

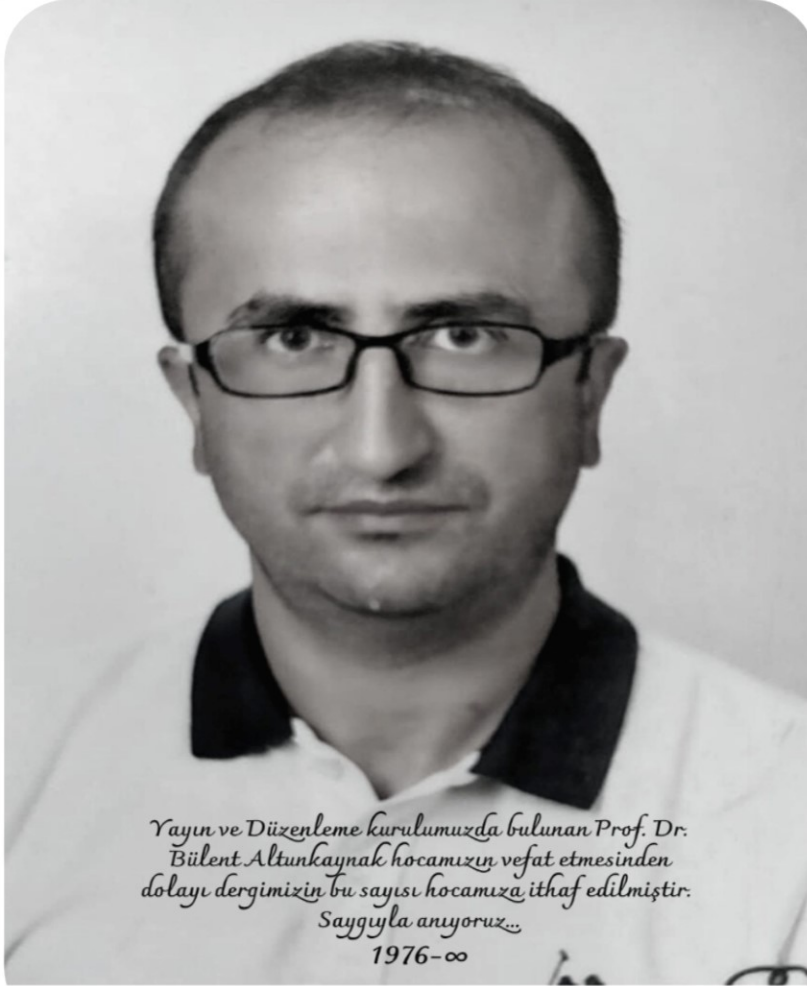


Gazi Üniversitesi

Fen Fakültesi Dergisi

e-ISSN: 2757-5543

Cilt 3 Sayı 2



*Yayın ve Düzenleme kurulumuzda bulunan Prof. Dr.
Bülent Altunkaynak hocamızın vefat etmesinden
dolayı dergimizin bu sayısı hocamıza ithaf edilmiştir.
Saygıyla anıyoruz...
1976-∞*

Kasım, 2022

**G.Ü. Fen Fakültesi Dekanlığı
tarafından yayınlanır**

Hakkında

Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Dergisi'nde, Biyoloji, Fizik, Kimya, Matematik ve İstatistik alanlarında uluslararası özgünlük taşıyan nitelikli araştırma ve derleme makaleleri yayımlanmaktadır. Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Dergisi yılda iki kez elektronik olarak Türkçe yayım yapan hakemli, ulusal ve akademik bir dergidir. Dergiye gönderilen makaleler amaç, kapsam ve yeterlilik kriterleri bakımından editör tarafından değerlendirilerek uygun bulunanlar alan editörlerine yönlendirilmektedir. Kör hakemlik uygulanarak en az iki uzman hakem görüşü ile makale inceleme aşamasını tamamlanmaktadır. Dergiye gönderilen makalelerin içerikleri özgün, daha önce herhangi bir yerde yayımlanmamış veya yayımlanmak üzere gönderilmemiş olmalıdır. Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Dergisi makale basımı için herhangi bir ücret talep etmemektedir.

Yayın Kurulu

Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Dergisi

İmtiyaz Sahibi:	Prof. Dr. Musa YILDIZ (Rektör)
Genel Yayın Yönetmeni:	Prof. Dr. Suat KIYAK (Dekan)

Baş Editör: Prof. Dr. Deniz YÜZBAŞIOĞLU

Editör Yardımcıları:

Prof. Dr. Zehranur YÜKSEKDAĞ	Prof. Dr. Bayram ÇEKİM	Doç. Dr. Tarık ASAR
------------------------------	------------------------	---------------------

Alan Editörleri:

Doç. Dr. Ebru Şebnem YILMAZ	Doç. Dr. Yasemin ŞAFAK ASAR	Doç. Dr. Barış KINACI
Prof. Dr. H. Hasan ÖRKÇÜ	Doç. Dr. Semra TÜRKAN	Prof. Dr. Nurşen SARI
Prof. Dr. Ayşegül ÖKSÜZ	Doç. Dr. Gürhan İÇÖZ	Doç. Dr. Levent KARGIN

Dil Editörü: Dr. Ömer ÇELİK

Yayın Danışma Kurulu:

Doç. Dr. Akif ÖZBAY	Prof. Dr. Ali TEKE	Prof. Dr. Bekir SARI
Prof. Dr. Belma ASLIM	Prof. Dr. Birol ALTIN	Prof. Dr. Cem KADILAR
Prof. Dr. Emre GÜR	Prof. Dr. Engin TIRAŞOĞLU	Prof. Dr. Fatma TAŞDELEN YEŞİLDAL
Prof. Dr. Fatma ÜNAL	Prof. Dr. H. İbrahim ÜNAL	Prof. Dr. Harun KARSLI
Prof. Dr. Metin AK	Prof. Dr. Ogün DOĞRU	Prof. Dr. Süleyman ÖZÇELİK
Prof. Dr. Şemsettin ALTINDAL	Prof. Dr. Zekiye SULUDERE	Prof. Dr. Bülent ALTUNKAYNAK

Teknik Sorumlular:

Doç. Dr. Damla AMUTKAN MUTLU	Arş. Gör. Görkem LİMAN
------------------------------	------------------------

Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Dergisi

Gazi Üniversitesi, Fen Fakültesi, 06500 ANKARA / TÜRKİYE

Telefon: (+90) 312 202 10 01

Faks: (+90) 312 212 22 79

E-posta: fenfakultesidergisi@gazi.edu.tr

Web adresi: <https://dergipark.org.tr/tr/pub/guffd>

Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Dergisi, 3. Cilt (2), Kasım, 2022

İÇİNDEKİLER

Sayfa

Mehtap Şahin, Özlem Yıldırım, (2022), ACC Enziminin Metabolik Hastalıklarda Terapötik Hedef Olarak Değerlendirilmesi (Derleme Makalesi)

70-82

Ahmet Kocatürk, Bülent Altunkaynak, (2022), İkili Kümeleme Algoritmalarının Parametre Seçimi için Çok Ölçütlü Karar Verme Yöntemi (Araştırma Makalesi)

83-101

Feride Efe, Zehranur Yüksekdağ, Berat Çınar Acar, (2022), *Lactobacillus* Cinsi Bakteriler Tarafından Üretilen Biyosüpfektanların Anti-Biyofilm ve Anti-Mikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi (Araştırma Makalesi)

102-115

Tuğçe D. Karaca, Aytaç Kocabaş, Mehmet A. Akay, (2022), Bazı Salisiliden Anilin Schiff Bazlarının DMSO ve DMF Çözücülerinde Antibakteriyel Aktiviteleri (Araştırma Makalesi)

116-122

İdris Candan, Yunus Özen, Barış Kınacı, (2022), Boşluk Taşıma Katmanının (HTL) Ters Çevrilmiş Organik Güneş Hücre Parametrelerine Etkisi (Araştırma Makalesi)

123-132

Ece Avuloğlu Yılmaz, Sevcan Mamur, Esra Erikel, Deniz Yüzbaşıoğlu, Fatma Ünal, (2022), Laktitolün Genotoksik ve Sitotoksik Etkilerinin İncelenmesi (Araştırma Makalesi)

133-143

ACC Enziminin Metabolik Hastalıklarda Terapötik Hedef Olarak Değerlendirilmesi

Mehtap Şahin* , Özlem Yıldırım 

Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Bölümü, 06110, Ankara, Türkiye

Öne Çıkanlar

- ACC enzimi, yağ asit metabolizmasını düzenleyici fonksiyonlarından dolayı metabolik hastalıklara yönelik dikkat çekici bir hedef hâline gelmiştir.
- ACC enzim inhibitörleri, klinik çalışmalarda yerini almıştır ve metabolik hastalıklara yönelik ilaç geliştirme ve ilaç keşfi çalışmalarına öncülük etmektedir.
- ACC enzim inhibitörlerinin geliştirilmesinde terapötik avantaj ve risk faktörleri değerlendirilmelidir.

Makale Bilgileri

Geliş: 01/04/2022

Kabul: 04/07/2022

Anahtar Kelimeler

ACC enzim inhibitörleri,
Yağ asit metabolizması,
Metabolik hastalıklar

Öz

Perifer dokularda aşırı yağ birikimi ile meydana gelen lipotoksiste, metabolik hastalıklara neden olan en önemli faktörlerden biridir. Lipid metabolizmasının anahtar enzimlerinden olan Asetil-KoA karboksilaz (ACC), yağ asitlerinin biyosentezinin ve oksidasyonunun düzenlenmesinde önemli fonksiyonlara sahiptir, aşırı yağ konsantrasyonunun azaltılmasına yönelik stratejiler ile diyabet, non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı, kanser, mikrobiyal enfeksiyon, metabolik sendrom, obezite, gibi hastalıkların tedavisinde büyük bir ilgi göyerek dikkat çekici bir hedef hâline gelmiştir. Onlarca yıllık araştırmalar sonucunda, ACC enziminin çok sayıda inhibitörü keşfedilmiştir ve yeni inhibitörlerin tasarlanmasına yönelik çalışmalar günümüzde de devam etmektedir. Bu çalışmada ACC enziminin yapısı, fonksiyonu ve katalitik mekanizmasının anlaşılmasına yönelik güncel bilgilere değinilmiştir ve ACC enzim inhibisyonunun moleküler temelleri incelenerek, güçlü ACC inhibitörleri ile ilgili son gelişmeler özetlenmiştir.

Evaluation of ACC Enzyme as Therapeutic Target in Metabolic Diseases

- The key regulator function of ACC in fatty acid metabolism makes it target for metabolic diseases.
- ACC inhibitors have entered clinical studies and leading development and discovering of novel drugs for metabolic diseases.
- Therapeutic advantages and risk factors should be evaluated in the development of ACC enzyme inhibitors.

Article Info

Received: 01/04/2022

Accepted: 04/07/2022

Keywords

ACC enzyme inhibitors,
Fatty acid metabolism,
Metabolic diseases

Abstract

Lipotoxicity results from the excessive lipid accumulation in peripheral tissues, is main contributing factor leading to metabolic diseases. Acetyl-CoA carboxylase (ACC) is a key enzyme regulating lipid metabolism and substantial function in the regulation of fatty acid synthesis and oxidation, has emerged as an attractive target for a plethora of emerging diseases, such as diabetes mellitus, non-alcoholic fatty liver disease, cancer, bacterial infections, metabolic syndrome, obesity and so on. Numerous inhibitors of ACC have been discovered for research on effort during the last decades and studies on the design of novel ACC inhibitors continue today. In this review, up-to-date information on the structure, function and catalytic mechanism of the ACC enzyme is highlighted, and the molecular basis of ACC enzyme inhibition is elucidated, and the latest developments in potent ACC inhibitors are summarized.



Makale, Creative Commons 4.0 (CC BY NC SA) uluslararası lisansı altında açık erişim olarak yayımlanmaktadır.

* Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Mehtap Şahin, mhtpsahin@ankara.edu.tr



1. GİRİŞ

Yağ asitleri hidrofobik ve amfifilik kısımlara sahip olan, organizmanın metabolik ihtiyaçları için enerji sağlayan, hücrenin içinde ve dışında çeşitli homeostaz süreçlerini düzenleyen, sinyal moleküllerinin önemli yapı taşlarını oluşturarak hücrenin yaşamsal fonksiyonlarını gerçekleştiren ve enerji metabolizmasında görevli olan lipid molekülleridir. De Novo Lipogenez (DNL) olarak adlandırılan mekanizma sayesinde beslenme ile alınan fazla glukozdan dönüştürülen yağ asitleri, glukotoksisiteye karşı koruma ve açlık durumunda kalori bakımından en yoğun enerji depolama kapasitesi ile en yüksek enerji rezervini sağlarlar. Açlık ve tokluk sürecindeki besin dalgalanmalarına karşı hücrenin enerji taleplerini yanıtlayan DNL hayati öneme sahiptir. DNL, embriyonik gelişim ve adipogenezde çok önemli rol oynamasının yanında, ökalorik koşullarda bile vücut yağ depolarına az miktarlarda lipid katkısında bulunabilmektedir. Kronik DNL yükselmeleri organel disfonksiyonu, hücre ölümü, lipotoksisite sonucu gelişen metaflamasyon, enerji ve substrat metabolizmasında bozukluklar gibi oldukça zararlı olabilen durumlara neden olur ve böylece yağ asitleri sağlıklı doku ve hücrelere hasar veren patofizyolojik kaskadın kritik bir parçası hâline gelirler [1,2]. Bu durum, kardiyovasküler hastalıklar (KVH), tip 2 diyabet (T2D), obezite, non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı (NAYKH), hipertrigliseridemi, kanser, viral enfeksiyonlar, otoimmün hastalıklar, akne vulgaris, nörodejenerasyon, ve yaşlanma gibi birçok yüksek riskli hastalık ve metabolik bozuklukların gelişimi ile sonuçlanmaktadır [3].

Adipoz doku, DNL'nin gerçekleştirildiği öncelikli dokudur, ancak uzun süreli besin fazlalığına maruz kalınması, non-adipoz dokularda kronik DNL yükselmeleri ile ektopik lipid birikimini tetikleyerek lipotoksisite ve kronik metabolik strese neden olmaktadır. DNL artışı ve yağ asidi oksidasyonunun zayıflaması ile yağ asidi metabolizmasında meydana gelen bozukluklar, metabolik hastalıkların gelişimi ile ilişkili vücut yağ kitlesinin artmasına neden olur. Yaşam tarzı değişiklikleri ile birlikte uygulanan diyet ve egzersiz, aşırı vücut yağ kitlesinin kontrolü ile ilgili beklentiyi karşılayamadığında farmakolojik müdahaleler ile metabolik hastalıkların tedavi edilebileceği öngörülmektedir. Aşırı vücut yağ kitlesi, bu hastalıkların oluşumu ile ilişkili metabolik durumun bir göstergesi olmasından dolayı, etkili tedavi edici stratejilerinin geliştirilmesinde yağ asidi metabolizmasına yönelik çalışmaların gerçekleştirilmesi, ilaç keşfinde çok acil bir ihtiyaç hâline gelmiştir [4,5].

Bu nedenle yağ asidi metabolizmasında anahtar düzenleyici role sahip olan ACC enziminin farmakolojik inhibisyonu, eşzamanlı olarak lipojenik dokularda yağ asidi sentezinin sınırlandırılmasına ve oksidatif dokularda yağ asidi oksidasyonunun uyarılmasına yönelik bimodal mekanizmalar sunarak, lipid metabolizmasındaki düzensizliklerin yeniden dengelenmesini sağlayarak metabolik hastalıkları olumlu yönde etkileyebilme potansiyeline sahip olduğunu ortaya koymuştur. ACC enzimi metabolik hastalıkların tedavisinde cazip bir hedef olarak günümüzde oldukça ilgi görmüştür ve yeni nesil ACC inhibitörleri ile oldukça başarılı sonuçlar elde edilmiştir [6]. Örneğin, NAYKH hastalığı dâhil metabolik hastalıkların tedavisine yönelik geliştirilen ACC enzim inhibitörü Faz II klinik deney aşamasında değerlendirilmektedir [7].

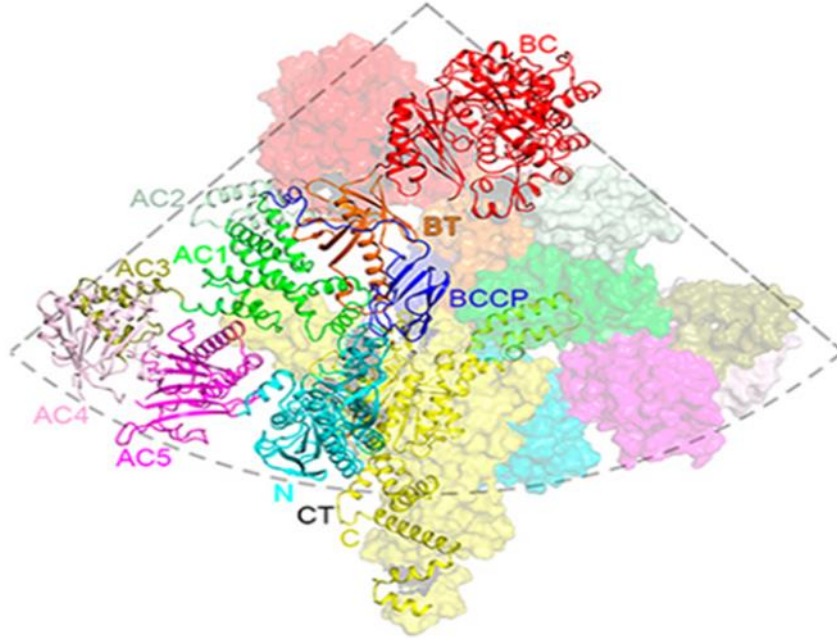
Son zamanlarda ACC enziminin kristal yapısının tanımlanması ile enzimin detaylı bilgileri elde edilmiştir. Yüksek verimli sanal tarama, yapı temelli ilaç tasarımı, moleküler kenetleme gibi teknolojik yöntemlerin kullanılması, çok sayıda güçlü potansiyel ACC inhibitörünün ortaya çıkmasına olanak vermiştir ancak henüz klinik ilaç aşamasına geçilememiştir

ACC enzimini düzenleyen moleküler mekanizmaların ve dinamik yapılarının daha iyi anlaşılması, artan klinik çalışmalarla birlikte yeni ve güçlü ACC inhibitörlerinin geliştirilmesine imkân sağlayacaktır ve gelecekte çeşitli hastalıklara yönelik kullanılacak yaklaşımlarda ACC inhibitörlerini kullanmak doğru bir hedef olacaktır [8].

2. GENEL BİLGİLER

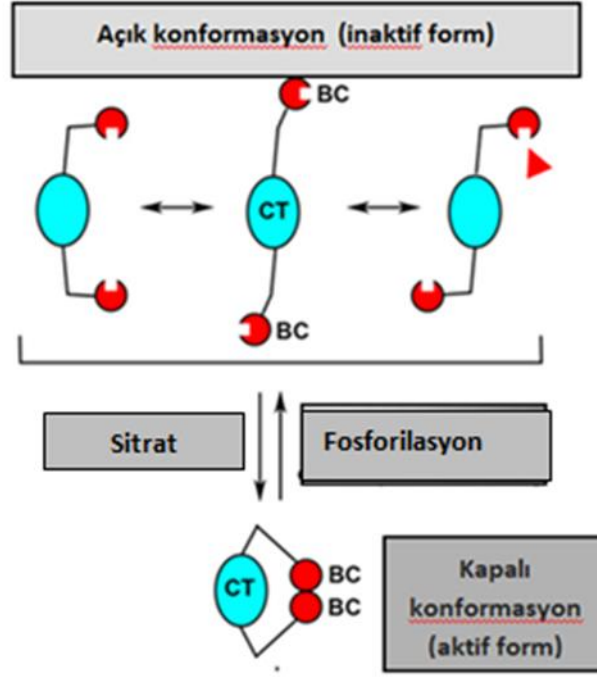
2.1. ACC Enziminin Biyokimyası

Ökaryotik memeli ACC enziminin birincil yapısı birden çok bölümden oluşur; C terminal ucunda karboksiltransferaz (CT) bölgesi, N terminal ucunda biyotin karboksilaz (BC) bölgesi, BC ve CT bölgeleri arasındaki bağlantıyı sağlayan interaksiyon bölgesi (BT), biyotinin kovalent olarak bağlandığı biyotin karboksil taşıyıcı protein (BCCP) ve ökaryotik ACC enzimine spesifik (homoloji göstermeyen) ACC merkezi bölgeden (AC) oluşmaktadır (Şekil 1). AC, kataliz esnasında BC ve CT bölgelerinin doğru bir şekilde konumlanması için yapısal iskele görevi görür.



Şekil 1. İnsan ACC enziminin kapalı, aktif yapısı [8]

BC dimeri, CT dimerine göre daha az karardır ve ACC enzime daha zayıf bağlarla bağlı olmasından dolayı aktif dimerik ve inaktif monomerik formları arasında kolayca geçiş yapabilen konformasyonel esnekliğe sahiptir. BC dimerinin arayüzündeki çukurda konformasyonel değişikliklere neden olan fosforilasyon ve/veya küçük moleküller, ACC enziminin inaktif olduğu açık konformasyonu destekler. Monomerik BC formunun stabilize edilmesi ile, BC bölgesinin dimerizasyonu engellenerek BCCP-biyotin substratının BC bölgesine bağlanması önlenir ve katalitik olarak enzimin inaktif olduğu konformasyona geçilir. BC bölgesi, enzimin inaktif olduğu durumlara neden olabilen çok sayıda konformasyon çeşitliliğine sahiptir. Sitrata, insan ACC1 enziminin aktif olduğu kapalı formu destekleyerek BC dimerizasyonunu stabilize eder (Şekil 2). Memeli ACC enzimi genellikle homodimer olarak bulunmasına rağmen, sitrata varlığında birçok ACC enziminin bir araya gelerek birleşmesi sonucunda polimerleşen ACC filament yapıları meydana gelir ve kriyo-elektron mikroskobu kullanılarak ortaya çıkarılan bu yapı, ACC1-sitrata filamentleri olarak adlandırılır. Palmitoil varlığında ise ACC-sitrata filament yapısı konformasyonel değişikliğe uğrar ve büyük olasılıkla globüler monomerik BC bölgesine eşdeğer olan bir alan ekstrüde edilir ve bu, palmitoil-KoA'nın enzim üzerindeki inhibitör etkisinin moleküler mekanizmasını açıklar. ACC enziminin düzenlenmesinde konformasyonel esneklik oldukça önemlidir. İnsan ACC1 ve ACC2 enziminin tanımlanan kristal yapısı ve ACC enziminin aktif/inaktif konformasyonel dinamiklerinin belirlenmesi, bu enzimin düzenlenmesinde kullanılan moleküler mekanizmalar daha iyi anlaşılmasını ve yeni inhibitörlerin geliştirilmesini sağlayacaktır [9-11].



Şekil 2. ACC enzim regülasyonunun moleküler mekanizması [8]

ACC, biyotin bağımlı merkezi metabolik bir enzimdir. ACC enzimi, üç fonksiyonel bölgenin dâhil olduğu iki basamaklı reaksiyon ile katalizlenmesi sonucunda, yağ asidi biyosentezi için Asetil-KoA' dan Malonil-KoA üretimini gerçekleştirir. İki basamaklı kataliz reaksiyonunun ilk basamağı, biyotin karboksilazın aktifliğini kazanmasıdır. Bu aktivite, ATP'ye bağımlı bir tepkimeyle bikarbonattan gelen CO₂ ile BCCP' ye bağlı bulunan biyotinin BC bölgesinde karboksillenmesi sonucunda gerçekleştirilir. Ayrıca ilk basamakta katalizin başlatılmasında gerekli olan divalent katyonlar (Mg⁺² veya Mn⁺²) ATP koordinasyonu için gereklidir. İkinci basamakta, CT bölgesine yerleşen biyotinin grubu, geçici olarak taşıdığı CO₂'i Asetil-KoA' ya transfer etmesi sonucunda Malonil-KoA üretimini sağlar [12-14].

ACC enziminin katalizi sırasında sallanan kol modeli ve hareketli bölge modelinin geçerliliği kabul edilmiştir. BC aktif bölgesi ve CT aktif bölgesi birbirine 80 Å uzaklıkta olup, biyotinin iki aktif bölge arasındaki bu mesafeye ulaşarak, yer değiştirmesi sağlanır. Sallanan kol modelinde, biyotin, BC ve CT aktif bölgeleri arasında yer değiştirir ve biyotinin BC ve CT aktif bölgeleri arasındaki mesafeyi tamamlayabilmesi için "hareketli bölge modeli" ile BCCP bölgesinin de yer değiştirdiği kabul edilmektedir [15].

Çeşitli organizmalardan izole edilmiş BC, BCCP ve CT bölgeleri incelendiğinde, BC alanının hem monomerik hem de dimerik formlarda bulunabildiği, BCCP alanının monomer olduğu ve CT alanının bir dimer olduğu gösterilmiştir [16].

2.2. ACC Enziminin Biyolojik Fonksiyonu

Memelilerde ACC enziminin farklı genler tarafından kodlanan, ACC1 (ACC α , 265kDa) ve ACC2 (ACC β , 275kDa) olmak üzere iki izoformu bulunmaktadır. ACC1 ve ACC2 enzimlerinin amino asit dizileri %75 ortaktır ve enzim aktivitesi için korunmuş bölgelere sahiptir. Hormon ve beslenme durumuna karşı duyarlı olan bu iki izoformun dokulardaki dağılımları ve hücresel yerleşimleri farklılık gösterir.

Her iki izoform aralarında yüksek homoloji göstermesine rağmen, ACC2 enziminin N terminal ucu, ACC1 enzimine kıyasla fazladan 114 amino asit içermektedir ve CPT1 (Karnitin palmitoil transferaz-I) enzimine yakın olan mitokondriyal hedef motifine sahiptir. Böylece yağ asidi oksidasyonunun düzenlenmesini sağlayabilmektedir. Sitozolda yerleşim gösteren çoğunlukla beyaz adipoz doku ve karaciğer gibi lipogenik dokularda bulunan ACC1, de novo yağ asidi sentezi için sitoplazmik Asetil-KoA' yı Malonil-KoA' ya dönüştürmekle görevlidir. Mitokondriyal dış membranında lokalize olan, çoğunlukla iskelet kası ve kalp gibi büyük mitokondriyal içeriğe ve yüksek oksidatif kapasiteye sahip olan oksidatif dokularda bulunan ACC2, Malonil-KoA tarafından CPT1 enziminin inhibe edilmesi ile yağ asitlerinin beta oksidasyonunu sınırlandırmakta görevlidir. Yağ asidi sentezi tarafından kontrol edilebilen hücre içi metabolik yollar arasındaki geçişler ile kanser ve metabolik hastalıkların ilerlemesi için gerekli enerji ve molekül ihtiyaçlar karşılanabilmektedir. ACC1, yağ asidi sentezinde merkezi bir enzim olmasından dolayı yağ asidi sentezi ile ilişkili diğer metabolik yolların da merkezi olarak kabul edilmektedir bu nedenle metabolik hastalıklarda ACC1 enziminin düzensizlikleri yoğun bir şekilde incelenmiştir. Ayrıca kofaktör olarak görevli olan Asetil-KoA ve Malonil-KoA, sırasıyla protein asetilasyonu ve malonilasyonundan sorumlu olduğu için hastalıklarda ACC1 enziminin metabolik olmayan farklı fonksiyonları ile ilgili çalışmalar yapılmaktadır. ACC, bu nedenle metabolik hastalıkların tedavisi için umut verici bir terapötik hedef olarak kabul edilmektedir [17].

2.3. ACC Enziminin Düzenlenmesi

ACC enziminin aktivitesi, hücrenin metabolik durumuna bağlı olarak gen ifadesi seviyesinde, fosforillenme-defosforillenme çevriminde kovalent modifikasyon ve geri bildirim/ ileri besleme döngülerinde allosterik modülatörler ile sıkı bir şekilde düzenlenir.

ACC gen ekspresyonu, yüksek glukoz diyeti sonrasında, insülin yolağı aracılığı ile aktive edilen sterol düzenleyici element bağlayıcı proteinler (SREBP1a ve SREBP1c) ve karbonhidrat yanıt elementi bağlayıcı protein (ChREBP) tarafından uyarılır. ACC enzimi, hormonal olarak kontrol edilen geri dönüşümlü fosforilasyon mekanizmaları ile düzenlenmektedir. Özellikle hücresel enerji homeostazında sensör olarak görevli AMP ile aktive olan protein kinaz (AMPK), ACC enziminin önemli bir düzenleyicisidir. Metabolik stres, glukoz ihtiyacı ve hipoksi koşullarında, ACC1 enziminin Ser-79 rezidülerinin ve ACC2 enziminin Ser-212 rezidülerinin, AMPK tarafından fosforillenmesi ile inaktif enzim yapısına geçiş sağlanır. Böylece sitrat ve palmitoil-KoA tarafından ACC'nin allosterik düzenlenmesi ve AMPK tarafından gerçekleştirilen fosforilasyon aracılığı ile enzimde konformasyonel değişiklikler meydana gelmektedir [18,19]. ACC enziminin allosterik düzenlenmesi, metabolik değişiklikler ile ilişkili metabolitler tarafından sağlanmaktadır. Asetil-KoA öncülü olan sitozolik sitrat ve glutamat tarafından enzimin aktivasyonu ve yağ asidi sentezinin son ürünü olan palmitoil-KoA tarafından enzimin inaktivasyonu gerçekleştirilir. Glutamat' ın ACC enzimini allosterik olarak aktive edebilmesi, amino asit metabolizmasından gelen sinyallerin yağ asidi metabolizması üzerinde etkisinin olduğunu düşündürmektedir.

Yakın tarihli bir çalışma, uzun zincirli yağ asidi-KoA esterlerinin, AMPK aktivatörü olduğunu ve böylece ACC enzim aktivitesini allosterik ve kovalent olmak üzere çift modlu mekanizma ile inhibe ederek, yağ asidi oksidasyonunu başlattığını ilk kez ortaya koymuştur [20,21]. ACC enzim aktivitesi; besinler, protein kinazlar, allosterik düzenleyiciler ve transkripsiyonel faktörler gibi çok sayıda faktör tarafından düzenlenmektedir. Bu düzenleyici faktörlerde meydana gelen düzensizlikler metabolik hastalıkların gelişimi ile ilişkili sinyallere neden olur.

3. ACC Enziminin Terapötik Etkileri

3.1. Terapötik Hedef Olarak ACC Enzimi

Lipogenez sürecinde meydana gelen düzensizlikler, obezite, diyabet, NAYKH gibi metabolik hastalıklara neden olabilmektedir. Yağ asidi sentezinde merkezi role sahip olan ACC enziminde ve bu enzimi düzenleyen faktörlerde gerçekleşen düzensizlikler, metabolik hastalıkların ilerlemesi ile doğrudan ilişkilidir. Bu nedenle ACC enzim aktivitesini sınırlandırmaya yönelik ACC nakavt fareler ile yapılan çalışmalar, metabolik hastalıkların gelişiminde ACC enziminin rolünü anlamaya yardımcı olan güçlü tekniklerdir.

Dokulardaki farklı dağılımlarından dolayı, ACC1 ve ACC2 enzimlerinin seçici inhibisyonu farklı fizyolojik durumları beraberinde getirmektedir. ACC1 nakavt farelerde enzimin tüm vücutta eksikliği embriyonik ölüme neden olmuştur [22]. ACC1 enziminin pankreatik beta hücrelerinde nakavt edilmesi ile glukoz intoleransı ve insülin salınımında bozukluklar meydana gelmiştir. Glukoz homeostazı için gerekli olan insülin salınımının gerçekleştirilmesinde ve beta hücre fonksiyonunun sağlanmasında ACC1 enziminin gerekli olduğu son yapılan çalışmalarda kanıtlanmıştır. Böylece ACC1 enziminin, beta hücre yetmezliği sonucunda gelişen Tip 2 diyabet durumunda, beta hücre gelişimini sağladığı ve insülin salınımını güçlendirdiği gösterilmiştir [23]. Ayrıca yapılan bir diğer çalışmada, karaciğere özgü ACC1 nakavt farelerin karaciğerinde, aşırı beslenmeye bağlı trigliserit birikiminin yabani tip farelerinkinden %40-70 daha düşük olduğu gösterilmiştir [24].

ACC2 delesyonu ise, yağ asidi oksidasyonunun artması ve lipid birikiminin azalması ile sonuçlanmıştır. Ayrıca insülin duyarlılığının gelişmesi ile birlikte tüm vücutta insülin direncinin düzeltildiği ortaya koyulmuştur. Böylece farmakolojik ACC2 inhibisyonu, insülin direncinin tedavisinde terapötik bir yol olarak kabul edilmektedir. Yüksek yağlı ve şekerli diyetle maruz bırakılan ACC2 nakavt farelerin yaşam sürelerinde yabani tip farelere kıyasla bir değişiklik olmamıştır. Adipoz doku yağ asidi oksidasyonunda ve glukoz oksidasyonunda eş zamanlı artış görülmüştür ve böylece vücut kitesinde azalma meydana gelmiştir. Sonuç olarak, diyet ile indüklenen obezitenin ACC2 inhibisyonu ile önlenebildiği gösterilmiştir [25,26]. İskelet kasında intramiyoselüler lipid içeriğinin artması insülin direnci ile yakından ilişkilidir. ACC2 nakavt farelerde yüksek yağlı diyet koşullarında bile intramiyoselüler lipid içeriğinin azaldığı görülmüştür. Bu çalışma ile ACC2 enziminin insülin direncine yönelik terapötik potansiyele sahip olduğu ortaya koyulmuştur [27]. Yüksek yağlı diyet ile beslenen ACC2 nakavt fareler ile yapılan deneylerde, insülin aracılığı ile glukozun hücre içine alındığı sinyal yolağının, AKT fosforilasyonu ile aktive olduğunu ve böylece diyabetten korundukları gösterilmiştir [28]. Diyet ile indüklenen NAYKH model ratlarda antisens oligonükleotid tekniği kullanılarak seçici (ACC1 veya ACC2) ve seçici olmayan (ACC1 ve ACC2) inhibisyonlarının hepatik lipid değerleri ve insülin duyarlılığı üzerindeki etkileri araştırılmıştır. ACC1 ve ACC2 enzimlerinin eş zamanlı inhibisyonu, seçici inhibisyona oranla hepatik yağ oksidasyonu artışında daha etkili olmuştur. Böylece NAYKH model ratlarda hepatik yağ oranının azaldığı ve hepatik insülin duyarlılığının kuvvetlendiği gösterilmiştir [29].

ACC enzimine yönelik geliştirilen alanin mutant fare modelinde, yüksek yağlı diyetle bağlı olarak gelişen insülin direnci, glukoz intoleransı ve NAYKH görülmemiştir. Çünkü alanin mutant fare modelinde eş zamanlı olarak ACC1 (Ser79) ve ACC2 (Ser212) bölgelerinin AMPK tarafından fosforilasyonu engellenmiştir [30].

Aşırı beslenme ve obezite durumunda artan ACC1 enzim aktivitesinin, lipogenezin hızlanması sonucunda hepatositlerde trigliserit birikimine neden olduğu ve NAYKH gelişiminden sorumlu olduğu gösterilmiştir. [31]. Hayvan deneylerine ek olarak insanlar üzerinde yapılan araştırmalar, obezite ve tip 2 diyabet görülen hastalarda artan ACC2 aktivitesinin ve Malonil-KoA değerlerinin düşük AMPK seviyeleri ile ilişkili olduğunu göstermiştir [32]. Sağlıklı gönüllülerin katıldığı bir diğer çalışmada, üç aylık egzersiz programı uygulanmıştır ve çalışma süresi boyunca ACC2 mRNA seviyelerinde azalma ve yağ asidi oksidasyonunda artış olduğu kanıtlanmıştır [33].

ACC enzimi, metabolik süreçlerdeki fonksiyonu ile birlikte ayrıca hücre sinyal yollarının düzenlenmesinde oldukça önemli role sahiptir. Yağ asitleri, Asetil-KoA ve Malonil-KoA efektör molekül olarak hücre sinyalizasyonuna katılırlar. Örneğin, eikozanoid gibi çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA), karaciğerde lipogenezi düzenleyen SREBP1c aktivitesinden sorumlu sinyal molekülüdür. Bu nedenle ACC enzimi özellikle karaciğer hastalıklarının tedavisinde bir hedef olarak kabul edilmektedir [34].

Metabolik hastalıkların gelişiminde seçici ACC inhibisyonunun, metabolik parametreleri düzenleyebildiği gösterilmiştir ancak sonraki çalışmalar izozimlerden birinin diğerinin inhibisyonunu metabolik kompanse mekanizması ile baskılayabildiğini göstermiştir. Metabolik kompanse mekanizmasında ACC enzim inhibisyonuna rağmen Malonil-KoA değerlerinin korunduğu bu durum, Malonil-KoA dekarboksilaz enziminin ifadesi ile ilişkilidir [35,36].

Bu bulgular, obezite, tip 2 diyabet ve NAYHK gibi diyet ile indüklenen metabolik hastalıklarda ACC enziminin önemini ve ACC enziminin, metabolik hastalıkların tedavisine ışık tutabilecek terapötik bir hedef olduğunu ortaya koymaktadır. Yüksek yağlı diyet koşullarında eş zamanlı olarak ACC1 inhibisyonu ile lipogenik dokularda lipogenez sınırlandırılırken, ACC2 inhibisyonu ile oksidatif dokularda yağ asidi oksidasyonu uyarılır (Şekil 3). Böylece ACC1 ve ACC2 dual inhibisyonu metabolik hastalıklara yönelik daha etkili terapötik sonuçlar sunabilmektedir.

3.2. ACC Enzim İnhibisyonunun Güvenlik Durumları

Metabolik hastalıklara yönelik izlenen stratejilerden biri olan ACC enzim inhibisyonu, potansiyel terapötik etkilere sahiptir. ACC enzimi, metabolik fonksiyonlarından bağımsız olarak hücrenin fizyolojik süreçlerini düzenleyebilmektedir. Bu nedenle ACC enzim inhibisyonu terapötik etkilerin dışında farklı durumları da beraberinde getirebilmektedir.

ACC inhibisyonu ile azalan Malonil-KoA değerleri, SREBP1c ve gliserol-3-fosfat asiltransferaz (GPAT) aktivitesini düzenleyen hepatik PUFA miktarının konsantrasyonunun azalmasına yol açmaktadır. Azalan PUFA miktarı ile SREBP1c aktivitesinin artması sonucunda hepatik VLDL salınımı uyarılır ve hipertrigliseridemi gelişir. Hipertrigliseridemi, fare ve insan deneylerinde uzun süreli ACC inhibisyonu sonucunda gözlenen istenmeyen bir durumdur ve kardiyovasküler yan etkilere neden olabilmektedir.

Yapılan çalışmalar ACC inhibisyonu ile gelişen hipertrigliseridemini, omega-3 yağ asidi veya fenofibrat ile kontrol edilebildiğini göstermiştir. Böylece uzun süreli ACC inhibisyonu ile özellikle NAYKH' ye yönelik etkili terapötik avantajlar elde edilirken, oluşan kardiyovasküler risk ortadan kaldırılabilir ve bununla ilgili çalışmalar devam etmektedir [37,38].

Enerji homeostazında kritik öneme sahip olan Malonil-KoA, beyinde doyma sinyali ile birlikte besin alımının negatif düzenleyicisi olarak beslenme davranışı ve iştah kontrolünde rol oynamaktadır. Bu nedenle, ACC inhibisyonu, Malonil-KoA seviyelerinin azalmasına neden olarak iştahın ve besin alımının artması ile hiperfajiye neden olabilmektedir. ACC inhibisyonunun terapötik etkilerini azaltabilecek bu durum, kan-beyin bariyerini geçmeyen ACC inhibitörlerinin geliştirilmesi ile engellenebilmiştir [39].

ACC tarafından kontrol edilebilen Asetil-KoA ve Malonil-KoA, sırasıyla protein asetilasyonu ve malonilasyonunda kofaktörler olarak hücrelerin protein fonksiyon ve çeşitliliğini artırmak üzere kullanılan posttranslasyonel modifikasyonları ve böylece hücrelerde önemli biyolojik faaliyetleri etkileyebilmektedirler. Yapılan bir çalışmada ACC enziminin kontrol ettiği hücre içi Asetil-KoA konsantrasyonu ile düzenlenen protein asetilasyonunun hastalık gelişiminde oldukça önemli olduğunu göstermiştir. ACC ile ilişkili hiperasetilasyonun altında yatan mekanizmalar henüz tam olarak anlaşılabilmiştir [40,41]. Protein modifikasyonlarında ACC enziminin düzenleyici etkileri ve hastalıklarla ilişkilerinin daha iyi anlaşılması için yapılacak çalışmalar bu hastalıkların tedavisinde ACC enzimlerine yönelik terapötik stratejilerin geliştirilmesini sağlayacaktır.

3.3. ACC Enzimine Yönelik Küçük Molekül İnhibitörler

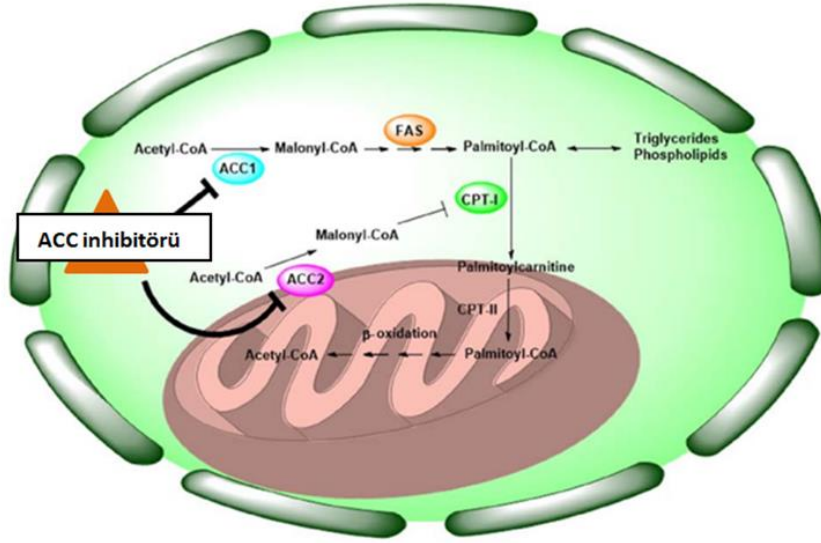
Metabolik süreçler ve hücre fizyolojisi ile ilgili biyolojik faaliyetlerin önemli bir parçası olan ACC enziminin moleküler yapısı ve metabolik hastalıklar ile doğrudan ilişkili olduğunu gösteren çok sayıda çalışmadan elde edilen bulgulardan faydalanılarak, sayısız ACC inhibitör madde geliştirilmiştir. Bu inhibitörlerden bazıları klinik faz aşamasına kadar gelebilmiştir [42-45]. ACC enziminin küçük molekül inhibitörleri, CT bölgesini ve BC bölgesini inhibe ederek etkinliklerini gösterirler.

ACC enziminin BC bölgesinde bulunan dimerizasyon alanında bulunan hidrofilik cep, memeli karboksilazlarından sadece ACC enzimine özgü olmasından dolayı bu bölgeye üstün fizyokimyasal özellikler sağladığı için farmasötik hedef olarak oldukça ilgi çekmektedir. ACC enziminin BC bölgesine yönelik inhibitörler, BC bölgesinde dimerizasyonunu engelleyerek ACC enziminin inaktivasyonunu gerçekleştirirler [46].

Birinci nesil ACC enzim inhibitörlerinden biri olan ve doğada bulunan Soraphen A, mikrobakteri türü olan *Sorangium cellulosum* bakterisinden elde edilmektedir ve enzime BC dimerinin arayüzünden bağlanıp, AMPK fosforilasyonunu taklit ederek BC dimerizasyonunu engellenmesi ile ACC enzim aktivitesini önleyen seçici olmayan ACC1 ve ACC2 inhibitörüdür. Diyet ile indüklenen obezitede gelişen insülin direncini düzenleyerek steatozun iyileşmesini desteklemesi prelinik çalışmalar ile ortaya koyulmuştur. ACC enziminin Soraphen A ile oluşturduğu kompleksin karakterize edilmesi, yapı temelli ilaç tasarım teknikleri kullanılarak gerçekleştirilen optimizasyon çalışmaları ile metabolik kararlılığı yüksek, daha güçlü biyolojik aktiviteye sahip inhibitörlerin geliştirilmesine öncülük etmektedir [47,48].

