp, adipoz doku, mide (mukozası), duodenum, pankreas, hipofiz bezi ve testiste salgılanmaktadır. Vücut ısısı üzerinde uzun süreli bir etkiye sahip olup, kan plazma seviyesindeki düşüklüğünün hiperglisemiye ve dolayısıyla hiperinsülinemiye neden olarak polikistik over sendromu gelişiminde rol oynayabilmektedir. Nesfatin-1hormonu koroner motiliteyi etkilemeden kasılma ve gevşemeyi baskılamaktadır. Testisteki oksidatif stresi azaltmayı amaçlayan bir çalışmada önemli bir etkisinin olmadığı görülmüştür. Ayrıca kan plazmasındaki seviye yüksekliğinin de demir eksikliği anemisindeki iştahsızlığın asıl nedeni olabileceği düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: Nesfatin, Hormon, Tokluk, İştah, NUCB2

Biochemical Functions of Nesfatin-1

Abstract: It was first discovered in 2006 and secreted in the hypothalamus region of the brain and was defined as a molecule that has an important task in regulating nutritional behavior. The pioneer is NUCB2 (ProneSfatin) and is an 82 amino acidity peptide that suppresses food intake. Nesfatin-1 hormone; It is secreted in the brain, heart, adipose tissue, stomach (mucosa), duodenum, pancreas, pituitary gland and testis. It has a long -term effect on body temperature and may cause hyperglycemia and hyperinsulinemia of blood plasma levels and play a role in the development of polycystic ovary syndrome. Nesfatin-1hormone suppresses contraction and relaxation without affecting the coronary motility. If a study aimed at reducing oxidative stress in the testist, it was seen that it has no significant effect. In addition, the level of level in blood plasma is considered to be the main cause of anorexia in iron deficiency anemia, as well as play an important role in preventing body fluid homeostasis and dehydration -related anorexia.

Keywords: Nesfatin, Hormone, Satiety, Appetite, NUCB2

*Sorumlu yazar (Corresponding author): Sivas Cumhuriyet Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Uygulama ve Araştırma Hastanesi, Kadın Doğum ve Çocuk Hastalıkları Bölümü, 58070, Sivas, Türkiye

E mail: nmyavuz@hotmail.com (N.M. YAVUZ)

Nedim Murat YAVUZ



<https://orcid.org/0000-0002-0551-4102>

Gönderi: 03 Mart 2022

Kabul: 31 Mayıs 2022

Yayınlanma: 01 Temmuz 2022

Received: March 03, 2022

Accepted: May 31, 2022

Published: July 01, 2022

Cite as: Yavuz NM. 2022. Biochemical functions of nesfatin-1. BSJ Eng Sci, 5(3): 130-136.

1. Giriş

İlk olarak 2006 yılında keşfedilmiş olup, beynin hipotalamus bölgesinde salgılanan, beslenme davranışının düzenlenmesinde önemli görevi olan bir molekül olan tanımlanmıştır. Nesfatin-1' in öncüsü NUCB2 (pronesfatin) olup, besin alımını baskılayan 82 amino asitlik bir peptittir. Nesfatin-1 zamana ve doza bağlı olarak besin alımını azaltmakta, kilo alımını yavaşlatmakta, vücut ağırlığının azaltılmasında rol almaktadır. Öncü protein olan (NUCB2)nükleobindin-2'de (pronesfatin), prohormon dönüştürücülerin pronesfatini nesfatin-1 (1-82 amino asitler), nesfatin-2 (85-163 amino asit) ve nesfatin-3 (166-396 amino asitler) dönüştürmesiyle oluşmaktadır. Nesfatin-1 molekülü üç kısımdan oluşur: N-terminali (N23), orta kısım (M30) ve C-terminali (C29). M30 aktif çekirdek kısmı, bu peptidin fizyolojik etkilerinin indüklenmesinde ve özellikle anorektik tepkilerinde anahtar rolü oynuyor gibi görünmektedir (Oh-I ve ark., 2006; Palasz ve ark., 2012). 2006 yılında ratlardaki çalışmayla, bu proteinin

anoreksiyaya neden olan hipotalamik endojen bir molekül olduğu keşfedilen nesfatin-1 ile özdeş sentetik bir peptidin enjeksiyonu, doza bağlı bir şekilde besin alımını azaltırken, bu etkisi enjeksiyondan sonra 6 saat boyunca devam ettiği olduğu görülmüştür. Buna karşılık, nesfatin-2 ve nesfatin-3'e karşılık gelen bir sentetik peptidin iştahı hiç etkilemediği görülmüştür. Nesfatin-1'i nötralize eden bir antikor enjeksiyonu ise tam tersine iştahı uyarmaktadır (Oh-I ve ark., 2006).

Kan beyin bariyeri, spesifik olarak modifiye edilmiş endotel hücrelerinden oluşur ve oreksijenik ve anoreksijenik moleküllerin beyne giriş çıkışını düzenleyerek beslenmede önemli bir rol oynayan yapıdır (Tulin ve ark., 2007). Nesfatin-1'in nüfuz etmesinin kandan beyne ya da beyinden kana doyurulamaz bir süreç olduğu anlaşılmıştır. Nesfatin-1, enjeksiyondan sonraki ilk 20 dakika boyunca kanda nispeten stabildir ve kan beyin bariyerini (KBB'yi) basit difüzyonla geçmektedir. Böylece sistemik toksisite olmadığı varsayıldığında, nesfatin-1'in periferik yoldan yüksek



miktarlarda verilebileceğini göstermektedir. Bu nedenle nesfatin-1'in periferik yoldan verilmesi herhangi bir sistemik toksisite sınırlarında uygulanabilir olduğunu göstermektedir (Weihong ve ark., 2007).

