



Institute of Pure and Applied Sciences

International Journal of Advances
in Engineering and Pure Sciences

MARMARA JEPS



In the name of Rectorate of Marmara University, *Rector*
Prof. Dr. Mustafa KURT

In the name of Directory of Institute of Pure and Applied Sciences, *Director*
Prof. Dr. Bülent MERTOĞLU

Editor-in-Chief

Assoc. Prof. Dr. Beste TURANLI

Associate Editors

Prof. Dr. Bülent EKİCİ, Assoc. Prof. Dr. Ceyhan BEREKETOĞLU,
Assist. Prof. Dr. Merve ER

Editorial Boards

Assoc. Prof. Dr. Ali İmran AYTEN
Mechanical Engineering

Assist. Prof. Dr. Berçem KIRAN YILDIRIM,
Chemical Engineering

Prof. Dr. Bülent Oktay AKKOYUNLU
Physics

Assist. Prof. Dr. Mustafa Alparslan ZEHİR,
Electrical and Electronics Engineering

Assoc. Prof. Dr. Esra ERKEN,
Environmental Engineering

Assoc. Prof. Dr. Sefa Anıl SEZER,
Mathematics

Assist. Prof. Dr. Batuhan ÖZKAN,
Statistics

Prof. Dr. Mehmet Emin Aydın,
Industrial Engineering

Assist. Prof. Dr. Buğrayhan BİÇKİCİ,
Civil Engineering

Prof. Dr. Mustafa Taylan ŞENGÜL,
Mathematics

Assoc. Prof. Dr. Ömer KORÇAK,
Computer Science and Engineering

Assoc. Prof. Dr. Sümeysa GÜRKÖK,
Biology

Assoc. Prof. Dr. Ali DOĞRUL,
Fluid Dynamics

Assoc. Prof. Dr. Duygu AKYÜZ ÇUBUKÇU,
Electrochemical Technologies

Prof. Dr. Hayriye KORKMAZ
Electrical Engineering

Assoc. Prof. Dr. Hüseyin Avni ES,
Industrial Engineering

Assist. Prof. Dr. Gözde BAKİOĞLU DOĞANYILMAZ,
Architecture and Civil Engineering

Assoc. Prof. Dr. Arzum ÖZGEN,
Industrial Engineering

Publishing Editor

Oğuz Eren SÜSLÜ

Correspondance and Communication

Beste TURANLI

Bioengineering, Faculty of Engineering,
M2-231 Maltepe /ISTANBUL

Tel: +90 216 777 0 777

beste.turanli@marmara.edu.tr

Publisher

Marmara University Press
Göztepe Kampusu 34722
Kadıkoy/ISTANBUL

Tel: +90 216 777 1408

yayinevi@marmara.edu.tr

Marmara Üniversitesi Rektörlüğü adına, Rektör
Prof. Dr. Mustafa KURT

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü adına, Müdür
Prof. Dr. Bülent MERTOĞLU

Editör

Doç. Dr. Beste TURANLI

Yardımcı Editörler

Prof. Dr. Bülent EKİCİ, Doç. Dr. Ceyhan BEREKETOĞLU,
Dr. Öğr. Üyesi Merve ER

Editörler Kurulu

Doç. Dr. Ali İmran AYTEN
Makine Mühendisliği

Dr. Öğr. Üyesi Berçem KIRAN YILDIRIM,
Kimya Mühendisliği

Prof. Dr. Bülent Oktay AKKOYUNLU
Fizik

Dr. Öğr. Üyesi Mustafa Alparslan ZEHİR,
Elektrik ve Elektronik Mühendisliği

Doç. Dr. Esra ERKEN,
Çevre Mühendisliği

Doç. Dr. Sefa Anıl SEZER,
Matematik

Dr. Öğr. Üyesi Batuhan ÖZKAN,
İstatistik

Prof. Dr. Mehmet Emin Aydın,
Endüstri Mühendisliği

Dr. Öğr. Üyesi Buğrayhan BİÇKİCİ,
İnşaat Mühendisliği

Prof. Dr. Mustafa Taylan ŞENGÜL,
Matematik

Doç. Dr. Ömer KORÇAK,
Bilgisayar Bilimleri ve Mühendisliği

Doç. Dr. Sümeyra GÜRKÖK,
Biyoloji

Doç. Dr. Ali DOĞRUL,
Akışkanlar Dinamiği

Doç. Dr. Duygu AKYÜZ ÇUBUKÇU,
Elektrokimyasal Teknolojiler

Prof. Dr. Hayriye KORKMAZ
Elektrik Mühendisliği

Doç. Dr. Hüseyin Avni ES,
Endüstri Mühendisliği

Dr. Öğr. Üyesi Gözde BAKİOĞLU DOĞANYILMAZ,
Mimarlık ve İnşaat Mühendisliği

Doç. Dr. Arzum ÖZGEN,
Endüstri Mühendisliği

Yayın Editörü

Oğuz Eren SÜSLÜ

Yazışmalar ve İletişim

Beste TURANLI
Biyomühendislik,
Mühendislik Fakültesi, M2-
231 Maltepe/İSTANBUL
Tel: +90 216 777 0 777
beste.turanli@marmara.edu.tr

Yayıncı

Marmara Üniversitesi Yayınevi
Göztepe Kampusu 34722
Kadıköy/İSTANBUL
Tel: +90 216 777 1408
yayinevi@marmara.edu.tr

İÇİNDEKİLER/ CONTENTS

Araştırma Makaleleri/ Research Articles

1. Effect of UV Aging on the Hardness Properties of Glass and Aramid Fiber-Reinforced Interply Hybrid Composites
Zeynal Abidin OĞUZ
Sayfa/Page: 1 – 7
2. Farklı Türbülans Modellerinin Daire ve Kare Kesitli Gaz Yıkayıcıların Hidrodinamik Performansları Üzerindeki Etkileri
Furkan TÜRKOĞLU, Seyfettin BAYRAKTAR
Sayfa/Page: 8 – 18
3. Nitrasyon Uygulanmış Waspaloy Alaşımının Oksidasyon Davranışı Üzerine Bir İnceleme Çalışması
Mehmet Masum TÜNÇAY
Sayfa/Page: 19 – 26
4. Adapting the AlphaZero Algorithm to Pawn Dama: Implementation, Training, and Performance Evaluation
Mehmet Kadir BARAN, Erdem PEHLİVANLAR, Cem GÜLEÇ, Alperen GÖNÜL, Muhammet ŞERAMET
Sayfa/Page: 27 – 35
5. A New Approach for Time Series Prediction: Fuzzy Regression Network Functions
Mehmet Raci AKTOPRAK, Özge CAGCAG YOLCU
Sayfa/Page: 36 – 52
6. Investigation of Mechanical Properties of Aloe Vera Gel (AVG)/PVA/PLLA Layered Nanobiocomposites
Ahmet Özgür AĞIRGAN, Emine Dilara KOÇAK, Mehmet AKALIN
Sayfa/Page: 53 – 63
7. PSMB8 as a Novel Target for AML Therapy: Uncovering Synergistic Potential with PI3K Inhibitors
Onur ATEŞ, Yağmur KİRAZ
Sayfa/Page: 64 – 72
8. Mikroakışkan Temelli Floresans Mikroskop Sistemi ile Otofloresan Flavin Koenzimlerinin Fotofiziksel Geçişleri Üzerine Nümerik Modelleme Çalışmaları
Selim Can DİRİCAN, Bahar TEZCAN, Süleyman Yiğit DÖLEK, Barış DEMİRBAŞ
Sayfa/Page: 73 – 91

Effect of UV Aging on the Hardness Properties of Glass and Aramid Fiber-Reinforced Interply Hybrid Composites

UV Yaşlanmasının Cam ve Aramid Elyaf Takviyeli Interply Hibrit Kompozitlerin Sertlik Özellikleri Üzerindeki Etkisi

Zeynal Abidin OĞUZ^{1,2} 

¹Department of Mechanical Engineering, Adiyaman University, 02040, Adiyaman, Turkey

²Mechatronics Department, Besni Ali Erdemoğlu Vocational School, Adiyaman University, 02040, Adiyaman, Turkey

Abstract

This study investigates the effect of UV aging on the hardness properties of hybrid composite materials configured with glass and aramid fibers in four designs: pure glass fiber (S1), pure aramid fiber (S4), and two hybrid structures (S2 and S3) with varied fiber layering. Samples were exposed to UV light for 0, 20, and 40 days, and hardness values were recorded to evaluate how UV exposure and fiber hybridization influence material durability. Initially, the pure aramid composite (S4) exhibited the highest hardness at 28 HV, a 26.13% increase over the pure glass configuration (S1) at 22.2 HV. The hybrid configurations demonstrated intermediate values (between pure glass and pure aramid), with S3 (aramid exterior) reaching 25.1 HV, indicating the influence of fiber hybridization. UV exposure further increased hardness in all configurations; after 20 days UV aging, values rose to 24.4 HV for S1, 27.3 HV for S2, 30.4 HV for S3, and 31.6 HV for S4. By 40 days UV aging, hardness reached 28.8 HV for S1, 30.1 HV for S2, 31.6 HV for S3, and 34.9 HV for S4, showing cumulative increases of 29.7% to 24.6% across the samples. These results demonstrate that UV aging enhances hardness, with hybrid models—particularly those with aramid fibers on the exterior—exhibiting improved UV resistance, suggesting their suitability for applications requiring both UV durability and hardness.

Keywords: Hardness, Glass Fiber, Aramid Fiber, Hybrid Composites, UV Aging

I. INTRODUCTION

Composite materials are essential in modern engineering and technology due to their unique ability to combine the best properties of different constituent materials, often resulting in superior performance compared to traditional materials. By blending fibers such as glass, carbon, aramid, or natural fibers with matrices like polymers, composites offer high strength-to-weight ratios, excellent durability, and enhanced resistance to environmental conditions. These attributes are particularly valuable in industries such as aerospace, automotive, and civil engineering, where reducing weight while maintaining strength is critical. Furthermore, the flexibility to tailor composites for specific applications through modifications in fiber orientation, layering, or hybridization allows engineers to meet diverse performance requirements [23], from enhanced load-bearing capabilities to improved mechanical properties. The development of composite materials continues to be a key area of research aimed at creating cost-effective, high-performance materials with reduced environmental impact [1,2,22]. Environmental aging tests are crucial for composite materials because these materials are often exposed to challenging environments that can change their mechanical, thermal, and chemical properties over time. Factors such as moisture, temperature fluctuations, UV radiation, and exposure to chemicals can cause irreversible changes in composite structures, leading to reduced strength, stiffness, and durability. Understanding the effects of environmental aging is essential for predicting the long-term performance of composites, especially in applications like aerospace, automotive, marine, and construction, where safety and reliability are paramount. By conducting environmental aging tests, researchers can identify vulnerabilities in the composite's design. Such tests also provide valuable data for life-cycle analysis and contribute to the development of industry standards, ensuring that composite materials maintain their performance and safety throughout their intended service lives [3,4].

A crucial characteristic of composites is their hardness, which indicates how well they can withstand surface wear, penetration, and deformation when forces are applied. For composites used in structural, automotive, and aerospace industries that need durability and endurance, this property is especially crucial. A composite material's hardness is a crucial measure of its total mechanical integrity as it is impacted by its matrix, reinforcement, and the interfacial bonding between these phases. Increased hardness helps to the composite's load-bearing capacity and surface stability in addition to improving its resilience to abrasive conditions. Therefore, it is crucial to comprehend and maximize the hardness of composite materials to guarantee their dependability and functionality throughout demanding operating circumstances.

UV aging is a significant factor affecting the hardness properties of composite materials, as prolonged exposure to ultraviolet radiation can lead to surface degradation, embrittlement, and a reduction in overall mechanical integrity [5,6]. The polymer matrices within composites are particularly susceptible to UV-induced chemical changes, such as chain scission and oxidation, which can result in change of mechanical properties. These changes not only diminish the hardness but also affect wear resistance and durability, especially in outdoor applications like automotive, marine, and aerospace structures where UV exposure is constant. Evaluating the impact of UV aging on hardness properties provides critical insights into the composite's longevity and performance under real-world conditions, enabling the development of UV-resistant formulations or protective coatings that enhance durability [7].

Raajeshkrishna et al. [8] investigated the effect of reinforcement material and production method on the mechanical properties of glass and basalt laminate composites. Hardness tests were applied to glass/epoxy and basalt/epoxy samples prepared using production methods such as hand layup followed by compression moulding (HLC), vacuum bagging method (VBM) and vacuum assisted resin infusion method (VARIM). The hardness values of glass/epoxy samples produced by HLC, VBN and VARIM methods were 78, 75, 73 SD, respectively. The hardness values of basalt/epoxy samples were 99, 95, 90 SD for HLC, VBN and VARIM methods, respectively. As a result, it was found that the production method was effective on the hardness values of composite materials.

The hardness values of hybrid composite materials reinforced with carbon and flax fibers were examined by Ramesh et al. [9]. As a result of hardness measurements, the hardness value of the composites ranged from 62.33 to 77.66 (HRC), and the average hardness was determined as 70.85 (HRC).

Suryawan et al. [10] compared to the hardness values of nettle fibers and glass fibers. Both nettle and glass fibers were mixed with epoxy resin at 10, 15 and 20% by weight. The effect of weight ratios on the hardness values of the samples was investigated. The hardness values of the glass fiber reinforced composites were measured as 82.4, 84.5 and 86.5 Shore D, respectively. The hardness values of the nettle fiber reinforced composites were found as 81.6, 85.0 and 86.6 Shore D, and an increase in hardness was observed as the fiber weight fraction increased.

Rout et al. [11] researched the hybridization effect of the hardness values of Kevlar, carbon and glass samples. When the hardness values of pure Kevlar, carbon and glass samples produced for comparison with hybrid samples were evaluated among themselves, it was found that carbon samples had the highest hardness value and glass samples had the lowest hardness value. In addition, it was observed that the hardness values of the samples with carbon layers on the outer surface in hybrid composites were higher than other hybrids.

Markovičová et al. [12] studied the hardness values of 10, 20, 30% glass fiber amounts added to the polyamide 66 (PA 66) matrix under UV light. Hardness tests were performed after 500 hours of UV aging and compared with control group samples. Accordingly, the hardness value of 10% glass reinforced samples increased by 21.21% after 500 hours of aging. However, UV aging caused a decrease of 23.91% and 37.04% in the hardness values of 20% and 30% reinforced samples, respectively.

Shi et al. [13] conducted hardness tests of carbon fiber/epoxy (CFRP) composites subjected to UV aging for 80 days. It was observed that the hardness of the fibers was minimally affected by UV irradiation, maintaining relatively stable values throughout the aging period. In contrast, the matrix material showed a substantial increase in hardness under UV aging, reflecting a pronounced embrittlement effect. The matrix phase exhibited a substantial increase in hardness, rising by up to 35% after 40 days of UV exposure due to embrittlement from UV-induced molecular changes. Following this peak, hardness began to decline with continued exposure.

Ramli et al. [14] examined the hardness values of glass-reinforced composite samples prepared with vinyl ester and epoxy matrices exposed to UV light for different periods of time. In this study, it was stated that while an increase in the hardness values of the vinyl ester matrix composite samples was observed as the UV duration increased, UV aging caused a decrease in the hardness values in the epoxy matrix samples.

Compston et al. [15] studied the effect of UV curing on the hardness value of glass-fibre/vinylester samples. The control group samples were left to cure at room temperature and after 7 days, no change was observed in the hardness values and reached a hardness value of 60 HRM. However, it was determined that the curing process using UV light caused an increase in the hardness values of the samples (85 HRM).

In this study, the hardness properties of pure and interply hybrid specimens made from glass and aramid fabrics were evaluated after aging under UV light for different durations. While the effects of UV exposure on polymer-matrix composites have been widely investigated in the literature, research specifically examining the UV aging resistance of hybrid composites combining different fibers remains limited. This study distinguishes itself by providing a comparative analysis of pure and hybrid structures, revealing how varying fiber combinations influence UV resistance in terms of hardness retention. By focusing on the impact of UV aging on hybrid composites' hardness properties, this research aims to identify optimal configurations that enhance durability in structures containing both glass and aramid reinforcements. This novel approach contributes to the literature by shedding light on the UV durability differences between glass and aramid fiber combinations, offering insights for designing

composites with improved resistance to environmental aging.

II. MATERIALS AND METHOD

2.1 Materials

For this study, woven glass and aramid fabrics with densities of 202 and 170 g/m² and fabric thicknesses of 0.15 mm and 0.27 mm, respectively, were used. Additionally, MGS 285 series epoxy and hardener were used as the resin system. Composite plates were fabricated using the hand lay-up technique at an ambient temperature of 25°C. All materials, including fabrics, hardener, and epoxy resin, were sourced from Dostkimya Company in Istanbul. The resin system used was Hexion MGS-L285 epoxy, mixed with Hexion MGS-H285 hardener in a 100:40 ratio. Four distinct composite plate configurations were produced: two pure and two hybrid using a sandwich structure. The configuration with 12 layers of glass fabric was designated as S1 (2.41±0.03 mm, thickness), while the configuration with 12 layers of aramid fabric was labeled S4 (2.91±0.07 mm, thickness). For the hybrid models, S2 (2.45±0.02 mm, thickness) was constructed with three layers of glass fabric on the exterior and six layers of aramid fabric in the core, whereas S3 (2.82±0.05 mm, thickness) featured three layers of aramid fabric on the exterior with six layers of glass fabric in the core.

Sample Code	Fiber configuration											
S1	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
S2	G	G	G	A	A	A	A	A	A	G	G	G
S3	A	A	A	G	G	G	G	G	G	A	A	A
S4	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A

Figure 1. Fiber configuration and sample coding (G: Glass; A: Aramid)

The configuration of fiber layers and sample code are illustrated in Figure 1. The samples were cured for one hour at 80°C under 0.4 MPa pressure using a hot mold press equipped with flat molds. Following this, the laminates were allowed to cool to room temperature

before being removed from the molds. A flowchart illustrating the production process and the hot mold machine are provided in Figure 2 (a) and (b), respectively.

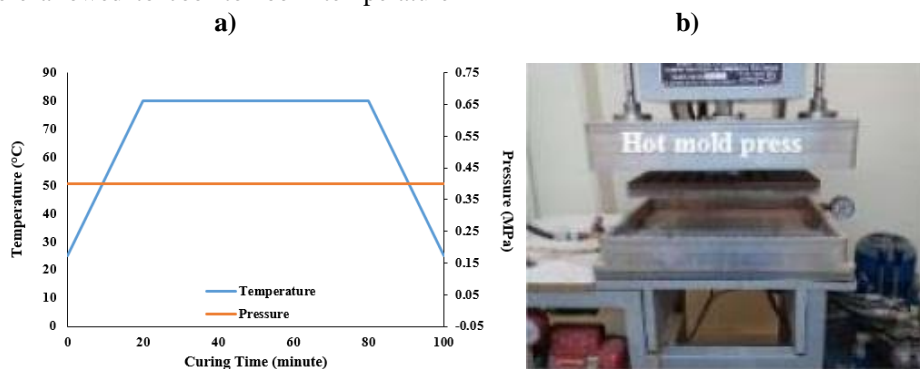


Figure 2. a) Flowchart of sample production b) Hot mold press

2.2 UV Aging

In accordance with the applicable ASTM standard, accelerated UV testing was carried out in this investigation utilizing an OSRAM ultraviolet lamp [16]. Three sets of samples were made for each composite configuration: one control group, which was not exposed to UV aging; a second group, which was exposed to UV light for 20 days; and a third group, which was exposed for 40 days.

2.3 Hardness Test

The material used in the Vickers hardness test creates an indentation that affects the test sample. The force that is applied and the area formed by the puncture on

the sample's test surface have a direct impact on the determined Vickers hardness measurement. The notch geometry employed in the Vickers hardness test is the geometric arrangement of a square pyramid formed of diamonds at an angle of 136° between opposing sides. The specimen exhibits an indentation zone with a somewhat typical diamond shape, as shown in Figure 3 a). The hardness test of samples is evaluated using a Qness brand hardness tester, as shown in Figure 3 b), in accordance with ASTM E92-17 (ASTM E92-17, 2017). The sample underwent at least fifteen Vickers hardness test measures for each composite combination; the findings are presented as the average of the fifteen examinations.

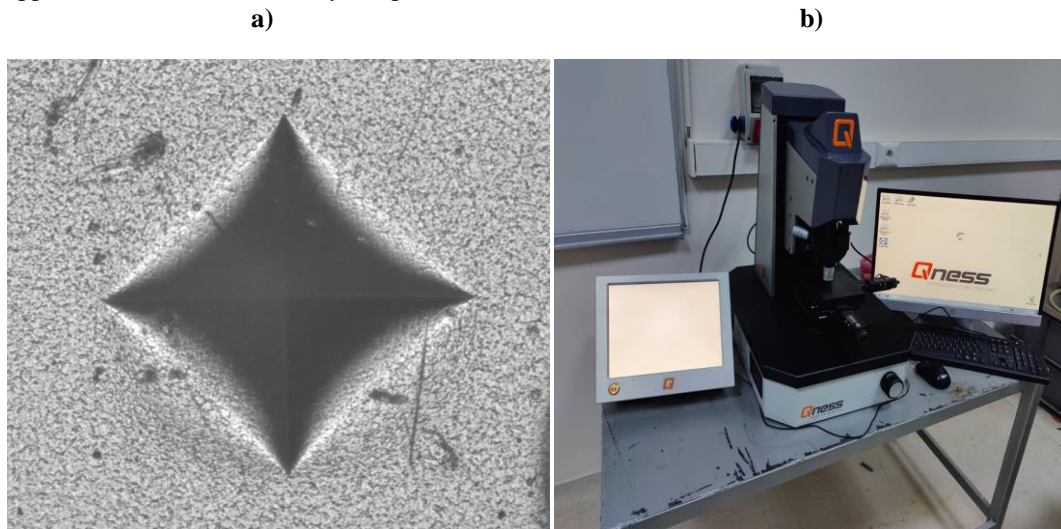


Figure 3. a) Regular diamond shape for hardness test b) Hardness test machine

III. RESULTS AND DISCUSSION

In this study, four distinct composite configurations (S1, S2, S3, and S4) were tested to evaluate the effects of hybridization, UV aging, and UV exposure duration on hardness. The hardness of each sample was measured at 0, 20, and 40 days of UV exposure. Hardness values of samples in different UV aging periods is shown in Figure 4. Further, change rate of hardness values of samples is shown in Figure 5 based on unaged samples. Each sample group (S1, S2, S3 and S4) was evaluated within itself in Figure 5. During the evaluation, the change rates after 450 and 900 hours of UV aging were compared with the unaged samples. The initial hardness values (0 days of UV exposure) indicate a clear impact of the fiber composition on hardness. Pure glass fiber composite (S1) had an initial hardness of 22.2 HV, while the pure aramid fiber composite (S4) had a higher hardness of 28 HV, showing that the aramid configuration offers a 26.1% increase in hardness over glass. For the hybrid configurations, S2 (glass on the outer layers, aramid in the core) and S3 (aramid on the outer layers, glass in the core) recorded

initial hardness values of 23.4 HV and 25.1 HV, respectively. This suggests that both hybrid structures improve hardness compared to pure glass fiber (S1), with S2 showing a 5.4% increase and S3 a 13.1% increase. S3, with aramid on the outside, achieved higher hardness than S2, indicating that the position of aramid fibers in the laminate impacts hardness, with aramid on the exterior providing better surface resistance. Although the two hybrid composites include an identical amount of fabrics, it is important to note that the fiber order affects the hybrid composites' hardness characteristics. Because Aramid fiber has a higher modulus than glass fiber, exterior Aramid layers increase the composite's hardness, according to comparable findings published by Rout et al. [11] and Nayak et al. [17]. As anticipated, it is also noted that the hardness of all hybrid composites differs between glass fiber-reinforced polymer composites and plain Aramid. In addition, when hybrid composites are compared with pure configurations, it has been stated in different studies in the literature [18-20] that the mechanical properties of hybrid configurations have values between those of pure composites.

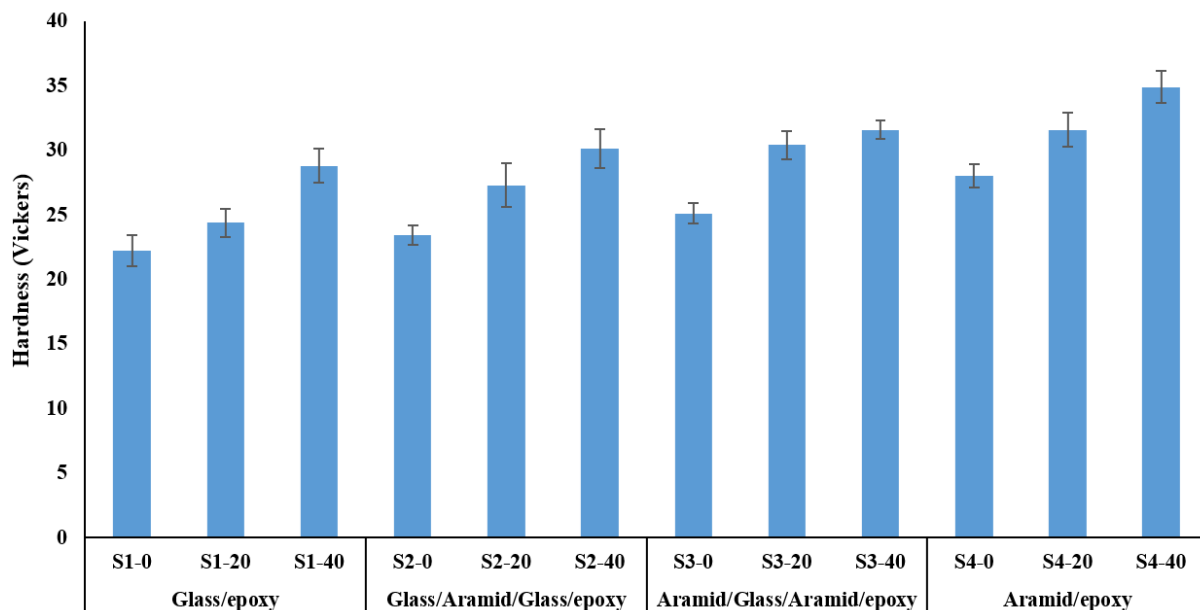


Figure 4. Hardness values of samples in different UV aging periods

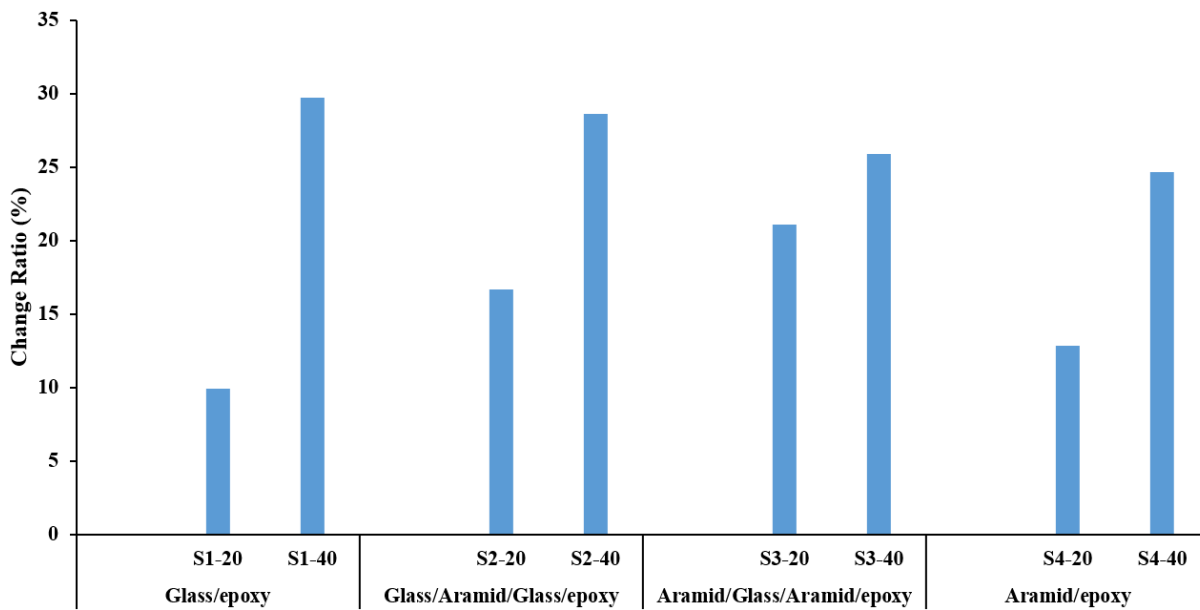


Figure 5. Change rates of hardness values of samples based on UV aging periods

UV exposure had a significant effect on the hardness of all samples, with increased hardness observed after both 20 and 40 days. After 20 days of UV exposure, the hardness values for S1, S2, S3, and S4 increased to 24.4 HV, 27.3 HV, 30.4 HV, and 31.6 HV, respectively. This represents an increase of 9.91% for S1, 16.67% for S2, 21.12% for S3, 12.86% for S4. After 40 days of UV exposure, further increases were noted, with hardness values reaching 28.8 HV for S1, 30.1 HV for S2, 31.6 HV for S3, and 34.9 HV for S4. This marks a cumulative increase of 29.73% for S1, 28.63% for S2, 25.9% for S3, 24.64% for S4. These results indicate that UV exposure enhances the hardness of all samples, likely due to surface embrittlement effects from prolonged UV-induced polymer degradation. Notably, the pure glass fiber sample (S1) experienced the highest percentage increase over 40 days, possibly because the glass fiber matrix is more susceptible to UV-related hardening than the aramid fiber [11,21]. The effect of UV aging duration (from 0 to 20 to 40 days) on hardness was evident across all configurations. Between 0 and 20 days, the hardness of S1, S2, S3, and S4 increased by 9.9%, 16.67%, 21.12%, and 12.86%, respectively. Between 20 and 40 days, the hardness values continued to rise by 18.0% for S1, 10.3% for S2, 3.9% for S3, and 10.4% for S4. The results show that while all samples exhibited increased hardness with extended UV exposure, the rate of increase was highest in the initial 20 days, especially for S3, which incorporates aramid fibers on the outer layers. After 20 days, the rate of hardness increase slowed, indicating a potential plateau in UV-induced hardening effects as the surface reaches a saturation point in embrittlement. In this study, UV aging caused an increase in the hardness values of the samples primarily due to photochemical changes in the polymer matrix, leading to surface hardening and embrittlement. When exposed to ultraviolet (UV) light, the polymer matrix undergoes chemical reactions, such as chain scission (breakage of polymer chains) and oxidation. These reactions result in the formation of free radicals, which can lead to cross-linking of the polymer chains at the surface. As a result, the material becomes more rigid and less flexible, contributing to an increase in surface hardness [5,6]. UV radiation accelerates the curing process on the surface of the composite materials, causing a hardening effect. This is because UV light promotes polymerization, where the free radicals initiate a process of bonding between polymer chains, creating a more tightly cross-linked structure on the surface [6,11,13]. This enhanced cross-linking reduces the material's ability to deform, thus increasing the material's surface hardness. Additionally, the UV-induced surface embrittlement creates a stiffer, more brittle outer layer, further raising the measured hardness values. While UV aging typically leads to degradation over time, the initial stages of UV exposure can result in surface hardening due to the increased degree of cross-linking and chemical changes in the polymer matrix [5,10]. Therefore, the observed

increase in hardness in this study can be attributed to these photochemical processes that make the surface layers of the composites more rigid and less prone to deformation under stress.