BC dimerizasyon alanında bulunan serin rezidülerinin AMPK tarafından fosforilasyonu ile ACC enziminin inhibe edildiği mekanizmayı taklit eden GS-0976/ND-630 inhibitörü, seçici olmayan dual ACC1 ve ACC2 inhibitörüdür. Obezite ile ilişkili metabolik sendromun tedavisinde ve hepatik lipogenezin azaltılmasında oldukça etkili olduğu ortaya koyulmuştur. Ayrıca GS-0976/ND-630 inhibitörü ile hepatik steatozda ve hiperinsülinemide düzelmeye sağlanır. GS-0976/ND-630 inhibitörünün kombine çalışmaları ile fibrozis ve siroz evresine geçiş yapmakta olan hastalarda çok iyi sonuçlar elde edilmiştir ve klinik çalışmalar devam etmektedir. Ayrıca önemli bir sonuç olarak yeni nesil GS-0976/ND-630 inhibitörü karaciğer hedefli olup, kan beyin bariyerini geçmediğinden, azalan hipotalamik Malonil-KoA değerlerinin neden olduğu iştah artışı görülmeksizin dislipidemiye hafifletmesi ve trombosit üretimini etkilememesi oldukça avantajlı bir durumdur [49-51].

ACC enziminin CT bölgesinde biyotinin bağlanmasını önleyerek etkinliğini gösteren seçici olmayan ACC inhibitörlerinden CP-640186, klinik öncesi aşamaya gelmiştir ve optimizasyon çalışmaları devam etmektedir (Şekil 3). CP-640186 türevli inhibitör, yüksek yağ diyetinin neden olduğu kilo artışı ve obeziteye bağlı metabolik sendromu düzenlediği gösterilmiştir [52,53]. CP-640186 ile gerçekleştirilen sonraki çalışmalar ile geliştirilen karaciğere yönelik seçici olmayan ACC1 ve ACC2 inhibitörü PF-05221304 için faz II klinik çalışmalar tamamlanmıştır. NAYKH ve steatohepatite yönelik etkisini serum trigliserit değerlerini yükseltmeden ve trombosit üretimini etkilemeden göstermesi gelecekte başarılı bir ilaç adayı olma potansiyeli olduğunu göstermektedir. Ayrıca HbA1c değerlerini düşürdüğü ve antidiyabetik özelliklere sahip olduğu ilk kez kanıtlanmıştır [54-57].



Şekil 3. ACC inhibitörlerinin etki mekanizmalarının şematik gösterimi [53]

İskelet kasında intramiyoselüler lipid içeriğinin artması ile yakından ilişkili olan insülin direnci, ACC enziminin farmakolojik inhibisyonu sonucunda intramiyoselüler lipid konsantrasyonunun azaltılması ile düzenlenebilmektedir. Bu inhibitör ACC2 enzimine karşı oldukça seçiciliği yüksektir ve kas dokusunda Malonil-KoA değerlerini düşürürken, karaciğerdeki Malonil-KoA değerlerinde bir değişiklik oluşturmamıştır. Olefin türevli seçici ACC2 inhibitörü, antidiyabetik etkileri ile insülin direnci ve tip 2 diyabet tedavisine yönelik yeni yaklaşımlar sunmaktadır. Ayrıca geliştirilmiş güvenlik profili ile hedeflenmeyen metabolik yolları etkilememesi, daha önce ortaya çıkan ACC2 inhibitörlerinden daha güçlü olduğunu göstermektedir [58].

4. TARTIŞMA

Yağ asidi sentezi, hücrenin ihtiyaçlarına göre karbon ve enerji kaynaklarının depolanmasını veya kullanılmasını kontrol ederek glukoz ve amino asit metabolizması gibi diğer metabolik yolları da düzenleyebilmektedir. Bu nedenle yağ asidi sentezinde meydana gelen düzensizlikler obezite, insülin direnci, tip 2 diyabet, NAYKH gibi metabolik hastalıkların gelişimini uyarabilmektedir. ACC enzimi, yağ asidi sentezi ile ilişkili metabolik ağın çekirdeği olmasının yanında hücre sinyalizasyonundaki fonksiyonları ile hücrenin fizyolojik ve patofizyolojik süreçlerini düzenler. Bu nedenle metabolik hastalıklara yönelik terapötik stratejilerin geliştirilmesinde ACC enzimi oldukça ilgi çekici bir hedef olarak görülmektedir.

ACC enzim aktivitesinin düzenlenmesinde besinler, transkripsiyon faktörleri, metabolik ürünler, hormonlar gibi çok sayıda faktör etkilidir. ACC enziminin düzenlenmesinde aktif ve inaktif formları arasında konformasyon çeşitliliğine neden olan BC dimer ara yüzündeki ve ACC filamentindeki etkileşimler oldukça önemlidir. ACC enzim aktivitesini düzenleyen faktörler ve farklı konformasyonların daha iyi anlaşılması, metabolik hastalıklara karşı ACC enzimini hedefleyen yeni stratejilerin geliştirilmesine olanak sağlayacaktır. Ayrıca ACC enziminin metabolik ağdaki ve metabolik ağdan bağımsız fonksiyonları göz önünde bulundurulduğunda, ACC enzime yönelik çok yönlü düzenlemeler ile terapötik hedeflerin gerçekleştirilmesi, metabolik güvenliğin sağlanması açısından önemlidir.

ACC enziminin metabolik hastalıklardaki öneminin anlaşılmasına yönelik yapılan in vivo çalışmalardan ACC nakavt fare deneyleri, ACC antisens oligonükleotidleri, alanine mutant fare deneyleri ile seçici (ACC1 veya ACC2) ve seçici olmayan (ACC1 ve ACC2) ACC enzim inhibisyonunun etkileri değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre ACC1 ve ACC2' nin seçici olmayan dual inhibisyonunun, ACC1 veya ACC2 seçici inhibisyonundan daha etkili olduğuna dair görüşler çoğunluktadır ve geliştirilen ACC enzim inhibitörlerinin çoğunun seçici olmayan dual ACC1/ACC2 inhibitörü olması bir tesadüf değildir. Genetik çalışmalar, ACC2 nakavt farelerin normal ve sağlıklı fenotipe sahip olduğunu ve diyet ile indüklenen obezitede, yabani farelere kıyasla yağ asidi oksidasyonunun daha yüksek ve vücut ağırlıklarının daha düşük olduğunu göstermiştir. Bu nedenle dokuya yönelik seçici ACC2 inhibitörleri, metabolik hastalıklara yönelik güvenli terapötik hedef olarak literatürde yerini almıştır. ACC2 inhibisyonunun oldukça etkili olduğunu gösteren çalışmalar vardır ancak Olson ve arkadaşları (2010) ACC1 enziminin ACC2 enzim inhibisyonunun etkilerini ortadan kaldırdığı kompanse mekanizmasına sahip olduğunu göstermiştir. İstenilen farmakolojik yanıtın elde edilmesinde ACC1/ACC2 dual inhibisyon veya ACC2 seçici inhibisyon arasından en etkili olanın saptanmasında daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

ACC enzim inhibisyonuna yönelik aydınlatılması gereken diğer konulardan biri, sistemik veya organa özgü DNL inhibisyon hedeflerinden hangisinin tercih edileceği ve inhibisyonun ne oranda olacağına saptanmasıdır. ACC inhibitörlerinin uzun süreli ve aşırı derecede uygulanması bazı yan etkilere neden olabilmektedir. Bu nedenle dokuya özgü optimize edilmiş inhibitörlerin ideal inhibisyon oranlarının uygulanması ile yan etkiler önlenebilecektir. Risk faktörlerinin iyi değerlendirilerek, inhibitörlerin oluşturduğu farklı yanıtların anlaşılması, etkili çözüm stratejilerinin sunulmasına yardımcı olacaktır

Henüz tedavi onayı alan bir ACC inhibitörü yoktur ancak metabolik hastalıklar üzerinde oldukça güçlü terapötik etkilere sahip olan çok sayıda ACC inhibitörü prelinik ve klinik faz aşamalarına kadar gelebilmiştir. Genetik ve farmakolojik ACC inhibisyonu sonucunda obezite, tip 2 diyabet, NAYKH ve insülin direncinin tedavisine yönelik umut verici terapötik sonuçlar elde edilmiştir. Özellikle karaciğerde lipid içeriğinin artması ile birlikte ortaya çıkan NAYKH patofizyolojisi oldukça karmaşıktır ve non-alkolik steatohepatit (NASH), siroz ve hepatoselüler karsinoma evrelerinden geçerek ilerleyebilmektedir. NAYKH tedavisine yönelik ilaçların etkileri sınırlıdır ve bu metabolik hastalığın tedavisine yönelik ilaçların geliştirilmesine ihtiyaç vardır. NAYKH' nin tedavisine yönelik yeni nesil terapötik ACC inhibitörleri klinik çalışmalarda oldukça ilerlemiştir. Özellikle karaciğere yönelik optimize edilmiş yeni nesil bu inhibitörler serum trigliserit seviyelerini yükseltmeden etkinliklerini gösterirler. Örneğin Bergman ve arkadaşları (2020) tarafından yapılan çalışmada, PF-05221304 inhibitörü hepatik lipogenezi inhibe ederken, trombosit sayısında azalma ve serum trigliserit seviyelerini yükseltme gibi yan etkiler göstermediğini kanıtlamışlardır.

Sanal tarama, yapı temelli ilaç tasarımı ve moleküler kenetleme tekniklerinin kullanılması ile yeni nesil inhibitörlerin geliştirilmesi için çalışmalar devam etmektedir ve bu prototip inhibitörler gelecekte ilaç geliştirme çalışmalarına hizmet ederek, metabolik hastalıklara yönelik ümit verici potansiyel tedavi imkânı sunacağı düşünülmektedir. Bir dizi ACC inhibitörünün etkinliği ve gücü kanıtlanmıştır ve bunlardan bazıları klinik deney aşamalarında onaylanmıştır. Bu inhibitörlerin tedavi amaçlı kullanılabilmesi için bu alanda çok fazla araştırmanın gerçekleştirilmesi gerekir.

ÇIKAR ÇATIŞMASI/ÇAKIŞMASI BİLDİRİMİ

Yazarlar arasında çıkar çatışması/çakışması bulunmamaktadır.

KAYNAKLAR

- [1] Hotamisligil, G. S. and Ertunc, M. E. (2016). Lipid signaling and lipotoxicity in metaflammation: indications for metabolic disease pathogenesis and treatment. *Journal of Lipid Research*, 57, 2099–2114.
- [2] Smedley, I. and Lubrzynska, E. (1913). The biochemical synthesis of the fatty acids. *Biochemistry Journal*, 7, 364–374.
- [3] Batchuluun, B., Pinkosky, S. L. and Steinberg, G. R. (2022). Lipogenesis inhibitors: therapeutic opportunities and challenges. *Nature Reviews Drug Discover*, 4, 283-305.
- [4] Lenhard, J. M. (2011). Lipogenic Enzymes as Therapeutic Targets for Obesity and Diabetes. *Current Pharmaceutical Design*, 17, 325-331.
- [5] Chen, L., Duan, Y., Wei, H., Ning, H., Bi, C., Zhao, Y., Qin, Y. & Yiliang, L. (2019). Acetyl-CoA carboxylase (ACC) as a therapeutic target for metabolic syndrome and recent developments in ACC1/2 inhibitors. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 382(8), 727-733.
- [6] Xin, W. & Tonghui, H. (2020). Recent development in acetyl-CoA carboxylase inhibitors and their potential as novel drugs. *Future Medicinal Chemistry*, 12(6), 27-34.
- [7] Harriman, G., Greenwood, J., Bhat, S., Huang, X., Wang, R., Paul, D., Tong, L., Saha, A. K., Westlin, W. F., Kapeller, R., and Harwood, H. J., Jr. (2016). Acetyl-CoA carboxylase inhibition by ND630 reduces hepatic steatosis, improves insulin sensitivity, and modulates dyslipidemia in rats. *The Proceedings of the National Academy of Sciences U. S. A.*, 113, E1796–E1805.
- [8] Wei, J. and Tong, L. (2018). How does polymerization regulate human acetyl-CoA carboxylase 1? *Biochemistry*, 57(38), 5495–5496.
- [9] Wei, J. and Tong, L. (2015). Crystal structure of the 500-kDa yeast acetyl-CoA carboxylase holoenzyme dimer. *Nature*, 526(7575), 723–727.
- [10] Hunkeler, M., Haggmann, A., Stutfeld, E., Chami, M., Guri, Y., Stahlberg, H. and Maier, T. (2018). Structural basis for regulation of human acetyl-CoA carboxylase. *Nature*, 558(7710), 470–474.
- [11] Wei, J. and Zhang, Y. X., Yu, T. Y. (2016). A unified molecular mechanism for the regulation of acetyl-CoA carboxylase by phosphorylation. *Cell Discovery*, 2, 16044–16055.
- [12] Tong, L. (2005). Acetyl-coenzyme a carboxylase: crucial metabolic enzyme and attractive target for drug discovery. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62(16), 1784–1803.
- [13] Kim, K. H. (1997). Regulation of mammalian acetyl-coenzymeA carboxylase. *Annual Review of Nutrition*, 17, 77–99.
- [14] Tong, L. (2013). Structure and function of biotin-dependent carboxylases. *Cellular and Molecular Life Science*, 70(5), 863–891.
- [15] Perham, R. N. (2000). Swinging arms and swinging domains in multifunctional enzymes: catalytic machines for multistep reactions. *Annual Review of Biochemistry*, 69, 961–1004.
- [16] Wang, Y., Yu, W., Li, S., Guo, D., He, J., and Wang, Y. (2022). Acetyl-CoA Carboxylases and Diseases. *Frontiers in Oncology*, 12, 836058.
- [17] Abu-Elheiga, L., Brinkley, W.R., Zhong, L. (2000). The subcellular localization of acetyl-CoA carboxylase 2. *The Proceedings of the National Academy of Sciences U. S. A.*, 97, 1444–1449.
- [18] Brownsey, R. W., Boone, A. N., Elliott, J. E., Kulpa, J. E. & Lee, W. M. (2006). Regulation of acetyl-CoA carboxylase. *Biochemical Society Transactions*, 34, 223–227.
- [19] Ha, J., Daniel, S., Broyles, S. S. & Kim, K. H. (1994). Critical phosphorylation sites for acetyl-CoA carboxylase activity. *J. Biol. Chem.*, 269, 22162–22168.
- [20] Vagelos, P.R., Alberts, A.W. and Martin, D.B. (1962). The mechanism of tricarboxylic acid cycle regulation of fatty acid synthesis. *Journal of Biological Chemistry*, 237(6), 1787–92.
- [21] Boone, A.N., Chan, A., Kulpa, J.E., Brownsey, R.W. (2000). Bimodal Activation of Acetyl CoA Carboxylase by Glutamate. *Journal of Biological Chemistry*, 275, 10819–25.
- [22] Abu-Elheiga, L., Matzuk, M.M., Kordari, P., Oh, W., Shaikenov, T., Gu, Z., Wakil, S.J. (2005). Mutant mice lacking acetyl-CoA carboxylase 1 are embryonically lethal. *The Proceedings of the National Academy of Sciences U. S. A.*, 102(34), 12011-12016.
- [23] Cantley, J., Davenport, A., Vetterli, L., Nemes, N.J., Whitworth, P.T., Boslem E. (2019). Disruption of Beta Cell Acetyl-CoA Carboxylase-1 in Mice Impairs Insulin Secretion and Beta Cell Mass. *Diabetologia*, 62, 99–111.
- [24] Abu-Elheiga, L., Matzuk, M.M., Abo-Hashema, K.A., Wakil, S.J. (2001). Continuous Fatty Acid Oxidation and Reduced Fat Storage in Mice Lacking Acetyl-CoA Carboxylase 2. *Science*, 291, 2613–2626.
- [25] Takagi, H., Tanimoto, K., Shimazaki, A., Tonomura, Y., Momosaki, S., Sakamoto, S., Abe, K., Notoya, M., and Yukioka, H. (2019). A Novel Acetyl-CoA Carboxylase 2 Selective Inhibitor Improves Whole-Body Insulin Resistance and Hyperglycemia in Diabetic Mice through Target-Dependent Pathways. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 372, 256–263.

- [26] Abu-Elheiga, L., Oh, W., Kordari, P., Wakil, S. J. (2003). Acetyl-CoA carboxylase 2 mutant mice are protected against obesity and diabetes induced by high-fat/highcarbohydrate diets. *The Proceedings of the National Academy of Sciences U. S. A.*, 100, 10207–10212.
- [27] Takagi, H., Ikehara, T., Kashiwagi, Y., Hashimoto, K., Nanchi, I., Shimazaki, A., Nambu, H., Yukioka, H. (2018). ACC2 deletion enhances IMCL reduction along with acetyl-CoA metabolism and improves insulin sensitivity in male mice. *Endocrinology*, 159, 3007–3019.
- [28] Abu-Elheiga, L., Wu, H., Gu, Z., Bressler, R., Wakil, S.J. (2012). Acetyl-CoA Carboxylase 2-/- Mutant Mice are Protected Against Fatty Liver Under High-Fat, HighCarbohydrate Dietary and De Novo Lipogenic Conditions. *Journal of Biological Chemistry*, 287, 12578–88.
- [29] Savage, D. B., Choi, C. S., Samuel, V. T., Liu, Z. X., Zhang, D., Wang, A., Zhang, X. M., Cline, G. W., Yu, X. X., Geisler, J. G., Bhanot, S., Monia, B. P., Shulman, G. I. (2006). Reversal of diet-induced hepatic steatosis and hepatic insulin resistance by antisense oligonucleotide inhibitors of acetyl-CoA carboxylases 1 and 2. *Journal of Clinical Investigation*, 116, 817–824.
- [30] Fullerton, M.D., Galic, S., Marcinko, K. (2013). Single phosphorylation sites in ACC1 and ACC2 regulate lipid homeostasis and the insulin-sensitizing effects of metformin. *Nature Medicine*, 19(12), 1649–1654.
- [31] Alves-Bezerra, M., Cohen, D.E. (2017). Triglyceride Metabolism in the Liver. *Comprehensive Physiology*, 8, 1–8.
- [32] Bandyopadhyay, G.K., Yu, J.G., Ofrecio, J., Olefsky, J.M. (2006). Increased malonyl-CoA levels in muscle from obese and type 2 diabetic subjects lead to decreased fatty acid oxidation and increased lipogenesis; thiazolidinedione treatment reverses these defects. *Diabetes*, 55(8), 2277–2285.
- [33] Schrauwen, P., van Aggel-Leijssen, D. P. C., Hul, G., Wagenmakers, A. J. M., Vidal, H., Saris, W. H. M., van Baak, M. A. (2002). The Effect of a 3-Month Low-Intensity Endurance Training Program on Fat Oxidation and Acetyl-CoA Carboxylase-2 Expression. *Diabetes*, 51, 2220–2226.
- [34] Wang, M., Ma, L.J., Yang, Y., Xiao, Z., Wan, J.B. (2019). N-3 Polyunsaturated Fatty Acids for the Management of Alcoholic Liver Disease: A Critical Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59, 116–129.
- [35] Olson, D. P., Pulinilkunnil, T., Cline, G. W., Shulman, G. I., and Lowell, B. B. (2010). Gene knockout of *Acc2* has little effect on body weight, fat mass, or food intake. *The Proceedings of the National Academy of Sciences U. S. A.*, 107, 7598–7603.
- [36] Mizojiri, R., Asano, M., Tomita, D., Banno, H., Nii, N., Sasaki, M., Sumi, H., Satoh, Y., Yamamoto, Y., Moriya, T., Satomi, Y., and Maezaki, H. (2018). Discovery of Novel Selective Acetyl-CoA Carboxylase (ACC) 1Inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*. 8;61(3), 1098-1117.
- [37] Kim, C. W., Addy, C., Kusunoki, J., Anderson, N. N., Deja, S., Fu, X., Burgess, S. C., Li, C., Chakravarthy, M., Previs, S., Milstein, S., Fitzgerald, K., Kelley, D. E., and Horton, J. D. (2017). Acetyl CoA carboxylase inhibition reduces hepatic steatosis but elevates plasma triglycerides in mice and humans: a bedside to bench investigation. *Cell Metabolism*. 26, 394–406.
- [38] Goedeke, L., Bates, J., Vatner, D.F., Perry, R.J., Wang, T., Ramirez, R., Li, L., Ellis, M.W., Zhang, D., Wong, K.E., Beysen, C., Cline, G.W., Ray, A.S., Shulman, G.I. (2018). Acetyl-CoA Carboxylase inhibition reverses NAFLD and hepatic insulin resistance but promotes hypertriglyceridemia. *Hepatology*, 68(6), 2197.
- [39] Fadó R, Rodriguez-Rodriguez R, Casals N. (2021). The Return of Malonyl-CoA to the Brain: Cognition and Other Stories. *Progress in Lipid Research*, 81, 101071.
- [40] Galdieri, L., Vancura, A. (2012). Acetyl-CoA Carboxylase Regulates Global HistoneAcetylation. *Journal of Biological Chemistry*. 287, 23865–76.
- [41] Rios Garcia, M., Steinbauer, B., Srivastava, K., Singhal, M., Mattijssen, F., Maida, A. (2017). Acetyl-CoA Carboxylase 1-Dependent Protein Acetylation Controls Breast Cancer Metastasis and Recurrence. *Cell Metabolism*, 842-855.
- [42] Lawitz, E.J., Coste, A., Poordad, F. (2018). Acetyl-CoA carboxylase inhibitor GS-0976 for 12 weeks reduces hepatic de novo lipogenesis and steatosis in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 16(12), 1983–91.
- [43] Kim, C. W., Addy, C., Kusunoki J, Anderson, N. N., Deja, S., Fu, X., Burgess, S. C., Li, C., Chakravarthy, M., Previs, S., Milstein, S., Fitzgerald, K., Kelley, D. E., and Horton, J. D. (2017). Acetyl CoA carboxylase inhibition reduces hepatic steatosis but elevates plasma triglycerides in mice and humans: a bedside to bench investigation. *Cell Metabolism*. 26, 394–406.
- [44] Amin, N., Carvajal-Gonzalez, S., Arggawal, N. (2019). PF-05221304 (PF'1304), a liver-targeted acetyl-CoA carboxylase inhibitor (ACCI), in adults with non-alcoholic fatty liver disease demonstrates robust reductions in liver fat and ALT - phase 2a, dose ranging study. *Hepatology*, 70, 12.
- [45] Griffith, D.A., Kung, D.W., Esler, W.P., Amor, P.A., Bagley, S.W., Beysen, C. (2014). Decreasing the Rate of Metabolic Ketone Reduction in the Discovery of a Clinical Acetyl-CoA Carboxylase Inhibitor for the Treatment of Diabetes. *Journal of Medicinal Chemistry*, 57, 10512–10526.

- [46] Stiede, K., Miao, W., Blanchette, H. S., Beysen, C., Harriman, G., Harwood, H. J., Kelley, H., Kapeller, R., Schmalbach, T., Westlin, W. F. (2017). Acetyl-coenzyme A carboxylase inhibition reduces de novo lipogenesis in overweight male subjects: a randomized, double-blind, crossover study. *Hepatology*, 66, 324–334.
- [47] Shen, Y., Volrath, S.L., Weatherly, S.C., Elich, T.D., Tong, L. (2004). A Mechanism for the Potent Inhibition of Eukaryotic Acetyl-Coenzyme A Carboxylase by Soraphen A, a Macrocyclic Polyketide Natural Product. *Molecular Cell*, 16, 881–91.
- [48] Alkhouri, N.; Lawitz, E., Noureddin, M., DeFronzo, R., Shulman, G. I. (2020). GS-0976 (Firsocostat): An Investigational Liver-Directed Acetyl-CoA Carboxylase (ACC) Inhibitor for the Treatment of Non-Alcoholic Steatohepatitis (NASH). *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 29, 135–141.
- [49] Stiede, K., Miao, W., Blanchette, H. S., Beysen, C., Harriman, G., Harwood, H. J., Kelley, H., Kapeller, R., Schmalbach, T., Westlin, W. F. (2017). Acetyl-coenzyme A carboxylase inhibition reduces de novo lipogenesis in overweight male subjects: a randomized, double-blind, crossover study. *Hepatology*, 66, 324–334.
- [50] Vyas, V.K., Dabasia, M., Qureshi, G., Gulamnizami, Qureshi., Patel, P. & Ghate, M. (2017). Molecular modeling study for the design of novel Acetyl-CoA carboxylase inhibitors using 3D QSAR, molecular docking and dynamic simulation. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 35, 2003–2015.
- [51] Loomba, R. (2021). Combination therapies including cilofexor and firsocostat for bridging fibrosis and cirrhosis attributable to NASH. *Hepatology*, 73, 625–643.
- [52] Zhang, H., Tweel, B., Li, J., Tong, L. (2004). Crystal structure of the carboxyltransferase domain. Accepted Manuscript Information Classification: General of acetyl-CoA carboxylase in complex with CP-640186. *Structure*, 12, 1683–1691.
- [53] Liu, T., Gou, L., Yan, S. & Huang, T. (2020). Inhibition of acetyl-CoA carboxylase by PP-7a exerts beneficial effects on metabolic dysregulation in a mouse model of diet-induced obesity. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 20, 521–529.
- [54] Bergman, A., Gonzalez, S. C., Tarabar, S., Saxena, A. R., Esler W. P., Amin, N. B. (2018). Safety, tolerability, pharmacokinetics and pharmacodynamics of a liver-targeting ACC inhibitor (PF-05221304) following single and multiple oral doses. *Journal of Hepatology*, 68, 582.
- [55] Bergman, A., Carvajal-Gonzalez, S., Tarabar, S., Saxena, A. R., Esler, W. P., Amin, N. B. (2020). Safety, Tolerability, Pharmacokinetics, and Pharmacodynamics of a Liver-Targeting Acetyl-CoA Carboxylase Inhibitor (PF-05221304): A Three-Part Randomized Phase 1 Study. *Clinical Pharmacology in Drug Development*, 9, 514–526.
- [56] Esler W. P., Amin, N. B., Ross, T., Bergman, A., Crowley, C., Gonzalez, S. C., Pfefferkorn, J. A. And Beebe, D. (2019). Partial inhibition of de novo lipogenesis with the acetyl-CoA carboxylase inhibitor PF-05221304 does not increase circulating triglycerides in humans and is sufficient to lower steatosis in rats. *Journal of Hepatology*, 70(1), 69.
- [57] Calle, R. A., Amin, N. B., Carvajal-Gonzalez, S., Ross, T.T., Bergman, A., Aggarwal, S., Crowley, C., Rinaldi, A., Mancuso, J., Aggarwal, N., Somayaji, V., Ingot, M., Tuthill, T. A., Kou, K., Boucher, M., Tesz, G., Dullea, R., Bence, K., Kim, A.M., Pfefferkorn, J.A. & Esler, W.P. (2021). ACC inhibitor alone or co-administered with a DGAT2 inhibitor in patients with non-alcoholic fatty liver disease: two parallel, placebo-controlled, randomized phase 2a trial. *Nature Medicine*. 27, 1836–1848.
- [58] Nishiura, Y., Matsumura, A., Kobayashi, N., Shimazakib, A., Sakamoto, S., Kitadec, N., Tonomurac, Y., Inoa, A., Okuno, T. (2018) Discovery of a novel olefin derivative as a highly potent and selective acetyl-CoA carboxylase 2 inhibitor with in vivo efficacy. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 28(14), 2498–2503.

İkili Kümeleme Algoritmalarının Parametre Seçimi için Çok Ölçütlü Karar Verme Yöntemi

Ahmet Kocatürk^{*}, Bülent Altunkaynak[†]

Gazi Üniversitesi, Fen Fakültesi, İstatistik Bölümü, 06500, Ankara, Türkiye

Öne Çıkanlar

- İkili kümeleme algoritmalarında kullanılan parametrelerin belirlenmesi.
- İkili kümelerin değerlendirilmesinde kullanılan uygunluk indeksi, benzerlik skoru, varyans ve maksimum standart alan ölçüsü.
- Parametrelerin belirlenmesinde NSGA-II çok amaçlı optimizasyon yönteminin kullanılması.
- Çok ölçütlü karar verme yöntemlerinden TOPSIS yöntemi ile çözüm kümesinin sıralanması.

Makale Bilgileri

Geliş: 31/12/2021
Kabul: 07/07/2022

Anahtar Kelimeler

İkili kümeleme,
Değerlendirme ölçüleri,
NSGA-II,
TOPSIS,
Algoritma ayarlanabilir
parametreleri

Öz

İkili kümeleme yöntemlerinde, veri matrisinde benzer satır ve sütunlar, alt kümelerine göre eş zamanlı olarak gruplandırılır. İkili kümeleme algoritmalarında kullanılan parametreler, elde edilecek ikili kümelerin belirlenmesinde oldukça önemlidir. Çünkü ikili kümeleme algoritmaları parametre değerlerine göre farklı ikili kümeler elde eder. Literatürde anlamlı ve etkili ikili kümeler elde etmek için birçok değerlendirme ölçütü bulunmaktadır. İkili kümelerin birden fazla ölçü ile değerlendirilmesi çok amaçlı bir optimizasyon problemini ortaya çıkarmaktadır. Çok amaçlı problemlerde, bir problemi optimal yapan çözüm diğer problemler için optimal değildir. Bu yüzden ideal tek bir çözüm yerine alternatif çözümler (Pareto optimal çözüm) elde edilir. Bu çalışmada, ikili kümeleme algoritmasının ayarlanabilir parametrelerini belirlemek için Pareto optimal çözüm elde edilmiştir. Pareto optimal çözüm elde etmek için en etkili yöntem Baskın Sıralı Genetik Algoritma-II (NSGA-II)'dir. NSGA-II algoritması ile elde edilen çözüm kümesinden tek bir uzlaşık çözüm seçmek için sistematik ve basit hesaplama sürecine sahip çok ölçütlü karar verme yöntemlerinden biri olan İdeal Çözüme Benzerlik Bakımından Sıralama Performansı Tekniği (TOPSIS) algoritması kullanılmıştır. Bu çalışmada ikili kümeleme algoritmasının ayarlanabilir parametrelerini belirlemek için yapay ve gerçek veri matrisleri kullanılmış ve değerlendirme ölçüleri için R fonksiyonları oluşturulmuştur. Her bir değerlendirme ölçüsü ayrı ayrı dikkate alınarak ikili kümeleme algoritmasının ayarlanabilir parametreleri belirlenmiştir. Ayrıca değerlendirme ölçüleri eşit önem derecesine göre çok ölçütlü karar yöntemi ile elde edilerek ikili kümeleme algoritmalarının ayarlanabilir parametreleri karşılaştırılmıştır. Her bir değerlendirme ölçüsüne göre farklı sonuçlar elde edildiği için çok ölçütlü karar verilmesi daha anlamlı ikili kümeler elde edilmesini sağlamıştır.

Multi-Criteria Decision Making Method for Parameter Selection of Biclustering Algorithms

Highlights

- Determining the parameters used in biclustering algorithms.
- The relevance index, similarity score, variance and maximum standard area measure used in the evaluation of biclusters.
- Use of NSGA-II multi-objective optimization method in the determination of parameters.
- Sorting the solution set with the TOPSIS method, one of the multi-criteria decision making methods.

Abstract

In biclustering methods, similar rows and columns in the data matrix are grouped simultaneously according to their subsets. The parameters used in biclustering algorithms are very important in determining the biclusters to be obtained. Because biclustering algorithms obtain different biclusters according to parameter values. There are many evaluation measures in the literature to obtain meaningful and effective biclusters. Evaluating biclusters with more than one measure reveals a multi-objective optimization problem. In multi-objective problems, the solution that makes one problem optimal is not optimal for other problems. Therefore, alternative solutions (Pareto optimal solution) are obtained instead of a single ideal solution. In this study, a Pareto optimal solution was obtained to determine the tuning parameters of the biclustering algorithm. The most effective method to obtain a Pareto optimal solution is the Non-dominated Sorting Genetic Algorithm-II (NSGA-II). Technique for Order Preference by Similarity to Ideal Solution (TOPSIS algorithm), which is one of the multi-criteria decision making methods with a systematic and simple calculation process, was used to select a single compromise solution from the solution set obtained by the NSGA-II algorithm. To determine the tuning parameters of the biclustering algorithm, artificial and real data matrices were used and R functions were created for the evaluation criteria. The tuning parameters of the biclustering algorithm were determined by considering each evaluation measure separately. In addition, the evaluation measures were obtained with the multi-criteria decision method according to the equal importance level and the tuning parameters of the biclustering algorithms were compared. Since different results were obtained according to each evaluation measure, making a multi-criteria decision led to more meaningful biclusters.

Article Info

Received: 31/12/2021
Accepted: 07/07/2022

Keywords

Biclustering,
Evaluation measures,
NSGA-II,
TOPSIS,
Algorithm tuning
parameters

Makale, Creative Commons 4.0 (CC BY NC SA) uluslararası lisansı altında açık erişim olarak yayımlanmaktadır.

* Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Ahmet Kocatürk, ahmetkocaturk@gazi.edu.tr, [†] Makale basım sırasında vefat eden hocamız için eklenmiştir.

1. GİRİŞ

Çok değişkenli analiz tekniklerinden biri olan kümeleme analizinin öncelikli amacı, birey ya da nesnelerin temel özelliklerini dikkate alarak onları gruplandırmaktır. Kümeleme analizi yöntemlerinde çözülecek probleme göre farklı algoritmalar mevcuttur. Gruplandırılmak istenen veri yapısı matris formunda olduğunda geleneksel kümeleme analizi yöntemleri sadece satır kümelerini veya sütun kümelerini elde etmeyi amaçlar. Ancak veri matrisinde hem satır hem de sütun kümelerinin eş zamanlı kümelenebilmesi için son zamanlarda yaygın bir şekilde kullanılan ikili kümeleme yöntemleri geliştirilmiştir [1].

İkili kümeleme yöntemlerinin amacı veri matrisinin bir sütun alt kümesine göre benzer olan satırları veya bir satır alt kümesine göre benzer olan sütunları gruplamaktır. İkili kümeleme yöntemleri pazarlama bölümlenmesinde [2], metin madenciliğinde [3] veya veri madenciliği problemlerinde [4] kullanıldığı gibi aslında daha çok biyolojik veri analizlerinde kullanılmıştır. İlk ikili kümeleme yöntemlerinin orijinal çalışma alanları gen ifade verileridir. Gen ifadesini belirlemek, protein etkileşimini incelemek ve mikrodizi veri analizi alanlarında kullanımı yaygınlaştıkça ikili kümeleme yöntemleri önem kazanmıştır.

Literatürde ikili kümeleme için birçok farklı sezgisel algoritmalar geliştirilmiştir. İlk olarak Cheng ve Church (2000) tarafından Ortalama Karesel Artık Değeri (Mean Squared Residue, MSR)'nin minimum değer almasına dayalı Cheng ve Church (CC) algoritması önerilmiştir [5]. Lazzeroni ve Owen (2002) tarafından önerilen Plaid algoritması, iki yönlü ANOVA modellerini içeren bir yapıya sahip olmasının yanında ikili kümelerin örtüşmesine de izin verir [6]. İkili kümeleri yinelemeli bir şekilde keşfeden deterministik olmayan yöntem ISA algoritması Bergmann ve diğerleri (2003) tarafından geliştirilmiştir [7]. OPSM (Order-Preserving Submatrix) algoritması ise ikili kümeleri belirlemek için olasılıksal bir modeli kullanarak yeniden sıralama yaklaşımına dayalı deterministik bir yöntemdir [8]. Prelic ve diğerleri (2006) tarafından ikili kümeleme yaklaşımlarının çoğunun temel özelliklerini barındıran iki değerli referans model Bimax algoritması önerilmiştir [9]. Veri yapısının nitel veya yarı nicel ölçümlerinin bir kombinasyonu olarak diğer algoritmalara göre daha genel bir biçimde ikili kümeler elde eden QUBIC (Qualitative Biclustering Algorithm) algoritması hesaplama süresinde diğer algoritmalara göre oldukça etkilidir [10]. Veri matrisindeki satır ve sütunlar arasındaki doğrusal bağlantıları dikkate alan ve normal dağılımlı olmayan veri yapılarında da etkili olan FABIA (Factor Analysis for Bicluster Acquisition) algoritması Bayes tekniklerine dayalı bir algoritmadır [11]. Bayes ikili kümeleme modelinin genişletilmiş bir versiyonu olan PPM (Plaid Penalized Method) algoritması genel bir örtüşme yapısını dikkate alır [12]. Büyük boyutlu veri matrisleri üzerinde etkili olan ENS (Ensemble Neighborhood Search) algoritması diğer yöntemlere göre daha esnek ve uyarlanabilirliğine sahiptir [13]. Kayıp değerlerin çok olduğu veri matrislerine uygun olan NCBI (Novel Correlation Based Imputing Technique) algoritması, korelasyon tabanlı kayıp değer atama tekniğine dayalıdır [14]. Bu algoritmaların bazıları sistematik arama yaklaşımına, bazıları ise stokastik arama veya metasezgisel yaklaşımına göre ikili kümeleri elde etmektedir. Metasezgisel yaklaşımına göre ikili kümeleri elde eden algoritmalar genetik algoritmalar veya benzetimli tavlama gibi sezgisel yöntemleri kullanan evrimsel ve hibrit algoritmalar [15].

İkili kümeler elde edilirken algoritmalarda kullanılacak parametrelerin belirlenmesi oldukça önemlidir. Çünkü ikili kümeleme algoritmaları parametrelerine göre farklı ikili kümeler elde etmektedir. Örneğin, Prelic ve diğerleri (2006), Liu ve Wang (2006), Al-Akwaa ve diğerleri (2009), Chia ve Karuturi (2010), Padilha ve Campello (2017) ve Karim ve diğerleri (2019) tarafından yapılan çalışmalarda algoritmaların parametreleri farklı seçildiğinden "Saccharomyces cerevisiae" verisinden elde edilen ikili kümeler farklılık göstermiştir [9, 16-20]. İkili kümeleme algoritmalarının performanslarının karşılaştırılmasında sonucu doğrudan etkileyen faktör, parametrelerin belirlenmesidir.

Bu çalışmada, ikili kümeleme algoritmasının ayarlanabilir parametreleri belirlenirken sayısal niteliklerin olduğu veri yapıları dikkate alınmıştır. Bununla birlikte veri yapıları satırlar ve sütunlardan oluşan matris formundadır. Bu veri yapısına en uygun gerçek hayat problemleri gen açıklama verileridir. Gen açıklama verilerinde on binlerce genin çeşitli koşullar altındaki ifade seviyeleri bulunmaktadır. Bu biçimde tanımlı büyük boyutlu veriden anlamlı bilgiler çıkarılması gen çalışmalarında önemli bir etkiye sahiptir [21]. Gen açıklama verilerinde benzer ifade yapılarına göre gen gruplarını belirlemek için ikili kümeleme algoritmaları kullanılır.

Anlamli ve etkili ikili kümeler elde etmek için küme büyüklüğü, satır varyansı ve ortalama karesel artık skoru gibi değerlendirme ölçüleri kullanılmaktadır. İkili kümelerin tek bir ölçü yerine birden fazla ölçü ile değerlendirilmesi daha anlamlı olacaktır. Böylece ikili kümelerin değerlendirilmesi çok amaçlı bir optimizasyon problemini ortaya çıkarmaktadır. Literatürde çok amaçlı optimizasyon problemlerin çözümünde yaygın olarak kullanılan yapay sinir ağıları, genetik algoritmalar veya tavlama benzetimi gibi sezgisel yöntemler bulunmaktadır [22, 23]. Sezgisel yöntemler her bir çözümü bulmak için birçok kez tekrarlandığından hesaplama karmaşıklığına neden olmaktadır. Bu yüzden çok amaçlı sezgisel yöntemler geliştirilmiştir. Çok amaçlı optimizasyon problemlerini çözmek için geliştirilen en etkili çok amaçlı sezgisel yöntemlerden biri Baskın Sıralı Genetik Algoritma-II (Non-dominated Sorting Genetic Algorithm-II, NSGA-II)'dir [24-28]. Bu çalışmada, ikili kümeleme algoritmasının ayarlanabilir parametreleri için birden fazla değerlendirme ölçütü dikkate alındığından ideal tek bir çözüm yerine alternatif çözümler kümesi (Pareto optimal çözüm) elde edilmiştir. Pareto optimal çözüm için en etkili yöntem NSGA-II'dir [29].

Karar verme yöntemlerinden literatürde yaygın olarak kullanılan Hwang ve Yoon (1981) tarafından önerilen TOPSIS (Technique for Order Preference by Similarity to Ideal Solution) yöntemi [30, 31], Pamucar ve Cirovic (2015) tarafından önerilen MABAC (Multi-Attributive Border approximation Area Comparison) yöntemi [32], Liu ve diğerleri (2016) tarafından önerilen ELECTRE (ELimination Et Choice Translating Reality) yöntemi [33] vb. bulunmaktadır. NSGA-II algoritması ile elde edilen çözüm kümesi içerisinde uzlaşık tek bir çözüm seçmek için çok ölçütlü karar verme yöntemlerinden yaygın olarak kullanılan, hesaplama süresi ve sistematik süreci basit olan TOPSIS algoritması kullanılmıştır.

Çalışmanın ikinci bölümünde ikili kümeleme yöntemlerinden CC algoritması tanıtılmaktadır. Üçüncü bölümde ise ikili kümelerin değerlendirilmesinde kullanılabilecek varyans ölçüsü (VAR), uygunluk indeksi (RI), maksimum standart alan (MSA) ve benzerlik skoru (SS) ölçüleri açıklanmıştır. Dördüncü bölümde NSGA-II, TOPSIS ve önerilen yöntemlerden bahsedilmiştir. Önerilen yöntem için NSGA-II ve TOPSIS yöntemleri kullanılarak R program kodları ile fonksiyonlar oluşturulmuştur. Beşinci bölümde yapay ve gerçek veri seti kullanılarak yapılan uygulamalar ve sonuçları yer almaktadır. Son bölümde çalışmadan elde edilen sonuçlar verilmiş ve önerilerde bulunulmuştur.

2. İKİLİ KÜMELEME YÖNTEMLERİ

Veri matrislerinden ikili kümeler elde edilirken yapılan analizler çalışmanın amacına göre farklılık gösterebilmektedir. Örneğin araştırmacı, veri matrisinde satırlar (gen verileri için genler, karar matrisi için alternatifler, vb.) veya sütunların (gen verileri için koşullar, karar matrisi için kriterler, vb.) kümelenebilir isteyebilir (Çizelge 1). Bunun için klasik kümeleme algoritmaları kullanılabilir. Ancak her iki durumu aynı anda yapabilmek için (hem satırları hem de sütunları eşzamanlı olarak kümelemek) ikili kümeleme algoritmaları geliştirilmiştir. İkili küme yapısı (2.1)'deki gibidir.

Çizelge 1. Çalışmada kullanılan sembol ve notasyon listesi

Sembol	Tanım	Sembol	Tanım
b_{ij}	İkili kümenin j . sütun ortalaması	σ_i	İkili kümenin i . satır standart sapması
b_{iJ}	İkili kümenin i . satır ortalaması	d_{ij}	i . ve j . satırlar arasındaki uzaklık
b_{IJ}	İkili kümenin genel ortalaması	d_{avg}	İkili küme elemanları arasındaki ortalama uzaklık
σ_{ij}^2	İkili kümenin j . sütun yerel varyansı	s_{ij}	İkili küme benzerlik matrisinin i . satır ve j . sütun elemanı
σ_j^2	İkili kümenin j . sütun genel varyansı	$m_j(\hat{B})$	Tahmin edilen ikili kümenin j . sütunu için alt sınır değeri
μ_i	İkili kümenin i . satır ortalaması	$M_j(\hat{B})$	Tahmin edilen ikili kümenin j . sütunu için üst sınır değeri

$$B = \begin{pmatrix} b_{11} & b_{12} & \cdot & \cdot & \cdot & b_{1|J|} \\ b_{21} & b_{22} & \cdot & \cdot & \cdot & b_{2|J|} \\ \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot \\ \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot \\ \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot \\ b_{|I|1} & b_{|I|2} & \cdot & \cdot & \cdot & b_{|I||J|} \end{pmatrix}. \quad (2.1)$$

Burada $b_{1|J|}$ birinci satır (gen) ve $|J|$ inci sütun (koşul veya örneklem) elemanını, $b_{|I|1}$ $|I|$ inci satır ve birinci sütun elemanını ve $b_{|I||J|}$ $|I|$ inci satır ve $|J|$ inci sütun elemanını göstermektedir. $|I|$ ve $|J|$ sırası ile satır ve sütun toplam sayılarını belirtmektedir. İkili kümeleme algoritmalarında yaygın olarak kullanılan bazı formüller (2.2)'deki gibi verilebilir

$$b_{ij} = \frac{1}{|I|} \sum_{i=1}^{|I|} b_{ij}, \quad b_{iJ} = \frac{1}{|J|} \sum_{j=1}^{|J|} b_{ij}, \quad b_{IJ} = \frac{1}{|I||J|} \sum_{i=1}^{|I|} \sum_{j=1}^{|J|} b_{ij}. \quad (2.2)$$

2.1. CC Algoritması

CC algoritması Ortalama Karesel Artık Değeri (Mean Squared Residue, MSR)'nin minimum değer almasına dayalıdır. Bir ikili kümenin anlamlılığı, küme içerisindeki elemanların birbirine olan benzerliğini hesaplayan MSR ölçüsü ile belirlenir. MSR ölçüsü (2.3)'teki gibi hesaplanır [5]

$$MSR(I, J) = \frac{1}{|I||J|} \sum_{i \in I, j \in J} (b_{ij} - b_{iJ} - b_{iI} + b_{IJ})^2. \quad (2.3)$$

MSR değerinin küçük olması küme elemanlarının benzerliğinin yüksek olduğunu gösterir. Bununla birlikte MSR değerinin büyük olması ise küme elemanların benzerliğinin düşük olduğunu ifade eder.

