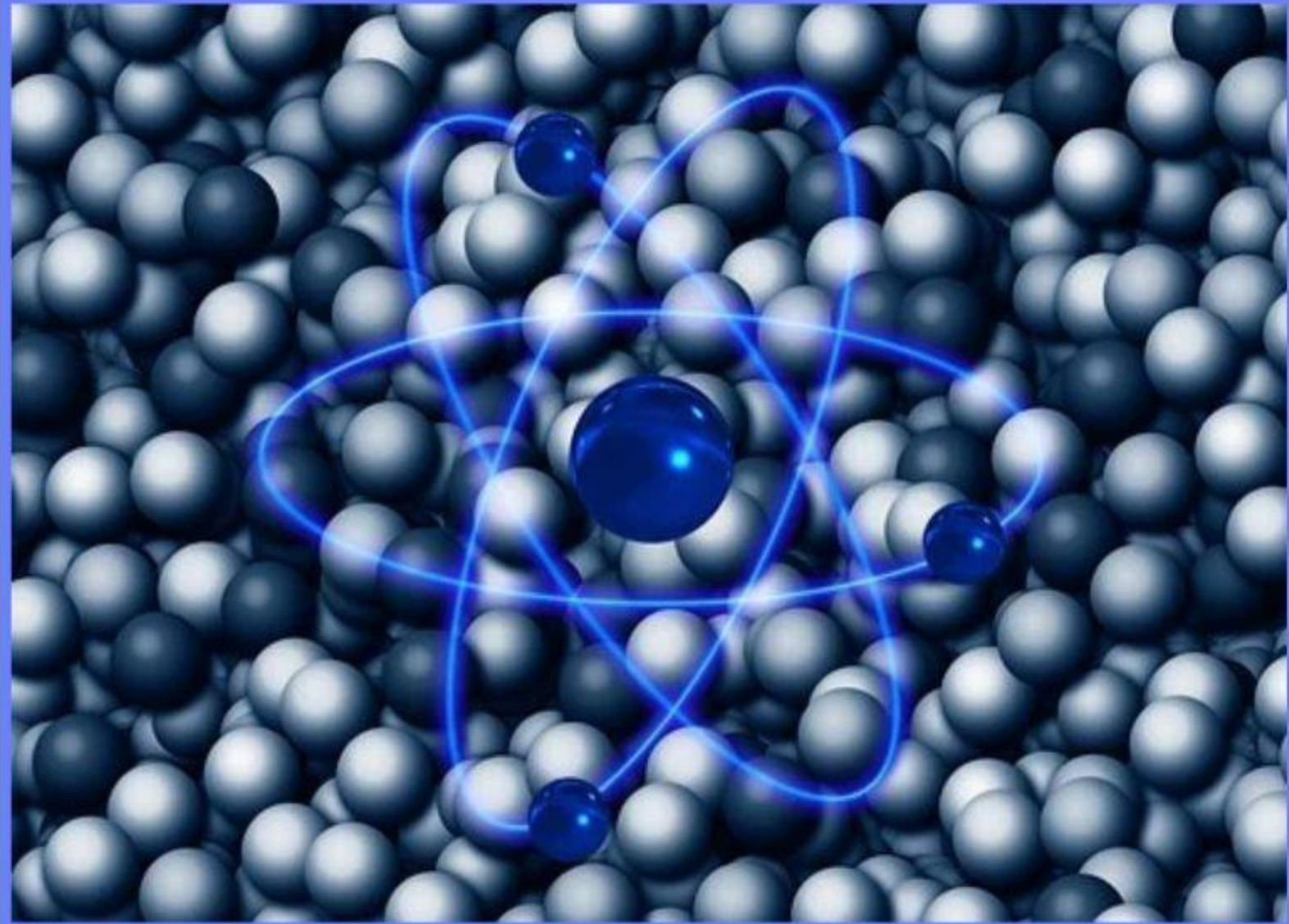




Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Dergisi

e-ISSN: 2757-5543

Cilt 1, Sayı 1-2



Aralık, 2020

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

Hakkında

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

Yayın Kurulu

Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Dergisi

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

Baş Editör: Prof. Dr. Deniz YÜZBAŞIOĞLU

Editör Yardımcıları:

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

Alan Editörleri:

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

Yayın Danışma Kurulu:

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

Teknik Sorumlular:

Dr. Damla AMUTKAN	Arş. Gör. Mazlum TÜRK
-------------------	-----------------------

Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Dergisi

Gazi Üniversitesi, Fen Fakültesi, 06500 Teknikokullar-ANKARA / TÜRKİYE

Telefon: (+90) 312 202 10 01 Faks: (+90) 312 212 22 79 E-posta: fenfakultesidergisi@gazi.edu.tr

Web adresi: www.sci-fac-j.gazi.edu.tr

Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Dergisi, 1. Cilt (1-2), Aralık, 2020

İÇİNDEKİLER

Sayfa

Fatma Ünal, Nesrin Durdu Helvacı Tülek, Deniz Yüzbaşıoğlu, Mustafa Çelik, (2020), Methidathion İnektisit/Akarisitinin Sitotoksik ve Genotoksik Potansiyelinin Allium Testi ile İncelenmesi	1-12
Selin Ural, Zehranur Yüksekdağ, (2020), Lactobacillus Cinsi Bakterilerinin Farklı Yöntemler ile Antioksidan Aktivitelerinin Belirlenmesi	13-21
Emre Koçak, H. Hasan Örkü, (2020), Parametre Tahmininde Farklı Doğrusal Programlama Modellerinin Karşılaştırılması	22-35
Sahra Setenay Baran, Belma Asım, (2020), Nörodejeneratif Hastalıkların Ca ⁺² Homeostazisi ile İlişkisi ve Ca ⁺² Homeostazisinin Düzenlenmesini Hedef Alan Doğal Bileşenler	36-50
Merve Keskin, Fatma Arslan, (2020), Biyosensörler	51-60

Methidathion İnsektisit/Akarisitinin Sitotoksik ve Genotoksik Potansiyelinin Allium Testi ile İncelenmesi

Fatma Ünal^{1*}, Nesrin Durdu Helvacı Tülek¹, Deniz Yüzbaşıoğlu¹, Mustafa Çelik²
¹ Gazi Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 06560, Ankara, Türkiye
² Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Temel Tıp Bilimleri Bölümü, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, 46100, Kahramanmaraş, Türkiye

Öne Çıkanlar

- Methidathion'un genotoksik potansiyeli Allium testi ile ilk kez incelenmiştir.
- Methidathion *Allium cepa* kök ucu hücrelerinde anlamlı sitotoksik ve genotoksik etki oluşturmuştur.
- Allium testinin, methidathionun toksik etkisini belirlemede hassas ve etkili bir test olduğu gösterilmiştir.

Makale Bilgileri

Geliş:05/11/2020
Kabul: 22/11/2020

Anahtar Kelimeler

Pestisit,
Methidathion,
Sitotoksik etki,
Genotoksik etki,
Allium cepa

Özet

Organik fosforlu pestisitlerden olan Methidathion (Supracide 40 EC, MET), meyve ağaçlarında, sebzelerde, tütünde, yoncada, ayçiçeğinde, seralarda ve gül bahçelerinde çeşitli böcek ve akarlar karşı kullanılmaktadır. Bu çalışmada, Allium testi kullanılarak, methidathionun Allium cepa kök ucu hücrelerindeki sitotoksik ve genotoksik etkileri incelenmiştir. Kök büyüme inhibisyon testi ile, etkili konsantrasyon (EC₅₀) değeri 30 mg/L olarak tespit edildikten sonra, Allium cepa kök uçları, MET'un dört farklı konsantrasyonu (7,5, 15, 30 ve 45 mg/L) ile 12, 24 ve 48 saat muamele edilmiştir. MET, mitotik indeksi (MI), tüm konsantrasyonlarda ve uygulama sürelerinde, kontrole kıyasla anlamlı şekilde düşürmüştür. Diğer yandan MET, kromozomal anomallikler, kontrole kıyasla anlamlı düzeyde artmıştır. En yaygın görülen anomallikler kromozom yapışıklığı (%47,50) ve C-mitoz (%44,24)'dur. Bunları sırasıyla fragment (%2,75), köprü (%2,55), geri kalma (%1,63) ve çok kutupluluk (%1,33) takip etmiştir. Çalışmada ayrıca, ön işleme tabi tutulmuş kök uçlarında kromozom ve kromatid kırıkları, fragmentler ve poliploidi tespit edilmiştir. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar, MET'un Allium cepa'da belirgin şekilde sitotoksik ve genotoksik olduğunu göstermiştir. Ayrıca, Allium testinin, MET'un toksik etkilerini belirlemede çok hassas ve etkili bir test olduğunu doğrulamıştır.

The Investigation of Cytotoxic and Genotoxic Potential of Methidathion Insecticide/Acaricide by Allium Test

Highlights

- The genotoxic potential of Methidathion was examined for the first time using the Allium test.
- Methidathion exhibited significant cytotoxic and genotoxic effects in root tip cells of *Allium cepa*.
- The Allium test has also been confirmed as a sensitive and effective test for determining the toxic effect of methidathion.

Article Info

Received: 05/11/2020
Accepted: 22/11/2020

Keywords

Pesticide,
Methidathion,
Cytotoxic effect,
Genotoxic effect,
Allium cepa

Abstract

Methidathion (Supracide 40 EC, MET), an organophosphorus pesticide, is used to control various insects/mites in a variety of crops such as fruits, vegetables, alfalfa, sunflower, tobacco, greenhouses, and rose gardens. In this study, cytotoxic and genotoxic potentials of methidathion were investigated in *Allium cepa* root meristem cells using the Allium test. Firstly, the EC₅₀ value of methidathion was detected as 30 mg/L using root growth inhibition test and then four concentrations, 7.5, 15, 30, and 45 mg/L, were applied to *Allium cepa* for 12, 24, and 48 hours. MET significantly decreased the mitotic index (MI) in all the concentrations and treatment periods compared to the control. On the other hand, MET significantly increased the frequency of chromosome aberrations compared to control groups. The most common types of abnormalities recorded were stickiness (47.50%) and C-mitosis (44.24%). They were followed by fragment (2.75%), bridge (2.55%), laggards (1.63%), and multipolarity (1.33%), respectively. Besides, in pretreated root tips, chromosome and chromatid breaks, fragments, and polyploidy were detected. The results of this study revealed that MET has significant cytotoxic and genotoxic effects in *Allium cepa*. It has also confirmed that the Allium test is a very sensitive and effective assay in determining the toxic effects of MET.



1. GİRİŞ

Yirminci yüzyılın başından beri giderek artış gösteren dünya nüfusunun, 2050 yılına kadar 9,4-10 milyar civarında olacağı tahmin edilmektedir [1, 2]. Dünya nüfusundeki bu artış, gıdaya ve tarımsal üretime olan ihtiyacı da ciddi şekilde artırmaktadır. Ancak tarım amacıyla kullanılan alanların sınırlı olması ve hatta giderek küçülmesi nedeniyle, bu ihtiyacın karşılanabilmesi için, birim alandan elde edilen verimin arttırılması yoluna gidilmektedir. Verimin arttırılabilmesi için de pestisit veya bitki koruma kimyasalları olarak bilinen ve doğaya yabancı olan kimyasal maddeler kullanılmaktadır. Bütün bunlardan dolayı, dünya çapında, 1950'lerde 0,2 milyon ton olan pestisit üretimi, 2000 yılına kadar yılda yaklaşık % 11 oranında artarak, 5 milyon tonun üzerine çıkmıştır [3]. 2000 yılından 2017 yılına kadar geçen sürede ise %7'lik bir artış olmuştur [4].

Pestisitler, birbiri ardına geliştirilen ve organoklorin, organofosfat, karbamat, piretroidler, büyüme düzenleyicileri, neonikotinoidler ve biyopestisitler gibi çeşitli bileşik gruplarını içermekte ve bunlara göre adlandırılmaktadır [2]. Pestisitler, etkiledikleri zararlı gruplarına göre de insektisit (böcek öldüren), akarisit (akarları-örümcekleri öldüren), herbisit (yabancı otları öldüren) vb. şekillerde adlandırılmaktadır. Pestisitler, tarım, sanayi ve sağlık alanlarında çeşitli faydalar sağlamakla birlikte, çevreye ve canlılara verebilecekleri zararlar nedeniyle hem toplumda ve hem de bilim insanlarında endişe oluşturmaktadır. Bu nedenle bir çok araştırmaya konu olmuşlardır [2, 5, 6].

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ), 2019 yılı verileri ışığında, pestisitleri tehlikelerine göre sınıflandırma kılavuzu yayınlamıştır. Bu kılavuzda pestisitler dört gruba ayrılmıştır. Çok tehlikeli pestisit aktif maddeler Sınıf Ia, oldukça tehlikeli olanlar Ib, orta derecede tehlikeli olanlar Sınıf II ve hafif tehlikeli olanlar Sınıf III olarak gruplandırılmıştır [7]. Methidathion (MET) organik fosforlu bir insektisit/akarisit olup, oldukça tehlikeli aktif maddelerin bulunduğu Ib sınıfında yer almaktadır [7]. Organik fosforlu insektisitler böceklerin sinir sistemini etkilemektedir. Sinyal iletiminde görev yapan asetilkolinin hidrolizinde rol oynayan asetilkolinesteraz enziminin işlevini engeller. Böylece sinyal iletimi durur ve ölüm gerçekleşir [8, 9]. Bu grupta yer alan bileşiklerin ve yan ürünlerinin diğer bir önemli özelliği de DNA'da alkillenmeye sebep olmaları [10, 11] ve sonuçta mutajenik ve karsinojenik etkiler ortaya çıkarabilmeleridir. Organik fosforlu pestisitlerin farklı canlılarda kromozomal anormalliklere, mutasyonlara ve DNA hasarına neden olduğunu gösteren çeşitli çalışmalar mevcuttur [12-15].

MET, organik fosforlu bileşiklerin heterosiklik türevleri grubundandır. Meyve ağaçlarında (şeftali, armut, elma, dut, incir vb.), sebzelerde, tütünde, yoncada, ayçiçeğinde, seralarda ve gül bahçelerinde çok çeşitli böcek ve akarlar karşı kullanılmaktadır. Ülkemizde 2011 yılında kullanımdan kaldırılmış [16] olmakla birlikte, yurt dışı menşeli çeşitli sitelerde ürün satışı yapılmakta ve dolayısıyla kullanımı da devam etmektedir. LD₅₀ değerleri sıçanlar için 25 ila 48 mg/kg ve fareler için 25 ila 70 m/kg arasında değişmektedir [17]. MET'nun genotoksik potansiyele sahip olup olmadığını belirlemek amacıyla Stivaktakis ve arkadaşlarının 2017 yılında yaptığı bir çalışmada [18], MET'un düşük konsantrasyonlarının etkisi kültürdeki insan lenfositlerinde incelenmiştir. Buna paralel olarak, farklı alkalın pH değerlerinin neden olduğu genotoksik aktivitesi de değerlendirilmiştir. Bu amaçla *in vitro* mikronukleus (MN) testi kullanılmıştır. İncelenen tüm konsantrasyonlarda MET'un mikronukleus frekanslarını artırmadığı ve genotoksik olmadığı belirlenmiştir. Benzer şekilde Lodovici ve arkadaşları [19], MET'un sıçanların karaciğerinde DNA hasarı oluşturmadığını açıklamışlardır. 1996 yılında fare kemik iliğinde gerçekleştirilen *in vivo* çalışmada MET'un MN frekansını artırmadığı bildirilmiştir. Ancak aynı çalışmada MET'un insan lenfositlerinde metabolik aktivasyon sistemi yokluğunda kardeş kromatid değişimlerini artırdığı belirlenmiştir [20]. 2014 yılında yapılan ve MET'un oldukça düşük dozlarının (0,01-0,075 mg/L) kullanıldığı bir çalışmada, *Drosophila*'da *in vivo* somatik mutasyon ve rekombinasyon (SMART) testinde genotoksositeye neden olmadığı tespit edilmiştir [21]. Dişi Wistar ratlarda kemik iliğinde *in vivo* MN testi kullanılarak yapılan bir araştırmada, MET'nun intraperitoneal uygulamasının MN frekansını artırmadığı ancak nekrotik ve apoptotik hücre oranını doza bağlı olarak anlamlı düzeyde artırdığı açıklanmıştır. Bu nedenle MET'un insanlar için güvenli olmadığı vurgulanmıştır [22]. MET'un *in vitro* insan lenfositlerinde genotoksik etkilerinin belirlenmesi amacıyla yürütülen bir araştırmada, bu pestisit kromozomal anormallik (KA) ve mikronukleus frekansını ve kardeş kromatid değişimi (KKD)/ oranını anlamlı düzeyde

artırdığı, diğer yandan mitotik indeksi anlamlı şekilde düşürdüğü rapor edilmiştir. Elde edilen bulgular ışığında MET'un klastojenik, mutajenik ve anöjenik etkilere neden olduğu belirtilmiştir [23]. Bu yayınlar, MET'nun genetik materyal ile etkileşime girebileceğini, DNA'da ve kromozomlarda değişimlere ve hasarlara sebep olabileceğini ve sonuçta genotoksik ve mutajenik olabileceğini göstermektedir. Bu da MET'nun insanlarda sağlık sorunlarına ve hatta kansere dahi neden olabileceğine işaret etmektedir.

Çevresel kirleticilerin genotoksik, mutajenik ve kanserojen etkilerinin belirlenmesinde çeşitli testler ve bu testlerde farklı türler kullanılmaktadır. Genellikle *Allium cepa*'nın kullanıldığı Allium testi de mükemmel bir genetik model ve biyogösterge olarak uzun yıllardır bilim insanları tarafından tercih edilen bir testtir. İlk defa 1938 yılında Levan tarafından kolşisinin etkisini belirlemek amacıyla uygulanan bu test, 1985 yılında Fiskeşjö tarafından standart bir test haline getirilmiş ve daha sonra 2003 yılında Rank tarafından bazı değişiklikler yapılarak geliştirilmiştir [24]. Bu test, Birleşmiş Milletler Çevre Programı (United Nations Environment Program-UNEP), Bitki Biyotestlerinde Uluslararası Program (International Program on Plant Bioassays-IPPB) [25] ve Birleşik Devletler Çevre Koruma Ajansı, Genetik Toksikoloji Programı (US Environmental Protection Agency-EPA, Gene-Tox Program) [26] tarafından da standardize edilerek önerilen testlerden biridir. Bu biyotestlerden elde edilen verilerin, çevresel genotoksisiteyi belirlemede etkili olduğu USEPA ve Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization-WHO) tarafından da kabul edilmektedir [27].

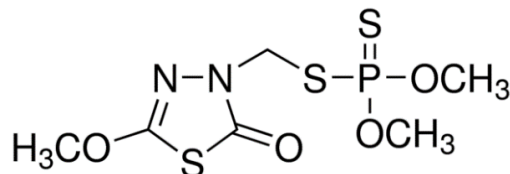
Gelişmiş bir organizma olan bitkilerin genotoksisite testinde kullanımı, çok hücreli bir sistemde çeşitli kimyasalların potansiyel DNA hasarı hakkında önemli bilgiler vermektedir. Bitkilerin kullanımı, ekzojen metabolik sistemler gerektirmediği için büyük avantaj sağlamaktadır. Ayrıca, deneysel çalışmalarda hayvanların kullanımına kıyasla, hem daha az maliyetli ve hem de etik kaygılardan uzak bir rahatlık oluşturmaktadır [24, 28-31]. Bütün bunlara ilaveten, Allium testi ile elde edilen sonuçların, çeşitli hücreler ile yapılan *in vitro* çalışmalarla ve farklı hayvanların kullanıldığı *in vivo* çalışmalarla benzer sonuçlar verdiği de belirlenmiştir [24, 30]. *Allium cepa*, hem az sayıda kromozoma sahip olması ($2n=16$) ve hem de kromozomlarının büyük ve ışık mikroskopunda incelenmesinin kolay olması gibi avantajları nedeniyle Allium testinde en çok tercih edilen türdür [24, 32-35]. Allium testinde ayrıca *Allium sativum*, *Vicia faba*, *Zea mays*, *Tradescantia paludose* ve *Hordeum vulgare* gibi başka türler de kullanılmaktadır [30, 36].

Yukarıda kısaca özetlenen araştırmalar, bir yandan MET'nun toksik olabileceğine yönelik bulguların olduğunu diğer yandan çevresel kimyasalların genotoksik etkilerinin belirlenmesinde *Allium cepa*'nın önemli bir biyogösterge olduğunu göstermektedir. Ayrıca, MET'nun genotoksik potansiyelinin *Allium cepa* kök ucu hücreleri gibi önemli bir biyogösterge türünde incelendiğine yönelik bir araştırma mevcut değildir. Bütün bu sebeplerden dolayı, bu araştırmanın amacı, MET (Supracide 40 EC)'un toksik etkilerini Allium testi kullanarak *Allium cepa* kök ucu meristeminde incelemektir. Bu test ile hem MET'nun mitoz bölünme üzerindeki etkisi (mitotik indeks) ve dolayısıyla sitotoksik potansiyeli ve hem de mitozda anormallik oluşturma ve dolayısıyla klastojenik ve anöjenik (genotoksisitenin) potansiyeli ortaya çıkarılabilecektir.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Test Maddesi

Bu çalışmada, organofosforlu insektisit/akarisit olan Supracide 40 EC (426 gr/L methidathion) kullanılmıştır. MET'un kimyasal formülü $C_6H_{11}N_2O_4PS_3$ olup katalog numarası 950-37-8'dir. Molekül ağırlığı 302,3 g/mol'dür. Kimyasal adlandırması S-[(5-methoxy-2-oxo-1,3,4-thiadiazol-3(2H)-yl)methyl]0,0-dimethyl phosphorodithioate şeklindedir. Yapısal formülü Şekil 1'de gösterilmiştir.



Şekil 1. Methidathion'un yapısal formülü [37]

2.2. Test Materyali

Bu araştırmada *Allium cepa* testi uygulanmıştır. Bunun için birbirine yakın büyüklükte (1,5-2,0 cm çapında) *Allium cepa* L. (2n=16) yumruları seçilmiş ve kurumuş kabukları ve kökleri temizlenerek kullanılmıştır.

2.3. EC₅₀ Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Öncelikle, MET'un EC₅₀ konsantrasyonunun belirlenmesi amacıyla, büyüme inhibisyon testi uygulanmıştır [38-40]. Bunun için, soğanlar dört gün boyunca MET'un 13 farklı konsantrasyonu (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200 ve 250 mg/L, etken madde miktarı temel alınarak) ile muamele edilmiştir. Her konsantrasyon için 5 farklı soğan kullanılmış ve her soğanda 10 farklı kökün uzunluğu ölçülmüştür. Ayrıca MET'un eklenmediği bir kontrol grubu da oluşturulmuştur. Uygulama sonucunda, kontrol grubundaki ortalama kök uzunluğuna kıyasla %50 oranında kısalma sağlayan konsantrasyonun, yani EC₅₀ değerinin 30 mg/L olduğu tespit edilmiştir.

2.4. Test Konsantrasyonları ve Muameleler

EC₅₀ konsantrasyonu belirlendikten sonra, en yüksek konsantrasyon olarak EC₅₀x3/2 değerleri de EC₅₀x1, EC₅₀x1/2 ve EC₅₀x1/4 olacak şekilde dört konsantrasyon (45, 30, 15 ve 7,5 mg/L) belirlenmiştir. Soğanlar önce 24 saat oda sıcaklığında (20±1°C) distile suda çimlendirilmiştir. Çimlenen soğanlar, MET'nun 4 farklı konsantrasyonu ile 12, 24 ve 48 saat muamele edilmiştir. Kontrol grubundaki soğanlar sadece distile suda bekletilmiştir. Tüm uygulama sürelerinde, her bir konsantrasyon için 12 soğan kullanılmıştır. Uygulamalardan sonra kök uçları alınarak, damıtık su ile yıkanmış ve 24 saat boyunca 3:1 etil alkol:glasiyal asetik asit ile tespit edilmiştir. Takiben kökler %70'lik alkole aktarılmış ve kullanılabildiği kadar buzdolabında saklanmıştır [41, 42]. Özellikle metafaz aşamasındaki anormalliklerin tespiti için köklerin bir kısmı tespit işleminden önce α -monobromonaftalin ile 3 saat muamele edilmiştir [43, 44]. Sitolojik preparatlar, 10 farklı soğandan elde edilen kök uçlarından, Feulgen metodu kullanılarak hazırlanmış ve depex ile kapatılarak daimi hale getirilmiştir.

2.5. Mitotik İndeks, Mitotik ve Kromozomal Anormallik Testi

Her bir konsantrasyon ve uygulama süresi için farklı soğanların kök uçlarından hazırlanmış 10 farklı preparatta mitotik indeks, mitotik safhaların oranları ve mitotik anormallikler incelenmiştir. Her bir preparatta 1000 hücre, 10 farklı kök ucundan toplam 10.000 hücre değerlendirilmiştir. Ayrıca ön muamele yapılan kök uçlarında metafazdaki anormalliklerin tespitinde her bir konsantrasyon ve uygulama süresi için beş farklı soğan kullanılmış olup, her soğandan 100 hücre (toplam 500 hücre) incelenmiştir.

2.6. İstatistiksel Analiz

Uygulama ve kontrol gruplarından elde edilen verilerin karşılaştırılmasında, mitotik indekste z-testi, mitotik faz oranları, mitotik ve kromozomal anormalliklerde ise χ^2 testi kullanılmıştır.

3. BULGULAR

MET'in *Allium cepa* kök uçlarına uygulanan tüm konsantrasyonları ve uygulama süreleri, mitotik indeksi kontrole kıyasla anlamlı düzeyde düşürmüştür. Diğer taraftan metafaz ve telofaz safhalarında bir miktar artışa ve profaz safhasında da bir miktar azalmaya neden olmuştur. Ancak mitotik safhaların oranları üzerinde anlamlı bir etkisi olmamıştır (*Çizelge 1*).

Çizelge 1. Methidathion ile muamele edilen *A. cepa* kök uçlarında mitotik indeks ve mitotik fazların frekansı

Konsantrasyonlar (mg/L) ve muamele süreleri	Bölünen hücre sayısı	M \bar{X} ±SH	Mitotik fazlar (%)			
			Profaz	Metafaz	Anafaz	Telofaz
Kontrol	823	8,23± 0,30	50,55	25,27	12,65	11,54
12 saat						
7,5	645	6,45±0,24 ^a	38,00	33,88	11,34	16,78
15	366	3,66±0,19 ^a	46,99	28,69	10,66	13,66
30	439	4,39±0,20 ^a	46,70	30,98	9,79	12,53
45	278	2,78±0,16 ^a	37,05	35,61	10,43	16,91
24 saat						
7,5	635	6,35±0,24 ^a	37,48	28,50	14,49	19,53
15	386	3,86±0,19 ^a	41,71	35,23	7,00	16,06
30	365	3,65±0,19 ^a	43,84	30,14	12,60	13,42
45	409	4,09±0,20 ^a	45,23	26,41	13,20	15,16
48 saat						
7,5	596	5,96±0,24 ^a	35,74	33,55	12,58	18,12
15	632	6,32±0,24 ^a	35,76	31,80	14,24	18,20
30	426	4,26±0,20 ^a	39,20	31,93	11,97	16,90
45	443	4,43±0,15 ^a	43,57	33,86	10,38	12,19

^aKontrolle göre P<0,001 düzeyinde anlamlı (z testi)

MET uygulaması *A. cepa* kök ucu hücrelerinde mitotik anormalliklerde artışa neden olmuştur (Çizelge 2). Mitotik anormallik düzeyi, tüm uygulama süreleri ve konsantrasyonlarda (12 saatlik uygulamanın en düşük konsantrasyonu hariç) kontrole kıyasla anlamlı düzeyde artmıştır. Yapışık kromozom, C-mitoz, köprü, fragment, geri kalma ve çok kutupluluk olmak üzere altı farklı mitotik anormallik gözlenmiştir (Şekil 2). En yaygın görülen anormallik tipi yapıışık kromozomlardır (%47,50). İkinci en sık görülen anormallik ise C-mitoz olup görülme frekansı %44,24'dür. Bunu sırasıyla fragment (%2,75), köprü (%2,55), geri kalma (%1,63) ve çok kutupluluk (%1,33) takip etmektedir. Diğer taraftan interfazda çok çekirdekli ve mikroçekirdekli hücreler gözlenmiştir. Ancak interfazda gözlenen anormallik düzeyi kontrole kıyasla anlamlı değildir (Çizelge 2).

MET uygulaması sonucunda ortaya çıkan ve α - monobromonaftalin ile ön muamele edilerek tespit edilen bazı kromozomal anormallikler Şekil 2'de gösterilmiştir. Bu anormalliklerin oranı kontrol grubuna kıyasla sadece 12 ve 48 saatlik uygulamaların 7,5 mg/L'lik konsantrasyonunda, 24 saatlik uygulamanın ise 15 mg/L'lik konsantrasyonunda anlamlıdır (Çizelge 3). En fazla gözlenen anormallikler kromozom kırıkları olup (%47,73) daha sonra fragment (%30,68) ve sayısal anormallik olan poliploidi (%18,18) gelmektedir. Ayrıca düşük oranda (%3,41) kromatit kırıkları da belirlenmiştir.

Çizelge 2. Methidathion ile muamele edilen *A. cepa* kök uçlarında mitotik anormallik tipleri ve frekansları

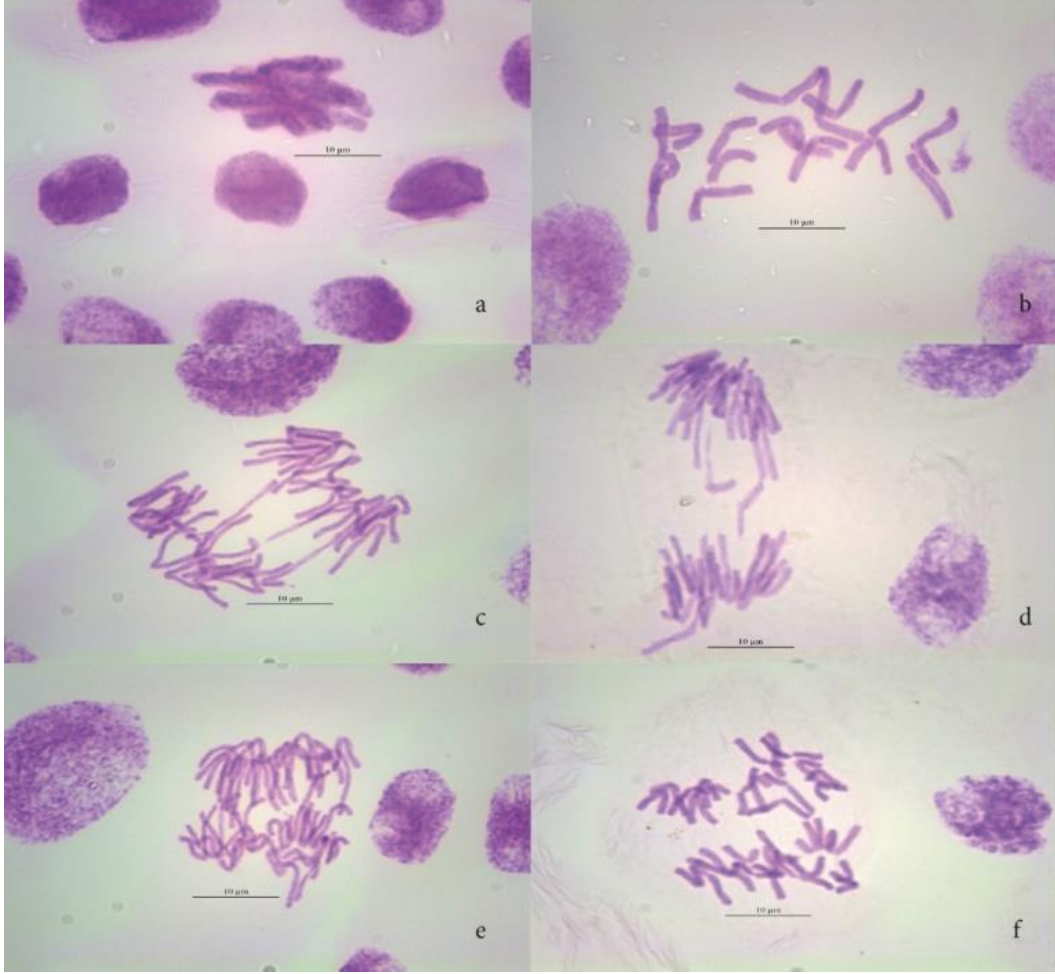
Kons. (mg/L) ve muam. süresi	Mitotik-kromozomal anormallikler (%)						Toplam anormallik (%)	Anormal interfaz		
	Yapışıklık	C-mitoz	Fragment	Köprü	Geri kalma	Çok kutupluluk		Çoklu çekirdek	Mikro-çekirdek	Anormal interfaz (%)
Kontrol	1,34	-	-	-	-	0,12	1,46	0,05	-	0,05
12saat										
7,5	0,62	1,24	1,09	0,47	0,31	0,31	4,04	0,88	0,01	0,89
15	9,84	6,56	-	1,09	-	-	17,49***	0,33	-	0,33
30	1,82	13,90	-	0,46	0,46	-	16,64***	-	0,04	0,04
45	6,47	16,91	-	1,80	1,08	0,36	27,34***	-	0,02	0,02
24 saat										
7,5	12,28	2,68	1,42	0,31	-	0,16	16,85***	0,98	0,05	1,03
15	10,36	11,66	-	0,52	-	0,26	22,80***	0,65	0,01	0,66
30	4,38	9,85	-	-	0,82	-	15,05***	-	0,01	0,01
45	10,51	3,42	-	0,24	0,49	0,24	14,90***	-	0,03	0,03
48 saat										
7,5	12,58	8,05	1,34	0,34	-	-	22,31***	0,65	0,09	0,74
15	5,22	2,53	-	0,63	-	0,47	8,85*	0,34	-	0,34
30	6,34	8,91	-	-	0,47	0,47	16,19***	-	-	-
45	19,86	18,07	0,68	-	-	0,45	39,06***	1,10	0,16	1,26
Anormallik frekansları (%)	47,50	44,24	2,75	2,55	1,63	1,33				

*Kontrole göre P<0,05 düzeyinde anlamlı (χ^2 testi) **Kontrole göre P<0,01 düzeyinde anlamlı (χ^2 testi)
 ***Kontrole göre P<0,001 düzeyinde anlamlı (χ^2 testi)

Çizelge 3. Methidathion ile muamele edilen ve α -monobromonaftalin ile ön işlem uygulanan *A. cepa* kök uçlarında metafazda gözlenen anormallik tipleri ve oranları

Kons. (mg/L) ve muamele süreleri	Anormallikler (%)				Toplam anormallik %
	Kromozom kırığı	Fragment	Poliploidi	Kromatid kırığı	
Kontrol	2	1	-	-	3
12 saat					
7,5	7	6	-	-	13*
15	-	-	-	-	-
30	-	-	-	-	-
45	-	1	-	-	1
24 saat					
7,5	5	4	-	-	9
15	7	2	14	-	23***
30	2	1	-	-	3
45	3	3	-	-	6
48 saat					
7,5	9	2	2	3	16**
15	2	3	-	-	5
30	2	2	-	-	4
45	5	3	-	-	8
Anormallik frekansları (%)	47,73	30,68	18,18	3,41	

*Kontrole göre P<0,05 düzeyinde anlamlı (χ^2 testi) **Kontrole göre P<0,01 düzeyinde anlamlı (χ^2 testi) ***Kontrole göre P<0,001 düzeyinde anlamlı (χ^2 testi)



Şekil 2. Methidathion ile muamele edilen *A. cepa* kök ucu hücrelerinde mitotik ve kromozomal anormallikler a)Yapışık kromozomlar b)C-mitoz c)Köprü d) Geri kalma e-f)Çok kutupluluk

4. TARTIŞMA

Pestisitler hem tarım alanlarında hem ticari alanlarda ve hem de insanların yerleşim yerlerinde kullanılan ve bütün popülasyonun çeşitli yollar ile maruz kaldığı kimyasal maddelerdir. İncelenen bazı popülasyonlarda, bireylerin büyük kısmının idrarında, çeşitli pestisitlerin metabolitleri tespit edilmiştir. Bu durum, bu popülasyonların özellikle pestisitler ile muamele edilmiş gıdaları tüketmesiyle veya diğer yollarla pestisitleri vücutlarına aldığını göstermektedir [45, 46]. Son 20 yılda yapılan araştırmalarda, pestisitlere maruz kalma ile bazı kanser türleri arasında bir bağlantı olduğu da tespit edilmiştir. Hematopoietik sistemin maligniteleri olan lösemi ve lenfoma ile beyin tümörleri, prostat kanseri, meme kanseri, pankreas kanseri ve akciğer kanseri en sık rastlanan kanser tipleridir [6, 47-49]. Epidemiyolojik çalışmaların yanı sıra, pestisitlerin karsinogenitesine aracılık eden mekanizmaları araştıran deneysel çalışmalar da bu durumu desteklemektedir. Kimyasal kanserojenlerin genetik veya epigenetik mekanizmalarla hücre döngüsünü kontrol eden genlerde neden olduğu değişiklikler, kanserin indüklenmesine neden olabilir. DNA ya da kromozom seviyesindeki genetik hasarlar, kanserojenitenin olası mekanizmaları olarak kabul edildiğinden, pestisitlerin genotoksitesine ilişkin çalışmalar, insan sağlığı açısından büyük önem taşımaktadır [50, 51]. Genetik toksisiteye ek olarak, pestisitlerin oksidatif strese neden olabileceği ve endokrin bozucu olarak davranabilecekleri, DNA ve diğer makromoleküllere zarar vererek gen ekspresyonunu etkileyebilecekleri belirlenmiştir. Bu değişiklikler çoğunlukla hücrelere zararlı olmakta ve kanser de dâhil olmak üzere, çoklu bozuklukların patogeneğinde önemli rol oynamaktadır. Pestisitlerin epigenetik düzeyde etkilerini inceleyen çalışmalar DNA metilasyon düzeninde, histon modifikasyonunda ve ayrıca kodlayıcı olmayan RNA seviyesinde çok sayıda modülasyona neden

olabileceklerini göstermektedir [52]. Bütün bu olası etkileri nedeniyle, pestisit kullanımı konusundaki endişeler giderek artış göstermektedir.