IV. CONCLUSION

This study examined the effect of UV aging on the hardness properties of composite samples with four configurations: pure glass fiber (S1), pure aramid fiber (S4), and two hybrid configurations (S2 and S3) combining both fiber types in different arrangements. The samples were subjected to UV exposure for 0, 20, and 40 days, and their hardness values were assessed to evaluate the impact of hybridization, UV exposure, and aging duration on material performance. The results showed that UV aging significantly increased the hardness of all samples. Initially, at 0 days of UV exposure, the pure glass fiber sample (S1) had a hardness of 22.2 HV, whereas the pure aramid sample (S4) exhibited a hardness of 28 HV, marking a 26.1% higher hardness for aramid. Hybrid configurations, S2 and S3, demonstrated intermediate initial hardness values of 23.4 HV and 25.1 HV, respectively, with S3 achieving a 13.1% improvement over the pure glass sample due to the outer positioning of aramid fibers. After 20 days of UV exposure, the hardness of all samples increased further. S1, S2, S3, and S4 reached hardness values of 24.4 HV, 27.3 HV, 30.4 HV, and 31.6 HV, respectively, representing increases of 9.9% for S1, 16.7% for S2, 21.1% for S3, and 12.9% for S4 compared to their initial values. After 40 days of exposure, the hardness values continued to rise, with S1 reaching 28.8 HV, S2 reaching 30.1 HV, S3 reaching 31.6 HV, and S4 reaching 34.9 HV. This resulted in cumulative hardness increases of 29.7% for S1, 28.6% for S2, 25.9% for S3, and 24.6% for S4. The data suggests that while UV exposure generally increases hardness across all configurations due to surface embrittlement and photochemical changes in the polymer matrix, the rate of increase tends to diminish over time as the materials reach a saturation point in hardening effects. Hybrid configurations, especially those with aramid fibers on the exterior (S3), consistently exhibited higher hardness, emphasizing the role of fiber positioning in optimizing UV resistance. These findings indicate that hybrid composites, with proper configuration, can offer enhanced durability under UV exposure, making them suitable for applications requiring high hardness and UV stability. Further studies could investigate longer UV exposure periods and additional mechanical properties to fully understand the long-term durability of these materials.

REFERENCES

- [1] Alsaadi, M., Bulut, M., Erklığ, A., & Jabbar, A. (2018). Nano-silica inclusion effects on mechanical and dynamic behavior of fiber reinforced carbon/Kevlar with epoxy resin hybrid composites. *Composites Part B: Engineering*, 152, 169-179.
- [2] Kosedag, E., Caliskan, U., & Ekici, R. (2022). The effect of artificial aging on the impact behavior of SiC nanoparticle-glass fiber-reinforced polymer matrix composites. *Polymer Composites*, 43(2), 964-976.
- [3] Kirar, E., Demircan, G., Kisa, M., Ozen, M., & Guven, C. (2024). Quasi-static punch shear behavior of glass/epoxy composite: Experimental and numerical study in artificial seawater environment. *Applied Ocean Research*, 153, 104262
- [4] Kosedag, E. (2023). Effect of artificial aging on 3-point bending behavior of glass fiber/epoxy composites. *Journal of Reinforced Plastics and Composites*, 42(21-22), 1147-1153.
- [5] Ovali, S., & Sancak, E. (2022). Investigating the effect of the aging process on LDPE composites with UV protective additives. *Journal of Thermoplastic Composite Materials*, 35(11), 1921-1939.
- [6] Celebi, M., Altun, M., & Ovali, S. (2022). The effect of UV additives on thermo-oxidative and color stability of pistachio shell reinforced polypropylene composites. *Polymers and Polymer Composites*, 30, 09673911221081700.
- [7] Wu, C., Meng, B. C., Tam, L. H., & He, L. (2022). Yellowing mechanisms of epoxy and vinyl ester resins under thermal, UV and natural aging conditions and protection methods. *Polymer Testing*, 114, 107708.
- [8] Raajeshkrishna, C. R., & Chandramohan, P. (2020). Effect of reinforcements and processing method on mechanical properties of glass and basalt epoxy composites. *SN Applied Sciences*, 2(5), 959.
- [9] Ramesh, M., Bhoopathi, R., Deepa, C., & Sasikala, G. (2018). Experimental investigation on morphological, physical and shear properties of hybrid composite laminates reinforced with flax and carbon fibers. *Journal of the Chinese Advanced Materials Society*, 6(4), 640-654.
- [10] Suryawan, I. G. P. A., Suardana, N. P. G., Winaya, I. S., & Suyasa, I. (2020). Hardness analysis of epoxy composite reinforced with glass fiber compared to nettle fibers. *Int. J. Eng. Emerg. Technol*, 5(1), 2020.
- [11] Rout, S., Nayak, R. K., Patnaik, S. C., & Yazdani Nezhad, H. (2022). Development of improved flexural and impact performance of kevlar/carbon/glass fibers reinforced polymer hybrid composites. *Journal of Composites Science*, 6(9), 245.
- [12] Markovičová, L., & Zatkalíková, V. (2019). The effect of UV aging on structural polymers. In *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering* (Vol. 465, No. 1, p. 012004). IOP Publishing.
- [13] Shi, Z., Zou, C., Zhou, F., & Zhao, J. (2022). Analysis of the mechanical properties and damage mechanism of carbon fiber/epoxy composites under UV aging. *Materials*, 15(8), 2919.
- [14] Ramli, J., Jeefferie, A. R., & Mahat, M. M. (2011). Effects of UV curing exposure time to the mechanical and physical properties of the epoxy and vinyl ester fiber glass laminates composites. *ARPJ. Eng. Appl. Sci*, 6, 104-109.
- [15] Di Pietro, A., & Compston, P. (2009). Resin hardness and interlaminar shear strength of a glass-fibre/vinylester composite cured with high intensity ultraviolet (UV) light. *Journal of Materials Science*, 44, 4188-4190.
- [16] ASTM G154 Standard Practice for Operating Fluorescent Light Apparatus for UV Exposure of Nonmetallic Materials.
- [17] Jesthi, D. K., & Nayak, R. K. (2019). Improvement of mechanical properties of hybrid composites through interply rearrangement of glass and carbon woven fabrics for marine application. *Composites Part B: Engineering*, 168, 467-475.
- [18] Özbek, Ö., Oğuz, Z. A., Bozkurt, Ö. Y., & Erklığ, A. (2024). Crashworthiness characteristics of hydrothermally aged intraply glass/basalt composite pipes. *Marine Structures*, 97, 103656.
- [19] Oğuz, Z. A., Özbek, Ö., Erklığ, A., & Bozkurt, Ö. Y. (2023). Hydrothermal aging effect on crushing characteristics of intraply hybrid composite pipes. *Engineering Structures*, 297, 117011.
- [20] Doğan, N. F., Oğuz, Z. A., & Erklığ, A. (2023). An experimental study on the hydrothermal aging effect on the free vibration properties of hybrid aramid/glass/epoxy composites: comparison of sea water and distilled water. *Polymer Composites*, 44(10), 6902-6912.
- [21] Alagumalai, V., Shanmugam, V., Balasubramanian, N. K., Krishnamoorthy, Y., Ganesan, V., Försth, M., ... & Das, O. (2021). Impact response and damage tolerance of hybrid glass/kevlar-fibre epoxy structural composites. *Polymers*, 13(16), 2591.
- [22] Demir, S., & Kemiklioğlu, U. (2023). A Comparison of Force Distribution Effects of Ductile and Brittle Adhesives at Different Hole Positioning. *International Journal of Advances in Engineering and Pure Sciences*, 35(4), 523-530.
- [23] Cebe, E., & İrez, A. B. (2024). Elektrikli araçlarda batarya kutusu imali için termal özellikleri iyileştirilmiş hibrit polimer kompozitlerin geliştirilmesi ve mekanik özelliklerinin incelenmesi. *International Journal of Advances in Engineering and Pure Sciences*, 36(3), 224-234.

Farklı Türbülans Modellerinin Daire ve Kare Kesitli Gaz Yıkayıcıların Hidrodinamik Performansları Üzerindeki Etkileri

Effects of Different Turbulence Models on Hydrodynamic Performance of Circular and Square Section Scrubbers

Furkan TÜRKÖĞLU¹, Seyfettin BAYRAKTAR²

¹Yıldız Teknik Üniversitesi, Gemi İnş. ve Gemi Makineleri Mühendisliği Bölümü, İstanbul, Türkiye

²Yıldız Teknik Üniversitesi, Gemi Makineleri İşletme Mühendisliği Bölümü, İstanbul, Türkiye

Öz

Bu çalışmada, ıslak venturi tipi gaz temizleyiciler ele alınarak farklı türbülans modellerinin özdeş kare ve daire kesitli gaz temizleyicilerin hidrodinamik performansları üzerindeki etkileri Hesaplamalı Akışkanlar Dinamiği (HAD) metodu kullanılarak incelenmiştir. Verifikasyon ve doğrulama çalışmaları yapılarak sonuçlar literatürdeki sayısal ve deneysel verilerle başarılı bir şekilde mukayese edilmiştir. Daha sonra iki farklı kesit geometrisine sahip gaz temizleyicilerin toplama verimi, basınç düşüşü ve hız dağılımları mukayese edilerek k-epsilon (Standart, Realizable ve RNG) ve k-omega (Standart ve SST) türbülans modellerinin venturi gaz temizleyicilerdeki performansları birbirleri ile karşılaştırmalı olarak sunulmuş ve damlacık toplama verimi açısından Realizable k-epsilon türbülans modelinin diğer modellere nazaran daha başarılı olduğu ancak basınç dağılımlarını tahmininde tüm bu modellerin birbirlerine yakın bir sonuçlar verdiği gösterilmiştir. Mukayese edilen daire ve kare kesitli özdeş gaz temizleyicilerden birincisinde daha yüksek hız ve dolayısıyla daha düşük basınç dağılımları elde edildiği ancak kare kesitli gaz temizleyicinin damlacık toplama veriminin dairesel kesitli olana nazaran %53 ile daha yüksek olduğu sonucuna varılmıştır. **Anahtar Kelimeler:** Islak venturi tipi gaz temizleyiciler, Toplama verimi, Daire kesitli gaz temizleyici, Kare kesitli gaz temizleyici, Türbülans modelleri

Abstract

In this study, wet venturi-type gas scrubbers are examined and the effects of various turbulence models on the hydrodynamic performance of two identical square and circular cross-section gas scrubbers were investigated using the Computational Fluid Dynamics (CFD) method. Verification and validation studies were conducted, and the results were successfully compared with numerical and experimental data obtained from the literature. Then, the collection efficiency, pressure drop, and velocity distributions of gas scrubbers with two different cross-sectional geometries were compared, and the performances of k-epsilon (Standard, Realizable, and RNG) and k-omega (Standard and SST) in venturi gas scrubbers were comparatively presented. It was demonstrated that the Realizable k-epsilon turbulence model performed better than the other models in terms of droplet collection efficiency; however, all models yielded similar results in predicting pressure distributions. Among the identical gas scrubbers with circular and square cross-sections, the former exhibited higher velocity and consequently lower pressure distributions. However, it was concluded that the droplet collection efficiency of the square cross-section gas scrubber was 53% higher than that of the circular one.

Keywords: Wet venturi scrubbers, Collection efficiency, Circular scrubber, Square scrubber, Turbulence models

I. GİRİŞ

İstenmeyen küçük parçacıkları içeren çok fazlı karışımlarda bu parçacıkların ayrıştırılması önemli bir problem olup günümüzde konuyla ilgili birçok çalışma yapılmaktadır. Bunların bir kısmında insan sağlığı ön plana çıkarken

diğerlerinde ise ayrıştırma veriminin artırılması amaçlanmaktadır. Hava kirliliğinin artan etkisiyle birlikte insan sağlığının risk altında olduğu yadsınamaz bir gerçektir. Bu olumsuz etkilerin ortadan kaldırılması ve çevre kirliliğinin önlenmesine yönelik yeni teknolojik çözüm arayışları devam etmektedir. Mühendisler atmosfere salınan gazların zararlı etkisini azaltmak ve endüstriyel uygulamalarda karşılaşılan ve kirlenici içeren çok fazlı karışımların birbirlerinden ayrıştırılması için birçok farklı yöntem geliştirmişlerdir. Hava kirliliğinin insan sağlığına doğrudan etkisi bilinen bir gerçektir. Örneğin Türk Tabipler Birliğine göre hava kirliliğinden kaynaklı olarak her yıl dünyada yaklaşık olarak 150.000 prematüre bebek dünyaya gelmekte ve aynı zamanda çocuk astımı da her geçen yıl artmaktadır. Yine Türk Tabipler Birliğine göre hava kirliliği akciğer hastalıklarında artış, astım nöbetlerinin sıklığında değişim, akut solunum yolu hastalıkları ve çeşitli cilt hastalıklarına doğrudan etki etmektedir [1]. Bu rahatsızlıkların temel nedenleri incelendiğinde hava kirliliğinin en başta gelen etkenlerden biri olduğu görülmüştür. Bundan dolayı yapılan düzenlemelerin 'Gelecek nesiller için yaşanabilir bir dünya bırakalım.' sloganının ötesinde gerçekten yaşamı doğrudan etkileyen kirliliği önlemek adına olması gerekmektedir. Bu noktada mühendislik alanında gelişmelerin insan sağlığı üzerindeki etkisi, tıp alanında koruyucu hekimliğe benzetilebilir. Zira koruyucu hekimlikte hastalığın tedavisinden önce, hastalığı oluşturan etkenlerin ortadan kaldırılması önceliklidir Buradan yola çıkarak toplumsal sağlığın temelinde de mühendisliğin önemli bir mihenk taşı olduğu bu farkındalıkla ortaya konulabilir. Venturi tipli gaz yıkayıcılar ile insan sağlığına zararlı gazların atmosfere salınımı engellenerek sağlık açısından risklerin azaltılması mümkündür. Tekstil ve iklimlendirme gibi karasal sistemlerde uzun süredir kullanılmakta olan gaz temizleyiciler, denizcilik sektörünün çatı kuruluşu olan Uluslararası Denizcilik Örgütünün (International Maritime Organization, IMO) gemilerden kaynaklanan emisyon değerlerinin düşürülmesini sağlayan düzenlemeleri sonrasında gemilerde de yoğun olarak kullanılmaktadır. IMO tarafından yapılan emisyon düzenlemeleri, gemi sahiplerini emisyonu azaltmak için çeşitli alternatif teknolojilere yönlendirmiştir. Güncel yasalara uyum açısından düşük sülfürlü yakıt sarfeden ana makina tercihi en kolay çözüm yöntemi olmasına karşılık, ana makine değişimi veya yeni inşa edilen gemilerde doğal gaz vb. yakıt kullanma ana makine tercihi, maliyetleri çok ciddi arttırdığından dolayı gemi sahipleri gaz temizleyicileri bacaya dahil ederek gemi emisyon yasalarına uyum sağlamayı tercih etmişlerdir.

Günümüzde ıslak, kuru, melez, açık veya kapalı çevrimli gibi farklı türlerde gaz temizleyiciler mevcut olup bunlar arasında yaygın olarak kullanılanlardan bir tanesi ıslak venturi tipi gaz temizleyicilerdir. Bu çalışmada, venturi tipi gaz temizleyicilerdeki akışı

sayısal olarak tahmin etmede kullanılan türbülans modellerinin daire ve kare kesitli venturi tipi gaz temizleyicilerdeki performanslarını gösterilmiştir. Çalışma, ilgili literatürde yaygın olarak kullanılan daire ve kare kesitli geometrileri beraber ele alması ve farklı türbülans modellerinin bu gibi geometrik keşide sahip gaz temizleyicilerdeki performanslarını göstermesi açısından yenilik içermektedir.

II. LİTERATÜR TARAMASI

Farklı sistemlerden ve/veya taşıtlardan salınan yanma sonucu gazlar doğrudan havaya karıştığında insan sağlığı için büyük riskler taşıyabilmektedir. Bu riskleri ortadan kaldırmak veya en azından azaltmak için çeşitli yasal düzenlemeler yapılmıştır. IMO tarafından benimsenen Gemilerden Kaynaklanan Kirliliğin Önlenmesine Dair Uluslararası Sözleşme (*International Convention for the Prevention of Pollution from Ships, MARPOL*) Ek-VI'ya göre dünya üzerindeki denizler Emisyon Kontrol Alanları, EKA (Emission Control Areas, ECA) ve EKA dışı bölgeler olarak ayrılmıştır. IMO yönetmeliklerine göre NO_2 , SO_2 , CO_2 gibi zararlı parçacıklı bileşenler EKA bölgesinde kullanılan yakıtta oransal olarak 0,10 ve 0,50 arasında olmalı ve bu sınırları aşmamalıdır. Yapılan yeni düzenlemeler ile gemilerin dönüşüm süreci de başladığından mühendisler bu dönüşümü daha ucuz ve kolay yapabilmenin yollarını aramaya koyulmuştur. Yapılan çalışmalarda birçok farklı tasarım ortaya konulmuş ve baca gazı için farklı tipte baca gaz temizleyici oluşturulmuş ve farklı lüle geometrisi, giriş hızı, sıvı türü için araştırmalar yapılmıştır. Örneğin, Guerra vd. [2] venturi tipli yıkayıcılarda deneysel ve sayısal çalışmalar yaparak basınç düşüşü, akışkan profili ve lüle adet ve konumunun akışkan davranışına olan etkilerini incelemişlerdir. Yang vd. [3] halka bölmeli ve bölmesiz venturi tipi bir yıkayıcıda gaz-sıvı akışını sayısal yöntemlerle incelemiş ve çeşitli değişkenlerin sıvı gaz karışımına etkilerini göstererek ideal geometriye sahip venturiyi boyutlandırmışlardır. Baca gazlarının temizlenmesinde kullanılan lülelerin uygun bir şekilde konumlandırılmasına yönelik çalışmada Giroth vd yeni tasarımlarının %40 daha verimli olduğunu ve ticari baca temizleyicilere nazaran daha ekonomik olduğunu iddia etmişlerdir [4]. Bal vd. [5] filtreli muhafaza havalandırma sistemli bir venturi yıkayıcıda hidrodinamik performansını artırmak için Hesaplamalı Akışkanlar Dinamiği (HAD) metodu kullanarak basınç düşüşlerini tahmin etmişlerdir. Brown vd. [6] enerji santrallerinde SO_2 emisyonunu azaltmak için kullanılan kireç bulamacının yıkayıcıya uygun noktadan püskürtülmesi için uygun lüle adedini sayısal yöntemlerle ele almışlardır. Jonivd. [7] bacalardan atmosfere salınan gazların temizlenmesinde literatürde yeni bir teknoloji olan kabarcıklı ıslak yıkama yöntemi ile bacanın basınç düşüşünü incelemiş ve atık parçacıklarının ayrılması işleminde verimi %83 olarak hesaplamışlardır. Wang vd. [8] kirliliği azaltmak için ıslak baca sisteminde su akışı yardımıyla kirliliği azaltan filtreleri incelemişlerdir. Çalışmada uygun su

akış hızı, filtrenin verimi ve performansının iyileştirilmesi konusuna öncelik vermişlerdir. Bir diğer çalışmalarında Guerra vd. [9] venturi tipli yıkayıcılarda sıvı enjeksiyonu sonrasında aksel olarak gaz ve sıvı hızının damlacık boyutuna etkisini incelemişlerdir. Lüle sayısının damlacık boyutuna etkisi de dikkate alınmış ve sıvı ve gaz hızlarındaki artışın damlacık boyutunu küçülttüğü gösterilmiştir. Luan vd. [10] kare kesitli venturi yıkayıcılardaki hız, basınç düşüşü ve kinetik enerji gibi değişkenleri HAD metodu yardımıyla inceleyerek kare kesitli geometrilerdeki avantajları ortaya koymuşlardır. Çalışmada, k-epsilon türbülans modeli yardımıyla 12 m/s gaz girişi ile dairesel kesitli gaz temizleyicilerle karşılaştırma yapılmıştır. Buna göre kare kesitli yıkayıcılarda akış profili dairesel kesitlere nazaran daha dağınık bir formdadır. Kare kesitten dolayı oluşan geri akış gösterilerek dairesel kesitli yıkayıcı ile mukayese edilmiş ve kare kesitli venturinin yıkama verimi ve basınç düşüşünün daha yüksek olduğu ifade edilmiştir. Ali vd. [11] venturi tipli yıkayıcılarda Eulerian-Lagrange metodu kullanılarak 0.09, 0.115 ve 0.14 kg/s gibi farklı gaz debilerinde TiO_2 hidrofobik gazın temizleme verimini; hız dağılımını, basınç düşüşünü ve kinetik enerji değişimlerini hesaplamışlardır. Venturi yapısı geometrik özelliklerinden dolayı birçok farklı alanlarda kullanılmaktadır. Örneğin; Ulas [12] yapmış olduğu çalışmada değişken kesitli venturilerin roket yakıtlarında kütle akışını kontrol edebilmek için kullanılmasının ideal bir çözüm olduğunu deneysel olarak göstermiştir. Manzano vd. [13] üç farklı geometri için gerçekleştirilen HAD analizleri yardımıyla geometrinin basınç düşüşü üzerindeki etkisini ele alarak kavitasyon ile genişleme açısı arasındaki ilişkiyi göstermişlerdir. O'Hern, vd. [14] venturi-lüle tasarımları için yedi farklı ampirik formül geliştirilerek bunların performanslarını deneysel verilerle karşılaştırmışlardır. Elde edilen sonuçlarda %5 ile %18 arasında hata payı olduğu görülmüştür. Wilson vd. [15] venturi tipli mikro kabarcıklı oksijen üreticisi için çeşitli geometriler üzerinde çalışarak HAD yardımıyla farklı değişkenlerin kabarcık üretimine etkisi için üç farklı hava ve akış hızlarıyla simülasyonlar gerçekleştirilmiş ve deneysel verilerle karşılaştırmalar yapmışlardır. Elde edilen sonuçlara göre kabarcık oluşumunda boğaz uzunluğu ve genişleme açısı küçük bir etkiye sahiptir. Shi vd. [16] yaptıkları deneysel ve sayısal çalışmalarda kavitasyonu çoklu faz metodu, k-epsilon türbülans modeli ve Schnerr-Sauer kavitasyon modeli kullanarak incelemişlerdir. Silva [17] deneysel ve HAD metotlarından yararlanarak venturi geometrisini incelemiştir. 1.27 metre uzunluğundaki venturi gaz yıkayıcıda 34 m/s ve 70 m/s hava hızında 0.013 kg/s ve 0.075 kg/s sıvı debisinde deneyler yapmış ve basınç ve hız profillerini göstermiştir. Ardından bu deneysel sonuçları Ayrık faz metoduyla, AFM (Discrete Phase Method, DPM) incelemiş ve deneysel sonuçlara ek olarak ampirik formüllerle de elde ettiği sonuçlarla karşılaştırmıştır. Xu vd. [18] yaptıkları çalışmada

dairese kesitli venturilerde yanlış okumaya yol açan sebepleri AFM ile inceleyerek deneysel sonuçlarla kıyaslamıştır. Atmaca vd. [19]. jet akışı üreten üç farklı lüle geometrisindeki akışı k-epsilon türbülans modeli kullanarak incelemişler ve sayısal sonuçları deneysel verilerle doğrulamışlardır. Kare kesitli venturi gaz temizleyicilerinin sayısal simülasyonu Luan vd tarafından ele alınarak venturi tüplerinin katran giderme verimliliğini artırmaya yönelik çalışmalar sayısal gerçekleştirilmiştir [20]. Turkoglu ve Bayraktar [21] lüle pozisyonlarının venturi geometrisinin hidrodinamik performansına etkisini göstermiştir. Turkoglu ve Bayraktar [22] tarafından yapılan bibliyografik çalışmada ise kara ve denizcilik sektöründe kullanılan gaz temizleyiciler hakkında literatür incelenmesi yapılarak gaz temizleyicilerinin önemi ortaya konulmuştur. Yapılan literatür çalışmasında genel olarak daire kesitli ıslak venturi tipi gaz temizleyici geometrileri ile çalışıldığı görülmüş ise de, kesit geometrisi dairesel olmayan gaz temizleyicilerin de uygulamalarda dikkate alındığı ifade edilmiştir. Bu gibi farklı en-kesit geometrilerde sahip gaz temizleyicilerdeki tek ya da çok fazlı akışın HAD metodu ile ele alındığı çalışmalarda farklı türbülans modellerinin kullanıldığı da yukarıdaki çalışmalarda görülmektedir. Bu çalışma, yaygın olarak kullanılan daire- ve kare-kesitli gaz temizleyicileri basınç düşüşü, hız dağılımları ve toplama verimi gibi farklı değişkenler açısından karşılaştırarak her iki geometrinin bir diğerine göre üstünlük ve zayıflıklarını ortaya koymayı amaçlamaktadır. Bunun dışında, iki-denklemlili türbülans modelleri olan k-epsilon ve k-omega türbülans modellerinin farklı türlerinin bu gibi geometrilerdeki performansları da gösterilmiştir.

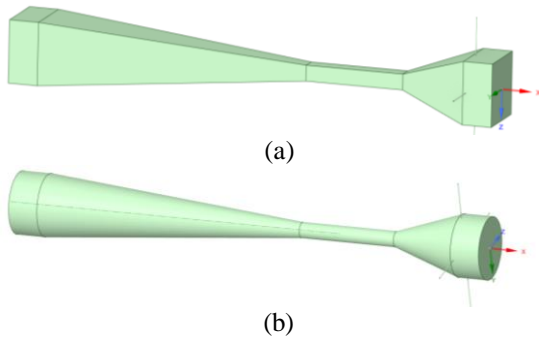
III. METOD

Günümüzde herhangi bir mühendislik problemi deneysel ya da sayısal çalışmalardan biri veya her ikisi kullanılarak çözülebilmekte ise deneysel çalışma yapmak personel, zaman ve yüksek maliyetler gerektirdiği için bir diğer alternatif olan Hesaplamalı Akışkanlar Dinamiği (HAD) yöntemi ile problemlerin çözülmesi bilgisayar teknolojilerindeki ilerleme ve güvenilir sayısal metotların varlığı ile beraber oldukça yaygın hale gelmiştir. Islak venturi tipi gaz temizleyicilerdeki çok fazlı akışın incelendiği bu çalışmada Ayrık Faz Metodu (AFM) kullanılarak probleme etki eden değişkenlerin etkisi incelenmiştir. HAD analizleri temelde i) ön işlemler, ii) çözüm süreci ve iii) sonuçlar olmak üzere 3 adımda gerçekleştirilir. Birinci adımda problemin tanımlanarak geometrisinin çizilmesi ve bu geometrinin her birinde ilgili akış denklemlerinin çözdürüleceği küçük alan veya hacimlere bölünerek ağ adı verilen yapıların oluşturulması, probleme ait bilinen sınır ve başlangıç şartlarının belirlenmesi gerekir. İkinci adım olan çözümlenme kısmı probleme atanan sınır şartlarıyla problemin sonuçlarının elde edilmesine kadar olan süreçtir. Üçüncü adım ise elde edilen sonuçlardan yola çıkılarak ham verilerin alınıp işlenmesi ve

yorumlanmasını sağlayacak grafik ve resimlerin elde edilmesini kapsar. Bu üç adımdan en önemlisi ön işlemler kısmıdır. Zira bu adımda uygun ağ örgüsünün oluşturulmaması ve problemin iyi tanımlanamaması, çözüme kavuşturulamamasına neden olabilir. Bu nedenle, aşağıdaki bölümlerde öncelikle bunlara yer verilmiştir.

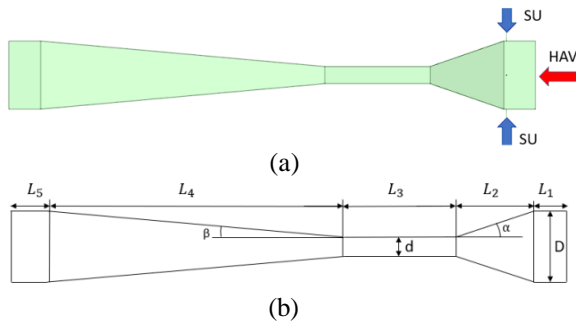
3.1. Gaz Temizleyici Tasarımı

Bu çalışma kapsamında en-kesitleri hariç geometrik olarak aynı ölçülere sahip eşdeğer iki adet gaz temizleyici tasarımı gerçekleştirilmiştir. Bunlardan biri kare kesitli, diğeri ise daire kesitli gaz temizleyici olup tasarımlar Şekil 1’de sunulmuştur.