CC algoritmasında kullanılan iki parametre değeri vardır. Bunlardan birincisi olan δ (delta) parametresi maksimum kabul edilebilecek MSR değerini gösterir. İkinci olarak kullanılan α (alfa) parametresi ise çoklu satır veya sütun silme işlemindeki eşik değerini belirler. CC algoritmasında δ parametresi önceden belirlenerek MSR değeri bu parametre değeri ile karşılaştırılır. MSR değeri δ parametresinden küçük olduğunda elde edilen ikili küme δ -ikili küme (δ -bicluster) olarak ifade edilir. Algoritmanın temel amacı minimum değerli MSR değerini maksimum büyüklükteki ikili kümeler ile bulmaktır.

CC algoritması başlangıç olarak veri matrisini bir ikili küme olarak alır. Daha sonra veri matrisinde satır ve sütun silme işlemleriyle devam eder. Bu işlemten sonra MSR değerinin δ parametresi değerini geçmeyecek şekilde satır veya sütun ekleme işlemiyle ikili kümelerin satır veya sütun sayıları artırılmaya çalışılır. MSR değeri δ parametresi değerine yaklaşıncaya kadar satır ve sütun ekleme işlemine devam edilir. CC algoritması ilk ikili kümeyi elde ettikten sonra veri matrisinden bu ikili kümeyi çıkararak ikinci iterasyona geçer. Veri matrisindeki tüm ikili kümeler elde edilinceye kadar iterasyon devam eder.

3. İKİLİ KÜME DEĞERLENDİRME ÖLÇÜLERİ

3.1. Varyans Ölçüsü

İkili kümelerde değerlendirme ölçüsü olarak kullanılan varyans ölçüsü (*VAR*), sabit değerli ikili kümelerde etkili bir ölçü türüdür [34]. İkili küme elemanlarının varyans toplamlarına dayanan bu ölçü (3.1)'deki gibi hesaplanır

$$VAR(B) = \frac{1}{|I||J|} \sum_{i=1}^{|I|} \sum_{j=1}^{|J|} (b_{ij} - b_{i.})^2 . \quad (3.1)$$

İkili kümelerin anlamlı ve etkili olabilmesi için *VAR* ölçüsünün minimum olması gerekir. İkili kümelerin karşılaştırılmasında kullanılan *VAR* ölçüsü küçük olan ikili küme diğerine göre daha anlamlı ve etkili olduğu söylenebilir.

3.2. Uygunluk İndeksi

İkili kümelerin sütun elemanlarının uygunluklarının toplamına dayalı olan uygunluk indeksi ölçüsü (*RI*), Yip ve diğerleri (2004) tarafından önerilmiştir [35]. Bu ölçü özellikle sabit değerli ikili kümelerde iyi sonuçlar vermektedir. *RI* ölçüsü her bir sütun değeri için ayrı ayrı hesaplanmaktadır.

$$RI_{ij} = 1 - \frac{\sigma_{ij}^2}{\sigma_j^2} . \quad (3.2)$$

Burada σ_{ij}^2 (yerel varyans) ikili kümedeki sütun değerlerinin varyansı ve σ_j^2 (genel varyans) tüm veri setindeki sütun değerlerinin varyansıdır. Yerel varyans küçüldükçe indeks değeri büyür. Olabilecek en yüksek uygunluk indeksi yerel varyansın sıfır olması durumunda gerçekleşir. Her bir sütun için hesaplanan *RI* ölçülerinin ortalaması ikili kümenin *RI* ölçüsünü temsil etmektedir. Buna göre en yüksek *RI* ölçüsüne sahip ikili küme daha anlamlı olacaktır.

3.3. Maksimum Standart Alan Ölçüsü

Standartlaştırma tabanlı ölçümlerden biri olan maksimum standart alan (*MSA*) ölçüsü veri matrisindeki elemanların ortak bir aralığa ölçeklendirmesini sağlayıp sayısal değerlerden ziyade eğilimi karakterize etmektedir [34]. Bir ikili kümenin elemanlarının standartlaştırılması (3.3)'teki gibidir

$$\hat{b}_{ij} = \frac{b_{ij} - \mu_i}{\sigma_i} , 1 \leq i \leq |I| , 1 \leq j \leq |J| . \quad (3.3)$$

Burada μ_i ve σ_i , sırasıyla *i* inci satırın ortalamasını ve standart sapmasını temsil etmektedir. Her bir satır için standartlaştırılmış değerler hesaplandıktan sonra veri matrisindeki maksimum ve minimum değerler arasındaki ölçüm *MSA* ölçüsünde kullanılır. Buna göre ikili kümedeki her sütun için hesaplanan alt sınır ve üst sınır sırasıyla $m_j(\hat{B})$ ve $M_j(\hat{B})$ hesaplanır

$$m_j(\hat{B}) = \min_i \hat{b}_{ij} , M_j(\hat{B}) = \max_i \hat{b}_{ij} . \quad (3.4)$$

Bu sınırlar kullanılarak standartlaştırılmış ikili küme elemanlarının her sütun değeri için hesaplanan alanların toplamı *MSA* ölçüsünü oluşturur

$$MSA(B) = \sum_{j=1}^{|J|-1} \left| \frac{M_j(\hat{B}) - m_j(\hat{B}) + M_{j+1}(\hat{B}) - m_{j+1}(\hat{B})}{2} \right|. \quad (3.5)$$

Eğer ikili küme içerisindeki satırlar mükemmel bir uyum içerisinde ise MSA ölçüsü sıfıra eşit olacaktır. Aksine MSA ölçüsü değeri arttıkça ikili kümenin anlamlılığı ve etkinliği azalacaktır. Bu yüzden ikili kümenin anlamlı olması için $m_j(\hat{B})$ ve $M_j(\hat{B})$ değerleri birbirine yakın olmalıdır.

3.4. Benzerlik Skoru Ölçüsü

Liu ve Wang (2007) tarafından önerilen benzerlik skoru (SS) ölçüsü ikili kümenin iki satırı arasındaki benzerliğini ölçmeye dayalıdır. İlk olarak referans satır elemanı belirlenir ve iki satır arasındaki uzaklık (3.6)'daki gibi hesaplanır [19]

$$s_{ij} = \begin{cases} 0 & , \text{eğer } d_{ij} > \alpha \times d_{avg} \\ 1 - \frac{d_{ij}}{\alpha \times d_{avg}} + \beta & , \text{diğer durumlarda} \end{cases}. \quad (3.6)$$

Burada d_{avg} ikili küme elemanlarının ortalama uzaklık ölçüsünü gösterir ve (3.7)'deki gibi hesaplanır

$$d_{avg} = \frac{\sum_{i \in I, j \in J} d_{ij}}{|I||J|}, \quad d_{ij} = |b_{ij} - b_{i^*j}|. \quad (3.7)$$

Uzaklık ölçüsü d_{ij} i inci satır ve referans satır elemanı arasındaki mutlak fark ile hesaplanır. İkili kümenin benzerlik skoru hesaplanırken ilk olarak her satır ve her sütun için sırasıyla $s(i, J)$ ve $s(I, j)$ değerleri (3.8)'deki gibi bulunur

$$s(i, J) = \sum_{j \in J} s_{ij}, \quad s(I, j) = \sum_{i \in I} s_{ij}. \quad (3.8)$$

Bu eşitlikler kullanılarak ikili küme için benzerlik skoru ölçüsü (3.9)'daki gibi hesaplanır

$$s(B) = s(I, J) = \min \left\{ \min_{i \in I} s(i, J), \min_{j \in J} s(I, j) \right\}. \quad (3.9)$$

Benzerlik skoru ölçüsü yüksek olan ikili küme daha anlamlı ve etkili olacaktır.

4. ÖNERİLEN YÖNTEM

4.1. Çok Amaçlı Optimizasyon

Çok amaçlı optimizasyon problemleri, belirli kısıtlar altında iki veya daha fazla amacın bulunduğu durumlardır. Ayrıca çözümlerin farklı amaçlar için değerlendirilmesini ve hangi çözümün seçilmesi gerektiğini de inceler. Araştırmacının amacına göre tek bir çözümün bulunabileceği gibi bazı durumlarda farklı amaçlar için birden fazla çözümün bulunduğu çözüm kümesini de elde eder. Optimize edilmesi gereken birden fazla çelişen amaç fonksiyonları olduğunda tek bir optimal çözüm yoktur. Ancak tüm amaç fonksiyonları için elde edilen çözüm kümesi vardır. Bu çözüm kümesine pareto optimal küme denir [15]. Çok amaçlı optimizasyon problemleri aşağıdaki gibi formüle edilebilir

$$\min_x f(x_1, x_2, \dots, x_n) = [f_1(x_1, x_2, \dots, x_n) \quad f_2(x_1, x_2, \dots, x_n) \quad \dots \quad f_m(x_1, x_2, \dots, x_n)].$$

Burada n tane x karar değişkeni bulunmaktadır. $f(x_1, x_2, \dots, x_n)$ ise m tane amaç fonksiyonunu ifade etmektedir.

4.1.1. Çok amaçlı ikili kümeleme

İkili kümeleme algoritmalarından anlamlı ve etkili ikili kümeler elde etmek için ikili kümelerin homojen yapıda ve anlamlı büyüklükte olması gibi farklı değerlendirme ölçülerine bakılır. İkili kümelerde benzerlik ölçütü olarak kullanılan *MSR* ölçüsü optimize edilirken yalnızca bir satır ve bir sütuna sahip ikili küme çözümü optimaldir. Ancak ikili küme boyutu arttığında *MSR* ölçüsü değeri de artacaktır. Böylece ikili kümelerde birden fazla değerlendirme ölçüsü dikkate alındığında çok amaçlı bir optimizasyon problemi ortaya çıkar. Literatürde bu problemlerin çözümü için çok amaçlı ikili kümeleme algoritma modelleri önerilmiştir [36-38].

Önerilen modelde birbiriyle çelişen dört farklı değerlendirme ölçüsü (*VAR*, *RI*, *MSA* ve *SS*), amaç fonksiyonu olarak optimize edilmek için kullanılmıştır

$$f_1 = \frac{1}{|I||J|} \sum_{i=1}^{|I|} \sum_{j=1}^{|J|} (b_{ij} - b_{IJ})^2, \quad (4.1)$$

$$f_2 = 1 - \frac{\sigma_{Ij}^2}{\sigma_j^2}, \quad (4.2)$$

$$f_3 = \sum_{j=1}^{|J|-1} \left| \frac{M_j(\hat{B}) - m_j(\hat{B}) + M_{j+1}(\hat{B}) - m_{j+1}(\hat{B})}{2} \right|, \quad (4.3)$$

$$f_4 = s(I, J) = \min \left\{ \min_{i \in I} s(i, J), \min_{j \in J} s(I, j) \right\}. \quad (4.4)$$

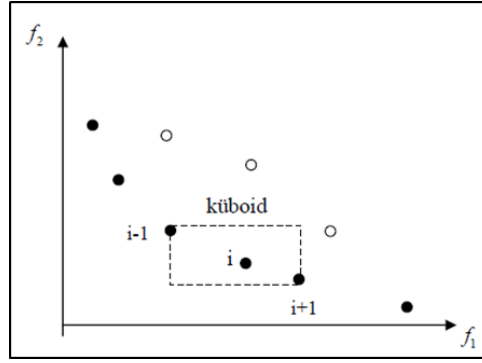
Burada f_1 amaç fonksiyonu için varyans toplamlarına dayalı *VAR* ölçüsü, f_2 amaç fonksiyonu için sütun elemanları uygunluklarına dayalı *RI* ölçüsü, f_3 amaç fonksiyonu için standartlaştırma tabanlı *MSA* ölçüsü ve f_4 amaç fonksiyonu için ikili kümenin iki satırı arasındaki benzerliği ölçen *SS* ölçüsü tanımlanmıştır. Her bir amaç fonksiyonu içerisinde ikili kümeyle ait ortak karar değişkenleri bulunmaktadır. *CC* algoritmasının δ (delta) ve α (alfa) parametresi başlangıç kromozomları olarak ele alınmıştır. Ortak karar değişkenleri δ ve α parametresi için alt sınır ve üst sınır değerleri arasında *NSGA-II* yöntemi için arama uzayı belirlenir. Optimal çözümler ile elde edilen parametre değerlerine göre ikili kümeler belirlenir. Belirlenen ikili kümeleri değerlendirmede ise f_1 , f_2 , f_3 ve f_4 amaç fonksiyonları kullanılır. Amaç fonksiyon değerlerine göre *NSGA-II* algoritması δ ve α parametresi için tekrar optimal çözüm için arama yapar. Elde edilen yeni δ ve α parametresi kullanılarak *CC* algoritması ile yeni ikili kümeler elde edilir. Elde edilen yeni ikili kümeleri değerlendirmek için tekrardan amaç fonksiyon değerleri hesaplanır. Anlamlı ikili kümeler elde etmek için f_1 ve f_3 fonksiyonları minimum olması gerekirken f_2 ve f_4 fonksiyonları maksimum olması gerekir. *NSGA-II* algoritması genel olarak bilgisayar programlama dillerinde optimizasyon süreci olarak varsayılan olarak bütün amaç fonksiyonlarını minimize edilmesi biçiminde oluşturulmuştur. Bu yüzden f_2 ve f_4 fonksiyonları maksimizasyon probleminden minimizasyon problemine dönüştürülerek *NSGA-II* algoritmasına dahil edilmiştir.

NSGA-II yöntemi kullanılarak *CC* algoritmasının ayarlanabilir parametreleri için Pareto optimal çözüm belirlenir. İkili küme değerlendirmesi için *VAR*, *RI*, *MSA* ve *SS* ölçütleri belirlendikten sonra *TOPSIS* yöntemi ile Pareto optimal çözüm içerisinden uzlaşık tek bir çözüm seçilir. Böylece en anlamlı ve etkili ikili küme için *CC* algoritmasının ayarlanabilir parametre değerleri bulunur.

4.1.2. NSGA-II yöntemi

Çok amaçlı optimizasyon problemlerinde sezgisel bir yöntem olan NSGA-II yönteminde, genetik algoritmaya göre ek olarak baskınlık sıralaması ve kalabalık uzaklığı hesaplanır [29]. İlk olarak başlangıç popülasyonundan elde edilen çözümler Pareto optimal çözümdeki üstünlüklere göre sıralanır. Sıralama için kullanılan hızlı baskınlık sıralama algoritmasında her bir çözüm diğer çözümlerle karşılaştırılıp popülasyondaki bireylerin baskınlıklarına bakılır. İlk baskın yüzeydeki çözümler popülasyondan çıkarılarak ikinci sıradaki baskın yüzey çözümleri için işlem tekrarlanarak devam eder. Böylece popülasyondaki bireyler farklı baskınlık kümelerine göre sınıflandırılır. Popülasyondaki her bir eleman için baskınlık sayısı ve baskın olduğu çözüm kümesi belirlenir. Baskınlık sayısı ilk baskın yüzeydeki elemanlar için 0'dır. Baskınlık sayısı 0 olan elemanların kümesinde karşılaştırma yapılır ve hızlı baskınlık sıralama algoritması süreci devam eder.

NSGA-II yönteminde kullanılan bir diğer hesaplama kalabalık uzaklığı yaklaşımıdır. Çözüm kümesi içerisindeki yayılımı ve çeşitliliği sağlamak için kullanılan kalabalık uzaklığında baskın yüzeylerdeki çözümlerin fonksiyon değerleri arasındaki uzaklık belirlenir. Uzaklık ölçüsü olarak genellikle Öklid uzaklık ölçüsü kullanılmaktadır. Kalabalık uzaklığının hesaplanması iki amaç fonksiyonu için Şekil 1'de gösterilmiştir.



Şekil 1. Kalabalık uzaklığının hesaplanması (iki amaç fonksiyonu için) [30]

Baskın yüzeydeki çözümler içerisindeki bir çözümün kalabalık uzaklığı, aynı baskın yüzeydeki komşu çözümler ile arasındaki uzaklık hesaplanılarak bulunur. Komşu çözümlerin koordinat düzlemindeki köşeleri kullanılarak elde edilen kenarların uzunluğu tahmin edilir. Tahmin edilen kenar uzunluklarına kalabalık uzaklığı denir.

NSGA-II algoritmasında kullanılan bir diğer hesaplama ise kalabalıklaştırılmış turnuva seçim operatörüdür. Kalabalıklaştırılmış turnuva seçiminde eşleşme havuzu oluşturulur. İlk olarak iki birey rastgele seçilir ve baskınlık sıraları karşılaştırılır. Karşılaştırılan bireylerden birinin baskınlık sırası diğerine göre küçük veya eşitse çözüm için o birey tercih edilir. Ayrıca turnuva seçiminde kalabalık uzaklığına da bakılır. Eğer bireylerden birinin kalabalık uzaklık değeri diğerine göre büyükse çözüm için o birey tercih edilir. Turnuva seçiminin tamamlanması için başlangıç popülasyonu boyutuna ulaşılması gerekir.

NSGA-II algoritmasının genetik operatörlerinden biri olan çaprazlama operatörü, iki yeni kromozom üretmek için ebeveynler arasında gen alışverişini gerçekleştirir. Genellikle tek nokta, çift nokta, sıralı ve tekdüze çaprazlama yöntemleri kullanılır. Genetik operatörlerden bir diğeri ise mutasyon operatörüdür.

Bir kromozomda gen değişimi dışında başka nedenlerden dolayı oluşan kalıtsal değişimler mutasyon ile meydana gelir. Optimizasyon probleminin yerel çözümde kalmasını engellemek için kullanılır. Başka bir ifadeyle popülasyonun yerel optimumda durgunlaşmasını önlemede yardımcı olur. Mutasyona uğrayacak gen dizileri rastgele seçilir. İki değerli diziler için bit değerinin tersi alınarak gerçekleşir. Gerçek değerli diziler için bit değerinden küçük bir sayı çıkarılarak veya eklenerek gerçekleşir [29].

NSGA-II algoritmasının genel yapısı Türkşen (2011) (Şekil 2) tarafından yapılan çalışmada özetlenmiştir [30]. Buna göre algoritmanın adımları aşağıdaki gibidir:

Adım 1

Her bir $p \in P$ için;

- $S_p = \emptyset$, p çözümünün baskın olduğu çözüm kümesi ve $n_p = 0$, p çözüme baskın çözümler sayısı tanımlanır.

Her bir $q \in P$ için;

- p çözümü q çözüme baskın ise $S_p = S_p \cup \{q\}$.

$n_p = 0$ ise p çözüme baskın çözüm yoktur ve p çözümü birinci yüzeye aittir. $F_1 = F_1 \cup \{p\}$.

Adım 2

Her bir $p \in P$ için *Adım 1* tekrarlanır.

Adım 3

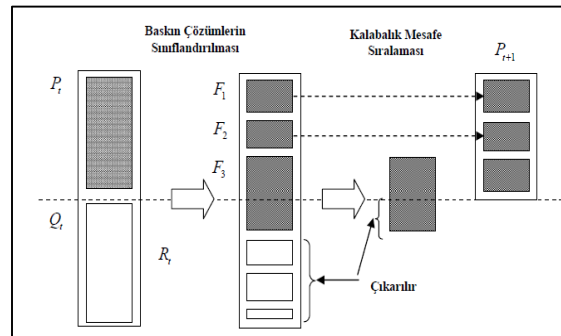
Yüzey sayacı $i=1$ olarak alınır.

- $F_i \neq \emptyset$ ise $(i+1)$. yüzey için elemanların toplandığı küme $Q = \emptyset$ alınır.
- F_i yüzeyindeki her p ve S_p kümesindeki her bir q için baskınlık sayacı azaltılır. $n_q = n_q - 1$.

Adım 4

$n_q = 0$ ise ardışık yüzeydeki hiçbir çözüm q çözüme baskın değildir. $Q = Q \cup \{q\}$.

- Yüzey sayacı bir artırılır. $i = i + 1$.
- Yeni yüzey Q kümesine atanır. $F_i = Q$.



Şekil 2. NSGA-II'de yeni popülasyonun oluşturulması [30]

4.2. Çok Ölçütlü Karar Verme

Çok ölçütlü karar verme yöntemi, birden fazla ölçütün bulunduğu durumlarda farklı özellikteki seçeneklerden bir veya daha fazlasını seçmek için kullanılan bir yöntemdir. Ölçütler eşit önem derecesine veya farklı ağırlıklandırma yapılarak seçenekler/alternatifler içerisinde sıralama veya sınıflandırma yapılabilir. Çok ölçütlü karar verme yöntemlerinden bazıları ağırlıklı toplam veya çarpım yöntemi, TOPSIS, MABAC, AHP ve ELECTRE yöntemleridir [31-33]. Genel olarak çok ölçütlü karar verme yöntemlerinde ilk olarak ölçütler ve seçenekler/alternatifler belirlenir. Daha sonra ölçütler için ağırlık katsayıları araştırmanın amacına göre belirlenir. Seçilecek olan alternatifler bu ölçütlere göre değerlendirilip her bir alternatif için sıralama yapılır. Bu çalışmada çok ölçütlü karar verme yöntemlerinden yaygın olarak kullanılan TOPSIS yöntemi seçilmiştir.

4.2.1. TOPSIS yöntemi

Hwang ve Yoon (1981) tarafından önerilen TOPSIS (Technique for Order Preference by Similarity to an Ideal Solution) yöntemi, pozitif ideal çözüme en yakın ve negatif ideal çözüme en uzak olan alternatifleri seçmeye dayalıdır [31]. Maliyet ölçütünü minimum ve fayda ölçütünü maksimum yapan çözüm pozitif ideal çözümdür. Negatif ideal çözüm ise maliyet ölçütünü maksimum ve fayda ölçütünü minimum yapan çözümdür. TOPSIS yönteminde pozitif ideal çözüme en yakın mesafedeki alternatif ile negatif ideal çözüme en uzak mesafedeki alternatif aynı anda değerlendirilir.

TOPSIS yönteminin uygulanmasında en az iki karar değişkeninin bulunması gerekmektedir. Karar değişkenleri dikkate alınarak alternatiflerin seçilmesinde Öklid, City-Blok ve Manhattan uzaklıkları gibi çeşitli uzaklık yöntemlerinden yararlanılabilir.

Algoritma, n ölçütün ve m alternatifin bulunduğu bir karar matrisi üzerinden uygulanır. Öncelikle karar matrisinde bulunan ölçütlerin ağırlıklandırılması gerekir. Her bir ölçüt farklı birimlere sahip olabileceğinden karar matrisi normalleştirilir. Ağırlıklandırılmış normalize karar matrisi hesaplanır. Fayda ölçütünü en üst düzeye çıkaran ve maliyet ölçütünü en aza indiren pozitif ideal çözüm ile maliyet ölçütünü en üst düzeye çıkaran ve fayda ölçütünü en aza indiren negatif ideal çözüm bulunur. Daha sonra alternatifler dizisi hesaplanan pozitif ve negatif ideal çözüme göre sıralanır.

TOPSIS algoritmasının adımları aşağıdaki gibidir:

Adım 1

$n \times m$ boyutlu karar matrisi oluşturulur

$$D = \begin{bmatrix} d_{11} & d_{12} & \dots & d_{1m} \\ d_{21} & d_{22} & \dots & d_{2m} \\ \cdot & \cdot & & \\ \cdot & \cdot & & \\ d_{n1} & d_{n2} & \dots & d_{nm} \end{bmatrix}.$$

Burada tanımlanan D karar matrisi, alternatiflerin ve değerlendirme ölçütleri belirlendikten sonra oluşturulan $n \times m$ boyutlu bir matristir. D matrisinde alternatiflerin sayısı n , değerlendirme ölçütlerinin sayısı ise m 'dir. D matrisi elemanlarından d_{ij} , i . alternatifin j . ölçütüne göre mevcut performansını gösterir.

Adım 2

Karar matrisi normalleştirilir

$$R = \begin{bmatrix} r_{11} & r_{12} & \dots & r_{1m} \\ r_{21} & r_{22} & \dots & r_{2m} \\ \cdot & \cdot & & \\ \cdot & & & \\ r_{n1} & r_{n2} & \dots & r_{nm} \end{bmatrix}$$

Burada, tanımlanan R standart karar matrisi her bir değerlendirme ölçütüne ait değerlerin karelerinin toplamının karekökü alınarak, ilgili elemanın bu çıkan değere bölünmesiyle (4.5)'teki gibi elde edilir.

$$r_{ij} = \frac{d_{ij}}{\sqrt{\sum_{k=1}^n d_{kj}}} \quad , \quad i = 1, 2, \dots, n \quad , \quad j = 1, 2, \dots, m ; \quad (4.5)$$

$0 \quad , \quad \text{diğer durumlarda.}$

Adım 3

Ağırlıklı standart karar matrisi oluşturulur

$$V = \begin{bmatrix} w_1 r_{11} & w_2 r_{12} & \dots & w_m r_{1m} \\ w_1 r_{21} & w_2 r_{22} & \dots & w_m r_{2m} \\ \cdot & \cdot & & \\ \cdot & & & \\ w_1 r_{n1} & w_2 r_{n2} & \dots & w_m r_{nm} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} v_{11} & v_{12} & \dots & v_{1m} \\ v_{21} & v_{22} & \dots & v_{2m} \\ \cdot & \cdot & & \\ \cdot & & & \\ v_{n1} & v_{n2} & \dots & v_{nm} \end{bmatrix}$$

Değerlendirme ölçütlerine ilişkin ağırlıklar w_i , $i = 1, 2, \dots, m$ olarak belirlenir. w_i değerleri, değerlendirme ölçütlerinin önem derecesine göre araştırmacı tarafından belirlenir. Burada, belirlenen ağırlık değerlerinin toplamının 1 olması gerekir ($\sum_{i=1}^m w_i = 1$).

Adım 4

Ağırlıklı standart karar matrisi V kullanılarak, değerlendirme ölçütünün amacına göre her bir ölçüt için pozitif ve negatif ideal çözüm kümeleri elde edilir. Fayda ölçütü için pozitif ideal çözüm kümesi, V matrisinin sütunlarının en büyük değerlerinden oluşur. Negatif ideal çözüm kümesi ise V matrisinin sütunlarının en küçük değerlerinden oluşur. Maliyet ölçütünde ise bu durumun tam tersidir. Pozitif ve negatif ideal çözüm kümesinin matematiksel gösterimi sırasıyla $V^* = \{v_1^*, v_2^*, \dots, v_m^*\}$ ve $V^- = \{v_1^-, v_2^-, \dots, v_m^-\}$ biçiminde tanımlanır.

Adım 5

Pozitif ve negatif ideal çözümlere olan uzaklık değerleri sırasıyla (4.6) ve (4.7)'deki gibi elde edilir

$$S_i^* = \sqrt{\sum_{j=1}^m (v_{ij} - v_j^*)^2} \quad , \quad i = 1, 2, \dots, n \quad (4.6)$$

$$S_i^- = \sqrt{\sum_{j=1}^m (v_{ij} - v_j^-)^2} \quad , \quad i = 1, 2, \dots, n. \quad (4.7)$$

Burada karar seçeneği sayısı kadar uzaklık değerleri hesaplanır. Her bir karar seçeneğine ilişkin pozitif ve negatif ideal çözüm değerlerinden sapmaları bulabilmek için uzaklık yöntemi olarak genellikle Öklid uzaklık ölçüsü kullanılır.

Adım 6

İdeal çözüme göreli yakınlık katsayıları (4.8)'deki gibi hesaplanır

$$C_i^* = \frac{S_i^-}{S_i^* + S_i^-}, \quad i = 1, 2, \dots, n. \quad (4.8)$$

Pozitif ve negatif ideal çözüme uzaklıkları hesaplanan her bir karar değişkeninin ideal çözüme göreli yakınlık katsayıları, negatif ideal çözüme uzaklığın toplam uzaklık içerisindeki payıdır. Burada, hesaplanan C_i^* değerleri 0 ile 1 arasında değer alır. Buna göre 1'e en yakın değere sahip karar seçenekleri öncelikli olarak tercih edilir.

5. DENEYSEL SONUÇLAR

Değerlendirme ölçülerinin CC algoritması ile elde edilen ikili küme yapılarında uygulanması yapay ve gerçek veri seti üzerinden gösterilmiştir. İkili küme elde etmek ve bu ikili kümenin değerlendirme ölçülerini hesaplamak için R programında f_1 , f_2 , f_3 ve f_4 fonksiyonları oluşturulmuştur. Her bir değerlendirme ölçüsü fonksiyonu içerisinde CC algoritmasının δ ve α parametresi başlangıç kromozomları olarak ele alınmıştır. Böylece her bir değerlendirme ölçüsü CC algoritmasının farklı parametre değerlerine göre hesaplanacaktır.

NSGA-II yönteminde kullanılan parametrelerden sırasıyla girdi boyutu 2 (CC algoritmasının δ ve α parametreleri) ve çıktı boyutu 4 (değerlendirme ölçüsü fonksiyonları) olarak seçilmiştir. Bununla birlikte nesil sayısı literatürde yaygın olarak 100 ile 200 olarak seçilmektedir [15, 25, 28]. Bu çalışmada problemin yapısına göre 200 olması yeterlidir. Nesil sayısının düşük değerde olması çözümlerin global sonuçlara olan uzaklığını artıracak, fazla olması ise hesaplama süresini geciktirecektir. Çözümdeki yeterli çeşitlilik sağlanması ve optimum hesaplanma süresi açısından popülasyon büyüklüğü 20 seçilmiştir.

NSGA-II algoritmasında kullanılan genetik operatörlerden çaprazlama işlemi tek noktalı çaprazlama yöntemi ile gerçekleştirilir. Eğer çaprazlama oranı gerekenden büyük seçilirse popülasyonun hızlı değişmesine sebep olur. Eğer küçük seçilirse yakınsamanın yavaş gerçekleşmesine sebep olur. Bu yüzden çaprazlama oranı genellikle 0.45 ve 0.95 aralığında seçilir. Bir diğer genetik operatörlerden mutasyon oranı ise yüksek belirlendiğinde rastgele aramaya sebep olacağı için %0.1 ve %1 aralığında seçilir [39]. Literatürde yapılan çalışmalarda çaprazlama ve mutasyon operatörleri belirli deneysel çalışmalar sonucunda bu varsayımları sağlayan değerler olarak belirlenmiştir. Örneğin Mitra ve Banka (2006) tarafından yapılan çalışmada çaprazlama ve mutasyon oranları sırasıyla 0.75 ve 0.03 olarak seçilmiştir [38].

Bir başka çalışmada Seridi ve diğerleri (2012) tarafından araştırmanın amacına göre önceden belirlenen çaprazlama ve mutasyon oranları 0.50 ve 0.40 olarak seçilmiştir [15]. Türkşen ve Akgün (2018) tarafından yapılan çalışmada ise genetik algoritmanın parametre değerleri Taguchi deney tasarımı kullanılarak belirlenmiştir [40]. Dale ve diğerleri (2019) tarafından yapılan çalışmada ise genetik operatörler ikili kümeleme algoritmalarından elde edilen ikili kümelerin yapısını etkilemediği için varsayılan değer olarak seçilmiştir [41]. Bu bilgiler doğrultusunda bu çalışmada çaprazlama oranı 0.70 olarak mutasyon oranı ise 0.10 olarak belirlenmiştir.

Girdi parametrelerinden δ için alt sınır ve üst sınır değerleri veri matrisi elemanlarının aldığı değerler aralığında seçilmiştir. Çünkü δ parametresi maksimum kabul edilebilecek MSR değerini gösterir. Buna göre yapay veri matrisi için 1 ve 100 değerleri arasında, gerçek veri matrisi için 1 ve 600 değerleri arasında

seçilmiştir. Bir diğer girdi parametrelerinden α parametresi ölçek faktörü olduğundan ve hesaplama süresini optimal seviyede tutmak için yapay ve gerçek veri matrislerinin her ikisinde de alt sınır ve üst sınır değerleri sırasıyla 1 ve 10 değerleri arasında seçilmiştir. NSGA-II algoritması için kullanılan parametreler *Çizelge 2*'de gösterilmiştir.

Çizelge 2. NSGA-II yönteminde kullanılan parametre değerleri

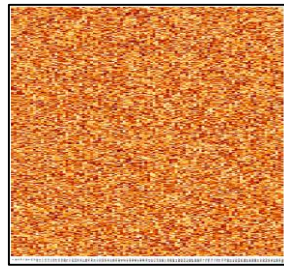
Parametreler	Yapay Veri Seti için Değerler	Gerçek Veri Seti için Değerler
Girdi Boyutu	2 (δ ve α)	2 (δ ve α)
Çıktı Boyutu	4 (VAR, RI, MSA, SS)	4 (VAR, RI, MSA, SS)
Nesil Sayısı	200	200
Popülasyon Büyüklüğü	20	20
Çaprazlama Olasılığı	0.7	0.7
Mutasyon Olasılığı	0.1	0.1
Girdiler için Alt Sınır ve Üst Sınır	$1 < \delta < 10$, $1 < \alpha < 10$	$1 < \delta < 600$, $1 < \alpha < 10$

TOPSIS yönteminde kullanılacak değerlendirme ölçütleri sırasıyla varyans ölçüsü (VAR), uygunluk indeksi (RI), maksimum standart alan (MSA) ve benzerlik skoru (SS)'dur. Bununla birlikte ölçütlerin her biri için ağırlık katsayısı 0.25 olarak alınmıştır. Böylece dört farklı ölçüt için ağırlık katsayıları hem eşit hem de toplamları 1 olacak şekilde ayarlanmıştır. Veri matrisinin büyüklüğüne göre NSGA-II algoritmasının parametreleri değiştirilebilir. Veri matrisinin ve ikili kümenin boyutuna göre 200 nesil tekrarı ve 20 başlangıç popülasyonu en iyi çözüm kümesini elde etmek için yeterli olmuştur.

NSGA-II yöntemi kullanılarak elde edilen alternatif çözümlerin dört farklı ölçüte (değerlendirme ölçüsüne) göre sıralaması TOPSIS yöntemi ile yapılmıştır. Her bir ölçüte eşit ağırlıklandırma yapılmış ve önem dereceleri de eşit olarak seçilmiştir. Böylece çözüm kümesi içerisindeki en iyi δ ve α parametreleri her bir değerlendirme ölçüsünün en iyi değerine göre ve TOPSIS yöntemi ile tüm değerlendirme ölçüleri eşit önem derecesine göre belirlenmiştir.

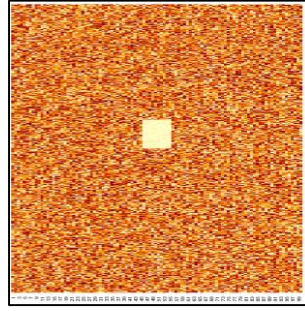
5.1. Yapay Veri

Veri seti 500×100 boyutlu matris şeklinde, 0 ile 100 değerleri arasında tekdüze dağılımdan rastgele üretilmiştir. Veri matrisinin ısı grafiği *Şekil 3*'te gösterilmiştir.



Şekil 3. Veri matrisinin ısı grafiği

Veri matrisi içerisine 50×10 boyutlu referans ikili küme eklenmiştir. Böylece algoritmalarından elde edilen sonuçlarla karşılaştırıldığında referans ikili kümeye yakın sonuçlar vermesi beklenmektedir. İkili küme elemanları ortalaması 50 ve standart sapması 2 olan normal dağılımdan rastgele üretilmiştir. Buradaki amaç ikili küme elemanlarının hem ortalama etrafında olması hem de sabit değerli ikili küme yapısında olmasını sağlamaktır. Ayrıca sabit değerli ikili küme elemanlarındaki hata payı için normal dağılımın standart sapması 2 olarak seçilmiştir. İçerisinde ikili kümenin bulunduğu veri matrisinde satır ve sütun elemanlarının yerleri rastgele değiştirilmiştir. Böylece ikili küme veri matrisi içerisine gizlenmiştir. İçerisinde referans ikili kümenin bulunduğu veri matrisinin ısı grafiği *Şekil 4*'te gösterilmiştir.



Şekil 4. İçerisinde ikili kümenin bulunduğu veri matrisinin ısı grafiği

Değerlendirme ölçülerine göre en anlamlı ve etkili ikili kümeler elde etmek için CC algoritmasının parametre değerlerinin çözüm kümesi elde edilmiştir. NSGA-II algoritması stokastik aramalara dayalı bir sezgisel optimizasyon algoritması olduğu için algoritma her yinelemede farklı sonuçlar verecektir. Elde edilen çözüm kümesinin belirli bir sonuca yakınsadığını göstermek amacıyla NSGA-II algoritmasının sonuçları 100 yinelemede incelenmiştir.

İçerisinde 50×10 boyutlu ikili kümenin bulunduğu veri matrisi kullanarak NSGA-II yönteminde 100 yinelemeli tekrar ile ikili kümeleme algoritmasının ayarlanabilir parametreleri (δ ve α) elde edilmiştir. NSGA-II algoritmasının popülasyon büyüklüğü 20 seçildiği için çözüm kümesinde δ ve α parametreleri için farklı 20 çözüm bulunmuştur. Her bir çözüm için ortalama, standart sapma, minimum ve maksimum değerleri Çizelge 3'de gösterilmiştir.

Çizelge 3. Yapay veri seti için NSGA-II yöntemi ile elde edilen çözüm kümesi

	Delta Parametresi (δ) $n = 100$				Alfa Parametresi (α) $n = 100$			
	Ort.	Std. Sp.	Min.	Max.	Ort.	Std. Sp.	Min.	Max.
Çözüm 1	1.0824	0.0105	1.0142	1.1610	6.7345	0.0115	6.7155	6.7559
Çözüm 2	3.8468	0.0085	3.8298	3.8705	1.0167	0.0044	1.0008	1.0346
Çözüm 3	1.4938	0.0124	1.4582	1.5238	9.4088	0.0098	9.3898	9.4208
Çözüm 4	2.3041	0.0087	2.2935	2.3197	1.5334	0.0117	1.5293	1.5544
Çözüm 5	1.2912	0.0142	1.2661	1.3124	8.2255	0.0177	8.2089	8.2487
Çözüm 6	1.2298	0.0054	1.2115	1.2374	4.7784	0.0180	4.7583	4.7911
Çözüm 7	3.1557	0.0107	3.1299	3.1719	2.9736	0.0055	2.9657	2.9917
Çözüm 8	2.8416	0.0073	2.8358	2.8516	5.8188	0.0087	5.8047	5.8314
Çözüm 9	2.4688	0.0155	2.4519	2.4912	1.2316	0.0115	1.2211	1.2533
Çözüm 10	3.8366	0.0189	3.8217	3.8575	1.0157	0.0136	1.0007	1.0375
Çözüm 11	3.8398	0.0155	3.8244	3.8611	1.0160	0.0075	1.0089	1.0389
Çözüm 12	3.1295	0.0077	3.1041	3.1519	1.0775	0.0105	1.0599	1.0974
Çözüm 13	1.2844	0.0118	1.2654	1.3024	5.7986	0.0068	5.7911	5.8101
Çözüm 14	3.8412	0.0057	3.8249	3.8656	1.0210	0.0179	1.0173	1.0444
Çözüm 15	2.3518	0.0015	2.3395	2.3679	7.6618	0.0063	7.6422	7.6882
Çözüm 16	3.2525	0.0116	3.2318	3.2797	7.5913	0.0083	7.5741	7.6111
Çözüm 17	2.3452	0.0022	2.3318	2.3519	8.8547	0.0045	8.8488	8.8772
Çözüm 18	1.2953	0.0191	1.2757	1.3193	6.7415	0.0167	6.7311	6.7575
Çözüm 19	2.8205	0.0069	2.8045	2.8404	4.7912	0.0177	4.7854	4.8109
Çözüm 20	2.2318	0.0088	2.2122	2.2543	9.3866	0.0023	9.3618	9.3955

Çözüm kümesindeki parametre değerlerine bakıldığında δ parametresinin ortalama değeri yaklaşık olarak 1.08 ile 3.84 değerleri arasında, α parametresinin ortalama değeri yaklaşık olarak 1.01 ile 9.40 değerleri arasındadır. Her iki parametre değeri için 100 yineleme sonucunda elde edilen çözümlerin standart sapma değeri ortalama 0.01'dir. Standart sapma değerinin küçük olması çözümlerin ortalamaya yakınsadığını göstermektedir. Böylece ikili kümeleme algoritmasının ayarlanabilir parametre değerlerinin yineleme sonucundaki ortalaması alınarak ikili kümeler elde edilir ve ikili kümelerin değerlendirme ölçüleri hesaplanabilir. İkili küme değerlendirme ölçülerine göre tek amaçlı ve çok amaçlı olarak CC algoritmasının ayarlanabilir parametre değerleri Çizelge 4'te gösterilmiştir.

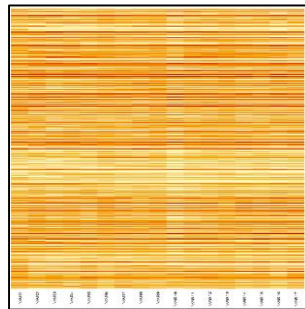
Çizelge 4. Yapay veri seti için farklı değerlendirme ölçülerine göre en iyi parametreler

Amaç Fonksiyonu	min f_1	max f_2	min f_3	max f_4	min $[(f_1), (-f_2), (f_3), (-f_4)]$
VAR	2.1388	2.1814	2.1418	4.1280	2.2966
RI	0.9972	0.9976	0.9973	0.9945	0.9973
MSA	3.4622	3.6204	3.4593	6.5644	3.7675
SS	2.2816	2.4117	2.2782	4.0383	3.1938
δ	1.0824	1.2844	1.2912	3.8412	1.2912
α	6.7345	5.7986	8.2255	1.0210	8.2255
Çözüm	1	13	5	14	5
TOPSIS Sıra	6	4	7	17	1

CC algoritmasının δ ve α parametrelerini belirlemek için oluşturulan deneysel çalışmada sonuçlara bakıldığında, tek amaçlı optimizasyon problemi olarak elde edilen parametre değerleri ve çözüm kümesi içerisindeki sıralama değerleri farklılık göstermektedir. Örneğin VAR ölçüsünü minimum yapan parametreler δ için 1.0824 ve α için 6.7345 iken, RI ölçüsünü maksimum yapan parametreler δ için 1.2844 ve α için 5.7986'dır. Bununla birlikte sadece birinci problem için TOPSIS yöntemi ile uzlaşık tek bir çözüm seçilirse çözüm kümesinde birinci sırada bulunan çözüm, ikinci problem için 13.sırada bulunan çözüm optimaldir. Ancak dört amaç eşit ağırlıklı olacak şekilde dikkate alınırsa δ için 1.2912 ve α için 8.2255 değerleri belirlenir. Çok amaçlı optimizasyon problemine göre çözüm kümesinde 5.sırada bulunan çözüm TOPSIS yöntemi ile belirlenen uzlaşık tek bir çözümdür.

5.2. Gerçek Veri

İkili kümeleme çalışmalarında iyi bilinen gerçek veri setlerinden biri olan "Saccharomyces cerevisiae" ailesinden maya (yeast) verisi kullanılmıştır. Bu veri seti matris şeklinde olup 2884 gen ve 17 koşuldan oluşmaktadır. Veri matrisi elemanları 0 ile 600 arasında değerler almaktadır. Kayıp değerler veri setinden çıkarılmış ve çalışmada 2265×17 boyutlu veri matrisi kullanılmıştır. Veri setine "http://arep.med.harvard.edu/biclustering" adresinden ulaşılabilir. Veri matrisinin ısı grafiği Şekil 5'te gösterilmiştir.



Şekil 5. Maya verisinin ısı grafiği

Maya veri matrisi içerisinde en anlamlı ve etkili ikili kümeler elde etmek için CC algoritmasının parametre değerlerinin çözüm kümesi elde edilmiştir. Yapay veri matrisinde olduğu gibi maya verisinde de NSGA-II algoritması ile 100 yinelemeli tekrar sonucunda ikili kümeleme algoritmasının ayarlanabilir parametreleri (δ ve α) için çözüm kümesi elde edilmiştir. CC algoritmasının ayarlanabilir parametre değerlerinin her biri için ortalama, standart sapma, minimum ve maksimum değerleri hesaplanmış ve Çizelge 5’de gösterilmiştir.