Bu çalışmada organofosforlu pestisitler grubunda yer alan ve insektisit/akarisit olan MET'un olası etkileri, güvenilen ve sıklıkla tercih edilen bir genotoksisite testi olan *Allium* testi ile *A. cepa* kök ucu hücrelerinde ilk kez incelenmiştir. Bu test kimyasal maddelerin hem sitotoksik ve hem de genotoksik potansiyelini tespit etmek amacıyla yaygın bir şekilde kullanılmaktadır.

MET'un *Allium cepa*'da kullanılan bütün konsantrasyonlarda ve uygulama sürelerinde mitotik indeksi kontrole kıyasla anlamlı derece düşürmüş olması güçlü sitotoksik potansiyelini göstermektedir. MI'te gözlenen düşüşler, kromozom anormalliği frekansındaki artış ile ters yönlü bir bağıntı göstermiştir. MET, profaz safhasında bir miktar düşüşe ve metafaz ve telofazda bir miktar artışa neden olsa da gözlenen değerler kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Bu çalışmada gözlenen güçlü sitotoksik etki, organofosfor grubundan olan farklı pestisitlerin *Allium* testinde mitotik indekste düşüşe ve mitoz bölünmenin inhibisyonuna neden olduğu çalışmalara benzerlik göstermektedir [12, 53-57]. Mitotik indekste gözlenen inhibisyonun, G₁ fazında hücre bölünmesinin durdurulmasından ya da uzamış bir G₂ periyodundan kaynaklanabileceği açıklanmıştır. Mitotik indekste düşüş, S-fazında DNA sentezinin inhibisyonundan da kaynaklanmış olabilir [55, 58]. Pestisitlerin etkisine bağlı olarak ortaya çıkan metabolik bozukluklar genellikle hücre bölünmesinin durdurulmasına sebep olmakta, bu da DNA, RNA, protein ve enerji sentezini etkilemektedir [41, 59-62].

MET, uygulanan bütün konsantrasyonlarda ve uygulama sürelerinde (7,5 mg/L, 12 saat hariç), kromozomal anormalliklerin frekansını kontrole kıyasla anlamlı düzeyde artırmıştır. MET, *Allium cepa* kök uçlarında yapışıklık, C-mitoz, köprü, fragment, geri kalma ve çok kutupluluk gibi anormalliklere neden olmuştur. Ayrıca anlamlı düzeyde olmamakla birlikte interfazda çok çekirdekli ve mikroçekirdekli hücreler de oluşturmuştur. Farklı organofosfat pestisitlerinin genotoksik etkilerinin incelendiği çalışmalarda da bu pestisitlerin kromozomal anormalliklerin frekansını artırdıkları yönünde sonuçlara ulaşılmıştır. Örneğin malathion, bu çalışma sonuçlarında olduğu gibi, *A. cepa* kök ucu hücrelerinde anormallik oranını artırmış ve kromozom kırığı, yapışıklık, geri kalma ve köprü gibi mitotik anormalliklere neden olmuştur [57]. Afugan fungusinin de *Allium* testinde çeşitli anormalliklere sebep olduğu açıklanmış ve yapışıklık, C-mitoz, köprü, geri kalma ve fragment gibi anormallikler rapor edilmiştir [53]. İki farklı organofosfatlı pestisit olan monocrotophos (MCP) ve chlorpyrifos (CPF)'un artan konsantrasyonları ile geri kalma, yapışıklık, köprüler, binükleat hücreler, mikronükleus ve fragmentler gibi anormalliklerin arttığı, mitotik indeksin ise anlamlı ölçüde düştüğü belirlenmiştir [55].

MET'un en fazla neden olduğu anormallik kromozom yapışıklığıdır (%47,50). Yapışkan kromozomların organofosfatlı pestisitlerin neden olduğu en baskın tip anormallik olduğu bildirilmiştir (Sinha ve Kumar, 2014). Elektron mikroskopunda yapılan çalışmalar kromozom yapışıklığının kromatid tipi bir anormallik olduğunu göstermiştir [63]. Diğer yandan, Patil ve Bhat (1992) [64] yapışkanlığın kromatin materyalinin protein içeren matrisindeki bir tür fiziksel adezyon olduğunu bildirmiştir. Yapışkanlığın, kromozomlar arasında subkromatik bağlantılara yol açan kromatin ipliklerinin bozulmasının bir sonucu olduğu [65] veya DNA topoizomera II gibi periferik proteinlerin etkilenmesinin bir sonucu olduğu da vurgulanmıştır. Bazı klastojenlerin, DNA'ya doğrudan etkili olmadığı, kromozom yapışıklığı oluşturmak suretiyle, dolaylı şekilde etkili olduğu belirtilmiştir [66]. Kromozom yapışıklığına neden olan kimyasalların sitotoksik olduğu, bu hasarın geri döndürülemez ve sonuçta hücre ölümüne neden olduğu açıklanmıştır [38, 67]. MET'un yaygın olarak ortaya çıkardığı diğer anormallik ise C-mitozdur (%44,24). C-mitoz, kullanılan kimyasalın disülfit bağlarını bozmak suretiyle güçlü bir iğ inhibitörü olarak davrandığını göstermektedir [66]. Diğer yandan, eğer hücrede iğler kısmen etkilenmişse, çok kutuplu anafaz veya geri kalmış kromozomlar gözlenir. Bu durum, mikronükleus oluşumu ile sonuçlanır. Bu mikronükleuslarla beraber hücreden genetik materyal kaybı gerçekleşeceğinden, hücreye ciddi etkileri olacaktır [67]. Ahmad ve Yasmin (1992) [68], mikronükleusların, geri kalmış kromozomlardan veya mitotik aşamada gözlenen fragmentlerden kaynaklanabileceğini bildirmişlerdir. Fragmentler kromozomlarda ortaya çıkan kromatid ya da kromozom kırıklarının yapısal sonuçlarıdır. Bu çalışmada, methidathion, *A. cepa*'da hem anöjenik (iğ ipliği üzerinde) hem de klastojenik (DNA üzerinde) etkiye işaret eden çok kutupluluk, geri kalmalar ve

fragmentler oluşturmuştur. Anafaz ve telofazdaki kromozomal köprü oluşumu, kromozomların metafaz aşamasındaki genel yapışkanlığından veya kromozomların kırılması ve yeniden birleşmesinden kaynaklanabilmektedir [41, 69]. Köprü ve fragmentler, kromatid kırıklarından da kaynaklanabilir. Bu oluşumlar, klastojenik etkinin göstergesidir [66]. MCP ve CPF pestisitlerinin Allium testi ile genotoksik potansiyelinin incelendiği çalışmada kromozomal anormalliklerin sıklığının sırasıyla yapışıklık>fragment>köprü>geri kalma>binükleat>mikronukleus şeklinde olduğu açıklanmıştır. Ayrıca, MCP'nin CPF'tan daha etkili olduğu belirtilmiştir [55]. Genotoksik hasarlar, kullanılan kimyasalın DNA tamir sitemini direkt veya indirekt yollarla engellemesinden örneğin DNA polimerazın fonksiyonu için gerekli belirli iyonların engellenmesinden de kaynaklanabilir [66].

Bu çalışmada ayrıca MET'un metafaz evresindeki kromozomlar üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla, α -monobromonafalin ile ön muamele edilmiş kök uçları da incelenmiştir. MET'un metafazda neden olduğu kromozomal anormallik oranı yalnızca 12 ve 48 saatlik uygulamaların 7,5 mg/L'lik konsantrasyonunda, 24 saatlik uygulamanın ise 15 mg/L'lik konsantrasyonunda anlamlı düzeydedir. Diğer konsantrasyonlarda kromozomal anormallik oranının istatistiksel olarak anlamlı olmamasının nedeni, bu pestisidin mitotik indeksi azaltacak şekilde etkili olmasıyla açıklanabilir. Bu uygulamada, kromozom kırıkları en sık gözlenen anormallik olup bunu fragment ve poliploidi izlemektedir. Daha düşük oranda kromatid kırıkları da gözlenmiştir. Bu bulgular yine MET'un klastojenik ve anöjenik etkili olduğunu desteklemektedir. Kromozom kırılmasına neden olan kimyasalların, kromozomlar üzerinde ve dolayısıyla DNA üzerinde bir etki oluşturarak klastojenik etkiye neden oldukları bilinmektedir [70]. Poliploidi, iğ ipliklerinin etkilendiğini göstermekte ve anöjenik etkili olduğunu düşündürmektedir. Kromozomal anormallikler, mutasyonun güvenilir göstergeleri olarak kabul edilmekte ve mutasyonel aktiviteyi taramak için güvenilir bir kanıt olarak kullanılmaktadır [55, 71].

MET'un genotoksik potansiyelinin incelendiği sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Fare kemik iliğinde MN testinin (25 ve 27,5 mg/kg vücut ağırlığı), insan lenfosit kültüründe ise kardeş kromatid değişimi testinin (1, 10 ve 100 μ mol/L) uygulandığı bir çalışmada, MET'un genotoksik etkileri metabolik aktivasyon varlığında ve yokluğunda incelenmiştir. MET'un, fare kemik iliğinde MN frekansını artırmadığı, insan lenfositlerinde ise metabolik aktivasyon sistemi yokluğunda KKD sayısını artırdığı belirlenmiştir [20]. Diğer bir çalışmada, MET'un 135, 270 ve 405 mg/kg'lık konsantrasyonları, dişi Wistar ratlara 30 gün boyunca intraperitoneal olarak uygulanmış ve genotoksik potansiyeli kemik iliğinde MN testi ile incelenmiştir. MET'un MN frekansını artırmadığı ancak nekrotik ve apoptotik hücre düzeyini doza bağlı olarak anlamlı şekilde artırdığı bildirilmiştir. Bu nedenle MET'un insanlar için güvenli olmadığı vurgulanmıştır [22].

MET'un 1 ila 3 μ g/mL'lik düşük konsantrasyonlarının genotoksik etkisi, insan lenfosit kültüründe, mikronukleus testi kullanılarak incelenmiştir. Ayrıca, farklı alkalın pH değerlerinde (pH 9,5 ve 12) MET'un neden olduğu genotoksik etki de değerlendirilmiştir. pH 7,4'te test edilen tüm konsantrasyonlarda, MET'un mikronukleus frekanslarını artırmadığı ve genotoksik olmadığı bildirilmiştir. Ancak en yüksek konsantrasyonda (3 μ g/mL), pH 10'dan itibaren MN frekanslarında artış ortaya çıkmış ve pH 11'de bu artış anlamlı düzeye ulaşmıştır. Methidathionun alkalın hidrolizinin, iki yeni molekül oluşumuyla sonuçlandığı, bunlardan birinin elektroaktif olmayan fosfono-bileşik ve diğerinin oldukça elektroaktif bir sülfhidril türü olduğu açıklanmıştır. İkinci molekülün, insan lenfosit kültüründe orijinal molekülden daha genotoksik olduğu vurgulanmıştır. Araştırmacılar, yüksek pH değerlerindeki alkali ortamın, orijinal ortamdaki çok daha genotoksik moleküller üretebileceğini de belirtmişlerdir [18].

Ünal ve arkadaşları [23], MET'un kültürdeki insan lenfositleri üzerindeki genotoksik etkilerini kromozomal anormallik, mikronukleus ve kardeş kromatid değişimi testleri ile incelemiştir. Lenfositler 24 ve 48 saat boyunca MET'un dört farklı konsantrasyonu (3,75, 7,5, 15 ve 30 μ g/mL) ile muamele edilmiştir. MET'un mitotik indeksi düşürdüğü, anormal hücre oranını, KKD ve MN frekansını anlamlı şekilde artırdığı belirlenmiştir. En sık görülen kromozomal anormalliklerin kardeş kromatitlerde birleşme, disentrik kromozomlar ve kromatid kırıkları olduğu açıklanmıştır. Araştırmacılar verilerine dayanarak, MET'un klastojenik, mutajenik ve anöjenik etkilere neden olduğunu belirtmişlerdir. Bu çalışmada elde ettiğimiz bulgular, adı geçen çalışma sonuçları ile paralellik göstermektedir.

Sonuç olarak bu araştırma, *Allium* testinin çevresel kirlenmelerin sitotoksik ve genotoksik etkisini belirlemede hassas ve başarılı bir test olduğunu göstermiştir. Bu çalışma ayrıca, methidathionun, *Allium cepa* kök ucu hücrelerinde hem mitoz bölünmeyi önemli ölçüde düşürdüğü/engellediği ve hem de mitoz sırasında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde anormallikler oluşturduğunu göstermiştir. Bu nedenle, bu kimyasalın insektisit/akarisit olarak kullanılması esnasında, diğer bazı pestisitlerde de olduğu gibi, hedef olmayan organizmalarda ve sonuçta insanlarda sitotoksik ve genotoksik etkileri olabileceği unutulmamalıdır.

ÇIKAR ÇATIŞMASI/ÇAKIŞMASI BİLDİRİMİ

Yazarlar arasında çıkar çatışması/çakışması bulunmamaktadır.



KAYNAKLAR

- [1] UN. 2015. United Nations, Department of Economic and Social Affairs, Population Division (2015). World Population Prospects: The 2015 Revision, Key Findings and Advance Tables. Working Paper No. ESA/P/WP.241. United Nations New York, 2015.
- [2] Carvalho, F. P. (2017). Pesticides, environment, and food safety. *Food and Energy Security*, 6(2), 48-60.
- [3] İnternet 1: FAO. 2017. <http://www.fao.org/faostat/en/#home> (Son Erişim Tarihi: 02. 07. 2020).
- [4] İnternet 2: FAO. 2020. <http://www.fao.org/faostat/en/#home> (Son Erişim Tarihi: 02. 07. 2020).
- [5] Yüzbaşıoğlu, D., Ünal, F. and Sancak C. (2009). Genotoxic effects of herbicide Illoxan (Diclofop-Methyl) on *Allium cepa* L. *Turkish Journal of Biology*, 33, 283-290.
- [6] Mostafalou, S. and Abdollahi, M. (2017). Pesticides: an update of human exposure and toxicity. *Archives of Toxicology*, 91(2), 549-599.
- [7] World Health Organization. (2020). The WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification 2019. *World Health Organization*.
- [8] Ünal, G. ve Gürkan, M. O. (2001). *İnsektisitler, Kimyasal Yapıları, Toksikolojileri ve Ekotoksikolojileri*. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü, Ankara, 159.
- [9] Singh, K. D., Labala, R. K., Devi, T. B., Singh, N. I., Chanu, H. D., Sougrakpam, S., and Rajashekar, Y. (2017). Biochemical efficacy, molecular docking and inhibitory effect of 2, 3-dimethylmaleic anhydride on insect acetylcholinesterase. *Scientific Reports*, 7(1), 1-11.
- [10] Bedford, C. T. and Robinson, J. (1972). The alkylating properties of organophosphates. *Xenobiotica*, 2(4), 307-337.
- [11] Wooder, M. F. and Wright, A. S. (1981). Alkylation of DNA by organophosphorus pesticides. *Acta Pharmacologica et Toxicologica*, 49, 51-55.
- [12] Timoroğlu, İ., Yüzbaşıoğlu, D., Ünal, F., Yılmaz S., Aksoy H., and Çelik M. (2014). Assessment of genotoxic effects of organophosphorus insecticides phorate and trichlorfon in human lymphocytes. *Environmental Toxicology*, 29, 577-587.
- [13] Ezzi, L., Salah, I. B., Haouas, Z., Sakly, A., Grissa, I., Chakroun, S., and Cheikh, H. B. (2016). Histopathological and genotoxic effects of chlorpyrifos in rats. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(5), 4859-4867.
- [14] Cortés-Eslava, J., Gómez-Arroyo, S., Risueño, M. C., and Testillano, P. S. (2018). The effects of organophosphorus insecticides and heavy metals on DNA damage and programmed cell death in two plant models. *Environmental Pollution*, 240, 77-86.
- [15] Yahia, D. and Ali, M. F. (2019). Cytogenetic and genotoxic effects of penconazole and chlorpyrifos pesticides in bone marrow of rats. *Journal of Advanced Veterinary Research*, 9(2), 29-38.
- [16] İnternet:<https://www.tarimorman.gov.tr/Konular/Bitki-Sagligi-Hizmetleri/Bitki-Koruma-Urunleri-Ve-Makinalari/Bitki-Koruma-Urunleri> (Yasaklanan Bitki Koruma Ürünleri Aktif Madde Listesi) (Son Erişim Tarihi: 19.10.2020).
- [17] Ukai, S. and Kakuta, N. (1992). *Standard Methods of Chemical Analysis in Poisoning With Commentary*. Pharmaceutical Society of Japan, 4th ed. Nanzandou Co., Tokyo.
- [18] Stivaktakis, P. D., Giannakopoulos, E., Vlastos, D., and Matthopoulos, D. P. (2017). Determination of genotoxic effects of methidathion alkaline hydrolysis in human lymphocytes using the micronucleus assay and square-wave voltammetry. *Bioelectrochemistry*, 113, 9-14.
- [19] Lodovici, M., Casalini, C., Briani, C., and Dolara, P. (1997). Oxidative liver DNA damage in rats treated with pesticide mixtures. *Toxicology*, 117, 55-60.
- [20] Kevekordes, S., Gebel, T., Pav K., Edenharder, R., and Dunkelberg, H. (1996). Genotoxicity of selected pesticides in the mouse bone-marrow micronucleus test and in sister-chromatid exchange test with human lymphocytes *in vitro*. *Toxicology Letters*, 89, 35-42.

- [21] Karabulut A. K. and Yeşilada E. (2014). Genotoxicity testing of tributyltin and methidathion in *Drosophila melanogaster* using the wing somatic mutation and recombination test. *Fresenius Environmental Bulletin*, 23, 3475-3480.
- [22] Alshehri, M. A. (2014). Cytogenetic effects of methidathion pesticide on rat bone marrow cells. *Environmental Research Journal*, 8(2), 48-54.
- [23] Ünal, F., Demir, H., and Yüzbaşıoğlu, D. (2017). Genotoxic effects of environmental contaminant methidathion and triadimenol pesticides. *The 3rd International Symposium on EuroAsian Biodiversity* 05-08 July 2017, Minsk-Belarus.
- [24] Bonciu, E., Firbas, P., Fontanetti, C. S., Wusheng, J., Karaismailoğlu, M. C., Liu, D., and Schiff, S. (2018). An evaluation for the standardization of the *Allium cepa* test as cytotoxicity and genotoxicity assay. *Caryologia*, 71(3), 191-209.
- [25] Ma, T. H. (1999). The international program on plant Bioassays and the report of the follow-up study after the hands-on workshop in China. *Mutation Research*, 426, 103-106.
- [26] Ma, T. H., Cabrera, G. L., and Owens E. (2005). Genotoxic agents detected by plant bioassays. *Reviews on Environmental Health*, 20(1), 1-14.
- [27] Palmieri, M. J., Andrade-Vieira, L. F., Trento, M. V. C., Eleutério, M. W. F., Lubber, J., Davide, L. C., et al. (2016). Cytogenotoxic effects of spent pot liner (SPL) and its main components on human leukocytes and meristematic cells of *Allium cepa*. *Water Air and Soil Pollution*, 227,156.
- [28] Vicentini, V. E. P., Camparoto, M. L., Teixeira, R. O., and Mantovani, M. S. (2001). *Averrhoa carambola* L., *Syzygium cumini* (L.) Skeels and *Cissus sicyoides* L.: medicinal herbal tea effects on vegetal and test systems. *Acta Scientiarum*, 23(2), 593-598.
- [29] Teixeira, R. O., Camparoto, M. L., Mantovani, M. S., and Vicentini, V. E. P. (2003). Assesment of two medicinal plants *Psidium guajava* L. and *Achillea millefolium* L., *in vitro* and *in vivo* assays. *Genetics and Molecular Biology*, 26(4), 551-555.
- [30] Tedesco, S. B. and Laughinghouse, I. V. H. D. (2012). Bioindicator of genotoxicity: The *Allium cepa* test. In: Srivastava J, editor. Environmental Contamination. *Croatia: InTech*, 137-156.
- [31] Özkul M., Özel Ç.A., Yüzbaşıoğlu D., and Ünal F. (2016). Does 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) induce genotoxic effects in tissue cultured *Allium* roots? *Cytotechnology*, 68, 2395-2405.
- [32] Doroftei, E., Antofie, M. M., Sava, D., and Arcus, M. (2010). Cytogenetic effects induced by Manganese and Lead micro-elements on germination at *Allium cepa*. *Botanica Serbica*, 34(2), 115-121.
- [33] Bonciu, E. (2012). Cytological effects induced by Agil herbicide to onion. *Journal of Horticulture, Forestry and Biotechnology*, 16(1), 68-72.
- [34] Khanna, N. and Sharma, S. (2013). *Allium cepa* root chromosomal aberration assay: A review. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1(3), 2320-9267.
- [35] Sarac, I., Bonciu, E., Butnariu, M., Petrescu, and I., Madosa, E. (2019). Evaluation of the cytotoxic and genotoxic potential of some heavy metals by use of *Allium* test. *Caryologia*, 72(2), 37-43.
- [36] Leme, D. M. and Marin-Morales, M. A. (2009). *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 682(1),71-81.
- [37] İnternet: https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/36158?lang=en®ion=TR&cm_sp=Insite_-_caSrpResults_srpRecs_srpModel_950-37-8_-_srpRecs3-1 (Son Erişim Tarihi: 21.11.2020).
- [38] Fiskesjö, G. (1985). The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. *Hereditas*, 102(1), 99-112.
- [39] Rank, J. and Nielsen, M.H. (1994). Evaluation of *Allium* anaphase-telophase test in relation to genotoxicity screening of industrial wastewater. *Mutation Research*, 312: 17-24.
- [40] Rank, J. and Nielsen, M.H. (1998). Genotoxicity testing of wastewater sludge using the *Allium cepa* anaphase-telophase chromosome aberration assay. *Mutation Research*, 418, 113-119.
- [41] El-Ghamery, A.A., El-Nahas, A.I., and Mansour, M.M. (2000). The action of atrazine herbicide as an inhibitor of cell division on chromosomes and nucleic acids content in root meristems of *Allium cepa* and *Vicia faba*. *Cytologia*, 65, 277-287.
- [42] Rank, J., Lopez, L.C., Nielsen, M.H., and Moretton, J. (2002). Genotoxicity of maleic hydrazide, acridine and DEHP in *Allium cepa* root cells performed by two different laboratories. *Hereditas*, 136, 13-18.
- [43] Fiskesjö, G. (1988). The *Allium* test-an alternative in environmental studies: The relative toxicity of metal ions. *Mutation Research*, 197, 243-260.
- [44] Kanaya, N., Gill, B.S., Grover, I.S., Murin, A., Osiecka, R., Sandhu, S.S., and Andersson, H.C. (1994). *Vicia faba* chromosomal aberration assay. *Mutation Research*, 310, 231-247.
- [45] Barr, D. B., Allen R., Olsson A. O., Bravo R., Caltabiano, L. M., Montesano, A., Nguyen, J., Udunka, S., Walden, D., Walker, R.D., Weerasekera, G., Whitehead, R. D. Jr, Schober, S. E., and Needham, L. L. (2005). Concentrations of selective metabolites of organophosphorus pesticides in the United States population. *Environmental Research*, 99(3), 314-326.
- [46] Barr, D. B., Olsson, A. O., Wong, L. Y., Udunka, S., Baker, S. E., Whitehead, R. D., Magsumbol, M. S., Williams, B. L., and Needham, L. L. (2010). Urinary concentrations of metabolites of pyrethroid insecticides in the general U.S.

- population: National Health and Nutrition Examination Survey 1999-2002. *Environmental Health Perspectives*, 118, 742-748.
- [47] Lee, W. J., Sandler, D. P., Blair, A., Samanic, C., Cross, A. J., and Alavanja, M. C. (2007). Pesticide use and colorectal cancer risk in the Agricultural Health Study. *The International Journal of Cancer*, 121(2), 339-346.
- [48] Thongprakaisang, S., Thiantanawat, A., Rangkadilok, N., Suriyo, T., and Satayavivad, J. (2013). Glyphosate induces human breast cancer cells growth via estrogen receptors. *Food and Chemical Toxicology*, 59, 129-136.
- [49] Luo, D., Zhou, T., Tao, Y., Feng, Y., Shen, X., and Mei, S. (2016). Exposure to organochlorine pesticides and non-Hodgkin lymphoma: a meta-analysis of observational studies. *Scientific Reports*, 6, 25768.
- [50] Mostafalou, S. and Abdollahi, M. (2012) Current concerns on genotoxicity of pesticides. *International Journal of Pharmacology*, 8, 473-474.
- [51] Shadnia, S., Azizi, E., Hosseini, R., Khoei, S., Fouladdel, S., Pajoumand, A., and Abdollahi, M. (2005). Evaluation of oxidative stress and genotoxicity in organophosphorus insecticide formulators. *Human & Experimental Toxicology*, 24(9), 439-445.
- [52] Sabarwal, A., Kumar, K., and Singh, R. P. (2018). Hazardous effects of chemical pesticides on human health-Cancer and other associated disorders. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 63, 103-114.
- [53] Yüzbaşıoğlu, D. (2003). Cytogenetic effects of fungicide afugan on the meristematic cells of *Allium cepa* L. *Cytologia*, 68(3), 237-243.
- [54] Yüzbaşıoğlu, D., Çelik, M., Yılmaz, S., Ünal, F., and Aksoy, H. (2006). Clastogenicity of the fungicide afugan in cultured human lymphocytes. *Mutation Research*, 604, 53-59.
- [55] Sinha, V. S. and Kumar, N. (2014). Assessment of mito-inhibitory and genotoxic effects of two organophosphate pesticides in the root tip cells of *Allium cepa* L. *Annals of Plant Sciences*, 3, 699-703.
- [56] Pandır, D. (2018). Assesment of the genotoxic effect of the Diazinon on root cells of *Allium cepa* (L.). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 61.
- [57] Sheikh, N., Patowary, H., and Laskar, R. A. (2020). Screening of cytotoxic and genotoxic potency of two pesticides (malathion and cypermethrin) on *Allium cepa* L. *Molecular & Cellular Toxicology*, 16, 291-299.
- [58] Sudhakar, R., Ninge Gowda, K. N., and Venu, G., (2001). Mitotic abnormalities induced by silk dyeing industry effluents in the cell of *Allium cepa*. *Cytologia*, 66, 235-239.
- [59] Jain, A.K. and Andsorbhoy, R.K. (1988). Cytogenetical studies on the effects of some chlorinated pesticides III. Concluding Remarks. *Cytologia*, 53, 427-436.
- [60] Hidalgo, A., Gonzales-Reyes, J.A., Navas, P., and Garcia-Herdugo, G. (1989). Abnormal mitosis and growth inhibition in *Allium cepa* roots induced by prophan and chlorprophan. *Cytobios*, 57(228), 7-14.
- [61] Chauhan, L. K. S., Dikshith, T. S. S., and Sundararaman, V., (1986). Effects of deltamethrin on plant cells I. Cytological effects on the root meristems of *Allium cepa*. *Mutation Research*, 171, 25-30.
- [62] Adesuyi, A. A., Njoku, K. L., Ogunyebi, A. L., Dada, E. O., Adedokun, A. H., Jolaoso, A. O., and Akinola, M. O. (2018). Evaluation of the cytogenotoxic effects of emulsifiable concentrate form of amitraz pesticide on *Allium cepa* L. *Journal of Applied Sciences and Environmental Management*, 22(11), 1841-1847.
- [63] Klasterska, I., Natarajan, A. T., and Ramel, C. (1976). An interpretation of the origin of subchromatid aberrations of chromosome stickiness as a category of chromatid aberrations. *Hereditas*, 83, 153-162.
- [64] Patil, B.C. and Bhat, G.I. (1992). A comparative study of MH and EMS in the induction of chromosomal aberrations on lateral root meristem in *Clitoria ternata* L. *Cytologia*, 57, 259-264.
- [65] Mc-Gill, M., Pathak, S., and Hsu, T.C., (1974). Effects of ethidium bromide on mitosis and chromosomes: A possible material basis for chromosomes stickiness. *Chromosoma*, 47, 157-167.
- [66] Datta, S., Singh, J., Singh, J., Singh, S., Singh S. (2018). Assessment of genotoxic effects of pesticide and vermicompost treated soil with *Allium cepa* test. *Sustainable Environment Research*, 28(4), 171-178.
- [67] Panda, B.B. and Sahu, U.K. (1985). Induction of abnormal spindle function and cytokinesis inhibition in mitotic cells of *Allium cepa* by the organophosphorus insecticide fensulfotion. *Cytobios*, 42, 147-155.
- [68] Ahmad, S. and Yasmin, R., (1992). Effects of methyl paration and tri-miltox on the mitosis of *Allium cepa*. *Cytologia*, 57, 155-160.
- [69] Özkara, A., Akyıl, D., Eren, Y., and Erdoğan, S. F. (2015). Potential cytotoxic effect of Anilofos by using *Allium cepa* assay. *Cytotechnology*, 67(5), 783-791.
- [70] Grant, W.F. (1978). Chromosomal aberrations in plants as a monitoring system. *Environmental Health Perspectives*, 27, 37-43.
- [71] Kihlman, B.A. (1966). *Action of chemicals on dividing cells*. Prentice-Hall Inc, Englewood Cliffs, New Jersey.

Lactobacillus Cinsi Bakterilerinin Farklı Yöntemler ile Antioksidan Aktivitelerinin Belirlenmesi

Selin Ural* , Zehranur Yüksekdağ 

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

Öne Çıkanlar

- *Lactobacillus* cinsine ait 20 bakterinin beş farklı metot ile antioksidan aktiviteleri belirlenmiştir.
- Kullanılan yöntemlere göre, bakterilerin antioksidan aktivitelerinde farklılıklar olmuştur.
- Bakteri yoğunluğu fazla olduğunda daha yüksek antioksidan aktivite tespit edilmiştir.
- Bakteriler en iyi DPPH radikalini süpürerek yüksek antioksidan aktivite göstermişlerdir.

Makale Bilgileri

Geliş: 05/11/2020
Kabul: 22/11/2020

Anahtar Kelimeler

Lactobacillus spp.,
Probiyotik,
Antioksidan aktivite

Özet

Çalışmada, süt ürünleri kaynaklı *Lactobacillus* cinsine ait 20 bakterinin beş farklı metot ile (2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) serbest radikalini giderme, Fe²⁺ iyonu şelatlama, plazma lipid peroksidasyonu, hidroksil radikalini süpürücü aktivitesi ve süperoksit anyon radikalini süpürücü aktivitesi) antioksidan aktiviteleri araştırılmıştır. Suşların, metotların hepsinde farklı oranlarda antioksidan etki gösterdiği bulunmuştur. Suşların DPPH serbest radikalini giderme yeteneği değerlendirildiğinde, *Lactobacillus brevis* KIR12 suşunda %81,9 oranında en yüksek aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. Bakterilerin metal şelatlama aktiviteleri %40,5 ile %31,8 arasında değişirken, en yüksek aktiviteyi *L. fermentum* BP5 suşu göstermiştir. Çalışmada lipid peroksidasyonunun inhibisyonunda suşlar arasındaki en yüksek inhibisyon *L. rhamnosus* SMC6 suşunda %39,2 olarak, en düşük inhibisyonu ise *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* 12L suşunda %30,2 olarak tespit edilmiştir. Çalışılan kültürler arasında, hidroksil radikalini süpürücü etki gösteren suşların *L. fermentum* FKK3 (%45,8) ve *L. brevis* YG7 (%43,6) olduğu belirlenmiştir. Suşlar arasındaki süperoksit radikalini süpürücü aktiviteleri kıyaslandığında ise; %75,0 ile %10,4 aralığında değişen değerler tespit edilmiştir. Bu çalışma sonucunda, kullanılan yöntemlere göre bakterilerin antioksidan aktivitelerinde farklılık olduğu belirlenmiştir. Antioksidan aktivitesi yüksek yetenekteki suşların gıda alanında yeni potansiyel antioksidan ajanlar olarak kullanılabilirlerdir.

Determination of Antioxidant Activities of *Lactobacillus* Genus Bacteria by Different Methods

Highlights

- The antioxidant activities of 20 *Lactobacillus* bacteria were determined by five different methods.
- According to the methods used, there were differences in the antioxidant activities of bacteria.
- When the bacteria density is higher, higher antioxidant activity was detected.
- The bacteria were showed high antioxidant activity by scavenging the best DPPH radical.

Article Info

Received: 05/11/2020
Accepted: 22/11/2020

Keywords

Lactobacillus spp.,
Probiotic,
Antioxidant activity

Abstract

In this study, antioxidant activities of 20 *Lactobacillus* bacteria that originated from dairy products were investigated by five different methods (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging, ferrous ions (Fe²⁺) chelating capacity, plasma lipid peroxidation, hydroxyl radical, and superoxide radical scavenging activity). It was determined that the strains have different antioxidant effects in all of the methods. When the DPPH free radical scavenging ability of the strains was evaluated, it was determined that *Lactobacillus brevis* KIR12 strain had the highest activity at a rate of 81.9%. Fe²⁺ chelating activities of the bacteria were in the range of 31.8 – 40.5% and *L. fermentum* BP5 showed highest activity (40.5 %) among the others. In the present study while *L. rhamnosus* SMC6 has highest lipid peroxidation inhibition (39.2%), *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* 12L has lowest inhibition (30.2%). Among the cultures studied, the strains showing hydroxyl radical scavenging effect were *L. fermentum* FKK3 (45.8%) and *L. brevis* YG7 (43.6%). When the superoxide radical scavenging activities among the strains are compared; values varying between 75.0% and 10.4% were determined. As a result of this study, it was determined that there is a difference in antioxidant activities of bacteria according to the methods used. The strains that have high antioxidant activity may be used as a new potential antioxidant agents in food industry.



Hava kirliliği, bozulmuş gıdalar ve ilaçlar gibi faktörler sonucunda oluşan serbest radikaller, vücuttaki hücrelere saldırarak tahribata yol açmaktadır [1]. Serbest radikaller biyolojik sistemlerde çok reaktiftir. Serbest radikallerin vücutta aşırı üretilmesi sonucunda ateroskleroz, kanser, kronik böbrek hastalığı, nörodejeneratif hastalıklar, Alzheimer hastalığı, siroz, artrit ve Parkinson hastalığı gibi yaşamı tehdit eden hastalıklara neden olabilmektedir [2, 3]. Hücrelerin bu reaktif türlere (serbest radikaller) karşı savunma kabiliyetini arttırmak için, antioksidanlar olarak adlandırılan bazı doğal ve kimyasal bileşikler bulunmaktadır [4]. Antioksidanlar, serbest radikallerin ara ürünlerini kaldırarak zincir reaksiyonlarını sonlandırmakta ve kendilerini oksitleyerek diğer oksidasyon reaksiyonlarını inhibe etmektedirler [5].

Antioksidanlar, doğal ve sentetik antioksidanlar olarak iki gruba ayrılırlar [4]. Sentetik antioksidanlar, daha yüksek performans ve stabilite, düşük maliyet ile geniş kullanılabilirlik sunmaları nedeniyle doğal antioksidanların yerine kullanımı yaygındır [6]. Sentetik antioksidanların suda çözünürlüğünün az olması, pahalı olması, antioksidan verimliliğinin düşük olması ve yüksek toksisite göstermeleri nedeniyle daha fazla antioksidan aktivite gösteren ve ekonomik olan doğal antioksidanlar son yıllarda daha çok tercih edilmektedir [4].

Son yıllarda yapılan çalışmalar, vücudun oksidatif stresle savaşmasına yardımcı olmak için yeni moleküllerin ve maddelerin araştırılmasına odaklanmıştır; bunlardan biri de probiyotik bakterilerin kullanımınıdır [2, 7, 8]. Probiyotiklerin antioksidatif enzimleri ve bağışıklık arttırıcı etkileri değiştirerek oksidatif stresi azalttığı ve antioksidan etkiler sergilediği gösterilmiştir [7]. Antioksidan maddelerin üretilmesi ve serbest radikal temizleme faaliyetleri dışında, probiyotiklerin aynı zamanda bir dereceye kadar metal şelatlama faaliyetleri de gösterdiği rapor edilmiştir [9]. Farklı cinslere ait birçok mikroorganizma probiyotik olarak kullanılırken, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* ve *Streptococcus* türleri en yaygın kullanılan probiyotik bakterilerdir [2]. Probiyotikler içerisinde yer alan laktik asit bakterileri (LAB) yaygın olarak gıda ve tıp alanında kullanılmaktadır [10]. Laktik asit bakterilerinin, içerisinde yer alan *Lactobacillus* cinsi bakterilerin insan sağlığı üzerindeki probiyotik etkileri dikkat çekicidir. *Lactobacillus* türleri sağlıklı insan mikrobiyotasının önemli üyeleridir [11] ve insan bağırsak sisteminde yüksek hayatta kalma oranına sahiptir. Ayrıca, fenolik bileşikler dahil antioksidan metabolitler üretmek iyi antioksidan aktivite sağlarlar [12]. Bu çalışmada, potansiyel probiyotik *Lactobacillus* cinsi bakterilerin farklı yöntemlerle antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi ve kullanılan antioksidan yöntemleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olup olmadığının belirlenmesi hedeflenmiştir.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Bakteriler ve Gelişme Ortamları

Bu çalışmada, Gazi Üniversitesi Biyoteknoloji Laboratuvarı Kültür Koleksiyonunda bulunan peynir ve yoğurttan izole edilmiş ve 16S rDNA ile moleküler olarak tanımlanmış *Lactobacillus brevis*, *L. rhamnosus*, *L. casei*, *L. fermentum*, *L. helveticus*, *L. delbrueckii* spp. *bulgaricus* türlerine ait 20 potansiyel probiyotik suş kullanılmıştır. *Lactobacillus* cinsi bakteriler Man Rogosa Sharpe (MRS) besiyerinde uygun sıcaklıklarda (37°C, 42°C) 18 saat inkübasyona bırakılmıştır. Geliştirilen mikroorganizmaların saflığı kontrol edilerek, steril edilmiş gliserol içerisinde 1:1 oranında stok alınmış ve -80°C'de muhafaza edilmiştir.