Şekil 1. Tasarlanan kare (a) ve daire (b) kesitli gaz temizleyiciler.

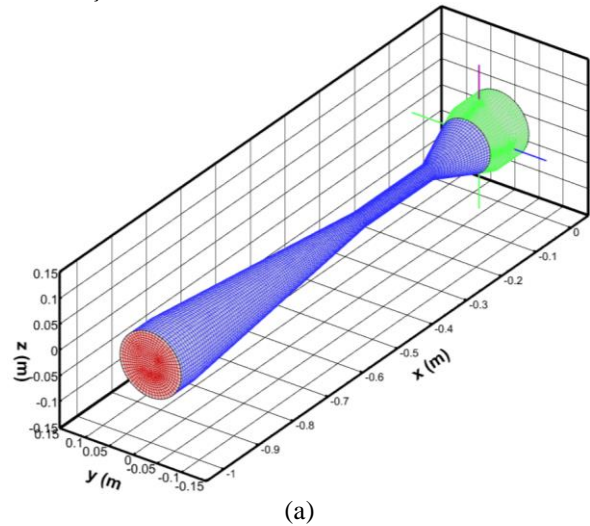
İlgili tasarımlara ait ölçüler ise Şekil 2’de gösterilmiş olup $L_1=60$ mm, $L_2=140$ mm, $L_3=200$ mm, $L_4=540$ mm ve $L_5=60$ mm olup $d=31.8$ mm ve $D=127$ mm olarak tanımlanmıştır. Dairesel ve kare kesitli venturi tasarımları için ASME, 2005 [23] standartları ve Luan vd., [20] tarafından sunulan önerilerden yararlanılmıştır. İlgili standartta daralma ve genişleme açıları $\alpha=19^\circ$ ve $\beta=5^\circ$ olarak önerildiği için bu çalışmada söz konusu açı değerleri kullanılmıştır. Diğer geometrik boyutlar için de literatür bilgileri dikkate alınmıştır (Baylar vd., 2009). Temizlenecek gaz (hava) Şekil 2’e göre sağ taraftan temizleyiciye girerken temizleyici akışkan (su) ise, gaz temizleyiciye dik olarak konumlandırılan 4 adet lüleden gaz püskürtülmektedir.

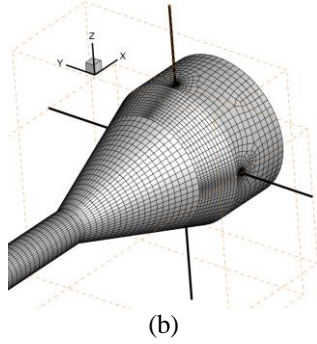


Şekil 2. Hava ve su girişleri (a) ile venturi boyutları (b).

3.2. Ağ Yapısı

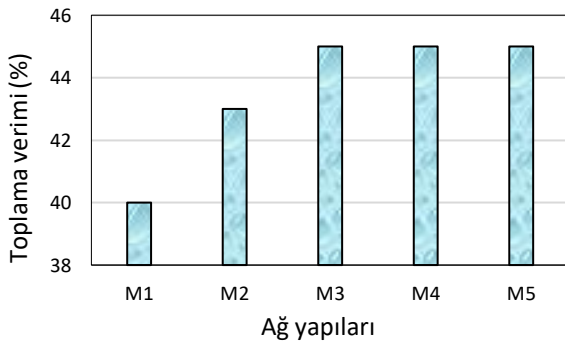
Çift fazlı akışın gerçekleşeceği çalışma bölgesi, tasarımları yapılan gaz temizleyicilerin kendileri olduğundan dolayı, öncelikle temizleyicilerin yüzey alanlarına uygun birer ağ örgüsü oluşturulmuş ve yüzeydeki ağ yapıları dikkate alınarak temizleyici içerisinde akışkanların geçeceği hacim ağları oluşturulmuştur. Şekil 3a’da gösterilen ağ örgüsünde her ne kadar çoğunlukla dikdörtgenler prizması şeklindeki elemanlar kullanılmış olsa da geometrinin gerektirdiği bölgelerde üçgen prizma şeklindeki ağ elemanlarının kullanılması yoluna da gidilmiştir. Boğaz kısmında dikdörtgenler prizması şeklindeki ağ elemanları mevcut iken boğazdan dış bölgelere doğru üçgen ağ elemanların varlığına ağırlık verilmiştir. Çift fazlı akış durumunda gaz (hava) ile sıvı (su) gaz temizleyicinin boğaz olarak adlandırılan en dar bölgesinde karışacaklarından ve su damlacıkları tarafından gaz moleküllerinin tutulması esas olarak bu bölgede olacağından dolayı buraya doğru daha sık ağ elemanı kullanılmıştır. HAD analizleri açısından önem arz eden bir diğer bölge ise lüle ile gaz temizleyicinin birleştiği yerdir. Lüle çapı gaz temizleyici çapına nazaran oldukça küçük ($d/D=0.25$) olduğundan, bu birleşme bölgesinde kullanılan ağ elemanlarının uygun şekilde seçilmesi gerekmiştir (Şekil 3b). HAD analizlerinde tercih edilecek y^+ değeri kullanılan türbülans modellerine ve -gerekli ise- kullanılan çeper fonksiyonlarına bağlı olup k-epsilon türbülans modeli için $30 \leq y^+ \leq 300$, k-omega türbülans modeli için $y^+ \leq 1$ olması tavsiye edilmektedir, ancak, çeper fonksiyonunun tercih edilmesi durumunda $y^+=10$ ’a kadar da kullanılabilen rapor edilmiştir (Majumdar, 2022). Bu çalışmada, k-omega türbülans modelinin kullanıldığı analizlerde $y^+ < 7$ olacak şekilde ağ üretilmiştir.





Şekil 3. Gaz temizleyiciler için türetilen ağ yapısının a) genel ve b) yakın görünümü.

Analiz sonuçları geliştirilen ağ örgüsünün dışında, ağ elemanı sayısına da bağlı olduğundan dolayı mevcut ağ örgüsü korunarak aynı geometri ve sınır şartları için 5 farklı sayıda ağ elemanı sayısı ile analizler tekrarlanmıştır. Ağdan bağımsızlık çalışması olarak nitelenen bu çalışma kapsamında M1=152000 eleman, M2=183000 eleman, M3=210219 eleman, M4=285473 eleman ve M5=353247 elemandan oluşacak şekilde farklı sayıda ağ elemanı ile analizler yapılarak sonuçlar toplama verimi cinsinden mukayese edilmiştir. Şekil 4'te görüldüğü üzere verim değeri eleman sayısı M3 ve M5 noktaları arasında %45 ile sabit olduğundan dolayı, türbülans modellerinin etkisinin deneneceği geri kalan tüm çalışmalar M3=210219 adet ağ elemanı sayısı ile gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4. Ağ eleman sayısı ve verim ilişkisi.

3.3. Çözücü

Bu çalışmada geliştirilen sayısal modelin doğruluğu literatürdeki ilgili çalışmalar dikkate alınarak gösterildikten sonra kare ve daire en kesitlere sahip venturi yıkayıcıların damlacık toplama verimleri ve hız ile basınç dağılımları farklı türbülans modelleri kullanılarak elde edilmiştir. Çalışmada kullanılan Ansys Fluent yazılımında venturi ile ilgili çok fazlı akış analizlerinde kullanılabilecek iki farklı yaklaşım mevcut olup bunlar Euler-Euler ve Euler-Lagrange metotlarıdır. Aşağıda her iki yaklaşımdan kısaca bahsedilmiştir.

3.3.1. Euler-Euler (E-E) yaklaşımı

Bu yaklaşımda bir faz diğerinin içine giremediğinden dolayı faz hacim oranı olarak tanımlanan bir kavram ortaya çıkmakta olup bu hacim oranının zamanın sürekli bir fonksiyonu olduğu varsayılır ve toplamları her zaman bire eşitlenir. Her fazın korunum denklemleri benzer yapıdaki fazlar için tek bir denklem elde edilmek için kullanılır. Bu yaklaşımda hacimsel model ve karışım modeli gibi iki farklı model mevcuttur [26]. Bu yaklaşımın dezavantajı parçacıkların farklı olması durumunda her parçacık için ayrı bir faz ataması yapılmasının gerekmesi olup bu zorunluluk problemin çözüm süresinin uzamasına neden olabilmektedir.

3.3.2. Euler-Lagrange (E-L) yaklaşımı

E-L yaklaşımda ikinci faz yeterince seyreltik olması durumunda kullanılır. Bu noktada damlacıkların birbiri ve gaz fazı üzerindeki etkileri ihmal edilir. Modelde parçacık ve damlacıkların rotaları ayrı ayrı hesaplandığından sıvı kurutucularda, yakıt püskürtme gibi yerlerde kullanılabilir ancak sıvı-sıvı fazlarında hacim oranının ihmal edilemediği karışımlarda kullanılamaz.

Ansys Fluent kullanıcı rehberine göre ayrık faz oranı %10 ve altında olması durumunda E-L yaklaşımı AFM ile beraber hesaplanmalıdır [27]. AFM, ikinci fazın sürekli fazda dağılmış küre biçimindeki damlacık/parçacıklardaki ısı ve kütle transferi ve hareket denklemlerinin hesaplanmasına fırsat verir. AFM bazı durumlar için sınırlayıcı etkiler ortaya çıkarabilmektedir. Örneğin; ikinci fazın küresel yapıdaki damlacık/parçacıklardan oluştuğunu ve ikinci fazın yeterince seyreltik durumda olması bu varsayımlardandır. Venturi yıkayıcılarda hız ve basınç gibi hidrodinamik özellikler deneysel, ampirik ve HAD yöntemiyle hesaplanabilmektedir. AFM, akışkan içerisinde bulunabilen sıvı, katı veya gaz parçacıklarını ayırt etmek için kullanılmaktadır ve Navier - Stokes denklemlerini kullanarak bu gibi parçacıkların izlediği yörüngeler hesaplanabilir. Ayrık fazın sürekli faz ile enerji, momentum ve kütle etkileşimi bulunmakta ise de kendi içerisindeki etkileşimi göz ardı edilir.

3.4. Akışı Yöneten Denklemler

Newtonyen ve sıkıştırılmaz kabul edilen akışkanların akışına ait temel denklemler kütle korunumu (Eşitlik 1) ve momentumun korunumu (Eşitlik 2) olup aşağıda verilmişlerdir.

$$\frac{\partial \rho}{\partial t} + \frac{\partial (\rho U_i)}{\partial x_i} = 0 \quad (1)$$

$$\frac{\partial (\rho U_i U_j)}{\partial x_i} = -\frac{\partial P}{\partial x_i} + \frac{\partial}{\partial x_j} \left(\mu \frac{\partial U_i}{\partial x_j} - \rho \overline{u_i' v_j'} \right) \quad (2)$$

Eşitlik 2’de sol taraf momentumun taşınmasını, sağ taraftaki 1. terim basınç gradyanını, 2. terim viskoz gerilmeleri, $-\rho \overline{u'_i v'_j}$ terimi Reynolds gerilmesi olarak da bilinen türbülans gerilmesini ifade etmekte olup bu eşitlikte yer alan bileşenlerin çözülebilmeleri için ilave denklemlere ihtiyaç duyulur. Eşitlik 3’te Reynolds gerilmesinin Boussinesq yaklaşımı ile açılımı gösterilmiştir [28].

$$\overline{u'_i u'_j} = \nu_t \left(\frac{\partial U_i}{\partial x_j} - \frac{\partial U_j}{\partial x_i} \right) - \frac{2}{3} k \delta_{ij} \quad (3)$$

Burada yer alan ν_t ve k sırasıyla eddy viskozitesini ve türbülans kinetik enerjisini göstermekte iken δ_{ij} kronecker delta’yı ifade etmektedir. HAD analizlerinde kullanılabilecek birçok türbülans modeli bulunmaktadır ve hepsinin birbirinden farklı avantajları mevcuttur. Özellikle endüstriyel uygulamalarda en çok tercih edilenleri türbülans kinetik enerjisi (k) ve türbülans kinetik enerjisinin yitim hızını (ε , ω gibi) gösteren iki denklemlilik türbülans modelleridir. Çalışmada standart k-epsilon (SKE) ve standart k-omega (SKO) türbülans modelleri ile bunların türevleri olarak bilinen RNG k-epsilon (RNG KE) ve Realizable k-epsilon (RKE) ve SST k-omega (SST KO) türbülans modellerinin venturi tipi gaz temizleyicilerdeki performansları değerlendirilmiştir. Bu modellerden SKE türbülans modeli ait taşınım denklemlerinin ilki olan türbülans kinetik enerjisi, k Eşitlik (4)’te, türbülans kinetik yitim oranı, ε ise Eşitlik (5)’te gösterilmiştir.

$$\frac{\partial(\rho k)}{\partial t} + \frac{\partial(\rho k u_i)}{\partial x_i} = \frac{\partial}{\partial x_j} \left[\left(\mu + \frac{\mu_t}{\sigma_k} \right) \frac{\partial k}{\partial x_j} \right] + P_k - \rho \varepsilon \quad (4)$$

$$\frac{\partial(\rho \varepsilon)}{\partial t} + \frac{\partial(\rho \varepsilon u_i)}{\partial x_i} = \frac{\partial}{\partial x_j} \left[\left(\mu + \frac{\mu_t}{\sigma_\varepsilon} \right) \frac{\partial \varepsilon}{\partial x_j} \right] + C_{1\varepsilon} \frac{\varepsilon}{k} P_k - C_{2\varepsilon} \rho \frac{\varepsilon^2}{k} \quad (5)$$

Eşitlik 4’te sol tarafın 1. terimi türbülans kinetik enerjisinin zamana bağlı değişimini, 2. terimi ise türbülans kinetik enerjisinin akışkanın hareketiyle birlikte taşınmasını ifade etmektedir. Eşitliğin sağ tarafındaki terimler ise sırasıyla yayılma, türbülans kinetik enerjisinin üretimini ve son olarak yitimini temsil etmektedir. Benzer durum Eşitlik 5 için de ifade edilebilir. Eşitliklerde yer alan μ_t türbülans viskozitesi ve C_μ katsayı olup Eşitlik 6’daki gibi tanımlanmışlardır.

$$\mu_t = \rho C_\mu \frac{k^2}{\varepsilon}, \quad C_\mu = \frac{1}{A_0 + A_s \cdot \frac{k}{\varepsilon}} \quad (6)$$

RKE modeline ait türbülans kinetik enerjisi ve yitim oranı ise Eşitlik (7) ve (8)’de sunulmuştur.

$$\frac{\partial(\rho k)}{\partial t} + \frac{\partial(\rho k u_i)}{\partial x_i} = \frac{\partial}{\partial x_j} \left[\left(\mu + \frac{\mu_t}{\sigma_k} \right) \frac{\partial k}{\partial x_j} \right] + C_{1k} \frac{\varepsilon}{k} P_k - C_{2k} \rho \frac{\varepsilon^2}{k} \cdot \frac{1}{1 + \beta \frac{\varepsilon}{k}} \quad (7)$$

$$\frac{\partial(\rho \varepsilon)}{\partial t} + \frac{\partial(\rho \varepsilon u_i)}{\partial x_i} = \frac{\partial}{\partial x_j} \left[\left(\mu + \frac{\mu_t}{\sigma_\varepsilon} \right) \frac{\partial \varepsilon}{\partial x_j} \right] + C_{1\varepsilon} \frac{\varepsilon}{k} P_k - C_{2\varepsilon} \rho \frac{\varepsilon^2}{k} \cdot (1 - \eta) \quad (8)$$

(9) numaralı denklem RNG k- ε türbülans modelinin enerji yitim oranını göstermektedir. (10) numaralı eşitlik düşük türbülanslı bölgelerde doğruluğu arttıran ilgili denklemler verilmiştir.

$$\frac{\partial(\rho \varepsilon)}{\partial t} + \frac{\partial(\rho \varepsilon u_i)}{\partial x_i} = \frac{\partial}{\partial x_j} \left[\left(\mu + \frac{\mu_t}{\sigma_\varepsilon} \right) \frac{\partial \varepsilon}{\partial x_j} \right] + C_{1\varepsilon} \frac{\varepsilon}{k} P_k - C_{2\varepsilon} \rho \frac{\varepsilon^2}{k} \cdot \frac{1}{1 + \beta \frac{\varepsilon}{k}} \quad (9)$$

(10) numaralı eşitlikte SST k- ω türbülans modelinin türbülans kinetik enerjisi, (11) numaralı eşitlikte enerji yitim oranı verilmiştir.

$$\frac{\partial(\rho k)}{\partial t} + \frac{\partial(\rho k u_i)}{\partial x_i} = \frac{\partial}{\partial x_j} \left[\left(\mu + \frac{\mu_t}{\sigma_k} \right) \frac{\partial k}{\partial x_j} \right] + P_k - \beta^+ \rho k \quad (10)$$

$$\frac{\partial(\rho \omega)}{\partial t} + \frac{\partial(\rho \omega u_i)}{\partial x_i} = \frac{\partial}{\partial x_j} \left[\left(\mu + \frac{\mu_t}{\sigma_\omega} \right) \frac{\partial \omega}{\partial x_j} \right] + \alpha \frac{\omega}{k} P_k - \beta \rho \omega^2 \quad (11)$$

Eşitlik 12’de gösterilen Reynolds sayısı değeri $7 \times 10^4 \leq Re \leq 2.5 \times 10^5$ olacak şekilde hesaplanmıştır [29].

$$Re_{D_{hd}} = \frac{u_{venturi} D}{\nu} \quad (12)$$

Damlacık toplama verimi Eşitlik 13’te gösterilmiştir.

$$Toplama \ verimi \ \eta = \frac{Yakalanan \ Tanecik \ Sayısı}{Toplam \ Tanecik \ Sayısı} \quad (13)$$

Eşitlik 14 ile AFM metodunda Lagrange yaklaşımı ile parçacık takibi temsil edilmektedir. Burada u_p parçacık ortalama hızı, t zaman, ρ ve p_p ise akışkan ve parçacık yoğunluğunu, d_p parçacık çapı, C_D direnç katsayısı, u yerel akışkan hızı, $u' = u_p + u_{df}$ eşitliğinde u_{df} parçacık difüzyonu hızı, P akışkan basıncı, g yerçekimi ivmesi olarak gösterilmiştir [30].

$$\frac{du_p}{dt} = \frac{3\rho}{4d_p \rho_p} C_D (u - u') |u - u'| - \frac{1}{\rho_p} \nabla P + \frac{(\rho - \rho_p)}{\rho_p} g \quad (14)$$

Diferansiyel formdaki türbülans modeli denklemlerinin çözümleri için başlangıç şartı olarak türbülans yoğunluğu (Eşitlik 15) $I=0.03$ ve karakteristik uzunluk (Eşitlik 16) $T_L = 2.5 \times 10^{-3}$ mm olarak tanımlanmıştır. Simülasyonlarda havanın giriş debisi 0.987 kg/s olarak dikkate alınmıştır. Hem hava hem de su girişi uniform olarak kabul edilmiştir.

$$I = 0.16x(Re_{D_{hd}})^{-1/8} \quad (15)$$

$$T_L = L \times 0.07 \quad (16)$$

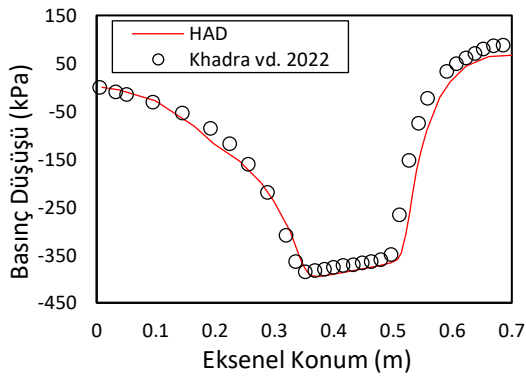
AFM metodunda su damlacıklarının ölçülerinin interpolasyonu için Rosin-rammler metodu tercih edilmiştir. Damlacıkların akış hızı 16 m/s, toplam akış debisi 6.6×10^{-4} kg/s ve yayılım parametresi ise 3.5

olarak tanımlanmıştır. Her bir damlacık boyutu 1×10^{-5} m olarak dikkate alınmış olup bunların yüzey normali doğrultusunda püskürtüldüğü varsayımı yapılmıştır. Zaman adımı 0,1 saniye olarak belirlenmiş olup, verifikasyon çalışması dahil, analizler 455 zaman adımı için yapılmıştır. Basınç ve hız değişkenleri birbirlerine bağlı (coupled); basınç, momentum, türbülans kinetik enerjisi ve türbülans kinetik enerji yitimi ile enerji denklemleri 2.dereceden uzaysal ayrıklaştırma ile çözdürülmüştür.

IV. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Verifikasyon ve Doğrulama

Verifikasyon çalışmaları için Khadra vd. [31] tarafından sunulan veriler, doğrulama için de Silva vd [17] tarafından gerçekleştirilen deneysel çalışma sonuçları dikkate alınmıştır. Bu amaçla, aynı geometrik ölçüler ve sınır şartları kullanılarak çift fazlı akış analizleri gerçekleştirilmiştir. Her iki çalışmada hava boğazdan 10 m/s hızla akarken su da lülelerden 0.05 kg/s debi ile gaz temizleyiciye püskürtülmüştür. Şekil 5'te görüldüğü üzere bu sayısal çalışma ile Khadra vd. [31] tarafından elde edilen basınç dağılımları birbirleriyle oldukça uyumludurlar.

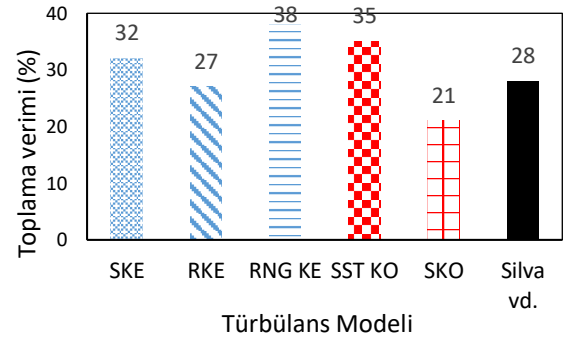


Şekil 5. Khadra vd. [31] ile yapılan mukayese.

AFM kullanılarak gerçekleştirilen bu çalışmada Lagrange yaklaşımı ile ikinci fazın ayrık faz olarak modellenmesine imkân tanınmış ve böylece gaz temizleyiciye 4 adet lülede su damlacıklarının gönderilmesi mümkün olmuştur. Bu damlacıklar gaz moleküllerini yakalayarak tutmaktadır.

4.2. Türbülans Modellerinin Performansları

Türbülans modellerinin damlacık toplama verimini tahmin etmedeki yeterliliklerini görmek üzere havanın gaz temizleyicinin boğaz kısmından 70 m/s hız, suyun ise lülelerden 0.038 kg/s debi ile püskürtüldüğü durumdaki damlacık toplama verimi Silva vd. [17] tarafından deneysel olarak %28 bulunan toplama verimi ile mukayese edilmiştir. Şekil 6'da sunulduğu üzere deneysel sonuçlara en yakın toplama verimi RKE türbülans modelinin kullanılmasıyla %27 olarak bulunmuştur.



Şekil 6. Farklı türbülans modelleri ile elde edilen toplama verimi.

Tablo 1'de gösterildiği üzere toplama verimini en yakın değerde hesaplayan RKE türbülans modeli iken SKE %4 sapma oranı ile ikinci en başarılı modeldir. Buna karşın KE modelinin diğer versiyonları olan RNG-KE ve SKO ve SST-KO ise deneysel sonuçlarla uyumlu olmayan sonuçlar vermişlerdir.

Tablo 1. Farklı türbülans modelleri ile hesaplanan toplama verim değerleri.

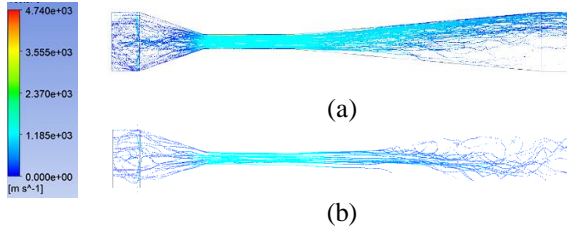
Deney ve türbülans modelleri	Verim %	Fark %
Silva vd., [17]	28	-
RKE	27	1
SKE	32	4
SKO	21	7
SST-KO	35	7
RNG-KE	38	10

İncelenen beş farklı türbülans modeli içerisinde toplama verimi açısından en iyisinin RKE, en kötüsünün ise SKO olduğu bulunmuştur. Tablo 1'de mukayeseli olarak bu farklar gösterilmiş ve Silva, vd. [17] çalışmasına en yakın verim değerinin RKE modeli elde edildiği gösterilmiştir. Deneysel çalışmada debileri 0.038 kg/s olan su ve 0.987 kg/s alüminyum oksit (Al_2O_3) kullanılmıştır. Yoğunluğu 3970 kg/m^3 olan bu kimyasal madde deneylerde $10 \mu\text{m}$ boyutunda 300 gram toz olarak kullanılmıştır. Benzer şartlar sağlanarak AFM ve RKE türbülans modelinin kullanılması durumunda gaz temizleyicideki su damlacıklarının dağılımı Şekil 7'de sunulmuştur.

Tablo 2. RKE ve AFM ile gerçekleştirilen çalışmada kullanılan değerler.

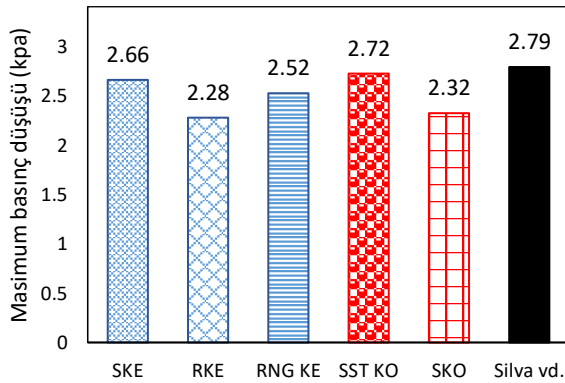
Değişken	Değer	Birim
Su debisi	0.038	(kg/s)
Damlacık çapı	10	(μm)
Damlacık miktarı	300	(gr)
Damlacık yoğunluğu	3970	(kg/m^3)
Damlacık debisi	0.987	(kg/s)

Şekil 7’de su damlacıklarının gaz temizleyici çıkışına kadar olan aksel mesafe boyunca kare-kesitli ve daire-kesitli gaz temizleyicilerde nasıl taşındığı görülmektedir. Damlacıklar geometrik özelliklerden dolayı başlangıçta birbirlerine oldukça yakın ve dolayısıyla yoğun olarak görülmekte iken gaz temizleyicinin ilerleyen kısımlarında değişen yapıdan dolayı daha dağılmış haldedirler. Bu durum türbülans etkisinin ve gaz akışı içinde damlacıkların dağılmasının bir sonucudur.



Şekil 7. Su damlacıklarının a) kare-kesitli ve b) daire-kesitli gaz temizleyicideki akışı.

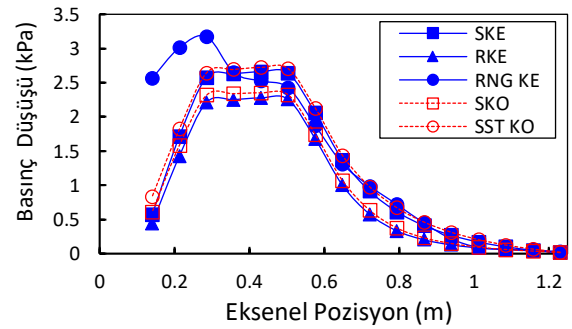
Şekil 8’de daire kesitli gaz temizleyicinin yakınsama bölgesindeki maksimum basınç düşüşlerinin farklı türbülans modelleri kullanılarak hesaplanmış değerleri gösterilmektedir. Bu çalışmaya ait sayısal sonuçlar Silva vd. tarafından gerçekleştirilen deneysel çalışmalarda ölçülen 2.79 kPa ile karşılaştırılmıştır. Toplama veriminin tahmininde deneysel veriye en yakın değeri veren RKE türbülans modelinin basınç düşüşü söz konusu olduğunda en kötü model olduğu görülmektedir. Maksimum basınç düşüşünün tahmininde SST-KO türbülans modelinin daha başarılı olduğu tespit edilmiştir. RKE modelinden sonra en uzak tahminin SKO türbülans modeli ile elde edildiği ortadadır.



Şekil 8. Farklı türbülans modelleri ile daire kesitli gaz temizleyicide hesaplanan maksimum basınç düşüşü (x=0,4 m).