Çizelge 5. Maya veri seti için NSGA-II yöntemi ile elde edilen çözüm kümesi

	Delta Parametresi (δ) $n = 100$				Alfa Parametresi (α) $n = 100$			
	Ort.	Std. Sp.	Min.	Max.	Ort.	Std. Sp.	Min.	Max.
Çözüm 1	8.5169	0.0078	8.5097	8.5214	1.1182	0.0067	1.0972	1.1258
Çözüm 2	1.1347	0.0103	1.1197	1.1498	1.7720	0.0082	1.7654	1.7915
Çözüm 3	2.0916	0.0012	2.0877	2.0983	1.7792	0.0092	1.7629	1.7922
Çözüm 4	2.9914	0.0069	2.9866	3.0144	1.1425	0.0751	1.1255	1.1599
Çözüm 5	2.8942	0.0088	2.8843	2.9116	1.0667	0.0105	1.0581	1.0706
Çözüm 6	3.8723	0.0144	3.8679	3.8868	1.0961	0.0078	1.0875	1.1131
Çözüm 7	1.0597	0.0154	1.0458	1.0716	1.0993	0.0658	1.0897	1.1103
Çözüm 8	8.5046	0.0097	8.4948	8.5113	1.3451	0.0092	1.3369	1.3588
Çözüm 9	10.0977	0.0099	10.0864	10.1048	1.1127	0.0126	1.0987	1.1213
Çözüm 10	10.8345	0.0035	10.8247	10.8431	1.0993	0.0625	1.0866	1.1089
Çözüm 11	43.9225	0.0106	43.9141	43.9377	1.1193	0.0038	1.1092	1.1263
Çözüm 12	18.0156	0.0083	18.0087	18.0248	1.1062	0.0097	1.0973	1.1122
Çözüm 13	13.6945	0.0044	13.6847	13.7044	1.0978	0.0105	1.0836	1.1010
Çözüm 14	35.9566	0.0079	35.9497	35.9711	1.1042	0.0094	1.0949	1.1176
Çözüm 15	32.0863	0.0169	32.0770	32.0955	1.0594	0.0074	1.0491	1.0719
Çözüm 16	32.0788	0.0029	32.0657	32.0874	1.0628	0.0316	1.0545	1.0770
Çözüm 17	13.7264	0.0021	13.7145	13.7374	1.1148	0.0110	1.0981	1.1237
Çözüm 18	9.2146	0.0196	9.2064	9.2248	1.0598	0.0068	1.0455	1.0711
Çözüm 19	18.0158	0.0067	18.0086	18.0251	1.1022	0.0239	1.0903	1.1126
Çözüm 20	4.3059	0.0499	4.2949	4.3136	1.1293	0.0072	1.1187	1.1491

NSGA-II yöntemi ile elde edilen çözüm kümesinde CC algoritmasının ayarlanabilir parametreleri δ için yaklaşık 1.06 ile 43.92 değerleri arasında, α için yaklaşık 1.05 ile 1.78 değerleri arasında bulunmuştur. δ ve α parametreleri için 100 yineleme sonucunda elde edilen çözümlerin standart sapma değeri ortalaması yaklaşık 0.01’dir. Böylece sapmanın çok küçük değerde olmasıyla yineleme ile elde edilen çözümler için ortalama değer kullanılabilir. CC algoritmasının parametre değerlerinin ortalaması kullanılarak ikili kümeler elde edilir. Elde edilen ikili kümelerin değerlendirme ölçüleri Çizelge 6’deki gibi hesaplanmıştır.

Çizelge 6. Maya verisi için farklı değerlendirme ölçülerine göre en iyi parametreler

Amaç Fonksiyonu	$\min f_1$	$\max f_2$	$\min f_3$	$\max f_4$	$\min [(f_1), (-f_2), (f_3), (-f_4)]$
VAR	1149.1577	1153.7813	1166.1734	3284.9496	3166.1216
RI	0.8249	0.8395	0.8211	0.7594	0.7861
MSA	54.4699	55.8978	52.1779	96.4496	93.1271
SS	0.0349	0.0288	0.0468	2.1442	3.6544
δ	1.1347	1.0597	2.0916	8.5046	9.2146
α	1.7720	1.0993	1.7792	1.3451	1.0598
Çözüm	2	7	3	8	18
TOPSIS Sıra	7	9	8	3	1

VAR, RI, MSA ve SS ölçütlerine göre δ ve α parametreleri incelendiğinde, tek amaçlı optimizasyon problemlerinin her biri için ayrı ayrı değerler elde edilmiştir. Sadece VAR ölçütü minimize edildiğinde, yani f_1 fonksiyonu optimalliğe ulaştığında δ için 1.1347 ve α için 1.7720 değeri elde edilir. Sadece RI ölçütü maksimize edildiğinde, yani f_2 fonksiyonu optimalliğe ulaştığında δ için 1.0597 ve α için 1.0993 değeri elde edilir. Sadece MSA ölçütü minimize edildiğinde, yani f_3 fonksiyonu optimalliğe ulaştığında δ için 2.0916 ve α için 1.7792 değeri elde edilir. Sadece SS ölçütü maksimize edildiğinde, yani f_4 fonksiyonu optimalliğe ulaştığında δ için 8.5046 ve α için 1.3451 değeri elde edilir. Çok amaçlı optimizasyon problemi olarak değerlendirildiğinde ise VAR, RI, MSA ve SS ölçütleri eşit önem derecesine sahip olduğunda δ için 9.2146 ve α için 1.0598 değeri elde edilir. TOPSIS yöntemine göre çözüm kümesi içerisinde 18.sırada bulunan çözüm, belirlenen uzlaşık tek bir çözümdür.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Gen açıklama verilerinde benzer gen yapılarının belirli koşullara göre kümelenmesi son yıllarda önem kazanmıştır. Bu yapıları belirlemek için geleneksel kümeleme yöntemleri yerine ikili kümeleme yöntemi kullanılır.

Bu çalışmada literatürde yaygın olarak kullanılan CC algoritması dikkate alınmıştır. İkili kümeler elde etmek için CC algoritmasının δ ve α parametreleri belirlenmesi gerekir. Parametre değerleri değiştikçe veri matrisinden farklı ikili kümeler elde edilmektedir. Elde edilen farklı ikili kümelerden anlamlı ve etkili olanları belirlemek için kullanılan birçok değerlendirme ölçüsü bulunmaktadır. Birden fazla değerlendirme ölçüsüne dikkate alınarak anlamlı ve etkili ikili kümeler belirlemek çok amaçlı optimizasyon problemini ortaya çıkarır. Böylece δ ve α parametrelerinin belirlenmesi için çok amaçlı sezgisel yöntemlerden biri olan NSGA-II algoritması kullanılmıştır.

CC algoritmasının NSGA-II yöntemiyle elde edilen parametre değerlerine göre bulunan ikili kümelerin değerlendirilmesi varyans ölçüsü (VAR), uygunluk indeksi (RI), maksimum standart alan (MSA) ve benzerlik skoru (SS) ölçüleri ile yapılmıştır. Bu değerlendirme ölçüleri çözüm kümesi içerisinde ölçütler olarak belirlenmiş ve TOPSIS yöntemi uygulanarak çözümlerin ölçütlere göre sıralaması yapılmıştır. NSGA-II yöntemi kullanılarak bulunan çözüm kümesi içerisinde TOPSIS yöntemiyle sıralama yapılmış ve yapay veri matrisinde referans ikili kümeye benzer en iyi ikili küme bulunmuştur. Bununla birlikte literatürde yaygın bir şekilde kullanılan gen verilerinden maya verisi için en iyi ikili kümelerin belirlenmesinde parametre değerleri elde edilmiştir. Böylece en etkili ve anlamlı ikili kümelerin elde edilmesinde CC algoritmasının hangi parametre değerlerinin alacağı belirlenmiştir.

İkili küme algoritmasını uygulamak için 0 ile 100 değerleri arasında tekdüze dağılımdan rastgele üretilen 500×100 boyutlu yapay veri matrisi ve 2265×17 boyutlu maya verisi kullanılmıştır. Yapay veri matrisi içerisinde 50×10 boyutlu referans ikili küme bulunmaktadır. CC algoritmasının δ ve α parametreleri için başlangıç çözüm kümesi yapay veri matrisi için 1 ile 10 değerleri arasında rastgele üretilen 20 sayıdan oluşmaktadır. Maya verisi için parametresi 1 ile 600 arasında, parametresi ise 1 ile 10 değerleri arasında rastgele üretilen 20 sayıdan oluşmaktadır. Her bir parametre değeri için VAR, RI, MSA ve SS ölçüleri amaç fonksiyonu olarak belirlenmiştir. Amaç fonksiyonlarının minimizasyon problemi olması için RI ve SS ölçüsü fonksiyonlarına dönüşüm uygulanmıştır. NSGA-II yönteminde çözüm kümesinin 100 yinelemeli tekrarlar sonuçları incelenmiştir. Bununla birlikte çözüm kümesi sonuçlarının ortalaması, standart sapması, minimum ve maksimum değerleri elde edilmiştir. Bu sonuçlara göre optimal amaç fonksiyonu değerlerinden elde edilen CC algoritmasının ayarlanabilir parametre değerleri bulunmuştur. Bulunan parametre değerlerine göre elde edilen ikili kümelerin değerlendirilmesi tek amaçlı ve çok amaçlı optimizasyon yöntemi ile yapılmıştır. Tek amaçlı optimizasyon problemindeki dezavantaj, hangi ölçüte göre optimal yapılmasına karar vermektir. Çünkü her bir değerlendirme ölçütüne göre farklı sonuçlar ortaya çıkmaktadır. Bu dezavantajı ortadan kaldırmak için çok amaçlı optimizasyon problemi olarak dört farklı ölçüt eşit ağırlıklandırılarak optimal çözüm elde edilmiştir.

Bu çalışmada sadece CC algoritması ve ikili küme türlerinden sabit ikili küme yapısı ele alınmıştır. İkili kümenin değerleri sabitlerden oluşabileceği gibi satırlar veya sütunlar bazında toplamsal veya çarpımsal artışların bulunduğu değerler de olabilir. Ayrıca hem toplamsal hem de çarpımsal değerlerden oluşan ikili küme yapıları da mümkündür. Bundan sonraki çalışmalarda diğer algoritmalar ve farklı yapıdaki ikili küme türlerinin bulunduğu deneysel çalışma, ikili kümeler için kullanılacak farklı değerlendirme ölçüleri veya farklı gerçek veri matrisleri kullanılarak ikili kümeleme algoritmalarının parametre değerleri çok amaçlı sezgisel yöntemler kullanılarak belirlenebilir.

ÇIKAR ÇATIŞMASI/ÇAKIŞMASI BİLDİRİMİ

Yazarlar arasında çıkar çatışması/çakışması bulunmamaktadır.

KAYNAKLAR

- [1] Mirkin, B. (1998). Mathematical classification and clustering: From how to what and why. *Classification, Data analysis, and Data Highways*, 172-181.
- [2] Wang, B., Miao, Y., Zhao, H., Jin, J., & Chen, Y. (2016). A biclustering-based method for market segmentation using customer pain points. *Engineering Applications of Artificial Intelligence*, 47, 101-109.
- [3] Dhillon, I. S. (2001). Co-clustering documents and words using bipartite spectral graph partitioning. *In Proceedings of the seventh ACM SIGKDD international conference on Knowledge discovery and data mining*, 269-274.
- [4] Busygin, S., Prokopyev, O., & Pardalos, P. M. (2008). Biclustering in data mining. *Computers & Operations Research*, 35(9), 2964-2987.
- [5] Cheng, Y., & Church, G. M. (2000). Biclustering of expression data. "International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology" kongresinde sunulan bildiri, UC San Diego, California, USA.
- [6] Lazzeroni, L., & Owen, A. (2002). Plaid models for gene expression data. *Statistica Sinica*, 61-86.
- [7] Bergmann, S., Ihmels, J., & Barkai, N. (2003). Iterative signature algorithm for the analysis of large-scale gene expression data. *Physical Review E*, 67(3), 031902.
- [8] Ben-Dor, A., Chor, B., Karp, R., & Yakhini, Z. (2003). Discovering local structure in gene expression data: the order-preserving submatrix problem. *Journal of Computational Biology*, 10(3-4), 373-384.
- [9] Prelic, A., Bleuler, S., Zimmermann, P., Wille, A., Bühlmann, P., Gruissem, W., Zitzler, E. (2006). A systematic comparison and evaluation of biclustering methods for gene expression data. *Bioinformatics*, 22(9), 1122-1129.
- [10] Li, G., Ma, Q., Tang, H., Paterson, A. H., & Xu, Y. (2009). QUBIC: a qualitative biclustering algorithm for analyses of gene expression data. *Nucleic Acids Research*, 37(15), 101.
- [11] Hochreiter, S., Bodenhofer, U., Heusel, M., Mayr, A., Mitterecker, A., Kasim, A., Talloen, W. (2010). FABIA: factor analysis for bicluster acquisition. *Bioinformatics*, 26(12), 1520-1527.
- [12] Chekouo, T., & Murua, A. (2015). The penalized biclustering model and related algorithms. *Journal of Applied Statistics*, 42(6), 1255-1277.
- [13] Biswal, B. S., Mohapatra, A., & Vipsita, S. (2019). Ensemble Neighborhood Search (ENS) for biclustering of gene expression microarray data and single cell RNA sequencing data. *Journal of King Saud University-Computer and Information Sciences*, 5(2), 105-112.
- [14] Chowdhury, H. A., Ahmed, H. A., Bhattacharyya, D. K., & Kalita, J. K. (2020). NCBI: A Novel Correlation Based Imputing Technique Using Biclustering. *Computational Intelligence in Pattern Recognition*, 1, 509-519.
- [15] Seridi, K., Jourdan, L., & Talbi, E.-G. (2012). Hybrid metaheuristic for multi-objective biclustering in microarray data. "2012 IEEE Symposium on Computational Intelligence in Bioinformatics and Computational Biology (CIBCB)" kongresinde sunulan bildiri, San Diego, California, USA.
- [16] Al-Akwaa, F. M., Ali, M. H., & Kadah, Y. M. (2009). Bicat_plus: An automatic comparative tool for bi/clustering of gene expression data obtained using microarrays. "2009 National Radio Science Conference" kongresinde sunulan bildiri.
- [17] Chia, B. K. H., & Karuturi, R. K. M. (2010). Differential co-expression framework to quantify goodness of biclusters and compare biclustering algorithms. *Algorithms for Molecular Biology*, 5(1), 23.

- [18] Karim, M. B., Kanaya, S., & Altaf-UI-Amin, M. (2019). Implementation of BiClusO and its comparison with other biclustering algorithms. *Applied Network Science*, 4(1), 1-15.
- [19] Liu, X., & Wang, L. (2006). Computing the maximum similarity bi-clusters of gene expression data. *Bioinformatics*, 23(1), 50-56.
- [20] Padilha, V. A., & Campello, R. J. (2017). A systematic comparative evaluation of biclustering techniques. *BioMed Central Bioinformatics*, 18(1), 55.
- [21] Seridi, K., Jourdan, L., & Talbi, E.-G. (2015). Using multiobjective optimization for biclustering microarray data. *Applied Soft Computing*, 33, 239-249.
- [22] Goldberg, D. E., & Holland, J. H. (1988). Genetic algorithms and machine learning. *Machine Learning*, 3(2), 95-99.
- [23] Kirkpatrick, S., Gelatt, C. D., & Vecchi, M. P. (1983). Optimization by simulated annealing. *Science*, 220(4598), 671-680.
- [24] Alikar, N., Mousavi, S. M., Ghazilla, R. A. R., Tavana, M., & Olugu, E. U. (2017). Application of the NSGA-II algorithm to a multi-period inventory-redundancy allocation problem in a series-parallel system. *Reliability Engineering & System Safety*, 160, 1-10.
- [25] Vo-Duy, T., Duong-Gia, D., Ho-Huu, V., Vu-Do, H., & Nguyen-Thoi, T. (2017). Multi-objective optimization of laminated composite beam structures using NSGA-II algorithm. *Composite Structures*, 168, 498-509.
- [26] Wang, B., Liang, Y., Zheng, T., Yuan, M., & Zhang, H. (2018). Multi-objective site selection optimization of the gas-gathering station using NSGA-II. *Process Safety and Environmental Protection*, 119, 350-359.
- [27] Wang, S., Ma, S., & Duan, W. (2018). Seakeeping optimization of trimaran outrigger layout based on NSGA-II. *Applied Ocean Research*, 78, 110-122.
- [28] Yang, Y., Cao, L., Wang, C., Zhou, Q., & Jiang, P. (2018). Multi-objective process parameters optimization of hot-wire laser welding using ensemble of metamodels and NSGA-II. *Robotics and Computer-Integrated Manufacturing*, 53, 141-152.
- [29] Deb, K., Pratap, A., Agarwal, S., & Meyarivan, T. (2002). A fast and elitist multiobjective genetic algorithm: NSGA-II. *IEEE Transactions on Evolutionary Computation*, 6(2), 182-197.
- [30] Türkşen, Ö. (2011). *Çok Yanıtlı Yüzey Problemlerinin Çözümüne Bulanık ve Sezgisel Yaklaşım*. Doktora Tezi. Ankara Üniversitesi Fen bilimleri Enstitüsü. Ankara. 126.
- [31] Hwang, C., & Yoon, K. (1981). *Multiple decision attribute making: Methods and applications*. New York: Springer-Verlag, 58-191.
- [32] Pamucar D. & Cirovic G. (2015). The selection of transport and handling resources in logistics centers using multi-attributive border approximation area comparison (mabac). *Expert Systems with Applications*, 42(6), 3016-3028.
- [33] Liu P., Li H., Wang P., & Liu J. (2016). Electre method and its application in multiple attribute decision making based on ins. *Journal of Shandong University of Finance and Economics*, 28(2), 80-87.
- [34] Pontes, B., Girdlez, R., & Aguilar-Ruiz, J. S. (2015). Quality measures for gene expression biclusters. *Plos One*, 10(3), 0115497.
- [35] Yip, K. Y., Cheung, D. W., & Ng, M. K. (2004). Harp: A practical projected clustering algorithm. *IEEE Transactions on Knowledge and Data Engineering*, 16(11), 1387-1397.
- [36] Lashkargir, M., Monadjemi, S. A., & Dastjerdi, A. B. (2009). A new biclustering method for gene expression data based on adaptive multi-objective particle swarm optimization. *In 2009 Second International Conference on Computer and Electrical Engineering*, 1, 559-563.
- [37] Liu, J., Li, Z., Hu, X., & Chen, Y. (2009, April). Biclustering of microarray data with MOSPO based on crowding distance. *In BMC bioinformatics*, 10(4), 1-10.
- [38] Mitra, S., & Banka, H. (2006). Multi-objective evolutionary biclustering of gene expression data. *Pattern Recognition*, 39(12), 2464-2477.
- [39] Talbi, E.-G. (2009). *Metaheuristics: from design to implementation* (74). New Jersey: John Wiley & Sons, 34-48.
- [40] Türkşen, Ö., & Akgün, F. (2018). Genetik-Simpleks hibrit algoritması ile doğrusal olmayan regresyon model parametrelerinin nokta tahmini. *İstatistikçiler Dergisi: İstatistik ve Aktüerya*, 11(2), 81-92.
- [41] Dale, J., Zhao, J., & Obafemi-Ajayi, T. (2019). Multi-objective optimization approach to find biclusters in gene expression data. *In 2019 IEEE Conference on Computational Intelligence in Bioinformatics and Computational Biology (CIBCB)*, 1-8.

Lactobacillus Cinsi Bakteriler Tarafından Üretilen Biyosürfektanların Anti-Biyofilm ve Anti-Mikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi

Feride Efe¹, Zehranur Yüksekdağ^{*2}, Berat Çınar Acar²¹Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji ABD, 06500, Ankara, Türkiye²Gazi Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 06500, Ankara, Türkiye

Öne Çıkanlar

- *S. aureus* bakterilerinin oluşturdukları biyofilmler hem endüstride önemli ekonomik kayıplara hem de insan ve hayvanlar için sağlık problemlerine yol açmaktadır.
- Biyofilm oluşumunun engellenmesinde probiyotik bakterilerden elde edilen biyosürfektanların uygulanması etkili ve önemli bir yöntemdir.
- Biyosürfektan molekülleri, biyolojik bozunabilirlik ve daha az toksisite içermesi nedeniyle sentetik süर्फektanlara kıyasla birçok uygulama alanı için daha avantajlıdır.

Makale Bilgileri

Geliş: 03/06/2022

Kabul: 04/08/2022

Anahtar Kelimeler

Lactobacillus sp.,
Biyosürfektan,
Anti-biyofilm,
Anti-mikrobiyal

Öz

Bu çalışmada, 20 *Lactobacillus sp.* tarafından üretilen biyosürfektanlar ile *Staphylococcus aureus* suşlarının biyofilm oluşumunun engellenmesi ve/veya azaltılması ve antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Öncelikle 52 *S. aureus* suşlarının Kongo Kırmızısı katı besi yerinde biyofilm yapma yetenekleri nitel olarak belirlenmiştir. Bakterilerin Kongo Kırmızısı katı besi yerinde siyah renkte koloniler oluşturması biyofilm pozitif, pembemsi renkte koloniler oluşturması ise biyofilm negatif olarak değerlendirilmiştir. 52 *S. aureus* suş arasından sadece yedisinin (26, 36, 38, 43, 55, 56, 60) çok kuvvetli (+++) biyofilm oluşturma yeteneğine sahip olduğu belirlenmiş ve çalışmada bu bakteriler kullanılmıştır. 20 *Lactobacillus sp.* suş arasından sekizinin (*Lactobacillus acidophilus* BAZ 22, *L. acidophilus* BAZ 51, *L. acidophilus* BAZ 61, *L. brevis* YG 7, *L. rhamnosus* MP 1, *L. rhamnosus* BAZ 78, *Limosilactobacillus fermentum* FKK 3 ve *L. fermentum* LB 16) ürettiği biyosürfektan yedi *S. aureus* suşun oluşturduğu biyofilmi %0,90-%80,60 arasında değişen oranlarda engellemiştir. En fazla engelleyici etki %80,60 oranı ile *S. aureus* 26 suşuna karşı *L. rhamnosus* MP1 suşunun ürettiği biyosürfektanda gözlemlenmiştir. Ancak yapılan çalışmada, laktobasiller tarafından üretilen biyosürfektanların *S. aureus* lara karşı anti-mikrobiyal aktivite göstermediği belirlenmiştir.

Determination of Anti-Biofilm and Anti-Microbial Activities of Biosurfactants Produced by *Lactobacillus* Genus Bacteria

Highlights

- Biofilms formed by *S. aureus* bacteria cause both significant economic losses in the industry and health problems for humans and animals.
- The application of biosurfactants obtained from probiotic bacteria is an effective and important method in preventing biofilm formation.
- Due to biosurfactant molecules, biodegradability and less toxicity it is more advantageous for many application areas compared to synthetic surfactants.

Article Info

Received: 03/06/2022

Accepted: 04/08/2022

Keywords

Lactobacillus sp.,
Biosurfactant,
Anti-biofilm,
Anti-microbial

Abstract

In this research, it was aimed to prevent and/or reduce biofilm formation and to determine antimicrobial activities of *Staphylococcus aureus* strains with biosurfactants produced by 20 *Lactobacillus sp.* First, the biofilm forming abilities of 52 *S. aureus* strains in Congo Red solid media were qualitatively determined. The formation of black colonies on Congo Red solid medium was evaluated as biofilm positive, and the formation of pinkish colonies as biofilm negative. Among the 52 *S. aureus* strains, only seven (26, 36, 38, 43, 55, 56, 60) were determined to have a very strong (+++) biofilm forming ability, and these bacteria were used in the studies. The biosurfactant produced by eight of the strains (*Lactobacillus acidophilus* BAZ 22, *L. acidophilus* BAZ 51, *L. acidophilus* BAZ 61, *L. brevis* YG 7, *L. rhamnosus* MP 1, *L. rhamnosus* BAZ 78, *Limosilactobacillus fermentum* FKK 3 ve *L. fermentum* LB 16), among the 20 *Lactobacillus sp.*, prevented the biofilm formed by seven *S. aureus* strains at rates ranging from 0.90% to 80.60%. The highest inhibitory effect was observed in the biosurfactant produced by *L. rhamnosus* MP 1 strain against *S. aureus* 26 strain with a rate of 80.60%. But, in the study, it was designated that biosurfactants produced by lactobacilli did not show anti-microbial activity against *S. aureus*.



Makale, Creative Commons 4.0 (CC BY NC SA) uluslararası lisansı altında açık erişim olarak yayımlanmaktadır.

* Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Zehranur Yüksekdağ, zehranur@gazi.edu.tr

1. GİRİŞ

Biyofilm, canlı veya cansız bir yüzeye yapışarak kendi ürettikleri organik bir ekzopolisakkarit (EPS) matriks içine gömülü ve hareketsiz olarak birbirine, bir katı yüzeye veya bir ara yüzeye geri dönüşümsüz olarak tutunmuş hâlde yaşayan mikroorganizmaların oluşturduğu topluluktur [1, 2]. Bakteriler, hayatta kalma mekanizmalarının bir parçası olarak biyofilm oluştururlar [3]. Bakterilerin zorlu ortamlarda yaşaması ve uygun koşullarda üremesi için oluşturulmuş olan bu yapı hücre dışı polimerik maddeler (EPS) ile sarılmaktadır [4]. EPS, hidrofobik etkileşimler ve iyon köprüleme etkileşimleri yoluyla hem bakterilerin kohezyonuna hem de biyofilmlerin yüzeylere yapışmasına aracılık etmektedir [5]. Bakteriler tarafından üretilen EPS, antibiyotiklerin penetrasyonuna karşı fiziksel ve kimyasal bir bariyer görevi görmektedir [6]. Bakteriyel biyofilm, bakteri ve EPS'nin basit bir kombinasyonu değil, kimyasal ve fiziksel karmaşıklığa sahip oldukça heterojen ve dinamik bir ekosistemdir [7]. Biyofilm içerisinde bulunan bakterilerin antibiyotiklere, planktonik formlarına göre 100-10000 kat daha dirençli oldukları bilinmektedir [8]. Anti-mikrobiyal ajanlara herhangi bir direnci bulunmayan bir mikroorganizma biyofilm oluşturunca dirençli hale, biyofilmden ayrıldığında ise yine duyarlı hale dönüşebilmektedir [9].

Bakteriyel adezyon ve biyofilm oluşumu, doğal ve endüstriyel ortamlarda yaygındır ve birçok durumda zararlı etki oluşturmaktadır. Gıda endüstrilerinde, patojenik bakteriler, işleme tesislerinin içinde biyofilm oluşturarak gıda bozulmasına yol açabilir ve tüketicinin sağlığını tehlikeye atabilir [10]. Hastane ortamlarında, biyofilmlerin tıbbi cihaz yüzeylerinde ve hastanın dokularında kalıcı enfeksiyonlara neden olabilmektedir [2, 11]. Kronik enfeksiyonlara, tıbbi implant enfeksiyonlarına ve tekrarlayan enfeksiyonlara neden olabilen özellikle intravasküler kateterler, idrar sondaları ve ortopedik implant gibi implante tıbbi cihaz gibi çeşitli yüzeylerde kolaylıkla görülebilmektedir [12]. Bakteri hücreleri tıbbi bir malzemenin yüzeyine yapışır, çoğalır ve implante olmuş yüzeyde biyofilm oluşturarak kolonize olur ve bunun sonucunda biyomalzeme ile ilişkili enfeksiyonlar ortaya çıkar [13]. Su ile temas eden tüm yüzeylerde biyofilm tabakasına rastlanılabilir. Ancak steril olma gereksinimi yüksek olan gıda ve petrol endüstrisi için büyük sorun teşkil etmektedir [14, 15].

Biyofilmlerin olumsuz etkilerinin yanısıra faydalı etkileri de bulunmaktadır. Bitki üretimini arttırmak amacıyla fitopatojenlere ve biyogübrelere karşı biyolojik ajan olarak kullanılması [16], korozyonun önlenmesi [17], deniz ekosisteminin korunması [18], tehlikeli kirleticilerin biyolojik olarak iyileştirilmesi [19, 20] gibi yararlı etkileri de yer almaktadır.

Bakteriler, UV radyasyonu, kuruma, sınırlı besinler, aşırı pH ve sıcaklık, yüksek tuz konsantrasyonları, yüksek basınç ve antimikrobiyal ajanlar gibi çevresel streslere tepki olarak biyofilmler oluşturmaktadır. Biyofilm oluşumu, bakterilerin bir yüzeye tersinir şekilde bağlanmasıyla başlamaktadır. Bunu da genellikle bakterilerin yapışkan yapılarının ve kısa mesafeli etkileşimlerin yardımıyla geri dönüşü olmayan bağlanma izlemektedir [2, 10]. Biyofilm oluşumunun kontrolü ve/veya engellenmesi konusu üzerine çeşitli çalışmalar yapılmaktadır. Bunlardan biri de mikroorganizmalar tarafından üretilen çeşitli biyosümfektan moleküllerinin biyofilm oluşumunda ve inhibisyonundaki genel rolü üzerine olan çalışmalardır [21-24].

Biyosümfektanlar çeşitli mikroorganizmalar tarafından üretilen belirgin yüzey ve emülsifikasyon aktivitelerine sahip, misel agregatları oluşturabilen, amfifilik, sekonder metabolitlerdir [25, 26, 27]. Bu moleküller, farklı yüzeyleri bir araya getiren özellik göstermekte ve yüzey gerilimini düşürmektedirler [28]. Düşük moleküler ağırlıklı biyosümfektanlar, hava-su ara yüzlerinde yüzey gerilimini ve yağ-su ara yüzlerinde ara yüzey gerilimini azaltırken, yüksek moleküler ağırlıklı biyosümfektan biyoemülgatörler adı verilen su içinde yağ emülsiyonlarının stabilize edilmesinde daha etkili rol oynamaktadır [29]. Üretici mikroorganizmanın fizyolojik fonksiyonlarına göre farklı özelliklere sahip biyosümfektanlar bulunmaktadır. Bunlar; mikroorganizmaların çoğalması esnasında hidrofobik bileşiklerin parçalanmasını sağlama, ağır metalleri parçalama, yüzey gerilimi azaltma, emülsiyon oluşturma, patojen mikroorganizmaların yüzeylere tutunmasını engelleme gibi farklı özelliklere sahip biyosümfektanlardır [30, 31]

Biyosürefektanlar amfifilik yapıları sayesinde mikroorganizmaların hidrofobik yüzeylerine kolaylıkla tutunabilmektedirler [32]. Ayrıca enfeksiyonlu bölgelerde veya katı yüzeylerde patojenik mikroorganizmaların koloni oluşturarak yüzeye tutunmasını engelleyebilmektedirler [25]. Biyosürefektanlar, yüksek biyobozunurluk, düşük toksisite ve çevre dostu gibi özelliklerinden dolayı endüstriyel olarak farklı alanlarda kullanılabilirler [33]. Biyoremediasyon, yağların geri kazanımı ve endüstriyel emülsifikasyonu arttırmak için kullanılmalarının yanı sıra antibakteriyel, antifungal, antiviral, anti-HIV, anti-inflamatuar immün modülatör aktiviteleri nedeniyle de birçok hastalıkla mücadelede de tedavi edici ajanlar olarak da kullanılabilirler [25, 34]. Tarımsal bağlamda yem sindirilebilirliğini arttırmak, tohumu koruma ve verimliliğini arttırmak, bitki patojen kontrolü, antimikrobiyal aktivite, antibiyofilm aktivitesi, yara iyileşmesi ve dermatolojik bakım ve antikanser tedavileri gibi çeşitli uygulamalarda da yer almaktadırlar [35]. Bilinen anti-mikrobiyal aktiviteye sahip biyosürefektanlar içinde *Bacillus subtilis* suşları tarafından üretilen surfaktin, iturin, fengisin, basillomisin, mikosubtilin [25, 36], *Candida antarctica* tarafından üretilen mannosileritroritol yağları [37], *Pseudomonas aeruginosa* tarafından üretilen ramnolipitler [38] ve *Streptococcus thermophilus* A and *Lactococcus lactis* 53 suşlarından izole edilen biyosürefektanların olduğu bildirilmiştir [39, 40].

Bu çalışma kapsamında; 20 laktobasil suşu tarafından üretilen biyosürefektanların 7 *S. aureus* suşlarına karşı anti-biyofilm ve anti-mikrobiyal özelliklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Araştırmada Kullanılan Bakteriler

Bu çalışmada, Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoteknoloji Laboratuvarı kültür koleksiyonunda bulunan 52 *Staphylococcus aureus* suşu (biyofilm oluşumu için) ve 20 *Lactobacillus* cinsine ait suşlar (biyosürefektan üretimi için) kullanılmıştır.

2.2. Biyofilm Oluşturma Özelliğinin Belirlenmesi

52 *S. aureus* suşun biyofilm oluşturma özellikleri Kongo Kırmızısı katı besiyeri yöntemi ile belirlenmiştir [41, 42]. Bakteriler Nutrient sıvı besi yerinde 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Geliştirilen bakteriler Kongo Kırmızısı Katı besi yerine (50 g/L sakkaroz, 37 g/L Brain Heart Infusion Agar ve 0,8 g/L Kongo kırmızısı) tek koloni ekimi yapılarak aynı koşullarda yeniden inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda petrielerde gelişme gösteren kolonilerinin renkleri incelenmiş ve sonuçlar görsel olarak değerlendirilmiştir. Siyah ve bordo renkte gözlenen koloniler için biyofilm pozitif, kırmızı, pembe ve beyaz renkte gözlenen koloniler için ise biyofilm negatif olarak değerlendirilmiştir. Biyofilm pozitif kabul edilen bakterilerin koloni rengi siyah ise “çok kuvvetli (+++)”, bordo-siyah ise “kuvvetli (++)”, bordo ise “orta (+)” biyofilm olarak kabul edilmiştir. Tüm bakteriler hem 24 saat sonunda (ön değerlendirme) hem de 48 saat sonunda (asıl sonuç) değerlendirilmiştir. Tüm bakteriler 2 tekrarlı ve 2 paralel olarak çalışılmıştır.

2.3. Biyosürefektan Eldesi

Laktobasiller tarafından üretilen biyosürefektanın elde edilmesinde Rodrigues ve arkadaşlarının [40] metodu kullanılmıştır. Bakteriler glukoz yerine aynı oranda laktoz içeren MRS besiyerinde 37°C'de 72 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda örnekler 10.000 devirde, 10°C'de, 5 dakika santrifüj edilmiştir. Kültürler 2 kez PBS (fosfat tamponlu tuz, 0,01 mol/L KH₂PO₄/K₂HPO₄ ve 0,15 mol/L NaCl, pH 7,0) tamponuyla yıkanarak yeniden süspansiyon edilmiştir. Biyosürefektanın serbest kalması için, süspansiyon hafifçe çalkalanmış ve oda sıcaklığında 2 saat bekletilmiştir. Daha sonra, bakteri hücrelerinin uzaklaştırılması için yeniden santrifüj işlemi uygulanmış ve süpernatant 0,22 mikrometre filtreden (Sigma-Aldrich) süzülerek diyaliz membranı (moleküler ağırlığı 6000-8000 Dalton) ile diyaliz edilmiştir.

2.4. Anti-Biyofilm Etki

20 *Lactobacillus* sp. suşları tarafından üretilen biyosürefektanların, çok kuvvetli (+++) biyofilm oluşturan 7 *S. aureus* (26, 36, 38, 43, 55, 56, 60) suşun ürettiği biyofilmi engelleme yüzdeleri Heinemann ve ark. [43] ve Stepanovic ve ark. [44] metotları modifiye edilerek belirlenmiştir. Laktobasiller tarafından üretilen biyosürefektanlar 96 kuyucuklu mikropklara 200 µL eklenmiş ve +4°C'de 18 saat bekletilmiştir. Süre bitiminde her bir kuyucuğuna yoğunluğu 0,05 OD'ye ayarlanan *S. aureus* kültürlerinden 200 µL eklenmiştir. Plate kapağı kapalı şekilde 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Kontrol grubu olarak PBS içeren kuyucuklar kullanılmıştır. İnkübasyondan sonra kuyucukların içeriği boşaltılmış her bir kuyucuk üç kez steril PBS tamponu ile yıkanmıştır. Her yıkama aşamasından sonra kuyucuklar boşaltılmış ve mikropklalar ters çevrilerek kurumaya bırakılmıştır. Yıkama işleminden sonra, yapışan bakterilerin kalıntısını gidermek amacıyla 200 µL metanol (Merck) ile 20 dakika fiksasyon işlemi uygulanmıştır. Mikropklalar boşaltılıp gece boyunca ters pozisyonda oda sıcaklığında havada kurumaya bırakılmıştır. Her bir mikropkale kuyucuğu 200 µL kristal viyole ile oda sıcaklığında 15 dakika bekletilerek boyanmıştır. Boya fazlası çekilmiş ve geri kalan kısımdan boya temizlenene kadar su altına yıkama işlemi uygulanmıştır. Ardından mikropklalar oda sıcaklığında ters çevrilerek kurumaya bırakılmıştır. Hücrelere bağlanan boyanın geri çözülmesi için, her kuyucuktaki boya 200 µL %33'lük glasiyel asetik asit (Merck) ilave edilmiştir. Glasiyel asetik asit kuyucukların hem tabanına hem de duvarlarına yapışan bakterilerin dolaylı ölçülmesine olanak sağlamaktadır. Havayla teması önlemek için mikropklaların kapakları kapatılmış ve oda sıcaklığında 45 dakika çalkalamaksızın bekletilmiştir. Her bir kuyucuktaki optik yoğunluk (OD) 570 nm'de ölçüm yapılarak belirlenmiş ve aşağıdaki formül kullanılarak yüzde anti-biyofilm oranları hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Mikrobiyal inhibisyon} = [1 - (A_c/A_0)] * 100$$

A_c: Biyosürefektan absorbe edilen kuyucukların biyofilm OD değerleri.

A₀: Biyosürefektansız kuyucukların biyofilm OD değerleri (Kontrol grubu)

Biyofilm oluşumundaki fenotipik ifadenin *in vitro* koşullarda değişmeye uygun olması nedeniyle, hataları minimize etmek ve bilgilerin güvenilirliğini sağlamak amacıyla, her bir suş için üç tekrarlı ve her bir test için 2 paralelli denemeler yapılmıştır.

2.5. Anti-Mikrobiyal Etki

Laktobasillerden elde edilen biyosürefektanların, çok kuvvetli (+++) biyofilm oluşturan 7 *S. aureus* suşlarına karşı anti-mikrobiyal aktiviteleri hem disk difüzyon hem de agar difüzyon yöntemleri ile test edilmiştir. Agar difüzyon tekniğinde Nutrient agarlı petri kaplarına açılan kuyucuklara her bir bakteriye ait 200 µL biyosürefektan aktarılmış ve 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonrası kuyucuk etrafında oluşan zon çapları dijital kumpas yardımıyla mm cinsinden ölçülmüştür [45].

Disk difüzyon tekniğinde ise standart, 5 mm çapında, steril ve boş antibiyogram diskleri 2,5-3 cm aralıklarla 0,5 McFarland bulanıklılığına ayarlanan *S. aureus* suşlarının yayıldığı Nutrient agar plakların üzerine yerleştirilmiştir. 20 µL biyosürefektanın antibiyogram disklere emdirilmesinin ardından 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Disklerin etrafında oluşan inhibisyon zon çapları mm olarak ölçülmüştür [46, 47].

3. BULGULAR

Bu çalışmada, *Lactobacillus* kültürleri tarafından üretilen biyosürefektanların, *Staphylococcus aureus* suşlarının biyofilm oluşumunu engellenmesi (anti-biyofilm) ve *S. aureus* bakterilerinin gelişimini inhibe etmesinin (anti-mikrobiyal) belirlenmesi hedeflenmiştir. Çalışmada kullanılan 52 *S. aureus* suşudan yedisinin (26, 36, 38, 43, 55, 56 ve 60) biyofilm yapma oranları çok kuvvetli (+++), on beşinin kuvvetli (++) ve on birinin de orta (+) seviyede olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca çalışmada kullanılan suşlardan 19'unda herhangi bir biyofilm oluşumu gözlenmemiştir (Çizelge 1).

Çalışmada kullanılan 20 laktobasil içerisinden 8 suştan elde edilen biyosürekentin, biyofilm yapma oranı çok kuvvetli olan *S. aureus* suşları tarafından üretilen biyofilm için farklı oranlarda engelleyici etki gösterdikleri belirlenmiştir. *Lactobacillus acidophilus* BAZ 22 için %1,60-%56,60, *L. fermentum* FKK3 için %43,90-%67,60, *L. acidophilus* BAZ 51 için %26,80-%44,00, *L. brevis* YG7 için %0,90-%45,20, *L. rhamnosus* MP1 için %39,20-%80,60, *L. fermentum* LB 16 için %1,30-%49,10, *L. rhamnosus* BAZ 78 için %24,30-%61,60 ve *L. acidophilus* BAZ 61 için %4,40-%52,40 aralıklarında değişen yüzdelerde anti-biyofilm etki göstermişlerdir (Çizelge 2, Şekil 1). Geriye kalan 12 suşun bazılarının biyofilm oluşumunu engelleyici etki gösterdiği, bazılarının etki göstermediği tespit edilmiştir.

