

Nanopartikül Karakterizasyon Yöntemleri ve Ekotoksisite Deneylerindeki Önemi

Nanoparticle Characterization Methods and Its Importance in Ecotoxicity Experiments

Yeşim DAĞLIOĞLU¹ , Huri ÖZKAN YILMAZ² 

¹Ordu Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Ordu/Türkiye

²Dr. Ali Menekşe Göğüs Hastalıkları Hastanesi, Giresun, Türkiye

Öz

Nanoteknoloji önemli bir yenilikçi, bilimsel ve ekonomik büyüme alanıdır. Bununla birlikte, nanopartiküller insan sağlığı ve çevre üzerinde zararlı etkilere sahip olabilir. Şimdiye kadar, nanopartiküllerin toksisitesi üzerine artan sayıda çalışma yapılmasına rağmen hala niceliksel ekotoksisite veri eksikliği bulunmaktadır. Nanopartiküller en az bir boyutu ≤ 100 nm olup karbon, silikon ve metaller gibi çok farklı temel materyalden oluşabilir. Nanopartikül atomlarının yaklaşık % 40-50'si yüzeyde olmasından dolayı reaktivitesi yüksektir. Buna bağlı olarak da farklı biyolojik etkiler göstermesi beklenmektedir. Ekotoksisite deneylerinde nanopartiküller ile nanopartikül agregatlarının ayrıntılı bir şekilde karakterize edilmesi gerekir. Çünkü, nanopartiküllerin çevresel konsantrasyonları hem etki derecelerini hem de maruz kalma değerlendirmelerini değiştirmektedir. Çevredeki nanopartiküller ile agregat nanopartiküllerinin yapısı son ürünlerin özellikleri ve ortamdaki davranışları üzerine büyük önem taşımaktadır. Farklı ortamlardaki nanopartikülleri ölçerken, konsantrasyonlarla ilgili veriler sağlamak tek başına yeterli değildir, aynı zamanda nanopartiküllerin boyut dağılımı ve fizikokimyasal özellikleri hakkında da bilgi gereklidir. Tek bir teknik bu bilgilerin hepsini sağlayamaz, bu nedenle farklı analitik teknikler gereklidir. Bu derlemede, nanopartikül toksisitesinin değerlendirilmesinde nanopartikül karakterizasyonun önemi açıklanmıştır. Aynı zamanda, nanopartiküllerin mikroskopik, kromatografik, spektroskopik yöntemler, santrifüjleme ve filtrasyon teknikleri ve diğer teknikler adı altında nanopartikül boyut ve fizikokimyasal özellikleri dikkate alınarak karakterizasyon yöntemleri ayrıntılı olarak tartışılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Ekotoksisite, Karakterizasyon, Nanopartikül, Nanotoksisite, Nanotoksikoloji

Abstract

Nanotechnology is an important area of innovation, scientific and economic growth. However, nanoparticles may have harmful effects on human health and the environment. So far, despite the increased number of studies on the toxicity of nanoparticles, there is still a lack of quantitative ecotoxicity data. At least one dimension of nanoparticles is ≤ 100 nm and can consist of very different base materials such as carbon, silicon and metals. The reactivity is high because about 40-50% of the atoms in the nanoparticle are on the surface. Accordingly, different biological effects are expected. Nanoparticles and nanoparticle aggregates should be characterized in detail in ecotoxicity assays. Because the environmental concentrations of nanoparticles change both the efficacy ratings and the exposure assessments. The structure of the surrounding nanoparticles and aggregate nanoparticles is of great importance to the properties of end products and their behavior in the environment. When measuring nanoparticles in different media, it is not enough to provide data on concentrations. It is also necessary to know the size distribution and physicochemical properties of nanoparticles. A single technique can not provide all of this information, so a different analytical technique is required. In this review, the significance of nanoparticle characterization in assessing nanoparticle toxicity is described. At the same time, the characterization of nanoparticles has been discussed in detail, taking into consideration the nanoparticle size and physicochemical properties, such as microscopic, chromatographic, spectroscopic methods, centrifugation and filtration techniques and other techniques.

Keywords: Ecotoxicity, Characterization, Nanoparticles, Nanotoxicity, Nanotoxicology

Sorumlu yazar/Corresponding Author: Yeşim DAĞLIOĞLU, Tel: 05321594062, e-posta: yozkan52@gmail.com

Gönderilme/Submitted: 25.10.2017, **Düzenleme/Revised:** 22.02.2018, **Kabul/Accepted:** 23.03.2018.

I. GİRİŞ

Nanoteknoloji, bilim ve teknolojik uygulamalarının pek çok alanını kapsayan oldukça umut ve heyecan verici yenilikçi, bilimsel ve ekonomik büyüme alanı olan çaprazlama moleküler teknolojisidir [1]. Nanobilim nanometre düzeyinde (0.1-100 nm çapında) materyalleri anlamaya çalışır [2].

Nanoteknoloji, maddenin bu seviyede (nano) sentezlenmesine, değiştirilmesine ve manipüle edilmesine çalışmaktadır. Resmi bir tanımlamasının yapılmamasına rağmen genelde 100 nm'nin altında en az bir boyuta sahip malzemeler olarak kabul edilir [3]. Nanoteknoloji uygulaması, konvansiyonel malzemelerin temel fiziksel ve kimyasal özelliklerinin değiştirilmesini sağlar, çünkü malzemelerin boyutları nanometreye indirgenmesiyle benzersiz elektrik, optik ve mekanik özelliklere sahip yeni malzemeler oluşur [13]. Bununla birlikte, nanomalzemelerin kalıntıları, insan sağlığı ve çevre üzerinde zararlı etkiye sahip olabilir. Nanopartiküllerin (NP'lerin) farklı matrislerdeki analizi, NP kompozisyonu ve kütle konsantrasyonunun belirlenmesi ile sınırlandırılmamalıdır. Çünkü, NP'lerin potansiyel toksisitesi ve davranışları, partikül sayısı, yükü, boyut ve boyut dağılımı, kimya ve reaktivitesi, yüzey alanı, yapı ve şekli ile agregasyon durumu ve elemental kompozisyonu gibi çok çeşitli faktörlerden etkilenebilir [5-8].

Kısaca bu özellikleri şunlardır;

Agregasyon/toplanma durumu; agregasyon eğilimi gösteren NP'ler işlevselliğini koruyabilir, ancak boyutlarındaki artış, hücreler tarafından alınımının azalmasına neden olabilir. *Elemental kompozisyonu*; farklı partikül bileşimi, farklı davranış/(toksik) etkiye yol açar. *Kütle konsantrasyonu*; normalde kontaminant konsantrasyonunun artışı toksisite/etki artışına neden olur, bu durum daima NP'ler için geçerli değildir. *Partikül sayısı konsantrasyonu*; NP'ler düşük kütle konsantrasyonlarına sahiptir, ancak toplam partikül sayıları yüksek yüzde göstermektedir. *NP Şekli*; farklı partikül şekilleri (örneğin, küresel, boru şekilli vs.) farklı afiniteler veya erişilebilirliklere sahiptir, örneğin NP'lerin membranlardan hücrelere taşınımı ve bu NP'lerin farklı antibakteriyel davranış sergilemesidir. *Boyut ve boyut dağılımı*; NP'ler boyutlarına göre tanımlanır ve sınıflandırılır, çünkü NP boyutu, taşınma davranışlarını tanımlayan temel özelliklerden birisidir. *Çözünürlük*; çözünür NP'lerin iyonik formları zararlı veya zehirli olabilir. *Türleşme*; farklı türler, farklı davranış, toksisite ve etki gösterebilir (Örneğin, C60'a karşı C70, doğal organik madde veya oksidasyon durumu ile NP kompleksleri). *Yapı*; NP kararlılığını veya davranışını etkileyebilir (örn., TiO₂'nin muhtemel kristal yapıları olarak rutil veya anastaz formları). *Yüzey alanı ve porozite*; yüzey alanının artışı reaktivite ve emme davranışını artırır. *Yüzey yükü*;

yüzey yükünün özellikle dispersiyonlarda NP stabilitesi üzerine etkisi vardır. *Yüzey kimyası*; kaplamalar farklı kimyasal bileşimlerden oluşabilir ve bu NP davranışını veya toksisitesini etkileyebilir (örneğin, CdSe çekirdeği ve ZnS kabuğu bulunan kuantum noktaları).

NP'ler, bulk ve moleküler materyal arasındaki madde-nin ara bir supramoleküler halini temsil eder [4]. Partikül boyutu çok büyük yüzey hacim oranı sağlamasının dışında, NP biyoyoumluluk yüzey özellikleri, NP tarafından taşınan yüklere ve kimyasal reaksiyona bağlıdır. Polimerik makromoleküller *in vitro* hücre membranları ile güçlü bir etkileşim gösterirler. NP'lerin biyolojik dokuların yüzey astar tabakaları ile bu etkileşimi NP'lerin yüzey kimyası ve reaktivitesi ile belirlenir [4].

NP'lerin herhangi bir ortamda nasıl davranacağı konusu hala büyük ölçüde bilinmemektedir. Bununla birlikte, boyutları, yüzey yükleri ve kimyasal reaktivitesi kısaca yukarıda bahsedilen özellikleri hakkında bilenlere dayanarak potansiyel tehlikeleri hakkında makul bazı öngörüler yapılabilir. Fakat temel olarak süper molekül varlıklar oldukları için, yüzey özelliklerinden edinilen bilgilere dayanarak öngörülemez yeni özellikleri ortaya çıkabilmesinden dolayı biyolojik etkileşimleri hakkında kolaylıkla öngörü yapılamaz [4, 24-25]. Nanoteknolojinin sürdürülebilir gelişimini sağlamak için çeşitli uygulamalarda kullanılan NP'lerin risk değerlendirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır [17, 25]. Bu tür risk değerlendirmeleri, hem etki hem de maruz kalma değerlendirmelerini gerçekleştirmek için uygun analizler ve yöntemler gerektirir [30-32].

Geleneksel olarak, maruz kalma değerlendirmesi hem bir modelleme hem de bir ölçüm yaklaşımı içermesi önerilir, her iki yaklaşımda enstrümantasyon ve analitik teknikler gerektirir [17,29]. Modelleme yoluyla NP'nin çevresel konsantrasyonlarının tahmini, emisyon senaryolarına (örneğin üretim hacimlerinden ve yaşam döngüsü değerlendirmelelerinden) ve parçalanma parametrelerine dayanır (örneğin akıbeti ve davranışı gibi). Analitik teknikler, düşük konsantrasyonlu NP'lerin ölçülmesi için yeterince hassastır, zira küçük partiküller normalde toplam kütlede yalnızca küçük bir bölümünü temsil eder.

Analitik teknikler, laboratuvar analizlerinin ortamdaki etkilenmeyen çevre koşullarını yansıtmasını sağlaması için numunelerin bozulmasını en aza indirmelidir [35, 36]. Mikroskopik yaklaşımlar, kromatografi, santrifüjleme ve filtrasyon, spektroskopik ve ilgili diğer teknikler olmak üzere NP konsantrasyonu, özellikleri, tespiti ve karakterizasyonu hakkında bilgi vermek için farklı yaklaşımlar ve çok sayıda analitik teknikler mevcuttur. Bu nedenle, su, toprak, çökelti, kanalizasyon çamuru ve biyolojik örnekler gibi

kompleks çevre matrislerindeki konsantrasyon ve NP karakteristiklerini belirlemek için uygun analitik yöntemlerin geliştirilmesi gerekmektedir.

1.1 Karakterizasyon için Numunelerin Hazırlanması

Kullanılacak tekniğe/yönteme bağlı olarak doğal numuneleri analiz etmek için numune hazırlama ve/veya sindirme işlemlerine sıklıkla ihtiyaç duyulmaktadır. NP'ler çevrelerine tepki olarak yapı ve bileşimini değiştirebilirler. Elde edilen veya ön işleme tabi tutulmuş veya sindirilmiş numuneler partiküllerin yerine karakterize edildiği durumda genellikle sonuçlar farklı olabilir [34]. Analizlerdeki bu artefaktlar numunenin hazırlanmasını minimuma indiren veya gerektirmeyen teknikler kullanarak önlenabilir. Numune hazırlığı önlenemiyorsa, artefaktları izlemek için dikkatli bir örnekleme ve hazırlama yöntemleri gereklidir. NP'lerin doğasında zamanla değişebilir; Örneğin agregasyon artabilir veya azalabilir ve partiküller eriyebilir [34]. Bununla birlikte, kolloidal NP'lerin dispersiyonlarının kararsızlığından dolayı *in situ* analizler tercih edilir. Ancak bu yöntemler nadiren mevcuttur [17, 20]. Diğer bir seçenek örneklemeden analize kadar minimum pertürbasyona neden olan metodolojileri uygulamaktır. NP'lerin

numunelenmesi genellikle standart numune alma protokolleri ile mümkündür ancak kullanma prosedürleri birçok diğer kimyasaldan farklıdır. Yüzey sularındaki kolloid numunelerinin toplanmasında çoğunlukla minimum adsorpsiyon ve kontaminasyonu önlemek için inorganik kolloidler ve metal analizleri için plastikler, özellikle fluoroplastik şişeler ile organik iz elementlerinin analizi için cam şişeler kullanılır [21]. Üretilen NP'ler organik bir kaplamaya veya yüzey aktif cismine sahip bir inorganik çekirdekten oluşabileceğinden geleneksel malzeme seçimlerine dikkat edilmelidir [17]. Ayrıca, nanopartikül yüzey yükü ve spesifik pH'da hem plastik hem cam şişe duvarlarındaki muhtemel yükler göz önüne alınmalıdır.

1.2 Karakterizasyon Yöntemleri

1.2.1 Mikroskopik teknikler

Mikroskopik teknikler optik, elektron ve taramalı prob mikroskopu yöntemlerini içerir. *Taramalı yakın alan optik mikroskopi (SNOM)*; NP'lerin boyutları optik mikroskopi algılama limitinin altında olduğundan, NP agregatlarını görüntülemek için 50 ila 100 nm arasında çözünürlüğe sahip SNOM modifiye görüntüleme tekniği kullanılabilir [9]. *Konfokal mikroskopi/Konfokal lazer tarama mikroskopu (CLSM)*; floresan numuneleri algılayabilmesi ve kalın örnekleri görüntüleyebilmesinden dolayı kolloid numunelerin

karakterize edilmesinde kullanılabilir [8]. NP'lerin görselleştirilmesi/karakterizasyonu için en popüler teknikler elektron ve taramalı prob mikroskoplarıdır. Bu tekniğe bağlı olarak, alt-nanometre aralığındaki çözünürlükler elde edilebilir. *Atomik kuvvet mikroskopisi (AFM)*, *taramalı elektron mikroskopu (SEM)* ve *geçirimli elektron mikroskopisi (TEM)* kullanılarak NP'ler sadece görselleştirilemez, aynı zamanda agregasyon, dağılma, emilim, boyut, yapı ve şekil durumu gibi özelliklerde gözlemlenebilir [11]. TEM'de, bir görüntü elde etmek için elektronlar bir numune boyunca iletilir (dolayısıyla numunenin çok ince olması gerekir). SEM'de dağınık elektronları görüntülemek için numune arayüzde bulunur. Genel olarak, bir elektron mikroskopunda daha hafif atomların görüntülenmesi, elektronları daha az verimli şekilde saçtığı için daha zordur [13]. *Analitik elektron mikroskopu (AEM)*; analitik (çoğunlukla spektroskopik) cihazlar, genel AEM olarak bilinen ek element bileşimi analizi için elektron mikroskoplarıyla birleştirilebilir. Örneğin, *kayıp elektron enerji spektroskopisi (EELS)* ve *enerji dağılımlı X-ışını spektroskopisi (EDS)*; elemental analizler için kullanılır. Bunlar TEM ile birleştirilirdiğinde numunenin temel bileşimi hakkında ek bilgiler verir [11]. *Seçilmiş alan elektron difraksiyonu (SAED)*; NP'lerin kristal özellikleri hakkında bilgi verir [10]. Bu teknikler güçlü olmakla birlikte bazı dezavantajlara sahiptir. Bunlar numuneleri yıkıcı/bozucu tekniklerdir ve bu nedenle numuneler sadece bir kez analiz edilebilir. Ayrıca, biyolojik numuneler için, TEM grubu olan taramalı transmisyon elektron mikroskopu olan (STEM) kullanılabilir. STEM ile karanlık alan mikroskopu, yüksek kontrast özellikleri olmasından dolayı biyolojik örneklerin lekelenmeden görüntülenmesine olanak tanır. Kırınım ve spektroskopik tekniklerle birlikte STEM'ler

NP'ler için alt nanometre mekansal çözünürlükte görüntüler ile kimyasal veriler de sağlayabilir. *Atomik kuvvet mikroskopu (AFM)* kullanılarak NP'leri tamamen sıvı halde görüntülemek mümkündür. AFM, taramalı prob mikroskopları (SPM) ailesine aittir [18]. NP görselleştirmesi için AFM'nin ana sınırlaması, uc geometrisinin genellikle taranan partiküllerden daha büyük olmasıdır. Bu durumda taramada partikül topografyasının başlangıcında ve ofsetinde hatalara yol açarak NP'lerin yanal boyutlarının aşırı tahminine neden olur. Bu nedenle, doğru boyut ölçümleri yalnızca partiküllerin yüksekliği üzerinden yapılmalı ve yanal boyutlar çok dikkatle kullanılmalıdır. *Kimyasal kuvvet mikroskopisi (CFM)*; tekniğiyle bireysel atomların doğasını tanımlanabilir [22-23]. NP'lerin nicelleştirilmesinde sadece bu yöntemler kullanılmaz. Yukarıda yazılan yöntemlerle, kompleks biyolojik ve sucul matrikslerde kullanılacak, selektif ve hassas analitik yöntemlerin geliştirilmesine katkıda

bulunabilecek NP'lerin yüzey özelliklerini ve reaktivitesini anlamalarına yardımcı olabilirler.

1.2.2 Kromatografik yöntemler

Numunelerde NP'lerin ayrılması için kromatografiye dayalı veya bununla ilgili teknikler kullanılabilir. Bu teknikler hızlı, hassas ve tahribatsızdır, böylece numuneler daha sonra yapılacak analizlerde kullanılabilir. Bazı kromatografik cihazlarda çözücüler kullanılır ve ayrıca numuneler genellikle orijinal ortamlarında çalıştırılmaz, bu da numunde değişikliğe ve numune çözücü etkileşimine neden olabilir. Boyutlandırma tekniklerine detektör olarak geleneksel analitik cihazların (örneğin ICP-MS, DLS vb.) eklenmesiyle, gıda, su, ve toprakta bulunan farklı NP'lerin sayısallaştırmasının yanı sıra NP'ler karakterize edilebilir veya elemental olarak analizi yapılabilir [8]. NP'leri karakterize etmek için, boyut ayırmada en iyi bilinen teknikler;

Boyut dışlama kromatografisi (SEC); bu en yaygın uygulanan kromatografik yöntem olup voltametrik gibi saptama teknikleriyle birlikte kullanılır.

Alan akış fraksiyonasyonu (FFF); Kompleks doğal numunelerde NP'lerin boyut ayırımı için son derece umut verici bir tekniktir NP'leri yalnızca hidrodinamik kuvvetlere dayanan sabit faz olmadan ayırır [17,120].

Hidrodinamik kromatografi (HDC); farklı ortamlarda geniş partikül boyutu ayırım aralığı ile çeşitli NP'lerin boyutlandırılmasını sağlar. Bununla birlikte HDC, agrega oluşumunun daha iyi anlaşılmasına yardımcı olmakta özellikle yararlıdır [121-123].

Kapiler elektroforez (CE) dir. Bu yöntemler oldukça hassas olup numunelerin daha sonraki analizlerde kullanılmasını sağlar [8].

1.2.3 Spektroskopik yöntemler

Nanopartikül analizi ve karakterizasyonu için çok çeşitli spektroskopik yöntemler mevcuttur. Nanopartikül karakterizasyonu için en kullanışlı saçılım teknikleri, SLS ve DLS gibi ışık saçma yöntemleri veya SANS gibi nötron saçılımıdır.

Dinamik ışık saçılımı metodu (DLS); NP boyutlandırılması ve süspansiyonlarda agregasyonunun belirlenmesi için kullanılan en yaygın yöntemdir [14]. Aynı zamanda, DLS hızlı

in situ ve gerçek zamanlı boyutlandırma sağlar [19], fakat, toz parçacıkları gibi müdahaleler ile daha küçük partiküllere kıyasla saçılma yoğunluğunu ve dolayısıyla boyutlandırma sonucunu etkileyecek olan bir dizi olası artefakt

kaynağı olmasından dolayı önemli sınırlamalara sahiptir. Ayrıca, heterojen boyut dağılımlarına sahip partikülleri içeren numunelerden elde edilen verilerin yorumlanması zordur. DLS sadece niceldir ve numunenin içeriği bilinmediği veya saf olmadığında boyut fraksiyonları spesifik bir kompozisyonun partikülleri ile ilgili değildir [26].

Foton korelasyon spektroskopisi (PCS); DLS de olduğu gibi özellikle NP'lerin boyutlandırılması ve süspansiyondaki agregasyon durumlarının saptanması için yararlıdır. Lazer tabanlı yöntemler;

Küçük açılı X-ışını saçılımı (SAXS); monodispers (ortamdaki tüm taneciklerin büyüklüğü aynı) ve polidispers (tanecik büyüklükleri birbirinden farklı) sistemleri karakterize edebilir.

Lazerle indüklenen arıza tespiti (LIBD); çok düşük algılama limitine sahip ve kolloidlerin boyut ve konsantrasyon analizi için uygundur.

Raman spektroskopisi; NP'lerin yapısal karakterizasyonu için uygundur [8, 33].

Küçük açılı nötron saçılımı (SANS); katı veya sıvı numunelerde kullanılabilir [8]. X-ışını spektroskopisi, XPS, XRF ve XAS ve XRD tekniklerini kapsar.

X-ışını fotoelektronunu (XPS); NP yüzeylerini ve kaplamaları karakterize etmek için yararlı olabilir.

X-ışını kırınımını (XRD); tahribatsızdır, doğal ve imal edilen malzemelerin kristalografik yapısı veya elemental bileşimi hakkında bilgi verebilir.

X-ışını absorpsiyonu (XAS) ve *emisyon spektroskopisi*; kimya ve malzeme bilimlerinde elemental kompozisyonu ve kimyasal bağları belirlemek için kullanılır.

X-ışını floresan (XRF); bu spektroskopi yöntemi numunelerde tahribat yapmaz. Katı, toz veya sıvı haldeki numunelerde bulunan elementlerin konsantrasyonlarının belirlenmesi ve tanımlanmasında kullanılabilir [27].

Kütle spektrometresi; bir iyon kaynağı, bir kütle analizörü ve bir dedektör sisteminden oluşur ve ESI ve MALDI tekniklerini içerir.

Elektrosprey iyonizasyon (ESI) ve *matris destekli lazer desorpsiyon/iyonizasyon (MALDI)*; sıvı ve katı biyolojik numuneler ile sıklıkla kullanılan iki iyonizasyon tekniğidir [28].

UV-görünür spektroskopi (UV-vis spektroskopisi); NP'lerin kütle konsantrasyonunu Beer'in yasasına göre ölçmek için basit ve kullanışlı bir analitik tekniktir. Bir numune tarafından emilen ve dağılan ışığı ölçmek için kullanılan tekniktir [45]. NP'ler optik özelliklere sahip olup boyut, şekil, konsantrasyon, aglomerasyon durumu ve nanopartiküllerin yüzeye yakın kırılma indeksine duyarlı olmasından

dolayı UV-vis ile karakterize edilmesi ve incelenmesi için uygundur.

1.2.4 Santrifüjleme ve filtrasyon teknikleri

Bu yöntemler, düşük maliyetli, yüksek hızlı ve yüksek hacimli teknikler olup numunelerin hazırlanması ve boyut fraksiyonlamasında uygun yöntemdir. *Ultra santrifüjleme (UC)*; 1,000,000 g'a kadar hızlanma için çok yüksek eğirme hızlarına sahip bir santrifüj sistemidir. Analitik ve hazırlayıcı UC olmak üzere İki farklı ultra-santrifüj tipi vardır. *Analitik ultra santrifüj (ANUC)*; numune ultraviyole ışık emilimi ve/veya optik refraktif indeks hassas sistemleri kullanılarak bir optik algılama sistemi vasıtasıyla gerçek zamanlı olarak izlenebilir. *Hazırlayıcı ultra santrifüj*; ince tanecikli fraksiyonların peletlenmesi, gradyan ayırma işlemleri ve TEM ve AFM substratlarında sudaki kolloidleri ve NP'lerin agregasyonu için kullanılmıştır [18, 26, 36]. *Çapraz akışlı filtrasyon (CFF) veya tanjant filtrasyon*; numuneleri tekrar sirküle eder ve bu sayede, tıkanıklığı, konsantrasyon polarizasyonunu ve geleneksel sonda filtrelemenin neden olduğu diğer artefaktları azaltır [20].

1.2.5 Diğer teknikler

Partikül sayıcı; bu teknik, bir karbon nanotüp tabanlı coulter counter kullanılarak NP'lerin boyut ve yüzey yükü karakterizasyonunda başarıyla uygulanmıştır [37].

Yoğunlaştırma parçacık sayacı (CPC); alkol ve su gibi çeşitli işletim sıvılarını kullanarak yoğunlaştırma işlemiyle partiküllerin büyütülmesi bireysel partiküllerin sayısı ve konsantrasyonu hakkında bilgi verir [15].

Diferansiyel hareketlilik analizörü (DMA); alt mikrometre aerosol partiküllerinin boyut dağılımını belirlemek için kullanılabilir [38, 39, 40].

Tarama hareketlilik parçacık ölçme cihazı (SMPS); bir DMA ve bir CPC'den oluşur. İlk olarak, partiküller DMA'daki elektriksel hareketlilikleri ile ayrılır, daha sonra, boyut fraksiyonlamaları, bu boyuttaki partikül konsantrasyonunu belirleyen TBM'ye girer.

Brunauer-Emmett-Teller (BET); çok yaygın olan bu yöntemi, katıların ve böylece gaz adsorpsiyonu ile nanopartiküllerin spesifik yüzey alanlarının belirlenmesini sağlar [12].

Elektroforetik hareketlilik ve zeta potansiyeli; elektroforez dağılık partiküllerin özelliklerini özellikle de zeta potansiyelini ölçmek için kullanılır.

Zeta potansiyeli; bir parçacığın belirli bir ortamda elde ettiği toplam yükün bir ölçümüdür ve bir koloidal sistemin potansiyel stabilitesinin göstergesidir. Tüm partiküller

büyük bir negatif veya pozitif zeta potansiyele sahipse birbirlerini iter böylece partikül yükü neredeyse nötr olduğunda daha yüksek kararlılığa neden olur. Zeta potansiyeli net yükün bir ölçüsüdür.

1.3 Yüzey Yük Ölçümleri

Kolloidal NP'ler sulu solüsyonlarda yüzey yüklerini artırır. Net yüzey yükü veya yüzey potansiyeli en önemli NP özelliklerinden biridir. NP dispersiyonunun partiküller arası itme ile ne derece elektrostatik olarak stabilize edildiğini açıklar. Sonuç olarak, NP yüzey potansiyelinin akibeti ve davranışları üzerinde yüzey yükünün büyük etkisi olur [16, 17]. Bununla birlikte, yüzey potansiyelini doğrudan ölçmek kolay değildir, ancak elektroforez ile ölçülen partiküllerin elektrostatik çift katmandaki bir hidrodinamik kayma düzlemindeki potansiyeli olan zeta potansiyeli ölçen basit bir yöntem bulunmaktadır. Ölçülen elektroforetik hareketlilik Smoluchowski teorileri ile Z potansiyeline dönüştürülebilir. Sıfır yük noktası (SYN) negatif ve pozitif yüklerin dengelendiği pH'dır, bu nedenle NP'lerin üzerinde net bir yük yoktur. SYN'de, genellikle çekici van der Waals kuvvetlerinin (bağlarının) harekete geçebilmesi için partiküllerin yakın temas etmesi sağlandığından dolayı maksimum agregasyon gerçekleşir.

1.4 Kütle Yoğunluğunun Ölçümü

Kütle, NP'lerin geleneksel ve en sık ölçülen konsantrasyon metriğidir. NP numunelerinin toplam kütle konsantrasyonlarını ölçmek için günümüzde çeşitli analitik teknikler ve metodolojiler mevcuttur. En yaygın olanları ICP-MS, AAS, UV-vis spektroskopisi ve kuvarz kristal mikro dengesidir. *Atomik absorpsiyon spektroskopisi (AAS)*; potansiyel olarak doğal organik madde (DOM) veya ağır yüzey aktif madde kapsama alanındaki kütle konsantrasyonlarını belirlemek için kullanışlı analitik yöntemdir [46]. AAS, çok çeşitli metal konsantrasyonlarının tespitinde güvenilirlik açısından iyi bilinir. *İndüktif plazma ile birleştirilmiş kütle spektrometresi (ICP-MS)*; karbon olmayan NP'lerin kütle konsantrasyonunu değerlendirmek için önde gelen bir analitik tekniktir, çünkü diğer yöntemlerle karşılaştırıldığında hassas bir saptama limiti sağlar (0.1-0.05 µg/L), izotopik ölçüm için büyük doğrusal bir aralık ve potansiyele sahiptir [11, 49]. Tipik olarak, ICP-MS için NP numuneleri, ölçümden önce çoklu asit ile muamele edilerek hazırlanır. Organik maddelerden NP analizi yapılacaksa yaş yakma (kül etme) metodu ile numuneler hazırlanır. UV-vis spektroskopisi laboratuvar temelli çalışmalar için basit ortamda agregasyonsuz NP numunelerinin

yaklaşık toplam kütle konsantrasyonu ölçümü için uygundur [11]. Sulu fazda fulleren NP gibi veya yüksek iyonik mukavemetli ortamda yüklü stabilize NP'ler gibi agrega numuneleri için UV-vis verileri dikkatlice analiz edilmelidir. Çünkü NP'lerin spektroskopik özellikleri boyutları, yüzey özellikleri ve agregasyon durumuna göre önemli ölçüde değişiklik gösterir [11, 48]. *Kuvars kristal mikro balans (KKMB)*; piezoelektrik özelliği etki yoluyla NP kütlesini algılamakta başarıyla kullanılabilir. KKMB, NP'lerin boyutlarından veya yüzeylerinden etkilenmeden nanokristallerin kütle konsantrasyonunu ölçmek için doğrudan ve hassas bir tekniktir [47].

Çevresel süreçleri değerlendirmek ve toksikolojideki doz-tepki ilişkilerini yorumlamak için farklı NP konsantrasyon ölçümlerinin önemini Palchoudhury 2015'de konsantrasyon metriğinde özetlemiştir. Buna göre; Kütle konsantrasyonu: birimi $\mu\text{g/L}$ dir. Daha büyük (yüksek kütle) NP'lerin toksisitesini analiz eden nano (toksikoloji) ile ilgilidir, örneğin, sedimentasyon. Yüzey alanı konsantrasyonu: birimi $\text{m}^2 \text{cm}^{-3}$ dir. Enflamasyon gibi küçük NP ile ilgili toksisite etkilerini daha iyi gösterir. Sayı konsantrasyonu: partiküller L^{-1} dir. Nanotoksikolojideki önemi küçük NP fraksiyonu ile alakalıdır, örneğin, agregasyon/ayırıştırma.

1.5 Nanopartikül Özelliklerine Göre Potansiyel Ölçümlerde Kullanılan Analitik Yöntemler

Agregasyon: Mikroskopik teknik; STEM, TEM, SEM, AFM, STM, santrifüj ve filtrasyon teknikler; ANUC, spektroskopik yöntemler; XRD, SANS, diğer teknikler; zeta potansiyeli.

Kütle konsantrasyonu ölçümü: Mikroskopik teknik; AEM, CFM, diğer teknik; gravimetri, termal analiz.

Kimyasal kompozisyonu: Mikroskopik teknik; AEM, CFM, spektroskopik yöntemler; NMR, XPS, Auger, AES, AAS, MS, XRD, EBSD.

Partikül sayısı konsantrasyonları: Diğer teknik; partikül sayacı, CPC

Şekil: Mikroskopik teknik; STEM, TEM, SEM, AFM, STM, Kromatografik teknikler; FIFFF-SLS, SedFFF-DLS, santrifüj ve filtrasyon teknikleri; UC

Boyut: Mikroskopik teknik; STEM, TEM, SEM, AFM, STM, diğer teknikler; DMA

Boyut dağılımı: Mikroskopik teknik; STEM, TEM, SEM, AFM, STM, Kromatografik teknikler; FFF, HDC, SEC, santrifüj ve filtrasyon teknikler; CFF, UC, CFUF, spektroskopik yöntemler; SPMS, SAXS, diğer teknikler; UCPC, SMPS

Çözülme: Diğer teknikler; Voltametri, titrasyon gibi ince filmlerde difüzyon gradyanlar

Türleşme yapısı: Mikroskopik teknik; STEM, TEM, SEM, AFM, STM, diğer teknikler; BET Yüzey alanı (porozite)

Yüzey yükü: Kromatografik teknikler; CE, diğer teknikler; Zeta potansiyel

Yüzey kimyası: Mikroskopik teknik; AEM, CFM, spektroskopik yöntemler; XPS, Auger, SERS

1.6. Nanopartikül Karakterizasyonunun Ekotoksitesite Çalışmalarındaki Yeri

Nanopartiküllerin, toksik etki mekanizmaları veya nedenlerini doğru şekilde saptamak için nanopartikül özelliklerini hem biyolojik ortamın dışında hem de biyolojik çevrede iyi anlamak gerekir. Araştırmacılar fizyolojik ortamın dışındaki NP'lerin boyut, şekil ve yüzey özelliklerini incelemek için

Tablo 1: Nanopartikül boyutlandırma yöntemleri ve nanopartikül ölçümleri için boyut aralıkları

	Boyut		Analizler
NP noyutu	0.001 μm (1 nm)	0.01 μm (10 nm)	FFF, TEM, SEM, AFM, UC, HDC, CE, santrifüj, SEC, LIBD, X-ışını, SANS
	0.01 μm (10 nm)	0.1 μm (100 nm)	SedFFF, DLS, TEM, SEM, AFM, CLSM, SNOM, membran filtrasyon, HDC, CE, santrifüj, SEC, LIBD, X-ışını, SANS
Partikül, bulk materyal ve agregatların boyutu	0.1 μm (100 nm)	1 μm (1000 nm)	SedFFF, DLS, TEM, SEM, AFM, CLSM, SNOM, membran filtrasyon, HDC, CE, santrifüj, LIBD, X-ışını, SANS.
	1 μm (1000 nm)	10 μm (10000 nm)	lazer kırınımı, CLSM, SNOM, membran filtrasyon, HDC, LIBD, X-ışını emilimi
	10 μm (10000 nm)	100 μm (100000 nm)	lazer kırınımı, X-ışını emilimi
	100 μm (100.000 nm)	1 mm (1000000 nm)	lazer kırınımı, X-ışını emilimi

* Lead ve Wilkinson (2006) ve Gimbert et al. (2007) tarafından uyarlanmıştır.

yukarıda da açıklandığı gibi birçok araç ve yönteme sahiptir. Ekotoksosite çalışmalarında, NP'lerin biyolojik aktivitesini etkileyen/değiştiren temel parametreler büyük oranda bilinmediğinden nanopartikül karakterizasyonu oldukça önemli hale gelmiştir. Bu sebeple ekotoksosite deneylerinde nanopartikül karakterizasyonu açık ve kapsamlı şekilde yapılmalıdır. Çünkü, toksisite için kritik olduğu tespit edilen özellikler için nitelendirilmemiş nanopartikül ile yapılan çalışmaların ekotoksositeye katkısı az olacaktır. Bununla birlikte, bu alanda çalışan araştırmacılar tarafından genellikle kabul edilen bir takım temel özellikler bulunmaktadır. Bunlar nanotoksosite çalışmalarında kullanılan nanopartiküller için ölçülmesi gereken minimum özelliklerin temelini oluşturmaktadır. Bunlar, boyut ve şekil, dispersiyon hali, fiziksel ve kimyasal özellikler, yüzey alanı ve yüzey kimyasıdır. Genelde toksiste çalışmalarında bu özellikler dikkate alınarak karakterizasyon yapılmıştır.

Ekotoksosite deneylerinde nanopartikül karakterizasyonu ilk yıllarda su ortamında (deiyonize su, distile su, nano saf su) gerçekleştirirken son yıllarda genellikle karakterizasyon için deney ortamları tercih edilmiştir. Bazı ekotoksosite çalışmalarda ise farklı deney ortamlarında nanopartikül karakterizasyonunun farklı sonuçlar sergilediğini göstermek için araştırmacılar aynı karakterizasyon yöntemlerini hem su hemde deney ortamlarında ayrı ayrı gerçekleştirmişlerdir. Ayrıca, yine aşağıdaki tabloda görüldüğü gibi nanopartikül toksisitesinin değerlendirildiğı ekotoksosite çalışmalarının ilk yıllarında yüksek yapılı organizmalar yerine daha çok fungus, maya, vektör ve bakteri gibi organizmalar ile hücre, hücre hattı gibi *in vivo* çalışmalar terih edilmiştir. Aşağıdaki tabloda ekotoksosite deneylerinde kullanılan nanopartikül karakterizasyon yöntemleri ve karakterize edilen deney ortamları kronolojik olarak verilmiştir (Tablo 2).

Tablo 2. Nanopartikül karakterizasyon yöntemlerinin değerlendirildiğı bazı ekotoksosite çalışmalar

Nanopartikül	İndikatör organizma	Karakterizasyon yöntemleri	Karakterize edilen ortam	Araştırmaçı ve yılı
Ag NP	Maya suşu MKY3	TEM, XRD, XPS, UV-Vis ve WAXS	Distile su	Kowshik ve ark., 2002 [50]
Kitosan-DNA NP	Mezenkimal kök hücreler İnsan embriyonik böbrek hücreleri (HEK293) İnsan osteosarkom hücreleri (MG63)	TEM, AFM, fFluorescamine ve PicoGreen analizleri	-	Corsi ve ark., 2003 [51]
Au NP	<i>Thermomonospora sp.</i> (aktinomiset)	TEM	-	Ahmad ve ark., 2003 [52]
Kitosan-Florescein NP	Tavşan kornea ve konjunktival epitel	TEM, PCS* ve LDA*	Distile su	De Campos ve ark., 2004 [53]
Ag, Al, MoO ₃ , MnO ₂ , Fe ₃ O ₄ , TiO ₂ , CdO,	Sıçan karaciğer hücreleri	-	-	Hussain ve ark., 2005 [54]
TiO ₂ NP	<i>Desmodesmus subspicatus</i> (alg) <i>Daphnia magna</i> (su piresi)	-	-	Hund-Rinke ve Simon 2006 [55]
Fulleren, C60	<i>Pimephales promelas</i> (balık) <i>Daphnia magna</i> (alg)	-	-	Zhu ve ark., 2006 [56]
TiO ₂ , ZnO, Fe ₃ O ₄ , Al ₂ O ₃ , CrO ₃	Fare neuro-2A hücreleri	TEM	Deiyonize su	Jeng ve Swanson 2006 [57]
ZnO, Bulk ZnO, ZnCl ₂	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> (alg)	DLS, TEM, Dengeleme diyalizi	Saf su	Franklin ve ark., 2007 [58]
Ag NP	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> (alg)	DLS, Zeta potansiyeli ve TEM	Deney ortamı	Navarro ve ark., 2008 [59]
Cu NP	<i>Phaseolus radiatus</i> (fasulye) <i>Triticum aestivum</i> (buğday)	TEM	-	Lee ve ark., 2008 [60]
Cu, ZnO, TiO ₂ NP	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> (alg)	-	-	Aruoja, ve ark., 2009 [61]
CeO ₂ NP	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> (alg) <i>Daphnia magna</i> (su piresi) <i>Thamnocephalus platyurus</i> (kabuklu) <i>Danio rerio</i> (balık)	NİA*, Zeta potansiyeli ve XANES*	Deney ortamları ve deiyonize su	Hoecke ve ar., 2009 [62]
Ag NP	<i>Caenorhabditis elegans</i> (nematod)	TEM, DLS ve karanlık alan mikroskopu	Deney ortamı	Roh ve ark., 2009 [63]

CeO ₂ , SiO ₂ , TiO ₂ NP'leri	<i>Chironomus riparius</i> <i>Daphnia magna</i>	TEM ve BET*	Deney ortamı	Lee ve ark., 2009 [64]
ZnO, CuO, TiO ₂	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	-	Kasemets ve ark., 2009 [65]
ZnO, CeO ₂	<i>Glycine max</i> (soya fasulyesi)	XRD, ICP-OES, XAS	CeO ₂ NP için saf HNO ₃ + H ₂ O ₂ (1:4), ZnO NP için Saf HNO ₃	López-Moreno ve ark., 2010 [66]
Au NP	<i>Oryzias latipes</i> (balık)	TEM, DLS ve ICP-MS	Su ortamı	Zhu ve ark., 2010 [67]
Eclipta prostrata yaprak özütü ile gümüş nanopartiküllerin sentezi	<i>Culex quinquefasciatus</i> <i>Anopheles subpictus</i> (filariasis ve sıtma vektörleri)	XRD, FTIR ve SEM	Deney ortamı	Rajakumar ve Rahuman 2011[68]
<i>Nelumbo nucifera</i> yaprak özütü ile Ag NP'lerin sentezi	<i>Anopheles subpictus</i> <i>Culex quinquefasciatus</i>	XRD, FTIR, SEM, UV – Vis	Deney ortamı	Santhoshkumar ve ark., 2011 [69]
<i>Mimosa pudica</i> yaprak özütü ile Ag NP'lerin sentezi	<i>Anopheles subpictus</i> <i>Culex quinquefasciatus</i> <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	XRD, FTIR, SEM ve UV-Vis	Deney ortamı	Marimuthu ve ark., 2011 [70]
Silika NP	Makrofaj (J774) ve fibroblast (3T3) hücre hattı	TEM, DLS	Deney ortamı	Rabolli ve ark., 2011 [71]
ZnO NP	<i>Lymnaea luteola</i> (Tatlı salyangozu)	UV-Vis, XRD, TEM ve DLS	Saf su ortamı	Ali ve ark., 2012 [72]
TiO ₂ NP	<i>Chlorella vulgaris</i> (alg) <i>Daphnia magna</i> <i>Phaeodactylum tricornutum</i> (diatom) <i>Brachionus plicatilis</i> <i>Linum usitatissimum</i> (bitki)	Zeta potansiyeli, TEM ve XRD	Deney ortamı	Clément ve ark., 2013 [73]
Ag NP	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> <i>Daphnia magna</i> Sıçan fibroblast hücre hattı Balb/3T3	EDX, TEM, SEM ve Zeta potansiyeli ve UV-Vis	Deney ortamı ve ultra saf su	Ivask ve ark., 2014 [74]
Ag NP	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> , <i>Daphnia magna</i> , <i>Danio rerio</i>	DLS, TEM ve EDX	Deney ortamı	Ribeiro ve ark., 2014 [75]
Bor NP	<i>Apis mellifera</i> ,	-	-	Dağlıoğlu ve ark., 2015 [76]
Silika NP'leri	A549, HepG2 epitel hücreleri, NIH/3T3 fibroblast hücreleri	TEM, SEM, DLS ve BET	Deney ortamı ve deiyonize su	Kim et al., 2015 [77]
PT/PVF ⁺ NP'leri	<i>Artemia salina</i> (Zooplankton)	-	-	Dağlıoğlu ve Çelebi 2015 [78]
TiO ₂ , ZnO-TiO ₂ and Ag-TiO ₂	<i>Apis mellifera</i> (Arı)	SEM	-	Özkan ve ark., 2015 [79]
Cu ve ZnO	<i>Daphnia magna</i>	TEM, ICP-OES ve DLS,	Deney ortamı	Xiao ve ark., 2015 [80]
ZnO NP	<i>Chlorella vulgaris</i> (Alg)	EDX, XRD, EDAX, FE-SEM, FTIR, ve KMA	Deney ortamı	Suman ve ar., 2015 [81]
Ag, ZnO, TiO ₂ NP	<i>Daphnia magna</i>	Zeta potansiyeli ve SEM	Deney ortamı, ultra safsu	Cupi ve ark., 2015 [82]
Pd/PVF ⁺ NP	<i>Apis mellifera</i>	-	-	Dağlıoğlu ve ark., 2015 [83]
Bor NP	<i>Desmodemus multivariabilis</i> (Alg)	-	-	Dağlıoğlu ve Öztürk 2016 [84]
ZnO-TiO ₂	<i>Artemia salina</i>	SEM ve DLS	Distile su	Dağlıoğlu ve ark., 2016 [85]
<i>Centroceras clavulatum</i> 'dan sentezlenmiş Ag NP	<i>Aedes aegypti</i> (sivrisinek)	UV-Vis, FTIR, XRD, SEM, EDX ve zeta potansiyeli	Deney ortamı	Murugan ve ark., 2016 [86]

TiO ₂ , AgTiO ₂ NP	<i>Artemia salina</i>	SEM ve DLS	Distile su	Özkan ve ark., 2016 [87]
PVA-AgNP, cit-Ag NP	İnsan hepatoblastoma (HepG2) hücreleri	TEM, ICPMS ve Zeta potansiyeli,	Deney ortamı	Vrček ve ark., 2016 [88]
Si NP'leri	<i>Zea mays</i> (Mısır)	EDX, XRD ve SEM,	Distile su	Tripathi ve ark., 2016 [89]
(ZnO-TiO ₂) _{NCM} NP'leri	<i>Desmodemus multivariabilis</i> (Alg)	TEM ve DLS	Distile su	Dağlıoğlu ve Öztürk 2017 [90]
PT/PVF ⁺ NP'leri	<i>Apis mellifera</i> (arı)	-	-	Dağlıoğlu ve ark., 2016 [91]
Pd/PVF ⁺ NP'leri	<i>Artemia salina</i> (Zooplankton)	-	-	Dağlıoğlu ve ark., 2016 [92]
TiO ₂	<i>Lemna minor</i> (sucul bitki)	-	-	Dağlıoğlu ve Türkş 2017 [93]
Bor NP'leri	<i>Myriophyllum spicatum</i> (sucul bitki)	-	-	Dağlıoğlu ve Türkş 2017 [94]

*Geniş açılı X-ışını kırınımı (WAXS), Nanopartikül izleme analizi (NIA), X-ışını fotoelektron spektroskopisi (XPS), Yüze karakterizasyonu (BET), Taramalı Elektron Mikroskopu (FESEM), X-ışını spektroskopisi (EDX), Lazer doppler anemometri (LDA), X-ışını emilimi yakın kenar yapısı (XANES), Konfokal mikroskop analizi (KMA).

II. TARTIŞMA

Temel olarak nanopartiküllerin (NP'lerin) ekotoksitesitesini belirlemek mümkündür. NP'ler spesifik NP'lerin özelliklerine bağlı olarak çeşitli ekotoksikolojik etkiler gösterebilir. Deney ortamlarında NP'lerin hazırlanması, doz/konsantrasyonlarının belirlenmesi ve uygulanması ortamdaki nanopartiküle maruz kalmanın potansiyel zararlı etkilerinin araştırılmasında önemli faktörler arasındadır. Buna ilaveten, NP'lerin çeşitli fizikokimyasal özelliklerinden biri olan agregasyon eğilimi ise, kimyasal çevreye bağlı olarak toksisiteyi etkileyen önemli bir faktördür. Bu eğilimlerinden dolayı, NP'lerin ekotoksitesite çalışmalarında kullanılan deney ortamlardaki agregasyon durumları diğer özelliklere nazaran daha önemli hale gelmiştir. Tam ve doğru nanopartikül karakterizasyonunun, biyolojik sistemlerde NP'lerin potansiyel toksitesitesini değerlendirmenin önemli bir parçası olduğu görüşü genel kabul görmüştür [2, 94].

Nanopartiküllerin doğru karakterizasyonu, sonuçların tekrarlanabilir olmasını ve ayrıca biyolojik etkilerini belirleyen NP'lerin özelliklerini anlamının temelini sağlamak için önemlidir. Bununla birlikte, nanopartikül karakterizasyon yöntemlerinde araştırmacılar tarafından genellikle kabul edilen bir takım temel özellikler bulunmaktadır [95-97]. Bunlar nanotoksitesite çalışmalarında kullanılan NP'ler için ölçülmesi gereken minimum özelliklerin temelini oluşturmaktadır [98]. Genellikle ekotoksitesite deneylerinde nanopartikül özelliklerini ve bunların biyolojik sistemler ile etkileşimlerini ölçmede belli başlı nanopartikül karakterizasyon teknikleri/yöntemleri kullanılmıştır. NP'lerin fiziko-kimyasal özellikleriyle ekotoksitesite arasındaki ilişkiyi araştırmak için genellikle NP'lerin birincil karakterizasyon yöntemleri arasında yüzey alanı ve yüzey alanı hakkında bilgi veren Branauer, Emmett ve Teller (BET) ve geçirimli elektron

mikroskopisi (TEM) dir. Nanopartiküller için yüzey alanı, genelde BET yöntemi kullanılarak ölçülür. BET, yüzey alanı gözeneksiz küresel bir modele dayanan tahmini bir ortalama boyut sağlar. 100 nm ve altında partikül sistemlerine uygulanabilen agregat boyutlandırma tekniklerinden birisidir. Genelde nominal boyut aralığı 5 nm'den birkaç mikrona kadar olan partiküller analiz edilebilir. Çoğu sistem için basit ve uygulanabilir. Dezavantajı ise partikül boyutu, gözeneksiz monodispers (tek dağılımlı) küresel bir modele dayalı olarak tahmini bir ortalama boyut vermesidir [98-99]. Elektron mikroskopisi (TEM), nominal boyut aralığı 0.3 nm'den birkaç mikrona kadar olan nanopartiküllerde iyi çözünürlük ve görüntüleme sağlar. Yüksek çözünürlüklü mikroskopi, numune hazırlamanın veya özel analiz koşullarının neden olduğu artefaktlara sebep olur. Örneğin, TEM, elektron demetinin numuneye nüfuz edebilmesi için yüksek vakum ve ince numune kesitleri veya sınırlı çaplı partiküller gerektirir. TEM, NP'lerin morfolojik şekli ve boyutu hakkında bilgi sağlar ve neredeyse ekotoksitesite deneylerinin tamamında NP'lerin morfoloji ve boyutlarını göstermek için rutin şekilde uygulanır. Örneğin, Lee ve ark., deney ortamında test edilen NP'lerin TEM görüntüleri ile boyut farkını göstermiştir. Aynı zamanda BET yüzey alanları daha küçük boyutlu CeO₂ ve TiO₂ NP'lerinin daha büyük yüzey alanlarına sahip olduğunu göstermiştir [64].

Nanopartiküllerin yaygın olarak, kristal yapısı X-ışını kırınımı (XRD) kullanılarak araştırılır [100]. Nano materyalin bileşimi/kompozisyonu ise, tipik olarak, enerji dağıtıcı X-ışını (EDX) spektroskopisi ve/veya X-ışını fotoelektron spektroskopisi (XPS) kullanılarak araştırılır [100-101]. XPS, daha yüzey hassas bir tekniktir ve materyaldeki elementlerin oksidasyon durumu hakkında bilgi sağlayabilir. EDX ve XPS'in tipik olarak >% 0.1 aralıktaki yabancı

madde seviyelerine karşı oldukça hassastır [100]. Kowshik ve ark., 2-5 nm boyut aralığındaki Ag NP'lerini gümüşe toleranslı maya türü MKY3 tarafından ekstraselüler olarak sentezlemişlerdir. TEM, XRD ve XPS analizleri sonucu metalik (elemental) Ag NP'lerinin oluştuğunu doğrulamıştır. Ek olarak, NP'lerin partikül boyutunun yanı sıra nanopartikül yapısını belirlemek için geniş açılı x-ışını kırınımı (WAXS) analizini gerçekleştirmişlerdir. Bu çalışmada XPS'nin, nanopartikülün kimyasal bileşiminin tahmin edilebilmesi için güçlü ve doğru bir teknik olmasından dolayı kullanılmış ve numunede C, O, N ve P ile birlikte Ag'nin bulunduğu görülmüştür. C, N, O ve P'nin varlığı muhtemelen numunedeki kontaminant proteinlerin ve diğer biyopolimerlerin varlığına bağlı olduğunu kaydetmişlerdir. Bununla birlikte, numunede Ag₂O veya Ag₂S görülmemiş ve bu sonuçlar aynı zamanda WAXS ve TEM analizinden elde edilmiştir. Mevcut araştırmalar, yüksek saflıkta Ag NP'lerinin mikrobik yolla sentezlendiğini göstermiştir. Bununla birlikte, XRD analizinde büyük partiküllerin geniş dağılımı ve baskınlığı nedeniyle daha küçük partiküllerin yapısal ayrıntıları hakkında sonuç alınamamıştır [50]. Bunu haricinde nanopartikül bileşiminin daha kesin analizleri için, NP'ler asitle diğeste edildikten sonra atomik absorpsiyon spektroskopisi (AAS), indüktif eşleşmiş plazma optik emisyon spektroskopisi (ICP-OES), daha düşük konsantrasyonda (tipik olarak ppm seviyesinde) saf olmayanları tespit edebilen endüktif eşleşmiş plazma kütle spektrometresi (ICP-MS) kullanılabilir [102-103]. Ayrıca, ICP-MS, nanopartikül alımını incelemek için nanopartiküle maruz bırakılan organizmaların veya doku örneklerinin analizine ve ayrıca NP'lerden metal iyonu salınımının miktar analiz için de uygulanabilir [102,104]. Lopez-Moreno ve ark., dokulardaki metal konsantrasyonu ve oksidasyon durumu ile ilgili verileri sırasıyla ICP-OES) ve X-ışını absorpsiyon spektroskopisi (XAS) kullanılarak elde etmişlerdir. XAS verileri CeO₂ NP'lerindeki Ce'nin oksidasyon durumuna sahip olduğunu göstermiştir. Buna ek olarak, bu çalışmada, XAS analizi soya fasulyesi fidelerindeki CeO₂ NP'lerinde herhangi bir değişiklik olmadığını göstermiştir. Yine bu çalışmada ICP analizleri, ZnO NP'leri için % 100.0±3.0 ve CeO₂ NP'leri için % 98.0±0.2 saflıkta olduğunu göstermiştir. Çinko için sertifikalı referans materyalin ICP-OES verileri bu çalışmanın sonuçlarını % 99 doğrulamıştır. Ayrıca, soya fidelerinin Zn ve Ce alımlarında oldukça farklı olduğu kaydedilmiştir [66].

Ekotoksiste çalışmalarında zeta potansiyel ölçümü, NP'lerin ve bakteri hücrelerinin (genellikle negatif yüklü yüzeye sahip olduğu) ve düşük çözünürlüklü NP'lerdeki toksiste öncüsünün arasındaki etkileşim gücünün önemli bir öngörücüsü olarak tespit edilmiştir [105-106]. Bununla birlikte, literatürde zeta potansiyelleri her zaman

bildirilmemiştir. Zeta potansiyelleri, pH'm, çözeltinin iyonik mukavemetinin ve yüzey kaplamaların varlığından etkilenebilir [105]. Ayrıca, çelişkili sonuçlarda bildirilmiştir, örneğin, partikül alımı ve protein adsorpsiyonu partikül yüküyle (negatif yüklü partiküllerin tercihli alınması) ilişkili olduğu bulunmuştur [104]. Bununla birlikte, negatif zeta potansiyelleri, negatif yüklü bakteri hücre duvarı ile daha zayıf bir etkileşime sahipken, P25 titanyum gibi toksikliği bilinen nanopartikül için de rapor edilmiştir [107-108]. Bu nedenle, zeta potansiyeli ve nanopartikül-hücre etkileşimi arasındaki ilişki tam olarak açık değildir [105]. NP'lerin zeta potansiyelleri tipik olarak elektroforez veya elektroakustik yöntemlerle ölçülür. Literatürdeki çalışmaların çoğu, ışık saçılım elektroforezi ölçümünü benimsemiştir çünkü ticari tam otomatik aletler piyasada yaygın olarak bulunmaktadır [103,108]. Zeta potansiyeli, numunenin konsantrasyonu, pH, ölçüm sıcaklığı ve dispersiyon ortamı bileşiminden önemli ölçüde etkilenir [103,109-113].

Ekotoksiste deneylerinde UV-Vis absorpsiyon spektroskopisi, belirli bir ışık dalga boyuyla aydınlatmanın fotokatalitik reaksiyonlara bağlı olarak ilave toksik etki oluşturup oluşturmayacağını incelemek için yararlı olan, nanopartikülün bant açısını belirlemek için kullanılabilir [100-101]. Fourier transform kızılötesi spektroskopisi (FTIR), adsorbatların nanomateryal yüzey üzerindeki varlığını karakterize etmek için kullanılabilir [114]. Adsorbatlar, ortamdaki numuneler için ortak olan suyun yanı sıra kasıtlı olarak katılan yüzey düzeltici/kaplayıcı ajanlar yada nano materyal sentezi sırasında istenmeden verilmiş olan adsorbat/ reaksiyona girmemiş reaktifler içerebilir [103,114]. Marimuthu ve ark., çalışmalarında *Mimosa pudica* yapraklar özütü ile Ag NP solüsyonunun sentezi ve çözeltilerde Ag⁺ iyonlarının biyolojik olarak indirgenmesi, UV-vis spektrumlarının ölçülmesi ile izlemişlerdir. Ag NP'lerinin sentezi öncesinde ve sonrasında alınan yaprak özütlerinin FTIR spektrumu analiz edilmiş ve Ag NP'lerinin oluşması için olası fonksiyonel gruplar tartışılmıştır. *M. pudica* yaprak özütü tarafından üretilen Ag NP'leri daha belirgin ve dağınık dağılmış ve FTIR spektrumları belirgin pikler sergilemiştir [70].

NP'lerin agregasyon durumu, toksik aktivitelerinin deneysel olarak değerlendirilmesi için ekotoksiste çalışmaları önemli bir zorunluluk olmuştur. Bu konu nanotoksikolojide yoğun tartışmalara neden olmuş ve bunu için iki farklı yaklaşım düşünülmüştür. İlki, elementer/birincil dağılımlı NP'lerin kendi özelliklerinin toksikolojik etkilerini araştırmak üzere incelemek, ikincisi ise risk değerlendirilmesi amaçları için önemli olduğundan organizmaların maruz kaldığı NP'lerin agregat ve/veya agregasyon durumlarının öncelikli olarak incelemektir [71]. Ekotoksiste çalışmalarında, deneysel koşullarda (deney ortamlarında) NP'lerin gerçek

agregasyon durumunun değerlendirilmesi bu sebeplerle gerekir ve bunun için dinamik ışık saçılması (DLS) gibi teknikler önerilir [115]. DLS, nominal boyutu 4 nm–6 µm arasında olan partiküller için uygulanabilir. Bu yöntemin avantajı zeta potansiyeli için de kullanılabilir olmasıdır. Dezavantajı ise boyut dağılımı genişledikçe daha az güvenilir olmasıdır [116-117]. Ayrıca, dispersiyonu arttıran fakat NP özelliklerini de değiştiren ajanlar (deterjanlar, proteinler, serum vs.) ve/veya prosedürlerin (örneğin sonikasyon) kullanılması, toksisite üzerine agregasyonun etkisinin kesin sonucuna varılmasını engellemektedir [71,115, 118-119].

Nanopartikül agregasyonunun toksisite üzerine etkisinin detaylı değerlendirildiği bir çalışmada dispersiyon ajanları olmaksızın kararlı monodispers ve agregat silikon tabanlı nanopartiküllerin (SNP) sitotoksik aktivitesi karşılaştırılmıştır. Bu amaçla, çalışmada SNP'nin dikattle kontrol edilen agregatları indüklenmiş ve iki tip hücre hattı, SNP'nin monodispers veya agregatlarca zenginleştirilmiş süspansiyonlarına maruz bırakılmıştır. DLS ile NP'lerin ortalama hidrodinamik çapının agregasyonu takiben 25 nm'den 183 nm'ye yükseldiği görülmüştür [71].

Tablo 2'de görüldüğü gibi 2007 yılına kadar yapılan birçok ekotoksikolojik çalışmalarda NP'lerin karakterizasyonu genel olarak eksik yada yapılmamıştır. Bu tarihten sonraki yapılan çalışmalarda nisbeten artan sayıda karakterizasyon yöntemleri kullanılmaya başlanmıştır. Öncelikli olarak karakterizasyon yöntemlerinde TEM sonra DLS daha sonrada XRD kullanılmaya başlanmıştır. Günümüze gelindiğinde ise ekotoksosite deneylerinde kullanılan karakterizasyon yöntemlerinin sayısı ve çeşitliliği artmıştır. Örneğin UV-vis, FTIR, ICP-OES, DLS ve EDX gibi karakterizasyon yöntemleri kullanılmaya başlanmıştır. Ayrıca, NP'lerin agregasyon kabiliyeti göz önüne alındığında, tek başına nominal (birincil/gerçek) partikül boyutunu sağlayan çalışmalar spesifik nanopartikül riskleri için yetersiz kalması muhtemeldir. Çünkü belli bir sistemde NP'lerin agregasyon derecesi NP'lerin hücrelere alımını büyük ölçüde etkiler. Nanopartiküllerin ekotoksitesi üzerine yapılan güvenilir araştırmalar NP'lerin uygun bir şekilde karakterizasyon değerlendirmelerini ve sulu (deney) ortamları hakkında temel fizikokimyasal bilgileri sağlar. Çünkü, sulu sistemlerde çözelti pH'sı ve adsorbe moleküllerin ve iyonların varlığı, yüzey yüklerini değiştirir ve NP'lerin agregasyon davranışlarını kuvvetlice etkiler. De Campos ve ark., çalışmalarında o yıllarda yapılan ekotoksosite deneylerinden farklı olarak nanopartikül karakterizasyonunda XPS ve lazer Doppler anemometre kullanılmıştır. Ayrıca, bu çalışma o yıllarda yapılan ekotoksosite deneyleriyle kıyaslandığında nadiren nanopartikül karakterizasyonunun yapıldığı çalışmalardandır [53]. Corsi ve ark., optimum sentez koşullarını belirlemek için kitosan ve DNA

arasındaki bağlanma derecesinin değerlendirilmesi için polimer üzerindeki serbest amino gruplarını ve süpernatandaki bağlanmamış DNA'yı ölçen tamamlayıcı teknikler olarak fluorescamine ve PicoGreen analizlerini kullanmışlardır [51]. Hoecke ve ark., yaptıkları çalışmalarında nanopartikül karakterizasyonunun ekotoksosite deneylerindeki önemini açıklayan ender çalışmalardan bir tanesidir. Buna göre, nanopartikül boyutu dağılımlarını nanopartikül izleme analizi (NIA) kullanılarak elde etmişlerdir. İlk olarak CeO₂ NP dağılımları pH 4'te seyreltilmesiyle incelenmiş ve NP'lerin küçük agregaları (14, 20 ve 29 nm) içerdiği ve ortalama boyutunun yaklaşık 100 nm olduğu görülmüştür. Bu agregatlar şaşırtıcı değildir, çünkü NP'ler sentez sırasında kurutulmuş ve digeste ile yeniden süspansiyon edilmiştir. NP'ler kurutulurken agregasyon oluşturması kaçınılmazdır ve digeste gibi mekanik işlemler nanopartikül agregalarını bir arada tutan kuvvetleri aşamaz. Ayrıca, numune hazırlama, ekotoksikolojik değerlendirme için önemlidir. Çünkü bu işlem, NP'lerin endüstriyel uygulamalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Çeşitli test ortamlarında seyreltikten ve pH 7.4'e ayarlanmasını takiben süspansiyonlar bir saat içinde bulanıklaşmış ve nanopartikül agregaları yaklaşık 400 nm çapa ulaşmıştır. Dolayısıyla, organizmalar ekotoksosite deneylerinde agregat haldeki CeO₂ NP'ne maruz kalırlar. Ayrıca, çalışmalarında, farklı deney ortamlarında analiz edilen nanopartikül boyut dağılımlarının çakıştığını kaydetmişlerdir. 14, 20 ve 29 nm CeO₂ NP agregalarının zeta potansiyelini, OECD alg ortamında ve M4 *Daphnia* ortamında incelemişlerdir. Buna göre NP'ler pH 7.4'te deney ortamında negatif yüzey yükü taşıırken, 10 mM KCl çözeltisinde yüzey yükü pH 7.4'te pozitif olduğunu kaydetmişlerdir. Yüzey yükünün değişimi, öncelikli olarak CeO₂ NP'lerin fosfat iyonlarını adsorbe etme eğilimi ile ve ikinci olarak NP'lerin düşük iyonik ortamda daha yüksek yük taşımalarıyla açıklanmışlardır. İstatistiksel analiz sonucunda, OECD ve M4 ortamında dağılmış NP'ler arasındaki zeta potansiyel farkları her CeO₂ NP boyutu için anlamlı olduğunu kaydetmişlerdir. Sonuç olarak araştırmacılar aynı NP'leri kullanırken bile ortam bileşimindeki değişiklikler nedeniyle nanopartikül özelliklerinde farklılıkların ortaya çıkabileceğini açıkça ortaya koymuşlardır [62].

Navarro ve ark., Ag NP'nin orijinal partikül süspansiyonunda (deneysel koşullarda) partikül boyutu ölçümlerinde (DLS) partikül boyutunun 10 nm'den 200 nm'ye kadar değişmekte olduğunu ve ortalama partikül çapının ise 40 nm olduğunu kaydetmiştir. Bununla birlikte, hacim bakımından, Ag NP'nin % 98'i 25 ±13 nm dir. TEM analizi bu sonuçları teyit etmiş ve ayrıca 10 nm'den küçük partiküller olduğu görülmüştür. Bu farklılıkların sebebinin ise, DLS ölçümlerinin daha büyük partiküllere yönelik eğilimi

ile açıklamışlardır. Ayrıca deneysel koşullar altında (MOPS) Ag NP'lerinin agregasyon oluşturmadığını kaydetmişlerdir [59]. Lee ve ark., çalışmalarında NP'lerin deney ortamındaki karakterizasyonunun ekotoksiste üzerindeki etkilerini açıklamaya çalışmışlardır. Çünkü, nanotoksiste ile bağlantılı olarak, sıklıkla boyutun küçülmesi toksistenin daha güçlü olması şeklinde beklenir. Buna göre, BET yüzey alanları sonuçları, SiO₂ NP'leri hariç daha küçük boyutlu CeO₂ ve TiO₂ NP'lerinin daha büyük yüzey alanına sahip olduğunu göstermiştir. SiO₂ NP'lerinde böyle bir eğilim gözlenmemesinin muhtemel sebebi çok küçük boyut farklılıklarından (7 ve 10 nm) ve farklı fiziksel özelliklerinden (füme ve gözenekli tipten) dolayı olabilir [64].