Bakterilerin antioksidan aktivitelerinin direk etkisini belirlemek amacıyla pellet ile çalışılmıştır. Pelletlerin hazırlanması: Bakteriler, OD 600 nm ≈0,600'e ayarlandıktan sonra MRS sıvı besiyerine aktarılıp uygun koşullarda 18 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda örnekler fosfat tamponu (PBS; 8 g/L NaCl; 1,21 g/L K₂HPO₄; 0,34 g/L KH₂PO₄, pH 6,2) ile 13000 rpm'de 15 dk süreyle iki defa yıkanmıştır. Yıkanmış pellet 10 mL PBS içerisinde McFarland 5'e (10¹¹ kob/mL) ayarlanmıştır. 13000 rpm'de 15 dk santrifüj edilmiş ve süpernatant dökülüp pellet 1 mL PBS ile süspanse edilmiştir.

2.2. Antioksidan Aktivite

Serbest radikal (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil-DPPH) giderme etkisi: 1 mL'lik örneklerin üzerine 1 mL DPPH (Sigma-Aldrich) eklenerek, karanlık ortamda 1 saat bekletilmiştir. Bekleme sonunda örnekler 13000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilip süpernatantlar 517 nm'de spektrofometrik olarak ölçülmüştür [13].

Suşların % DPPH radikalini gideriminin hesaplanması ise;

$$\% \text{ Süpürücü Aktivite} = [1 - (A_{\text{örnek}} - A_{\text{körve}}) / A_{\text{kontrol}}] \times 100$$

Körve= PBS çözeltisi

Kontrol= PBS çözeltisi ve DPPH çözeltisi

Metal (Fe²⁺) iyonu şelatlama aktivitesi: 1 mL PBS ile süspanse edilen pellete 2 mM 0,05 mL FeCl₂ ve 5 mM 0,2 mL ferrozin eklenerek karanlık ortamda 10 dakika bekletilmiştir. Bekleme sonunda örnekler 13000 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Şelatlama aktivitesi için 562 nm dalga boyunda yapılan ölçüm sonucu optikal yoğunluktaki azalma belirlenerek hesaplama yapılmıştır [14].

Şelatlama aktivitesinin hesaplanması;

$$\% \text{ Demir iyonu şelatlama yeteneği} = [1 - (OD_2 / OD_1)] \times 100$$

OD₂: PBS ile FeCl₂ ve ferrozin solüsyonu, OD₁: Örnek

Plazma lipit peroksidasyonunun önlenmesi: Çalışma Ou ve arkadaşlarının [15] önerdiği metoda göre yapılmıştır. Yoğunluğu ayarlanan bakterilerden 400 µL alınarak, üzerine 400 µL plazma, 100 µL FeSO₄ ve 100 µL hidrojen peroksit (H₂O₂) ilave edilmiştir. 37°C de su banyosunda 12 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda %4 TCA (trikloroasetik asit) ve yapay oksidan olan butilhidroksianizol (BHA) ortama eklenmiş ve karışım buz banyosunda bekletilmiştir. İndikatör tiobarbitürik asit (TBA) eklenip 100°C'lik su banyosunda 30 dk bekletilmiş ve soğuduktan sonra 532 nm dalga boyunda spektrofometrik olarak ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Bakterilerin lipit peroksidasyonunu inhibe etme yüzdeleri aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$\text{Plazma lipit peroksidasyonu inhibisyon oranı} = [1 - A_{532}(\text{Örnek}) / A_{532}(\text{Kontrol})] \times \%100$$

Kontrol: PBS çözeltisi

Hidroksil radikal süpürücü aktivitesi: Çalışma Wang ve arkadaşlarının [16] önerdiği metotta modifikasyon yapılarak çalışılmıştır. Örneklerin üzerine 1 mL brilliantblue (0,435 mM), 2 mL FeSO₄ (0,5 mM), 1,5 mL H₂O₂ (%3, w/v) ilave edilmiş ve 37°C'de 1 saat inkübe edilmiştir. Örnekler 4000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiş ve 624 nm de absorbansları ölçülmüştür. Bakterilerin hidroksil radikalini süpürücü etkisi aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır:

$$\% \text{ Hidroksil Radikali Süpürücü Aktivite} = [(A_0 - A_1) / (A - A_1)] \times 100$$

A₀: Belirli bir konsantrasyonda örnek içeren çözeltinin absorbans değeri

A₁: Örnek olmadığı çözeltinin absorbans değeri

A: Örnek ve Fenton reaksiyon sistemini içermeyen çözeltinin absorbans değeridir.

Süperoksit anyon radikali süpürücü aktivitesi: Süspanse edilen örneklerin üzerine 25°C de ısıtılmış 0,2 mL pyrogallol (3 mM) ilave edilmiştir. Karışımın absorbansı 325 nm'de ölçülmüş ve yüzde süperoksit anyonu radikalini süpürücü aktivitesine göre tespit edilmiştir [16].

$$\% \text{ Süperoksit anyonu radikalinin süpürücü aktivitesi} = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100$$

A₁: Örneklerin absorbands değeri

A₀: Örnek içermeyen çözeltinin absorbands değeri

2.3. İstatiksel Analizler

Tüm çalışmalar 2 paralelli ve 3 tekerrürlü olarak yapılmış ve bulunan değerlerin ortalama sonuçları verilmiştir. İstatistiksel analizlerde SPSS Inc. Software (16.0 versiyonu, SPSS Inc., Chicago, IL) kullanılmıştır. Bakterilerin antoksidan aktivitesinin belirlenmesinde kullanılan metotlar arasında anlamlı farklılık olup olmadığını belirlemek amacıyla tek yönlü varyans analizi (ANOVA) yapılmıştır.

3. BULGULAR VE TARTIŞMA

İnsanlar yaşlandıkça, hücrelerin yapısında biriken ROS hasarı sonucu nörodejeneratif hastalıklar ve kanser ortaya çıkmaktadır [7]. Bazı araştırmacılar probiyotiklerin ROS birikimini azalttığı ve oksidatif strese karşı koruyucu etkisinin olduğunu bildirmişlerdir [7, 17-19]. *Lactobacillus* cinsine ait türlerin, probiyotik özelliklerinin yanı sıra fenolik bileşikler dahil olmak üzere antioksidan metabolitler üreterek yüksek antioksidan aktivite gösterdiği tespit edilmiştir [12, 20-22]. Çalışmada süt ürünlerinden izole edilen *Lactobacillus* cinsine ait 20 suşun, DPPH giderme, Fe⁺² şelatlama, lipit peroksidasyonunun inhibisyonu, hidroksil radikal süpürücü aktivitesi ve süperoksit radikal süpürücü aktivitesi gibi farklı metotlar ile antioksidan etkileri belirlenmiştir. Suşların hepsinde denenen yöntemlerde farklı miktarlarda antioksidan etki olduğu belirlenmiştir (Çizelge 1).

Çizelge 1. Suşların antioksidan aktiviteleri (%)

Suşlar	DPPH radikali giderim yeteneği (%) ^{b,c,d,e}	Fe iyonu şelatlama (%) ^{a,d,e}	Lipit peroksidasyonunu inhibe etme yeteneği (%) ^{a,e}	Hidroksil radikali süpürücü aktivitesi (%) ^{a,b,e}	Süperoksit anyon radikali süpürücü aktivitesi (%) ^{a,b,c,d}
<i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> 12L	61,8±4,9	34,1±0,8	30,2±1,0	22,9±3,9	50,0±3,9
<i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> 15L	56,3±3,1	35,4±1,9	34,0±3,9	21,9±2,8	27,1±2,8
<i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> 26L	77,7±4,2	37,5±1,1	31,8±3,4	21,1±2,9	10,4±2,9
<i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> 31L	62,1±4,4	36,4±1,3	32,7±2,7	12,1±2,4	47,9±2,4
<i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> 37L	71,1±1,5	36,8±3,9	31,9±2,3	8,0±1,3	66,7±4,3
<i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> 43L	61,2±2,1	31,8±1,5	32,2±3,0	23,2±1,8	43,7±1,8
<i>L. brevis</i> KIR12	81,9±4,2	32,9±0,8	31,1±1,5	31,0±1,3	45,8±1,3
<i>L. brevis</i> KIR3	63,3±2,2	36,0±3,5	32,9±1,2	16,1±2,3	37,5±2,3
<i>L. brevis</i> SU1	64,4±3,2	36,3±3,2	36,3±1,8	22,3±1,2	31,2±4,2
<i>L. brevis</i> YG7	70,6±3,4	37,0±2,4	31,1±2,1	43,6±3,8	75,0±3,8
<i>L. brevis</i> YG9	72,9±3,5	33,8±1,6	30,9±3,8	27,1±2,3	56,2±2,4
<i>L. casei</i> EMP2	78,5±1,1	35,7±2,7	31,2±1,2	24,8±2,4	39,6±3,2
<i>L. fermentum</i> BP5	66,0±2,7	40,5±2,4	30,4±1,7	42,2±3,2	54,2±1,7
<i>L. fermentum</i> FKK3	64,7±2,7	37,6±1,9	30,5±0,9	45,8±1,7	60,4±1,2
<i>L. fermentum</i> IP5	63,4±4,4	34,4±0,9	31,3±3,1	26,1±1,2	45,8±4,3
<i>L. helveticus</i> SU2	63,2±4,1	33,5±2,8	33,2±3,3	23,1±3,3	70,8±1,8
<i>L. rhamnosus</i> CEP1	62,9±3,2	34,0±1,6	31,4±2,9	25,0±1,8	64,6±4,1

<i>L. rhamnosus</i> SU3	71,6±3,5	36,1±2,3	32,4±3,6	29,4±2,2	41,2±4,2
<i>L. rhamnosus</i> SU4	62,6±3,2	34,9±1,7	30,3±2,5	27,7±2,8	52,1±2,8
<i>L. rhamnosus</i> SMC6	62,8±2,3	36,6±2,8	39,2±4,2	28,4±3,1	66,7±2,3

a,b,c,d,e: ortalama fark 0,05 düzeyinde anlamlıdır.

Antioksidan aktivitenin belirlenmesinde sıkça kullanılan metotlardan biri DPPH giderim yeteneğinin test edilmesidir. DPPH radikali antioksidan varlığında DPPH-H formuna dönüşmektedir. DPPH radikal süpürücü yöntemi; kolaylığı, hızı, diğer yöntemlerle karşılaştırıldığında hassasiyeti ve tekrarlanabilirliği açısından antioksidan aktivite çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Ortama DPPH radikali verildiğinde oluşan mor rengin giderimi ile orantılı olarak antioksidan aktivite artmaktadır. 517 nm de maksimum absorbans gösteren DPPH radikali antioksidan varlığında mor rengi sarıya dönmektedir. Bu nedenle spektrofotometrik olarak çalışılmaktadır [23]. Ortama verilen bir çeşit radikal madde olan DPPH'ın bakterilerin etkisiyle süpürülmesinin test edilmesiyle, suşların antioksidan aktiviteleri belirlenmektedir. Suşların radikal süpürücü aktivitesi spektrofotometrik metot ile tespit edilmiştir. En yüksek aktivite *L. brevis* KIR12 (%81,9) ve *L. casei* EMP2 (%78,5) suşlarında görülmüştür. Çalışılan diğer suşlara kıyasla DPPH giderim aktivitesi en az olan *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* 15L suşu (%56,3) olarak tespit edilmiş ve *Lactobacillus* cinsi bakterilerle yapılan çalışmalarda suşlardan daha yüksek DPPH giderim aktivitesi gösterdikleri belirlenmiştir. 11 LAB (*Leuconostoc* sp. ve *Lactobacillus* sp.) ile yapılan bir çalışmada bakterilerin, DPPH radikal süpürücü aktivitelerini %50'ye yakın ve üzerinde bulmuşlardır. Bu suşların çevresel faktörleri optimize ederek, antioksidan kapasitelerini arttırarak endüstriyel materyal olarak kullanılabilmesi bildirilmiştir [20]. Yang ve diğerlerinin [7] yapmış oldukları çalışmada DPPH süpürücü etkinliği 10^8 kob/mL'lik *L. plantarum* 200655 suşunda %30,51 ile en yüksek aktiviteyi, *L. rhamnosus* GG %27,93 ve *L. plantarum* KCTC 3108' de %20,20 oranında bulmuşlardır. Zhang ve diğerleri [11], *L. casei* subsp. *casei* SY13 ve *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* LJJ suşlarının (10^9 kob/mL) DPPH radikal süpürücü aktivitelerini sırasıyla %23,99 ve %27,50 olarak bulmuşlardır. Bakterilerin DPPH radikal süpürücü aktivitelerinin yoğunluğa bağlı olarak değiştiği görülmektedir.

Antioksidan aktivitenin belirlenmesinde çalışılan bir diğer yöntem ise Fe^{+2} iyonu şelatlama aktivitesinin tespit edilmesidir. Hayatımız için temel elementlerden biri olan demir, aynı zamanda protein, lipit ve diğer bileşenlerle reaksiyonlara girerek oksidatif hasara neden olabilmektedir [24]. Ferrozin, ferröz iyonları gibi +2 değerlikli metal iyonları ile kompleks oluşturmaktadır. Oluşan renkli ferrozin-metal kompleksi ise 562 nm'de maksimum absorbans göstermektedir. Metal şelatlayıcı ajanların (antioksidan madde) varlığında, kompleks oluşmaz ve meydana gelen mor renkte açılma gerçekleşir. Dolayısıyla 562 nm absorbansta meydana gelen azalma yani renkteki açılma metal şelasyonunun göstergesi olarak kabul edilmektedir. Bu çalışmada bakterilerin Fe^{+2} iyonu şelatlama aktivitesi, $FeCl_2$ 'nin ferrozin ile koyu mor renkli bir kompleks oluşturmaya dayanılarak spektrofotometrik olarak gerçekleştirilmiştir. Antioksidan maddeler tarafından şelatlanan demir iyonları ferrozin tarafından bağlanamayacağı için oluşacak olan mor renk şiddeti azalacak ve absorbans daha düşük olacaktır. Denenen tüm suşların metal (Fe^{+2}) iyonu şelatlama etkisinin olduğu belirlenmiştir. En yüksek aktiviteyi *L. fermentum* BP5 suşu %40,5, en düşük aktiviteyi ise *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* 43L suşu %31,8 oranında göstermiştir. Düşük aktivite gösteren 43L suşunun DPPH giderim aktivitesine bakıldığında ise, ortalama bir değerde (%66) etki gösterdiği tespit edilmiştir. DPPH giderimi en yüksek olan *L. brevis* KIR12 suşunun da metal şelatlamada çok yüksek bir etkiye sahip olmadığı (%32,9) gözlenmiştir. Riane ve arkadaşları [2] probiyotik bir bakteri olan *Lactobacillus plantarum* 15 suşunun, demir iyonlarını %20,52 oranında şelatlama kapasitesine sahip olduğunu bildirmişlerdir. *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LJJ ile *L. casei* subsp. *casei* SY13 suşlarının pellet ve süpernatantın şelatlama aktivitesinin araştırıldığı çalışmada, SY13 ve LJJ suşlarının farklı oranlarda Fe^{+2} şelatlama aktivitesi sergilediğini, şelatlama yeteneğinin pellette (*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LJJ %50,55), süpernatanta göre daha yüksek olduğunu rapor edilmiştir [11].

Oksidasyon reaksiyonları sırasında serbest radikaller, reaktif oksijen türleri ve toksik ürünler ortaya çıkarak biyolojik moleküllerde hasara yol açmaktadır [21]. Reaktif oksijen türlerinin yol açtığı hasarlardan biri de lipitler üzerinedir. Hücrelerdeki zar fosfolipitlerinin yükseltgenerek peroksit türevlerine dönüşmesi lipit peroksidasyonu olarak tanımlanır [25]. Bu çalışmada, bakterilerin lipit peroksidasyon inhibisyon oranı

%39,2-30,2 arasında farklılık göstermektedir. *L. rhamnosus* SMC6 (%39,2) ve *L. brevis* SU1 (%36,3) suşlarında yüksek inhibisyon gözlenmiştir. Laktik asit bakterilerinin lipit peroksidasyon inhibisyonunda 10^9 kob/mL bakteri yoğunluğunda en yüksek aktiviteyi %64,4 (*L. brevis* MG882402)- %31,8 (*L. acidophilus* ATCC 4356) oranında değiştiğini bildirilmiştir [12]. Bu çalışmada daha yoğun bir bakteri canlı hücre sayısı (10^{11} kob/mL) ile çalışılmasına rağmen *L. brevis* SU suşu %31,8 ile en düşük inhibisyon yeteneği göstermiştir. Buda lipit peroksidasyon inhibisyonunun aynı türde suşa bağlı olarak değişebileceğini düşündürmüştür. Başka bir lipit peroksidasyonu inhibisyonu çalışmasında, *Bifidobacterium longum* ATCC 15708 ve *L. acidophilus* ATCC 4356 bakterilerinin (10^9 kob/mL de) pellet ve süpernatantında inhibisyon oranlarının %11 ile %29 arasında değiştiği rapor edilmiştir [21]. Bu çalışmada ise, bakterilerin yoğunluğu 10^{11} kob/mL olup, lipit peroksidasyonu inhibisyon oranları da %30 ile %39,2 arasında değişen değerlerdedir. Kullanılan yoğunluğa bağlı olarak plazma lipit inhibisyonunun değiştiği düşünülmektedir. Ayrıca; Kaizu ve arkadaşları [26] heterofermentatif suşların daha yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğunu bildirmişlerdir. Lipit peroksidasyon inhibisyonu çalışmasında, %39,2 oranında en yüksek aktiviteyi gösteren suş (*L. rhamnosus* SMC6) homofermentatif olmasına karşın, bir diğer yüksek inhibisyon yeteneğindeki *L. brevis* SU1 (%36,3) suşu heterofermentatiftir. Dolayısıyla bu çalışmada test edilen antioksidan aktivite metodlarında heterofermentatif laktik asit bakterilerinin yüksek olsa da istisnaların mevcut olabileceğini, farklı yöntemlerde farklı sonuçların alınabileceğini göstermektedir.

Reaktif oksijen türleri arasında, hidroksil radikali en reaktif kimyasaldır ve makromoleküllerde ciddi hasara yol açar [27]. Hidroksil radikali (OH•), Fenton reaksiyonu ve Haber-Weiss reaksiyonu sonucu hidrojen peroksitten ortaya çıkmaktadır. Bu çalışmada hidroksil radikalini süpürücü etkide, en yüksek aktiviteyi gösteren suşların *L. fermentum* FKK3 %45,8 ve *L. brevis* YG7 %43,6 olduğu tespit edilmiştir. Noreen vd. [12] yapmış oldukları bir çalışmada, laktik asit bakterilerinin hidroksil radikali süpürücü aktivitesini 10^9 kob/mL bakteri yoğunluğunda en yüksek aktiviteyi %53,2- %66,4 oranında değiştiğini tespit etmişlerdir. Sonuçlar, Li ve arkadaşlarının [13] yaptıkları benzer bir araştırmanın sonuçları ile paralel çıkmıştır. Geleneksel Çin fermente gıdalarından izole edilen 11 det *L. plantarum* suşunun hidroksil radikali süpürücü aktiviteleri incelemişler. Test edilen 11 suş arasından *L. plantarum* C88 suşunun (10^{10} kob/mL, %44,31) yüksek inhibisyon gösterdiği, 10^8 - 10^{10} kob/mL farklı konsantrasyonlarda doza bağlı olarak hidroksil radikali süpürücü aktivitesinin değiştiği rapor edilmiştir.

Süperoksit radikalleri, mitokondride elektron taşıma zinciri reaksiyonlarının bir yan ürünü olarak oluşur ve hücre için tehlikelidir. Önemli bir antioksidan savunma sistemi elemanı olan süperoksit dismutaz enzimi, süperoksit içindeki oksijen ve hidrojen peroksiti katalize eden bir enzim olup oksijenin toksik formuna karşı vücudumuzu korur [12, 20]. Ji ve arkadaşlarının [20] yaptıkları bir çalışmada, *Leuconostoc* sp. ve *Lactobacillus* sp. suşlarını (0,2 mL) kullanarak, pirogallol oto-oksidasyonu ile süperoksit anyon radikallerini süpürücü aktivitesini test etmişlerdir. SOD aktivitesini pellette çalıştıkları 11 suşun (*Leuconostoc* sp. E1 ve E2 suşu dışında) %35'in üzerinde süpürücü aktivite gösterdiğini, *Lactobacillus* sp. S1 suşunun en yüksek aktiviteye sahip olduğunu tespit etmişler. Pelletin saflaştırılmasıyla daha yüksek bir aktivite tespit edildiğini bildirmişlerdir. Bu çalışmada pirogallol ile çalışılmış olup, suşlar arasındaki süpürücü aktivite kıyaslandığında ise, %75,0 ile %10,4 aralığında değişen değerler tespit edilmiştir. En yüksek aktiviteyi gösteren suşun (*L. brevis* YG7 %75) aynı zamanda hidroksil radikal süpürücü aktivitesinin de yüksek olduğu (%43,6) bulunmuştur. Bu çalışmada, 1 mL konsantrasyonunda bakteri hücre pelleti kullanılırken, Ji ve arkadaşlarının [20] çalışmalarında 0,2 mL konsantrasyonunda hücre pelleti ile çalışmışlardır. Sonuçların konsantrasyona bağlı olarak değiştiğini, bakteri yoğunluğu fazla olduğunda daha yüksek süpürücü aktivite sergiledikleri görülmektedir.

Protein türevi peptitler gibi biyoaktif bileşikler, serbest radikalleri nötralize ederek bu bileşiklerin gıda ürünlerindeki etkisini azaltmada önemli bir role sahiptir [28]. Virtanen ve arkadaşlarının [22] yapmış oldukları çalışma sonucunda süt proteini hidrolizatları ile hidrolizden sonra salınan peptitlerin antioksidan aktivitesi tanımlanmıştır. Antioksidan aktivitenin bazı amino asit dizilerine bağlı olduğu ve yüksek konsantrasyonlarda histidin ve bazı hidrofobik amino asitler ile ilgili olduğu bildirilmektedir. Herna'ndez-Ledesma ve arkadaşları [29] tarafından yapılan çalışmada tanımlanan bir peptit (Trp-Tyr-Ser-Leu-Ala-Met-Ala-Ser-Asp-Ile), BHA'dan daha yüksek radikal süpürücü aktivitesine sahip olduğu bulunmuştur. Buna ek

olarak, bazı serbest amino asitlerin (çoğunlukla aromatik), antioksidan özelliğe sahip olduğu da bilinmektedir. Ayrıca araştırmalarda, süt bileşenleri oksidasyon zincir reaksiyonlarını serbest radikal süpürücü özelliği ile sonlandırıldığı rapor edilmektedir [22]. *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* IFO 13953 ile fermente edilmiş süttten izole edilen κ-kazeinin özellikle Ala-Arg-His-Pro-His-Pro-His-Leu-Ser-PheMet dizilimindeki peptidinin DPPH radikalini indirgeme aktivitesi sergilediği rapor edilmiştir. Bu antioksidan peptit IFO 13953 laktik asit fermentasyonu ile oluşturulan bir peptit olduğu tahmin edilmiştir. Bu peptidin DPPH radikalini temizleme etkinliği BHT'e göre düşük olmasına rağmen, peptit β-karoten renk giderimi sistemi BHT'den yaklaşık 5 kat daha güçlü antioksidan aktivite göstermiştir [30].

LAB çeşitli yollarla antioksidan aktivite gösterir, süperoksit dismutaz (SOD) gibi enzimleri salgılayarak doğal hücrel antioksidan savunmayı güçlendirebilirler. Büyük enzimatik olmayan antioksidan ve serbest radikal temizleyici olan glutatyonun (GSH) üretilmesini sağlar. Ayrıca, ekzopolisakkaritler (EPS) gibi bazı antioksidan biyomoleküllerin üretimini de uyarır [31]. LAB'de glutatyon dışında birkaç düşük molekül antioksidan da bildirilmiştir. Laktik asit bakterilerinden elde edilen düşük molekül ağırlıklı antioksidanların gıda endüstrisi ve insan sağlığı için son derece faydalı olması beklenmektedir. Bugüne kadar, LAB'de manganez süperoksit dismutaz ve NADH peroksidaz gibi çeşitli antioksidan enzimleri bildirilmiştir. LAB'de antioksidan ferritin-likeiron-binding proteini (Dpr) adı verilen bir demir bağlayıcı protein de tespit edilmiştir. Dpr üzerinde yapılan çalışma sırasında, serbest hücre ekstraktları düşük molekül ağırlıklı fraksiyonu ile fenton reaksiyonu inhibe aktivitesi tespit edilmiştir. Dpr proteini üzerine çalışmalar sürmektedir. Tüm bu veriler probiyotiklerin özellikle de laktik asit bakterilerinin, reaktif oksijen türlerinin (ROS), gastrointestinal bozukluklarda terapötik bir role sahip olabileceğini düşündürmektedir [10].

Bu çalışma sonucunda test edilen suşların farklı oranlarda olmakla birlikte antioksidan yetenekte oldukları bulunmuştur. DPPH radikali süpürücü aktivite, Fe⁺² şelatlama, lipit peroksidasyonunu inhibe etme, hidroksil radikali süpürücü aktivite ve süperoksit radikali süpürücü aktivite arasında bir ilişki olup olmadığını araştırmak için SPSS Inc. Software (16.0 versiyonu, SPSS Inc., Chicago, IL) programı ile ANOVA testi yapılmış ve analizler sonucunda çalışılan yöntemler arasında anlamlı bir fark olduğu tespit edilmiştir (p<0,05).

Suşların antioksidan aktivitelerindeki farklılığın nedeni henüz tam olarak açıklanamamıştır. Bu sonuçlar ve günümüze kadar yapılan çalışmalar antioksidan aktivitenin proteolitik aktiviteyle bağlantılı olabileceğini, açığa çıkan peptitlerle ilgili olabileceği, türe, suşa ve doza bağlı olarak değişebileceği rapor edilmiştir [12, 21, 22, 27, 30]. Ayrıca, antioksidan aktivitenin izolasyon kaynağına bağlı olarak da değişebileceği düşünülmektedir. Bu çalışmada peynirden izole edilen suşların, yoğurttan izole edilen suşlara kıyasla daha yüksek antioksidan aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Yüksek antioksidan yeteneğine sahip olan *L. brevis* KIR12, *L. fermentum* BP5, *L. rhamnosus* SMC6, *L. fermentum* FKK3, *L. brevis* YG7 suşlarının gıda ve probiyotik uygulamalarda kullanılabilme potansiyelleri bulunmaktadır. Wilson ve arkadaşları [32] antioksidan etki ile antikanserojenik etkinin bağlantılı olduğunu belirtmişlerdir. Dolayısıyla çalışılan suşların antikanserojenik etkinliğe de sahip olabileceğini düşündürmektedir. Bu suşların antikanserojenik etkilerinin belirlenmesinden sonra probiyotik olarak oksidatif hasarın yol açtığı hastalıkların önlenmesinde doğal antioksidan kaynağı olarak kullanılabilme potansiyelleri de olabilecektir.

TEŞEKKÜR

Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi 05/2015-13 nolu proje için vermiş oldukları araştırma-geliştirme desteklerinden dolayı teşekkür ederiz.

ÇIKAR ÇATIŞMASI/ÇAKIŞMASI BİLDİRİMİ

Yazarlar arasında çıkar çatışması/çakışması bulunmamaktadır.

KAYNAKLAR

[1] Özenç, B. (2011). *Fumaria officinalis*'un antioksidan aktivitesinin belirlenmesi. *Yüksek Lisans Tezi*. Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Konya.

- [2] Riane, K., Sifour M., Ouled-Haddar, H., Idoui, T., Bounar, S., and Boussebt, S. (2019). Probiotic properties and antioxidant efficiency of *Lactobacillus plantarum* 15 isolated from milk. *Journal Microbiology Biotechnology Food Science*, 9(3), 516-520.
- [3] Bartkiene, E., Lele, V., Starkute, V., Zavistanaviciute, P., Zokaityte, E., Varinauskaite, I., and Dmitrijeva, L. (2020). Plants and lactic acid bacteria combination for new antimicrobial and antioxidant properties product development in a sustainable manner. *Foods*, 9(4), 433.
- [4] Mbah, J.C., Orabueze, I., and Okorie, H. N. (2019). Antioxidants properties of natural and synthetic chemical compounds: Therapeutic Effects on Biological System. *Acta Scientific Pharmaceutical Sciences*. 3(6), 28-42.
- [5] Hamid, A. A., Aiyelaagbe, O. O., Usman, L. A., Ameen, O. M., and Lawal, A. (2010). Antioxidants: Its medicinal and pharmacological applications. *African Journal of Pure and Applied Chemistry*. 4(8), 142-151.
- [6] Lourenço, S. C., Moldão-Martins, M., and Alves, V. D. (2019). Antioxidants of natural plant origins: From sources to food industry applications. *Molecules*. 24(22), 4132.
- [7] Yang, S. J., Lee, J. E., Lim, S. M., Kim, Y. J., Lee, N. K., and Paik, H. D. (2019). Antioxidant and immune-enhancing effects of probiotic *Lactobacillus plantarum* 200655 isolated from kimchi. *Food Science and Biotechnology*. 28(2), 491-499.
- [8] Garcia, S. L. A., Silva, G. M., Medeiros, J. M. S., Queiroga, A. P. R., Queiroz, B. B., Farias, D. R. B., and Buriti, F. C. A. (2020). Influence of co-cultures of *Streptococcus thermophilus* and probiotic lactobacilli on quality and antioxidant capacity parameters of lactose-free fermented dairy beverages containing *Syzygium cumini* (L.) skeels pulp. *RSC Advances*, 10(17), 10297-10308.
- [9] Spyropoulos, B. G., Misiakos, E. P., Fotiadis, C., and Stoidis, C. N. (2011). Antioxidant properties of probiotics and their protective effects in the pathogenesis of radiation induced enteritis and colitis. *Digestive Diseases and Sciences*. 56(2), 285-294.
- [10] Afify, A. E. M. R., Romeliah, R. M., Sultan, S. I., and Hussein, M. M. (2012). Antioxidant activity and biological evaluations of probiotic bacteria strains. *International Journal Academic Research*. 4(6), 131-139.
- [11] Zhang, S., Liu, L., Su, Y., Li, H., Sun, Q., Liang, X., and Lv, J. (2011). Antioxidative activity of lactic acid bacteria in yogurt. *African Journal of Microbiology Research*. 5(29), 5194-5201.
- [12] Noureen, S., Riaz, A., Saif, A., Arshad, M., Qamar, M. F., and Arshad, N. (2018). Antioxidant properties of *Lactobacillus brevis* of horse origin and commercial lactic acid bacterial strains: A comparison. *Pakistan Veterinary Journal*. 38(3).
- [13] Li, S., Zhao, Y., Zhang, L., Zhang, X., Huang, L., Li, D., and Wang, Q. (2012). Antioxidant activity of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from traditional Chinese fermented foods. *Food Chemistry*. 135(3), 1914-1919.
- [14] Decker, E.A. and Welch, B. (1990). Role of ferritin as a lipid oxidation catalyst in muscle food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 38(3), 674-677.
- [15] Ou, C., Ko, J., and Lin, M. (2006). Antioxidative effects of intracellular extracts of yogurt bacteria on lipid peroxidation and intestine 407 cells. *Journal of Food and Drug Analysis*. 14(3), 304-310.
- [16] Wang, J., Zhao, X., Yang, Y., Zhao, A., and Yang, Z. (2015). Characterization and bioactivities of an exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* YW32. *International Journal of Biological Macromolecules*. 74, 119-126.
- [17] Amaretti, A., Di Nunzio, M., Pompei, A., Raimondi, S., Rossi, M., and Bordoni, A. (2013). Antioxidant properties of potentially probiotic bacteria: *In vitro* and *in vivo* activities. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 97(2), 809-817.
- [18] Chang, C. K., Wang, S. C., Chiu, C. K., Chen, S. Y., Chen, Z. T., and Duh, P. D. (2015). Effect of lactic acid bacteria isolated from fermented mustard on immunopotentiating activity. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 5, 281-286.
- [19] Mishra, V., Shah, C., Mokashe, N., Chavan, R., Yadav, H., and Prajapati, J. (2015). Probiotics as potential antioxidants: A systematic review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 63(14), 3615-3626.
- [20] Ji, K., Jang, N. Y., and Kim, Y. T. (2015). Isolation of lactic acid bacteria showing antioxidative and probiotic activities from kimchi and infant feces. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 25(9), 1568-1577.
- [21] Lin, M. Y. and Chang, F. J. (2000). Antioxidative effect of intestinal bacteria *Bifidobacterium longum* ATCC 15708 and *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356. *Digestive Diseases and Sciences*. 45(8), 1617-1622.
- [22] Virtanen, T., Pihlanto, A., Akkanen, S., and Korhonen, H. (2007). Development of antioxidant activity in milk whey during fermentation with lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology*. 102(1), 106-115.
- [23] Miguel, M. G. (2010). Antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oils: A short review. *Molecules*. 15(12), 9252-9287.
- [24] Rival, S. G., Boerri, C. G., and Wichers, H. J. (2001). Caseins and casein hydrolysates antioxidative properties and relevance to lipoxygenase inhibition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49, 295-302.
- [25] Yarsan, E. (1998). Lipid peroksidasyon olayı ve önlenmesine yönelik uygulamalar. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*. 9(1), 89-95.

- [26] Kaizu, H., Sasaki, M., Nakajima, H. and Suzuki, Y. (1993). Effect of antioxidative lactic acid bacteria on rats fed a diet deficient in vitamin E. *Journal of Dairy Science*, 76, 2493–2499.
- [27] Zhang, L., Liu, C., Li, D., Zhao, Y., Zhang, X., Zeng, X., and Li, S. (2013). Antioxidant activity of an exopolysaccharide isolated from *Lactobacillus plantarum* C88. *International Journal of Biological Macromolecules*. 54, 270-275.
- [28] Ayyash, M., Olaimat, A., Al-Nabulsi, A., and Liu, S. Q. (2020). Bioactive properties of novel probiotic *Lactococcus lactis* fermented camel sausages: Cytotoxicity, angiotensin converting enzyme inhibition, antioxidant capacity, and antidiabetic activity. *Food Science of Animal Resources*. 40(2), 155.
- [29] Hernández-Ledesma, B., Da'valos, A., Bartolome, B., and Amigo, L. (2005). Preparation of antioxidant enzymatic hydrolysates from alpha-lactalbumin and beta-lactoglobulin identification of active peptides by HPLC-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53, 588–593.
- [30] Kudoh, Y., Matsuda, S., Igoshi, K., and Oki, T. (2001). Antioxidative peptide from milk fermented with *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* IFO13953. *Nippon Shokuhin Kagaku Kaishi*. 48, 44–55.
- [31] Adebayo-Tayo, B. and Fashogbon, R. (2020). *In vitro* antioxidant, antibacterial, *in vivo* immunomodulatory, antitumor, and hematological potential of exopolysaccharide produced by wild type and mutant *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *Heliyon*. 6(2), e03268.
- [32] Wilson, T. A., Nicolosi, R. J., Chrysam, M., and Kritchevsky, D. (2000). Conjugated linoleic acid reduces early aortic atherosclerosis greater than linoleic acid in hypercholesterolemic hamsters. *Nutrition Research*. 20(12), 1795-1805.

Parametre Tahmininde Farklı Doğrusal Programlama Modellerinin Karşılaştırılması

Emre Koçak* , H. Hasan Örkücü 

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

Öne Çıkanlar

- Regresyon analizinde parametre tahmini için doğrusal programlama yönteminin kullanılması
- Farklı tahmin edicilerin yöntemlerinin karşılaştırmalı olarak incelenmesi
- Doğrusal programlama modellerinin hesaplama sürelerine etkileri

Makale Bilgileri

Geliş: 11/11/2020
Kabul: 03/12/2020

Anahtar Kelimeler

Parametre tahmini,
Regresyon analizi,
Doğrusal programlama

Özet

L_p norm ve L_∞ norm parametre tahmin yöntemleri kullanılarak doğrusal ve doğrusal olmayan regresyon modellerin parametrelerini tahmin etmek için çeşitli yapılarda modeller geliştirilmiştir. L_p normunun özel bir hali olan L_1 norm ve L_∞ norm yöntemlerinden geliştirilmiş modellerin karşılaştırıldığı bu çalışmada, simülasyon çalışması ile üretilen farklı örneklem büyüklüklerindeki veri kümeleri yardımıyla katsayıların tahmini dışında açıklayıcılık katsayısı ve hesaplama süreleri incelenmiştir. Karşılaştırılan modeller parametre tahmini ve açıklayıcılık katsayıları açısından önemli derecede farklılık oluşturmaz iken hesaplama süreleri açısından farklılıklara neden olmuştur.

A Comparison of Different Linear Programming Models in Parameter Estimation

Highlights

- Using linear programming method for parameter estimation in regression analysis
- Comparative study of methods of different estimators
- Effects of linear programming models on computation time

Article Info

Received: 11/11/2020
Accepted: 03/12/2020

Keywords

Parameter estimation,
Regression analysis,
Linear programming

Abstract

Models with various constructs have been developed to estimate the parameters of linear and nonlinear regression models using L_p -norm and L_∞ -norm parameter estimation methods. In this study, which is L_1 -norm, a special case of the L_p -norm and L_∞ -norm methods were compared, with the help of datasets in different sample sizes produced by the simulation study apart from the estimation of the coefficients, the explanatory coefficient and calculation times were examined. While the compared models did not make a significant difference in terms of parameter estimation and explanatory coefficients, they caused differences in terms of calculation times.



1. GİRİŞ

En küçük kareler yöntemine alternatif olarak önerilen L_p norm ve L_∞ norm parametre tahmin yöntemleri, doğrusal ve doğrusal olmayan regresyon modellerinin parametre tahmininde kullanılmaktadır. Genel olarak L_p norm, modellerin parametreleri tahmin edilen değerlerin bağımlı değişkenin gözlemlenen değerlerinden mutlak sapmalarının p . güçlerinin toplamının en aza indirilmesi ile tahmin edilir. L_∞ norm ise, Gauss-Newton veya Levenberg-Marquardt tipindedir ve yalnızca birinci türev bilgilerini kullanır. Orijinal doğrusal olmayan problem, her biri doğrusal bir programlama problemi olarak verimli bir şekilde çözülebilen bir dizi doğrusal L_∞ norm problemine indirgenmiştir [1].

Charnes vd. ve Wagner yaptıkları çalışmalar ile doğrusal programlama problemini L_p norm yönteminin özel hali olan L_1 norm ve L_∞ norm yöntemlerine uyarladılar ve bu tahmin yöntemleri kısıtlı bir optimizasyon problemi olarak modellenmiştir [2, 3]. Zamanın bilgisayarları çok büyük boyuttaki doğrusal programlama problemlerini çözebilecek kadar gelişmiş olmamasından dolayı çalışmalarını daha ileri seviyelere getirememişlerdir. Fakat ilerleyen teknoloji ile bu tahmin yöntemleri geliştirildi ve çeşitli model yapıları meydana geldi.