2. Nesfatin-1' in Ekspresyonu

Nesfatin-1 hormonu; beyin, kalp, adipoz doku, mide (mukozası), duodenum, pankreas, hipofiz bezi ve testiste salgılanmaktadır (Oh-I ve ark., 2006; Angelone ve ark., 2013). Karaciğer, böbrek, dalak, viseral yağ dokusunda, adrenal bezde, gastrokneimius kasında ve akciğerde nesfatin immünopozitif hücreler saptanmamıştır. Antrumda çok az seviyede nesfatin immünreaktif hücre görülmüş, özofagus, karaciğer, ince bağırsak ve kolonda nesfatin ise hiç görülmemiştir (Stengel, 2009; Zhang ve ark., 2010). Anne sütü bebekler için bir biyoaktif peptit çorbası olarak görülebilir. Kolostrum ve olgun anne sütünde nesfatin-1 içeriğine sahip olduğu bildirilmiştir. Nesfatin-1 konsantrasyonu gestasyonel diyabetli hastalarda normal emziren annelere göre daha düşük seviyede olduğu görülmüştür (Aydın, 2010).

Çalışmalarla, nesfatin-1'in salgılanan bir protein olduğunu ve beyin omurilik sıvısında ve dolaşımında bulunduğu doğrulanmıştır. Nesfatin-1'in hem merkezi hem de periferik uygulaması, besin alımında bir azalma ile sonuçlanmıştır ve kilo azaltıcı etkileri olan bir anoreksijen olarak kabul edilmektedir. Pronesfatin, proinsülini olgun insüline dönüştüren aynı enzimler olan prohormon dönüştürücüler tarafından nesfatin -1, -2 ve -3'e dönüştürülür. Ratlarda yapılan çalışmalarda pankreasın beta hücrelerinde insülin ve pronesfatinin birlikte ekspresyonu olduğunu, nesfatin-1 veya diğer pronesfatin kodlu peptitlerin glukoz homeostazında potansiyel rolüne işaret etmektedir (Gonzalez ve ark., 2009).

Nesfatin-1 sıçan mide mukozasında periferik olarak üretilmektedir. Veriler, NUCB2'nin oksintik mide bezlerindeki endokrin hücre havuzunda yüksek oranda eksprese edildiğini açıkça göstermektedir. NUCB2'nin mRNA ekspresyonunun mide mukozasında beyin ve kalp dokularına kıyasla yaklaşık 10 kat daha fazla eksprese edildiğini gösterilmiştir. Buna karşılık, sadece beyinde değil aynı zamanda midede de enerji homeostazında rol oynayan NUCB2/nesfatin-1 varsayımını destekleyen önemli bir NUCB2 mRNA regülasyonu görülmüştür. Ayrıca ghrelin ve nesfatin-1 hormonlarının immünreaktivitesinin oksintik mukozanın endokrin hücrelerinde farklı veziküllerde bulunduğunu da görülmüştür. Buda, ghrelin ve NUCB2/nesfatin-1'in farklı hücre içi mesajlaşma sistemleri tarafından iletilen ayrı metabolik yollarla ayrı ayrı salınabileceğini göstermiş ve aynı hücre içinde besin alımının çevresel düzenlenmesinde negatif bir geri besleme döngüsü olduğunu düşündürmektedir (Stengel, 2009).

Duodenumda nesfatin-1/NUCB2 hücreleri de submukozal tabaka bezlerinde eksprese edilmiş olup ratlarda yemek borusu, karaciğer, ince bağırsak veya kolonda nesfatin-1/NUCB2 hücresi tespit edilmemiştir

(Zhang ve ark., 2010). Pankreas adacıklarında, mide endokrin hücrelerinde ve kemirgenlerin duodenal Brunner bezlerinde bol miktarda nesfatin-1 / NUCB2 IR hücresi dağılımı bulundu. Duodenumdaki Brunner bezlerinin sayısı, duodenumun küçük bir kısmında sınırlı alanda, nispeten az olduğu için, daha önceki çalışmalarda gözden kaçmış olabilmektedir. Bu nedenle, duodenumun Brunner bezlerinde nesfatin-1/NUCB2 IR hücrelerinin varlığını gösteren ilk rapordur (Zhang ve ark., 2010). Brunner'ın bezlerinin ana işlevi, mideden duodenuma gelen asidik içerikten korumak için bikarbonat ve mukus içeren alkali bir salgı üretmektir; böylece bağırsak enzimlerinin aktif olması için alkali bir ortam sağlanmakta, bağırsak duvarından emilim ile barsak hareketinin kolay gerçekleşmesine yardımcı olmaktadır. Nesafatin-1/NUCB2 duodenumdaki fonksiyonel rolü şu anda bilinmemekle birlikte, Brunner bezlerinde nesfatin-1/NUCB2 hücrelerinin bol ekspresyonu ile enzim aktivasyonu, besin emilimi ve bağırsak duvarlarının korunması işlevlerinde rol aldığı düşünülmektedir (Zhang ve ark., 2010).

Özetle, mide mukozası, diğer iç organlar ve beyin ile karşılaştırıldığında yüksek miktarlarda NUCB2 eksprese etmektedir. NUCB2 mRNA'nın gastrik endokrin hücrelerde ekspresyonu, sıçanda 24 saatlik açlık ile önemli ölçüde aşağı yönde regüle edilir (hormon seviyesinde düşüş), bu da periferik NUCB2/nesfatin-1'in enerji homeostazında düzenleyici bir anoreksijenik rolü olduğunu düşündürmektedir (Stengel, 2009).

3. Çeşitli Biyokimyasal İşlevleri

Nesfatin-1'in, III. ventriküle sürekli infüzyonu, vücut kütlesinde önemli bir azalmaya ve beyaz adipoz doku miktarında azalmaya neden olmaktadır. Nesfatin-1'in intraperitoneal enjeksiyonu, farelerde besin alımının 3 saatlik baskılanmasını sağlamaktadır. Ayrıca, deri altı uygulaması aynı etkiyi indükler (sağlar) ve bu anoreksijenik etki 14 saat boyunca korunabilmektedir. Tekrarlanan intraperitoneal dozlar, 6 günlük bir süre boyunca vücut kütlesi artışını önemli ölçüde engellemiştir. Besin alımını baskılamak için gereken periferik nesfatin-1 dozlarının MSS'de etkili olanlardan yaklaşık 1000 kat daha yüksek olmaktadır (Palasz ve ark., 2012).