III. SONUÇ

Nanoteknoloji, ekonomik büyüme alanı olan medikal ve üretim teknolojilerindeki muazzam gelişmeleri ile çevresel iyileştirmeleri vaad etmektedir. Hem nanoteknoloji endüstrileri hem de hükümetler bu yeni teknolojinin bir sonucu olarak insan sağlığı ve çevresel bozulmalar için öngörülemeyen risklerin olasılığı üzerine ciddi önlemler almaktadır [1, 4, 41-43]. NP'lerin imalatının ve kullanımının dinamik bir şekilde büyümesine rağmen, eşsiz fiziksel ve kimyasal özelliklerine bağlı olarak çevresel matrislerde nicelendirmeleri için çok az analitik yöntem bulunmaktadır. NP'lerin koloidal fazlar ve agregasyon oluşturma eğilimi farklı emme ve emilme özellikleri ile şekil ve boyut çeşitliliği

NP'lerin nicelleştirilmesini (miktar, sayısallaştırma) zorlaştırır [13, 19]. Ayrıca, mevcut bilimle, NP'ler ile doğal veya başka kaynaklardan gelen partiküllerin ayırt edilmesi çok zordur [34]. Doğal olarak ortaya çıkan partiküller ile NP'lerin ayırt edilmesinin yolu bulunmalıdır. Bu sayede NP'lerin tüketici ürünleri ve çevresel konsantrasyonlarının belirlenmesini sağlayacaktır. Bu nedenle, NP'ler için seçici tespit yöntemleri geliştirilmelidir. Tieda 2012'de bu sorunun çözümünün NP etiketlemesi olabileceğini belirtmiştir. Bu etiketleme, örneğin karbon temelli NP'ler için floresan ve radyoaktif etiketlemeden, metal tabanlı nanopartiküllerin izotop zenginleşmesine veya tükenmesine kadar değişen etiketleme önerileridir. Ayrıca, deneysel bir çalışmadan sonra, özel partikül kaplamaları, nanotüpler veya fullerenlerde nadir elementlerin tutulması bu belirgin kimyasal özelliklerin saptanmasını sağlamak için kullanılabilir [15]. Farklı ortamlardaki NP'leri ölçerken, konsantrasyonlarla ilgili veriler sağlamak tek başına yeterli değildir, aynı zamanda NP'lerin boyut dağılımı ve özellikleri hakkında da bilgi gereklidir. Tek bir teknik tüm bu bilgileri sağlayamaz, bu nedenle bir dizi analitik teknik uygulaması gereklidir. Dahası, NP'lerin analizi için bir dizi yöntem uygulanabilirken,

mevcut yöntemler tüm veri gereksinimlerini karşılayamamaktadır [8]. Yukarıda da bahsedildiği gibi, NP'lerin karakterizasyonu için teorik olarak birçok analitik teknik/yöntem uygundur. Metroloji ve analitik kimyadan elde edilen sonuçların izlenebilirliğini sağlamak esastır. Niceleme için kullanılan kalibrasyon standartları genellikle birincil ulusal veya uluslararası standartlara göre izlenebilir. Bununla birlikte, NP için bu standartların geçerliliği diğer standartların çoğundan daha kısa bir ömre sahiptir ve çalışma koşullarına daha duyarlıdır. NP standartları veya referans malzemeleri hem süspansiyonlar hem de tozlar olarak mevcuttur. Süspansiyon içindeki NP standartları genellikle son kullanma tarihleri ve depolama talimatları ile etiketlenir. Bazen standartın bütünlüğünü korumak için standartın daha da seyreltilmesine ilişkin talimatlar da mevcuttur. Toz nanopartikül standartlarının kullanımı NP süspansiyonu için standart bir prosedür içermez. Her bir laboratuvarında NP dispersiyonu yapıldığında üretici tarafından belirtilen orijinal metriğin belirsizliği artar. Nitekim, NP için yapılan bir çok metrik (boyut, şekil, vs.) dispersiyonun hangi ortamda (pH, iyonik kuvvet ve bileşim ve organik madde varlığı) yapıldığına kuvvetle bağlıdır. Bu metrik belirsizliği en aza indirmenin birkaç yolu vardır. Bunlardan biri, laboratuvarlar arası karşılaştırma yapmaktır. Örneğin, kör numuneler analiz için birçok laboratuvara gönderilir ve böylece elde edilen sonuçların karşılaştırılması bu sonuçların doğruluğunu ve hassasiyetini gösterir. Fakat, laboratuvarlar arası karşılaştırmalar, sertifikalı akreditasyonun sağlanması için klasik analitik kimyada olduğu gibi nano-metrolojide henüz yaygın değildir. Diğerleri ise, maruziyet/etki deneylerinin karakterizasyonundaki başarılı/uygun laboratuvar uygulamaları, minimal örnek pertürbasyonu ve dispersiyon aglomerasyon durumunun belirlenmesini içermelidir [17, 44].

TEŞEKKÜR

Değerli babamız MURAT ÖZKAN'a eğitimimize gösterdiği emeklerinden dolayı teşekkür ederim. Nur içinde uyu, mekânın cennet olsun babacığım.

KAYNAKÇA

- [1] Moore, M.N. (2006). Do Nanoparticles Present Ecotoxicological Risks for the Health of the Aquatic Environment?. *Environmental International*. 32:967-976.
- [2] Royal Society And The Royal Academy Of Engineering, 2004.
- [3] Borm, P.J.A., Robbins, D., Haubold, S., Kuhlbusch, T., Fissan, H., Donaldson, K., Schins R., Stone, V., Kreyling, W., Lademann, J. (2006). The Potential Risks of Nanomaterials: A Review Carried Out for ECETOC. *Particle Fibre Toxicol* 3.

- [4] Peter, H., Bruske-Hohlfeld, I., Salata, O. (2004). Nanoparticles – Known and Unknown Health Risks. *Journal of Nanobiotechnology*. 2 (1):12.
- [5] Pal, S., Tak, Y.K., Song, J.M. (2007). Does The Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles Depend On The Shape of The Nanoparticle? A Study of the Gram-Negative Bacterium *Escherichia Coli*. *Appl Environ Microbiol*. 73:1712–1720.
- [6] Madden, A.S., Hochella, J. (2005). A Test of Geochemical Reactivity As a Function of Mineral Size: Manganese Oxidation by Hematite Nanoparticles Promoted. *Geochim Cosmochim Acta*. 69:389–398.
- [7] Chau, C-F., Wu, S-H., Yen, G-C. (2007). The Development of Regulations for Food Nanotechnology Trends in Food Science & Technology. 18.5: 269-280.
- [8] Tiede, K., Boxall, A.B.A., Tear, S.P., Lewis, J., David, H., Hasselov, M. (2008). Detection and Characterization of Engineered Nanoparticles in Food and the Environment. *Food Additives And Contaminants*. 25(7), 795-821.
- [9] Maynard AD. (2000). Overview of Methods for Analysing Single Ultrafine Particles *Philosophical Transactions of the Royal Society of London a: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*. 358.1775: 2593-2610.
- [10] Mavrocordatos, D., Pronk, W., Boller, M. (2004). Analysis of Environmental Particles by Atomic Force Microscopy, Scanning and Transmission Electron Microscopy. *Water Science and Technology*. 50.12: 9-18.
- [11] Palchoudhury, S., Baalousha, M., Lead, J. (2015). Methods for Measuring Concentration (Mass, Surface Area And Number) of Nanoparticles. DOI: 10.1016/B978-0-08-099948-7.00005-1.
- [12] Brunauer, S., Emmet, P.H., Teller, E. (1938). Adsorption of Gases in Multimolecular Layers. *J Am Chem Soc*. 60:309–319.
- [13] Farre, M., Gajda-Schranz, K., Kantiani, L., Barceló, D. (2009). Ecotoxicity and Analysis of Nanomaterials in the Aquatic Environment. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 393.1: 81-95.
- [14] Ledin, A., Karlsson, S., Düker, A., Allard, B. (1994). Measurements In Situ Of Concentration and Size Distribution of Colloidal Matter in Deep Groundwaters by Photon Correlation Spectroscopy *Water Research* 28.7: 1539-1545.
- [15] Tiede, K., Boxall, B.A.A., Tear, P.S., Lewis, J. (2008). David H., Hasselov M., Detection and Characterization of Engineered Nanoparticles in Food and The Environment. *Food Additives and Contaminants*. 25,7: 795-821.
- [16] Guzman, K.A.D., Finnegan, M.P., Banfield, J.F. (2006). Influence of Surface Potential on Aggregation and Transport of Titania Nanoparticles. *Environmental Science & Technology* 40.24: 7688-7693.
- [17] Hasselov, M., Readman, J.W., Ranville, J.F., Tiede, K. (2008). Nanoparticle Analysis and Characterization Methodologies in Environmental Risk Assessment of Engineered Nanoparticles. *Ecotoxicology*. 17.5: 344-361.
- [18] Balnois, E., Papastavrou, G., Wilkinson, K.J. (2007). Force Microscopy and Force Measurements of Environmental Colloids. in: Wilkinson KJ, Lead JR (Eds) *Environmental Colloids and Particles: Behaviour, Structure and Characterization*. IUPAC Series on Analytical and Physical Chemistry of Environmental Systems. John Wiley and Sons, Chichester. Pp 405–468.
- [19] Ledin, A., Karlsson, S., Duker, A., Allard, B. (1994). Measurements in Situ of Concentration and Size Distribution of Colloidal Matter in Deep Groundwaters by Photon-Correlation Spectroscopy. *Water Res*. 28:1539–1545.
- [20] Lead, J.R., Wilkinson, K.J. (2006). Aquatic Colloids And Nanoparticles: Current Knowledge And Future Trends. *Environ Chem*. 3:159–1.
- [21] Hall, G.E.M. (1998). Relative Contamination Levels Observed In Different Types Of Bottles Used To Collect Water Samples. *Explorer*. 101:1–7.
- [22] Sugimoto, Y., Pou, P., Abe, M., Jelinek, P., Perez, R., Morita, S. (2007). Chemical Identification Of Individual Surface Atoms By Atomic Force Microscopy. *Nature*. 446.7131: 64-67.
- [23] Trevethan, T., Shluger. A.L. (2007). Building Blocks For Molecular Devices: Organic Molecules on the MgO (001) Surface the *Journal of Physical Chemistry C* 111.42: 15375-15381.
- [24] Warheit, D.B., Laurence, B.R., Reed, K.L., Roach, D.H., Reynolds, G.A., Webb, T.R. (2004). Comparative Pulmonary Toxicity Assessment Of Single-Wall Carbon Nanotubes In Rats. *Toxicological Sciences*. 77, 117–125.
- [25] Colvin, V.L. (2003). The Potential Environmental Impact Of Engineered Nanomaterials *Nature Biotechnology* 21.10: 1166-1170.
- [26] Bootz, A., Vogel, V. (2004). Comparison Of Scanning Electron Microscopy, Dynamic Light Scattering And Analytical Ultracentrifugation For The Sizing Of Poly(Butyl Cyanoacrylate) Nanoparticles. *Eur J Pharm Biopharm*. 57(2):369–375.
- [27] Nurmi, J.T., Tratnyek, P.G., Sarathy, V., Baer, D.R., Amnette, J.E., Pecher, K., Wang, C.M., Linehan, J.C., Matson, D.W., Penn, R.L. (2005). Characterization and Properties of Metallic Iron Nanoparticles: Spectroscopy, Electrochemistry, and Kinetics. *Environ Sci Technol*. 39:1221–1230.
- [28] Ho, C.S., Lam, C.W.K., Chan, M.H.M., Et Al. (2003). Electrospray Ionisation Mass Spectrometry: Principles and Clinical Applications. *Clinical Biochemistry Review*, Vol. 24, Pp. 3–12.
- [29] Holt, M.S., Fox, K., Griebach, E., Johnsen, S., Kinnunen, J., Lecloux, A., Murray-Smith, R., Peterson, D.R., Schroder, R., Silvani, M., Ten Berge, W.F.J., Toy, R.J., Feijtel, T.C.M. (2000). Monitoring, Modelling And Environmental Exposure Assessment of Industrial Chemicals In The Aquatic Environment. *Chemosphere*. 41:1799–1.

- [30] Crane, M., Handy, R.D. (2007). An Assessment of Regulatory Testing Strategies and Methods for Characterizing The Ecotoxicological Hazards of Nanomaterials, Report For Defra, London, UK. Available At: 2007, [Http://Randd.Defra.Gov.Uk/Document.Asp?Documentid=2270](http://Randd.Defra.Gov.Uk/Document.Asp?Documentid=2270).
- [31] E.P.A. (2007). Nanotechnology White Paper, U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC. [Http://Es.Epa.Gov/Ncer/Nano/Publications/Whitepaper12022005.Pdf](http://Es.Epa.Gov/Ncer/Nano/Publications/Whitepaper12022005.Pdf).
- [32] SCENIHR. (2005). Opinion On The Appropriateness of Existing Methodologies to Assess The Potential Risks Associated With Engineered and Adventitious Products of Nanotechnology. Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks, European Commission. [Http://Ec.Europa.Eu/Health/Ph_Risk/Committees/04_Scenihr/Docs/Scenihr_r_0_003b.Pdf](http://Ec.Europa.Eu/Health/Ph_Risk/Committees/04_Scenihr/Docs/Scenihr_r_0_003b.Pdf).
- [33] Kim, J.I., Walther, C. (2007). Laser Induced Breakdown Detection (LIBD). In: Wilkinson KJ, Lead JR (Eds) Environmental Colloids and Particles: Behaviour, Structure And Characterization. IUPAC Series on Analytical And Physical Chemistry Of Environmental Systems. John Wiley and Sons, Chichester. Pp 555–612.
- [34] Burleson, D.J., Driessen, M.D., Penn, R.L. (2004). On The Characterization of Environmental Nanoparticles. *J Environ Sci Health A*. 39:2707–2753.
- [35] Gimbert, L.J., Worsfold, P.J., Haygarth, P.M. (2007). Processes Affecting Transfer Of Sediment and Colloids, With Associated Phosphorus, From Intensively Farmed Grasslands: Colloid and Sediment Characterization Methods. *Hydrol Processes*. 21:275–279.
- [36] Mavrocordatos, D., Perret, D., Leppard, G.G. (2007). Strategies And Advances in the Characterization of Environmental Colloids by Electron Microscopy. in: Wilkinson KJ, Lead JR, Editors. Environmental Colloids And Particles: Behaviour, Structure and Characterization. Chichester: Wiley. Pp. 345–404.
- [37] Ito, T., Sun, L., Henriquez, R.R., Crooks, R.M. (2004). A Carbon Nanotube-Based Coulter Nanoparticle Counter. *Accounts of Chemical Research*. 37.12: 937-945.
- [38] McMurry, P.H., Litchy, M., Huang, P.F., Cai, X.P., Turpin, B.J., Dick, W.D., Hanson, A. (1996). Elemental Composition And Morphology Of Individual Particles Separated By Size And Hygroscopicity With The TDMA. *Atmos Environ*. 30:101–108.
- [39] Weber, A.P., Baltensperger, U., Gaggeler, H.W., Schmidttott, A. (1996). In Situ Characterization and Structure Modification of Agglomerated Aerosol Particles. *J Aerosol Sci*. 27:915–929.
- [40] Okada, Y., Yabumoto, J., Takeuchi, K. (2002). Aerosol Spectrometer For Size and Composition Analysis of Nanoparticles. *J Aerosol Sci*. 33:961–965.
- [41] Colvin, V.L. (2003). The Potential Environmental Impact of Engineered Nanomaterials. *Nat Biotechnol*. 21:1166–70.
- [42] Howard, C.V. (2004). Small Particles — Big Problems. *Int Lab News*. 34(2):28–9.
- [43] Perkel, J.M. (2004). Nanoscience Is Out of the Bottle. *The Scientist*. 17(15):20–3.
- [44] Aitken, R.J., Hankin, S.M., Tran, C.L., Donaldson, K., Stone, V., Cumpson, P., Jhonstone, J., Chaudhry, Q., Cash, S. (2007). REFNANO: Reference Materials for Engineered Nanoparticle Toxicology And Metrology Final Report on Project CB01099. London: IOM.
- [45] Tejamaya, M., Roemer, I., Merrifield, R.C., Lead, J.R. (2012). Stability Of Citrate, PVP, And PEG Coated Silver Nanoparticles In Ecotoxicology Media. *Environ Sci Technol*. 46:7011-7017.
- [46] Hartmann, G., Schuster, M. (2013). Species Selective Preconcentration And Quantification Of Gold Nanoparticles Using Cloud Point Extraction And Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry. *Anal Chim Acta*. 761:27-33.
- [47] Reipa, V., Purdum, G., Choi, J. (2010). Measurement of Nanoparticle Concentration Using Quartz Crystal Microgravimetry. *J Phys Chem B*. 114:16112-16117.
- [48] Baalousha, M., Nur, Y., Roemer, I., Tejamaya, M., Lead, J.R. (2013). Effect Of Monovalent And Divalent Cations, Anions And Fulvic Acid on Aggregation of Citrate-Coated Silver Nanoparticles. *Sci Total Environ*. 454:119-131.
- [49] Mitrano, D., Ranville, J., Neubauer, K., Thomas, R. (2012). Field-Flow Fractionation Coupled With ICP-MS For The Analysis of Engineered Nanoparticles in Environmental Samples. *Spectroscopy*. 27:36-44.
- [50] Kowshik, M., Ashtaputre, S., Kharrazi, S., Vogel, W., Urban, J., Kulkarni, S.K., Paknikar, K. M. (2002). Extracellular Synthesis Of Silver Nanoparticles By A Silver-Tolerant Yeast Strain MKY3. *Nanotechnology*, 14(1), 95.
- [51] Corsi, K., Chellat, F., Yahia, L.H., Fernandes, J. C. (2003). Mesenchymal Stem Cells, MG63 And HEK293 Transfection Using Chitosan-DNA Nanoparticles. *Biomaterials*, 24(7), 1255-1264.
- [52] Ahmad, A., Senapati, S., Khan, M.I., Kumar, R., Sastry, M. (2003). Extracellular Biosynthesis of Monodisperse Gold Nanoparticles By A Novel Extremophilic Actinomycete, *Thermomonospora Sp*. *Langmuir*, 19(8), 3550-3553.
- [53] De Campos, A.M., Diebold, Y., Carvalho, E.L., Sánchez, A., Alonso, M.J. (2004). Chitosan Nanoparticles As New Ocular Drug Delivery Systems: *in vitro* Stability, *in vivo* Fate, and Cellular Toxicity. *Pharmaceutical Research*, 21(5), 803-810.
- [54] Hussain, S.M., Hess, K.L., Gearhart, J.M., Geiss, K.T., Schläger, J.J. (2005). *In Vitro* Toxicity of Nanoparticles in BRL 3A Rat Liver Cells. *Toxicology In Vitro*, 19(7), 975-983.
- [55] Hund-Rinke, K.; Simon, M. Ecotoxic Effect of Photocatalytic Active Nanoparticles TiO_2 on Algae and Daphnids. *Environ. Sci. Pollution Res*. 2006, 13, 225–232.
- [56] Zhu, S., Oberdörster, E., Haasch, M.L. (2006). Toxicity Of An Engineered Nanoparticle (Fullerene, C60) in Two Aquatic

- Species, *Daphnia* and *Fathead Minnow*. Marine Environmental Research, 62, S5-S9.
- [57] Jeng, H.A., Swanson, J. (2006). Toxicity of Metal Oxide Nanoparticles in Mammalian Cells. Journal of Environmental Science And Health Part A, 41(12), 2699-2711.
- [58] Franklin, N.M., Rogers, N.J., Apte, S.C., Batley, G.E., Gadd, G.E., Casey, P.S. (2007). Comparative Toxicity of Nanoparticulate ZnO, Bulk ZnO, And ZnCl₂ To A Freshwater Microalga (*Pseudokirchneriella Subcapitata*): The Importance of Particle Solubility. Environmental Science & Technology, 41(24), 8484-8490
- [59] Navarro, E., Piccapietra, F., Wagner, B., Marconi, F., Kaegi, R., Odzak, N., Laura, S., Behra, R. (2008). Toxicity Of Silver Nanoparticles to *Chlamydomonas Reinhardtii*. Environmental Science & Technology, 42(23), 8959-8964.
- [60] Lee, W.M., An, Y.J., Yoon, H., Kweon, H.S. (2008). Toxicity and Bioavailability Of Copper Nanoparticles to the Terrestrial Plants Mung Bean (*Phaseolus Radiatus*) And Wheat (*Triticum Aestivum*): Plant Agar Test For Water-Insoluble Nanoparticles. Environmental Toxicology and Chemistry, 27(9), 1915-1921.
- [61] Aruoja, V., Dubourguier, H.C., Kasemets, K., Kahru, A. (2009). Toxicity of Nanoparticles of CuO, ZnO and TiO₂ to Microalgae *Pseudokirchneriella Subcapitata*. Science of the Total Environment, 407(4), 1461-1468.
- [62] Hoecke, K.V., Quik, J.T., Mankiewicz-Boczek, J., Schampheleere, K.A.D., Elsaesser, A., Meeren, P.V.D., ... & Rydzyński, K. (2009). Fate And Effects Of CeO₂ Nanoparticles In Aquatic Ecotoxicity Tests. Environmental Science & Technology, 43(12), 4537-4546.
- [63] Roh, J.Y., Sim, S.J., Yi, J., Park, K., Chung, K.H., Ryu, D.Y., Choi, J. (2009). Ecotoxicity of Silver Nanoparticles on The Soil Nematode *Caenorhabditis Elegans* Using Functional Ecotoxicogenomics. Environmental Science & Technology, 43(10), 3933-3940.
- [64] Lee, S.W., Kim, S.M., Choi, J. (2009). Genotoxicity and Ecotoxicity Assays Using the Freshwater Crustacean *Daphnia Magna* and The Larva of The Aquatic Midge *Chironomus Riparius* to Screen The Ecological Risks of Nanoparticle Exposure. Environmental Toxicology and Pharmacology, 28(1), 86-91.
- [65] Kasemets, K., Ivask, A., Dubourguier, H.C., Kahru, A. (2009). Toxicity of Nanoparticles Of ZnO, CuO And TiO₂ to Yeast *Saccharomyces Cerevisiae*. Toxicology in vitro, 23(6), 1116-1122.
- [66] López-Moreno, M.L., De La Rosa, G., Hernández-Viezcas, J.Á., Castillo-Michel, H., Botez, C.E., Peralta-Videa, J.R., Gardea-Torresdey, J. L. (2010). Evidence of the Differential Biotransformation and Genotoxicity of ZnO and CeO₂ Nanoparticles on Soybean (*Glycine Max*) Plants. Environmental Science & Technology, 44(19), 7315-7320.
- [67] Zhu, Z.J., Carboni, R., Quercio, M.J., Yan, B., Miranda, O.R., Anderton, D.L., Arcaro, F.K., Rotella, M.V., Vachet, R.W. (2010). Surface Properties Dictate Uptake, Distribution, Excretion, and Toxicity of Nanoparticles in Fish. Small, 6(20), 2261-2265.
- [68] Rajakumar, G., Rahuman, A.A. (2011). Larvicidal Activity of Synthesized Silver Nanoparticles Using *Eclipta Prostrata* Leaf Extract Against Filariasis and Malaria Vectors. Acta Tropica, 118(3), 196-203.
- [69] Santhoshkumar, T., Rahuman, A.A., Rajakumar, G., Marimuthu, S., Bagavan, A., Jayaseelan, C., ... & Kamaraj, C. (2011). Synthesis of Silver Nanoparticles Using *Nelumbo Nucifera* Leaf Extract And Its Larvicidal Activity Against Malaria and Filariasis Vectors. Parasitology Research, 108(3), 693-702.
- [70] Marimuthu, S., Rahuman, A.A., Rajakumar, G., Santhoshkumar, T., Kirthi, A.V., Jayaseelan, C., Bagavan, A., Zahir, A.A., Elango, G., Kamaraj, C. (2011). Evaluation of Green Synthesized Silver Nanoparticles Against Parasites. Parasitology Research, 108(6), 1541-1549.
- [71] Rabolli, V., Thomassen, L.C., Uwambayinema, F., Martens, J.A., Lison, D. (2011). The Cytotoxic Activity of Amorphous Silica Nanoparticles is Mainly Influenced by Surface Area and Not by Aggregation. Toxicology Letters, 206(2), 197-203.
- [72] Ali, D., Alarifi, S., Kumar, S., Ahamed, M., & Siddiqui, M. A. (2012). Oxidative Stress And Genotoxic Effect of Zinc Oxide Nanoparticles in Freshwater Snail *Lymnaea Luteola* L. Aquatic Toxicology, 124, 83-90.
- [73] Clément, L., Hurel, C., Marmier, N. (2013). Toxicity of TiO₂ Nanoparticles to Cladocerans, Algae, Rotifers and Plants—Effects of Size and Crystalline Structure. Chemosphere, 90(3), 1083-1090.
- [74] Ivask, A., Kurvet, I., Kasemets, K., Blinova, I., Aruoja, V., Suppi, S., Vija, H., Käkinen, A., Titma, T., Heinlaan, M., Visnapuu, M., Koller, D., Kisand, V., Kahru, A. (2014). Size-Dependent Toxicity of Silver Nanoparticles to Bacteria, Yeast, Algae, Crustaceans and Mammalian Cells *in vitro*. Plos One, 9(7), E102108.
- [75] Ribeiro, F., Gallego-Urrea, J.A., Jurkschat, K., Crossley, A., Hassellöv, M., Taylor, C., Soares, M.V.M.A., Loureiro, S. (2014). Silver Nanoparticles and Silver Nitrate Induce High Toxicity to *Pseudokirchneriella Subcapitata*, *Daphnia Magna* And *Danio Rerio*. Science of The Total Environment, 466, 232-241.
- [76] Dağlıoğlu, Y., Kabakçı, D., Akdeniz, G. (2015). Toxicity Of Nano And Non-Nano Boron Particles on *Apis Mellifera* (Honey Bee). Research Journal of Chemical and Environmental Sciences. 3(3).
- [77] Kim, I.Y., Joachim, E., Choi, H., Kim, K. (2015). Toxicity of Silica Nanoparticles Depends on Size, Dose, and Cell Type. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, 11(6), 1407-1416.
- [78] Dağlıoğlu, Y., Çelebi, M.S. (2015). The Evaluation of the Acute Toxic Effects of Polyvinylferrocenium Supported

- Platinum Nanoparticles on *Artemia Salina* (Brine Shrimp). Biological Diversity and Conservation, ISSN, 1308-8084.
- [79] Özkan, Y., Irende, İ., Akdeniz, G., Kabakçı, D., Sökmen, M. (2015). Evaluation Of The Comparative Acute Toxic Effects Of TiO_2 , TiO_2 , Ag-TiO_2 and ZnO-TiO_2 Composite Nanoparticles on Honey Bee (*Apis Mellifera*). Journal of International Environmental Application and Science, 10(1), 26.
- [80] Xiao, Y., Vijver, M.G., Chen, G., Peijnenburg, W J. (2015). Toxicity and Accumulation of Cu and Zn Nanoparticles in *Daphnia Magna*. Environmental Science & Technology, 49(7), 4657-4664.
- [81] Suman, T.Y., Rajasree, S.R., Kirubakaran, R. (2015). Evaluation of Zinc Oxide Nanoparticles Toxicity on Marine Algae *Chlorella Vulgaris* Through Flow Cytometric, Cytotoxicity and Oxidative Stress Analysis. Ecotoxicology and Environmental Safety, 113, 23-30.
- [82] Cupi, D., Hartmann, N. B., Baun, A. (2015). The Influence of Natural Organic Matter and Aging on Suspension Stability in Guideline Toxicity Testing of Silver, Zinc Oxide, and Titanium Dioxide Nanoparticles With *Daphnia Magna*. Environmental Toxicology and Chemistry, 34(3), 497-506.
- [83] Dağlıoğlu, Y., Önalın, Ş., Çelebi, S.M., Kabakçı, D., Akdeniz, G. (2015). The Evaluation of Toxic Effects of Poly(Vinylferrocenium)-Supported Palladium NPs (Pd/PVF⁺) on *Apis Mellifera* (Honey Bee). International Journal of Development Research. 5(6), 4577-4583.
- [84] Dağlıoğlu, Y., Öztürk, B.Y. (2016). The Assessment of Biological Accumulation on Exposure In Boron Particles of *Desmodesmus Multivariabilis*. Biological Diversity and Conservation, 9(3), 204-209.
- [85] Dağlıoğlu, Y., Altınok, İ., İlhan, H., Sokmen, M. (2016). Determination of the Acute Toxic Effect of ZnO-TiO₂ Nanoparticles in Brine Shrimp (*Artemia Salina*). Acta Biologica Turcica, 29(1), 6-13.
- [86] Murugan, K., Aruna, P., Panneerselvam, C., Madhiyazhagan, P., Paulpandi, M., Subramaniam, Rajaganesh R, Wei H, Alsahli MS, Devanesan S, Nicoletti M, Syuhei B, Canale A, Benelli G. J. (2016). Fighting Arboviral Diseases: Low Toxicity on Mammalian Cells, Dengue Growth Inhibition (*In Vitro*), and Mosquitocidal Activity Of *Centrocercas Clavulatum*-Synthesized Silver Nanoparticles. Parasitology Research, 115(2), 651-662.
- [87] Ozkan, Y., Altınok, I., İlhan, H., & Sokmen, M. (2016). Determination Of TiO_2 And AgTiO_2 Nanoparticles In *Artemia Salina*: Toxicity, Morphological Changes, Uptake and Depuration. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 96(1), 36-42.
- [88] Vrček, I.V., Žuntar, I., Petlevski, R., Pavičić, I., Dutour Sikirić, M., Čurlin, M., Goessler, W. (2016). Comparison of *in vitro* Toxicity of Silver Ions and Silver Nanoparticles on Human Hepatoma Cells. Environmental Toxicology, 31(6), 679-692.
- [89] Tripathi, D.K., Singh, S., Singh, V.P., Prasad, S.M., Chauhan, D.K., Dubey, N.K. (2016). Silicon Nanoparticles More Efficiently Alleviate Arsenate Toxicity Than Silicon In Maize Cultivar and Hybrid Differing In Arsenate Tolerance. Frontiers In Environmental Science, 4, 46.
- [90] Dağlıoğlu, Y., Yılmaz Öztürk, B. (2017). Effect of Concentration and Exposure Time of ZnO-TiO₂ Nanocomposite On Photosynthetic Pigment Contents, ROS Production Ability, and Bioaccumulation of Freshwater Algae (*Desmodesmus Multivariabilis*). Caryologia, 1-11.
- [91] Dağlıoğlu, Y., Kabakçı, D., Akdeniz, G., Çelebi, M.S. (2016). Determining The Acute Toxic Effects of Poly (Vinylferrocenium) Supported Platinum Nanoparticle (Pt/PVF⁺ Nps) on *Apis Mellifera*. Muğla Journal of Science And Technology, 2(2), 1-8.
- [92] Dağlıoğlu, Y., Çelebi, S.M., Önalın, Ş. (2016). Determination of Acute Toxic Effects of Poly (Vinylferrocenium) Supported Palladium Nanoparticle (Pd/PVF⁺) on *Artemia Salina*. Pakistan Journal of Zoology Vol. 48(1), 187-193.
- [93] Dağlıoğlu, Y., Türkiş S., TiO₂ Nanopartikül Uygulamasının Su Mercimeğinin (*Lemna Minor L.*) Fotosentetik Pigment İçeriği Üzerine Etkisi. Acta Biologica Turcica, 30(4), 108-115.
- [94] Dağlıoğlu, Y., Türkiş, S. (2017). *Myriophyllum Spicatum*'un Süperoksit Dismutaz Enzim Aktivitesi, Lipid Peroksidasyonu ve Hidrojen Peroksit Üzerine Nano ve Mikro Bor Partiküllerinin Etkisi. BEÜ Fen Bilimleri Dergisi, 6(2), 62-70.
- [95] Bucher, J., Masten S., Moudgil B., Powers K., Roberts S., Walker N. (2004), Developing Experimental Approaches for The Evaluation of Toxicological Interactions of Nanoscale Materials. Final Workshop Report 3–4 November, 1–37; University of Florida, Gainesville, FL. Wwww. Nanotoxicology. Ufl.Edu.
- [96] Oberdorster, G., Oberdorster, E., Oberdorster, J. (2005a). Nanotoxicology: an Emerging Discipline Evolving From Studies of Ultrafine Particles. Environ. Health Perspect. 113, 823–839.
- [97] Oberdorster, G., Maynard, A., Donaldson, K., Castranova, V., Fitzpatrick, J., Ausman K., Carter, J., Karn, B., Kreyling, W., Lai, D., Et Al. (2005b). Principles for Characterizing the Potential Human Health Effects from Exposure to Nanomaterials: Elements of a Screening Strategy. Particle Fibre Toxicol. (Doi:10.1186/1743–8977-2-82:8)
- [98] Powers, K.W., Brown, S.C., Krishna, V.B., Wasdo, S.C., Moudgil, B.M., Roberts, S.M. (2006). Research Strategies For Safety Evaluation of Nanomaterials. Part VI. Characterization of Nanoscale Particles for Toxicological Evaluation. Toxicological Sciences, 90(2), 296-303.
- [99] Lowell, S., Shields, J.E., Thomas, M.A., Thommes, M. (2004). Characterization of Porous Solids and Powders: Surface Area, Pore Size and Density, Particle Technology Series, Springer, New York.

- [100] Yu, J.C., Ho, W., Yu, J., Yip, H., Wong, P.K., Zhao, J. (2005). Efficient Visible-Light-Induced Photocatalytic Disinfection On Sulfur-Doped Nanocrystalline Titania. *Environmental Science & Technology*, 39(4), 1175-1179.
- [101] Tseng, Y.H., Sun, D.S., Wu, W.S., Chan, H., Syue, M.S., Ho, H.C., Chang, H.H. (2013). Antibacterial Performance Of Nanoscaled Visible-Light Responsive Platinum-Containing Titania Photocatalyst In Vitro And *In Vivo*. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1830(6), 3787-3795.
- [102] Dhawan, A., & Sharma, V. (2010). Toxicity Assessment Of Nanomaterials: Methods And Challenges. *Analytical And Bioanalytical Chemistry*, 398(2), 589-605.
- [103] Djurišić, A.B., Leung, Y.H., Ng, A., Xu, X.Y., Lee, P.K., Degger, N. (2015). Toxicity of Metal Oxide Nanoparticles: Mechanisms, Characterization, and Avoiding Experimental Artefacts. *Small*, 11(1), 26-44.
- [104] Patil, S., Sandberg, A., Heckert, E., Self, W., Seal, S. (2007). Protein Adsorption and Cellular Uptake of Cerium Oxide Nanoparticles As a Function of Zeta Potential. *Biomaterials*, 28(31), 4600-4607.
- [105] Neal, A.L. (2008). What Can Be Inferred from Bacterium-Nanoparticle Interactions About the Potential Consequences of Environmental Exposure to Nanoparticles?. *Ecotoxicology*, 17(5), 362.
- [106] Cho, W.S., Duffin, R., Thielbeer, F., Bradley, M., Megson, I.L., Macnee, W., Poland, C.A., Tran, L.C., Donaldson, K. (2012). Zeta Potential And Solubility to Toxic Ions as Mechanisms of Lung Inflammation Caused by Metal/Metal Oxide Nanoparticles. *Toxicological Sciences*, 126(2), 469-477.
- [107] Long, T.C., Saleh, N., Tilton, R.D., Lowry, G.V., Veronesi, B. (2006). Titanium Dioxide (P25) Produces Reactive Oxygen Species in Immortalized Brain Microglia (BV2): Implications for Nanoparticle Neurotoxicity. *Environmental Science & Technology*, 40(14), 4346-4352.
- [108] Kosmulski, M. (2009). Ph-Dependent Surface Charging and Points Of Zero Charge. IV. Update and New Approach. *Journal of Colloid and Interface Science*, 337(2), 439-448.
- [109] Clogston, J.D., Patri, A.K. (2011). Zeta Potential Measurement. In *Characterization Of Nanoparticles Intended For Drug Delivery* (Pp. 63-70). Humana Press.
- [110] Berg, J.M., Romoser, A., Banerjee, N., Zebda, R., Sayes, C.M. (2009). The Relationship Between Ph and Zeta Potential of ~ 30 Nm Metal Oxide Nanoparticle Suspensions Relevant To *in vitro* Toxicological Evaluations. *Nanotoxicology*, 3(4), 276-283.
- [111] Tantra, R., Schulze, P., Quincey, P. (2010). Effect of Nanoparticle Concentration on Zeta-Potential Measurement Results and Reproducibility. *Particology*, 8(3), 279-285.
- [112] Kosmulski, M. (2003). A Literature Survey of The Differences Between the Reported Isoelectric Points and Their Discussion. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 222(1-3), 113-118.
- [113] Kosmulski, M. (2002). The Ph-Dependent Surface Charging and The Points of Zero Charge. *Journal of Colloid and Interface Science*, 253(1), 77-87.
- [114] Premanathan, M., Karthikeyan, K., Jeyasubramanian, K., & Manivannan, G. (2011). Selective Toxicity of ZnO Nanoparticles Toward Gram-Positive Bacteria and Cancer Cells by Apoptosis Through Lipid Peroxidation. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 7(2), 184-192.
- [115] Murdock, R.C., Braydich-Stolle, L., Schrand, A.M., Schlager, J.J., Hussain, S.M., 2008. Characterization of Nanomaterial Dispersion in Solution Prior to *in vitro* Exposure Using Dynamic Light Scattering Technique. *Toxicol. Sci.* 101, 239-253.
- [116] Bootz, A., Vogel, V., Schubert, D., Kreuter, J. (2004). Comparison of Scanning Electron Microscopy, Dynamic Light Scattering and Analytical Ultracentrifugation for the Sizing of Poly (Butyl Cyanoacrylate) Nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 57(2), 369-375.
- [117] Jilavenkatesa, A., Kelly, J.F. (2002). Nanopowder Characterization: Challenges and Future Directions. *J. Nanopart. Res.* 4, 463-468.
- [118] Drescher, D., Orts-Gil, G., Laube, G., Natte, K., Veh, R.W., Osterle, W., Kneipp, J., 2011. Toxicity of Amorphous Silica Nanoparticles on Eukaryotic Cell Model is Determined by Particle Agglomeration and Serum Protein Adsorption Effects. *Anal. Bioanal. Chem.* (Online).
- [119] Ahamed, M., Karns, M., Goodson, M., Rowe, J., Hussain, S.M., Schlager, J.J., Hong, Y., 2008. DNA Damage Response to Different Surface Chemistry of Silver Nanoparticles in Mammalian Cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 233, 404-410
- [120] Schimpf M, Caldwell K, Giddings JC. 2000. *Field-Flow Fractionation Handbook*. New York: Wiley.
- [121] Williams A, Varela E, Meehan E, Tribe K. 2002. Characterisation of Nanoparticulate Systems by Hydrodynamic Chromatography. *Int J Pharm.* 242:295-299.
- [122] Chmela E, Tijssen R, Blom M, Gardeniers HJGE, Van Den Berg A. 2002. A Chip System For Size Separation of Macromolecules and Particles by Hydrodynamic Chromatography. *Anal Chem.* 74:3470-3475.
- [123] Blom MT, Chmela E, Oosterbroek RE, Tijssen R, Van Den Berg A. 2003. On-Chip Hydrodynamic Chromatography Separation and Detection of Nanoparticles and Biomolecules. *Anal Chem.* 75:6761-6768.

The Research on Biased Estimators Based on Mean Square Error Matrix Criteria

Ortalama Karesel Hata Matrisi Kriterine göre Yanlı Tahmin Ediciler Üzerine Çalışma

Nilgün YILDIZ 

Department of Mathematics, Faculty of Art-Sciences, Marmara University, 34722, Istanbul, TURKEY

Öz

Çoklu doğrusallığa sahip regresyon modelleri, $r - (k, d)$ sınıfı tahmincileri, ana bileşen regresyonu, Liu tipi tahminciler gibi çeşitli tahmincileri kullanarak ele alınabilir. Bu çalışmada, $r - (k, d)$ sınıfı kestiricisinin, ana bileşenlerin regresyonu, Liu tipi tahmincileri ve sıradan en küçük kareler üzerinde, ortalama karesel hata matrisi (MSEM) kriteri açısından üstün olduğu koşulları belirledik. Son olarak, sayısal bir örnek ve Monte Carlo simülasyonu ile teorik sonuçları gösterdik.

Anahtar Kelimeler: Liu-tipi tahmin edici, $r - (k, d)$ Sınıf Tahmin Edici Temel bileşenler regresyonu, ortalama karesel hata matrisi

Abstract

Regression models with multicollinearity can be tackled by using various estimators such as $r - (k, d)$ class estimators, principal components regression, Liu-type estimators. In this study, we defined conditions where the $r - (k, d)$ class estimator is superior over the biased estimators in terms of mean square error matrix (MSEM) criterion. Finally, we showed theoretical results by means of a numerical example and a simulation study.

Keywords: $r - (k, d)$ class estimator, Liu-type estimators, $(r - d)$ class estimator, Ordinary Ridge Regression Principal Component Regression, Mean square error matrix, Multicollinearity

I. INTRODUCTION

The ordinary least squares (OLS) estimation is one of the most commonly used methods in the literature. But this estimator is unsuitable in the presence of multicollinearity. Through the years a lot of research has been dedicated to overcome this hurdle. To overcome this problem, different remedial actions have been proposed and the most popular of those are Stein estimator [1], the principal components regression (PCR) estimator which became one of the most popular estimators proposed by Massy [2]. Another very popular estimator is ordinary Ridge Regression (ORR) estimator, which was proposed by Hoerl and Kennard [3].

While early studies have proposed new estimators to tackle the multicollinearity in later years researchers combined various estimators to obtain better results. In 1984 Baye and Parker [4] introduced $(r - k)$ class estimator, which combines the ORR and PCR. In addition, Baye and Parker also showed that $(r - k)$ class estimator is superior to PCR estimator based on the scalar mean square error (SMSE) criterion.

Liu [5] introduced a new estimator called Liu estimator (LE), which combined the Stein estimator with the ORR estimator and Akdeniz and Kaçıranlar [6] named this estimator after Liu as Liu estimator (LE). Kaçıranlar and Sakallıoğlu [7] introduced the $(r - d)$ class estimator, which is a combination of the Liu and PCR estimators. Liu [8] presented the Liu-type

estimator (LTE) by combining the ordinary ridge regression estimator and LE. Based on the MSEM criterion Özkale and Kacıranlar [9] have compared the $(r - d)$ class estimator with PCR, $(r - k)$ class estimator and LE.

One of the latest additions to such efforts is the $r - (k, d)$ estimator, which is a combination of the Liu-type and PCR estimators. Inan [10], who proposed the $r - (k, d)$ estimator. She studied the scalar mean square error (SMSE) properties of this estimator. As the MSEM is stronger criterion than the SMSE, we use the MSEM criteria. But calculation of MSEM is more difficult than SMSE. In this study, we aimed to compare the $r - (k, d)$ estimator with OLS, PCR, ORR, LE, $(r - k)$ and Liu-type estimators based on the MSEM criteria. Furthermore, necessary and sufficient conditions for the $r - (k, d)$ class estimator to dominate the OLS, PCR and Liu-type estimators sense are derived.

A Monte Carlo simulation and and real data have been conducted to show the performance of estimators. The article is organized as follows: The second section of the article describes our model and defines $r - (k, d)$ estimator. The MSEM criteria comparison of $r - (k, d)$ estimator with OLS, PCR, and Liu-type estimators also takes place in the second section. The third section provides the numerical example and the outcome of the Monte Carlo simulation. Finally, some conclusions remarks are given in section four.

II. MATERIAL AND METHOD

We considered the linear regression model given as

$$y = X\beta + \varepsilon \tag{1}$$

Where y is $(n \times 1)$ observable random vector, X is a $(n \times p)$ matrix of non-stochastics variables of rank p ; β is $(p \times 1)$ $(p \times 1)$ vector of unknown parameters associated with X , and ε is a $(n \times 1)$ vector of error terms. Let $T = [t_1, t_2, \dots, t_p]$ be an orthogonal matrix that consist of the eigenvalues of $X'X$.

$T'X'XT = \Lambda$, where $\Lambda = \text{diag}(\lambda_1, \lambda_2, \dots, \lambda_p)$ ranked according to the magnitude. Further let $T_r[t_1, t_2, \dots, t_r]$ be remaining columns of T having deleted r columns where $r \leq p$. Obviously, $T_r'X'XT_r = \Lambda_r = \text{diag}(\lambda_1, \lambda_2, \dots, \lambda_r)$ and $T_{p-r}'X'XT_{p-r} = \Lambda_{p-r} = \text{diag}(\lambda_{r+1}, \lambda_{r+2}, \dots, \lambda_p)$ where $T_{p-r} = [t_{r+1}, t_{r+2}, \dots, t_p]$. The $r - (k, d)$ class estimator for β as proposed by Inan [10] is

$$\hat{\beta}_r(k, d) = T_r (T_r'X'XT_r + kI)^{-1} (T_r'X'XT_r - dI) T_r' \hat{\beta}_{PCR} \quad k \geq 0, -\infty < d < +\infty \tag{2}$$

where $\hat{\beta}_{PCR} = T_r (T_r'X'XT_r)^{-1} T_r'X'y$ is the PCR estimator.

Inan[10] proposed $r - (k, d)$ class estimator and saw that MSE was decreased. Thus, $r - (k, d)$ class estimator is an improved method for undertaking multicollinearity.

2.1: Main Results

In this section, we have compare the $r - (k, d)$ class estimator with the OLS estimator, PCR and the Liu-type estimator.

Theorem 1. The $\hat{\beta}_r(k, d)$ is superior to the OLS estimator $\hat{\beta}$ if and only if

$$\beta' T_r (k + d)^2 [2(k + d)I_r + (k^2 - d^2)\Lambda_r^{-1}]^{-1} T_r' \beta + \beta' T_{p-r} \Lambda_{p-r}^{-1} T_{p-r}' \beta \leq \sigma^2$$

Proof. We first compared the $\hat{\beta}_r(k, d)$ with the OLS estimator of β by the MSEM .

$$MSEM(\hat{\beta}) = \sigma^2 S^{-1} \text{ where } S = X'X. \text{ If we write } \Lambda = \begin{pmatrix} \Lambda_r & 0 \\ 0' & \Lambda_{p-r} \end{pmatrix} \text{ and}$$

$$T = (T_r \quad T_{p-r}) \text{ then}$$

$$MSEM(\hat{\beta}) = \sigma^2 (T_r \Lambda_r^{-1} T_r' + T_{p-r} \Lambda_{p-r}^{-1} T_{p-r}') \tag{3}$$

The MSEM of $\hat{\beta}_r(k, d)$ is given as

$$\begin{aligned}
 MSEM(\hat{\beta}_r(k, d)) &= \sigma^2 T_r S_r(k)^{-1} S_r(-d) A_r^{-1} S_r(-d) S_r(k)^{-1} T_r' \\
 &\quad + [(-k - d) T_r S_r(k)^{-1} T_r' - T_{p-r} T_{p-r}'] \beta \\
 &\quad \times \beta' [(-k - d) T_r S_r(k)^{-1} T_r' - T_{p-r} T_{p-r}']
 \end{aligned} \tag{4}$$

by using (3) and (4), $MSEM(\hat{\beta}) - MSEM(\hat{\beta}_r(k, d))$ can be expressed as

$$\begin{aligned}
 MSEM(\hat{\beta}) - MSEM(\hat{\beta}_r(k, d)) &= \sigma^2 T_r S_r(k)^{-1} [2(k + d) I_r + (k^2 - d^2) A_r^{-1}] S_r(k)^{-1} T_r' \\
 &\quad + T_{p-r} [\sigma^2 A_{p-r}^{-1} - T_{p-r}' \beta \beta' T_{p-r}] T_{p-r}' \\
 &\quad - (k + d)^2 T_r S_r(k)^{-1} T_r' \beta \beta' T_r S_r(k)^{-1} T_r' \\
 &\quad - (k + d) T_r S_r(k)^{-1} T_r' \beta \beta' T_{p-r} T_{p-r}' \\
 &\quad - (k + d) T_{p-r} T_{p-r}' \beta \beta' T_r S_r(k)^{-1} T_r'
 \end{aligned} \tag{5}$$

Let us define $S^*(k, d)$ and $A^*(k, d)^{-1}$ as follows

$$S^*(k, d) = \begin{pmatrix} \frac{1}{k + d} S_r(k) & 0 \\ 0' & I_{p-r} \end{pmatrix}$$

and

$$A^*(k, d)^{-1} = \begin{pmatrix} \frac{1}{(k + d)^2} [2(k + d) I_r + (k^2 - d^2) A_r^{-1}] & 0 \\ 0' & A_{p-r}^{-1} \end{pmatrix}$$

Then the expression in (5) equals

$$MSEM(\hat{\beta}) - MSEM(\hat{\beta}_r(k, d)) = T S^*(k, d)^{-1} [\sigma^2 A^*(k, d)^{-1} - T' \beta \beta' T] S^*(k, d)^{-1} T' \tag{6}$$

So that the $r - (k, d)$ class estimator is superior to the OLS estimator if and only if $\beta' T A^*(k, d) T' \beta \leq \sigma^2$ (Rao and Toutenburg, [11]). We conclude the proof.

There are many different theorems that compare two biased estimators in terms of MSEM such as Trenkler [12], Trenkler and Toutenburg [13] and etc. We used the theorem by Baksalary and Trenkler [14].

Theorem 2. *The $r - (k, d)$ class estimator is superior to the PCR estimator by the criterion of MSEM if and only if $\beta \in N(W_1)$, where $N(W_1)$ is the null space of $W_1 = \left(\frac{k+d}{\sigma}\right) [2(k + d) I_r + (k^2 - d^2) A_r^{-1}]^{-\frac{1}{2}} T_r'$*

Proof.

$$MSEM(\hat{\beta}_r) = \sigma^2 T_r A_r^{-1} T_r' + (T_r T_r' - I_p) \beta \beta' (T_r T_r' - I_p) \tag{7}$$

$MSEM(\hat{\beta}_r) - MSEM(\hat{\beta}_r(k, d))$ can be expressed as

$$\begin{aligned}
 MSEM(\hat{\beta}_r) - MSEM(\hat{\beta}_r(k, d)) &= \sigma^2 T_r S_r(k)^{-1} [2(k+d)I_r + (k^2 - d^2)A_r^{-1}] S_r(k)^{-1} T_r' \\
 &+ (T_r T_r' - I_p) \beta \beta' (T_r T_r' - I_p) + \\
 &[-(k+d)T_r S_r(k)^{-1} T_r' - T_{p-r} T_{p-r}'] \beta \\
 &\times \beta' [-(k+d)T_r S_r(k)^{-1} T_r' - T_{p-r} T_{p-r}'] \tag{8}
 \end{aligned}$$

Since comparing $(\hat{\beta}_r(k, d))$ with $(\hat{\beta}_r)$ in terms of MSEM by using the matrix would be challenging, we opted to use a theorem proposed by Baksalary and Trenkler [14].

We noted from (8) that in our case $A = \sigma^2 T_r B T_r'$, where

$$\begin{aligned}
 B &= S_r(k)^{-1} [2(k+d)I_r + (k^2 - d^2)A_r^{-1}] S_r(k)^{-1} \\
 A^+ &= \frac{1}{\sigma^2} T_r B^{-1} T_r'
 \end{aligned}$$

Where A^+ is Moore-Penrose inverse of A and also $A A^+ = T_r T_r'$. Hence

$$\alpha_1 = (T_r T_r' - I_p) \beta \text{ and } \alpha_2 = [-(k+d)T_r S_r(k)^{-1} T_r' - T_{p-r} T_{p-r}'] \beta. \alpha_1 \in \mathfrak{R}(A) \text{ if and only if } \alpha_1 = 0.$$

From the part (b) of theorem we can obtain the definition of ss :

$$s = \frac{[\alpha_1^* (I_n - AA^-)^* (I_n - AA^-) \alpha_2]}{[\alpha_1^* (I_n - AA^-)^* (I_n - AA^-) \alpha_1]} = 1$$

In addition, $\alpha_2 - \alpha_1 = A \eta_1$, where

$$\begin{aligned}
 \eta_1 &= -\frac{(k+d)}{\sigma^2} T_r S_r(k) [2(k+d)I_r + (k^2 - d^2)A_r^{-1}]^{-1} T_r' \beta \\
 (\alpha_2 - \alpha_1)' A^- (\alpha_2 - \alpha_1) &= \eta_1' A \eta_1 \leq 0
 \end{aligned}$$

Then, $(\hat{\beta}_r(k, d))$ is superior over $(\hat{\beta}_r)$ if and only if

$$\eta_1' A \eta_1 = \left(\frac{k+d}{\sigma}\right)^2 \beta' T_r [2(k+d)I_r + (k^2 - d^2)A_r^{-1}]^{-1} T_r' \beta \leq 0.$$

Under the assumption $(k - d + 2)(k + d) \geq 0$,

if we let $Q_1 = W_1 \beta$ $Q_1 = W_1 \beta$ where

$$W_1 = \left(\frac{k+d}{\sigma}\right) [2(k+d)I_r + (k^2 - d^2)A_r^{-1}]^{-\frac{1}{2}} T_r'$$

$MSEM(\hat{\beta}_r) - MSEM(\hat{\beta}_r(k, d))$ is nnd if and only if $W_1 \beta = 0$ $W_1 \beta = 0$

Theorem 3. The $r - (k, d)$ class estimator is superior to the Liu-type estimator by the criterion of MSEM if and only if $\beta \in N(W_2)$, where $N(W_2)$ is the null space of $W_2 = \left(\frac{1}{\sigma}\right) (A_{p-r})^{\frac{1}{2}} T_{p-r}'$

Proof.

$$MSEM(\hat{\beta}(k, d)) = \sigma^2 T S(k)^{-1} S(-d) A^{-1} S(-d) S(k)^{-1} T' + (k+d)^2 T S(k)^{-1} T' \beta \beta' T S(k)^{-1} T' \tag{9}$$

where $S(k) = (A + kI_p)$. In consequence of (4) and (9), it can be seen that

$$\begin{aligned} MSEM(\hat{\beta}_r(k)) - MSEM(\hat{\beta}_r(k, d)) &= \sigma^2 T_{p-r} S_{p-r}(k)^{-1} S_{p-r}(-d) A_{p-r}^{-1} S_{p-r}(-d) S_{p-r}(k)^{-1} T_{p-r}' \\ &+ (k+d)^2 TS(k)^{-1} T' \beta \beta' TS(k)^{-1} T' \\ &- [(-k-d) T_r S_r(k)^{-1} T_r' - T_{p-r} T_{p-r}'] \beta \\ &\times \beta' [(-k-d) T_r S_r(k)^{-1} T_r' - T_{p-r} T_{p-r}'] \end{aligned}$$

Similar to the previous case, theorem by Baksalarly and Trenkler [14] was used below.

Letting $A = \sigma^2 T_{p-r} B T_{p-r}'$, where $B = S_{p-r}(k)^{-1} S_{p-r}(-d) A_{p-r}^{-1} S_{p-r}(-d) S_{p-r}(k)^{-1}$

$$\alpha_1 = (k+d) TS(k)^{-1} T' \beta \text{ and } \alpha_2 = [(-k+d) T_r S_r(k)^{-1} T_r' - T_{p-r} T_{p-r}'] \beta.$$

$A^+ = \frac{1}{\sigma^2} T_{p-r} B^{-1} T_{p-r}'$ and $A^+ = T_{p-r} T_{p-r}'$. $\alpha_1 \in \mathfrak{R}(A)$ and $\alpha_2 \in \mathfrak{R}(A: \alpha_1)$ because $s = -1$, where

$$\eta_2 = -\frac{1}{\sigma^2} T_{p-r} S_{p-r}(k) S_{p-r}(-d)^{-1} A_{p-r} T_{p-r}' \beta$$

then the $(\hat{\beta}_r(k, d))$ dominates the $\hat{\beta}_r(k)$ if and only if

$$\eta_2' A \eta_2 = \frac{1}{\sigma^2} \beta' T_{p-r} A_{p-r} T_{p-r}' \beta \leq 0$$

However, it is obvious that $\eta_2' A \eta_2$ is always ≥ 0 so the condition turns out to be $\eta_2' A \eta_2 = 0$. If we let $Q_2 = W_2 \beta$ where

$$W_2 = \left(\frac{1}{\sigma}\right) (A_{p-r})^{\frac{1}{2}} T_{p-r}', \text{ we obtain } \eta_2' A \eta_2 = Q_2' Q_2$$

Then $MSEM(\hat{\beta}_r(k)) - MSEM(\hat{\beta}_r(k, d))$ is nnd if and only if $Q_2 = 0$; $Q_2 = W_2 \beta = 0$

We can say that the necessary and sufficient conditions for the r -(k, d) class estimator to dominate the OLS, PCR and Liu-type estimators have been obtained in Theorems 1–3.

III. RESULTS

To motivate the problem of estimation in the linear regression model, we consider the data about Total National Research and Development Expenditures as a percent of Gross National Product by country from 1972–1986, which was discussed in Gruber [15] and Akdeniz and Erol [16].

We firstly obtain the eigenvalue of $X'X$ as

$$\lambda_1 = 312.930, \lambda_2 = 0.7536, \lambda_3 = 0.0453, \lambda_4 = 0.0372, \lambda_5 = 0.0019$$

The condition number indicates a serious multicollinearity among the regression vector. For the OLS, PCR, ORR, LE, LTE, $r - k$ and $r - (k, d)$ were obtained by replacing the corresponding theoretical MSE expressions in all unknown model parameters with their OLS are summarized in Table 1 and 2.

We can use the following formula to choose k as given by Liu [8]

$$\hat{k} = \frac{\lambda_1 - 100 * \lambda_p}{99}$$

Table 1. Estimated MSE with $d=1$ and various values of k

	$k = 0.10$	$k = 0.30$	$k = 0.50$	$k = 0.70$	$k = 1$
<i>OLS</i>	0.8814	0.8814	0.8814	0.8814	0.8814
<i>PCR</i>	0.7417	0.7417	0.7417	0.7417	0.7417
<i>ORR</i>	0.6068	0.6816	0.7058	0.7186	0.7300
<i>LE</i>	0.8814	0.8814	0.8814	0.8814	0.8814
<i>LTE</i>	153.2568	22.1533	9.7610	5.9868	3.7802
<i>r-k</i>	0.7417	0.7435	0.7459	0.7482	0.7513
$r - (k, d)$	0.6102	0.6054	0.6023	0.6001	0.5978

Table 2. Estimated MSE with \hat{k}_{HK} and various values of d

	$d = -2$	$d = -1$	$d = 0$	$d = 0.30$	$d = 0.50$	$d = 0.70$	$d = 1$	$d = 2$
<i>OLS</i>	0.8814	0.8814	0.8814	0.8814	0.8814	0.8814	0.8814	0.8814
<i>PCR</i>	0.7417	0.7417	0.7417	0.7417	0.7417	0.7417	0.7417	0.7417
<i>ORR</i>	0.7550	0.7550	0.7550	0.7550	0.7550	0.7550	0.7550	0.7550
<i>LE</i>	31.9632	13.5274	3.1667	1.6332	1.0146	0.7191	0.8814	6.6712
<i>LTE</i>	0.4579	0.4419	0.7550	0.9139	1.0363	1.1720	1.4004	2.377
<i>r-k</i>	0.7622	0.7622	0.7622	0.7622	0.7622	0.7622	0.7622	0.7622
$r - (k, d)$	0.5571	0.5640	0.5756	0.5800	0.5832	0.5865	0.5919	0.6130

We observed that under some conditions on d and k , $r - (k, d)$ class estimator performed well compared to others. The estimated MSE values of the $r - (k, d)$ are indeed than those of the OLS, PCR, ORR, LE, $r-k$ and LTE, which agrees with our theoretical findings described in the theorem.

3.1 Monte Carlo Simulation

In this study, the properties of $r - (k, d)$ estimator is examined by Monte Carlo simulation. $r - (k, d)$ estimator was compared with the PCR, $r - k$ estimator in terms of MSE.

According to Liu [8] and Kibria [17] the explanatory variables and response variable are generated by using the following equations:

$$x_{ij} = (1 - \gamma^2)^{1/2} z_{ij} + \gamma z_{ip}, y_i = (1 - \gamma^2)^{1/2} z_{ij} + \gamma z_{ip} \quad i = 1, 2, \dots, n, j = 1, 2, \dots, p$$

Where z_{ij} are independent standard normal pseudo-random numbers and p is specified so that correlation between any two explanatory variables is given by γ^2 . In this simulation, three different sets of correlations namely, $\gamma = 0.90, 0.95$ and 0.99 were considered to show collinearity between the explanatory variables. By applying the variance inflation factors and condition indices it can easily be shown that the explanatory variables are weak, strong and severely collinear when $\gamma = 0.90, 0.95$ and 0.99 , respectively. In this experiment, we selected $p = 4$ for $n = 30, 50, 100$. Then, the experiment was replicated 1000 times by generating new error terms.

Let us consider the PCR, $r - k$ and $r - (k, d)$ and compute their respective estimated MSE values with the different levels of multicollinearity. Based on the simulation results shown in Tables 3, we can see that with the increase of the levels of multicollinearity, the estimated MSE values of the PCR, $r - k$ and $r - (k, d)$ increase in general. For fixed k and d the estimated MSE of estimators increase with the increasing level of multicollinearity. We can see that $r - (k, d)$ is much better than the competing estimators when the explanatory variables are severely collinear. The simulation results are given in Tables 3.

Table 3. Estimated MSE values for three estimator

γ	n	PCR	$r - k$	$r - (k, d)$
0.90	30	0.1454	0.1304	0.1181
	50	0.1860	0.1824	0.1818
	100	0.0800	0.0809	0.0645
0.95	30	0.3462	0.4318	0.1627
	50	0.1054	0.0821	0.0816
	100	0.2587	0.2530	0.2530
0.99	30	0.1543	0.3523	0.1955
	50	0.2721	0.1754	0.2542
	100	0.2659	0.1695	0.1688

We have repeated the simulation studies and our results showed that for three different values of n and multicollinearity there was a deviation in the MSE values. The least deviation was seen with $r - (k, d)$. Generally speaking, the smallest MSE value calculated was seen with $r - (k, d)$, while for $\gamma = 0.90$ and $n = 100$ the $r - (k, d)$ showed a better performance. So the simulation results support the findings in this article.

IV. DISCUSSION AND CONCLUSION

In this study, We have used the MSEM criterion to compare the $r - (k, d)$ class estimator with the OLS , PCR , ORR , LE , $r-k$ and Liu-type estimators. We proved that the $r - (k, d)$ class estimator is superior overall seven aforementioned estimators in terms of mean squared error matrix under certain conditions in a numerical example. We also determined that those conditions depend on some unknown parameters. Finally, we illustrated our findings with a numerical example and a Monte Carlo simulation. Both numerical example and simulation results which agrees with our theoretical findings.

REFERENCES

- [1] Stein. C., (1956). Inadmissibility of the usual estimator for mean of multivariate normal distribution. In Neyman J (ed). *Proceedings of the third Berkley symposium on mathematical and statistics probability* 1. 197–206.
- [2] Massy. W. F., (1965) . Principal component regression in explanatory statistical research. *J. Amer. Statist. Assoc* 60 234–256.
- [3] Hoerl. A and Kennard. R., (1970) .Ridge regression biased estimation for nonorthogonal problems. *Technometrics* 12 55–67.
- [4] Baye, M. and Parker.D., (1984) .Combining ridge and principal component regression: a money demand illustration. *Communications in Statistics Theory and Methods* 13,197–205.
- [5] Liu. K., (1993) . A new class of biased estimate in linear regression. *Commun. Statist. Theor.Meth* 22(2), 393–402.
- [6] Akdeniz. F. and Kaciranlar.A., (1995). On the almost unbiased generalized Liu estimator and unbiased estimation of the bias and MSE. *Communications in Statistics Theory and Methods*, 24, 1789-1797.
- [7] Kaciranlar.S. and Sakallioğlu.S., (2001). Combining the Liu estimator and the principal component regression estimator. *Communications in Statistics Theory and Methods*, 30, 2699-2705.
- [8] Liu. K., (2003). Using Liu-type estimator to combat collinearity. *Communications in Statistics Theory and Methods*, 32 (5), 1009–1020.
- [9] Ozkale. M. R. and Kaciranlar. S., (2007). Superiority of the $(r - d)$ class estimator over some estimators by the mean square error matrix criterion. *Statist. Prob. Let*, 21, 438-446.
- [10] Inan. D., (2015). Combining the Liu-type estimator and the principal component regression estimator. *Statistical Papers*, 56. 147-156.
- [11] Rao. C. and Toutenburg. H., (1995). *Linear Models: Least Squares and Alternatives*. New York:Springer-Verlag Inc.
- [12] Trenkler. G., (1985). Mean Square Error Matrix Comparisons of Estimators in Linear Regression. *Communications in Statistics Theory and Methods* A.14, 2495–2509.
- [13] Trenkler. G. and Toutenburg. H., (1990). Mean squared error matrix comparisons between biased estimators an overview of recent results. *Statistical Paper*, 31 165–179.
- [14] Baksalary. J.K. and Trenkler. G., (1991). Nonnegative and positive definiteness of matrices modified by two matrices of rank one. *Linear Algebra and Its Application*, 151, 169–184.
- [15] Gruber. M. H. J., (1998). *Improving Efficiency by Shrinkage: The James-Stein and Ridge Regression Estimators*. New York: Marcel Dekker, Inc.
- [16] Akdeniz. F. and Erol. H., (2003). Mean squared error matrix comparisons of some biased estimators in linear regression. *Comm Stat Theory Methods*, 32(12), 2389–2413.
- [17] Kibria. B.M.G.,(2003). Performance of some new ridge regression estimators. *Communications in Statistics – Simulation and Computation*, 32, 2389-2413.

MIMO PID Control of Rotors with Electromagnetic Bearings

Elektromanyetik Yataklı Rotorların MIMO PID Kontrolü

İbrahim Sina KUSEYRİ¹ 

Marmara Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Makine Mühendisliği Bölümü, 34722, İstanbul, Türkiye

Öz

Elektromanyetik yataklı rotorlar kararsız sistemler oldukları için geribeslemeli kontrol yapılması gerekmektedir. Rotor dinamiği sabit hızda doğrusal ve zamanla değişmeyen özellikte olmakla birlikte, elektromanyetik yatak dinamiği doğrusal değildir. Doğrusal olmayan yatak dinamiği sabit bir sapma akımı kullanılarak bir çalışma noktası civarında doğrusallaştırılabilir. Bu makalede yatay rotor/aktif manyetik yataklı sistemler için merkezi bir MIMO PID kontrolör tasarlayarak çoklu SISO PID kontrol ile performans karşılaştırması yapmaktayız. Rotor dinamiğindeki dinamik eşleşme birbirine dik yönlerde jiroskopik kuvvetler oluşturmaktadır. Eşleşik (dinamik) dengesizlik kuvvetler nedeniyle oluşabilecek yanal yönlerdeki açıl hareketlerin meydana getirdiği jiroskopik kuvvetlerin kompanzasyonu için SISO PID kontrol yeterli performansa sahip değildir.

Anahtar kelimeler: Konveks optimizasyon, MIMO PID kontrol, dinamik balanssızlık giderme, jiroskopik rotor dinamiği, elektromanyetik yataklar.

Abstract

Rotors with electromagnetic bearings are inherently unstable systems; hence feedback control is an integral part of their operation. While the rotor dynamics is linear and time-invariant at constant operation speed, electromagnetic bearing model is non-linear. Non-linear bearing dynamics can be linearized at an operating point using a constant bias current. In this paper we design a MIMO PID controller for horizontal rotor/active magnetic bearing systems and compare its performance with respect to SISO decentralized PID control. Dynamic coupling in rotor dynamics causes gyroscopic forces to act at orthogonal directions on the rotor. SISO PID control lacks sufficient performance as it has limited capability to compensate for the gyroscopic effects due to angular motions in transverse directions which can be caused by couple (dynamic) unbalance forces.

Keywords: Convex optimization, MIMO PID control, dynamic unbalance suppression, gyroscopic rotor dynamics, electromagnetic bearings.

I. INTRODUCTION

Due to their non-contact and lubricant-free operation, utilization of magnetic bearings in rotating machinery is attracting increasing interest both from industry and academia. Their dynamic equations can be derived in LTI form for small deviations from the operating point. Dynamics depends on the operational speed due to electromagnetic and gyroscopic cross-coupling. Disturbance acting on the rotor/electromagnetic bearing system is often the unbalance force, which is speed-synchronous and sinusoidal.