Osborne ve Watson ile Anderson ve Osborne çalışmalarında Gauss-Newton tipinde kısıtsız bir L_∞ regresyon problemi çözmüşlerdir [4, 5]. Barrodale ve Phillips, L_∞ norm tahmin probleminin ilk formülasyonunu çözmek için ikili bir yöntem önerdiler [6]. Armstrong vd., çoklu regresyon modellerinde çok hızlı bir algoritma geliştirmek için, temel matrisin LU ayrışımı ile revize edilmiş simpleks yöntemini kullandı [7]. Murray ve Overton, doğrusal olmayan minimax problemini çözmek için bir prosedür geliştirdiler [8]. Daha sonra Overton, bu yaklaşımı doğrusal olmayan L_∞ norm tahmin problemini çözmek için uyarlamıştır [9]. Dielman, en küçük mutlak değer ve en küçük kare regresyon denklemlerinden gelen tahminleri 30 gözlemlerle karşılaştırmak için Monte Carlo simülasyonunu kullandı [10]. Gentle vd., geliştirilen bazı modelleri ele alarak basit ve çoklu regresyon için en küçük mutlak değer algoritmalarının performansını inceledi [11]. Narula vd., basit regresyon için büyüklükleri farklı olan geliştirilmiş modellerin hesaplama sürelerini incelemişlerdir [12]. Soliman vd., en küçük mutlak değer artık değerleri sıfıra eşit olan gözlemleri tanımlamak için bir algoritma önermiştir. Bu şekilde, en küçük mutlak değer regresyonunun belirlenebileceğini ve ortaya çıkan hesaplama süresinin simpleks çözümleri kullanan algoritmalarından daha hızlı olacağını iddia ettiler [13]. Seneta ve Steiger, parametrelerin sayısı gözlemlerin sayısına göre büyük olduğunda diğer algoritmalarından daha hızlı olan bir en küçük mutlak değer algoritması önermiştir [14]. Narula ve Wellington, her biri için ayrı algoritmalar kullanmak yerine hem en küçük mutlak değer hem de Chebychev regresyon problemlerini çözmek için tek bir verimli algoritma sağlamıştır [15]. Dielman ve Rose, bozulmalara birinci dereceden otokorelasyona neden olduğunda Monte Carlo simülasyonunu kullanarak en küçük mutlak değer ve en küçük kare regresyonlarının tahmin performansını araştırdı [16]. Hong ve Choi, tahmini bir regresyon çizgisinde olduğu varsayılan noktaya kadar her veri noktasından eğimlerin yakınsak ağırlıklı medyanları cinsinden tahminleri tanımlayarak en küçük mutlak değer regresyon katsayısı tahminlerini bulmanın bir yöntemini önermiştir [17]. Portnoy ve Koenker, en küçük mutlak değer tahminlerini doğrusal programlama ile çözmek için iç nokta algoritmalarını inceledi [18].

Geliştirilen model yapılarındaki farklılıklardan dolayı doğrusal ve doğrusal olmayan regresyon analizi alanında yapılan çalışmalarda parametre tahmini, hesaplama süresi ve açıklayıcılık katsayısı gibi farklılıkları ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle hangi modelin hangi yapıdaki veri kümeleri için daha uygun bir yapıda olduğu sorusu önemli bir hale gelmiştir. Bu çalışmada L_1 norm ve L_∞ norm yöntemlerinden geliştirilmiş çeşitli modeller farklı yapılarıdaki veri kümeleri için karşılaştırılmış ve ele alınan veri kümesi için uygun model belirlenmiştir. Çalışmada ele alınacak olan modeller 2. Bölümde, çalışma sonucunda bulunan bulgular ve modellerin karşılaştırılması 3. Bölümde yer almaktadır. Son bölümde ise elde edilen sonuçlar yer almaktadır.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

n gözlemlili doğrusal regresyon modeli aşağıdaki gibi tanımlansın.

$$y_i = \beta_0 + \sum_{j=1}^m x_{ij}\beta_j + \varepsilon_i, i = 1, 2, \dots, n$$

Burada y_i , bağımlı değişkenin i . gözlem değeri; x_{ij} , j . açıklayıcı değişkenin i . gözlem değeri; β_0 , sabit terim; β_j , j . açıklayıcı değişkenin katsayısı ve ε_i , i . gözlem değişkeninin hatası şeklinde tanımlanmaktadır. Bu kapsamda, L_p norm, L_1 norm ve L_∞ norm tahmin yöntemi sırasıyla aşağıdaki gibi ifade edilebilmektedir

$$L_p \rightarrow \min \left(\sum_{i=1}^n |y_i - \hat{y}_i|^p \right)$$

$$L_1 \rightarrow \min \left(\sum_{i=1}^n |y_i - \hat{y}_i| \right)$$

$$L_\infty \rightarrow \min \max |y_i - \hat{y}_i|.$$

L_p norm yöntemi altında regresyon modeli parametrelerini tahmin etmek ve hesaplama süresini en aza indirmek için zamanla çeşitli modeller geliştirilmiş ve bu modeller doğrusal programlama modellerine dönüştürülmüştür. Bu çalışmada ele alınacak doğrusal programlama modelleri ise sırasıyla aşağıda verilmiştir.

Model 1

L_p norm yönteminin özel hali olan L_1 normunun en çok bilinen doğrusal programlama modeli;

$$\min \sum_{i=1}^n (d_i^+ + d_i^-)$$

s. t.

$$y_i - \left(b_0 + \sum_{j=1}^m x_{ij}b_j + d_i^+ + d_i^- \right) = 0, \quad i = 1, 2, \dots, n$$

$$d_i^+, d_i^- \geq 0$$

şeklindedir. Burada d_i^+ ve d_i^- , sırasıyla i . gözlem değeri için pozitif ve negatif sapmalarıdır.

Model 2

Gonin ve Money çalışmalarında Model 1'de verilen doğrusal programlama modelindeki sapma değişkenlerini yarıya indirmiş ve modeli tekrar formüle etmişlerdir [1]. Geliştirilen model;

$$\min \sum_{i=1}^n d_i$$

s. t.

$$y_i - \left(b_0 + \sum_{j=1}^m x_{ij} b_j - d_i \right) \geq 0, \quad i = 1, 2, \dots, n$$

$$y_i - \left(b_0 + \sum_{j=1}^m x_{ij} b_j - d_i \right) \leq 0, \quad i = 1, 2, \dots, n$$

$$d_i \geq 0$$

şeklindedir. Burada d_i , i . gözlem değerinin sapmasıdır.

Model 3

Göreceli amaç fonksiyonlarının diğer geliştirilen amaç fonksiyonlara göre daha uygun olarak düşünülmesi nedeniyle geliştirilen model;

$w_i = 1/y_i$ $i = 1, 2, \dots, n$ olmak üzere;

$$\text{Min } z = \sum_{j=1}^n (d_i^+ + d_i^-) w_i$$

s. t.

$$b_0 + \sum_{j=1}^k x_{ij} b_j + d_i^+ - d_i^- = y_i \quad i = 1, 2, \dots, n$$

$$d_i^+, d_i^- \geq 0 \quad i = 1, 2, \dots, n$$

şeklindedir. Burada d_i^+ ve d_i^- , sırasıyla i . gözlem değeri için pozitif ve negatif sapmalarıdır.

Model 4

Chebyshev yaklaşımı teorisinden türetilen L_∞ normunun doğrusal programlama modeli;

$$\text{min } d_\infty$$

s. t.

$$y_i - d_\infty \leq \sum_{j=1}^m x_{ij} b_j \leq y_i + d_\infty$$

$$d_\infty \geq 0$$

şeklindedir [1].

Ele alınan model yapılarındaki kısıt ve sapma değişkeni sayısındaki farklılıklardan dolayı modellerin parametre tahmini, hesaplama süresi ve açıklayıcılık katsayısı farklılık gösterebilmektedir. Bu nedenle farklı veri kümeleri için hangi modelin kullanılmasının uygun olacağını belirlemek için modelleri sadece

hesaplama süresi ya da açıklayıcılık katsayısını açısından incelemek yerine birlikte incelenmesi daha uygun olacağı düşünülmektedir.

Bağımlı değişkenlerin değişkenler tarafından ne derece açıklandığını belirlemek önemlidir. En küçük kareler yönteminde kullanılan açıklayıcılık katsayısının farklı olarak L_1 norm ve L_∞ norm tahmin yöntemi için kullanılacak eşitlik yapısı;

$$R^2 = r(y, \hat{y})^2$$

şeklinde [19].

3. BULGULAR

L_1 norm ve L_∞ norm yöntemlerinden geliştirilmiş çeşitli modellerin karşılaştırıldığı bu bölümde katsayıların tahmininin dışında açıklayıcılık katsayısı ve hesaplama süreleri açısından incelenmiştir. Karşılaştırılan regresyon modellerine ait parametre değerleri ve bu modellere ait örneklem büyüklükleri *Çizelge 1*'de verilmiştir.

Çizelge 1. Parametre değerleri ve örneklem büyüklükleri

Parametre Değerleri	Örneklem Büyüklükleri
$(B_0 = 2; B_1 = 1)$	n=10, 100, 1000
$(B_0 = 3; B_1 = 2; B_2 = 1)$	
$(B_0 = 4; B_1 = 3; B_2 = 2; B_3 = 1)$	
$(B_0 = 6; B_1 = 5; B_2 = 4; B_3 = 3; B_4 = 2; B_5 = 1)$	
$(B_0 = 11; B_1 = 10; B_2 = 9; B_3 = 8; B_4 = 7; B_5 = 6; B_6 = 5; B_7 = 4; B_8 = 3; B_9 = 2; B_{10} = 1)$	

Bu karşılaştırmaların performansları değerlendirilmesi için, simülasyon çalışmasında çeşitli sayıda değişkene sahip modellerden farklı örneklem büyüklüğünde veri kümeleri üretilip, her bir yapı için 1000 bağımsız deney yapılmıştır. Ayrıca hata terimi dağılım standart normal dağılım olarak ele alınmıştır. Simülasyon sonuçları 16.0 GB RAM ve 2.60 GHz Intel(R) Core(TM) i7-9750H CPU tipi bir bilgisayar kullanılarak elde edilmiştir.

Çizelge 2'de verilen tek değişkenli model yapıları incelendiğinde, belirleyicilik katsayısı ve parametre tahmin değerleri tüm model yapılarında birbirlerine yakın çıkmıştır. Hesaplama süreleri açısından örneklem büyüklüğü n=10, 100, 1000 olduğu zaman en iyi performansı Model 4 göstermiştir. Örneklem büyüklüğü n=10 olduğu durumda modellere ait hesaplama süreleri birbirlerine yakın iken örneklem büyüklüğü arttıkça bu yakınlık farkı artmaya başlamıştır. Özellikle n=1000 örneklem büyüklüğünde Model 4'ün hesaplama süresi kendinden sonraki en iyi hesaplama süresime sahip diğer modelden yaklaşık olarak 3,16 kat daha hızlı olup büyük bir farklılık göstermiştir. Tek değişkenli modele ait hesaplama sürelerine ait grafik *Şekil 1*'de verilmiştir.

Çizelge 2. Tek değişkenli veri kümesi için parametre tahmini, açıklayıcılık katsayıları ve hesaplama süresi

$(B_0 = 2; B_1 = 1)$			
Model	n = 10	n = 100	n = 1000
Model 1	$b_0 = 2,0904$	$b_0 = 2,0279$	$b_0 = 2,0015$
	$b_1 = 0,9994$	$b_1 = 0,9997$	$b_1 = 1,0000$
	$R^2 = 0,9791$	$R^2 = 0,9894$	$R^2 = 0,9901$
	Hesaplama Süresi=5,7519	Hesaplama Süresi=6,8189	Hesaplama Süresi=67,5326
Model 2	$b_0 = 2,0600$	$b_0 = 1,9513$	$b_0 = 2,0065$

	$b_1 = 0,9994$	$b_1 = 1,0004$	$b_1 = 0,9999$
	$R^2 = 0,9898$	$R^2 = 0,9905$	$R^2 = 0,9908$
	Hesaplama Süresi=5,5632	Hesaplama Süresi=7,3233	Hesaplama Süresi=107,2357
Model 3	$b_0 = 2,0666$	$b_0 = 2,0038$	$b_0 = 1,9944$
	$b_1 = 0,9994$	$b_1 = 0,9999$	$b_1 = 1,0000$
	$R^2 = 0,9952$	$R^2 = 0,9905$	$R^2 = 0,9911$
	Hesaplama Süresi=5,5059	Hesaplama Süresi=6,8160	Hesaplama Süresi=63,3877
Model 4	$b_0 = 1,9973$	$b_0 = 1,9259$	$b_0 = 1,9436$
	$b_1 = 0,9997$	$b_1 = 1,0009$	$b_1 = 1,0006$
	$R^2 = 0,9917$	$R^2 = 0,9919$	$R^2 = 0,9913$
	Hesaplama Süresi=5,4670	Hesaplama Süresi=5,9009	Hesaplama Süresi=20,0407



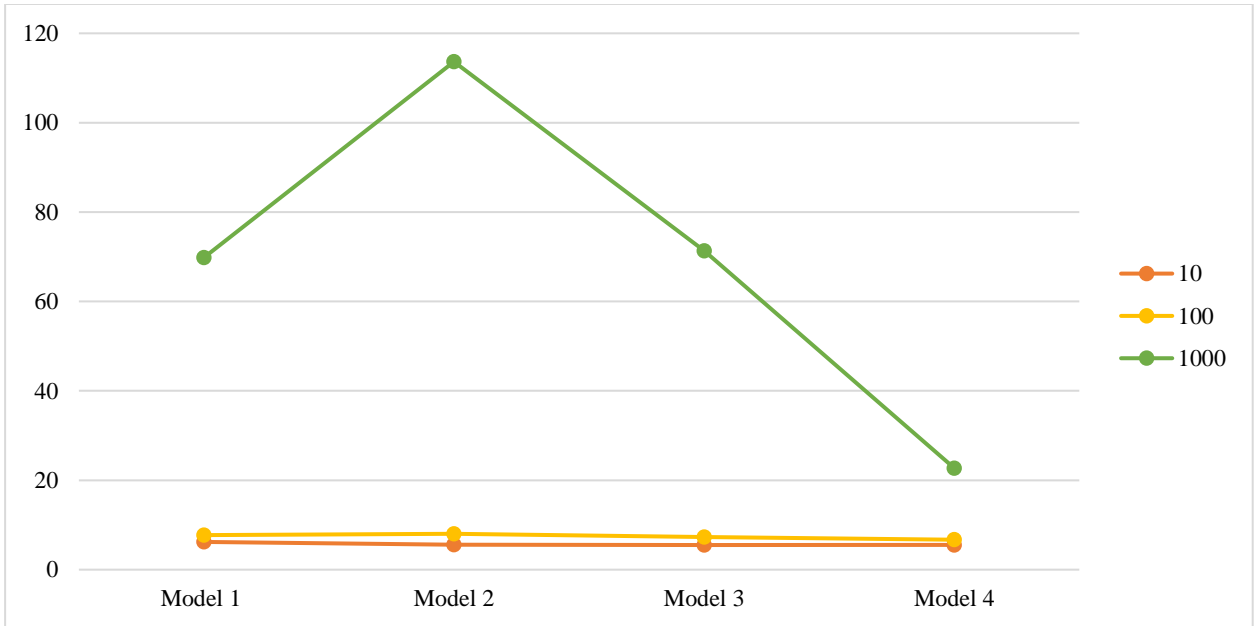
Şekil 1. Tek değişkenli model yapıları için hesaplama süresi

Çizelge 3’te verilen iki değişkenli model yapıları incelendiğinde, belirleyicilik katsayısı ve parametre tahmin değerleri tüm model yapılarında birbirlerine yakın çıkmıştır. Hesaplama süreleri açısından örneklem büyüklüğü $n=10$, 100 , 1000 olduğu zaman en iyi performansı Model 4 göstermiştir. Örneklem büyüklüğü $n=10$ olduğu durumda modellere ait hesaplama süreleri birbirlerine yakın iken örneklem büyüklüğü arttıkça bu yakınlık farkı artmaya başlamıştır. Özellikle $n=1000$ örneklem büyüklüğünde Model 4’ün hesaplama süresi kendinden sonraki en iyi hesaplama süresine sahip diğer modelden yaklaşık olarak 3,07 kat daha hızlı olup büyük bir farklılık göstermiştir. İki değişkenli modele ait hesaplama sürelerine ait grafik Şekil 2’de verilmiştir.

Çizelge 3. İki değişkenli veri kümesi için parametre tahmini, açıklayıcılık katsayıları ve hesaplama süresi

$(B_0 = 3; B_1 = 2; B_2 = 1)$			
Model	$n = 10$	$n = 100$	$n = 1000$
Model 1	$b_0 = 3,1268$	$b_0 = 3,0118$	$b_0 = 3,0238$
	$b_1 = 1,9995$	$b_1 = 2,0005$	$b_1 = 1,9997$
	$b_2 = 0,9996$	$b_2 = 0,9997$	$b_2 = 1,0001$
	$R^2 = 0,9979$	$R^2 = 0,9986$	$R^2 = 0,9988$
	Hesaplama Süresi=6,1967	Hesaplama Süresi=7,7171	Hesaplama Süresi=69,8322
Model 2	$b_0 = 2,9847$	$b_0 = 3,0014$	$b_0 = 3,0063$
	$b_1 = 1,9987$	$b_1 = 1,9996$	$b_1 = 2,0001$
	$b_2 = 1,0012$	$b_2 = 1,0003$	$b_2 = 0,9999$

	$R^2 = 0,9986$ Hesaplama Süresi=5,5659	$R^2 = 0,9989$ Hesaplama Süresi=8,0185	$R^2 = 0,9988$ Hesaplama Süresi=113,6476
Model 3	$b_0 = 3,0675$	$b_0 = 2,9916$	$b_0 = 3,0019$
	$b_1 = 2,0005$	$b_1 = 1,9997$	$b_1 = 2,0001$
	$b_2 = 0,9992$	$b_2 = 1,0002$	$b_2 = 0,9999$
	$R^2 = 0,9984$	$R^2 = 0,9987$	$R^2 = 0,9988$
	Hesaplama Süresi=5,5381	Hesaplama Süresi=7,2969	Hesaplama Süresi=71,3415
Model 4	$b_0 = 2,7137$	$b_0 = 2,9785$	$b_0 = 3,1478$
	$b_1 = 2,0000$	$b_1 = 1,9994$	$b_1 = 1,9985$
	$b_2 = 1,0018$	$b_2 = 1,0005$	$b_2 = 0,9999$
	$R^2 = 0,9960$	$R^2 = 0,9988$	$R^2 = 0,9987$
	Hesaplama Süresi=5,5380	Hesaplama Süresi=6,6941	Hesaplama Süresi=22,7218



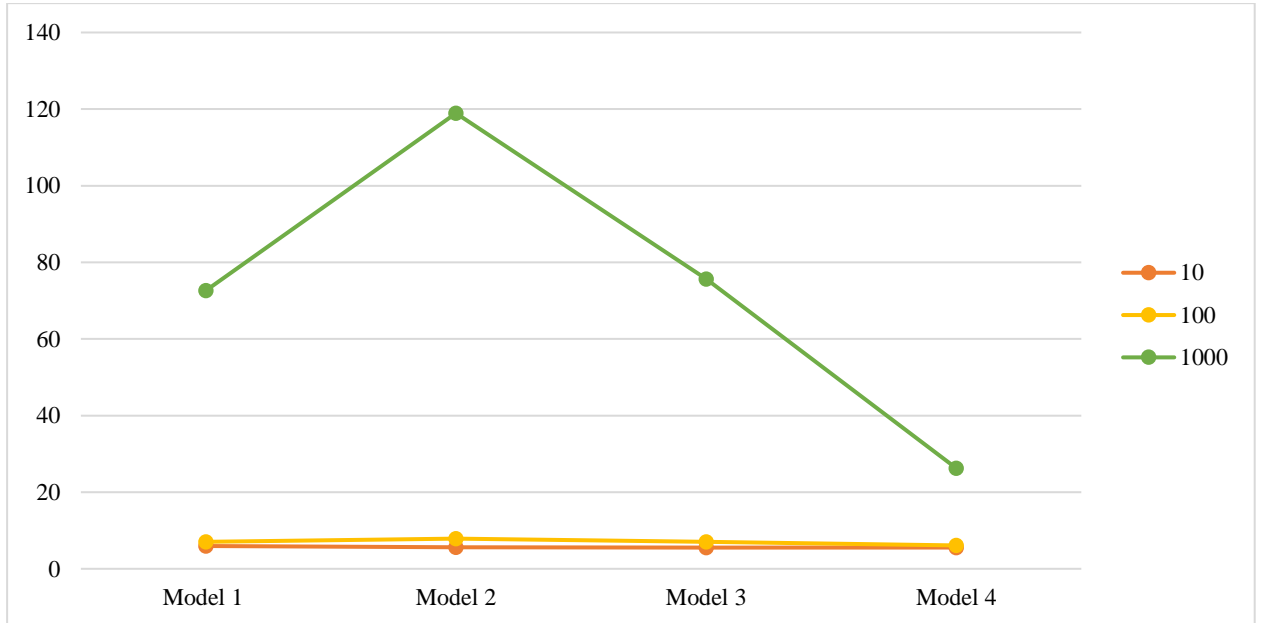
Şekil 2. İki değişkenli model yapıları için hesaplama süresi

Çizelge 4'te verilen üç değişkenli model yapıları incelendiğinde, belirleyicilik katsayısı ve parametre tahmin değerleri tüm model yapılarında birbirlerine yakın çıkmıştır. Hesaplama süreleri açısından örneklem büyüklüğü $n=10$, 100 , 1000 olduğu zaman en iyi performansı Model 4 göstermiştir. Örneklem büyüklüğü $n=10$ olduğu durumda modellere ait hesaplama süreleri birbirlerine yakın iken örneklem büyüklüğü arttıkça bu yakınlık farkı artmaya başlamıştır. Özellikle $n=1000$ örneklem büyüklüğünde Model 4'ün hesaplama süresi kendinden sonraki en iyi hesaplama süresine sahip diğer modelden yaklaşık olarak 2,77 kat daha hızlı olup büyük bir farklılık göstermiştir. Üç değişkenli modele ait hesaplama sürelerine ait grafik Şekil 3'te verilmiştir.

Çizelge 4. Üç değişkenli veri kümesi için parametre tahmini, açıklayıcılık katsayıları ve hesaplama süresi

$(B_0 = 4, B_1 = 3; B_2 = 2; B_3 = 1)$			
Model	$n = 10$	$n = 100$	$n = 1000$
Model 1	$b_0 = 4,0590$	$b_0 = 4,0916$	$b_0 = 4,0042$
	$b_1 = 3,0024$	$b_1 = 3,0005$	$b_1 = 3,0001$
	$b_2 = 1,9993$	$b_2 = 1,9992$	$b_2 = 1,9999$
	$b_3 = 0,9991$	$b_3 = 0,9999$	$b_3 = 1,0000$
	$R^2 = 0,9994$	$R^2 = 0,9996$	$R^2 = 0,9996$
	Hesaplama Süresi=5,9429	Hesaplama Süresi=7,0558	Hesaplama Süresi=72,6555

Model 2	$b_0 = 4,2379$	$b_0 = 3,9639$	$b_0 = 4,0053$
	$b_1 = 3,0010$	$b_1 = 3,0000$	$b_1 = 2,9998$
	$b_2 = 1,9994$	$b_2 = 1,9998$	$b_2 = 2,0001$
	$b_3 = 0,9988$	$b_3 = 1,0003$	$b_3 = 1,0000$
	$R^2 = 0,9996$	$R^2 = 0,9997$	$R^2 = 0,9996$
	Hesaplama Süresi=5,5848	Hesaplama Süresi=7,8741	Hesaplama Süresi=118,9213
Model 3	$b_0 = 4,1388$	$b_0 = 4,0157$	$b_0 = 3,9734$
	$b_1 = 2,9981$	$b_1 = 3,0002$	$b_1 = 3,0000$
	$b_2 = 1,9999$	$b_2 = 2,0002$	$b_2 = 2,0000$
	$b_3 = 1,0004$	$b_3 = 0,9997$	$b_3 = 1,0001$
	$R^2 = 0,9995$	$R^2 = 0,9996$	$R^2 = 0,9996$
	Hesaplama Süresi=5,5558	Hesaplama Süresi=7,0443	Hesaplama Süresi=75,6436
Model 4	$b_0 = 4,3402$	$b_0 = 3,8405$	$b_0 = 4,0035$
	$b_1 = 2,9972$	$b_1 = 2,9998$	$b_1 = 3,0002$
	$b_2 = 1,9990$	$b_2 = 1,9996$	$b_2 = 2,0001$
	$b_3 = 1,0005$	$b_3 = 1,0012$	$b_3 = 0,9998$
	$R^2 = 0,9997$	$R^2 = 0,9998$	$R^2 = 0,9996$
	Hesaplama Süresi=5,5465	Hesaplama Süresi=6,0968	Hesaplama Süresi=26,2545



Şekil 3. Üç değişkenli model yapıları için hesaplama süresi

Çizelge 5'te verilen beş değişkenli model yapıları incelendiğinde, belirleyicilik katsayısı ve parametre tahmin değerleri tüm model yapılarında birbirlerine yakın çıkmıştır. Hesaplama süreleri açısından örneklem büyüklüğü $n=10$ olduğu zaman en iyi performansı Model 3, $n=100$, 1000 olduğu zaman Model 4 göstermiştir. Örneklem büyüklüğü $n=10$ olduğu durumda modellere ait hesaplama süreleri birbirlerine yakın iken örneklem büyüklüğü arttıkça bu yakınlık farkı artmaya başlamıştır. Özellikle $n=1000$ örneklem büyüklüğünde Model 4'ün hesaplama süresi kendinden sonraki en iyi hesaplama süresine sahip diğer modelden yaklaşık olarak 2,41 kat daha hızlı olup büyük bir farklılık göstermiştir. Beş değişkenli modele ait hesaplama sürelerine ait grafik Şekil 4'te verilmiştir.

Çizelge 5. Beş değişkenli veri kümesi için parametre tahmini, açıklayıcılık katsayıları ve hesaplama süresi

$(B_0 = 6; B_1 = 5; B_2 = 4; B_3 = 3; B_4 = 2; B_5 = 1)$			
Model	$n = 10$	$n = 100$	$n = 1000$
Model 1	$b_0 = 6,1367$	$b_0 = 6,0156$	$b_0 = 6,0090$
	$b_1 = 4,9994$	$b_1 = 5,0000$	$b_1 = 4,9999$
	$b_2 = 4,0010$	$b_2 = 4,0002$	$b_2 = 4,0001$
	$b_3 = 2,9986$	$b_3 = 2,9997$	$b_3 = 2,9999$
	$b_4 = 2,0001$	$b_4 = 2,0002$	$b_4 = 2,0000$
	$b_5 = 1,0001$	$b_5 = 0,9999$	$b_5 = 1,0000$
	$R^2 = 0,9999$	$R^2 = 0,9999$	$R^2 = 0,9999$
	Hesaplama Süresi=5,5958	Hesaplama Süresi=7,5807	Hesaplama Süresi=77,1659
Model 2	$b_0 = 5,8639$	$b_0 = 5,9751$	$b_0 = 5,9703$
	$b_1 = 4,9987$	$b_1 = 5,0000$	$b_1 = 5,0000$
	$b_2 = 3,9992$	$b_2 = 4,0001$	$b_2 = 4,0000$
	$b_3 = 2,9975$	$b_3 = 3,0002$	$b_3 = 3,0001$
	$b_4 = 1,9994$	$b_4 = 1,9999$	$b_4 = 2,0001$
	$b_5 = 1,0035$	$b_5 = 1,0000$	$b_5 = 1,0000$
	$R^2 = 0,9999$	$R^2 = 0,9999$	$R^2 = 0,9999$
	Hesaplama Süresi=5,5538	Hesaplama Süresi=8,0252	Hesaplama Süresi=127,7422
Model 3	$b_0 = 6,0426$	$b_0 = 5,9756$	$b_0 = 6,0269$
	$b_1 = 5,0025$	$b_1 = 5,0000$	$b_1 = 4,9997$
	$b_2 = 4,0000$	$b_2 = 4,0002$	$b_2 = 3,9999$
	$b_3 = 2,9981$	$b_3 = 3,0000$	$b_3 = 3,0000$
	$b_4 = 2,0016$	$b_4 = 2,0000$	$b_4 = 2,0000$
	$b_5 = 0,9990$	$b_5 = 1,0000$	$b_5 = 1,0000$
	$R^2 = 0,9999$	$R^2 = 0,9999$	$R^2 = 0,9999$
	Hesaplama Süresi=5,5497	Hesaplama Süresi=7,4646	Hesaplama Süresi=77,6776
Model 4	$b_0 = 5,9598$	$b_0 = 6,0407$	$b_0 = 6,0375$
	$b_1 = 4,9997$	$b_1 = 4,9995$	$b_1 = 4,9999$
	$b_2 = 3,9994$	$b_2 = 3,9998$	$b_2 = 3,9999$
	$b_3 = 3,0001$	$b_3 = 2,9994$	$b_3 = 2,9997$
	$b_4 = 2,0002$	$b_4 = 2,0001$	$b_4 = 1,9999$
	$b_5 = 1,0003$	$b_5 = 1,0005$	$b_5 = 1,0002$
	$R^2 = 0,9999$	$R^2 = 0,9999$	$R^2 = 0,9999$
	Hesaplama Süresi=6,3072	Hesaplama Süresi=6,3648	Hesaplama Süresi=32,0031



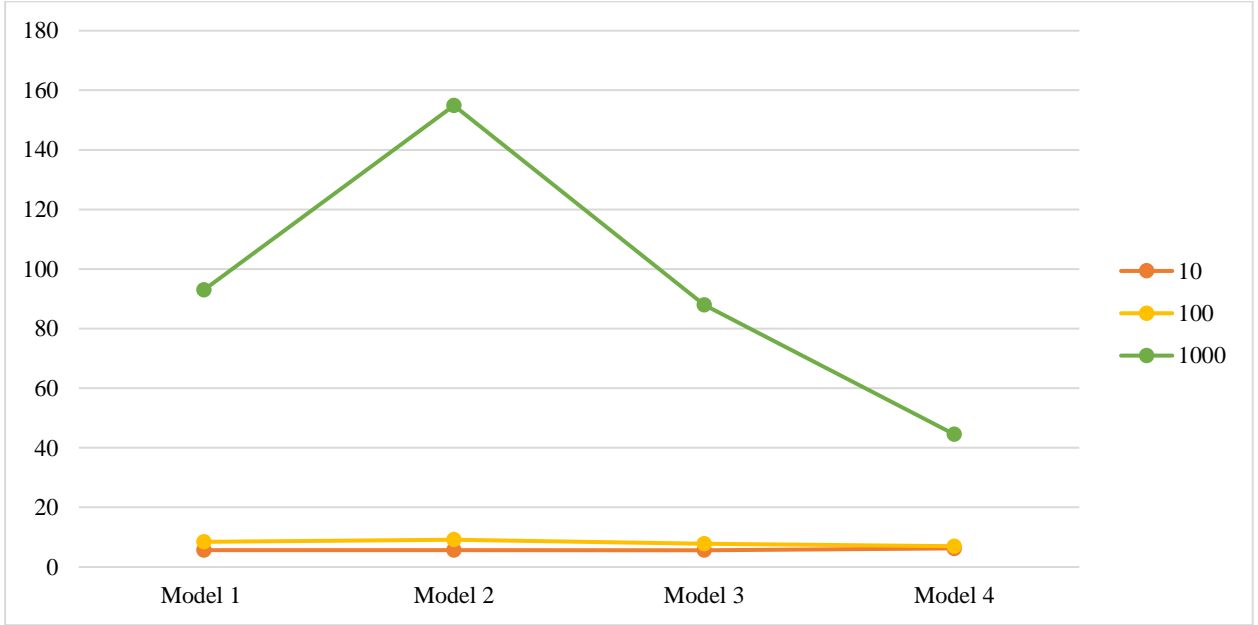
Şekil 4. Beş değişkenli model yapıları için hesaplama süresi

Çizelge 6’da verilen on değişkenli model yapıları incelendiğinde, belirleyicilik katsayısı ve parametre tahmin değerleri tüm model yapılarında birbirlerine yakın çıkmıştır. Sadece sabit terime ait katsayı değerleri $n=10$ örneklem büyüklüğüne sahip modellerde çok farklı çıkmıştır. Hesaplama süreleri açısından örneklem büyüklüğü $n=10$ olduğu zaman en iyi performansı Model 3, $n=100$, 1000 olduğu zaman Model 4 göstermiştir. Özellikle $n=1000$ örneklem büyüklüğünde Model 4’ün hesaplama süresi kendinden sonraki en iyi hesaplama süresi sahip diğer modelden yaklaşık olarak 1,97 kat daha hızlı olup büyük bir farklılık göstermiştir. On değişkenli modele ait hesaplama sürelerine ait grafik Şekil 5’te verilmiştir.