Çizelge 1. *S. aureus* suşlarının nitel biyofilm oluşturma özelliği

<i>Suşlar</i>	<i>Biyofilm Oluşumu</i>	<i>Suşlar</i>	<i>Biyofilm Oluşumu</i>	<i>Suşlar</i>	<i>Biyofilm Oluşumu</i>
<i>S. aureus</i> 1	+	<i>S. aureus</i> 26	+++	<i>S. aureus</i> 44	++
<i>S. aureus</i> 2	-	<i>S. aureus</i> 27	-	<i>S. aureus</i> 45	++
<i>S. aureus</i> 3	++	<i>S. aureus</i> 28	+	<i>S. aureus</i> 46	++
<i>S. aureus</i> 4	-	<i>S. aureus</i> 29	+	<i>S. aureus</i> 47	+
<i>S. aureus</i> 5	-	<i>S. aureus</i> 30	-	<i>S. aureus</i> 48	+
<i>S. aureus</i> 6	-	<i>S. aureus</i> 31	++	<i>S. aureus</i> 49	
<i>S. aureus</i> 7	-	<i>S. aureus</i> 32	-	<i>S. aureus</i> 50	++
<i>S. aureus</i> 8	-	<i>S. aureus</i> 33	-	<i>S. aureus</i> 52	-
<i>S. aureus</i> 9	-	<i>S. aureus</i> 34	-	<i>S. aureus</i> 53	-
<i>S. aureus</i> 10	-	<i>S. aureus</i> 35	++	<i>S. aureus</i> 54	++
<i>S. aureus</i> 11	++	<i>S. aureus</i> 36	+++	<i>S. aureus</i> 55	+++
<i>S. aureus</i> 12	++	<i>S. aureus</i> 37	-	<i>S. aureus</i> 56	+++
<i>S. aureus</i> 20	+	<i>S. aureus</i> 38	+++	<i>S. aureus</i> 57	+
<i>S. aureus</i> 21	++	<i>S. aureus</i> 39	++	<i>S. aureus</i> 58	+
<i>S. aureus</i> 22	-	<i>S. aureus</i> 40	++	<i>S. aureus</i> 59	+
<i>S. aureus</i> 23	+	<i>S. aureus</i> 41	++	<i>S. aureus</i> 60	+++
<i>S. aureus</i> 24	++	<i>S. aureus</i> 42	-		
<i>S. aureus</i> 25	-	<i>S. aureus</i> 43	+++		

-: biyofilm oluşumu gözlenmemiş

+: orta

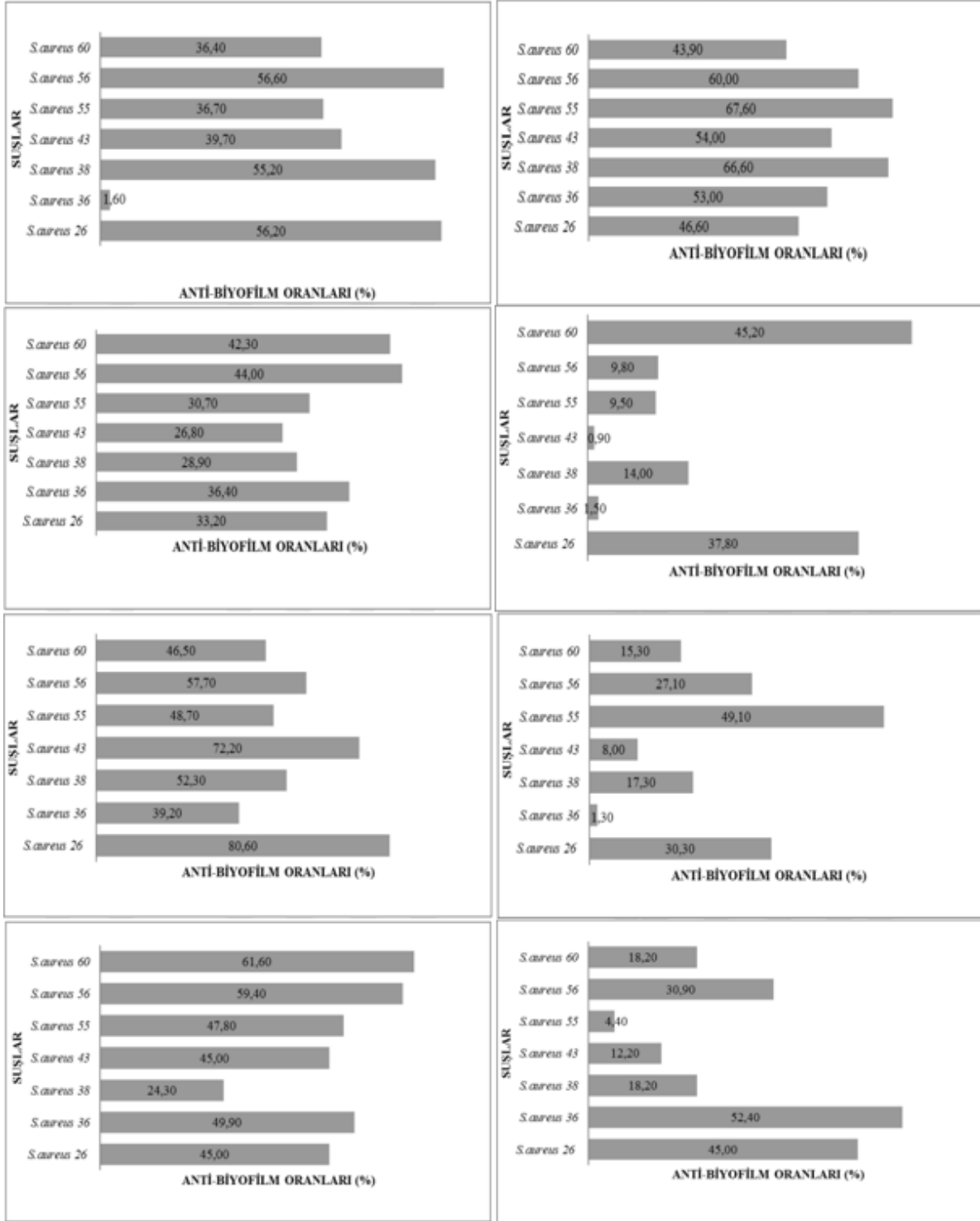
++: kuvvetli

+++ : çok kuvvetli

Çizelge 2. Lactobacillus suşlarından elde edilen biyosümfektanların S. aureus suşlarına karşı anti-biyofilm oranları (%)

Lactobacillus suşları	S. aureus						
	26	36	38	43	55	56	60
BAZ 59	45,20±0,10	21,80±0,20	-17,20±0,10*	-2,30±0,10*	30,70±0,10	30,70±0,05	-33,20±0,05*
LB 17	29,50±0,35	44,30±0,70	-10,80±0,10*	6,70±0,00	-13,10±0,10*	54,30±0,15	17,80±0,10
BTM1	39,20±0,10	-20,00±0,00*	-23,50±0,00*	27,10±0,05	4,60±0,10	26,70±0,15	-2,60±0,00*
BTM3	32,70±0,05	5,80±0,20	-78,40±0,20*	-18,20±0,10*	39,80±0,10	16,80±0,10	-44,80±0,20*
BAZ 36	39,10±0,05	44,80±0,10	-59,70±0,20*	16,00±0,20	41,80±0,10	-19,10±0,10*	35,40±0,05
ATCC 4356	-3,40±0,00*	8,90±0,10	40,50±0,20	34,80±0,10	12,50±0,20	34,10±0,15	21,60±0,20
KIR3	-40,80±0,20*	-29,90±0,00*	-140,20±0,10*	-89,50±0,00*	-90,00±0,40*	18,70±0,35	23,60±0,10
EDS4	-71,60±0,05*	41,90±0,15	27,10±0,20	43,80±0,35	27,90±0,20	1,90±0,20	20,80±0,35
SMÇ6	47,00±0,05	48,90±0,10	12,20±0,20	26,60±0,20	13,10±0,20	50,70±0,15	-29,00±0,20*
BAZ 54	47,00±0,20	24,60±0,05	35,10±0,10	28,70±0,20	36,70±0,15	23,30±0,15	-8,10±0,00*
IP5	11,90±0,20	7,20±0,20	9,70±0,15	8,30±0,15*	-4,70±0,05*	-6,80±0,20*	35,00±0,00
ZYN 17	26,20±0,40	29,00±0,20	21,40±0,20	-44,70±0,05*	30,50±0,10	-80,60±0,20*	34,60±0,10
BAZ 22	56,20±0,20	1,60±0,05	55,20±0,20	39,70±0,20	36,70±0,70	56,60±0,40	36,40±0,60
FKK3	46,60±0,20	53,00±0,15	66,60±0,20	54,00±0,20	67,60±0,35	60,00±0,05	43,90±0,15
BAZ 51	33,20±0,60	36,40±0,05	28,90±0,20	26,80±0,15	30,70±0,40	44,00±0,10	42,30±0,10
YG7	37,80±0,20	1,50±0,10	14,00±0,05	0,90±0,05	9,50±0,05	9,80±0,20	45,20±0,00
MP1	80,60±0,05	39,60±0,10	52,30±0,20	72,20±0,15	48,70±0,40	57,70±0,15	46,50±0,05
LB 16	30,30±0,05	1,30±0,15	17,30±0,15	8,00±0,10	49,10±0,20	27,10±0,00	15,30±0,10
BAZ 78	45,00±0,20	49,90±0,20	24,30±0,20	45,00±0,10	47,8±0,40	59,40±0,15	61,60±0,10
BAZ 61	45,00±0,05	52,40±0,05	18,20±0,00	12,20±0,05	4,40±0,00	30,90±0,20	18,20±0,15

*: Biyofilm oluşumunu artırıcı yönde etki



Şekil 1. *Lactobacillus* cinsi bakteriler tarafından üretilen biyosüpfektanın *S. aureus* suşları üzerindeki % anti-biyofilm oranları

- a) *L. acidophilus* BAZ 22 b) *L. fermentum* FKK3 c) *L. acidophilus* BAZ 51 d) *L. brevis* YG 7
e) *L. rhamnosus* MP 1 f) *L. fermentum* LB16 g) *L. rhamnosus* BAZ 78 h) *L. acidophilus* BAZ 610

Bu çalışmada, *Lactobacillus* sp. suşlarının ürettiği biyosürfektanın çok kuvvetli (+++) biyofilm oluşturan 7 *S. aureus* suşlarına karşı antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesine yönelik analizler yapılmıştır. İki farklı yöntem (disk difüzyon ve agar difüzyon) ile yapılan antimikrobiyal aktivite çalışmalarında biyosürfektanların etkili sonuç gösteremediği ve Stafilakokların üremesini engelleyemediği gözlenmiştir.

4. TARTIŞMA

Biyosürfaktanlar glikolipid, lipopeptit, polisakarit-protein kompleksi, fosfolipit, yağ asitleri ve nötr lipidleri içeren amfipatik bileşiklerdir [48]. Bakterisidal, bakteriyostatik, biyofilm oluşumunun inhibisyonu, biyofilm bozulması, sinerjistik ve adjuvan etkiler (sekonder tümör oluşumunun baskılama) gibi çeşitli uygulamalarda etkin olarak kullanılmaktadırlar [35].

Biyosürfektanlar yüksek biyobozunurluk ve çevre dostu özellikleri nedeniyle endüstriyel olarak çeşitli alanlarda kullanılabilirler. Birçoğunun insan konakçılara karşı düşük toksisite ve yüksek pH, sıcaklık koşullarına dayanıklılık özellikleri bulunmaktadır [33]. Ayrıca, yüzey aktif bileşikler, anti-viral, anti-kanser, anti-HIV, anti-inflamatuar, immün modülatör ve antimikrobiyal aktiviteler gibi farklı aktiviteler sergileyebilirler [34, 49] ve patojenlere karşı anti-adhesiv (antibiyofilm) ajanlar olarak kullanılabilirler [50]. Bu anlamda biyosürfektanların probiyotik bakteriler tarafından serbest bırakılması ürogenital ve gastrointestinal sistemdeki kolonize olmuş diğer suşlar için bir silah olarak kabul edilmektedir [51]. Biyosürfektanların, silikon [52], titanyum [53] ve polistiren plakalar [54] gibi yüzeylerde biyofilm oluşumunu engellediği ve/veya azalttığı bildirilmiştir. Biyosürfektanların, önleyici ajan olarak kullanılabilirliği; kateter ve diğer cerrahi malzemeler üzerinde patojenik biyofilm oluşumunun başlangıcını geciktirmesi nedeniyle sentetik ilaç ve kimyasal kullanımının azaltılabileceği bildirilmiştir [31, 50, 55].

Laktobasillerden biyosürfaktan üretimini etkileyen birçok faktör bulunmaktadır. Bu faktörler; inokulum boyutu, pH, sıcaklık, ajitasyon hızı, inkübasyon süresi, oksijen varlığı ve kültür ortamı bileşimini içermektedir [27]. Süt ürünleri, anne sütü, fermente karides ve meyvelerden izole edilen *L. acidophilus*, *L. pentosus* ve *L. fermentum* antimikrobiyal aktiviteye sahip hücresiz biyosürfektan ürettikleri, Laktik asit bakterisi olan *Pediococcus dextrinicus* SHU1593 suşunun *Bacillus cereus*, *E. aerogenes* ve *Salmonella typhimurium*'a karşı antimikrobiyal aktiviteye sahip hücreye bağlı bir lipoprotein ürettiği rapor edilmiştir [56]. Madhu ve Prapulla [57] *L. plantarum* CFR2194 tarafından üretilen glikoprotein biyosürfektanının *S. aureus*'un yapışmasını engellediğini bildirmişlerdir. Başka bir çalışmada aynı patojenin *L. agilis* tarafından üretilen biyosürfektan ile yüzeye yapışmasının inhibe edildiği bildirilmiştir [48]. Ayrıca araştırmacılar, biyosürfektan üreten suşun yapışma önleyici özelliklerinin, mikroorganizmanın büyüdüğü ortamdaki karbon kaynağından da etkilenebileceğini rapor etmişlerdir. Bu nedenle, mikrobiyal biyosürfektanların polimerik fraksiyonlarında bulunan karbonhidrat, lipid ve protein oranındaki değişiklikler biyolojik etkinliklerinde de önemli rol oynayabilmektedir [35]. *Lactobacillus*lar, temel olarak protein, polisakarit ve fosfattan oluşan biyosürfektanları farklı oranlarda üretebilmektedirler ve bunlar temel olarak glikolipid veya glikolipoprotein olarak sınıflandırılmaktadır [49, 58].

LAB tarafından üretilen biyosürfektanlar ile ilgili çalışmalar, *Bacillus* türleri tarafından üretilen lipopeptidler ve *Pseudomonas* türleri tarafından üretilen rhamnolipidler gibi diğer biyosürfektanlara kıyasla daha az bulunmaktadır. Bunun sebebi; daha az etkili olmaları, yüzey gerilimini 36-45 mN/m civarında değerlere düşürmeleri; kritik misel konsantrasyonlarının (cmc) nispeten yüksek olması (1,0 ila 20,0 mg/mL) nedeniyle geri kazanımları için bir ekstraksiyon işlemine ihtiyaç duyulmasıdır [48]. Ancak LAB tarafından üretilen biyosürfektanlar genellikle güvenli (GRAS) olarak kabul edildiklerinden dolayı birçoğu gıda üretimi ve endüstriyel işlemlerde kullanılmaktadır.

Bu araştırmada, 20 *Lactobacillus* sp. suşunun biyosümfaktan üretim kapasitesi belirlenmiştir. Üretilen biyosümfaktanların *S. aureus* suşlarının biyofilm oluşumunu engellemesi ve/veya azaltılmasını belirleme çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Ardından *S. aureus* patojenine karşı antimikrobiyal aktiviteleri incelenmiştir.

Stafilokokların, çeşitli yüzeylere yapışabilme ve biyofilm oluşturabilme özelliklerinin olduğu bilinmektedir. *S. aureus* bakterilerinin oluşturdukları biyofilmler hem endüstride önemli ekonomik kayıplara hem de tıp alanında sağlık problemlerine yol açmaktadır. *S. aureus* suşları insan ve hayvanlar için çok sayıda enfeksiyonlara (iltihaplı yaralar, septisemi, menenjit, mastitis, enzootik piyemi) neden olan fırsatçı patojen mikroorganizmalardır [59]. Stafilocoklar, adheransı kolaylaştıran “slime” (slaym, biyofilm) oluşturabilme yeteneğine sahip oldukları için biyomateryalleri kaplayan biyofilm oluşturma etkileri daha kolay olmaktadır. Bakteriye fagositozdan koruyan, nötrofillerin etkisini önleyen ve lenfosit aktivitesini azaltan slaym yapısını üretebilen suşların anti-bakteriyal tedaviye daha dirençli oldukları bildirilmiştir [60, 61].

Bu çalışmada, *Lactobacillus* kültürleri tarafından sentezlenen biyosümfaktanların, patojenlerin yüzeye tutunmayı engellemeye yönelik aktivitesinin *S. aureus* bakterilerine karşı kullanılabilirliğinin ve patojen mikroorganizmanın gelişimini engelleme etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Analiz sonuçlarına göre 52 *S. aureus* suşu içerisinde 33’ünde farklı oranlarda (çok kuvvetli, kuvvetli, orta) biyofilm oluşturma yeteneği gözlenirken, 19’unda herhangi bir biyofilm oluşumu tespit edilememiştir (Çizelge 1).

Votava ve Woznicova [62] kan kültüründen izole ettikleri 32 *S. aureus* suşundan 18’inin (%56,2) biyofilm oluşturma kapasitesinin pozitif olduğunu belirlemişlerdir. Başka bir çalışmada bilateral konjonktivitli soft kontakt lens kullanan kişilerin sürüntü örneklerinden izole edilen *S. aureus* suslarının %61,1’inde biyofilm üretimi tespit edilmiştir [63]. *Ica* (intersellüler adezyon) operonunu kodlayan enzimler tarafından, polisakkarit intersellüler adezin (PIA) üretimi, stafilocoklardaki biofilm oluşumunun en iyi bilinen mekanizmasıdır. PIA, *ica operon bölgesinde bulunan icaA, icaD, icaB ve icaC* genlerinin ürünüdür ve biofilm oluşumu esnasında hücreler arası iletişimi sağlamaktadır. *IcaADBC* hem *Staphylococcus aureus*, hem *S. epidermidis*’te bulunan bir operondur. Özellikle *icaA* ve *icaD* biyofilm genleri, *S. aureus* ve *S. epidermidis*’deki slime üretiminde etkin role sahiptir [64, 65]. Cucarella ve diğerlerinin [66] çalışmasında, sığır mastitinden izole edilen 195 *S. aureus* suşu içerisinde 184’ü (%94,36) *icaADBC* pozitif bulurken, 50’sinin (%25,60) *BAP* pozitif olduğu bildirilmiştir. *BAP* pozitif izolatların hepsinde *ica* genleri pozitif olarak tespit edilmiştir. Hem *IcaADBC* hem de *BAP* pozitif olanların daha güçlü biyofilm oluşturdıkları bildirilmiştir. Rohde ve arkadaşları ise fenotipik olarak biyofilm pozitiflik ile *icaA* ve *icaD* genlerinin arasında tam uyumluluk olmadığını savunmaktadırlar [67]. Arciola ve arkadaşları [41] protez enfeksiyonlarından elde ettikleri 15 *S. aureus* suşundan 11 tanesinde (%73,0) biyofilm üretimi gözlemlemişlerdir. Biyofilm pozitif suşların hepsinde *icaA* ve *icaD* genleri tespit edilmiş, ancak biyofilm negatif suşlarda bu genler tespit edilmemiştir. Şahin ve Kaleli [68] araştırmalarında *S. aureus* izolatlarında biyofilm üretiminden sorumlu olan *icaA, icaD* genleri ve ürünleri arasındaki ilişkiyi belirlemişler ve *S. aureus* izolatlarında biyofilm oluşturma düzeyinin yüksek olduğunu (yaklaşık %80), *icaA* ve *icaD* genleri ve ürünlerinin (PIA/PNAG) biyofilm oluşumunda rol oynadıklarını rapor etmiştir. Negatif biyofilm oluşturan *S. aureus* suşlarının, biyofilm oluşumundan sorumlu olan genlere sahip olmadığı düşünülmektedir. Ancak çalışma kapsamında biyofilm oluşumundan sorumlu tutulan genler araştırılmadığından doğrudan bir ilişkisi olup olmadığı tespit edilememiştir.

Biyosümfaktanların; anti-bakteriyel, anti-fungal, anti-tümör, anti-mikoplasmik, anti-viral, insektisidal ve anti-biyofilm (anti-adheziv) özellikler sergiledikleri belirlenmiştir [34, 49]. Bu moleküller çoklu ilaç dirençli bazı patojenlere karşı potansiyel ilaç molekülleri olarak değerlendirilmiştir [69]. Biyosümfaktan molekülleri, biyolojik bozunabilirlik ve daha az toksisite içermesi nedeniyle sentetik sümfaktanlara kıyasla birçok biyomedikal uygulama için daha fazla avantaj sağlamaktadır [70, 71]. Tüketicilerin sağlıklı ve doğal ürünlere olan ilgisinin artmasıyla birlikte yeni ve doğal anti-mikrobiyallere duyulan ihtiyaç da artış göstermiştir. Bunlar arasında biyosümfaktanlar doğal alternatifler arasında yer almaktadır [72]. Analiz

sonuçlarına göre tüm suşların anti-biyofilm sonuç aralıkları %-140,2-80,6 değerleri arasında bulunmuştur (Çizelge 2). Negatif çıkan sonuçlar biyofilm oluşumunu artırdığı yönünde değerlendirilirken, pozitif çıkan sonuçlar biyofilm oluşumunu azalttığı yönünde değerlendirilmiştir [43, 44]. Gudiña ve diğerleri [73] biyosürfektanın, anti-biyofilm etkisinin test edilen mikroorganizmaya ve biyosürfektan konsantrasyonuna bağlı olarak değiştiği bildirmiştir. Bu nedenle, çalışmamızda laktobasil suşlarından elde edilen biyosürfektanların biyofilm oluşumunu engellememesi yani sonuçların negatif çıkması, kullanılan biyosürfektan miktarının (200 µL) yeterli gelmediğini ve/veya test edilen *S. aureus* suşuna göre değiştiğini düşündürmektedir. Biyosürfektanın anti-biyofilm etkisinin aynı türün farklı suşlarına karşı bile değişebileceği bildirilmiştir [74]. Çalışmamızda da, *L. acidophilus* BAZ 22 tarafından üretilen biyosürfektanın, *S. aureus*'un farklı suşlarına karşı anti-biyofilm etkisi incelenmiştir. Buna göre; *S. aureus* 26,36,38,43,55,56 ve 60 için sırasıyla %56,20; 1,60; 55,20; 39,70; 36,70; 56,60 ve 36,40 anti-biyofilm etki oluşturduğu belirlenmiştir. Tüm *Lactobacillus* suşları içerisinde *L. rhamnosus* MP1 suşundan elde edilen biyosürfektanın *S. aureus* 26 suşu tarafından üretilen biyofilm oluşumunu %80,6 oranı ile en fazla engellediği belirlenmiştir (Çizelge 2). *S. aureus* 36 suşu tarafından üretilen biyofilm *Lactobacillus* biyosürfektanlarının %90'ından etkilenmiş ve biyofilm oluşumu azalmıştır. Yalnız *L. rhamnosus* BTM1 ve *L. brevis* KIR3 suşları tarafından üretilen biyosürfektanların, *S. aureus* 36 suşunun oluşturduğu biyofilmin oluşumuna engelleyici özellik göstermediği tespit edilmiştir. *L. brevis* KIR3 suşundan elde edilen biyosürfektanın sadece *S. aureus* 56 ve *S. aureus* 60 suşlarının oluşturduğu biyofilmi sırasıyla, %18,7, %23,6 oranında engellediği tespit edilmiştir. Diğer *S. aureus* suşlarının biyofilm oluşumuna engelleyici özellik göstermediği aksine biyofilm oluşumunu artırıcı yönde etki gösterdiği belirlenmiştir (Çizelge 2).

Biyosürfektanların yapışma önleyici aktivitesi, özellikle biyofilm oluşumunu engellemek için oldukça önemlidir [10]. Çünkü biyofilm oluşumu hem patojenik hem de patojen olmayan mikroorganizmaların yüzeye bağlanmasında ve canlı kalabilmesinde önemli rol oynamaktadır [75]. Ayrıca mikroorganizmaya ilaç toleransı, konakçı bağışıklık tepkilerinden kaçınma ve enfeksiyonun tekrarlanması gibi çeşitli avantajlar sağlamaktadır [35]. Çalışmamızda kullanılan biyosürfektanların *S. aureus* suşlarına karşı antimikrobiyal aktivitelerinin olmadığı tespit edilmiştir. Gudiña ve diğerlerinin [73] çalışmasında *Lactococcus paracasei* subsp. *paracasei* A20 suşu tarafından üretilen biyosürfektanın, 18 mikroorganizmaya karşı anti-mikrobiyal aktivitesi incelenmiştir. Bütün mikroorganizmalar için, düşük biyosürfektan konsantrasyonlarında (3,12 mg/mL; 6,25 mg/mL; 12,50 mg/mL; 25,00 mg/mL) bile anti-mikrobiyal aktivite gözlemlendiği bildirilmiştir. Ayrıca artan biyosürfektan konsantrasyonuyla birlikte büyüme inhibisyon yüzdelerinde de artış gözlemlendiği tespit edilmiştir. En yüksek biyosürfektan konsantrasyonunda (50 mg/mL) *E. coli*, *C. albicans*, *P. aeruginosa* karşı düşük anti-adhesiv özellik gözlenirken, aynı konsantrasyonda biyosürfektanın suşlara karşı sırasıyla %100, %100, %91,50 anti-mikrobiyal aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Elde ettikleri sonuçlar doğrultusunda anti-biyofilm ve anti-mikrobiyal aktivitenin birbiri ile uyumlu olmadığı bildirilmişlerdir. Başka bir çalışmada, *L. plantarum* CFR 2194 suşu tarafından üretilen biyosürfektanın, *Escherichia coli* ATCC 31075, *E. coli* MTCC 108, *Salmonella typhi*, *Yersinia enterocolitica* MTCC 859 ve *S. aureus* F722 suşlarına karşı anti-mikrobiyal aktivitesi test edilmiştir. 4 mg/mL konsantrasyonda biyosürfektanın *E. coli* ATCC 31075, *S. typhi* ve *Y. enterocolitica* MTCC 859 gelişimini inhibe edemediği gözlenmiştir. *E. coli* MTCC108 için 5-10 mm çapı civarında, *S. aureus* F 722 için ise yaklaşık 5 mm çapında inhibisyon zonu olduğu bildirilmiştir. Biyosürfektan konsantrasyonunun 25 mg/mL'ye getirildiği durumda ise, *S. typhi*'nin gelişiminin inhibe edilemediği ve *E. coli* ATCC 31075, *Y. enterocolitica* MTCC 859, *S. aureus* F722 ve *E. coli* MTCC 108 için sırasıyla 5 mm, 5-10 mm, 5-10 mm ve 15 mm'den fazla inhibisyon zonu çapının gözlemlendiği bildirilmiştir [57].

Biyosürfektanlar moleküler ağırlıklarına göre sınıflandırılıp mikrobiyal kökenlerine ve kompozisyonlarına göre kategorize edilmektedirler. Yüksek moleküler ağırlıklı biyosürfektanlar, lipopolisakaritleri içerir. Ancak asıl ilgi alanları, düşük moleküler ağırlıklı glikolipitler ve lipopeptitler (LP'ler) ve fosfolipitlerdir. LP'ler, peptit zincirine bağlı lipit parçalarından oluşan ve antimikrobiyal aktivite gibi biyolojik aktivitelere sahip yapılardır. LP'ler, negatif yüklü hücre zarlarını içeren lipite zarar verebilir ve/veya nüfuz edebilir. Polar elementin çözünürlüğü korumaya çalışmasının bir sonucu olarak hücre yüzeyi ara yüzünde bir yük dengesizliği gelişebilmektedir. Bu durum, Gram-negatif bakterilerin lipid içeren hücre zarında hücre hasarına/ölümüne neden olan ve gözenek oluşumuna yol açan hücre morfolojisi kaybına neden olmaktadır.

[35]. *Pseudomonas*'tan türetilen ve glikolipit çeşidi olan ramnolipitlerin antimikrobiyal özelliği, bakteri hücre plazma zarının bozulmasına yol açan geçirgenleştirici etkilerine, hücre yüzey yükünü tehlikeye atma yeteneklerine ve bakteri hücresi hidrofobikliğini değiştirme yeteneklerine atfedilmiştir [76, 77]. Ayrıca biyofilm oluşumunu önleme ve engelleme yeteneğine sahip olan ramnolipitlerin, kurucu bakterileri antimikrobiyal maddelere karşı daha duyarlı hale getirdikleri bildirilmiştir [78]. LAB'den türetilen biyosülfektanların kimyasal bileşimi hakkında yeterli bilgi bulunmamaktadır. Ancak biyosülfektanların kimyasal bileşimi üzerine yapılan çalışmalarda kullanılan suş tipine bağlı olarak glikolipitler, glikoproteinler veya fosfat gruplarıyla bağlantılı proteinlerin ve polisakkaritlerin çok bileşenli karışımları gibi farklı bileşenlerden oluştukları bildirilmiştir [79]. Çalışmamızda, antimikrobiyal aktivitenin hiç gözlenmemiş olması; kullanılan bakterilerin izolasyon kaynaklarının ve gelişme ortamlarında kullanılan karbon kaynaklarının farklı olması, düşük konsantrasyonlarda (inhibisyon için yetersiz) biyosülfektan kullanılması, kullanılan bakterinin cinsine göre üretilen biyosülfektan çeşidinin farklı olması ya da patojen bakterinin kullanılan biyosülfektana karşı dirençli olması nedeniyle olabileceği düşünülmektedir.

Sonuç olarak yaptığımız literatür taramaları neticesinde çeşitli kaynaklardan izole edilen mikroorganizmaların tarafından üretilen biyosülfektanların, patojen mikroorganizmalar tarafından oluşturulan biyofilm yapısını engellemede etkili bir yöntem olduğu belirlenmiştir. Bu araştırmada, *Lactobacillus* cinsi bakterileri tarafından üretilen ve toksisitesi, kimyasal yapısının aydınlatılması konusunda yeterli kanıt bulunmayan biyosülfektanlar ile *Staphylococcus aureus* suşlarının biyofilm oluşumunu engelleme ve/veya azaltma etkisi tespit edilmiştir [80]. Laktobasil tarafından üretilen biyosülfektanların absorpsiyon uygulaması, *S. aureus* biyofilmlerinin kontrolünde, gıda sanayinde uygulanan klor gibi çevre ve canlılar için toksik etkileri olan kimyasallara alternatif olabilecektir. Ayrıca laktobasil suşları tarafından üretilen biyosülfektanın hastane kökenli patojen *S. aureus* bakterilerini azaltmak için biyomedikal ekipmanlarda biyolojik koruyucu kaplamalar olarak da kullanılabilceği düşünülmektedir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında, 2017 yılında tamamlanan “*Lactobacillus* Cinsi Bakterilerde Biyosülfektan Üretimi ve Biyosülfektanın *Staphylococcus aureus* Bakterilerinin Oluşturduğu Biyofilmi Engellemesi” isimli yüksek lisans tezinden türetilmiştir. Berat Çınar Acar, çalışmanın deneysel aşamalarında ve makalenin yazılmasında sorumluluk almıştır.

ÇIKAR ÇATIŞMASI/ÇAKIŞMASI BİLDİRİMİ

Yazarlar arasında çıkar çatışması/çakışması bulunmamaktadır.

KAYNAKLAR

- [1] Tremblay, Y.D., Levesque, C., Segers, R.P., Jacques, M. (2013). Method to grow *Actinobacillus pleuropneumoniae* biofilm on a biotic surface. *BMC Veterinary Research*, 9, 213.
- [2] Muhammad, M.H., Idris, A.L., Fan, X., Guo, Y., Yu, Y., Jin, X., Qiu, J., Guan, X., Huang, T. (2020). Beyond risk: Bacterial biofilms and their regulating approaches. *Frontiers in Microbiology*, 11, 928.
- [3] Vestby, L.K., Grønseth, T., Simm, R., Nesse, L.L. (2020). Bacterial biofilm and its role in the pathogenesis of disease. *Antibiotics*, 9(2), 59.
- [4] Jayathilake, G., Jana, P.S., Rushton, S., (2017). Extracellular polymeric substance production and aggregated bacteria colonization influence the competition of microbes in biofilms. *Frontier in Microbiology*. 11, 698.
- [5] Costa, O.Y.A., Raaijmakers, J.M., Kuramae, E.E. (2018). Microbial extracellular polymeric substances: Ecological function and impact on soil aggregation. *Frontier in Microbiology*, 9, 1636.
- [6] Del Pozo, J.L., Patel, R. (2007). The challenge of treating biofilm-associated bacterial infections. *Clinical Pharmacology Therapeutics*, 82(2), 204-209.
- [7] Wimpenny, J., Manz, W., Szewzyk, U. (2000). Heterogeneity in biofilms. *FEMS Microbiology Reviews*, 24(5), 661-671.
- [8] Szczuka, E. and Kaznowski A. (2014). Antimicrobial activity of tigeicycline alone or in combination with rifampin against *Staphylococcus epidermidis* in biofilm. *Folia Microbiologica (Praha)*, 59(4), 283-8.

- [9] Ceçe, E.N. (2011). Staphylococcus epidermidis biyofilmlerine karşı antimikrobiyal aktivite gösteren bakteriyofajların izolasyon ve karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 16-23.
- [10] Galie, S., Garcia-Gutierrez, C., Miguelez, E.M., Villar, C.J., Lombo, F. (2018). Biofilms in the food industry: Health aspects and control methods. *Frontier in Microbiology*, 9, 898.
- [11] Percival, S.L., Suleman, L., Vuotto, C., Donelli, G. (2015). Healthcare-associated infections, medical devices and biofilms: Risk, tolerance, and control. *Journal of Medical Microbiology*, 64, 323-334.
- [12] Bi, Y., Xia, G., Shi, C., Wan, J., Liu, L., Chen, Y., Wu, Y., Zhang, W., Zhou, M., He, H., Liu, R. (2021). Therapeutic strategies against bacterial biofilms. *Fundamental Research*, 1(2), 193-212.
- [13] Francolini, I., Donelli, G. (2010) Prevention and control of biofilm-based medical device-related infections. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 59, 227-238.
- [14] Garrett, T.R., Bhakoo, M., Zhang, Z. (2008). Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. *Progress in Natural Science*, 9(18), 1049-1056.
- [15] Kavanaug, N.L. and Ribbeck, K. (2012). Selected antimicrobial essential oils eradicate *Pseudomonas* spp. and *Staphylococcus aureus* biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(11), 4057-61.
- [16] Timmusk, S., Behers, L., Muthoni, J., Muraya, A., Aronsson, A.C. (2017). Perspectives and challenges of microbial application for crop improvement. *Frontiers in Plant Science*, 8:49.
- [17] Martinez, P., Vera, M., Bobadilla-Fazzini, R.A. (2015). Omics on bioleaching: Current and future impacts. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99, 8337-8350.
- [18] Naidoo, S., Olaniran, A.O. (2013). Treated wastewater effluent as a source of microbial pollution of surface water resources. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 11, 249-270.
- [19] Ali, J., Sohail, A., Wang, L., Rizwan Haider, M., Mulk, S., Pan, G. (2018). Electro-microbiology as a promising approach towards renewable energy and environmental sustainability. *Energies*, 11(7), 1822.
- [20] Irankhah, S., Abdi Ali, A., Mallavarapu, M., Soudi, M.R., Subashchandrabose, S., Gharavi, S., Ayati, B. (2019). Ecological role of *Acinetobacter calcoaceticus* GSN3 in natural biofilm formation and its advantages in bioremediation. *Biofouling*, 35(4), 377-391.
- [21] Satpute, S.K., Banpurkar, A.G., Banat, I.M., Sangshetti, J.N., Patil, R.H., Gade, W.N. (2016). Multiple roles of biosurfactants in biofilms. *Current Pharmaceutical Design*, 22(11), 1429-448.
- [22] Díaz De Rienzo, M.A., Stevenson, P., Marchant, R., Banat, I.M., (2016). Antibacterial properties of biosurfactants against selected Gram-positive and -negative bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 363(2), 1-8.
- [23] Yan, X., Gu, S., Cui, X., Shi, Y., Wen, S., Chen, H., Ge, J. (2019). Antimicrobial, anti-adhesive and anti-biofilm potential of biosurfactants isolated from *Pediococcus acidilactici* and *Lactobacillus plantarum* against *Staphylococcus aureus* CMCC26003. *Microbial Pathogenesis*, 127, 12-20.
- [24] Mishra, R., Panda, A.K., Mandal, S.D., Shakeel, M., Bisht, S.S., Khan, J. (2020). Natural anti-biofilm agents: strategies to control biofilm-forming pathogens. *Frontiers in Microbiology Antimicrobials, Resistance and Chemotherapy*, 11, 1-23.
- [25] Yuliani, H., Perdani, M.S., Savitria, I., Manurung, M., Sahlan, M., Wijanarkob, A., Hermansyah, H. (2018). Antimicrobial activity of biosurfactant derived from *Bacillus subtilis* C19. *5th International Conference on Energy and Environment Research*, 153, 274-278.
- [26] Ghasemi, A., Moosavi-nasab, M., Setoodeh, P., Mesbahi, G., Yousefi, G. (2019). Biosurfactant production by lactic acid bacterium *Pediococcus dextrinicus* SHU1593 grown on different carbon sources: Strain screening followed by product characterization. *Scientific Reports*, 9, 5287.
- [27] Mouafo, H.T., Sokamte, A.T., Mbawala, A., Ndjouenkeu, R., Devappa, S. (2022). Biosurfactants from lactic acid bacteria: A critical review on production, extraction, structural characterization and food application. *Food Bioscience*, 46, 101598.
- [28] Van Hamme, J.D., Singh, A. and Ward, O.P. (2006). Physiological aspects Part 1 in a series of papers devoted to surfactants in microbiology and biotechnology. *Biotechnology Advances*. 24(6), 604-620.
- [29] Banat, I.M., Franzetti, A., Gandolfi, I., Bestetti, G., Martinotti, M.G., Fracchia, L., Smyth, T.J., Marchant, R. (2010). Microbial biosurfactants production, applications and future potential. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87, 427-444.
- [30] Ron, E.Z. and Rosenberg, E. (2001). Natural roles of biosurfactants. *Environmental Microbiology*, 3(4): 229-236.
- [31] Singh, P. and Cameotra, S.S. (2004). Potential applications of microbial surfactants in biomedical sciences. *Trends in Biotechnology*, 22(3), 142-146.
- [32] Özden, D. (2021). Plastik biyodegradasyonu: Genel sorunlar ve biyoteknolojik çözümler. *International Journal of Life Sciences and Biotechnology*, 4(2), 324-339.
- [33] Santos, D.K.F., Rufino, R.D., Luna, J.M., Santos, V.A., Sarubbo, L. A. (2016). Biosurfactants: Multifunctional biomolecules of the 21st century. *International Journal of Molecular Sciences*, 17, 401.

- [34] Jahan, R., Bodratti, A. M., Tsianou, M. T., and Alexandris, P. (2020). Biosurfactants, natural alternatives to synthetic surfactants: Physicochemical properties and applications. *Advances in Colloid and Interface Science*, 275, 102061.
- [35] Naughton, P.J., Naughton, R.M.V., Banat, I.M. (2019). Microbial biosurfactants: Current trends and applications in agricultural and biomedical industries. *Journal of Applied Microbiology*, 127, 12-28.
- [36] Hussain, T., Khan, A.A., Mohamed, H.I. (2022). Potential efficacy of biofilm-forming biosurfactant *Bacillus firmus* hussaint-LAB.66 against rhizoctonia solani and mass spectrometry analysis of its metabolites. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 28, 3.
- [37] Arutchelvi, J.I., Bhaduri, S., Uppara, P.V., Doble, M. (2008). Mannosylerythritol lipids: A review. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 35(12), 1559-1570.
- [38] Soberón-Chávez, G., González-Valdez, A., Soto-Aceves, M.P., Cocotl-Yañez, M. (2020). Rhamnolipids produced by *Pseudomonas*: From molecular genetics to the market. *Microbial Biotechnology*, 14 (1), 136-146.
- [39] Rodrigues, L.R., Van der Mei, H.C., Teixeira, J.A. and Oliveira, R. (2004). Influence of biosurfactants from probiotic bacteria on formation of biofilms on voice prosthesis. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 4408-4410.
- [40] Rodrigues, L.R., Banat, I.M., Teixeira, J.A. and Oliveira, R. (2006). Biosurfactants: potential applications in medicine. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 57(4), 609-618.
- [41] Arciola, C.R., Campoccia, D., Montanaro, L. (2002). Detection of biofilm-forming strains of *Staphylococcus epidermidis* and *S. aureus*. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 2(5), 478-484.
- [42] Arciola, C.R., Campoccia, D., Gamberini, S., Cervellati M., Donati, E., Montanaro, L. (2002b). Detection of slime production by means of an optimised Congo red agar plate test based on a colourimetric scale in *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates genotyped for ica locus, *Biomaterials*, 23(21), 4233-4239.
- [43] Heinemann, C., Van Hylckama, V., Janssen, D., Busscher, H.J., Van der Mei, H.C. and Reid, G. (2000) Purification and characterization of a surface-binding protein from *Lactobacillus fermentum* RC-14 that inhibits adhesion of *Enterococcus faecalis* 1131. *FEMS Microbiology Letters*, 190(1), 177-180.
- [44] Stepanovic, S., Vukovic, D., Dakic, I., Savic, B., Svabic-Vlahovic, M. (2000). A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods*, 40(2), 175-9.
- [45] Al-Qadisy, I., Saeed, W.S., Al-Odayni, A., Al-Faqeeh, L.A.S., Alghamdi, A.A., Farooqui M. (2020). Novel metformin-based schiff bases: Synthesis, characterization, and antibacterial evaluation. *Materials*, 13(3), 514.
- [46] Öztürk, H. (2009). *Jurinea consanguinea* 'nın antioksidan ve antibakteriyel aktivitesinin belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Edirne, 32.
- [47] Bakır, E.P., Ünal, S., Bakır, Ş. (2022). Kavite dezenfektanları ile antibakteriyel içerikli adeziv ajanların kombine kullanımının antibakteriyel etkisi. *Anadolu Kliniği Tıp Bilimleri Dergisi*, 27,1.
- [48] Gudiña, E.J., Fernandes, E.C., Teixeira, J.A., Rodrigues, L.R. (2015). Antimicrobial and anti-adhesive activities of cell-bound biosurfactant from *Lactobacillus agilis* CCUG31450. *RSC Advances*, 5, 90960-90968.
- [49] Giani, A.D., Zampolli, J., Di Gennaro, P. (2021). Recent trends on biosurfactants with antimicrobial activity produced by bacteria associated with human health: Different perspectives on their properties, challenges, and potential applications. *Frontier in Microbiology*, 12, 655150.
- [50] Rodrigues, L.R., Teixeira, J.A., Van der Mei, H.C. and Oliveira, R. (2006c). Physicochemical and functional characterization of a biosurfactant produced by *Lactococcus lactis* 53. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 49(1), 79-86.
- [51] Van Hoogmoed, C.G., Van der Mei, H.C. and Busscher, H.J. (2004). The influence of biosurfactants released by *S. mitis* BMS on the adhesion of pioneer strains and cariogenic bacteria. *Biofouling*, 20(6), 261-267.
- [52] Ceresa, C., Tessarolo, F., Caola, I., Nollo, G., Cavallo, M., Rinaldi, M. and Fracchia, L. (2015) Inhibition of *Candida albicans* adhesion on medical-grade silicone by a *Lactobacillus*-derived biosurfactant. *Journal of Applied Microbiology*, 118(5), 1116-1125.
- [53] Ciandrini, E., Campana, R., Casettari, L., Perinelli, D.R., Fagioli, L., Manti, A., Palmieri, G.F., Papa, S. et al. (2016). Characterization of biosurfactants produced by *Lactobacillus* spp. and their activity against oral streptococci biofilm. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(15), 6767-6777.
- [54] Gomez, N.C., Ramiro, J.M., Quecan, B.X. and de Melo Franco, B.D. (2016) Use of potential probiotic lactic acid bacteria (LAB) biofilms for the control of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, and *Escherichia coli* O157:H7 biofilms formation. *Frontier in Microbiology*, 7, 863.
- [55] Falagas, M.E., Makris, G.C. (2009). Probiotic bacteria and biosurfactants for nosocomial infection control: A hypothesis. *Journal of Hospital Infection*, 71(4), 301-306.
- [56] Abdalsadiq, N., Hassan, Z., Lani, M. (2018). Characterization of the physicochemical properties of the biosurfactant produced by *L. acidophilus* and *L. pentosus*. *EPH-International Journal of Science and Engineering*. 4(7), 1-17.
- [57] Madhu, A.N., Prapulla, S.G. (2014). Evaluation and functional characterization of a biosurfactant produced by *Lactobacillus plantarum* CFR 2194. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 172(4), 1777-1789.

- [58] Morais, I.M.C., Cordeiro, A.L., Teixeira, G.S., Domingues, V.S., Nardi, R.M.D., Monteiro, A.S., et al. (2017). Biological and physicochemical properties of biosurfactants produced by *Lactobacillus jensenii* P6A and *Lactobacillus gasseri* P65. *Microbial Cell Factories*, 16, 155.
- [59] Rashid, Z., Farzana, K., Sattar, A., Murtaza, G. (2012). Prevalence of nasal *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in hospital personnel and associated risk factors. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 69(5), 985-991.
- [60] Çelik, İ., Cihangiroğlu, M., Çabalak, M., Sevim, E., Akbulut, A., Kılıç, S.S. (2005). Hastane kaynaklı koagülaz negatif stafilkoklarda fosfomisin duyarlılığı ile metisilin direnci ve slaym yapımı ilişkisi, *ANKEM Dergisi*, 19(3), 139-143.
- [61] Yıldırım, N., Sezen, İ.Y., Ardıç, N., İleri, Ç. (2008). Farklı klinik örneklerden izole edilen koagülaz-negatif stafilkokların slime faktör üretimlerinin ve bazı antibiyotiklere duyarlılıklarının araştırılması. *İnfeksiyon Dergisi*, 22(4), 209-214.
- [62] Votava, M., Woznicova, V. (2000). Production of slime by staphylococcal isolates from blood cultures. *Central European Journal of Public Health*, 8(1), 18-20.
- [63] Catalanotti, P., Lanza, M., Del Prete, A., Lucido, M., Catania, M.R., Galle, F., Boggia, D., Perfetto, B., Rossano, F. (2005). Slime-producing *Staphylococcus epidermidis* and *S. aureus* in acute bacterial conjunctivitis in soft contact lens wearers. *New Microbiologica*, 28(4), 345-354.
- [64] Us, E., Tekeli, A., Dolapçı, İ., Karahan, Z.C., Sancak, B., Haşçelik, G. (2009). Çeşitli klinik enfeksiyonlardan elde edilen *Staphylococcus aureus* izolatlarında insersiyon sekansı IS256'nın biofilm oluşumu üzerine etkisi. *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası*, 62(2), 53-57.
- [65] Öcal, D.N., Dolapçı, İ., Karahan, Z.C., Tekeli, A. (2017). Stafilkok izolatlarının biyofilm oluşturma özelliklerinin araştırılması. *Mikrobiyoloji Bülteni*, 51(1), 10-19.
- [66] Cucarella, C., Solano, C., Valle, J., Amorena, B., Lasa, I., Penadés, J.R. (2001). Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. *Journal of Bacteriology*, 183(9), 2888-96.
- [67] Rohde, H., Knobloch, J.K.M., Horstkotte, M.A., Mack, D. (2001). Correlation of *Staphylococcus aureus* icaABCD genotype and biofilm expression phenotype. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(12), 4595-4596.
- [68] Şahin, R., Kaleli, İ. (2018). *Staphylococcus aureus* izolatlarında biyofilm üretiminin genotipik ve fenotipik karakterlerinin karşılaştırılması. *Mikrobiyoloji Bülteni*, 52(2), 111-122.
- [69] Das, P., Mukherjee, S., Sen, R. (2008). Antimicrobial potential of a lipopeptide biosurfactant derived from a marine *Bacillus circulans*. *Journal of Applied Microbiology*, 104(6), 1675-84.
- [70] Satpute, S.K., Bhuyan, S.S., Pardesi, K.R., Mujumdar, S.S., Dhakephalkar, P.K., Shete, A.M., Chopade, B.A. (2010) Molecular genetics of biosurfactant synthesis in microorganisms. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 672, 14-41.
- [71] Fracchia, L., Cavallo, M., Allegrone, G., Martinotti, M.G. (2010). A *Lactobacillus*-derived biosurfactant inhibits biofilm formation of human pathogenic *Candida albicans* biofilm producers. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2, 827-837.
- [72] Xu, C., Yagiz, Y., Hsu, W.Y., Simonne, A., Lu, J., Marshall, M.R. (2014). Antioxidant, antibacterial, and antibiofilm properties of polyphenols from muscadine grape (*Vitis rotundifolia* Michx.) pomace against selected foodborne pathogens. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 62(28), 6640-6649.
- [73] Gudiña, E.J., Rocha, V., Teixeira, J.A., Rodrigues, L.R. (2010). Antimicrobial and antiadhesive properties of a biosurfactant isolated from *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* A20. *Letters in Applied Microbiology*, 50(4), 419-424.
- [74] Velraeds, M.M., Van de Belt-Gritter, B., van der Mei, H.C., Reid, G., Busscher, H.J. (1998). Interference in initial adhesion of uropathogenic bacteria and yeasts to silicone rubber by a *Lactobacillus acidophilus* biosurfactant. *Journal of Medical Microbiology*, 47(12), 1081-1085.
- [75] Kumar, A., Alam, A., Rani, M., Ehtesham, N.Z. and Hasnain, S.E. (2017). Biofilms: Survival and defense strategy for pathogens. *International Journal of Medical Microbiology*, 307(8), 481-489.
- [76] Fracchia, L., Banat, J.J., Cavallo, M., Ceresa, C., Banat, I.M. (2015). Potential therapeutic applications of microbial surface-active compounds. *AIMS Bioengineering*, 2, 144-162.
- [77] Díaz de Rienzo, M., Stevenson, P., Marchant, R., Banat, I.M. (2016b). *P. aeruginosa* biofilm disruption using microbial biosurfactants. *Journal of Applied Microbiology*, 120, 868-876.
- [78] Chen, J., Wu, Q., Hua, Y., Chen, J., Zhang, H. and Wang, H. (2017). Potential applications of biosurfactant rhamnolipids in agriculture and biomedicine. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 101, 8309-8319.
- [79] Ghasemi, A., Moosavi-Nasab, M., Setoodeh, P., Mesbahi, G., Yousefi, G. Biosurfactant production by lactic acid bacterium *Pediococcus dextrinicus* SHU1593 grown on different carbon sources: Strain screening followed by product characterization. *Scientific Reports*, 9, 5287.
- [80] Efe, F. (2017). *Lactobacillus cinsi bakterilerde biyosürefektan üretimi ve biyosürefektanın Staphylococcus aureus bakterilerinin oluşturduğu biyofilmi engellemesi*. Yüksek Lisans Tezi. Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 67-77.