Leptine dirençli obez farelerde nesfatin-1'e karşı antikor enjeksiyonu, leptin enjeksiyonunun neden olduğu besin alımındaki azalmayı etkilememiştir. Bu nedenle nesfatin-1, leptin yolu aracılığıyla etki etmediği görülmüş, muhtemelen hipotalamustaki melanokortin sistemi aracılığıyla etki ettiği düşünülmektedir. Bu durum nesfatin-1'in insanlarda diyete bağlı obezitede olduğu gibi leptin direnci durumlarında işlevsel olabileceğini düşündürmektedir. Bu peptitlerin, otonomik aktivite, nöroendokrin fonksiyon ve lökomotor davranışlar üzerindeki etkiler dahil olmak üzere besin alımı üzerindeki etkilerine ek olarak beyinde birden fazla eylem uyguladığı gösterilmiştir (Tulin ve ark., 2007). 2013 yılındaki obez çocuklarda yapılan bir çalışma,

nesfatin-1 düzeylerinin obez çocuklarda sağlıklı kontrollere göre anlamlı derecede düşük olduğunu ve nesfatin-1 düzeylerinin BKİ ile negatif ilişkili olduğunu gösterilmiştir (Abacia ve ark., 2013).

Nesfatin-1, farelerde pankreas β -hücrelerinde L-tipi kanallar yoluyla Ca^{2+} akışını teşvik ederek glukozun neden olduğu insülin sekresyonunu arttırmaktadır. Bu sonuçlar, nesfatin-1'in fare adacık β -hücrelerinde L-tipi Ca^{2+} kanallarından Ca^{2+} akışını teşvik ederek glikoz kaynaklı insülin salgılanmasını güçlendirdiğini göstermektedir. Nesfatin-1'in konsantrasyona bağlı bir şekilde glikoz kaynaklı insülin salınımını arttırdığı gösterilmiştir. Bu nedenle, nesfatin-1'in, pankreasın β -hücrelerinde L-tipi kanallar yoluyla Ca^{2+} akışı yoluyla Ca^{2+} 'i artışı teşvik ederek, glukozun neden olduğu insülin salınımını güçlendirmesi muhtemeldir. Bu veriler, nesfatin-1'in Ca^{2+} 'yi bağımsız olarak artırdığını göstermektedir. Kesin olmamakla birlikte nesfatin-1, hem insülin sekresyonunu hem de insülin etkisini artırarak anti-diyabetik faktör olarak görev yapabilmektedir (Nakata ve ark., 2011). Nesfatin-1 başlangıçta hipotalamusta bir tokluk molekülü olarak tanımlanmış olmasına rağmen, hiperglisemik ratlara intravenöz olarak verildiğinde anti-hiperglisemik bir etkiye sahip olduğu bildirilmiştir. Diğer anti-hiperglisemik ajanlarla karşılaştırıldığında, muhtemelen yeni bir insülin yardımcıları sınıfında olabileceği düşünülmektedir. Etkisi ise doza, zamana ve insüline bağımlı olduğu görülmüştür (Su ve ark., 2010). Tip-2 diyabetli hiperglisemik farelerde nesfatin-1 enjeksiyonu, herhangi bir ek insülin uygulaması olmaksızın 6 saat boyunca önemli ölçüde daha düşük kan şekeri seviyelerini korumaktadır. Bu çalışmada anti-hiperglisemik etkisinin sadece periferik olduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte, hiperglisemik farelerde anti-hiperglisemik etkisinin görünüşte saatlerce sürdüğünü bulunmuş, bu da hücre içi etkisinin kalıcı olabileceğini düşündürmüştür. Bir *in vivo* deneyde, Nesfatin-1'in anti hiperglisemik etkisinin, insülin sinyalleşmesinin iyi bilinen iki unsuru olan PPAR-c antagonisti ve AMPK inhibitörü tarafından önlendiği bulunmuştur (Su ve ark., 2010). Gestasyonel DM'li hastalardaki çalışmada nesfatin-1 düzeyinin ılımlı insülin rezistansının olduğu kontrol gebe grubuna kıyasla daha fazla baskılandığı görülmüştür. GDM 'de serum nesfatin-1 düzeyinin düştüğü, postpartum dönemde ise arttığı bildirilmiştir (Karakaya, 2011).

18-25 yaş aralığında ve normal BKİ değerlerine sahip 25 kişiden oluşan deneklerde akut aerobik egzersizin nesfatin-1 etkileri incelenmiştir. Akut egzersiz esnasında denekler üzerinde zıt yönlü farklılıklar gözlemlendiğinden egzersiz hormonu olarak kabul edilemeyeceği bildirilmiştir (Algül ve Özçelik, 2016). Benzer bir çalışmada 30 sporcu erkek denekten oluşan bir gruba sabah saatlerinde 30 dakikalık aerobik koşma egzersizi yaptırılmıştır. Bu çalışmada da nesfatin-1 düzeylerinde zıt sonuçlar elde edilmiştir. Çalışmada, BKİ, vücut yağ oranı ve ağırlığı ile nesfatin-1 hormonu arasında anlamlı

bir korelasyon görülmemiştir (Özdenk, 2018). Sedanter ve antrenmanlı 28 kişilik grupta yapılan nesfatin-1 ile akut aerobik egzersiz ilişkisi değerlendirilmesinde önceki çalışmaları destekleyen benzer sonuçlarda bulunmuştur. Hatta sedanter deneklerin, bazal ve egzersiz sonrası nesfatin-1 düzeyleri antrenmanlı gruptan daha yüksek olduğu görülmüştür (Özdenk, 2017). Bu çalışmalarda nesfatin-1 düzeyindeki farklılıkların ise beslenme, metabolik, psikolojik vb. durumlardaki farklılıklarından kaynaklanabileceği düşünülmektedir (Özdenk, 2017).