Çizelge 6. On değişkenli veri kümesi için parametre tahmini, açıklayıcılık katsayıları ve hesaplama süresi

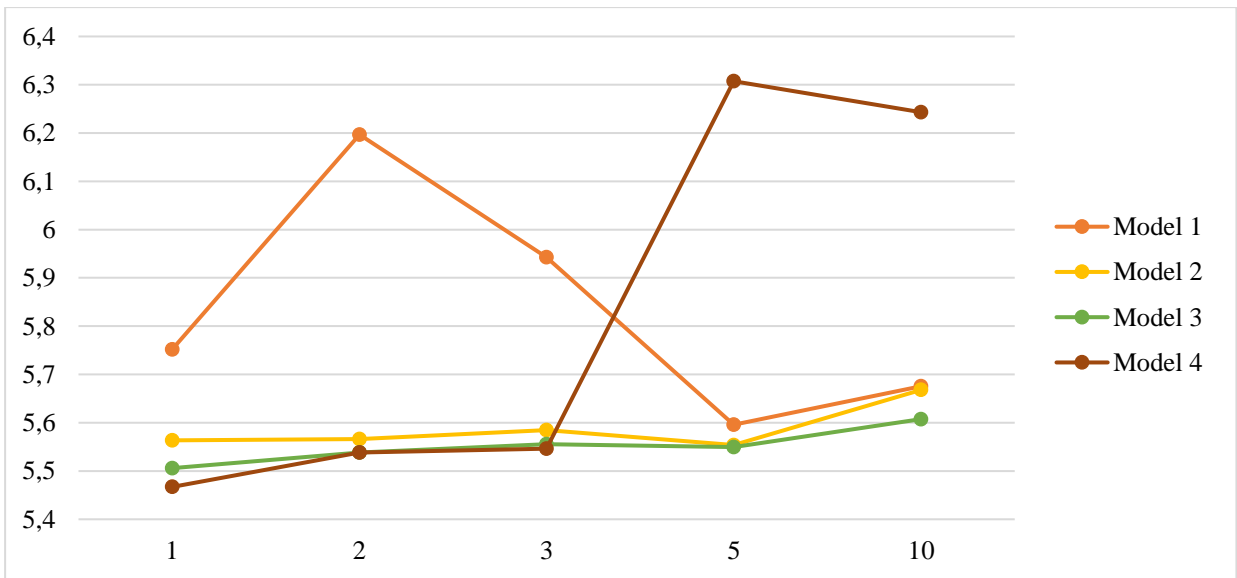
$(B_0 = 11; B_1 = 10; B_2 = 9; B_3 = 8; B_4 = 7; B_5 = 6; B_6 = 5; B_7 = 4; B_8 = 3; B_9 = 2; B_{10} = 1)$			
Model	$n = 10$	$n = 100$	$n = 1000$
Model 1	$b_0 = 172,9723$	$b_0 = 10,9550$	$b_0 = 11,0051$
	$b_1 = 10,2733$	$b_1 = 9,9998$	$b_1 = 9,9999$
	$b_2 = 9,1598$	$b_2 = 9,0000$	$b_2 = 8,9999$
	$b_3 = 7,8593$	$b_3 = 8,0003$	$b_3 = 7,9999$
	$b_4 = 7,0250$	$b_4 = 6,9998$	$b_4 = 7,0001$
	$b_5 = 6,0935$	$b_5 = 6,0001$	$b_5 = 6,0000$
	$b_6 = 5,0711$	$b_6 = 5,0002$	$b_6 = 5,0001$
	$b_7 = 3,9273$	$b_7 = 4,0001$	$b_7 = 4,0000$
	$b_8 = 2,6773$	$b_8 = 2,9999$	$b_8 = 3,0001$
	$b_9 = 1,8393$	$b_9 = 1,9997$	$b_9 = 2,0000$
	$b_{10} = 1,0218$	$b_{10} = 1,0002$	$b_{10} = 0,9999$
	$R^2 = 0,9999$	$R^2 = 0,9999$	$R^2 = 0,9999$
Hesaplama Süresi=5,6753	Hesaplama Süresi=8,4415	Hesaplama Süresi=93,0474	
Model 2	$b_0 = 154,3132$	$b_0 = 10,9081$	$b_0 = 11,0232$
	$b_1 = 10,1359$	$b_1 = 9,9997$	$b_1 = 9,9998$
	$b_2 = 9,1690$	$b_2 = 8,9999$	$b_2 = 9,0000$
	$b_3 = 8,0496$	$b_3 = 8,0000$	$b_3 = 8,0001$
	$b_4 = 7,0271$	$b_4 = 6,9998$	$b_4 = 7,0001$
	$b_5 = 5,9985$	$b_5 = 6,0000$	$b_5 = 6,0000$
	$b_6 = 5,0257$	$b_6 = 4,9996$	$b_6 = 5,0000$
	$b_7 = 3,9901$	$b_7 = 4,0004$	$b_7 = 4,0000$
	$b_8 = 2,6650$	$b_8 = 3,0001$	$b_8 = 2,9999$
	$b_9 = 1,8349$	$b_9 = 2,0002$	$b_9 = 1,9999$
	$b_{10} = 1,0537$	$b_{10} = 1,0001$	$b_{10} = 1,0001$
	$R^2 = 0,9999$	$R^2 = 0,9999$	$R^2 = 0,9999$
Hesaplama Süresi=5,6679	Hesaplama Süresi=9,1513	Hesaplama Süresi=154,8841	
Model 3	$b_0 = 142,0238$	$b_0 = 11,0256$	$b_0 = 11,0217$
	$b_1 = 10,4050$	$b_1 = 10,0003$	$b_1 = 9,9999$
	$b_2 = 9,0898$	$b_2 = 9,0002$	$b_2 = 8,9999$
	$b_3 = 7,9351$	$b_3 = 7,9996$	$b_3 = 7,9999$
	$b_4 = 7,1129$	$b_4 = 7,0003$	$b_4 = 7,0001$
	$b_5 = 6,0637$	$b_5 = 6,0002$	$b_5 = 6,0000$
	$b_6 = 5,0449$	$b_6 = 4,9998$	$b_6 = 4,9999$
	$b_7 = 4,0265$	$b_7 = 4,0000$	$b_7 = 3,9999$
	$b_8 = 2,6865$	$b_8 = 3,0001$	$b_8 = 3,0000$
	$b_9 = 1,7631$	$b_9 = 1,9998$	$b_9 = 2,0001$
	$b_{10} = 1,0281$	$b_{10} = 1,0000$	$b_{10} = 1,0001$
	$R^2 = 0,9999$	$R^2 = 0,9999$	$R^2 = 0,9999$
Hesaplama Süresi=5,6074	Hesaplama Süresi=7,7538	Hesaplama Süresi=87,9371	
Model 4	$b_0 = 166,1652$	$b_0 = 11,0749$	$b_0 = 11,0034$
	$b_1 = 10,0849$	$b_1 = 10,0008$	$b_1 = 10,0004$
	$b_2 = 9,1210$	$b_2 = 9,0004$	$b_2 = 8,9997$
	$b_3 = 7,9861$	$b_3 = 7,9991$	$b_3 = 8,0001$

	$b_4 = 7,1162$	$b_4 = 7,0006$	$b_4 = 7,0004$
	$b_5 = 6,0022$	$b_5 = 6,0001$	$b_5 = 6,0002$
	$b_6 = 5,0820$	$b_6 = 5,0003$	$b_6 = 4,9998$
	$b_7 = 3,9281$	$b_7 = 4,0002$	$b_7 = 3,9995$
	$b_8 = 2,7599$	$b_8 = 3,0001$	$b_8 = 3,0000$
	$b_9 = 1,8266$	$b_9 = 2,0000$	$b_9 = 2,0002$
	$b_{10} = 0,9749$	$b_{10} = 0,9993$	$b_{10} = 0,9999$
	$R^2 = 0,9999$	$R^2 = 0,9999$	$R^2 = 0,9999$
	Hesaplama Süresi=6,2431	Hesaplama Süresi=6,9802	Hesaplama Süresi=44,5412



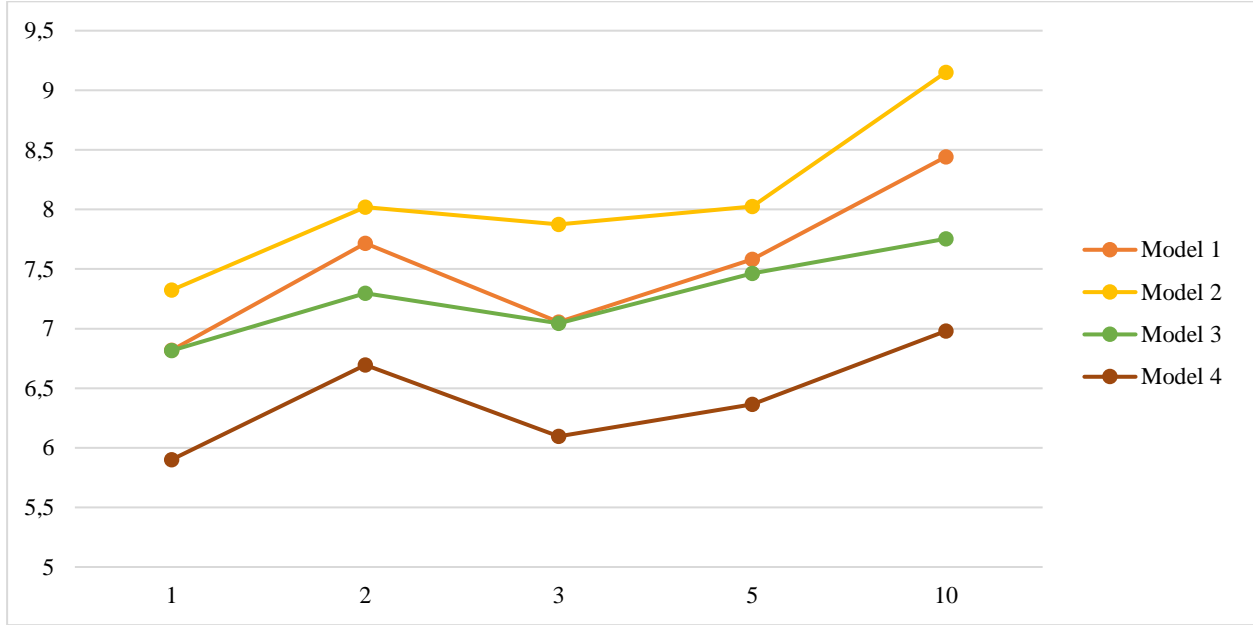
Şekil 5. On değişkenli model yapıları için hesaplama süresi

Her bir örneklem büyüklüğü açısından, farklı değişken sayılarındaki veri kümelerine ilişkin hesaplama sürelerine ait değişimi gösteren grafikler ise Şekil 6, Şekil 7 ve Şekil 8’de verilmiştir.



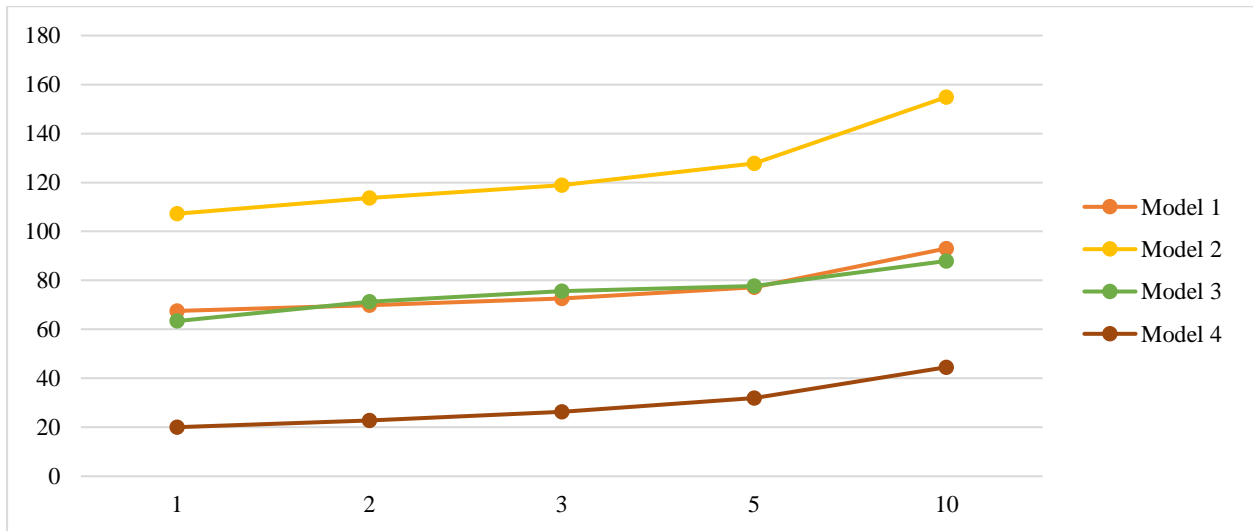
Şekil 6. $n=10$ için değişken sayılarına ilişkin hesaplama süresi

Şekil 6’da verilen $n=10$ örneklem büyüklüğüne sahip olan veri kümelerinde Model 4, değişken sayısı az iken en iyi hesaplama sürelerinden birine sahip iken değişken sayısı arttıkça bu özelliğini kaybetmeye başlamaktadır. Buna karşın Model 1’de ise değişken sayısı az iken en kötü hesaplama süresi performansına sahip model iken değişken sayısı arttıkça daha iyi bir hesaplama süresi performansı özelliği kazanmaya başlamış fakat hesaplama süresi en iyi model olamamıştır.



Şekil 7. $n=100$ için değişken sayılarına ilişkin hesaplama süresi

Şekil 7’de verilen $n=100$ örneklem büyüklüğüne sahip olan veri kümelerinde, değişken sayısının üç olduğu durum hariç değişken sayısı arttıkça modellerin hesaplama sürelerinde orantılı bir şekilde artmaya başlamıştır. Değişken sayısı üç olduğunda tüm modellerin hesaplama sürelerinde bir azalış meydana gelse de artan değişken sayısı ile bu modellere ait hesaplama süreleri de artmaya başlamıştır. Model 4 ele alınan tüm değişken sayılarında en iyi hesaplama süresine sahip iken Model 2 ise en kötü hesaplama süresine sahip modeller olmuşlardır.



Şekil 8. $n=1000$ için değişken sayılarına ilişkin hesaplama süresi

Şekil 8’de verilen $n=1000$ örneklem büyüklüğüne sahip olan veri kümelerinde değişken sayısı arttıkça modellerin hesaplama sürelerinde orantılı bir şekilde artmaya başlamıştır. Model 4 ele alınan tüm değişken sayılarında en iyi hesaplama süresine sahip iken Model 2 ise en kötü hesaplama sayısına sahip modeller olmuşlardır. Ayrıca Model 1 ve Model 3’e ait hesaplama süreleri, farklı değişken sayılarında birbirlerine karşı üstünlük kurmuşlardır.

4. TARTIŞMA

Doğrusal ve doğrusal olmayan regresyon modellerde parametreleri tahmin etmek için kullanılan L_p normunun özel bir hali olan L_1 normu ve L_∞ norm modelleri ile elde edilen sonuçlar açıklayıcılık katsayısı açısından incelendiğinde, örneklem büyüklüğü ve değişken sayısı ne olursa olsun açıklayıcılık katsayısı tüm modellerde neredeyse aynı çıkmıştır. Parametre tahmin değerleri açısından incelendiğinde, küçük örneklem büyüklüklerinde sahip veri kümelerinde değişken sayısı arttıkça sabit terime ait katsayının tahminde farklılıklar oluşmaktadır. Buna rağmen, örneklem büyüklüğü büyüdükçe sabit terime ait parametre, tahmin edilmek istenen değere yakınlaşmaktadır. Belirleyicilik katsayısı ise tüm model yapılarında birbirlerine yakın çıkmıştır. Bu çalışmada öne çıkan modellerin hesaplama süresi açısı incelendiğinde, genel olarak en iyi hesaplama süresi sahip olan Model 4’ün, küçük örneklem büyüklüğüne sahip veri kümelerinde değişken sayısı arttıkça bu özelliğini kaybettiği görülmüştür. Ayrıca çalışmada ele alınan ve Model 4’ün hesaplama süresinde ön plana çıktığı $n=1000$ örneklem büyüklüğüne sahip veri kümelerinde değişken sayısı arttıkça, Model 4’ten sonra gelen en iyi hesaplama süresine sahip modellere karşı avantajının bir miktar azaldığı görülse de ele alınan tüm değişken sayılarında en iyi hesaplama süresine sahip olan modeldir.

ÇIKAR ÇATIŞMASI/ÇAKIŞMASI BİLDİRİMİ

Yazarlar arasında çıkar çatışması/çakışması bulunmamaktadır.

KAYNAKLAR

- [1] Gonin, R. and Money, A. H. (1989). Nonlinear L_p -norm estimation. *Marcel Dekker, Inc.*, 1-154.
- [2] Charnes, A., Cooper, W. W., and Ferguson, R. O. (1955). Optimal estimation of executive compensation by linear programming. *Management science*, 1(2), 138-151.
- [3] Wagner, H. M. (1959). Linear programming techniques for regression analysis. *Journal of the American Statistical Association*, 54(285), 206-212.
- [4] Osborne, M. R. and Watson, G. A. (1969). An algorithm for minimax approximation in the nonlinear case. *The Computer Journal*, 12(1), 63-68.
- [5] Anderson, D. H. and Osborne, M. R. (1977). Discrete, nonlinear approximation problems in polyhedral norms. *Numerische Mathematik*, 28(2), 157-170.
- [6] Barrodale, I. and Phillips, C. (1975). Solution of an overdetermined system of linear equations in the Chebychev norm. *ACM Transactions on Mathematical Software*, 1(3), 264-270.
- [7] Armstrong, R. D., Frome, E. L. and Kung, D. S. (1979). A revised simplex algorithm for the absolute deviation curve fitting problem. *Communications in Statistics-Simulation and Computation*, 8(2), 175-190.
- [8] Murray, W. and Overton, M. L. (1980). A projected Lagrangian algorithm for nonlinear minimax optimization. *SIAM Journal on Scientific and Statistical Computing*, 1(3), 345-370.
- [9] Overton, M. (1982). Algorithms for nonlinear L_1 and L_∞ fitting. In *Nonlinear optimization*, Academic Press, 91-102.
- [10] Dielman, T. E. (1986). A comparison of forecasts from least absolute value and least squares regression. *Journal of Forecasting*, 5(3), 189-195.
- [11] Gentle, J.E., Narula, S.C., and Sposito, V.A. (1987). Algorithms for unconstrained L_1 linear regression. In: *Dodge, Y. (Ed.), Statistical Data Analysis Based on the L_1 - Norm and Related Methods*, 83-94.
- [12] Narula, S. C., Sposito, V. A., and Gentle, J. E. (1991). Comparison of computer programs for simple linear L_1 regression. *Journal of Statistical Computation and Simulation*, 39(1-2), 63-68.
- [13] Soliman, S. A., Christensen, G. S., and Rouhi, A. (1988). A new technique for curve fitting based on minimum absolute deviations. *Computational Statistics and Data Analysis*, 6(4), 341-351.
- [14] Seneta, E. and Steiger, W. L. (1984). A new LAD curve-fitting algorithm: slightly overdetermined equation systems in L_1 . *Discrete Applied Mathematics*, 7(1), 79-91.

- [15] Narula, S. C. and Wellington, J. F. (1988). An efficient algorithm for the MSAE and the MMAE regression problems. *SIAM Journal on Scientific and Statistical Computing*, 9(4), 717-727.
- [16] Dielman, T. E. and Rose, E. L. (1994). Forecasting in least absolute value regression with autocorrelated errors: a small-sample study. *International Journal of Forecasting*, 10(4), 539-547.
- [17] Hong, C. S. and Choi, H. J. (1997). On L1 regression coefficients. *Communications in Statistics-Simulation and Computation*, 26(2), 531-537.
- [18] Portnoy, S. and Koenker, R. (1997). The Gaussian hare and the Laplacian tortoise: computability of squared-error versus absolute-error estimators. *Statistical Science*, 12(4), 279-300.
- [19] Weisberg, S. (2005). *Applied Linear Regression*. Wiley, 284-286.

Nörodejeneratif Hastalıkların Ca²⁺ Homeostazisi ile İlişkisi ve Ca²⁺ Homeostazisinin Düzenlenmesini Hedef Alan Doğal BileşenlerSahra Setenay Baran^{1*} , Belma Aslım² ¹Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye²Gazi Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 06500, Ankara, Türkiye**Öne Çıkanlar**

- Ca²⁺ homeostazisinin nörodejeneratif hastalıklar üzerindeki etkisi
- Ca²⁺ kanal blokerlerinin nörodejeneratif hastalıkların tedavisindeki potansiyeli
- Ca²⁺ kanal blokerlerinin olarak doğal bileşenlerin nörodejeneratif hastalıklarındaki rolü

Makale BilgileriGeliş: 05/11/2020
Kabul: 05/12/2020**Anahtar Kelimeler**Nörodejeneratif
Hastalıklar,
Kalsiyum Homeostazisi,
Kalsiyum Kanal
Bloklerleri**Özet**

Nörodejeneratif bozukluklar sinir sisteminin yapısal ve fonksiyonel işlevsizliği sonucu ortaya çıkan hastalıklardır. Bu hastalıklarda kabul gören başlıca birkaç tedavi edici yaklaşım olmasına karşın, bu yaklaşımlar patolojik süreçler üzerinde etkili olamamakta ve palyatif olarak uygulanmaktadır. Bu sebepten nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde etkin olabilecek yeni bileşiklerin arayışı sürmektedir. İkinci bir haberci olarak hareket eden kalsiyum (Ca²⁺), birçok biyolojik aktivite için gerekli olduğu gibi nöronal aktivite için de gereklidir. Hücre içi Ca²⁺ homeostazisinin hipertansiyon ve kardiyovasküler hastalıklardaki önemli rolü uzun zamandır bilinmektedir. Ca²⁺ kanal blokerleri, Ca²⁺ akışını azaltması nedeniyle hipertansiyon ve kardiyovasküler hastalıkların tedavileri için reçete edilmektedir. Hücre içi Ca²⁺ homeostazisindeki bozulmaların, Alzheimer ve Parkinson gibi nörodejeneratif hastalıkların patofizyolojisinde de merkezi bir role sahip olduğu düşünülmektedir. Bu sebepten, Ca²⁺ kanal blokerlerinin nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde de etkin olabileceğine inanılmaktadır. Bu derlemede, nörodejeneratif hastalıkların metabolizması ile Ca²⁺ homeostazisinin düzensizliği arasındaki ilişkinin incelenmesi ve Ca²⁺ homeostazisinin modülasyonu yoluyla nörodejeneratif hastalıklarda terapötik etkiler yaratabilecek doğal bileşiklerin ortaya konulması hedeflenmiştir. Bu bileşiklerin ilaç adayı olabilme potansiyellerinin irdelenmesi, nörodejenerasyonun önlenmesi ve Ca²⁺ homeostazisi bozukluklarının moleküler mekanizmaları açısından önemli bir adımı temsil etmektedir.

The Relation of Neurodegenerative Diseases with Ca²⁺ Homeostasis and New Natural Component Targetting Regulation of Ca²⁺ Homeostasis**Highlights**

- Effect of Ca²⁺ homeostasis on neurodegenerative diseases
- Potential of Ca²⁺ channel blockers in the treatment of neurodegenerative diseases
- Role of natural compounds as a Ca²⁺ channel blockers in neurodegenerative diseases

Article InfoReceived: 05/11/2020
Accepted: 05/11/2020**Keywords**Neurodegenerative
Diseases,
Calcium Homeostasis,
Calcium Channel
Blockers**Abstract**

Neurodegenerative disorders are results of structural and functional dysfunction of the nervous system. Although there are several therapeutic approaches for these diseases, these approaches cannot be effective in pathological processes and are applied only palliative. For this reason, new compounds for neurodegenerative diseases are crucial. Calcium (Ca²⁺) which acts as a second messenger, is required for neuronal activity as well as for many biological activities. The pivotal role of Ca²⁺ homeostasis has long been recognized in hypertension and cardiovascular disease. Ca²⁺ channel blockers have been commonly prescribed for treatment of the hypertension and cardiovascular diseases because of their mechanism of action due to reducing the influx of Ca²⁺. Disruptions in the intracellular Ca²⁺ homeostasis play a central role in the pathophysiology of neurodegenerative diseases such as Alzheimer and Parkinson. Channel blockers may be effective in neurodegenerative diseases. In this review, we aimed to review the relationship between the metabolism of neurodegenerative diseases and Ca²⁺ dyshomeostasis and to reveal natural compounds, which have therapeutic effects in neurodegenerative diseases, with modulation of Ca²⁺ homeostasis. Evolution of their potentials for drug candidates represents an important step for the prevention of neurodegeneration and for molecular mechanisms of Ca²⁺ homeostasis disorders.



1. GİRİŞ

Alzheimer hastalığı (AH), Parkinson hastalığı (PH) ve Amyotrofik Lateral Skleroz (ALS) sinir sisteminin yapısal ve fonksiyonel işlevsizliği sonucu nöronların kaybına neden olan nörodejeneratif hastalıklar olarak nitelendirilmektedir [1]. AH amiloid plak birikmesi ve hiperfosforile olmuş nörofibriler yumakların agregasyonu, PH hiperfosforile α -sinüklein'den oluşan Lewy cisimciği, ALS ise ubikuitine proteinlerinin birikimi sonucu nöronların dejenerasyonu ile karakterize edilmektedir [2, 3]. Bu nörodejeneratif hastalıklarda kabul gören tedaviler ise asetilkolinesteraz (AChE), monoamine oxidase-B, catechol-O-methyltransferase inhibitörleri, N-metil-D-aspartat (NMDA) ve dopamin antagonistleridir [4, 5]. Fakat bu tedavilerin birincil patolojik süreçleri değiştirdiğine dair net bir kanıt bulunmamakta ve bu yaklaşımlara yönelik mevcut ilaçlar palyatif tedavi olarak uygulanmaktadır. Ayrıca, bu ilaçların uzun vadedeki etkinlikleri ve güvenilirlikleri de belirsizliğini korumaktadır. Güncel terapötik yaklaşımların tedavi sağlayamaması ve giderek daha da artacak olan bu hastalıklardaki morbidite ve mortalite oranları [6–8], nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde etkin olan yeni yaklaşımları önemli kılmaktadır.

AH, PH ve ALS her ne kadar klinik olarak farklı patofizyolojik özelliklere ve farklı tedavi edici yaklaşımlara sahip olsalar da aslında hastalık süreci başlatıldıktan sonra nörodejenerasyona sebep olan hücrel moleküler mekanizmalarda oksidatif stres, plak veya protein agregasyonu ve nöroinflamasyon gibi bazı ortak noktaları paylaşmaktadırlar [9]. Nörodejenerasyonda en önemli mekanizmalardan bir tanesi oksidatif strestir. Oksidatif stresle indüklenen hücre ölümünün altında yatan hücrel ve moleküler mekanizmalarda hücre içi aşırı Ca^{+2} birikiminin de rol oynadığı bilinmektedir [10]. Anormal seviyede hücre içi Ca^{+2} 'nin birikimi, proteazları aktive ederek, kaspaz aktivasyonuna yol açan sinyalleri artırarak veya lipazlar ve nükleazların aracılık ettiği diğer katabolik süreçleri tetikleyerek hücre ölümüne neden olabilmektedir [11]. Bu sebepten dolayı, Ca^{+2} kanal blokerleri nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde etkin olabilecek yeni bir yaklaşım olarak görülmektedir [6, 12, 13]. Bu derlemede de Ca^{+2} hemeostazisindeki bozuklukların nörodejeneratif hastalıklardaki rolü ortaya konularak, Ca^{+2} kanal blokerlerinin bu nörodejeneratif hastalıklarda nasıl etkin olabileceğinin gösterilmesi hedeflenmiştir. Ca^{+2} kanal bloker özelliğindeki mevcut ilaçların nörodejeneratif hastalıklar üzerindeki etkisine dair kısıtlı da olsa klinik çalışmalar sürdürülmesine rağmen bu çalışmalarda kullanılan etken maddelerin hiçbiri biyolojik kaynaklı değildir. Hatta doğal bileşiklerin Ca^{+2} kanal bloker etkinliği çoğunlukla nörodejeneratif hastalıklardan farklı alanlarda araştırılmıştır. Bu nedenle bu derlemede nörodejeneratif hastalıklarda Ca^{+2} kanal blokeri olarak ilaç adayı olabilecek doğal bileşiklere ve bu bileşiklerin Ca^{+2} hemeostazisi dışındaki nörodejeneratif yollar üzerindeki etkisine yer verilmiştir. Dolayısıyla bu makale, hem nörodejeneratif hastalıklarda etkili olabilecek yeni doğal bileşiklerin belirlenmesi açısından hem de bu hastalıklara yönelik çok yönlü ilaç seçim stratejileri açısından önemli olup, Ca^{+2} kanal bloker özelliğindeki yeni ve daha etkin ilaç adaylarının ortaya çıkmasına katkıda bulunabilecektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Ca^{+2} Homeostazisindeki Bozulmanın Neden Olduğu Başlıca Hastalıklar

Ca^{+2} homeostazisindeki bozulmalar, sayısız kronik ve patolojik koşulun oluşmasına ve ilerlemesine neden olmaktadır. Ca^{+2} homeostazisindeki bozulmaların Timothy ve Brugada sendromları başta olmak üzere [14] olumsuz kardiyovasküler ve gastrointestinal etkilere sebep olduğuna ve böbrek taş oluşum riskini arttırdığına dair güçlü kanıtlar bulunmaktadır [15]. Ca^{+2} hemeostazisindeki bozulmalar çeçe sineği ile bulaşan Trypanosoma parazitlerinin neden olduğu uyku hastalığında da görülmektedir [16]. Ayrıca, Ca^{+2} homeostazisindeki bozulmaların bazı metabolik hastalıklara ve immün bozukluklara da neden olduğu düşünülmektedir [17]. Aynı zamanda pek çok kanserin yapısında ve ilerlemesinde [18], akut pankreatit, kontraktür [19, 20] ve patolojik ağrı formlarının [21] oluşumunda da rol aldığı bilinmektedir.

2.2. Ca^{+2} Homeostazisinin Bozulması

Ca^{+2} , iskelet mineralizasyonu, kas kasılması, sinir impuls iletimi, kan pıhtılaşması ve hormon salgısı gibi birçok hücrel fizyolojik süreci kontrol eden [22], ancak toksik hale de gelebilen, hücre

yaşlanmasına ve ölümüne neden olabilen bir hücre içi habercidir [23]. Ca^{+2} homeostazisi, enerji bağımlı pompalar, plazma membranlarında ve organellerde bulunan reseptör ve kanallar ile Ca^{+2} bağlayıcı proteinler arasındaki etkileşim sayesinde korunmaktadır [19]. Fakat kalıtsal bozukluklara ve mutasyona uğramış genler tarafından kodlanan sorunlu kanalların, Ca^{+2} homeostazisini bozduğu bilinmektedir [23–26]. Bunun dışında bazı toksinler [19] ve dolayısıyla oluşan oksidatif stres ve reaktif oksijen türleri (ROS)'nin üretimi hücre dışı ortamından, endoplazmik retikulum (ER) veya sarkoplazmik retikulumdan hücre sitoplazmasına Ca^{+2} akışına neden olmaktadır [27]. Hücre içindeki Ca^{+2} iyon konsantrasyonundaki aşırı artış solunum zincirini geriye dönüşümsüz olarak bloke etmekte, önce mitokondriyal fosfolipazları, ardından sitoplazmik fosfolipazları, proteazları ve endonükleazları aktifleştirerek, sinyal iletim yollarını modülasyonuna neden olmakta ve tüm bu sebeplerden dolayı hücre ölümüne yol açabilmektedir [27, 28].

2.3. Ca^{+2} Homeostazisindeki Bozulmalara Bağlı Nöral Hasar Oluşumu

Ca^{+2} , merkezi sinir sistemindeki sayısız elektrokimyasal sinyalleşme kaskadlarında, hücre içi haberci olarak rol oynamaktadır [29]. Bu yüzden hücre içi Ca^{+2} sinyalini düzenleyen mekanizmaların sürekli bozulması, nöronların işleyişindeki olumsuz değişikliklere neden olmaktadır [30]. Öyle ki, son yıllarda nörodejeneratif hastalıklardaki ilerleme, Ca^{+2} homeostazisinin kanal alt birimlerinin (*Çizelge 1*) bozulması ile ilişkilendirilmektedir [29–33]. Hatta Steinlein ve arkadaşları (2014) tarafından yayınlanan makalede Ca^{+2} homeostazisinin bozulmasının nörolojik rahatsızlıkların birincil nedeni olabileceğini gösteren çok sayıda örneğe yer verilmiştir [26]. Ca^{+2} homeostazisinin bozulması ile ilişkili olduğu düşünülen nörodejeneratif hastalıklardan biri de AH'dir. ROS kaynaklı oksidatif stresin, Ca^{+2} salınımının ve mitokondriyal membran geçirgenliğini artırarak, mitokondri kaynaklı apoptoza olanak sağladığı ve kaspazları aktive ederek, nöral apoptoza neden olduğu da düşünülmektedir [34]. Ayrıca, hücre sitoplazmasındaki aşırı Ca^{+2} , tau proteinin hiperfosforilasyonuna neden olabilen GSK3β'nin protein fosfataz'ın aktivasyonu ve Akt aracılı mitokondriyal yollar ile defosforile edilmesine ve nörofibril yumak oluşumuna neden olmaktadır [35, 36]. AH'nin patofizyolojik göstergelerinden biri olan, ER ve plazma zarında gerçekleşen amilod beta ($A\beta$) oluşumu ise, var olan Ca^{+2} kanallarının aktivitesinin modülasyonuna [32] ve yeni Ca^{+2} geçirgen kanalların oluşumuna neden olmaktadır. Oluşan $A\beta$ 'nin Fe^{+2} ve Cu^{+2} ile etkileşime girerek lipid peroksidasyonuna yol açtığı ve lipid peroksidasyonu sonucu oluşan 4-hidroksinonenal'in kovalent modifikasyonlar ile Ca^{+2} kanallarını bozabildiği de bilinmektedir [37]. Ayrıca, ER'de bulunan presenilin proteinleri de Ca^{+2} 'yi hücre sitoplazmasına sızdırabilmekte veya etkinliklerini arttırmak için farklı Ca^{+2} reseptörleri ile etkileşime girebilmektedir [31]. Ca^{+2} homeostazisindeki değişiklik, başka bir nörodejeneratif bozukluk olan PH ile de bağlantılıdır. PH'nin patolojik mekanizmasında rol alan birçok gen ve proteinin Ca^{+2} homeostazisi ile de ilişkili olduğu bilinmektedir [38]. Ca^{+2} homeostazisindeki bozulmalar PH oluşumunu ve ilerlemesini tetikleyebilir. Diğer bir yandan dopamin tükenmesi ile gözlenen striatal nöronlarda omurga kaybının, azalmış striatal dopaminerjiklerinin neden olduğunun bazı L tipi Ca^{+2} kanallarının disinhibisyonu ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir [39]. ALS'de de aktif mikroglialar tarafından indüklenen inflamatuvar hasarın, membranlarda Ca^{+2} geçirgen kanalların oluşumuna yol açtığı bilinmektedir [32]. Epilepside ise Ca^{+2} homeostazisindeki bozuklukların çeşitli yollar ile astrosit indüksiyonu sonucu nöbet oluşumu ve doku transglutaminaz aracılı hücre ölümüne neden olabileceği düşünülmektedir [14].

Çizelge 1. Voltaj-bağımlı Ca^{+2} kanal tipleri ve ilişkili olduğu nörodejeneratif hastalıklar [40]

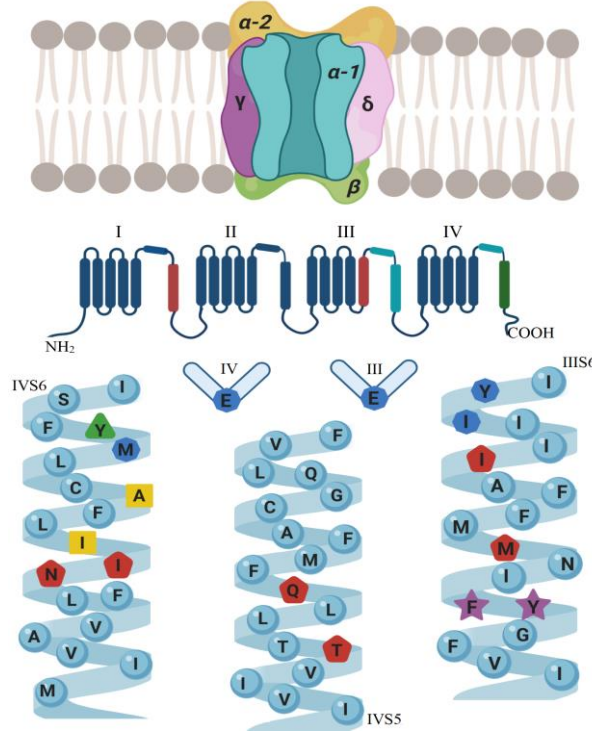
	Kanal Tipleri	Görevi	İlişkilendirildiği Nörodejeneratif Hastalıklar
Yüksek Voltaj ile Aktive Olan Kanallar	L-Type	Elektrik Sinyallerinin Aktarımı ve Uyarım	AH, PD, HD, ALS
	N-Type	Transmitter ve Hormon Salınımı.	AH, ALS
	P/Q-Type	Transmitter ve Hormon Salınımı.	AH, ALS
Düşük Voltaj ile Aktive Olan Kanallar	T-Type	Pacemaker Aktivite	AH, PD, ALS

2.4. Ca²⁺ Homeostazisini Hedef Alan Mevcut İlaçlar

Ca²⁺ homeostazisinin korunması özellikle nörodejeneratif hastalıklar için çok önemlidir. Ca²⁺ kanal blokerlerinin, plazma membranından aşırı kalsiyum akışını tamponlayarak bazı hasarların oluşumunu önleyebileceği bildirilmiştir [41]. Ca²⁺ kanal blokerleri, öncelikle hipertansiyon, anjina pectoris ve aritmiler gibi kardiyovasküler bozuklukların tedavisi için kullanılan bir grup ilaçtır. Günümüzde klinik kullanım için onay almış Ca²⁺ kanal blokerleri farklı kimyasal yapılara sahiptir. Voltaj-bağımlı Ca²⁺ kanallarını hedef alan bu ilaçlar kimyasal yapılarındaki farklılıklar açısından başlıca nifedipin, nimoldipin, nikardipin gibi dihidropiridinler; diltiazem gibi benzotiyazepinler; verapamil gibi fenilakilaminler olmak üzere üç alt grupta değerlendirilmektedirler [33].

2.4.1. Ca²⁺ kanal blokerlerinin etki mekanizması

Voltaj-bağımlı Ca²⁺ kanalları, açıldığında Ca²⁺'nin geçebileceği transmembran yapıdaki iletken $\alpha 1$ alt birimi ve $\alpha 1$ alt birimin düzenlenmesinde rol alan yardımcı alt birimlerden (β , γ , $\alpha 2$ ve δ) oluşmaktadır. $\alpha 1$ her biri altı transmembran segmenti (S1-S6) ve bir gözenek bölgesi (S5-S6 segmentleri arasında) içeren dört homolog alana (I-IV) sahiptir. Ca²⁺ kanal blokerlerinin her üçü de $\alpha 1$ alt birimini hedef almasına rağmen, bağlandıkları bölgeler ve amino asitler açısından bazı farklılıklar göstermektedir. Şekil 1'de de gösterildiği gibi dihidropiridinler (beşgen), tercihen açık durumundaki kanalların bitişik S6 ve S5 segmentlerindeki amino asitler tarafından oluşturulmuş bir bölgeye bağlanmaktadır. Fenilakilaminler (yıldız), $\alpha 1$ alt biriminin III ve IV alanlarında S6 segmentlerindeki amino asitlere bağlanmaktadır ve açık durumundaki kanalları tercih etmektedir. Benzotiyazepinler ise IIIS6 ve IVS6 segmentlerinde bulunan amino asitler ile etkileşime girmektedir (yalnızca benzotiyazepinlerin bağlandığı bir alan bulunmamaktadır). Bu $\alpha 1$ amino asitlerden bazılarında ise birden çok Ca²⁺ kanal blokerleri bağlanabilir fakat bunlar birbiri ile yarışmazlar (kare, sekizgen ve üçgen) [42, 43].



Şekil 1. Ca²⁺ kanallarının yapısı ve blokerlerle etkileşime giren amino asitleri. Beşgen dihidropiridinlerin, yıldız ise fenilakilaminlerin bağlanma alanını temsil etmektedir. Kare ile gösterilen bölgeler fenilakilaminler ve benzotiyazepinler için, sekizgen ile gösterilen dihidropiridinler ve fenilakilaminler için, üçgen ile gösterilen ise her üçü içinde bağlanma bölgesidir [41 ve 42'den uyarlanmıştır]

Bu etki mekanizmaları sayesinde Ca^{+2} kanal blokerleri, vasküler düz kas ve kalp kası hücrelerine Ca^{+2} 'nin akışını engellediği için ağırlıklı olarak hipertansiyon ve diğer majör kardiyovasküler rahatsızlıkların tedavisinde kullanılmaktadır [44, 45]. Bunun yanı sıra, mast hücre aktivasyonu ile ilgili süreçlerdeki antitrombositler ve immünomodülatör etkileri sayesinde Raynaud fenomeni, pernio ve kronik anal fissurların tedavileri için de reçete edilmektedir [46, 47]. Ayrıca, Ca^{+2} kanal blokerlerinin fibronektin, proteoglikan gibi ekstraselüler matris proteinlerinin sentezini baskılayabildiği, vasküler düz kas hücreleri ve fibroblastlarda büyüme ve proliferasyonu inhibe edebildikleri de bilinmektedir. Bu sebepten Ca^{+2} kanal blokerlerinin yaralanma sonrası veya bazen kendiliğinden oluşan kontrolsüz fibröz doku proliferasyonu ile meydana gelen keloid ve hipertrofik izlerin tedavisinde de yararlı olabileceği düşünülmektedir [47].