Şekil 9’da SKE, RNG-KE ve RKE ile SKO ve SST-KO gibi iki denklemlilik türbülans modelleri kullanılarak hesaplanan basınç düşüşleri, aksel pozisyona bağlı olarak verilmiştir. Islak venturi tipi gaz temizleyici i) giriş bölgesi, ii) boğaz ve iii) çıkış bölgesi olmak üzere 3 farklı bölgeye ayrılıp ayrı ayrı incelenecek olursa,

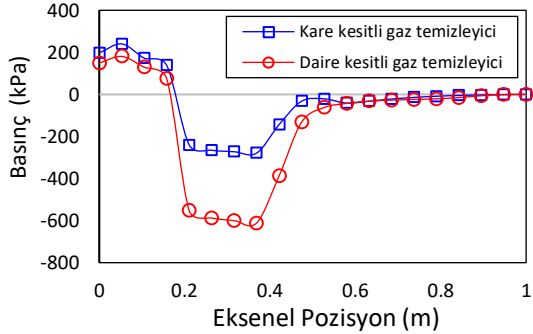
havanın gaz temizleyiciye girdiği giriş bölgesindeki daralmadan ötürü basıncın hızla azaldığı görülebilir. Giriş bölgesinde RNG-KE türbülans modelinin diğer modellerden daha yüksek değerde basınç düşüşü hesapladığı, bunun dışında kalan diğer tüm türbülans modellerinin ise birbirleri ile daha uyumlu dağılımlar sağladığı ifade edilebilir. Gaz temizleyicinin en dar yeri olan boğaz bölgesinde hava akışı en yüksek hızda gerçekleştiğinden dolayı Bernouilli prensibine göre basınç değeri de bu bölgede en düşük olmaktadır. RNG-KE türbülans modeli boğaz bölgesinde de diğerlerinden farklı bir dağılım izleyerek ayrılmaktadır. Bu bölgede RKE ve SKO benzer dağılımlar gösterirken, SKE ve SST KO birbirleri ile daha yakın değerde basınç düşüşü hesaplamışlardır. Son bölge olan genişleme bölgesinde ise RNG KE da dahil olmak üzere tüm modellerin birbirlerine oldukça yakın basınç düşüşü hesaplayabildikleri görülmektedir. Bunun temel nedenleri olarak akış karakteristiğinin türbülanslı olmasından dolayı seçilen modellerin benzer varsayımlar yapması ve basınç düşüşünün seçilen modellerden ziyade akışın temel özelliklerine ve geometriye bağlı olmasıdır. RKE türbülans modelinin girişten genişleme bölgesine kadar tüm bölgelerde genel olarak daha düşük basınç düşüşü gösterdiği not edilmelidir.



Şekil 9. Farklı türbülans modelleri ile hesaplanan basınç düşüşleri (su debisi=0,038 kg/s, hava debisi=0,01 kg/s).

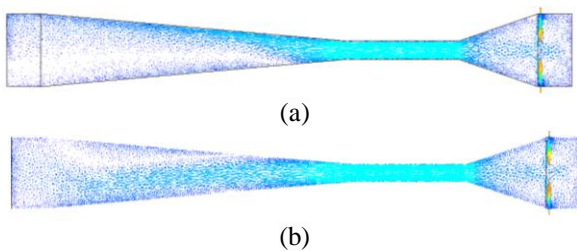
Gaz temizleyici kesit geometrilerinin akış yapısı ve basınç dağılımlarına olan etkileri Şekil 10’da sunulmuştur. Daire ve kare kesitli gaz temizleyicilerden akmakta olan akış başlangıçta pozitif basınçlara sahipken, hız artışının olduğu boğaz bölgesinde Bernouilli prensibine göre basınç düşmektedir. Basıncıdaki bu düşüş, oluşan yüksek akış hızlarına bağlı olarak negatif değerlere kadar devam etmekte, akabinde yaklaşık 0,4 m civarında en düşük değere ulaşmakta ve genişleme bölgesinde toplanarak sıfır cihaz basıncında gaz temizleyiciyi terk etmektedir. Daire kesitli gaz temizleyicideki basınç düşüşü kare kesitli temizleyiciye göre daha çok olup negatif basınç değeri daha düşük seviyelerde olmaktadır. Bu durum, daire kesitli gaz temizleyicide, kare kesitliye nazaran akışkanın daha az dirençle karşılaşarak daha yüksek hızlarda akabilmekte ve buradaki basınç düşüşünün kare kesitliye nazaran daha yüksek olmasına yol açmaktadır. Elde edilen sonuçta

göre, eğer bir uygulamada hız gereksinimi yüksekse daire kesitli gaz temizleyici, amaç sistemde basınç kaybını en az düzeyde tutmak ise kare kesitli gaz temizleyici kullanmanın daha avantajlı olacağını söylemek mümkündür.



Şekil 10. Kare ve daire kesitli gaz temizleyicilerdeki basınç dağılımları.

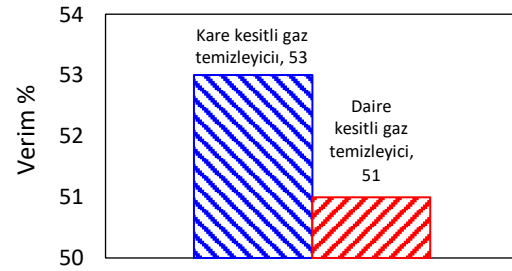
Şekil 11'de kare ve daire kesitli gaz temizleyicilerdeki hız vektörlerinin dağılımları karşılaştırılmıştır. Kare kesitte akış, kanal geometrisinin sınırlarına bağlı olarak daha düzenli bir hız profili sergilemekte ise de köşe bölgelerinde enerji kaybı veya türbülans oluşumu gözlemlenmiştir. Daire kesitli gaz temizleyicide akış, daha az köşe direnci nedeniyle daha pürüzsüz ve hızlı bir şekilde yönlendirilmektedir. Konik yapıdan dolayı akış merkez bölgede hızlanmakta simetrik bir şekilde devam etmektedir. Kare kesitli gaz temizleyicide akışkan daha geniş bir alana yayılarak akış kararlılığı açısından avantaj sağlamaktadır. Kare kesit, köşe bölgelerinde türbülans ve enerji kayıplarına daha yatkın iken daire kesitli gaz temizleyicide geometriden dolayı türbülans daha az oluşarak akış direnci azaltılmaktadır. Bu durum Şekil 10'da gösterilen basınç dağılımında da görülebilmektedir. Uygulama açısından bakıldığında daire kesitli gaz temizleyici daha düşük basınç kaybı ve yüksek hızların gerektirdiği çalışmalarda tercih edilebilir.



Şekil 11. Kare (a) ve daire (b) kesitli gaz temizleyicilerdeki hız vektörleri.

Şekil 12'de RKE türbülans modeli kullanılarak kare ve daire kesitli gaz temizleyicilerdeki toplama verimi değerleri karşılaştırmalı olarak verilmiştir. Görüldüğü üzere kare kesitli gaz temizleyicinin toplama verimi daire kesitli gaz temizleyicinin toplama veriminden %2 daha yüksektir. Bunun nedeni kare kesitli gaz

temizleyicinin içeride akmakta olan akışkanlara daha geniş bir akış alanı sağlayarak damlacıkların tutulmasında avantaj sağlaması ve akışkanın daha türbülanslı olup bunun etkisiyle damlacıkların daha etkili bir şekilde tutulmuş olması olabilir. Daire kesitli temizleyicide, akışın daha hızlı ve simetrik olması, damlacıkların yüzeylerle temasını azaltarak daha düşük bir verime neden olmuş görünmektedir. Dolayısıyla, yüksek verim gereken uygulamalarda kare kesitli gaz temizleyici tercih edilebilir. Ancak, verim farkının %2 gibi küçük bir değer olması da dikkate alındığında daha hızlı akış istenen uygulamalarda dairesel kesitli gaz temizleyici de düşünülebilir.



Şekil 12. Kare ve daire kesitli gaz temizleyicilerde toplama verimi

V. SONUÇ

Hesaplamalı akışkanlar dinamiği (HAD) metodu kullanılarak gerçekleştirilen bu çalışmada, en kesit geometrileri dışında tamamen özdeş olan kare ve dairesel kesitli iki gaz temizleyicinin hidrodinamik performansları SKE, RNG-KE, RKE ve SKO ve SST-KO gibi farklı türbülans modelleri ile incelenmiştir. Her bir türbülans modeli ile elde edilen toplama verimi, literatürde Silva vd. tarafından deneysel olarak hesaplanmış olan toplama verimi değerleri ile karşılaştırılarak deneysel değere en yakın toplama verimi sağlayan RKE türbülans modeli olduğu belirlenmiştir. RKE türbülans modelinin toplama verimindeki bu başarısına karşılık, maksimum basınç düşüşü açısından en kötü performans gösteren modelin de yine RKE olduğu saptanmıştır. Maksimum basınç düşüşünün tahmin edilmesinde deneysel değere en yakın sonuç veren modellerin sırasıyla SST-KO ve SKE ile elde edilmesi, farklı türbülans modellerinin farklı değişkenler söz konusu olduğunda aynı performansı göstermediğini ortaya koymaktadır. Yapılan karşılaştırmalarda, dairesel kesitli gaz temizleyicide daha fazla basınç düşüşü olduğu belirlenmiştir. Köşeli yapısından dolayı içeride neden olduğu türbülanslı akışın bir sonucu olarak ve sağladığı daha düşük hız değerlerinden ötürü kare kesitli gaz temizleyicinin toplama veriminin %53 olarak daire kesitli gaz temizleyici veriminden %2 kadar daha yüksek toplama verimi sağladığı ortaya konulmuştur.

KAYNAKLAR

- [1] Hava Kirliliği ve Sağlık Etkileri-Kara rapor, Temiz Hava Hakkı Platformu” 2019.
- [2] Guerra, V.G., Béttega, R., Gonçalves, J.A.S., Coury, J.R. (2012). Pressure drop and liquid distribution in a venturi scrubber: Experimental data and CFD simulation. *Ind Eng Chem Res*, 51(23), 8049–8060.
- [3] Yang, S., Zhao, X., Sun, W., Yuan, J., Wang, Z. (2019). Effect of ring baffle configuration in a self-priming venturi scrubber using CFD simulations. *Particuology*, 47, 63–69.
- [4] Giroth, E.J., Ang, E.B. (2022). The design and evaluation of exhaust gas cleaning system equipped with SO_x scrubber,” 2022 IEEE 13th *International Conference on Mechanical and Intelligent Manufacturing Technologies*, Cape Town, South Africa.
- [5] Bal, M., Meikap, B.C. (2017). Prediction of hydrodynamic characteristics of a venturi scrubber by using CFD simulation, *S Afr J Chem Eng*, 24, 222–231.
- [6] Brown, K., Kalata, W., Schick, R. (2014). Optimization of SO₂ scrubber using CFD modeling, *Procedia Engineering*, 170–180.
- [7] Joni, J., Tambing, E., Siregar, S.P., Setiawan, R.P.A., Tambunan, A.H., Siregar, K. (2023). Evaluating the application of bubble wet scrubber systems for gas cleaning in gasification, *Instrumentation Measure Metrologie*, 22(1), 21–27
- [8] Wang, S.C., Gabriela, D. (2022). Filtering analysis of a wet scrubber with computational fluid dynamics simulation. IEEE 4th Eurasia Conference on IOT, *Communication and Engineering (ECICE)*, Yunlin, Taiwan
- [9] Guerra, V.G., Gonçalves, J.A.S., Coury, J.R. (2008). Experimental investigation on the effect of liquid injection by multiple orifices in the formation of droplets in a Venturi scrubber. *J Hazard Mater*. 161(1), 351–359.
- [10] Luan, Z., Liu, X., Zheng, M., Zhu, L. (2017). Numerical simulation of square section venturi scrubber with horizontal spray, *Procedia Computer Science*, 107, 117–121.
- [11] Ali, M., Yan, C., Sun, Z., Wang, J., Gu, H. (2013). CFD simulation of dust particle removal efficiency of a venturi scrubber in CFX. *Nuclear Engineering and Design*, 256, 169–177.
- [12] Ulas, A. (2006). Passive flow control in liquid-propellant rocket engines with cavitating venturi. *Flow Measurement and Instrumentation*, 17(2), 93–97.
- [13] Manzano, J., Palau, C.V., De Azevedo, B.M., Do Bomfim, G.D., Vasconcelos, D.V. (2016). Geometry and head loss in venturi injectors through computational fluid Dynamics. *J Brazilian Association of Agricultural Engineering*, 3, 482–491.
- [14] O’Hern, H., Murphy, T., Zhang, X., Liburdy, J., Abbasi, B. A. (2022). Design method for low-pressure venturi nozzles, *Applied Mechanics*, 3(2), 390–411.
- [15] Wilson, D.A, Pun, K., Ganesan, P.B., Hamad, F. (2021). Geometrical optimization of a venturi-type microbubble generator using CFD simulation and experimental measurements. *Design*, 5(1), 4.
- [16] Shi, H., Li, M., Nikrityuk, P., Liu, Q. (2019). Experimental and numerical study of cavitation flows in venturi tubes: From CFD to an empirical model. *Chem Eng Sci*, 207, 672–687.
- [17] Silva, A.M., (2008). Numerical and Experimental Study of Venturi Scrubbers, PhD thesis, Universidade do Minho, Portugal.
- [18] Xu, Y., Zhao, Y., Long, Z. (2012). Study on the key factors of wet gas metering overreading in standard venturi tube base on DPM. *Applied Mechanics and Materials*, 220-223, 1693–1697.
- [19] Atmaca, M., Cetin, B., Ezgi, C., Kosa, E. (2021). CFD analysis of jet flows ejected from different nozzles. *International Journal of Low-Carbon Technologies*, 16(3), 940–945.
- [20] Luan, Z., Liu, X., Zheng, M., Zhu, L. (2016) Numerical simulation of square section venturi scrubber with horizontal spray. *Procedia Computer Science*, 107, 117-121.
- [21] Turkoglu, F., Bayraktar, S. (2023). Effects of the Nozzle Location on Hydrodynamic Properties of a Venturi- Type Scrubber. *International conference on innovative academic studies*, 3(1),107-111.
- [22] Turkoglu, S., Bayraktar, S. (2024). Kara ve Denizcilik Sektöründe Kullanılan Gaz Temizleyiciler (Scrubbers) Hakkında Literatür İncelenmesi. The 3rd International Congress on Ship and Marine Technology (GMO-SHIPMAR 2024) Trabzon, Turkey.
- [23] ASME, (2005). Measurement of fluid flow in pipes using orifice, nozzle, and venturi. The American Society of Mechanical Engineers. MFC-3M-2004; United Engineering Center: New York, NY, USA.
- [24] Baylar, A., Aydin, M.C., Unsal, M., Ozkan, F. (2009). Numerical modeling of venturi flows for determining air injection rates using Fluent V6.2. *Math. Comput. Appl.* 14, 97-108.
- [25] Majumdar, P. (2022). Computational fluid dynamics and heat transfer, 2nd Edition, CRC Press.
- [26] Ansys Inc, (2018). ANSYS Fluent Tutorial Guide.
- [27] Ansys Inc, (2016). ANSYS Fluent Tutorial Guide.
- [28] Bolek, A., Bayraktar, (2019). Flow and heat transfer investigation of a circular jet issuing on different types of surfaces. *Sadhana*, 44, 242.
- [29] Brunhart, M., Soteriou, C., Gavaises, M., Karathanassis, I. (2020). Investigation of cavitation and vapor shedding mechanisms in a venturi nozzle. *Physics of Fluids*, 32(8), Article 083306.

-
- [30] Zahari, N.M., Zawawi, M.H., Sidek, L.M., Mohammad, D., Itam, Z., Ramli, M.Z., Syamsir, A., Abas, A., Rashid, M, (2018). Introduction of discrete phase model (DPM) in fluid flow: A review,” *AIP Conference Proceedings*, 2030 (1).
- [31] Khadra, H., Kouider, R., Tayeb, N.T., Al-Kassir, A., Carrasco-Amador, J.P, (2022). Numerical Simulation of the Cleaning Performance of a Venturi Scrubber. *Energies*, 15(4), 1531.

Nitrasyon Uygulanmış Waspaloy Alaşımının Oksidasyon Davranışı Üzerine Bir İnceleme Çalışması

A Study on the Oxidation Behavior of Nitrided Waspaloy Alloy

Mehmet Masum TÜNÇAY ¹ 

¹Marmara Üniversitesi (MÜ), Mühendislik Fakültesi, Metalurji ve Malzeme Mühendisliği Bölümü, 34854, İstanbul, Türkiye

Öz

Nikel bazlı bir süper alaşım olan Waspaloy gaz türbinleri gibi yüksek sıcaklık uygulamalarında kullanılmaktadır. Süper alaşımların kullanım sıcaklıklarının daha da artırılması için krom, alüminyum, tantal, hafniyum gibi farklı element ilaveleri ya da fiziksel buhar biriktirme, kimyasal buhar biriktirme, difüzyon kaplama, thermal bariyer kaplama gibi yüzey işlemleri uygulanabilmektedir. Bu çalışmada, gaz nitrasyon işlemi sonrası Waspaloy'un oksidasyon direnci incelenmiştir. Gaz nitrasyonu, azot iyonlarının malzeme yüzeyine difüzyonunu sağlayarak CrN fazı oluşturmasıyla sertlik ve aşınma direncini arttırmayı amaçlar. Nitrasyon uygulanmış numuneler, 48, 96 ve 288 saat boyunca 1175°C'de izotermal oksidasyona tabi tutulmuştur ve ağırlık kazanımları sırasıyla 0,01, 0,03 ve 0,45 gram olarak ölçülmüştür. Oksidasyon sonrası mikroyapının kesit görüntüleri SEM ile incelenmiş ve yüzeye XPS işlemi gerçekleştirilmiştir. Sonuçlara göre, 48 sa numunesinden itibaren bir miktar oksitlenme başlamakla birlikte 288 sa sonunda oksidasyon şiddetinde dikkate değer bir artış olmuştur. XPS analizlerinde 288 saatlik numunede ilave Co ve O pikleri tespit edilmiştir; bu, kobalt içerikli oksit oluşumuna işaret etmektedir. İzotermal oksidasyon işlemi sonrası numunenin mekanik performansındaki değişimi gözlemlemek amacıyla iç bölgeden mikrosertlik ölçümü alınmıştır. Numunelerin oksidasyon öncesi ve 48 sa, 288 sa oksidasyon sonrası iç bölge sertlikleri ise sırasıyla 457±7, 373±9, 347±7 HV_(0.2) olarak ölçülmüştür. Sertlikteki düşüş olası çökelti çözünmesi ve/veya tane sınırlarında meydana gelen ve buralardaki çökeltilerin olası iç oksidasyonu ile oluşan çökelti azalması ile ilişkilendirilebilir. Ağırlık kazanımları, SEM kesit görüntüleri ve XPS analizlerine göre gaz nitrasyonunun, 1175°C'de Waspaloy'un oksidasyon direncini arttırmada yeterli koruma sağlayamadığı düşünülebilir. Bununla birlikte, gelecekteki çalışmalarda daha detaylı bir oksit karakterizasyonu ve metalurjik yapı bozunması analizi tavsiye edilmektedir.

Anahtar Kelimeler: Waspaloy, Gaz Nitrasyon, Oksidasyon, İzotermal

Abstract

Waspaloy, a nickel-based superalloy, is widely used in high-temperature applications such as gas turbines. Enhancing the operating temperature limits of superalloys often involves adding elements like chromium, aluminum, tantalum, and hafnium or applying surface treatments such as PVD, CVD, diffusion coatings, and thermal barrier coatings. This study investigates the oxidation resistance of Waspaloy following gas nitriding, a process that enhances hardness and wear resistance by forming a CrN phase through nitrogen diffusion. Nitrided samples were subjected to isothermal oxidation at 1175°C for 48, 96, and 288 hours, with weight gains of 0.01, 0.03, and 0.45 grams, respectively. Cross-sectional microstructures were analyzed via SEM, and surface characterization was performed using XPS. Oxidation began after 48 hours, with significant progression by 288 hours. XPS analysis of the 288-hour sample revealed Co and O peaks, suggesting the formation of cobalt-containing oxides. Interior microhardness measurements, to evaluate changes in mechanical performance after isothermal oxidation, showed reductions from 457±7 HV_(0.2) pre-oxidation to 373±9 HV_(0.2) and 347±7 HV_(0.2) after 48 and 288 hours, respectively. This hardness decrease is linked to potential precipitate dissolution and/or precipitate depletion due to possible internal oxidation at grain boundaries. The findings suggest that gas nitriding does not sufficiently improve Waspaloy's oxidation resistance at 1175°C. Detailed characterization of oxides and metallurgical degradation is recommended for future studies.

Keywords: Waspaloy, Gas Nitriding, Oxidation, Isothermal

I. GİRİŞ

Süper alaşımlar, özellikle yüksek sıcaklık uygulamaları için tasarlanmış yüksek performanslı malzemelerdir. Bu alaşımlar, yüksek mekanik dayanım, korozyon direnci, yüzey kararlılığı ve termal sürünme direnci gibi üstün özelliklere sahiptir. Süper alaşımlar, tipik yüzey merkezli kübik (YMK) östenitik kristal yapıya sahiptir, ve kimyasal değişiklik (alaşım elementi ilavesi) yoluyla tasarlanır. Genellikle katılaşmada tek bir kristal fazlı yapı elde edilecek şekilde ergitilerek dökülürler. Tane sınırları düşük sıcaklıklarda bir miktar dayanım sağlayabilirken aynı zamanda sürünme direncini de azaltır. Süper alaşımlar, yaşlandırma sertleştirilmesi ve gama prime (γ') ve karbürler gibi ikincil faz çökeltilerinden katı çözelti (alaşım) takviyesi yoluyla yüksek sıcaklık dayanımına ulaşır. Süper alaşımlar genellikle nikel bazlıdır ve yüksek sıcaklıklarda yük taşıma kapasiteleri ile bilinirler. Nikel bazlı süper alaşımlar (NBS'ler), benzersiz γ' çökeltisi sayesinde bu uygulamalar için popüler bir malzeme haline gelmiştir. Nikel alaşımları mukavemeti, sıcaklığı, oksidasyonu ve korozyon direncini artırmak için oluşturulmuştur. Süper alaşımlar, gaz türbinleri, havacılık, kimyasal işleme ve kömür dönüştürme tesislerinde yaygın olarak kullanılır. Yüksek sıcaklıklar, mekanik stres ve yüzey kararlılık, nikel süper alaşımlarının gaz türbini olarak kullanılmasındaki en önemli özellikleridir [1, 2]. Yaklaşık 980 °C'ye kadar mükemmel mukavemet ve iyi korozyon direncini koruyan Waspalloy, yaşlandırılarak veya çökeltme sertleştirilmesi ile dayanımı artırılmış östenitik nikel bazlı bir süper alaşımdır. United Technologies Corp.'un ticari marka olarak tescil ettirdiği bu alaşım, gaz türbinleri gibi yüksek sıcaklık uygulamalarında kullanılmaktadır [3].

Ni bazlı süper alaşımlar, gaz türbini motorunun sıcak bölümlerinde ciddi gerilme ile karşı karşıyadır ve bileşimsel ve mikroyapısal olarak optimize edilmiştir. Oksidasyon bozulması, bu koşullar altında bileşen ömrünün belirlenmesinde çok önemli bir faktördür. İlgili oksidasyon süreçlerini ve mekanizmalarını anlamak çok önemlidir. IN718, RR1000, Udimet720 ve ME3 gibi çeşitli alaşımlar, izotermal ve döngüsel oksidasyon deneyleri kullanılarak havada kapsamlı bir şekilde araştırılmıştır. Oksit tabakası tipik olarak yoğun bir krom oksit (Cr_2O_3) katmanı, bir dış rutil (TiO_2) katmanı ve taneler arası iğnemsiz nüfuzlara sahip bir alt yüzey alümina (Al_2O_3) dahili oksidasyon bölgesinden oluşur. Waspaloy, Astroloy ve Udimet 720 gibi daha basit alaşımlar hala alüminyumun dahili oksidasyonunu sergilemektedir. Ni bazlı krom oluşturan süper alaşımlar, yapısal bileşenlerde ve türbin disklerinde ~750 °C'ye kadar sıcaklıklarda yaygın olarak kullanılır. 800 °C'ye kadar olan daha yüksek sıcaklıklar, oksidasyon direncine sahip alaşımlar gerektirir [4]. Chen ve ark. [5] tarafından yapılan bir çalışmada ticari Ni bazlı süper alaşımlar, 750°C ile 1000°C arasındaki sıcaklıklarda havada ve 1000°C'de döngüsel koşullar altında izotermal olarak test edilmiştir. Oksidasyon kinetiği ve oluşan oksit

tabakalarının özellikleri elektron mikroskobu ve X-ışını kırınımı kullanılarak araştırılmıştır. Alaşımlar 1000 saat sonra 750°C'de dış kısımlarında ince, krom açısından zengin yapılar oluşturmuştur. Bu teste Waspaloy'un en düşük ağırlık artışına sahip olduğu görülmüştür. Ancak aynı zamanda tane sınırındaki karbür oksidasyonundan kaynaklanan en derin iç korozyona da sahiptir. 1000 °C'ye kadar sıcaklıklarda dış kısımların krom açısından zengin ancak iç korozyonun daha belirgin olduğu gözlemlenmiştir. Alaşımlardaki titanyum oksitlenerek yüzeyde yönlü rutil (TiO_2) granülleri ve içeride TiO_2 ve TiN oluşturmuştur. Oksit yüzeyindeki rutil miktarı sıcaklık ve alaşımdaki Ti içeriğiyle birlikte yükselmiştir. Astroloy, 1000°C'de izotermal olarak oksitlenmesine rağmen, yüksek Al konsantrasyonu nedeniyle yarı sürekli bir iç alümina tabakası oluşturmuştur; alümina, krom oksit yapısının altında ilave iç oksitler olarak oluşmuştur. Astroloy'un azalan Cr konsantrasyonuna bağlı olarak, döngüsel koşullar altında daha kalın, daha az koruyucu bir geçiş oksit tabakası oluşturmuştur. Chen ve ark. [13] tarafından yapılan diğer bir çalışmada ise krom oksit oluşturabilen nikel esaslı süper alaşımlar olan Astroloy, Udimet 720 ve Waspaloy alaşımları 750, 1000 ve çevrimsel olarak 1000 °C'lerde hava ortamında izotermal olarak okside edilmiştir. İzotermal testlerde Udimet 720'nin oksidasyon hızının Waspaloy ve Astroloy'dan daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Udimet 720'nin daha yüksek titanyum konsantrasyonu (% ağırlık 5) krom oksit yapısının üzerinde daha yüksek TiO_2 oluşumuna bağlı daha yüksek ağırlık kazanımına neden olmuştur. Astroloy'daki daha yüksek alüminyum konsantrasyonu (%ağırlık 4) kabuk büyüme hızını azaltan alümina iç oksitlerin daha yüksek miktarda oluşmasına imkan tanımıştır. Waspaloy tane sınırları boyunca oksit seritleri ve iç oksitleri oluşturan yüksek oksidasyon hızı göstermiştir. Çevrimsel testler süresince, 100 çevrimden (her biri 1 saat olan) önce ağırlık kaybı yaşanmıştır, fakar ağırlık kaybının hızı azalmış ve Waspaloy ile en iyi performansın gösterildiği ağırlık kazanımı ile takip edilmiştir. Meyer ve ark. [6] HAYNES® 282 alaşımının 871°C'deki oksidasyon verileri, 263 alaşımı, R-41 alaşımı ve Waspaloy alaşımı gibi diğer gama prime takviyeli alaşımlarla bir yıl boyunca karşılaştırmaktadır. Her alaşımın oksidasyon direnci ağırlık değişim davranışı, metal kaybı, krom tükenmesi ve mikroyapısal özellikler dikkate alınarak değerlendirilmiştir. 871°C'de 282 alaşımı, 263 alaşımına benzer oksidasyon direnci göstermiş ancak Waspaloy alaşımından daha iyi performans gösterdiği tespit edilmiştir. Li ve ark. [14] DZ125 nikel süper alaşımının yüksek sıcaklık oksidasyon direncini incelemiş ve safsızlık elementi O, N ve S içeriğindeki artışın oksidasyonu arttırdığını tespit etmişlerdir. Yao ve ark. [15] Waspaloy alaşımındaki Molibden (Mo) miktarının kısmen Tungsten (W) ile değiştirilmesi ile birlikte alaşımın yüksek sıcaklıktaki sürünme direncinde iyileşme olduğunu göstermişlerdir. Mo'nun W ile kısmi değişiminin alaşımda çökelen karbürlerin

bileşimi üzerinde ihmal edilebilir bir etkiye sahip olduğunu ifade eden yazarlar, bunun yerine, γ' fazının miktarının önemli ölçüde arttığını ve γ ve γ' fazları arasındaki uyumsuzluğun azaldığını belirtmişlerdir. Bu şekilde, γ' fazının stabilitesi artmış, kabalaşma hızı azalmış ve kritik kayma gerilimi artmıştır. Sonuç olarak, yeni alaşımın yüksek sıcaklıkta sürünme-kırılma mukavemeti artmıştır.

Parçacık akışı ortamlarında türbinler ve motorlar aşınır ve zayıf çalışır. Makine bileşenlerinin erozyonunu azaltmanın endüstriyel yöntemi, aşınmaya dayanıklı kaplamalar kullanmaktır. Shanov ve ark. [7] kromit bazlı ortamda aşındırılan kaplanmamış ve kaplanmış Waspaloy'un davranışını karşılaştırmak için bir dizi deney yapmıştır. Malzemeler kimyasal buhar biriktirme (CVD) yöntemi kullanılarak titanyum karbür (TiC) ile kaplanmıştır. Parçacık hızları 180-305 m/s olarak belirlenmiştir ve çarpma açıları ortam sıcaklığından 538°C'ye kadar 20° ila 90° arasında değişmiştir. Özel bir yüksek sıcaklık erozyon rüzgar tüneline yapılan çalışmada bozulmuş yüzeyi analiz etmek için elektron mikroskobu (SEM) kullanılmıştır. Sonuçlar sıcaklığın, hızın ve çarpma açısının erozyon hızı üzerindeki etkisini göstermektedir. İlave deliller kaplama erozyon oranının kullanılan kromit tozu miktarına göre değiştiğini göstermektedir. TiC kaplamanın erozyon oranı çarpma açılarına göre kırılmalı bir eğilim sergilemektedir. Kaplamasız süper alaşım sünektir çünkü erozyon en yüksek 30° ila 45° arasındadır. Çalışma, numune sıcaklığının malzeme erozyon hızını önemli ölçüde etkilediğini ortaya koymaktadır. Yüksek sıcaklıklarda, CVD kaplama erozyon direncini artırırken, kaplanmamış Waspaloy'da azalır. Sonuçlar erozyon oranının hem işlenmemiş hem de kaplanmış numuneler için parçacık darbe hızı/gücü ile orantılı olduğunu göstermektedir. Çalışma, CVD titanyum karbür kaplamanın Waspaloy'u yüksek sıcaklıklarda parçacık akışı ortamında erozyona karşı etkili bir şekilde koruduğunu bulmuştur. Biava ve ark. [8] tarafından yapılan bir çalışmada ise fiziksel buhar biriktirme (PVD) kaplamaları olan CrN, AlCrN ve TiAlN'nin Waspaloy'a uygulandığında sıcak korozyona karşı ne kadar iyi koruduğunu incelenmiştir. Belirtilen çalışmada, Waspaloy, CrN, TiAlN ve AlCrN PVD kaplamaları 700 °C'de %75 Na₂SO₄ ve %25 NaCl içeren tuz çözeltisinde test edilmiştir. Mikro yapılarına ve sıcak korozyonda nasıl performans gösterdiklerine bakılmıştır. AlCrN kaplamanın, bu araştırmada 700 °C'de daha yüksek mekanik kalite ve en düşük korozyon oranını sergilediği görülmüştür. AlCrN yüzeyinde korozyon testleri yapıldığında, koruyucu bir Al₂O₃ oksit filmi ve ihmal edilebilir nitrür tabakası bozulması ortaya çıktığı ve bu durumun, sıcak korozyon koşulları altında kaplamanın ömrünü uzattığı anlaşılmıştır. Sonuç olarak, AlCrN kaplama aşırı korozyon ve aşınma koşullarında diğer bileşimlerden daha iyi performans gösterdiği tespit edilmiştir. Wang ve ark. [16] tek kristal nikel süper alaşımının amorf

Al₂O₃ ile kaplandıktan sonra yüksek sıcaklık oksidasyon direncinin arttığını göstermişlerdir.