Bazı Salisiliden Anilin Schiff Bazlarının DMSO ve DMF Çözücülerinde Antibakteriyel AktiviteleriTuğçe D. Karaca¹, Aytaç Kocabaş^{*2}, Mehmet A. Akay³¹Gazi Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Gölbaşı/Ankara, 06830, Türkiye²Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Karaman, 70100, Türkiye³Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, Ankara, 06100, Türkiye**Öne Çıkanlar**

- DMSO ve DMF bakteriler üzerinde toksik etkiye sahiptir.
- DMF'nin toksik etkisi kimyasalların biyoaktivitelerini perdeleyebilmektedir.
- Salisiliden Anilin Schiff bazları gram negatif bakteriyel etki göstermiştir.

Makale Bilgileri

Geliş: 22/05/2022

Kabul: 09/08/2022

Anahtar Kelimeler

Schiff bazı,
Salisiliden Anilin,
Antibakteriyel etki,
Halogen sübstitüe

Öz

Günümüzde en önemli problemlerden birisi bakterilerde gözlemlenen çoklu antibiyotik dirençliliğidir. Bu sorun ülkelerin hem sağlık sektörünü hem de ekonomisini etkilemektedir. Mevcut antibiyotiklerin etkisiz kalması sağlık harcamalarına ayrılan bütçenin artmasına sebep olmaktadır. Bu soruna çözüm olarak yeni antimikrobiyal etkiye sahip kimyasallar yeni araştırmaların odak noktası olmuştur. Bu araştırmaların odak noktasını doğal bitkisel kaynaklar oluştursa da antibakteriyel etkiye sahip yeni kimyasalların sentezlenmesi de ön plana çıkmaktadır. Bu kimyasallar arasında Schiff bazları önemli bir yer tutmaktadır. Bu çalışmada da salisiliden anilin Schiff bazı ve onun 2-sübstitüe iyot, klor ve brom halojen türevi Schiff bazlarının hem DMSO hem de DMF'de antibakteriyel etkileri gram negatif *Escherichia coli* ve gram pozitif *Staphylococcus aureus*'a karşı ölçülmüştür. DMF'nin aşırı toksik etkisi kimyasalların biyoaktivitesini perdelemiştir. Buna karşılık, DMSO'da çözüdüren kimyasallar antibakteriyel etki göstermişlerdir. Kimyasalların gram negatif *E. coli*'ye karşı daha etkili oldukları gözlemlenmiştir. En düşük MİK değeri 135 µg/mL olarak belirlenmiş ve *E. coli*'ye karşı tüm Schiff bazları bu etkiyi göstermiştir. Dolayısıyla yeni sentezlenen Schiff bazların geleceğin antibiyotik çağına öncülleri olması muhtemeldir.

Antibacterial Activities of Some Salicylidene Aniline Schiff Bases in DMSO and DMF Solvents**Highlights**

- DMSO and DMF have toxic effects on bacteria.
- The toxic effect of DMF can mask the bioactivities of chemicals.
- Salicylidene aniline Schiff bases showed more effective antibacterial effect against gram negative bacteria.

Article Info

Received: 22/05/2022

Accepted: 09/08/2022

Keywords

Schiff's bases,
Salicylidene Aniline,
Antibacterial effect,
Halogen substitute

Abstract

One of the most important problems today is the multi-antibiotic resistance observed in bacteria. This problem affects both the health sector and the economy of countries. The ineffectiveness of existing antibiotics causes an increase in the budget allocated to health expenditures. As a solution to this problem, chemicals with new antimicrobial effects have been the focus of new research. Although natural plant sources are the focus of these studies, the synthesis of new chemicals with antibacterial effect is also prominent. Among these chemicals, Schiff bases have an important place. In this study, the antibacterial effects of salicylidene aniline Schiff base and its 2-substituted iodine, chlorine and bromine halogen derivative Schiff's bases were measured in both DMSO and DMF against gram negative *Escherichia coli* and gram positive *Staphylococcus aureus*. The extremely toxic effect of DMF masked the bioactivity of the chemicals. On the other hand, chemicals dissolved in DMSO showed antibacterial effects. It has been observed that the chemicals are more effective against gram negative *E. coli*. The lowest MIC value was determined as 135 µg/mL and all Schiff's bases showed this effect against *E. coli*. Thus, new synthesized Schiff bases are likely to be the precursors of the future antibiotic era.



Makale, Creative Commons 4.0 (CC BY NC SA) uluslararası lisansı altında açık erişim olarak yayımlanmaktadır.

* Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Aytaç Kocabaş, aytackocabas@gmail.com

1. GİRİŞ

Bulaşıcı hastalıklara bağlı ölüm oranındaki artış, antibiyotiklere karşı çoklu direnç gösteren bakterilerle doğrudan ilişkilidir [1]. Son yıllarda, çoklu direnç fenotiplerine sahip olanlar da dâhil olmak üzere çeşitli mikroorganizmalarda antibiyotik dirençleri tanımlanmıştır. Bu durum, Dünya Sağlık Örgütü'nün de belirttiği gibi endişe vericidir [2]. Etkili tedavilerin olmaması bu sorunun ana nedeni olarak belirtilmektedir. Bu nedenle son zamanlarda birçok araştırmalarda yeni terapötik alternatiflerin geliştirilmesine odaklanılmıştır. Özellikle bazı araştırmalarda alternatif olarak, mevcut antibiyotik sınıflarında bulunmayan yeni kimyasal özelliklere sahip yeni antibiyotik sınıflarının geliştirilmesinin önemi vurgulanmıştır [3,4]. Bu bağlamda Schiff bazları yeterince araştırılmamış bir alternatif sunmaktadır.

İlk olarak 1864 yılında Hugo Schiff tarafından önerilen Schiff bazı reaksiyonu [5]; Aldehitler (veya ketonlar) ve amino grupları içeren bileşikler arasında imin gruplarının oluşumuyla sonuçlanan reaksiyonu ifade eder ve yapısal olarak, bir Schiff bazı (imin veya azometin olarak da bilinir), karbonil grubunun (C=O) bir imin veya azometin grubu ile değiştirildiği bir aldehit veya ketonun bir nitrojen analogudur [6-8]. Dolayısıyla, Schiff bazı ligandlarının sentezlenmesi kolay olmakla birlikte hemen hemen tüm metal iyonları ile kompleks oluşturarak Schiff bazı/metal kompleksleri oluşturulabilmektedir [9]. Schiff bazların organik kimyadaki bu istisnai popülaritesi, ucuz malzemeler kullanan basit sentez tekniklerine bağlanmaktadır. Aslında, hâlâ literatürde farklı sentetik yollar tarif edilmeye devam etmektedir [10].

Schiff bazları, gelişmiş nanomalzemeler gibi endüstriyel kullanımlardan kemoterapötiklere ve yeni ilaç geliştirmeye kadar çeşitli alanlardaki geniş uygulamaları nedeniyle çok dikkat çekmiştir. Özellikle amino asitlerden türetilen Schiff baz komplekslerinin, yeni bir tür potansiyel antibakteriyel ve antikanser reaktifleri, anti-inflamatuar, DNA bölünmesi, ateş düşürücü gibi özellikler dahil olmak üzere geniş bir biyolojik aktivite yelpazesi göstermiştir [11].

Yeni antimikrobiyal maddelerin eldesi ile yeni bir soru daha ortaya çıkmıştır. Özellikle bu maddelerin araştırma aşamasında antimikrobiyal etkilerinin ortaya konabilmesi için uygun çözücüye ihtiyaç duyulmuştur. Genellikle bu tür moleküller suda veya sulu çözeltide çözünmezler ve uygun organik çözücülerin araştırılması gereklidir. Dimetil sülfoksit (DMSO) ve dimetil formamid (DMF), geleneksel antibiyotiklerin ve diğer çözülmesi zor anti-enfektif moleküllerin çözündürülmesi için kullanılan köklü çözücülerdir. Ayrıca, Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü kılavuzları gibi iyi kurulmuş antimikrobiyal duyarlılık testi protokolleri, etionami ve rifampin gibi çözünmeyen antibiyotikleri çözmek için bu çözücülerin kullanılmasını önerir. Bu nedenle, bu tür DMSO ve DMF çözücülerinden kaynaklanan herhangi bir potansiyel antimikrobiyal etkininde incelenmesi önemlidir [12].

Bu nedenle, bu çalışmada salisilaldehitten türetilen Schiff bazlarının (Salisiliden-3-iodoanilin, Salisiliden-3-chloroanilin, Salisiliden-3-bromoanilin) hem DMSO hem de DMF'de çözünürlüğüyle antibakteriyel aktivitelerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

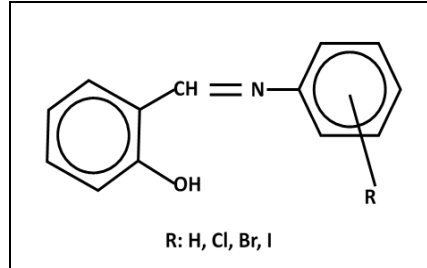
2.1. Materyal

Bu çalışmada kullanılan salisilaldehit, anilin, süstitüe anilinler Merck'ten alınmış ve saflaştırılmadan kullanılmıştır.

2.2. Schiff baz sentezi

Çalışılan Schiff bazları, salisilaldehit ile anilin ve kloro, bromo ve iyodo anilinlerin kondensasyonu sonucunda sentezlendi (Çizelge 1). Her sentezde 0,02 mol salisilaldehit ve 0,02 mol anilin ve anilin türevleri (2-,kloro, bromo ve iyodo anilinler) kullanıldı. 0,02 mol salisiladehit ve 0,02 mol anilin, 50 mL sıcak etanol içinde ayrı ayrı çözdürüldü ve ardından salisilaldehit çözeltisi, anilin çözeltisine ilave edildi. Salisilidenanilin için saat camı ile kaplanmış bir beher içindeki karışım 24 saat dinlenmeye bırakıldı. Schiff bazının kristal çökeltisi filtre kâğıdından süzüldü. Schiff bazı etanolden yeniden kristallendirilerek saflaştırıldı [13].

Çizelge 1. Schiff Baz ligandı ve onun halojen türevleri



R	Schiff bazı
H	Salisiliden Anilin (Ligand)
2-I	Salisiliden-2-iodoanilin
2-Cl	Salisiliden-2-chloroanilin
2-Br	Salisiliden-2-bromoanilin

2.3. Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesi

Çalışmada kullanılan tüm çözeltiler bekleme sonrası çökme olması sebebiyle çözeltiler taze olarak hazırlanarak kullanılmıştır. Schiff bazı çözeltileri hazırlarken, tüm Schiff bazları için hiç çökeltinin oluşmadığı maksimum kütle olarak 13 mg belirlenmiştir. Tartılan Schiff bazlarının üzerine konsantre ya Dimetil sulfoksit (DMSO, Formül: C_2H_6OS , yoğunluk: $1,1 g/cm^3$, Ma: $78,13 g/mol$) ya da dimetil formamid (DMF, Formül: C_3H_7NO , yoğunluk: $0,948$, Ma: $73,09 g/mol$) ilave edilerek çözünme sağlanmış ve daha sonra distile su (dH_2O):etanol (EtOh) (4:1 h/h) solüsyonu ile 1:5'e (h/h) seyreltilmiştir. Kontrol olarak Salisiliden Anilin (salisilidin anilin Schiff bazı: SA, Ma: $197 g/mol$), ve türevleri olan salisilidin-2-iyodoanilin (S2IA, Ma: $323 g/mol$), salisilidin-2-kloroanilin (S2KA, Ma: $231,5 g/mol$) ve salisilidin-2-bromoanilin (S2BA, Ma: $276 g/mol$) gram pozitif *Staphylococcus aureus* ve gram negatif *Escherichia coli* üzerinde test edilmiş ve eşit oranda seyreltilmiş DMSO ve DMF kullanılmıştır.

Disk Difüzyon Yöntemi

Elde edilen Schiff bazlarının bakterilere karşı antimikrobiyal aktivitelerini değerlendirmek için *E. coli* ile *S. aureus* bakterileri için öncelikle disk difüzyon yöntemi uygulanmıştır. Gece boyunca büyütülen bakteri kültürleri, McFarland 0,5 bulanıklığa ayarlanmış ve $100 \mu L$ kültür Mueller-Hinton agar plakalarına aşılmalıdır. $20 \mu L$ çözünmüş kimyasallar $6 mm$ 'lik steril disklere emdirilmiş ve agar besiyerine yerleştirilmiştir. Standart antibiyotik olarak penisilin G $10 mg/disk$, gentamisin $10 mg/disk$ ve tetrasiklin $30 mg/disk$ kullanılmıştır. Bakteriler 16-20 saat süreyle $35 ^\circ C$ 'de inkübe edilmiş ve tüm inhibisyon bölgelerinin çapları ölçülmüştür [14].

Minimum İnhibitör (MİK) ve Bakterisidal Konsantrasyon (MBK)

Bir gecede yetiştirilen bakteri kültürleri, bulanıklık McFarland 0,5'e ayarlandıktan sonra sıvı besi yeri ile 1:100 oranında seyreltilmiştir. Daha sonra 100µL bakteri kültürü eşit hacimde 1X, 0,5X, 0,25X, 0,125X ve 0,0615X konsantrasyonlarda kimyasal ile 1:1 (h/h) oranında mikropkaya kuyusunda karıştırılmıştır. 35 °C'de gece boyunca inkübasyondan sonra, MİK değeri görsel gözlem ile belirlenmiştir. Daha sonra kimyasalların bakterisidal / bakteriyostatik etkisini değerlendirmek için mikropkaya kuyularından 50 µL inokulum alınmış ve aynı koşullar altında inkübe edilen Mueller-Hinton agar üzerine inoküle edilmiştir. Agar plakta üreme olmayan en düşük kimyasal konsantrasyon MBK [15] olarak belirlenmiştir.

3. BULGULAR VE TARTIŞMA

Çalışmada Schiff bazlarının ve çözücülerin antimikrobiyal etkilerinin belirlenmesinden önce standart antibiyotikler olarak penisilin G (10 mg/disk), gentamisin (10 mg/disk) ve tetrasiklin (30 mg/disk) *Escherichia coli* ve *Staphylococcus aureus* karşı test edilmiştir (Çizelge 2). Denenen standart antibiyotikler her iki mikroorganizmaya karşı etkili bulundu. En düşük açıklık *S. aureus* için penisilin tarafından 14 mm olarak gözlemlendi. Tüm karışımlar için de öncelikle disk difüzyon yöntemi kullanıldı. Salisilidin-2-iyodoanilin (S2IA) DMSO karışımında çözünmezken DMF karışımında çözünmüştür. Bu aşamada kimyasal yüklenmiş disklerin sadece çevresinde temiz alan ölçüldü (6mm). Benzer sonuçlar negatif kontrol olarak test edilen DMSO kontrol karışımı (DMSO:EtOH:dH₂O 1:1:4) ve DMF kontrol karışımı (DMF:EtOH:dH₂O 1:1:4) içinde gözlemlendi ve sadece 6mm'lik bir temiz alan ölçüldü.

Çizelge 2. Standard antibiyotiklerin disk difüzyon ile antimikrobiyal etkileri

	Penisilin (mm)	Gentamisin (mm)	Tetrasiklin (mm)
<i>S. aureus</i>	14 - 15	18 -20	27-28
<i>E. coli</i>	19-20	24-24	20-22

Bu tarz çalışmalarda öncelikle bilinmesi ve göz önünde bulundurulması gereken konu çözücünün hem saf hem de sinerjistik etkisinin olabileceğidir. Bu çalışmada kullanılan DMSO'nun 1/10 dilüsyona kadar konsantrasyonda toksik etki gösterebildiği iyi bilinmektedir [16,17]. Disk difüzyon deneyinde 1/6 seyreltik DMSO yüklenen diskler etrafında temiz alan oluştu. Benzer şekilde DMF yüklenen diskler etrafında da temiz alan gözlemlendi. DMF'nin DMSO'ya göre daha toksik olduğu bilindiği için bunlar beklenen sonuçlardı. Ancak tüm kimyasallar içinde benzer sonuçlar elde edildi. Bunun sebebi olarak bu çalışmada kullanılan Schiff bazları hidrofobik bazlardı ve su içerisinde hiçbir şekilde çözülme göstermediler. Hatta DMSO:dH₂O 1:5 (h/h) karışımında dahi çökelmeler gözlemlendi. Bu sebepten maksimum konsantrasyonda Schiff baz çözeltisi elde edebilmek adına karışıma bir birim EtOH eklendi. Buna rağmen S2IA Schiff bazının DMSO çözeltisi elde edilemedi ve sadece DMF çözeltisi ile deneyler devam ettirildi.

Disk difüzyon yöntemini takiben MİK ve MBK antibakteriyel aktivite testleri gerçekleştirildi (Çizelge 3 ve 4). Schiff bazı konsantrasyonları 1,083mg/mL (1X) ila 0,068mg/mL (1/16X) aralığında denendi. Elde edilen veriler ışığında, DMF kontrol karışımının antibakteriyel etkisinin daha yüksek olduğunu ve bu etkinin gram negatif *E. coli* üzerinde daha yüksek olduğu gözlemlendi. DMSO kontrol karışımının MİK değeri 1/2 iken DMF kontrol karışımında *E. coli* için 1/4 ve *S. aureus* için 1/2 bulundu. DMF kontrol için bu değerler aynı zamanda MBK değerleri olarak da tespit edildi. DMSO kontrol karışımı için MBK değerleri en yüksek konsantrasyon değeri (1:5 DMSO:karışım h/h) olarak gözlemlendi. Buna karşılık DMF çözeltileri için Schiff bazların MBK değerleri tespit edilemedi. DMSO çözeltileri için ise MBK değerleri tüm Schiff bazlar için 1/2 (542 µg/mL) olarak belirlendi. Kimyasalların MİK değerleri değerlendirildiğinde *E. coli* için tüm Schiff bazların hem DMSO hem DMF değerleri 1/8 (135 µg/mL) olarak ölçüldü. *S. aureus* için ise S2KA Schiff bazının DMSO çözeltisi hariç diğer Schiff bazlara ait MİK değerleri 1/4 (271 µg/mL) olarak tespit edildi. Bunun yanında Schiff bazların DMSO çözeltilerinde MİK değerleri 1/8'lere kadar düştü ve MBK değerleri kontrolden farklı olarak gözlemlendi.

Çizelge 3. Schiff bazların MİK bulguları*

	DMSO					DMF				
	SA	S2IA	S2KA	S2BA	Cdmso*	SA	S2IA	S2KA	S2BA	Cdmf*
<i>E. coli</i>	1/8	DD	1/8	1/8	1/2	1/8	1/8	1/8	1/8	1/4
<i>S. aureus</i>	1/4	DD	1/2	1/4	1/2	1/4	1/4	1/4	1/4	1/2

*DD: Değerlendirme dışı; Cdmso: DMSO kontrol; Cdmf: DMF kontrol

Çizelge 4. Schiff bazların MBK bulguları*

	DMSO					DMF				
	SA	S2IA	S2KA	S2BA	Cdmso*	SA	S2IA	S2KA	S2BA	Cdmf*
<i>E. coli</i>	1/2	DD	1/2	1/2	1	1/4	1/4	1/4	1/4	1/4
<i>S. aureus</i>	1/2	DD	1/2	1/2	1	1/2	1/2	1/2	1/2	1/2

*DD: Değerlendirme dışı; Cdmso: DMSO kontrol; Cdmf: DMF kontrol

Çalışmanın bulgularını genel olarak ele aldığımızda, Schiff bazların etkisini belirlemede DMSO'nun daha etkin olduğunu gözlemledik. Benzer sonucu Baluja vd. (2015)[18] ve Kirkwood vd. (2018)[12] de çalışmalarında göstermişlerdir. DMF'nin DMSO'dan daha toksik etki göstermesi ve MBK etkilerinin gözlemlenmesini etkilemesi ve aynı şekilde MİK değerlerinde kimyasalların etkin değerlerinin kontrolün etkin konsantrasyonundan 2 kat daha seyreltik olarak elde edilmesi DMF'nin etkisinin Schiff bazların etkisini perdelediğini göstermektedir. Ancak burada DMF kontrol karışımının MİK değerinin 1/4 ve DMSO kontrol karışımının ise 1/2 olduğu göz önüne alınırsa DMF'nin kimyasalların antibakteriyel aktivitelerine sinerjistik bir etkisinin olmadığını da söyleyebiliriz.

Her ne kadar DMF çözeltilerinden elde edilen bulgular Schiff bazların aktivitelerini perdelesede DMSO çözeltilerini göz önünde bulundurduğumuzda Schiff bazların antibakteriyel aktivitelerine sahip oldukları gözlemlenmektedir (Çizelge 4). Hatta bulguları değerlendirdiğimizde *E. coli*'nin (gram negatif bakteri) hem salisiliden anilinden hem de türevlerinden daha fazla etkilendiğini söyleyebiliriz. Bu büyük olasılıkla, azalan elektrofiliğe bağlı olarak bakterinin membranı (özellikle gram negatif bakterilerin lipopolisakarit tabakası) ile Schiff bazları arasındaki etkileşimdeki artıştan kaynaklanmaktadır [19]. Çünkü, Mohamed ve diğerleri (2021) [19], salisiliden anilinin (F, Cl ve Br) halojenlerinin orto (o-; 1,2-), meta (m-; 1,3-), ve para (p-; 1,4-) pozisyonlarının reaktivite değişimi üzerindeki etkisi ile ilgili bir çalışma yürütmüştür ve halojenlerin pozisyonlarının metallere karşı yapının reaktivitesini hemen hemen değiştirmemesine rağmen, buldukları konumun yapıda elektrofiliği azalttığını bulmuşlardır.

Bu çalışmada Schiff bazların en düşük ve etkili konsantrasyonu olarak 135 µg/mL bulunmuştur. Literatür verileri incelendiğinde Schiff bazlarının metal komplekslerinin ligandın veya türevlerinin etkisini %50 hatta daha fazla artırdığı belirtilmiştir [20,21]. Hatta yeni yapılan bir çalışmada yeşil kimya yöntemi ile selüloz bazlı üretilen bir Schiff bazın bakır kompleksinin *E. coli* ve *S. aureus*'a karşı antibakteriyel etkinliği, ligandın kendisine kıyasla sırasıyla %472 ve %823 arttığı gösterilmiştir. Dolayısıyla ileride gerçekleştirilecek çalışmalarla farklı metaller denenerek ligandların etkin konsantrasyonları daha düşük seviyelere çekilerek ilaç etken maddesi olarak kullanım potansiyelleri artırılmış olacaktır.

Sonuç olarak, çoklu antibakteriyel dirençlilik bakteriler arasında yayılmaktadır ve ilerde hem sağlık sektöründe hem de ekonomik alanda daha çok zararlar verecektir. Bunun önlenmesi amacıyla yeni antibakteriyel maddelerin bulunması önem arz etmektedir. Yeni tür antibakteriyel maddeler arasında yeni Schiff bazların ve bunların türevlerinin önemi artmaktadır. Ancak endüstriyel üretim açısından ve ilerde sağlık sektöründe kullanımı açısından üretilen bu kimyasalların su bazlı ve hatta yeşil kimya teknolojileri ile üretilmesi kolaylıklar sağlayacaktır. Buna karşılık, moleküler etki mekanizmalarını araştırmak için hâlâ

uzun bir yol var. Bu nedenle, yeni modifikasyonların bulunması ve yeni Schiff bazlarının sentezlenmesi, yeni özelliklere sahip antibakteriyel, antimikrobiyal kimyasallar için yeni bir dönem açabilir.

ÇIKAR ÇATIŞMASI/ÇAKIŞMASI BİLDİRİMİ

Yazarlar arasında çıkar çatışması/çakışması bulunmamaktadır.

KAYNAKLAR

- [1] Mkpenie, V. N., Essien, E. E., & Mkpenie, I. V. (2015). Antimicrobial Activity Of Azo-Schiff Bases Derived From Salicylaldehyde And Para-Substituted Aniline. *World Journal of Pharmaceutical Research*, 4(12), 52–60.
- [2] Teran, R., Guevara, R., Mora, J., Dobronski, L., Barreiro-Costa, O., Beske, T., Pérez-Barrera, J., Araya-Maturana, R., Rojas-Silva, P., Poveda, A., & Heredia-Moya, J. (2019). Characterization of Antimicrobial, Antioxidant, and Leishmanicidal Activities of Schiff Base Derivatives of 4-Aminoantipyrine. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 24(15), 2696.
- [3] Allend, S. O., Garcia, M. O., da Cunha, K. F., de Albernaz, D. T. F., da Silva, M. E., Ishikame, R. Y., Panagio, L. A., Nakazaro, G., Reis, G. F., Pereira, D. B., & Hartwig, D. D. (2022). Biogenic silver nanoparticle (Bio-AgNP) has an antibacterial effect against carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* with synergism and additivity when combined with polymyxin B. *Journal of Applied Microbiology*, 132(2), 1036–1047.
- [4] Gigante, V., Sati, H., & Beyer, P. (2022). Recent advances and challenges in antibacterial drug development. *ADMET and DMPK*, 10(2), 147–151.
- [5] Schiff, H. (1864). Mittheilungen aus dem Universitätslaboratorium in Pisa: Eine neue Reihe organischer Basen. *Annalen Der Chemie Und Pharmacie*, 131(1), 118–119.
- [6] da Silva, C. M., da Silva, D. L., Modolo, L. V., Alves, R. B., de Resende, M. A., Martins, C. V. B., & de Fátima, A. (2011). Schiff bases: A short review of their antimicrobial activities. *Journal of Advanced Research*, 2(1), 1–8.
- [7] Abu-Dief, A. M., & Mohamed, I. M. A. (2015). A review on versatile applications of transition metal complexes incorporating Schiff bases. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, 4(2), 119–133.
- [8] Pervaiz, M., Sadiq, S., Sadiq, A., Younas, U., Ashraf, A., Saeed, Z., Zuber, M., & Adnan, A. (2021). Azo-Schiff base derivatives of transition metal complexes as antimicrobial agents. *Coordination Chemistry Reviews*, 447, 214128.
- [9] Xu, Y., Shi, Y., Lei, F., & Dai, L. (2020). A novel and green cellulose-based Schiff base-Cu (II) complex and its excellent antibacterial activity. *Carbohydrate Polymers*, 230, 115671.
- [10] Ceramella, J., Iacopetta, D., Catalano, A., Cirillo, F., Lappano, R., & Sinicropi, M. S. (2022). A Review on the Antimicrobial Activity of Schiff Bases: Data Collection and Recent Studies. *Antibiotics*, 11(2), 191.
- [11] Adam, M. S. S., Abdel-Rahman, L. H., Abu-Dief, A. M., & Hashem, N. A. (2020). Synthesis, catalysis, antimicrobial activity, and DNA interactions of new Cu(II)-Schiff base complexes. *Inorganic and Nano-Metal Chemistry*, 50(3), 136–150.
- [12] Kirkwood, Z., Millar, B., Downey, D., & Moore, J. (2018). Antimicrobial effect of dimethyl sulfoxide and N, N-Dimethylformamide on *Mycobacterium abscessus*: Implications for antimicrobial susceptibility testing. *International Journal of Mycobacteriology*, 7(2), 134.
- [13] Kılıç, E., Köseoğlu, F., Canel, E., & Akay, M. A. (1997). Potentiometric studies of copper(II) complexes of some substituted salicylideneanilines. *Indian Journal of Chemistry*, 36(A), 115–117.
- [14] Matuschek, E., Brown, D. F. J. F. J., & Kahlmeter, G. (2014). Development of the EUCAST disk diffusion antimicrobial susceptibility testing method and its implementation in routine microbiology laboratories. *Clinical Microbiology and Infection*, 20(4), O255–O266.
- [15] EUCAST. (2003). Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by broth dilution. *Clinical Microbiology and Infection*, 9(8), 9–15.
- [16] Afrin, T., Tsuzuki, T., Kanwar, R. K., & Wang, X. (2012). The origin of the antibacterial property of bamboo. *The Journal of The Textile Institute*, 103(8), 844–849.
- [17] Hassan, A. S. (2014). The Antibacterial Activity of Dimethyl Sulfoxide (DMSO) with and without of Some Ligand Complexes of the Transitional Metal Ions of Ethyl Coumarin against Bacteria Isolate from Burn and Wound Infection. *Journal of Natural Sciences Research*, 4(19), 106–111.
- [18] Baluja, S., Chanda, S., & Nandha, K. (2015). Antimicrobial Activity of some Pyrimidine Derivatives in DMF and DMSO. *International Letters of Chemistry, Physics and Astronomy*, 56, 131–141.
- [19] Mohamed, S., Djamel, B., & Eddine, H. S. (2021). Assessing the Effects of Substitution and Substituent Position on the Reactivity of Salicylideneaniline Ligands to Coordinate Transition Metal(II) Ions: a DFT Study. *Chemistry & Chemical Technology*, 15(3), 343–351.
- [20] Iqbal, J., Tirmızı, S. A., Wattoo, F. H., & Imran, M. (2006). Biological Properties of Chloro-salicylidene Aniline and Its Complexes with Co(II) and Cu(II). *Turkish Journal of Biology*, 30(1), 1–4.

[21] Patel, V., Trivedi, P., Gohel, H., & Khetani, D. (2014). Synthesis and Characterization of Schiff Base of p - chloro aniline and their Metal Complexes and their evaluation for Antibacterial Activity. *International Journal of Advances in Pharmacy, Biology and Chemistry*, 3(4), 999–1003.

Boşluk Taşıma Katmanının (HTL) Ters Çevrilmiş Organik Güneş Hücre Parametrelerine Etkisi

İdris Candan*¹, Yunus Özen^{2,3}, Barış Kınacı^{3,4}¹Kocaeli Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Fizik Bölümü, 41001, İzmit/Kocaeli, Türkiye²Gazi Üniversitesi, Fen Fakültesi, Fizik Bölümü, 06500, Ankara, Türkiye³Gazi Üniversitesi, Uygulamalı Bilimler Fakültesi, Fotonik Bölümü, 06500, Ankara, Türkiye⁴Gazi Üniversitesi, Fotonik Uygulama ve Araştırma Merkezi, 06500, Ankara, Türkiye

Öne Çıkanlar

- Boşluk taşıma katmanının (HTL) ters çevrilmiş organik güneş hücrelerine eklenmesi.
- HTL katmanı olarak kullanılan MoO₃'ün hücre parametrelerine etkisinin incelenmesi.
- Tersine çevrilmiş organik güneş hücrelerinde PCE değerinin HTL tabakası ile iyileştirilmesi.

Makale Bilgileri

Geliş: 22/09/2022

Kabul: 14/11/2022

Anahtar Kelimeler

Ters Çevrilmiş Organik Güneş Hücreleri,
Boşluk Taşıma Katmanı,
MoO₃,
Güneş Hücre Parametreleri

Öz

Yüksek performanslı organik güneş hücresi elde etmek için yapıyı oluşturan katmanlar arasında bant kaymasını minimuma indiren arayüz modifikasyonu gerekli ve hayati koşullardan biridir. Bu çalışmada, HTL katmanının ters çevrilmiş organik güneş hücrelerinde verimlilik değerine ve hücre parametrelerine etkisini araştırmak için boşluk taşıma katmanı (Hole Transport Layer, HTL) olmayan (Cam/ITO/ZnO/P3HT:PCBM/Ag) ve HTL olarak yapıya dâhil edilen MoO₃ ince film tabakalı (Cam/ITO/ZnO/P3HT:PCBM/MoO₃/Ag) iki tür aygıt üretildi ve karşılaştırıldı. Elektron taşıma katmanı (Elektron Transport Layer, ETL) için ZnO ve foto-aktif polimer tabakası P3HT:PCBM tabakaları dönel kaplama yöntemi kullanılarak kaplandı. HTL olarak kullanılan MoO₃ ince film tabakası termal buharlaştırma yöntemi kullanılarak üretildi. Kaplama sonrası ZnO, P3HT:PCBM ve MoO₃ ince film katmanlarının yüzey morfolojileri AFM görüntüleri yardımı ile analiz edildi. HTL olmadan ve HTL eklenerek üretilen güneş hücrelerinin fotovoltaiik hücre parametrelerini karşılaştırmak için tüm aygıtların AM 1.5 (1 Güneş) aydınlatma koşulu altında akım yoğunluğu (J) – voltaj (V) ölçümleri gerçekleştirildi. J-V grafiği kullanılarak, kısa devre akım yoğunluğu (JSC), açık devre voltajı (VOC), dolgu faktörü (FF), şönt direnci (RSH), seri direnç (RS) ve güç dönüşüm verimliliği (PCE) değerleri her iki aygıt için hesaplandı ve karşılaştırıldı. MoO₃ ince film tabakasının HTL olarak aygıt yapısına eklenmesi sonrasında JSC, FF ve RSH değerlerinin yükseldiği ve RS değerinin düştüğü görüldü. HTL eklenerek üretilen aygıtların PCE değerinin %0,89'dan %2,23'e çıktığı gözlemlendi.

Influence of The Hole Transporting Layer (HTL) on The Cell Parameters of Inverted Organic Solar Cells

Highlights

- Addition of the hole transport layer (HTL) to inverted organic solar cells.
- Investigation of the effect of MoO₃ as an HTL layer on cell parameters.
- Enhancement of PCE value with HTL layer in inverted organic solar cells.

Article Info

Received: 22/09/2022

Accepted: 14/11/2022

Keywords

Inverted Organic Solar cells,
Hole Transport Layer,
MoO₃,
Solar Cell Parameters

Abstract

To obtain high performance organic solar cells, interface modification that minimizes the large band offset between the layers forming the structure is one of the necessary and vital conditions. In this study, two different types of devices without an HTL (Glass/ITO/ZnO/P3HT:PCBM/Ag) and with an HTL of MoO₃ thin film layer (Glass/ITO/ZnO/P3HT:PCBM/MoO₃/Ag) were fabricated and compared to investigate the effect of HTL on the efficiency values and cell parameters of devices. The surface morphologies of ZnO, P3HT:PCBM and MoO₃ thin film layers were analyzed by using AFM images. To compare the photovoltaic cell parameters with and without HTL, current density (J) – voltage (V) measurements were performed on the devices under the illumination of AM 1.5 condition. The solar cell parameters of short-circuit current density (JSC), open-circuit voltage (VOC), fill factor (FF), shunt resistance (RSH), series resistance (RS), and power conversion efficiency (PCE) values for both devices were calculated and compared by using the J-V graph. It was observed that the values of JSC, FF and RSH increased, and the value of RS decreased after the MoO₃ thin film layer was added to the structure as an HTL. The PCE value increased from 0.89% to 2.23% by adding HTL.



Makale, Creative Commons 4.0 (CC BY NC SA) uluslararası lisansı altında açık erişim olarak yayımlanmaktadır.

* Sorumlu Yazar/Corresponding Author: İdris Candan, idris.candan@kocaeli.edu.tr



1. GİRİŞ

Yarı iletken polimerlere dayalı organik fotovoltaik güneş hücreleri, esnek yapıları, düşük sıcaklıktaki üretim teknikleri ve ucuz malzeme yapısına sahip olmalarından dolayı bu alanda çalışan araştırmacıların dikkatini çekmiş ve 1985'te keşfedilmelerinden bu yana büyük ilgi görmüştür [1–5]. Organik fotovoltaik malzemelerde donör-akseptör yapısının 1986 yılında geliştirilmesi ve bu yapılarda %1 civarında verimlilik elde edilmesinden sonra bulk heterojunction (bulk heterojunction, BHJ) yapıların daha verimli olduğu keşfedilmiş ve %18,2 verimlilik değeri elde edilmiştir [6–9]. BHJ mimarisine sahip güneş hücresi aygıtları çok katmanlı bir yapıya sahip olup her katman farklı bir teknik ile üretilmektedir. Foto-aktif soğurucu polimer tabaka bir donör (verici) materyal (genellikle bir konjuge polimer) bir de akseptör (alıcı) materyal (genellikle fulleren türevleri) olmak üzere iki bileşenin karışımından oluşur. Donör ve akseptör malzemelerin karışımı, eksiton (elektron-boşluk çifti) ayrışması için geniş bir arayüzey alanı sağlayan BHJ nanoyapısı oluşturur [10,11]. Elektromagnetik radyasyonun bu eklem bölgesinde absorpsiyonu sonucunda eksiton üretimi gerçekleşir. Bu eksitonların ayrışması (elektron ve boşluk olarak) ve bu oluşan serbest yük taşıyıcıların yapı içerisinde difüzyonu, katman içerisinde oluşan iç elektrik alan tarafından sağlanır.

BHJ yapısındaki basit bir organik güneş hücresi, saydam bir iletken anot (örneğin, İndiyum Kalay Oksit, ITO ve Florin Kalay Oksit, FTO) ve düşük iş fonksiyonuna (work function) sahip bir katot (örneğin, Al, Ca) arasına sıkıştırılmış aktif fotovoltaik polimer bir katmana sahip olacak şekilde tasarlanır. İş fonksiyonu, bir elektronu bir metalin yüzeyinden tümüyle koparmak için gerekli olan minimum enerji miktarıdır. Fakat bu tasarımda, aktif fotovoltaik tabaka içerisindeki donör-akseptör yapısı hem katot kontak hem de anot kontak ile direk temas hâlinindedir. Bu durum elektronların boşluk (hole) toplayıcı metal kontak noktasına aktarılması neticesinde akım kaçakları oluşturmakta ve verim kaybına sebep olmaktadır. Polimer tabanlı organik güneş hücrelerinde verim kaybına neden olan bir diğer durum ise, alt ve üst metal kontakların iş fonksiyonları ve foto-aktif katmanı oluşturan polimerlerin bant aralığı en yüksek dolu moleküler orbital seviyesi (HOMO) ve en düşük boş orbital seviyesi (LUMO) arasındaki geniş bant kayması nedeniyle arayüzeylerde yük taşıyıcıların rekombinasyonu meydana gelmekte ve bu durum da aygıtların foto akımının azalmasına neden olmaktadır [12]. Dolayısıyla, yüksek verim elde etmek için kaçak akımların önlenmesi, elektronların ve boşlukların tek ve ayrı yönlerde hareket etmesini sağlanması ve rekombinasyonun önlenmesi, polimer aktif bölge ile alt ve üst kontaklar arasındaki bant kaymasını minimuma indirmek için yük taşıyıcıyı türüne göre seçici ve uygun katmanların yapı içerisine dâhil edilmesi gerekmektedir [10,13,14].

Geleneksel yapıdaki organik güneş hücrelerinde saydam iletken oksit (transparent conductive oxide, TCO) olarak kullanılan ITO ve foto-aktif katman arasına bant kayasını minimuma indirmek ve yapıya boşluk enjeksiyonu için Poli Polistiren sülfonat (poly(3,4-ethylenedioxythiophene) polystyrene sulfonate, PEDOT: PSS) katmanı ve üst katot tampon katmanı olarak kalsiyum (Ca) kullanılmaktadır. Fakat bu şekilde tasarlanan aygıtlarda kalsiyum elektrotunun kararsızlığı ve oksitlenme probleminden dolayı elektrodun metalik bir durumdan oksitlenmiş bir duruma bozulmasına sebep olmaktadır. Ayrıca zamanla performans kaybı oluşmakta ve dolayısıyla güneş hücrelerinin verimliliği düşmektedir [15,16]. Shirakawa ve ekibi tarafından, oksitlenme problemini çözmek ve uzun ömürlü güneş hücreleri üretmek için 2004 yılında ters çevrilmiş organik güneş hücreleri (inverted organic solar cell) yapısı tasarlandı [17].

Ters çevrilmiş güneş hücre yapısında, oksidasyon problemini ortadan kaldırmak için üst metal elektrot için gümüş (Ag) ve altın (Au) gibi yüksek iş fonksiyonuna sahip metaller kullanılmaktadır. Bununla beraber, alt elektrot için de ITO veya FTO üzerindeki PEDOT:PSS katmanının asidik yapısından kaynaklanan problemleri ortadan kaldırmak için ise ITO veya FTO üzerine şeffaf bir elektron iletici katman (electron transport layer, ETL) olarak ZnO, TiO₂, SnO₂, Al₂O₃ ve In₂O₃ gibi metal oksit malzemeler kullanılmaktadır [18–20].

PEDOT:PSS geleneksel yapıdaki güneş hücrelerinde foto-aktif polimer katmanı üzerine kaplanan ve yaygın olarak kullanılan bir delik taşıma malzemesidir. Ancak, yukarıda belirtildiği gibi PEDOT:PSS asidik yapısı ve hidrofilik doğasından dolayı ters çevrilmiş organik hücre yapısında tercih edilen bir malzeme değildir. Ayrıca, hidrofobik foto-aktif polimer katmanı üzerine doğrudan hidrofilik PEDOT:PSS'i kaplamak çok zorlu süreçler gerektirmektedir [21]. Bu sorunları aşmak için ters çevrilmiş güneş hücrelerinde HTL tabakası olarak PEDOT:PSS yerine alternatif olarak termal buharlaştırma yöntemiyle kaplanabilen MoO_3 , V_2O_5 , CuO , WO_3 ve NiO gibi metal oksit malzemeler kullanılmaktadır [22]. Metal oksit malzemeler içerisinde özellikle, MoO_3 toksik olmayan yapısı, 5.5-6.7 eV değer aralığındaki çalışma fonksiyonu ve termal buharlaştırma yöntemi ile kolayca foto-aktif polimer tabaka üzerine kaplanabilmesi nedeniyle yaygın bir şekilde HTL tabakası olarak kullanılmaktadır [22–24].

Bu çalışmada, boşluk taşıma katmanının (hole transport layer, HTL) BHJ yapıdaki tersine çevrilmiş organik güneş hücrelerinin aygıt parametrelerine etkilerini araştırmak için HTL tabakası olmayan ve HTL olarak MoO_3 ince film katmanı kullanılan iki tür aygıt üretildi ve bu aygıtların güneş hücre parametreleri karşılaştırıldı. Foto-aktif soğurucu polimer tabaka için donör olarak Poly (3-hexylthiophene-2, 5-diyl) (P3HT) ve akseptör (alıcı) materyal olarak fullerene bazlı poly (6, 6-phenyl C61-butyric acid methyl ester) (PCBM) karışımı kullanıldı. Güneş hücre yapısını oluşturan katmanlardan ETL olarak kullanılan ZnO , polimer foto-aktif tabakası P3HT:PCBM ve HTL olarak kullanılan MoO_3 tabakalarının yüzey morfolojilerini incelemek için AFM görüntüleri elde edilerek incelendi. Üretilen aygıtların güneş hücre parametrelerini karşılaştırmak için aygıtların akım yoğunluğu (J) – voltaj ölçümleri (V) yapıldı ve hücre parametreleri hesaplanarak analiz edildi.