Using appropriate control methods, the desired bearing characteristics can be optimized for the particular application. In linear control, compensators are designed using a linear time-invariant model after the linearization of the system. A common strategy is to oppose the unbalance forces by speed synchronous forces through electromagnetic bearings. The amplitude and phase of compensation forces is computed on-line based on the model of the system and the displacements of the rotor due to unbalance in a rotating frame. Burrows et al. [1] describe this method. When the speed of the rotor is constant, linear time-invariant controllers can be designed to reject disturbances (mainly unbalance) at that particular synchronous frequency. This is accomplished by incorporating notch filters in the loop [2]. Perfect disturbance rejection at a particular frequency is also possible by incorporating a transmission-zero into the closed loop system. Decentralized SISO PID controllers are used extensively in commercial systems as they are simple to use and provide sufficient performance. To enhance PID controllers' performance to achieve minimum displacements, especially at critical speeds, much research has been accomplished [3].

An alternative to using decentralized SISO PID control is to design a central MIMO PID controller that uses all sensors to drive all actuators. MIMO PID controllers can achieve satisfactory performance even when the system dynamics are quite coupled. Motivated by this capability of MIMO PID controllers, their implementation in rotor/AMB systems having coupled angular motion deserves attention. However, MIMO PID design is more complex and challenging. General analytical solutions are not available and numerical methods using algorithms based on iterative linear matrix inequalities (ILMI's) are developed for this purpose [4].

PID control has inherent limitations due to limitations on defining the performance criteria for the controllers. Hence, current research is concerned with model based controllers and, especially, the application of modern robust control techniques. The loop shaping design procedure has been used to adjust the open-loop singular values based on the requirements for the sensitivity of the closed-loop system [5]. Design by loop shaping exhibits limited performance when the rotor operates at different operating speeds due to the change in the frequency of the unbalance force. In robust and optimal control theory controller design can be cast in the form of an optimization problem, which has further advantages over conventional PID control. H_∞ control problem was set in linear matrix inequality (LMI) formulation in [6]. This procedure is applicable to a wider range of plants and convex optimization algorithms are utilized for the solution efficiently via semi-definite programming [7]. Optimal controller design methods such as H_∞ and μ synthesis provide better performance over decentralized PID controller design techniques as shown in [8]. Noshadi et al. have determined the parameters of an active magnetic bearing system before implementing MIMO robust control techniques [9].

LMI frame work also allows for the synthesis of gain-scheduled controllers, which increase robustness and/or performance for the feedback control of LPV plants. In robust LTI H_∞ design, time varying plant characteristics are treated as uncertainty, which often leads to overly conservative controllers. If the system matrices of the plant are functions of time varying parameters, which can be continuously measured, LMI synthesis methods allow the computation of gain scheduled controllers as functions of measured parameters. The derivations of LMI controller synthesis for parameter varying plants are shown in the literature [10].

Although advanced control techniques such as H_∞ , μ synthesis, or adaptive control techniques lead to superior performance, controllers designed by these methods are of high order and difficult, if not impossible, to realize. Thus we have decided to study and develop a MIMO centralized PID controller, which has not been used before for rotor/electromagnetic bearing systems in the literature, and can be

implemented using simple controllers commercially available. We compare the performance of the MIMO PID control with respect to decentralized SISO PID controlled system.

The paper is organized as follows: In Section 2 we develop a state-space model of horizontal rotor/electromagnetic bearing systems. In Section 3 we contemplate MIMO PID control design and present the synthesis algorithms. In Section 4 numerical results and simulations for a horizontal rotor/electromagnetic bearing systems with SISO and MIMO PID controllers are provided and we compare their performance. Finally in Section 5 we conclude with our comments on the results.

II. ROTOR/ELECTROMAGNETIC BEARING MODEL

Dynamics of a rigid rotor can be derived using Newton-Euler equations

$$\mathcal{F} = \dot{\mathcal{J}} = \frac{d}{dt}(M_r v) \quad \text{and} \quad \mathcal{M} = \dot{\mathcal{H}} = \frac{d}{dt}(I\omega) \quad (1)$$

Where M_r is rotor mass, v is mass center velocity, I is the inertia dyadic, ω is the angular velocity of the rotor. Linear and angular momentum are denoted by \mathcal{J} and \mathcal{H} respectively. Hence \mathcal{F} and \mathcal{M} are the total external force and the total external moment about the mass center of the rotor respectively.

External moment in (1) can be obtained in body fixed rotating coordinates $\zeta\eta\xi$ to read

$$\left(\frac{d}{dt} \right)_{\zeta\eta\xi} (I\omega) + \omega \times I\omega = \mathcal{M}_{\zeta\eta\xi} \quad (2)$$

Assuming that the rotor mass is distributed evenly around the rotation axes, inertia dyadic and angular velocity of the rotor in rotating coordinates are given by

$$I_{\zeta\omega\xi} = \begin{pmatrix} I_t & 0 & 0 \\ 0 & I_t & 0 \\ 0 & 0 & I_r \end{pmatrix} \quad \text{and} \quad \begin{pmatrix} \omega_1 \\ \omega_2 \\ \omega_3 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \dot{\theta} \sin\phi + \dot{\psi} \cos\phi \\ \dot{\theta} \cos\phi - \dot{\psi} \sin\phi \\ \dot{\phi} + \dot{\psi} \sin\theta \end{pmatrix} \quad (3)$$

Where I_t and I_r are the principle moment of inertia of the rotor in transverse and radial directions respectively. The angular displacements ϕ , θ and ψ are reflecting the orientations of body fixed rotating frame $\zeta\eta\xi$ about the inertial zyx frame (321 Euler angles). However, since the angles ψ and θ during the motion of the rotor are negligible, we have $\cos\theta \approx 1$ and $\sin\theta \approx 0$ and angular velocities in equations (3) simplifies to

$$\begin{pmatrix} \omega_1 \\ \omega_2 \\ \omega_3 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \cos\phi & \sin\phi & 0 \\ -\sin\phi & \cos\phi & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} \dot{\psi} \\ \dot{\theta} \\ \dot{\phi} \end{pmatrix} \quad (4)$$

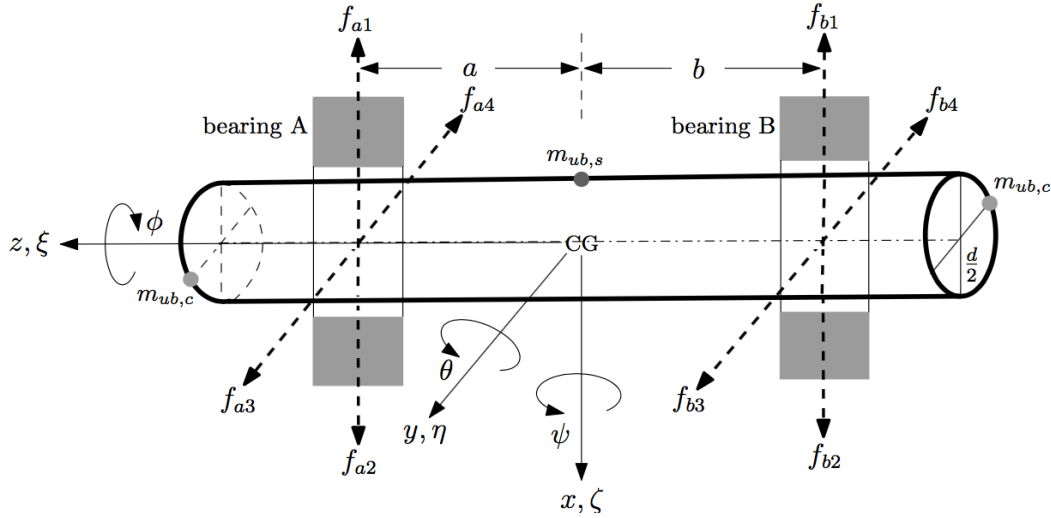


Figure1. Horizontal rigid rotor

Similarly, moment vector in rotating coordinates is

$$\mathcal{M}_{\xi\eta\zeta} = \begin{pmatrix} \cos\phi & \sin\phi & 0 \\ -\sin\phi & \cos\phi & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{pmatrix} \mathcal{M}_{xyz} \quad (5)$$

The force acting on the rotor caused by two electromagnets in opposing directions is [11]

$$F_r = F_+ - F_- = k_m \left(\left(\frac{i_+}{s_0 - r} \right)^2 - \left(\frac{i_-}{s_0 + r} \right)^2 \right)$$

where k_m is the magnetic bearing constant $k_m := \frac{\mu_0 A_A n_c^2}{4} \cos\alpha_M$ with α_M denoting the angle between the magnet centerline and a pole), s_0 is the nominal air gap between the rotor and the bearing, and r is the displacement of the rotor. Nonlinearity of the magnetic force can be reduced by introducing a bias current i_0 added to the control currents $\pm i_c$ in each control axis. Then electromagnetic force can be linearized around the operating point to read

$$F_r \cong F_{rOP} + \left. \frac{\partial F_r}{\partial i} \right|_{OP} (i_c - i_{cOP}) + \left. \frac{\partial F_r}{\partial r} \right|_{OP} (r - r_{OP})$$

Therefore, with $i_{cOP} = 0$ and $r_{OP} = 0$, the linearized magnetic bearing force for small currents and displacements around the operating point is given by

$$F_{r,lin} = k_i i_c - k_s r \quad (6)$$

with current gain of the actuator k_i and the bearing (negative) stiffness k_s defined to be

$$k_i := 4k_m \frac{i_0}{s_0^2} \text{ and } k_s := -4k_m \frac{i_0^2}{s_0^3}.$$

Total displacement of the rotor at the bearing positions are the superposition of translation and rotation motions, which are

$$r_{A,x} = x + a\theta, \quad r_{B,x} = x - b\theta, \quad r_{A,y} = y - a\psi, \quad r_{B,y} = y + b\psi \quad (7)$$

Substituting (4-7) into (1) leads to the equations of motion

$$\ddot{x} = \frac{1}{M_r} \left(f_{A,x} + f_{B,x} + \frac{M_r}{\sqrt{2}} g \right) \quad (8a)$$

$$\ddot{y} = \frac{1}{M_r} \left(f_{A,y} + f_{B,y} + \frac{M_r}{\sqrt{2}} g \right) \quad (8b)$$

$$\ddot{\psi} = \frac{1}{I_t} \left(-\Omega I_p \dot{\theta} + b f_{B,y} - a f_{A,y} \right) \quad (8c)$$

$$\ddot{\theta} = \frac{1}{I_t} \left(\Omega I_p \dot{\psi} + a f_{A,y} - b f_{B,x} \right) \quad (8d)$$

with bearing forces

$$f_{A,x} = f_{a2} - f_{a1} = k_{i,A} i_{A,x} - k_{s,A} (x + a\theta) \quad f_{B,x} = f_{b2} - f_{b1} = k_{i,B} i_{B,x} - k_{s,B} (x + b\theta)$$

$$f_{A,y} = f_{a3} - f_{a4} = k_{i,A} i_{A,y} - k_{s,A} (y + a\psi) \quad f_{B,y} = f_{b3} - f_{b4} = k_{i,B} i_{B,y} - k_{s,B} (y + b\psi)$$

Equations of motion (8) can be given in state-space form

$$\dot{x}_r = Ax_r + Bu + \bar{g}, \quad y = Cx_r \quad (9)$$

where $x_r := (x \ y \ \psi \ \theta \ \dot{x} \ \dot{y} \ \dot{\psi} \ \dot{\theta})^T$, and $u := (i_{cA,x} \ i_{cA,y} \ i_{cB,x} \ i_{cB,y})^T$.

Matrices A, B, and C are

$$A = \begin{pmatrix} 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 \\ -\frac{k_{s,A} + k_{s,B}}{M_r} & 0 & 0 & \frac{ak_{s,B} + bk_{s,A}}{M_r} & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & -\frac{k_{s,A} + k_{s,B}}{M_r} & \frac{bk_{s,A} + ak_{s,B}}{M_r} & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & \frac{bk_{s,A} + ak_{s,B}}{I_t} & -\frac{b^2k_{s,B} + a^2k_{s,A}}{I_t} & 0 & 0 & 0 & 0 & -\frac{\Omega I_r}{I_t} \\ \frac{ak_{s,B} + bk_{s,A}}{I_t} & 0 & 0 & -\frac{b^2k_{s,B} + a^2k_{s,A}}{I_t} & 0 & 0 & \frac{\Omega I_r}{I_t} & 0 \end{pmatrix}$$

$$B = \begin{pmatrix} 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 \\ \frac{k_{i,A}}{M_r} & 0 & \frac{k_{i,B}}{M_r} & 0 \\ 0 & \frac{k_{i,A}}{M_r} & 0 & \frac{k_{i,B}}{M_r} \\ 0 & -\frac{ak_{i,A}}{I_t} & 0 & \frac{bk_{i,B}}{I_t} \\ \frac{ak_{i,A}}{I_t} & 0 & -\frac{bk_{i,B}}{I_t} & 0 \end{pmatrix} \quad C = \begin{pmatrix} 1 & 0 & 0 & a & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & -a & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 1 & 0 & 0 & -b & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & b & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \end{pmatrix}$$

The gravity term \bar{g} in (9) can be neglected because the bias current can be adjusted larger than enough to compensate for the additional current required to suspend the rotor against gravity.

III. CONTROLLER DESIGN

For many years single input-single output (SISO) PID controllers have been used with acceptable performance for multi input-multi output (MIMO) plants. Generally this is accomplished by matching inputs and outputs in pairs. As such, SISO PID controllers can be designed for each channel using standard tuning rules for PID control. For decoupled MIMO plants multi-loop decentralized SISO PID design can be satisfactory. An alternative to decoupled SISO PID control is to synthesize a central MIMO PID controller that combines all sensors to drive all actuators. MIMO PID controllers can achieve much better performance even when the plant dynamics are predominantly coupled. However, MIMO PID design is more challenging and complex. Iterative optimization algorithms based on linear matrix inequalities (LMI's) are developed for this purpose. However the solution they provide is either overly conservative [12] or may converge to a local minima instead of the global minimum [13].

3.1. MIMO PID Control in State-Space

In MIMO PID control rotors suspended by magnetic bearings a single four input-four output PID controller can be used for both bearings with the rotor position measurements $y = (r_{A,x} r_{A,y} r_{B,x} r_{B,y})^T$ fed back into the controller and the system input (controller output) $u = (i_{cA,x} i_{cA,y} i_{cB,x} i_{cB,y})^T$ sent to electromagnetic bearings/actuators. Linearized system derived in Section 2 can be represented by the state-space equations

$$\dot{x}_r = Ax_r + Bu \quad y = Cx_r \quad (10)$$

with the following PID controller

$$u = K_1 y + K_2 \int_0^t y d\tau + K_3 \frac{dy}{dt} \quad (11)$$

where $x_r \in \mathbb{R}^n$ is the rotor state vector, $u \in \mathbb{R}^m$ is the input, $y \in \mathbb{R}^p$ is the output, and $K_1, K_2, K_3 \in \mathbb{R}^{p \times m}$ are matrices to be designed.

Let $v_1 = x_r$ and $v_2 = \int_0^t y d\tau$. We define $v := (v_1^T v_2^T)^T$. Hence the dynamics of the augmented system can be represented by

$$\dot{v} = \tilde{A}x_r + \tilde{B}u \quad y = (C \ 0)v \quad (12)$$

$$\text{where } \tilde{A} = \begin{pmatrix} A & 0 \\ C & 0 \end{pmatrix}, \quad \tilde{B} = \begin{pmatrix} B \\ 0 \end{pmatrix}$$

$$\text{Also note that } \dot{y} = C\dot{x}_r = CAx_r + CBu = \begin{pmatrix} CA & 0 \end{pmatrix}v + CBu.$$

Denoting $\tilde{C}_1 = \begin{pmatrix} C & 0 \end{pmatrix}$, $\tilde{C}_2 = \begin{pmatrix} 0 & I \end{pmatrix}$, $\tilde{C}_3 = \begin{pmatrix} CA & 0 \end{pmatrix}$, and $\tilde{y}_i = \tilde{C}_i v$, for $i = 1, 2, 3$; equation (11) transforms to

$$u = K_1 \tilde{y}_1 + K_2 \tilde{y}_2 + K_3 \tilde{y}_3 + K_3 CBu \quad (13)$$

Assuming that $(I - K_3 CB)$ is invertible, multivariable PID control design reduces to the following static output-feedback problem

$$\dot{v} = \tilde{A}v + \tilde{B}u, \quad \tilde{y} = \tilde{C}v, \quad u = \tilde{K}\tilde{y}, \quad (14)$$

$$\text{where } \tilde{y} := (\tilde{y}_1^T \tilde{y}_2^T \tilde{y}_3^T)^T, \quad \tilde{K} := (\tilde{K}_1 \tilde{K}_2 \tilde{K}_3) = \left((I - K_3 CB)^{-1} K_1 (I - K_3 CB)^{-1} K_2 (I - K_3 CB)^{-1} K_3 \right)$$

$$\text{and } \tilde{C} := \begin{pmatrix} \tilde{C}_1^T & \tilde{C}_2^T & \tilde{C}_3^T \end{pmatrix}^T.$$

Once the composite matrix $\tilde{K} := (\tilde{K}_1 \tilde{K}_2 \tilde{K}_3)$ is computed, PID gain matrices can be recovered from the equations

$$K_3 = \tilde{K}_3 (I + CB\tilde{K}_3)^{-1}, \quad K_2 = (I - K_3 CB)\tilde{K}_2, \quad K_1 = (I - K_3 CB)\tilde{K}_1 \quad (15)$$

It is easy to show that matrices $(I - K_3 CB)$ and $(I + CB\tilde{K}_3)$ are both invertible [12].

3.2. Static Output Feedback Stabilization

As is well known, static output feedback stabilization (SOFS) problem is among the important open questions in control theory. See the survey in [14] and a recent paper [15]. Common approach to solve the SOFS problems is to exploit the special structure of a particular problem as there is no general analytic solution. However numerical solutions may also be possible to a SOFS problem. This approach is rejected in [4], where linear matrix inequalities (LMIs) are used, which are very effective if the associated problem has a numerical solution. The objective of SOFS problem is to find a static output feedback controller $u = Ky$ where $K \in \mathbb{R}^{p \times m}$, such that the closed loop system $\dot{x} = (A + BKC)x$ is asymptotically stable.

Lemma[4] System (10) is stabilizable via static output feedback, if and only if, there exist matrices $P \succ 0$ and K satisfying the following matrix inequality:

$$A^T P + PA - PBB^T P + (B^T P + KC)^T (B^T P + KC) \prec 0 \quad (16)$$

Remark: It can be shown that that matrix inequality (16) is valid for all state-space realizations of the system under consideration [12]. In general industrial PID controllers are designed by modeling in frequency domain. Hence we can use any state-space realization of the system to investigate a possible solution for static output feedback stabilization provided that the model of the system is available in frequency domain.

Solution of the matrix inequality (16) is very complicated due the negative sign nonlinear term $-PBB^T P$. Suppose that it is possible to find a matrix Γ depending affinely on P and satisfies

$$\Gamma \preceq PBB^T P \quad (17)$$

Then it is can be shown that it is possible to stabilize the system (10) by $u = Ky$ provided that the following inequality

$$A^T P + PA - \Gamma + (B^T P + KC)^T (B^T P + KC) \succ 0 \quad (18)$$

can lead to a solution for matrices (P, K) . Using Schur complement formula [16], the inequality (17) is equivalent to

$$\begin{pmatrix} A^T P + PA - \Gamma & (B^T P + KC)^T \\ B^T P + KC & -I \end{pmatrix} \prec 0 \quad (19)$$

Once other parameters in Γ are given, matrix inequality (19) depends affinely on the pair (P, K) . In [4], Γ is given by

$$\Gamma = X^T BB^T P + P^T BB^T X - X^T BB^T X \quad (20)$$

where $X \succ 0$. In this case inequality (17) is always satisfied and the equality holds if and only if $X^T B = P^T B$. Once X is known, matrix inequality (19) can be solved by LMI solvers very efficiently. Based upon the facts above, the following iterative linear matrix inequality (ILMI) algorithm is developed to solve SOFS problem.

Optimization algorithm[4]

Initial data: A state-space realization (A, B, C) of the system.

Step 1: Choose $Q_0 \succ 0$ and solve P for the Riccati equation

$$A^T P + PA - PBB^T P + Q_0 = 0, \quad P \succ 0.$$

Set $i = 1$ and $X_1 = P$.

Step 2: Solve the optimization problem OP1 for P_i, K and α_i . given below.

OP1: Minimize α_i subject to the following LMI constraints

$$\begin{pmatrix} \sum_{i} (B^T P_i + KC)^T & \\ B^T P_i + KC & -I \end{pmatrix} \prec 0, P_i \prec 0 \quad (21)$$

where

$$\begin{aligned} \sum_{i} &= A^T P_i + P_i A - X_i B B^T P_i - P_i B B^T X_i \\ &+ X_i B B^T X_i - \alpha_i P_i \end{aligned}$$

Denote by α_i^* the minimized value of α_i .

Step 3: If $\alpha_i^* \leq 0$, the matrices (P_i, K) solves the problem. Stop. Otherwise go to Step 4.

Step 4: Solve the optimization problem OP2 for P_i and K given below.

OP2: Minimize $\text{tr}(P_i)$ subject to LMI constraints (21) with $\alpha_i = \alpha_i^*$, where tr represents the trace of a matrix. Denote by P_i^* the optimal P_i .

Step 5: If $\|X_i B - P_i^* B\| < \varepsilon$, where ε is the tolerance prescribed, go to Step 6; otherwise set $i := i + 1$, $X_i = P_i^*$, and go to Step 2.

Step 6: Algorithm cannot decide whether this SOFS problem is solvable or not. Stop

3.3. Feedback Stabilization with MIMO PID Controllers

Consider system (10) again, but now we use PID controller (11) instead of static output feedback controller $u = \tilde{K}y$ such that the closed-loop system $\dot{\nu} = (\tilde{A} + \tilde{B}\tilde{K}\tilde{C})\nu$ is asymptotically stable. Our objective here is to design the feedback matrices K_1, K_2, K_3 of the MIMO PID controller.

The stabilizing feedback matrices K_1, K_2, K_3 in (14) can be found by solving \tilde{K} through the application of the optimization algorithm given in Section 3.2 to system $(\tilde{A}, \tilde{B}, \tilde{C})$. In order to guarantee the invertability of the matrix $(I + CB\tilde{K}_3)$, we can add the following LMI

$$I + (CB\tilde{K}_3) + CB\tilde{K}_3 \succ 0 \quad (22)$$

Hence Steps 2 and 4 in the algorithm are changed to read:

Step 2: Solve the optimization problem for (P_i, \tilde{K}) and α_i : Minimize α_i subject to the constraints

LMI (21) and LMI (22) (OP1). Step 4: Solve the optimization problem for P_i and \tilde{K} : Minimize $\text{tr}(P_i)$ subject to the constraints LMIs (21) and (22) with $\alpha_i = \alpha_i^*$ (OP2).

Note that the inequality (22) stems from the fact that if (22) holds, we have

$$(I+CB\tilde{K}_3)^T (I+CB\tilde{K}_3) = (I+CB\tilde{K}_3)^T + CB\tilde{K}_3 + (CB\tilde{K}_3)^T > 0$$

Hence it follows that $I+CB\tilde{K}_3$ is invertible. However, note that LMI (22) is a very conservative condition. It is suggested to first check whether $I+CB\tilde{K}_3$ is invertible before using this constraint.

IV. RESULTS AND SIMULATIONS

In this section we synthesise SISO and MIMO PID controllers for a horizontal rotor/electromagnetic bearing system and compare their performance.

4.1. Numerical Example

Rotor with its electromagnetic bearings and the associated data is shown in Figure 2 and Table 1.

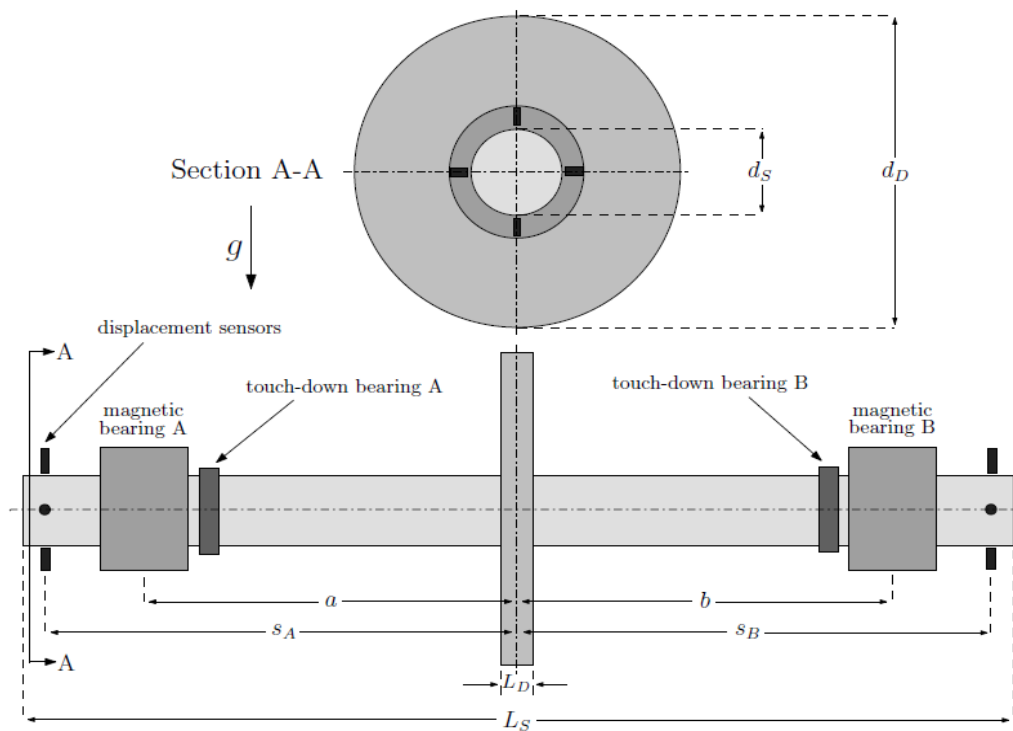


Figure 2. Horizontal rotor with radial electromagnetic bearings

Table 1. Rotor/electromagnetic bearing data

Parameter	Value	Unit	Parameter	Value	Unit	Parameter	Value	Unit
M_S	85.90	kg	L_S	1.50	m	s_0	2.0×10^{-3}	m
M_D	77.10	kg	L_D	0.05	m	s_1	5.0×10^{-3}	m
I_t	17.28	kg.m ²	d_S	0.10	m	i_0	3.0	A
I_r	2.41	kg.m ²	d_D	0.50	m	k_m	7.8455×10^{-5}	N.m ² /A ²
a	0.60	m	s_A	0.75	m	k_s	-3.5305×10^{-5}	N/m
b	0.60	m	s_B	0.75	m	k_i	237.4	N/A

5 kW 6000 rpm DC motor drives the rotor shown above. A passive magnetic bearing can be used to support the rotor axially. To calculate the magnetic bearing constant k_m , we target the force supplied

by the electromagnets to be three times the rotor weight. Optimal bias current i_0 is decided to be 3.0 A by trial and error during the simulations. It has been chosen large enough as a low bias current value would increase the linearization error. Note that the currents supplied to the bearing should not be too large with respect to operating point of the system which is set around the bias current [17].

4.2. Simulations

Coupled non-linear dynamics of the rotor/electromagnetic bearing system used in the simulations is shown in Figure 3.

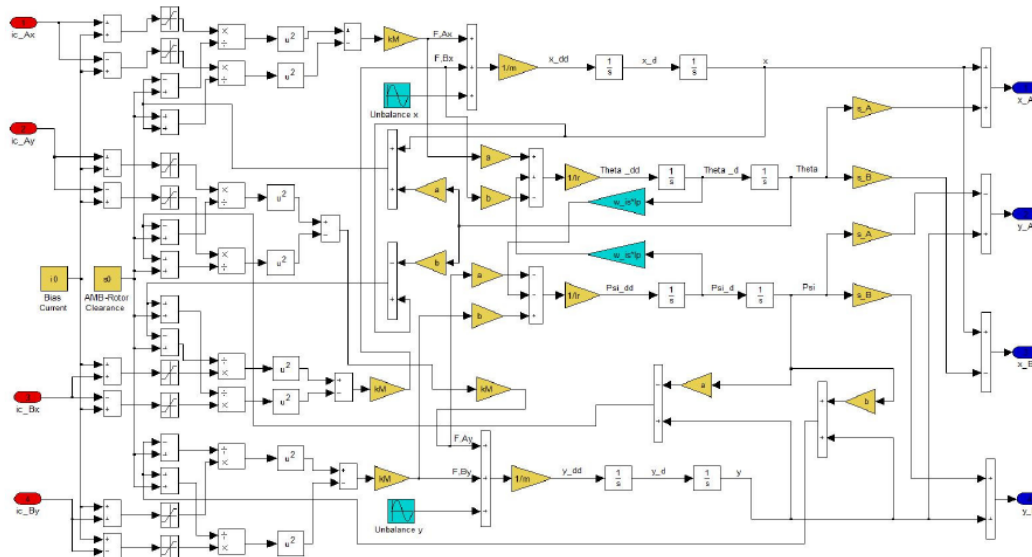


Figure 3. Nonlinear rotor/electromagnetic bearing model in Simulink

To activate the gyroscopic coupling of the rotor a couple unbalance force, as shown in Figure 1, is applied to the rotor. With static and couple unbalance forces, equations of motion given in (8) become

$$\ddot{x} = \frac{1}{M_r} \left(f_{A,x} + f_{B,x} + \frac{M_r}{\sqrt{2}} g + m_{ub,s} \Omega^2 \frac{d}{2} \cos(\Omega t + \varphi_s) \right), \quad \ddot{y} = \frac{1}{M_r} \left(f_{A,y} + f_{B,y} + \frac{M_r}{\sqrt{2}} g + m_{ub,s} \Omega^2 \frac{d}{2} \cos(\Omega t + \varphi_s) \right),$$

$$\ddot{\psi} = \frac{1}{I_t} \left(-\Omega I_p \dot{\theta} + b f_{B,y} - a f_{A,y} + (a+b) m_{ub,c} \Omega^2 \frac{d}{2} \cos(\Omega t + \varphi_c) \right), \quad \ddot{\theta} = \frac{1}{I_r} \left(\Omega I_p \dot{\psi} + a f_{A,y} - b f_{B,x} + (a+b) m_{ub,c} \Omega^2 \frac{d}{2} \cos(\Omega t + \varphi_c) \right).$$

Last two equations show that couple unbalance causes angular acceleration of the rotor in transverse directions, hence the coupled angular dynamics of the system.

Decentralized (decoupled) PID controller has been designed in MATLAB[®]-Simulink with manual tuning at a rotor speed of 6000 rpm. Disturbance force applied is 300 gm.cm static unbalance. Results of the simulations are shown in Figures 4a and 4b for bearing A in y-direction. Sensor calibration for the output Y_A is 0.1 V/mm. Simulations for bearing B give similar results. A 1 V amplitude discrete pulse (vector disturbance for all four channels) with 0.025 seconds duration is injected into the loop at the input of the controller during the simulations. It is verified from the simulations that the closed-loop system is internally stable. However it has been observed that the decentralized PID controller could not stabilize a rotor/AMB even with 50 gm.cm couple (dynamic) unbalance.

MIMO centralized PID controller is designed by semidefinite programming, using the optimization algorithm given in Section 3.2 and LMI (22) given in Section 3.3, with optimization toolboxes YALMIP [18] and SEDUMI [7] for MATLAB®. After the computation of the composite matrix \tilde{K} , controller gain matrices K_1 , K_2 , and K_3 are found by using equations (15). They are given as

$$K_1 = \begin{pmatrix} 8590.3 & 121 & 194.9 & 98.1 \\ 80.9 & 8605.4 & 112.0 & 91.5 \\ 105.7 & 100.1 & 8705.8 & 59.8 \\ 103.0 & 90.6 & 89.7 & 8606.0 \end{pmatrix} \quad K_2 = \begin{pmatrix} 70.3 & 3.0 & 0.9 & 4.1 \\ 1.5 & 75.7 & 2.0 & 3.5 \\ 1.7 & 1.1 & 80.8 & 3.8 \\ 3.0 & 1.6 & 1.7 & 76.3 \end{pmatrix} \quad K_3 = \begin{pmatrix} 10.9 & 0.3 & 0.1 & 0.1 \\ 1.1 & 9.8 & 0.7 & 0 \\ 0.1 & 0.3 & 11.1 & 0.8 \\ 0 & 1.0 & 0.9 & 12.3 \end{pmatrix}$$

Results of the simulations at 6000 rpm operation speed are shown in Figure 5 for bearing A in y-direction. Disturbance force applied is 300 gm.cm static unbalance and 250 gm.cm couple (dynamic) unbalance. A 1 V amplitude discrete pulse (vector disturbance for all four channels) with 0.025 seconds duration is injected into the loop at the input of the controller during the simulations. It is verified from the simulations that the closed-loop system is internally stable. Note that the controller can accommodate the whirling motion due to unbalance of the rotor.

It is also clear from Figure 5b that vibration has a peak value less than 0.1 V (except the transient due to disturbance injected), corresponding to 1mm of rotor displacement.

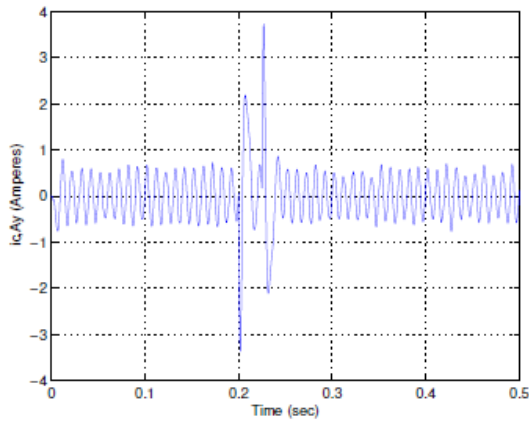


Figure 4a. Control current (Amperes) for decentralized PID Control

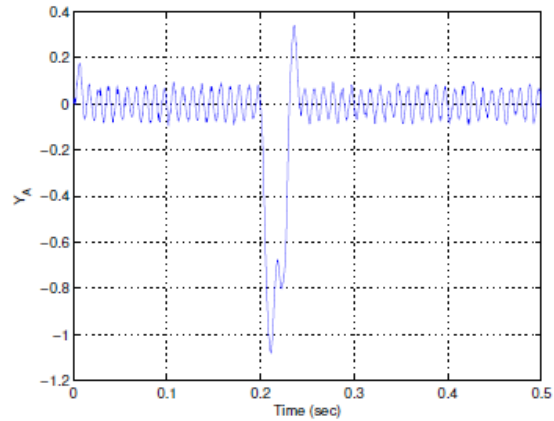


Figure 4b. Rotor position (Volts) for decentralized PID Control

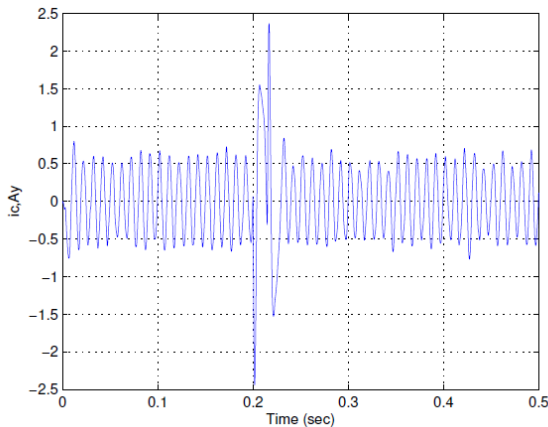


Figure 5a. Control current (Amperes) for MIMO PID Control

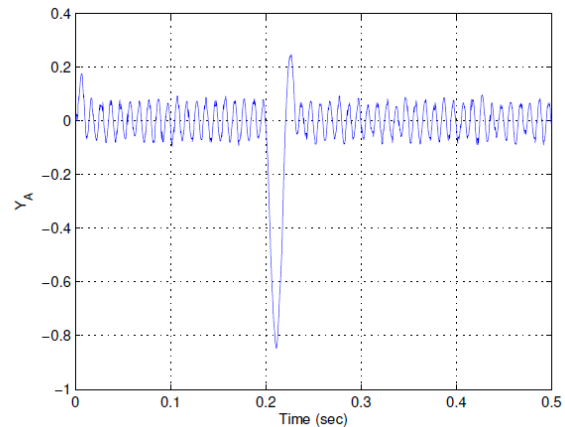


Figure 5b. Rotor position (Volts) for MIMO PID Control

It can clearly be noticed from the Figures 5a and 5b that MIMO PID control achieves better performance than decentralized PID control with respect to transient effects as well.

V. DISCUSSION AND CONCLUSION

In this paper we studied centralized MIMO PID control of rotor/electromagnetic bearing systems and compared its performance relative to the decentralized SISO PID control. In our numerical example we have shown that MIMO PID control can tolerate four times more dynamic unbalance force with respect to SISO PID controlled system. It can be seen in Figure 6 that decentralized control system cannot stabilize the rotor if couple unbalance exceeds 50 gm.cm at 6000 rpm. Simulation results show that rotor touches the roller bearings which are set at 2 mm radial clearance with 300 gm.cm static and 50 gm.cm couple unbalance. However, as shown in Figure 7, the MIMO PID controller can accommodate 300 gm.cm static and 250 gm.cm couple unbalance at this speed with less than 1 mm vibration peak amplitude. This result was expected due to the fact that centralized MIMO PID can also compensate for the cross-coupling gyroscopic terms caused by the angular motion of the rotor.

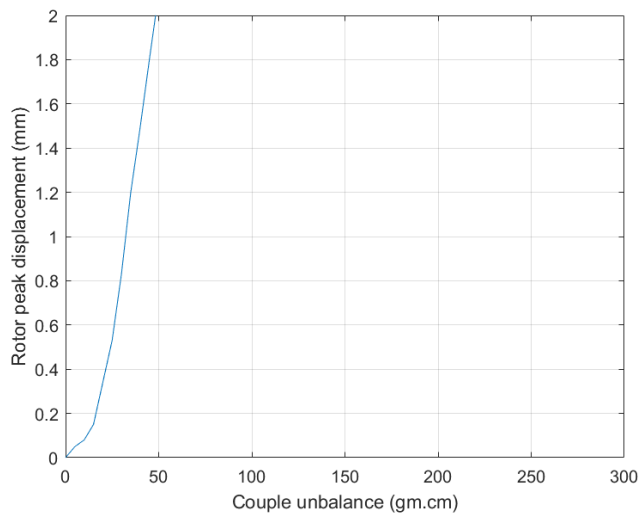


Figure 6. Rotor peak displacement versus couple unbalance with SISO PID Control

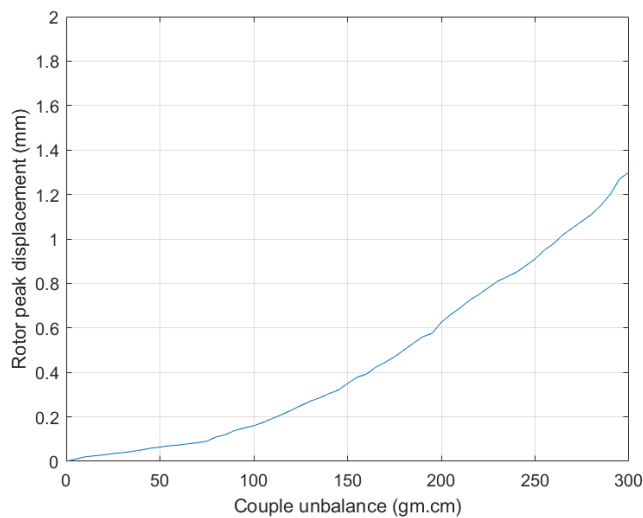


Figure 7. Rotor peak displacement versus couple unbalance with MIMO PID Control

REFERENCES

- [1] Burrows C.R., Sahinkaya N., Traxler A., and Schweitzer G. (1988) Design and application of a magnetic bearing for vibration control and stabilization of a flexible rotor, *1st International Symposium on Magnetic Bearings*, pp. 159-168.
- [2] Herzog R., Bühler P., Gähler C., and Larsonneur R. (1996) Unbalance compensation using generalized notch filters in the multivariable feedback of magnetic bearings. *IEEE Transactions on Control Systems Technology*, vol. 4, no. 5, pp. 580-586.
- [3] Kuseyri S. (2012) Robust control and unbalance compensation of rotor/active magnetic bearing systems, *Journal of Vibration and Control*, 12: 817-832.
- [4] Cao, Y.-Y., Lam, J., and Sun, Y.-X. (1998) Static output feedback stabilization: An ILMI approach, *Automatica*, vol. 34, pp. 1641-1645.
- [5] Fujita M., Hatake K., and Matsumura F. (1993) Loop shaping based robust control of a magnetic bearing, *IEEE Control Systems Magazine*, vol. 13, no. 4, pp. 57-65.
- [6] Gahinet P. and Apkarian P. (1994) A linear matrix inequality approach to H_∞ control, *International Journal of Robust and Nonlinear Control*, vol. 4, pp. 421-448.
- [7] Sturm J.F. (1999) Using SEDUMI 1.02: A MATLAB®Toolbox for Optimization Over Symmetric Cones, *Optimization Methods and Software*, 11(12), pp. 625-653.
- [8] Fittro R.L. and Knospe C.R. (2002) The mu approach to control of active magnetic bearings, *Journal of Engineering for Gas Turbines and Power*, vol. 124, no.3, pp.566-570 .
- [9] Noshadi A., et al. (2016) System Identification and Robust Control of Multi-Input Multi-Output Active Magnetic Bearing Systems, *IEEE Transactions on Control Systems Technology*, vol. 24, pp. 1227-1239.
- [10] Sivrioğlu S. and Nanomi K. (1996) LMI approach to gain scheduled H_∞ beyond PID control for gyroscopic rotor-magnetic bearing system, *Proceedings of the 35th Conference on Decision and Control*, pp. 3694-3699.
- [11] Schweitzer G. and Maslen E. (Editors) (2009) *Magnetic Bearings*. Springer-Verlag.
- [12] Zheng F., Wang Q.G., and Lee T.H. (2002) On the design of multivariable PID controllers via LMI approach, *Automatica*, vol.38, pp. 517-526.
- [13] Boyd S., Hast M., and Astrom K.J. (2016) MIMO PID tuning via iterated LMI restriction, *Int. J. Robust Nonlinear Control*, vol. 26, pp. 1718-1731.
- [14] Syrmos, V. L., Abdallah, C. T., Dorato, P., and Grigoriadis, K. (1997) Static output feedback survey. *Automatica*, vol.33, pp.125-137.
- [15] Köroğlu H., and Falcone P. (2014) New LMI conditions for static output feedback synthesis with multiple performance objectives. *Proceedings of IEEE 53rd Annual Conference on Decision and Control*, DOI: 10.1109/CDC.2014.7039490.
- [16] Boyd, S., El Ghaoui, L., Feron, E., and Balakrishnan, V. (1994) *Linear matrix inequalities in system and control theory*. Philadelphia: SIAM.
- [17] Löscher F. (2002) Identification and Automated Controller Design for Active Magnetic Bearing Systems. Ph.D. Thesis, ETH Zurich.
- [18] Löfberg J. (2004) YALMIP: A toolbox for modeling and optimization MATLAB *Proceedings of the CACSD Conference*, Taipei, Taiwan.

Ege Denizi Limanlarının Arasındaki En Kısa Yol Probleminin Çözümünde Genetik Algoritma Yaklaşımı

A Genetic Algorithm Approach to Shortest Path Problem Among the Ports on the Aegean Sea

Timur İNAN¹ , Ahmet Fevzi BABA² 

¹*İstanbul Arel Üniversitesi, Meslek Yüksekokulu, Bilgisayar Programcılığı Programı,
34295 Sefaköy – Küçükçekmece, İSTANBUL*

²*Marmara Üniversitesi, Teknoloji Fakültesi, Elektrik-Elektronik Mühendisliği Bölümü, 34722, Kadıköy / İSTANBUL*

Öz

Genetik algoritma, evrimsel bir algoritma olup, en sık kullanılan problem çözümüleme algoritmalarından biridir. En kısa yol bulma problemi ise denizcilik, havacılık, savunma ve yük taşımacılığı gibi önemli alanlarda çokça çalışılan bir konudur. Bu çalışmada Ege denizi kıyısında bulunan limanların arasındaki en kısa yolun bulunmasında genetik algoritma kullanılmıştır. Ege denizi üzerinde bulunan 61 liman ve bu limanlar arasında yapılacak olası seyir için rota belirlemede tanımlanan 604 adet düğüm en kısa yol probleminin genetik algoritma yardımıyla belirlenmesi amacıyla kullanılmıştır. Çalışmayı farklı yapan kısımlar; limanların ve düğümlerin gerçek harita üzerinde ve gerçek koordinatlara göre kayıt altına alınmış olması ve düğüm haritasının büyük ölçekli olmasıdır. Ege denizi üzerinde bulunan 61 adet liman arasında yapılabilecek olası seyir durumunda izlenilebilecek rotalar genetik algoritma yardımıyla hesaplanarak sonuçlar ortaya konulmuştur.

Anahtar Kelimeler: Genetik Algoritma, En Kısa Yol, Ege Denizi, Optimizasyon

Abstract

The genetic algorithm is an evolutionary algorithm that is one of the most frequently used problem-solving algorithms. As for the problem of finding the shortest route, it is a subject that is widely studied in important areas such as shipping, aviation, defence and freight forwarding. In this study a genetic algorithm was used to find the shortest paths between Greek and Turkish ports located on the Aegean Sea. Sixty one ports located on the Aegean Sea and 604 nodes that were identified for a possible course between these ports were used to determine the shortest path problem with the help of the genetic algorithm. The originality of this study is that the ports and nodes were identified according to real coordinates and a large scale node map was used. The routes that can be taken in the case of a possible course between the 61 ports located on the Aegean Sea were calculated with the help of the genetic algorithm and the results were put forward.

Keywords: Genetic Algorithm, Shortest path, Aegean Sea, Optimization

I. GİRİŞ

Karınca kolonisi algoritması, genetik algoritma, parçacıklı sürü algoritması gibi üst sezgisel algoritmalar denizcilik, havacılık ve kara taşımacılığı gibi sektörel alanlarda en kısa yol problemlerinin çözümünde yaygın olarak kullanılmaktadır [1], [2], [3]. Bu yöntemler denizcilik alanında da filo optimizasyonu [4], rota optimizasyonu [5], çarpışma önleme [6] gibi alanlarda da çözüm olmuştur. Ege denizi bağlamında genetik algoritma kullanılarak yapılan rota optimizasyonu literatürde bulunamamıştır.

Bu çalışmada Ege denizi üzerinde bulunan Yunanistan ve Türkiye limanları temel alınmıştır. Ege denizi üzerinde bulunan 61 adet limanın arasında yapılabilecek olası seyir durumu için 604 adet düğüm belirlenmiştir. Rota belirlemede olası düğümlerin seçilerek en uygun rotanın bulunması genetik algoritma kullanılarak yapılmıştır.

Limanların gerçek koordinatları ve düğümlerin koordinatları için World Port Index, liman otoritelerinin web siteleri, Google Maps uygulaması ve liman bilgileri içeren web siteleri kullanılmıştır [7], [8], [9], [10], [11]. Derinlikler için

General Bathymetric Chart of Oceans (GEBCO) kuruluşunun internet sitesinden talep edilen bilgiler kullanılmıştır. Haritalama için MATLAB programının Mapping Toolbox fonksiyonları kullanılmıştır [12]. Ege denizi haritası oluşturmak için Yunanistan kıyılarını ve Türkiye kıyılarını içeren shape file dosyaları kullanılmıştır. Haritanın oluşturulması için QGIS programından yardım alınmıştır çünkü her iki ülkenin limanlarını barındıran ortak bir harita bulunamamıştır. İki shape file birleştirilerek ortaya yeni bir shape file çıkarılmıştır. Shape file kullanımının nedeni; shape file haritanın detaylı olarak tüm kıyıları alması ve internet bağlantısı gerektirmemesidir [13], [14], [15].

Genetik algoritmanın giriş değişkenlerinin problem üzerindeki etkisi incelenmiştir. Değişken birey sayısı ve iterasyon

sayısı miktarlarında yapılan tecrübelerde elde edilen çözümler sonuç bölümünde grafiksel olarak gösterilerek genetik algoritmanın problemin çözümündeki performansı değerlendirilmiş ve başarılı sonuçlar elde edildiği görülmüştür.

1.1. Limanlar

Yunanistan ve Türkiye kıyılarında Ege denizinde seyir yapılarak ulaşılabilecek limanlar ve koordinatları kayıt altına alınarak harita üzerinde limanlar belirlenmiştir. Şekil 1’de limanlar ve düğüm haritasının bir kısmı görülmektedir.

Kayıt altına alınan limanların adları ve koordinat bilgileri Tablo 1’deki gibidir.

Tablo 1. Ege denizi limanları ve koordinatları

Limani Adı	Enlem (Kuzey)	Boylam (Doğu)	Limani Adı	Enlem (Kuzey)	Boylam (Doğu)
Achladi	38,9166	23,52183	Miliana	39,1740	23,2131
Akra Kavonisi	35,5145	23,64159	Milos	36,7211	24,4438
Alexandroupoli	40,8329	25,90073	Mitilini	39,1006	26,5848
Aliğa	38,8552	26,93722	Navplio	37,5636	22,7829
Andros	37,8445	24,94554	Nemrut Limanı	38,7919	26,8606
Aspropirgos	38,0370	23,56076	Neon Karlovas	37,7993	26,6855
Ayios Nikolaos	35,1940	25,74136	Nisos Naxos	37,1078	25,3641
Ayvalık	39,3217	26,63370	Ormos Aliveriou	38,3899	24,0450
Bodrum	37,0135	27,42766	Ormos Mikro Vathi	38,4343	23,5993
Chalkis	38,4430	23,60909	Pachi Oil Terminal	37,9725	23,3628
Dhiavlos Steno	38,4498	23,59945	Perama	37,9571	23,5663
Dikili	39,0806	26,86314	Piraevs	37,9344	23,6174
Elevisis	38,0384	23,55630	Pithagorion	37,6867	26,9507
Gavrio	37,8849	24,73322	Plomarion	38,9723	26,3694
Güllük	37,2407	27,58553	Porthmos Evripou	38,4618	23,5884
Iraklion	35,3613	25,17378	Rethimnon	35,3801	24,4851
İzmir	38,4370	27,11123	Rodhos	36,4548	28,2330
Kalimnos	36,9487	26,99567	Samos	37,7545	26,9660
Kavala	40,9211	24,40924	Sitia	35,2209	26,1298
Khios	38,3699	26,14638	Soudha	35,5318	24,2495
Kuşadası	37,8679	27,22846	Spetses	37,2695	23,1561
Kymassi	38,8135	23,52061	Stilis	38,9091	22,6192
Lagos	40,9497	25,06806	Stratoni	40,5130	23,8329
Lakki	37,1089	26,82484	Thessaloniki	40,6234	22,9295
Larimna	38,5731	23,29796	Tsingeli	39,1689	22,8536
Lavrio	37,7081	24,06613	Volos	39,3464	22,9525
Limni Kos	36,9136	27,30059	Vrakhonisi Kallonisi	39,1010	26,5577
Limni Sirou	37,4352	24,94863	Yerakini	40,2643	23,4426
Marmaris	36,7451	28,36273	Çanakkale	40,0254	26,1766
Megara Oil Terminal	37,9770	23,35355	Ekklesia Agios Georgios	36,4279	23,2045
Mikonos	37,4499	25,3260			

1.2. Dügümler

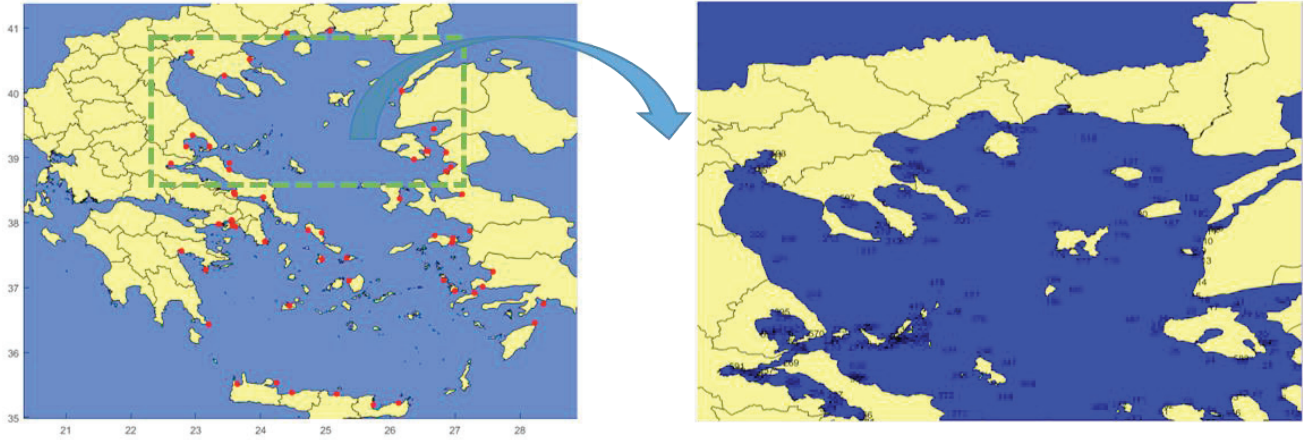
Limanlar arasındaki bağlantılar çoğu liman için direkt düz bir çizgi ile ifade edilemez, çünkü Ege denizi içerisinde birden çok irili ufaklı ada bulundurmaktadır. Dügüm haritası çıkarılarak bu düğümlerin koordinatlarının kayıt altına alınması, düğümlerin arasındaki deniz yolu bağlantılarının hesaplanıp hangi düğümlerin hangi limanlarla bağlantılı olduğunun hesaplanması gerekmektedir. Dügüm haritası çıkarılırken düğümler olası bir seyir durumunda ticari gemilerin rota planlamasında olduğu gibi en kısa yol olacak şekilde kara parçalarının burun kısımları hedef gözetilerek hesaplanmıştır. Elde edilen dügüm haritasının bir kısmı Şekil 1’de görülmektedir.

Çalışmamız, gemiler için dinamik olarak seyir planlaması yapabilen bir zeki sistemin parçasıdır. Rota planlamasının dinamik olarak güncellenebilmesi için zeki sistemin herhangi bir noktadan herhangi başka bir noktaya nasıl gidileceğini dügüm haritası üzerinden hesaplayabilmesi gerekmektedir. Dügüm haritasının çok detaylı olmasının nedeni budur. Dügüm haritasının çıkarılmasındaki asıl ihtiyaç, limanlar arasındaki en kısa yolu hesaplamaktan daha çok zeki sistemin karar değiştirmesi aşamasında tıpkı bir kaptan gibi düşünüp her ihtimali değerlendirip, bu ihtimallerin nasıl gerçekleşebileceği konusunda bilgiyi edinebileceği bir dügüm haritasının elde edilmesi zorunludur. Tablo 2’de dügüm numaraları ve düğümlerin koordinatları görülmektedir.

Tablo 2. Dügümlerin numaraları ve koordinatları

Dügüm No.	Enlem (Kuzey)	Boylam (Doğu)	Dügüm No.	Enlem (Kuzey)	Boylam (Doğu)	Dügüm No.	Enlem (Kuzey)	Boylam (Doğu)
1	39,9409	26,0538	41	38,6861	26,5077	81	37,1723	26,7507
2	39,9363	26,0932	42	38,6960	26,4051	82	37,2168	26,7514
3	39,8420	25,9578	43	38,6678	26,3287	83	37,0094	26,8659
4	39,8508	26,0548	44	38,4535	26,3068	84	36,9405	26,8878
5	39,8309	26,0848	45	38,3845	26,2639	85	36,8738	26,9104
6	39,7978	26,0843	46	38,3022	26,1949	86	36,7578	26,8956
7	39,7861	26,0488	47	38,2135	26,1189	87	36,6567	26,9702
8	39,8203	25,9662	48	38,1381	26,0220	88	36,7485	27,1243
9	39,8408	26,1285	49	38,1805	25,9020	89	36,8459	27,3716
10	39,9152	26,1421	50	38,2457	25,8441	90	36,6329	27,1257
11	39,9935	26,1701	51	38,5473	25,8081	91	36,5531	27,1253
12	40,0131	26,1927	52	38,5989	25,8501	92	36,5173	26,9637
13	39,7605	26,1303	53	38,6254	26,0030	93	36,4895	26,9821
14	39,5903	26,0940	54	38,5583	26,1699	94	36,5767	27,0537
15	39,4776	26,0500	55	38,4597	26,1649	95	36,6069	27,0237
16	39,4491	26,1160	56	38,3179	26,1739	96	36,4986	27,2575
17	39,3879	26,1849	57	38,1030	26,5418	97	36,4113	27,2749
18	39,3983	26,3446	58	37,9925	26,8342	98	36,3499	27,3973
19	39,3366	26,4320	59	37,7880	27,0981	99	36,4141	27,4954
20	39,1687	26,5522	60	37,0535	27,0719	100	36,4837	27,4019
21	39,0330	26,6396	61	37,6677	26,9388	101	36,5060	27,8754
22	38,9238	26,5898	62	37,6093	26,8580	102	36,5691	28,1340
23	38,9514	26,4051	63	37,6677	26,5679	103	36,7451	28,3627
24	38,9591	26,1613	64	37,7410	26,5323	104	36,4856	28,2345
25	39,0274	25,8922	65	37,8275	26,6393	105	36,3109	27,6848
26	39,1808	25,7473	66	37,8481	26,8176	106	36,2550	27,4873
27	39,2378	25,7555	67	37,3509	27,1480	107	36,2662	27,7391
...
602	35,5382	24,2472	603	35,4840	24,1780	604	35,6595	24,3384

Şekil 1. Ege limanları ve düğüm haritasının bir kısmı



Düğüm sayısı çok olduğundan tablo kısa tutulmuştur. Düğümler arasında deniz yolu ile bağlantının olup olmadığı, varsa aralarındaki mesafelerin ne olduğu ve aralarındaki açıların ne olduğu deniz seyrinin gerçekleştirilmesi açısından kritik öneme sahiptir.

1.2.1. Düğümler arasındaki açıların hesaplanması

Düğümler arasındaki bağlantıların hesaplanabilmesi için düğümler arasındaki bağlantının açısının kayıt altına alınması gereklidir. Açılar düğümler arasındaki gerçek deniz bağlantısının olup olmadığı konusunun anlaşılmasında kullanılmıştır ayrıca zeki sistemin rota belirlemesi aşamasında da kullanılacaktır. Açılar matrisi 604 düğümün birbirleri

arasındaki açıyı tutacak şekilde oluşturulmuştur. Tablo 3'te düğümler arasındaki açı bilgilerini tutan matrisin bir kısmı görülmektedir.

1.2.2. Düğümler arasındaki mesafelerin hesaplanması

Düğümler arasındaki bağlantıların hesaplanabilmesi için düğümler arasındaki mesafenin kayıt altına alınması gereklidir. Mesafeler matrisi 604 düğümün birbirleri arasındaki mesafeyi tutacak şekilde oluşturulmuştur. Tablo 4'te düğümler arasındaki mesafeleri kilometre cinsinden gösteren matrisin bir kısmı görülmektedir.

Tablo 3. Düğümler arasındaki açıları gösteren matris (açılar derece cinsindedir)

Düğüm No	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	...	604
1	0	99	217	180	168	171	181	209	150	111	...	198
2	279	0	228	199	184	183	193	220	164	119	...	199
3	37	48	0	83	96	114	129	163	90	63	...	198
4	360	19	263	0	131	157	184	246	100	46	...	198
5	348	4	277	311	0	181	212	263	73	28	...	199
6	351	3	294	337	1	0	247	284	38	21	...	199
7	1	13	309	4	32	67	0	298	48	29	...	199
8	29	40	343	66	83	104	118	0	81	55	...	198
9	330	344	271	280	253	218	228	261	0	8	...	199
10	291	299	243	226	208	201	209	235	188	0	...	199
...	0	198
604	17	17	17	17	18	18	18	17	18	18	...	0

Tablo 4. Düşümler arasındaki mesafeleri gösteren matris (mesafeler kilometre cinsindedir)

Düşüm No.	1	2	3	4	5	6	7	...	604
1	0	3,404	13,71	10,01	12,52	16,12	17,22	...	499,32
2	3,40	0	15,60	10,05	11,74	15,41	17,13	...	499,9
3	13,71	15,60	0	8,334	10,90	11,86	9,95	...	486,35
4	10,01	10,05	8,334	0	3,387	6,405	7,217	...	489,84
5	12,52	11,74	10,90	3,387	0	3,671	5,849	...	488,56
6	16,12	15,41	11,86	6,405	3,671	0	3,297	...	485,07
7	17,22	17,13	9,955	7,217	5,849	3,297	0	...	482,85
...	0	...
604	499,33	499,9	486,35	489,84	488,56	485,073	482,857	...	0

1.2.3. Düşümler arasındaki bağlantıların hesaplanması

Düşümlerin arasındaki bağlantıların hesaplanması aşamasında düşümler arasındaki mesafeler ve açılar hesaplanarak düşümlerin arasındaki yol üzerinde kara parçası olup olmadığı denetlenmiştir. Shape file dosyaları matrise çevrilerek belirtilen noktanın deniz üzerinde mi yoksa kara üzerinde mi olduğunun bulunması mümkündür. Bir düşüm ile diğer düşüm arasındaki mesafe ve açı biliniyorsa belli mesafe aralıklarıyla adım adım ilerleyerek belirtilen noktanın karaya mı yoksa denize mi geldiği 1,2,3,4 numaralı formüller yardımıyla hesaplanabilmektedir. Noktalar arasındaki mesafeler ve açılar kayıt altına alınarak her ikisi için de 604x604 büyüklüğünde iki adet matris oluşturulmuştur. Daha sonra bağlantıları kayıt altına alabilmek için yine 604x604 büyüklüğünde bağlantı matrisi oluşturulmuştur. Matriste bilgiler bağlantı var için 1, bağlantı yok için 0 olacak şekilde kaydedilmiştir.

Adım aralığı hesaplaması şöyle yapılmaktadır:

$$dx = km * \sin(\text{açı}(\text{nokta1}, \text{nokta2})) \quad (1)$$

$$dy = km * \cos(\text{açı}(\text{nokta1}, \text{nokta2})) \quad (2)$$

$$\text{delta boylam} = dx / (11320 * \cos(\text{nokta1.enlem})) \quad (3)$$

$$\text{delta enlem} = dy / 110540 \quad (4)$$

dx: Boylam olarak istenilen açıda istenilen kilometre miktarında ilerlemek için gerekli yol miktarı.

dy: Enlem olarak istenilen açıda istenilen kilometre miktarında ilerlemek için gerekli yol miktarı.

km: İlerlemek istenilen yol miktarı (kilometre).

delta boylam= Boylam üzerinde ilerlemek istenilen yol miktarının derece cinsinden değeri.

delta enlem= Enlem üzerinde ilerlemek istenilen yol miktarının derece cinsinden değeri.

Adım aralığı hesaplaması sonrasında koordinat eğer kara parçasına denk geliyorsa bağlantı matrisine 0, tüm adımların bitmesinden sonra hiç kara parçasına denk gelinmediyse bağlantı matrisine 1 kaydedilmektedir.

Tablo5'te yapılan hesaplamalar sonucunda düşümlerin arasındaki bağlantıların var olup olmadığını gösteren matrisin bir kısmı görülmektedir.

Tablo 5. Düşümler arasındaki bağlantıyı gösteren matris

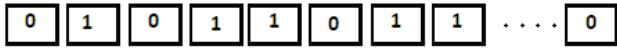
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	...	604	
1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	...	0	
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	...	0	
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	...	0	
4	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	...	0	
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	...	0	
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	...	0	
7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	...	0	
8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	...	0	
9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	...	0	
10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	...	0	
11	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	...	0	
...
604	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	...	0	

II. YÖNTEM

Çalışmada yöntem olarak genetik algoritma kullanılmıştır. Genetik algoritma ilk olarak J. Holland tarafından ortaya konulmuştur [16]. Genetik algoritma evrimsel bir algoritmadır yani problemin çözümünü canlıların hayatlarını devam ettirme yöntemlerini kullanarak çözüme ulaştırmaya çalışır.

2.1. Kromozom Yapısı

Problemin ortaya konulmasının ardından problemi çözmek için kullanılacak bireyler oluşturulur. Her birey kendi kromozom yapısına sahiptir. Şekil 2’de örnek bir kromozom yapısı görülmektedir.



Şekil 2. Genetik algoritmada kullanılan örnek kromozom yapısı

Kromozom yapısı 0 ve 1 lerden de oluşabilir, içinde string ifadeler de olabilir veyahut da bizim çalışmamızda olduğu gibi düğüm numaraları da olabilir. Çalışmamızda kromozom yapısı düğüm numaralarından oluşmaktadır.

2.2. Uygunluk Fonksiyonu

Her birey probleme uygun olarak kendi uygunluğunu kromozomu ile test etmek durumundadır. Uygunluk fonksiyonu probleme göre değişiklik gösterir. Uygunluk fonksiyonundan elde edilen sonuç ışığında bireylerin hayatlarına devam etmeleri veya devam etmemeleri konusunda bir karar elde edilir.

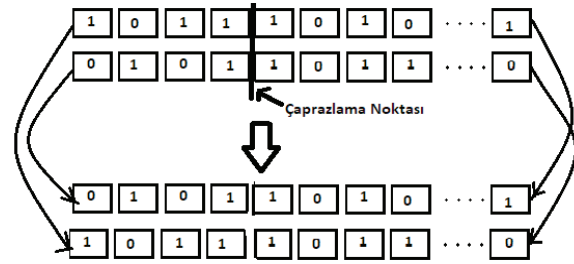
2.3. Seçim

Bireyler uygunluk fonksiyonundan elde ettikleri değer sonucunda bir sıralamaya tabi tutulurlar. En uygun değere sahip birey sıralamada en üstte, en kötü değere sahip birey ise sıralamada en altta tutulur. Bireyler arasından yeni nesil üretmek için seçim yapılması gerekir. Bu seçim çeşitli yöntemlerle yapılabilir. Rulet yöntemi, turnuva yöntemi veya sıralama gibi yöntemler seçim için kullanılan yöntemlerdir.

2.4. Çaprazlama

Uygunluk fonksiyonlarına göre sıralanan ve seçime giren bireyler kendi aralarında yeni bireyler üretmek amaçlı kullanılırlar bu işlemin ilk adımına çaprazlama denir. Çaprazlama için bireylerin kromozomları belli bir yerden kesilerek diğer bireyin kromozomunun parçası ile birleştirilir. Böylece yeni birey veya bireyler elde edilmiş olur. Birleşme noktası

rasgele seçilen bir yer olabilir. Şekil 3’de bir çaprazlama örneği görülmektedir.



Şekil 3. Genetik algoritmada çaprazlama örneği

2.5. Mutasyon

Oluşturulan yeni bireylerin gen yapısında bazı yerlerin mutasyona uğraması, sonuca rasgele ulaşılabilmesi ve çeşitliliğin sağlanarak çözümün bir noktada takılmaması için önemlidir. Mutasyon bir veya birden çok gene uygulanabilir. Kaç genin mutasyona uğrayacağı problemin yapısına göre değişiklik gösterebilir.