Majör depresif hastalardaki çalışmada, kısa ve uzun dönemde uygulanan ilaç tedavisinin etkinliğiyle birlikte nesfatin-1 hormonunun tedavi öncesi ve sonrasındaki 3 ile 9 aylık dönemlerdeki seviyesi araştırılmıştır. Tedavi öncesi nesfatin-1 değeri hasta grubunun, kontrol grubundaki hastalara göre nesfatin-1 değerinin anlamlı olarak yüksek olduğu görülmüştür. 3 aylık tedavi sonrasında nesfatin-1 seviyesi azalmış olup, yine 9 aylık tedavi sonundaysa azaldığı görülmüştür. Araştırmada tedavinin üç ile dokuzuncu aylardaki nesfatin-1 düzeyindeki azalmanın hastaların anksiyete durumu veya santral sinir sistemlerindeki düzelmeye ilişkili olabileceği düşüncesini öne çıkarmaktadır. Öne çıkan noktaysa, depresyon tedavisinde bazal 3 ve 9 aylık periyotlarının tamamında nesfatin-1 seviyesindeki azalma önemli bir noktadır (Algül ve ark., 2014).

Depresyon tedavisinin öncesi ve sonrası durumu üzerine çalışmada hasta ve kontrol grubu arasında serum nesfatin-1 seviyesi açısından, depresyon tedavisi öncesi ve sonrası nesfatin-1 seviyeleri kıyaslandığında anlamlı fark görülmemiştir. Üç aylık antidepresan tedavisinde nesfatin-1 düzeylerine etki etmediği gözlemlenmiştir (Dede ve ark., 2017).

Nesfatin-1 yetersizliği, lipopolisakkarit kaynaklı murin akut akciğer iltihabını artırdığı bildirilmiştir. Çalışmalar NUCB2/nesfatin-1'in yokluğunun, yapışık nötrofillerin birikimini yaklaşık 3 kat artırdığını göstermektedir. NUC2/nesfatin-1'in yokluğu sadece yapışık nötrofil birikimini önemli ölçüde arttırmakla kalmamış, aynı zamanda proinflatuar sitokinleri ve kemokinleri de arttırmıştır. Fare akciğerlerinde ve nötrofillerde yapısal olarak eksprese edilip, akut akciğer hasarı sırasında fare akciğerlerinde yapışık nötrofil birikimini ve enflatuar sitokin ekspresyonunu inhibe ederek antiinflatuar özellikler olduğu sonucunda varılmıştır. Bu bulgularda, NUCB2/nesfatin-1'in antiinflatuar bir sitokin olduğunu da düşündürmektedir (Shimizu, 2020). Nesfatin-1 anoreksijenik özelliğinin yanında, son çalışmalar enflamasyonun düzenlenmesi de dahil olmak üzere çeşitli ek fonksiyonları olduğunu ortaya koymuştur. Nöroinflatuar hastalık olan multiple sklerozda (MS) NUCB2/nesfatin-1'in durumu hakkındaki çalışmada MS hastalarının beyin omurilik sıvısında NUCB2/nesfatin-1'in artan ekspresyonu ilk kez doğrulanmıştır. Böylece mevcut veriler beyin omurilik sıvısındaki NUCB2/nesfatin-1 seviyesinin MS tanısı için etkili bir biyobelirteç olma potansiyeline sahip olabileceğini göstermektedir (Shimizu, 2020). Akut

pankreatit modelinde gelişen oksidan hasarın nesfatin-1 hormon tedavisiyle azaldığı ve bu hormonun pankreatik hasarı azalttığı gözlenmiş olup, lipaz ve tripsinojen-2 gibi serum belirteçlerinde melanokortin reseptörleri üzerinden etkiliyken, farklı enflamatuvar ve oksidan hasar parametrelerinde farklı reseptörler üzerinden etki ettiği görülmektedir. Bu çalışmayla nesfatin-1'in, antioksidan etkisini glutasyon seviyesini arttırarak reseptörlerin antagonisti üzerinden gösteriyor olabileceğini düşündürmektedir (Buzcu, 2019).

Nesfatin-1, besin alımı ve vücut ısısı üzerinde uzun süreli bir etkiye sahiptir. Nesfatin-1'in etkilerinin zaman seyri, uygulanan süreye bağlı olarak değişebilmektedir. Nesfatin-1 nöronlarının çoğu soğuğa duyarlıdır ve termoregülasyonun kilit merkezlerine yerleştirilmiştir. Nesfatin-1, hipotalamik paraventriküler çekirdeğin soğuğa duyarlı nöronlarında ve kahverengi yağ dokusu termojenezini ve cilt kan akışını düzenleyen premotor nöronlar olan çekirdek raphe pallidus ve obscurus'un nöronlarında prepro-tirotropin salgılayan hormon ile birlikte lokalize şekilde olduğu rapor edilmiştir (Könczöl ve ark., 2012). Nesfatin-1, yemeğin motivasyonel ve ödüllendirici değerini azalttığı öne sürülmüş, bulgulara dopaminerjik nöron aktivitesini ve dolayısıyla besin alımının hedonik yönlerini negatif olarak modüle ederek enerji alımını azalttığını göstermektedir. Mevcut çalışmada, nesfatin-1'in mezolimbik dopamin sisteminin modülasyonu yoluyla enerji alımını etkilediğini göstermektedir (Dore ve ark., 2020). Literatürde ilk kez yapılan bir araştırmada; hem psikolojik hem de fizyolojik bir akut stres modeli olarak deney hayvanlarındaki yüzme stresinin nesfatin-1 nöronları aracılığıyla besin alımını azaltabileceği ve bu şekildeki azalmasının da glutamaterjik sistemle olabildiği ifade edilmiştir. Besin alımının baskılanmasında etkili nöronların periferik stres sinyallerini algılayabilecek reseptörleri sentezlediği ve bu yolla periferik dokuları etkileyerek, akut stres durumunda besin tüketiminin azalmasına, nesfatin-1'in nöronal sisteminin strese bağlı aktivasyonunda glutamaterjik sistemin önemli rol oynadığı belirlenmiştir. Periferik sinyalleri aldığı belirlenen nesfatin-1 nöronlarının aktivasyonuna neden olduğu ve bu besin alımının baskılanması yönünde etki sağlayabileceği gösterilmiştir (Ekizceli, 2019). Ratların duyuşal nöronlarında kalsiyum sinyalleşmesi etkisinin incelendiğinde, ilk defa nesfatin-1'in sıçan kültüre DKG(Dorsal Kök Gangliyonu) nöronlarında intrasellüler kalsiyum konsantrasyonunu arttırdığı ispatlanmaktadır. Ca^{2+} üzerindeki etkisinin ise doza bağımlı olduğu gösterilmiştir. Çalışmada protein kinaz C inhibitörünün DKG nöronlarında nesfatin-1 ile indüklenmiş kalsiyum artışını ortadan kaldırmasının; merkezi ve periferik nöronlarda farklı akış etkileyicileri olduğunu düşündürmektedir. Verilerde; nesfatin-1'in dorsal kök gangliyon nöronlarında (DKG) kalsiyum akışını, G protein bağılı reseptör ve protein kinaz C' ye bağımlı mekanizma kullanılarak stimüle ettiğini ilk defa göstermiştir. Araştırma sonuçlarına göre nesfatin-1'in sıçan kültüre