Servis sıcaklığının yükseltilmesi, bir gaz türbininde daha yüksek verimlilik elde etmenin temel bir yoludur. Sonuç olarak, mukavemet, oksidasyon ve korozyon açısından, giderek daha yüksek servis sıcaklıklarına uygun malzemelere yönelik bir talep bulunmaktadır. Bu zorluktan yola çıkarak nikel bazlı alaşımlarda yüksek sıcaklık dayanımı elde etmek için yeni yöntemler geliştirilmektedir. Bunlar temel olarak yeni alaşım elementleri ilavesi ile daha farklı süper alaşımların elde edilmesi veya yüzeye kaplama uygulayarak malzeme performansının iyileştirilmesi şeklinde gruplandırılabilir.

Nitrasyon süper alaşımların sertlik gibi yüzey özelliklerini iyileştirmek amacıyla uygulanan bir tür kaplama çeşididir ve nitrasyon ortamına göre gaz, sıvı ve plazma gibi türleri vardır [17]. Nitrasyonun mekanizması azotun malzeme içerisine difüzyon olup arayer katı çözeltisi oluşturarak genişletilmiş östenit (expanded austenite) yapısı sağlaması ya da yeni nitrür fazı oluşturmaya dayanmaktadır ve bunlardan hangi mekanizmanın olacağı nitrasyon sıcaklığı ya da ortamı gibi faktörlere bağlıdır. Ni bazlı süper alaşımlarda, özellikle gaz nitrasyonda, 450° C civarı ortamlarda gerçekleştirilen nitrasyon işlemi genişletilmiş östenit yapısı sağlayarak yüzeyi sertleştirirken, daha yüksek sıcaklık ortamlarında ve/veya uzun sürelerde gerçekleştirilen nitrasyon işlemleri ise temel olarak yüzeyde CrN fazı oluşturmaktadır [17, 18].

Bu çalışmada, gaz türbini parçaları ve havacılık sanayinde kullanılan ve yüzey tasarımına yardımcı olacak bilgilerin üretilmesi için Waspaloy alaşımının gaz nitrasyon işlemi sonrasında izotermal oksidasyon davranışının gözlemlenmesi üzerinde durulmuştur. Kaplanmış numuneler 1175°C'de 48, 96, 288 sa oksidasyon işlemine tabi tutulmuş, SEM, XPS, mikrosertlik ölçümleri ile karakterize edilmiştir.

II. MATERYAL VE METOD

Bu çalışmada, Waspaloy alaşımı 20 cm x 20 cm x 5 mm olarak tedarik edildikten sonra 20 mm x 20 mm x 5 mm olarak kesilmiş ve şahit numune ile bir numune çifti sıcak kalıplama ile bakalit kalıp içine alınmıştır. Ardından numuneler #600, #800, #1000, #1200 grid numaralı zımparalar ile zımparalandıktan sonra, 3 µm ve 1 µm partikül boyutlarına sahip elmas pasta kullanılarak parlatılmıştır. Etil alkol ve aseton ile temizlenmiş ve kurutulmuştur. Daha sonra Niton XL2 marka portatif XRF cihazı kimyasal analizi yapılarak Waspaloy alaşımı olduğu teyit edilmiştir. Diğer numuneler F24 boyut beyaz alumina bilyalar ile kumlanmış, etil alkol ile temizlenip, aseton ile kurutulmuş, el değmeden paketlenmiştir. Gaz nitrasyon işlemi, Alpha Metalurji A.Ş.'de %80 amonyak (NH₃) ve %20 azot (N₂) içeren kontrollü bir atmosfer altında, 500 °C sıcaklıkta ve 4 saat süreyle gerçekleştirilmiştir. İşlem sonrası numuneler, yüksek sıcaklık oksidasyon

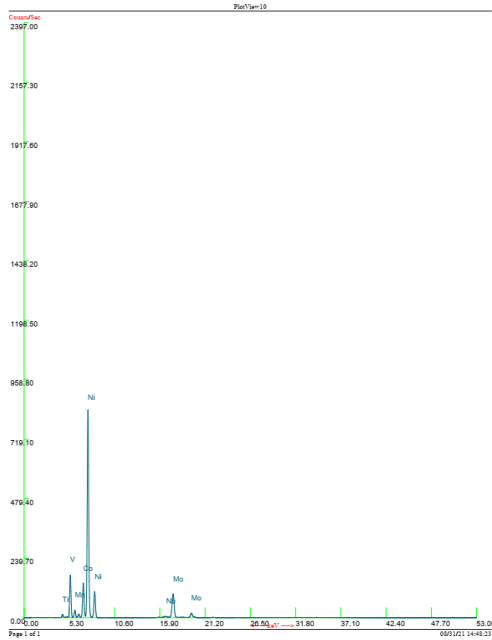
çalışmaları için Protherm kutu fırında 1175 °C sıcaklıktaki hava ortamında 48, 96 ve 288 sa izotermal oksidasyona maruz bırakılmış ve ağırlık değişimi ölçümü ise 5 haneli Precisa marka hassas terazi ile yapılmıştır. Thermo Scientific K-Alpha marka XPS cihazı ile yüzey bileşimi, Niton XL2 marka portatif XRF cihazı ile kimyasal kompozisyonundaki değişim ölçülmüştür. İşlem sonrası mikroyapı kesit görüntü incelemesi Carl Zeiss 300VP SEM cihazı ile yapılmıştır. Ayrıca, mikrosertlik ölçümleri Emcotest durascan G50, cihazı ile 200 gram yük ($HV_{0,2}$) altında gerçekleştirilmiştir. Sertlik ölçümleri izotermal oksidasyon işlemi sonrası numunenin iç kısmında mekanik performansındaki değişimleri gözlemek amacıyla iç bölgeden alınmıştır.

III. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Numunelerin tedarik edildiği hali ile yapılan XRF analizinin sonuçları Şekil 1'de verilmektedir.

Waspaloy XRF Analizi					
Element	%ağırlık	sapma	Element	%ağırlık	sapma
Ni	59,566	0,255	Si	0,322	0,046
Cr	18,406	0,113	V	0,119	0,040
Co	12,899	0,124	Nb	0,117	0,010
Mo	4,294	0,046	Zr	0,045	0,005
Ti	3,018	0,087	Zn	0,033	0,015
Fe	1,125	0,038	Diğer	0,056	

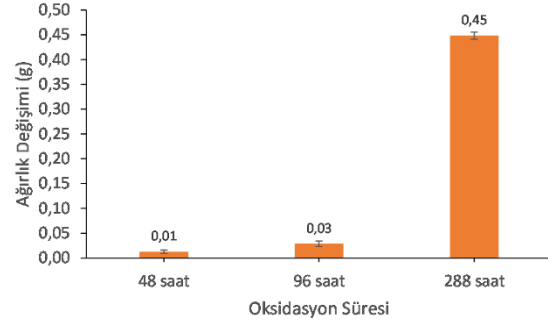
(a)



(b)

Şekil 1. Waspaloy numunesine ait XRF analiz sonucu, (a) ve pikleri (b).

1175 °C sıcaklıkta, 48, 96 ve 288 sa izotermal oksidasyon işlemi sonrasında numunelerin ağırlık değişimleri Şekil 2'de verilmiştir.



Şekil 2. 2-12 gün arası izotermal oksidasyon sonrası numunelerin ağırlık değişimi grafiği.

Ağırlık değişimi verilerinin analizi, 96 saatten sonra ağırlık değişiminde önemli bir artış olduğunu göstermiştir. Waspaloy gibi yüksek sıcaklık alaşımlarında oksidasyon direnci temelde Cr_2O_3 bazlı oksit tabakalarına dayanır. Bu Cr_2O_3 oksit tabakasının malzeme yüzeyine adhezyonu ve malzeme içinde yeterli miktarda Cr bulunduğu sürece yavaş oranlarda büyümesi ile koruyucu özellik gösterir. Bununla birlikte bu tabaka daha az koruyucu olan kobalt oksit bazlı tabakalara dönmeye başladığında kontrolden çıkan oksidasyon ya da ayrılma oksidasyonu (breakaway oxidation) meydana gelebilir. Bu durum ise ağırlık kazanımında hızlı bir artış olarak gözlemlenebilmektedir [6]. Dolayısıyla, 288 saat izotermal oksidasyona maruz kalmış numune ile birlikte meydana gelen ani kütle artışı, olası bir ayrılma oksidasyonu olarak da değerlendirilebilir. 48 saat ve 288 sa numunelerine ait XRF analiz sonuçları sırasıyla Tablo 1 ve 2'de sunulmaktadır. XRF analizinde toprak modu ve genel metal modu, analiz edilen numunenin türüne göre farklılık gösterir. Genel metal modu daha ziyade döküm ile elde edilmiş metalin yalın hali için kullanılmaktadır. Toprak modu, oksitler gibi yapıların analizinde daha etkilidir. Oksitlenmiş yapılar yüzeyde bulunduğundan dolayı bu modun verileri daha açıklayıcı olduğundan tercih edilmiştir. XRF analizi, 288 sa oksidasyon sonrası kaplanmış yüzey tabakası içindeki krom konsantrasyonunda %40'ın üzerinde bir azalma, nikel konsantrasyonunda % 65'in üzerinde azalma, kobalt konsantrasyonunda ise yaklaşık % 40 civarında bir azalma olduğunu ortaya koymaktadır. Krom oranlarındaki düşüş, kesim sürecinde numunede yaşanan kırılma yapı ve korozyon temelli dökülerek kopmaları da açıklamaktadır. Nitrasyon tabakası, yüksek oksidasyon sürelerinde 1175 °C'de koruyucu özellik gösterememiş, çatlamış, bu mikro çatlaklardan penetre olan oksijen, ana metalin kafes yapısı boyunca ilerlemiş, yüzeyde de kopma, bozulma ve Cr ve Co gibi elementlerde fakirleşmeye neden olmuştur.

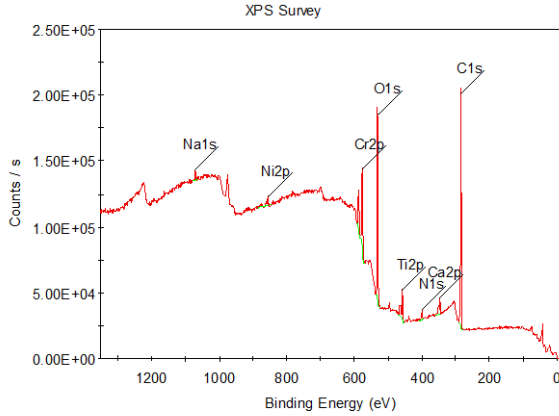
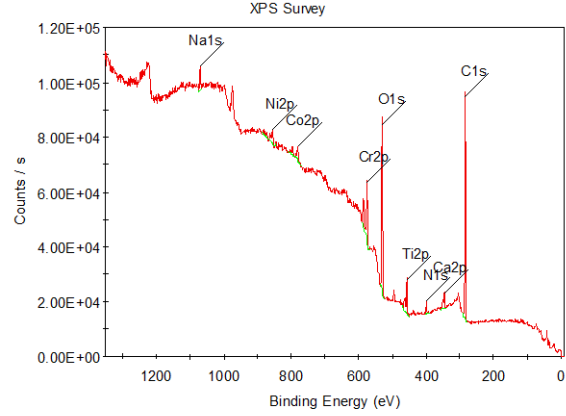
Tablo 1. 48 sa oksidasyon sonrası XRF sonucu

Toprak Modu		
Element	ppm	sapma
Cr	14M	0M
Ni	3M	0M
Co	787.9K	11K

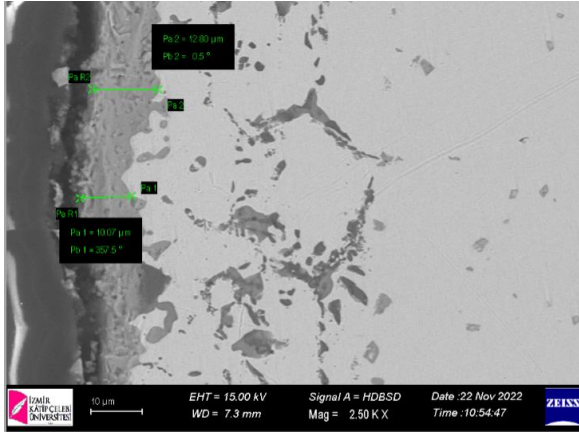
Tablo 2. 288 sa oksidasyon sonrası XRF sonucu

Toprak Modu		
Element	ppm	sapma
Cr	8M	0M
Ni	1M	0M
Co	479.6K	6.3K

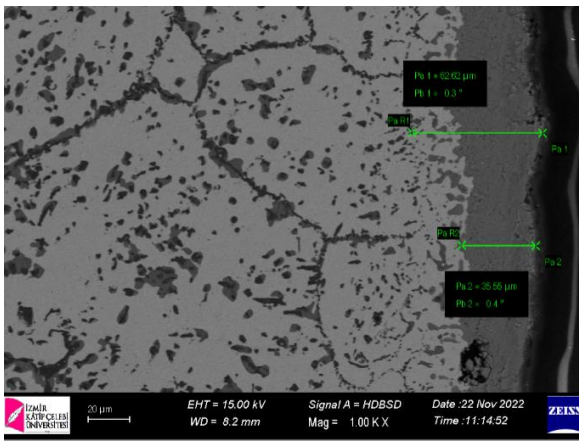
XRF analizinin yüzey hassasiyeti düşük olup, gerçek verilerden ziyade karşılaştırmaya olanak sağlayacak sonuçlar ortaya koyduğundan, ek olarak oksidasyon etkisini görmek amacıyla malzeme yüzeyinin elementel kimyasal bileşimi için gerçekleştirilen XPS analizinin sonuçları sırasıyla 48 sa ve 288 sa numuneler için Şekil 3 ve 4’de verilmiştir.

**Şekil 3.** Nitrasyon sonrası 48 sa oksidasyona maruz kalan yüzeyin XPS sonucu**Şekil 4.** Nitrasyon sonrası 288 sa oksidasyona maruz kalan yüzeyin XPS sonucu

Sonuçlar incelendiğinde her iki koşul için de oksijen pikleri gözlemlenmektedir. Bu yüzeyde oksitlenmenin başladığını doğrulamaktadır. 48 sa numunesi sonuçlarında oksijen pikine ek olarak gözlemlenen Ti, Cr, Ni pikleri de olası krom oksit, titanyum oksit, nikel oksit ve nikel krom oksit yapılarına işaret etmektedir [5]. Ayrıca her iki koşulda da N pikleri gözükmemektedir. Bu durum yapıda CrN de olabileceğini göstermektedir. Du ve ark. [19] CrN tabakası üzerinde yaptıkları yüksek sıcaklık oksidasyon incelemesinde 800°C ile birlikte nitrür tabakası yanında Cr_2O_3 yapılarının da oluştuğunu, 1100 °C'lere geldiğinde Cr_2O_3 fazında artış olduğunu, CrN fazının ise azalmakla birlikte hala yapıda bulunduğunu gözlemlenmişlerdir. Dolayısıyla, bu çalışmadaki XPS piklerinde görülen N bu durumla ilişkilendirilebilir. Bununla birlikte 288 sa sonunda ilave olarak oksijenle birlikte Co pikleri de ölçülmeye başlanmıştır ve olası CoO, Co_2O_3 , Co_3O_4 gibi oksitlerin oluşumuna işaret etmektedir. Bu durum oksidasyonun (oksijen difüzyonunun) kaplama kalınlığı boyunca devam ederek altlık malzeme yüzeyinde ilave oksitlenme oluşturduğunu düşündürmektedir. Bu nedenle XPS analizinde 288 saat sonunda koruyucu özelliğini yitiren kaplamadan yüzeye yakın bölgede ana metalin bileşikleri olan Co pikleri oksitli yapılar oluşmuştur. Ağırlık değişimi kısmında bahsedilen ayrılma oksidasyonu davranışı burada da benzer şekilde düşünülebilir. 288 sa ile birlikte meydana gelen oksidasyon hızındaki artış kobalt oksit gibi koruyucu özelliği olmayan oksitlerin oluşumu ile ilişkilendirilebilir. Nitrasyon sonrasında oksitlenmiş numunelerin 48 sa ve 288 sa SEM analiz sonuçlarına bakarak (Şekil 5-6) oksitlenme süresi arttıkça oksit tabakanın kalınlığının arttığını söylenebilir (48 sa oksidasyon sonrası oksit tabaka kalınlığı 12 µm civarı iken, 288 sa oksidasyon sonrası 35 µm civarıdır).



Şekil 5. Nitrasyon sonrası 48 sa oksidasyona maruz kalan numunenin SEM mikrografi.



Şekil 6. Nitrasyon sonrası 288 sa oksidasyona maruz kalan numunenin SEM mikrografi.

Chen ve ark. [13] yüzeyinde kaplama olmayan bir Waspaloy için yaptıkları oksidasyon incelemesinde (1000°C, 100 sa) SEM kesit analizinde yüzeydeki oksit tabakasının (10 µm civarı) yanı sıra iç bölgelerde (30 µm civarına kadar) tane sınırlarında oksitlerin oluştuğunu raporlamışlar ve bunun Waspaloy'un tane sınırlarındaki krom açısından zengin karbürlerinin oksitlenmesiyle ilişkili olabileceğini belirtmişlerdir. Yüzeyinde oluşan krom ve rutile oksitleri ile 900°C'lere kadar oksidasyona direnç gösterdiği düşünülen Waspaloy'un, artan sıcaklıklarla (1000°C, 1100°C) birlikte koruyuculuğunu yitiren krom oksitin de etkisiyle iç bölge tane sınırlarında oksidasyonun yoğunlaştığı Forsik ve ark. [20] tarafından da gösterilmiştir. Forsik ve ark. [20] yüzeyde biriken krom oksitin 1000°C ve üzeri sıcaklıktaki uçuculuğu ile birlikte koruyuculuğunun azalarak taneler arası (intergranüler) oksidasyona yol açtığını vurgulamıştır. Bu çalışmadaki, özellikle Şekil 6 incelendiğinde, literatürdeki yalnız Waspaloy üzerindeki yüksek sıcaklık oksidasyon yapısına benzer bir görüntü elde edilmiştir ve 288 saat numunesinde taneler arası ya da iç oksidasyonun yoğunluğunun daha arttığı düşünülmektedir [13, 20]. Bu ise yukarıda daha önce bahsedilen ayrılma oksidasyonu davranışının göstergelerinden biri olarak ifade edilmektedir [6]. Bu

durum gas nitrasyon işlemi yapılan Waspaloy'un 1175 °C'de, özellikle 48 sa sonrası, oksidasyona karşı yeterli bir koruma sağlayamadığını düşündürmektedir.

Sertlik ölçümleri numunenin kesitinde iç bölgeden alınmıştır. Numuneye oksidasyon işleminden önce yapılan sertlik ölçümü 457±7 HV_(0,2) neticesini vermiştir. Nitrasyon sonrasında 48 sa oksidasyon sonunda kaplama altı numune iç bölgesi sertliği 373±9 HV_(0,2) olarak ölçülmüştür. Nitrasyon sonrasında 288 sa oksidasyon sonunda kaplama altı numune iç bölgesi sertliği 347±7 HV_(0,2) olarak ölçülmüştür. Oksidasyon ile beraber bozulan malzemenin ve kaplamanın, 48 sa ve 288 sa oksidasyon karşılaştırıldığında, ana metal içi mekanik özelliklerinde bir miktar daha azalmaya yol açtığı görülmüştür. Oksidasyon sonrası sertlikte meydana gelen düşüşün yüzeyde poroz bir oksit tabakası kaynaklı olması da muhtemel olabilmekle birlikte, mevcut çalışmada yüzey sertliği alınmaması nedeniyle bu durumun tane sınırlarında meydana gelen ve buralardaki çökeltilerin olası iç oksidasyonu ile oluşan çökelti azalmasının da bir neticesi olabileceği düşünülebilir [6]. Bununla birlikte, işlem öncesine göre sertlik değerinde dikkate değer bir düşüş olmuştur. Bu durum yaşlandırma ile çökelti sertleşmesi aracılığıyla mukavemet sağlayan Waspaloy alaşımındaki olası çökelti çözünmesini ve/veya çökeltilerde meydana gelebilecek irileşmeyi ve yüksek sıcaklıkta beklemeyle meydana gelebilecek tane büyümesini de düşündürmektedir [9-11]. Utada ve ark. [12] Waspaloy alaşımının 1000°C üzeri sıcaklıklarda çekme mukavemetinde meydana gelen düşüşü çökelti çözünmesi ile ilişkilendirmiştir.

Tüm bu sonuçlar incelendiğinde, gas nitrasyon işlemi ile kaplanan Waspaloy alaşımının 1175 °C'de izotermal oksidasyona maruz kaldığında kaplama tabakasının uzun süreli bir koruma sağlayamadığı düşünülmektedir. Söz konusu sıcaklıklarda alaşımda meydana gelen bir miktar mekanik özellik kaybına ilave olarak kaplama işleminin oksidasyona karşı ek bir korumayı yeterince sağlayamadığı düşünüldüğünde Waspaloy'un yüksek sıcaklık yüzey koruma performansı açısından gas nitrasyon işleminin istenen performansı vermediği değerlendirilebilir.

IV. SONUÇ

Bu çalışmada, Waspaloy süper alaşımı 500°C'de 4 sa boyunca gaz nitrasyon işlemine tabi tutulmuştur. Elde edilen numuneler 1175 °C sıcaklıkta hava ortamında 48 sa, 96 sa ve 288 sa boyunca izotermal oksidasyona maruz bırakılmıştır. Numunelerde meydana gelen ağırlık değişimi 5 haneli hassas tereazi ile ölçülmüştür. Oksidasyon sonrası numunelerin kesit görüntüleri SEM yöntemiyle alınmıştır. Ayrıca, XPS aracılığı ile yüzey kimyası incelenmiştir. Vickers mikrosertlik testi ile sertlik ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre 48 sa ile birlikte hafif seviyede meydana gelen oksitlenme 288 sa sonunda yoğun hale gelmiştir. XPS analizleri 48 sa ile birlikte oksidasyonun

başladığını doğrularken, 288 sa sonucu yüzeyde daha fazla oksit tabakasının oluştuğu gözlemlenmiştir. Oksidasyondan önce ve sonra yapılan sertlik ölçümleri malzemenin mukavemetinde çökelti çözünmesiyle ve/veya tane sınırlarında meydana gelen ve buralardaki çökeltilerin olası iç oksidasyonu ile oluşan çökelti azalması ile de ilişkili olması muhtemel dikkate değer düşüş olduğunu göstermiş, oksitlenen 48 sa ile 288 sa numuneleri arasında ise az miktarda sertlik farkı ölçülmüştür. Sonuç olarak gaz nitrasyon işleminin Waspaloy alaşımının yüksek sıcaklık oksidasyon direncine dikkate değer olumlu bir katkısının olmadığı görülmüştür. Bununla birlikte, oksitlerin ve metalurjik yapı bozunmasının daha ayrıntılı karakterizasyonu gelecekteki çalışmalar için önerilmektedir.

TEŞEKKÜR

Prof.Dr. Arif Nihat Güllüoğlu'na sunduğu alt yapı desteği için teşekkür ederim. Deneylerin gerçekleştirilmesi için proses desteği sunan Alfa Metalurji'ye, Mikrosertlik analizlerimizde desteklerini esirgemeyen Tri Mühendislik A.Ş ve AR-GE Müh. Hilal Çolak'a, XPS analizlerinin gerçekleştirilmesinde destek sunan Dokuz Eylül Üniversitesi EMUM'a, SEM analizlerinin gerçekleştirildiği Katip Çelebi Üniversitesi Merkez Laboratuvarı çalışanlarına, Marmara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Metalurji ve Malzeme Mühendisliği Metalografi Laboratuvarı'nda Tekniker Semih Güven'e destekleri için teşekkür ederim.

KAYNAKLAR

[1] Akande, I.G., O.O. Oluwole, O.O., Fayomi, O.S.I., Odunlami, O.A. S., (2021). Overview of mechanical, microstructural, oxidation properties and high-temperature applications of superalloys. *Materials Today: Proceedings*, Cilt. 43, s. 2222–2231.

[2] Meetham, G. W. S., (1991). High-temperature materials- a general review. *Journal of Materials Science*, Cilt. 26, s. 853-860.

[3] Bar-Cohen, Y., (2014). High-temperature Materials and Mechanisms. 1st ed., CRC Press, Boca Raton, 563s.

[4] Cruchley, S., Evans, H., Taylor, M., (2016). An overview of the oxidation of Ni-based superalloys for turbine disc applications: surface condition, applied load and mechanical performance. *Materials at High Temperatures*, Cilt. 33:4-5, s. 465-475.

[5] Chen, J.H., Roger, P.M., Little, J.A., (1997). Oxidation Behavior of Several Chromia-Forming Commercial Nickel-Base Superalloys. *Oxidation of Metals*, Cilt. 47, Sayı. 5/6, s.381-409.

[6] Meyer, J., Deodeshmukh, V., (2017). Long-Term Oxidation Resistance of Several Precipitation Strengthened Ni-Based Superalloys. *Proceedings of ASME Turbo Expo 2017: Turbomachinery Technical Conference and Exposition*, GT2017, June 26-30, 2017, Charlotte, NC, USA

[7] Shanov, V., Tabakoff, W., Gunaraj, J.A., (1997). Erosion behavior of uncoated Waspaloy and Waspaloy coated with titanium carbide. *Surface and Coatings Technology*, 94-95, 64-69.

[8] Biava, G., de Araujo Fernandes Siqueira, I.B., Vaz, R.F., de Souza, G.B., Jambo., H.C.M., Szogyenyi, A., Pukasiewicz, A.G.M., (2022). Evaluation of high temperature corrosion resistance of CrN, AlCrN, and TiAlN arc evaporation PVD coatings deposited on Waspaloy. *Surface and Coatings Technology*, 438, 128398.

[9] Shoja-Razavia, R., (2015). Laser Beam Welding of Waspaloy for Aeronautic Engine Application. *Lasers in Manufacturing Conference 2015*, June 22-25, 2015, Munich ICM, Germany,

[10] Penna, C. D. , (2000). Development of New Nitrided Nickel-Base Alloys for High Temperature Applications. *Superalloys 2000*, ed. Pollock, T.M. , Kissinger, R.D., Bowman, R.R., Green, K.A., McLean, M. , Olson, S., Schirra, J.J., TMS The Minerals, Metals &Materials Society.

[11] Lerch, B. A. , Jayaraman, N., Antolovich, S. D., (1984). A study of fatigue damage mechanisms in Waspaloy from 25 to 800°C. *Materials Science and Engineering*, 66, 151-166.

[12] Utada, S., Sasaki, R., Reed, R. C., Tang, Y. T., (2022). Overheating of Waspaloy: Effect of cooling rate on flow stress behavior. *Materials & Design*, 221, 110911.

[13] Chen, J.H., Roger, P.M., Little, J.A., (1997). Isothermal & Cyclic Oxidation of Chromia Forming Nickel-Based Superalloys. *Materials Science Forum*, 251-254 , 57-64.

[14] Li, Y., Tan, Y., You, X., Wang, D., Hu, Y., Song, S., Qiang, J., (2023). Effect of trace impurity elements on the high-temperature oxidation resistance of a high-purity nickel-based superalloy. *Corros. Sci.*, 211, 110904.

[15] Yao, H., Dong, J., Gong, Z., Zhao, J., Yang, G., (2022). Influence of Replacing Molybdenum with Tungsten on the Creep Fracture Property of Waspaloy Nickel-Based Alloy. *Metals*, 12(11):1842.

[16] Wang, M., Cheng, X., Jiang, W., Cao, T., Liu, X., Lu, J., Zhang, Y., Zhang, Z., (2023). The effect of amorphous coating on high temperature oxidation resistance of Ni-based single crystal superalloy. *Corros. Sci.*, 213, 111000.

-
- [17] Palma Calabokis, O., Nuñez de la Rosa, Y.E., Ballesteros-Ballesteros, V., Gil González, E.A., (2024). Nitriding Treatments in Nickel–Chromium-Based Superalloy INCONEL 718: A Review. *Coatings*, 14, 993.
- [18] Eliassen, K. M., Christiansen, T. L., Somers, M. A. J., (2010). Low temperature gaseous nitriding of Ni based superalloys. *Surface Engineering*, 26(4), 248–255.
- [19] Du, J. W., Chen, L., Chen, J., Hu, C., (2021). Influence of oxygen addition on the structure, mechanical and thermal properties of CrN coating. *Surface and Coating Technology*, 411, 126992.
- [20] Forsik, S.A.J., Polar Rosas, A.O., Wang, T., Colombo, G.A., Zhou, N., Kernion, S.J., Epler, M.E., (2018). High-Temperature Oxidation Behavior of a Novel Co-Base Superalloy. *Metall Mater Trans A*, 49, 4058–4069.