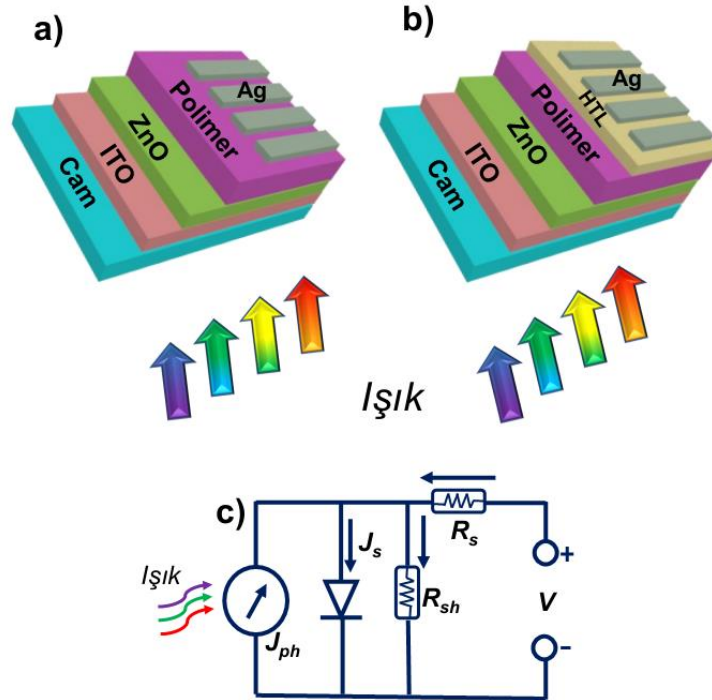
2. MATERYAL VE YÖNTEM

Bu çalışmada, hazır olarak temin edilen $10 \pm 5 \Omega/\text{m}^2$ direnç değerine sahip indiyum katkılı kalay oksit (ITO) kaplı camlar ters çevrilmiş polimer güneş hücresi üretmek için alttaş olarak kullanıldı. Kirliliğin deneysel üretim aşamalarını etkilememesi için tüm cam alttaşlar kullanılmadan önce temizlik işlemine tabi tutuldu. ITO kaplı cam üzerindeki organik kirliliği temizlemek için deterjan ve saf su dolu beher içerisinde ultrasonik olarak 15 dakika boyunca tutuldu. Daha sonra inorganik kirliliği temizlemek için, alttaşlar saf su ile durularak sodyum hidroksit (NaOH) solüsyonu (150 ml saf su içinde 15 gr NaOH) içeren temiz bir beher içerisine yerleştirildi, ultrasonik banyoda 15 dakika tutuldu ve sonrasında saf su ile durulandı. Son aşamada ITO kaplı camlar, izopropil alkol (IPA) içeren bir behere aktarıldı. 10 dakika ultrasonik banyoya tabi tutuldu ve yüksek saflıktaki azot (N_2) gazı ile kurutularak elektron taşıma katmanını (ETL) oluşturacak olan metal oksit (ZnO) kaplama işlemine geçildi.

Şekil 1 (a) ve Şekil 1 (b)'de verilen aygıt yapısında ETL görevi görecektir olan ZnO metal oksit katmanını kaplamak üzere, toz hâlindeki 100 mg çinko asetat dehidrat (Zinc acetate dehydrate), 0.28 g etanolamin (Sigma Aldrich, %99,5) ve 2-metoksi etanol (2-methoxy ethanol, Sigma Aldrich, %99,8) içinde çözülerek hava ortamında 12 saat boyunca manyetik karıştırıcı üzerinde tutularak bir çözelti hazırlandı. Cam/ITO/ ZnO yapısı elde etmek için, bu çözelti daha sonra iyi temizlenmiş ITO kaplı cam alttaşlar üzerine dönel kaplama cihazı (spin coating) yardımı ile ZnO film tabakası kalınlığının 25 nm ile 30 nm aralığında olması için 4000 rpm hızda 30 saniye sürede kaplandı. Sol-jel yöntemi kullanılarak kaplanan ZnO kaplı numuneler, sıcak yüzey (hot plate) üzerinde yerleştirildi ve 1 saat boyunca 200 °C'de ısıl işleme tabi tutuldu.

Foto-aktif polimer tabakası için hazır temin edilen Poly (3-hexylthiophene-2, 5-diyl) (P3HT) ve poly (6, 6-phenyl C61-butyrac acid methyl ester) (PCBM) kullanıldı. Polimer çözeltisi, eşit ağırlıkta P3HT ve PCBM polimerleri kullanılarak, diklorobenzen (dichlorobenzene) çözücüsü içerisinde konsantrasyonu 20 mg/mL olarak ayarlanarak homojen bir yapı elde etmek için 80 °C sıcaklıkta manyetik karıştırıcı üzerinde 14 saat tutularak elde edildi. Foto-aktif polimer tabakası, Cam/ITO/ZnO alttaşlar üzerine dönele kaplama (spin coating) sisteminde ilk aşamada 600 rpm hızda 20 s ve ardından 1100 rpm hızda 9 s parametreleri ve her bir numune için 25 µL polimer çözeltisi kullanılarak Cam/ITO/ZnO/Polimer yapısı elde edildi. Kaplamanın ardından örnekler, polimer tabakanın kuruması için oda sıcaklığında yaklaşık 15 dakika bekletildi. Polimer tabakanın kaplanmasından sonra kuruması için bekletilen numunelerin görüntüleri literatürden görülebilir [18]. Son aşamada, yapı içerisinde kalması istenmeyen kimyasalları buharlaştırmak için kuruyan örnekler sıcak yüzey (hot plate) üzerinde 5 dakika süresince 150 °C sıcaklıkta ısıl işleme tabi tutuldu.

Boşluk (hole) taşıma katmanının ters çevrilmiş organik güneş hücrelerindeki etkilerini araştırmak için boşluk katmanına sahip olmayan ve boşluk katmanına sahip aygıtlar üretildi. Cam/ITO/ZnO/Polimer/Ag ve Cam/ITO/ZnO/Polimer/MoO₃/Ag yapılarını elde etmek için, ilk aşamada, Cam/ITO/ZnO/Polimer yapısı üzerine vakum ortamında ve oda sıcaklığında boşluk taşıma tabakası olarak 10 nm kalınlığında MoO₃ ince film tabakası kaplandı ve Cam/ITO/ZnO/Polimer/MoO₃ yapısı elde edildi. Daha sonra Cam/ITO/ZnO/Polimer/MoO₃ yapısının bulunduğu vakum çemberi içerisine Cam/ITO/ZnO/Polimer yapısındaki aygıtlarda eklenerek ön metal kontak olarak kullanılmak üzere 100 nm kalınlığında gümüş (Ag) tabakası kaplandı. Şekil 1 (a) ve (b)'de verilen tersine çevrilmiş organik güneş hücre yapıları elde edildi. Tersine çevrilmiş güneş hücresi yapısında ışık cam tarafından gelmekte ve ITO ve ZnO tabakalarını geçerek foto aktif tabakaya ulaşmaktadır. Şekil 1 (c)'de elde edilen tersine çevrilmiş organik güneş hücrelerinin diyot şeması verilmiştir.



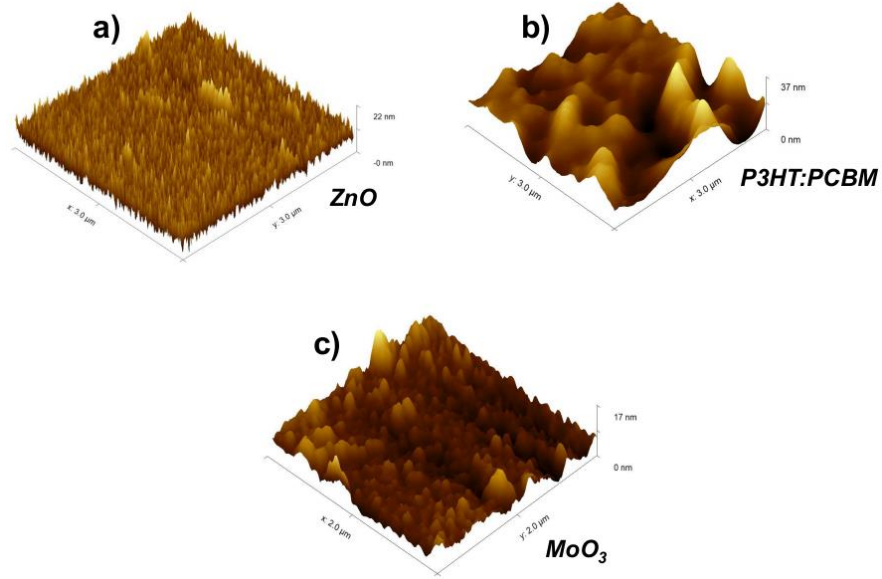
Şekil 1. Tersine çevrilmiş polimer güneş hücre yapısının a) HTL tabakası olmadan ve b) HTL tabakası ile şematik gösterimi c) Tersine çevrilmiş polimer güneş hücrelerinin diyot şeması.

Bu çalışmada üretilen elektron iletim tabakası olarak kullanılan çinko oksit (ZnO), polimer aktif tabakası P3HT:PCBM ve boşluk (hole) iletim tabakası olarak kullanılan molibden trioksit (MoO_3) tabakalarının yüzey analizleri için Atomik Kuvvet Mikroskobu (NanoMagnetics Instrument, AFM) kullanıldı. Boşluk tabakasına sahip olan ve boşluk tabakasına sahip olmayan tersine çevrilmiş organik güneş hücrelerinin verimliliği ve çıkış parametreleri değerleri karşılaştırmak için Keithley 4200 kaynak cihazlı bir I – V ölçüm sistemi kullanılarak Newport Oriel-Sol1A güneş simülatörü AM 1.5G (1 Güneş değeri, 0,1 W/cm²) aydınlatması altında bir I – V ölçümleri yapıldı ve sonuçlar karşılaştırıldı.

3. BULGULAR

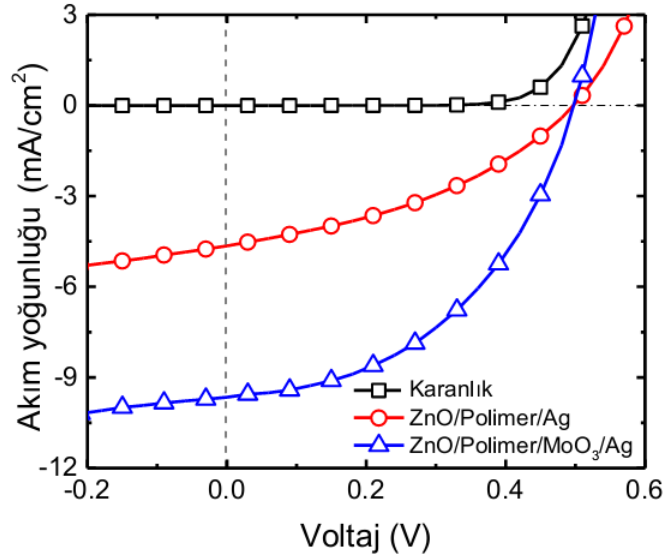
Bu çalışmada, tersine çevrilmiş organik güneş hücrelerinde boşluk taşıma katmanının (*hole transport layer, HTL*) hücre parametrelerine etkilerini araştırmak için HTL tabakalı Cam/ITO/ZnO/Polimer/MoO₃/Ag ve HTL tabakası olmayan Cam/ITO/ZnO/Polimer/Ag olmak üzere iki çeşit tersine çevrilmiş güneş hücresi üretildi ve hücre parametreleri karşılaştırıldı. Her iki aygıtta da elektron transfer katmanı (*ETL*) ZnO'dır, aktif polimer katman P3HT:PCBM'dir, ön kontak ITO ve arka metal kontak Ag'dir. Üretilen aygıtlardan biri HTL tabakasına sahiptir (*Cam/ITO/ZnO/Polimer/MoO₃/Ag*) ve HTL tabakası MoO₃'tür (Şekil 1 (b)).

Polimer aktif tabanlı tersine çevrilmiş güneş hücresi işlemleri yapılmadan önce hücreleri oluşturan katmanlar Atomik Kuvvet Mikroskobu (*Atomic Force Microscopy, AFM*) kullanılarak yüzey morfolojileri incelendi. Dönel kaplama sistemi üretilen ZnO ve P3HT:PCBM ile termal buharlaştırma yöntemi ile üretilen MoO₃ film yüzeylerinden elde edilen üç boyutlu (3D) yüzey görüntüleri Şekil 2'de verilmiştir.



Şekil 2. Elektron iletim tabakası olarak kullanılan çinko oksit (ZnO), b) polimer aktif tabakası P3HT:PCBM ve c) boşluk (hole) iletim tabakası olarak kullanılan molibden trioksit (MoO_3) tabakalarının AFM görüntüsü

Şekil 2’de görüldüğü gibi, pik yükseklikleri ZnO tabakası için 22 nm, polimer aktif tabakası P3HT:PCBM için 37 nm ve molibden trioksit (MoO_3) tabakası için 17 nm olarak ölçüldü. Ayrıca, ZnO (Şekil 2 (a)), P3HT:PCBM (Şekil 2 (b)) ve MoO_3 (Şekil 2 (c)) ince film tabakalarının AFM görüntülerinden elde edilen ortalama pürüzlülük (*average roughness*) değerlerinin sırayla 1.15 nm, 1.93 nm ve 1.49 nm olduğunu görüldü. Bu görüntüler incelendiğinde, ince filmlerin yüzeylerinde az miktarda ve bölgesel yığılmalara rastlansa da filmlerin yüzey üzerine neredeyse düzgün bir şekilde dağıldığı görülmektedir. İnce filmlerin üretimi sırasında farklı bölgelerde görülen az miktardaki yığılmanın nedeninin, kullanılan cam tabanların yüzey özelliklerinden ve üretim sonrası uygulanan ısıl işlemlerden kaynaklandığı düşünülmektedir. Şekil 2 (a) ve Şekil 2 (c) de görüldüğü gibi ZnO ve MoO_3 ince filmler kristal yüzey morfolojisine sahiptir. HTL tabakasının ters çevrilmiş organik güneş hücrelerinin fotovoltaik hücre parametrelerine etkisini incelemek için MoO_3 katmanlı ve MoO_3 katmanı olmadan üretilen aygıtlara AM 1.5 güneş simülatörü aydınlatma koşulu altında DC bias voltajı uygulanarak akım yoğunluğu (*current density, J*) – voltaj (*voltage, V*) ölçümleri gerçekleştirildi. Cam/ITO/ZnO/Polimer/ MoO_3 /Ag ve HTL tabakası olmayan Cam/ITO/ZnO/Polimer/Ag aygıtları için elde edilen karanlık ortamda ve AM 1.5 güneş simülatörü aydınlatması altında elde edilen *J-V* performans grafikleri Şekil 3’te verilmiştir.



Şekil 3. Polimer güneş hücrenin karanlık, MoO_3 tabakası olmadan ve MoO_3 tabakası ile AM 1.5 güneş simülatörü aydınlatma altında akım yoğunluğu (*J*) – voltaj (*V*) grafiği.

Şekil 3’te verilen *J-V* grafiği kullanılarak üretilen ters organik güneş pillerinin hücre parametreleri hesaplanarak elde edilen veriler Çizelge 1’de verilmektedir. *J-V* grafiği kullanılarak, kısa devre akım yoğunluğu (*short circuit current density, J_{SC}*), açık devre voltajı (*open circuit voltage, V_{OC}*), dolgu faktörü (*fill factor, FF*), şönt direnci (*shunt resistance, R_{SH}*), seri direnç (*series resistance, R_S*) ve güç dönüşüm verimliliği (*power conversion efficiency, PCE*) değerleri her iki aygıt için hesaplanarak analiz edildi ve karşılaştırıldı. *J-V* grafiğinden, *J_{SC}* ve *V_{OC}* değerleri *J* ve *V* eksenlerindeki kesişimler kullanılarak doğrudan belirlenebilmekte fakat diğer parametreler için hesaplamalar yapmak gerekmektedir.

Çizelge 1. Polimer güneş hücresinin MoO_3 olmadan ve MoO_3 var iken AM 1.5 güneş simülatörü aydınlatması altında elde edilen güneş hücresi parametreleri.

Numune	J_{sc} (mA/cm ²)	V_{OC} (V)	FF (%)	R_{sh} (Ω/cm ²)	R_s (Ω/cm ²)	PCE (%)
ZnO/Polimer/Ag	4.65	0.5	38	264.45	40.08	0.89
ZnO/Polimer/ MoO_3 /Ag	9.66	0.5	46	431.71	13.01	2.23

J - V ölçümlerinden elde edilen ve Şekil 3'te verilen J - V eğrilerinin dikey J eksenini kestiği noktalar J_{SC} değerlerini vermektedir

$$J_{SC} = \frac{I_{SC}}{A}. \quad (1)$$

Verilen eşitlikte A değeri aktif alan olarak adlandırılır. Bu çalışmada kullanılan tüm aygıtlar için aktif alan 8.2 mm² değerindedir. Çizelge 1'den görüldüğü gibi, boşluk taşıma katmanı yapıya eklendiğinde J_{SC} değeri kayda değer şekilde artmaktadır. HTL tabakası eklenmeden üretilen aygıtın J_{SC} değeri 4.65 mA/cm² olarak hesaplanırken, HTL tabakası olarak MoO_3 tabakası aygıt yapısına eklendiğinde J_{SC} değeri kayda değer bir şekilde artmış ve 9.46 mA/cm² olarak hesaplanmıştır. Aktif bölge içerisinde oluşan elektron-boşluk çiftlerinin ayrışması sonrasında elektronları engelleyen katmanın yani HTL tabakasının olmaması elektronların çift yönlü akışına sebep olmakta ve hem ön kontak hem de arka kontak noktalarına akan elektronlar boşluklar ile rekombinasyonu neticesinde J_{SC} değerinin düşük çıkmasına sebep olmakta ve aygıt verimine ciddi oranda etki etmektedir.

Açık devre gerilimi (V_{OC}), güneş hücresinin açık devre yani devre akımının sıfır olduğu ($J_{SC} = 0$) anda doğrudan ölçülebilen voltaj değeridir. Bu çalışmada, HTL olan ve olmayan güneş hücreleri için 0.5 V değeri ölçülmüştür.

Dolgu faktörü (*fill factor*, FF), güneş hücrelerinden elde edilebilecek en yüksek verimi belirleyen önemli parametrelerden biridir. FF , güneş hücresinin maksimum gücünün (*maksimum gerilim ile maksimum akım yoğunluğunun çarpımı*, $J_M \cdot V_M$) üretimine (*açık devre voltajı ile kısa devre akım yoğunluğunun çarpımı*, $J_{SC} \cdot V_{OC}$) oranı olarak tanımlanmaktadır

$$FF = \frac{J_M \cdot V_M}{V_{OC} \cdot J_{SC}}. \quad (2)$$

Şekil 3'te verilen J - V eğrileri kullanılarak HTL olmayan aygıtlarda FF değeri %38 olarak hesaplanırken, HTL olan aygıtlarda dolgu faktörü %46 olarak hesaplanmıştır.

Güneş hücrelerindeki seri direnç (R_s), ön ve arka metal kontakların kendi omik dirençleri ile bu kontakların elektron ve boşluk taşıma katmanları arasındaki temas neticesinde oluşan dirençler ve polimer aktif bölgedeki verici ile ön ve arka kontağa doğru oluşan tabandaki akım hareketinden kaynaklanmaktadır [25,26]. Güneş hücrelerinin verimini artırmak için seri direnç mümkün olduğu kadar düşük seviyelerde olmalıdır. Seri direnç değeri, güneş hücresinin kalınlığını arttırma, gelen ışık şiddetini optimize etme ve hücre sıcaklığını düşük düzeylerde tutma gibi prosesler ile azaltılabilmektedir. Öte yandan, güneş hücreleri içerisinde şönt direnci (R_{SH}) yüksek değerli olmalıdır. Genel olarak, düşük şönt direnci, ideal olmayan p-n eklem bağlantılarının yakınlarındaki safsızlıkların bir sonucudur ve ışık kaynaklı akımın alternatif bir akım yolu sağlayarak bağlantının kısa devre olmasına neden olarak güneş hücreleri içerisinde güç kayıplarına sebep olmaktadır. İdeal bir fotovoltaiik güneş hücresinde seri direncin sıfır ve paralel direncin ise sonsuz olduğu varsayılır [27].

Çizelge 1'den görüldüğü gibi, HTL olmayan güneş hücresi için R_s değeri 40.08 Ω olarak hesaplanırken, HTL eklenmiş aygıt için R_s değeri 13.01 Ω olarak hesaplanmıştır. R_{SH} değeri ise HTL olmayan güneş hücresi için 264.45 Ω olarak hesaplanırken, HTL eklenmiş güneş hücresi için 431.71 Ω olarak hesaplandı.

MoO₃ tabakasının güneş hücrelerine HTL olarak eklenmesinden sonra beklendiği gibi seri direnç değerinde düşüş ve şönt direncinde ise artış meydana gelmiştir.

J-V ölçümlerinden elde edilen Şekil 3'te verilen *J-V* eğrilerinden elde edilen kısa devre akım yoğunluğu (J_{SC}), açık devre voltajı (V_{OC}) ve dolgu faktörü (FF) değerleri ve aşağıda verilen eşitlik kullanılarak HTL olmayan ve HTL eklenmiş aygıtlar için güç dönüşüm verimliliği (*power conversion efficiency, PCE*) hesaplandı [28,29]

$$\eta = \frac{J_{SC} \cdot V_{OC} \cdot FF}{P_{in}} \quad (3)$$

Bu eşitlikteki P_{in} , aygıtta gelen ışık şiddetinin değeridir. HTL olmayan aygıtta *PCE* değeri %0,89 olarak hesaplanırken, HTL eklenmiş aygıtta *PCE* değeri %2,23 olarak hesaplanmıştır. *PCE* değerindeki bu artışın farklı birkaç nedenden kaynaklanmaktadır. Ana nedenlerden biri, HTL tabakasının eklenmesi ile seri direnç (R_s) değerinin düşmesi ve kısa devre akım yoğunluğu (J_{SC}) değerindeki artış olarak söylenebilir. Dolayısı ile, seri direncin düşmesi aygıt içerisindeki yük taşıyıcılarının mobilitesinin artmasına sebep olmuştur. Ayrıca MoO₃ ince film tabakasının yapıya eklenmesi, aktif polimer katman P3HT:PCBM ile gümüş (Ag) metal kontak arasındaki doğrudan teması engellemiştir. Diğer bir neden ise, ince film hâlindeki MoO₃ tabakasının yapıya boşluk (hole) enjeksiyonunu büyük ölçüde arttırarak seri direnç değerinin azalmasında yol açmıştır [30,31]. HTL tabakasının eklenmesi ile *PCE* değerinin artmasına sebep olan diğer bir olasılık ise, polimer foto-aktif bölgede oluşan elektron-delik çiftlerinin ayrılması sonrasında elektronların Ag metal kantağa geçmesini engelleyen bir bariyerin varlığıdır. MoO₃ tabakası boşlukları (holes) seçerek Ag metal kantağa geçirirken, elektronları da engelleyerek bunların ITO tarafına geçmesini ve bu kontak üzerinden toplanmasını ve *PCE* değerinin artmasını sağlar [32].

4. TARTIŞMA

Bu çalışmada, P3HT:PCBM polimer tabanlı tersine çevrilmiş güneş hücrelerinde boşluk taşıma katmanı (hole transport layer, HTL) olarak kullanılan MoO₃ ince film tabakasının hücre parametrelerine etkileri araştırıldı. HTL tabakası olmayan Cam/ITO/ZnO/Polimer/Ag ve HTL tabakası olarak MoO₃ ince film kullanılan Cam/ITO/ZnO/Polimer/MoO₃/Ag yapılarında güneş hücresi aygıtları üretildi ve analizleri yapıldı. Güneş hücresini oluşturan katmanlardan ZnO, foto-aktif polimer (P3HT:PCBM) ve MoO₃ katmanlarının AFM görüntüleri alınarak yüzey morfolojileri incelendi. Elde edilen veriler analiz edildiğinde yapıyı oluşturan ince filmlerin yüzeylerinde alttaş olarak kullanılan cam tabanların yüzey pürüzlülüğünden ve üretim sonrası uygulanan ısıl işlemlerden kaynaklanan az miktarda ve bölgesel yığılmalar haricinde filmlerin yüzey üzerine neredeyse düzgün bir şekilde dağıldığı görüldü. HTL olmadan ve HTL eklenerek üretilen aygıtlar, AM 1.5 güneş radyasyonu aydınlatma koşulu altında akım yoğunluğu–voltaj (*J-V*) ölçümleri gerçekleştirildi. *J-V* grafiği kullanılarak, her iki aygıtın sahip olduğu kısa devre akım yoğunluğu (J_{SC}), açık devre voltajı (V_{OC}), dolgu faktörü (FF), şönt direnci (R_{SH}), seri direnç (R_s) ve güç dönüşüm verimliliği (*PCE*) değerleri hesaplandı ve karşılaştırıldı.

MoO₃ tabakasının HTL olarak aygıt yapısına eklenmesi sonrasında J_{SC} değeri 4.65 mA/cm²'den 9.46 mA/cm²'ye çıktığı ve V_{OC} değerinin 0.5 V'ta sabit kaldığı görüldü. Benzer şekilde, FF ve R_{SH} değerlerinin HTL eklenmesi sonrasında sırayla %38 ve 264.45 Ω'dan %46 ve 431.71 Ω'a çıktığı gözlemlendi. R_s değeri ise HTL olmayan aygıt için 40.08 Ω olarak hesaplanırken, HTL eklendikten sonra azalarak 13.01 Ω değerini aldığı görüldü. Üretilen güneş hücresi aygıtlarının HTL eklendikten sonra bu parametrelerindeki iyileşmeler aygıtların *PCE* değerine de etkilediği ve *PCE* değerinin %0,89'dan %2,23'e çıktığı gözlemlendi.

Sonuç olarak, ince film MoO₃ boşluk taşıma katmanının (HTL) polimer tabanlı tersine çevrilmiş güneş hücrelerine eklenmesi aygıtların performanslarına olumlu yönde etkiler yapmış ve hücre parametrelerin iyileşmesine ve verimliliğinin artmasına sebep olduğu gözlemlenmiştir.

ÇIKAR ÇATIŞMASI/ÇAKIŞMASI BİLDİRİMİ






Yazarlar arasında çıkar çatışması/çakışması bulunmamaktadır.

KAYNAKLAR

- [1] C.W. Tang, (1986). Two-layer organic photovoltaic cell. *Appl. Phys. Lett.*, 48, 183.
- [2] W. Ma, C. Yang, X. Gong, K. Lee, A.J. Heeger, (2005). Thermally Stable, Efficient Polymer Solar Cells with Nanoscale Control of the Interpenetrating Network Morphology. *Adv. Funct. Mater.*, 15, 1617–1622.
- [3] H.J. Snaith, A.C. Arias, A.C. Morteani, C. Silva, R.H. Friend, (2002). Charge Generation Kinetics and Transport Mechanisms in Blended Polyfluorene Photovoltaic Devices. *Nano Lett.* 2, 1353–1357.
- [4] M. Al-Ibrahim, S. Sensfuss, J. Uziel, G. Ecke, O. Ambacher, (2005). Comparison of normal and inverse poly(3-hexylthiophene)/fullerene solar cell architectures. *Sol. Energy Mater. Sol. Cells.*, 85, 277–283.
- [5] A.K.K. Kyaw, X.W. Sun, C.Y. Jiang, G.Q. Lo, D.W. Zhao, D.L. Kwong, (2008). An inverted organic solar cell employing a sol-gel derived ZnO electron selective layer and thermal evaporated MoO₃ hole selective layer. *Appl. Phys. Lett.*, 93, 221107.
- [6] C.W. Tang, (1986). Two-layer organic photovoltaic cell. *Appl. Phys. Lett.*, 48, 183–185.
- [7] G. Yu, J. Gao, J.C. Hummelen, F. Wudl, A.J. Heeger, (1995). Polymer Photovoltaic Cells: Enhanced Efficiencies via a Network of Internal Donor-Acceptor Heterojunctions. *Science*, 270, 1789–1791.
- [8] G. Dennler, M.C. Scharber, C.J. Brabec, (2009). Polymer-Fullerene Bulk-Heterojunction Solar Cells. *Adv. Mater.*, 21, 1323–1338.
- [9] NREL, Best Research - Efficiency Chart <https://www.nrel.gov/pv/assets/pdfs/best-research-cell-efficiencies-rev220630.pdf> Access date: 09.13.2022, (n.d.).
- [10] A. Facchetti, (2013). Polymer donor–polymer acceptor (all-polymer) solar cells. *Mater. Today*, 16, 123–132.
- [11] X. Liu, H. Kim, L.J. Guo, (2013). Optimization of thermally reduced graphene oxide for an efficient hole transport layer in polymer solar cells. *Org. Electron.*, 14, 591–598.
- [12] J. Kettle, H. Waters, M. Horie, S.-W. Chang, (2012). Effect of hole transporting layers on the performance of PCPDTBT : PCBM organic solar cells. *J. Phys. D: Appl. Phys.*, 45, 125102.
- [13] R.A. Street, K.W. Song, J.E. Northrup, S. Cowan, (2011). Photoconductivity measurements of the electronic structure of organic solar cells. *Phys. Rev. B.*, 83, 165207.
- [14] R.A. Street, (2011). Localized state distribution and its effect on recombination in organic solar cells. *Phys. Rev. B.*, 84 075208.
- [15] M. Jørgensen, K. Norrman, F.C. Krebs, (2008). Stability/degradation of polymer solar cells. *Sol. Energy Mater. Sol. Cells*, 92, 686–714.
- [16] B. Paci, A. Generosi, V. Rossi Albertini, P. Perfetti, R. de Bettignies, C. Sentein, (2008). Time-resolved morphological study of organic thin film solar cells based on calcium/aluminium cathode material. *Chem. Phys. Lett.*, 461, 77–81.
- [17] T. Shirakawa, T. Umeda, Y. Hashimoto, A. Fujii, K. Yoshino, (2004). Effect of ZnO layer on characteristics of conducting polymer/C 60 photovoltaic cell. *J. Phys. D: Appl. Phys.*, 37847–850.
- [18] İ. Candan, Y. Özen, (2019). P3HT:PCBM Fotoaktif Tabanlı Tersine Çevrilmiş Polimer Güneş Hücrelerinin Üretimi ve Karakterizasyonu. *Gazi Üniversitesi Fen Bilim. Derg. Part C Tasarım ve Teknol.*, 7, 916–926.
- [19] N. Oka, S. Yamada, T. Yagi, N. Taketoshi, J. Jia, Y. Shigesato, (2014). Thermophysical properties of SnO 2 -based transparent conductive films: Effect of dopant species and structure compared with In 2 O 3 -, ZnO-, and TiO 2 -based films. *J. Mater. Res.*, 291579–1584.
- [20] H. Cheun, C. Fuentes-Hernandez, J. Shim, Y. Fang, Y. Cai, H. Li, A.K. Sigdel, J. Meyer, J. Maibach, A. Dindar, Y. Zhou, J.J. Berry, J.-L. Bredas, A. Kahn, K.H. Sandhage, B. Kippelen, (2012). Oriented Growth of Al₂O₃:ZnO Nanolaminates for Use as Electron-Selective Electrodes in Inverted Polymer Solar Cells. *Adv. Funct. Mater.*, 22, 1531–1538.
- [21] C. Liu, J. Tu, X. Hu, Z. Huang, X. Meng, J. Yang, X. Duan, L. Tan, Z. Li, Y. Chen, (2019). Enhanced Hole Transportation for Inverted Tin-Based Perovskite Solar Cells with High Performance and Stability. *Adv. Funct. Mater.*, 291808059.
- [22] H.N. Tran, D.Q. Dao, Y.J. Yoon, Y.S. Shin, J.S. Choi, J.Y. Kim, S. Cho, (2021). Inverted Polymer Solar Cells with Annealing-Free Solution-Processable NiO. *Small*, 17, 2101729.
- [23] Y. Wang, Q. Luo, N. Wu, Q. Wang, H. Zhu, L. Chen, Y.-Q. Li, L. Luo, C.-Q. Ma, (2015). Solution-Processed MoO₃ :PEDOT:PSS Hybrid Hole Transporting Layer for Inverted Polymer Solar Cells. *ACS Appl. Mater. Interfaces.*, 7, 7170–7179.

- [24] I. Irfan, A. James Turinske, Z. Bao, Y. Gao, (2012). Work function recovery of air exposed molybdenum oxide thin films. *Appl. Phys. Lett.*, 101, 093305.
- [25] Ü. Murat, S. Çamur, B. Arifoğlu, (2013). *Fotovoltaik hücrenin tek diyot eşdeğer devre parametrelerinin çıkarılması ve MATLAB/SIMULINK modeli*, in: *5. Enerji Veriml. ve Kalitesi Sempozyumu*. Kocaeli, 232–236.
- [26] M. Kul, (1989). *Güneş pili seri direncinin belirlenmesi ile ilgili yöntemler (Yüksek Lisans Tezi)*, Anadolu Üniversitesi.
- [27] W. Kim, W. Choi, (2010). A novel parameter extraction method for the one-diode solar cell model. *Sol. Energy*, 84, 1008–1019.
- [28] J. Nelson, (2003). *The Physics of Solar Cells*, Imperial College Press. London.
- [29] C. Zafer, M. Kus, G. Turkmen, H. Dincalp, S. Demic, B. Kuban, Y. Teoman, S. Icli, (2007). New perylene derivative dyes for dye-sensitized solar cells. *Sol. Energy Mater. Sol. Cells*, 91, 427–431.
- [30] M. Kröger, S. Hamwi, J. Meyer, T. Riedl, W. Kowalsky, A. Kahn, (2009). Role of the deep-lying electronic states of MoO₃ in the enhancement of hole-injection in organic thin films. *Appl. Phys. Lett.*, 95, 123301.
- [31] P.R. Brown, R.R. Lunt, N. Zhao, T.P. Osedach, D.D. Wanger, L.Y. Chang, M.G. Bawendi, V. Bulović, (2011). Improved current extraction from ZnO/PbS quantum dot heterojunction photovoltaics using a MoO₃ interfacial layer. *Nano Lett.*, 11, 2955–2961.
- [32] Patel, V., Trivedi, P., Gohel, H., & Khetani, D. (2014). Synthesis and Characterization of Schiff Base of p - chloro aniline and their Metal Complexes and their evaluation for Antibacterial Activity. *International Journal of Advances in Pharmacy, Biology and Chemistry*, 3(4), 999–10.

Laktitolün Genotoksik ve Sitotoksik Etkilerinin İncelenmesi

Ece Avuloğlu Yılmaz*¹ , Sevcan Mamur² , Esra Erikel³ ,
Deniz Yüzbaşıoğlu³ , Fatma Ünal³ 

¹Amasya Üniversitesi Teknik Bilimler Meslek Yüksekokulu, Sağlık Bilgi Sistemleri Teknikerliği Programı, 05100, Amasya, Türkiye

²Gazi Üniversitesi, Yaşam Bilimleri Uygulama ve Araştırma Merkezi, 06830, Ankara, Türkiye

³Gazi Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 06500, Ankara, Türkiye

Öne Çıkanlar

- Laktitol tatlandırıcılar sınıfına dâhil bir gıda katkı maddesidir.
- Laktitolün olası genotoksik etkisi comet testi ile insan lenfositlerinde değerlendirilmiştir.
- Laktitolün sitotoksitesi MTT testi ile BHK-21 An 31 yavru hamster böbrek hücrelerinde incelenmiştir.
- Sonuçta laktitolün önemli bir genotoksik ve sitotoksik etki sergilemediği tespit edilmiştir.

Makale Bilgileri

Geliş: 13/10/2022

Kabul: 16/11/2022

Anahtar Kelimeler

Laktitol,
Genotoksisite,
Sitotoksisite,
Comet,
MTT

Öz

Laktitol bir poliol (şeker alkolü) olup tatlandırıcı olarak kullanılan bir gıda katkı maddesidir. Tatlılar, sakızlar, hamur işleri ve ekmekler gibi sık tüketilen gıdalarda bulunmakla birlikte bazı farmasötiklerde de bulunmaktadır. Kullanımları sürekli artan gıda katkı maddelerinin sağlığa olan etkileri de çokça tartışılmaktadır. Genotoksisite, biyolojik, fiziksel veya kimyasal herhangi bir ajanın DNA hasarına neden olabileceği potansiyeli olarak tanımlanır ve söz konusu hasarın mutasyona neden olabileceği kabul edilmektedir. Sitotoksisite testleri, maddelerin çeşitli dokulara ya da hücrelere toksisitesini belirlemek için kullanılır. Bu çalışmada, laktitolün genotoksik ve sitotoksik etkisini değerlendirmek amacıyla comet ve MTT testleri kullanılmıştır. Comet testi sağlıklı iki donörden alınan kan örneklerinden izole edilen lenfositlerde, MTT testi ise BHK-21 An 31 yavru hamster böbrek hücrelerinde gerçekleştirilmiştir. Hücrelere laktitolün (125 µg/mL sadece MTT testinde), 250, 500, 1000, 2000 ve 4000 µg/mL'lik konsantrasyonlarıyla comet testinde 1 saat, MTT testinde 24 saat muamele edilmiştir. Sonuçta laktitolün önemli bir genotoksik ve sitotoksik etki göstermediği tespit edilmiştir. Ancak bu sonuçların farklı test yöntemleri ve hücre grupları ile desteklenmesi gereklidir.

Investigation of Genotoxic and Cytotoxic Effects of Lactitol**Highlights**

- Lactitol is a food additive included in the sweeteners class.
- The possible genotoxic effect of lactitol was evaluated in human lymphocytes by the comet assay.
- The cytotoxicity of lactitol was investigated in BHK-21 An 31-baby hamster kidney cells by MTT test.
- As a result, it was determined that lactitol did not exhibit a significant genotoxic and cytotoxic effect.

Article Info

Received: 13/10/2022

Accepted: 16/11/2022

Keywords

Lactitol,
Genotoxicity,
Cytotoxicity,
Comet,
MTT

Abstract

Lactitol is a polyol (sugar alcohol) and a food additive used as a sweetener. It is included in common foods such as sweets, chewing gums, pastries, and bread, but also other some pharmaceuticals. The health effects of food additives, whose use is constantly increasing, are also widely discussed. Genotoxicity is defined as the ability of any biological, physical, or chemical agent to cause DNA damage, and it is accepted that such damage can cause mutation. Cytotoxicity tests are used to predict the toxicity of substances to various tissues or cells. In this study, comet and MTT tests were used to evaluate the genotoxic and cytotoxic effects of lactitol. Comet test was performed with lymphocytes isolated from blood from two healthy donors, and MTT test was performed on BHK-21 An 31 baby hamster kidney cells. Cells were treated with (125 µg/mL only in MTT test), 250, 500, 1000, 2000, and 4000 µg/mL concentrations of lactitol for 1 hour in the comet test and 24 hours in the MTT test. As a result, it was determined that lactitol did not show a significant genotoxic and cytotoxic effect. However, these results need to be supported by different test methods and cell groups.



Makale, Creative Commons 4.0 (CC BY NC SA) uluslararası lisansı altında açık erişim olarak yayımlanmaktadır.

* Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Ece Avuloğlu Yılmaz, ece.yilmaz@amasya.edu.tr



1. GİRİŞ

Gıda ve beslenme, insanoğunun uzun yıllardır teknolojik ve bilimsel ilerlemeler ışığında geliştirdiği ve üzerinde çalıştığı en önemli konulardan biri olmuştur. Söz konusu ilerlemeler içinde belki de en çok tartışılanı gıdalara eklenen kimyasal bileşenlerdir. Vitaminler, karbonhidratlar, proteinler, yağlar ve mineraller gıdalardaki doğal bileşenler olup, bunlara ek olarak gıdaları işleme aşamalarında isteğe bağlı olan veya olmayan şekilde eklenen bazı kimyasal maddeler de vardır. Bu kimyasal bileşenlere gıda katkı maddeleri adı verilmektedir. Gıda katkı maddeleri, aromayı korumak, tadını, görünümünü veya diğer niteliklerini geliştirmek için gıdaya eklenen maddelerdir [1-3]. Bunlardan biri veya birkaçı paketlenmiş gıdalarda mutlaka bulunmaktadır.

İşlevlerine göre çok sayıda ve farklı özellikte gıda katkı maddesi sınıfı bulunmaktadır. Bu sınıflardan birini oluşturan tatlandırıcılar binlerce gıda ürünüde bulunan ve dünya çapında yaygın olarak kullanılan gıda katkı maddelerinden birisidir. Tatlandırıcı içeren birçok gıda ürünü arasında özellikle diyabetik ve/veya obez kişiler için üretilen yiyecek ve içecekler, tatlılar, sakızlar, hamur işleri ve ekmekler bulunmaktadır. Ayrıca diş macunları ve öksürük şurupları gibi diğer kişisel bakım ve farmasötik ürünlerde de kullanılmaktadır [4]. Bu tür gıda katkı maddeleri öncelikle gıda endüstrisinde şekersiz düşük kalorili gıdaların işlenmesi için kullanılmaktadır. Çoğu, bir kez alındıklarında herhangi bir glisemik etki/insülin reaksiyonu indüklemediği için, insan beslenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca şekerden farklı olarak kalori değerleri yoktur ya da düşüktür ve diş plağı mikroflorasını olumsuz etkilemezler [4, 5].

Polioller (şeker alkoller) tatlandırıcıların bir grubu olup doğal tatlandırıcıları içerir. Bunlar en sık kullanılan tatlandırıcı sınıfı olup, hücre içine girmek için insüline ihtiyaç göstermezler, bu nedenle diyabetli hastaların kullanımlarına uygundur. Ancak günlük aşırı alımın (yetişkin bir insan ortalama 70 kg kabul edilerek 50-60 g) karaciğerde glikoza dönüştüğu de ifade edilmektedir. Poliollerin belirli miktarların üzerinde tüketiminin oluşturacağı laksatif etkinin bilinmesi, bunların gıdalarda kullanımlarını kısıtlayan başka bir konudur [6, 7].

Laktitol (E966) bir disakkarit polioller (şeker alkolü) olup, şekerden daha az (0,3-0,4 kat) tatlıdır. Kan şekeri düzeyine etkisi önemsizmeyecek kadar azdır. Bu tatlandırıcı ile üretilen ürünlerin lezzetli olduğu ve tüketimi sırasında beğenilmeyen bir tat bırakmadığı bildirilmektedir. Ayrıca laktitol ilaçlar gibi farmasötik ürünlerde de ek komponent niteliğinde kullanılmaktadır. Bunların dişında, laktozun yerine prebiyotik olarak fonksiyonel gıda ürünlerinde, özel beslenmeye yönelik gıdalarda ve bazı tedaviye dönük uygulamalarda da kullanılmaktadır [8, 9].

Genotoksisite, fiziksel, kimyasal veya biyolojik herhangi bir etkenin DNA'da hasara neden olma potansiyeli olarak tanımlanmakta ve söz konusu hasarın mutasyona neden olabileceği kabul edilmektedir. Onarılmamış genetik hasarlar, genetik materyalde kalıcı değişikliklere (mutasyonlar) yol açabilir. Bu durum özellikle kritik genlerde meydana gelirse kansere dahi yol açabilir. Bu nedenle, her mutajen potansiyel olarak kanserojen olarak kabul edilir. Mutajenite, insan sağlığı üzerindeki önemli sonuçları nedeniyle, tüm ürünlerin etkilerinin belirlenmesinde gerekli olan bir risk değerlendirmesidir. Bu nedenle birçok kimyasal ürün gibi gıda katkı maddelerinin güvenilirliklerinin değerlendirilmesi amacıyla geliştirilen test stratejileri için kilit bir noktadır [10]. Hücrenin bütünlüğünü etkileyerek genetik materyale zarar veren herhangi bir ajan genotoksin olarak adlandırılmaktadır. Genotoksinler doğrudan ya da dolaylı hasar oluşturmak suretiyle DNA'nın yapısını değiştirebilir. DNA eklentileri, oksidasyon ve alkilasyon gibi olaylar çoğu kimyasalın genotoksik etkisinin mekanizmasını oluşturmaktadır. Bu hasarlar DNA onarım mekanizmaları ile genomik DNA'dan uzaklaştırılır. Ancak, onarılmamış hasarlar kromozomal kararsızlığa veya hücre ölümine yol açabilir. Söz konusu bu hasarların kanserogeneze de hizmet ettiği bilinmektedir[10,11].

Comet testi, tek tek hücrelerde DNA zincir kırıklarının ölçmek için kullanılan bir genotoksisite test yöntemidir. Küçük parçalara ayrılmış DNA'nın bir agaroz matrisi boyunca elektroforez altında bozulmamış DNA'dan daha hızlı göç etmesi ilkesine dayanır. Testin çok yönlülüğü ve duyarlılığı, çok çeşitli deneysel koşullar altında çok sayıda farklı organizmadan elde edilen hücrelerde kimyasal veya fiziksel ajanların neden olduğu DNA hasarını değerlendirmek için uygulanmasına yol açmıştır. Comet testi insan biyo-izlem çalışmalarında DNA'ya zarar veren ajanlara maruz kalmanın bir biyolojik belirteci olarak ve çeşitli sentinel organizmalarda ekotoksikolojik çalışmalarda kullanılır. Kontrollü laboratuvar koşullarında uygulanan bu test, kimyasalların etki şeklinin anlaşılmasına katkıda bulunmakta ve risk değerlendirmesi hakkında bilgi vermektedir [12, 13].