2.4.2. Nörodejeneratif hastalıklarda Ca^{+2} homeostazisini hedef alan ilaçlar

Nörodejenerasyondaki Ca^{+2} homeostazisi bozuklukları yıllardır gözlemlenmiş olmasına rağmen, bunlara yönelik terapötik yaklaşımlar oldukça yeni bir konudur [33]. Ca^{+2} kanal blokerleri özelliğindeki aritmi, hipertansiyon veya anjina ilaçlarının aynı zamanda nöronal koruyucu etki sergilediğinin keşfedilmesi ile birlikte, Ca^{+2} kanal blokerleri nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde yeni bir yaklaşım olarak görülmeye başlanmıştır [6, 12]. Hatta göğüs kanserinin tedavisinde kullanılan Tamoksifenin de Ca^{+2} kanal blokerleri özelliğinden dolayı nörodejeneratif hastalıklarda kullanılabileceği düşünülmüştür [6]. AH tedavisinde FDA tarafından onaylanmış, klinik olarak kullanılan iki ilaç ile hücre içerisine Ca^{+2} iyonlarının uzun süreli akışını engellemektedir. Bu ilaçlardan biri olan Memantin, Mg^{+2} iyonlarından daha yüksek afinite ile NMDA reseptörlerine bağlanarak, nöronal toksisiteye yol açan Ca^{+2} iyonlarının uzun süreli akışını engellemektedir [48]. Dantrolen ise ER üzerindeki Ryanodine reseptörleri için antagonist bir rol üstlenerek ER'den sitoplazmaya Ca^{+2} salınımını engellemektedir [49]. Zaman içerisinde yapılan çalışmalar ile nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde kullanılan AChE inhibitörlerinin ve dopamin antagonistlerinin de Ca^{+2} homeostazisinin modülasyonuna yönelik etkilere sahip olduğu keşfedilmiştir [33, 48–52]. Fakat bu ilaçların uzun vadede güvenliği ve etkinliğine dair var olan çalışmalar henüz yeterli değildir [53] ve birçok yan etkilerine rağmen yalnızca semptomların hafifletilmesini sağlamak amacı ile palyatif tedavi olarak uygulanmaktadırlar [8]. Dünyada yaşlı nüfus popülasyonunun gittikçe artması ile birlikte, prevalansı yükselecek olan nörodejeneratif hastalıklar için bahsedilen sebeplerden dolayı yetersiz kalan mevcut ilaçlardan başka yeni tedavi edici yaklaşımlara ihtiyaç duyulmaktadır. Bu sebepten dolayı nörodejeneratif hastalıklara yönelik yeni ilaç arayışları devam etmektedir ve Ca^{+2} kanal blokerleri de bu kapsamda kısıtlı da olsa araştırılmaktadır. Haziran 2020 itibarıyla, "<https://clinicaltrials.gov/>" adresinden Ca^{+2} kanal blokerlerinin nörodejeneratif hastalıklardaki (AH, PH ve ALS) etkinliğini değerlendirmeye yönelik 6'sı sonuçlanmış (Çizelge 2) ve 10'u devam etmekte olan 16 çalışmaya ulaşılabilmektedir. Bu derlemede de bu konuya dikkat çekilerek, özellikle nörodejeneratif hastalıklarda Ca^{+2} kanal blokeri olarak etki gösterebilecek yeni ilaç etken maddelerinin araştırılmasının önemi vurgulanmaya çalışılmıştır. Bu çalışmalarda kaydedilmiş en ileri başarı, yüksek tansiyon ve kalp yetmezliğini tedavi etmek için kullanılan, Karvedilol'un AH tedavisi için Faz 4 aşamasında klinik olarak test edilmesidir. Fakat elde edilen sonuçlar Karvedilol verilen grubun beyin omurilik sıvısı içerisinde plasebo grubundan daha yüksek konsantrasyonda $A\beta_{42}$ bulunduğunu göstermektedir [54].

Çizelge 2. Klinik olarak farklı faz çalışmalarındaki Ca^{+2} kanal blokeri olabilme potansiyeline sahip ilaçlar ve bu ilaçlar ile tedavisi hedeflenen nörodejeneratif hastalıklar [55]

Hastalık	İlacın Adı	Faz aşaması	NCT Numarası
Alzheimer Hastalığı	Nilvadipine	Faz 3	NCT02017340
	Carvedilol	Faz 4	NCT01354444
	SAM-531	Faz 1	NCT00745576
Parkinson Hastalığı	Isradipine	Faz 3	NCT02168842
	Isradipine CR	Faz 2	NCT00909545
	Dynacirc CR	Faz 2	NCT00753636

2.5. Ca^{+2} Homeostazisini Hedef Alan Biyolojik Etken Maddeler

2.5.1. Ca^{+2} kanal blokeri venomlar

Ca^{+2} homeostazisi üzerinde etki gösteren biyolojik maddelerden biri venom olarak adlandırılan hayvansal zehirlerdir. İnorganik tuzlar, organik moleküller, proteinler ve peptitlerden oluşan venomlar, aslında onları sentezleyebilen canlılara avlanma, savunma veya rakip caydırıcılığı gibi ekolojik avantajlar sağlamaktadır [56]. Venomlar tarafından sağlanan bu avantajlar nöronal sinyalleşme ve kas kasılmalarında önemli bir yere sahip olan Ca^{+2} , Na^{+} ve K^{+} gibi iyon kanallarının modülasyonu sayesinde gerçekleştirilmektedirler [57]. Venomların iyon kanalları üzerindeki bu etkisinin yüzyıllardır diüretik, anestezi, anti-alerjik ve anti-kanser gibi tıbbi faydalar sağladığı da bilinmektedir [57]. Günümüzde ise hipertansiyon, tip 2 diyabet, akut koroner sendromlar, kronik ağrılar, pıhtılaşma sorunları ve perioperatif kanamalar için FDA tarafından onaylanan ilaçların bazıları venom kökenlidir. Bu ilaçlardan biri olan Zikonotid, koni salyangozlarından elde edilen ω -conotoxin MVIIA'nın sentetik bir versiyonudur [56]. Zikonotid, N-tipi Ca^{+2} kanalındaki $\alpha 1$ alt biriminin II ve III alanları ile etkileşime girmektedir. Bu alanlardaki S5 ve S6 segmentlerine bağlanarak, segmentler arasındaki gözenğin tıkanmasını sağlamakta ve bu sayede Ca^{+2} akımını engellemektedir [58, 59]. Bu N-tipi Ca^{+2} kanal blokeri özelliği sayesinde kanser, AIDS ve nöropatilerle ilişkili şiddetli kronik ağrının tedavisinde kullanılmaktadır [56, 58]. Ayrıca, hücre kültür teknikleri ve deney hayvanları ile yapılan çalışmalarda ω -conotoxin MVIIA'nın nörodejeneratif hastalıklarda da etkili olabileceği savunulmuştur [60–64]. Fakat şimdiye kadar hem Zikonotid'in kronik ağrı tedavisi dışında klinik olarak kullanımı söz konusu olmamıştır, hem de N-tipi Ca^{+2} kanal blokeri (Zikonotid) dışındaki herhangi bir kanal tipini bloke eden peptid toksinleri geliştirilmemiştir [65]. Tüm bunlar ile birlikte, pek çok venomunun da çeşitli Ca^{+2} kanal tipleri üzerinde bloker aktiviteye sahip olduğu bilinmektedir [58]. Bu bileşiklerden bazıları ve etkinlikleri Çizelge 3'te özetlenmiştir.

Çizelge 3. Ca^{+2} kanal blokeri bazı venomlar ve bu venomların etki ettiği Ca^{+2} kanal alt birimleri

Kanal Tipi	Bileşiğin adı	Organizma	Kaynaklar
L-tipi	Calcicludine	<i>Dendroaspis angusticeps</i>	[66]
	ω -PnTx3-3	<i>Phonoetrica nigriventer</i>	[67]
P/Q-tipi	ω -conotoxin CVIB	<i>Conus catus</i>	[68]
	ω -agatoxin-IIIa	<i>Agelenopsis aperta</i>	[69]
N-tipi	DW13.3	<i>Filistata hibernalis</i>	[70]
	Phonetoxin IIA	<i>Phonoetrica nigriventer</i>	[71]
T-tipi	Protoxin I ve II	<i>Thrixopelma pruriens</i>	[72]
	SO-3	<i>Conus striatus</i>	[73]

2.5.2. Ca^{+2} kanal blokeri bitkisel bileşikler

Bitkisel bileşiklerin de, sorunlu kanalları hedef alarak, Ca^{+2} homeostazisini sağlayamaya yönelik düzenleyici etkileri sayesinde farmakolojik ve terapötik potansiyele sahip olduğu bilinmektedir [74]. Bu bitkisel bileşik grupları başlıca alkaloidler, fenolikler, ginsenositler ve bitki ekstraktlarından oluşmaktadır.

Alkaloidler, karbon (C), hidrojen (H) ve oksijene (O) ilaveten yapısında en az bir azot atomu bulunduran bitkisel kaynaklı sekonder metabolitlerdir [1]. Alkaloidler de tıpkı venomlar gibi, bitkileri dış etkenlere (herbivorlar ve patojenler gibi) karşı korumada rol alan bileşiklerdir ve tıbbi amaç ile de kullanılmaktadırlar [1, 75]. Bu amaçlardan biri de içerdikleri azot atomu sayesinde L, P/Q, N ve T gibi elektrofizyolojik özelliklere sahip Ca^{+2} kanallarının ve dolayısıyla birçok fizyolojik sürecin düzenlenmesidir (Çizelge 4) [74]. Bunun en iyi örneklerinden biri β -karbolin ($C_{11}H_8N_2$) yapısına sahip harman ve harmalinin L- ve N-tipi Ca^{+2} kanallarının $\alpha 1$ alt birimindeki dihidropiridin bağlanma bölgesi ile etkileşime girmesidir [76]. Bir diğeri ise, hücre içi aşırı Ca^{+2} birikimi ile karakterize edilen aritmiye karşı kullanılan birçok ilaçta bulunan kinolin (C_9H_7N) yapısıdır [77] (Çizelgedeki allokriptopin, berberin ve tetrandrin kinolin yapısına sahip olan izokinolin grubu alkaloidlerdir). Alkaloidlerin Ca^{+2}

homeostazisini sağlayamaya yönelik bu bloker etkileri kanser, hipertansiyon ve kardiyovasküler hastalıkların [1, 78, 79] yanı sıra nöronal açıdan da ele alınmış olup, bu alkaloidlere *Çizelge 4*'de yer verilmiştir. Bu alkaloidlerden mitragynin içerdiği indol yapısı (C_8H_7N) sayesinde nöroblastoma hücrelerinin L-tipi Ca^{+2} kanallarının yanı sıra T- tipi Ca^{+2} kanallarını bloke ettiği bilinmektedir [80]. β -karbolin yapılı harman ve harmalinin dorsal ganglionlar ile gerçekleştirilen çalışmada ise L-ve N-tipi Ca^{+2} kanallarının aktivitesini azalttığı ortaya konulmuştur. Berberin ve Daurisolin'in ise P/Q-tipi Ca^{+2} kanal blokerleri aktivitesi ile nöromusküler kavşağı inhibe ettiği gözlemlenmiştir. Ayrıca çizelgede tetrandrinin yalnızca fare nöronal kültürleri ile yapılan çalışmadaki T-tipi Ca^{+2} kanalları blokeri aktivitesine yer verilmiştir. Fakat tetrandrinin seçici bir kanal blokeri değildir; farklı nöronal kültür çalışmalarında L- ve P/Q-tipi Ca^{+2} kanal bloker aktivitesi de gösterdiği raporlanmıştır [74, 81]. Ayrıca bu alkaloidler Ca^{+2} homeostazisi dışında bellek ve motor koordinasyonunu destekleyici, plak ve protein agregasyonunu önleyici, antioksidan, antiapoptotik, antienflamatuar, anti-AChE ve BuChE gibi aktivitelere de sahiptir [82–85].

Fenolikler ise, temel olarak C, H ve O atomlarında oluşan 8.000'den fazla üyesi bulunan bir başka bitkisel sekonder metabolitlerdir. Terapötik etkileri nedeniyle kanser, kardiyovasküler ve nörodejeneratif hastalıklarda tıbbi amaçlar ile kullanılmaktadırlar [86]. En az bir aromatik halka ve hidroksil gruptan oluşan fenoliklerin Ca^{+2} 'nin de içerisinde bulunduğu kardiyak iyon kanallarını etkileyerek, kardiyovasküler hastalıklara karşı koruyucu etki sağladığı bilinmektedir [87]. Kanalların modülasyonunun neden olan etkileşim ve bu etkileşimde önemli olan kimyasal gruplara dair bir çalışma olmaması ile birlikte, bu fenoliklerin nöronal modellerdeki Ca^{+2} kanallarını da bloke edebileceği birkaç çalışma ile de olsa gösterilmiştir. *Çizelge 4*'deki ekinakositin ve mirisetinin bunlardan biridir; bu fenoliklerin P/Q- ve N-tipi Ca^{+2} kanallarını bloklayarak sinir terminallerinden glutamat salınımını inhibe ettiği ve bu sayede Alzheimer ve parkinson gibi hastalıklara karşı koruyucu etki gösterebileceği ortaya konulmuştur [88, 89]. Ayrıca ekinakositin ve mirisetin, Ca^{+2} homeostazisi dışındaki nörodejenerasyon süreçlerinde, plak agregasyonunun, oksidatif stresin ve apoptozun baskılanmasını, bu karşın antioksidan aktivite ve mitokondriyal membran potansiyelinin artmasını sağlamaktadır [90–93].

Ginsengin bitkisinin temel bileşenleri olan ginsenositler, saponin bileşikler grubuna ait olan triterpenlerdir ve çoğunlukla C-3, C-6 veya C-20 pozisyonunda şeker motifleri taşıyan 4 halkalı hidrofobik steroid benzeri yapıya sahiptirler. Bu pozisyonlardaki şeker motiflerine göre de isimlendirilmektedirler (Rb1, Rf v.b.) [94–96] ve eski zamanlardan beri antioksidan, antimikrobiyal, antienflamatuar ve antitümör gibi bazı biyolojik aktiviteleri nedeniyle kullanılmaktadırlar [97]. Bunların haricinde Ca^{+2} kanal bloker aktivitesi de göstermektedirler (*Çizelge 4*). Hipokampal nöron kültürleri ile gerçekleştirilen bir çalışmada [98] Rb1 ginsenositinin Ca^{+2} kanalının biyofiziksel doğasını değiştirerek, inhibe edebileceği gösterilmiştir. Rf'nin endojen opioid peptitleri (şiddetli ağrılar için kullanılan bir ilaç) ile karşılaştırıldığı bir çalışmada ise [99], hem peptit yapısında olmamasında rağmen iyi bir opioidin mimiği, hem de P/Q-tipi Ca^{+2} kanal blokeri olduğu, bu sayede nöronal sekresyon üzerinde büyük bir etkiye sahip olduğu ortaya konmuştur. Diğer yandan *Xenopus* oositleri ile yapılan, ginsenositlerin karşılaştırıldığı bir çalışmada Rg₃ ve Rh₂'nin çok güçlü bir şekilde Ca^{+2} kanal alt birimlerinin gen ifadelerini baskıladığı gözlemlenmiştir [100]. Tüm bunların yanı sıra, ginsenositler antioksidan, antiapoptotik, anti-AChE ve nörotrofik etkileri sayesinde de nöral koruyucu aktivite sergilemektedirler [101, 102].

Bitkisel ekstrakt ise, tanenler, alkaloidler, karbonhidratlar, terpenoidler, steroidler ve fenolikler gibi biyoaktif bileşiklerin hepsini içermektedirler ve bu zengin fitokimyasal içerikleri nedeniyle nörodejeneratif hastalıkların tedavisine yönelik yaklaşımlarda yüzyıllardır kullanılmaktadırlar [103]. Fakat Ca^{+2} kanalları üzerindeki aktivitelerine dair oldukça az çalışma mevcuttur. Bu çalışmalara *Çizelge 4*'de yer verilmiş olup, bu bitkilerden *Olea europaea*'in L-tipi Ca^{+2} kanal bloker aktivite ekstraktın ana bileşeni olan oleuropeine [104], *Valeriana jatamansi* ve *Lavandula angustifolia* ekstraktlarının T, P/Q ve N tipi Ca^{+2} kanalları üzerinde etkinliği ise *Valeriana jatamansi* için ana bileşeni olan valepotriatlar, *Lavandula angustifolia* için ise lavanta yağına atfedilmiştir [105, 106].

Çizelge 4. Ca^{+2} kanal blokleri bazı bitkisel bileşikler ve bu bileşiklerin etkin olduğu Ca^{+2} kanal alt birimleri

Kanal Tipi	Bileşiğin Adı	Kullamlan Model	Kaynaklar
L-tipi	Alkaloidler	Mitragynin	N1E-115 hücre hattı [80]
		Harman	Rat dorsal kök gangliyonu
		Harmalin	Endotel hücreleri [74, 76]
		Allokriptopin	Fare ventriküler miyositleri Tavşan kalbi [76, 107]
	Fenolikler	Berberin	Rat oartik halkaları [108]
		Kurkumin	Rat oartik halkaları [109]
		Kersetin	Rat oartik düz kası [110]
		Kafeik asit	Gine kalp preparatları [111]
	Ginsenositler	Rb1	Hipokampal nöronlar [98]
		Rd	Rat ventriküler miyositler [112]
		Re	Gine kardiyomiyositleri [113]
	Ekstratlar	<i>Olea europaea</i>	Wistar ratları [104]
		<i>Averrhoa carambola</i>	GH ₃ hücre hattı [114]
	P/Q tipi	Alkaloidler	Berberin
Daurisolin			Purkinje Hücreleri [116]
Fenolikler		Ekinekosid	<i>Sprague-Dawley fareleri</i> [88]
		Mirisetin	<i>Sprague-Dawley fareleri</i> [89]
Ginsenositler		Rf	Rat duyu nöronlarında [99]
		Rg ₃	Xenopus oositleri [100]
		Rh ₂	Xenopus oositleri [100]
Ekstratlar		<i>Lavandula angustifolia</i>	NMRI fareleri [105]
		<i>Valeriana jatamansi</i>	HEK 293T hücre hattı Xenopus oositleri [106]
N-tipi		Alkaloidler	Tetrandrin
	Kannabinoid		NG108-15 hücre hattı [118]
	Fenolikler	Ekinekosid	<i>Sprague-Dawley fareleri</i> [88]
		Mirisetin	<i>Sprague-Dawley fareleri</i> [89]
	Ginsenositler	Rh ₂	Xenopus oositleri [100]
		Rg ₃	Xenopus oositleri [100]
	Ekstratlar	<i>Valeriana jatamansi</i>	HEK 293T hücre hattı Xenopus oositleri [106]
		<i>Lavandula angustifolia</i>	NMRI fareleri [105]
T-tipi	Alkaloidler	Mitragynin	N1E-115 hücre hattı [80]
		Tetrandrin	Fetal fare nöronal kültürü [81]
	Fenolikler	Kersetin	GH ₄ C ₁ hücre hattı [119]
		Resveratrol	Pankreas β hücreleri [120]
	Ginsenositler	Rh ₂	Xenopus oositleri [100]
		Rg ₃	Xenopus oositleri [100]
	Ekstratlar	<i>Lavandula stoechas</i>	HEK 293T hücre hattı [105]
		<i>Valeriana jatamansi</i>	HEK 293T hücre hattı Xenopus oositleri [106]

3. TARTIŞMA

Birçok nörodejeneratif hastalıkta hücre ölümüne yol açan ve terapötik olarak hedef alınan mekanizmalar oksidatif stres, plak veya protein agregasyonu ve nöroinflamasyondan oluşmaktadır. Son yıllarda nörodejeneratif hastalıkların oluşumunda ve ilerlemesinde Ca^{+2} homeostazisindeki bozulmaların da rolü

olduğu tespit edilmiştir [29–33]. Ca^{+2} homeostazisindeki bozukluklar birçok doku ve hastalık patolojisinde olduğu gibi nörodejeneratif hastalılarda da ROS üretimi, oksidatif stres, enerji kaybı, mitokondriyal disfonksiyon ve apoptotik yolların aktivasyonu başta olmak üzere bazı yapısal ve moleküler değişiklikleri meydana getirerek, nöral hasar ve ölüme neden olmaktadır. Bu sebepten dolayı hücre içi Ca^{+2} akışından sorumlu olan kanalların modülasyonu ile Ca^{+2} homeostazisinin sağlanması oldukça önemlidir. Nitekim Ca^{+2} kanal bloker aktivitesine sahip bazı hipertansiyon ve kardiyovasküler ilaçların nöral koruyucu etkilerinin fark edilmesi de, Ca^{+2} kanal blokerleri ile bozulan hücre içi Ca^{+2} homeostazisinin dengelenebileceğini fikrini desteklemektedir [6, 12]. Ca^{+2} kanal blokerleri, kanallar aracılı Ca^{+2} akışını kontrol etmenin yanı sıra, antioksidan, anti-enflamatuar, antiapoptotik ve antitrombotik aktivite gibi ikincil rollere de sahiptirler. Çok yönlü bu etkileri sayesinde nörodejeneratif hastalıkların hem erken, hem de geç safhalarında terapötik etki gösterebilirler [121]. Ayrıca, KV, BK_{Ca} , IK_{Ca} , ve SK_{Ca} gibi potasyum ve Na^+ 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6 ve 1.7 gibi sodyum kanalları Ca^{+2} 'ye karşı oldukça duyarlıdır ve Ca^{+2} homeostazisindeki değişiklikler bu kanallar ile ilişkili geri bildirim mekanizmalarını da etkilemektedir. Dolayısıyla Ca^{+2} kanal blokerleri ile Ca^{+2} homeostazisinin sağlanması diğer iyon kanallarının homeostazisi için de önemlidir [26, 122].

Ca^{+2} homeostazisinin sağlanması amacıyla kullanılan ilaçlardan biri olan dantrolenin merkezi sinir sistemini etkileyen baş dönmesi, sersemlik ve uyuşukluk gibi yan etkilere, NMDA antagonistlerinin ise ciddi psikotomimetik sorunlara neden olduğu bilinmektedir [123–125]. Ca^{+2} homeostazisine yönelik mevcut yaklaşımların eksik veya yeteri kadar güvenilir bulunmaması nedeniyle, yeni Ca^{+2} kanal bloker arayışları da sürmektedir. Diğer yandan, venomlar ve bitkisel bileşikler gibi biyolojik yapıların farmakolojik ve terapötik açıdan Ca^{+2} kanal blokeri olma potansiyeli taşıdığı bilinmektedir. Venomlar zengin peptid ve organik içerikleri sayesinde Ca^{+2} 'de dahil olmak üzere tüm iyonik kanalları modüle edebilmektedirler. Fakat venomların intravenöz veya intratekal yollardan verilmesi gerekmektedir. Biyo-yararlanımlarının çok düşük olması ve kan-beyin bariyerini geçememeleri sebebiyle nörodejeneratif hastalıklar için intravenöz olarak uygulanması uygun değildir. FDA tarafından onaylanan Zikonotid'in de uygulanma şekli olan intratekal yol ile verilmeleri durumunda ise kanalları bölgesel seçicilik göstermeksizin, geri döndürülemez şekilde bloke edebileceği için güçlü yan etkilere neden olabilmektedirler [58, 126–128]. Bu sebepten venomlar nörodejeneratif hastalıklardaki Ca^{+2} homeostazisinin sağlanmasında rol alamamaktadırlar, ancak farmakofor çalışmalar ile seçici ve daha uygun peptid analoglarının geliştirilmesine ilham olmaktadır [56, 129–131]. Bitkisel bileşiklerin Ca^{+2} homeostazisi üzerindeki potansiyellerinin keşfedilmesine yönelik çalışmalar ise Tablo 4'te de görülebileceği üzere çoğunlukla nörodejeneratif hastalıklardan farklı alanlarda sürdürülmüştür. Bu bitkisel bileşiklerden alkaloidler, yapılarındaki azotlu heterosiklik halkalar sayesinde nöronal Ca^{+2} kanallarının geçiş poru, aynı zamanda da ikincil haberciler, ilaçlar ve toksinler için hedef bölgesi olan $\alpha 1$ alt birimindeki bağlanma bölgeleri ile etkileşime girebilmektedirler. Diğer yandan fenoliklerin ve ginsenositlerin de nöronal Ca^{+2} kanallarının $\alpha 1$ alt birimi ile etkileşime girdiği bilinmektedir fakat bu durum yapısal özellikleri ile ilişkilendirilmemiştir. Ginsenositlerin $Na^+/K^+-ATPase$ 'in $\alpha 1$ alt birimini ile etkileşiminin modellendiği bir çalışmada kanal bloker aktivite, yapılarındaki şeker motiflerine atfedilmiştir. Aslında voltaj-bağımlı iyon kanal ailesinin üyeleri (Na^+ , Ca^{+2} ve K^+) arasında güçlü sekans benzerlikler bulunmaktadır [132], özellikle de Ca^{+2} kanal alt birimleri ile Na^+ kanal alt birimleri arasındaki yüksek amino asit dizi benzerliği biyokimyasal özellikler bakımından da oldukça yakın olmalarını sağlamaktadır [133]. Bu sebepten şeker motiflerinin Ca^{+2} kanallarına bağlanmada da rol aldığını düşünmekteyiz. *Xenopus* oositleri ile yapılan karşılaştırmalı ginsenosit çalışmasında Rg_3 'ün tüm Ca^{+2} kanal alt birimleri için, Rh_2 'nin ise L- ve T-tipi için çok güçlü Ca^{+2} kanal blokeri oldukları ortaya konulmuştur. Yine $Na^+/K^+-ATPase$ çalışmasında Rg_3 ve Rh_2 gibi yalnızca C-3 pozisyonunda şeker motifi bulunan ginsenositlerin, C-6 ve/veya C-20 pozisyonunda şeker motifi bulunanlara göre daha iyi etkileşim gösterdiği raporlanmıştır [134]. Rg_3 'ün daha geniş Ca^{+2} kanal altbirimlerini etkilemesi ise C-3 konumunda Rh_2 'nin aksine iki glikoz bulundurması ile ilişkilendirilmiştir [100]. Bitkisel ekstraktlar ise tüm bu fitokimyasallar açısından oldukça zengin bir kaynaktır. Fakat farklı kanal alt birimleri üzerinde etkisi olduğu bilinen bileşikler içermelerine rağmen, bitkisel ekstraktların tüm Ca^{+2} kanal alt birimlerinde etkin olmadığı gözlemlenmiştir. Ayrıca, kanal bloker aktiviteleri ekstraktlarındaki ana bileşiklere atfedilmiştir. Bu durumun çalışmaların oldukça kısıtlı oluşundan kaynaklanabileceği gibi fitokimyasalların birbirine karşı antagonistik etki de yapabileceğini düşünmekteyiz.

Diğer bir yandan tüm bu biyojik bileşiklerin kanal tipleri üzerindeki seçiciliği iki durum ile ilişkilendirilebilir. İlki ginsenositlerde olduğu gibi birleşiklerin kimyasal yapısındaki çeşitlik ve farklılıklardır. İkincisi ise kanal tiplerinin depolarizasyon, iletkenlik ve inaktivasyon kinetiği gibi bazı karektristik özellikleridir. Genellikle küçük depolarizasyonlar ile uyarılabilen ve iletkenliği düşük olan kanallar oldukça farklı bir aksiyon aralığına/inaktivasyon kinetiğine sahiptir ve bu sebepten Ca^{+2} kanal blokerlerine karşı direnç göstermektedir. Depolarizasyonu -60 ile -40 mV arasında ve iletkenliği yaklaşık 8 pikosaniye olan T-tipi Ca^{+2} kanalları bunun en iyi örneğidir [40, 135]. Bunun ile birlikte T-tipi dışındaki Ca^{+2} kanalları da bu anlamda ufak farklılıklara sahiptir ve blokerlerin seçici aktiviteleri de buna dayandırılmaktadır [136]. Aslında Ca^{+2} kanalları normal nöronal süreçlerde önemli roller üstlenmektedir ve nörodegeneratif hastalıklarla ilişkilendirilen fonksiyonel bozukluklar tüm Ca^{+2} kanal tiplerini kapsamamaktadır (Çizelge 1) [25]. Bu açıdan kanal ailesindeki farklı alt birimler arasında seçicilik gösterebilen ajanların hedef seçiciliği sayesinde en etkili ve tolere edilebilir yaklaşımları sunacağına öngörülmektedir [137]. Ca^{+2} kanal blokerleri için bir diğer hedef seçici yaklaşım ise dihidropiridinler ve fenilakilaminler gibi yalnızca patolojik koşullar ile aşırı aktifleşmiş kanallara bağlanan durum-bağımlı (state-dependent) ajanlardır [41]. Kısacası bu iki strateji ile hem normal sinaptik ve hücrel sinyalleşme sürdürülebilir hem de patolojik Ca^{+2} kanalları bloke edilebilir.

Sonuç olarak, biyolojik bileşiklerin Ca^{+2} kanal bloker aktivitesinin ve etkinliğinin araştırılmasına yönelik yapılacak çalışmaların nörodegeneratif hastalıklar boyutunda daha çok ele alınması, bu hastalıkların tedavisine farklı bir yaklaşım getirebileceği gibi yeni ilaç adaylarının geliştirilmesini de mümkün kılacaktır. Ayrıca, bu bileşiklerin Ca^{+2} homeostazisi dışındaki terapötik olarak hedef alınan mekanizmalar üzerinde de etkili olması, nörodegeneratif hastalıkların tüm süreçlerinde etkin olabilecek çok yönlü ilaç seçim stratejilerine de katkı sağlayacaktır. Yaptığımız literatür araştırması ile Ca^{+2} homeostazisini hedef alan Ca^{+2} kanal blokerlerinin, nörodegeneratif hastalıklardaki önemi ortaya konulmuş olup, bunların nörodegeneratif hastalıklara yönelik yeni ilaçların geliştirilmesinde güncel bir konu olduğu ve bu konuda çok araştırma olmadığı gözlemlenmiştir. Derlemede bu konuya dikkat çekilerek, özellikle nörodegeneratif hastalıklarda Ca^{+2} kanal blokeri olarak etki gösterebilecek bitkisel bileşiklerin önemi ve bu bileşiklerin yeni ilaç etken maddesi olabilme potansiyelleri vurgulanmıştır.

ÇIKAR ÇATIŞMASI/ÇAKIŞMASI BİLDİRİMİ

Yazarlar arasında çıkar çatışması/çakışması bulunmamaktadır.

KAYNAKLAR

- [1] Hussain, G., Rasul, A., Anwar, H., Aziz, N., Razzaq, A., Wei, W., et al. (2018). Role of plant derived alkaloids and their mechanism in neurodegenerative disorders. *International Journal of Biological Sciences*, 14(3), 341–357.
- [2] Hussain, R., Zubair, H., Pursell, S., and Shahab, M. (2018). Neurodegenerative diseases: regenerative mechanisms and novel therapeutic approaches. *Brain Sciences*, 8(9), 177–214.
- [3] Yurtkap, O. and Arslan, B. (2018). Axonal transport in neurodegenerative diseases. *The Journal of Neurobehavioral Sciences*, 5 (2), 115–123.
- [4] Finberg, J. P. M. (2010). Pharmacology of rasagiline, a new mao-b inhibitor drug for the treatment of parkinson's disease with neuroprotective potential. *Rambam Maimonides Medical Journal*, 1(1), e0003.
- [5] Korabecny, J., Zemek, F., Soukup, O., Spilovska, K., Musilek, K., Jun, D., and Kuca, K. (2014). Pharmacotherapy of Alzheimer's disease: current state and future perspectives. *Drug Design and Discovery in Alzheimer's Disease*. Elsevier, 3–39.
- [6] Durães, F., Pinto, M., and Sousa, E. (2018). Old drugs as new treatments for neurodegenerative diseases. *Pharmaceuticals*, 11(2), 1–21.
- [7] Girdhar, S., Girdhar, A., Verma, S. K., Lather, V., Pandita, D., Ji, H. F., et al. (2015). Plant derived alkaloids in major neurodegenerative diseases : from animal models to clinical trials. *Journal of Ayurvedic and Herbal Medicine*, 1(3), 91–100.
- [8] Selkoe, D. J. (2019). Alzheimer disease and aducanumab: adjusting our approach. *Nature Reviews Neurology*, 15(7), 365–366.
- [9] Yacoubian, T. A. (2017). Neurodegenerative disorders: Why do we need new therapies? *Drug discovery approaches for the treatment of neurodegenerative disorders*. Academic Press., 1-16.
- [10] Numakawa, T., Matsumoto, T., Numakawa, Y., Richards, M., Yamawaki, S., and Kunugi, H. (2011). Protective action of neurotrophic factors and estrogen against oxidative stress-mediated neurodegeneration.

Journal of Toxicology, 2011(405194), 12.

- [11] Zündorf, G. and Reiser, G. (2011). Calcium dysregulation and homeostasis of neural calcium in the molecular mechanisms of neurodegenerative diseases provide multiple targets for neuroprotection. *Antioxidants and Redox Signaling*, 14(7), 1275–1288.
- [12] Wu, C. L. and Wen, S. H. (2016). A 10-year follow-up study of the association between calcium channel blocker use and the risk of dementia in elderly hypertensive patients. *Medicine (United States)*, 95(32), 4593.
- [13] Schrank, S., Barrington, N., and Stutzmann, G. E. (2020). Calcium-handling defects and neurodegenerative disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 12(7), 1–25.
- [14] Heyes, S., Pratt, W. S., Rees, E., Dahimene, S., Ferron, L., Owen, M. J., et al. (2015). Genetic disruption of voltage-gated calcium channels in psychiatric and neurological disorders. *Progress in Neurobiology*, 134, 36–54.
- [15] Reid, I. R., Bristow, S. M., and Bolland, M. J. (2017). Calcium and cardiovascular disease. *Endocrinology and Metabolism*, 32(3), 339–349.
- [16] Benaim, G. and Garcia, C. R. S. (2011). Targeting calcium homeostasis as the therapy of Chagas' disease and leishmaniasis - a review. *Tropical Biomedicine*, 28(3), 471–481.
- [17] Tatar, M. and Tatar, T. (2018). Endoplazmik retikulum stresi ve ilişkili hastalıklar. *Osmangazi Journal of Medicine*, 294–303.
- [18] Verne, J. (2019). Ca²⁺ channels in cancer. *Cell Calcium*, 84, 102083.
- [19] Dong, Z., Saikumar, P., Weinberg, J. M., and Venkatachalam, M. A. (2006). Calcium in cell injury and death. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 405–434.
- [20] Gerasimenko, J. V., Peng, S., Tsugorka, T., and Gerasimenko, O. V. (2018). Ca²⁺ signalling underlying pancreatitis. *Cell Calcium*, 70, 95–101.
- [21] Oliveira, A. M. M., Bading, H., and Mauceri, D. (2014). Dysfunction of neuronal calcium signaling in aging and disease. *Cell and Tissue Research*, 357 (2), 381–383.
- [22] Veldurthy, V., Wei, R., Oz, L., Dhawan, P., Jeon, Y. H., and Christakos, S. (2016). Vitamin D, calcium homeostasis and aging. *Bone Research*, 4(August), 1–7.
- [23] Bagur, R. and Hajnóczky, G. (2017). Intracellular Ca²⁺ Sensing: Its role in calcium homeostasis and signaling. *Molecular Cell*, 66(6), 780–788.
- [24] Carmeliet, G., Van Cromphaut, S., Daci, E., Maes, C., and Bouillon, R. (2003). Disorders of calcium homeostasis. *Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism*, 17(4), 529–546.
- [25] Kumar, P., Kumar, D., Jha, S. K., Jha, N. K., and Ambasta, R. K. (2016). Ion Channels in Neurological Disorders. Advances in protein chemistry and structural biology (1st ed.) Elsevier Inc., 97-136.
- [26] Steinlein, O. K. (2014). Calcium signaling and epilepsy. *Cell and Tissue Research*, 357(2), 385–393.
- [27] Ermak, G. and Davies, K. J. A. (2002). Calcium and oxidative stress: From cell signaling to cell death. *Molecular Immunology*, 38(10), 713–721.
- [28] Gürer, R. (2005). İdiopatik parkinson hastalığı etyopatogenezinde seruloplazminin yeri ve proton mr spektroskopisi ile verifikasyonu. T.C. Sağlık Bakanlığı Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi, 2005.
- [29] Kuchibhotla, K. V., Goldman, S. T., Lattarulo, C. R., Wu, H. Y., Hyman, B. T., and Bacskai, B. J. (2008). Aβ plaques lead to aberrant regulation of calcium homeostasis *in vivo* resulting in structural and functional disruption of neuronal networks. *Neuron*, 59(2), 214–225.
- [30] Alzheimer's Association Calcium Hypothesis Workgroup (2017). Calcium Hypothesis of Alzheimer's disease and brain aging: A framework for integrating new evidence into a comprehensive theory of pathogenesis. *Alzheimer's & Dementia : The Journal of the Alzheimer's Association*, 13(2), 178-182.e17.
- [31] Anekonda, T. S. and Quinn, J. F. (2011). Calcium channel blocking as a therapeutic strategy for Alzheimer's disease: The case for isradipine. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1812 (12), 1584–1590.
- [32] Bezprozvanny, I. (2009). Calcium signaling and neurodegenerative diseases. *Trends in Molecular Medicine*, 15(3), 89–100.
- [33] Tan, Y., Deng, Y., and Qing, H. (2012). Calcium channel blockers and Alzheimer's disease. *Neural Regeneration Research*, 7 (2), 137–140.
- [34] Zuo, L., Hemmelgarn, B. T., Chuang, C. C., and Best, T. M. (2015). The role of oxidative stress-induced epigenetic alterations in amyloid-β production in alzheimer's disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2015.
- [35] Galas, M. C., Dourlen, P., Bégard, S., Ando, K., Blum, D., Hamdane, M., et al. (2006). The peptidylprolyl cis/trans-isomerase Pin1 modulates stress-induced dephosphorylation of Tau in neurons: Implication in a pathological mechanism related to Alzheimer disease. *Journal of Biological Chemistry*, 281(28), 19296–19304.
- [36] Poppek, D., Keck, S., Ermak, G., Jung, T., Stolzing, A., Ullrich, O., et al. (2006). Phosphorylation inhibits turnover of the tau protein by the proteasome: Influence of RCAN1 and oxidative stress. *Biochemical Journal*, 400(3), 511–520.
- [37] Sierra, H., Cordova, M., Chen, C. S. J., and Rajadhyaksha, M. (2015). Calcium dyshomeostasis and pathological calcium signalling in neurological diseases. *Journal of Investigative Dermatology*, 135 (2), 612–615.
- [38] Zaichick, S. V., McGrath, K. M., and Caraveo, G. (2017). The role of Ca²⁺ signaling in Parkinson's disease.

DMM Disease Models and Mechanisms, 10 (5), 519–535.

[39] Cali, T., Ottolini, D., and Brini, M. (2014). Calcium signaling in Parkinson's disease. *Cell and Tissue Research*, 357(2), 439–454.

[40] Emre, M. (2018). Voltaj kapılı kalsiyum kanalları ve moleküller özellikleri. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 27(1), 1–17.

[41] Nimrich, V. and Eckert, A. (2013). Calcium channel blockers and dementia. *British Journal of Pharmacology*, 169(6), 1203–1210.

[42] Lacinova, L. (2005). Voltage-dependent calcium channels. *General Physiology and Biophysics*, 24, 1–78.

[43] Hughes, A. (2017). Calcium channel blockers. in: *Hypertens. A Companion to Braunwald's Hear. Dis.*, pp. 242–253.