2.6. Yeni Jenerasyonların Oluşturulması

Mutasyon sonucu yeni bireyler oluşturulur, yeni bireylerin oluşturulmasında eski bireylerden bazılarının devamı da sağlanabilir ya da tamamen yeni bireyler oluşturularak devam edilmek istenilebilir. Çeşitlilik ne kadar fazla ise o kadar doğru sonuca yaklaşma oranı artar, ancak çeşitliliğin fazla olması, algoritmanın işlemesi bakımından harcanan zaman yüzünden sonuca ulaşılması için harcanan süreyi yükseltir.

III. GENETİK ALGORİTMANIN UYGULANMASI

3.1. Bireylerin Oluşturulması

Ege denizindeki düğüm sayısı bu problemde 604 adettir. Bireylerin kromozomlarındaki genler başlangıç düğümünden bitiş düğümüne kadar olan rasgele seçilmiş tekrar etmeyen düğümlerden oluşmaktadır. Başlangıç ve bitiş düğümleri ilk ve son genler olarak belirlenerek ilk genden başlayarak düğüme bağlı olan düğümlerden bir tanesi rasgele seçilmiş, bu işlem son gen yani bitiş düğümü elde edilene kadar devam ettirilmiştir. Şekil 4’te bireylerin oluşturulması aşaması görülmektedir.

3.2. Bireylerin, Uygunluk Fonksiyonlarına Göre Uygunluklarının Hesaplanması

Sayıları ve gen dizilimleri belli olan bireylerin her biri uygunluk fonksiyonuna göre değerlendirilirler. Çalışmadaki

```

bireydizisi tanımla;
for i=1 to bireysayısı
  birinci geni başlangıç düğümü olarak ata;
  j=1;
  while rasgeledüğüm!=bitişdüğümü
    rasgeledüğüm=rasgeledugumsec(1,604);
    if rasgeledüğüm!=başlangıçdüğümü&&rasgeledüğüm!=bitişdüğümü&& rasgeledüğüm
      bağlantılı mı bireydizisi(i,j-1)
      bireydizisi(i,j)=rasgeledüğüm;
      j++;
    end if
  end while
end for

```

Şekil 4. Bireylerin oluşturulması.

uygunluk fonksiyonu bireyin başlangıçtan hedefe ulaşmak için kullandığı düğümlerin arasındaki mesafe hesaplanmasına dayanmaktadır. En kısa mesafeyi bulan birey uygunluk fonksiyonuna göre en başarılı birey olarak kabul edilmektedir.

Bireyler en kısa mesafe bulandan en uzun mesafe bulana doğru sıraya konulmaktadır. Eski bireyler ve yeni bireyler aynı anda uygunluk yönünden kıyaslamaya tutulmaktadır, bu yöntemle yeni popülasyonda çeşitlilik hedeflenmekte ve jenerasyonun daha kötüye gitmesi engellenmektedir. Eski bireylerin içinde eğer yeni bireylerden daha uygun olanı varsa o birey hayatına devam etmektedir. Şekil 5'te algoritmada kullanılan uygunluk fonksiyonu görülmektedir.

```

başla;
bireyleri al;
mesafeler matrisini al;
skor=0;
dizi=dizinin 0 dan farklı elemanları;
for t=1:to dizelemansayısı-1
  skor=skor+mesafeler(dizi(t),dizi(t+1));
end for
bitir;

```

Şekil 5. Uygunluk fonksiyonu

3.3. Çaprazlama

Bireyler kendi aralarında sıralanma durumlarına göre çaprazlanmıştır. Çaprazlama işleminde bireyin kromozom yapısından rasgele bir geni seçilerek bu gene kadar olan gen dizisi kesilmiştir yani bireyin gen dizisi iki parçaya ayrılmıştır. Çaprazlama işlemine giren diğer bireyin de aynı şekilde rasgele bir geni seçilmiş ve seçilen genden iki parçaya ayrılmıştır. Birinci birey ile ikinci bireyden elde edilen genler çaprazlanarak yeni bireyler üretilmiştir.

3.4. Tekrar Eden Genlerin Kaldırılması

Mutasyon işlemi sonunda elde edilen gendeki düğüm, yerleştiği yerin öncesindeki veya sonrasındaki bir düğümle aynı olabilir. Şekil 6'da buna bir örnek görülmektedir. Yeni bireyde 65. Düğüme iki kere uğranılmaktadır. Çözümün aynı yolu dolaşmaması için tekrar eden düğümler arasındaki genler kesilerek tekrar birleştirilmiştir bu şekilde çözüme daha hızlı ulaşıldığı görülmüştür.

Birey1	539	65	559	532	59	57	324	203	...	545
Birey2	539	494	65	166	271	575	273	...	545
Yeni Birey	539	65	65	166	271	575	273	...	545

Şekil 6. Çaprazlama örneği

3.5. Mutasyon

Bireylerin gen dizilerinde çeşitliliği arttırmak ve çözümün bir noktada tıkanmasını engellemek amacıyla bir veya birkaç gen mutasyona uğratılır. Çalışmamızda bu mutasyon, içinde düğüm bilgisi bulunan genin uygun başka bir gen ile değiştirilmesi şeklinde yapılmıştır. Şekil 7'de mutasyon işlemine bir örnek görülmektedir. Mutasyona uğrayan gen yerine gelen genin içindeki düğüm hem kendisinden önceki hem de kendisinden sonraki düğüm ile bağlantılı olmalıdır. Bağlantılı olup olmadıkları daha önce bahsedilen bağlantı matrisi ile denetlenmektedir.

485	73	84	85	86	89	95	97	...	604
					92				
485	73	84	85	86	92	95	97	...	604

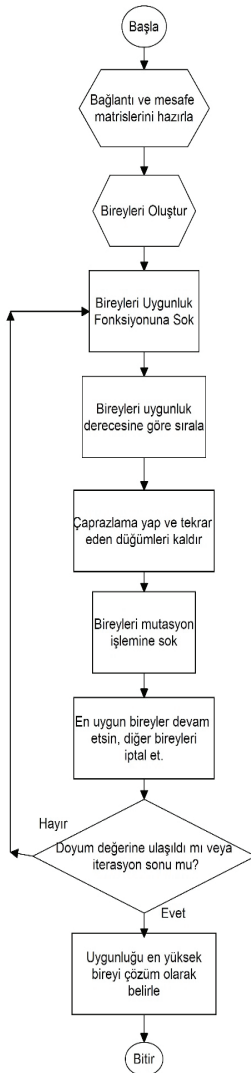
Şekil 7. Yeni bireylerin belirlenmesinde mutasyon işlemi

3.6. Seçim Yöntemi

Popülasyonun daha başarılı hale gelebilmesi için eski ve yeni bireylerin arasında bir kıyaslama yapılarak popülasyonun her denemede daha başarılı hale getirilmesi gerekir. Ancak popülasyonun hep en iyi bireylerden üretmesi çözümü bir noktada tıkayabilir. Bu sorunun önüne geçilebilmesi için popülasyonun başarılı bireylerden devam etmesi kadar başarısız bireylerin de yeni popülasyonda etkisi olması gerekir. Çalışmamızda bu amaçla “Random Selection” yöntemi kullanılmıştır ancak seçim yapılmadan önce yapılan sıralama ile en başarılı bireylerin seçimde üst sıralarda yer almaları sağlanmıştır.

3.7. Algoritma Genel Yapısı

Genetik algoritmanın probleme uygulanması aşamasında hangi adımların gerçekleştiği Şekil 8’de gösterilmiştir.



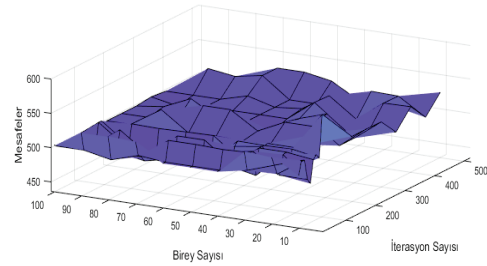
Şekil 8. Çalışmada kullanılan genetik algoritma yapısı.

IV. SİMÜLASYON SONUÇLARI

Genetik algoritmanın hızını ve doğruluğunu etkileyen faktörler değiştirilerek elde edilen sonuçlar kayıt altına alınmıştır. Hıza ve doğruluğa etki eden faktörler birey sayısı ve iterasyon sayısıdır. Genetik algoritmanın sonlanması için bu çalışmada “stagnation” kullanılmıştır. En başarılı değerin 10 kez üst üste bulunması durumunda algoritma sonlanmaktadır. Hesaplamalar Windows işletim sistemi üzerinde MATLAB programı kullanılarak yapılmıştır. Hesaplamaların yapıldığı bilgisayar Intel Pentium i7, 3.6 Ghz hızında işlemciye sahiptir.

4.1. Değişken Birey Sayısı ve İterasyon Sayısı Miktarlarının Mesafeler Yönünden Karşılaştırılması

Birey sayısı 10 ile başlayarak 10 artımla 100’e kadar artırılmış, buna karşılık iterasyon miktarı 10 ile başlayarak 10 artımla 200’e kadar, 200’den sonra ise 50 artımla 500’e kadar artırılmıştır. Her birey sayısı ve iterasyon sayısı miktarı ile yapılan denemelerde elde edilen mesafe miktarı kilometre cinsinden sonuçlar Şekil 9’da gösterilmiştir.

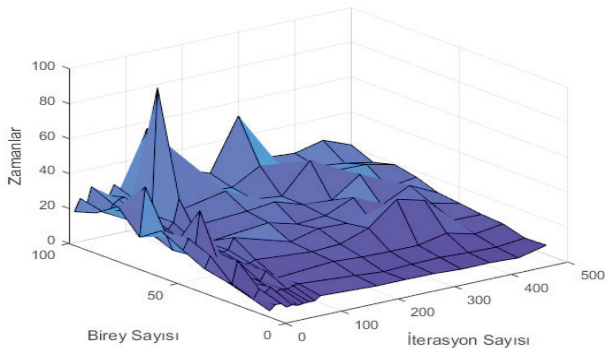


Şekil 9. Achladi limanı ile Aya Nikolas limanı arasında çeşitli birey sayısı ve iterasyon sayısı ile elde edilen mesafe miktarları

Şekil 9’da görüleceği üzere genetik algoritma birey sayısı ve iterasyon sayısına bağlı kalmaksızın tüm denemelerde aynı veya birbirine çok yaklaşık mesafe sonuçlarına erişmiştir.

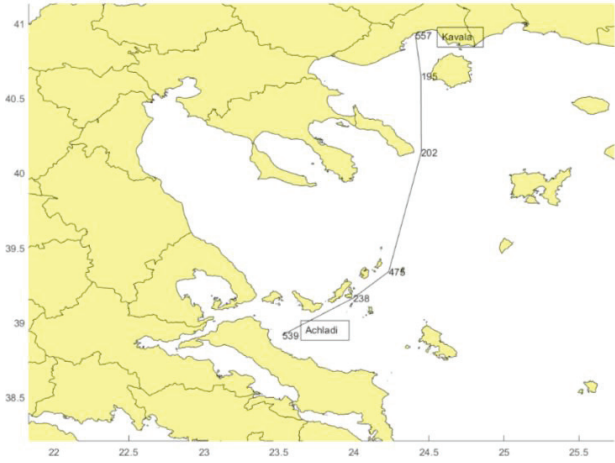
4.2. Değişken Birey Sayısı ve İterasyon Sayısı Miktarlarının Zaman Yönünden Karşılaştırılması

Birey sayısı 10 ile başlayarak 10 artımla 100’e kadar artırılmış, buna karşılık iterasyon miktarı 10 ile başlayarak 10 artımla 200’e kadar, 200’den sonra ise 50 artımla 500’e kadar artırılmıştır. Her birey sayısı ve iterasyon sayısı miktarı ile yapılan denemelerde elde edilen zaman miktarları saniye cinsinden kayıt altına alınmıştır.



Şekil 10. Achladi limanı ile Aya Nikolas limanı arasında çeşitli birey sayısı ve iterasyon sayısı ile elde edilen zaman miktarları

Genetik algoritmanın hesaplamayı sonlandırması için “stagnation” yöntemi kullanıldığından, hesaplamalar için harcanan zamanın incelenmesinde iterasyon sayısının harcanan zaman üzerinde bir etkisi olmadığı lakin birey sayısının az veya çok olmasına bağlı olarak hesaplama zamanının azaldığı veya arttığı Şekil 10’daki grafiğe bakarak gözlemlenmiştir. Genetik algoritma ile Achladi limanından Kavala limanına rota belirleme işlemi yapılmıştır. Algoritma 500 iterasyon ve 100 birey ile çalıştırılmıştır. Şekil 11’de bu uygulamaya ilişkin rota görülmektedir. Kavala limanına 539,238,475,202,195,557 numaralı düğümler takip edilerek sonuca 247 km’lik yol ulaşılmıştır.

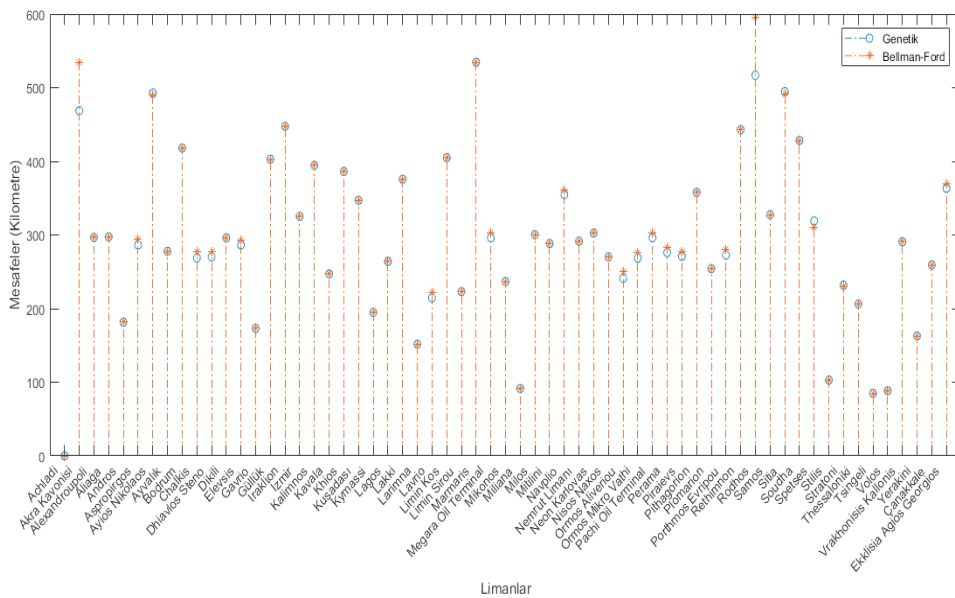


Şekil 11. Geliştirilen sistem ile yapılan bir hesaplama örneği

V. SONUÇ VE DEĞERLENDİRME

Bu çalışmada Ege denizi üzerinde bulunan Yunanistan ve Türkiye limanları temel alınmıştır. Ege denizi üzerinde bulunan 61 adet limanın arasında yapılabilecek olası seyir durumu için 604 adet düğüm belirlenmiştir. Rota belirlemede olası düğümlerin seçilerek en uygun rotanın bulunması genetik algoritma kullanılarak yapılmıştır.

Genetik algoritmanın değişkenleri olan birey sayısı ve iterasyon sayısının problemin çözümü üzerindeki etkisi incelenmiştir. Her bir liman için bu değişkenlerin en iyi değerleri bulunmuştur. Değişken birey sayısı ve iterasyon sayısı



Şekil 12. Genetik algoritma ile elde edilen en kısa mesafe sonuçları ile Bellman-Ford algoritması ile elde edilen en kısa mesafe sonuçlarının karşılaştırılması

miktarlarında yapılan tecrübelerde elde edilen çözümler sonuç bölümünde grafiksel olarak gösterilmiştir. Genetik algoritmanın problemin çözümündeki performansı değerlendirilmiş ve başarılı sonuçlar elde edildiği görülmüştür.

Yapılan literatür araştırmasında Ege denizi üzerinde genetik algoritmanın kullanıldığı bir örneğe rastlanmadığından çalışma bu yönüyle önceki yapılan çalışmalar ile benzerlik göstermemektedir.

En kısa yol sonuçlarının doğruluğunu ölçmek amacıyla düğüm haritası, yönlü grafik (directed graph) haline getirilerek Achladi limanı ile diğer limanlar arasındaki en kısa yollar Bellman-Ford algoritması [17], [18] kullanılarak MATLAB programı ile hesaplatılmış, elde edilen değerler ortaya konulan genetik algoritmanın elde ettiği değerler ile karşılaştırılmıştır. Sonuçlar Şekil 12'de görülmektedir. Ortaya konulan genetik algoritma Bellman-Ford algoritması ile aynı sonuçları bulmuştur.

Problemi çözümedeki hızlarına bakılınca ortaya konulan genetik algoritmanın Bellman-Ford algoritmasına göre daha yavaş olduğu gözlemlenmiştir. Ortaya konulmak istenen sistemin amacına bakıldığında algoritmanın çok hızlı sonuç vermesi zaten beklenmemektedir.

Çalışma, aslında seyir planlanması yapabilen zeki sistemin oluşturulması aşamasında kullanılması planlanan optimizasyon algoritmalarından biri olan genetik algoritmayı problemin çözümünde gösterdiği performans açısından değerlendiren bir çalışma olarak ortaya konulmuş, elde edilen sonuçlar ışığında ise genetik algoritmanın zeki sistemde kullanılabilirliğinin yüksek olduğu değerlendirilmiştir.

Kaynakça

- [1] K. S. T. a. S. K. K. F. Man, «Genetic Algorithms: Concepts and Applications,» *IEEE TRANSACTIONS ON INDUSTRIAL ELECTRONICS*, cilt 43, no. 5, pp. 519-534, 1996
- [2] H. A. Y., «A genetic algorithm for finding the k shortest paths,» *Egyptian Informatics Journal*, pp. 75-79, 2010.
- [3] K. M. Kumar R., «Exploring Genetic Algorithm for Shortest Path,» *Global Journal of Computer Science and Technology*, cilt 10, no. 11, pp. 8-12, 2010.
- [4] «The ant colony system: optimization for the logistics of marine cargo in the Aegean,» *Journal of Statistics and Management Systems*, cilt 8, no. 1, pp. 1-11, 2005
- [5] «Multi-criteria ACO-based Algorithm for Ship's Trajectory Planning,» *The International Journal on Marine Navigation and Safety of Sea Transportation*, cilt 11, no. 1, pp. 31-36, 2017.
- [6] «Autonomous Ship Collision Avoidance Navigation Concepts, Technologies and Techniques,» *THE JOURNAL OF NAVIGATION*, cilt 61, pp. 129-142, 2008.
- [7] «World Port Index,» Erişim Tarihi: 10 12 2016. [Çevrimiçi]. https://msi.nga.mil/NGAPortal/MSI.portal?_nfpb=true&_pageLabel=msi_portal_page_62&pubCode=0015.
- [8] «Ports.com,» Erişim Tarihi: 12 12 2016. [Çevrimiçi]. <http://ports.com/sea/aegean-sea/>.
- [9] «<http://www.worldportsource.com>,» 13 12 2016. [Çevrimiçi]. http://www.worldportsource.com/waterways/Aegean_Sea_8.php.
- [10] «Pireaus Port Authority S.A.,» Erişim Tarihi: 2 1 2017. [Çevrimiçi]. <http://www.olp.gr/en>. [Erişildi: 2017].
- [11] «PORT AUTHORITY S.A.,» Erişim Tarihi: 2 1 2017. [Çevrimiçi]. <http://www.ola-sa.gr/en-us/home.aspx>.
- [12] Matlab, *R 2017a, Mapping Toolbox*, Natick, Massachusetts: Mathworks Inc., 2017.
- [13] «GEBCO2014_22.2269_34.7694_27.9551_41.517_30Sec_ESRIASCII,» 2016.
- [14] «QGis,» QGis Project, [Çevrimiçi]. <http://www.qgis.org/tr/site/>. [Erişildi: 25 12 2016].
- [15] «British Ocenographic Data Centre,» Erişim Tarihi: 20 12 2016. [Çevrimiçi]. https://www.bodc.ac.uk/my_account/get_basket/E2DH5DEF85D870C4E008G86129F5G512/Skey-GEBCONETE/.
- [16] J. Holland, *Adaptation in Natural and Artificial Systems*, Massachusetts: MIT Press, 1992.
- [17] R. Bellman, «On a routing problem,» *Quarterly of Applied Mathematics*, pp. vol. 16, no. 1, pp. 87-90, 1958.
- [18] L. R. Ford, «Network flow theory,» *DEFENSE DOCUMENTATION CENTER FOR SCIENTIFIC AND TECHNICAL INFORMATION*, p. 923, 1956.

Türk Popülasyonunda Tümör Nekroz Faktör Alfa Gen Polimorfizmi (-376) ile Multipl Skleroz Arasındaki İlişki

Association Between Tumor Necrosis Factor Alpha Gene Polymorphism (-376) and Multiple Sclerosis in Turkish Population

Ahmet ARMAN¹ , Hasan ŞİMŞEK¹ , Merve SARIDAL² 

¹Marmara Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

²Marmara Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, İstanbul, Türkiye

Öz

Bu araştırmanın amacı Multipl Skleroz (MS) ile Tümör Nekroz Faktör-Alfa (TNF-A) geninin promotör bölgesindeki (-376) gen polimorfizmi arasındaki ilişkinin ortaya çıkarılmasıdır. Yapılan çalışmada 100 MS hastası ve 100 sağlıklı kontrol olmak üzere toplam 200 birey incelenmiştir. Bunun için ilk olarak kandan DNA izolasyonu yapılmış ve elde edilen DNA'lardan TNF-A geninin promotör – 376 bölgesi polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi ile çoğaltılmıştır. İkinci aşamada ise elde edilen PCR ürünleri Tsp50 enzimi ile kesilerek genotip dağılımları ve allel frekansları incelenmiştir. Türk popülasyonunda MS hastalığı ile TNF-A – 376 polimorfizminin genotip dağılımı arasında kuvvetli bir ilişki bulunmuştur (p=0,010). Aynı zamanda TNF-A – 376 polimorfizminin allel frekansı MS hastalığıyla bir ilişki göstermektedir (p=0,011). Bu ilişkide TNF-A – 376 polimorfizminin heterozigot genotip G/A olduğu ve A allelinin koruyucu etkisi olduğu görülmüştür. TNF-A – 376 polimorfizmi ile MS arasında hastalığın risk oluşturması açısından herhangi bir ilişki bulunmamıştır ancak G/A genotipi ve A allelinin sağlıklı kişilerde koruyucu etkisi olabileceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Promoter, Polymorphism, Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF-A), Multiple Sclerosis (MS)

Abstract

The purpose of this study is the detection of the association between MS and TNF-A gene promoter – 376 polymorphism. In this study, 100 MS patients and 100 healthy controls were examined. Firstly, genomic DNA was extracted from human leukocyte nuclei isolated from whole blood by standard methods and then the promoter region of TNF-A including – 376 polymorphism was amplified with PCR method. Secondly, the PCR products were digested with a digestion enzyme and genotype distributions and allele frequencies were determined. A strong association between MS and TNF-A – 376 genotype distribution was detected (p= 0,010). At the same time TNF-A – 376 allele frequency was showed an association with MS (p=0,011), but this association indicates that GA genotype and A allele have protective effects. There is not an association between TNF-A – 376 polymorphism and MS progression, but GA genotype and A allele may be the protective factors in the healthy people.

Keywords: Promoter, Polymorphism, Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF-A), Multiple Sclerosis (MS)

I. GİRİŞ

MS sık görülen inflamasyon, demiyelinizasyon ve aksonal hasarlı alanlar ile karakterize otoimmün bir hastalıktır [1]. MS etiyojisi gerçekte iyi bilinmemekle birlikte multifaktöriyel olup genetik, çevresel ve coğrafi faktörler önemli rol almaktadır [2]. Çalışmalar göstermektedir ki TNF-A geninin de lokalize olduğu [3] majör doku uygunluk

kompleksi (MHC) sınıf II ve sınıf III genlerinin polimorfizmleri MS duyarlılık, direnç ve klinik formları ile ilişkilidir [4-5]. MS hastaları hastalığın şiddetine göre dört gruba ayrılmıştır: Primer ilerleyen MS (PPMS), ikincil ilerleyen MS (SPMS), yineleyici-düzelen MS (RRMS) ve ilerleyen relap MS (PRMS) [6]. TNF-A geni ürünü olan TNF- α bir proinflamatuvar sitokin olup özellikle makrofajlardan sekrete

olmakta ve hücre proliferasyonu ve farklılaşması, apoptoz, lipid metabolizması ve koagülasyon gibi çok önemli fonksiyonlara sahiptir. Otoimmün hastalıklar, insülin rezistansı ve kanser gibi birçok hastalığın patogenezinde yer almaktadır [7]. Bu yüzden de TNF- α , otoimmün bir hastalık olan MS'in ilerlemesinde de önemli bir rol alabilmektedir. TNF- α 'nın MS hastalarında beyin omurilik sıvısı (BOS) ve periferik kan düzeylerinin arttığı rapor edilmiştir [8]. Bu yüzden de TNF-A gen yapısındaki değişikliklerin MS hastalığının ilerlemesinde önemli bir rol oynayacağı ileri sürülmektedir. Bugüne kadar TNF-A promotör bölgesinde tek nükleotid polimorfizmleri (SNP) üzerinde durulmuştur ve bu değişikliklerin TNF-A transkripsiyonunu artırarak hastalığın şiddetinin artmasında önemli rol alacağı düşünülmektedir. TNF-A promotör bölgesindeki SNP'ler 1031 T/C, - 863 C/A, - 857 C/T, - 376 G/A, - 308 G/A, ve - 238 G/A'dır [9-10]. TNF-A - 308 G/A polimorfizmi Asya nüfusunda risk oluşturmuş fakat Kafkas nüfusunda risk oluşturmamıştır [11]. TNF-A ve MS arasındaki ilişkinin temel sebebi, TNF- α molekülünün inflamasyonu indüklemeye özelliğinden kaynaklanmaktadır. Yapılan çalışmalar göstermiştir ki TNF-A geninin yapısında meydana gelen varyasyonlar TNF-A'nın çalışmasını etkilemektedir. Tek nükleotid polimorfizmi olarak adlandırılan varyasyonlar da bunlardan biridir. Molekülün özellikle promotör bölgesindeki polimorfizmlerin, molekülün çalışmasını ve çoğalmasını etkilediği bilinmektedir. Özellikle TNF-A - 376 polimorfizm bölgesinde gen ekspresyonunda rol alan Oct-1 transkripsiyon faktörü bağlanma yeri bulunması ve - 376 bölgesi ile ilgili yapılan çalışmaların oldukça az olması [12] bizi, Türk populasyonunda TNF-A geninin promotör bölgesi üzerindeki - 376 G/A polimorfizmi ile MS arasındaki ilişkiyi incelemeye yöneltmiştir.

II. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Klinik Testler

Hastalığın ön tanısı, nöroloji uzmanı tarafından muayene sonrası konmuş olup daha sonra hastanın beyin manyetik rezonans görüntülemesi (MR) yapılmış BOS ve kaydedilmiş potansiyelleri ile hastalığın tanısı kesinleştirilmiştir.

2.2. Moleküler Biyoloji ile İlgili Testler

Bu çalışmada, TNF-A promotör bölgesindeki - 376 G/A polimorfizmi bakılmıştır. TNF-A gen polimorfizmlerini belirlemede kullanılan moleküler biyoloji tekniklerden yararlanılmıştır.

2.2.1. DNA izolasyonu

100 normal, 100 MS hastalığı olan toplam 200 bireyden kan alınmış ve daha sonra kandan tuzda çöktürme yöntemi ile manuel olarak DNA'ları izole edilmiştir [13].

2.2.2. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)

TNF-A promotör bölgesindeki değişiklik gösterdiği bilinen bölge PCR yöntemiyle çoğaltılmıştır. PCR işlemi aşağıda anlatıldığı şekilde yapılmıştır.

PCR için gerekli malzemeler:

- ddH₂O
- 10X reaksiyon tamponu
- 10 pmol/ml primer çifti
- 200 M dNTP karışımı
- 1.5 mM MgCl₂
- 0.50 ünite Taq polimeraz enzimi

Yukardaki malzemelere 2 μ l'lik (50 ng/ μ l) template DNA eklenilmiş ve tüpler PCR cihazına (Techne, TC-312) yerleştirilmiştir. İlk olarak çift sarmal DNA, 94°C'de 3 dakika tutulmuştur. Bu işlem ile çift zincirli DNA tamamen tek zincir DNA'ya dönüşmesi sağlanmıştır. Sonrasında üç basamaktan oluşan döngü 30 kez tekrarlanmıştır.

PCR Döngüsü:

- Basamak 1 - 94°C'de 1 dakika
- Basamak 2 - 55°C'de 1 dakika
- Basamak 3 - 72°C'de 1 dakika

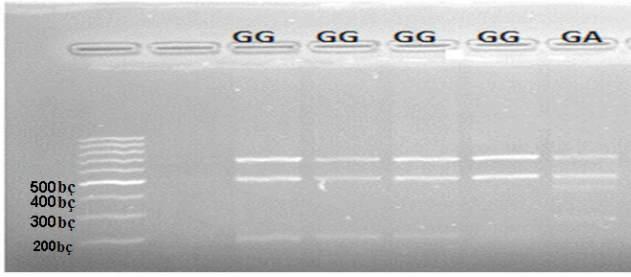
En son işlem olarak PCR ürünleri 72°C'de 7-10 dakika tutulmuştur.

2.2.3. Agaroz jel elektroforezi

PCR ürünlerinin ayrılması ve büyüklüğünün tespit edilmesi için bu teknik kullanılmıştır. PCR ürünleri ve pozitif kontrol (100 baz marker) etidyum bromür ile boyanan %1'lik agaroz jele yüklenmiştir. 1X Tris Asetat EDTA (TAE) tamponunda yürütülmüştür. 20 dakika sonra jel görüntüleme sisteminde PCR ürünlerine bakılmıştır.

2.2.4. Genotipleme

TNF-A gen promotör bölgesi üzerinde yer alan - 376 G/A polimorfizmi 5 ünite Tsp50 enzimi (Fermentas, USA) ile 65°C'de 2 saat inkübe edilerek kesilmiştir ve oluşan uzunluklara göre genotipleme yapılmıştır (Şekil 1).



Şekil 1: Türk popülasyonunda TNF A – 376 polimorfizimin MS ile ilişkisinin agaroz jeldeki genotipleme görüntüsü

2.3. İstatistik

Tüm bireylerin genotipleri belirlendikten sonra hasta grubunun allel frekansları ve genotip dağılımları kontrollerle karşılaştırılmış ve elde edilen veriler SPSS 17.0 programı yardımıyla Ki-Kare testi kullanılarak analiz edilmiştir. $p < 0.05$ (2-sided) değeri anlamlı olarak kabul edilmiştir. Hardy-Weinberg prensibine göre değerlendirme yapılmış, fark saptanmamıştır.

2.4. Etik Kurulu ve Hasta Onayı

Bu çalışma için tüm hastalardan yazılı onay alınmıştır. Etik kurul onayı Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından verilmiştir. Bu çalışmaya katılan tüm bireylerin hakları saklıdır ve her türlü bilginin gizliliği korunacaktır. Etik kurulu sayı numarası B.30.2MAR.0.70.00.03/120062485.

III. BULGULAR

Çalışmamızda toplam 100 sağlıklı kontrol ve 100 hasta olmak üzere 200 birey incelenmiştir. Hasta ve kontrollerin genotip dağılımları Tablo 1’de özetlenmiştir. 100 hasta bireyden 98’inin genotipi homozigot GG olarak bulunmuştur. Sadece 2 bireyde heterozigot GA görülmüştür. Ayrıca homozigot genotip AA tespit edilmemiştir. Sağlıklı 100 bireyden ise 89’unun genotipi GG ve 11’i heterozigot GA’dır. Aynı şekilde sağlıklı bireylerde de homozigot AA gözlenmemiştir. Bu sonuçlar değerlendirildiğinde MS hastalığı ile TNF-A – 376 genotip dağılımı arasında anlamlı bir ilişki bulunmuştur ($p = 0,010$). Hasta ve kontrollerin allel frekansları Tablo 2’de özetlenmiştir. Allel frekanslarına bakıldığında kontrol grubunda 189 G alleli ve 11 A alleli; hasta grubunda ise 198 G alleli ve 2 A alleli tespit edilmiştir. Sonuç olarak MS hastalığı ile TNF-A – 376 allel frekansı arasında da anlamlı bir ilişki saptanmıştır ($p = 0,011$). Bu anlamlı ilişki, heterozigot GA genotipi ve aynı zamanda A allelinin MS hastalığından koruyucu olduğu yönündedir.

Tablo 1: Türk popülasyonunda MS hastaları ve sağlıklı kontrollerde TNF-A – 376 polimorfizmi genotip dağılımları

TNF-A (-376)	Genotip		TOPLAM	MS vs. Kontrol
	G/G	G/A		
Kontrol	89 (%89)	11 (%11)	100 (%100)	p=0.010
MS	98 (%98)	2 (%2)	100 (%100)	
TOPLAM	187 (%93.5)	13 (%6.5)	200 (%100)	

Tablo 2: Türk popülasyonunda MS hastaları ve sağlıklı kontrollerde TNF-A – 376 polimorfizmi allel frekansları

TNF-A (-376)	Allel		TOPLAM	MS vs. Kontrol
	G	A		
Kontrol	189 (%94.5)	11 (%5.5)	200 (%100)	p=0.011
MS	198 (%99)	2 (%1)	200 (%100)	
TOPLAM	387 (%96.8)	13 (%3.3)	400 (%100)	

IV. TARTIŞMA

MS hastalığı aksonal hasarla seyreden otoimmün demyelinizan bir hastalıktır. MS hastalığına genetik yatkınlık ihtimali bilim insanları tarafından defalarca araştırılmış, bu genetik faktörlerden birisinin de TNF-A gen polimorfizmleri olabileceği üzerinde durulmuştur [14-16]. Bu amaçla daha önce – 376, – 308, – 238 ve – 244 polimorfizmleri en sık araştırılan polimorfizmler olmuştur. Bu polimorfizmler hakkında farklı etnik gruplarda yapılan çalışmalarda farklı sonuçlar elde edilmiştir [17]. Çalışmamızda da bulgularımız gösterdiği üzere TNF-A – 376 GG genotipi ve G allelinin MS hastalarında sıklığı artmış, ancak bunun hastalık açısından risk oluşturması yönünde herhangi bir ilişki bulunamamıştır. Daha önce yapılan birkaç çalışmada da bu sonucu destekleyen bulgular saptanmasına [18, 19] karşın hastalıkla ilişkisi olduğu yönünde bulgular olan çalışmalar da mevcuttur [20, 21]. MS hastalığı ile TNF-A gen polimorfizmleri arasındaki ilişkiyi inceleyen bir kısım araştırmalar – 376, – 308 ve – 238’inci pozisyonlarda düşük frekanslarda bulunan A allelinin koruyucu etkisi olabileceğini belirtmiştir [21-25] ve bizim çalışmamız da bu bulgu ile korelasyon göstermektedir ki hem – 376 GA genotipi dağılımı ($p = 0,010$) hem de A alleli frekansı ($p = 0,011$) arasındaki ilişkinin daha çok koruyucu etkisi olduğu yönündedir. Yukarıda bahsedilen çalışmalar ülkemize yakın ülkelerde yapılmış ve benzer bulgular elde edilmiştir. Farklı etnik gruplarda yapılan TNF-A promotör polimorfizmleri ile MS arasındaki ilişkiyi araştıran çalışmaların farklı sonuçlar vermesinin nedeni HLA bölgesindeki farklılıklardan kaynaklanabilmektedir[26].

Çalışmamızın zayıf noktası olarak, hasta sayımızın düşük olması ve çalışmaya katılan bireylerde kanda ve BOS’da TNF- α seviyesine bakarak polimorfizmlerin gerçek etkisinin ortaya koyulamaması söylenebilir. Çünkü daha önce

yapılan bazı çalışmalar göstermiştir ki – 376 GG genotipi taşıyan organ donörleri, GA genotipi taşıyanlara göre daha fazla TNF- α üretmektedir [24] ve progresif MS hastalarının BOS'unda TNF- α seviyesi daha yüksek bulunmaktadır [8]. Lassmann ve ark. tarafından yapılan çalışmanın sonuçları bizim çalışmamızın aksine, MS hastalarında G allelinin daha fazla saptanmasının daha fazla TNF- α üretimine ve böylece myelin kılıfı hasarını artırarak hastalığın progresyonuna neden olup, oligodendroglial hücre kaybı ve demyelinizasyona ilerlemesine neden olduğunu savunmaktadır [27]. Bizim çalışmamızda da MS hastalarında G alleli daha fazla saptanmış ancak istatistik olarak anlamlı bulunmamıştır. Literatürde bulgularımızı destekleyen çalışmalar da mevcuttur [17]. Bahsedilen çalışmada, MS ile ilişkili daha fazla SNP çalışılması ve mutlaka TNF- α seviyeleri ile korelasyonu yapılması önerilmektedir. Çalışmamızda A allel frekansı MS hastalarında %1 civarında saptanmıştır ve daha önce yapılan çalışmalara göre daha düşüktür [19-21, 12]. Çalışmamızdaki AA genotipi, önceki çalışmalarla uyumlu olarak, katılımcılarda saptanmamıştır [20, 21].

Sonuç olarak, Türk popülasyonunda G allelinin MS hastalığı ile ilişkili olmadığı ve A allelinin koruyucu bir etkisi olabileceği düşünülmektedir. Bulgularımızı doğrulamak ve istatistikî gücünü artırmak için çalışmanın daha da genişletilmesine ihtiyaç vardır.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma FEN-C-YLP-140312-0051 numaralı proje kapsamında Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

- [1] Noseworthy JH., Lucchinetti C. ve Rodriguez M., Weinshenker BG. (2000). Multiple sclerosis. *N Engl J Med.*, 343, 938-952.
- [2] Dymant DA., Sadovnick AD. ve Ebers GC. (1997). Genetics of multiple sclerosis. *Hum Mol Genet*, 6, 1693-1698.
- [3] Elahi MM., Asotra K., Matata BM. ve Mastana SS. (2009). Tumor necrosis factor alpha – 308 gene locus promoter polymorphism: an analysis of association with health and disease. *Biochim Biophys Acta*, 1792, 163-172.
- [4] Zipp, F., Weber, F., Huber, S., Sotgiu, S., Czlonkowska, A., Holler, E., Albert, E., Weiss, E. H., Wekerle, H., ve Hohlfeld, R. (1995). Genetic control of multiple sclerosis: increased production of lymphotoxin and tumor necrosis factor-alpha by HLA-DR2+ T cells. *Ann Neurol*, 38, 723-730.
- [5] Rahmanian M1, Kargar M2. Tumor necrosis factor-alpha polymorphism and susceptibility to multiple sclerosis in the Iranian population. *Iran Red Crescent Med J*. 2014 Dec 27;17
- [6] Hurwitz BJ. (2009). The diagnosis of multiple sclerosis and the clinical subtypes. *Ann Indian Acad Neurol*, 12, 226-230.
- [7] Kassiotis G. ve Kollias G. (2001). TNF and receptors in organ-specific autoimmune disease: multi-layered functioning mirrored in animal models. *J Clin Invest*, 107, 1507-1508.
- [8] Sharief MK. ve Hentges R. (1991). Association between tumor necrosis factor-alpha and disease progression in patients with multiple sclerosis. *N Engl J Med*, 325, 467-472.
- [9] Fargion S., Valenti L., Dongiovanni P. ve Fracanzani AL. (2004). TNFalpha promoter polymorphisms. *Methods Mol Med*, 98, 47-58.
- [10] Akcali A1, Pehlivan S, Pehlivan M, Sever T, Akgul P, Neyal M. TNF-alpha promoter polymorphisms in multiple sclerosis: no association with – 308 and – 238 alleles, but the – 857 allele is associated with the disease in Turkish patients. *Int J Immunogenet*. 2010 Apr;37(2):91-5
- [11] Braun, N., Michel, U., Ernst, B. P., Metzner, R., Bitsch, A., Weber, F., ve Rieckmann, P. (1996). Gene polymorphism at position – 308 of the tumor-necrosis-factor-alpha (TNF-alpha) in multiple sclerosis and its influence on the regulation of TNF-alpha production. *Neurosci Lett*, 215(2), 75-78.
- [12] Knight JC1, Udalova I, Hill AV, Greenwood BM, Peshu N, Marsh K, Kwiatkowski D. A polymorphism that affects OCT-1 binding to the TNF promoter region is associated with severe malaria. *Nat Genet*. 1999 Jun;22(2):145-50.
- [13] S.A. Miller, D.D. Dykes DD, H.F. Polesky, A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*. 16(3) (1988), pp:1215.
- [14] Hauser, S. L. (1995). Tumor necrosis factor: immunogenetics and disease. *Ann Neurol*, 38(5), 702-704.
- [15] Weinshenker, B. G., Wingerchuk, D. M., Liu, Q., Bissonet, A. S., Schaid, D. J., ve Sommer, S. S. (1997). Genetic variation in the tumor necrosis factor alpha gene and the outcome of multiple sclerosis. *Neurology*, 49(2), 378-385.
- [16] Wingerchuk, D., Liu, Q., Sobell, J., Sommer, S., ve Weinshenker, B. G. (1997). A population-based case-control study of the tumor necrosis factor alpha-308 polymorphism in multiple sclerosis. *Neurology*, 49(2), 626-628.
- [17] Bayley, J. P., de Rooij, H., van den Elsen, P. J., Huizinga, T. W., ve Verweij, C. L. (2001). Functional analysis of linker-scan mutants spanning the – 376, – 308, – 244, and – 238 polymorphic sites of the TNF-alpha promoter. *Cytokine*, 14(6), 316-323.
- [18] de Jong, B. A., Huizinga, T. W., Zanelli, E., Giphart, M. J., Bollen, E. L., Uitdehaag, B. M., Polman, C. H., ve Westendorp, R. G. (2002). Evidence for additional genetic risk indicators of relapse-onset MS within the HLA region. *Neurology*, 59(4), 549-555.
- [19] Wirz, S. A., Morale, M. C., Marchetti, B., Barr, A. M., Sotgiu, S., Rosati, G., Pugliatti, M., Sanna, M. V., Giliberto, O., Bartfai, T., ve Conti, B. (2004). High frequency of TNF alleles – 238A and – 376A in individuals from northern Sardinia. *Cytokine*, 26(4), 149-154.

- [20] Fernandez-Arquero, M., Arroyo, R., Rubio, A., Martin, C., Vigil, P., Conejero, L., Figueredo, M. A., ve de la Concha, E. G. (1999). Primary association of a TNF gene polymorphism with susceptibility to multiple sclerosis. *Neurology*, 53(6), 1361-1363.
- [21] Losonczi, E., Bencsik, K., Nagy, Z. F., Honti, V., Szalczer, E., Rajda, C., Illes, Z., Matyas, K., Rozsa, C., Csepany, T., Fuvési, J., ve Vecsei, L. (2009). Tumour necrosis factor alpha gene (TNF-alpha) – 376 polymorphism in Hungarian patients with primary progressive multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*, 208(1-2), 115-118.
- [22] Drulovic, J., Popadic, D., Mesáros, S., Dujmovic, I., Cvetkovic, I., Miljkovic, D., Stojsavljevic, N., Pravica, V., Pekmezovic, T., Bogdanovic, G., Jarebinski, M., ve Mostarica Stojkovic, M. (2003). Decreased frequency of the tumor necrosis factor alpha – 308 allele in Serbian patients with multiple sclerosis. *Eur Neurol*, 50(1), 25-29.
- [23] He, B., Navikas, V., Lundahl, J., Soderstrom, M., ve Hillert, J. (1995). Tumor necrosis factor alpha-308 alleles in multiple sclerosis and optic neuritis. *J Neuroimmunol*, 63(2), 143-147.
- [24] Huizinga, T. W., Westendorp, R. G., Bollen, E. L., Keijsers, V., Brinkman, B. M., Langermans, J. A., Breedveld, F. C., Verweij, C. L., van de Gaer, L., Dams, L., Crusius, J. B., Garcia-Gonzalez, A., van Oosten, B. W., Polman, C. H., ve Pena, A. S. (1997). TNF-alpha promoter polymorphisms, production and susceptibility to multiple sclerosis in different groups of patients. *J Neuroimmunol*, 72(2), 149-153.
- [25] Ristic, S., Lovrecic, L., Starcevic-Cizmarevic, N., Brajenovic-Milic, B., Segajazbec, S., Sepcic, J., Kapovic, M., ve Peterlin, B. (2007). Tumor necrosis factor-alpha-308 gene polymorphism in Croatian and Slovenian multiple sclerosis patients. *Eur Neurol*, 57(4), 203-207.
- [26] Maurer, M., Kruse, N., Giess, R., Kyriallis, K., Toyka, K. V., & Rieckmann, P. (1999). Gene polymorphism at position – 308 of the tumor necrosis factor alpha promoter is not associated with disease progression in multiple sclerosis patients. *J Neurol*, 246(10), 949-954.
- [27] Lassmann, H., Bruck, W., ve Lucchinetti, C. F. (2007). The immunopathology of multiple sclerosis: an overview. *Brain Pathol*, 17(2), 210-218.

18 Temmuz 2017 Tarihinde İstanbul'da Meydana Gelen Sel Olayının Meteorolojik Analizi

Meteorological Analysis of Flash Flood in Istanbul on 18 July 2017

Hakkı BALTACI¹ 

¹Meteoroloji 1. Bölge Müdürlüğü, Bölgesel Tahmin ve Erken Uyarı Merkezi, İstanbul, Türkiye

Öz

Sel hadisenin yer yüzünde meydana gelen önemli doğal afetlerden birisi olduğu bilinmektedir. Sel nedeniyle meydana gelmesi muhtemel zararları minimize etmek için sebeplerinden birisi olan kısa süreli orta ölçekli konvektif yağışların analizi ve tahmini oldukça önemlidir. Bu çalışmada, 18 Temmuz 2017 tarihinde İstanbul'da meydana gelen sel hadisesinin meteorolojik analizi yapılmıştır. Azor Yüksek Basınç Merkezi ile İzlanda Alçak Basınç Merkezi'nin etkileşimi arasında kalan İstanbul İline, yukarı seviye alçak merkezinin bölge üzerinde konumlanması neticesinde Ege ve Marmara Denizlerinden nem transfer edilmiştir. Nemin aşağı seviyelerden yukarı seviyelere kuvvetli rüzgarlar ile birlikte iletilmesi kararsızlık koşullarını artırmış (K index= 36.6), İstanbul İli üzerinde sabah saatlerinde kısa süreli kuvvetli yağışlara neden olmuş (Beykoz'da 1 saatte 44.0 mm yağış meydana gelmiştir) ve ekonomik ve sosyal hayatı olumsuz yönde etkilemiştir.

Anahtar Kelimeler: İstanbul, Sel, Radar, Yağış

Abstract

It is known that flash floods are one of the main natural hazards that occur on the earth. To minimize the probable risks occurring by the flash floods, analyzing and predicting of mesoscale convective systems are quite important. In this study, meteorological analysis was investigated for the Istanbul flash flood on 18 July 2017. In addition to the interaction between Azor High-Pressure Center and Island Low-Pressure Center, the position of high low center over Istanbul transferred high amount of moisture to the region by Aegean and Marmara Seas. Transferring of moisture from low to high levels by strong vertical winds increased the instability conditions (K index=36.6) caused severe precipitation events in the morning times of the day (44.0 mm in one hour in Beykoz) and negatively influenced the economic and social life of the city.

Keywords: Istanbul, Flash Flood, Radar, Precipitation

I. GİRİŞ

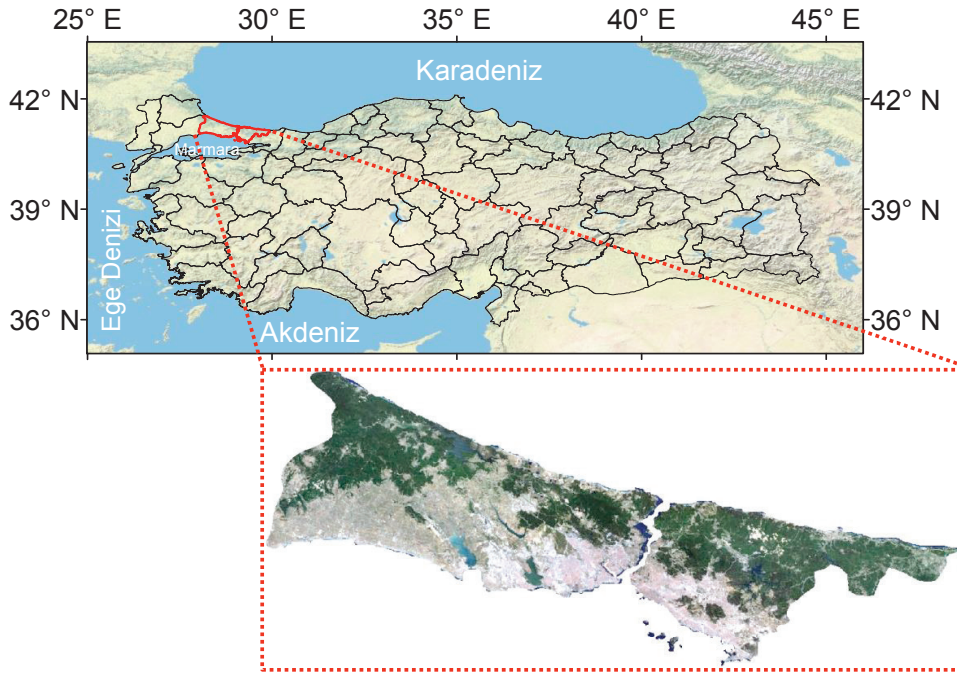
En çok bilinen doğal afetlerden birisi olan seller, özellikle son yıllarda Akdeniz havzasında artan sıklıkta şiddetli taşkınlara sebep olmakta ve bir çok ülke sonuçlarıyla yüzleşmektedir [1]. Genellikle yaz ve sonbahar mevsimlerinde Akdeniz'de şiddetli yağış neticesinde görülen taşkınların başlıca sebeplerinin orta ölçekteki konvektif sistemler ile karmaşık topografya olduğu bilinmektedir. Ülkemizde de artan sıklıkta görülmeye başlayan sel ve su baskınlarının tahmininin de kolayca yapılamayışı sosyal ve ekonomik hayatı olumsuz yönde etkilemektedir. Bu

nedenle, şiddetli yağışlara sebep olan atmosferik mekanizmaların arkasındaki dinamik etkenlerin araştırılması gerek tahmin ve gerekse de erken uyarı açısından oldukça önemlidir. Bu amaçla, ülkemizde meydana gelen belli başlı sel hadiselerinin meteorolojik ve hidrometeorolojik incelemeleri yapılmıştır. 3-4 Kasım 1995 tarihleri arasında İzmir'de meydana gelen sel olayı sonucunda 61 vatandaşımız hayatını kaybetmiş ve 50 milyon dolar zarar meydana gelmiştir. Sele sebebiyet veren atmosferik koşullar incelendiğinde, aşağı seviye adveksiyonu, pozitif vortisiti alanı ve güçlü yukarı seviye diverjansı başlıca nedenler olarak

görülmektedir. Ayrıca, Ege Denizi üzerindeki alçak basınç merkeziyle beraber ılık ve nemli kararsız havanın aşağı seviye jetleri ile Akdeniz üzerinden taşınması ve orografinin de etkili olması bölgenin az zamanda çok miktarda yağış almasında neden olmuş, Ilıca ve Dallık Derelerinin taşmasına sebebiyet vermiştir [2]. 5 Aralık 2002 tarihinde Antalya'da gün içerisindeki toplam yağışın 230 mm'lere kadar ulaşması neticesinde bölgede seller meydana gelmiş, atmosferik nedeni olarak ılık ve nemli havanın aşağı seviye jetleri ile taşınması sonucu orografik bariyerle karşılaşması bölgenin az zamanda çok şiddetli yağışlarla karşılaşmasına neden olmuştur [3]. Daha sonraları, 32 kişinin ölümü ile milyonlarca dolar hasar ile sonuçlanan 7-10 Eylül 2009 tarihleri arasında İstanbul'da gerçekleşen sel hadisesi meydana gelmiştir. Şehirleşmenin, yoğun nüfusun, yanlış ve kontrolsüz yapılaşmanın sonuçları şiddetli yağışlarla birleşince, sosyoekonomik hayatı felç etmiştir. Atmosferik koşullar olarak, yukarı seviyedeki soğuk hava ile birlikte yavaş hareket eden trof ve ılık Ege Denizi üzerinden sürekli nem takviyesi konvektif hücre kümelerinin oluşmasına neden olmuştur [4]. Daha sonraları, şiddetli yağışlara sebebiyet veren gök gürültülü fırtınaların meteorolojik olarak incelemesi Esenboğa havaalanı için yapılmıştır [5]. Türkiye'de en fazla sel olayının meydana

geldiği bölge olarak Doğu Karadeniz bölgesi görülmektedir. Özellikle yaz ve sonbahar mevsimlerinde kısa zamanda çok miktarda yağışların gerçekleşmesi pürüzlü topografyanın da etkisiyle selin olumsuz etkilerini artırmaktadır. En son olarak 24 ağustos 2015 tarihinde Artvin ve çevrelerinde meydana gelen sel sonucunda 11 insan hayatını kaybetmiş ve milyon dolarlık ekonomik kayıplar gerçekleşmiştir. Asya kaynaklı kopan alçak basınç merkezinin Doğu Karadeniz üzerine yerleşmesi ve bu siklonun durağan hareketi, deniz suyu sıcaklıklarının normallerinin üzerinde seyretmesi, aşağı seviye nem konverjans alanlarının gelişmesine neden olmuştur. Ayrıca, nemin Karadeniz üzerinden sıcak kuzeyli akışlarla transferi ile Artvin'in karasal alanlarından nispeten soğuk güneyli akışlar kararsızlık durumlarını artırmış ve derin konvektif hücrelerinin oluşmasına neden olmuştur [6].

En son olarak, 18 Temmuz 2017 tarihinde İstanbul'da sel hadisesi meydana gelmiştir (Şekil 1). Sel özellikle Gümüşyaka, Silivri ve Kınalı arasında etkili olmuş olup, ulaşımında aksamalara, ev, iş yeri ve metro hatlarına su basmaları (Şekil 2) ile sonuçlanmıştır. AKOM verilerine göre aşırı yağışla ilgili toplamda 8866 ihbar kaydı yapılmıştır. Bu çalışmada İstanbul'da en son meydana gelen sel hadisesinin meteorolojik incelemesi yapılmıştır.



Şekil 1. Türkiye Haritası ve İstanbul İli'nin coğrafi konumu

II. MATERYAL VE YÖNTEM

Bu çalışmada, ilk aşamada sinoptik ölçekli sirkülasyonların hareketini incelemek amacıyla yer ve yukarı seviyelerinin (500 hPa) 17 Temmuz 2017 tarihi 06:00 UTC ile 18 Temmuz 2017 06:00 UTC zamanki atmosferik haritaları incelenmiştir. Atmosferin yukarı seviyelerindeki dikine hareketi inceleyebilmek amacıyla da İstanbul Radiosonde verilerinin sel hadisesinin olduğu gündeki 00:00 UTC SkewT-logP diyagramından yararlanılmıştır. Gerçekleşen yağış miktarı ve rüzgar değerleri Meteoroloji Genel Müdürlüğünden alınan 15 istasyonun saatlik yağış ile rüzgar hız değerleri kullanılarak değerlendirilmiştir. Yağış bantlarının hareketi ve kuvvetli olduğu alanlar ise İstanbul Çatalca Radarından alınan MAX görüntüleri kullanılarak irdelenmiştir.

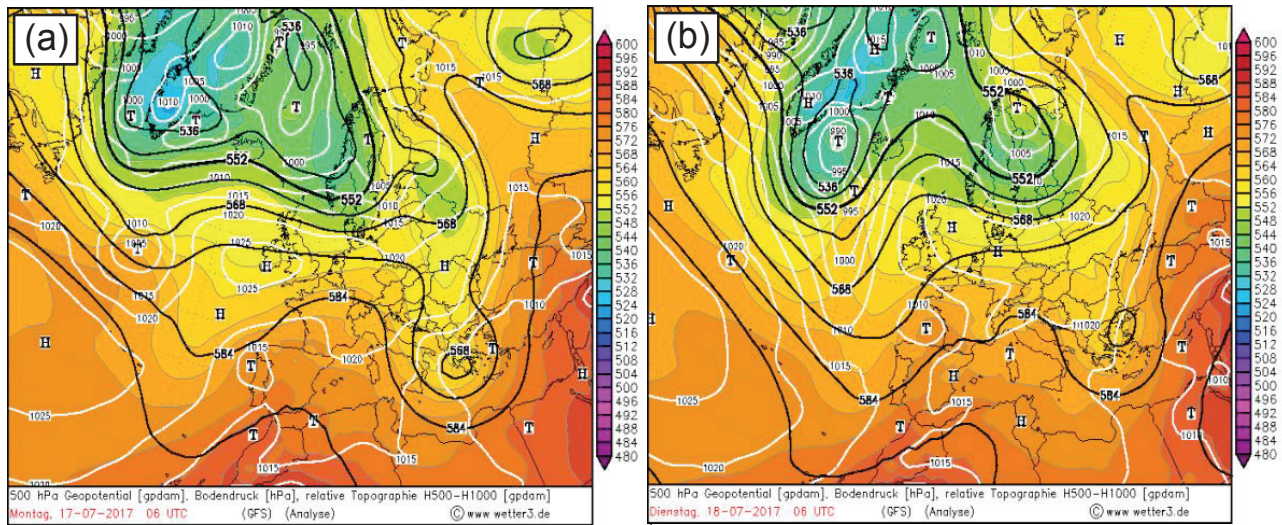


Şekil 2. 18 Temmuz 2017 tarihinde meydana gelen şiddetli yağış sonucu Bayrampaşa Metro İstasyonu'nun sular altında kalması

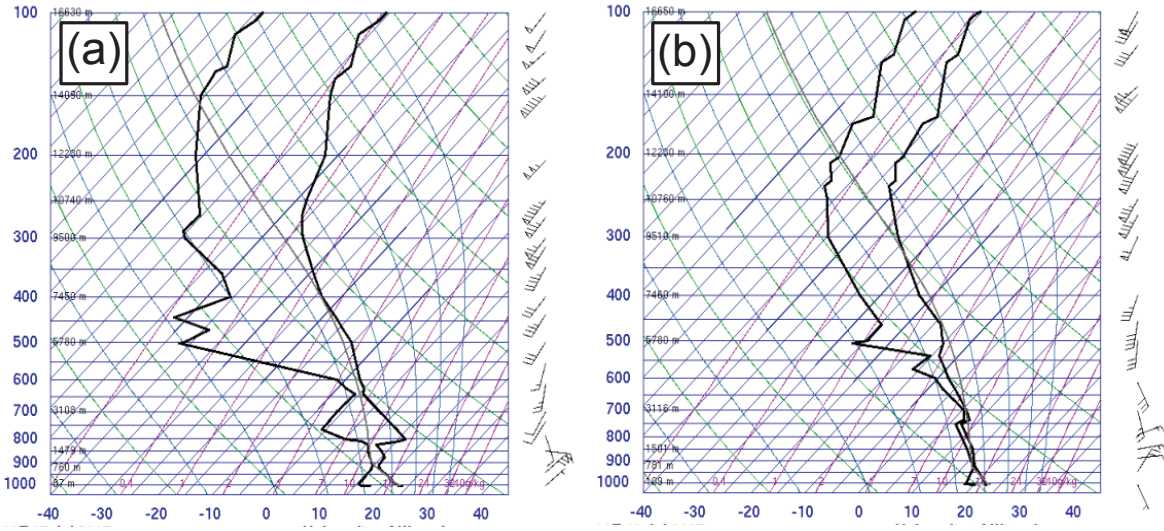
III. BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1. Sinoptik Analiz

Sel hadisesi meydana gelmeden 1 gün önceki sinoptik koşullar incelendiğinde, Azor Yüksek Basınç Merkezi etki alanını genişletmiş ve 1020 hPa'lık değeri ile Balkanlara kadar genişlemiştir (Şekil 3a). Buna ek olarak ise Türkiye'nin güney kesimlerinde etkili olan sıcak karakterli Basra alçak merkezi ise Türkiye'nin iç kesimlerine kadar uzanmıştır. İstanbul ise Azor Yüksek Basınç Merkezi ile Asya Alçak Basınç Merkezine bağlı oluşun etkisi altında olup basınç gradyanı sıkışmasından dolayı kuvvetli kuzeyli rüzgarlar Karadeniz üzerinden İstanbul'a nem taşımamını sağlamaktadır. Yukarı seviyelerde ise 568 hPa'lık alçak merkez Yunanistan üzerinde konumlanmış olup, Bölge üzerine güneyli rüzgarlar ile Akdeniz üzerinden nem transferini sağlamaktadır (Şekil 3a). Yer ve yukarı seviyeler arasındaki akışların farklılığından dolayı belirgin sıcaklık farklılıkları meydana gelmiş ancak 500-hPa alçak merkezin İstanbul'a uzaklığından dolayı kuvvetli kararsızlık koşulları tam anlamıyla oluşmamıştır. 18 Temmuz 2017 sabah saatlerinde ise yer seviyesindeki basınç merkezlerinin konumunun değişmemesine ek olarak yukarı seviyede bulunmakta olan alçak merkez batılı hareketi neticesinde Marmara Bölgesi üzerine yerleşerek Ege ve Marmara Denizleri'nden kuvvetli nem transferi gerçekleşmiştir (Şekil 3b).



Şekil 3. Yer ve yukarı seviye haritalarının (a) 17 Temmuz 2017 06:00 UTC ve (b) 18 Temmuz 2017 06:00 UTC harita analizleri



Şekil 4. SkewT-logP diyagramının (a) 17 Temmuz 2017 00:00 UTC ve (b) 18 Temmuz 2017 00:00 UTC analiz ürünleri

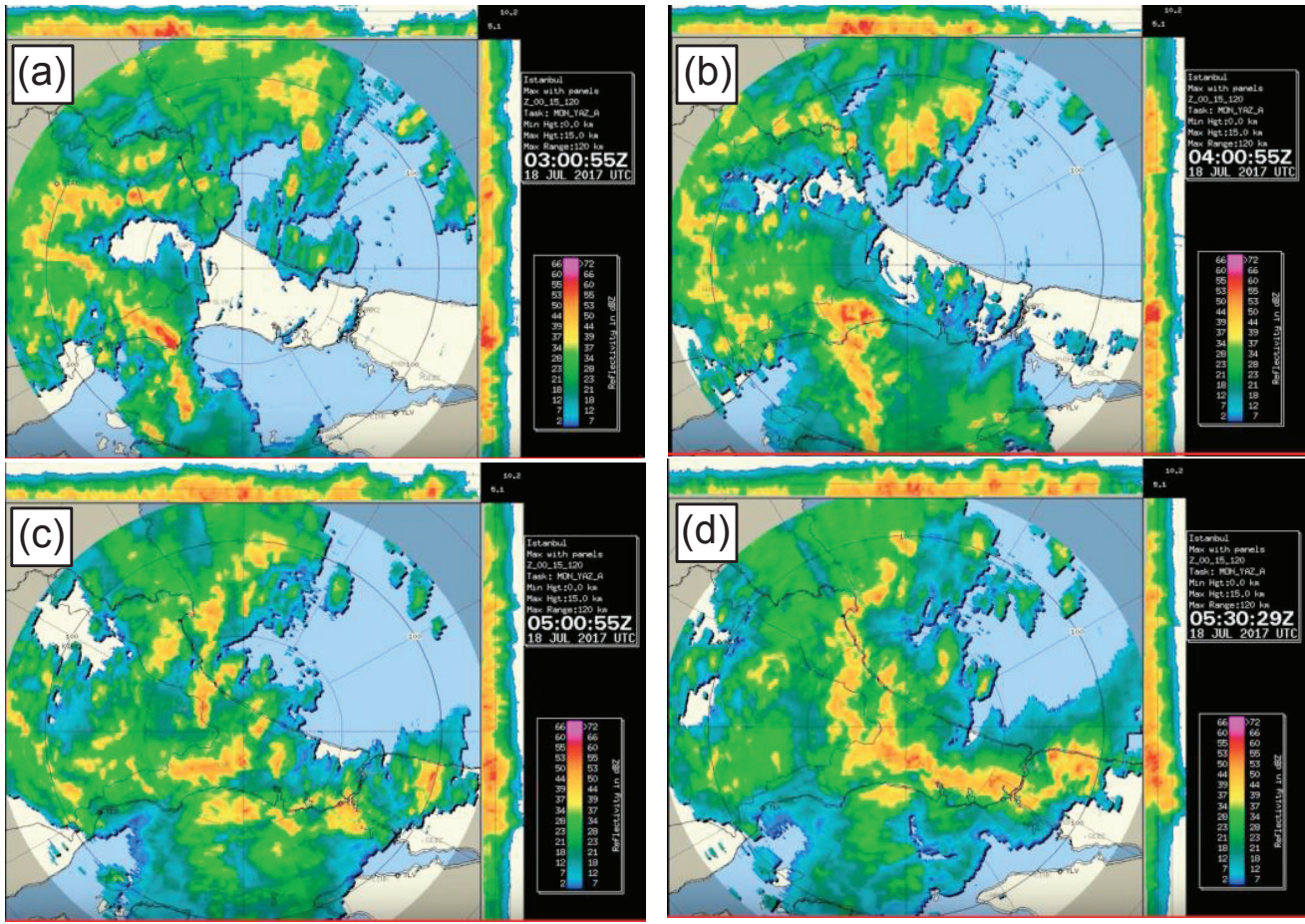
3.2. SkewT-logP Diyagramı

Konvektif oluşumların meydana gelmesinde yatay hareketin yanında dikine gelişen hareketler de oldukça önemlidir. Yukarı ve aşağı yönlü bu hareketleri inceleyebilmek amacıyla günde 2 defa 00:00 UTC’de gözlemler yapılmaktadır. Türkiye’nin 11 merkezinde yapılmakta olan bu gözlemler tahmin ve uçuculuk açısından önemli bir yer teşkil etmektedir. İstanbul’un Kartal İlçesinde yapılmakta olan radiosonde gözlemlerini sel hadisesini inceleyebilmek açısından, 17 Temmuz 00:00 UTC ve 18 Temmuz 00:00 UTC’deki atmosferik koşullar SkewT-logP diyagramlarından yararlanılarak ortaya konulmuştur. 17 Temmuz tarihinde yer seviyesinde 23.8 °C sıcaklık değeri ile aşağı seviyelerdeki enverziyon ve kuzeyli akışlar, Karadeniz üzerinden transfer edilen nemin yukarı seviyelere transfer edilerek soğumasını engellemiş, yaklaşık 800 hPa seviyelerinde rüzgarın güneye dönmesi sistemin yeteri kadar doygun hale gelmesini engellemiştir (Şekil 4a). Önemli kararsızlık indekslerinden TOTL indeks değeri 46 görülmekte ve kararsızlık oluşumu için 50 eşik değerinin hemen altında gerçekleşmektedir. Kararsızlık için kullanılan bir diğer indeks olan K indeks değeri 27.8 olup gökgürültülü sağanak yağışların belirlenmesi amacıyla kullanılan 30 eşik değerinin hemen altındadır. Aşağı seviyelerdeki nemi, yer ile yukarı seviye sıcaklık farklılıklarını ve yukarı yönlü hareketi temsil etmesi açısından kullanılan SWEAT indeks değeri ise oraj oluşumu için kullanılan 250 değerinin altında gözükmemektedir (209). Bir gün sonraki Temp diyagramını incelediğimizde yer sıcaklığının 22.4 C olduğu görülmektedir. Yer ve aşağı seviyelerde bulunan alçak ve yüksek (basınç) merkezlerinin durağan olarak konumlarını korumalarından dolayı kuzeyli

rüzgarlar Karadeniz üzerinden İstanbul iline nem transferini sağlamaktadır (Şekil 4b). Sinoptik haritalardan da görüldüğü gibi Yunanistan üzerinde bulunan yukarı seviye alçak merkezin Marmara Bölgesi üzerine hareketi neticesinde, 800 hPa seviyesinden itibaren atmosfer nem açısından doygun durumda bulunmakta ve kuvvetli güneyli dikine hareketler ile su damlacıkları buz partiküllerine doğru evrilmiştir. Kararsızlık indekslerinden TOTL, K ve SWEAT değerleri 48, 36.6 ve 212 olarak kaydedilmiştir. Özellikle K indeks değeri bize kuvvetli gök gürültülü yağış oluşumu için elverişli koşulların bulunduğunu göstermektedir.