Adapting the AlphaZero Algorithm to Pawn Dama: Implementation, Training, and Performance Evaluation

Erdem PEHLİVANLAR ¹ , Alperen GÖNÜL ¹ , Cem GÜLEÇ ¹ , Muhammet ŞERAMET ¹ ,
Mehmet Kadir BARAN ¹ 

¹Marmara University, Faculty of Engineering, Computer Science Department, İstanbul, Turkey

Abstract

This research uses deep reinforcement learning techniques, notably the AlphaZero algorithm, to construct an artificial intelligence system that can play Pawn Dama at a level that surpasses human players. Pawn dama, a simplified variant of Dama, is a perfect platform to explore AI's ability to think strategically and make decisions. The primary goal is to develop an AI that can use self-play to develop sophisticated strategies and comprehend the game's dynamics and regulations. The project incorporates MCTS to improve decision-making during games and uses a Convolutional Neural Network (CNN) to enhance the AI's learning capabilities. Creating an intuitive graphical user interface, putting the reinforcement learning algorithm into practice, and testing the system against real players are steps in the development process. The accomplishment of this project will contribute to the field of strategic game AI research by providing insights that may be applied to other domains and spurring further advancements in AI-driven game strategies.

Keywords: Deep Reinforcement Learning, Deep Learning, AlphaZero Algorithm, Pawn Dama, Monte Carlo Tree Search (MCTS), Convolutional Neural Network (CNN)

I. INTRODUCTION

Board games provide a good platform for AI research due to their controlled settings, which facilitate examining strategic thinking. AlphaZero algorithm, introduced by Deepmind in 2017, has profoundly transformed AI's approach to board games. In contrast to the previous approaches, the AlphaZero algorithm achieved a high level of competence in playing pawn dama without prior domain knowledge, relying solely on self-play and general-purpose learning. Its success showcased the potential of reinforcement learning combined with neural networks and Monte Carlo Tree Search, setting a new standard for AI in strategic decision-making and game theory.

This project aims to adapt the AlphaZero algorithm to Pawn Dama, a simplified version of Turkish Dama. The rules for Pawn Dama are given in the Appendix. The AI will learn the rules and strategies of Pawn Dama through self-play and extensive training, ultimately reaching a high level of competence in playing Pawn Dama. For this purpose, it is necessary to rewrite the two core components of the AlphaZero algorithm, neural networks, and the Monte Carlo Tree Search (MCTS) for Pawn Dama. A snapshot of the game is given in Figure 1 and Figure 2.

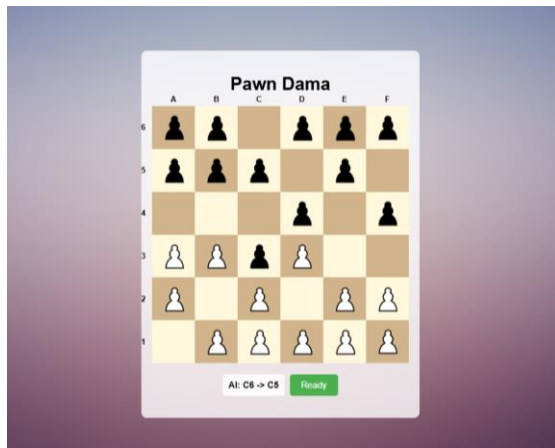


Figure 1. View of the Game

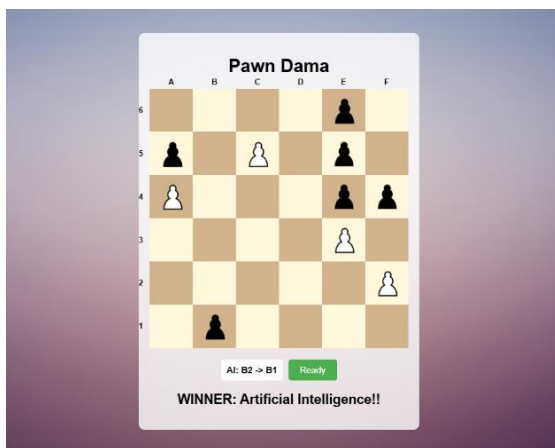


Figure 2. View of the Game

1.1. Aims of the Project

This research has two primary objectives: To develop a simple framework for applying the AlphaZero algorithm tailored to limited computational budgets and to lay the groundwork for the eventual full implementation of Turkish Dama.

By accomplishing these objectives, the project also aims to contribute to the broader area of AI research by showcasing the use of modern AI methods in culturally significant games and encouraging further advancements in AI-driven strategic gaming.

The main technical contributions of this article can be collected under two headings:

- The adaptation of the CNN to pawn dama and the design of its action space (Sect. 3.1.3).
- Developing an MCTS algorithm for pawn dama. (Sect. 3.1.1)

In summary, the inclusion of a new game in AlphaZero's repertoire enhances its coverage and applicability. This game presents a complexity level that is intermediate between simple games like Tic-Tac-Toe or Connect Four and computationally demanding games such as Chess or Go thus filling a gap in the spectrum of games suitable for training.

II. RELATED WORK

2.1 Standard Reinforcement Learning Algorithm

AlphaZero uses a modified version of the Reinforcement Learning algorithm (RL), a key method to train an agent in decision-making within a given environment. An environment is composed of numerous states, and at every moment, the agent takes actions based on the environmental factors. The quality of each action is determined by the reward it generates, prompting the agent to adjust its strategy to maximize cumulative rewards. One classical RL algorithm is Q-learning, which relies on creating a Q-table. The rows of this table represent possible environmental states, while the columns reflect potential actions and the rewards they produce. As the agent interacts with its environment, it updates the Q-table with reward values. Eventually, the agent can use the completed table to choose actions that maximize its rewards in any given scenario. However, despite its effectiveness in specific scenarios, Q-learning has limitations when applied to more complex environments. For example, in chess, the number of possible positions is approximately 10^{120} . Completing and storing a Q-table for such a vast number of states is impractical. The development of deep reinforcement learning algorithms, such as AlphaZero, overcame the limitations of classical reinforcement learning and enabled superhuman performance in chess.

2.2 Deep Reinforcement Learning on Strategy Games

Until the advent of deep RL learning, board game-playing algorithms were mainly based on minimax algorithms enhanced by alpha-beta pruning [1, 2]. This approach peaked in Deep Blue for chess [3] and in Chinook for checkers [4], which achieved superhuman performance by successfully defeating the reigning world champions.

Starting in 1990, Reinforcement Learning [27] made its appearance in board game-playing algorithms with algorithms like TD-Gammon [5, 6].

The introduction of MCTS revolutionized board game-playing algorithms by using random simulations to estimate the potential outcomes of moves. [7, 8] This method balanced exploration and exploitation without exhaustive search and was applied to Go within a year of its development [9] and then to Kriegspiel in 2010 [10]. For a survey of the applications of MCTS for game playing, see [11].

Finally, in 2016, a synergy between MCTS-based RL methods and neural network-based deep learning methods was achieved in the Alphago algorithm by Deepmind. [12]. The game of Go, long considered a formidable challenge to AI, was first conquered by Alphago, making it the first program to beat a professional Go player.

AlphaGo initially trained its neural network on a large dataset of games played by human experts. After this supervised learning phase, AlphaGo trained its neural net further through self-play.

The following algorithm from DeepMind, AlphaGo Zero (2017) [13], eliminated the use of human knowledge and trained its neural network solely through self-play, therefore learning strategies and tactics from first principles.

Alphago Zero was explicitly developed for the game of Go. The next algorithm of Deepmind, Alphazero (2017) [14], was a more generalized version of Alphago zero. It was capable of mastering multiple games (e.g., Go, chess, shogi) without any domain-specific modifications, thus demonstrating that the same algorithm can achieve superhuman performance across different environments.

Deepmind published two more algorithms: Alphastar (2019) [15] and Muzero (2020) [16]. Alphastar was developed for real-time strategy games like StarCraft II and achieved superhuman performance. MuZero is a deep reinforcement learning algorithm that combines a model-based approach with policy and value networks, learning both a model of the environment and optimal strategies without relying on prior knowledge of the environment's dynamics. Alphastar and Muzero are not directly relevant to our research and are mentioned here solely for the purpose of completeness. For more recent developments, see [23-26]

III. METHOD

The primary approach employed in developing an algorithm capable of playing pawn dama involved tailoring the AlphaZero algorithm specifically to this game. AlphaZero algorithm combines reinforcement learning with Monte Carlo Tree Search (MCTS) and neural networks to excel in strategic games such as Chess, Go, and Shogi. Unlike traditional engines, it learns solely through self-play, starting without pre-existing game knowledge. AlphaZero algorithm has two components: (1) A neural network embedded within the AlphaZero evaluates board positions and predicts optimal moves, while (2) MCTS efficiently explores possible outcomes by simulating future states of the game. As AlphaZero plays, its strategies are continuously improved by adjusting its neural network parameters based on game results. In the end, it achieves superhuman performance.

3.1 Alpha-Zero on Pawn Dama

In the following sections, we detail the modifications we have made to the AlphaZero algorithm to adapt it to pawn dama. As previously noted, the AlphaZero algorithm comprises two key components: Monte Carlo Tree Search (MCTS) and a neural network. We will briefly describe the functionality of these components

and outline the adjustments necessary to tailor them for pawn dama.

3.1.1. Monte Carlo Tree Search (MCTS)

In its classical form, Monte Carlo Tree Search (MCTS), is an artificial intelligence algorithm designed to determine the optimal move based on the current game state without incorporating any learning mechanisms. It operates through four fundamental steps in each iteration:

a) Selection: Starting from the root node, the algorithm traverses the tree by selecting child nodes based on a selection policy, often the **Upper Confidence Bound (UCB)** formula.

$$UCB(i) = \frac{W_i}{N_i} + C \sqrt{\frac{\ln N_p}{N_i}},$$

where N_i is the visit count of the node i , N_p is the visit count of its parent, and W_i is the total reward accumulated in node i at the backpropagation steps. C is a hyperparameter that balances exploration with exploitation. When traversing down the tree, the child node with the highest UCB score is selected.

b) Expansion: Once a promising node is selected, the algorithm checks if it has unexplored child nodes. If so, it expands the tree by adding one or more child nodes to represent possible moves.

c) Simulation: From the newly expanded node, the algorithm plays a simulation (also called a "playout") by performing random moves until the game reaches a terminal state (e.g., a win, loss, or draw).

d) Backpropagation: The simulation result is propagated back through the path of nodes leading to the root. [8]

The four steps of MCTS are illustrated in Figure 3.

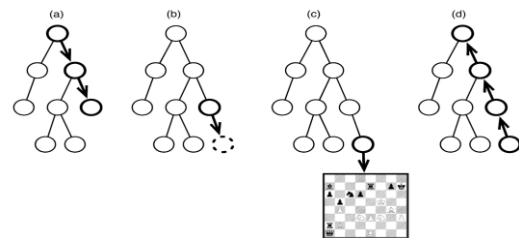


Figure 3. MCTS Structure, from [10]

These four steps are repeated for a predefined number of iterations or until a computational budget (e.g., time or resource limit) is reached, after which the algorithm determines the best move to make from the root node based on the data collected during the search.

AlphaZero makes two key differences from the classical MCTS algorithm described in Figure 3:

- It does away with step 3 (simulation), replacing the value returned from the simulation with the value vector of the neural network. With this update, rather than simulating the game randomly, the value vector of the CNN model is used to predict the actual result of the game.
- Another update is applied to the UCB formula, where an additional factor is introduced: the winning probability $P(i)$ for node i . This new factor serves as a multiplier in the UCB formula, helping the algorithm make better decisions when selecting moves.

$$\frac{W_i}{N_i} + CP(i) \frac{\sqrt{N_p}}{1+N_i}$$

$P(i)$ is i th component of the policy vector of the i th node's parent. In our work, the constant C , which balances exploration with exploitation, is taken as 1.

Policy and value vectors of a neural network will be explained in the next section.

In this study, we adapted the Monte Carlo Tree Search (MCTS) algorithm as it is used by AlphaZero to the specific rules of pawn dama. This adaptation was straightforward because pawn dama lacks repetition, as each move produces a unique board configuration; otherwise, additional measures would have been necessary.

3.1.2. Convolutional Neural Network (CNN)

The algorithm uses a convolutional neural network (CNN) [20]. It takes 3 layers of information as input: board size, whose turn it is, and a representation of the game board. It produces two outputs: a policy and a value vector, which are used in MCTS. For an $N \times N$ input board, the policy vector, output by the policy head, describes the winning probability of each possible legal move in the space of all possible legal moves, the action space. If the CNN generates probabilities for some illegal moves, we mask them by clearing their corresponding probabilities, ensuring that only legal moves are considered in the decision-making process. The representation chosen for the action space is critical and will be explained in detail in the next subsection. The value vector is a prediction of the outcome of the given game board. Once the model training is complete, the algorithm returns a value of 1, 0, or -1, indicating a loss, draw, or win. The Convolutional Network (CNN) structure used is illustrated in Figure 4.

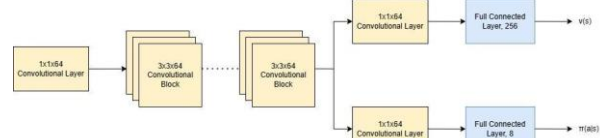


Figure 4. Two-headed Convolutional Neural Network (CNN) Architecture, from [18]

Table 1. Layer details of CNN used

Layer	Type	Input Shape	Output Shape	Parameters
conv1	Conv2D	(B, 1, X, Y)	(B, C, X, Y)	3x3 kernel, stride=1, padding=1
bn1	BatchNorm2D	(B, C, X, Y)	(B, C, X, Y)	-
conv2	Conv2D	(B, C, X, Y)	(B, C, X, Y)	3x3 kernel, stride=1, padding=1
bn2	BatchNorm2D	(B, C, X, Y)	(B, C, X, Y)	-
conv3	Conv2D	(B, C, X, Y)	(B, C, X-2, Y-2)	3x3 kernel, stride=1, no padding
bn3	BatchNorm2D	(B, C, X-2, Y-2)	(B, C, X-2, Y-2)	-
conv4	Conv2D	(B, C, X-2, Y-2)	(B, C, X-4, Y-4)	3x3 kernel, stride=1, no padding
bn4	BatchNorm2D	(B, C, X-4, Y-4)	(B, C, X-4, Y-4)	-
flatten	Reshape	(B, C, X-4, Y-4)	(B, C*(X-4)*(Y-4))	-
fc1	Linear	(B, C*(X-4)*(Y-4))	(B, 1024)	-
bn_fc1	BatchNorm1D	(B, 1024)	(B, 1024)	-
fc2	Linear	(B, 1024)	(B, 512)	-
bn_fc2	BatchNorm1D	(B, 512)	(B, 512)	-
fc3 (Policy)	Linear	(B, 512)	(B, action_size)	-
fc4 (Value)	Linear	(B, 512)	(B, 1)	-

Below are key notations used in Table

- B: Batch size (64)
- C: Number of channels (512)
- X, Y: Board dimensions

We applied ReLU activation and dropout with a rate of 0.3 after each BatchNorm. Finally policy vector is transformed by log_softmax function and value prediction is scaled using tanh activation.

3.1.3. Action Space

Action space is the set of all possible actions (moves) that can be taken in a given state of the game. It is a fundamental concept of reinforcement learning, and its design defines CNN's policy vector.

The rules of Pawn Dama allow each piece to have three possible moves after it has already moved and four possible moves during its first move.

Consequently, for an $N \times N$ board, an action space of dimension $4 * 2N + 3(N - 2)^2$ would be sufficient to describe all possible moves. However, after some consideration, it was decided to use an action space of dimension $N^4 = N^2 * N^2$ instead.

In this design, the first N^2 represents the piece's initial position, and the second N^2 is the target position. A move is thus depicted as $(x_1, y_1) \rightarrow (x_2, y_2)$, meaning there are four indices in total to specify each action. This description of the action space, while having higher dimensionality, provides the flexibility to incorporate pieces with arbitrary movement rules in future versions of the algorithm without significantly changing the structure of CNN, thereby increasing its adaptability.

After discussing the dimensionality of the action space, it becomes evident that the policy vector is a single vector of dimension N^4 . Each potential move $(x_1, y_1) \rightarrow (x_2, y_2)$, on the board is represented by a single element of this vector determined by the following index:

$$x_1 + (y_1 * N) + (x_2 * N^2) + (y_2 * N^3)$$

The output of the CNN stores the winning probability of the corresponding move into this element.

3.1.4. Self-Play and Training

After these modifications to MCTS and CNN components of the AlphaZero algorithm are made, the training process begins. Initially, the CNN is initialized with random weights. The algorithm then engages in 100 MCTS self-play games, experiencing wins, losses, and draws. During this competition, every position encountered is recorded. The recorded data consists of a triplet: board position, which move is made, and which side eventually won the game. This accumulated data is then used to train the CNN model for 100 epochs. Once training is completed, the process moves to the arena phase, where each new model plays 30 games against the previous model. If the new model's win threshold fraction is 60% higher than the previous one, it is accepted; otherwise, it is rejected. These three stages (MCTS, CNN training, and Arena play) are called an iteration. Numerous iterations were carried out in a loop. The algorithm is set up to run for 300 iterations. But during a run, we follow the loss value and stop the algorithm manually when it stabilizes around zero. Figure 5 is the flowchart of the AlphaZero algorithm.

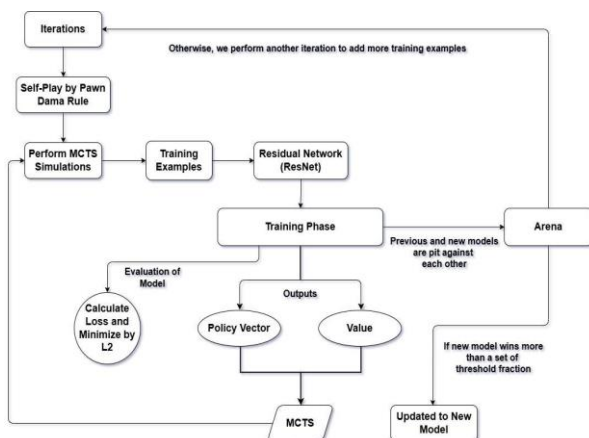


Figure 5. Flow of self-play based on the game rules

IV. EXPERIMENTS

4.1. Overview

We evaluated the performance of our algorithm using three different methods. First, we tracked the loss values at the end of each epoch during the training process. At the conclusion of the training, we visualized

these values in a graph to analyze the model's learning progress and overall development. Second, at the end of each iteration, we tested the newly trained model against the previous version in 30 matches. We observed how the model improved over iterations by analyzing the number of wins, losses, and draws. Finally, we tested the trained model against approximately 100 human players through an interactive interface. Remarkably, no human player (some of them competitive chess players) managed to defeat the model. These three approaches provided a comprehensive understanding of our algorithm's training process and performance in real-world scenarios.

4.2 Decrease in Training Error

To evaluate our model's learning progression, we analyzed the training errors for two different board sizes: 5x5 and 6x6. We tracked each configuration's policy vector and value losses throughout the training process. The training was conducted on NVIDIA A100 and NVIDIA GeForce RTX 3050 GPUs, with losses recorded at the end of each epoch. The following subsections present detailed analyses for each board size.

4.2.1. 5x5 Board Experiments and Results

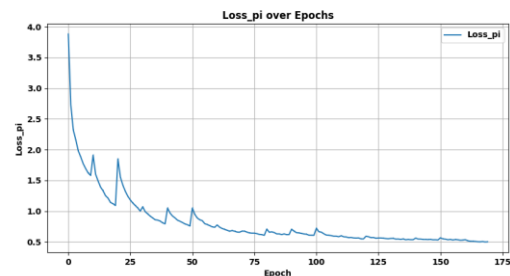


Figure 6. 5x5 Board Policy Vector Losses

Figure 6 shows the decrease in the loss of the policy network over 175 epochs in a 5x5 board. This graph was essential for understanding the learning process of the AlphaZero algorithm when applied to our Pawn Dama game. The plot indicates that the training process for the policy network was successful. The rapid initial decrease in training losses, followed by a gradual and stable convergence, shows that the model effectively learned to make policy predictions. The overall performance suggests that the model was well-trained and capable of generalizing its learned strategies to new game scenarios.

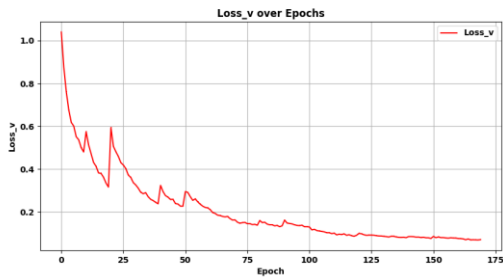


Figure 7. 5x5 Board Value Losses

Figure 7 shows the decrease in the loss of the value network over 175 epochs for a 5x5 board. Looking at the graph, we can tell that the training process was successful for the value network. We saw a sharp decrease in training loss at the beginning, followed by a steady and stable drop, which suggests that the model learned to make good value predictions.

The spikes in the loss function of both graphs indicate points at which one iteration finishes and a new iteration starts (See 3.1.4). Each iteration brings its own training set, and we can assume that these new training sets bring some new information (i.e., previously unseen game situations) that is not contained in the old training sets. At that point, the neural net, solely trained by the old training sets, struggles to handle this new information, hence the sudden jump in error. However, in time, it absorbs this new information into its weights via backpropagation, and the errors drop. Also note that as the game progresses, it becomes harder to surprise neural networks, and the size of the spikes decreases.

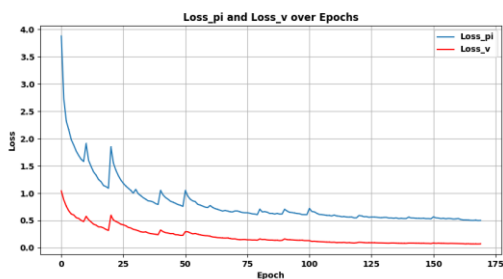


Figure 8. 5x5 Board Policy Vector and Value Losses

As shown in Figure 8, we display both the policy vector and value losses on a single graph for the 5x5 board. This side-by-side presentation helps visualize the learning progress of the policy and value networks simultaneously. The training was conducted on an NVIDIA A100 GPU, a high-performance computing unit known for handling complex deep-learning tasks. The model was trained for approximately 18 hours, allowing it to reach an effective level of performance. This training duration was sufficient to capture the

essential patterns and nuances of the game while ensuring the model had enough time to refine its learning.

4.2.2. 6x6 Board Experiments and Results

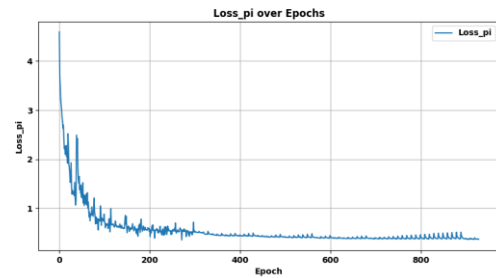


Figure 9. 6x6 Board Policy Vector Losses

Figure 9 shows the policy loss for a 6x6 board, helping us understand how the model learns to select moves in the pawn game. Here, the convergence is slower than on the 5x5 board. The loss values were relatively high initially but dropped quickly during the first 100 epochs. By reaching 600 epochs, the loss had settled at its minimum level and remained steady. The reasons for the spikes are the same as discussed for the 5x5 board. The consistent decline and eventual stabilization of the loss values indicate that the model successfully learned the key strategies of the game.

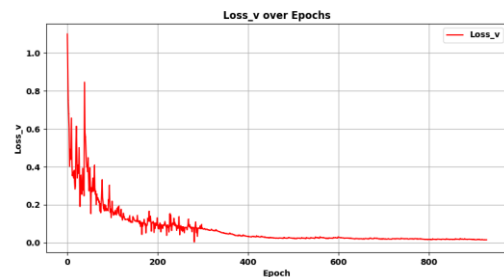


Figure 10. 6x6 Board Value Losses

In Figure 10, the value loss curve shows how the model improved its ability to evaluate positions in the 6x6 pawn game. Again, the loss was high initially but dropped quickly during the first 100 epochs. This rapid decrease tells us that the model learned the basics of position evaluation early in the training. After this point, the loss continued to decline more gradually, showing that the model was fine-tuning its understanding of more complex situations.

By the 1000th epoch, the loss reached a stable and low value, staying consistent for the rest of the training. Unlike the policy loss, we do not see any significant spikes here, which shows that the training process for the value network was smooth and reliable.

The final result confirms that the model successfully learned to evaluate positions accurately, predicting game outcomes with confidence. This stability tells us that once the core ideas of position evaluation were understood, the model could consistently apply them to new scenarios, showing a clear understanding of pawn structures and their impact on gameplay.

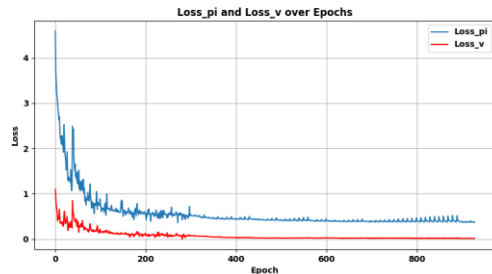


Figure 11. 6x6 Board Policy and Value Vector Losses

Figure 11 presents the policy vector and value losses for the 6x6 board. By displaying both losses simultaneously, we can assess the model's performance in both areas more efficiently. The training process required significant computational power, and we used an NVIDIA A100 GPU for this task. The training for the 6x6 board took approximately 48 hours. This extended training period allowed the model to learn more complex strategies and game dynamics effectively.

4.3 Self-Play Results

In this section, we discuss the results obtained from the self-play games, a critical step in the training process of our model. Self-play allowed the model to improve iteratively by competing against itself, refining its strategies, and correcting mistakes over time. The model was set to play 40 matches throughout training at the end of each iteration, where the newly trained version competed against the model from the previous iteration. The new model consistently improved and outperformed its predecessor as the training progressed. However, in the later stages, the matches between iterations consistently resulted mostly in draws, suggesting that the model had achieved its maximum potential and was operating at an optimal level, unable to further improve against itself. These findings highlight the model's ability to reach a high level of performance autonomously through self-play. This iterative process not only ensured strategic improvement but also validated the robustness of the training methodology.

4.4 Playing Against Humans

To evaluate our model's performance in real-world scenarios, we conducted tests by allowing humans to play directly against the trained AI. Using the interactive interface we developed, over 100 games were played against various individuals with varying experience levels, including skillful players who

frequently play chess at well-known online platforms such as lichess or chess.com. Impressively, the AI model remained undefeated throughout these matches, consistently demonstrating its ability to adapt to human strategies. This experience highlighted the AI's strategic depth and robustness, as it effectively handled diverse human gameplay styles. Additionally, feedback from the participants revealed that the AI not only played competently but also provided a challenging and engaging experience. These results confirmed the strength of the model and its capability to perform reliably outside of controlled testing environments, marking a significant milestone in its development.

V. CONCLUSIONS

In this study, we ran AlphaZero on a new game that had never been explored. By integrating Monte Carlo Tree Search (MCTS) with neural networks, we adapted AlphaZero to this novel environment. The updates to the MCTS algorithm, particularly in the simulation phase and UCB formula, allowed for more effective data generation and evaluation. Leveraging the CNN model to predict game outcomes and optimize move selection, the algorithm improved iteratively, achieving superior performance. The self-play and evaluation process ensured that only models with significant improvements were accepted. This showcases the strength of combining MCTS and deep learning, as AlphaZero successfully adapted to our custom game and demonstrated advanced strategic decision-making. This study is the first step toward fully implementing Turkish Dama in the AlphaZero algorithm.

VI. APPENDIX

6.1 Rules of Pawn Dama

1. The board must have at least four rows. Other than this, they can be of any side.
2. At the start of the game, white pawns occupy the first two rows of the board. Black pawns occupy the last two rows of the board.
3. Pawns can move one square forward if that square is not occupied.
4. If this is their first move, pawns have the option to move two squares forward if both squares are unoccupied.
5. Pawns capture diagonally.
6. The side whose pawn reaches the opposite end of the board first wins.

VII. CODE AVAILABILITY

Our project's complete source code implementation is available as open-source at:

<https://github.com/erdemphl/solving-pawn-dama-with-alphazero>. Our code builds upon and extends the code presented in [18].