duyuşal nöronlarında Protein Kinaz C (PKC) mekanizmaları aracılığıyla nosiseptif uyarımında dahil olduğu somatosensöriyel transmisyonu modüle ettiğini ortaya koymaktadır. Bulgularla nesfatin-1'in duyuşal nöronlarda doza bağımlı olarak Ca^{2+} düzeyini arttırdığı ve nesfatin-1'in indüklediği bu artışın PKC-aracılı sinyal yolağı aracılığıyla olabileceğini, aynı zamanda diğer önemli bulgusuysa yüksek doz nesfatin-1'in uygulaması (100nM) ağrı iletiminden sorumlu olan nosiseptif (küçük ve orta çapa sahip DKG) nöronlardan ziyade büyük çapa sahip olan propriyoseptif nöronları etkilediği bildirilmiştir (Gök, 2016). CDP-kolin çeşitli nörolojik hastalıkların tedavisinde kullanılan ilaçtır. Serebral iskemi ve hipoksi, kafa travmaları, nörodejeneratif hastalıklar (Alzheimer ve demans gibi hastalıklar), hafıza ve öğrenme bozukluklarında olumlu yönde etkileri mevcuttur. İnsan ve hayvanlardaki çalışmalarda CDP-kolinin endokrin sistemi üzerinde etkili olduğu bulunmuştur. Büyük ve polar bir bileşik olmasından dolayı kan-beyin bariyerinden geçişi zordur. Ratlardaki çalışmada, verilmiş yolu, açlık-tokluk durumu, cinsiyet farkı gibi birçok değişken dikkate alınmış; farklı dozların, 7 veya 8 farklı zaman aralığında etkisi ilk kez incelenmiştir. Sonuçta, intraserebroventriküler yolla verilen CDP-kolinin serum nesfatin-1 seviyesini etkilediği görülmüş olup, etkinin açlık-tokluk koşullarına göre değiştiği saptanmıştır. Tokluk koşullarında dolaşımında nesfatin-1 düzeylerini artırırken, aç bırakılmış hayvanlarda ilacın etkisi nesfatin-1'i baskılamak şeklinde olmuştur. Cinsiyete bağılı olarak etkinin yönü değişmemiş, ancak etkinin başlama ve devam sürelerinde farklılıklar olduğu izlenmiştir (Usta, 2014).

Polistik over sendrom (PKOS)'lu 90 katılımcılı araştırmada; nesfatin-1 seviyelerinin kontrol grubundan daha düşük olduğu belirlenmiş olsa da bu durumun hasta grubunun BMI değerlerinin yüksek olmasından kaynaklanabileceği düşünülüp, tüm gruplar BMI'ye göre alt gruplara ayrılarak karşılaştırılmıştır. Sonuç olarak hastalık durumundaki nesfatin-1 düşmelerinin BMI'den bağımsız olduğu gözlemlenmiştir. PKOS'lu kadınlarda FSH ve nesfatin-1 seviyesi arasında pozitif korelasyon belirlenmiş, HOMA-IR ile nesfatin-1 hormonu arasındaysa bir ilişkiye görülmemiştir (Alp, 2014). 60 katılımcıdan oluşan başka bir araştırmada; PKOS'lu kadınların plazma nesfatin-1 seviyeleri kontrol grubundan anlamlı olarak düşük olduğu görülmüştür. PKOS patofizyolojisinde obesite, hiperinsülinemi ve insülin direnci mekanizmaları etkenlerinde, nesfatin-1'in plazma seviyelerinin düşüklüğünün hiperglisemiye ve dolayısıyla hiperinsülinemiye neden olarak, PKOS gelişiminde rol oynayabileceği bildirilmiştir (Deniz, 2010).

Nesfatin-1'in kalp üzerine direkt etkisinin incelendiğinde, periferik arter direnci ve kardiyak kontraktilité üzerinde direkt etkisi aracılığıyla periferik kardiyovasküler yanıtları etkileyebileceği sonucuna varılmıştır. Literatürde ilk kez nesfatin-1'in izole sıçan aort dokusu ve sağ atrium preparatındaki fonksiyonel etkileri birlikte

değerlendirildiği çalışmada, izole sıçan aort preparatında nesfatin-1'in kasılma yanıtını anlamlı olarak etkilemediğini ancak konsantrasyon bağımlı şekilde gevşeme yanıtları oluşturduğunu bildirilmiştir. Ayrıca, izole sağ atrium preparatlarında da nesfatin-1 pozitif inotrop(kasılma gücü) ve pozitif kronotrop (kalbin düzenli çalışması) etki ortaya çıkardığı açıklanmıştır (Barutcuğil, 2016).

Nesfatin-1'in kardiyovasküler etkilerinde merkezi kolinerjik sistemin aracılığını göstermek için ratlarda nesfatin-1'in pH (sıçanların posterior hipotalamusuna)'den asetilkolin (Ach) ve kolin (Ch) salınımına etkisi üzerine bir çalışma yapılmıştır. Merkezi olarak uygulanan nesfatin-1'in normotansif ratlarda pressör ve bradikardik/taşikardik fazlar içeren yanıtlar oluşturduğu görülmüştür. Nesfatin-1'in oluşturduğu kardiyovasküler etkilere PH'den salınan Ach ve Ch, merkezi kolinerjik muskarinik ve nikotinik reseptörler vasıtasıyla aracılık ettiği bildirilmiştir. Merkezi sinir sistemi ile kardiyovasküler sistemin düzenlenmesinde nesfatinerjik ve kolinerjik sistem arasında bir etkileşim olduğunu göstermektedir. Çünkü serebral yan ventriküle nesfatin-1 enjeksiyonu posterior hipotalamik Ach ve Ch seviyesini arttırmakta ve merkezi kolinerjik hem nikotinik hem de muskarinik reseptörlerin aktivasyonu enjekte edilen nesfatin-1'e alınan kardiyovasküler yanıtı aracılık ettiği gösterilmiştir. Çalışmalarla nesfatin-1'in merkezi kontrol açısından oldukça önemli bir molekül olduğunu doğrular nitelikte görülmüştür (Aydın, 2017).