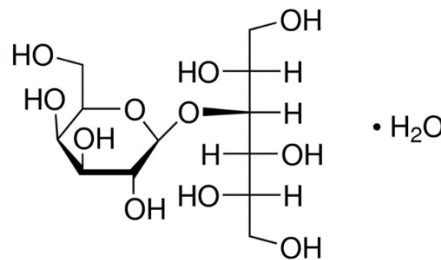
Birçok kimyasal ajan hücelere farklı seviyelerde zarar vererek sitotoksisiteye neden olmaktadır. Söz konusu ajanların biyolojik aktivitesinin belirlenmesi amacıyla, bunların toksik olup olmadığının tespit edilmesi gerekmektedir. Bu amaçla *in vitro* hücre kültüründe sitotoksisite testleri yapılmaktadır. Uygulanan bu testler kısa zamanda birçok ajanın aktivitesinin incelenmesine izin vermekte ve ileriye dönük yapılması gereken değerlendirmeler için temel veriler sunmaktadır. Maddelerin çeşitli dokulara toksisitesini tahmin etmek için kullanılan ilk *in vitro* biyoanaliz yöntemleri arasında olan sitotoksisite testleri, güvenlik değerlendirmesi için çok önemli araçlardır. Sitotoksisitenin veya hücre canlılığının değerlendirilmesinde kullanılan 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür (MTT) testi en çok tercih edilen kolorimetrik testlerden biridir [14]. Test hızlı, güvenilir ve uygulaması kolay olup dünya çapında birçok laboratuvarında tercih edilmektedir [15, 16].

Bu çalışmanın amacı, genotoksik ve sitotoksik etkileri yönünden çok sınırlı değerlendirmeye sahip olan laktitolün genotoksik etkisini insan periferik lenfositlerinde comet testi ile, sitotoksik etkisini ise BHK-21 An 31 yavru hamster böbrek hücrelerinde MTT testi ile değerlendirmektir.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Materyaller

Test maddesi olan laktitol (Katalog No: 81025-04-9), Sigma-Aldrich firmasından satın alınmış ve steril distile suda çözülerek kullanılmıştır. Laktitolün kimyasal yapı formülü Şekil 1'de gösterilmiştir. DMSO (Katalog No: 67-68-5), EDTA (Katalog No: 6381-92-6), Tris (Katalog No: 77-86-1), Triton X-100 (Katalog No: 9002- 93-1), düşük erime ısı agar (Katalog No: 9012-36-6), normal erime ısı agar (Katalog No: 9012-36-6), EtBr (Katalog. No: 1239-45-8) ve H₂O₂ (Katalog No: 7722-84-1) Applichem'den, NaOH (Katalog No: 1310-73-2), Tris (Katalog No: 77-86-1), PBS (Katalog No: L1825) ve Biocoll (Katalog No: L 6115) Merck'ten temin edilmiştir. Dulbecco's Modified Eagle Medium with phenol red (DMEM) (Katolog No: F0445), fetal bovine serum (FBS) (Katolog No: S0613), penicillin/streptomycin (Katolog No: A2213), trypsin (Katolog No: L2163) Biochrome'den, Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (Katolog No: M2128) Sigma'dan temin edilmiştir. Çalışma, Amasya Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 11.06.2020-42 tarih ve sayılı izni ile gerçekleştirilmiştir.



Şekil 1. Laktitolün kimyasal yapısı [17]

2.2. Comet Testi

Bu araştırmada, Singh ve arkadaşlarının [18] comet tekniği bazı değişikliklerle uygulanmıştır [13, 19]. Sigara, alkol ve ilaç kullanmayan, herhangi bir hastalığı olmayan, genotoksik bir etkene maruziyeti olmayan, sağlıklı ve 25-30 yaşları arasında iki kadın gönüllüden periferal kan örnekleri temin edilmiştir. Soğuk ortamda 100 µL kan, PBS ile karıştırılarak süspanse edilmiş ve ardından Biocoll kullanılarak lenfositler izole edilmiştir. İzole lenfositlerde tripan mavisi canlılık testi gerçekleştirilerek, hücre canlılık oranı \geq %97 olarak saptanmıştır. Laktitolün DNA'da bir hasar oluşturup oluşturmadığını belirlemek için izole lenfositler beş farklı konsantrasyon (250, 500, 1000, 2000 ve 4000 µg/mL) ile tek başına 1 saat muamele edilmiştir. Ayrıca, kültür ortamına bir pozitif kontrol (100 µM, H₂O₂) ve bir negatif kontrol (distile su) dahil edilmiştir. İnkübasyon sonunda, santrifüj işlemi gerçekleştirilerek süpernatant atılmış ve hücreler PBS ile resüspanse edilmiştir. Bu aşamadan sonra, lenfositler temiz ependorflar içersinde düşük erime ısılı agarla karıştırılmıştır. Bu lenfosit-agar karışımları önceden yüksek erime ısılı agar ile kaplanmış lamalar üzerine yayılarak lamelle kapatılmıştır. Preparatlar buzdolabında bekletildikten sonra lameller kaldırılmış ve lysing solüsyonu ile en az 1 saat muamele edilmiştir. Daha sonra elektroforez tamponunda beklemeye alınan preparatlara (pH>13) 25 V, 300 mA'da 20 dakika elektroforez işlemi uygulanmıştır. Takiben 0,4 M Tris (pH=7,5) tamponunda nötrale edilen lamalar, EtBr ile boyanarak Olympus marka floresan mikroskopta 40X objektifte incelemeye alınmıştır. Her bir donör ve konsantrasyon için 100 hücre olmak üzere toplam 200 hücre Comet ölçüm programı (Comet Assay IV, Perceptive Instruments Ltd., UK) kullanılarak değerlendirilmif ve hücrelerin hasar dereceleri iki farklı comet parametresi (kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momentini) bakımından analiz edilmiştir, ek olarak istatistiksel değerlendirmede t-testi kullanılmıştır.

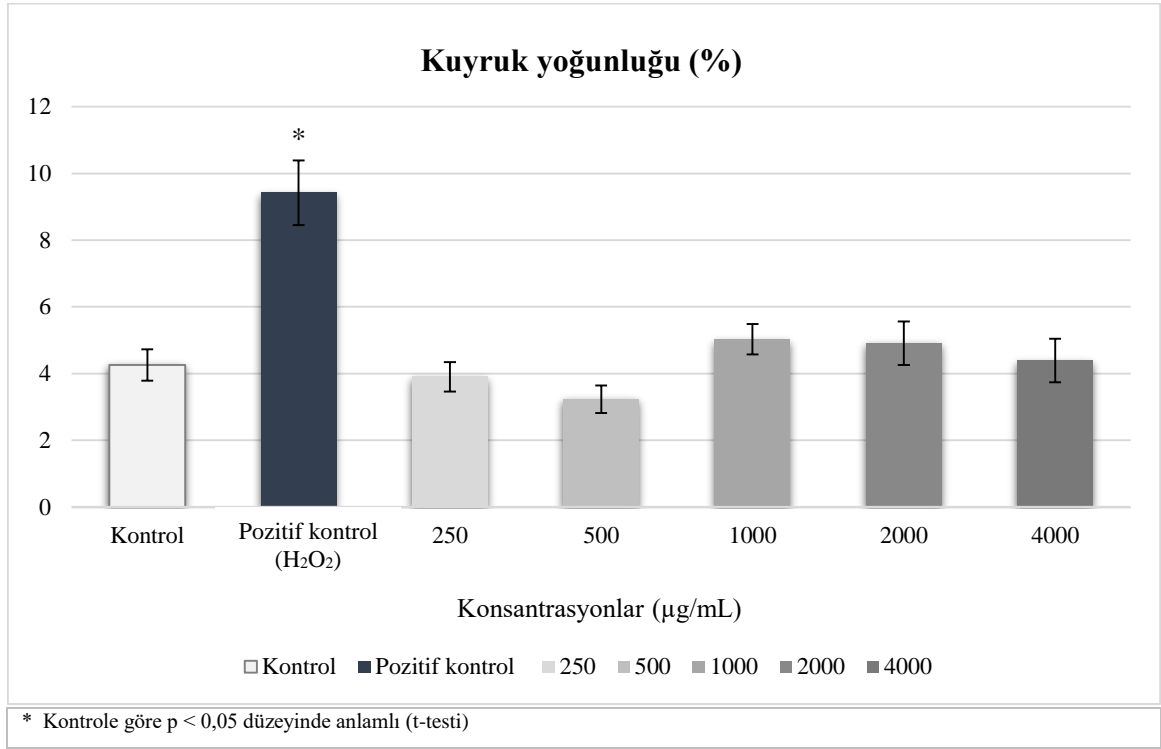
2.3. MTT Testi

Laktitolün potansiyel sitotoksik etkisi BHK-21 An 31 yavru hamster böbrek hücrelerinde (HÜKÜK, Ankara) 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür (MTT) testi ile analiz edilmiştir. MTT testi Mossman'ın [20] metoduna göre bazı modifikasyonlarla [16] takip edilmiştir. BHK-21 An 31 yavru hamster böbrek hücreleri %10 Fetal Bovine Serum (FBS), %1 penisilin/streptomisin ve 2mM L-glutamin içeren Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) içersinde nemlendirilmif, %5 CO₂/ %95 hava, 37°C'de 75 cm² ya da 25 cm² kültür flaklarında geliştirilmifdir. Analiz için hücreler 96 kuyucuklu plakalara alınarak her bir kuyucuğa 5x10³ hücre gelecek şekilde ekilmifdir. BHK-21 An 31 hücreleri, Laktitolün altı farklı konsantrasyonu (125, 250, 500, 1000, 2000 ve 4000 µg/mL) ile 24 saat boyunca muamele edilmiştir. Süre bitiminde tüm kuyucuklara MTT solüsyonu ilave edilmiştir. Formazan kristalleri oluşana kadar (yaklaşık 2-4 saat) inkübe edilmiştir. Takiben tüm kuyucuklara çözücü çözeltilisi olarak dimetilsülfoksit (DMSO) eklenecek kristallerin çözümlenmesi sağlanmıştır. Tüm uygulamalar için absorbans (ABS) değerleri Elisa okuma cihazında (Molecular Devices, M5) 570 nm dalga boyunda belirlenmiştir. Tüm işlemler 3 tekrarlı olarak gerekleştirilmifdir. Elde edilen absorbans değerlerinden, tüm uygulamalar için ortalama absorbans ve nisbi canlılık (% canlılık) değerleri hesaplanmıştır. İstatistiki değerlendirme SPSS 15.0 bilgisayar programı kullanılarak One Way ANOVA-Dunnet testi ile gerekleştirilmifdir. P<0,05 'in altındaki değerler kontrole göre anlamlı kabul edilmiştir.

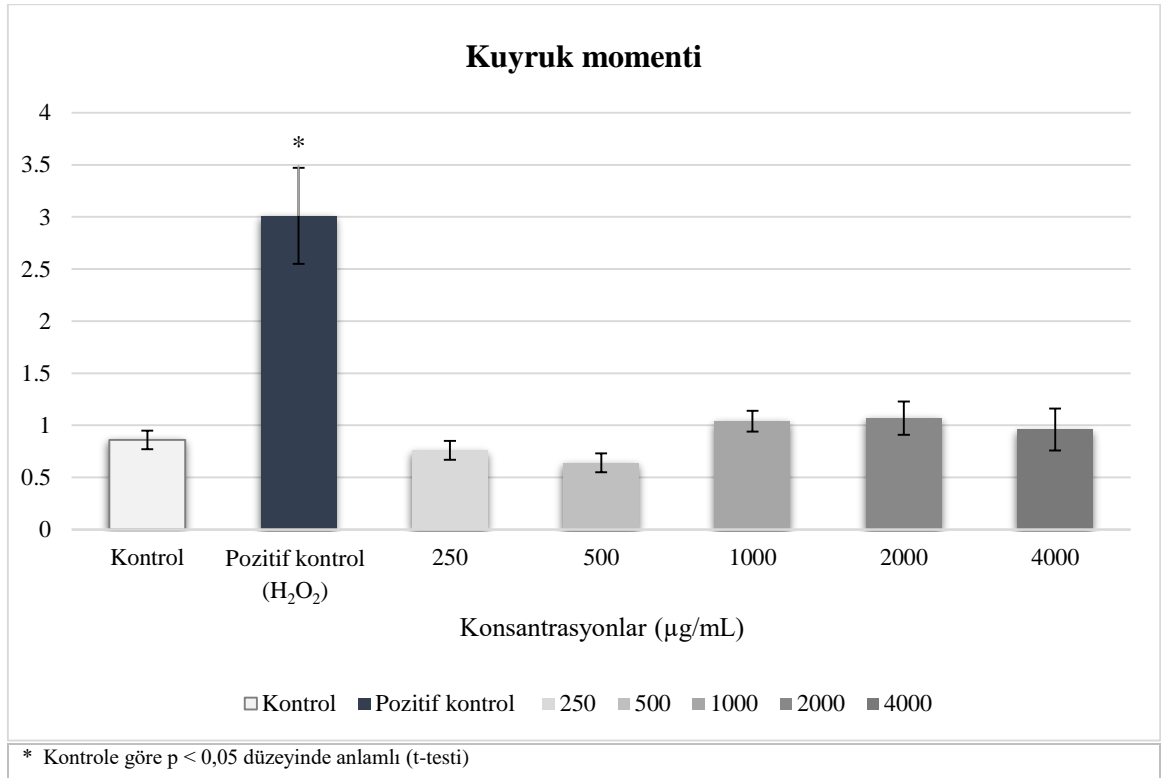
3. BULGULAR

3.1. Comet Testi

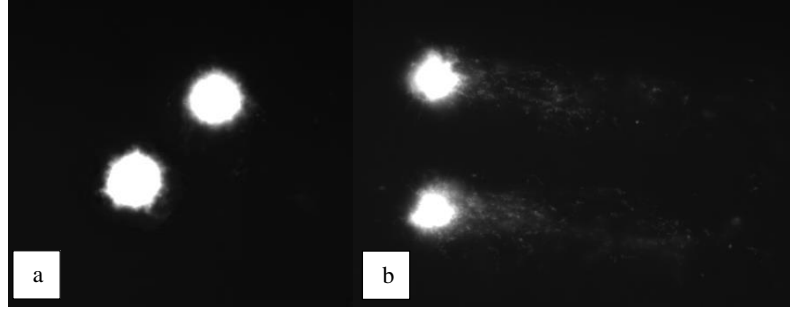
Laktitolün izole lenfositlere uygulamasının DNA hasarı üzerine etkileri iki önemli comet parametresi olan comet kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momentini açısından değerlendirilmifdir. Buna göre, laktitolün izole lenfositlere 1 saatlik muamelesi sonucunda, test edilen tüm konsantrasyonlarda comet kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momentini istatistiki olarak önemli düzeyde artırmadığı belirlenmiştir (*şekil 2* ve *şekil 3*). Bu veriler ışığında, laktitolün test edilen konsantrasyonlar için önemli ölçüde DNA hasarına neden olmadığı sonucuna varılmıştır. Resim 1'de, laktitol uygulaması sonucunda gözlenen DNA hasarı örnekleri sunulmuştur.



Şekil 2. İnsan periferik kan lenfositlerinde laktitol'ün comet kuyruk yoğunluğuuna etkileri



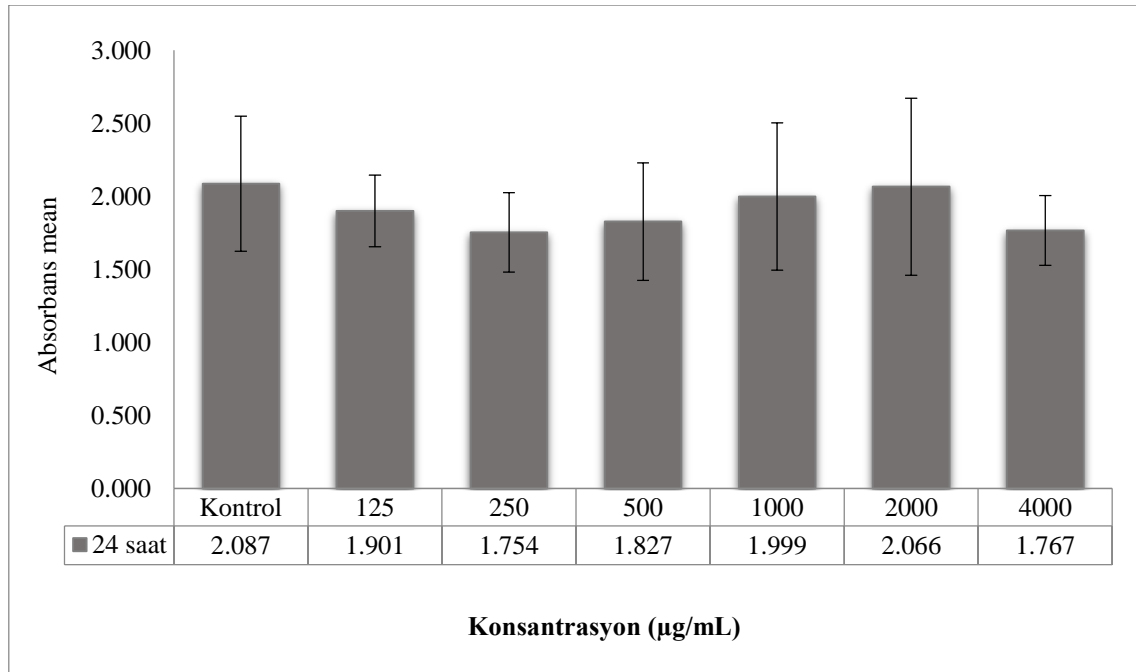
Şekil 3. İnsan periferik kan lenfositlerinde laktitol'ün comet kuyruk momentine etkileri



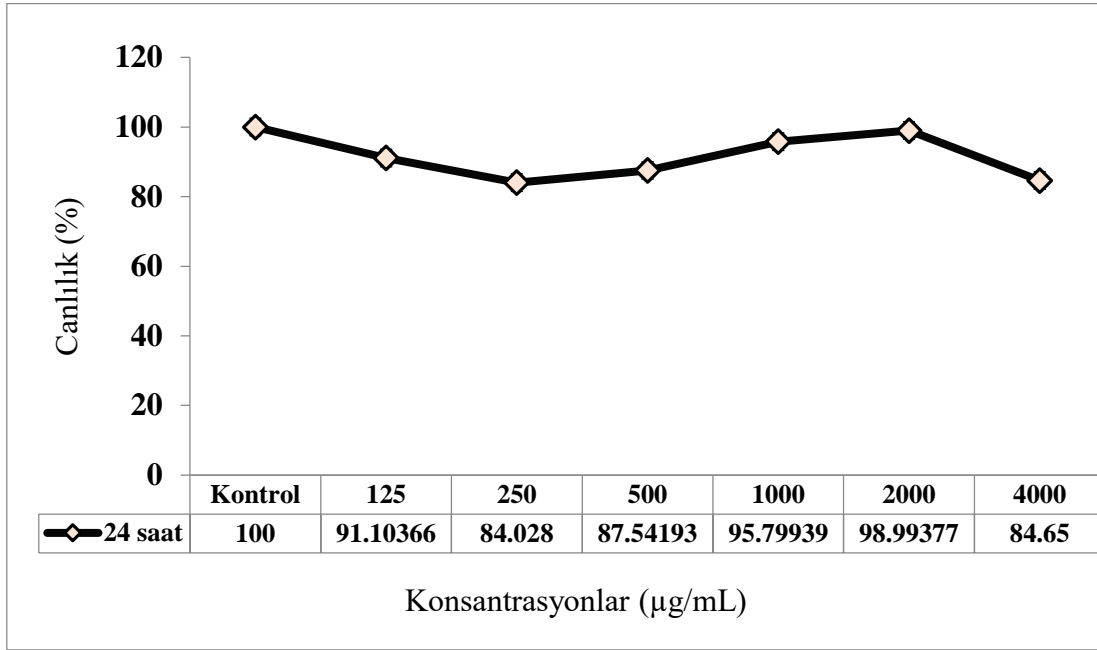
Resim 1. Laktitol muamelesi sonucu insan lenfositlerinde meydana gelen DNA hasarının comet testi ile görünümü a) hasarsız DNA, b) hasarlı DNA

3.2. MTT Testi

Laktitolün çeşitli konsantrasyonlarının BHK-21 An 31 yavru hamster böbrek hücrelerine 24 saat uygulanması sonucunda elde edilen MTT analizi sonuçları Şekil 4'te özetlenmiştir. Uygulama sonucunda elde edilen hücre canlılık değerleri Şekil 5'te sunulmuştur. Laktitolün 125, 250, 500, 1000, 2000 ve 4000 µg/mL konsantrasyonlarında kontrole göre istatistiksel açıdan anlamlı olmadığı belirlenmiştir (Şekil 4). Laktitolün BHK-21 An 31 yavru hamster böbrek hücrelerinde hücre canlılığını hafif düzeyde düşürdüğü, ancak bu düşüşün önemli olmadığı belirlenmiştir (Şekil 5). Sonuç olarak, laktitolün BHK-21 An 31 yavru hamster böbrek hücrelerine önemli düzeyde sitotoksik etkiye yol açmadığı gözlenmiştir.



Şekil 4. Laktitolün BHK-21 An 31 yavru hamster böbrek hücreleri üzerine absorbans değerleri



Şekil 5. Laktitolün BHK-21 An 31 yavru hamster böbrek hücreleri üzerine hücre canlılık değerleri

4. TARTIŞMA

Sorbitol ve galaktozdan oluşan laktitol, laktozun hidrojenasyonu ile üretilen bir disakkarit polioldür. Laktitol, besleyici bir tatlandırıcı olarak tanımlanır. FAO/WHO Ortak Gıda Katkı Maddeleri Uzman Komitesi [21] tarafından "ADI belirtilmemiş" sınıfına dâhildir. Bu disakkarit polioldür, sakkarozdan %48-40 daha düşük kalorili, hafif tatlı bir tada sahip olduğundan genellikle düşük kalori değerine sahip bir tatlandırıcı olarak kullanılmaktadır. Ayrıca laktitol bir prebiyotik olarak minerallerin biyoyararlanımını artırabilmekte ve probiyotiklerin çoğalmalarını teşvik edebilmektedir [9,20]. Bu çalışmada laktitolün oluşturabileceği DNA hasarı insan lenfositlerinde comet testi ile, olası sitotoksik etkisi ise MTT testi ile BHK-21 An 31 yavru hamster böbrek hücrelerinde değerlendirilmiştir. Sonuçta, her iki hücre tipinde de önemli genotoksik ve sitotoksik bir etkiye neden olmadığı gözlenmiştir.

Bu çalışmada genotoksitesisi ve sitotoksitesisi incelenen laktitolün insan lenfositlerinde daha önce yapılmış bir çalışmasına rastlanmamıştır. 1983 yılında JECFA laktitolün *S. typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537 ve TA1538 suşlarında mutajenik olmadığını rapor etmiştir [21]. Bu çalışma dışında laktitolün genotoksik etkilerinin incelendiği başka bir çalışmaya ulaşılamamıştır. Ancak diğer tatlandırıcıların farklı hücrelerle genotoksitesisinin ve sitotoksitesisinin değerlendirildiği çalışmalar bulunmaktadır.

Bir polioldür olan eritritol, *Salmonella typhimurium* TA98, TA1537, TA100, TA1535 ve *Escherichia coli* WP2 uvrA suşlarında uygulanan Ames testinde mutajenik etkiye neden olmamıştır. *In vitro* kromozomal anormallik (Çin hamsteri akciğer fibroblast hücrelerinde) ve mikronükleus testi (L5178Y tk+/- hücrelerinde) 1250, 2500 ve 5000 g/mL konsantrasyonları kullanılarak gerçekleştirilmiş ve herhangi bir mutajenite tespit edilmemiştir. Eritritol'ün L5178Y tk+/- hücrelerinde aynı konsantrasyonlarla gerçekleştirilen comet testinde çalışılan en yüksek iki konsantrasyonda DNA hasarında artışa neden olduğu görülmüştür. İlâveten, 1250, 2500 ve 5000 g/mL konsantrasyonlarının oral olarak verildiği erkek ICR farelerinin kemik iliği hücrelerinde mikronükleus frekansında bir değişiklik görülmemiştir. Elde edilen çıktılar değerlendirildiğinde eritritolün bakteri hücre sistemlerinde mutajeniteye ve *in vitro* veya *in vivo* memeli hücre sistemlerinde de kromozom hasarına sebep olmadığı belirtilmiştir [22].

Bir diğer tatlandırıcı gıda katkı maddesi olan maltitolün olası genotoksik etkisi insan periferal lenfositlerinde mikronükleus, kardeş kromatid değişimi ve kromozomal anormallik testleri kullanılarak değerlendirilmiştir. Çalışmada lenfositler maltitolün 1,25; 2,5 ve 5 mg/mL konsantrasyonları ile 24 ve 48 saat boyunca muamele edilmiştir. Kardeş kromatit değişimi ve kromozomal anormallik frekansları uygulanan hiçbir konsantrasyon ve muamele süresinde, kontrole kıyasla istatistiksel olarak etkilenmemiştir. Ancak konsantrasyondan bağımsız olarak tüm muamele sürelerinde mikronükleus sıklığını artırmıştır. Ayrıca hiçbir uygulamada replikasyon indeksi ve mitotik indeks etkilenmemiştir. Sonuçta, maltitolün genotoksik etkisinin zayıf olduğu ve insan lenfositlerinde *in vitro* koşullarda sitotoksik etki göstermediği belirtilmiştir [23].

Bir tatlandırıcı olan steviol Ames testinde mutajeniteye neden olmamıştır [24-26]. 125, 250, 500 ve 1000 mg/kg steviol verilen MS/Ae farelerinden alınan kemik iliği eritrositlerinde mikronükleus frekansı etkilenmemiştir [24]. En fazla 200 mg/kg dozunda kullanılan steviol fare kemik iliği ve karaciğer hücrelerinde yine mikronükleus artışına neden olmamıştır [27]. Çok benzer şekilde, kemirici (rat, fare ve hamster) kemik iliği eritrositlerinde (4000 ve 8000 mg/kg) mikronükleus testinde genotoksik etki tespit edilmemiştir [28]. Steviolün 1, 2, 4, 8 ve 16 µg/mL konsantrasyonlarda insan lenfositlerinde kromozomal anormallik ve mikronükleus oluşumunu indüklediği belirtilmiştir [29]. Fare karaciğer hücreleri ve kemik iliği eritrositlerine en fazla 250 mg/kg olacak şekilde verilen steviosid, mikronükleus sıklığını değiştirmemiştir [27]. En yüksek doz olarak 2000 mg/kg steviol verilen BDF1 ve ddY farelerinin çeşitli organ ve dokularında gerçekleştirilen comet testinde DNA hasarında artış gözlenmemiştir [30-31]. Yapılan bu gözlemlere karşın steviosidin *S. typhimurium* TA98 suşunda mutajenik etkiye neden olduğu (50 mg/petri) [32], TM677 suşunda ise ileri mutasyon testinde pozitif etkiye neden olduğu görülmüştür [33]. Steviolün CHL (Chinese Hamster Lung) hücre hattında kromozomal aberasyonları artırdığı ve gen mutasyonu testinde mutajenik etkiye sebep olduğu gözlenmiştir [24]. Wistar ratlar kullanılarak (4 mg/mL oral) steviosidin dalak, karaciğer, beyin ve kan hücrelerinde comet testi ile DNA hasarına sebep olduğu rapor edilmiştir [34].

Rebaudiosid A, tatlandırıcılardan olup genotoksisitesi metabolik aktivasyon bulunan ve bulunmayan şartlarda *in vitro* ve *in vivo* olarak incelenmiştir. Çin Hamster V79 hücrelerinde kromozomal aberasyon (en fazla 5000 µg/mL'lik konsantrasyon), *S. typhimurium* ve *E. coli* ile Ames ve L5178Y+/- hücreleri ile fare lenfoma testleri uygulanmış ve hiçbirinde mutajeniteye neden olmadığı görülmüştür. Farklı bir çalışmada farelere en yüksek doz olarak 750 mg/kg verilen rebaudiosid A, hayvanların kemik iliğinde mikronükleus oluşumunu artırmamış ve en yüksek doz olarak 2000 mg/kg verilen ratlarda da programlanmamış DNA sentezi testinde yine genotoksisiteye neden olmamıştır. Sonuçta rebaudiosid A'nın uygulanan konsantrasyonlarda genotoksik etki göstermediği ve kullanıma uygun olabilecek bir tatlandırıcı olduğu belirtilmiştir [35]. Başka bir çalışmada Rebaudiosid A'nın etkisi insan kolon kanser HT-29 ve T84 hücre hatlarında farklı konsantrasyonlarda (%0, %0.001, %0.05, %0.1, %0.3, %0.5 ve %1) MTT testi ile değerlendirilmiş ve sonuçta farklı miktarlarda Rebaudiosid A eklendiğinde (%1 hariç) hücresel canlılık ve proliferasyonda belirgin bir değişiklik gözlenmediği bildirilmiştir [36].

Yapay bir tatlandırıcı olan aspartamın (3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, ve 100 mg/L) primer insan kan hücrelerinde sitotoksik etkisi MTT testi ile, genotoksik etkisi ise kromozomal anormallik testi ile değerlendirilmiştir. Sonuçta hücre canlılığında konsantrasyona bağlı önemli düşüşe yol açan aspartamın kromozomal anormallik frekansında ise artışa neden olduğu görülmüştür [37].

Van Eyk (2015), Asesülfam-K'nın Caco-2, HT-29 (kolon) ve HEK-293 (böbrek) hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisini 1, 4, 10, 20 ve 50 mM konsantrasyonlarda 24, 48 ve 72 saatlik muamele sürelerinde MTT testi ile değerlendirmiştir. Hücre canlılığının, kullanılan tüm hücre hatlarında konsantrasyona ve muamele süresine bağlı olarak 10 mM'dan büyük konsantrasyonlarda azaldığı tespit edilmiştir. Asesülfam K'nın yüksek konsantrasyonlardaki sitotoksik etkisinden dolayı dikkatle kullanılması gerektiği vurgulanmıştır [38]. Asesülfam K'nın insan karaciğer karsinoma HepG₂ hücrelerinde MTT analizi sonucunda 48 saatlik uygulamada 120 ve 240 µg/mL konsantrasyonlarının hücre canlılığını önemli düzeyde düşürdüğünü belirtmişlerdir. Ayrıca bu tatlandırıcının hem 24 hem de 48 saatlik muamele süresinde mitotik indeksi 60, 120 ve 240 µg/mL konsantrasyonlarda anlamlı düzeyde düşürdüğü gözlenmiştir [39]. Sonuç olarak, genellikle çalışma çıktılarımızın literatür örnekleri ile uyumlu olduğu gözlenmektedir. Ancak farklı fonksiyonel gruplara ait tatlandırıcılarla yapılan genotoksisite ve sitotoksisite çalışmalarında pozitif sonuçların rapor edildiği de göz ardı edilmemelidir.

Günümüze kadar tatlandırıcıların sağlık açısından yapılan değerlendirmelerine bakıldığında, bu maddelerin ADI (kabul edilebilir günlük alım miktarı) değeri altında kalan tüketimi açısından risk değerlendirmesinde yeterli kanıt olmadığı sonucuna varılmıştır. Bununla birlikte, çelişkili sonuçlara sahip son epidemiyolojik ve deneysel çalışmalar, bu katkı maddelerinin güvenliği konusundaki tartışmayı yeniden canlandırmıştır [40-43]. Bu bağlamda, Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA) dâhil olmak üzere birçok sağlık otoritesi tatlandırıcıları yeniden değerlendirmektedir. Kansere ilgili olarak yapılan tüm değerlendirmeler, özellikle insanlarda ek çalışmalara ihtiyaç olduğu konusunda hemfikirdir [44]. Yine de tatlandırıcıların sayısı ve kullanımı artmış ve sıklıkla tartışılmalarına rağmen üretimleri sürekli çoğalmıştır. Günümüzde birçok tatlandırıcı, şeker yerine kullanılmaya başlamıştır. Gündelik kullanıma bakıldığında tatlandırıcıların kullanıldığı ürünler yalnızca diyabet hastaları ya da metabolik bozuklukları bulunanlar için değil, vücut ağırlığını dengede tutmak ve kalori kontrollü bir beslenme biçimi isteyen tüketicilere de hitap etmektedir. Kısacası tatlandırıcı bulunduran gıdaları diyetine dâhil eden kişi sayısı oldukça fazladır. Bu nedenle bu kimyasallar, doz-cevap ilişkisi ve vücutta birikim gibi olası tehlikeler de göz önünde bulundurulmak suretiyle kullanılmalıdır. Çalışmamızdan çıkan sonuç, laktitolün uygulanan konsantrasyonlar ve sürelerde *in vitro* insan lenfositlerinde genotoksik ve BHK-21 An 31 yavru hamster böbrek hücrelerinde sitotoksik hasar oluşturmadığını göstermektedir. Ancak bu sonuçlar farklı test sistemlerinde ve hücre gruplarında ileri analizler ile desteklenmelidir.

TEŞEKKÜR

BHK-21 An 31 yavru hamster böbrek hücrelerinin temini için Dr. Şükran Yılmaz'a teşekkürlerimizi sunuyoruz.

ÇIKAR ÇATIŞMASI/ÇAKIŞMASI BİLDİRİMİ

Yazarlar arasında çıkar çatışması/çakışması bulunmamaktadır.

KAYNAKLAR

- [1] Ishidate Jr, M., Sofuni, T., Yoshikawa, K., Hayashi, M., Nohmi, T., Sawada, M., and Matsuoka, A. (1984). Primary mutagenicity screening of food additives currently used in Japan. *Food and Chemical Toxicology*, 22(8), 623-636.
- [2] Linke, B. G., Casagrande, T. A. and Cardoso, L. I. A. (2018). Food additives and their health effects: a review on preservative sodium benzoate. *African Journal of Biotechnology*, 17(10), 306-310.
- [3] Wu, L., Zhang, C., Long, Y., Chen, Q., Zhang, W., and Liu, G. (2021). Food additives: from functions to analytical methods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1-21.
- [4] Naik, A. Q., Zafar, T., and Shrivastava, V. K. (2021). Environmental impact of the presence, distribution, and use of artificial sweeteners as emerging sources of pollution. *Journal of Environmental and Public Health*, 6624569.
- [5] Kokotou, M. G., Asimakopoulos, A. G. and Thomaidis, N. S. (2012). Sweeteners. *Food Analysis by HPLC*. CRC Press, 22-44.

- [6] Altuğ, T., ve Elmacı, Y. (2009). Tatlandırıcılar. *Gıda Katkı Maddeleri*. Kan Yılmaz Matbaacılık. 201-223.
- [7] Scettri, A., and Schievano, E. (2022). Quantification of polyols in sugar-free foodstuffs by qNMR. *Food Chemistry*, 390, 133125.
- [8] Ünal, D. (2011). Farklı oranlarda laktitol ve sakkaroz ilavesiyle hazırlanan tekirdağ peynir helvalarının bazı özelliklerinin belirlenmesi, *Yüksek Lisans Tezi*, Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Tekirdağ.
- [9] Li, H., Song, W., Liu, T., Xu, S., Zhang, S., Zhang, Y., Liu, D., Li, H., and Yu, J. (2022). Developing novel synbiotic yoghurt with *Lactocaseibacillus paracasei* and lactitol: investigation of the microbiology, textural and rheological properties. *International Dairy Journal*, 135, 105475.
- [10] Siivola, K. K., Burgum, M. J., Suárez-Merino, B., Clift, M. J., Doak, S. H., and Catalán, J. (2022). A systematic quality evaluation and review of nanomaterial genotoxicity studies: a regulatory perspective. *Particle and Fibre Toxicology*, 19(1), 1-24.
- [11] Akagi, J. I., Yokoi, M., Cho, Y. M., Toyoda, T., Ohmori, H., Hanaoka, F., and Ogawa, K. (2018). Hypersensitivity of mouse embryonic fibroblast cells defective for DNA polymerases η , ι and κ to various genotoxic compounds: its potential for application in chemical genotoxic screening. *DNA Repair*, 61, 76-85.
- [12] Cordelli, E., Bignami, M., and Pacchierotti, F. (2021). Comet assay: a versatile but complex tool in genotoxicity testing. *Toxicology Research*, 10(1), 68-78.
- [13] Ünal, F., Saygılı, Y., ve Dimici, E. (2022). Kuyruklu Yıldız/Komet Testi. *Genetik Toksikoloji*. Nobel Akademik Yayıncılık. 313-340.
- [14] Ghasemi, M., Turnbull, T., Sebastian, S., and Kempson, I. (2021). The MTT assay: utility, limitations, pitfalls, and interpretation in bulk and single-cell analysis. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(23), 12827.
- [15] Tolosa, L., Donato, M. T., and Gómez-Lechón, M. J. (2015). General cytotoxicity assessment by means of the MTT assay. *Protocols in vitro Hepatocyte Research*, 333-348.
- [16] Mamur, S. Sitotoksiste Testleri. *Genetik Toksikoloji*. Nobel Akademik Yayıncılık, 31-40.
- [17] İnternet: Sigma-Aldirich URL: <https://www.sigmaaldrich.com/TR/en/product/sigma/13520> Son Erişim tarihi: 07.10.2022
- [18] Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R. and Schneider, E.L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, 175(1), 184-191.
- [19] Avuloğlu-Yılmaz, E., Yüzbaşıoğlu, D., Özçelik, A. B., Ersan, S., and Ünal, F. (2017). Evaluation of genotoxic effects of 3-methyl-5-(4-carboxycyclohexylmethyl)-tetrahydro-2H-1, 3, 5-thiadiazine-2-thione on human peripheral lymphocytes. *Pharmaceutical Biology*, 55(1), 1228-1233.
- [20] Mossman, T. (1983). Rapid colometric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65, 55-63.
- [21] JECFA. (1983). Evaluations of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. JECFA Evaluations.
- [22] Chung, Y. S., and Lee, M. (2013). Genotoxicity assessment of erythritol by using short-term assay. *Toxicological Research*, 29(4), 249.
- [23] Canımoğlu, S., and Rencüzoğulları, E. (2006). The cytogenetic effects of food sweetener maltitol in human peripheral lymphocytes. *Drug and Chemical Toxicology*, 29(3), 269-278.
- [24] Matsui, M., Matsui, K., Kawasaki, Y., Oda, Y., Noguchi, T., Kitagawa, Y., Sawada, M., Hayashi, M., Nohmi, T., Yoshihira, K., Ishidate, M. Jr., and Sofuni, T. (1996). Evaluation of the genotoxicity of stevioside and steviol using six in vitro and one in vivo mutagenicity assays. *Mutagenesis*, 11(6), 573-579.
- [25] Pezzuto, J.M., Compadre, C.M., Swanson, S.M., Nanayakkara, N.P.D. and Kinghorn, A.D. (1985). Metabolically activated steviol, the aglycone of stevioside, is mutagenic. *Proceedings of the National Academy Science of the United States of America*, 82, 2478-2482.
- [26] Pezzuto, J.M., Nanayakkara, N.P.D., Compadre, C.M., Swanson, S.M., Kinghorn, A.D., Guenther, T.M., Sparnins, V.L., and Lam, L.K.T. (1986). Characterization of bacterial mutagenicity mediated by 13-hydroxy-ent-kaurenoic acid (steviol) and several structurally-related derivatives and evaluation of potential to induce glutathione s-transferase in mice. *Mutation Research*, 169, 93-103.
- [27] Oh, H. Y., Han, E. S., Choi, D. W., Kim, J. W., Eom, M. O., Kang, I. H., Kang, H. J., and Ha, K. W. (1999). In vitro and in vivo evaluation of genotoxicity of stevioside and steviol, natural sweetner. *Journal Pharmaceutical Society of Korea*, 43, 614-622.
- [28] Temcharoen, P., Suwannatrai, M., Klongpanichpak, S., Apibal, S., Glinsukon, T., and Toskulkao, C. (2000). Evaluation of the effect of steviol on chromosomal damage using micronucleus test in three laboratory animal species. *Journal of the Medical Association of Thailand Chotmaihet Thangphaet*, 83, 101-108.
- [29] Uçar, A., Yılmaz, S., Yılmaz, Ş., and Kılıç, M. S. (2018). A research on the genotoxicity of stevia in human lymphocytes. *Drug and Chemical Toxicology*, 41 (2), 221-224.
- [30] Sekihashi, K., Saitoh, H., and Sasaki, Y. (2002). Genotoxicity studies of stevia extract and steviol by the comet assay. *The Journal of Toxicological Sciences*, 27, 1-8.

- [31] Sasaki, Y.F., Kawaguchi, S., Kamaya, A., Ohshita, M., Kabasawa, K., Iwama, K., Taniguchi, K., and Tsuda, S., (2002). The comet assay with 8 mouse organs: results with 39 currently used food additives. *Mutation Research*, 519, 103–119.
- [32] Suttajit, M., Vinitketkaumnuen, U., Meevatee, U., and Buddhasukh, D. (1993). Mutagenicity and human chromosomal effect of stevioside, a sweetener from stevia rebaudiana bertonii. *Environmental Health Perspectives*, 101(3), 53-56.
- [33] Terai, T., Ren, H., Mori, G., Yamaguchi, Y., and Hayashi, T. (2002). Mutagenicity of steviol and its oxidative derivatives in *Salmonella typhimurium* Tm677. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 50, 1007–1010.
- [34] Nunes, A. P. M., Ferreira-Machado, S. C., Nunes, R. M., Dantas, F. J. S., De Mattos, J. C. P., and Caldeira-de-Araujo, A. (2007). Analysis of genotoxic potentiality of stevioside by comet assay. *Food and Chemical Toxicology*, 45(4), 662-666.
- [35] Williams, L. D., and Burdock, G. A. (2009). Genotoxicity studies on a high-purity rebaudioside A preparation. *Food and Chemical Toxicology*, 47(8), 1831-1836.
- [36] Wu, X., Wang, B., Chen, T., Gan, M., Chen, X., Chen, F., Wei, H., and Xu, F. (2014). The non-cytotoxicity characterization of rebaudioside A as a food additive. *Food and Chemical Toxicology*, 66, 334-340.
- [37] Çadırcı, K., Tozlu, Ö. Ö., Türkez, H., and Mardinoğlu, A. (2020). The in vitro cytotoxic, genotoxic, and oxidative damage potentials of the oral artificial sweetener aspartame on cultured human blood cells. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 50(2), 448-454.
- [38] Van Eyk, A. D. (2015). The effect of five artificial sweeteners on Caco-2, HT-29 and HEK-293 cells. *Drug and Chemical Toxicology*, 38(3), 318-327.
- [39] Mamur, S., Yüzbaşıoğlu, D., Bülbül, S.N., ve Ünal, F. (2022). Investigation of cyto-genotoxic effects of a food sweetener Acesulfame potassium. *Food Health*, 8(4), 273-283.
- [40] Toews I, Lohner S, de Gaudry DK, Sommer H, and Meerpohl J. J. (2019). Association between intake of non-sugar sweeteners and health outcomes: systematic review and meta-analyses of randomised and non-randomised controlled trials and observational studies. *British Medical Journal*, 364, 4718.
- [41] Laviada-Molina, H., Molina-Segui, F., Pérez-Gaxiola, G., Cuello-García, C., Arjona-Villicaña, R., Espinosa-Marrón, A., and Martínez-Portilla, R. J. (2020). Effects of nonnutritive sweeteners on body weight and BMI in diverse clinical contexts: Systematic review and meta-analysis. *Obesity Reviews*, 21(7), e13020.
- [42] Pang, M. D., Goossens, G. H., and Blaak, E. E. (2021). The impact of artificial sweeteners on body weight control and glucose homeostasis. *Frontiers in Nutrition*, 7, 598340.
- [43] Azad, M. B., Abou-Setta, A. M., Chauhan, B. F., Rabbani, R., Lys, J., Copstein, L., Mann, A., Jeyaraman, M. M., Reid A. Y., Fiander, M., MacKay, D. S., McGavock, J., Wicklow, B., and Zarychanski, R. (2017). Nonnutritive sweeteners and cardiometabolic health: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials and prospective cohort studies. *Canadian Medical Association Journal*, 189(28), 929-939.
- [44] Debras, C., Chazelas, E., Srour, B., Druetne-Pecollo, N., Esseddik, Y., de Edelenyi, F. S., Agae'sse, C., e De Sa, A., Lutchia, R., Gigandet, S., Huybrechts, I., Julia, C., Kesse-Guyo, E., Allès, B., Andreeva, V. A., Galan, P., Hercberg, S., Deschasaux-Tanguy, M., and Touvier, M. (2022). Artificial sweeteners and cancer risk: results from the nutriNet-santé population-based cohort study. *PLoS Medicine*, 19(3), e1003950.