REFERENCES

- [1] Shannon, C.E. (1950). Programming a Computer for Playing Chess. *Philosophical Magazine*, 41(314), 256-275.
- [2] Knuth, D.E., & Moore, R.W. (1975). An Analysis of Alpha-Beta Pruning. *Artificial Intelligence*, 6(4), 293-326.
- [3] Newborn, M. (1997). *Kasparov versus Deep Blue: Computer Chess Comes of Age*. Springer.
- [4] Schaeffer, J. (1997). *One Jump Ahead: Challenging Human Supremacy in Checkers*. Springer-Verlag.
- [5] Tesauro, G. (1995). Temporal Difference Learning and TD-Gammon. *Communications of the ACM*, 38(3), 58-68.
- [6] Samuel, A.L. (1959). Some studies in machine learning using the game of checkers. *IBM Journal of Research and Development*, 3(3), 210-229.
- [7] Coulom, R. (2006). Efficient Selectivity and Backup Operators in Monte-Carlo Tree Search. In *Proceedings of the 5th International Conference on Computers and Games* (pp. 72-83).
- [8] Kocsis, L., & Szepesvári, C. (2006). Bandit Based Monte-Carlo Planning. *Machine Learning*, 282, 282-293.
- [9] Gelly, S., & Silver, D. (2007). Combining Online and Offline Knowledge in UCT. In *Proceedings of the 24th International Conference on Machine Learning* (273-280).
- [10] Ciancarini, P., & Favini, G.P. (2010). Monte Carlo tree search in Kriegspiel. *Artificial Intelligence*, 174, 670-684.
- [11] Browne, C.B., Powley, E., Whitehouse, D., Lucas, S.M., Cowling, P.I., Rohlfshagen, P., Tavener, S., Perez, D., Samothrakis, S., & Colton, S. (2012). A Survey of Monte Carlo Tree Search Methods. *Artificial Intelligence Review*, 34(1), 1-49.
- [12] Silver, D., Huang, A., Maddison, C.J., Guez, A., Sifre, L., Van Den Driessche, G., Schrittwieser, J., Antonoglou, I., Panneershelvam, V., & Lanctot, M. (2016). Mastering the game of Go with deep neural networks and tree search. *Nature*, 529(7587), 484-489.
- [13] Silver, D., Schrittwieser, J., Simonyan, K., Antonoglou, I., Huang, A., Guez, A., Hubert, T., Baker, L., Lai, M., Bolton, A., & Hassabis, D. (2017). Mastering the game of Go without human knowledge. *Nature*, 550(7676), 354-359.
- [14] Silver, D., Schrittwieser, J., Simonyan, K., Antonoglou, I., Huang, A., Guez, A., & Hassabis, D. (2018). A general reinforcement learning algorithm that masters chess, shogi, and Go through self-play. *Science*, 362(6419), 1140-1144.
- [15] Vinyals, O., Babuschkin, I., Czarnecki, W.M., Mathieu, M., Dudzik, A., Chung, J., Choi, D., Powell, R., Ewalds, T., Georgiev, P., & Silver, D. (2019). Grandmaster level in StarCraft II using multi-agent reinforcement learning. *Nature*, 575(7782), 350-354.
- [16] Schrittwieser, J., Antonoglou, I., Hubert, T., Simonyan, K., Sifre, L., Schmitt, S., Guez, A., Lockhart, E., Hassabis, D., Graepel, T., & Silver, D. (2020). Mastering Atari, Go, Chess and Shogi by Planning with a Learned Model. *Nature*, 588(7839), 604-609.
- [17] Dong, H., Ding, Z., & Zhang, S. (2020). Fundamentals, Research and Applications. In *Deep Reinforcement Learning* (pp. 391-414).
- [18] Thakoor, S., Nair, S., & Jhunjhunwala, M. (2016). Learning to play othello without human knowledge. Stanford University.
- [19] Hassabis, D. (2017). Mastering Chess and Shogi by Self-Play with a General Reinforcement Learning Algorithm. ArXiv. Retrieved from <https://arxiv.org/abs/1712.01815>
- [20] LeCun, Y., Bottou, L., Bengio, Y., & Haffner, P. (1998). Gradient-based learning applied to document recognition. *Proceedings of the IEEE*, 86(11), 2278-2324.
- [21] Ioffe, S., & Szegedy, C. (2015). Batch normalization: Accelerating deep network training by reducing internal covariate shift. In *Proceedings of the International Conference on Machine Learning*.
- [22] Srivastava, N., Hinton, G., Krizhevsky, A., Sutskever, I., & Salakhutdinov, R. (2014). Dropout: A simple way to prevent neural networks from overfitting. *Journal of Machine Learning Research*, 15(1), 1929-1958.
- [23] Nair, V., & Hinton, G.E. (2010). Rectified linear units improve restricted boltzmann machines. In *Proceedings of the International Conference on Machine Learning*.

-
- [24] Tomašev, N., Paquet, U., Hassabis, D., & Kramnik, V. (2020). Assessing game balance with AlphaZero: Exploring alternative rule sets in chess. arXiv preprint arXiv:2009.04374. <https://arxiv.org/abs/2009.04374>
- [25] Ye, W., Liu, S., Kurutach, T., Abbeel, P., & Gao, Y. (2021). Mastering Atari games with limited data. *Advances in Neural Information Processing Systems*, 34, 14917–14929.
- [26] Schmid, M., Moravčík, M., Burch, N., Kadlec, R., Davidson, J., Waugh, K., Bard, N., Timbers, F., Lanctot, M., Holland, G. Z., Davoodi, E., Christianson, A., & Bowling, M. (2023). Student of Games: A unified learning algorithm for both perfect and imperfect information games. *Science Advances*, 9(45), eadg3256. <https://doi.org/10.1126/sciadv.adg3256>
- [27] Sutton, R. S., & Barto, A. G. (2018). *Reinforcement learning: An introduction* (2nd ed.). MIT Press.

A New Approach for Time Series Prediction: Fuzzy Regression Network Functions

Mehmet Raci AKTOPRAK ¹, Özge CAGCAG YOLCU ¹

¹Marmara University (MU), Faculty of Sciences, Department of Statistics, Istanbul, Türkiye

Abstract

The fuzzy regression functions (FRFs) constructs a comprehensive model by combining a series of linear functions based on the inputs. However, the relationship between input and output is not always purely linear. The approach presents novel FRFs with nonlinear structures based on neural networks, combining the strengths of both computational models and fuzzy logic. The proposed model generates membership values by fuzzifying real-valued time series observations, utilizing the fuzzy C-means clustering algorithm. Inputs are then created from the real-valued lagged observations and transformed membership values. A set of feed-forward neural networks, corresponding to the number of fuzzy sets, produces outputs as nonlinear functions of the inputs. These outputs are combined based on the membership values, representing the degree to which each time point belongs to the respective fuzzy sets, to generate the final predictions. The proposed prediction model is referred to as Fuzzy Regression Network Functions (FRNFs). The prediction performance of FRNFs is investigated across several criteria by implementing it in various real-world time series datasets.

Keywords: Fuzzy regression network functions, Artificial neural networks, Type-1 fuzzy functions, Time series prediction

I. INTRODUCTION

Accurate prediction of any event and/or phenomenon plays an important role in our daily life. Especially under uncertain situations, prediction exact values is quite tough. This is because of the uncertainty and non-linearity that real-world events often involve. The way to obtain satisfactory estimation results is possible with the use of appropriate and competent estimation tools. From this perspective, fuzzy time series methods are capable of giving superior prediction performance owing to their effective approach to the uncertainty contained in the time series. Also, unlike traditional time series methods, fts methods do not require strict assumptions. All these advantageous situations have increased the interest in this method and make them attractive and popular for different areas such as information technologies, medicine, business, finance and different engineering fields. Fuzzy time series, which was first put forward by Song and Chissom [1], is basically based on Zadeh's [2] fuzzy set theory. Fuzzy time series prediction models basically consist of three stages: fuzzification of observations, identifying the fuzzy relationships, and defuzzification. In the fuzzification phase, the relevant time series with real observations is converted into a fuzzy time series with fuzzy observations by using different fuzzification methods. Fuzzy relations between observations of fuzzy time series are modelled at the determination of fuzzy relations stage. Fuzzy predictions obtained from fuzzy relations modelling stage are transformed into real predictions with an approach adopted in the fuzzification phase and presented to the decision maker. When the fuzzy time series literature is examined, it is seen that different approaches have been put forward for all three stages of the analysis process with the aim of improving the prediction performance of the methods. The methods introduced in the early studies, use partition of universe of discourse in the fuzzification phase. Song and Chissom [1, 3, 4] and Chen [5, 6] determined interval lengths based on fixed and subjective decisions. Huarng determined the interval lengths with a mean and distribution-based approach, and the influence of subjective judgments was removed [7]. In addition, Eğrioğlu et al. [8, 9] introduced different approaches in which fixed interval lengths are determined within the optimization process.

Huang and Yu used a ratio-based approach that produces varying interval lengths in universe of discourse stage, with the aim of improving prediction performance, especially in predicting time series with trend [10]. On the other hand, Yolcu et al. developed this idea further and suggested the optimization of the ratio [11]. Panigrahi and Behera developed a mean-based model [12]. In addition to these approaches; while Cheng and Chung and Lee et al. [13, 14] used genetic algorithm, Kuo et al. [15, 16], Davari et al. [17], Hsu et al. [18], Aladağ [19], Cagcag Yolcu and Lam [20] performed the fuzzification process with particle swarm optimization algorithm. Moreover, Yolcu et al. [21], Cai et al. [22], and Jiang et al. [23], to transformed real time series into fuzzy time series, utilized artificial bee colony, ant colony, and harmony search algorithms, respectively. In addition, Cheng et al. [24], Li et al. [25], Alpaslan and Cagcag Yolcu [26], Eğrioglu et al. [27], Wei et al. [28], Cheng et al. [29], Sun et al. [30], Wang and Liu [31], and Cagcag Yolcu and Alpaslan [32] preferred approaches based on fuzzy means clustering instead of universe of discourse in the fuzzification phase.

In the determination of fuzzy relationships stage, which the internal relationship of the fuzzy time series is determined, Song and Chissom [1, 3, 4] used approaches based on matrix operations, while Sullivan and Woodall [33] used transition matrices consisting of Markov chains. On the other hand, Kocak [34], Cheng et al. (2016) [29], and Kocak [35] determined fuzzy relationships with tables. With the widespread use of artificial neural networks (ANNs), Huang and Yu [36], Aladag et al. [37], Kocak et al. [38], Wei et al. [28], Wang and Xiong [31], Chen and Chen [39], Arslan and Yolcu [40] determined fuzzy relationships with ANN models with different structures. Although the usage of ANN had become a popular tool, excessive hidden layer neuron number was an issue to be solved. In this direction, Cagcag Yolcu [41] determined fuzzy relationships with a PSO-trained single multiplicative neuron model ANN which does not have a structure problem. In addition to all these studies, Yu and Huang [42], Alpaslan and Cagcag [26], Alpaslan et al. [43] and Yolcu et al. [44] proposed prediction models that consider the membership degrees of the observations in the determination of fuzzy relations with ANNs. Moreover, Arslan [45] proposed a gated recurrent unit network-based fuzzy time series forecasting model. Although centroid method was preferred for the last stages of fuzzy time series analyses process, Cheng et al. [46] and Aladag et al. [47] utilized adaptive expectation method for the defuzzification stage.

All these studies have shown that; the performances of fuzzy time series prediction models are highly dependent on each of these stages and can be improved with some changes in these stages. Apart from fuzzy time series models, inference-based systems which is a kind of nonlinear mapping that derives its output from

fuzzy reasoning and a group of fuzzy if-then rules have been also become popular. ANFIS algorithm the fuzzy-logic based model has been widely used for the prediction of time series. In the literature, Sarica et al. [48], Catalao et al. [49], Chang [50], Cheng et al. [51, 52], Ho and Tsai [53], and Pousinho et al. [54] utilized ANFIS in prediction problems.

On the other hand, T1FFs, which form the basis idea of this paper, have recently become more popular as a FIS approach due to their simplicity and rule-free structure. Turksen [55] first introduced a fuzzy functions approach called T1FF, for the solution of regression and clustering problems, and this approach was also used for time series prediction with the simultaneous use of time series within the framework of a regression logic. To get better prediction performance, Aladag et al. [56] took into consideration time series' lagged variables as covariates. After that Aladag et al. [57] proposed another prediction method which the lagged variables of the T1FFs' inputs were determined through binary particle swarm optimization. Tak et al. [58] used T1FFs, taking into account the moving average (MA) model, in their paper. Moreover, although Tak [59] proposed the meta-probabilistic fuzzy function approach, in this approach Tak did not essentially build a prediction model but instead provides a perspective based on the construction of fuzzy functions to combine predictions. In addition to these, several studies using T1FFs have been suggested by Goudarzi [60] and Zarandi [61]. On the other hand, Yalaz and Atay [62] used fuzzy linear regression based on simple membership function and fuzzy rule generation technique for time series data.

When the literature examined in detailed, prediction tools based on artificial intelligence and fuzzy logic are widely used to provide a service for time series prediction. However, accurately predicting time series is a challenging task due to the complex and often chaotic relationships they may contain. FRFs approach, by using some transformation of the memberships as well as the real values of series, create a model with more information. It is important to note that FRFs construct a holistic model by combining a set of linear functions based on the inputs. The relationship between input and output is not always simply linear. This situation is one of the gaps in the fuzzy regression functions literature that needs to be filled. In addition, although each fuzzy function was formed from a multiple linear regression model in the FRF studies in the literature, the basic assumptions of this model were not examined and the validity of the model was not checked. So, the validity of the presented model is an important point and needs to be checked. This study aims to address these gaps by developing fuzzy regression functions with a nonlinear structure, built on feed-forward neural networks. In this paper, as a new approach, Fuzzy Regression Network Functions which capable of modelling nonlinear relationships between

inputs and outputs is introduced. In the proposed approach, each fuzzy function is constructed with FFNN instead of a linear regression model, and nonlinear matching is achieved. Moreover, due to the structure of the proposed FNF approach and used FFNN as a fuzzy function, strict assumptions and their examination are not required. In addition, it has been shown over many real time series that the proposed approach has superior prediction performance due to its ability to provide nonlinear matching.

The rest of the paper is fictionalised as follows: The second section outlines the motivation behind this study and highlights its key contributions. With the third section FCM and Type 1 Fuzzy Regression Functions are given. The fourth chapter presents the methodology, including the proposed new approach with its detailed features. The comprehensive results of implementations are investigated in section five with comparatively comments and evaluations. The findings and conclusions are presented and discussed in the sixth section. Finally, future work and limitations are presented in the last section.

II. MOTIVATION & CONTRIBUTIONS

Time series prediction methods aim to accurately forecast events and/or extend identified patterns from historical data. The processes that generate time series data and their underlying system models are often complex, making it difficult to predict precise future values. Accurate and unbiased predictions of data sets, including almost all-time series, generated by such systems cannot always be obtained using well-known linear techniques. Therefore, more advanced algorithms developed for time series prediction are often required. Recently, alternative methods have been utilized for time series prediction. And these models generally based on fuzzy set theory or computational based approaches. uncertainty Although computational models perform exceptionally well in capturing nonlinear patterns due to their adaptability, they do not incorporate measures for uncertainty.

From this perspective, an approach has been proposed in this study that will both shed light on uncertainty and preserve the high adaptability of computational based methods. The main contributions of the proposed Fuzzy Regression Network Functions to the literature can be summarized item by item as follows;

- The proposed Fuzzy Regression Network Functions (FRNF) offer a more realistic approach, by using some transformation of the memberships as well as the real values of series, and also create a model with more information (to compare fuzzy-based FTS models).

- Fuzzy inference systems are generally rule-based and often need expert opinion. Although T1FRF's approach has handled this problem, the generated functions are linear in terms of parameters. However, many real-life problems are not linear. So, the proposed FRNFs use FFNNs to model nonlinear relationships contained in the time series (to compare fuzzy-based FTS and T1FRF models).
- Although each fuzzy function is composed of a multiple linear regression model in T1FRF studies in the literature, the basic assumptions of this model have been ignored. The model's validity has not been assessed. From this point of view, proposed FRNFs do not need strict assumptions existing in linear regression model to satisfy (to compare FRF models).
- FRNFs combine the benefits of both computational-based and fuzzy-based models. (to compare single fuzzy-based and neural network-based models).
- Moreover, the proposed FRNFs perform exceptionally well, furthering the prediction accuracy for almost all time series datasets used in this study.

III. PRELIMINARIES

3.1. Fuzzy C-means

Fuzzy C-means algorithm is one of the fuzzy partitional clustering algorithm which was proposed by Bezdek [63]. The FCM algorithm employs fuzzy membership to assign a degree of belonging to each class. And, the data is divided into fuzzy sets by minimizing the sum of squared errors within the groups. The FCM algorithm uses the membership values and Euclidean distance to compute the objective function. And the form of the objective function tried to be minimized is as follows:

$$J_m(X, V, U) = \sum_{i=1}^c \sum_{j=1}^N u_{ij}^\beta d^2(x_j, v_i) \quad (1)$$

Here, u_{ij} represents membership value, v_i shows the cluster centres n symbolizes the number of variables. On the other hand β is weighting exponent ($\beta > 1$) which defines the fuzziness of the resulting clusters and $d(x_j, v_i)$ is the distance measure between the observation and the cluster center. J_β is tried to be minimized under the constraints given below.

$$\begin{aligned} 0 &\leq u_{ij} \leq 1, \forall i, j \\ 0 &\leq \sum_{j=1}^n u_{ij} \leq n, \quad \forall i \\ \sum_{i=1}^c u_{ij} &= 1, \quad \forall j \end{aligned} \quad (2)$$

The minimization [2] of the objective function process of J_β is performed iteratively. In this process the values of u_{ij} and v_i are updated with the given formulas.

$$v_i = \frac{\sum_{j=1}^n u_{ij}^\beta X_j}{\sum_{j=1}^n u_{ij}^\beta} \quad (3)$$

$$u_{ij} = \frac{1}{\sum_{k=1}^c \left(\frac{d(X_j, v_i)}{d(X_j, v_k)} \right)^{2/(\beta-1)}} \quad (4)$$

3.2. Type 1 Fuzzy Regressions

Type-1 fuzzy regression functions, proposed by Turksen [64], works based on a combination of a multiple linear regression model and FCM. T1FRFs use as many functions as the number of fuzzy sets. In the regression models created for each fuzzy set, in addition to the original time series observations, inputs consist of the membership values of the relevant fuzzy set and some functions of these memberships. The outputs/predictions produced by each regression equation are weighted by their corresponding membership values and converted into final predictions. Let c represents the number of fuzzy sets. Thus, the regression function for each fuzzy set is given in equation (5).

$$Y^{(i)} = X^{(i)}\beta^{(i)} + \varepsilon^{(i)}, \quad i = 1, 2, \dots, c \quad (5)$$

In that case, the explanatory (inputs) and dependent (targets) variables are given in equations (6) and (7).

$$X^{(i)} = \begin{bmatrix} u_{i1} & u_{i1}^2 & \exp(u_{i1}) & \log\left(\frac{1-u_{i1}}{u_{i1}}\right) & x_{11} & x_{21} & \dots \\ u_{i2} & u_{i2}^2 & \exp(u_{i2}) & \log\left(\frac{1-u_{i2}}{u_{i2}}\right) & x_{12} & x_{22} & \dots \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \dots \\ u_{iN} & u_{iN}^2 & \exp(u_{iN}) & \log\left(\frac{1-u_{iN}}{u_{iN}}\right) & x_{1N} & x_{2N} & \dots \end{bmatrix} \quad (6)$$

$$= 1, 2, \dots, c \quad Y^{(i)} = [y_1 \quad y_2 \quad \dots \quad y_N]^T \quad (7)$$

OLS (ordinary least squares) is used to estimate each T1FRF. Thus, the estimated function becomes as in equation (8).

$$\hat{Y}^{(i)} = X^{(i)}\hat{\beta}^{(i)}, \quad i = 1, 2, \dots, c \quad (8)$$

Here, $\hat{\beta}^{(i)}$ is obtained via OLS with the following matrix operations.

$$\hat{\beta}^{(i)} = (X^{(i)'}X^{(i)})^{-1}X^{(i)'}Y^{(i)}, \quad i = 1, 2, \dots, c \quad (9)$$

The outputs produced by each fuzzy function for each data point are weighted with their corresponding membership values and converted into final predictions as in equation (10).

$$\hat{y}_k = \frac{\sum_{i=1}^c \hat{y}_{ik} u_{ik}}{\sum_{i=1}^c u_{ik}}, \quad k = 1, 2, \dots, N \quad (10)$$

IV. THE PROPOSED FRNFs

Although ANNs are commonly utilized for time series prediction, when determining relationships, the inevitable, uncertainty in the data structure is not taken into account in a meaningful way. However, this uncertainty reveals both the existence of fuzzy relations and the necessity of modelling them. At this point, even though T1FRFs have significantly advanced the literature in this sense, it produces outputs as a linear function of the inputs, since each fuzzy function consists of a multiple linear regression model. In short, it contains a linear model in terms of parameters. However, many time series contain nonlinear relationships. From this context, in this study, owing to the superior adaptability of artificial neural networks to data and their capacity to model nonlinear relationships, a superior prediction tool has been introduced for time series prediction. In the study, the introduced new approach' inputs are consisted of not only the memberships produced by FCM but also some functions of these memberships and crisp lagged variables as well. In this approach, each regression function consists of an FFNN. In this study a prediction tool that takes the advantage of FRF by converting more information, obtained from membership transformations, into inputs and has the ability to model nonlinear relationships using FFNNs as a polyaromatic tool is proposed.

In the light of this information, the algorithm of the proposed approach is summarized with some steps:

Step 1 All the necessity parameters of process are determined

$maxitr$: Maximum iteration number
 p : # lagged crisp variables
 K : # hidden layer neuron
 t_{tr} : Length of the training set
 t_{val} : Length of the validation set
 t_{test} : Length of the test set
 c : # fuzzy sets
 β_f : fuzziness index

Step 2 The dataset fragmentation is performed

The data set is divided into three parts as training, validation, and testing subsets A block partitioning strategy is employed to partition the dataset to preserve its time-dependent structure.

$$X = [x_{it}], i = 1, 2, \dots, p; t = 1, 2, \dots, T - p \quad (11)$$

$$X_{tr} = [x_{it}], i = 1, 2, \dots, p; t = 1, 2, \dots, t_{tr} \quad (12)$$

$$X_{val} = [x_{it}], i = 1, 2, \dots, p; t = t_{tr} + 1, t_{tr} + 2, \dots, t_{tr} + t_{val} \quad (13)$$

$$X_{test} = [x_{it}], i = 1, 2, \dots, p; t = t_{tr} + t_{val} + 1, t_{tr} + t_{val} + 2, \dots, T \quad (14)$$

$$X_{tr} = \begin{bmatrix} x_p & x_{p-1} & \dots & x_1 \\ x_{p+1} & x_p & \dots & x_2 \\ \vdots & \vdots & \dots & \vdots \\ x_{t_{tr}-1} & x_{t_{tr}-2} & \dots & x_{t_{tr}-p} \end{bmatrix} \quad (17)$$

Here, T represents the number of observations in time series.

Step 3 A standardization process is applied to the data In this step to be able to convert the structure of different datasets into one common format of data, data standardization is performed as below;

$$X^{st} = \frac{tr x^{max} - x_t}{tr x^{max} - tr x^{min}} \quad t = 1, 2, \dots, T \quad (15)$$

Step 4 FCM clustering algorithm is performed

FCM is applied over the training set based on c , the number of fuzzy sets. The input matrix for FCM is given in equation (16)

$$X_{tr} = [X_{t-1}, X_{t-2}, \dots, X_{t-p}] \quad (16)$$

It means that;

$$^{(k)}X = \begin{bmatrix} ^{(k)}\mu_1 & ^{(k)}\mu_1^2 & \exp(^{(k)}\mu_1) & \log\left(\frac{1-^{(k)}\mu_1}{^{(k)}\mu_1}\right) & x_p & x_{p-1} & \dots & x_1 \\ ^{(k)}\mu_2 & ^{(k)}\mu_2^2 & \exp(^{(k)}\mu_2) & \log\left(\frac{1-^{(k)}\mu_2}{^{(k)}\mu_2}\right) & x_{p+1} & x_p & \dots & x_2 \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \dots & \vdots \\ ^{(k)}\mu_{t_{tr}-p} & ^{(k)}\mu_{t_{tr}-p}^2 & \exp(^{(k)}\mu_{t_{tr}-p}) & \log\left(\frac{1-^{(k)}\mu_{t_{tr}-p}}{^{(k)}\mu_{t_{tr}-p}}\right) & x_{t_{tr}-1} & x_{t_{tr}-2} & \dots & x_{t_{tr}-p} \end{bmatrix} \quad (18)$$

Thus, $\mu_{tk}, t = 1, 2, \dots, t_{tr} - p; k = 1, 2, \dots, c$ membership values and v_k cluster centers are obtained. During the operation of FCM, the alpha-cut value, which refers to the threshold that defines the degree of membership of data points in clusters, was taken as zero to operate the prediction system without any loss of information by using all the information.

Step 5 The input matrix is created

In this step, an input matrix is created for each fuzzy regression network. The input matrix consists of lagged variables, memberships and some transformations of these memberships. In this study, three different transformations are used: quadratic, exponential, and logarithmic. These transformations form the 2nd, 3rd, and 4th columns in the input matrix given as $^{(k)}X$ in equation (18) respectively. For the $k^{th}, k = 1, 2, \dots, c$ fuzzy regression network, the input matrix can be given as below.

The target values corresponding to these inputs are as in equation (19).

$$^{(k)}Y = [x_{p+1}, x_{p+2}, \dots, x_{t_{tr}}]^T \quad (19)$$

The basic structure of the proposed approach is given with Figure 1 as visual.

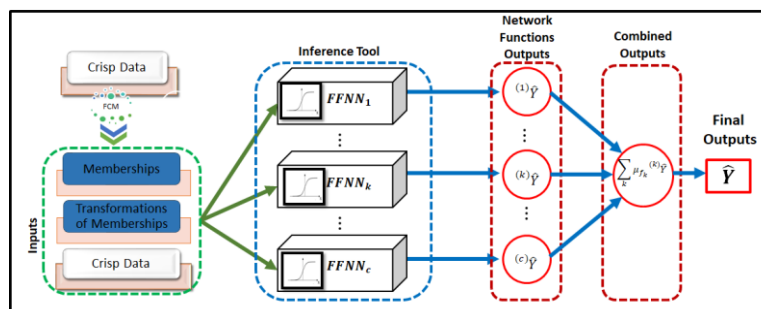


Figure1. The architecture of proposed Fuzzy Regression Network Functions

Step 6 Training of networks is carried out

Depending on the potential parameter values, networks are trained for all possible combinations. The training of neural networks is performed with the Levenberg Marquardt backpropagation algorithm. The number of network functions trained for each combination is equal to the fuzzy set number. Fuzzy networks produce outputs (predictions) as a nonlinear combination of

their inputs. These outputs are weighted with the membership values of the relevant observation set and thus converted to final outputs.

Step 7 The best combination of parameters are determined

Data points of validation sets are transformed into inputs as an out of sample for the trained networks. For

this purpose, firstly, lagged variables are established for the validation set as in equation (20). A vector of target values given in equation (21) is also created for the validation set.

$$X_{val} = \begin{bmatrix} x_{t_{tr}} & x_{t_{tr}-1} & \dots & x_{t_{tr}-p} \\ x_{t_{tr}+1} & x_{t_{tr}} & \dots & x_{t_{tr}-p+1} \\ \vdots & \vdots & \dots & \vdots \\ x_{t_{tr}+t_{val}-1} & x_{t_{tr}+t_{val}-2} & \dots & x_{t_{tr}+t_{val}-p} \end{bmatrix} \quad (20)$$

$${}^{(k)}Y_{val} = [x_{t_{tr}+1}, x_{t_{tr}+2}, \dots, x_{t_{tr}+t_{val}}]^T \quad (21)$$

Secondly, membership values are calculated based on cluster centers determined by FCM as in equation (22).

$$\mu_{tk} = \frac{1}{\sum_{l=1}^c \left(\frac{d(X_{t_i}, v_k)}{d(X_{t_i}, v_l)} \right)^{2/(\beta-1)}}, \quad k = 1, 2, \dots, c \quad (22)$$

Moreover, for validation set, memberships, some transformations of memberships, and lagged variables with real values constitute the inputs of the trained neural networks. The fitness function values for the validation set are calculated over the final outputs of the trained neural networks. In this process the mean square error (MSE) criterion has been taken as fitness function. Thus, the combination that gives the lowest RMSE given in equation (23) value for the validation set is determined as the best parameter values.

$$MSE = \sqrt{\frac{1}{t_{val}} \sum_{t=1}^{t_{val}} (Target_t - Forecast_t)^2} \quad (23)$$

Step 8 With the best combination of parameters, predictions for the test set are obtained.

Predictions are obtained for the out-of-sample dataset to evaluate the performance of the proposed FNFs. Memberships and input matrix can be created for the test set as similar to the validation set. Predictions of the test set are generated by FRNFs using the best combination of parameter values, and converted into final predictions via membership degrees.

V. EXPERIMENTAL RESULTS AND DISCUSSION

5.1. Data preparation

The prediction capacity and performance of the proposed FRNFs have been examined with various financial time series applications. These time series are Taiwan Stock Exchange Capitalization Weighted Stock Index (TAIEX), and Istanbul Stock Exchange (IEX). Table 1 provides a summary of the datasets along with their relevant application features.

The data sets were divided into three parts as raining, validation, and test set. Depending on the potential parameter values, networks were trained for all possible combinations. The best combination of parameters was determined on validation sets. And the performance evaluation was discussed on test sets. The size of the validation and test sets was chosen equally to each other in all implementations. In total, analyses were fulfilled for 26 different data sets.

Table 1. The application features and the data sets.

Series No	Time Series	Year	# of Observations	Size of Training Set	Size of Validation & Testing Sets
1	TAIEX	2000	271	177	47
2		2001	244	158	43
3		2002	248	162	43
4		2003	249	163	43
5		2004	250	160	45
6 / 17 / 28	TAIEX	2008	249	163	43
7 / 18 / 29		2009	247	159	44
8 / 19 / 30		2010	250	160	45
9 / 20 / 31		2011	247	159	44
10 / 21 / 32		2012	246	162	42
11 / 22 / 33		2013	244	158	43
12 / 23 / 34		2014	248	162	43
13 / 24 / 35		2015	244	156	44
14 / 25 / 36		2016	242	154	44
15 / 26 / 37		2017	243	157	43
16 / 27 / 38		2018	245	161	42
39 / 40	IEX	2009	103 / 103	89 / 73	7 / 15
41 / 42		2010	104 / 104	90 / 74	7 / 15
42 / 44		2011	106 / 106	92 / 76	7 / 15
45 / 46		2012	106 / 106	92 / 76	7 / 15
47 / 48		2013	106 / 106	92 / 76	7 / 15

Moreover, the grid-search algorithm has been used to determine the best hyper-parameters. The basic hyper-parameters and potential values of them which produced the points of search space in grid-search are given in Table 2.