Sıçan kalp özütlerinde hem Nesfatin-1 proteini hem de NUCB2 mRNA'nın varlığını belirlediği çalışmada, İzole ve Langendorff ile perfüze edilmiş sıçan kalbi preparatlarında, eksojen Nesfatin-1'in koroner motiliteyi etkilemeden kasılma ve gevşemeyi baskıladığı bulunmuştur (Angelone ve ark., 2013).

Nesfatin-1'in, testosteron salgılanması üzerine araştırmada, merkezi olarak uygulanmasının ratların plazma GnRH seviyesinde kontrol grubuna göre anlamlı bir değişiklik oluşturmaksızın plazma FSH, LH ve testosteron seviyelerinde anlamlı bir artışa sebep olduğu görülmüştür. Bu verilerle ilk kez nesfatin-1'in merkezi enjeksiyonunun plazma FSH, LH ve testosteron düzeylerini artırarak erkek HPGA (Hipotalamo-hipofizer-gonadal)'sını regüle ettiğini göstermiştir (Yalçın ve ark., 2019). Nesfatin-1'in ratlardaki testis iskemi reperfüzyon hasarı üzerine koruyuculuğunu inceleyen bir araştırmadaysa, torsiyon sonrasında oksidatif enzimlerde, lipid peroksidasyonda artış testis dokusunda oksidatif stresin geliştiğini göstermektedir. Bulgular neticesinde nesfatin-1'in testisteki oksidatif stresi azaltmadığı gözlemlenmiştir. Nesfatin-1 kullanıldığında testisteki oksidatif stresi azaltmayı amaçlanmış ancak önemli bir etkisinin olmadığı bildirilmiştir (Erdoğan, 2018).

6 ay boyunca diyet kısıtlaması ile birlikte β -glukan takviyesi verilen erkek erişkin ratlarda nesfatin-1 düzeyleri arasındaki ilişki incelenmiştir. Arpa, yulaf, çavdar gibi tahılların ve bakteri, maya ve mantarların

hücre duvarından elde edilen glukoz polimerleri β -glukan olarak tanımlanıp, önemli bir diyet lifidir. Diyet kısıtlaması ve β -glukan takviyesi uygulanan grupla kontrol grubu karşılaştırıldığında nesfatin-1 hormonunun kan plazmasındaki konsantrasyonu üzerinde önemli bir etkisinin olmadığı gözlemlenmiştir (Akça, 2017).

Tüp mide ameliyatı olan bireyler üzerindeki (31 kadın, 9 erkek) çalışma da ameliyat öncesi ve sonrasındaki 4. Haftadaki nesfatin-1 seviyeleri karşılaştırılmış ve ameliyattan sonralı 4. Haftada serum nesfatin-1 seviyelerinin azaldığı görülmüştür. Buna rağmen ameliyattan 1 ay sonrası için nesfatin-1 seviyesiyle, glikoz ve insülin seviyeleri arasında ilişki saptanmamıştır. Tüp mide ameliyatı olmuş kadın ve erkek hastalarda 0-4 haftalık serum nesfatin-1 düzeyleri incelendiğinde erkek hastalarla anlamlı bir fark bulunamazken, kadın hastalarda anlamlı bir fark bulunmuştur (Deliloğlu, 2019).

Nesfatin-1'in çeşitli kanser türleri üzerinde etkilerini ele alan çalışmalarda birbiriyle çelişkili farklı sonuçlar elde edilmiştir. Bu farklılıklar dolayısıyla henüz NUCB2/NESF-1, hem kanser baskılama hem de ilerleme faktörleri olarak kabul edilmemektedir. Nesfatin-1 proteinin birkaç fonksiyonel alanı ve proteolitik türevleri olup, bu nedenle dokular ve hücre tipleri arasında farklı rolleri olabileceği görüşü öne çıkmaktadır. Ayrıca, nesfatin-1 için varsayılan bir reseptör henüz tanımlanmamıştır (Kmieciak ve ark., 2021).

Sigara içmenin, erken foliküler fazda kadınlardaki nesfatin-1 seviyesindeki etkisini belirlemeyi amaçlayan bir çalışmada sigara içen kadınlarda sigara içmeyenlere göre erken foliküler fazda ölçülen serum nesfatin-1 seviyeleri anlamlı olarak düşük olduğu belirlenmiş, ancak buna hangi mekanizmanın sebep olduğu bilinmemektedir (Yıldız ve ark., 2020).

Demir eksikliğinden kaynaklı anemide en çok karşılaşılan klinik şikâyet iştahsızlıktır. DEA tanımlı çocuklarda iştah düzenleyici hormonlardan ghrelin, obestatin, nesfatin-1 seviyesi arasında ilişkisi üzerine olan çalışmada, DEA olan grupta kontrol grubuna kıyasla nesfatin-1 seviyesi yüksek görülmüştür. Nesfatin-1 seviyesinin cinsiyet ve yaşa bağlı olmadığı da ortaya konulmuştur. Literatürdeki başka çalışmalar demir eksikliği anemisinde iştahsızlık nedenini ghrelin hormonu seviyesindeki düşüklüğe bağlarken; bu çalışmada tam tersine demir eksikliği anemisi hasta grubunda ghrelin hormonu seviyesi kontrol grubundan yüksek seviyededir. Nesfatin-1 seviyesi DEA grubunda kontrol grubuna kıyasla daha yüksek olduğu için, nesfatin-1 düzeyindeki bu yüksekliğin demir eksikliği anemisindeki iştahsızlığın asıl nedeni olabileceği düşünülmektedir (Altıntaş, 2017).