3.3. Radar Verisi Analizi

İstanbul üzerine yerleşmekte olan yağış banlarının dağılımı ve evrimini incelemek amacıyla İstanbul’un Çatalca İlçesi’nde bulunan C band radarının MAX ürünleri 03:00, 04:00, 05:00 ve 05:30 UTC zamanları için Meteoroloji Genel Müdürlüğünden temin edilmiştir. 03:00 UTC’de Marmara Denizi üzerinde aniden gelişen konvektif hücreler 55 dBZ den daha büyük değerlere ulaşarak Tekirdağ’ın güney kesimlerinde şiddetli dolu hadiselerine neden olmuştur (Şekil 5a). Bir saat sonra konvektif hücreler alanını genişleterek Tekirdağ üzerinde etkili olmaya devam etmiş ve deniz üzerinden kuvvetli nem takviyesi ile beraber yağış bantlarının güneyli akışlarla birlikte Tekirdağ İli üzerine şiddetli yağışlar bıraktığı görülmektedir (Şekil 5b). Saat 05:00 UTC’de Marmara Denizi üzerindeki konvektif hücre oluşum merkezlerinin doğu-batı ekseninde geniş bir alana yayılmış olduğu görülmektedir (Şekil 5c). Bu yağış bantlarının bir kısmının İstanbul’un Avrupa



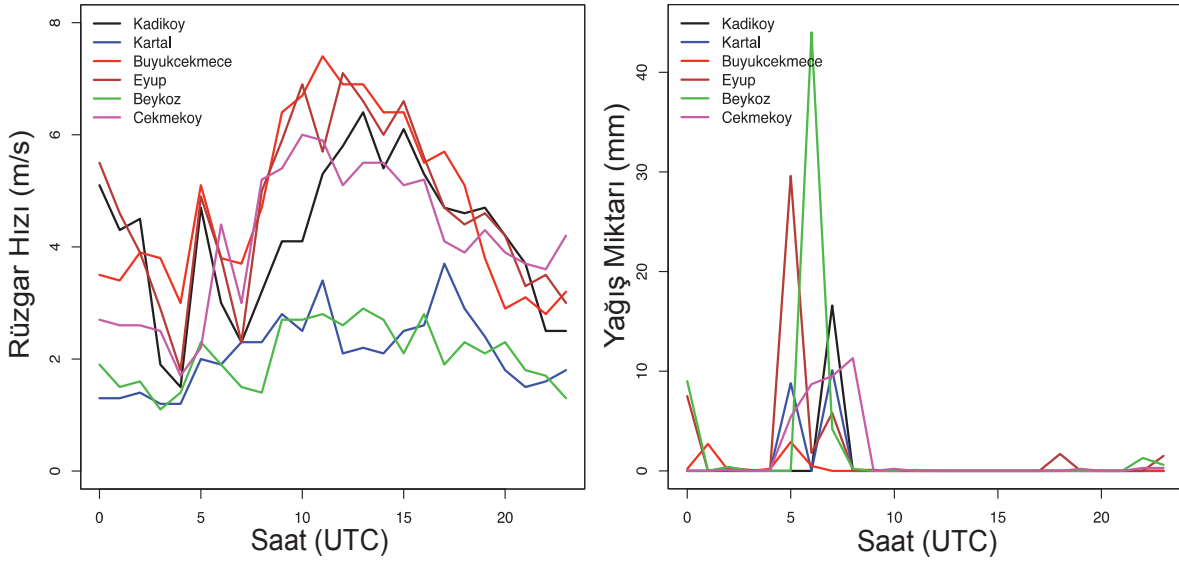
Şekil 5. İstanbul radarı MAX ürünlerinin (a) 17 Temmuz 2017 03:00 UTC, (b) 04:00 UTC, (c) 05:00 UTC ve (d) 05:30 UTC görüntüleri

Yakasında ve boğaz çevrelerinde etkin olduğu görülmektedir. Kuvvetli güneyli rüzgarlar ile beraber yarım saat içerisinde mezo ölçekli konvektif hücrelerin İstanbul İli genelinde etkin olduğu ve yoğun yağışlara neden olduğu görülmektedir. Yağışın en yoğun olduğu günün bu ilk saatlerinde (Şekil 5d), şehirleşmenin ve altyapı sorunlarının da meydana gelmesiyle ulaşımda ve sosyal yaşamda aksamalar ve ciddi ekonomik kayıplar meydana gelmiştir.

3.4. Rüzgar Hızı ve Yağış Miktarı Değişimleri

Orta ölçekteki konvektif sistemin geçişi esnasında rüzgar hızı ve yağış miktarındaki değişimleri incelemek amacıyla İstanbul İli üzerindeki 6 adet otomatik gözlem istasyonu verilerinden yararlanılmıştır. Bu istasyonlardan 2 si Avrupa Yakasında (Eyüp ve Büyükçekmece) ve 4'ü de Anadolu Yakasında bulunmaktadır. Genellikle kuzeyli yönlerden esmekte olan rüzgarın gece saatlerindeki şiddeti hızı 2 ila 5 m/sn arasında değişmekte iken hücrelerin bölge üzerinde en yoğun olduğu zamanlarda

şiddetinde önemli bir değişim gözükmemektedir (Şekil 6a). Öğle saatlerinden sonra bütün istasyonlarda rüzgar şiddetinin maksimum değere ulaştığı gözlenmiştir. Bu istasyonlardan Anadolu Yakasında bulunan Beykoz ve Kartal İstasyonları'nda en düşük değerlerde rüzgar hızı kayıtları mevcuttur. En kuvvetli rüzgar Büyükçekmece ve Eyüp Bölgeleri'nde 8 m/sn değerlerine ulaşacak şekilde gözlenmiştir. Gözlenmiş olan bu değerler de göstermektedir ki, fırtına oluşturacak ve sosyal yaşamı etkileyecek ölçüde kuvvetli rüzgarlar meydana gelmemiştir. Yağış açısından incelendiğinde, radar ürünleriyle de paralel olacak şekilde 05:00-06:00 UTC saatleri arasında istasyonlarda kuvvetli yağış değerleri ölçülmüştür. Bu istasyonlardan, Beykoz'da 1 saatte 44.0 mm yağış kaydedilmiş ve bunu 29.6 mm ile Eyüp İlçesi takip etmektedir. Şekil 6b' den de görüleceği üzere konvektif hücreler 1 saatlik periyotta kuvvetli yağışlar meydana getirmiştir. Bunun sonucu şehirleşmenin de etkisiyle altyapı sorunları meydana gelmiştir.



Şekil 6. İstanbul İli üzerindeki 6 adet otomatik meteoroloji istasyonunun 18 Temmuz 2017 tarihine ait saatlik (a) rüzgar şiddeti ve (b) yağış miktarı değişimleri

IV. DEĞERLENDİRME

18 Temmuz 2017 tarihinde sabah saatlerinde İstanbul'da meydana gelen sel hadisesi ekonomik ve sosyal hayatı olumsuz yönde etkilemiştir. İstanbul Meteoroloji Bölge Müdürlüğünden elde edilen FEVK kayıtlarına göre il genelinde şiddetli yağış ile beraber yıldırım ve şimşek hadiseleri gözlenmiş, yıldırım düşmesi sonucunda 15 yangın olayına büyümeden müdahale edilmiştir. Sağanak yağmurlar neticesinde meydanlar, yollar, sokaklar, metro hatları sular altında kalmış ve ulaşımda aksamalar meydana gelmiştir. Şiddetli ve ani gelişen yağışın neticesinde meydana gelen sel hadisesinin meteorolojik değerlendirmesi yapıldığında, Azor Yüksek Basınç merkezi ile İzlanda Alçak Basınç Merkezi arasında kalan bölge üzerine kuvvetli kuzeyli rüzgarlar ile birlikte Karadeniz üzerinden nem transfer edilmiştir. Bunun yanında yukarı seviye alçak merkezinin Marmara Bölgesi üzerinde konumlanması güneyli rüzgarlar ile Ege ve Marmara Denizleri'nden nem taşınmasına imkan sağlamış, İstanbul İli'nde atmosferin aşağı ve yukarı seviyelerinde doymuş atmosferik koşullar meydana getirmiştir. Bununla beraber, yer ve yukarı seviyeler arasındaki sıcaklık farkı kararsızlık koşullarını artırmış ve özellikle sabah saatlerinde orta ölçekli konvektif sistemlerin meydana gelmesine neden olmuştur. Konvektif sistemler sonucunda kısa süreli ve şiddetli yağışlar İstanbul İli'nin çeşitli ilçelerinde daha etkili olmuş ekonomik ve sosyal hayatı olumsuz yönde etkilemiştir.

KAYNAKLAR

- [1] Milelli, M., Llasat, M. C., & Ducrocq, V. (2000). The cases of June 2000, November 2002 and September 2002 as examples of Mediterranean floods. *Nat. Hazards Earth Syst. Sci.*, 6, 271–284.
- [2] Kömüscü, A. Ü., Erkan, A., & Çelik, S. (1998). Analysis of meteorological and terrain features leading to the İzmir Flash Flood, 3–4 November 1995. *Nat. Hazards*, 18, 1–25.
- [3] Kotroni, V., Lagouvardos, E., Defer, S., Dietrich, F., Porcu, C., Medaglia, C. M., & Demirtas, M. (2006). The Antalya 5 December 2002 storm: observations and model analysis. *J. Appl. Meteorol. Clim.*, 45, 576–590.
- [4] Kömüscü, A. Ü. & Çelik, S. (2013). Analysis of the Marmara flood in Turkey, 7–10 September 2009: an assessment from hydrometeorological perspective. *Nat. Hazards*, 66, 781–808.
- [5] Özdemir, E. T. & Deniz, A. (2016). Severe thunderstorm over Esenboğa International Airport in Turkey on 15 July 2013. *Weather*, 71(7), 157–161.
- [6] Baltacı, H. (2017). Meteorological analysis of flash floods in Artvin (NE Turkey) on 24 August 2015. *Nat. Hazards Earth System Sciences*, 17, 1221–123

Bitkilerde Programlı Hücre Ölümü

Programmed Cell Death in Plants

Fatma YANIK¹ , Aslıhan ÇETİNBAŞ¹ , Filiz VARDAR¹ 

Marmara Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 34722, Göztepe Kampüsü, Kadıköy, İstanbul

Öz

Programlı hücre ölümü (PHÖ) yaşlanmış, görevini yitirmiş, fazla üretilmiş, düzensiz gelişmiş veya genetik olarak hasarlı hücrelerin, organizma için güvenli bir şekilde yok edilmesini sağlayan, genetik olarak kontrol altında olan bir ölüm mekanizmasıdır. PHÖ vejetatif-geratif organ gelişimi sırasında ve biyotik-abiyotik stres şartları altında bitkilerin farklı organ ve dokularında görülür. Bitkilerde gelişim sırasında hücre ölümü; kök şapkası hücrelerinin değişimi, trakeal elementlerin oluşumu, su bitkilerinde havalandırma parankimasının oluşumu, trikom gelişimi, yaprak senesensi, eşey belirlenmesi ve üreme organlarının gelişimi sırasında ortaya çıkar. Bunun yanında virüs, bakteri, mantar gibi biyotik ve UV ışık, kuraklık, tuzluluk, sıcaklık, donma, sel, ağır metaller, pestisitler gibi birçok abiyotik stres faktörü bitkilerde PHÖ'ye yol açar. Bitkilerdeki PHÖ mekanizması hayvan hücrelerindeki benzer şekilde nükleus morfolojisindeki değişiklikler, kromatin yoğunlaşması, DNA fragmentasyonu, protoplastta büzülme, hücre iskeletinde değişiklikler ve kaspaz benzeri enzimatik aktiviteler ile gelişir. Apoptotik hücre ölümü görülmeyen bitkilerde, vakuoler ve nekrotik hücre ölümü olmak üzere iki tip ölüm vardır.

Anahtar Kelimeler: Nekrotik hücre ölümü, programlı hücre ölümü, reaktif oksijen türleri, vakuoler hücre ölümü

Abstract

Cell death which is one of the basic characteristics of both prokaryotic and eukaryotic cells is encountered within the whole organism. Programmed cell death (PCD) is a genetically controlled mechanism, allows retired, dysfunctional, overproduced, irregularly developed or genetically damaged cells to be destroyed safely for organism. It has been first used in 1964 by Lockshin and Williams. Animal apoptosis which is best characterized form of PCD is used first in 1972 by Kerr et al. According to the recent biochemical and molecular studies PCD is categorized in three basic groups: apoptosis, autophagy and necrosis. Plants do not undergo apoptotic cell death, and cell death is classified into two groups as vacuolar and necrotic cell death. In vacuolar cell death, alterations in nucleus morphology, chromatin condensation, DNA fragmentation, protoplast condensation, vacuolization, generation of reactive oxygen species, alterations in the cytoskeleton and caspase like enzymatic activities are observed, as in animal cells. Necrotic cell death has different features from vacuolar cell death such as ATP depletion, cell and mitochondria swelling. PCD appears in different organs and tissues of plants during vegetative-generative organ development and under biotic-abiotic stress conditions. It occurs during the development of plants such as regeneration of root cap cells, formation of tracheal elements, formation of aerenchyma in hydrophytes, trichome development, leaf senescence, sex determination and male-female organ development. Biotic stress factors such as virus, bacteria, fungus and abiotic stress factors such as UV light, drought, salinity, temperature, freezing, flood, heavy metals, pesticides lead to PCD. Under biotic and abiotic stress factors, the balance between antioxidant enzymes and generation of reactive oxygen species (ROS) changes. ROS are free radicals and cause lipid peroxidation, protein oxidation, nucleic acid damage and enzyme inhibition. These alterations in the cellular structures lead to oxidative stress. ROS accumulation also causes caspase-like activities by activating vacuolar processing enzymes, metacaspases, saspases and phytaspases. These proteolytic enzymes execute cell death and cut their substrates from specific amino acid residues such as aspartic acid. PCD can be visualized by light, fluorescence and electron microscopy. Besides DNA fragmentation during cell death is determined by TUNEL, comet assay and gel electrophoresis. Moreover, cytoplasmic cytochrome c identification, caspase like activities and alterations of mitochondrial membrane potential can be identified by biochemical analyses. Although a lot of morphological characteristic features are identified, plant cell death is still not clear with regard to molecular aspects. Molecular characterization of PCD will lead in the future to a better understanding of the mechanisms of plant development and stress tolerance for developing high quality plants.

Keywords: Necrotic cell death, programmed cell death, reactive oxygen species, vacuolar cell death

I. GİRİŞ

Prokaryotik ve ökaryotik canlıların temel karakterlerinden birisi olan ölüm, gerek hücre gerekse organizma düzeyinde sıklıkla karşılaşılan bir olaydır. Hücre ölümü ve hücre bölünmesi çok hücreli canlıların dokularında bir denge halindedir. İnsanlarda hücre bölünmesi ve ölümü arasındaki dengenin bozulmasıyla ortaya kanser, tip II diyabet gibi birçok sistemik hastalık çıkar. Çok hücreli ökaryotlarda, genetik bakımdan düzenlenmiş olan hücre ölümü normal gelişim ve büyüme için gereklidir. İlk kez 1964 yılında Lockshin ve Williams tarafından kullanılan programlı hücre ölümü (PHÖ) terimi, klonal bakteriler ve ökaryotik canlıların normal gelişim sürecinde veya biyotik-abiyotik strese karşı hücrel bir cevabın oluşturulması sırasında ortaya çıkan genetik olarak kontrol altında olan fizyolojik bir süreç olarak tanımlanmaktadır [1]. Diğer bir şekliyle yaşlanmış, görevini yitirmiş, fazla üretilmiş, düzensiz gelişmiş veya genetik olarak hasarlı hücrelerin, organizma için güvenli bir şekilde yok edilmelerini sağlayan kontrollü bir ölüm mekanizmasıdır [2, 3]. Hayvan hücrelerinde PHÖ'nün en iyi karakterize olmuş formu olan apoptoz (Yun: ayrılarak düşmek) terimi ise ilk kez 1972 yılında Kerr ve arkadaşları tarafından bölgesel anemiye maruz kalan karaciğer dokusunun etrafında nekrozdan daha farklı özellikler gösteren hücre ölümü için kullanılmıştır [4]. Yakın zamana kadar hücre ölümü, genetik olarak programlı hücre ölümü olan apoptoz ve ani olarak ortaya çıkan programsız hücre ölümü nekroz olarak iki grupta inceleniyordu. Ancak son yıllarda yapılan biyokimyasal ve moleküler çalışmalar sonucunda PHÖ apoptoz, otofaji ve nekroz olarak 3 temel grupta sınıflandırılmıştır (Tablo 1) [5, 6].

Apoptoza uğrayan hücreler karakteristik olarak hacim kaybederek küçülürler. Bunun yanında hücrede sitoplazma ve kromatin yoğunlaşması, 180-200 bp'lik DNA fragmentasyonu, sitosolik Ca^{+2} artışı, fosfatidilserinin hücre zarının dışına göçü, sitoplazma ve nükleus parçaları bulunduran zarla çevrili apoptotik cisimlerin oluşması gibi morfolojik ve biyokimyasal değişiklikler gözlemlenir. Hayvanlarda apoptoza uğrayan hücrelerden meydana gelen bu apoptotik cisimler komşu hücreler veya makrofajlar tarafından fagosite edilirler [7, 8]. Apoptoz, hedef substratların aspartik asit aminoasidinden sonraki peptit bağımlı kırın ve kaspazlar (caspases-cysteine aspartic proteinases) olarak bilinen sistein proteinazlar familyasına ait düzenleyici proteinler tarafından başlatılır ve ilerler [9]. Kaspazlar hücreye apoptotik sinyal gelene kadar, hücre içerisinde inaktif prokaspazlar olarak bulunurlar. Bir kez aktive olan kaspaz geri dönüşümsüz olarak çalışmaya başlar ve diğer kaspazları da aktive eder. Kaspaz enzimlerinin yanı sıra antiapoptotik ve proapoptotik proteinlerden oluşan Bcl-2 gen ailesi de (bcl-2, bcl-xL, bax, bak, bad vb.) apoptozda ölüm mekanizmasının düzenlenmesinde önemli rollere sahiptir [10, 11].

Otofaji (Yun: kendini yeme) evrimsel olarak oldukça korunmuş katabolik bir işlemdir. Otofagozom adını alan sitoplazmanın bir kısmını ve/veya organelleri içeren çift katlı ya da daha fazla zarlara sahip veziküller ile morfolojik olarak karakterize edilirler. Bu tip hücre ölümünde otofagozomlar, asidik hidrolazları içeren lizozomlar veya vakuoller ile birleşerek hücrenin kendi kendini sindirmesine neden olur [12]. Otofajik hücre ölümü, otofaji ile ilişkili genler (autophagy related genes – ATGs) tarafından düzenlenir. Bu tip ölümde apoptotik kaspazların aktivitesi gözlenmez. Otofaji, özellikle açlık, biyotik-abiyotik stres koşulları altında hücrenin yaşamını devam ettirebilmesi açısından kritik bir rol oynar [13, 14]. Otofajik hücre ölümü çoğunlukla sitoplazmada zarla çevrili keseciklerle ortaya çıkarken, apoptozun ölüm sırasındaki en önemli hedefi nükleus ve DNA'dır [12].

Nekroz (Yun: doku ölümü) ise apoptoz ve otofajiden oldukça farklı özellikler taşır. Hücre ölümü tipleri ilk tanımlandığında, nekroz programlı olmayan, ani ve patolojik bir ölüm olarak değerlendirilmekteydi [5]. Kendine özgü morfolojik özellikler gösteren nekrozda, hücre hacminin artması, hücrel enerji kaynaklarının azalması, hücre zarı ve organellerde ani bozulmalar görülür. Nekrozun ilerlemesiyle hücrenin bütünlüğü bozularak, bulunduğu dokuda bir inflamasyona (yangı) neden olarak parçalanır. Apoptoz ve otofajiden farklı olarak, bu parçalanmada hücrel içerik tamamen sindirilemez, dokudaki diğer hücreler arasında inflamasyona neden olan hücrel artıklar kalır [15, 16, 17].

Tablo 1. Apoptoz, otofaji ve nekrozun morfolojik ve biyokimyasal özelliklerine göre karşılaştırılması [18].

Morfolojik-Biyokimyasal Özellikler	Apoptoz	Otofaji	Nekroz
DNA fragmentasyonu	+	-	-
Kromatin yoğunlaşması	+	-	-
Apoptotik cisimler	+	-	-
Sitoplazmada vakuolleşme	-	+	+
Organel yıkılması	-	+	+
Mitokondride şişme	Nadir	Geç evrede	+
Sitoplazmik şişme	-	-	+
Hücre zarının ani parçalanması	-	-	+
ATP tüketimi	+	-	-
Kaspaz aktivitesi	+	-	-
Doku inflamasyonu (yangı)	-	-	+
Hücrel etki	Tek hücre	Tek hücre	Hücre grubu
Markır moleküller	Bcl-2, Kaspazlar, Bax, Bad, Bak	LC3, Beclin-1, Atg ailesi, FIP200	PARP1, TNF α , NF- κ B

II. BİTKİLERDE PROGRAMLI HÜCRE ÖLÜMÜ

Prokaryotlar ve ökaryotlar arasında, benzer morfolojik ve biyokimyasal özellikleri olan PHÖ'nün ortak bir atasal hücre ölümü sürecinden evrimleştiği ve ortak bir düzenleyici mekanizmayı paylaştığı düşünülmektedir [19]. Ölen hücrelerin, komşu hücreler tarafından fagosite edilmesini önleyen hücre çeperine sahip olan bitkilerin, bu evrimsel süreçte kendilerine ait bir yol geliştirdikleri sanılmaktadır. Bunun yanında yapılan moleküler analizlerde, hayvanlardaki apoptotik genlerle dizi homolojisine sahip bitki genleri henüz tanımlanamadığı gibi çok az sayıda korunmuş ortak protein bulunmuştur [20].

Bitkilerde hücre ölümünün biyokimyasal ve moleküler mekanizması tam olarak açıklanamamıştır. Bitkilerde hücre ölümü sırasında görülen nukleus morfolojisindeki değişiklikler, kromatin yoğunlaşması, DNA fragmentasyonu, protoplastta büzülme, hücre iskeletinde değişiklikler ve kaspaz benzeri enzimatik aktiviteler hayvanlardaki apoptoz ile benzer ve ortak morfolojik karakterlerdendir [21]. Ancak bitkilerde meydana gelen PHÖ apoptotik süreç ile gerçekleşmez [21, 22]. Bitkilerdeki PHÖ, vakuoler hücre ölümü ve nekrotik hücre ölümü olarak 2 grupta sınıflandırmaktadır (Tablo 2).

Tablo 2. Bitkilerde vakuoler ve nekrotik hücre ölümünün özellikleri [21].

Hücre Ölümü Tipi	Morfolojik ve Biyokimyasal Özellikler
Vakuoler hücre ölümü	Otofagozomların, küçük ve büyük litik vakuollerin oluşumu
	Sitoiskelet elemanlarının yeniden düzenlenmesi
	DNA fragmentasyonu
	Kromatin yoğunlaşması
	Nukleus zarının bozulması
	Vakuoler işlem enzimlerinin (VPE) aktivasyonu
	Tonoplastın parçalanmasına kadar organellerin bütünlüğünün ve turgorun korunması
	Tonoplastın parçalanması
	Hücre içeriğinin tamamen sindirilmesi
	Hücrenin şişmesi
Nekrotik hücre ölümü	Mitokondrilerde şişme
	Hücre solunumu ve ATP üretiminin durması
	Plazma zarının erken ve ani parçalanması
	Hücre içeriği sindirilemeden artıklar halinde kalması

Hayvanlardaki otofajik hücre ölümü ile ortak özellikler taşıyan vakuoler hücre ölümünde, vakuoller büyük önem taşımaktadır. Bilindiği gibi bitki hücrelerinde 2 tip vakuol vardır. Bunlardan biri çeşitli maddelerin biriktiği depo vakuolu, diğeri ise aspartat proteinazlar, sistein proteinazlar ve

nükleazlar gibi hidrolitik enzimleri içeren litik vakuollerdir [23]. Bitkilerde hücredeki litik vakuollerin hacminin artması ve en sonunda vakuol zarı olan tonoplastın parçalanarak hidrolitik enzimlerin sitoplazmaya geçmesi ile hücre ölümü gerçekleşir. Tonoplastın parçalanmasına kadar kromatinde yoğunlaşma ve DNA fragmentasyonu gözlemlenirken, henüz bozulmamış mitokondri, plastitler gibi sitoplazmik organeller hücrede varlığını ve aktivitesini korur. Vakuolün parçalanması ile birlikte tüm hücre yapısının yıkılması gerçekleşir. Bunun yanında nekrotik hücre ölümünde plazma zarı ve organellerin erken ve ani parçalanması gerçekleştiği için vakuoler hücre ölümünden farklı özellikler gösterir. Nekrotik hücre ölümünde hücre ve hücre organelleri şişer, plazma zarı erken bozulma gösterir, mitokondri yapısı bozulduğu için hücre solunumu gerçekleşemez. Bununla birlikte bu tip ölümde hücrede reaktif oksijen türleri (ROT) artar ancak ATP üretimi azalır. Bitkilerde vakuoler hücre ölümü gelişim veya stres koşulları altında gerçekleşen fizyolojik bir olayken, nekrotik hücre ölümü bitkinin karşılaştığı ani ve şiddetli stres koşulları altında oluşan patolojik bir ölüm sürecidir [21].

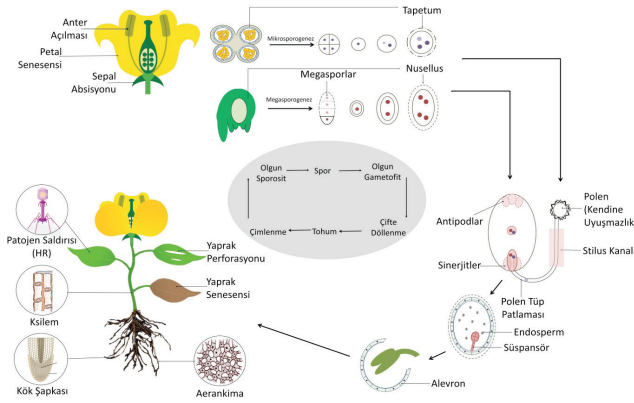
Bitkilerin çeşitli vejetatif ve generatif doku ve organlarının gelişimi ve olgunlaşması sırasında vakuoler hücre ölümü görülür. Bu PHÖ'nün ilgili hücrelerde zamanından önce veya geç görülmesi ya da hiç gerçekleşmemesi doku ve organ gelişiminde yapısal ve fonksiyonel bozukluklara sebep olur. Bunun yanında bitkilerin maruz kaldığı biyotik ve abiyotik stres şartlarında da bitkilerin değişik doku ve organlarında PHÖ görülür.

2.1. Bitkilerde Gelişim Sırasında Görülen Programlı Hücre Ölümü

İletim demetli bitkiler embriyogenez, dölleme, doku ve organların normal gelişimleri sırasında PHÖ'ye uğrarlar (Şekil 1). Bitkiyi toprağa bağlayan vejetatif bir organ olan kök toprak içerisinde ilerlerken kök şapkası hücreleri onu mekanik zararlardan korur. Zarar gören veya yaşlanan kök şapkası hücreleri PHÖ'ye uğrayarak hızlı bir gelişim sürecinden geçer. Bitkilerde PHÖ sürecinden geçen ksilem elemanlarından trake-trakeitlerin oluşumu *Zinnia elegans*'ta ayrıntılı bir biçimde incelenmiştir. *Z. elegans*'ta mezofil hücrelerinin trakeal elementlere değişimi sırasında vakuoler hücre ölümü meydana gelir. Ancak çok hızlı gerçekleşen bu ölüm sürecinde nukleus değişiklikleri ve DNA fragmentasyonu gözlemlenmez. Hücresel içeriğin hızlı bir şekilde sindirilmesinden sonra geriye sekonder çeperlerden oluşan boru şeklinde hücreler kalır. Özellikle su bitkilerinin kök korteks tabakasında çeşitli gazların depo edilebilmesi için büyük boşlukların oluşumu sırasında da parankimatik

hücreler PHÖ'ye uğrar. Böylece havalandırma parankiması (aerenkima) oluşur. Bunların yanında sklerenkima oluşumu, trikoma (tüy) gelişimi, yaprak absisyonu ve senesensi, çiçeklerde dişi veya erkek eşeyin belirlenmesi ve üreme organlarının gelişimi sırasında PHÖ normal bir süreç şeklinde ortaya çıkar [24, 25, 26, 27].

Dişi ve erkek üreme organlarının gelişimi, bitkilerde PHÖ'nün gösterilmesi için zengin bir araştırma alanıdır. Erkek eşey organı gelişimi sırasında anter loblarını bir arada tutan konnektif doku, anter çeper tabakalarından tapetum, endotesyum ve ara tabaka hücreleri, polen tanelerinin tam olarak gelişip doğaya salınması için zamanı geldiğinde hücre ölümüne uğrarlar. Bunun yanında kendine uyumsuz bitkilerde polenlerin pistil ile etkileşimi sırasında, polen tüpü stilus içinde hücre ölümüne uğrayarak mikropile ulaşmadan körelir. Stilüste polen tüpünün geçişi için kanal yapısı bulunmayan türlerde tüpün ilerlediği yere rastlayan hücrelerde de PHÖ gerçekleşir. Dişi eşey organının gelişiminde ise mayoz sonunda faal olmayan megasporlarda, nusellus dokusunda, embriyo kesesi hücrelerinden sinerjit ve anti-potlarda, embriyoyu endosperma (besi doku) içine iten suspansör hücrelerinde, apomiktik kese oluşumunda ve tohum çimlenmesi sırasında endospermada PHÖ görülür [26, 28, 29, 30, 31].



Şekil 1. Bitkilerde gelişim sırasında vejetatif ve generatif organlarda görülen hücre ölümü [30].

Durme ve Nowack [32] bitkilerin gelişimi sırasında görülen hücre ölümünü 3 evreye ayırmıştır. 1. evrede öncelikle sinyal molekülü olan farklı bitki büyüme düzenleyicilerinin tetiklemesi ile hücre ölümünde görevli hidrolitik enzimler litik vakuollerde birikmeye başlar. 2. evrede Ca^{+2} ve ROT gibi sekonder sinyal molekülleri hücre içinde ölüm mekanizmasını başlatırlar. Hücre ölümü öncelikle litik vakuoller içerisinde hidrolitik enzimlerin yardımıyla otofajik olarak gerçekleşmeye başlar. Sitosolik pH'nın düşmesi ile birlikte

hidrolitik enzimler sitoplazmaya geçmeye başlar. 3. evrede ise tonoplast ve sonrasında plazma zarı parçalanır. Hücrenin geriye kalan tüm bileşenleri sindirilir. Bazı tip hücrelerde (tapetum, megasporlar vb.) hücre ölümü sırasında hücre çeperi de tamamen sindirilirken, bazılarında ise (ksilem elemanları, sklerenkima vb.) sindirilmeden kalır. Her ne kadar bitkilerde gelişim sırasında görülen hücre ölümünün genetik olarak kontrol altında olduğu bilirse de, yaprak gibi bitki organlarının yaşlanarak ölümü olarak tanımlanan senesense bu genetik kontrol ani mevsimsel değişiklikler gibi çevresel etmenlerden de etkilenmektedir [30, 32].

2.2. Bitkilerde Stres Sırasında Görülen Programlı Hücre Ölümü

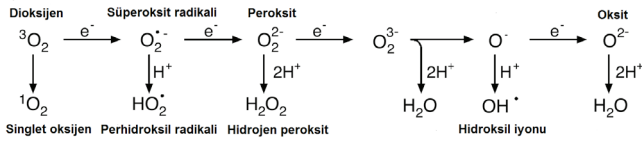
Bitkilerin bazı doku ve organları biyotik ve abiyotik stres koşulları altında PHÖ'ye uğrarlar [28, 33]. Bitkilerde çok yaygın olarak görülen virüs, bakteri, mantar gibi patojenlerin bitkiye bulaşması sonucunda ortaya çıkan ölüm "Aşırı Duyarlılık Cevabı" (Hypersensitive Response-HR) olarak adlandırılmaktadır [34]. Biyotik stres şartlarında ortaya çıkan bu ölüm sırasında, bir patojenin bitki tarafından tanınması ile programlı ölüm mekanizması hızlı bir şekilde devreye girer. Enfekte olan hücreler fenoller gibi çeşitli sekonder metabolitleri üreterek hem kendisinin ölümüne hem de çevresindeki hücreleri uyarak onların ölümüne sebep olur. Böylece patojenin enfekte ettiği hücrenin etrafını çeviren ölü hücrelerden oluşan bir tabaka meydana gelir. HR ile dokuda meydana gelen ölüm, patojenin daha fazla hücreyi etkileyip yayılmasını engellemekte ve bir sinyal oluşturarak bitkinin diğer savunma mekanizmalarını uyarabilmektedir [35]. Her ne kadar HR nekrotik ölüme benzer özellikler gösterse de litik vakuollerin oluşumu, otofajik aktivitenin artması, ROT artışı ve tonoplast parçalanması sonucunda gösterdiği hücre bozulma özellikleri bakımından vakuoller hücre ölümüyle ortak özellikler göstermektedir. Ancak nekrotik hücre ölümünde olduğu gibi ölüm sonrasında hücre artıkları tamamen sindirilemeden kalır [21].

Bitkiler biyotik stres faktörlerinin yanında yer değiştirememelerinden dolayı yaşam döngüleri boyunca büyüme ve gelişmelerini olumsuz yönde etkileyecek düzeyde UV ışık, kuraklık, tuzluluk, sıcaklık, donma, sel, ağır metaller, pestisitler, nanopartiküller gibi birçok abiyotik stres faktörü ile karşılaşırırlar. Biyotik stres koşullarında olduğu gibi abiyotik stres koşulları altında da ROT'ların üretimi artmaktadır. Hücresel ROT konsantrasyonunun artması durumunda, antioksidan savunma sistemleri ve ROT üretimi arasındaki denge bozulmakta ve zincirleme reaksiyonlar şeklinde bitkiler oksidatif strese girmektedir. Stres altında ROT üretiminin artışı lipidlerin peroksidasyonuna, proteinlerin

oksidasyonuna, nükleik asit hasarına, enzim inhibisyonuna neden olur ve bunların sonucunda PHÖ ortaya çıkar [36, 37, 38]. PHÖ stresin bitkiyi etkilemesine bağlı olarak ya bazı doku ve organlarda veya tüm bitkide gözlemlenebilir. Stres koşulları altında bitkilerde gözlemlenen hücre ölümü bitkinin normal gelişimini etkilediği gibi tarımsal açıdan bakıldığında verimi ve ürün eldesini de etkilemektedir. Bu durumda ekonomik bakımdan zararlara sebep olmaktadır.

2.3. Reaktif Oksijen Türlerinin Hücre Ölümündeki Rolü

Reaktif oksijen türleri (ROT) bitkilerde endojen olarak kloroplast, mitokondri ve peroksizomlarda çeşitli enerji dönüşüm reaksiyonları sırasında oluşan serbest radikallerdir [39]. Bitkinin normal gelişim sürecinde de sentezlendikleri halde detoksifikasyon mekanizması ile aralarındaki denge sayesinde zararlı etki oluşturmazlar [40]. ROT'lar diğer moleküllere elektron verebildiklerinden ya da onlardan elektron alabilmelerinden dolayı organizmada indirgeyici veya yükseltgeyici olarak davranırlar [41]. Hücrelerde bilinen başlıca ROT'lar moleküler oksijenin (O_2) indirgenmiş formlarıdır (Şekil 2). O_2 molekülünün elektron alması ile açığa çıkan ve en çok rastlanan ROT'lar singlet oksijen (1O_2), süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$), peroksit (O_2^{2-}), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil iyonu (OH^{\cdot})'dur [42].



Şekil 2. Moleküler oksijenin indirgenerek ROT'ların oluşumu [43].

Gelişimsel ve çevresel strese karşı toleransı da kapsayan birçok hücrel süreçte ROT'lar düşük konsantrasyonlarda sekonder mesajcılar olarak da rol oynamaktadırlar. Ancak yüksek konsantrasyonda üretilen ROT'lar hücrede zararlı ve zincir etkilere sebep olmaktadır. Hücrede fazla üretilen ROT'ların detoksifikasyonu antioksidan enzimler ve enzimatik olmayan antioksidan sistemleri ile gerçekleştirilir. Süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), askorbat glutatyon (AsA-GSH), askorbat peroksidaz (APX), hidrojen peroksidaz (POD) ve glutatyon redüktaz (GR) ROT'ların detoksifikasyonun rol alan antioksidan enzimlerdir. Askorbat (AsA), glutatyon (GSH), karotenoitler, tokoferoller ve fenolik bileşikler ise enzimatik olmayan antioksidanlar adı altında incelenmektedir [44]. Bitkilerde antioksidan savunma mekanizmasının aktivitesi çeşitli çevresel streslerin uyarmasına

bağlı olarak oluşan oksidatif stresin yok edilmesi sırasında artış gösterir. Bitkinin ROT'ları detoksifiye etmek için yüksek antioksidan kapasitesini koruması bitkinin strese olan toleransına bağlıdır. Hücre içerisinde anormal ROT birikiminin en önemli ROT yakalayıcı enzim olan katalazın yıkımına sebep olmaktadır. Bunun yanında ROT birikimi farklı mekanizmalar ile DNA'nın baz ve şekerinde hasar, tek ve çift zincir kırıkları, DNA-protein çapraz bağlanması gibi bir takım modifikasyonlara sebep olur. Bu şekilde hücrede artarak biriken ROT'lar PHÖ sürecinin başlayarak ilerlemesine sebep olur [45, 46].

Bitki gelişimde olduğu gibi abiyotik veya biyotik stres koşullarına maruz kalmış bitkilerde gelişen hücre ölümünün ROT miktarının değişmesi ile kontrol edildiği bilinmektedir [47]. En iyi bilinen gelişimsel hücre ölümü tipi olan organ senesensi ve çimlenme sırasında alevronlarda gerçekleşen hücre ölümünün, ROT ve etilen hormonu işbirliği ile gerçekleştiği bilinmektedir. ROT üretilmesi ve detoksifiye edilmesi arasındaki denge; herbisitler ve patojen saldırılar gibi çeşitli biyotik stresler veya tuzluluk, UV radyasyonu, kuraklık, ağır metaller, aşırı sıcaklık, besin eksikliği ve hava kirliliği gibi çeşitli abiyotik stresler tarafından bozulur. Bu dengenin bozulması, hücreler arasındaki ROT miktarının aniden artmasına ve hücre yapısında oksidatif hasara neden olabilir [48]. PHÖ her türdeki ROT'lar ile başlatılabilir. Hidroksil radikalleri lipid peroksidasyonunu başlatarak hem kendileri hem de bu olay sonucu açığa çıkan diğer ROT'lar ile hücre ölümünü başlatıp devam ettirebilir [39].

Pirinç *drc1* mutantında ROT birikiminin olmaması sebebiyle tapetal PHÖ'nün geciktiği ve steril (kısır) polenlerin geliştiği belirlenmiştir [49]. *Arabidopsis*'te ise tapetal PHÖ'nün zamanlaması ROT üretimindeki değişimler sebebiyle gecikmiş ve bunun sonucunda polen tanelerinin gelişimi ve olgunlaşmasında aksamalar meydana gelmiştir [50]. ROT birikiminin PHÖ'de rol oynayan proteazları aktive ettiği bilinmektedir. Bu durumun en iyi örneği haşhaşa kendine uyuşmaz polenlerin polen tüplerinin oluşumu sırasında ve spermin yumurtaya nakli sırasında polen tüplerindeki ROT artışı verilebilir [51, 52]. Gelişim sırasında ROT üretimi ve birikiminin arttığı gibi, stres koşulları altında da ROT ve buna bağlı olarak antioksidan enzim artışı gözlenmektedir. Alüminyum stresine maruz kalan arpa köklerinde ROT artışı, süperoksit dismutaz ve peroksidaz enzim aktivitesi ve bunların sonucu olarak da DNA fragmentasyonu gözlemlenmiştir [53].

2.4. Bitkilerde Kaspaz Benzeri Aktiviteler

Hayvan hücrelerinde PHÖ'nün en iyi karakterize olmuş formu olan apoptoz oldukça korunmuş ve kaspazlar olarak

bilinen sistein proteinaz ailesi tarafından yürütülür. Kaspazlar hedefledikleri substratları P1 pozisyonunda aspartik asit birimlerinden keserler. Kaspazlar hücre içerisinde inaktif zimojenler olarak sentezlenirler ve prokaspaz adını alırlar. Bu inaktif prokaspaz enzimleri apoptoz sinyalinin alınmasıyla birlikte aktifleşirler ve aktifleşen bu kaspazlar diğer inaktif kaspazları aktive ederler. Memelilerde 13 farklı kaspaz enzimi vardır. Bunlardan kaspaz-2, -8, -9, -10 başlatıcı, kaspaz-3, -6, -7 infazcı, kaspaz-1, -4, -5, -11, -12, -14 ise enflamatuvar kaspazlardır [54].

Bitkilerde proteoliz hücre yapısında birçok enzimi ve çeşitli proteolitik yolları içeren karmaşık bir süreçtir [55]. Bitkilerde gelişme, patojen ve abiyotik stres nedenli hücre ölümü ile ilişkili çok çeşitli proteolitik enzim bilinmektedir. Son yıllardaki çalışmalar hayvanlardaki kaspazlarla yapısal homoloji gösteren sistein proteinaz ve serin proteinazların hücre ölümünde rol aldığını (Tablo 3) ve hayvanlardaki kaspazlara benzer olarak substratlarını aspartik asit, aspargin, arginin veya lizinden sonra kestiğini ortaya koymuştur [54, 56]. Birçok destekleyici çalışma hücre ölümüne uğrayan bitkilerin ekstrelerinin insan kaspaz - 1 substratı YVAD-AMC ve insan kaspaz - 3 substratı DEVD-AMC gibi sentetik kaspaz substratlarına etki ettiğini göstermiştir. Benzer olarak YVAD-CHO ve DEVD-CHO gibi kaspaz inhibitörlerinin bitki hücre ölümünü birçok sistemde baskıladığı gösterilmiştir [19, 20, 57]. Bu çalışmalar bitkilerde kaspaz benzeri aktivitenin varlığını kuvvetli bir şekilde ortaya koyar. Çok hücreli organizmalarda muhtemel hücre ölümünün kökeni ve apoptozun bazı özelliklerinin korunmasının kısmen de olsa moleküler seviyede yansımaları beklenmektedir. Fakat *Arabidopsis* genom dizisi tamamlandığı halde sadece çok az bitki geninin memelilerde görülen apoptoz geni ile ortak olduğu görülmüştür. Bitkilerde kesin kaspaz homologları olmadığı halde ölen bitki hücrelerinde proteolitik kaspaz benzeri aktivitenin artması, hayvan kaspazları ile fonksiyonel olarak eş olan özel bitki proteinazlarının bulunduğunu düşündürür [20, 58, 59, 60].

İlk kez 1998'de tütünde bakteriler tarafından oluşturulan PCD'de sentetik kaspaz - 1 substratına karşı proteolitik aktivite gözlemlenmiştir [56]. Bitkilerde vakuollerde bulunan ve kaspaz - 1 substratını katalizleyen bir sistein proteinaz olan vakuoler işlem enziminin (Vacuolar processing enzyme-VPE) gelişim ve stres sırasında hücre ölümünde kritik rol oynadığı belirlenmiştir [61]. Bu bulgularla birlikte kaspaz benzeri aktivite çeşitli sentetik kaspaz substratları kullanılarak belirlenmiştir [62, 63]. Bunun yanında son yıllarda protoza, mantar ve bitkilerde ortak olarak bulunan bir sistein proteinaz olan kaspaz ortologları da bulunmuştur. Metakaspazlar hayvansal kaspazlarla yapısal benzerlik gösterse de substratlarını arjinin ve lizin aminoasitlerinden

sonra kesmektedirler. *Arabidopsis* ile yapılan çalışmalarda 9 farklı metakaspazın farklı düzeylerde farklı dokularda sentezlendiği belirlenmiştir [64]. *Avena sativa*'da (yulaf) patojen saldırısı sonucunda meydana gelen PHÖ'nde kaspaz - 6 benzeri aktivite gösteren serin proteinazlara ait fitaspaz ve saspaz aktiviteyi gözlemlenmiştir. Buna ek olarak *Arabidopsis thaliana*'da 26S proteozom $\beta 1$ alt ünitesinin ksilem gelişiminde ve bakteri enfeksiyonu sırasında kaspaz - 3 substratını katalizleyerek PHÖ'ne aracılık ettiği belirlenmiştir [54].

Tablo 3. Bitkilerde programlı hücre ölümü ile ilişkili proteinazlar

Proteinaz adı	Proteinaz ailesi	Substrat	Etki ettikleri kaspaz substratı
VPE	Sistein proteinaz	Asparjin Aspartik asit	YVAD (kaspaz-1 substratı)
26S proteozom $\beta 1$ alt ünitesi	Treonin proteinaz	Glutamik asit Aspartik asit	DEVD (kaspaz-3 substratı)
Saspaz	Serin proteinaz	Aspartik asit	VKMD (kaspaz-6 substratı)
Fitaspaz	Serin proteinaz	Aspartik asit	IETD (kaspaz-8 substratı)
Metakaspaz	Sistein proteinaz	Arjinin, lizin	VEID (kaspaz-6 substratı)

III. BİTKİLERDE PROGRAMLI HÜCRE ÖLÜMÜNÜN ANALİZİ

Hayvan hücrelerinde olduğu gibi bitki hücrelerinde de PHÖ süreci birçok yöntem ile baştan sona gözlemlenebilir. PHÖ'nün varlığı temel olarak mikroskopik teknikler kullanılarak belirlenir. Özellikle hematoksilen, toluidin mavisi gibi genel yapı boyalarının kullanılması ile nükleus morfolojisindeki değişiklikler karşılaştırmalı olarak saptanabilir. Nükleus ve kromatin değişiklikleri DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole), Hoechst, propidium iodit gibi nükleus ve kromatine özgü işaretleyiciler yardımıyla floresan mikroskopta da görüntülenebilir. PHÖ ile DNA'da nukleozomlar arası bölgelerde oluşan kırıklar TUNEL (TdT-dUTP nick-end-labelling) yöntemi ile de özgül olarak belirlenebilir. Terminal deoksinükleotidil transferaz (TdT) enzimi ve fluorescein gibi floresan boyalarla işaretli nükleotidler kullanılarak yapılan *in situ* işaretleme ile ışımaya yapan (PHÖ geçiren) ve ışımaya yapmayan (PHÖ geçirmeyen) hücreler belirlenebilir. Nükleus ve kromatin yapısındaki değişikliklerin yanı sıra PHÖ sırasında hücrenin ince yapısında meydana gelen değişiklikler, elektron mikroskobu kesitleri ile ayrıntılı olarak incelenebilir [65]. Vardar ve Ünal [26] *Lathyrus undulatus* L. anter çeper tabakalarından tapetumun gelişimini ayrıntılı olarak incelemiştir. Tapetumun gelişimi sırasında PHÖ'nün polen taneleri tetrattan salındıktan sonra başladığı toluidin

mavisi, DAPI ve TUNEL işaretleme yöntemleriyle saptanmıştır. Araştırmacılar ayrıca elektron mikroskobu ile PHÖ sırasında hücrenin ince yapısında meydana gelen değişiklikleri de ayrıntılı olarak belirlemişlerdir. Araştırmacıların elde ettikleri sonuçlara göre, PHÖ vakuolleşme, nükleus ve kromatin değişiklikleri ile başlayıp, tonoplastın parçalanmasıyla birlikte tüm hücrel içeriğin sindirilerek sonlanmaktadır.

Mikroskopik tekniklerin yanı sıra PHÖ'nün belirlenmesi için en sık kullanılan yöntem genomik DNA'da meydana gelen fragmentasyonun belirlenmesidir. Bu amaç için genomik DNA agaroz jel elektroforezinde yürütülür. PHÖ geçirmeyen örneklerde genomik DNA jelde ilerleme göstermezken, DNA'sı fragmente olmuş örneklerde farklı büyüklüklerdeki DNA parçaları jelde farklı hızlarda ilerleyerek merdiven basamağı görüntüsü oluşturur. Jel elektroforezi yöntemi nekroz ve vakuoler hücre ölümünün karşılaştırılmasında da kullanılabilir. Nekrozda ani ve rastgele DNA parçalanması gerçekleştiği için bu parçalar jelde ilerlerken merdiven basamağından çok, yayılmış (smear) bir görüntü verir [65]. Agaroz jel elektroforezi yönteminin yanında PHÖ kaynaklı DNA hasarı komet yöntemiyle de belirlenebilmektedir. Bitkisel materyalden izole edilen nükleuslar etidyum bromür, akrinin oranj gibi DNA bağlayıcı floresan boyalarla boyanırlar [16]. Eğer DNA kırık içeriyorsa, gevşemiş ve kırılmış DNA parçaları elektrik yüklü ortamda, nükleustan anoda doğru göç ederek kuyruklu yıldız görünümünü verir. DNA hasarını saptamak için kuyruk uzunluğu ölçülerek hasarın büyüklüğü karşılaştırılmalı olarak belirlenir. Kontrol grubundaki nükleuslarda DNA fragmentasyonu olmadığı için kuyruk oluşumu görülmez, küresel şeklini korur [66]. Vardar ve ark. [67] farklı Gramineae türlerinde, abiyotik stres faktörlerinden biri olan alüminyum (Al) toksisitesinin PHÖ'nün hangi saatte başlattığını belirlemek için agaroz jel elektroforezini kullanmışlardır. Elde edilen sonuçlara göre Al toksisitesi tritikale, çavdar, arpa ve yulafta 2 saat içerisinde PHÖ'nün belirteçlerinden biri olan DNA fragmentasyonuna sebep olmuştur. Benzer şekilde Yanık ve Vardar [68] nanopartikül stresine maruz kalmış köklerde zaman ve doza bağımlı olarak DNA fragmentasyonu gözlemlenmiştir. Bunun yanında tritikale, buğday ve çavdar köklerinde Al toksisitesi 15. dakikadan itibaren komet analizi kullanılarak, uzamış kuyuk oluşumlarının ölçülmesi ile belirlenmiştir [69].

Daha önce de belirtildiği gibi bitkilerde kaspaz benzeri aktiviteler hayvan hücrelerindeki kaspaz substratları ve inhibitörleri kullanılarak spektrofotometrik olarak belirlenebilir. Birçok araştırmacı bitkilerde özellikle abiyotik stres sonucunda oluşan kaspaz benzeri aktiviteyi kaspaz-1 (YVAD), kaspaz-3 (DEVD), kaspaz-8 (IETD) ve kaspaz-9 (LEHD) substratlarını kullanarak kolorimetrik ve florometrik olarak ölçmüşlerdir [62, 63]. Bunun yanında PHÖ sırasında hem

hayvan hem de bitki hücrelerinde ortak olarak gözlemlenen mitokondrilerden sitokrom c salınımı western blotlama (immunoblotlama) yöntemiyle belirlenebilmektedir. Bu yöntemde hücrelerden izole edilmiş bir protein karışımı içindeki belirli bir proteinin varlığını ve büyüklüğünü saptamak için antikör-antijen özgüllüğü kullanılır. Panda ve ark. [70] Al stresine maruz kalan tütün hücrelerindeki mitokondriyel değişiklikleri izlemişlerdir. Araştırmacılar yaptıkları ayrıntılı çalışmalar sonucunda hücrede ROT'ların artması ile birlikte mitokondri iç zarının potansiyelinde değişiklikler meydana geldiği ve bunun sonucunda da sitokrom c'nin sitoplazmaya salınarak PHÖ'ne sebep olduğunu belirtmişlerdir.

IV. SONUÇ

PHÖ prokaryotik ve ökaryotik tüm canlılarda gelişimsel ve çevresel sinyallerin tetiklenmesi ile başlayan, genetik olarak kontrol altında olan bir süreçtir. Bitkiler de hücre ölümü hayvanlardaki apoptozla ortak morfolojik özelliklere sahiptir. Ancak hayvanlardaki apoptotik genlerle dizi homolojisine sahip bitki genleri ve homolog proteinler henüz tanımlanamamıştır. Morfolojik bakımdan gelişim sırasında görülen hücre ölümünün vakuoler hücre ölümü tipinde, strese bağımlı hücre ölümünün ise hem nekrotik hem de vakuoler hücre ölümü tipinde olduğu belirlenmiştir. Ancak PHÖ'nün başlatılması, devamı ve sonuçlanması sırasında gerçekleşen moleküler olaylar ve transkripsiyon faktörleri henüz aydınlatılamamıştır. Bunun yanında gelişimsel ve stres kaynaklı PHÖ'nün aynı veya farklı mekanizma tarafından mı kontrol edildiği de hala tartışma konusudur [60]. Bitkilerde hücre ölümünü kontrol eden proteinlerin ve genlerin tanımlanarak anlaşılması, özellikle stres koşulları altında gelişen hücre ölümünün engellenmesi ve bitkide strese karşı tolerans mekanizmasının geliştirilmesi açısından önemlidir. Çevresel streslere karşı tolerans geliştirilmesi, gelecekte birçok tarımsal ürünün ıslahı ve veriminin artırılması bakımından çok önemlidir. Bunun yanında normal gelişim sırasında meydana gelen PHÖ'nün erken gerçekleşmesi, gecikmesi veya hiç olmaması ile gerçekleşen gelişimsel bozuklukların önlenmesinde de yardımcı olacaktır.

KAYNAKLAR

- [1] Lockshin, R.A., Williams, C.M., (1964). Programmed cell death. II. Endocrine potentiation of the breakdown of the intersegmental muscles of silkworms. *Journal of Insect Physiology*, 10, 643-649.
- [2] Bayles, K.W., (2014). Bacterial programmed cell death: Making sense of a paradox. *Nature Reviews Microbiology*, 12, 63-69.

- [3] Wang, J., Bayles, K.W., (2013). Programmed cell death in plants: Lessons from bacteria? *Trends in Plant Science*, 18(3), 133-139.
- [4] Kerr, J.F.R., Wyllie, A.H., Currie, A.R., (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*, 26, 239-257.
- [5] Galluzzi, L., Vitale, I., Abrams, J.M., Alnemri, E.S., Baehrecke, E.H., Blagosklonny, M.V., Dawson, T.M., Dawson, V.L., El-Deiry, W.S., Fulda, S., Gottlieb, E., Green, D.R., Hengartner, M.O., Kepp, O., Knight, R.A., Kumar, S., Lipton, S.A., Lu, X., Madeo, F., Malorni, W., Mehlen, P., Nuñez, G., Peter, M.E., Piacentini, M., Rubinsztein, D.C., Shi, Y., Simon, H.U., Vandenabeele, P., White, E., Yuan, J., Zhivotovskiy, B., Melino, G., Kroemer, G., (2012). Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death and Differentiation*, 19(1), 107-120.
- [6] Green D.R., Galluzzi L., Kroemer G., (2011). Mitochondria and the autophagy–inflammation–cell death axis in organismal aging. *Science*, 333(6046), 1109-1112.
- [7] Hengartner, M.O., (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature*, 407, 770-776.
- [8] Elmore, S., (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*, 35(4), 495-516.
- [9] Jacobsen, M.D., Weil, M., Raff, M.C., (1997). Programmed cell death in animal development. *Cell*, 88, 347-354.
- [10] Earnshaw, W.C., Martins, L.M., Kaufmann, S.H., (1999). Mammalian caspases: Structure, activation, substrates and functions during apoptosis. *Annual Review of Biochemistry*, 68, 383-424.
- [11] Denault, J.B., Salvesen, G.S., (2002). Caspases: Keys in the ignition of cell death. *Chemical Reviews*, 102, 4489-4499.
- [12] Öz-Arslan, D., Korkmaz, G., Gözüaçık, D., (2009). Otofajji: Bir hücrel stres yanıtı ve ölüm mekanizması. *Acıbadem Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 2, 184-194.
- [13] Ouyang, W., Liao, W., Luo, C.T., Yin, N., Huse, M., Kim, M.V., Peng, M., Chan, P., Ma, Q., Mo, Y., Meijer, D., Zhao, K., Rudensky, A.Y., Atwal, G., Zhang, M.Q., Li, M.O., (2012). Novel foxo1-dependent transcriptional programs control T-reg cell function. *Nature*, 22, 491(7425), 554-559.
- [14] Michaeli, S., Galili, G., Genschik, P., Fernie, A.R., Avin-Wittenberg, T., (2016). Autophagy in plants: What's new on the menu. *Trends in Plant Science*, 21(2), 134-144.
- [15] Leist, M., Jaattela, M., (2001). Four deaths and a funeral: From caspases to alternative mechanisms. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2(8), 589-98.
- [16] Wu, J.J., Poon, K.Y., Channual, J.C., Shen, A.Y., (2012). Association between tumor necrosis factor inhibitor therapy and myocardial infarction risk in patients with psoriasis. *Archives of Dermatology*, 148(11), 1244-50.
- [17] McCall, K., (2010). Genetic control of necrosis – another type of programmed cell death. *Current Opinion in Cell Biology*, 22(6), 882-888.
- [18] Galluzzi, L., Vitale, I., Kroemer, G., (2011). Cell death signaling and anticancer therapy. *Frontiers in Oncology*, 1, 1-18.
- [19] Woltering, E.J., Van der Bent, A., Hoeberichts, F.A., (2002). Do plant caspases exist? *Plant Physiology*, 130, 1764-1769.
- [20] Danon, A., Rotari, V.I., Gordon A., Mailhac N., Gallois, P., (2004). Ultraviolet-C overexposure induces programmed cell death in *Arabidopsis* which is mediated by caspase-like activities and which can be suppressed by caspase inhibitors, p35 and defender against apoptotic death. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 779-787.
- [21] van Doorn, W.G., Beers, E.P., Dangl, J.L., Franklin-Tong, V.E., Gallois, P., Hara-Nishimura, I., Jones, A.M., Kawai-Yamada, M., Lam, E., Mundy, J., Mur, L.A., Petersen, M., Smertenko, A., Taliansky, M., Van Breusegem, F., Wolpert, T., Woltering, E., Zhivotovskiy, B., Bozhkov, P.V., (2011). Morphological classification of plant cell deaths. *Cell Death and Differentiation*, 18(8), 1241-1246.
- [22] Gunawardena, A.H., (2008). Programmed cell death and tissue remodelling in plants. *Journal of Experimental Botany*, 59(3), 445-51.
- [23] Huang, S., Mira, M.M., Stasolla, C., (2016). Dying with style: Death decision in plant embryogenesis. In: *In vitro embryogenesis in higher plants*, M.A. Germaná, M. Lambardi, (eds), Springer, New York, USA. s. 101-115.
- [24] Munné-Bosch, S., (2016). Flower senescence and other programmed cell death processes in plants: Attribute to the late Wouter G. Van Door. *Journal of Experimental Botany*, 67(20), 5885-5886.
- [25] Hülskamp, M., (2004). Plant trichomes: A model for cell differentiation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 5(6), 471-480.
- [26] Vardar, F., Ünal, M., (2012). Ultrastructural aspects and programmed cell death in the tapetal cells of *Lathyrus undulatus* Boiss. *Acta Biologica Hungarica*, 63(1), 52-66.
- [27] Çetinbaş-Genç A., (2016). Türkiye endemiği olan *Crataegus tanacetifolia* (Lam.) Pers. (Alıç)' in üreme biyolojisinin analizi. Doktora Tezi, Marmara Üniversitesi, Türkiye, s. 106-107.
- [28] Wu, H.M., Cheung, A.Y., (2000). Programmed cell death in plant reproduction. *Development*, 44, 267-281.
- [29] Wei, C.X., Lan, S.Y., Xu, Z.X., (2002). Ultrastructural features of nucleus degradation during programmed cell death of starchy endosperm cells in rice. *Acta Botanica Sinica*, 44, 1396-1402.
- [30] Van Hautegeem, T., Waters, A.J., Goodrich, J., Nowack, M.K., (2015). Only in dying, life: programmed cell death during plant development. *Trends in Plant Science*, 20: 102-113.
- [31] Vardar, F., Ünal, M., (2011). Development and programmed cell death in the filament cells of *Lathyrus undulatus* Boiss. *Caryologia*, 64(2), 164-172.
- [32] Van Durme, M., Nowack, M.K., (2016). Mechanisms of developmentally controlled cell death in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 29, 29-37.

- [33] Drew, M.C., He, C.J., Morgan, P.W., (2000). Programmed cell death and aerenchyma formation in root. *Trends in Plant Science*, 5, 123-127.
- [34] Jones, A.M., Dangl, J.L., (1996). Logjam at the styx: Programmed cell death in plants. *Trends in Plant Science*, 1, 1360-1385.
- [35] Dietrich, R.A., Delaney, T.P., Uknes, S.J., Ward, E.R., Ryals, J.A., Dangl, J.L., (1994). *Arabidopsis* mutants simulating disease resistance response. *Cell*, 77, 565-577.
- [36] Smirnov, N., (1993). The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. *New Phytologist*, 125, 27-58.
- [37] Sghery, C.L.M., Pinzino, C., Navari-Izzo, F., (1996). Sunflower seedlings subjected to increasing water stress by water deficit: Changes in O₂-production related to the composition of thylakoid membranes. *Physiologia Plantarum*, 96, 446-452.
- [38] Büyüç, İ., Soydam-Aydın, S., Aras, S., (2012). Bitkilerin stres koşullarına verdiği moleküler cevaplar. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 69, 2, 97-100.
- [39] Van Breusegem, F., Dat, J. F., (2006). Reactive oxygen species in plant cell death. *Plant Physiology*, 141, 384-390.
- [40] Levitt, J., (1972). Responses of plants to environmental stresses. New York, London.
- [41] Flora, S. J., (2007). Role of free radicals and antioxidants in health and disease. *Cellular and Molecular Biology*, 53, 1-2.
- [42] Gill, S.S., Tuteja, N., (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48, 909-930.
- [43] Gechev, T. S., Van Breusegem, F., Stone, J. M., Denev, I., Laloi, C., (2006). Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death. *Bioessays*, 28, 1091-1101.
- [44] Noctor, G., Foyer, C. H., (1998). Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Biology*, 49, 249-279.
- [45] Zaefyzadeh, M., Quliyev, R., Babayeva, S., Abbasov, M., (2009). The effect of the interaction between genotypes and drought stress on the superoxide dismutase and chlorophyll content in durum wheat landraces. *Turkish Journal of Biology*, 33, 1-7.
- [46] Chen, Q., Zhang, M., Shen, S., (2010). Effect of salt on malondialdehyde and antioxidant enzymes in seedling roots of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.). *Acta Physiologiae Plantarum*, 33, 273-278.
- [47] Apel, K., Hirt, H., (2004). Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*, 55, 373-399.
- [48] Sharma, P., Jha, A.B., Dubey, R.S., Pessarakli, M., (2012). Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidant defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of Botany*, Article ID 217037, 26.
- [49] Yi, J., Moon, S., Lee, Y.S., Zhu, L., Liang, W., Zhang, D., Jung, K.H., An, G., (2016). Defective tapetum cell death 1 (DTC1) regulates ROS levels by binding to metallothionein during tapetum degeneration. *Plant Physiology*, 170, 1611-1623.
- [50] Xie, H.T., Wan, Z.Y., Li, S., Zhang, Y., (2014). Spatiotemporal production of reactive oxygen species by NADPH oxidase is critical for tapetal programmed cell death and pollen development in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 26, 2007-2023.
- [51] Wilkins, K.A., Poulter, N.S., Franklin-Tong, V.E., (2014). Taking one for the team: Self-recognition and cell suicide in pollen. *Journal of Experimental Botany*, 65, 1331-1342.
- [52] Duan, Q., Kita, D., Johnson, E.A., Aggarwal, M., Gates, L., Wu, H.M. Cheung, A.Y., (2014). Reactive oxygen species mediate pollen tube rupture to release sperm for fertilization in *Arabidopsis*. *Nature Communications*, 5, 3129.
- [53] Yalçın, G., Vardar, F., (2016). The alleviating effects of salicylic acid application against aluminium toxicity in barley (*Hordeum vulgare* L.) roots. *Biologia*, 71(12), 1338-1344.
- [54] Hatsugai, N., Yamada, K., Goto-Yamada, S., Hara-Nishimura, I., (2015). Vacuolar processing enzyme in plant programmed cell death. *Frontiers in Plant Science*, 6, 234.
- [55] Grudkowska, M., Zagdańska, B., (2004). Multifunctional role of plant cysteine proteinases. *Acta Biochimica Polonica*, 51, 609-624.
- [56] Coffeen, W.C., Wolpert, T.J., (2004). Purification and characterization of serine proteases that exhibit caspase-like activity and are associated with programmed cell death in *Avena sativa*. *Plant Cell*, 16, 857-873.
- [57] Del Pozo, O., Lam, E., (1998). Caspases and programmed cell death in the hypersensitive response of plants to pathogens. *Current Biology*, 8(20), 1129-1132.
- [58] Uren, A.G., O'Rourke, K., Aravind, L., Pisabarro, M.T., Sesagiri, S., Koonin, E.V., Dixit, V.M., (2000). Identification of paracaspases and metacaspases: Two ancient families of caspase-like proteins, one of which plays a key role in MALT Lymphoma. *Molecular Cell*, 6, 961-967.
- [59] Suarez, M.F., Filonova, L.H., Smertenko, E.I., Clapham, D.H., von Arnold, S., Zhivotovsky, B., Bozhkov, P.V., (2004). Metacaspase dependent programmed cell death is essential for plant embryogenesis. *Current Biology*, 14, 339-340.
- [60] Huysmans, M., Lema, S., Coll, N.S., Nowack, M.K., (2017). Dying two deaths-Programmed cell death regulation in development and disease. *Current Opinion in Plant Science*, 35, 37-44.
- [61] Hatsugai, N., Kuroyanagi, M., Yamada, K., Meshi, T., Tsuda, S., Kondo, M., (2004). A plant vacuolar protease, VPE, mediates virus-induced hypersensitive cell death. *Science*, 305, 855-858.
- [62] Ayturk, O., Vardar, F., (2014). Aluminum-induced caspase-like activities in some Gramineae species. *Advances in Food Sciences*, 37(2), 71-75.
- [63] Yanik, F., Ayturk, O., Vardar, F., (2017). Programmed cell death evidence in wheat (*Triticum aestivum* L.) roots induced

- by aluminum oxide (Al₂O₃) nanoparticles. *Caryologia*, 70(2), 112-119.
- [64] Tsiatsiani, L., van Breusegem, F., Gallois, P., Zavalov, A., Lam, E., Bozhkov, P.V., (2011). Metacaspases. *Cell Death and Differentiation*, 18, 1279-1288.
- [65] Güleş, Ö., Eren, Ü., (2008). Apoptozun belirlenmesinde kullanılan yöntemler. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 2, 73-78.
- [66] Fidan, A.F., (2005) DNA Hasar tespitinde tek hücre jel elektroforezi. *Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 8(1), 41-52.
- [67] Vardar, F., Çabuk, E., Aytürk, Ö., Aydın, Y., (2016). Determination of aluminum induced programmed cell death characterized by DNA fragmentation in Gramineae species. *Caryologia* 69, 111-115
- [68] Yanık, F., Vardar, F., (2015). Toxic effects of aluminum oxide Al₂O₃ nanoparticles on root growth and development in *Triticum aestivum*. *Water Air and Soil Pollution*, 226, 296-309.
- [69] Vardar, F., Akgül, N., Aytürk, Ö., Aydın, Y., (2015). Assessment of aluminum induced genotoxicity with comet assay in wheat rye and triticale roots. *Fresenius Environmental Bulletin*, 24, 3352-3358.
- [70] Panda, S.K., Yamamoto Y., Kondo H., Matsumoto H., (2008). Mitochondrial alterations related to programmed cell death in tobacco cells under aluminum stress. *Comptes Rendus Biologies*, 331, 597-610.