[44] Godfraind, T. (2017). Discovery and development of calcium channel blockers. *Frontiers in Pharmacology*, 8(May), 1–25.

[45] İnternet: Bethesda (MD). Calcium Channel Blockers, LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury,. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK548577/>, Son Erişim Tarihi: 20.06.2020

[46] Baydın, A., Yardan, T., Dilek, A., Nural, M.S., Eden, A.O. ve Gönüllü, H. (2008). Yüksek dozda kalsiyum kanal blokeri alımına bağlı ölüm olgusu ve literatürün gözden geçirilmesi. *Türkiye Acil Tıp Dergisi*, 8(2), 84–89.

[47] Polat, M. ve Uzun, Ö. (2013). Deri hastalıklarında kalsiyum kanal blokerlerinin kullanımı. *Türkderm Deri Hastalıkları ve Frengi Arşivi*, 47(2), 75–79.

[48] Alam, S., Lingenfelter, K. S., Bender, A. M., and Lindsley, C. W. (2017). Classics in chemical neuroscience: Memantine. *ACS Chemical Neuroscience*, 8(9), 1823–1829.

[49] Liang, L. and Wei, H. (2015). Dantrolene, a treatment for Alzheimer disease? *Alzheimer Disease and Associated Disorders*, 29(1), 1–5.

[50] Alés, E., Gullo, F., Arias, E., Olivares, R., García, A. G., Wanke, E., et al. (2006). Blockade of Ca²⁺-activated K⁺ channels by galantamine can also contribute to the potentiation of catecholamine secretion from chromaffin cells. *European Journal of Pharmacology*, 548(1–3), 45–52.

[51] Haraguchi, Y., Mizoguchi, Y., Ohgidani, M., Imamura, Y., Murakawa-Hirachi, T., Nabeta, H., et al. (2017). Donepezil suppresses intracellular Ca²⁺ mobilization through the PI3K pathway in rodent microglia. *Journal of Neuroinflammation*, 14(1), 1–14.

[52] Solntseva, E. I., Bukanova, J. V., Marchenko, E., and Skrebitsky, V. G. (2007). Donepezil is a strong antagonist of voltage-gated calcium and potassium channels in molluscan neurons. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*, 144(4), 319–326.

[53] Graham, W. V., Bonito-Oliva, A., and Sakmar, T. P. (2017). Update on Alzheimer's disease therapy and prevention strategies. *Annual Review of Medicine*, 68 (1), 413–430.

[54] İnternet: Trial of Carvedilol in Alzheimer's Disease - Study Results - ClinicalTrials.gov. URL: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/results/NCT01354444?term=calcium+channel+blocker&recrs=e&cond=Neurodegenerative+Diseases&phase=23&draw=2&rank=3&view=results>, Son Erişim Tarihi: 20.06.2020

[55] İnternet: Search of: calcium channel blocker | Neuro-Degenerative Disease- List Results- ClinicalTrials.gov. <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=Neuro-Degenerative+Disease&term=calcium+channel+blocker&cntry=&state=&city=&dist=>, Son Erişim Tarihi: 20.07.2020

[56] King, G. F. (2011). Venoms as a platform for human drugs: translating toxins into therapeutics. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 11(11), 1469–1484.

[57] Bajaj, S. and Han, J. (2019). Venom-derived peptide modulators of cation-selective channels: Friend, foe or frenemy. *Frontiers in Pharmacology*, 10, 1–12.

[58] Sousa, S. R., Vetter, I., and Lewis, R. J. (2013). Venom peptides as a rich source of Cav2.2 channel blockers. *Toxins*, 5(2), 286–314.

[59] Ellinor, P. T., Zhang, J. F., Horne, W. A., and Tsien, R. W. (1994). Structural determinants of the blockade of N-type calcium channels by a peptide neurotoxin. *Nature*, 372(6503), 272–275.

[60] McDonough, S. I., Swartz, K. J., Mintz, I. M., Boland, L. M., and Bean, B. P. (1996). Inhibition of calcium channels in rat central and peripheral neurons by ω -conotoxin MVIIC. *Journal of Neuroscience*, 16(8), 2612–2623.

[61] Pringle, A., Benham, C., Sim, L., Kennedy, J., Iannotti, F., and Sundstrom, L. (1996). Selective N-type calcium channel antagonist omega conotoxin MVIIA is neuroprotective against hypoxic neurodegeneration in organotypic hippocampal-slice cultures. *Stroke A Journal of Cerebral Circulation*, 27(11), 2124–2130.

[62] Asakura, K., Matsuo, Y., Kanemasa, T., and Ninomiya, M. (1997). P/Q-type Ca²⁺ channel blocker ω -agatoxin IVA protects against brain injury after focal ischemia in rats. *Brain Research*, 776(1–2), 140–145.

[63] Ramsden, M., Henderson, Z., and Pearson, H. A. (2002). Modulation of Ca²⁺ channel currents in primary cultures of rat cortical neurones by amyloid β protein (1–40) is dependent on solubility status. *Brain Research*, 956(2), 254–261.

- [64] de Souza, J. M., Goncalves, B. D. C., Gomez, M. V., Vieira, L. B., and Ribeiro, F. M. (2018). Animal toxins as therapeutic tools to treat neurodegenerative diseases. *Frontiers in Pharmacology*, 9, 1–25.
- [65] Zamponi, G. W., Striessnig, J., Koschak, A., and Dolphin, A. C. (2015). The physiology, pathology, and pharmacology of voltage-gated calcium channels and their future therapeutic potential. *Pharmacological Reviews*, 67(4), 821–870.
- [66] Stotz, S. C., Spaetgens, R. L., and Zamponi, G. W. (2000). Block of voltage-dependent calcium channel by the green mamba toxin calcicludine. *Journal of Membrane Biology*, 174(2), 157–165.
- [67] Leão, R. M., Cruz, J. S., Diniz, C. R., Cordeiro, M. N., and Beirão, P. S. L. (2000). Inhibition of neuronal high-voltage activated calcium channels by the ω -Phoneutria nigriventer Tx3-3 peptide toxin. *Neuropharmacology*, 39(10), 1756–1767.
- [68] Motin, L., Yasuda, T., Schroeder, C. I., Lewis, R. J., and Adams, D. J. (2007). ω -Conotoxin CVIB differentially inhibits native and recombinant N- and P/Q-type calcium channels. *European Journal of Neuroscience*, 25(2), 435–444.
- [69] Yan, L. and Adams, M. E. (2000). The spider toxin ω -Aga IIIA defines a high affinity site neuronal high voltage-activated calcium channels. *Journal of Biological Chemistry*, 275(28), 21309–21316.
- [70] Sutton, K. G., Siok, C., Stea, A., Zamponi, G. W., Heck, S. D., Volkmann, R. A., et al. (1998). Inhibition of neuronal calcium channels by a novel peptide spider toxin, DW13.3. *Molecular Pharmacology*, 54(2), 407–418.
- [71] Dos Santos, R. G., Van Renterghem, C., Martin-Moutot, N., Mansuelle, P., Cordeiro, M. N., Diniz, C. R., et al. (2002). Phoneutria nigriventer ω -phonetoxin IIA blocks the Cav2 family of calcium channels and interacts with ω -conotoxin-binding sites. *Journal of Biological Chemistry*, 277(16), 13856–13862.
- [72] Bladen, C., Hamid, J., Souza, I. A., and Zamponi, G. W. (2014). Block of T-type calcium channels by protoxins I and II. *Molecular Brain*, 7(1), 1–8.
- [73] Wen, L., Yang, S., Zhou, W., Zhang, Y., and Huang, P. (2006). New conotoxin SO-3 targeting N-type voltage-sensitive calcium channels. *Marine Drugs*, 4(3), 215–227.
- [74] Alaoui, C. El, Choukairi, Z., Lamri, L., Berrada, F., and Taoufiq, F. (2015). Inhibition of voltage-gated calcium channels by natural alkaloids: Pharmacological and therapeutic effects. *International Journal of Science and Research (IJSR)*, 4(9), 1289–1294.
- [75] Amirikia, V. and Heinrich, M. (2014). Alkaloids as drug leads - A predictive structural and biodiversity-based analysis. *Phytochemistry Letters*, 10 (October), xlviii–liiii.
- [76] Spletstoesser, F., Bonnet, U., Wiemann, M., Bingmann, D., and Büsselberg, D. (2005). Modulation of voltage-gated channel currents by harmaline and harmaline. *British Journal of Pharmacology*, 144 (1), 52–58.
- [77] Fu, Y.-C., Zhang, Y., Tian, L.-Y., Li, N., Chen, X., Cai, Z.-Q., et al. (2016). Effects of allocryptopine on outward potassium current and slow delayed rectifier potassium current in rabbit myocardium. *Journal of Geriatric Cardiology: JGC*, 13(4), 316–25.
- [78] McCawley, E. L. (1955) Cardioactive Alkaloids. *Alkaloids Chem. Physiol.* Academic Press, 79–107.
- [79] Vacek, J., Walterová, D., Vrublová, E., and Šimánek, V. (2010). The chemical and biological properties of protopine and allocryptopine. *Heterocycles*, 81 (8), 1773–1789.
- [80] Matsumoto, K., Yamamoto, L. T., Watanabe, K., Yano, S., Shan, J., Pang, P. K. T., et al. (2005). Inhibitory effect of mitragynine, an analgesic alkaloid from Thai herbal medicine, on neurogenic contraction of the vas deferens. *Life Sciences*, 78(2), 187–194.
- [81] Bickmeyer, U. and Wiegand, H. (1993). Tetrandrine effects on calcium currents in cultured neurones of foetal mice. *NeuroReport*, 4(7), 938–940.
- [82] Gibbons, S. and Arunotayanun, W. (2013). Natural product (fungal and herbal) novel psychoactive substances. *Novel Psychoactive Substances*. Elsevier Inc., 345–362.
- [83] Hazim, A. I., Mustapha, M., and Mansor, S. M. (2011). The effects on motor behaviour and short-term memory tasks in mice following an acute administration of mitragyna speciosa alkaloid extract and mitragynine. *Journal of Medicinal Plant Research*, 5(24), 5810–5817.
- [84] Dey, A. and Mukherjee, A. (2017). Plant-derived alkaloids: A promising window for neuroprotective drug discovery. *Discovery and Development of Neuroprotective Agents from Natural Products*. Elsevier Inc., 237–320.
- [85] Moloudizargari, M., Mikaili, P., Aghajanshakeri, S., Asghari, M., and Shayegh, J. (2013). Pharmacological and therapeutic effects of *Peganum harmala* and its main alkaloids. *Pharmacognosy Reviews*, 7(14), 199–212.
- [86] Dai, J. and Mumper, R. J. (2010). Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, 15(10), 7313–7352.
- [87] Scholz, E. P., Zitron, E., Katus, H. A., and Karle, C. A. (2010). Cardiovascular ion channels as a molecular target of flavonoids. *Cardiovascular Therapeutics*, 28(4), 46–52.
- [88] Lu, C., Lin, T., Huang, S., and Wang, S. (2016). Echinacoside inhibits glutamate release by suppressing voltage-dependent Ca^{2+} entry and protein kinase C in rat cerebrocortical nerve terminals. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(7), 1006.
- [89] Chang, Y., Chang, C. Y., Wang, S. J., and Huang, S. K. (2015). Myricetin inhibits the release of glutamate in rat cerebrocortical nerve terminals. *Journal of Medicinal Food*, 18(5), 516–523.
- [90] Ara Gulshan, Afzal Mohammad, Jyoti Smita, S. Y. H. (2020). Effect of myricetin on the oxidative stress

- markers in the brain of transgenic flies expressing human alpha-synuclein. *International Journal of Nutrition, Pharmacology, Neurological Diseases*, 8, 41–46.
- [91] Liu, J., Yang, L., Dong, Y., Zhang, B., and Ma, X. (2018). Echinacoside, an inestimable natural product in treatment of neurological and other disorders. *Molecules*, 23(5), 1–23.
- [92] Joshi, V., Mishra, R., Upadhyay, A., Amanullah, A., Poluri, K. M., Singh, S., et al. (2019). Polyphenolic flavonoid (Myricetin) upregulated proteasomal degradation mechanisms: Eliminates neurodegenerative proteins aggregation. *Journal of Cellular Physiology*, 234(11), 20900–20914.
- [93] Shimmyo, Y., Kihara, T., Akaike, A., Niidome, T., and Sugimoto, H. (2008). Multifunction of myricetin on A β : Neuroprotection via a conformational change of A β and reduction of A β via the interference of secretases. *Journal of Neuroscience Research*, 86(2), 368–377.
- [94] Yi, Y. S. (2019). Roles of ginsenosides in inflammasome activation. *Journal of Ginseng Research*, 43(2), 172–178.
- [95] Özer, E. Ö., Tan, O. U., and Turkoglu, S. (2020). The structural diversity of ginsenosides affects their cholinesterase inhibitory potential. *Turkish Journal of Biochemistry*, 45(2), 1–9.
- [96] Biswas, T., Mathur, A. K., and Mathur, A. (2017). A literature update elucidating production of Panax ginsenosides with a special focus on strategies enriching the anti-neoplastic minor ginsenosides in ginseng preparations. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(10), 4009–4032.
- [97] Cao, X., Ye, Q., Fan, M., and Liu, C. (2019). Antimicrobial effects of the ginsenoside Rh2 on monospecies and multispecies cariogenic biofilms. 126(3), 740–751.
- [98] Lin, Z. Y., Chen, L. M., Zhang, J., Pan, X. D., Zhu, Y. G., Ye, Q. Y., et al. (2012). Ginsenoside Rb1 selectively inhibits the activity of L-type voltage-gated calcium channels in cultured rat hippocampal neurons. *Acta Pharmacologica Sinica*, 33(4), 438–444.
- [99] Nah, S. Y., Park, H. J., and McCleskey, E. W. (1995). A trace component of ginseng that inhibits Ca²⁺ channels through a pertussis toxin-sensitive G protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(19), 8739–8743.
- [100] Lee, J. H., Jeong, S. M., Kim, J. H., Lee, B. H., Yoon, I. S., Lee, J. H., et al. (2006). Effects of ginsenosides and their metabolites on voltage-dependent Ca²⁺ channel subtypes. *Molecules and Cells*, 21(1), 52–62.
- [101] Rausch, W. D., Liu, S., Gille, G., and Radad, K. (2006). Neuroprotective effects of ginsenosides. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, 66(4), 369–375.
- [102] Zheng, M., Xin, Y., Li, Y., Xu, F., Xi, X., Guo, H., et al. (2018). Ginsenosides: A potential neuroprotective agent. *BioMed Research International*, 2018, 1–11.
- [103] Hostettmann, K., Wolfender, J.-L., and Terreaux, C. (2001). Modern screening techniques for plant extracts. *Pharmaceutical Biology*, 39(sup1), 18–32.
- [104] Zare, L., Esmaili-Mahani, S., Abbasnejad, M., Rasouljan, B., Sheibani, V., Sahraei, H., et al. (2012). Oleuropein, chief constituent of olive leaf extract, prevents the development of morphine antinociceptive tolerance through inhibition of morphine-induced l-type calcium channel overexpression. *Phytotherapy Research*, 26(11), 1731–1737.
- [105] Schuwald, A. M., Nöldner, M., Wilmes, T., Klugbauer, N., Leuner, K., and Müller, W. E. (2013). Lavender Oil-Potent Anxiolytic Properties via Modulating Voltage Dependent Calcium Channels. *PLoS ONE*, 8(4), 1–9.
- [106] Dong, F., Jiang, H.-H., Yang, L., Gong, Y., Zi, C.-T., Yang, D., et al. (2018). Valepotriates from the roots and rhizomes of valeriana jatamansi jones as novel N-type calcium channel antagonists. *Frontiers in Pharmacology*, 9, 1–9.
- [107] Xu, B., Fu, Y., Liu, L., Lin, K., Zhao, X., Zhang, Y., et al. (2015). Effect of α -Alloxyptopine on delayed afterdepolarizations and triggered activities in mice cardiomyocytes treated with isoproterenol. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015, 1–9.
- [108] Medeiros, M. A. A., Pinho, J. F., De-Lira, D. P., Barbosa-Filho, J. M., Araújo, D. A. M., Cortes, S. F., et al. (2011). Curine, a bisbenzylisoquinoline alkaloid, blocks L-type Ca²⁺ channels and decreases intracellular Ca²⁺ transients in A7r5 cells. *European Journal of Pharmacology*, 669(1–3), 100–107.
- [109] Liu, K., Gui, B., Sun, Y., Shi, N., Gu, Z., Zhang, T., and Sun, X. (2013). Inhibition of L-type Ca²⁺ channels by curcumin requires a novel protein kinase-theta isoform in rat hippocampal neurons. *Cell Calcium*, 53(3), 195–203.
- [110] Roghani, M., Baluchnejadmojarad, T., and Roghani, F. (2006). The Involvement of L-type voltage-operated calcium channels in the vascular effect of quercetin in male rats. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 5(3), 199–202.
- [111] Chang, G. J., Chang, C. J., Chen, W. J., Yeh, Y. H., and Lee, H. Y. (2013). Electrophysiological and mechanical effects of caffeic acid phenethyl ester, a novel cardioprotective agent with antiarrhythmic activity, in guinea-pig heart. *European Journal of Pharmacology*, 702(1–3), 194–207.
- [112] Lu, C., Sun, Z., and Wang, L. (2015). Inhibition of L-type Ca²⁺ current by ginsenoside Rd in rat ventricular myocytes. *Journal of Ginseng Research*, 39(2), 169–177.
- [113] Bai, C. X., Takahashi, C., Masumiya, H., Sawanobori, T., and Furukawa, T. (2004). Nitric oxide-dependent modulation of the delayed rectifier K⁺ current and the L-type Ca²⁺ current by ginsenoside Re, an ingredient of

- Panax ginseng, in guinea-pig cardiomyocytes. *British Journal of Pharmacology*, 142 (3), 567–575.
- [114] Vasconcelos, C. M., Gondim, A. N., Cruz, J. S., Mafra, R. A., Silva, B. A., and Conde-Garcia, E. A. (2008). Aqueous leaf extract of *Averrhoa carambola* L. (Oxalidaceae) reduces both the inotropic effect of BAY K 8644 on the guinea pig atrium and the calcium current on GH3 cells. 18, 539–543.
- [115] Lin, T. Y., Lin, Y. W., Lu, C. W., Huang, S. K., and Wang, S. J. (2013). Berberine inhibits the release of glutamate in nerve terminals from rat cerebral cortex. *PLoS ONE*, 8 (6), e67215.
- [116] Lu, M., Föstl, J., Dreesen, J., and Knöpfel, T. (1994). P-type calcium channels are blocked by the alkaloid daurisoline. *NeuroReport*, 5, 1489–1492.
- [117] Kwan, C. Y. and Achike, F. I. (2002). Tetrandrine and related bis-benzylisoquinoline alkaloids from medicinal herbs: Cardiovascular effects and mechanisms of action. *Acta Pharmacologica Sinica*, 23(12), 1057–1068.
- [118] Mackie, K. and Hille, B. (1992). Cannabinoids inhibit N-type calcium channels in neuroblastoma-glioma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(9), 3825–3829.
- [119] Summanen, J., Vuorela, P., Rauha, J. P., Tammela, P., Marjamäki, K., Pasternack, M., et al. (2001). Effects of simple aromatic compounds and flavonoids on Ca²⁺ fluxes in rat pituitary GH 4C 1 cells. *European Journal of Pharmacology*, 414(2–3), 125–133.
- [120] Rajagopal, S. and Ponnusamy, M. (2017). Channelopathies: Application of Natural Products Using Nanotechnology. *Calcium Signaling: From Physiology to Diseases*. Singapore: Springer, 73–86.
- [121] Saravanaraman, P., Chinnadurai, R. K., and Boopathy, R. (2014). Why calcium channel blockers could be an elite choice in the treatment of Alzheimer's disease: A comprehensive review of evidences. *Reviews in the Neurosciences*, 25 (2), 231–246.
- [122] Shah, V. N., Chagot, B., and Chazin, W. J. (2017). Calcium-dependent regulation of ion channels. *Calcium Binding Proteins*, 1,(4), 203–212.
- [123] Wuis, E. W., Rijntjes, N. V. M., and Van der Kleijn, E. (1989). Whole-body autoradiography of 14C-dantrolene in the marmoset monkey. *Pharmacology and Toxicology*, 64(1), 156–158.
- [124] Lyden, P. and Wahlgren, N. G. (2000). Mechanisms of action of neuroprotectants in stroke. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*, 9(6), 9–14.
- [125] Lakhan, S. E., Caro, M., and Hadzimichalis, N. (2013). NMDA receptor activity in neuropsychiatric disorders. *Frontiers in Psychiatry*, 4, 1–7.
- [126] Kochegarov, A. A. (2003). Pharmacological modulators of voltage-gated calcium channels and their therapeutical application. *Cell Calcium*, 33(3), 145–162.
- [127] Arranz-Tagarro, J.-A., de los Ríos, C., García, A. G., and Padín, J.-F. (2014). Recent patents on calcium channel blockers: emphasis on CNS diseases. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 24(9), 959–977.
- [128] Yu, S., Li, Y., Chen, J., Zhang, Y., Tao, X., Dai, Q., et al. (2019). TAT-modified w-conotoxin MVIIA for crossing the blood-brain barrier. *Marine Drugs*, 17 (5), 286.
- [129] Bellacchio, E. (2013). Mechanism of neurotoxicity of prion and Alzheimer's disease-related proteins: Molecular insights from bioinformatically identified ω -conotoxin-like pharmacophores. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression*, 23(4), 355–373.
- [130] Menzler, S., Bikker, J. A., Suman-Chauhan, N., and Horwell, D. C. (2000). Design and biological evaluation of non-peptide analogues of omega-conotoxin MVIIA. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 10(4), 345–347.
- [131] Nimmrich, V. and Gross, G. (2012). P/Q-type calcium channel modulators. *British Journal of Pharmacology*, 167(4), 741–759.
- [132] Charalambous, K. and Wallace, B. A. (2011). NaChBac: The long lost sodium channel ancestor. *Biochemistry*, 50(32), 6742–6752.
- [133] Catterall, W. A. (1988) Structure and function of voltage-sensitive ion channels sulfotransferases. *Science*, 242(4875), 50–61.
- [134] Chen, R. J. Y., Chung, T. Y., Li, F. Y., Lin, N. H., and Tzen, J. T. C. (2009). Effect of sugar positions in ginsenosides and their inhibitory potency on Na⁺/K⁺-ATPase activity. *Acta Pharmacologica Sinica*, 30(1), 61–69.
- [135] Iftinca, M. C. (2011). Neuronal T-type calcium channels: what's new? Iftinca: T-type channel regulation. *Journal of Medicine and Life*, 4(2), 126–138.
- [136] Gurkoff, G. G., Shahlaie, K., Lyeth, B. G., and Berman, R. F. (2017). Voltage-gated calcium channel blockers for the treatment of traumatic brain injury. *New Therapeutics for Traumatic Brain Injury*. Academic Press, 179–197.
- [137] Teichert, R. and Olivera, B. (2010). Natural Products and Ion Channel Pharmacology. *Future Medicinal Chemistry*, 2(5), 731–744.

Biyosensörler

Merve Keskin^{1,*}, Fatma Arslan²

¹ Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, 11020, Bilecik, Türkiye

² Gazi Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, 06500, Ankara, Türkiye

Öne Çıkanlar

- Biyosensörler biyolojik bir algılayıcı ile fiziksel bir dönüştürücünün birleştirilmesiyle elde edilmiş cihazlardır.
- Hızlı, yüksek doğrulukta ve geniş ölçüm aralığında analiz yapılmasına olanak sağlarlar.
- Sağlıktan çevreye birçok alanda kullanılmaktadırlar.

Makale Bilgileri

Geliş: 21/11/2020

Kabul: 05/12/2020

Anahtar Kelimeler

Biyosensör,
Amperometri,
Enzim

Özet

Biyosensörler, analitlerin derişimi ile orantılı ölçülebilir sinyal elde edebilmek amacıyla bir biyolojik algılayıcı ve fiziksel dönüştürücü ile birleştirilmiş cihazlardır. Biyosensörler yüksek duyarlılık, hızlı cevap süresine sahip, basit ve ucuz cihazlardır. Bu nedenle biyosensörler teşhis ve tedavide birden çok kullanım alanına sahiptir. Biyosensörlerin çeşitli uygulamaları arasında gıda teknolojisi, biyoteknoloji, genetik mühendisliği, nanoteknoloji, kanser dâhil tıbbi teşhisler, enzim çalışmaları, antikor çalışmaları ve DNA çalışmaları bulunmaktadır. Biyosensörlerin tasarımında enzimler, nükleik asitler gibi biyomateriyaller kullanılabilir gibi doğrudan doku veya mikroorganizmaların da kullanılması mümkündür. Biyosensörlerin tasarımında farklı dönüştürücü türleri kullanılmakla birlikte yaygın olarak elektrokimyasal dönüştürücüler kullanılmaktadır. Biyosensörlerin kablosuz sistemlerle birleştirilerek uzaktan, hızlı, yüksek doğrulukta verilerin elde edilmesi de sağlanmaktadır.

Biosensors

Highlights

- Biosensors are devices obtained by combining a biological component and physical transducer.
- They allow fast, high accuracy and wide measurement range analysis.
- They are used in many areas from health to environment.

Article Info

Received: 21/11/2020

Accepted: 05/12/2020

Keywords

Biosensor,
Amperometry,
Enzyme

Abstract

Biosensors are devices combined with a biological sensor and a physical transducer in order to obtain a measurable signal proportional to the concentration of analyte. Biosensors are simple and inexpensive devices with high sensitivity and fast response time. Therefore, biosensors have multiple uses in diagnosis and treatment. Various applications of biosensors include food technology, biotechnology, genetic engineering, nanotechnology, and medical diagnostics including cancer, enzyme, antibody and DNA studies. Biomaterials such as enzymes and nucleic acids as well as tissues or microorganisms can be used in the design of biosensors. Although different types of transducers are used in the design of biosensors, electrochemical converters are widely used. Biosensors combined with wireless systems can provide remote, fast, high-accuracy data.



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

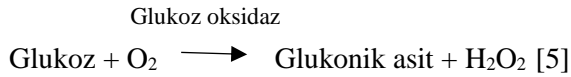
1. GİRİŞ

Biyosensörler, analitlerin derişimi ile orantılı ölçülebilir sinyal elde edebilmek amacıyla biyolojik algılayıcı ve fiziksel dönüştürücü ile birleştirilmiş cihazlardır. Biyolojik materyal tayin edilecek bileşen ile etkileşime girer. Elektrokimyasal, optik, kalorimetrik özelliklerdeki dönüştürücüler kullanılarak anlamlı sinyaller oluşturulur ve analitin miktarı tayin edilir [1].

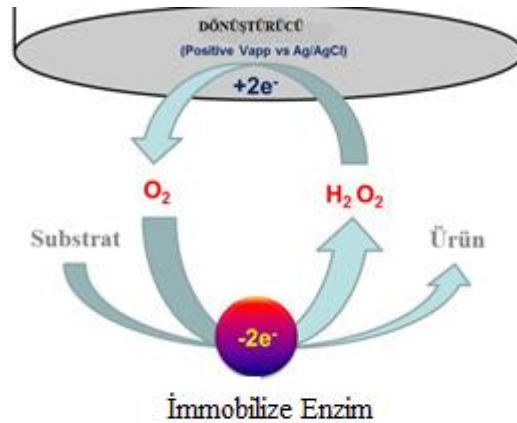
1962 yılında Clark ve Lyons'un enzim elektrotları geliştirmesinden sonra biyosensörler yoğun bir şekilde çalışılmış ve tıptan çevreye oldukça geniş alanlarda kullanılmaya başlanmıştır [2]. Biyosensörlerin tasarımında kofaktörler, enzimler, antijen-antikorlar, mikroorganizmalar, organeller, dokular ve hücreler gibi çeşitli biyolojik materyaller kullanılmaktadır [3, 4]. Bu biyolojik materyaller içerisinde enzimler yüksek duyarlılık ve özgüllükleri nedeniyle en fazla kullanım alanı olan biyomateryaldir [4].

2. BİYOSENSÖRLERİN TARİHÇESİ ve KARAKTERİSTİK ÖZELLİKLERİ

Biyosensörlerin tarihi 1950'li yılların ortalarına doğru L. C. Clark'ın kandaki oksijen miktarını bir elektrot vasıtasıyla ölçmesiyle başlamaktadır. 1962 yılında ise Clark ve Lyons oksijen elektrot ile glukoz oksidaz enzimini birleştirerek kandaki glukoz miktarını ölçmeyi başarmışlardır. Bu çalışmaların neticesinde yeni bir cihaz geliştirilmiştir. Elde edilen bu sistem yüksek spesifik özelliği olan biyolojik sistem ve yüksek tayin duyarlılığı olan fiziksel bir sistem ile birleştirilmiştir. Böylelikle geniş bir uygulama alanı bulmuştur.

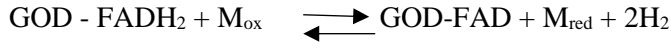


Biyolojik bir sıvıdaki glukoz ve oksijen elektrot etrafındaki zarı geçip elektrot yüzeyine ulaştığında, glukoz glukonik aside dönüşür ve bu esnada oksijen (O₂) harcanır. Ortamdaki glukoz tükendiğinde oksijen harcanması da durur (Şekil 1). Ortamda bulunan oksijen miktarı tepkime başında ve sonunda ölçülür ve aradaki fark hesaplanarak glukoz miktarı tespit edilir [6-8].



Şekil 1. Elektrot yüzeyinin şematik gösterimi [9]

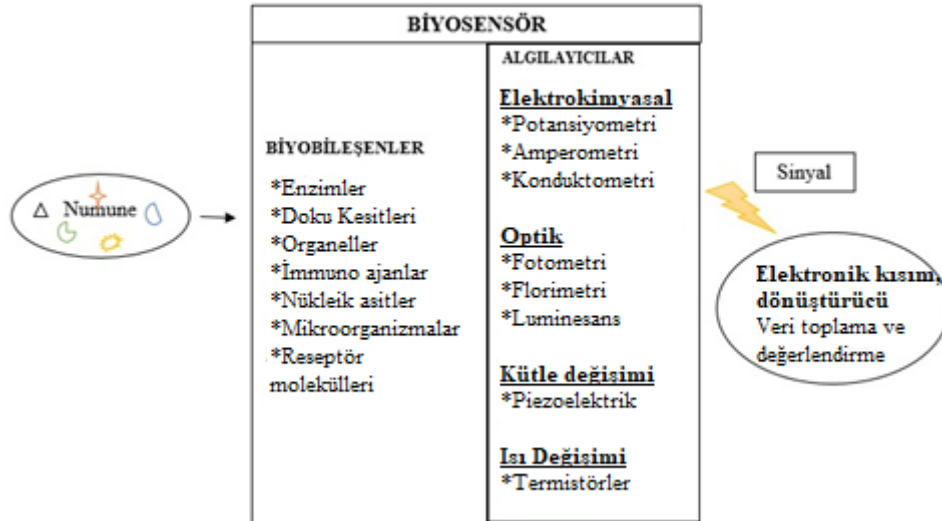
Klasik elektrokimya ile sadece anyon ve katyonları belirleyen sensörler hazırlanırken, sisteme biyolojik materyalin de dahil edilmesiyle birçok bileşenin tayin edilmesi mümkün olmaktadır. Clark ve Lyons tarafından geliştirilen ilk biyosensörde elektron alıcısı olarak oksijen kullanılırken, ikinci nesil biyosensörlerde oksijen yerine enzimin redoks merkezinden elektron yüzeyine elektron taşıyabilen bir redoks medyatörü kullanılmaya başlanmıştır [10-12].



$\text{M}_{\text{red}} = \text{M}_{\text{ox}}$ = redoks medyatörü

Biyosensörlerin çalışması sırasında öncelikle analit çözeltiliden biyosensör yüzeyine taşınır. Analitin taşınması difüzyon, karıştırma vb. gibi çeşitli şekillerde gerçekleşir [4]. Analit, biyobileşenin aktif bölgesine yayılır. Biyolojik bileşen, polimerik bir gözenekli zar (selülozik diyaliz zarı gibi) ile absorbe edilebilir veya sensör ile polimerik zar (selofan, selüloz, asetat / nitrat, polivinil alkol, poliüretan, vb.) arasına sıkıştırılabilir veya bir polimerik jelde tutulabilir. Bu hapsedme işlemi için akrilamid, jelatin ve agaroz gibi doğal veya sentetik polimerler kullanılabilir. Biyobileşen ve substrat arasında tepkime meydana gelir. Bu etkileşim sonucunda gaz molekülleri (O_2 , CO_2 , NH_3 vb.) serbest bırakılabilir veya kullanılabilir, seçici iyonlar oluşabilir (H^+ , NH_4^+ , diğer tek değerlikli anyon ve katyonlar), ısı oluşabilir veya azalabilir, optik yoğunluk değişebilir ve elektron serbest bırakılabilir veya kullanılabilir [13].

Biyobileşenler ve analit tepkimesi sonucu oluşan ürün sensör yüzeyine taşınır. Sensör yüzeyinde yukarıda belirtilen değişiklikler tespit edilir ve elektrik devreleri ile ölçülebilen bir büyüklüğe dönüştürülür (Şekil 2). Ölçülen elektrik sinyali, analit derişimiyle orantılıdır [13].



Şekil 2. Biyosensörlerin genel gösterimi

Her biyosensörün sahip olduğu belirli statik ve dinamik özellikler vardır. Bu özelliklerin optimizasyonu biyosensörün performansına yansır.

2.1. Seçicilik

Seçicilik, bir biyosensörün belki de en önemli özelliğidir. Seçicilik, bir biyoreseptörün içerisinde analit ve diğer bileşenleri içeren çözelti içerisindeki analite spesifik olmasıdır. Antijen-antikor ve enzim-substrat ilişkileri seçiciliğe en iyi örnekler [14].

2.2. Tekrar üretilebilirlik

Tekrar üretilebilirlik, biyosensörün, her çoğaltmada aynı yanıtları üretme yeteneğidir. Tekrar üretilebilirlik, bir biyosensördeki dönüştürücü ve elektroniklerin hassasiyeti ve doğruluğu ile karakterize edilir [14]. Doğruluk, sensörün bir numune her ölçüldüğünde benzer sonuçları sağlama yeteneğidir. Sensörün, bir

numune birden fazla kez ölçüldüğünde gerçek değere yakın bir ortalama değer sağlama kapasitesi tekrarlanabilirliği ifade etmekte ve tekrarlanabilir sinyaller, bir biyosensörün tepkisi üzerine yapılan çıkarıma yüksek güvenilirlik ve sağlamlık sağlar.

2.3. Kararlılık

Kararlılık, biyoalgılama sisteminin içindeki veya etrafındaki olumsuzluklarına karşı duyarlılık derecesidir. Bu olumsuzluklar ölçüm altındaki bir biyosensörün çıkış sinyallerinde kaymaya neden olabilir. Bunun neticesinde ölçülen derişimde biyosensörün hassasiyet ve doğruluğunda hatalar olabilir. Sensörün kararlı bir şekilde yanıt vermesini sağlamak için elektronik kısmın ayarlanması iyi yapılmalı ve sistemin takip edilmesi gerekir [14].

2.4. Duyarlılık

Bir biyosensör tarafından tespit edilebilecek minimum analit miktarı, tespit limitini (LOD) veya hassasiyetini tanımlar. Bir dizi tıbbi ve çevresel izleme uygulamasında, analiti tespit etmek için bir biyosensörün kullanılması gerekmektedir. Bir numunedeki analit kalıntılarının varlığını doğrulamak için ng/ml hatta daha düşük derişimlerdeki analit miktarlarını ölçebilmek gerekmektedir [14].

2.5. Doğrusallık

Doğrusallık, farklı ölçümlere sahip bir dizi ölçüm için ölçülen yanıtın doğruluğunu gösteren özelliktir. Doğrusallık matematiksel olarak $y=mc$ (y çıkış sinyali, m biyosensörün duyarlılığı ve c analitin derişimi) olarak ifade edilir. Biyosensörün doğrusallığı, biyosensörün çözünürlüğü ve ölçülecek analitin derişimi ile orantılıdır. Biyosensörün çözünürlüğü yanıtta bir değişiklik getirmek için gerekli olan bir analit derişimindeki en düşük miktar olarak tanımlanır. Uygulamaya bağlı olarak, iyi bir biyosensör çözünürlüğü sadece analit tayini için değil aynı zamanda analiti geniş bir çalışma aralığında tespit edebilmek için gereklidir. Doğrusallık ile ilişkili diğer bir terim ise doğrusal aralıktır. Bu aralık biyosensör yanıtının analit derişimi ile doğrusal olarak değiştiği aralık olarak tanımlanır [14].

3. BİYOSENSÖRLERİN SINIFLANDIRILMASI

Mühendislik, kimya, biyoloji gibi çoklu disiplinler çalışmaları neticesinde ortaya çıkan biyosensörlerin sınıflandırılması biyobileşene veya ölçüm yöntemine göre çeşitli şekillerde yapılabilmektedir.

3.1. Biyosensörlerin Biyobileşene Göre Sınıflandırılması

Biyosensörlerin tasarımında enzimler, nükleik asitler, antikolarlar, doku ve organeller, nükleik asitler, mikroorganizmalar gibi çeşitli biyobileşenler kullanılmaktadır [15].

Biyosensörleri biyobileşenlerine göre dört sınıfta incelemek mümkündür.

1. Enzim biyosensörleri
2. Mikrobiyal biyosensörler
3. Nükleik asit biyosensörleri
4. İmmünsensörler

3.1.1. Enzim biyosensörleri

Biyosensör tasarımında biyobileşen olarak enzimlerin kullanıldığı biyosensörlerdir. Biyosensör teknolojisindeki ilk çalışmaların enzim biyosensörleriyle başladığı görülmektedir [16]. Enzimler katalitik işlevi olan genellikle protein yapısında olan biyomoleküllerdir. Katalitik tepkime esnasında enzim-substrat kompleksi oluşur ve tepkime sonunda oluşan ürün biyosensör tarafından doğrudan veya dolaylı olarak ölçülebilen sinyallerin oluşumunu sağlar. Enzimlerin yüksek spesifikliği, enzim-substrat etkileşimi ile

tepkimelerin meydana gelmesi, biyokatalizin oldukça hızlı ve %100 verimle gerçekleşmesi enzim biyosensörlerinin kullanım alanlarını genişletmektedir [17-23]. *Çizelge 1*'de biyosensör uygulamalarında oldukça önemli bir yeri olan asetilkolin estereaz enzimi kullanılarak hazırlanan biyosensörlere örnekler verilmiştir.