Bir araştırmada Nesfatin-1'in dehidrasyona bağlı anoreksiyada çok önemli bir peptit olduğu öne sürülmüştür. Buna göre hipertonic salin yüklemesi veya su yoksunluğu gibi ozmotik uyarılara maruz kaldıktan sonra nesfatin-1 seviyelerinin arttığı görülmüştür. Susuzluğa yanıt olarak nesfatin-1 ekspresyonu zamana

bağlı olarak artış göstermiştir. Araştırmada nesfatin-1 seviyelerinin de 48 saatlik dehidrasyondan sonra arttığını ve 24 saatlik rehidrasyonla azaldığını ortaya koyulmuştur. Nesfatin-1/NucB2, vücuttaki Na konsantrasyonlarını korumak için işlev gören düzenleyici bir faktör olduğu görüşü öne çıkmıştır. Bu sonuçlar, nesfatin-1' in vücut sıvısı homeostazını ve dehidrasyona bağlı anoreksiyi önlemede önemli rolleri olduğunu göstermiştir (Yoshimura ve ark., 2014).

4. Sonuç ve Öneriler

Özellikle obezite hastalarının tedavisinde iştah kontrolü mekanizması rolüyle yeni bir alternatif yöntem olabileceği düşünülmektedir. İştahsızlık kaynaklı malnutrisyonun ortaya çıkarabileceği anemi, büyüme ve gelişme geriliği gibi çeşitli hastalıklardan korunmak içinde hormon seviyesinin düzenlenmesi tedavide farklı bir yöntem olarak göz ardı edilmemelidir. Bazı biyokimyasal fonksiyonlarının aydınlatılmasının neticesinde farmakolojik ajan olarak kullanılma potansiyeli de olan bu hormonunun metabolik etkileri fonksiyonel açıdan oldukça önemlidir. Obezite, diyabet, metabolik cerrahi, endokrinolojik hastalıklar, onkolojik, nörolojik, psikolojik, elit sporcular ile bazı fiziksel aktiviteler, kalp ve testis gibi organlardaki etkilerinin aydınlatılması için daha kapsamlı araştırmalar yapılmasının yanında literatürde değinilmemiş hastalıklar üzerine araştırma yapılması halk sağlığının korunması ve sürdürülmesi göz önüne alındığında, hastalıklardan korunma ve tedavi sürecinde nesfatin-1 hormonunun kullanımının etkilerini diğer hastalıklarla ilişkileri üzerine daha kapsamlı araştırmalar yapılması gerekmektedir.

Katkı Oranı Beyanı

Makale ile ilişkili tüm işlemler NMY (%100) tarafından yapılmıştır. Yazar makalenin son halini inceleyip onaylamıştır.

Çatışma Beyanı

Yazar bu çalışmada hiçbir çıkar ilişkisi olmadığını beyan etmektedirler.

Kaynaklar

- Abacia A, Catlia G, Anika A, Kumb T, Bober E. 2013. The relation of serum nesfatin-1 level with metabolic and clinical parameters in obese and healthy children. *Pediatr Diabetes*, 14: 189-195.
- Akça GY. 2017. Diyet kısıtlaması ile birlikte beta gluklan uygulanan erişkin erkek sıçanlarda leptin, nesfatin konsantrasyonları ve tiroid hormon değerlerinin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Uludağ Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Bursa, ss. 68.
- Algül S, Kara B, Özçelik O. 2014. Majör depresif hastalarda kısa ve uzun dönem ilaç tedavisinin etkinliği ile nesfatin-1, grelin ve nitrik oksit seviyesi arasındaki ilişkinin belirlenmesi. *FÜ Sağ Bil Tıp Derg*, 28 (3): 105 - 109
- Algül S, Özçelik O. 2016. Akut aerobik egzersizin nesfatin-1 üzerine etkilerinin belirlenmesi. *FÜ Sağ Bil Tıp Derg*, 30 (1): 05-08.

- Alp E. 2014. Polikistik over sendromu hastalarında nesfatin-1 düzeyleri ve metabolik sendromla ilişkili parametreler. Uzmanlık Tezi, İstanbul Bilim Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Anabilim Dalı, İstanbul, ss. 103.
- Altıntaş S. 2017. Çocuklarda demir eksikliği anemisinde grelin obestatin nesfatin düzeyi. Uzmanlık Tezi, Pamukkale Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Denizli, ss.
- Angelone T, Filice E, Pasqua T, Amodio N, Galluccio M, Montesanti G. 2013. Nesfatin-1 as a novel cardiac peptide: identification, functional characterization, and protection against ischemia/reperfusion injury. *Cell Mol Life Sci*, 70: 495-509.
- Aydın B. 2017. Nesfatin-1'in oluşturduğu kardiyovasküler etkilerde merkezi kolinerjik sistemin aracılığının incelenmesi. [Yüksek Lisans Tezi]. Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fizyoloji Anabilim Dalı. Bursa.
- Aydın S. 2010. The presence of the peptides apelin, ghrelin and nesfatin-1 in the human breast milk, and the lowering of their levels in patients with gestational diabetes mellitus. *Peptides*, 31: 2236-2240.
- Barutçugil A. 2016. Nesfatin-1'in damar yanıtı ve kalp hızı üzerine etkisinin değerlendirilmesi. [Uzmanlık Tezi]. Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı. Antalya.
- Buzcu H. 2019 Nesfatin-1'in sıçan akut pankreatit modelinde etkileri ve alta yatan mekanizmanın araştırılması. [Uzmanlık Tezi]. Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. İstanbul.
- Dede Ş, Şahpolat M, Kocaçaya MH, Arı M, Sesliokuyucu C, Yönden Z. 2017. Depresyon hastalarında serum apelin ve nesfatin-1 düzeyleri ve tedavi ile ilişkisi. *J Psychiat Neurol Sci*, 30: 39-47.
- Deliloğlu A. 2019. Tüp mide ameliyatı geçiren bireylerde beslenme durumu, serum nesfatin düzeyi ve glikoz regülasyonunun incelenmesi. [Uzmanlık Tezi]. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Ankara.
- Deniz M. Anaerobik eşikteki iş gücünde yapılan egzersizin irisin, nesfatin-1 ve oksidatif stres üzerine olan etkilerinin belirlenmesi [Yüksek Lisans Tezi]. Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Elazığ; 2017
- Deniz R. 2010. Polikistik over sendromlu kadınlarda nesfatin 1'in plazma düzeylerinin araştırılması. Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları Ve Doğum Anabilim Dalı. [Uzmanlık Tezi]. Elazığ.
- Dore R, Krotenko K, Reising J P, Murru L, Sundaram S M, Spiezio A. 2020. Nesfatin-1 decreases the motivational and rewarding value of food. *Neuropsychopharmacol*, 45: 1645-1655.
- Ekizceli G. 2019. Farklı stres modellerinde nesfatin-1 VE nöronostatin nöronlarındaki aktivasyonun ve glutamaterjik sistem etkilerinin histolojik tekniklerle araştırılması. Doktora Tezi, Uludağ Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Bursa, ss 156.
- Erdoğan Ö. 2018. Ratlarda testis iskemisi reperfüzyon hasarı üzerine nesfatin-1'in koruyucu etkisinin araştırılması. Uzmanlık Tezi, Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Üroloji Anabilim Dalı, Muğla, ss 64.
- Foo KS, Brauner H, Ostenson CG, Broberger C. 2010. Nucleobindin-2/nesfatin in the endocrine pancreas: distribution and relationship to glycaemic state. *J Endocrinol*, 204: 255-263.
- Gonzalez R, Tiwari A, Unniappan S. 2009. Pancreatic beta cells colocalize insulin and nesfatin immunoreactivity in rodents. *Biochem Biophys Res Commun*, 381: 643-648.
- Gök ZB. 2016. Nesfatin-1'in sıçan duyuşal nöronlarında kalsiyum sinyalleşmesi üzerine etkisi. Uzmanlık Tezi, Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Fizyoloji Anabilim Dalı, Elazığ, ss 69.