Endokrin Bozucu Kimyasallar: Nonilfenol ve Bisfenol AEndocrine

Disruptive Chemicals: Nonylphenol and Bisphenol A

Fahriye ZEMHERİ¹ , Cevdet UĞUZ² 

¹ Bartın Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Biyoteknoloji Anabilim Dalı, 74110 Bartın/TÜRKİYE

² Afyon Kocatepe Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Medikal Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, 03030 Afyonkarahisar/TÜRKİYE

Öz

Teknoloji ve bilimin ilerlemesi, insan hayatını önemli ölçüde kolaylaştırmış ancak çeşitli olumsuzlukları da beraberinde getirmiştir. Çevrede mevcut olan kimyasallar canlılığı olumsuz yönde etkilemektedir. Bu maddeler gıda katkı maddeleri, kozmetik ve ilaç sanayide kullanılan kimyasallar, pestisitler, herbisitler, sigara dumanı ve alkoller gibi bileşiklerdir. Kirleticilerin canlıların sağlığı üzerindeki olası olumsuz etkileri giderek artmakta özellikle de canlıların endokrin sistemini etkilemektedir. Endokrin bozucu kimyasalların başında çoğu endüstride kullanılan nonilfenol (NF) ve bisfenol A (BFA) gibi bileşikler yer almaktadır. Genelde parçalanabilir olan bu maddeler arıtma tesislerinde uzaklaştırılabilmelerine rağmen, indirgenmiş konsantrasyonlarda atık sularla nehir ve çaylara (akarsulara) verilmektedir. Bu şekilde de biyolojik döngüye katılarak biyokütle tarafından depolanmaktadır. Ksenoöstrojenik olarak adlandırılan bu kimyasallar, endüstride ve evlerdeki çeşitli kullanımları yanında, deterjan, sabun ve temizlik maddelerinin ana bileşeni olarak da büyük önem taşımaktadır. Bu kimyasalların çoğu veya bunların parçalanma ürünleri mutajenik, östrojenik, toksik veya karsinojenik olabilmektedir. Ayrıca üreme ve gelişmede görev yapan östrojen, progesteron, androjen ve diğer hormonların metabolik faaliyetlerini, hormon reseptör bölgelerine bağlanarak hormon gibi davranarak veya doğal hormonun spesifik reseptör bölgesine bağlanmasını engelleyerek anti-hormonal etki gösterebildiğinden, endişelerin ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Bu nedenle NF ve BFA'nın olası dolaylı veya direkt etkilerinin moleküler düzeyde incelenmesi önem arz etmekte ve önemli araştırma konuları arasında olduğu öngörülmektedir.

Anahtar kelimeler: Endokrin bozucu kimyasallar, Nonilfenol, Bisfenol A, çevre, gen

Abstract

The improvement of technology and science has facilitated human, but these brought various negative effects. The chemicals that exist in the environment affects the vitality negatively. These compounds are such as food additives, cosmetics and medicines used in industry, pesticides, herbicides, cigarette smoke and alcohols. The possible negative effects of pollutants on the health of living beings are increasing. These especially affect the endocrine system of living things. Endocrine disrupting chemical compounds are nonylphenol (NP) and bisphenol A (BPA) which are most commonly used in the industry. These degradable materials are removed at the treatment facility, but reduced concentrations of them are given to rivers and streams. In this way, they participate in the biological cycle and stored by the biomass. These chemicals are called xenoestrogens, and they have various usage at home and industry. In addition to these, they have great importance as the main component of detergents, soaps and cleaners. Most of them or their decomposition products may be mutagenic, estrogenic, toxic or carcinogenic. In addition, they could block the metabolic activities of estrogen, progesterone, androgen and other hormones by means of adhering to the hormone receptor domain or act as anti-hormonal substances. Therefore, it is important to examine the possible indirect or direct effects of NP and BPA at the molecular level, and it is foreseen as an important research topic.

Keywords: Endocrine disruptive chemicals, Nonylphenol, Bisphenol A, environment, gene

I. GİRİŞ

Ksenoöstrojen olarak adlandırılan kimyasallar arasında olan bisfenol A (BFA) ve nonilfenol (NF), insanların kullanım alanındaki çeşitli ürünleri üretmek üzere polimer endüstrisinde kullanılan en önemli endokrin bozucu bileşiklerdir [1]. Endokrin bozucular (ED), hayvanlarda ve insanlarda iç hormonal dengeyi bozan, geçici ve/veya kalıcı etkilere neden olan bileşiklerin tümüne verilen bir terimdir [2].

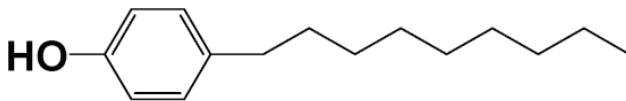
NF, dış hekimliği, gıda ambalajlama, tekstil, zirai ilaç, deterjan, boya ve kozmetik ürünlerin üretiminde kullanılan plastik bileşimlerin yani alkilfenol etoksilatların bir bozunma ürünüdür. Yapılan bir çalışmada, NF'nin erkek üreme sisteminde; testis boyutunun azalmasına, germ hücresinin apoptozisine ve spermatozoa üretiminin azalmasına etki ettiği gösterilmiştir [1]. NF'nin doğrudan veya dolaylı olarak birçok ortamda sıklıkla görülen ve en sık rastlanan kimyasallardan biri olduğu tespit edilmiştir. NF, nonilfenoletoksilatların (NFEO) (Şekil 2.) geniş ve uzun süreli uygulamasından dolayı, özellikle atık su artıkları ve çamurlardaki diğer kirleticilerden daha yüksek konsantrasyonlarda olduğu tespit edilmiştir [3].

BFA ise monomer polikarbonat plastikler ve epoksi reçineleri imalatında kullanılan zayıf östrojenik bir kimyasaldır. BFA polikarbonat ürünlerden epoksi reçineyle eksik polimerizasyon oluşumu sırasında gıda ve sıvılara bulaşır ve bu şekilde de insanlar tarafından tüketilebilmektedir [1].

Nonilfenol 'ün Genel Özellikleri

NF, alkil fenollerin alt kümesinden ve organik bileşikler ailesindedir. Sudaki çözünürlüğü 6 mg/L (pH 7)'dir. Etanol ve dimetilsülfoksit (DMSO) gibi çözücülerde iyi çözünmektedir.

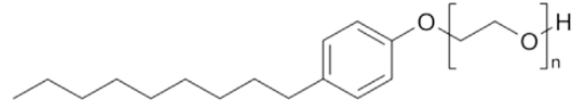
Alkil fenol etoksilatlar, temizlik ürünleri, boya, herbisit, pestisit gibi maddelerin yapımında kullanılan yüzey aktif bileşenleridir. Alkil fenol etoksilatların biyolojik olarak kolay parçalanma özelliği vardır ve parçalanma ürünleri biyodegradasyona karşı dirençli yapılarıdır [4].



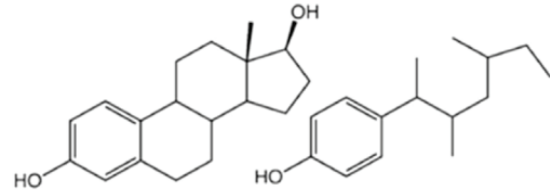
Şekil 1. NF'nin kimyasal yapısı [5].

NF, çeşitli alkil zincir yapısında ve ağırlıklı olarak 4-nonilfenol (>% 90) (Şekil 1) formunda olan kompleks bir karışımdır. İyonik olmayan yüzey aktif maddeler için NFEO ve tris (nonilfenil) fosfit formu başta olmak üzere pek çok çeşidi endüstriyel uygulamada yaygın bir şekilde kullanılmaktadır.

Bu kimyasallar, daha sonra ortamı ve gıdayı kirleten NF'ye dönüşmektedir [6].



4-Nonilfenoletoksilat



17β-Östradiol

4-Nonilfenol

Şekil 2. 4-Nonilfenoletoksilat, 17β-Östradiol, 4-Nonilfenol yapılarının karşılaştırılması [7].

17β-Östradiol ve NF kimyasal yapıları açısından çok benzerlik göstermektedir (Şekil.2). Bu nedenle NF bu dişilik hormonunun bütün fonksiyonlarını taklit etme yeteneğine sahiptir. NF diğer BFA gibi östrojenik kimyasallardan daha güçlü bir östrojenik aktiviteye sahiptir. NF'nin östrojenik aktivitesi balıklarda vitellojenin (Vtg) artışı ile birlikte gösterilebilir [8]. Uğuz ve ark. [9]'na göre Türkiye'de bulunan Sakarya Nehri ve Değirmen deresinden toplanan sediman ve balık örneklerinde alkilfenollere rastlanmıştır. Bunun nedeni de alkilfenoller, hidrofobik (su çözünmeyen) ve lipofilik (yağda çözünen) özelliklerinden dolayı, sulara değil sediman ve suda yaşayan canlılarda birikmektedir. Alkilfenollerin balık dokularında ölçülmesi, nehirlerimizde alkilfenol varlığını göstermektedir. Ayrıca NF'nin, balıkların karaciğerinde patolojik ve biyokimyasal bozukluklara neden olduğu da ortaya konmuştur [10].

NF ve BFA'nın Ames/Salmonella/Mikrozom test yöntemi kullanılarak mutajenik etkisinin belirlenmesi amacı ile NF ve BFA'nın toksik olmayan 100 µg/plak, 10 µg/plak, 1 µg/plak, 0,1 µg/plak dozlarında mutajenik etkiye rastlanmıştır [11].

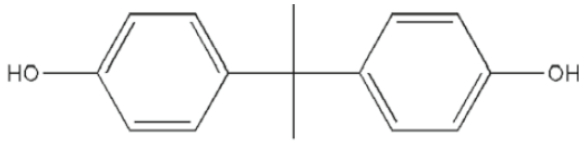
NF, hidrofobikliği ve uzun yarılanma ömrü nedeniyle insanlar dahil olmak üzere canlılarda, bir dizi toksik etki sergilediği görülmektedir. NF'nin erkek üremesini etkilediği ve pankreas da dahil olmak üzere çeşitli organlara zararlı olduğunu gösteren kanıtlar da mevcuttur [12]. Yücedağ ve ark.'nın [13] yaptığı diğer bir çalışmada sığanlarda NF'nin iştih fonksiyonu üzerinde olumsuz etkilere sahip olduğu gösterilmiştir. Ergün ve ark., [14]'nın yaptığı diğer bir

çalışmada; NF ve BFA'nın çevresel dozlarının (0,001; 0,1; 1, 10 ve 100 µg NF/ml ve 0,001; 0,1; 1, 10 ve 100 µg BFA/ml) sığırlarda sperm DNA'sına ve oosit olgunlaşmasına etkileri belirlenmiştir. NF'nin 100 µg /ml ve BFA'nın 0,1; 1, 10 ve 100 µg /ml konsantrasyon gruplarının sığır sperm hücrelerinde DNA kırılmalarına neden olduğu, bu nedenle de apoptozise yol açabileceği bildirilmiştir.

Bisfenol A'nın Genel Özellikleri

BFA, iki mol fenolün bir mol aseton ile düşük pH'da ve yüksek sıcaklıkta kondensasyonu ile elde edilmektedir. Genelde üretilen BFA %99-99.8 saflıkta olmaktadır [15]. BFA katı, fenolik kokulu, krem-beyaz renkte, kristal yapıdadır (Şekil 3). Etanol, aseton ve dimetilsülfoksit (DMSO) gibi çözücülerde iyi çözünmektedir [16;17].

BFA'nın en fazla kullanıldığı alan %60'lık oranla polikarbonat plastik üretimidir. Bunu %26'lık oranla epoksi reçine üretimi takip etmektedir. Günlük hayatımızda kullandığımız PVC plastik pencereler, kompakt disk, otomotiv parçaları, toz boya, su ve süt şişesi, bebek biberonu, birçok elektrik ve elektronik parça yapımında BFA kullanılmaktadır [18].



Şekil 3. BFA'nın kimyasal yapısı [19].

BFA'nın çevresel konsantrasyonu hakkında yapılan çalışmalarda yüzey sularında BFA konsantrasyonlarının farklılıklar gösterdiği belirtilmektedir. Avrupa'da yapılan çalışmalarda BFA'nın yüzey sularındaki oranlarının farklı ülkelerin sınırlarından geçen aynı nehirde bile farklılık gösterdiği belirtilmiştir [20]. BFA'nın çevresel konsantrasyonu hakkında yapılan çalışmalara bakılarak Avrupa Gıda Kurumu (EFSA) ve Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından tolere edilebilir günlük alım sınırları içersinden BFA'nın vücuttan hızla atılabileceği sınırlar standartlaştırılmış olup, polikarbonat ürünlerde litrede maximum 0,02 mg BFA bulunmasına müsaade edilmektedir [21]. 2003 yılında dünya çapında 6 milyar pound BFA üretildiği belirtilmektedir ve bu üretimin son yıllarda 5,4 milyon tonu aşacağı düşünülmektedir [22].

Oral yolla alınan BFA, gastrointestinal yolla vücuda girmektedir. Oral yolla alınan miktarın %83 kadarı 72 saat içinde dışkı ile atılmaktadır. Vücuda alınan BFA, öncelikle karaciğerde monoglukuronid formuna dönüştürülmekte ve

daha sonra idrarla vücuttan atılmaktadır. BFA'nın monoglukuronid formunun anne sütüne geçebileceği belirtilmektedir [23]. İçme suyu ile verilen BFA'nın üreme, testis patolojisi ve spermatogenezis üzerine etkisi dört döl boyunca incelenmiş (2-200 µg kg⁻¹ vücut ağırlığı gün), BFA'nın sıçanlarda üreme, testis patolojisi ve özellikle spermatogenezis üzerinde olumsuzluklar meydana getirdiği belirlenmiştir [24].

BFA, östrojenik aktiviteye sahip olan her yerde bulunan bir endokrin bozucu ve üreme ve tiroit hormonu disregülasyonu, kilo alımı, glukoz intoleransı, insülin direnci, tip 2 diyabet, metabolik sendrom, kardiyovasküler hastalık ve yağlı karaciğer hastalığına yol açan çok çeşitli metabolik bozukluklara neden olduğu bildirilmektedir [25].

Çevre Koruma Ajansı (Environmental Protection Agency, EPA), her yıl 1 milyon poundluk BFA'nın çevreye sızıntı yaptığını tespit etmiştir. Özellikle bebek ve çocukların %90'ından fazlasında en yüksek seviyelerde BFA'ya maruz kaldığı tahmin edilmektedir.

BFA ile ilgili daha fazla araştırma gerektiren alanlar şu şekildedir:

- Erken yaşam döngüsündeki BFA maruziyeti; prostat, rahim, yumurtalık ve testiste belirlenen kanserojenik hasarların, kanser oluşumundaki potansiyelinin belirlenmesi gereklidir.
- Başarması zor olsa da, BFA maruziyetinin herhangi bir tümör oluşumu ile ilişkisinin olup olmadığını bulmak için fetus gelişimi ile hayat boyu takibinin geniş çaplı, iyi kontrol edilebilen insan çalışmaları ile belirlenmesi gerekli olabilir.
- BFA'nın östrojen hedef dokularındaki kanser hassasiyeti üzerine etkilerine odaklanmak gereklidir.
- Erken dönem BFA'ya maruz kalınması durumunda, özellikle karaciğer gibi üreme olmayan östrojen hedef dokularında genomik stabilite, epigenetik ve gen ekspresyon değişiklikleri üzerine etkilerinin değerlendirilmesinin en büyük ihtiyaç olduğu düşünülmektedir [22].

Moleküler biyolojinin temeli biyokimyasal bilgilerin DNA'dan RNA'ya ve daha sonra da proteine doğru aktarılmasını içeren bir doğmadır. Bu akışın bir sonucu olarak DNA'da bulunan nükleotid baz dizisi, proteindeki temel amino asit dizisi ve buna bağlı olarak sentezlenen proteinin tipini belirler. Bu düzendeki tüm biyolojik olaylar, bu yolu izleyen bilgilerin regülasyonuna ya da kontrolüne bağlı olan üreme ve ürün performansları ile de ilişkilidirler. Bu süreç temel genetik belirleyiciler tarafından çok sıkı bir şekilde kontrol edilmesine rağmen, birçok dış etken bunların regülasyonunda etkili olabilmektedir. Bu dış etkiler arasında NF

ve BFA gibi ksenoöstrojenik, toksik veya mutajenik maddelere maruz kalma gibi etkenler sayılabilir.

Gen ekspresyon düzeylerinin belirlenmesine yönelik olarak kullanılan northern blotting, hibridizasyon differential display veya RT-PCR (Reverse Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu) gibi teknikler sayesinde transkripsiyonal düzeyde gen ekspresyonunu oldukça anlaşılabilir hale gelmiştir. Bu çalışmalar yıllardır sürmesine rağmen, oligonükleotid ve cDNA (Komplementer=Tamamlayıcı DNA) mikroarrayler ile yapılan çalışmalar gen ekspresyonu hakkında daha hızlı ve kolay değerlendirme yapılmasına olanak vermektedirler [26]. Gen ekspresyon çalışmaları genel olarak kanser ve SNP (Tek Nokta Polimorfizmi) gibi insan sağlığını olumsuz etkileyen durumları en iyi açıklayan çalışmalardır. Mikroarraylerde prob olarak kullanılan mRNA RT-PCR'la cDNA'ya çevrilir ki cDNA'lar daha sonraki aşamalara daha dayanıklıdır (işaretleme, hibridizasyon). Aynı anda kantasyon yapılabildiği için RT-PCR'a verilen önem giderek artmaktadır [27].

II. SONUÇ

NF ve BFA'nın etkilediği belli bir grup genin ya da tüm genlerin, dokularda bulunan RNA miktarı üzerindeki etki düzeyini belirlemek çok önemlidir. Östrojen moleküllerinin hücredeki östrojen reseptörlerine bağlanması sonucu bu reseptörler aktif duruma geçer. Aktif duruma geçen östrojen reseptör bağlantısı çekirdek içindeki gen aktivasyonu ve mRNA transkripsiyonunun meydana geldiği özel bölgelere (DNA dizilerine, çekirdek matriksine, non histon proteinlere ve çekirdek zarına) bağlanır. Çekirdekte oluşan bu etkileşim sonrası reseptör östrojen bağlantısı ayrılır ve reseptör kullanılmayacak bir şekilde kalır. Bununla birlikte reseptör-hormon bileşiğinin gen transkripsiyonunu düzenlemesi östrojenin en önemli biyolojik aktivitesi olarak gösterilir. Ayrıca bu moleküllerin genomdan bağımsız diğer fonksiyonları da bulunur.

NF ve BFA gibi kimyasal bileşenler östrojen benzeri etki gösterdiği için hücrelerde bulunan östrojen reseptörlerine subtoksik konsantrasyonlarda bağlanırlar. Östrojenitenin belirlenmesinde de in vitro ve in vivo yöntemler kullanılabilir [28]. 2004 yılında yapılan bir çalışmada, NF'nin bildircinlara olan etkisi araştırılmıştır. NF'ye maruz bırakılmış gruplardaki hayvanların kromozomlarında telomer kısalması meydana geldiği tespit edilmiştir. Karaciğer ve böbrek hücreleri ile kromozomlarda meydana gelen bozuklukların dozdan çok zamana bağlı olarak meydana geldiği gözlenmiştir. Sonuç olarak, NF'nin bildircinlarda hem histopatolojik hem de moleküler düzeyde gözlenebilen bozukluklara neden olduğu ortaya konmuştur [29].

Vivacqua ve ark., BFA ve NF'nin her ikisinin de iyonik olmayan yüzey aktif maddesi ürünlerine parçalanarak östrojen reseptörü alfa (ER- α)'yi aktive ederek östrojen bağımlı gen ekspresyonuna sebep olduklarını ve östrojene duyarlı meme kanseri hücreleri MCF7'nin büyümesini uyardıklarını belirtmiştir [30]. Yapılan diğer bir çalışmada NF'nin yavaş bir şekilde insan plasantasına geçtiği ve amnion sıvısında çevrede bulunan miktarlara ulaştığı tespit edilmiştir [31]. Ayrıca anne sütü ile yapılan bir çalışmada, temizlik ürünü ve balık tüketimine bağlı olarak süte bulunan NF miktarında artış olduğu gözlenmiştir [32].

NF'nin ratlarda [33], sığırlarda [34,35] ve koçlarda [36] sperm motilitesini azalttığı ve akrozom reaksiyonunu tetiklediği rapor edilmiştir. Diğer bir çalışmada hücre hattındaki granüloza hücreleri ve insan fetal obstastik hücrelerdeki sitokrom P450 aromataz ekspresyonu üzerindeki BFA'nın etkisi araştırılmış ve aromataz (CYP19) gen ekspresyon seviyesini etkilediği görülmüştür [37].

Yapılan son çalışmalar BFA'nın vücuda alınımının yemden kaynaklı olmasına dikkat çekmektedir. BFA deneysel modeli erkeklerdeki üretkenlikle ve kansere hassasiyet artışıyla ilişkilidir. BFA'ya maruz kalan ratların neonatal gelişiminde yetişkinlerde östrojen ve testosteron maruz kalma sürecinin uzaması prostat intraepitelyal neoplazi oluşumunun artışıyla sonuçlandığı görülmüştür. Prostat dokularında östrojene veya BFA'ya maruz kalma sonucunda sürekli metilasyon değişiklikleri gözlemlendiği rapor edilmiştir. Epigenetik değişiklikler yaşa bağlı prostat kanserine yakalanma riskine neden olabilir [38]. Suyu NF'ye maruz bırakılan genç dil balıklarında (Solea solea) östrojen reseptör- β (ER- β) mRNA ekspresyonunun ve plazma Vtg ekspresyon seviyelerinde artış olduğu gözlenmiştir. Ksenoöstrojenlerin düzenlenmesinde ER- β 'nin fonksiyonel rolü önemlidir. Çevresel ksenoöstrojenlerin kontrol çalışmalarında yassı balıklar koruyucu tür olarak kullanılabilir [39].

Hem in vitro hem de in vivo çalışmalarda NF'nin östrojenik etkiye sahip olduğu birçok araştırmacı tarafından rapor edilmektedir. NF'nin beyin ve karaciğere etkisini ölçmek için, genç gökkuşuğu alabalıkları (*Oncorhynchus mykiss*) su yoluyla NF ve 17 β -Östrodiol (E2)'e maruz bırakılmış ve sonuçlar E2 veya tamoxifene (17 β -Östrodiol muhalifi) göre karşılaştırılmıştır. Hepatik E2 ve NF'nin yüksek dozları Vtg ve ER α uzun izoform mRNA seviyesini artırmıştır. Fakat NF, ER α kısa izoform traskripsiyon seviyesini etkilememiştir. NF beyinde doza bağlı durumlarda serbest gonadotropin hormon (sGnRH) gen ekspresyonunu azaltmış fakat sGnRH veya ER α mRNA seviyesini değiştirememiştir [40].

BFA'nın düşük çevresel konsantrasyonları (2,4 μ g/kg) sıçanlarda eşeyssel olgunluğun hızlanması ve postnatal

gelişmelerde anormalliklere neden olduğu gösterilmiştir [41]. NF'ye maruz bırakılan sıçanlarda yapılan bir çalışmada, TUNEL boyama sonucunda pankreasdaki apoptoz düzeyininin doza bağımlı olarak artırdığı gözlenmiştir. Ayrıca NF'nin insülin salınımını engellediği ve glukoz dengesini bozduğu da ortaya çıkarılmıştır [12].

NFEO'ların östrojenik aktiviteye sahip olmasının özellikle NF'ye bağlı olduğu düşünülmektedir. NF çevrede, tatlı sularda ve balıklarda kalıcıdır. Bu nedenle besin zinciri içinde insanlara ulaşması olağandır. Nitekim NF'nin insanlarda östrojen reseptör sinyal yolağını etkilediği bilinmektedir. Bu nedenle de NF ve BFA gibi östrojenik aktivite gösteren maddelerin çevrede varlıklarının gösterilmesi ve rutin tayin yöntemlerinin belirlenmesi çevre canlılarında birikimin gözlenmesi, deney hayvanlarında çeşitli dozlarda deneyler yapılması acil önem taşımaktadır. Mutajenik, ksenoöstrojenik ve toksik maddeleri tanımlama; kansere neden olma ve gelecek nesillerdeki olumsuz değişimlere neden olabilecek hücre sayısına DNA'ya ve gen düzeyindeki zarar verme potansiyelinden dolayı özellikle önemlidir.

KAYNAKLAR

- [1] Urriola-Muñoz, P., Li, X., Maretzky, T., McIlwain, D.R., Mak, T.W., Reyes, J.G., Blobel, C.P., Moreno, D. (2018). The Xeniestrogens Biphenol-A and Nonylphenol differentially regulate metalloprotease-mediated shedding of EGFR ligands. *J Cell Physiol*, 233(3), 2247-2256.
- [2] Lagos-Cabre R, Moreno R.D. (2012). Contribution of environmental pollutants to male infertility: a working model of germ cell apoptosis induced by plasticizers. *Biological research*, 45(1), 5-14.
- [3] Gao, Q. T., Wong, Y. S., Tam, N.F.Y. (2017). Antioxidant responses of different microalgal species to nonylphenol-induced oxidative stress. *Journal of Applied Phycology*, 29(3), 1317-1329.
- [4] Warhurst, A.M. (1995). An Environmental Assessment of Alkylphenol Ethoxylates and Alkylphenols. Friends of the Earth, London, UK. Syf.10.
- [5] Sharma, V.K., Anquandah, G.A.K., Yngard, R.A., Kim, H., Fekete, J., Bouzek, K., Ray, A.K., Golovko, D. (2009). Nonylphenol, octylphenol, and bisphenol-A in the aquatic environment: A review on occurrence, fate, and treatment. *Journal of Environmental Science and Health Part A*, 44, 423-442.
- [6] Kawamura, Y., Ogawa, Y., Mutsuga, M. (2017). Migration of nonylphenol and plasticizers from polyvinyl chloride stretch film into food simulants, rapeseed oil, and foods. *Food Sci Nutr*, 5(3), 390-398.
- [7] Lyons, R., Van de Bittner, K., Morgan-Jones, S. (2014). Deposition patterns and transport mechanisms for the endocrine disruptor 4-nonylphenol across the Sierra Nevada Mountains, California. *Environmental Pollution*, 195, 123-132.
- [8] İşcan, M., Togan, İ., Tabak, İ., Uğuz, C., Ergüven, A., Eroğlu, Y., Zengin, M., Aktaş, M., Zengin, B. (2001). Deniz ve Akarsulardaki Kirliliğin Karadeniz'deki Ekonomik Değeri Yüksek Balıkların Stok ve Üremesi Üzerine Olan Etkisinin Belirlenmesi. T. C. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü. TAGEM / HAYSÜD /98/12/02/00.
- [9] Uğuz, C., Togan, İ., Eroğlu, Y., Tabak, İ., Zengin, M., İşcan, M., (2003). Alkylphenol concentrations in two rivers of Turkey. *Environ Toxicol Pharm*, 14, 87-88.
- [10] İşcan, M., Togan, İ., Severcan, F., Uğuz, C., Ergüven, A. (2005). Sakarya Nehri ve Değirmenderesi'nde Alkilfenol Kirliliği ve Nonilfenol'ün Alabalıklar (*Onchoryncus Mykiss*) Üzerine Etkileri. *The Sientific and technical Research Council of Turkey*. 286.
- [11] Zemheri, F., ve Uğuz, C., 2016. Determining Mutagenic Effect of Nonylphenol and Bisphenol A by Using Ames/*Salmonella*/Microsome Test. *Journal of Applied Biological Sciences*, 10(3), 09-12.
- [12] Li, X., Zhou, L., Ni, Y., Wang, A., Hu, M., Lin, Y., Hong, C., Wan, J., Chen, B., Fang, L., Tong, J., Tong, X., Tao, S., Tian, H. (2017). Nonylphenol Induces Pancreatic Damage in Rats through Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Stress. *Toxicology Research*. Toxicol. Res., 6, 353-360.
- [13] Yücedağ, F., Okur, E., Uğuz, C., Zemheri, F., Kuzu, S., Ayçiçek, A., Kahveci, O.K. (2014). The 875 effects of nonylphenol on hearing in rats. *Int. Adv. Otol.*, 10(1), 76-9.
- [14] Ergün, S. S., Üstüner, B., Alçay, S., Sağırkaya, H., Uğuz, C. (2014). The Effects of Nonylphenol on Gamete Physiology in Bovine. *Journal of Applied Biological Sciences*, 8(2), 32-38.
- [15] Prokop, Z., Hankova, L., Jerabek, K. (2004). Bisphenol A Synthesis – Modeling of Industrial Reactor and Catalyst Deactivation, *Reac. And Func. Polym.* 60, 77-83.
- [16] Johnson, I., Harvey, P. (2002). Study on The Scientific Evaluation of 12 Substances In The Context of Endocrine Disrupter Priority List of Actions European Commission, Wrc-Nsf Ref: Uc 6052.
- [17] Kosky, P.E., Guggenheim, E.K. 1991. The Aqueous Phase in the Interfacial Sythesis of Polycarbonates. 1. Ionic Equilibra and Experhmental Solubilities in the BPA-NaOH-H₂O System. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 30, 3.
- [18] ECB. (2003). European Chemicals Bureau, European Union Risk Assessment Report 4,4'-Isopropylidenediphenol (Bisphenol-A). Office for Official Publications of the European Communities, Einesc No: 201-245-8.
- [19] Zhang, J., Zhang, T., Guan, T., Yu, H., Li, T. (2017). In vitro and in silico assessment of the structure-dependent binding of bisphenol analogues to glucocorticoid receptor. *Anal Bioanal Chem.*, 409,8,2239-2246.
- [20] Wenzel, A., Muler, J., Ternes, T. (2003). Study on Endocrine Disrupters in Drinking Water Final Report, Schmalleberg and Wiesbaden Env.D.1/Etu/2000/0083.
- [21] Sağlık Bakanlığı T.C. Sağlık Bakanlığı, Temel Sağlık Bülteni. (2008). Yıl:3 Sayı:24 Kasım 2008 'Ayn Mesajı' syf:3.

- [22] Seachrist, D.D., Bonk, K.W., Ho, S.M., Prins, G.S., Soto, A.M., Keri, R.A. (2016). A review of the carcinogenic potential of bisphenol A. *Reprod Toxicol.*, 59,167-82.
- [23] Snyder, R.W., Maness, S.C., Gaido, K.W., Welsch, F., Sumner, S.C.J., Fennell, T.R. (2000). Metabolism and Disposition of Bisphenol A in Female Rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 168, 225-234.
- [24] Buckiova, D., Kyselova, V., Piknicova, J., Boubelik, M. (2001). Low Doses of Bisphenol A (BPA) Affect Fertility in CD Mice. *Reprod. Toxicol.*, 15, 459.
- [25] Beydoun, H.A., Beydoun M.A., Jeng, H. A., Zonderman, A. B., Eid, S.M. (2016). Bisphenol-A and Sleep Adequacy among Adults in the National Health and Nutrition Examination Surveys. *Sleep*. 39(2): 467–476.
- [26] Öner, Y., Canpolat, Ö., Elmacı, C. (2012). Nutrigenomik ve Hayvan Beslemedeki Uygulamaları. *Hayvansal Üretim*. 53(1), 49-54.
- [27] Okutucu, B., Pehlivan, S. (2003). Revers-Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) ve Uygulama Alanları. *ARŞİV.12*, 138.
- [28] Tuncer, S., Demirci, M. (2011). Dental Materyallerde Biyouyumluluk Değerlendirmeleri. *Atatürk Üniv. Diş Hek. Fak. Derg.* Cilt:21, Sayı: 2, Sayfa: 141-149.
- [29] Uğuz, C., Erdoğan, M., Sevimli, A., Onrat, S.T., Özdemir, M., Lenger, F.Ö., Arıkan, E.S., Bayram, İ., İşcan, M., Togan, İ. (2004). Nonilfenol'ün Bildiricilerde Histopatolojik Ve Moleküler Düzeydeki Etkileri. *Türk Biyokimya Dergisi*, 29 (1), 1-176.
- [30] Vivacqua, A., Recchia, A.G., Fasanella, G., Gabriele, S., Carpino, A., Rago, V. (2003). The food contaminants bisphenol A and 4-nonylphenol act as agonists for estrogen receptor alpha in MCF7 breast cancer cells. *Endocrine.*, 22(3), 275-284.
- [31] Balakrishnan, B., Thorstensen, E., Ponnampalam, A., Mitchell, M. D. (2011). Passage of 4-Nonylphenol across the human placenta. *Placenta*. 32, 788-792.
- [32] Sise, S., Uguz, C. (2017). Nonylphenol in Human Breast Milk in Relation to Sociodemographic Variables, Diet, Obstetrics Histories and Lifestyle Habits in a Turkish Population. *Iran J Public Health*, 46,4,491-499.
- [33] Uğuz, C., Varışlı, O., Ağca, C., Ağca, Y. (2009). Effects of nonylphenol on motility and subcellular elements of epididymal rat sperm. *Reproduct. Toxicol.*, 28(4), 542-549.
- [34] Lukac, N., Lukacova, J., Pinto, B., Knazicka, Z., Tvrdá, E., Massanyi, P. (2013). The effect of nonylphenol on the motility and viability of bovine spermatozoa in vitro. *Journal of Environmental Science and Health, Part A* 48, 973-979.
- [35] Uğuz, C., Varışlı, O., Ağca, C., Ağca, Y. (2014a). Effects of Nonylphenol on Motion Kinetics, Acrosome and Mitochondrial Membrane Potential in Frozen-Thawed Bull Sperm. *Kafkas Üniv. Vet. Fak. Derg.*, 20(4), 583-590.
- [36] Uğuz, C., Varışlı, O., Ağca, C., Ağca, Y. (2014b). In vitro effects of nonylphenol on motility, mitochondrial, akrozomal and chromatin integrity of ram and boar spermatozoa. *Andrologia*, 3, 1-10.
- [37] Watanabe, M., Ohno, S., Nakajin, S. (2012). Effects of bisphenol A on the expression of cytochrome P450 aromatase (CYP19) in human fetal osteoblastic and granulosa cell-like cell lines. *Toxicology Letters*, 210, 95– 99.
- [38] Perera, F., Herbstman, J. (2011). Prenatal environmental exposures, epigenetics and disease. *Reproductive Toxicology*, 31, 363–373.
- [39] Palermo, F. A., Cocci, F., Nabissi, M., Polzonetti-Magni, A., Mosconi, G. (2012). Cortisol response to waterborne 4-nonylphenol exposure leads to increased brain POMC and HSP70 mRNA expressions and reduced total antioxidant capacity in juvenile sole (*Solea solea*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 156, 135-139.
- [40] Vetillard, A., Bailhache, T. (2006). Effects of 4-n-Nonylphenol and Tamoxifen on Salmon Gonadotropin-Releasing Hormone, Estrogen Receptor, and Vitellogenin Gene Expression in Juvenile Rainbow Trout. *Toxicological Sciences*, 92 (2), 537–544.
- [41] Howdeshell, K.L., Hotchkiss, A.K., Thayer, K.A., Vandenberg, J.G., Vom Saal, F.S. (1999). Exposure to Bisphenol A Advances Puberty. *Nature*, 401, 763-764.

Egzotik Hadronlar

Exotic Hadrons

Jale Y. SÜNGÜ¹ , Elşen VELİ^{1,2} 

¹Kocaeli Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Fizik Bölümü, 41380 Umutepe/İzmit

²Kocaeli Üniversitesi Eğitim Fakültesi, 41380 Umutepe/İzmit

Öz

Son yıllarda yapılan yüksek enerji fiziği deneylerinde Standart Model çerçevesinde bilinen parçacık yapıları dışında yeni parçacıklar dedekte edilmiştir. Bu gelişmeler, Standart Model ötesi fizik açısından oldukça önemlidir. İç yapısı nedeniyle egzotik parçacık diye adlandırılan bu parçacıkların hem deneysel, hemde teorik çalışmalara farklı bir yön vereceği düşünülmektedir. Bu parçacıklar bugüne kadar tam olarak açıklanamayan madde-antimadde asimetrisi, evrenin oluşumu, karanlık madde, karanlık enerji, nötron yıldızlarının iç yapısı gibi pekçok konu hakkında ipuçları verebilir. Ayrıca bu parçacıkların keşfi son yıllarda hadron spektroskopisine olan ilgiyi oldukça artırmıştır. Bu çalışmada, bugüne kadar tespit edilen egzotik parçacıkların kütle, kuantum sayıları, bozunma genişlikleri gibi temel özellikleri hakkında bilgi sunulacaktır.

Anahtar Kelimeler: Egzotik parçacık, gluontopu, hibritler, tetrakuark, pentakuark, hegzakuark, molekül yapılar, baryonyum

Abstract

In recent years, in the high energy physics experiments, new particles have been detected except for known particle structures in the Standard Model framework. These developments are also very important in terms of physics beyond the Standard Model. It is thought that particles in this different structure, which is called exotic particle due to internal structure, will give a different direction to both experimental and theoretical studies. These particles can give clues on the asymmetry of matter-antimatter, the formation of the universe, the dark matter, the dark energy, the inner structure of neutron stars, and so forth. Moreover, the discovery of these particles has widely increased the interest in hadron spectroscopy in recent years. In this work, information on the basic properties of exotic particles, such as mass, quantum numbers, and decay widths, which are detected until now, will be presented.

Keywords: Exotic particle, glueball, hybrids, tetraquark, pentaquark, hexaquark, molecular structures, baryonium

1. GİRİŞ

Standart Modelin bir parçası olan ve 1964 yılında Gell-Mann ve Zweig tarafından önerilen Kuark Modeli, hadronları en iyi açıklayan modeldir [1]. Bu modele göre, hadronlar kuark içeriklerine göre mezonlar ($q\bar{q}$) ve baryonlar (qqq veya $\bar{q}\bar{q}\bar{q}$) olarak sınıflandırılır. Standart Modele göre kuarklar arasındaki etkileşme gluonların alışverişi ile gerçekleşir. Kuark ve gluonlar arasındaki güçlü etkileşimi tanımlayan Kuantum Renk Dinamiği (KRD veya QCD), Abelyan olmayan $SU(3)$ simetrisine sahip yerel ayar alan teorisidir. KRD Lagranjyeni aşağıdaki şekilde tanımlanır:

$$L = \bar{\psi}_i \left(i\gamma^\mu (D_\mu)_{ij} - m\delta_{ij} \right) \psi_j - \frac{1}{4} G_{\mu\nu}^a G_a^{\mu\nu}, \quad (1)$$

burada

$$(D_\mu)_{ij} = \partial_\mu \delta_{ij} - igA_\mu^a T_{ij}^a \quad (2)$$

kovaryant türev, ψ_i kuark alanı ve A_μ^a gluon alanı, γ^μ Dirac matrisi ve $T^a = \lambda^a/2$, $SU(3)$ ayar grubunun üreteçleridir. KRD lagranjyeninden yararlanarak analitik olarak hadron spektrumunu elde etmek mümkün değildir. Büyük enerji bölgesinde veya küçük mesafelerde güçlü etkileşme sabiti küçük olduğundan, KRD'de seri açılımı kullanılarak hesap yapılabilir. Fakat düşük enerji

bölgesinde veya uzak mesafelerde etkileşme sabiti büyük olduğundan, KRD lagranjyenini kullanarak parçacıkların özelliklerini incelemek büyük zorluklar içermektedir. Bu enerji bölgesinde seri açılımı geçerli değildir ve parçacıkların incelenmesi pertürbatif olmayan yeni yöntemlerin kullanılmasını gerektirmektedir. KRD'de gluonların kendi kendileriyle de etkileşmeleri (özetkileşim) nedeniyle, bağlı gluon durumlarının da varolabileceği öngörülmektedir. Gluonların birbiri ile etkileşmesi teoriyi nonlineer yapmakta ve bazı özel durumlarda yaklaşık yöntemler kullanılarak teorik hesaplar yapılabilmektedir. KRD'ye göre renk kuantum sayısı nötr olacak şekilde bir parçacık oluşturmak üzere farklı kuark ve/veya gluon kombinasyonları da mümkündür [2].

Ayrıca derin elastik olmayan saçılmaların detaylı incelenmesi sonucu artık mezonların basit bir $q\bar{q}$ yapısına sahip olmadıklarını biliyoruz; Renkli kuarklar KRD vakumu ile etkileşme halinde olduğundan, kuark ve gluon yoğunmaları kutuplanır ve mezonik dalga fonksiyonu, sanal $q\bar{q}$ çiftleri ve gluonik alan konfigürasyonlarını içerir. Bu nedenle Örgü (Lattice) KRD'den ve KRD'den ilham alan modellerden sıradan spektrumun ötesinde öngörüler bekleniyor. Bu yeni durumlar bilinmeyen ve farklı üretim ve/veya bozunma özelliklerine sahip olabilir.

1974 yılında J/ψ ($c\bar{c}$) parçacığının keşfinden sonra yaşanan en ilginç olaylardan birisi, 2003 yılında BaBar işbirliği ile $D_s(2317)$ parçacığının dedekte edilmesi olmuştur. Bu parçacığın keşfi ile yüksek enerji fiziğinde yeni bir dönem başlamıştır. Ardından CLEO, Belle, DO, CDF, LHCb, BES, v.b. işbirlikleri ile deneyler yapılmış ve çok sayıda yeni ve farklı yapıdaki parçacıklar bulunmuştur [3-8]. Standart olmayan doğalarından dolayı, bu yeni gözlemlenen parçacıklara "egzotik parçacıklar" adı verildi. Bu ilginç yapılar: XYZ parçacıkları, gluontopları (glueball) veya gluonyum, hibritler ($q\bar{q}g$ veya $qqqg$), mezon molekülleri ($qq\bar{q}\bar{q}$), tetrakuarklar ($qq\bar{q}\bar{q}$), pentakuarklar ($qqqq\bar{q}$) ve hegzakuarklar ($qqqqq\bar{q}$ veya $\bar{q}\bar{q}\bar{q}\bar{q}\bar{q}$) veya dibaryonlar ($qqq\bar{q}\bar{q}\bar{q}$). Son yıllarda geleneksel durumların listesine yeni bulunan, h_c , $\chi_{c2}(2P)$, B_c^+ ve $\eta_b(1S)$ durumlarının eklendiği çalışmalar oldu. Bunlara ilaveten beklenmedik ve hala net bilgilere sahip olmadığımız $X(3872)$ ve bir düzineden fazla diğer çarmonyum ve botonyum benzeri XYZ durumları keşfedildi. Bu parçacıkların Standart Kuark Modelinin dışında kaldığı düşünülmektedir. Bunların birçoğunun hala deneysel doğrulanmaya ihtiyacı vardır [9,10].

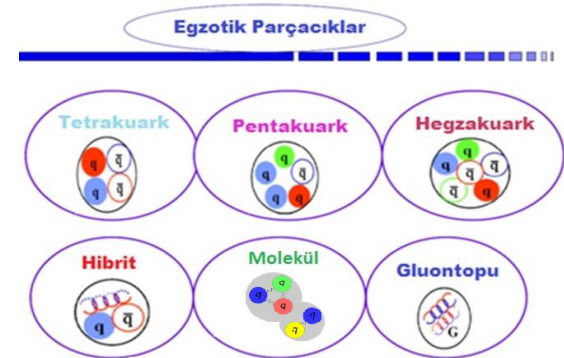
Bu makalede son yıllarda keşfedilen çok sayıda egzotik parçacık sınıflarından ve bu yeni tipteki parçacıkların temel özelliklerinden kısaca bahsedilecektir. Bu yeni durumların daha hassas ve

yeni ölçümler yapılarak doğrulanması gerekmektedir.

II. EGZOTİK PARÇACIKLARIN SINIFLANDIRILMASI

Son yıllarda yüksek enerji fiziği laboratuvarlarında bildiğimiz parçacık yapılarından farklı çok sayıda egzotik mezon ve baryon tespit edilmesi bu konudaki deneysel ve teorik çalışmalara hız kazandırmıştır. Egzotik parçacık terimi, Standart Modeldeki herhangi bir parçacığın özelliklerine benzemeyen farklı özelliklere sahip parçacıkları tanımlamakta kullanılır.

Bu çalışmada, kuark ve gluon içerikli olup Standart Kuark Model ile açıklanamayan egzotik parçacıklar ele alınacaktır. Literatürdeki bazı çalışmalarda Büyük Birleşik Teorilerinin X&Y ayar bozonları, Higgs bozonu, monopol (tek manyetik kutup) ve benzeri egzotik parçacıklar olarak yer almaktadır. Deneysel teknolojilerdeki son gelişmeler, aranan parçacığa ait sinyaller ile arkaalan sinyallerinin daha iyi ayırt edilmesi sonucunda egzotik parçacıkların dedekte edilmesini kolaylaştırmıştır. Bu parçacıklar genel olarak aşağıdaki şekilde sınıflandırılabilir:



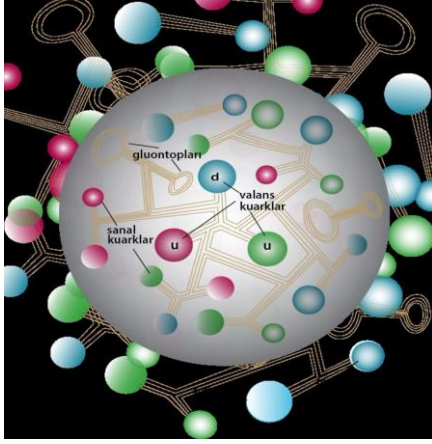
Şekil 1. Egzotik parçacık sınıfları [11].

Gözlemlenen hadronik spektrumun açıklanmasında, özellikle de ağır çeşni sektöründe Standart Kuark Modeli oldukça başarılıdır. Bununla birlikte, hafif hadronik spektrumun açıklanmasında Kuark Model yetersizliklere sahiptir. Böylece hafif hadron spektroskopisini inceleyerek KRD vakumu, ebedi hapsolme ve benzeri özellikler anlaşılabilir.

2.1 Gluontopları

İlk kez Fritsch ve Gell-Mann, 1972'de gluonlardan oluşan mezonlar olabileceği fikrini önesürdüler [12]. Bu, protonların kuark yapısının keşfedildiği 1968 yılındaki SLAC derin-elastik olmayan saçılma deneyinden yaklaşık dört yıl sonra idi. 1975'de Fritsch ve Minkowski [13] gluontopu durumlarının yeni bir madde türü olabileceğini, bu durumların varlığının doğrudan kuark-gluon alan teorisinin sonucu olduğunu söylediler. Literatürde

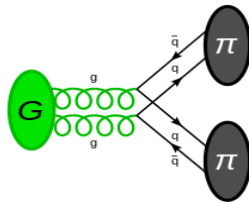
gluonyum terimi bir $g\bar{g}$ durumu için kullanılırken gluontopu kavramı ise daha genel anlamda kullanılmaktadır.



Şekil 2. Protonun modern tasviri, $+1e$ elektrik yükü üreten üç valans kuarktan çok daha fazlasını içerir. Bu üç kuark, protonun kütlelerinin yalnızca yüzde 2'sini oluşturur. Gerisi sanal kuarkların ve yapışkan topların "denizinden" gelir [14].

1977'de D. Robson [15] makalesinde skaler mezonların ideal dokuzlu karışım olabileceğini belirtti. Ayrıca kuantum sayısı $J^{PC} = 0^{-+}$ olan $\eta'(958)$ 'nin büyük bir kısmının gluontopu olarak ele alınabileceğini öngördü. O zamandan bu yana yaklaşık 40 yıl geçmesine rağmen hala net bir bilgiye sahip değiliz.

Skaler mezonları anlamak özellikle önemlidir, çünkü bu parçacıklar vakumla aynı kuantum sayılarına sahiptirler ($J^{PC} = 0^{++}$). Bu nedenle vakum içine yoğunlaşabilir (yani vakum bu parçacıkları sogurup veya yayabilir) ve $U(N_f) \times U(N_f)$ bir global kiral simetriyi kırabilirler. Bu simetrinin nasıl kırıldığıın ayrıntıları parçacık fiziğinin önemli problemlerinden biridir. Skaler mezonların iç yapıları uzun süredir devam eden bir bulmacadır. Yaklaşık son 40 yıldır fizikçiler gluontopu denilen ve sadece gluonlardan oluşan hipotetik parçacıkları aramaktadır. Bu parçacıklar kararsız olduğundan sadece bozunmaları analiz edilerek dolaylı yollardan gözlemlenebilirler.



Şekil 3. π mezonlara bozunan gluontopları [16].

Skaler gluontopu spektrumunu incelemek için çok sayıda deney yapılmış ve özellikle 1 GeV'in üstündeki bölge önem kazanmıştır. Hafif

pseudoskaler mezonların aksine skaler mezonların özelliklerini anlamak çok daha önemlidir ve düşük enerjideki KRD için hala netleştirilmesi gereken bir konudur. Kütleleri 1GeV'in altındaki durumlar: $f_0(500)$ (veya sigma (σ) mezon) ve $f_0(980)$, $K_0^*(800)$ (veya kappa (κ) mezon) ve $a_0(980)$ mezonlar basit $q\bar{q}$ gösterimi ile açıklanamaz. Bununla birlikte kütleleri 1 GeV'in üstündeki $f_0(1370)$, $f_0(1500)$ ve $f_0(1710)$, $K_0^*(1430)$ ve $a_0(1450)$ gluontoplarına aday parçacıklar olarak görülebilir. $a_0(980)$ ve $f_0(980)$ parçacıkları literatürde geniş bir şekilde tartışılmakta ve bunların gluontopu olabileceği gibi $K\bar{K}$ molekül durumu, tetrakuark durumu veya $q\bar{q}$ mezon durumları olabileceği de düşünülmektedir. Ayrıca $f_0(1710)$ adı verilen parçacığın uzun zamandır aranan gluontopu olduğuna dair güçlü deliller önesürülmüştür. Basitleştirilmiş model hesaplamaları $f_0(1500)$ ve $f_0(1710)$ 'un gluontopu adayları olduğuna göstermektedir [17].

Örgü Teorisi, KRD toplam kuralları, akı tüpü ve gluon bileşenli modeller en hafif gluontoplarının kuantum sayılarının $J^{PC} = 0^{++}$ ve $J^{PC} = 2^{++}$ olduğu konusunda hemfikirlerdir. Örgü Teorisine göre, gluontoplarının kütleleri uyarılmış durumlar (2^{++}) için yaklaşık 2300MeV, 0^{++} kuantum numaralı temel durumlar için ise 1600 – 1700MeV kütle aralığındadır [18-21]. 0^{+-} ve 0^{-+} , 0^{+-} , 1^{-+} , 2^{+-} , vb. gluontopu durumlarının kütlelerinin 2GeV üzerinde olması beklenmektedir [21]. Ayrıca Örgü Teorisine göre gluontopları kompakt nesnelere ve skaler gluontoplarının yarıçapı yaklaşık 0.3 fm'dir [22].

Gluontopu üretimi için en göze çarpan süreç ışınal J/ψ bozunumudur. J/ψ 'nin bozunma genişliği dardır; $D\bar{D}$ eşiği J/ψ kütlelerinin üstündedir ve OZI kuralı, $c\bar{c}$ sisteminin hafif kuarklara dönüşmesini engeller. Bozunmaların çoğunda, J/ψ , üç gluona bozularak hadronlara dönüşür. Ancak J/ψ iki gluon ve bir fotona da bozulanabilir. Foton dedekte edilebilir, iki gluon ise etkileşime gluontopları oluşturabilirler. Ayrıca, yapılan çalışmalar, merkezi çarpışmalarda gluontoplarının bol miktarda üretileceğini gösterir. Merkezi çarpışmalarda iki hadron birbirine hemen hemen dokunmadan geçer ve ileri yönde kırılarak dağılırlar, valans kuarklar ise değiş-tokuş yapmaz. Süreç genellikle Pomeron-Pomeron saçılması olarak adlandırılır. Üretim sürecine valans kuarkların katılmaması merkezi çarpışmaları gluontoplarının araştırılması için uygun bir çalışma alanı yapar. Ayrıca $p\bar{p}$ yokoluşunda, kuark-antikuark çiftleri gluontopları oluşturabilir.

2014 yılında Thomas Jefferson Ulusal Hızlandırıcısında (JLAB) başlayan GlueX deneyi gluontoplarını dedekte edebilmek amacıyla dizayn edilmiştir. Bu deneyin ana amacı kuarkları birarada

tutan gluon alanının uyarılmasıyla oluşan egzotik mezonların spektrum haritasını çıkarıp, KR'D' nin hala tam olarak açıklanamayan ebedi hapsolme olayının doğasını anlamaktır. Deneyde egzotik durumları oluşturmak için fotoüretim (bir nükleon üzerinden gerçek bir fotonun saçılması) tekniği kullanılmaktadır. GlueX dedektöründe 12GeV enerjilere kadar çıkıldı. Gluontopu spektroskopisinin en önemli sorunu, gluontoplarının bilinen ve egzotik hadron durumları ile karışması ve bu nedenle deneylerde tespit edilmesinin zor olmasıdır. Gelecekte GlueX, CLAS12, BESIII ve PANDA deneylerinden elde edilecek verilerle gluontopları hakkında daha net bilgilere ulaşılabilmektedir.

2.2 Tetrakuarklar

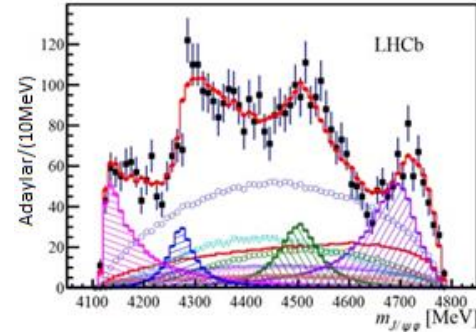
1977 yılında Jaffe $\kappa, a_0(980), f_0(980)$ ve σ parçacıklarının bilinen parçacık yapısında olmadığını öngören ilk modeli önerdi [23]. Bu parçacıklar tetrakuark yapıda olabilirlerdi. Egzotik parçacıklardan biri olan tetrakuarklar, belirli bir renk kuantum sayısına sahip iki kuark ve uygun iki anti-renk yüküne sahip, iki antikuarkın biraraya gelmesi ile ($[q\bar{q}][q\bar{q}]$) oluşurlar. Bu parçacıkların keşfi, yıldızların evrimini anlamak bakımından oldukça önemlidir. Bilim adamlarına göre nötron yıldızlarındaki maddenin bir kısmı nötronlar, bir kısmı ise standart kuark modeli çerçevesindeki hadronlar, bir kısmı ise egzotik parçacıklar olabilir. Tetrakuarklar, B mezonların bozunumu sonucu oluşurlar ve yaşam süreleri yaklaşık 10^{-24} saniyedir. Bu yeni parçacıklar farklı uyarılmış durumlarda bulunarak, farklı kütleler kazanırlar.

2003 yılında Japonya'daki Belle deneyinde ilk kez dört kuark içerdiği düşünülen $X(3872)$ parçacığının gözlemlendiği bildirildi [4]. Ancak yeterli kanıt mevcut değildi. 2007 yılında keşfedilen $Y(4660)$ parçacığının da bir tetrakuark olabileceği önerildi [25,26]. 2009'da Fermilab $Y(4140)$ adını verdikleri yeni bir parçacık bulduklarını duyurdular [27]. Bu parçacık iki mezona bozunuyordu. Bu parçacığın tılsımlı ve anti-tılsımlı kuark içerebileceği düşünüldü. Daha sonra 2010 yılında $Y(5S)$ mezonunun tetrakuark rezonansı olduğu önerildi [28]. 2008 yılında ilk kez Belle İşbirliği, B mezonların bozunumunda $Z(4430)$ adı verilen bir egzotik parçacığı dedekte ettiklerini bildirdi [29]. Bu parçacık daha sonra LHCb tarafından proton-proton çarpışmasındaki 25.000'den fazla veri analiz edilerek B mezon bozunumu ile doğrulandı [30].

2013'de iki bağımsız grup $Z_c(3900)$ adını verdikleri parçacığı keşfettiklerini bildirdiler [31]. Bu parçacık $Y(4260)$ parçacığı bozduğunda gözlenmiştir ve dört kuark içerdiği

düşünülmektedir. 2015 yılında, Çin'deki BESIII (Beijing Elektron Pozitron Çarpıştırıcısı III) işbirliği nötr $Z_c(3900)$ parçacığını dedekte etti. Bu parçacık bir nötr pion ve bir mezona bozunuyordu. Bu sonuçlar B^+ mezonunun $J/\psi, \phi$ ve K^+ mezonlarına bozunması sırasında gözlemlendi [32].

Sonuç olarak, 2014 yılında LHC tetrakuarkların varlığını doğruladı ve bu parçacıkların atomun yapısına benzer şekilde yapıya sahip olduğunu bildirdi. Bu yapılarda kuarklar daha yüksek enerji seviyelerine atlayıp, uyarılabiliyordu. Kuarkların enerji konfigürasyonu, egzotik yapıların kütle ve kuantum sayılarını belirlemekteydi. Daha büyük kütlere sahip olan gözlemlenen yeni parçacıklar ise, $X(4140), X(4274), X(4500)$ ve $X(4700)$ diye adlandırıldı [33]. Her dört parçacıkta aynı kuark yapısına sahip olmasına rağmen, her biri farklı kütle ve kuantum sayılarına sahiptir. Bu parçacıkların herbiri iki c ve iki s kuark içerir.



Şekil 4. Grafiğin alt kısmındaki dört pik $X(4140), X(4274), X(4500)$ ve $X(4700)$ egzotik parçacıklarını işaret eder (Görüntü: CERN, [33]).

Temmuz 2015'de Fermilab Tevatron çarpıştırıcısında gerçekleştirilen DO deneyi sonucunda 5.1σ istatistik ağırlık ile $X(5568)$ adı verilen yeni bir parçacık keşfedildiği duyuruldu [34]. Aslında Tevatronun çalışması 2011 yılında durdurulmuştu. Ama çarpışma sonucu elde edilen milyarlarca verinin analizi ancak yapılabildi. Parçacık fiziğinde 5σ bir keşif yapmak için gerekli olan istatistik ağırlıktan daha büyüktür. Bu parçacığın bir b, s, u ve d kuarklarını içerdiğini öngördüler. Bu parçacığın en ilginç özelliği, diğer tetrakuark ve pentakuarklara benzememesidir; dört farklı çeşnili kuark ve antikuark içerir. Ancak bu keşif CERN tarafından henüz doğrulanmamıştır. Ancak bu konuda LHCb'de çalışmalara devam edilmektedir [35].

2.3 Molekül Yapılar

Kuark modelde, dörtlü-kuark durumları genellikle iç yapılarına göre $[qq][\bar{q}\bar{q}]$ ve $[q\bar{q}][q\bar{q}]$ olarak sınıflandırılır. Bu iki tip dörtlü kuarklardan ilki

$[qq]$ $[\bar{q}\bar{q}]$ tetrakuark durumu olarak adlandırılmış ve MIT torba modeline göre incelenmiştir. Hafif kuark içeren bu tür egzotik parçacıklara hafif tetrakuarklar denir. İkinci tipi ise iki hafif mezonun birbiri ile etkileşmesi sonucu oluşur ve molekül olarak adlandırılır. Bu iki yapının iç dinamiklerinin birbirinden farklı olması beklenir. Bu farklılık kendini, bu parçacıkların güçlü bozunmalarıyla sergileyebilir. Hadronik bir molekül, güçlü kuvvet ile birbirine zayıf bağlı mezon-mezon, baryon-baryon veya mezon-baryon kümesidir denilebilir.

Beklenmedik bir şekilde XYZ olarak bilinen çok sayıda çarmonyum benzeri durumların keşfi, hadronik spektrumun teorik olarak daha detaylı incelenmesini gündeme getirmiştir. Tılsımlı hadron sektöründe de (D ve D_s mezonlar) benzer bir şaşkınlık yaşandı. B fabrikaları çok dar bozunma genişliğine sahip iki parçacık tespit etti: $D_{s0}^*(2317)^\pm$ ve $D_{s1}(2460)^\pm$ [3]. Bu durumlar için ölçülen deneysel kütle ve genişlikler Standart Kuark Modellerinden beklenenden çok daha küçük ve dardı. Bu parçacıkların kütlesi $c\bar{s}$ mezonlar için beklenen kütleden daha küçük bir değere sahiptir. Bu nedenle $D_{s0}^*(2317)^\pm$ ve $D_{s1}(2460)^\pm$ dörtlü tetrakuark durumları veya DK (DK^*) molekül durumu olarak yorumlanabilirler [36,37].

2003'te Belle deneyi tarafından keşfedilen $X(3872)$ ve 2007'de keşfedilen $Z(4430)$, molekül grubundaki en iyi adaylardır. Ayrıca $Z_b(10610)$ ve $Z_b(10650)$ durumları da molekül yapı adaylarıdır. $X(3872)$ 'nin $D\bar{D}^*$ eşik kütlesine ve bozunma özelliklerine yakın olması onun $J^P = 1^{++}$ kuantum sayılı zayıf bağlı bir durum olarak kabul edilmesine sebep oldu. $D\bar{D}$ kütle eşiği üzerinde dedekte edilen durum sayısı potansiyel modelin öngördüğü çarmonyum durumlarından çok daha fazladır. Bu tür ağır kuark içeren tetrakuark durumlarına çarmonyum benzeri veya "XYZ parçacıkları" denir. Bu durumlar arasında kuantum sayısı $J^P = 1^{--}$ olan pekçok vektör parçacık vardır: $Y(4260)$, $Y(4360)$ ve $Y(4660)$ [38].

2017 yılının Mart ayında Beijing Spektrometre Deneyi (BESIII), yeni çarmonyum benzeri durumların gözlemlendiğini bildirdi. Deney, BEPCII hızlandırıcısında BESIII dedektörü ile $e^+e^- \rightarrow \pi^+\pi^-J/\psi$ ve $e^+e^- \rightarrow \pi^+\pi^-h_c$ tesir kesitlerini yüksek hassasiyetle ölçmüş ve her iki bozunma modunda da rezonans yapılar gözlenmiştir. İlk yapı $Y(4220)$ yaklaşık 4.22GeV kütlesi ile her iki modda da görüldü. $Y(4320)$ parçacığı $e^+e^- \rightarrow \pi^+\pi^-J/\psi$ sürecinde, $Y(4390)$ ise $e^+e^- \rightarrow \pi^+\pi^-h_c$ reaksiyonunda görüldü [39]. Bunlar vektör parçacıklardır ve bilinen vektör çarmonyum ve çarmonyum benzeri herhangi bir durumdan farklıdır. Yapılan deneylerde kütleleri 4 ile 4.6GeV aralığında bulunan çok sayıda vektör parçacıklar gözlemlenmiştir. Bu bölge, bir tılsımlı kuark-antikuark içeren birçok egzotik hadron için

kütle bölgesidir. Bu durumların araştırılması molekül yapıların anlaşılması bakımından oldukça önemlidir.

2.4 Baryonyum, Dibaryon ve Hegzakuarklar

Altı kuarktan, farklı yapıda parçacıklar oluşabilir. Eğer altı kuarktan oluşan bir parçacık varsa, baryon sayısı ikidir ve bu parçacığa "dibaryon" adı verilir. Üç kuark ve üç anti-kuarktan oluşan bir durum için baryon sayısı sifıra eşittir ve bu duruma "baryonyum" denir. Deneylerde baryonyum durumları, mezonlar ve tetrakuarklar ile karışabilir. Tam tersine, dibaryonlar, baryon sayısı korunumundan ötürü sıradan hadronlarla karışmaz ve daha kolay tespit edilebilirler. Ayrıca üç kuark ve üç antikuarktan oluşan sistemlere "hegzakuark" da denir. Tetrakuarklar ve pentakuarklar gibi, hegzakuarklar da çoklu kuark ya da bir baryon-baryon molekülü şeklinde varolabilirler.

İki nükleonun bağlı durumu olarak öngörülen baryonyumun keşfi tam olarak netlik kazanmamıştır. Bugüne kadar sadece birkaç olası baryonyum adayı belirlendi. Sadece $p\bar{p}$ yokoluşunda görülen [40,41] $f_2(1565)$ durumunun baryonyum adayı olduğu düşünülmektedir. Belle deneyinde $\sqrt{s} = 4.63$ GeV civarında $e^+e^- \rightarrow \Lambda_c^+ \Lambda_c^-$ bozunmasında gözlenen sinyal $Y(4660)$ tılsımlı baryonyum olarak yorumlanmış ve tam olarak netlik kazanmamıştır [42,43,44]. Şimdiye kadar gözlemlenen tek altı kuark içerikli parçacık, u ve d kuarklardan oluşmuş $d^*(2380)$ dibaryondur. Hegzakuarkların yaşamının 2/3'ünü kompakt bir hegzakuark formunda, 1/3'ünü ise bir molekül olarak geçirdiği düşünülüyor. Edinburgh nükleer fizik grubu, $d^*(2380)$ 'in gerçek doğasını saptamak ve daha ağır kuark sektörlerinde diğer durumların varlığını ortaya koymak için bir dizi yeni deneysel çalışmaya öncülük etmektedir [45].

2.5 Hibrit mezonlar

Standart kuark modelinde mezonlar $q\bar{q}$ yapısına sahip olup, $I(J^{PC})$ kuantum sayıları ile karakterize edilirler. Burada I izospin, J toplam açıl momentum, P parite ve C yük eşleniğidir. L kuark ve antikuarkın görelî yörüngesel açıl momentumu, S ise $q\bar{q}$ çiftinin toplam iç açıl momentumu olmak üzere, $P = (-1)^{L+1}$ ve $C = (-1)^{L+S}$ ile verilir ve mezonların kuantum sayıları $J^{PC} = 0^{-+}, 0^{++}, 1^{--}, 1^{+-}, 1^{++}, 2^{--}, 2^{-+}, 2^{++}, \dots$ şeklindedir. Ancak KRD teorisine göre, mezon spektrumu oldukça zengindir. Uyarılmış gluon alanları mezonun kuantum sayılarına katkı verir. Bu tip parçacıklar yani, bir $q\bar{q}$ ve salınım yapan gluon sistemi hibrit olarak adlandırılır. Gluon alanları vakum durumundan daha farklı kuantum sayıları taşıyabileceklerinden, hibritler $J^{PC} = 0^{-+}, 0^{++}, 1^{-+}, 2^{+-}, \dots$ egzotik kuantum sayılarına

sahip olabilirler. Yüksek hassasiyetli yeni deneyler doğadaki bu tip yapıların varlığı hakkında ipuçları vermektedir.