Çizelge 1. Asetilkolin estereaz enzimi kullanılarak hazırlanan biyosensörler

Tayin Yöntemi	Dönüştürücü	Enzim İmmobilizasyon Türü	En Düşük Tayin Limiti (μM)	Doğrusal Aralık (μM)	Substrat, İnhibitör	İnkübasyon Süresi (Gün)	Raf Ömrü (Gün)	Kaynak
Potansiyometrik	Nylon ve selüloz nitrat/pH elektrot	Çapraz bağlama	0,038 0,077	50×10^3 – $2,5 \times 10^3$ – 50×10^3 – $2,5 \times 10^3$	Triklorfon, Co-Ral	15	30 15	[24]
Fiber-optik	Glass/sol-gel/polivinil	Çapraz bağlama	0,53 0,023	0,54–39,8 0,022–0,13	Carbaryl, diklorovos	10	21	[25]
Amperometrik	PAN/AuNPs/Pt elektrot	Kovalent bağlama	$0,026 \times 10^{-5}$	$3,6 \times 10^{-7}$ – $3,6 \times 10^{-4}$	Parakson	20	30	[26]
Konduktometrik	$\text{Si}_3\text{N}_4/\text{Ti}$ tabaka	Çapraz bağlama	10 ppb	-	Zn^+ , Cd^+	30	20	[27]
Amperometrik	Hibrid mezoporöz silika/Pt elektrot	Tutuklama	$1,2 \times 10^{-3}$	$1,0 \times 10^{-3}$ – 0,3	DZN-okson	15	80	[28]
Amperometrik	MWCNTs/PAN/Pt elektrot	Konkanavalin A ile afinite bağlanma	$5,0 \times 10^{-9}$	$3,6 \times 10^{-8}$ – $3,6 \times 10^{-5}$	Parokson	20	120	[29]
Amperometrik	Poliakrilamid/pH elektrot	Çapraz bağlama	$3,62 \times 10^3$	-	Diklorovos	30	50	[30]
Amperometrik	PVA-SbQ/Pt elektrot	Tutuklama	$7,2 \times 10^{-5}$, 0,049	-	Parakson, tifenilsulforon metil	30	50	[31]
Potansiyometrik	Gözenekli cam/ H^+ elektrot	Çapraz bağlama	2×10^{-1} ^0M	10^{-11} – 10^{-4} M	Organofosfor bileşikleri	30	-	[32]
Amperometrik	Selofan/AuE	Çapraz bağlama	1,45	1,45–7,26	Parokson	15	-	[33]

3.1.2. Mikrobiyal biyosensörler

Biyosensör tasarımında biyobileşen olarak mikroorganizmaların kullanıldığı biyosensörlerdir. Biyolojik sensör olarak kullanılan mikroorganizmalar kimyasal madde saptama konusunda kapsamlı avantajlara sahiptir. Enzimler biyosensör üretiminde en çok kullanılan biyolojik anlamda duyarlılığı çok yüksek yapılardır. Saflaştırılmış enzimler substratları veya inhibitörleri için özgül olsa da, saflaştırma işlemleri yorucu, zaman alıcı ve yüksek maliyetlidir. Mikroorganizmalar bu engellere ideal bir alternatif sunarlar. Enzimler doğal ortamlarda bulunacaklarından dış etkilere karşı daha dayanıklıdır. Koenzimle çalışan enzimler için dışarıdan koenzim ilavesi gerekmez, ayrıca koenzimlerin rejenarasyonu da hücre içinde gerçekleşir. Enzim elektrotlarından genelde daha uzun ömürlüdürler. Ayrıca intrasellüler enzimler durumunda tek enzim yerine birçok enzimin katıldığı bir tepkime dizisi incelenecekse enzim yerine hücre kullanılması yine önemli bir avantajdır. Mikroorganizma kullanımının dezavantajlı tarafları da vardır.

Hücre membranı bir difüzyon bariyeri oluşturduğundan makromoleküller ve membrandan geçemeyen moleküller için uygun biyosensörler hazırlanamaz. Mikrobiyal biyosensörlerin cevap süresi ve kullanımdan sonra temel sinyal düzeyine dönüş süresi enzim sensörlerinden uzundur. Hücre birçok enzim içerdiğinden hedeflenen tayin tepkimesinin diğer enzimler tarafından etkilenmesi söz konusu olabilir [34].

İmmobilizasyon sırasında yaşanabilecek aktivite düşmesi ve kontaminasyon da önemli sorunların başında gelir.

3.1.3. Nükleik asit biyosensörleri

Biyosensör tasarımında biyobileşen olarak nükleik asitlerin kullanıldığı biyosensörlerdir. DNA biyosensörleri, geleneksel hibridizasyon deneylerine kıyasla insan, viral ve bakteriyel nükleik asitte diziye özgü bilgilerin daha hızlı, daha basit ve daha ucuz bir şekilde elde edilmesi için önemli bir umut vaat etmektedir. Bir DNA hibridizasyon biyosensörünün geliştirilmesi, geniş ölçekli patojen tespiti ve moleküler teşhiste önemli yer tutmaktadır [35-38].

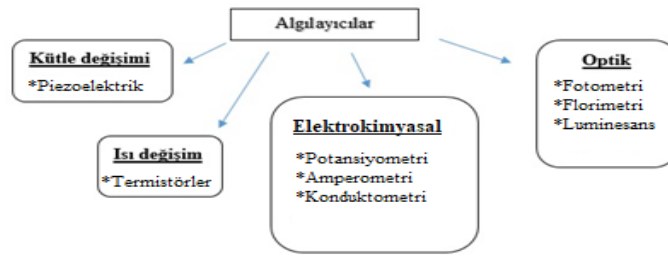
DNA tanıma yüzeyleri, dizisi belli hibridizasyon olaylarının izlenmesinde veya bu yüzey ile etkileşime giren analizlenecek maddelerin (karsinojen maddeler, ilaçlar, vb.) tayininde kullanılır. DNA biyosensörlerinin temeli, aranan hedefin baz dizisinin karşılığı olan 20–40 baz gibi kısa bir baz dizimine sahip olan sentetik tek sarmallı DNA (ssDNA) oligomerin (veya “prob“ olarak isimlendirilir), hedef diziyle hibridizasyonuna dayanmaktadır [35].

3.1.4. İmmünsensörler

Biyosensör tasarımında biyobileşen olarak antikorların kullanıldığı biyosensörlerdir. Antikorlar immün sistem tarafından üretilen glikoproteinlerdir. Bu biyosensör türü antikor-antijen etkileşimine dayanarak hazırlanır [39].

3.2. Biyosensörlerin Dönüştürme Araçlarına Göre Sınıflandırılması

Biyosensörler dönüştürme araçlarına göre dört gruba ayırmak mümkündür. Şekil 3’de dönüştürücüler (algılayıcı) özetlenmiştir.



Şekil 3. Algılayıcı türleri

3.2.1. Elektrokimyasal biyosensörler

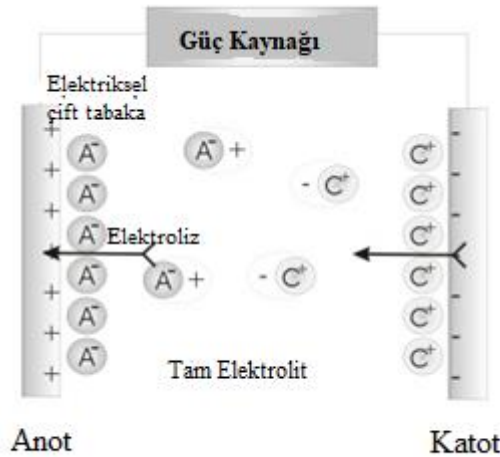
Elektrokimyasal biyosensörler basit, taşınabilir, kısa sürede cevap verme, yüksek duyarlılık, ucuz oluşları, spesifik ve seçici olmaları bakımından termal, optik, piezoelektrik biyosensörlere göre ilaç sanayisinden çevreye kadar geniş bir skalada uygulama alanı bulmaktadırlar. Kimyasal değişikliğin derişim ile orantılı elektrik sinyallerine dönüşmesi neticesinde elde edilen elektrokimyasal biyosensörlerin tasarımında genellikle altın, gümüş, karbon veya platinden elde edilen elektrotlar kullanılmaktadır [40]. Amperometrik, potansiyometrik, kondüktometrik biyosensörler elektrokimyasal biyosensörlere örnektir.

Amperometri genellikle belirli bir potansiyelde akım gücünün ölçülmesine dayanır. Bu akım yoğunluğu, çalışan elektrotta oksitlenen veya indirgenen elektroaktif türlerin derişiminin bir fonksiyonu olarak tanımlanır. İkinci elektrot, referans elektrot görevi görür. Kalibrasyondan sonra, ilgili türlerin derişimlerini belirlemek için akım yoğunlukları kullanılır. Verici sistem olarak amperometrik sensör kullanılması durumunda potansiyometrik sensörlerden en büyük farkı, ürünlerden sinyal üreten türlerin elektrot yüzeyinde tüketilmesidir [41].

Potansiyometri, genellikle çalışma elektrodu ve referans elektrot arasındaki potansiyel farkın ölçümüne dayanır. Elektrot potansiyelinin belirlenmesi, doğrudan analit derişimini tanımlar. Potansiyometrik biyosensörlerde kullanılan elektrotlar genellikle pH' ya veya tek değerlikli iyonlara duyarlı cam elektrotlar, anyonlara veya katyonlara duyarlı iyon seçici elektrotlar veya karbondioksit, amonyak vb. gazların tayini için gaza duyarlı elektrotlardır [42].

Hava nemi ve belirli gazların derişiminin belirlenmesinde genellikle konduktometrik biyosensörler kullanılır. Konduktometrik biyosensörler amperometrik ve potansiyometrik biyosensörlere göre daha az uygulama alanı bulmakla birlikte analiz esnasında referans elektrot kullanılmaması, düşük voltajda çalışmaları, ışığa duyarlı olmaları konduktometrik biyosensörlerin avantajlarından [43].

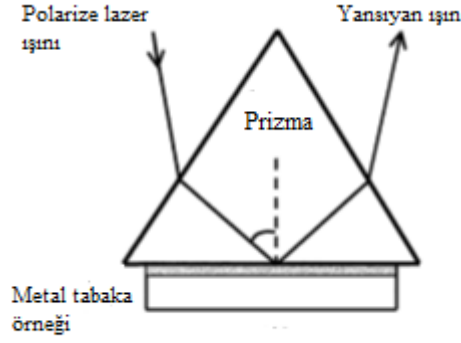
Sıvıların iletkenliğinin temel alındığı biyosensörde iyonların göçü söz konusudur. Çözelti içerisinde potansiyel uygulandığında bir elektrik alanı oluşur ve iyon göçü başlar. Şekil 4'te çözelti ortamında iyonların göçü özetlenmiştir.



Şekil 4. Çözelti ortamında iyonların göçü [44]

3.2.2. Optik biyosensörler

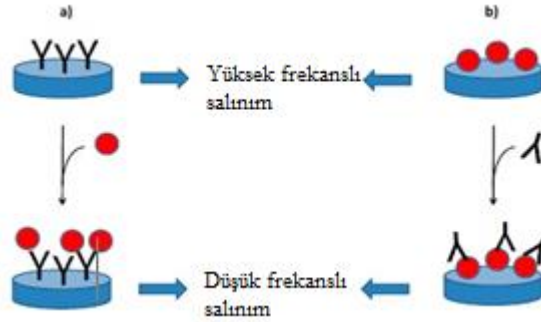
Işının absorblanması, kırılması, yansınması, dağılması ya da parlaklığından faydalanarak geliştirilen dönüştürücü türüdür (Şekil 5). Çalışmalarda referans elektrot kullanılmaz. Uzun mesafeli kullanımlarda optik fiberlerin kullanımı mümkün olduğundan biyoalıcı ile yakın temasta olmasına gerek yoktur ve *in vivo* çalışmalarda kolaylıkla minimize edilebilir. Optik metotlar en fazla uygulama alanı bulan dönüştürücülerden biridir [45].



Şekil 5. Optik dönüştürücülerin çalışma mekanizması [45]

3.2.3. Piezoelektrik biyosensörler

Piezoelektrik etki mekanik olarak gerilen bir yüzeyin voltaj üretmesi anlamına gelmektedir. Bir piezoelektrik malzemenin yüzeyine verilen voltajın değişimi sonrasında mekanik stres veya salınım meydana gelmektedir. Bu değişim kütle ile orantılıdır (Şekil 6). Analitik sensörlerin tasarlanmasında oldukça fazla uygulama alanı bulur [46].



Şekil 6. Piezoelektrik biyosensörlerin çalışma mekanizması a) antijen b) antikor [46].

3.2.4. Termal biyosensörler

Kalorimetrik biyosensör olarak da adlandırılan termal biyosensörler biyomateryal ile termometre gibi fiziksel bir dönüştürücü ile birleştirilmesi ile geliştirilmişlerdir. Meydana gelen ısı değişiklikleri takip edilerek enzim aktivitesi ölçümleri, klinik izleme, süreç kontrol, susuz ortam ölçümleri ve çevresel izlemelerde termal tabanlı kalorimetrik biyosensörlerin kullanımı mümkündür [47].

Biyosensörler yüksek duyarlılıklı, hızlı cevap süresine sahip, basit ve ucuz cihazlardır. Bu nedenle sağlıktan çevreye birçok alanda kullanılmaktadırlar. Gelişen teknoloji ile kablosuz biyosensörler tasarlanmakta ve özellikle sağlık alanında hastaların tanı ve takibinde yer almaktadırlar. Bu nedenle farklı biyosensörlerin tasarımı ve bu biyosensörlerin kullanımı önem arz etmektedir. Son yıllarda *in vivo* kullanıma uygun kablosuz biyosensörler tasarlanmaktadır. 50' li yıllarda Clark ve Lyons glukozu *in vitro* ortamda tayin etmiş ve ilerleyen yıllarda bu tayini temel alarak kişiye özel ticari şeker ölçüm cihazları tasarlanmıştır. Günümüzde ise enerjisini vücut içerisindeki kimyasal değişimlerden, kanın pompalanmasından, soluk alıp vermektan veya vücut hareketlerinden alan vücut içi biyosensörler tasarlanmaktadır. Vücuda yerleştirilen mikroçipler sayesinde elektronik ortama (cep telefonu, bilgisayar vb.) aktarılan veriler ile vücut içerisinde miktarı belirlenmek istenen bileşenin tayini yapılabilmektedir. Kablosuz biyosensörler hızla gelişen, ağ

şebekeleriyle bağlantılı sürekli ve giyilebilir biyosensörlerdir. Bu nedenlerden dolayı kablosuz biyosensörler hastane ortamında veya günlük yaşamda hastalık belirteçlerini takip etmede kolaylık sağlar.

ÇIKAR ÇATIŞMASI/ÇAKIŞMASI BİLDİRİMİ

Yazarlar arasında çıkar çatışması/çakışması bulunmamaktadır.

KAYNAKLAR

- [1] Kissinger, P. T. (2005). Biosensors—A perspective. *Biosensors and Bioelectronics*, 20(12), 2512-2516.
- [2] Burçin, B. O. Z., Paylan, İ. C., Kızmaz, M. Z. ve Erkan, S. (2017). Biyosensörler ve tarım alanında kullanımı. *Tarım Makinaları Bilimi Dergisi*, 13(3), 141-148.
- [3] Luong, J. H. T., Mulchandani, A., and Guilbault, G. G. (1988). Developments and applications of biosensors. *Trends in Biotechnology*, 6(12), 310-316
- [4] Newman, J. D. and Turner, A. P. (2005). Home blood glucose biosensors: a commercial perspective. *Biosensors and bioelectronics*, 20(12), 2435-2453
- [5] Arslan, H., Özdemir, M., Zengin, H., and Zengin, G. (2012). Glucose biosensing at carbon paste electrodes containing polyaniline-silicon dioxide composite. *International Journal of Electrochemical Science*, 7(10), 10205-10214.
- [6] Donmez, S., Arslan, F., Sarı, N., Hasanoğlu Özkan, E., and Arslan, H. (2017). Glucose biosensor based on immobilization of glucose oxidase on a carbon paste electrode modified with microsphere-attached l-glycine. *Biotechnology and applied biochemistry*, 64(5), 745-753.
- [7] Arslan, F., Ustabaş, S., and Arslan, H. (2011). An amperometric biosensor for glucose determination prepared from glucose oxidase immobilized in polyaniline-polyvinylsulfonate film. *Sensors*, 11(8), 8152-8163.
- [8] Dönmez, S., Arslan, F., Sarı, N., Yetim, N. K., and Arslan, H. (2014). Preparation of carbon paste electrodes including poly (styrene) attached glycine-Pt (IV) for amperometric detection of glucose. *Biosensors and Bioelectronics*, 54, 146-150.
- [9] Rocchitta, G., Spanu, A., Babudieri, S., Latte, G., Madeddu, G., Galleri, G., and Manetti, R. (2016). Enzyme biosensors for biomedical applications: Strategies for safeguarding analytical performances in biological fluids. *Sensors*, 16(6), 780.
- [10] Baskin, R., Koyuncu, E., Arslan, H., and Arslan, F. (2020). Development of choline biosensor using toluidine blue O as mediator. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 50(3), 240-245.
- [11] Çolak, Ö. and Arslan, F. (2015). Amperometric biosensing of ethanol based on integration of alcohol dehydrogenase with a Pt/PPy--PVS/MB electrode. *Turkish Journal of Chemistry*, 39(1), 84-95.
- [12] Arslan, H., Ünal, K., Koyuncu, E. A., Yildirim, E., and Arslan, F. (2020). Development of a novel phenylalanine biosensor for diagnosis of phenylketonuria. *IEEE Sensors Journal*, 20(20), 12127-12133.
- [13] Su, L., Jia, W., Hou, C., and Lei, Y. (2011). Microbial biosensors: A review. *Biosensors and Bioelectronics*, 26(5), 1788-1799.
- [14] Nikhil, B., Pawan, J., Nello, F., and Pedro, E. (2016). Introduction to biosensors. *Essays in Biochemistry*, 60(1), 1-8.
- [15] Shukla, S. K., Govender, P. P., and Tiwari, A. (2016). Polymeric micellar structures for biosensor technology. *Advances in Biomembranes and Lipid Self-Assembly*, Vol. 24, pp. 143-161. Academic Press.
- [16] Clark Jr, L. C., and Lyons, C. (1962). Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Annals of The New York Academy of Sciences*, 102(1), 29-45.
- [17] Özdemir, M. and Arslan, H. (2014). Choline-sensing carbon paste electrode containing polyaniline (pani)-silicon dioxide composite-modified choline oxidase. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 42(1), 27-31.
- [18] Nguyen, H. H., Lee, S. H., Lee, U. J., Fermin, C. D., and Kim, M. (2019). Immobilized enzymes in biosensor applications. *Materials*, 12(1), 121.
- [19] Özer, B. O. and Çete, S. (2017). Development of a novel biosensor based on a polypyrrole-dodecylbenzene sulphonate (PPy-DBS) film for the determination of amperometric cholesterol. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 45(4), 824-832.
- [20] Çete, S., Yaşar, A., and Arslan, F. (2006). An amperometric biosensor for uric acid determination prepared from uricase immobilized in polypyrrole film. *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology*, 34(3), 367-380.
- [21] Yıldırımöğlü, F., Arslan, F., Çete, S., and Yaşar, A. (2009). Preparation of a polypyrrole-polyvinylsulphonate composite film biosensor for determination of cholesterol based on entrapment of cholesterol oxidase. *Sensors*, 9(8), 6435-6445.
- [22] Dolmacı, N., Çete, S., Arslan, F., and Yaşar, A. (2012). An amperometric biosensor for fish freshness detection from xanthine oxidase immobilized in polypyrrole-polyvinylsulphonate film. *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology*, 40(4), 275-279.

- [23] Çolak, Ö., Yaşar, A., Çete, S., and Arslan, F. (2012). Glucose biosensor based on the immobilization of glucose oxidase on electrochemically synthesized polypyrrole-poly (vinyl sulphonate) composite film by cross-linking with glutaraldehyde. *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology*, 40(5), 354-361.
- [24] Ivanov, A. N., Evtugyn, G. A., Gyurcsányi, R. E., Toth, K., and Budnikov, H. C. (2000). Comparative investigation of electrochemical cholinesterase biosensors for pesticide determination. *Analytica Chimica Acta*, 404(1), 55-65.
- [25] Andreou, V. G. and Clonis, Y. D. (2002). A portable fiber-optic pesticide biosensor based on immobilized cholinesterase and sol-gel entrapped bromocresol purple for in-field use. *Biosensors and Bioelectronics*, 17(1-2), 61-69.
- [26] Marinov, I., Ivanov, Y., Gabrovska, K., and Godjevargova, T. (2010). Amperometric acetylthiocholine sensor based on acetylcholinesterase immobilized on nanostructured polymer membrane containing gold nanoparticles. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 62(1), 66-74.
- [27] Chouteau, C., Dzyadevych, S., Durrieu, C., and Chovelon, J. M. (2005). A bi-enzymatic whole cell conductometric biosensor for heavy metal ions and pesticides detection in water samples. *Biosensors and Bioelectronics*, 21(2), 273-281.
- [28] Shimomura, T., Itoh, T., Sumiya, T., Mizukami, F., and Ono, M. (2009). Amperometric biosensor based on enzymes immobilized in hybrid mesoporous membranes for the determination of acetylcholine. *Enzyme and Microbial Technology*, 45(6-7), 443-448.
- [29] Ivanov, Y., Marinov, I., Gabrovska, K., Dimcheva, N., and Godjevargova, T. (2010). Amperometric biosensor based on a site-specific immobilization of acetylcholinesterase via affinity bonds on a nanostructured polymer membrane with integrated multiwall carbon nanotubes. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 63(3-4), 141-148.
- [30] Stein, K. and Schwedt, G. (1993). Comparison of immobilization methods for the development of an acetylcholinesterase biosensor. *Analytica chimica acta*, 272(1), 73-81.
- [31] Marty, J. L., Mionetto, N., Noguier, T., Ortega, F., and Roux, C. (1993). Enzyme sensors for the detection of pesticides. *Biosensors and Bioelectronics*, 8(6), 273-280.
- [32] Lee, H. S., Kim, Y. A., Cho, Y. A., and Lee, Y. T. (2002). Oxidation of organophosphorus pesticides for the sensitive detection by a cholinesterase-based biosensor. *Chemosphere*, 46(4), 571-576.
- [33] Rekha, K. and Murthy, B. N. (2008). Studies on the immobilisation of acetylcholine esterase enzyme for biosensor applications. *Food and Agricultural Immunology*, 19(4), 273-281.
- [34] Li, Yanbin. (2006). Biosensors, *CIGR Handbook of Agricultural Engineering USA, ASABE. Copyright American Society of Agricultural Engineers*, 52-93.
- [35] Sassolas, A., Leca-Bouvier, B. D., and Blum, L. J. (2008). DNA biosensors and microarrays. *Chemical Reviews*, 108(1), 109-139.
- [36] Donmez, S., Arslan, F., and Arslan, H. (2015). A nucleic acid biosensor for detection of hepatitis C virus genotype 1a using poly (l-glutamic acid)-modified electrode. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 176(5), 1431-1444.
- [37] Yesil, M., Donmez, S., and Arslan, F. (2016). Development of an electrochemical DNA biosensor for detection of specific *Mycobacterium tuberculosis* sequence based on poly (L-glutamic acid) modified electrode. *Journal of Chemical Sciences*, 128(11), 1823-1829.
- [38] Donmez, S., Çağdaş, L., Arslan, H., and Arslan, F. (2019). Electrochemical nucleic acid hybridization biosensor based on poly (L-Aspartic acid)-modified electrode for the detection of short oligonucleotide sequences related to hepatitis C virus 1a. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 49(9), 900-907.
- [39] Hartwell, S. K. and Grudpan, K. (2010). Flow based immuno/bioassay and trends in micro-immuno/biosensors. *Microchimica Acta*, 169(3-4), 201-220.
- [40] Heinemann, W. R., Anderson, C. W., and Halsall H. B. (1979). Immunoassay by differential pulse polarography. *Science Wash*, 204, 865-866
- [41] Pizzariello, A., Stredanský, M., Stredanská, S., and Miertuš, S. (2001). Urea biosensor based on amperometric pH-sensing with hematein as a pH-sensitive redox mediator. *Talanta*, 54(4), 763-772.
- [42] Cass, E. A. G., (1990). *Biosensors: A Practical Approach*. Oxford, UK, Oxford University Press.
- [43] Soldatkin, O. O., Kucherenko, I. S., Pyeshkova, V. M., Kukla, A. L., Jaffrezic-Renault, N., El'Skaya, A. V., and Soldatkin, A. P. (2012). Novel conductometric biosensor based on three-enzyme system for selective determination of heavy metal ions. *Bioelectrochemistry*, 83, 25-30.
- [44] Jaffrezic-Renault, N. and Dzyadevych, S. V. (2008). Conductometric microbiosensors for environmental monitoring. *Sensors*, 8(4), 2569-2588.
- [45] Marazuola, M. and Moreno-Bondi, M. (2002). Fiber-optic biosensors—An overview. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 372(5-6), 664-682.
- [46] Pohanka, M. (2018). Overview of piezoelectric biosensors, immunosensors and DNA sensors and their applications. *Materials*, 11(3), 448.
- [47] Yakovleva, M., Bhand, S., and Danielsson, B. (2013). The enzyme thermistor—A realistic biosensor concept. A critical review. *Analytica Chimica Acta*, 766, 1-12.

Yazım Kuralları

Araştırma Makalesi: Orijinal bir araştırmayı bulgu ve sonuçlarıyla yansıtan yazılardır. Çalışmanın özgün ve ulusal bilime katkısı olmalıdır.

Derleme Makalesi: Yeterli sayıda bilimsel makaleyi tarayıp, konuyu bugünkü bilgi ve teknoloji düzeyinde özetleyen, değerlendirme yapan ve bulguları karşılaştırarak yorumlayan yazılardır. Derleme makalelerde, ağırlıklı olarak son 5 yıla ait kaynaklar kullanılmalıdır.

Makale başvurusu yapılırken beş dosyanın yüklenmesi gerekmektedir:

1- Kapak sayfası:

Makale başlığı her kelimenin ilk harfi büyük ve diğerleri küçük harflerle sayfaya ortalı olarak yazılmalıdır. Yazar ya da yazarlarının adı – soyadı ve ORCID numaraları yazılmalıdır. Şablona, “Kapak Sayfası” bağlantısına tıklayarak ulaşabilirsiniz.

2- **Kontrol Sayfası:** “Makale Kontrol Formu” doldurulmalıdır. İlgili Forma, Kontrol Listesi Formu bağlantısına tıklayarak ulaşabilirsiniz. Bu formun doldurulmadığı ve Dergi formatına uygun olmayan makaleler değerlendirilmeye alınmayacaktır.

3- **Makale metni:** Dergi yazım kurallarına ve makale şablonuna uygun olarak hazırlanan makale metni yüklenmelidir. İlgili şablona ulaşmak için “Makale şablonu” bağlantısına tıklanmalıdır.

4- **Telif Hakkı Devir Formu:** Makalelerin telif hakkı devri için doldurulması gereken Telif hakkı devir formunun tüm yazarlar tarafından imzalanması gerekmektedir. Forma, “Telif Hakkı Devir Formu” bağlantısına tıklayarak ulaşabilirsiniz. Yazarlar tarafından imzalandıktan sonra tarayıcıdan geçirilmeli ve elektronik dosya olarak yüklenmelidir. Bu formun farklı kopyaları başka şehirlerde yaşayan yazar(lar) tarafından ayrı ayrı imzalanıp sisteme yüklenebilir. Makale basım için kabul edilmezse, telif devir formunun yasal bir önemi kalmaz ve hükümsüz olarak kabul edilir.

5. Hakem Öneri Formu: En az 2 en fazla 4 hakem önerilmesi gerekmektedir.

Makale Yazım Kuralları

MAKALENİN HAZIRLANMASI

- Başvuru yapılan eserlerde yazarlarla ilgili bilgiler hariç, diğer tüm bölümler “Makale Hazırlama” bölümünde verilen detaylar göz önünü alınarak hazırlanmalıdır.

Dergiye gönderilecek makaleler, Microsoft Office Word 2010 ve üzeri bir kelime işlemci ile hazırlanması gerekmektedir. Tüm bölümler Times New Roman karakterinde 11 punto ile, sağa ve sola dayalı olarak satır aralıkları tek olarak ayarlanmalı **Kaynaklar** ise Times New Roman karakterinde 10 punto sağa ve sola dayalı olarak satır aralıkları tek olarak ayarlanmalıdır. Her paragraf arasında bir satır boşluk bırakılmalı, paragraf başlarında içerden başlanmamalıdır (Tab tuşu kullanılmamalıdır). Araştırma makaleleri, çizelge ve şekiller dâhil toplam 22 sayfayı, derleme makaleler de 30 sayfayı geçmemelidir. Editör, makalelerin kısaltılmasını isteyebilir.

Türkçe Makale başlığı; Times New Roman, 14 punto (koyu olmayacak) ile başlığın sadece ilk harfi büyük olacak şekilde sayfa ortalanarak yazılmalıdır. Yazar adı veya adları; ünvan belirtilmeden, İsim ve Soyad’ın tamamı büyük harf ile, birden fazla yazarlarda aralarına virgül konularak, Times New Roman, 11 punto, koyu ve sayfa ortalanarak yazılmalıdır. Yazarın/ların adresi/leri; Yazar adının hemen altına boşluk bırakılmadan, Times New Roman, 10 punto ve italik olarak yazılmalıdır. Adresleri aynı olan yazarlar için tek adres, farklı yazar adresleri alt alta boşluk bırakılmadan yazılmalıdır. Sorumlu

yazarının bilgileri; Ünvanlı Ad SOYAD ve e-mail adresi, aralarına virgül konularak 1. sayfanın altına dipnot olarak, Times New Roman, 8 punto ile yazılmalıdır.

Makale Metni:

Türkçe özet; Çalışmanın amacını, temel ve önemli sonuçlarını içermelidir. Özet ve Abstract metni Times New Roman yazı karakterinde, 8 punto ve *italik* olarak yazılmalıdır. En fazla 200 kelime olmalıdır. Özet/Abstract, Öne çıkanlar/Highlights başlıkları ve İngilizce Makale Adı (Manuscript Title) Times New Roman, 11 punto ve **koyu** olarak yazılmalıdır. Makale Bilgileri/Article Info, Anahtar kelimeler/Keywords başlıkları Times New Roman, 8 punto ve **koyu** olarak, içerikleri ise Times New Roman, 8 punto ve *italik* olarak yazılmalıdır. En az 2 en fazla 5 adet anahtar kelime verilmeli, ilk harfleri büyük yazılmalıdır. Makalelerin İngilizce özetinin (Abstract), anadili İngilizce olan ve konuya hâkim bir bilim insanı tarafından kontrol edilmesi önerilir.

Makale, farklı ana başlıklarla bölümlere ayrılmalı ve her bölüm başlığı numaralandırılmalıdır. Bölüm adlandırılmaları Kalın Yazı Tipine dönüştürülmelidir. Numaralandırma işlemleri ana bölümler için 1'den başlamalı ve tüm ana başlıklar (Özet, Teşekkür ve Kaynaklar hariç) 2., 3., ... olarak devam etmelidir. İkincil başlıklar ana bölüm numaralandırmasına uygun olarak 1.1., 1.2., 1.3., ... şeklinde devam etmelidir. Tüm başlıklar sola dayalı Times New Roman, 11 punto, koyu ve büyük harf ile yazılmalıdır. Aşağıda bir örnek verilmiştir:

ÖZET

ABSTRACT

1. GİRİŞ

2. MATERYAL VE YÖNTEM /

2.1. Materyal

2.2. Karakterizasyon

3. BULGULAR

4. TARTIŞMA

TEŞEKKÜR

KAYNAKLAR

EKLER

Şekiller/ Resimler/ Fotoğraflar

Sayfa sınırlarını aşmayacak şekilde ortalanarak, net ve okunaklı olmalıdır. Sıra ile numaralandırılmalıdır. Şekil numara ve adları şeklin altında ortalanarak ve sadece ilk kelimenin ilk harfi büyük olarak *italik* verilmelidir. Şekiller ya bir çizim programı ile çizilmiş olmalı ya da en az 300 dpi çözünürlükte taranmış olmalıdır. Şekil olarak gösterilen grafik, resim ve metin kutularında yer alan yazı ve sayıların büyüklüğü makale içinde Times New Roman karakteri ile yazılmış 9 punto boyutundaki bir yazının büyüklüğünden az olmamalıdır. Şekilden önce, şekil adından önce ve sonra birer satır boşluk bırakılmalıdır. Şekiller metin içine yerleştirilirken mutlaka şekilden önce atıfta bulunulmalıdır.

Çizelgeler

Sayfa sınırlarını aşmayacak şekilde ortalanarak konulmalıdır. Sıra ile numaralandırılmalıdır. Çizelge numara ve adları, çizelgenin üstünde tek satır boşluk ile sadece ilk kelimenin ilk harfi büyük olacak şekilde ortalanarak **italik** yazılmalıdır. Çizelge adı yazılırken üstte ve altta birer satır, çizelgeden sonra yine bir satır boşluk bırakılmalıdır. Çizelgelerde çizelgeden önce mutlaka metin içerisinde atıfta bulunulmalıdır. Çizelge satır ve sütunlarındaki rakam ve yazılar Times New Roman 11 punto ile yazılmalıdır. Ancak zorunlu kalınan durumlarda yazı boyutu yazı sınırlarını geçmeyecek şekilde en az 9 puntoya kadar düşürülebilir.

Denklemler

Metin içerisine yazılacak denklemler, Word yazım programındaki Mathtype ile sola dayalı olarak yazılmalı ve eşitliklere sağa dayalı olarak parantez içerisinde sıra ile numara verilmelidir.

Semboller

Makale çok sayıda sembol içeriyor ya da makaledeki sembollerin açıklanması gerekiyorsa uluslararası standarda uygun olarak, semboller, kaynaklardan önce, Times New Roman 11 punto ile **italik** yazılmalıdır. Makalede ondalık gösterimde virgül kullanılmalı, binlikleri ayırırken virgül veya nokta kullanılmamalı gerekiyorsa tek boşluk kullanılmalıdır.

Kaynaklar

Metin İçinde Kaynak Gösterimi:

Kaynak Numara ile gösterilmeli ve köşeli parantez kullanılmalıdır. Kaynak numarası doğrudan verilir.

1. “Probiyotikler, bireylerin intestinal mikrobiyal dengesini koruyarak veya geliştirerek tüketici sağlığına yararlı olan mikrobiyal yem ve gıda katkıları olarak tanımlanmaktadır” [1].
- 2.
3. Gürsoy vd., “probiyotikleri, bireylerin intestinal mikrobiyal dengesini koruyarak veya geliştirerek tüketici sağlığına yararlı olan mikrobiyal yem ve gıda katkıları olarak tanımlanmaktadır” [1].
- 4.

Numaralandırmada; ilk kaynağa köşeli parantez içerisinde [1] numarası verilir, nokta parantez dışına konulur. Daha sonra gelen kaynaklara bir sonraki sayı verilerek devam edilir. Kaynak numaraları birbirini takip ediyorsa, birincisi ve sonuncusunun numaraları aralarına çizgi [-] konularak yazılır. Örneğin; 3'ten 8'e kadar olan kaynaklar birbirinin devamı ve ayrıca 13. kaynaktan alıntı yapılmış ise bu durum metin içinde aşağıdaki gibi gösterilir.

Örnek

[3-8, 13].

Kaynaklar Listesinin Hazırlanması

Kaynak listesinde dergi adı verilirken kesinlikle kısaltma yapılmayacaktır. Kitap ve dergi isimleri italik olarak yazılmalıdır. Kaynak gösteriminde uluslararası kurallar dikkate alınmıştır.

Kaynak bir makale ise;

Yazarın Soyadı, Adının Baş Harfi. (Tarih). Makalenin adı. *Derginin Adı*, Cilt (sayı), Sayfa No.

[1] Yüzbaşıoğlu, D., Zengin, N., ve Ünal, F. (2014). Gıda koruyucuları ve genotoksisite testleri. *Gıda*, 39 (3), 179-186.

[2] Yuksekdağ, Z. N., Sahin, N., and Aslim, B. (2014). *In vitro* evaluation of the suitability potential probiotic of lactobacilli isolates from the gastrointestinal tract of chicken. *European Food Research and Technology*, 239(2), 313-320.

Kaynak bir kitap ise;

Yazarın Soyadı, Adının Baş Harfi. (Yıl). Kitabın Adı. (Baskı sayısı). Yayın Yeri: *Yayınevi*, Sayfa aralığı.

[3] Denizli, A. (2009). Biyoayırma ve Polimerik Taşıyıcılar. *TÜBA Yayınları*, 25-36.

Kaynak bir kitap bölümü ise;

Yazarın Soyadı, Adının Baş Harfi. (Yıl). Kitap Bölümünün Adı. Kitabın adı. (Baskı sayısı). Yayın Yeri: *Yayınevi*, Sayfa aralığı.

[4] Çekim, B. and Erkuş-Duman, E. (2013). On the g-Jacobi Matrix Functions. *Advances in Applied Mathematics and Approximation Theory. Springer Proceedings in Mathematics & Statistics*. 73-84.

Kaynak basılmış tez ise;

Yazarın soyadı, adının baş harf(ler)i. (tezin yılı). Tezin adı. Tezin cinsi (Yüksek lisans, doktora). Tezin sunulduğu enstitü. Sunulduğu yer. Toplam sayfa.

Örneğin;

Asar, T. (2010). IngGaAs kızılötesi fotodedektör üretimi ve karakterizasyonu. Doktora Tezi. Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Ankara. 202.

İnternet Kaynağı için örnek;

İnternet: Agarwal, C. A Review and Assessment of Land-Use Change Models Dynamics of Space, Time, and HumanChoice. Cipec.URL: <http://www.webcitation.org/query?url=http%3A%2F%2Fhero.geog.psu.edu%2Farchives%2FAgarwalEtALInPress.pdf&date=2014-03-17>, Son Erişim Tarihi: 17.03.2014.