- Hui J, Aulakh GK, Unniappan S, Singh B. 2021. Loss of Nucleobindin 2/Nesfatin 1 increases lipopolysaccharide induced murine acute lung inflammation. *Cell Tissue Res*, 385: 87-103.
- Karakaya F. 2011. Gestasyonel diyabetes mellituslu hastalarda serum nesfatin-1 düzeyleri. Uzmanlık Tezi, Fırat Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, Elazığ, ss 51.
- Kmiecik AM, Dziegiel P, Podhorska-Okolów M. 2021. Nucleobindin-2/Nesfatin-1—A new cancer related molecule? *Int J Mol Sci*, 22: 8313.
- Könczöl K, Pinter O, Ferenczi S, Varga J, Kovacs K, Palkovits M. 2012. Nesfatin-1 exerts long-term effect on food intake and body temperature. *Int J Obes*, 36: 1514-1521.
- Nakata, M, Manaka, K, Yamamoto, S, Mori, M, Yada, T. 2011. Nesfatin-1 enhances glucose-induced insulin secretion by promoting Ca²⁺ influx through L-type channels in mouse islet β -cells. *Endocr. J*, 58, 305-313
- Oh-I S, Schimizu H, Satoh T, Okada S, Adachi S, Inoue K. 2006. Identification of nesfatin-1 as a satiety molecule in the hypothalamus. *Nature*, 443(7112):709-13.
- Özdenk Ç. Antrenmanlı erkek bireylerde anaerobik eşikte yapılan egzersizin nesfatin-1 hormonu üzerine olan etkilerinin belirlenmesi. *J Health Sci*, 27(2): 132-136
- Palasz A, Krzystanek M, Worthington J, Czajkowska B, Kostro K, Wiaderkiewicz R, Bajor G. 2012. Nesfatin-1, a unique regulatory neuropeptide of the brain. *Neuropeptides*, 46: 105-112
- Shimizu M, Manome T, Kumami M, Matsumura K, Kanai K, Shimomura K. 2020. Detection of NUCB2/nesfatin-1 in cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients. *Aging*, 12/23: 24134-24140.
- Stengel A. 2009. Identification and characterization of nesfatin-1 immunoreactivity in endocrine cell types of the rat gastric oxyntic mucosa. *Endocrinol*, 150(1): 232-238
- Su Y, Zhang J, Tang Y, Bi F, Liu JN. 2010. The novel function of nesfatin-1: antihyperglycemia. *Biochem Biophys Res Commun*, 391: 1039-1104
- Tulin O, Price, Willis K, Samson, Michael L. 2007. Niehoff, William A. Banks. Permeability of the blood-brain barrier to a novel satiety molecule nesfatin-1. *Peptides*, 28: 2372-238.
- Usta H. A. 2014. Merkezi ve periferik olarak verilen Cdp-Kolinin serum Nesfatin-1 düzeylerine etkisi. Yüksek Lisans Tezi. Uludağ Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Bursa, ss 40.
- Weihong Pan, Hung Hsuchou, Abba J. Kastin. 2007. Nesfatin-1 crosses the blood-brain barrier without saturation. *Peptides*, 28: 2223-2228.
- Yalçın E, Güvenç G, Altınbaş B, Özyurt E, Yalçın M. 2019. Nesfatin'in erkek sıçanlarda hipotalamo-hipofizer-gonadal aks üzerine etkileri. 2. Uluslararası Mardin Artuklu Bilimsel Araştırmalar Kongresi, 3-25 Ağustos, Mardin, ss. 129-135.
- Yıldız DE, Akçığ Z, Salman S, Uçar E, Tunç Karaman S. 2020. Sigara içmenin foliküler fazdaki kadınlarda serum nesfatin-1 değerleri üzerindeki etkisi: bir pilot çalışma. *JAREM*. 10(1): 23-26.
- Yoshimura M, Matsuura T, Ohkubo J, Maruyama T, Ishikura T, Hashimoto H, Kakuma T, Mori M, Ueta Y. 2014. A role of nesfatin-1/NucB2 in dehydration-induced anorexia. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 307: 225-236
- Zhang AQ, Li XL, Jiang CY, Lin L, Shi RH, Chen JD, Oomura Y. 2010. Expression of nesfatin-1/NUCB2 in rodent digestive system. *World J Gastroenterol*, 16: 1735-1741.