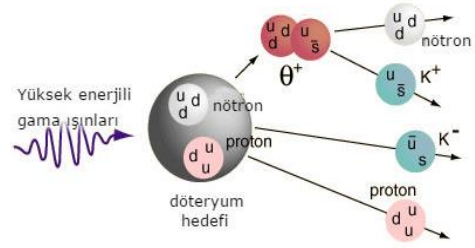
Hibritlerin kütlelerinin yaklaşık 2GeV civarında olması ve iki mezona bozunması beklenmektedir. Kuantum sayıları $0^{-+}, 1^{-+}, 1^{--}$ ve 2^{-+} olan temel durumdaki hibrit parçacıkların kütle değerlerinin 1.7 – 1.9GeV aralığında olması bekleniyor. Örgü Teorisine göre ise 1^{-+} egzotik kuantum sayılarına sahip hibritlerin kütlesi yaklaşık $1.9 \pm 0.2\text{GeV}$ 'dir[46,47]. Araştırmacılara göre $\pi_1(1370)$ en düşük kütleli egzotik mezondur. Ancak bu parçacık hibrit olabileceği gibi, tetrakuark da olabilir. Kuantum sayısı bize bu parçacığın iki olasılıktan hangisi olduğu konusunda bir ipucu vermez. Ayrıca $\pi_1(1440), \pi_1(1625)$ ve $\pi_1(2000)$ 'inde hibrit olma ihtimali görülüyor [48,49]. Bir diğer 1^{-+} durumu olan $\pi_1(1600)$ 'ün COMPASS deneyinde 190GeV enerjili pionların kurşun bir hedefe çarptırılarak $\rho\pi$ 'ye bozunduğu dedekte edildi [50]. Ayrıca $J^{PC} = 0^{-+}, 1^{--}$ ve 2^{-+} olan hibrit adaylarının bulunduğu da rapor edildi [51,52].

2.6 Pentakuarklar

Yüksek enerji fizikçileri dört kuark ve bir antikuaraktan oluşan baryonların varolabileceğini önesürdü. 1997'deki bir makalesinde Diakonov ve grubu u, d ve s kuarklardan oluşan, spini $\frac{1}{2}$ ve pozitif pariteli bir egzotik baryonun varolabileceğini öngördü [53]. Bu gibi parçacıklar renk kuantum sayısı açısından nötrdür, kararsız olurlar ve kolaylıkla baryonlara ve mezonlara dönüşürler.

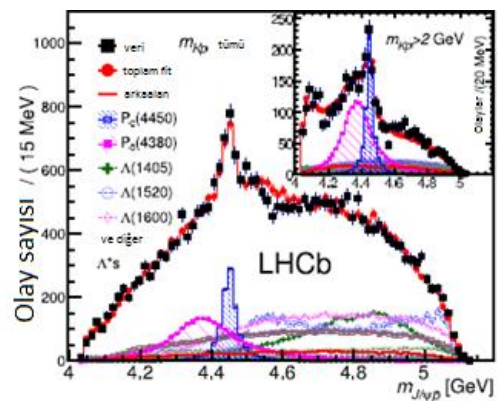
1986'da Moskova ITEP'deki kabarcık odası deneylerinde 1.54GeV'lik bir pik gözlemlendi. 1997 yılında Petersburg Nükleer Fizik Enstitüsünden bir grup bilim adamı pentakuarkların varlığını önesürdü. 1997/98 yılında Almanya Bonn'daki ELSA hızlandırıcısında alınan verilerin 25MeV'den küçük bozunma genişlikli ve 1.54GeV kütleli bir parçacığın varlığına işaret ettiği bildirildi. 2002'de Osaka üniversitesi'nden Prof. Nakano'nun grubu bir karbon hedefi X-ışınları ile bombardıman ederek pentakuarkların varlığına dair ipuçları buldular [54]. Pentakuarkların varlığına dair son kanıt 2003 yılında Amerika'daki Jefferson laboratuvarından geldi. Deneyde bir döteryum hedefi fotonlarla bombardıman edildi. 22MeV bozunma ömrüne sahip, 1.54GeV kütleli beş kuarktan oluşan bir baryona ait deliller bulundu [7]. $uudd\bar{s}$ içeriğine sahip bu yeni parçacığa *Theta-plus* (θ^+) adı verildi. Parçacığın toplam elektrik yükü

$+1e$ idi ve yaklaşık 10^{-20} s'de bir K^+ mezon ve bir nötrona dönüşüyordu.



Şekil 5. Bir döteryum hedefinin fotonlarla bombardıman edilmesi ve pentakuark parçacığının oluşumu [55].

Pentakuarkları destekleyen daha sonraki kanıtlar - 2e elektrik yüklü, 1862 MeV kütleli, $ssdd\bar{u}$ ve 3099 MeV kütleli, nötr, $uudd\bar{c}$ durumunun gözlenmesi ile geldi. Bu parçacıklara sırasıyla $\Phi(1860)$ and $\theta_c(3100)^0$ adları verildi [56,57]. 2015 yılında LHC'de yapılan deneyler sonucu proton kütlelerinden yaklaşık 4.7 kat ve diğeri bundan biraz daha ağır iki bilinmeyen parçacık tespit edildi. Yapılan analizlere göre bu parçacıklar bir c , bir \bar{c} , iki u ve bir d kuark içermekteydi. Gözlenen egzotik baryonlar 2015 yılında LHCb işbirliği ile $\Lambda_b^0 \rightarrow J/\psi p K^-$ bozunması ile keşfedilen ve iki tılsımlı kuark içeren pentakuarklar $P_c^+(4380)$ ve $P_c^+(4450)$ 'dir [7]. Bu tür parçacıkların geleneksel Standart Kuark Model ve onun yeni versiyonları ile açıklanması mümkün olmamış ve bu parçacıkların özelliklerini açıklamak için Tek-bozon-değiştirme modeli (OBE), Tek-pion-değiştirme modeli (OPE) gibi çeşitli teorik modeller önesürülmüştür.



Şekil 6. LHCb işbirliği ile keşfedilen $P_c^+(4380)$ ve $P_c^+(4450)$ baryonlar (Görüntü: LHCb [7]).

Tablo I. Egzotik mezon ve baryon adayları ($q = u, d, s$ kuark).

Parçacık	Olası İçerik	J^{PC}	Γ (MeV)	Yorum	Deney	Gözlemlendiği Bozunum
$f_0(500)$ veya σ	$u\bar{d}$ [ud][$\bar{u}\bar{d}$] $\pi\pi$	0^{++}	400 – 700	Gluontopu [58,59] Tetrakuark [23] Molekül [23]	E791[60] BESIII [61]	$\eta_c \rightarrow \eta\pi^+\pi^-$ $\chi_{c1} \rightarrow \eta\pi^+\pi^-$
κ veya $K_0^*(800)$	$u\bar{s}$ [ud][$\bar{d}\bar{s}$] [ud][$\bar{u}\bar{s}$] $K\pi$	0^+	547 ± 24	Tetrakuark [23] Molekül [23]	E791 [60]	$D^+ \rightarrow K^-\pi^+\pi^-$
$f_0(980)$	$u\bar{d}$ $\frac{us\bar{u}\bar{s} + ds\bar{d}\bar{s}}{\sqrt{2}}$ veya $us\bar{u}\bar{s}$ $K\bar{K}$	0^{++}	10 – 100	Gluontopu [62] Tetrakuark [23,63] Molekül [23,64,65] $a_0(980)$ ile karışım [66]	E791 [60] BESIII [62] CLEO [67] LHCb [68] Belle [69]	$D_s^+ \rightarrow \pi^+[\pi^+\pi^-]$ $D_s^+ \rightarrow \pi^+[K^+K^-]$ $e^+e^- \rightarrow \varphi\gamma f_0(980)$ $B \rightarrow f_0(980)K$ $B \rightarrow J/\psi f_0(980)$ $f_0(980) \rightarrow \pi^+\pi^-$
$a_0(980)$	$u\bar{d}$ [ds][$\bar{u}\bar{s}$] $\frac{us\bar{u}\bar{s} - ds\bar{d}\bar{s}}{\sqrt{2}}$ [us][$\bar{d}\bar{s}$] $K\bar{K}$	0^{++}	50 – 100	Tetrakuark [23] Molekül [23,65]	Belle [70] BESIII [61] COSY [71] BaBar [72] KLOE [73]	$\eta_c \rightarrow \eta\pi^+\pi^-$ $\chi_{c1} \rightarrow \eta\pi^+\pi^-$ $pp \rightarrow ppK^+K^-$ $D^0 \rightarrow \bar{K}^0 a_0(980)$, $\bar{K}^0\varphi$, $K^- a_0^+(980)$ $e^+e^- \rightarrow \varphi$ $\rightarrow \gamma a_0(980)$
$f_0(1370)$	$u\bar{d}$	0^{++}	200 – 500	Tetrakuark [74] Gluontopu [75]	BESIII [61] GAMs [76] Crystal [77] Barrel [78] BaBar [79]	$D_s^+ \rightarrow \pi^+\pi^+\pi^-$ $D^0 \rightarrow \sigma f_0(1370)$ $J/\psi \rightarrow \gamma f_0(1370)$ $\psi(2S) \rightarrow \gamma f_0(1370)$ $\Upsilon(1S) \rightarrow \gamma f_0(1370)$ $\Upsilon(2S) \rightarrow \gamma f_0(1370)$
$\pi_1(1400)$	$u\bar{d}$ $\eta(1295)\pi$	1^{-+}	330 ± 35	Tetrakuark [80] Molekül [81]	GAMs [82] KEK [83] Crystal Barrel[84] E852 [85]	$\pi^-p \rightarrow (\eta\pi^-)p$ $p\bar{n} \rightarrow \pi^-\pi^-\pi^0\eta$
$\Lambda(1405)$	uds $\bar{K}N(S)$ $\pi\Sigma$ $\bar{D}^*\Sigma_c$	$1/2^-$	50.5 ± 2	Hibrit [86] Molekül [87,88,89,90]	Siddharta [91] LEPS [92] CLAS [93]	$\gamma p \rightarrow K^+\Lambda(1405)$

					HADES [94]	
$K_0^*(1430)$	$u\bar{s}$	0^+	270 ± 80	Gluontopu [95]	CERN-USSR [97]	$K^+p \rightarrow K^{*+}(1430)p$
$a_0(1450)$	$u\bar{d}$	0^{++}	265 ± 13	Gluontopu [95]	Crystal Barrel [98,99]	$\bar{p}p \rightarrow \eta' \pi^0 \pi^0$
$f_0(1500)$	$u\bar{d}$	0^{++}	109 ± 7	Gluontopu [95,96]	BES [100] BESIII [101]	$\bar{p}p \rightarrow \pi^0 K_L K_L$ $J/\psi \rightarrow \gamma f_0(1500)$ $f_0(1500) \rightarrow \pi\pi,$ $K\bar{K}, \eta\eta, \eta\eta'$ $J/\psi \rightarrow \gamma\eta\eta$
$f_2(1565)$	$u\bar{d},$ $\rho\rho + \omega\omega$	2^{++}	134 ± 8	$\bar{p}p$ baryonyum [40] Molekül [102]	Asterix [40] Obelix [103]	$\bar{p}p \rightarrow \pi^- \pi^+ \pi^0$ $\bar{n}p \rightarrow \pi^- \pi^+ \pi^0$
$\pi_1(1600)$	$u\bar{d}$	1^{-+}	241 ± 40	Hibrit [104]	CLEO [105] COMPASS [50] E852[106] VES [107]	$\chi_{c1} \rightarrow \eta' \pi^+ \pi^-$ $\pi^- p \rightarrow \pi^+ \pi^- \pi^-$ $\pi^- p \rightarrow (\eta^0 \pi^-) p$ $\pi^- p \rightarrow (\eta^0 \pi^0) n$
$\eta_2(1645)$	$u\bar{d}$	2^{-+}	181 ± 11	Hibrit [108]	Crystal Barrel [109]	$\bar{p}p \rightarrow \pi^0 \pi^0 \pi^0 \eta$
$\pi_2(1670)$	$u\bar{d}$	2^{-+}	260 ± 9	Hibrit [110]	E852 [50]	$\pi^- p \rightarrow \pi^+ \pi^- \pi^- p$
$f_0(1710)$	$s\bar{s}$	0^{++}	139 ± 8	Gluontopu [111,112]	GlueX [113] BESIII [114]	$\gamma p \rightarrow p\pi^0$ $\gamma p \rightarrow p\eta$ $J/\psi \rightarrow \gamma\eta\eta$
$f_0(1810)$	$u\bar{d}$	2^{++}	105 ± 20	Gluontopu [115]	BESIII [116,117]	$J/\psi \rightarrow \gamma\eta\eta$ $J/\psi \rightarrow \gamma\pi^0\pi^0$
$\pi(1800)$	$u\bar{d}$	0^{-+}	208 ± 12	Hibrit [118]	VES [118] COMPASS [119]	$\pi^- p \rightarrow \pi^+ \pi^- \pi^- p$
$\eta_2(1870)$	$u\bar{d}$	2^{-+}	225 ± 14	Hibrit [120,121]	WA102 [122]	pp $\rightarrow p_f (\pi^+ \pi^- \pi^+ \pi^-) p_s$
$D_{s0}^*(2317)^\pm$	$c\bar{s}$ [cq][$\bar{s}\bar{q}$] $c\bar{s}q\bar{q}$ DK	0^+	<3.8	Molekül [37,36,123] Tetrakuark [124,125]	BaBar [126] Belle [127] CLEO [128] Focus [129]	$\bar{p}p \rightarrow D_s^- D_{s0}^*(2317)^+$ $B \rightarrow D_{s0}^*(2317)^+ \bar{D}^*$ $e^+ e^- \rightarrow D_s(2317) \rightarrow D_s \pi^0$
$D_{s1}(2460)^\pm$	$c\bar{s}$ D^*K	1^+	<3.5	Molekül [123] Tetrakuark [124,125]	CLEO[128] BaBar [126] Belle [127]	$B \rightarrow D_{s1}(2460)^+ \bar{D}^*(*)$
$\Omega_c(3119)^0$	$c\bar{q}$ $sscq\bar{q}$ $\Xi_c K$ ve $\Xi_c' K$	$3/2^-$	$0.6-1.1$	Pentakuark [130] Molekül [131]	LHCb [132]	$\Xi_c^+ \rightarrow p K^- \pi^+$

$X(3823)$	$c\bar{c}$	2^{--}	<16	Hibrit [133]	Belle [134] BESIII [135] E705 [136]	$B \rightarrow KX(3823)(\gamma\chi_{c1})$ $e^+e^- \rightarrow \pi^+\pi^-X(3823)$ $\psi' \rightarrow J/\psi \pi^+\pi^-$
$X(3872)$	$c\bar{c}$ [cq][$\bar{c}\bar{q}$] $c\bar{c}q\bar{q}$ $D^0\bar{D}^{*0}$	1^{++} $/2^{-+}$	1.3 ± 0.6	Hibrit [137] Molekül [138] Tetrakuark [139,140]	Belle[4] BaBar [141] CDF[6], DO[142]	$B \rightarrow KX; p\bar{p}$ $X \rightarrow \pi^+\pi^-J/\psi$ $X \rightarrow \pi^+\pi^-\pi^0J/\psi$ $X \rightarrow \gamma J/\psi;$ $X \rightarrow \gamma\psi(2S)$ $X(3875) \rightarrow D^0\bar{D}^0\pi^0$
$Z_c(3900)^0$	$qc\bar{q}\bar{c}$	1^{+-}	29.6 ± 8.2	Tetrakuark [143]	BESIII [144] CLEO-c [145]	$e^+e^- \rightarrow \pi^0Z_c(3900)$ $\rightarrow \pi^0\pi^0J/\psi$
$Z_c(3900)^+$	$qc\bar{q}\bar{c}$ $D\bar{D}^*$	1^{+-}	35 ± 7	Tetrakuark [146] Molekül [147]	BESIII [31] Belle [148]	$e^+e^- \rightarrow \pi^\pm Z_c^\pm$ $Z_c^\pm \rightarrow \pi^\pm J/\psi$ $Z_c \rightarrow h_c\pi$ $e^+e^- \rightarrow \psi(4160)$ $\rightarrow \pi^\pm J/\psi$
$X(3915)$	$c\bar{c}$ $D\bar{D}^*$	0^{++} $/2^{++}$	20 ± 5	Molekül [2]	Belle [32], BaBar [149]	$B \rightarrow K(J/\psi\omega)$ $e^+e^- \rightarrow e^+e^-$ $\gamma\gamma \rightarrow J/\psi\omega$
$X(3940)$ veya $Y(3940)$	$c\bar{c}$ $D\bar{D}^*$	$?^{?+}$	37^{+27}_{-17}	Hibrit [150] Molekül [151,152]	Belle[153] BaBar [154]	$e^+e^- \rightarrow J/\psi Y$ $\rightarrow J/\psi(D\bar{D}^*)$ $B \rightarrow KY(3940)$ $Y \rightarrow J/\psi\omega$
$Z_c(4020)^\pm$	$sc\bar{s}\bar{c}$ $D\bar{D}^*$	1^{+-} $/2^+$	7.9 ± 3.7	Tetrakuark [155] Molekül [147]	Belle [156] BESIII [157]	$e^+e^- \rightarrow \pi[D\bar{D}^*]$ $e^+e^- \rightarrow \pi[h_c\pi]$ $e^+e^- \rightarrow \pi[\psi'\pi]$
$X(4140)$ veya $Y(4140)$	$c\bar{c}$ $c\bar{c}s\bar{s}$ $sc\bar{s}\bar{c}$ $D_s^*\bar{D}_s^*$	1^{++}	15^{+6}_{-5}	Hibrit [158] Molekül [159,160] Tetrakuark [161,162]	CDF [163] CMS [164] DO [165] LHCb [33] Babar [166]	$p\bar{p} \rightarrow B^+ \rightarrow Y(4140)K^+$ $\rightarrow K[J/\psi\phi]$ $B \rightarrow J/\psi KKK$
$Y(4220)$	$c\bar{c}g$ $D\bar{D}(2420)$	1^{--}	44.1 ± 4.3 0.5 ve 0.023	Hibrit [167] Molekül [168] Tetrakuark [169]	Belle [170] BESIII [8,171]	$e^+e^- \rightarrow \pi^+\pi^-\psi(2S)$ $e^+e^- \rightarrow \pi^+\pi^-h_c$ $e^+e^- \rightarrow \omega\chi_{cJ}$
$Y(4260)$	$c\bar{c}g$ [cq][$\bar{c}\bar{q}$] $\bar{D}D_1(2420)$ veya $D_0\bar{D}^*$ $\Lambda_c\bar{\Lambda}_c$ baryonyum	1^{--}	120 ± 12	Hibrit [172] Molekül [168] Tetrakuark [25] Baryonyum [173]	BaBar [174] Cleo [175] BESIII [31] Belle [176]	$e^+e^- \rightarrow \pi^+\pi^-J/\psi$ $e^+e^- \rightarrow \pi D\bar{D}^*$ $e^+e^- \rightarrow \chi_{c0}\omega$

$Y(4360)$	$[c\bar{q}][\bar{c}q]$	1^{--}	74 ± 18	Tetrakuark [155,25]	BaBar [177] Belle [178]	$e^+e^- \rightarrow \gamma\pi^+\pi^-\psi(3686)$
$P_c(4380)^+$	$c\bar{c}uud$ $\bar{D}^*\Sigma_c$	$3/2^+$	205 ± 90	Pentakuark [7] Molekül [179,180]	LHCb [7]	$\Lambda_b^0 \rightarrow J/\psi pK^-$
$Y(4390)$	$D^*\bar{D}_0^*(2400)$	1^{--}	153.2 ± 11.4	Molekül [168]	BESIII [39]	$e^+e^- \rightarrow \gamma\pi^+\pi^-h_c$
$Z_c(4430)^\pm$	$c\bar{c}u\bar{d}$ $D_1\bar{D}^*$ veya $D_2\bar{D}^*$	1^+	200_{-58}^{+49}	Molekül [29] Tetrakuark [181]	Belle [29, 182] BaBar [29] LHCb [30]	$\bar{B}^{-,0} \rightarrow K^{0,+}[J/\psi\pi^-]$ $B \rightarrow K[\pi^+J/\psi]$ $B \rightarrow KZ \rightarrow K^+[\psi'\pi^\pm]$
$P_c(4450)^+$	$c\bar{c}uud$ $\bar{D}^*\Sigma_c(S)$ ve $\bar{D}^*\Lambda_c$ karışımı	$5/2^+$	39 ± 20	Pentakuark [7] Molekül [180]	LHCb [7]	$\Lambda_b^0 \rightarrow J/\psi pK^-$
$X(4500)$	$c\bar{c}$ $cs\bar{c}\bar{s}$	0^{++}	$92 \pm 21_{-20}^{+21}$	Tetrakuark [183]	LHCb [184]	$B^+ \rightarrow K^+[J/\psi\phi]$
$X(4660)$ veya $Y(4660)$	$c\bar{c}$ $c\bar{c}g$ $\bar{c}c\bar{q}q$ $\psi'f_0(980)$	1^{--}	48 ± 15	Hibrit [185] Molekül [186] Tetrakuark [155]	Belle [187] BaBar [178]	$e^+e^- \rightarrow \pi^+\pi^-\psi(2S)$
$X(4700)$	$c\bar{c}$ $cs\bar{c}\bar{s}$	0^{++}	$120 \pm 31_{-33}^{+42}$	Tetrakuark [183]	LHCb [33]	$B^+ \rightarrow K^+[J/\psi\phi]$
$X(5568)$	$[bu][\bar{d}\bar{s}]$ $[bd][\bar{s}\bar{u}]$ $[su][\bar{b}\bar{d}]$ veya $[sd][\bar{b}\bar{u}]$ $s\bar{b}u\bar{d}$ $B\bar{K}$ veya $B^*\bar{K}$	0^+	21.9 ± 6.4	Molekül [188,189] Tetrakuark [190]	LHCb [35] D0 [34]	$X(5568) \rightarrow B_s^0\pi^+$ $B_s^0 \rightarrow J/\psi\phi$ $J/\psi \rightarrow \mu^+\mu^-$ $\phi \rightarrow K^+K^-$
$Z_b(10610)^0$	$b\bar{b}u\bar{d}$ $B^*\bar{B}^*$	1^{+-}	?		Belle [191]	$e^+e^- \rightarrow (\Upsilon(2, 3S)\pi^0)\pi^0$
$Z_b(10610)^+$	$b\bar{b}u\bar{d}$ $B^*\bar{B}^*$	1^{+-} 1^{++} $/0^{++}$ $/2^{++}$	18.4 ± 2.4	Molekül [147] Tetrakuark [192,193]	Belle [194]	$e^+e^- \rightarrow \Upsilon(10860) \rightarrow \pi[B^*\bar{B}^*]$ $\Upsilon(10860) \rightarrow \pi[\Upsilon\pi]$ $\Upsilon(10860) \rightarrow \pi[h_b\pi]$

III. SONUÇ

1964'te Murray Gell-Mann ve George Zweig tarafından önerilen ve hadronların sınıflandırılması

için en etkili model olan Kuark Modeli 2000'li yıllara kadar deneylerde gözlemlenen parçacıkların özelliklerini büyük ölçüde başarılı bir şekilde açıkladı. Bu modele göre mezonlar bir kuark-antikuark çiftinden ($q\bar{q}$), baryonlar ise üç kuarktan (qqq) oluşmaktadırlar. Güçlü etkileşimin kuramı Kuantum Renk Dinamiğine göre Standart Kuark Modelinin dışında farklı yapılaraya sahip hadronlar olabiliyordu. KRD'ye göre hadron spektrumu geleneksel Kuark Modelinin öngördüğü parçacık spektrumundan çok daha zengin ve geniş yapıya sahiptir. Standart Kuark Modelinin gözlemlenen tüm hadronların özelliklerini başarılı bir şekilde açıklayabilmesi Modelin dışında hadron yapılarının mevcut olamayacağı düşüncesini ortaya çıkardı. Uzun yıllar yüksek enerji fiziğinde kabul gören bu yaklaşım bazı fizikçiler tarafından zaman zaman sorgulanıyordu. 1975'de Fritsch ve Minkowski yalnız gluonlardan oluşabilecek ve gluontopu olarak adlandırılan durumlarının var olabileceğini, 1977 yılında

Jaffe $a_0(980)$, $f_0(980)$ ve σ parçacıklarının bilinen parçacık yapısında olmadığını ve bu parçacıkların tetrakuark yapıda ($[qq][q\bar{q}]$) olabileceğini öne sürdü. Ayrıca, 1990'ların sonunda bazı yüksek enerji fizikçileri tarafından dört kuark ve bir antikuarktan oluşan baryonların (pentakuarklar) var olabileceği öne sürüldü.

XX. yüzyılın sonu ve XXI. yüzyılın başlangıcında hızlandırıcılarda gözlemlenen birçok parçacık standart kuark modeli çerçevesinde açıklanamayan özellikler gösteriyordu. 2003 yılında Japonya'daki Belle deneyinde gözlemlenen ve dört kuark içerdiği öngörülen $X(3872)$, 2007'de keşfedilen $Z(4430)$ ve $Y(4660)$, 2009 yılında keşfedilen $X(4140)$, 2014 yılında LHC'de gözlemlenen $X(4274)$, $X(4500)$, $X(4700)$ parçacıkları ve çok sayıda diğer parçacık geleneksel Kuark Modelinin yetersizliğini gösteriyordu. Standart olmayan doğalarından dolayı, bu parçacıklara "egzotik parçacıklar" adı verildi.

Bu parçacıkların keşfi hadron spektroskopisinde yeni bir çağın başladığını göstermektedir. Son yıllarda egzotik parçacıklarla ilgili çok sayıda deneysel ve teorik çalışmalar yapılmış ve bu araştırmalara devam edilmektedir. Günümüz yüksek enerji fizikçileri gluontopu (glueball) veya gluonyum, hibrit ($q\bar{q}g$ veya $qqqg$), mezon molekül ($qq\bar{q}\bar{q}$), tetrakuark ($qqq\bar{q}$), pentakuark ($qqqq\bar{q}$), hegzakuark ($qqqqqq$ veya $\bar{q}\bar{q}\bar{q}\bar{q}\bar{q}\bar{q}$) ve dibaryon ($qqq\bar{q}\bar{q}\bar{q}$) yapıların incelenmesinin güçlü etkileşimin özelliklerinin ve kuarkların ebedi hapsolme olayının anlaşılmasına, Standart Model Ötesi fiziğin gelişimine büyük katkı sağlayacağını düşünmektedirler. Ayrıca, egzotik parçacıkların incelenmesi evrenin oluşumu, karanlık madde, karanlık enerji, nötron yıldızlarının iç yapısının araştırılması bakımından da oldukça önemlidir.

Egzotik parçacıklar evrenin oluşumunda önemli bir rol oynamış olabilirler. Bir nötron yıldızının geleneksel modeli, nötronlardan oluşmasıdır ve genellikle bir nötron yıldızı içindeki parçacık etkileşimleri nötronlar arasında olur. Nötron yıldızının çekirdeğinde nötronlar güçlü bir şekilde etkileşerek, tetrakuarkları oluşturabilir. Bu durum pentakuarkların ve hegzakuarkların üretimini de sağlayabilir. Egzotik parçacıkların doğrulanması astrofizikçilerin, nötron yıldızlarının iç yapısı hakkındaki bazı varsayımları yeniden gözden geçirmesine neden olabilir.

Kuark-gluon hibritleri, tetrakuark durumları, hadron molekülleri veya daha farklı egzotik durumların varlığının LHC ve diğer hızlandırıcılarda yapılacak yeni ölçümlerle netleştirilmesi gerekiyor. Önümüzdeki yıllarda yapılacak BESIII deneylerinde egzotik hadronların iç yapılarının ve özelliklerinin iyi anlaşılması hedeflenmektedir. 2019 yılında GSI'deki PANDA deneyinde antiprotonlar kullanılarak, tılsımlı hibrit durumlarının araştırılması planlanmaktadır. FAIR deneyindeki PANDA dedektörünün kütle çözünürlüğü B fabrikalarından yirmi kat daha fazla olacak şekilde tasarlanmaktadır. Elde edilecek yeni deney verilerinin analizi hadron spektroskopisi ile ilgili çok daha net bilgilere ulaşılmasını sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

- [1] Gell-Mann, M. (1964). A schematic model of baryons and mesons. *Phys. Lett.* 8, 214.
- [2] Olive, K.A. et al. [Particle Data Group] (2015). Non- $q\bar{q}$ mesons. *Chin. Phys. C*, 38, 090001.
- [3] Besson, D. et al., [CLEO Collaboration] (2003). Observation of a narrow resonance of mass 2.46 GeV/ c^2 decaying to $D_s^{*+} \pi^0$ and confirmation of the D_{sJ}^* (2317) state, *Phys. Rev. D*, 68, 032002, [Erratum: *Phys. Rev. D* 75, 119908 (2007)].
- [4] Choi, S.K. et al., [Belle Collaboration] (2003). Observation of a new narrow charmonium state in exclusive $B^\pm \rightarrow K^\pm \pi^+ \pi^- J/\psi$ decays, *Phys. Rev. Lett.* 91, 262001.
- [5] Abazov, V. M. et al., [D0 Collaboration] (2016). Evidence for a $B_s^0 \pi^\pm$ state, *Phys.Rev.Lett.*, 117 (2) 022003.
- [6] Acosta, D. et al. [CDF II Collaboration] (2004). Observation of the narrow state $X(3872) \rightarrow J/\psi \pi^+ \pi^-$ in $\bar{p}p$ collisions at $\sqrt{s} = 1.96$ TeV, *Phys.Rev.Lett.* 93, 072001.
- [7] Aaij, R. et al. [LHCb Collaboration] (2015). Observation of $J/\psi p$ resonances consistent with pentaquark states $\Lambda_b^0 \rightarrow J/\psi K^- p$ decays. *Phys.Rev.Lett.* 115, 072001.

- [8] Ablikim, M. et al. [BESIII Collaboration] (2017). Precise measurement of the $e^+e^- \rightarrow \pi^+\pi^-J/\psi$ cross section at center-of-mass energies from 3.77 to 4.60 GeV. *Phys.Rev.Lett.* 118, 092001.
- [9] Chen, H. et al. (2017). A review of the open charm and open bottom systems, *Reports on Progress in Physics*, 80, 7.
- [10] Brambilla, N. et al. (2011). Heavy quarkonium: progress, puzzles, and opportunities. *Eur. Phys. J. C* 71, 1534.
- [11] <https://en.wikipedia.org>
- [12] Fritzsche, H. and Gell-Mann, M. (1972). Current algebra: Quarks and what else? eConf, 11 C720906V2, 135–165.
- [13] Fritzsche, H. and Minkowski, P. (1975). Psi resonances, gluons and the Zweig Rule, *Nuovo Cim. A* 30, 393.
- [14] Dzierba, A. R., Meyer, C. A. and Swanson, E. S. (2000). The search for QCD exotics. *Am.Sci.* 88, 406-415.
- [15] Robson, D. (1977). A basic guide for the glueball spotter. *Nucl.Phys. B*, 130, 328–348.
- [16] <https://en.wikipedia.org/wiki/Glueball>
- [17] Klempt, E and Zaitsev, A. (2007). Glueballs, hybrids, multiquarks. Experimental facts versus QCD inspired concepts. *Phys.Rept.* 454, 1–202.
- [18] Lee, W. and Weingarten, D. (2000). Scalar quarkonium masses and mixing with the lightest scalar glueball. *Phys.Rev. D* 61, 014015.
- [19] Bali, G.S. et al. [UKQCD Collaboration] (1993). A Comprehensive lattice study of $SU(3)$ glueballs. *Phys. Lett. B* 309, 378.
- [20] Morningstar, C.J. and Peardon, M.J. (1997). Efficient glueball simulations on anisotropic lattices. *Phys. Rev. D* 56, 4043.
- [21] Chen, Y. et al. (2006). Glueball spectrum and matrix elements on anisotropic lattices. *Phys.Rev. D* 73, 014516.
- [22] Loan, M. and Ying, Y. (2006). Sizes of lightest glueballs in $SU(3)$ lattice gauge theory. *Prog. Theor. Phys.* 116, 169.
- [23] Jaffe, R.L. (1977). Perhaps a Stable Dihyperon? *Phys.Rev. Lett.* 38 (5) 195.
- [24] Swanson, E.S. (2006). The New heavy mesons: A status report, *Phys.Rept.* 429, 243-305.
- [25] Chen, H.X. et al. (2016). The hidden-charm pentaquark and tetraquark states. *Phys.Rept.* 639, 1-121.
- [26] Cotugno, G., Faccini, R., Polosa, A.D. and Sabelli, C. (2010). Charmed baryonium. *Phys.Rev.Lett.* 104 (13) 132005.
- [27] T. Aaltonen et al. [CDF Collaboration] (2009). Evidence for a narrow near-threshold structure in the $J/\psi\phi$ mass spectrum in $B^+ \rightarrow J/\psi\phi K^+$ decays. *Phys.Rev.Lett.* 102, 242002.
- [28] Ali, A., Hambrock, C. and Aslam, M.J. (2010). Tetraquark interpretation of the BELLE data on the anomalous $\gamma(1S)\pi^+\pi^-$ and $\gamma(2S)\pi^+\pi^-$ production near the $Y(5S)$ resonance. *Phys.Rev.Lett.* 104 (16) 162001.
- [29] Choi, S.K. et al. [Belle Collaboration] (2008). Observation of a resonance-like structure in the $\pi^\pm\psi'$ mass distribution in exclusive $B \rightarrow K\pi^\pm\psi'$ decays. *Phys.Rev. Lett.* 100, 142001.
- [30] Aaij, R. et al. [LHCb collaboration] (2014). Observation of the resonant character of the $Z(4430)$ state. *Phys.Rev.Lett.* 112, 222002.
- [31] Ablikim, M. et al. [BESIII collaboration] (2013). Observation of a charged charmoniumlike structure in $e^+e^- \rightarrow \pi^+\pi^-J/\psi$ at $\sqrt{s} = 4.26$ GeV. *Phys.Rev.Lett.* 110 (25) 252001.
- [32] Liu, Z. et al. [Belle collaboration] (2013). Study of $e^+e^- \rightarrow \pi^+\pi^-J/\psi$ and Observation of a charged charmoniumlike state at Belle, *Phys.Rev.Lett.* 110 (25) 252002.
- [33] Aaij, R. et al. [LHCb Collaboration] (2017). Observation of $J/\psi\phi$ structures consistent with exotic states from amplitude analysis of $B^+ \rightarrow J/\psi\phi K^+$ decays. *Phys Rev Lett.* 118, 022003.
- [34] Abazov, V.M. et al. (2016). Evidence for a $B_s^0\pi^\pm$ state D0 Collaboration. *Phys.Rev.Lett.* 117 (2) 022003.
- [35] Aaij, R. et al. [LHCb Collaboration] (2016). Search for structure in the $B_s^0\pi^\pm$ invariant mass spectrum *Phys.Rev.Lett.* 117 (15) 152003, Addendum: *Phys.Rev.Lett.* 118 (2017) no.10, 109904.
- [36] Barnes, T. et al. (2003). Implications of a DK molecule at 2.32 GeV. *Phys.Rev. D* 68, 054006.
- [37] Liu, L. et al. (2013). Interactions of charmed mesons with light pseudoscalar mesons from lattice QCD and implications on the nature of the $D_{s0}^*(2317)$. *Phys.Rev. D* 87, 014508.
- [38] Guo, F.K., et al. (2017). Hadronic molecules. e-Print: arXiv:1705.00141 [hep-ph].
- [39] Ablikim, M. et al. [BESIII Collaboration] (2017). Evidence of two resonant structures in $e^+e^- \rightarrow \pi^+\pi^-h_c$, *Phys.Rev.Lett.* 118, 092002.
- [40] May, B. et al. [ASTERIX Collaboration] (1990). Anti-proton proton annihilation at rest in H_2 gas into $\pi^+\pi^-\pi^0$. *Z. Phys.* C46, 203.

- [41] Bertin, A. et al. (1998). Study of the $f_0(1500)/f_0(1565)$ production in the exclusive annihilation $\bar{n}p \rightarrow \pi^+ \pi^+ \pi^- n$ flight. *Phys.Rev. D* 57, 55.
- [42] Pakhlova, G. et al. [Belle Collaboration] (2008). Observation of a near-threshold enhancement in the $e^+e^- \rightarrow \Lambda_b \Lambda_c$ cross section using initial-state radiation. *Phys.Rev. Lett.* 101, 172001.
- [43] Cotugno, G. et al. (2010). Charmed baryonium. *Phys.Rev.Lett.* 104, 132005.
- [44] Guo, F.K. et al. (2010). Reconciling the $X(4630)$ with the $Y(4660)$. *Phys.Rev. D* 82, 094008.
- [45] Adlarson, P. et al. [WASA-at-COSY Collaboration] (2015). Measurement of the $np \rightarrow np\pi^0\pi^0$ reaction in search for the recently observed $d^*(2380)$ resonance. *Phys.Lett. B* 74, 325-332.
- [46] Lacock, P. et al. (1997). Hybrid mesons from quenched QCD. *Phys.Lett. B* 401, 308.
- [47] Bernard, C. et al. (1997). Exotic mesons in quenched lattice QCD. *Phys.Rev. D* 56, 7039.
- [48] Kuhn, J. (2004). Evidence for exotic mesons. *AIP Conf.Proc.* 717, 377-386.
- [49] Lu, M. et al. [E852 Collaboration] (2005). Exotic meson decay to $\omega\pi^0\pi^-$. *Phys.Rev.Lett.* 94, 032002.
- [50] Chung, S.U. (2015). Recent COMPASS results and future prospects for ALICE Published in AIP Conf.Proc. 1654, 050009.
- [51] Alekseev, M.G. et al. (2010). Observation of a $J^{PC} = 1^{-+}$ exotic resonance in diffractive dissociation of $190\text{GeV}/c$ π^- into $\pi^-\pi^-\pi^+$. *Phys.Rev.Lett.* 104, 241803.
- [52] Amelin, D.V. et al. [VES Collaboration] (1995). Study of resonance production in diffractive reaction $\pi^- A \rightarrow \pi^+\pi^-\pi^- A$. *Phys.Lett. B* 356, 595.
- [53] Diakonov, D., Petrov V. and Polyakov, M. (1997). Exotic anti-decuplet of baryons: prediction from chiral solitons. *Zeitschrift für Physik A Hadrons and Nuclei*, 359 (3) 305–314.
- [54] Nakano, T. et al. [LEPS Collaboration] (2009). Evidence of the θ^+ in the $\gamma d \rightarrow K^+K^-pn$ reaction. *Phys. Rev. C* 79 (2) 025210.
- [55] <http://hyperphysics.phy-astr.gsu.edu/hbase/Particles/pquark.htm>
- [56] Zavertyaev, M. [WA89 and COMPASS Collaborations] (2005). A search for pentaquark candidates in experiments WA89 and COMPASS. *Nucl. Phys. A* 755, 387-390.
- [57] Aubert, B. et al. [BaBar Collaboration] (2006). Search for the charmed pentaquark candidate $\theta_c(3100)^0$ in e^+e^- annihilations at $\sqrt{s} = 10.58\text{ GeV}$. *Phys.Rev. D* 73, 091101.
- [58] Mennessier, G., Narison, S. and Wang, X. G. (2010). The σ and $f_0(980)$ from $K_{e4} \oplus \pi\pi$ scatterings data. *Phys.Lett. B* 688, 59.
- [59] Ochs, W. (2013). The Status of glueballs. *J.Phys.G* 40, 043001.
- [60] Aitala, E.M. et al. [E791 Collaboration] (2001). Experimental evidence for a light and broad scalar resonance in $D^+ \rightarrow \pi^-\pi^+\pi^+$ decay. *Phys.Rev.Lett.* 86 770-774.
- [61] M. Ablikim et al. [BESIII Collaboration] (2017). Amplitude analysis of the $\chi_{c1} \rightarrow \eta\pi^+\pi^-$ decays. *Phys.Rev. D* 95 (3) 032002.
- [62] Morningstar, C.J. and Peardon, M.J. (1999). The Glueball spectrum from an anisotropic lattice study. *Phys.Rev. D* 60, 034509.
- [63] Achasov, N.N. (2000). On nature of scalar $a_0(980)$ and $f_0(980)$ mesons. *Nucl.Phys. A* 675, 279C-284C.
- [64] Oller, J.A. et al. (2003). Finite width effects in ϕ radiative decays. *Nucl.Phys. A* 714, 161.
- [65] Sekihara, T., Kumano, S. (2015). Constraint on $\bar{K}K$ compositeness of the $a_0(980)$ and $f_0(980)$ resonances from their mixing intensity. *Phys.Rev. D* 92 (3) 034010.
- [66] Ablikim, M. et al. [BESIII Collaboration] (2015). Observation of the isospin-violating decay $J/\psi \rightarrow \phi\pi^0$ $f_0(980)$. *Phys.Rev. D* 92 (1) 012007.
- [67] Hietala, J., Cronin-Hennessy, D., Pedlar, T. and Shipsey, I. (2015). Exclusive D_s semileptonic branching fraction measurements. *Phys.Rev. D* 92 (1) 012009.
- [68] Aaij, R. et al. [LHCb Collaboration]. (2015). Study of the rare B_s^0 and B^0 decays into the $\pi^-\pi^+\mu^+\mu^-$ final state. *Phys.Lett.B* 743, 46.
- [69] Li, J. et al. [Belle Collaboration] (2011). Observation of $B_s^0 \rightarrow J/\psi f_0(980)$ and evidence for $B_s^0 \rightarrow J/\psi f_0(1370)$. *Phys.Rev.Lett.* 106, 121802.
- [70] Uehara, A. (2009). High-statistics study of $\eta\pi^0$ production in two-photon collisions. *Phys.Rev. D* 80, 032001.
- [71] Silarski, M. and Moskal, P. for the COSY-11 collaboration. (2010). Study of the near threshold $pp \rightarrow ppK^+K^-$ reaction in view of the K^+K^- final state interaction. Invited talk at the Excited QCD 2010 Workshop, 31 January-6 February, Stara Lesna, Slovakia.
- [72] Sanchez, P. del Amo. et al. [BaBar Collaboration] (2010). Measurement of $D^0 - \bar{D}^0$ mixing parameters using $D^0 \rightarrow K_S^0\pi^+\pi^-$ and $D^0 \rightarrow K_S^0K^+K^-$ decays. *Phys.Rev.Lett.* 105, 081803.

- [73] Achasov, N.N. [KLOE Collaboration] (2003). Radiative decays of ϕ meson about nature of light scalar resonances. *Nucl. Phys. A* 728, 425.
- [74] Mukherjee, T.K., et al. (2014). Chiral phase transition with mixing between scalar quarkonium and tetraquark. *Phys.Rev. D* 89 (7) 076002.
- [75] Gutsche, T. et al. (2017). Role of scalar mesons in the beam asymmetry of $p\bar{p}$ and $\Lambda\bar{\Lambda}$ photoproduction at JLab. arXiv:1705.07002 [hep-ph].
- [76] Alde et al., D. [GAMS Collaboration] (1999). New results of the GAMS collaboration on meson spectroscopy. *Phys.Atom.Nucl.* 62, 1993-1998, *Yad.Fiz.* 62 (1999) 2160-2166.
- [77] Abele, et al. [Crystal Barrel Collaboration] (1996). Observation of $f_0(1500)$ decay into $K_L K_L$. *Phys.Lett.B* 385, 425.
- [78] Abe, K. et al. [Belle Collaboration] (2002). Study of three-body charmless B decays *Phys.Rev. D* 65, 092005.
- [79] Aubert, B. et al. [BABAR Collaboration] (2004). Measurements of the branching fractions of charged B decays to $K^\pm\pi^\mp\pi^\pm$ final states. *Phys.Rev. D* 70, 092001.
- [80] Chung, S.U., Klempt, E. and Korner, J.G. (2002). SU(3) classification of p-wave $\eta\pi$ and π systems. *Eur. Phys. J. A* 15, 539.
- [81] Zhang, R., Ding, Y.B., Li, X.Q. and Page, P.R. (2002). Molecular states and 1^{-+} exotic mesons. *Phys.Rev. D* 65, 096005.
- [82] Alde, D. et al. [IHEP-IISN-LANL-LAPP Collaboration] (1988). Evidence for a 1^{-+} exotic meson. *Phys.Lett.B* 205, 397.
- [83] Aoyagi, H. et al. Study of the $\eta\pi^-$ system in the π^-p reaction at 6.3 GeV/c. *Phys.Lett. B* 314, 246 (1993).
- [84] Abele, A. et al. [Crystal Barrel Collaboration] (1998). Exotic $\eta\pi$ state in $\bar{p}d$ annihilation at rest into $\pi^- \pi^0 \eta p$ (spectator). *Phys.Lett. B* 423, 175; (1999). 446, 349.
- [85] Adams, G.S. et al. [E852 Collaboration] (2007). Confirmation of the 1^{-+} meson exotics in the $\eta\pi^0$ System. *Phys.Lett. B* 657, 27.
- [86] Azizi, K., Barsbay, B. and Sundu, H. Mass and residue of $\Lambda(1405)$ as a hybrid baryon, arXiv:1705.10345 [hep-ph].
- [87] Hall, J.M.M. et al. (2015). Lattice QCD evidence that the $\Lambda(1405)$ resonance is an antikaon-nucleon molecule, *Phys. Rev. Lett.* 114 (13) 132002.
- [88] Dalitz, R. and Tuan, S. (1959). A possible resonant state in pion-hyperon scattering, *Phys.Rev.Lett.* 2, 425-428.
- [89] Dalitz, R. and Tuan, S. (1960). The phenomenological description of K^- nucleon reaction processes. *Annals Phys.* 10, 307-351.
- [90] Roca, L. and Oset, E. (2016). On the hidden charm pentaquarks in $\Lambda_b \rightarrow J/\psi K^- p$ decay. *Eur.Phys.J. C* 76 (11) 591.
- [91] Bazzi, M. et al. (2012). Kaonic hydrogen X-ray measurement in SIDDHARTA, *Nucl.Phys. A* 881, 88-97.
- [92] Sumihama, M. et al. [LEPS Collaboration] (2006). The $\gamma p \rightarrow K^+ \Lambda$ and $\gamma p \rightarrow K^+ \Sigma^0$ reactions at forward angles with photon energies from 1.5 GeV to 2.4 GeV. *Phys.Rev. C* 73, 035214.
- [93] Moriya, K. et al. [CLAS Collaboration] (2013). Differential photoproduction cross sections of the $\Sigma^0(1385)$, $\Lambda(1405)$ and $\Lambda(1520)$. *Phys.Rev. C* 88, 045201. Addendum: [*Phys. Rev. C* 88 (4) 049902 (2013)].
- [94] Agakishiev, G. et al. [HADES Collaboration] (2013). Baryonic resonances close to the $\bar{K}N$ threshold: the case of $\Lambda(1405)$ in pp collisions. *Phys.Rev. C* 87, 025201.
- [95] Cheng, H.Y., Chua, C.K. and Liu, K.F. (2015). Revisiting scalar glueballs. *Phys.Rev. D* 92 (9) 094006.
- [96] Amsler, C. and Close, F.E. (1996). Is $f^0(1500)$ a scalar glueball? *Phys. Rev. D* 53, 295.
- [97] Azhinenko, I.V. et al. [CERN-USSR Collaboration] (1984). Inclusive $K^{*+}(890)$, $K^{*+}(1430)$ and $K^*(890)$ Production in K^+p Interactions at 32 GeV/c. *Z.Phys. C* 25, 103.
- [98] Abele, A. et al. [Crystal Barrel Collaboration] (1997). Study of the $\pi^0\pi^0\eta'$ final state in $p\bar{p}$ annihilation at rest. *Phys.Lett. B* 404 179-186.
- [99] Abele, A. et al. [Crystal Barrel Collaboration] (1998). $\bar{p}p$ annihilation at rest into $K_L K^\pm\pi^\mp$. *Phys. Rev. D* 57, 3860.
- [100] Ablikim, M. et al. [BES Collaboration] (2006). Partial wave analyses of $J/\psi \rightarrow \gamma\pi^+\pi^-$ and $\gamma\pi^0\pi^0$. *Phys.Lett. B* 642, 441-448.
- [101] Ablikim, M. et al. [BESIII Collaboration] (2013). Partial wave analysis of $J/\psi \rightarrow \gamma\eta\eta$. *Phys.Rev. D* 87 (9) 092009, Erratum: *Phys.Rev. D* 87 (2013) no.11, 119901.
- [102] Rai, A.K. Rathaud, D.P. (2015). The mass spectra and decay properties of dimesonic states, using the Hellmann potential. *Eur.Phys.J. C* 75 (9) 462.
- [103] Adamo, A. et al. [OBELIX Collaboration] (1992). First physics results from OBELIX. *Sov.J.Nucl.Phys.* 55, 1732-1742, *Yad.Fiz.* 55, 3099-3121.
- [104] Close, F.E. and Page, P.R. (1995). The production and decay of hybrid mesons by flux-tube breaking. *Nucl. Phys. B* 443, 23.

- [105] Adams, G.S. et al. [CLEO Collaboration] (2011). Amplitude analyses of the decays $\chi_{c1} \rightarrow \eta\pi^+\pi^-$ and $\chi_{c1} \rightarrow \eta'\pi^+\pi^-$. *Phys.Rev. D* 84 112009.
- [106] Ivanov, E. I. et al. [E852 Collaboration] (2001). Observation of exotic meson production in the reaction $\pi^-p \rightarrow \eta'\pi^-p$ at 18 GeV/c. *Phys.Rev.Lett.* 86, 3977.
- [107] Khokhlov, Y.A. et al. [VES Collaboration] (2000). Study of $X(1600) 1^{-+}$ hybrid. *Nucl.Phys.A* 663, 596.
- [108] Amsler, C. et al. (2008). Review of particle physics. *Phys.Lett. B* 667, 1.
- [109] Pinder, C.N. [CRYSTAL BARREL Collaboration] (1997). Analysis of $\bar{p}p \rightarrow \pi^0\pi^0\pi^0\eta$ for annihilation at rest in liquid and gaseous hydrogen targets. *Nucl.Phys.Proc.Suppl.* 56 (1) 154-159.
- [110] Kalashnikova, Y.S. (1994). If the ρ (1405) is the exotic $1^-(1^{-+})$ hybrid, then where are the nonexotic ones? *Nuovo Cim. A* 107, 2421-2424.
- [111] Klempt, E. and Zaitsev, A. (2007). Glueballs, hybrids, multiquarks. Experimental facts versus QCD inspired concepts. *Phys. Rept.* 454, 1.
- [112] Albaladejo, M. and Oller, J.A. (2008). Identification of a scalar glueball. *Phys. Rev. Lett.* 101, 252002.
- [113] Ghoul, H.A. et al. [GlueX Collaboration] (2017). Measurement of the beam asymmetry Σ for π^0 and η photoproduction on the proton at $E_\gamma = 9\text{GeV}$. *Phys.Rev.* C95, 042201.
- [114] Ablikim, M. et al. [BESIII Collaboration] (2013). Partial wave analysis of $J/\psi \rightarrow \gamma\eta\eta$. *Phys.Rev. D* 87 (9) 092009. Erratum: *Phys.Rev. D* 87 (2013) no.11, 119901.
- [115] Bicudo, P. et al. (2007). The BES $f^0(1810)$: A new glueball candidate. *Eur.Phys.J. C* 52, 363-374.
- [116] Ablikim, M. et al. [BES Collaboration] (2006). Observation of a near-threshold enhancement in the mass spectrum from the doubly OZI suppressed decay $J/\psi \rightarrow \gamma\omega\phi$. *Phys. Rev. Lett.* 96, 162002.
- [117] Ablikim, M. et al. [BESIII Collaboration] (2015). Amplitude analysis of the $\pi^0\pi^0$ system produced in radiative J/ψ decays. *Phys.Rev. D* 92, 052003.
- [118] Amelin, D.V. et al. (2005). Investigation of hybrid states in the VES experiment at the Institute for High Energy Physics. *Phys.Atom.Nucl.* 68, 359-371, *Yad.Fiz.* 68 (2005) 388-400.
- [119] Adolph, C. [COMPASS Collaboration] (2017). Resonance production and S-wave in $\pi^- + p \rightarrow \pi^-\pi^-\pi^+$ + precoil at 190 GeV/c. *Phys.Rev. D* 95 (3) 032004.
- [120] Bing, C., Wei, K.W. and Zhang, A. (2013). $X(1870)$ and $\eta_2(1870)$: Which can be assigned as a hybrid state? *Adv. High Energy Phys.* 2013, 217858.
- [121] Anisovich, A.V. et al. [Crystal Barrel Collaboration] (2000). Three $I = 0$, $J^{PC} = 2^{-+}$ mesons. *Phys. Lett. B* 477, 19.
- [122] Barberis, D. et al. [WA102 Collaboration] (2000). A Study of the $\eta\pi^+\pi^-$ channel produced in central pp interactions at 450 GeV/c. *Phys.Lett.* B471, 435-439.
- [123] Chen, Y.Q. and Li, X.Q. (2004). A comprehensive four-quark interpretation of $D_s(2317)$, $D_s(2457)$ and $D_s(2632)$. *Phys.Rev.Lett.* 93 232001.
- [124] Cheng, H.Y. and Hou, W.S. (2003). B decays as spectroscopy for charmed four quark states, *Phys. Lett.* B566 193-200.
- [125] Browder, T.E., Pakvasa, S. and Petrov, A.A. Comment on the new $D_s^{(*)+}\pi^0$ resonances, *Phys. Lett.* B578 (2004) 365-368.
- [126] B. Aubert et al. [BaBar collaboration] (2003). Observation of a narrow meson decaying to $D_s^+\pi^0$ at a mass of 2.32 GeV/c². *Phys. Rev. Lett.* 90, 242001.
- [127] Krokovny, P. et al., [Belle collaboration] (2003). Observation of the $D_{sJ}(2317)$ and $D_{sJ}(2457)$ in B decays. *Phys. Rev. Lett.* 91, 262002.
- [128] Besson, D. et al. [CLEO collaboration] (2003). Observation of a narrow resonance of mass 2.46 GeV/c² decaying to $D_s^+\pi^0$ and confirmation of the $D_{sJ}^*(2317)$ state, *Phys. Rev. D* 68, 032002 [Erratum *ibid.* D 75 (2007) 119908].
- [129] Vaandering, E.W. (2004). Charmed hadron spectroscopy from FOCUS, in: QCD and high energy hadronic interactions. Proceedings, 39th Rencontres de Moriond, La Thuile, Italy, March 28-April 2, pp. 127-132. arXiv:hep-ex/0406044.
- [130] Yang, G. and Ping, J. The structure of pentaquarks Ω_c^0 in the chiral quark model. Mar 26, 2017. 8 pp. arXiv:1703.08845 [hep-ph].
- [131] Huang, H., Ping, J. and Wang, F. Investigating the excited Ω_c^0 states through $\mathcal{E}_c K$ and $\mathcal{E}'_c K$ decay channels. Apr 5, 2017. 6 pp. arXiv:1704.01421 [hep-ph].
- [132] Aaij, R. et al. [LHCb Collaboration] (2017). Observation of five new narrow Ω_c^0 states decaying to $\mathcal{E}'_c K$. *Phys.Rev.Lett.* 118 (18) 182001.
- [133] Govaerts, J., Viron, F.D., Gusbin, D. and Weyers, J. (1984). QCD sum rules and hybrid mesons. *Nucl.Phys.* B248, 1-18.
- [134] Bhardwaj, V. et al. [Belle Collaboration] (2013). Evidence of a new narrow resonance decaying to $\chi_{1c}\gamma$ in $B \rightarrow \chi_{c1}\gamma K$. *Phys.Rev.Lett.* 111 (3) 032001.
- [135] Ablikim, M. et al. [BESIII Collaboration] (2015). Observation of the $\psi(1^3D^2)$ state in $e^+e^- \rightarrow \pi^+\pi^-\gamma\chi_{1c}$ at BESIII. *Phys.Rev.Lett.* 115 (1) 011803.
- [136] Antoniazzi, L. et al. [E705 Collaboration] (1994). Search for hidden charm resonance states decaying into J/ψ or ψ' plus pions. *Phys.Rev. D* 50, 4258-4264.

- [137] Li, B.A. (2005). Is $X(3872)$ a possible candidate of hybrid meson. *Phys.Lett. B605*, 306-310.
- [138] Voloshin, M.B. (2004). Heavy quark spin selection rule and the properties of the $X(3872)$. *Phys.Lett. B604*, 69-73.
- [139] Burns, T.J., Piccinini, F., Polosa, A.D. and Sabelli, C. (2010). The 2^{-+} assignment for the $X(3872)$. *Phys.Rev. D82*, 074003.
- [140] Maiani, L., Piccinini, F., Polosa, A. D. and Riquer, V. (2005). Diquark-antidiquarks with hidden or open charm and the nature of $X(3872)$. *Phys. Rev. D71*, 014028.
- [141] Aubert, B. [BaBar Collaboration] (2004). Observation of the decay $B \rightarrow J/\psi\eta K$ and search for $X(3872) \rightarrow J/\psi\eta$. *Phys.Rev.Lett. 93*, 041801.
- [142] Abazov, V. M. et al. [D0 Collaboration] Observation and properties of the $X(3872)$ decaying to $J/\psi\pi^+\pi^-$ in pp collisions at $\sqrt{s} = 1.96 \text{ TeV}$, *Phys. Rev. Lett. 93* (2004) 162002.
- [143] Ikeda, Y. [HAL QCD Collaboration] (2017). The Tetraquark candidate $Z_c(3900)$ from Dynamical Lattice QCD Simulations. arXiv:1706.07300 [hep-lat].
- [144] Ablikim, M. et al. [BESIII Collaboration] (2015). Observation of $Z_c(3900)^0$ in $e^+e^- \rightarrow \pi^0\pi^0 J/\psi$. *Phys.Rev.Lett. 115* (11) 112003.
- [145] Dobbs, S. et al. [CLEO Collaboration] (2007). Measurement of absolute hadronic branching fractions of D mesons and $e^+e^- \rightarrow DD$ cross-sections at the $\psi(3770)$. *Phys.Rev. D76*, 112001.
- [146] Hogaasen, H., Kou, E., Richard, J.M. and Sorba, P. (2014). Isovector and hidden-beauty partners of the $X(3872)$. *Phys. Lett. B 732*, 97.
- [147] Karliner, M., Rosner, J.L. (2015). New exotic meson and baryon resonances from doubly-heavy hadronic molecules, *Phys. Rev. Lett. 115* (12) 122001.
- [148] Uehara, S. et al., [Belle Collaboration] (2010). Observation of a charmonium-like enhancement in the $\gamma\gamma \rightarrow \omega J/\psi$ process. *Phys. Rev. Lett. 104*, 092001.
- [149] Lees, J.P. et al. [BaBar Collaboration] (2012). Study of $X(3915) \rightarrow J/\psi\omega$ in two-photon collisions, *Phys. Rev. D86*, 072002.
- [150] Liao, X. and Manke, T. (2002). Excited charmonium spectrum from anisotropic lattices, CU-TP-1063, arXiv:hep-lat/0210030v2.
- [151] Close, F.E., and Godfrey, S.. (2003). Charmonium hybrid production in exclusive B meson decays. *Phys.Lett. B574*, 210-216.
- [152] Branz, T., Gutsche, T. and Lyubovitskij, V.E. (2009). Hadronic molecule structure of the $Y(3940)$ and $Y(4140)$. *Phys.Rev. D80*, 054019.
- [153] Pakhlov, P. [Belle Collaboration] (2008). Production of new charmoniumlike states in $e^+e^- \rightarrow J/\psi D^{(*)}\bar{D}^{(*)}$ at $\sqrt{s} \approx 10.6 \text{ GeV}$. *Phys.Rev.Lett. 100*, 202001.
- [154] Aubert, B. et al., [BaBar Collaboration] (2008). Observation of $Y(3940) \rightarrow J/\psi\omega$ in $B \rightarrow J/\psi\omega K$ at BABAR. *Phys. Rev. Lett. 101*, 082001.
- [155] Wang, Z.G. (2016). Tetraquark state candidates: $Y(4260), Y(4360), Y(4660)$ and $Z_c(4020/4025)$ *Eur.Phys.J. C76* (7) 387.
- [156] Yuan, C.Z. [BESIII Collaboration] (2015). Study of the XYZ states at the BESIII. *Front.Phys. (Beijing)* 10 (6) 101401.
- [157] Ablikim, M. et al. [BESIII Collaboration] (2014). Observation of $e^+e^- \rightarrow \pi^0\pi^0 h_c$ and a neutral charmoniumlike structure $Z_c(4020)^0$. *Phys. Rev. Lett. 113*, 212002.
- [158] Oncala, R. and Soto, J. (2017). Heavy quarkonium hybrids: Spectrum, decay and mixing. *Phys.Rev. D96* (1) 014004.
- [159] Chen, X. et al. (2016). Calculation of mass of $Y(4140)$ by introducing mixed molecule state in quark model. *Nucl.Phys. B909*, 243-259.
- [160] Dağ, H. and A. Türkan. (2017). Investigating the structure of $X(4140)$ in QCD. *EPJ Web Conf. 137*, 06007.
- [161] Agaev, S.S. Azizi, K. and Sundu, H. (2017). Exploring the resonances $X(4140)$ and $X(4274)$ through their decay channels. *Phys.Rev. D95*, (11) 114003.
- [162] Wang, Z.G. (2016). Reanalysis of $X(4140)$ as axial-vector tetraquark state with QCD sum rules. *Eur.Phys.J. C76* (12) 657.
- [163] Aaltonen, T. et al., [CDF Collaboration] (2009). Evidence for a narrow near-threshold structure in the $J/\psi\phi$ mass spectrum in $B^+ \rightarrow J/\psi\phi K^+$ decays, *Phys. Rev. Lett. 102*, 242002.
- [164] Chatrchyan, S. et al., [CMS Collaboration] (2014). Observation of a peaking structure in the $J/\psi\phi$ mass spectrum from $B^\pm \rightarrow J/\psi\phi K^\pm$ decays, *Phys. Lett. B734*, 261-281.
- [165] Abazov, V.M. [D0 Collaboration] (2014). Search for the $X(4140)$ state in $B^+ \rightarrow J/\psi\phi K^+$ decays with the D0 Detector. *Phys.Rev. D89* (1) 012004.
- [166] Prencipe, E. [BABAR Collaboration] (2015). Search for exotics in the rare decay $B \rightarrow J/\psi KKK$ at BABAR. *EPJ Web Conf. 95*, 05012.
- [167] Chen, Y., Chiu, W.F., Gong, M., Gui, L.C. and Liu, Z. (2016). Exotic vector charmonium and its leptonic decay width. *Chin. Phys. C40* (8) 081002.
- [168] Wang, Z.G. (2017). Analysis of the $Y(4220)$ and $Y(4390)$ as molecular states with QCD sum rules. *Chin.Phys. C41* (8) 083103.

- [169] Feng, X.N., Gao, X.Y. and Shen, C.P. (2015). Combined fit to BESIII data on $e^+e^- \rightarrow h_c\pi^+\pi^-$ and $\chi_{c0}\omega$. *Int.J.Mod.Phys. A30* (24) 1550142.
- [170] Wang, X.L. et al. [Belle Collaboration] (2015). Measurement of $e^+e^- \rightarrow \pi^+\pi^-\psi(2S)$ via initial state radiation at Belle, *Phys. Rev. D* 91, 112007.
- [171] Ablikim, M. et al. [BESIII Collaboration] (2015). Study of $e^+e^- \rightarrow \omega\chi_{cJ}$ at center-of-mass energies from 4.21 to 4.42 GeV, *Phys. Rev. Lett.* 114, 092003.
- [172] Zhu, S.L. (2008). New hadron states. *Int.J.Mod.Phys. E17*, 283-322.
- [173] Qiao, C.F. (2006). One explanation for the exotic state $Y(4260)$. *Phys.Lett. B639*, 263-265.
- [174] Lees, J.P. [BaBar Collaboration] (2012). Study of the reaction $e^+e^- \rightarrow J/\psi\pi^+\pi^-$ via initial-state radiation at BaBar. *Phys.Rev. D86*, 051102.
- [175] He, Q. [CLEO Collaboration] (2006). Confirmation of the $Y(4260)$ resonance production in ISR. *Phys.Rev. D74*, 091104.
- [176] Wang, M.Z. et al. [BELLE Collaboration] (2005). Study of the baryon-antibaryon low-mass enhancements in charmless three-body baryonic B decays. *Phys. Lett.* B617, 141.
- [177] Lees, J.P. et al. [BaBar Collaboration] (2014). Study of the reaction $e^+e^- \rightarrow \psi(2S)\pi^-\pi^-$ via initial-state radiation at BaBar, *Phys. Rev. D89* (11) 111103.
- [178] Wang X.L. et al., [Belle Collaboration] (2007). Observation of two resonant structures in $e^+e^- \rightarrow \pi^+\pi^-\psi(2S)$ via initial state radiation at Belle, *Phys. Rev. Lett.* 99, 142002.
- [179] He, J. $D\Sigma_c^*$ and $D^*\Sigma_c$ interactions and the LHCb hidden-charmed pentaquarks. *Phys.Lett. B753* (2016) 547-551.
- [180] Azizi, K. Sarac, Y. and Sundu, H. Hidden bottom pentaquark states with spin 3/2 and 5/2. arXiv:1707.01248v1 [hep-ph].
- [181] Deng, C., Ping, J., Huang, H. and Wang, F. (2015). Systematic study of Z_c^+ family from a multiquark color flux-tube model, *Phys. Rev. D92* (3) 034027.
- [182] Chilikin, K. [Belle Collaboration] (2013). Experimental constraints on the spin and parity of the $Z(4430)^+$. *Phys.Rev. D88*, (7) 074026.
- [183] Wang, Z.G. (2017). Scalar tetraquark state candidates: $X(3915)$, $X(4500)$ and $X(4700)$. *Eur.Phys.J. C77* (2) 78.
- [184] Aaij, R. [LHCb Collaboration] (2017). Amplitude analysis of $B^+ \rightarrow J/\psi\phi K^+$ decays. *Phys.Rev. D95*, (1) 012002.
- [185] Oncala, R. and Soto, J. (2017). Heavy hybrids: Decay to and mixing with heavy quarkonium. *EPJ Web Conf.* 137, 06025.
- [186] Wang, Z.G. and Zhang, X.H. (2010). Analysis of $Y(4660)$ and related bound states with QCD sum rules. *Commun. Theor. Phys.* 54, 323.
- [187] Aubert, B. et al. [BaBar Collaboration] (2007). Evidence of a broad structure at an invariant mass of $4.32 \text{ GeV}/c^2$ in the reaction $e^+e^- \rightarrow \pi^+\pi^-\psi(2S)$ measured at BaBar. *Phys. Rev. Lett.* 98, 212001.
- [188] Albaladejo, M., Nieves, J., Oset, E., Sun, Z.F. and Liu, X. (2016). $X(5568)$ be described as a $B_s\pi, B\bar{K}$ resonant state? *Phys.Lett. B757*, 515-519.
- [189] Agaev, S.S., Azizi, K. and Sundu, H. (2016). Mass and decay constant of the newly observed exotic $X(5568)$ state, *Phys. Rev. D93* (7) 074024.
- [190] Zhang, J.R., Zou, J.L. and Wu, J.Y. 0^+ tetraquark states from improved QCD sum rules: Delving into $X(5568)$. May 10, 2017. 14 pp. e-Print: arXiv:1705.03741 [hep-ph].
- [191] Krokovny, P. [Belle Collaboration] (2013). First observation of the $Z_b(10610)$ in a Dalitz analysis of $Y(10860) \rightarrow Y(nS)\pi^0\pi^0$. *Phys.Rev. D88*, (5) 052016.
- [192] Wang, Z.G. and Huang, T. (2014). The $Z_b(10610)$ and $Z_b(10650)$ as axial-vector tetraquark states in the QCD sum rules. *Nucl.Phys. A930*, 63-85.
- [193] Guo, F.K., Hidalgo-Duque, C., Nieves, J., Ozpineci, A. and Valderrama, M.P. (2015). Hidden charm and bottom molecular states. *Hyperfine Interact.* 234 (1-3) 125-132.
- [194] Bondar et al. [Belle Collaboration] (2012). Observation of two charged bottomonium-like resonances in $Y(5S)$ decays. *Phys. Rev. Lett.* 108, 122001.

Meme Kanseri Kök Hücrelerinde Notch Sinyal Yolağının İnhibisyonunda Güncel Yaklaşımlar

Recent Applications in Inhibition of Notch Signalling Pathway on Breast Cancer Stem Cell

Selcen ARI¹ 

Alanya Alaaddin Keykubat Üniversitesi Mühendislik Fakültesi, Genetik ve Biyomühendislik Bölümü, Kestel, Alanya/Antalya.

Öz

Dünyada kadınlarda kanser sebepli ölümlerde meme kanseri en üst sıralarda yer almaktadır. Kemoterapi, radyoterapi, hormonal tedavi gibi yöntemler meme kanserinin tedavisi için kullanılmasına rağmen metastaz ve nüks sıkça karşılaşılan durumlardır. Meme kanseri tedavisinin etkin olarak sağlanamamasında en çarpıcı etken tümör dokusundaki ufak bir popülasyonu oluşturan kanser kök hücreleridir. Meme kanser kök hücrelerinin eliminasyonu konusundaki çalışmalar kök hücre özelliklerinin ortaya çıkmasında kritik rol oynayan gelişimsel sinyal yolları üzerinde etkili olabilecek yaklaşımları içermektedir. Gelişimsel sinyal yollarından en önemlilerinden biri olan Notch sinyal yolağı meme kanser kök hücrelerinde apoptoz, proliferasyon, anjiyogenez ve farklılaşma mekanizmaları üzerinde oldukça etkilidir. Güncel çalışmalar kanser kök hücrelerinin karakteristiğinde kritik rol oynayan Notch sinyal yolağının inhibisyonunun etkili tedavi yaklaşımları için önemli olduğunu göstermektedir. Bu derlemede meme kanserinin tedavisinde Notch sinyal yolağının inhibisyonu için getirilmiş farklı yaklaşımlar ele alınacak ve gelecekte etkin kanser tedavisinin geliştirilmesinde faydalı olabilecek yöntemler tartışılacaktır.

Anahtar kelimeler: Meme kanseri, Notch, Kanser kök hücre.

Abstract

In the world, breast cancer is at the top of the list in deaths due to cancer in women. Although treatments such as chemotherapy, radiotherapy, hormonal therapy are used for the treatment of breast cancer, metastasis and recurrence are frequent cases. The most striking factor in the inability to effectively breast cancer treatment is cancer stem cells, which form a small population of tumor tissue. Studies on the elimination of breast cancer stem cells involve approaches that may be effective on developmental signaling pathways that play a critical role in the forming of stem cell characteristics. One of the most important developmental signaling pathways, the Notch signaling pathway is highly effective on apoptosis, proliferation, angiogenesis and differentiation mechanisms in breast cancer stem cells. Recent studies indicate that inhibition of the Notch signaling pathway, which plays a critical role in the characterization of cancer stem cells, is important for effective treatment approaches. In this review, different approaches will be discussed for inhibition of Notch signalling pathway in breast cancer treatment and methods that may be useful for efficient cancer treatment.

Keywords: Breast cancer, Notch, Cancer stem cell.

I. GİRİŞ

Meme kanserinin kadınlarda görülme oranı yaklaşık %29' dur ve en çok tanı koyulan kanser türü olmakla birlikte kanser sebepli ölümler arasında ikinci sırada yer almaktadır [1]. Meme kanseri tedavisi için son yıllarda farklı yaklaşımlar geliştirilmesine rağmen etkin tedavi hala geliştirilememiştir. Günümüz tedavilerinin yeterli etkinlikte

sağlanamamasının ana sebeplerinden biri olarak *Meme Kanseri Kök Hücreleri* (MKKH) gösterilmektedir. İlk olarak Al-Hajj ve arkadaşlarının NOD/SCID (Nonobese diabetic/severe combined immunodeficiency) dişi fareleri kullanarak katı tümörde yaptıkları çalışmalar ile meme kanser kök hücreleri tanımlanmış [2], meme kanseri kök hücrelerinin biyolojisi ve tedavideki yeri konusunda çalışmalar başlamıştır. Al-Hajj ve arkadaşları heterojen yapıdaki meme tümör dokusunda

çok küçük bir popülasyonu oluşturan CD44+CD24⁻/dü-şük fenotipteki hücrelerin farklı fenotip sergileyen hücrelere göre daha tümörogenik olduğunu göstermiştir. Buna ek olarak MKKH'lerin normal kök hücreler ile farklılaşma ve kendini yenileme özelliklerini de paylaştığını belirtmişlerdir. Sonraki çalışmalarda MKKH'lerin kemoterapötik ilaçların metabolize edilmesinde etkili olan Aldehitdehidrojenaz (ALDH) enzim ifadesi veya Epitelyal Yüzey Antijeni (ESA) ifadesi de yapabilecekleri gösterilmiştir [3-6]. Tümör içerisindeki çok az sayıdaki kanser kök hücrelerinin tümör oluşumu [7], ilerlemesi, invazyonu ve metastazında önemli olduğu görülmüştür. Meme kanseri kök hücrelerinin spesifik yüzey ifadeleri sadece belirteç görevi görmeye kalma- yıp; bununla birlikte tümör oluşumundan metastaza kadar tüm fonksiyonlarda da görev alabilmektedir. MKKH'lerin bu fonksiyonları gerçekleştirmesinde sinyal yolaklarının kendine has düzenlenmesi de kritik rol oynamaktadır. MKKH'lerde Notch, Hedgehog ve Wnt gelişimsel sinyal yolaklarının bir veya birkaçının anormal düzenlenmesi diğer sinyal yolaklarının da anormalliğine sebep olarak farklı fizyolojik sonuçlara yol açmaktadır [8]. MKKH'lerin sistemik tedavinin etkinliğini düşürmesi sebebiyle güncel çalışmalar bu sinyal yolaklarını hedefleyebilecek özellikte yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesine odaklanmıştır.

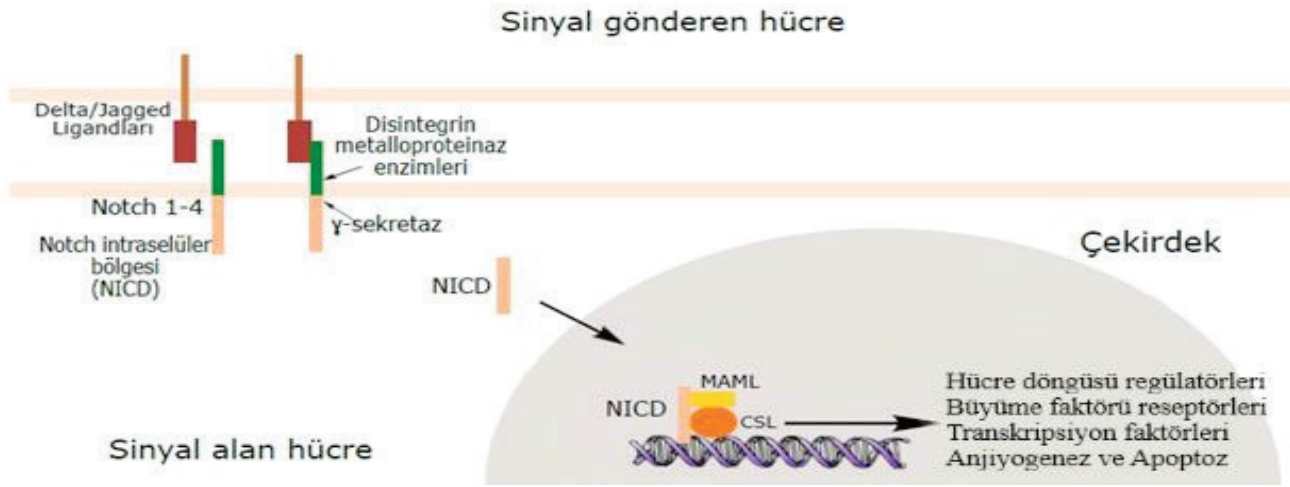
MKKH'lerin fizyolojik aktivitelerinin düzenlenmesinde etkili olan gelişimsel sinyal yolakları Notch, Hedgehog ve Wnt'dir [9]. Doku onarımı ve embriyo doku modellemesinde önemli rolü olan Hedgehog (HH) sinyal yolağı kanser kök hücreleri için de kritik görevlere sahiptir. Sinyal yolağının transmembran reseptörü Patched1'in (PTCH) Smoothed (SMO) üzerindeki inhibe edici etkinliği HH ligandlarının bağlanması sonucunda baskılanmaktadır [10]. SMO'nun aktifleşmesi sonucunda kaskat başlar ve GLI transkripsiyon faktörünün nükleer yerleşimi ve aktivasyonu sonucunda sağ kalım, proliferasyon ve anjiyogenezde görev alan hedef genlerin ifadeleri gerçekleştirilir [8]. Wnt sinyal yolağında Frizzled reseptörüne Wnt'nin bağlanmasıyla β -katenin'in bozunması inhibe edilir ve hücre nükleusunda birikmesi sonucunda hedef genlerin ifadesi sağlanmaktadır [11]. Wnt hedef genlerinin ifadesi sonucunda kendini yenileme, epitelyal-mezenkimale dönüşüm (EMT) ve kanser kök hücresi fenotipinin ifadesi gerçekleşmektedir [12]. Notch ise fazla sayıda ligand ve reseptör alt birimini içeren kök hücre karakterinin ortaya çıkmasında kritik rolü olan karmaşık bir sinyal yolağıdır [13].

Kanserde gelişimsel sinyal yolaklarının hücredeki fonksiyonları ve çapraz etkileşimleri pek çok çalışmada ele alınmıştır. Günümüze kadar ağırlıklı olarak klinik çalışmaların sonuçlarının derlemesini, bir kanser türündeki sinyal yolaklarının etkileşimini veya bir hücresel fonksiyon için sinyal yolaklarının görevlerini içeren çalışmalar gerçekleştirilmiştir

[8, 14-17]. Notch sinyal yolağı doku spesifik olarak hücrede kritik süreçlere yön vermesinden dolayı önem taşımaktadır [18]. Özellikle diğer gelişimsel sinyal yolaklarından farklı olarak Notch hücreler arasında doğrudan etkileşim yoluyla sinyalizasyon gerçekleştirdiği, kompleks bir yapıya sahip olması sebebiyle doku spesifik olarak fonksiyonu değişebildiği için kritiktir [18, 19]. Notch sinyal yolağının artmış aktivitesinin meme kanserinde kanser kök hücre fenotipinin sergilenmesinde ve küresel yapının oluşumunda etkili olduğu gösterilmiştir [20]. Bununla birlikte spesifik meme kanseri tiplerinde Notch sinyal yolağının aktivitesi veya önemi farklı çalışmalarda belirtilmiştir [21-23]. Demans hastalıkları için üretilmiş ancak kanser türlerinde Notch sinyal yolağı aracılı etkili olabileceği düşünülen, spesifik Notch inhibitörü gruplarının genel klinik çalışmalarının ele alındığı kaynaklar da mevcuttur [24]. Bu derlemeyle ise MKKH anormal işlevi-şinde kritik rol oynayan Notch sinyal yolağının hedeflenmesi ve inhibisyonu ile ilgili günümüze kadar olan farklı yaklaşımları içeren çalışmalar ele alınacaktır.

II. NOTCH SİNYAL YOLAĞININ FİZYOLOJİK AKTİVİTESİ

İnsan ve fare embriyonik kök hücrelerinde Notch sinyal-lerin sonuçları hücrelerin akıbetinin ne olacağına belirlenmesinde [25], proliferasyon, farklılaşma ve apoptozun dengesinde kritiktir [26-28]. Hücre-hücre etkileşimlerinde önemli olan bu yolak aynı zamanda anjiyogenez [29], kanser kök hücre [30], kemoterapötik ilaç dirençliliği ve tümör immünitesi için de önemlidir [12]. Transmembran protein yapıdaki Notch (Notch 1-4) reseptörleri, Delta-benzeri (DLL1,3,4) ve Jagged (Jagged 1,2) ligandları, Notch sinyal yolağının ana bileşenlerini oluşturmaktadır [23]. Endoplazmik retikulum ve golgi tarafından işlenmiş olan reseptör plazma membranına translokasyona uğramakta ve sinyali oluşturan hücrenin membranında konumlanmış aktifleşmiş olan Delta-benzeri ve Jagged ligandları ile bağlanmaktadır [9]. Ligand reseptör arasındaki bu etkileşim reseptörün iki basamaklı proteolitik yıkımına sebep olmaktadır [12]. Birinci yıkım disintegrin ve metalloproteinaz (ADAM10, ADAM17 veya TACE) enzimleri tarafından hücre dışında yürütülürken [31]; sonraki basamak ilk aşamada gerçekleşen yıkım ürününün γ -sekretaz ile hücre içinde bir yıkıma daha uğratılmasını içerir [21]. Proteolitik yıkım sürecinden sonra ise Notch hücre içi bölgesi (NICD) hücre nükleusuna geçer ve hedef gen bölgelerinin ifadesini sağlayan DNA'ya bağlı CSL (CBF1/Su(H)/LAG-1) [32] proteini ve Mastermind benzeri (MAML) proteiniyle etkileşimi gerçekleştirir [12, 17]. Sinyallerin transkripsiyonel hedefleri hücre döngüsü regülatörleri, büyüme faktörleri reseptörleri, transkripsiyon faktörleri ve anjiyogenez ve apoptoz düzenleyicileridir [26] (Şekil 1).



Şekil1: Kanser kök hücrelerinde anormal düzenlenmiş Notch sinyal yolağının aktivitesi.

Tümörögenizde önemli role sahip olan Notch sinyal yolağının herhangi bir bileşenindeki anormal düzenlenmeler katı tümörlerde sıkça karşılaşılan bir durumdur [21]. Notch reseptör ve ligandlarının translayon sonrası modifikasyonları ile yarı ömürleri ve ligand afiniteleri değişmektedir [32]. Örneğin, Notch3'te 34 ve Notch4'te 29 Epidermal Büyüme Faktörü (EGF) tekrarı bulunması, reseptörlerin ligandlara olan afinitelerine etki etmektedir [33]. Notch reseptörünün golgi içerisinde glikozilasyonunun da Delta veya Jagged ligandlarıyla bağlanmasına etki ettiği belirtilmiştir. Öyle ki FRINGE tarafından golgi içerisinde yürütülen glikozilasyon işlemi Notch reseptörünün Delta ligandına cevabını arttırırken, Jagged indüklenmiş sinyalleri negatif etkilemektedir [32]. Meme kanser hücrelerinde Notch sinyal yolağı alt birimlerinin hangilerinin kök hücre karakteristiğine etki ettiği hala tartışmalı bir konu olup günümüze kadar farklı sonuçlar elde edilmiştir. Meme kanser kök hücreleri üzerinde yapılan çalışmalarda Notch4 reseptör anormal aktivitesinin tümör başlamasında önemli bir rol oynadığı belirtilmiştir [34]. Ancak Östrojen Reseptör Pozitif (ER+) [35] ve üçlü negatif meme kanser (TNBC) hücrelerinde [36] Notch1 sinyal yolağının anormal düzenlendiği görülmüştür. Buna benzer olarak Notch1 aşırı ifadesinin zayıf derece farklılaşmış meme tümörünün klinikopatolojik özellikleriyle örtüştüğü de bildirilmiştir [37].

İnsan meme kanser kök hücrelerinde, Notch sinyallerinin tümörögeneze ve tedaviye yansızlığa olan katkısında diğer sinyal yollarıyla etkileşimleri de önemlidir. Notch sinyallerinin NF-κB (Nuclear factor-kappa B) sinyallerini aktive etmesi veya TGFβ (Transforming growth factor beta) sinyallerini düzenlemesiyle metastazın en önemli basamağı olan

EMT gerçekleştirilmektedir [38]. Meme kanser hücrelerinin kemik metastazında kemik hücreleri kaynaklı TGFβ sitokini ve Jagged-1 ligandının etkileşimiyle, kemik hücrelerinde aktifleştirilen Notch sinyallerinin önemli rolü olduğu görülmüştür [39]. γ-sekretaz inhibitörü PF-03084014'ün Notch sinyal yolağını inhibe ettiği gibi translayon sonrası aktif β-katenin miktarının azaltılması yoluyla Wnt sinyal yolağını da inhibe ettiği bilinmektedir [40]. Bununla birlikte histon modifikasyonu, DNA metilasyonu ve tümör oluşumunda önemli olan Mel-18'in Wnt sinyal yolağını negatif düzenleme yoluyla Jagged-1 aracılı Notch inhibisyonunu desteklediği de gösterilmiştir [41]. Östrojen reseptör pozitif meme kanser türlerinde çoğunlukla hormonal tedavi yöntemleri seçilse de, antiöstrojenlere olan direnç sıklıkla karşılaşılan bir durumdur. Direnç gelişiminde Notch sinyallerinin östrojen yokluğunda aktifleşerek östrojen reseptör α bağımlı transkripsiyonunu tetiklemesi ve antiöstrojen etkinliğinde inhibitör etki göstermesinin etkili olduğu düşünülmektedir [21].

III. NOTCH'U HEDEFLEMEK AMACIYLA GERÇEKLEŞTİRİLEN ÇALIŞMALAR

Notch sinyallerinin kanser kök hücrelerindeki anormal fonksiyonlarının inhibisyonu için günümüze kadar pek çok yaklaşım geliştirilmiştir. Bu yaklaşımlar temel olarak sinyal yolağının işleyişinin herhangi bir basamağında etkili olarak hedef ifadelerin gerçekleşmesini engelleyici yöndedir. Notch sinyallerinin inhibisyonu için yaklaşımlar; inhibitörler, doğal ajanlar, nükleik asitler, antikolar ve nanotaşıyıcılar olarak gruplandırılabilir (Tablo1).

Tablo 1: Meme kanserinde Notch sinyal yolağının inhibisyonu için gerçekleştirilen çalışmalar

Türü	Ajan	Mekanizma	Kapsam	Referans
İnhibitör	DAPT	Notch4 ve DLL3 inhibisyonu aracılı anjiyogenez baskılanması	<i>In vivo</i>	[47]
	LY900009	γ – sekretaz inhibisyonu	Faz I	[50]
	PF03084014	γ – sekretaz inhibisyonu	Faz I	[51]
	MK-0752	γ – sekretaz inhibisyonu	<i>In vivo</i> , Faz I-II	[52]
	R04929097	γ – sekretaz inhibisyonu	<i>In vitro</i>	[53]
Antikor	Enoticumab	DLL4 monoklonal antikor	Faz I	[59]
	MMGZ01	DLL4 monoklonal antikor	<i>In vivo</i>	[60]
Nükleik asitler	miR-200	Jagged-1 aracılı Notch inhibisyonu	<i>In vitro</i>	[67]
	miR-34a	Notch1 geni baskılanması	<i>In vitro</i>	[68, 69]
Doğal ajanlar	Vitamin D türevleri	Notch1,2,3 inhibisyonu	<i>In vitro</i>	[74]
	Kapsaisin	NICD translokasyonunun engellenmesi	<i>In vitro</i>	[75]
	Luteolin	Notch sinyal yolağıyla ilgili protein ve miRNA'ların inhibisyonu	<i>In vitro</i> , <i>In vivo</i>	[76]
	Xanthohumol	Notch1 ve Hes1 ifadesinin azaltılması	<i>In vitro</i> , <i>In vivo</i>	[77]
	Oridonin	Notch 1-4 protein ifadesinin azaltılması	<i>In vitro</i> , <i>In vivo</i>	[79]
	Paeoniflorin	Notch1 ve Hes1 ifadesinde azalma	<i>In vitro</i>	[80]
Nanotaşıyıcılar	Mezoporlu silika nanopartikül	γ – sekretaz inhibitörü DAPT ile Notch inhibisyonu, folik asit ile kanser hücre hedeflemesi	<i>In vivo</i>	[83,84]
	Katyonik mezoporlu silika nanopartikül	γ – sekretaz inhibitörü DAPT ile Notch inhibisyonu, glikoz ile kanser hücre hedeflemesi	<i>In vitro</i> , <i>In vivo</i>	[85]
	Manyetik çok fonksiyonlu nanopartikül	shRNA ile Notch inhibisyonu ve folik asit ile kanser hücre hedeflemesi	<i>In vitro</i>	[86]

3.1. İnhibitörler

Notch sinyal yolağının inhibisyonu amacıyla çalışılan ilk inhibitörler γ -sekretaz inhibitörleri (GSI) olup, mekanizmaları Notch reseptörlerinin son basamaktaki proteolitik yıkımlarının engellenmesi temeline dayanmaktadır [17, 21]. γ -sekretaz inhibitörleri esasında alzheimer gibi hastalıkların tedavisinde kullanılan etken maddelerdir [42]. GSI'lar proteozom aktivitesinin inhibe edilmesi ve endoplazmik retikulum stresinin arttırılması yoluyla tümör hücrelerini apoptoza götürmektedir [43]. GSI'lar meme kanseri fare modellerinde, kanser kök hücrelerinin proliferasyon inhibisyonunu, apoptoz ve farklılaşma indüklenmesini sağlamaktadır [44]. Kemoterapötiklerin kanser hücrelerinde ilaç direnç gelişimine ve kanser kök hücre fenotipinin ortaya çıkmasına sebep olduğunu gösteren güncel bir çalışmada GSI inhibitörü DAPT (N-[N-(3,5difluorofenasetil) – L-alanil] – S-fenilglisin t-bütül ester)'nin Notch4 ve DLL3 inhibisyonu ile metastaz için önemli olan Vasküler Endotelial Büyüme Faktörünün (VEGF) [45] aracılığıyla tümör anjiyogenezini azalttığı gösterilmiştir [46]. Östrojen reseptör, Progesteron reseptör ve HER2 ifadesi göstermeyen zayıf prognozla karakterize TNBC türünün kök hücre benzeri kanser hücrelerini içerdiği

bilinmektedir [47, 48]. GSI LY900009'un ileri düzey meme kanseri hastalarında gerçekleştirilen klinik çalışmasında antikanserojen etkinlik beklenen düzeyde sağlanamamış, özellikle gastrointestinal sistemde yan etkileri gözlenmiştir [49]. Locatelli ve arkadaşlarının klinik faz 1 çalışmasında PF-03084014 GSI ve Docetaxel'in kombineli kullanımında inhibitörün kemoterapötik ilacın farmakokinetiği üzerinde negatif etkisinin olmadığı bildirilmiştir [50]. Buna benzer şekilde MKKH yönlü tedavi için GSI MK-0752'nin etkinliğinin prelinik ve klinik olarak incelenmesiyle kemoterapötik ilaçların etkinliğinin arttırıldığı bildirilmiştir [51]. Diğer bir GSI olan R04929097'nin kanser kök hücre fenotipindeki inflamatuvar meme kanser hücrelerinin büyümesinde bir miktar etki ettiği ve bir antikanserojen ajanla daha etkili bir sonuç alınabileceği belirtilmiştir [52]. Ancak lokal ileri ve metastatik özellikteki TNBC hastalarında nötropeni, bulantı, lökopeni, anemi gibi yan etkiler görülmüş ve etkin bir antikanserojen etki sağlanamamıştır [50]. Diğer yandan γ -sekretazların normal doku hücrelerinde önemli fizyolojik işlevlere sahip olması [32], bu inhibitörlerin γ -sekretaz dışındaki proteazlar üzerinde de etkili olabilmesi ve bununla birlikte γ -sekretazların Notch sinyali dışındaki ErbB4, sindekan ve

CD44 gibi önemli substratlarının bulunması [53], umut vaat edici olan GSI'ların klinik uygulamalarının oldukça zor olduğunu göstermektedir [54].

3.2. Antikorlar

Notch reseptör ve ligand alt birimlerinin hedeflenmesi ve inhibisyonu amacıyla yüksek spesifiteye sahip antikorların üretilmesi mümkündür. Antikorların yüksek spesifite ve afiniteye sahip olması, kullanım uygunluğu açısından büyük avantaj sağlamaktadır. Notch inhibitörlerinin intestinal sistemdeki yan etkinlerinin giderilmesi için yalnızca Notch1 sinyallerinin düzenlenmesine yönelik antikor kullanımına dair yaklaşımlar mevcuttur [55]. Notch sinyal yollarındaki EGF tekrarlarını spesifik şekilde tanıyarak ligand bağlamasını engelleyen monoklonal antikor yaklaşımları bulunmaktadır. Sharma ve arkadaşlarının çalışmasında 11 ve 12. EGF tekrarlarına spesifik monoklonal antikorların Notch-1 reseptör aktivasyonunu iyi şekilde inhibe ettiği, kök hücre karakteristiğini belirleyen genlerin ifadesini ve EMT'yi etkilediği görülmüştür [56].

Vücut normal vaskülerizasyonuna etkide bulunmadan tümör anjiyogenezi üzerinde etki edilmesi yoluyla DLL4 antikorları da tümör büyümesini negatif etkilemektedir [57]. DLL4 antikorlarının katı tümörlerde etkinliğinin ortaya çıkarılması için yalnızca Enoticumab ile gerçekleştirilen faz-1 klinik çalışmasında GSI'lara göre intestinal sistemde daha az yan etki oluşturduğu gösterilmiştir [58]. Notch sinyal yolağının inhibisyonuna dair en dikkat çekici yaklaşımlardan olan antikorların kemoterapötik ilaçlarla kullanımı sayesinde etkin tedavinin gerçekleştirilebileceği düşünülmektedir. Notch sinyal yolağının üyesi DLL4 üzerinde etkili olabilecek monoklonal antikor üretilmiş, kemoterapötiklerle kombinasyonunda MKKH popülasyonunda ve kanser hücresi proliferasyonunda azalma görülmüştür [59]. DLL4 antikorlarının katı tümörlerdeki etkinliğine dair çalışmalar devam etmektedir (NCT sayısı: NCT03292783, NCT01577745). Ancak antikorların büyük moleküler yapılarda olması Notch inhibisyonunda kullanılmasında en önemli kısıtlamadır. Bu büyük moleküllerin lokal seviyede kolayca dağılımı gerçekleştirilebilirken, kanser kök hücrelerinin rol oynadığı metastatik kanser türlerinde geniş alanda etkili olabilmeleri için etkin antikor dağılımı sağlanmalıdır [60].

3.3. Nükleik Asitler

Meme kanser kök hücrelerinde Notch sinyal yollarının inhibisyonu amacıyla Notch anormal fonksiyonunu hücrel ifadelere etki yoluyla doğrudan veya dolaylı olarak etkileyebilecek nükleik asit yaklaşımları mevcuttur. Kanser kök

hücre fenotipinin ortaya çıkmasına neden olabilen gen bölgelerinin Notch sinyal yolağıyla ilişkisini gösteren pek çok çalışma bulunmaktadır. DNA hasar onarımı, kromatin yeniden modellemesi ve hücre döngüsü kontrol noktası denetimi gibi pek çok önemli fonksiyonda görev alan BRCA-1'de meydana gelen mutasyonlar sonucunda kök hücre aktivitesinde artış görülmektedir [61]. BRCA-1'in Notch sinyallerinin transkripsiyonel aktivasyonu yoluyla Notch ve Jagged-1 üzerinde etkili olduğu, meme kanser hücrelerinin akıbetinin belirlenmesinde önemli olabileceği bulunmuştur [62]. BRCA-1 genini hedefleyerek düzenlenmesini sağlayan miR-182, miR-146 gibi farklı mikroRNA (miRNA) türleri mevcuttur [63]. Moskwa ve arkadaşları tarafından meme kanser hücreleri üzerinde gerçekleştirilen çalışmada miR-182'nin, BRCA-1'i hedefleyebileceği ve baskılayıcı etkinliği sonucunda DNA onarımını engelleyerek radyasyon tedavisini olumlu yönde etkilediği *in vitro* ve *in vivo* gösterilmiştir [64]. Bununla birlikte, tümör baskılayıcı veya tam tersine onkogenik özellikte olan miRNA'ların, Notch sinyal yolağıyla doğrudan ilişkili olduğu da bildirilmiştir [65]. miR-200 ailesinin meme kanser hücrelerinde Notch sinyallerini inhibe ettiği ve kök hücre karakterini kazandırdığı belirtilen çalışmada miR-200 ile transfekte edilen hücrelerde Jagged-1 ligand aracılı Notch sinyal inhibisyonu gerçekleştirilmiştir [66]. Öte yandan Notch1 geninin 3' UTR ucuyla doğrudan olarak etkileşimde olan miR-34a'nın, ilaç dirençli meme kanser hücrelerinde Notch inhibisyonu için önemli bir hedef olabileceği sonucuna ulaşılmıştır [67]. Kang ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen çalışma ile ise Paclitaxel ile miR-34a tedavisi uygulanan meme kanser hücrelerinde kök hücre benzeri fenotipin azaldığı ve ilaca duyarlılığın arttığı belirtilmiştir [68]. miRNA'ların hücrel veya serum nükleazları tarafından bozunması, negatif yüklü olması ve boyutları sebebiyle hücre membranından geçememesi kanser tedavisinde kullanımında ortaya çıkan temel zorluklardır [69]. Bu zorlukların giderilmesi için güncel çalışmalar miRNA'ların modifikasyonu ve taşınması yönündedir.

3.4. Doğal Ajanlar

Kanser kök hücrelerinin eliminasyonunun sağlanması sırasında sağlıklı dokularda meydana gelebilecek toksik etkilerin tedavi açısından dezavantajının ortadan kaldırılması için doğal bileşiklerin kullanımına dair çalışmalar da mevcuttur. *Psoralea Corylifolia* (Babchi) iç çekirdeğinden elde edilen Psoralidin, EMT Notch1 sinyalleri üzerinde γ – sekretaz inhibitörü vazifesi gördüğü, meme kanser ve kanser kök hücreleri üzerinde etkili olduğu bilinmektedir [70, 71]. D vitamini türevi BXL0124'ün, kanser kök hücre fenotipindeki meme kanser hücrelerin Notch Ligandları üzerinde

inhibitör etki oluşturduğu gösterilmiştir [72]. TNBC hücrelerinin (SUM159) Notch reseptörlerinin vitamin D türevleri ile inhibe edilmesine yönelik gerçekleştirilen çalışmada Notch1,2,3 ifadesinin yanı sıra pluripotensi belirteci OCT4'ün ve kök hücre sinyal düzenlemesinin ana elemanlarından olan NF- κ B1'in de dikkate değer şekilde inhibe edildiği belirtilmiştir [73]. Bununla birlikte, tümör invazyon ve metastazında kritik bir süreç olan EMT için meme kanser hücrelerince ifade edilen sitokeratin 5 ve 18 seviyesinin de vitamin D türevi ile düşürüldüğü gösterilmiştir. Shim ve arkadaşları MKKH fenotipi sergileyen MCF7 hücreleri üzerinde kırmızı biberden elde edilmiş Kapsaisin ($C_{18}H_{27}NO_3$) molekülünü uyguladığında, NICD'nin nükleusa translokasyonunun gerçekleşmediğini ve kanser kök hücre sayısının belirgin düzeyde azaldığını göstermiştir [74]. Diğer yandan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda toksik olmayan flavonoid bileşiklerinden Luteolin'in Notch sinyal yolağının ve miR-34a'nın ifadesini değiştirerek meme kanserinde invazyon, göç ve vaskülerizasyon üzerinde negatif etkili olduğu saptanmıştır [75]. Sun ve arkadaşları ise *Humulus Lupulus*'tan elde edilmiş bir flavonoid olan Xanthohumol'ün Notch1 aracılı olarak meme kanser hücrelerinin sağ kalımını inhibe ettiğini göstermiştir [76]. Bunların dışında curcumin, delphinidin, likopen, withaferin A, oridonin, paeoniflorin gibi diğer doğal bileşiklerin de meme kanser kök hücreleri üzerinde etkili olduğu bildirilmiştir [77-79]. En ilgi çekici tedavi yaklaşımlarından olan doğal bileşikler etkinlik açısından umut vaat edicidir. Uzun süreli kullanımı ve klinik uygulaması konusunda çalışmaların gerçekleştirilmesiyle faydalı yaklaşımların getirilebileceği düşünülmektedir.

3.5. Nanotaşıyıcılar

Notch sinyal yolağının diğer dokularda da normal düzenlenmiş olması halinde pek çok düzenleyici fonksiyonunun olması, bu sinyal yolağının spesifik olarak kanser ve kanser kök hücrelerinde hedeflenmesini gerekli kılmıştır. Tümör doku ve hücrelerinin sağlıklı dokulardan farklı özelliklerinin seçimini sağlayan nanotaşıyıcı sistemler, Notch inhibitörlerinin hedef bölgeye taşınmasında da kullanılmıştır. Kanser hücreleri metabolizmalarında folik asite ihtiyaç duydıkları için folik asit reseptör ifadesi oldukça fazladır [80, 81]. Bu yönde folik asit ile modifiye edilmiş DAPT γ -sekretaz inhibitörü yüklenmiş mezoporlu silika nanopartiküllerinin folik asit reseptörü ifadesi gösteren meme kanser hücrelerinde *in vivo* terapötik etkinliği iyileştirdiği gösterilmiştir [82, 83]. Tümör hücrelerinin yüksek glikoz ihtiyacının hedeflendiği, Mamaeva ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen çalışmada glikozla yüzey modifikasyonu gerçekleştirilmiş katyonik mezoporlu silika nanopartiküllerine γ -sekretaz

inhibitörü DAPT yüklenip kanser ve kanser kök hücreleri üzerinde etkinliği incelendiğinde MKKH'ler tarafından kolayca içselleştirildiği ve inhibitör etki oluşturduğu, tümör büyümesini ise negatif yönde etkilediği görülmüştür [84].

Nanotaşıyıcılar Notch sinyalizasyonunun inhibisyonunda, nükleik asitlerin taşınması amacıyla da kullanılmaktadır. Kanser gen tedavisi konusunda viral yaklaşımlar olmasına rağmen viral kökenli uygulamaların immünojen özellikte olması, transfeksiyon etkinliğinin düşük olması gibi sebeplerle istenilen sonuçlar elde edilememiştir. Bunun sonucu olarak formülasyon optimizasyonu, ayarlanabilir fiziksel ve kimyasal özelliklere sahip olması ve immünojenite göstermemesi gibi avantajlara sahip olmaları sebebiyle nanotaşıyıcılar gen taşınması ve hedeflenmesi amacıyla kullanılmaya başlanmıştır. Yang ve arkadaşları Notch-1 shRNA'nın (small hairpin RNA) folik asit ile hedefleme yapan manyetik çok fonksiyonlu nanopartiküllerle taşınması sonucunda folat reseptörü ifade eden hücreler tarafından hücre alımının arttırıldığını, Notch sinyallerinin etkili bir şekilde inhibe edildiğini ve proliferasyonun baskılandığını belirtmiştir [85]. Nanotaşıyıcıların kanser tedavisinde kemoterapötikler ile kullanımı mevcut klinik uygulamalarda karşımıza çıkmaktadır. Ancak kanser kök hücreleri ve özellikle Notch gibi sinyal yolağının inhibe edici nitelikte sistemler *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar şeklinde yürütülmektedir.

IV. SONUÇ

Meme kanserinde metastaz ve nüks gibi durumların sebebi olarak gösterilen kanser kök hücrelerinin biyolojisi üzerine yapılan çalışmalar sonucunda, gelişimsel sinyal yolağının tedavi için hedef olarak kullanılabilmesi düşünülmektedir. Bu yönde Notch sinyal yolağının hedeflenmesi; kanser kök hücrelerinin eliminasyonu, tümör ilerlemesinin inhibisyonu, anjiyogenez ve metastazın engellenmesi için büyük önem taşımaktadır. Notch anormal düzenlenmesinin inhibisyonu, ancak karmaşık düzendeki sinyal yolağının alt birimlerinde veya spesifik bölgelerinde etkinlik sağlanması ile mümkündür. Sinyal yolağının inhibisyonu için günümüze kadar geliştirilen yaklaşımlar; inhibitörler, antikolar, doğal bileşikler, nükleik asitler ve nanotaşıyıcılar olarak gruplandırılmaktadır. Notch sinyal inhibitörlerinin ilk jenerasyonu, genellikle alzheimer için kullanılan moleküller olan γ -sekretaz inhibitörleridir. *In vitro* ve *in vivo* çalışmalarda etkili sonuçlar vermekle birlikte klinik olarak intestinal yan etkileri çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. Bununla birlikte bir antikanserojen ajanla kullanımının etkili proliferasyon inhibisyonu sağlayacağı düşünülmektedir. Notch sinyal yolağının spesifik bölgelerini hedef alan antikör yaklaşımları, γ -sekretaz inhibitörlerinde olduğu gibi, alzheimer

benzeri hastalıkların tedavisi için geliştirilmiştir. Bu antikolar Notch sinyal yolağının meme kanserinde önemli olduğunun saptanmasıyla klinik ve klinik öncesi araştırmalarda çalışılmıştır. Ancak, meme kanser hücrelerinde hangi Notch alt birimlerinin veya alt birimlerin hangi spesifik bölgelerinin anormal düzenlendiği açık olarak hala belirlenmemiştir. Notch sinyal yolağı aktivitesinin canlı vücudunun farklı bölgelerinde fonksiyon gösterdiği düşünüldüğünde, antikoların kanser hücresinde tam olarak tanımlanmış olan Notch kompleks sisteminde daha faydalı olabileceği düşünülmektedir. Doğal bileşikler Notch sinyal yolağını nasıl düzenlediği ve klinik etkinliğinin nasıl gerçekleştiği incelenmesi gereken terapötiklerdir. Notch sinyal yolağının doku spesifik olarak fonksiyonunun değişebildiği düşünüldüğünde inhibitör özellikteki moleküllerin, inhibitörlerin veya antikoların kullanımı konusunda soru işaretlerine sebep olmaktadır. Kanser kök hücre temelli çalışmalarda son zamanlarda oldukça dikkat çeken bir yaklaşım olan nanotaşıyıcılar diğer ajanların taşınması ve doğru lokasyona iletilmesi amacıyla kullanılmaktadır. Nanotaşıyıcı sistemlerin kontrollü olarak ajanların salınımı sağlayabilmesi, sentez aşamasında belli parametrelerle ayarlanabilir özelliklerinin olması kanser tedavisi için faydalı olabileceğini göstermektedir.

Notch inhibisyonu için yaklaşımlar incelendiğinde bu ajanların doğrudan tedavi edici etkinlik sağlamadığı, ancak antikanserojenlerle kullanımıyla daha etkili sonuçlar verdiği görülmektedir. Meme kanser kök hücrelerinin heterojen bir tümör dokusu içerisinde bulunduğu ve niş kaynaklı mikroçevreyle farklı etkileşimler gerçekleştirdiği düşünüldüğünde bir etkili bir tedavinin gerçekleştirilmesinin zor olduğu açıktır. Öyle ki günümüz çalışmaları göz önünde bulundurulursa spesifik olarak tümör dokusunu hedefleyen akıllı taşıyıcı sistemler, antikanserojenlerin ve Notch inhibisyonunu sağlayan ajanların birlikte kullanılması daha etkili bir tedavinin gerçekleştirilmesini sağlayabilir. Bu şekilde gerçekleştirilecek yeni yaklaşımlarla antikanserojenlerin ve Notch inhibisyon ajanlarının istenmeyen yan etkilerinin de önüne geçilebilir.

Notch sinyal yolağının tümör gelişimi, invazyonu, metastazında önemli olan diğer sinyal yollarıyla etkileşimi negatif sonuçlar elde edilmesine sebep olabilir. Ancak Notch sinyal yolağı, Wnt ve Hedgehog sinyal yolağından farklı olarak, hücre-hücre etkileşimlerini doğrudan ligand-reseptör bağlantısıyla sağladığı için daha etkili bir hedef olarak gösterilebilir. Aynı zamanda kompleks yapısından dolayı dokuda sinyal yolağının reseptör ve ligand alt birimlerinden hangilerinin etkileşeceği inhibisyonunun nasıl gerçekleşeceğinin belirlenmesinde kritiktir. Sinyal yolağının alt birimler halinde olması tedavinin spesifikleşmesini sağlarken, sadece etkileşimde olan belirli bir kanser ve kanser kök hücre

topluluğu hedeflenerek tedavinin etkinliğini arttırabilir. Sonuç olarak Meme kanserinin Notch inhibisyonu hedefli tedavisinin bütün bu etkenler göz önüne alınarak şimdiye kadar yapılan çalışmaların sonuçları ışığında gerçekleştirilebileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- [1] American Cancer Society. (2016). Cancer Facts & Figures. Retrieved from <https://www.cancer.org/research/cancer-facts-statistics/all-cancer-facts-figures/cancer-facts-figures-2016.html>
- [2] Al-Hajj, M., Wicha, M. S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S. J., & Clarke, M. F. (2003). Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *100*(7), 3983-3988. doi:10.1073/pnas.0530291100
- [3] Charafe-Jauffret, E., Ginestier, C., Iovino, F., Wicinski, J., Cervera, N., Finetti, P., Hur, M.H., Diebel, M.E., Monville, F., Dutcher, J., Brown, M., Viens, P., Xerri, L., Bertucci, F., Stassi, G., Dontu, G., Birnbaum, D., Wicha, M. S. (2009). Breast Cancer Cell Lines Contain Functional Cancer Stem Cells with Metastatic Capacity and a Distinct Molecular Signature. *Cancer Res*, *69*(4), 1302.
- [4] Croker, A. K., Goodale, D., Chu, J., Postenka, C., Hedley, B. D., Hess, D. A., & Allan, A. L. (2009). High aldehyde dehydrogenase and expression of cancer stem cell markers selects for breast cancer cells with enhanced malignant and metastatic ability. *J Cell Mol Med*, *13*(8b), 2236-2252. doi:10.1111/j.1582-4934.2008.00455.x
- [5] Fillmore, C. M., & Kuperwasser, C. (2008). Human breast cancer cell lines contain stem-like cells that self-renew, give rise to phenotypically diverse progeny and survive chemotherapy. *Breast Cancer Res*, *10*(2), R25-R25. doi:10.1186/bcr1982
- [6] McCubrey, J. A., Davis, N. M., Abrams, S. L., Montalto, G., Cervello, M., Libra, M., Nicoletti, F., D'Assoro, A.B., Cocco, L., Martelli, A.M., Steelman, L. S. (2014). Targeting breast cancer initiating cells: advances in breast cancer research and therapy. *Adv Biol Regul*, *56*, 81-107. doi:10.1016/j.jbior.2014.05.003
- [7] Wang, R., Lv, Q., Meng, W., Tan, Q., Zhang, S., Mo, X., & Yang, X. (2014). Comparison of mammosphere formation from breast cancer cell lines and primary breast tumors. *J Thorac Dis*, *6*(6), 829-837. doi:10.3978/j.issn.2072-1439.2014.03.38
- [8] Takebe, N., Warren, R. Q., & Ivy, S. P. (2011). Breast cancer growth and metastasis: interplay between cancer stem cells, embryonic signaling pathways and epithelial-to-mesenchymal transition. *Breast Cancer Res*, *13*(3), 211. doi:10.1186/bcr2876
- [9] Yu, Z., Pestell, T. G., Lisanti, M. P., & Pestell, R. G. (2012). Cancer stem cells. *Int J Biochem Cell Biol*, *44*(12), 2144-2151. doi:10.1016/j.biocel.2012.08.022

- [10] Dragu, D. L., Necula, L. G., Bleotu, C., Diaconu, C. C., & Chivu-Economescu, M. (2015). Therapies targeting cancer stem cells: Current trends and future challenges. *World J Stem Cells*, 7(9), 1185-1201. doi:10.4252/wjsc.v7.i9.1185
- [11] Reya, T., & Clevers, H. (2005). Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature*, 434(7035), 843-850.
- [12] Iqbal, W., Alkarim, S., AlHejin, A., Mukhtar, H., & Saini, K. S. (2016). Targeting signal transduction pathways of cancer stem cells for therapeutic opportunities of metastasis. *Oncotarget*, 7(46), 76337-76353. doi:10.18632/oncotarget.10942
- [13] Espinoza, I., Pochampally, R., Xing, F., Watabe, K., & Miele, L. (2013). Notch signaling: targeting cancer stem cells and epithelial-to-mesenchymal transition. *Oncotargets & Therapy*, 6.
- [14] Pires, B. R., D. E. Amorim IS., Souza, L. D., Rodrigues, J. A. & Mencialha, A. L. (2016). Targeting Cellular Signaling Pathways in Breast Cancer Stem Cells and its Implication for Cancer Treatment. *Anticancer Res.*, 36(11): p. 5681-5691.
- [15] Koury, J., L. Zhong, & J. Hao, (2017), Targeting Signaling Pathways in Cancer Stem Cells for Cancer Treatment. *Stem Cells International*. 2017: p. 10.
- [16] Han, J., M.J. Hendzel, & J. Allalunis-Turner, (2011). Notch signaling as a therapeutic target for breast cancer treatment?, *Breast Cancer Research : BCR*. 13(3): p. 210-210.
- [17] Takebe, N., Miele, L., Harris, P. J., Jeong, W., Bando, H., Kahn, M., Yang, S. X., Ivy, S. P. (2015). Targeting Notch, Hedgehog, and Wnt pathways in cancer stem cells: clinical update. *Nat Rev Clin Oncol*, 12(8), 445-464. doi:10.1038/nrclinonc.2015.61
- [18] Fortini, M.E., (2009)., Notch Signaling: The Core Pathway and Its Posttranslational Regulation. *Developmental Cell*, 16(5): p. 633-647.
- [19] Lobry, C., P. Oh, & I. Aifantis, (2011), Oncogenic and tumor suppressor functions of Notch in cancer: it's NOTCH what you think. *The Journal of Experimental Medicine*. 208(10): p. 1931-1935.
- [20] D'Angelo, R.C., Ouzounova, M., Davis, A., Choi, D., Tchuhenkam, S.M., Kim, G., Luther, T., Quraishi, A.A., Senbabaglu, Y., Conley, S.J., Clouthier, S.G., Hassan, K.A., Wicha, M.S., Korkaya, H., (2015), Notch reporter activity in breast cancer cell lines identifies a subset of cells with stem cell activity. *Molecular cancer therapeutics*, 14(3): p. 779-787.
- [21] Al-Hussaini, H., Subramanyam, D., Reedijk, M., & Sridhar, S. S. (2011). Notch signaling pathway as a therapeutic target in breast cancer. *Mol Cancer Ther*; 10(1), 9-15. doi:10.1158/1535-7163.MCT-10-0677.
- [22] Acar, A., Simoes, B.M., Clarke R.B. & Brennan, K., (2016), A Role for Notch Signalling in Breast Cancer and Endocrine Resistance. *Stem Cells Int*, p. 2498764.
- [23] Liu, J., Shen, J.X., Wen X.F., Guo, Y.X. & Zhang, G.J., (2016), Targeting Notch degradation system provides promise for breast cancer therapeutics. *Crit Rev Oncol Hematol*, 104: p. 21-9.
- [24] Yuan, X., Wu, H., Xu, H., Xiong, H., Chu, Q., Yu, S., Wu, G. S. & Wu, K., (2015), Notch signaling: an emerging therapeutic target for cancer treatment. *Cancer Lett*, 369(1): p. 20-7.
- [25] Dontu, G., Jackson, K. W., McNicholas, E., Kawamura, M. J., Abdallah, W. M., & Wicha, M. S. (2004). Role of Notch signaling in cell-fate determination of human mammary stem/progenitor cells. *Breast Cancer Research*, 6(6), R605. doi:10.1186/bcr920
- [26] Pannuti, A., Foreman, K., Rizzo, P., Osipo, C., Golde, T., Osborne, B., & Miele, L. (2010). Targeting Notch to target cancer stem cells. *Clin Cancer Res*, 16(12), 3141-3152. doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-2823
- [27] Bray, S. J. (2006). Notch signalling: a simple pathway becomes complex. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7(9), 678-689. doi:10.1038/nrm2009
- [28] Yang, F., Xu, J., Tang, L., & Guan, X. (2017). Breast cancer stem cell: the roles and therapeutic implications. *Cell Mol Life Sci*, 74(6), 951-966. doi:10.1007/s00018-016-2334-7
- [29] Dufraigne, J., Funahashi, Y., & Kitajewski, J. (2008). Notch signaling regulates tumor angiogenesis by diverse mechanisms. *Oncogene*, 27(38), 5132-5137. doi:10.1038/onc.2008.227
- [30] Harrison, H., Simões, B. M., Rogerson, L., Howell, S. J., Landberg, G., & Clarke, R. B. (2013). Oestrogen increases the activity of oestrogen receptor negative breast cancer stem cells through paracrine EGFR and Notch signalling. *Breast Cancer Research*, 15(2), R21. doi:10.1186/bcr3396
- [31] Atapattu, L., Saha, N., Chheang, C., Eissman, M. F., Xu, K., Vail, M. E., Hii, L., Llerena, C., Liu, Z., Horvay, K., Abud, H.E., Kusebauch, U., Moritz, R.L., Ding, B.S., Cao, Z., Rafii, S., Ernst, M., Scott, A.M., Nikolov, D.B., Lackmann, M., Janes, P. W. (2016). An activated form of ADAM10 is tumor selective and regulates cancer stem-like cells and tumor growth. *J Exp Med*, 213(9), 1741-1757. doi:10.1084/jem.2015109
- [32] Andersson, E. R., & Lendahl, U. (2014). Therapeutic modulation of Notch signalling—are we there yet? *Nat Rev Drug Discov*, 13(5), 357-378. doi:10.1038/nrd4252
- [33] Zhang, J., Kuang, Y., Wang, Y., Xu, Q., & Ren, Q. (2017). Notch-4 silencing inhibits prostate cancer growth and EMT via the NF-κB pathway. *Apoptosis*, 22(6), 877-884. doi:10.1007/s10495-017-1368-0
- [34] Harrison, H., Farnie, G., Howell, S. J., Rock, R. E., Stylianou, S., Brennan, K. R., Brundred, N.J., Clarke, R. B. (2010). Regulation of breast cancer stem cell activity by signaling through the Notch4 receptor. *Cancer Res*, 70(2), 709-718. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-1681
- [35] Clarke, R. B., Spence, K., Anderson, E., Howell, A., Okano, H., & Potten, C. S. (2005). A putative human breast stem cell population is enriched for steroid receptor-positive cells. *Dev Biol*, 277(2), 443-456. doi:10.1016/j.ydbio.2004.07.044
- [36] Andrieu, G., Tran, A. H., Strissel, K. J., & Denis, G. V. (2016). BRD4 Regulates Breast Cancer Dissemination through

- Jagged1/Notch1 Signaling. *Cancer Res*, 76(22), 6555-6567. doi:10.1158/0008-5472.can-16-0559
- [37] Li, Y., Burns, J. A., Cheney, C. A., Zhang, N., Vitelli, S., Wang, F., Bett, A., Chastain, M., Audoly, L.P., Zhang, Z.-Q. (2010). Distinct expression profiles of Notch-1 protein in human solid tumors: Implications for development of targeted therapeutic monoclonal antibodies. *Biologics : Targets & Therapy*, 4, 163-171.
- [38] Polyak, K., & Weinberg, R. A. (2009). Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nat Rev Cancer*, 9(4), 265-273.
- [39] Sethi, N., Dai, X., Winter, C. G., & Kang, Y. (2011). Tumor-derived JAGGED1 promotes osteolytic bone metastasis of breast cancer by engaging notch signaling in bone cells. *Cancer Cell*, 19(2), 192-205. doi:10.1016/j.ccr.2010.12.022
- [40] Kwon, C., Cheng, P., King, I. N., Andersen, P., Shenje, L., Nigam, V., & Srivastava, D. (2011). Notch Post-Translationally Regulates β -Catenin Protein in Stem and Progenitor Cells. *Nature cell biology*, 13(10), 1244-1251. doi:10.1038/ncb2313
- [41] Won, H. Y., Lee, J. Y., Shin, D. H., Park, J. H., Nam, J. S., Kim, H. C., & Kong, G. (2012). Loss of Mel-18 enhances breast cancer stem cell activity and tumorigenicity through activating Notch signaling mediated by the Wnt/TCF pathway. *Faseb j*, 26(12), 5002-5013. doi:10.1096/fj.12-209247
- [42] Golde, T.E., Koo, E.H., Felsenstein, K.M., Osborne, B.A. & Miele, L., (2013), γ -Secretase inhibitors and modulators. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*, 1828(12): p. 2898-2907.
- [43] Steg, A. D., Burke, M. R., Amm, H. M., Katre, A. A., Dobbin, Z. C., Jeong, D. H., & Landen, C. N. (2014). Proteasome inhibition reverses hedgehog inhibitor and taxane resistance in ovarian cancer. *Oncotarget*, 5(16), 7065-7080.
- [44] Kondratyev, M., Kreso, A., Hallett, R. M., Girgis-Gabardo, A., Barcelon, M. E., Ilieva, D., Ilieva, D., Ware, C., Majumder, P.K., Hassell, J. A. (2012). Gamma-secretase inhibitors target tumor-initiating cells in a mouse model of ERBB2 breast cancer. *Oncogene*, 31(1), 93-103. doi:http://www.nature.com/ncj/journal/v31/n1/supinfo/ncj2011212s1.html
- [45] Li, S., & Li, Q. (2014). Cancer stem cells and tumor metastasis (Review). *Int J Oncol*, 44(6), 1806-1812. doi:10.3892/ijo.2014.2362
- [46] Zhang, P., He, D., Chen, Z., Pan, Q., Du, F., Zang, X., Wang, Y., Tang, C., Li, H., Lu, H., Yao, X., Jin, J. Ma, X. (2016). Chemotherapy enhances tumor vascularization via Notch signaling-mediated formation of tumor-derived endothelium in breast cancer. *Biochem Pharmacol*, 118, 18-30. doi:10.1016/j.bcp.2016.08.008
- [47] Collignon, J., Lousberg, L., Schroeder, H., & Jerusalem, G. (2016). Triple-negative breast cancer: treatment challenges and solutions. *Breast Cancer : Targets and Therapy*, 8, 93-107. doi:10.2147/BCTT.S69488
- [48] Guestini, F., McNamara, K. M., Ishida, T., & Sasano, H. (2016). Triple negative breast cancer chemosensitivity and chemoresistance: current advances in biomarkers identification. *Expert Opin Ther Targets*, 20(6), 705-720. doi:10.1517/14728222.2016.1125469
- [49] Pant, S., Jones, S. F., Kurkjian, C. D., Infante, J. R., Moore, K. N., Burris, H. A., McMeekin, D.S., Benhadji, K.A., Patel, B.K., Frenzel, M.J., Kursar, J.D., Zamek-Gliszczynski, M.J., Yuen, E.S., Chan, E.M., Bendell, J. C. (2016). A first-in-human phase I study of the oral Notch inhibitor, LY900009, in patients with advanced cancer. *Eur J Cancer*, 56, 1-9. doi:10.1016/j.ejca.2015.11.021
- [50] Locatelli, M. A., Aftimos, P., Dees, E. C., LoRusso, P. M., Pegram, M. D., Awada, A., Huang, B., Cesari, R., Jiang, Y., Shaik, M.N., Kern, K.A., Curigliano, G. (2017). Phase I study of the gamma secretase inhibitor PF-03084014 in combination with docetaxel in patients with advanced triple-negative breast cancer. *Oncotarget*, 8(2), 2320-2328. doi:10.18632/oncotarget.13727
- [51] Schott, A.F., Landis, M. D., Dontu, G., Griffith, K. A., Layman, R. M., Krop, I., Paskett, L. A., Wong, H., Dobrolecki, L. E., Lewis, M. T., Froehlich, A. M., Paraniham, J., Hayes, D. F., Wicha, M. S. & Chang, J. C., (2013), Preclinical and clinical studies of gamma secretase inhibitors with docetaxel on human breast tumors. *Clin Cancer Res*, 19(6): p. 1512-24.
- [52] Debeb, B.G., Cohen, E. N. Boley, K. Freiter, E. M., Li, L., Robertson, F. M., Reuben, J. M., Cristofanilli, M., Buchholz, T. A. & Woodward, W., (2012) A.Pre-Clinical studies of Notch Signaling Inhibitor RO4929097 in Inflammatory Breast Cancer Cells. *Breast cancer research and treatment*, 134(2): p. 495-510.
- [53] Nickoloff, B. J., Osborne, B. A., & Miele, L. (2003). Notch signaling as a therapeutic target in cancer: a new approach to the development of cell fate modifying agents. *Oncogene*, 22(42), 6598-6608. doi:10.1038/sj.onc.1206758
- [54] Shih Ie, M., & Wang, T. L. (2007). Notch signaling, gamma-secretase inhibitors, and cancer therapy. *Cancer Res*, 67(5), 1879-1882. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-3958
- [55] Wu, Y., Cain-Hom, C., Choy, L., Hagenbeek, T. J., de Leon, G. P., Chen, Y., Finkle, D., Venook, R., u, X., Fidgway, J., Scshahin-Reed, D., Dow, G.J., Shelton, A., Stawicki, S., Watts, R.J., Zhang, J., Choy, R., Howard, P., Kadyk, L., Yan, M., Zha, J., Callahan, C. A., Hymowitz, S. G., Siebel, C. W. (2010). Therapeutic antibody targeting of individual Notch receptors. *Nature*, 464(7291), 1052-1057. doi:http://www.nature.com/nature/journal/v464/n7291/supinfo/nature08878_S1.html
- [56] Sharma, A., Paranjape, A. N., Rangarajan, A., & Dighe, R. R. (2012). A monoclonal antibody against human Notch1 ligand-binding domain depletes subpopulation of putative breast cancer stem-like cells. *Mol Cancer Ther*, 11(1), 77-86. doi:10.1158/1535-7163.mct-11-0508
- [57] Ridgway, J., Zhang, G., Wu, Y., Stawicki, S., Liang, W.-C., Chanthery, Y., Kowalski, J., Watts, R.J., Callahan, C., Kasman, I., Singh, M., Chien, M., Tan, C., Hongo, J.S., de

- Sauvage, F., Plowman, G., Yan, M. (2006). Inhibition of Dll4 signalling inhibits tumour growth by deregulating angiogenesis. *Nature*, 444(7122), 1083-1087. doi:http://www.nature.com/nature/journal/v444/n7122/supinfo/nature05313_S1.html
- [58] Chiorean, E. G., LoRusso, P., Strother, R. M., Diamond, J. R., Younger, A., Messersmith, W. A., Adriaens, L., Liu, L., Kao, R.J., DiCioccio, A.T., Kostic, A., Leek, R., Harris, A., Jimeno, A. (2015). A Phase I First-in-Human Study of Enoticumab (REGN421), a Fully Human Delta-like Ligand 4 (Dll4) Monoclonal Antibody in Patients with Advanced Solid Tumors. *Clin Cancer Res*, 21(12), 2695-2703. doi:10.1158/1078-0432.ccr-14-2797
- [59] Xu, Z., Wang, Z., Jia, X., Wang, L., Chen, Z., Wang, S., . . . Wu, M. (2016). MMGZ01, an anti-DLL4 monoclonal antibody, promotes nonfunctional vessels and inhibits breast tumor growth. *Cancer Lett*, 372(1), 118-127. doi:10.1016/j.canlet.2015.12.025
- [60] Purow, B. (2012). Notch inhibition as a promising new approach to cancer therapy. *Adv Exp Med Biol*, 727, 305-319. doi:10.1007/978-1-4614-0899-4_23
- [61] Smalley, M. J., Reis-Filho, J. S., & Ashworth, A. (2008). BRCA1 and stem cells: tumour typecasting. *Nat Cell Biol*, 10(4), 377-379.
- [62] Buckley, N. E., Nic An tSaoir, C. B., Blayney, J. K., Oram, L. C., Crawford, N. T., D'Costa, Z. C., Quinn, J.E., Kennedy, R.D., Harkin, D.P., Mullan, P. B. (2013). BRCA1 is a key regulator of breast differentiation through activation of Notch signalling with implications for anti-endocrine treatment of breast cancers. *Nucleic Acids Res*, 41(18), 8601-8614. doi:10.1093/nar/gkt626
- [63] Chang, S., & Sharan, S. K. (2012). BRCA1 and MicroRNAs: Emerging Networks and Potential Therapeutic Targets. *Molecules and Cells*, 34(5), 425-432. doi:10.1007/s10059-012-0118-y
- [64] Moskwa, P., Buffà, F. M., Pan, Y., Panchakshari, R., Gottipati, P., Muschel, R. J., Beech, J., Kulshrestha, R., Abdelmohsen, K., Weinstock, D.M., Gorospe, M., Harris, A.L., Helleday, T., Chowdhury, D. (2011). miR-182-mediated downregulation of BRCA1 impacts DNA repair and sensitivity to PARP inhibitors. *Mol Cell*, 41(2), 210-220. doi:10.1016/j.molcel.2010.12.005
- [65] Wang, Z., Li, Y., Kong, D., Ahmad, A., Banerjee, S., & Sarkar, F. H. (2010). Cross-talk between miRNA and Notch signaling pathways in tumor development and progression. *Cancer Lett*, 292(2), 141-148. doi:10.1016/j.canlet.2009.11.012
- [66] Brabletz, S., Bajdak, K., Meidhof, S., Burk, U., Niedermann, G., Firat, E., Wellner, U., Dimmler, A., Faller, G., Schubert, J., Brabletz, T. (2011). The ZEB1/miR-200 feedback loop controls Notch signalling in cancer cells. *Embo j*, 30(4), 770-782. doi:10.1038/emboj.2010.349
- [67] Li, X.-j., Ji, M.-h., Zhong, S.-l., Zha, Q.-b., Xu, J.-j., Zhao, J.-h., & Tang, J.-h. (2012). MicroRNA-34a Modulates Chemosensitivity of Breast Cancer Cells to Adriamycin by Targeting Notch1. *Archives of Medical Research*, 43(7), 514-521. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.arcmed.2012.09.007
- [68] Kang, L., Mao, J., Tao, Y., Song, B., Ma, W., Lu, Y., Zhao, L., Li, J., Yang, B. & Li, L., (2015), MicroRNA-34a suppresses the breast cancer stem cell-like characteristics by downregulating Notch1 pathway. *Cancer Sci*. 106(6): p. 700-8.
- [69] Garzon, R., Marcucci, G., & Croce, C. M. (2010). Targeting microRNAs in cancer: rationale, strategies and challenges. *Nat Rev Drug Discov*, 9(10), 775-789. doi:10.1038/nrd3179
- [70] Suman, S., Das, T. P., & Damodaran, C. (2013). Silencing NOTCH signaling causes growth arrest in both breast cancer stem cells and breast cancer cells. *Br J Cancer*, 109(10), 2587-2596. doi:10.1038/bjc.2013.642
- [71] Pal, D., Kolluru, V., Chandrasekaran, B., Baby, B. V., Aman, M., Suman, S., Sirimulla, S., Sanders, M.A., Alattasi, H., Ankem, M.K., Damodaran, C. (2017). Targeting aberrant expression of Notch-1 in ALDH+ cancer stem cells in breast cancer. *Mol Carcinog*, 56(3), 1127-1136. doi:10.1002/mc.22579
- [72] So, J. Y., Wahler, J., Das Gupta, S., Salerno, D. M., Maehr, H., Uskokovic, M., & Suh, N. (2015). HES1-mediated inhibition of Notch1 signaling by a Gemini vitamin D analog leads to decreased CD44(+)/CD24(-/low) tumor-initiating subpopulation in basal-like breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 148, 111-121. doi:10.1016/j.jsbmb.2014.12.013
- [73] Shan, N. L., Wahler, J., Lee, H. J., Bak, M. J., Gupta, S. D., Maehr, H., & Suh, N. (2016). Vitamin D compounds inhibit cancer stem-like cells and induce differentiation in triple negative breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol*. doi:10.1016/j.jsbmb.2016.12.001
- [74] Shim, Y., & Song, J. M. (2015). Quantum dot nanoprobe-based high-content monitoring of notch pathway inhibition of breast cancer stem cell by capsaicin. *Mol Cell Probes*, 29(6), 376-381. doi:10.1016/j.mcp.2015.09.004
- [75] Sun, D. W., Zhang, H. D., Mao, L., Mao, C. F., Chen, W., Cui, M., Ma, R., Cao, H.X., Jing, C.W., Wang, Z., Wu, J.Z., Tang, J. H. (2015). Luteolin Inhibits Breast Cancer Development and Progression In Vitro and In Vivo by Suppressing Notch Signaling and Regulating MiRNAs. *Cell Physiol Biochem*, 37(5), 1693-1711. doi:10.1159/000438535
- [76] Sun, Z., Zhou, C., Liu, F., Zhang, W., Chen, J., Pan, Y., Ma, L., Liu, Q., Du, Y., Yang, J. & Wang, Q., (2018), Inhibition of breast cancer cell survival by Xanthohumol via modulation of the Notch signaling pathway in vivo and in vitro. *Oncology Letters*. 15(1): p. 908-916.
- [77] Moselhy, J., Srinivasan, S., Ankem, M. K., & Damodaran, C. (2015). Natural Products That Target Cancer Stem Cells. *Anticancer Res*, 35(11), 5773-5788.
- [78] Xia, S., Zhang, X., Li C. & Guan, H., (2017), Oridonin inhibits breast cancer growth and metastasis through blocking the Notch signaling. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 25(4): p. 638-643.

- [79] Zhang, J., Yu, K., Han, X., Zhen, L., Liu, M. Zhang, X., Ren, Y. & Shi, J., (2018), Paeoniflorin influences breast cancer cell proliferation and invasion via inhibition of the Notch1 signaling pathway. *Mol Med Rep*, 17(1): p. 1321-1325.
- [80] Brannon-Peppas, L., & Blanchette, J. O. (2012). Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy. *Advanced drug delivery reviews*, 64, 206-212.
- [81] Hartmann, L. C., Keeney, G. L., Lingle, W. L., Christianson, T. J., Varghese, B., Hillman, D., Oberg, A. L., Low, P. S. (2007). Folate receptor overexpression is associated with poor outcome in breast cancer. *Int J Cancer*, 121(5), 938-942.
- [82] Wittig, R., Rosenholm, J. M., von Haartman, E., Hemming, J., Genze, F., Bergman, L., Simmet, T., Lindén, M., Sahlgren, C. (2014). Active targeting of mesoporous silica drug carriers enhances gamma-secretase inhibitor efficacy in an in vivo model for breast cancer. *Nanomedicine (Lond)*, 9(7), 971-987. doi:10.2217/nmm.13.62
- [83] Mamaeva, V., Rosenholm, J. M., Bate-Eya, L. T., Bergman, L., Peuhu, E., Duchanoy, A., Fortelius, L.E., Landor, S., Toivola, D.M., Lindén, M. (2011). Mesoporous silica nanoparticles as drug delivery systems for targeted inhibition of Notch signaling in cancer. *Molecular Therapy*, 19(8), 1538-1546.
- [84] Mamaeva, V., Niemi, R., Beck, M., Ozliseli, E., Desai, D., Landor, S., Gronroos, T., Kroqvist, P., Pettersen, I.K.N., McCormack, E., Rosenholm, J.M., Linden, M., Sahlgren, C. (2016). Inhibiting Notch Activity in Breast Cancer Stem Cells by Glucose Functionalized Nanoparticles Carrying gamma-secretase Inhibitors. *Mol Ther*, 24(5), 926-936. doi:10.1038/mt.2016.42
- [85] Yang, H., Li, Y., Li, T., Xu, M., Chen, Y., Wu, C., Dang, X., Liu, Y. (2014). Multifunctional core/shell nanoparticles cross-linked polyetherimide-folic acid as efficient Notch-1 siRNA carrier for targeted killing of breast cancer. *Sci Rep*, 4, 7072. doi:10.1038/srep07072.