Table 2. The possible values of hyper-parameters.

# fuzzy sets	# lagged crisp variable	# hidden layer neuron	Fuzziness Index	# model's target
from 3 to 7	from 2 to 5	from 2 to 5	(1.8, 1.9, 2.0, 2.1, 2.2)	1

5.2. Performance Measure

The prediction performance of the introduced approach, FRNF, have been examined with different evaluation metrics. As in many studies, Root Mean Square Error (RMSE) and Average Absolute Percent Error (MAPE) have been used as performance measures. The formulation of RMSE, the standard deviation of the residuals is commonly used in prediction problems to verify experimental results, is given in equation (24).

$$RMSE = \sqrt{\frac{1}{T} \sum_{t=1}^T (Target_t - Forecast_t)^2} \quad (24)$$

Although the RMSE criterion is accepted as an effective evaluation criterion in comparing models, it cannot give clear information about the level of accuracy of the predictions produced by the model alone, i.e. whether it produces satisfactory predictive results. From this point of view, in this study, to evaluate the proposed model from different aspects, we also choose the MAPE criterion.

MAPE produces a scale-independent metric that can be used to understand and compare model performance. Also, it measures this accuracy as a percentage regardless of the size of the data. The formulation of MAPE is given in equation (25).

$$MAPE = \frac{1}{T} \sum_{t=1}^T \left| \frac{Target_t - Forecast_t}{Target_t} \right| \times 100\% \quad (25)$$

Another method, which shows how well the obtained prediction results are compatible with real observations, is designing a linear regression model to be designed between the predictions and targets. Some properties of the linear regression model can be examined to prove the superior prediction performance of the proposed model. Two key parameters (β and R^2) of a regression model given by equation (26) were used as other metrics to measure the performance of the proposed model.

$$Y_t = \beta \hat{Y}_t + \varepsilon_t \quad (26)$$

Apart from all these metrics, different graphics that present the harmony between the predicted and the target values are also used as visual metrics.

5.3. Implementation Results

The performance of proposed FRNFs has been evaluated on the results obtained from some different financial time series analysis.

5.3.1. TAIEX Implementations - the daily data sets between 2000-2004 years

First, daily observed TAIEX datasets recorded from 2000-2004 were analysed using the proposed FRNFs. The produced prediction results, in terms of RMSE metric, are summarized in Table 3 together with the results of some other state-of-the-art models in order to provide a comparative perspective. When these results given in Table 3 are evaluated, it is seen that the predictions produced by the proposed FRNFs for TAIEX 2000-2004 datasets have the highest accuracy. The proposed model has superior performance over many fuzzy time series methods. Moreover, the FRNFs method seems to be superior, especially when compared to both some ANN ((CNN and LSTM [65]) and some Type-1 fuzzy regression function approaches ([58, 66, 67])). When the datasets are approached from a holistic point of view, it is seen that the proposed FRNFs perform the best in terms of average and median statistics. When the results presented in Table 3 are evaluated from another perspective, it is seen that the proposed FRNFs improved the prediction performance by approximately 5% to 10% when each TAIEX time series is evaluated separately, compared to the best of the state-of-the-art model available in the literature. Moreover, when the 5 TAIEX time series are considered as a whole, it made approximately 9% progress on average.

The superior performance of the proposed FRNFs, which is numerically proven with the RMSE metric, can also be supported by some visuals presented in Figure 2. For all datasets, as other evidence of the special performance of the proposed prediction tool, the visuals in Figure 2 indicate a strong consistency between the predictions produced by FRNFs and the observed time series points. Again, the parameter values of regression models, which are given with these figures and established between the observed and predicted values of the data points, point to the results in the same direction. The estimation of the regression coefficient ($\hat{\beta}$) and the determination coefficient (R^2) for all TAIEX time series are very close to 1. Also, at the 95% level established for $\hat{\beta}$, all confidence intervals cover 1. These findings can be seen as proof that the proposed FRNFs approach is a prediction tool with a high capability.

Table 3. The possible values of hyper-parameters.

Models	Time Series / TAIEX Data Sets					RMSE's	
	2000	2001	2002	2003	2004	Average	Median
[1]	293	116	76	77	82	129	82
[5]	225	116	76	77	82	115	82
[7] ¹	473	359	234	247	384	339	359
[7] ²	473	810	116	308	384	418	384
[36]	133	124	82	62	85	97	85
[18]	152	130	84	56	116	108	116
[68]	154	124	93	66	72	102	93
[42]	131	130	80	58	67	93	80
[37]	168	120	76	58	63	97	76
[69]	129	113	67	54	60	85	67
[70]	124	115	71	58	58	85	71
[71]	131	113	66	52	54	83	66
[8]	255	130	84	56	116	128	116
[44]	227	102	66	51	55	100	66
[72]	126	114	65	54	53	82	65
[39]	125	115	65	53	53	82	65
[22]	132	113	60	52	50	81	60
[73]	140	120	77	60	59	91	77
[29]	126	113	63	51	54	81	63
[74]	180	134	81	77	55	105	81
[75]	129	110	60	51	53	81	60
[76]	127	110	62	53	53	81	62
[58]	128	106	65	52	54	81	65
[77]	137	115	66	57	61	87	66
[78]	124	112	63	52	54	81	63
[48]	123	111	66	52	54	81	66
[66]	120	113	63	49	52	79	63
[79]	122	110	54	51	50	77	54
[80]	122	107	64	52	53	80	64
[65]	105	110	60	51	50	75	60
LSTM from [65]	136	101	89	92	70	98	92
[67]	118	104	64	51	52	78	64
[45]	189	104	156	69	53	114	104
The Proposed FRNFs	<u>100</u>	<u>96</u>	<u>51</u>	<u>44</u>	<u>48</u>	<u>68</u>	<u>51</u>
<i>Progress Rate (%)</i>	<i>5</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>10</i>	<i>4</i>	<i>9</i>	<i>6</i>

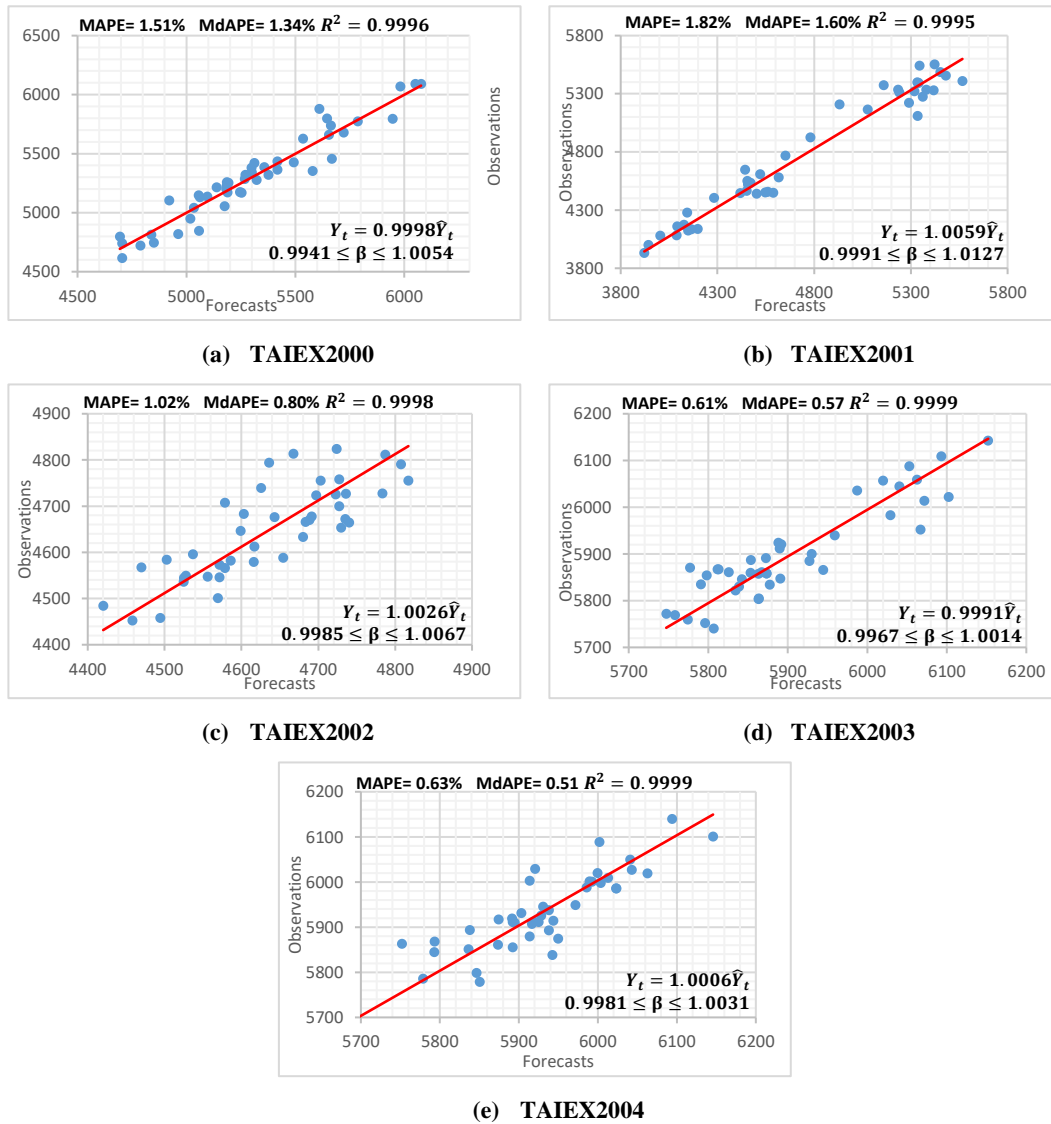


Figure 2. The harmony between the predictions and observations

Moreover, MAPE and MdAPE criteria are also presented in Figure 2 as a measure of performance. The obtained predictions for the TAIEX2000 and TAIEX2001 datasets were produced with MAPE and MdAPE values below 2%. Moreover, for the other 3 TAIEX time series, these values were obtained around 1% or even below 1%. The best values obtained for the parameters are presented in Table 4.

Table 4. The best values obtained for the parameters for TAIEX2000-2004

Data Sets		Parameters		
TAIEX	p	K	c	β_f
2000	5	4	3	1.9
2001	4	2	6	1.8
2002	4	2	5	1.8
2003	3	2	3	2.2
2004	3	3	5	1.8

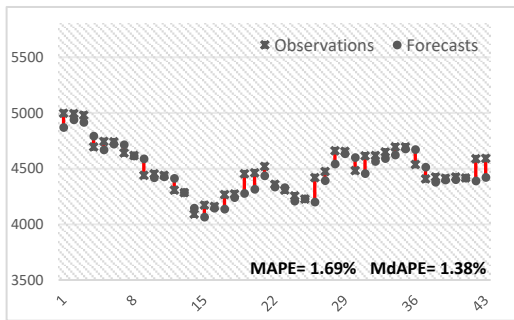
5.3.2. TAIEX Implementations - the daily data sets between 2008-2018 years

Second, eleven TAIEX datasets observed daily from 2008 to 2018 were analysed. The obtained results are discussed by comparing them with the results produced in some other studies. The results in terms of the RMSE metric are given in Table 5. As can be seen from Table 5, the proposed method exhibits the best prediction performance for the time series of these 11-year TAIEX datasets. In addition, when the average of the RMSE values obtained for the 11 different time series is considered, it is seen that there has been progress of about 7% $((74.32-67.87)/ 74.32)$. As seen from Table 5, the proposed FRNFs improve the prediction performance by approximately up to 13% when each dataset is evaluated separately, compared to the best model available in the literature. In addition, when the 11 data sets are considered an entire, it made approximately 9% progress on average.

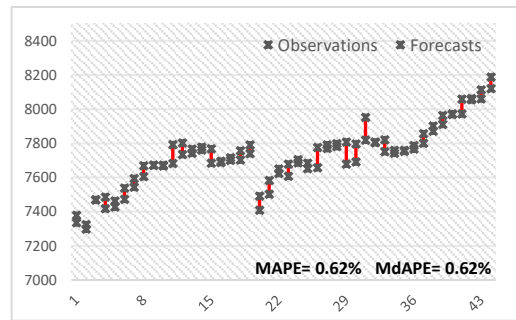
Some visual graphs can also be created showing that the proposed FRFNs approach produces very successful prediction results for these TAIEX data sets. These visuals are graphs showing observed and predicted values and residuals between them. One such bundle of visuals is given in Figure 3.

When Figure 3 is investigated detailed, it is clearly seen that the predicted values are in harmony with the observed data points. The red lines representing the residuals are quite short in almost all data points, with

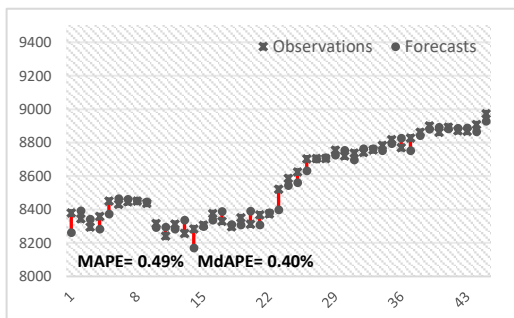
the exception of the 3-year dataset specifically. Even for these 3 datasets (2011, 2016, and 2018 years), while some residuals may seem relatively large, they still indicate fairly reasonable error levels. While the MAPE value, which is a relative error measure for 2011, indicates an extraordinary prediction performance of approximately 1%, these values were even below 1% for 2016 and 2018. Considering that the MAPE values are even below 1% for most of the other years, the superior performance of the proposed FRFNs approach is once again remarkable.



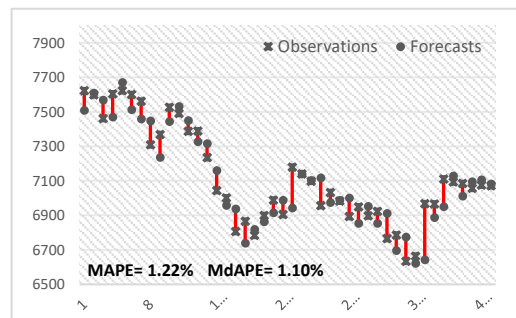
(a) TAIEX2008



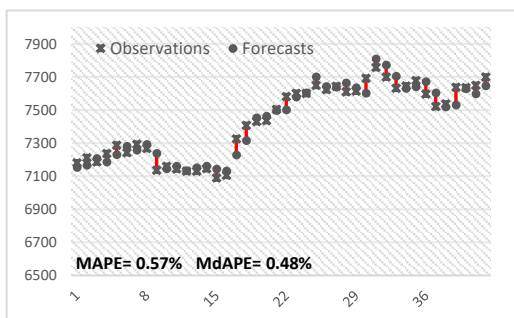
(b) TAIEX2009



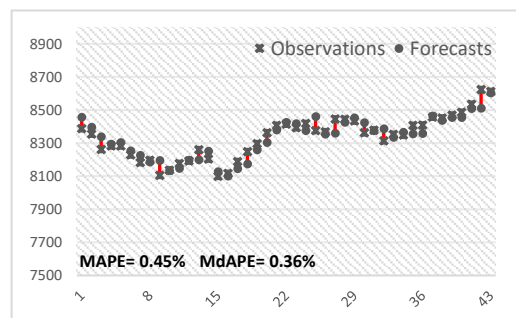
(c) TAIEX2010



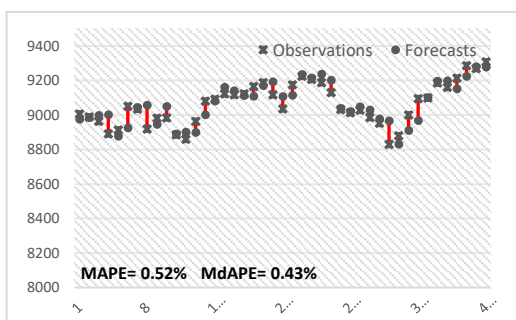
(d) TAIEX2011



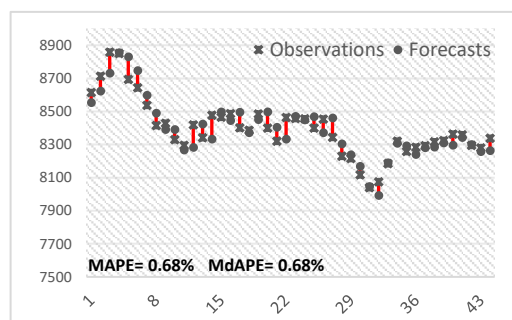
(e) TAIEX2012



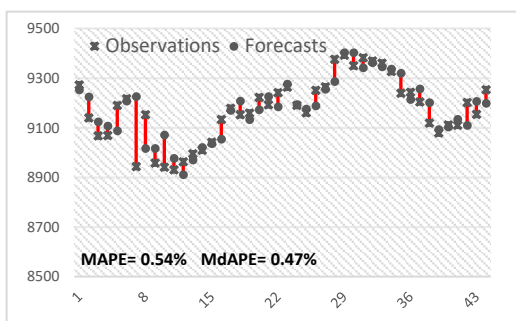
(f) TAIEX2013



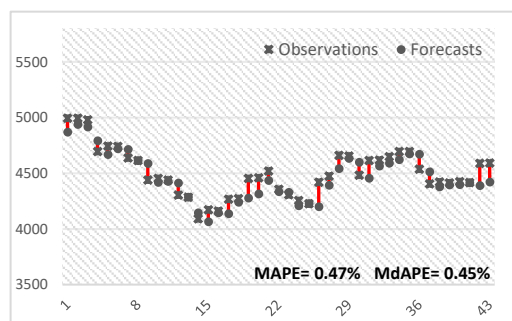
(g) TAIEX2014



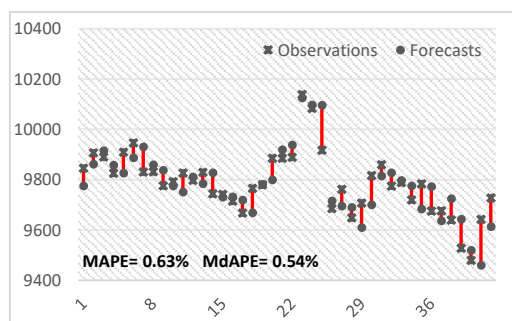
(h) TAIEX2015



(i) TAIEX2016



(j) TAIEX2017



(k) TAIEX2018

Figure 3. The together plot of the observations, predictions, and residuals for TAIEX (2008-2018)

Table 5. The results of current models in terms of RMSE for TAIEX (2008-2018).

Models	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	Average
[4]	225.38	204.11	151.42	237.43	81.08	82.3	98.64	176.6	122.71	91.69	173.36	149.52
[5]	186.48	207.42	211.21	215.13	78.37	184.83	308.72	100.75	316.57	902.18	492.89	291.32
[7]	105.10	78.25	103.84	117.78	59.14	49.59	87.52	90.72	80.98	63.20	186.21	92.94
[81]	138.94	71.30	72.92	115.54	62.32	49.53	69.60	78.73	82.22	62.98	102.19	82.39
[82]	142.38	110.88	100.76	180.79	63.30	63.16	71.62	104.4	88.35	89.02	231.35	113.27
[10]	131.18	71.48	74.07	119.34	59.55	50.09	65.72	79.93	82.10	61.67	101.99	81.56
[68]	144.23	72.16	62.23	114.25	59.94	50.97	64.79	79.27	82.29	62.15	107.08	81.76
[42]	129.48	69.91	67.11	123.03	58.37	50.39	69.15	78.22	80.51	64.25	103.74	81.29
[18]	140.49	70.34	93.08	118.89	62.35	49.63	66.55	78.46	82.73	62.21	109.39	84.92
[83]	142.37	112.45	99.83	164.97	63.31	64.76	74.85	94.33	86.59	88.93	161.78	104.92
[84]	114.03	70.91	68.59	117.02	60.50	49.92	70.44	77.67	80.86	62.61	106.75	79.94
[85]	129.29	70.27	75.46	111.45	63.20	50.84	67.67	78.33	84.39	61.09	103.26	81.39
[86]	137.44	71.76	74.52	117.38	61.59	51.37	69.23	79.89	83.53	62.37	103.24	82.94
[87] ¹	108.52	121.46	75.33	128.46	60.43	51.17	79.44	94.92	80.39	78.76	88.23	87.92
[87] ²	108.57	68.57	52.15	113.38	58.84	48.87	65.90	80.22	82.24	64.31	74.52	74.32
[88]	140.19	73.22	80.37	124.38	62.53	52.39	66.26	82.78	80.14	61.98	99.03	83.93
[89]	126.29	73.77	143.53	122.49	60.73	55.38	66.15	79.47	83.18	65.54	203.72	98.20
[90]	140.48	70.63	67.46	121.27	61.10	50.23	67.08	80.65	81.12	66.34	98.13	82.23
[91]	113.03	72.30	62.82	113.69	60.45	50.17	68.28	78.65	82.43	62.49	104.49	78.98
The Proposed FRFNs	<u>95.81</u>	<u>59.85</u>	<u>51.38</u>	<u>106.07</u>	<u>51.68</u>	<u>46.32</u>	<u>60.04</u>	<u>70.98</u>	<u>69.59</u>	<u>58.00</u>	<u>74.31</u>	<u>67.87</u>
<i>Progress Rate (%)</i>	9	13	1	5	11	5	7	9	13	5	1	9

The best values obtained for the parameters are presented in Table 6.

Table 6. The best values obtained for the parameters for TAIEX2008-2018.

Data Sets	Parameters			
TAIEX	p	K	c	β_f
2008	5	3	3	1.9
2009	3	3	6	2.1
2010	4	3	3	1.9
2011	2	5	7	2.2
2012	3	3	5	2.2
2013	2	4	3	1.9
2014	5	5	4	2.1
2015	4	4	6	1.9
2016	2	4	3	2.0
2017	4	3	4	2.0
2018	2	4	7	1.8

5.3.3. IEX Implementations

Finally, the prediction ability of the proposed FRFNs has been revealed by analysing daily IEX datasets observed in 5 different years from 2009 to 2013. A total of 10 different analyses were performed using two different test sets of lengths 7 and 15 for each of the IEX time series. The obtained results were evaluated comparatively with traditional time series estimation methods, and also both fuzzy-based and ANN-based models. For this purpose, RMSE criterion values have been given in Table 7 and Table 7 for all prediction models.

The proposed FRFNs exhibited the best predictive performance for all-time series excluding a single IEX dataset. Especially in the time series in 2010, 2011, and 2013, where the test set length was 7, nearly 40% progress has been achieved in prediction accuracy. Moreover, in the time series in 2011 and 2013, where the test set length was 15, over 10% progress has been achieved in prediction accuracy. In addition, in the time series where the test set length was 7 in 2012, the level of progress was observed to be close to 20%. Considering all 10 data sets, it is seen that an average of 20% performance improvement is achieved.

Table 7. The results in terms of RMSE for IEX data sets.

	Year / Test Set Size										RMSE's Average
	2009/7	2009/15	2010/7	2010/15	2011/7	2011/15	2012/7	2012/15	2013/7	2013/15	
[92]	345	540	1221	1612	1058	1130	651	621	1362	1269	981
[93]	345	540	1208	1612	1057	1130	651	621	1362	1269	980
[94]	325	525	1077	1603	920	1096	775	783	1315	1233	965
[1]	1402	1754	1128	1742	1396	1360	1292	1047	1450	1931	1450
[73]	267	514	1050	1357	765	917	590	582	786	1208	804
[77]	405	647	1141	2033	1007	1134	634	938	1447	1413	1080
[78]	261	503	1144	1303	960	1009	634	629	1418	1264	913
[48]	240	467	1136	1451	987	999	631	619	1362	1256	915
[55]	446	534	1180	1852	1083	1146	1034	1038	1512	1279	1110
[66]	319	495	1080	1575	915	1028	720	676	1251	1237	930
[67]	240	500	1045	1300	946	1000	662	762	832	1207	849
Proposed FRFNs	<u>213</u>	<u>466</u>	<u>663</u>	<u>1247</u>	<u>442</u>	<u>806</u>	<u>477</u>	716	<u>477</u>	<u>1084</u>	<u>649</u>
<i>Progress Rate (%)</i>	<i>11</i>	<i>1</i>	<i>37</i>	<i>4</i>	<i>42</i>	<i>12</i>	<i>19</i>	<i>NA</i>	<i>39</i>	<i>10</i>	<i>19</i>

VI. CONCLUSIONS

Fuzzy-based prediction models are able to produce very satisfactory results, as they offer a flexible approach to the uncertainty contained in the time series. Also, T1-FRF approach, by using some transformation of the memberships as well as the real values of series, create a model with more information. However, there are some significant problems, considered as a gap in the literature and worth investigating. The first one is that the T1-FRF forms a holistic model based on the combination of a set of linear functions of the inputs. But the relationship between input and output is not always simply linear. The second gap is, FRF studies in the literature do not take into account the rigid assumptions of the linear regression model and the validity of the model is not checked. Moreover, current studies on time series prediction consider the data sets either from computational based point of view or fuzzy based points. So, this issue can be considered as another gap belongs to current studies.

In this study, a novel prediction approach has been proposed in order to both fill all these important gaps in the literature and improve the prediction performance of the model significantly. The proposed FRNFs, by using some transformation of the memberships as well as the real values of series, create a model with more information and so offer a more realistic approach. The proposed FRNFs are capable of modelling nonlinear relationships in time series, thanks to their properties and structure. The proposed FRNFs do not need strict assumptions existing in linear regression model to satisfy, thanks to the used computational-based approach.

In addition to completing the shortcomings of the current studies in the literature, the proposed method's superior prediction performance has been proven by the analysis of different real-life time series.

It has been clearly demonstrated that the proposed prediction tool has a superior predictive ability as well as overcoming the existing problems in the literature. With these aspects, the proposed FRNF is expected to be an effective prediction tool that researchers and practitioners in many fields can benefit from dealing with the time series problem.

VII. FUTURE WORK AND LIMITATIONS

The present approach is limited to tuning the hyper parameters of FFNN, used as a nonlinear fuzzy function. Although this problem has been tried to be overcome by using the validation set, the search space has been limited. Therefore, in future studies, hyperparameter tuning can be carried out in an optimization process.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study has been supported, by Marmara University Scientific Research Projects Coordinatorship, as part of the Master Science Thesis Projects (FYL-2022-10538).

REFERENCES

- [1] Q. Song, B.S. (1993). Chissom, Fuzzy time series and its models, *Fuzzy Sets Syst* 54. [https://doi.org/10.1016/0165-0114\(93\)90372-O](https://doi.org/10.1016/0165-0114(93)90372-O).
- [2] L.A. Zadeh, (1965). Fuzzy sets, *Information and Control* 8. [https://doi.org/10.1016/S0019-9958\(65\)90241-X](https://doi.org/10.1016/S0019-9958(65)90241-X).
- [3] Q. Song, B.S. Chissom, (1993). Forecasting enrollments with fuzzy time series - Part I, *Fuzzy Sets Syst* 54. [https://doi.org/10.1016/0165-0114\(93\)90355-L](https://doi.org/10.1016/0165-0114(93)90355-L).
- [4] Q. Song, B.S. Chissom, (1994). Forecasting enrollments with fuzzy time series - part II, *Fuzzy Sets Syst* 62. [https://doi.org/10.1016/0165-0114\(94\)90067-1](https://doi.org/10.1016/0165-0114(94)90067-1).
- [5] S.M. Chen, (1996). Forecasting enrollments based on fuzzy time series, *Fuzzy Sets Syst* 81. [https://doi.org/10.1016/0165-0114\(95\)00220-0](https://doi.org/10.1016/0165-0114(95)00220-0).
- [6] S.M. Chen, (2002). Forecasting enrollments based on high-order fuzzy time series, *Cybern Syst* 33. <https://doi.org/10.1080/019697202753306479>.
- [7] K. Huarng, (2001). Effective lengths of intervals to improve forecasting in fuzzy time series, *Fuzzy Sets Syst* 123. [https://doi.org/10.1016/S0165-0114\(00\)00057-9](https://doi.org/10.1016/S0165-0114(00)00057-9).
- [8] E. Egrioglu, C.H. Aladag, U. Yolcu, V.R. Uslu, M.A. Basaran, (2010). Finding an optimal interval length in high order fuzzy time series, *Expert Syst Appl* 37. <https://doi.org/10.1016/j.eswa.2009.12.006>.
- [9] E. Egrioglu, C.H. Aladag, M.A. Basaran, U. Yolcu, V.R. Uslu, (2011). A new approach based on the optimization of the length of intervals in fuzzy time series, *Journal of Intelligent and Fuzzy Systems* 22. <https://doi.org/10.3233/IFS-2010-0470>.
- [10] K. Huarng, T.H.K. Yu, (2006). Ratio-based lengths of intervals to improve fuzzy time series forecasting, *IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics, Part B: Cybernetics* 36. <https://doi.org/10.1109/TSMCB.2005.857093>.
- [11] U. Yolcu, E. Egrioglu, V.R. Uslu, M.A. Basaran, C.H. Aladag, (2009). A new approach for determining the length of intervals for fuzzy time series, *Applied Soft Computing Journal* 9. <https://doi.org/10.1016/j.asoc.2008.09.002>.
- [12] S. Panigrahi, H.S. Behera, (2020). A study on leading machine learning techniques for high order fuzzy time series forecasting, *Eng Appl Artif Intell* 87. <https://doi.org/10.1016/j.engappai.2019.103245>.
- [13] L.W. Lee, L.H. Wang, S.M. Chen, (2007). Temperature prediction and TAIEX forecasting based on fuzzy logical relationships and genetic algorithms, *Expert Syst Appl* 33. <https://doi.org/10.1016/j.eswa.2006.05.015>
- [14] L.W. Lee, L.H. Wang, S.M. Chen, (2008). Temperature prediction and TAIEX forecasting based on high-order fuzzy logical relationships and genetic simulated annealing techniques, *Expert Syst Appl* 34. <https://doi.org/10.1016/j.eswa.2006.09.007>.
- [15] I.H. Kuo, S.J. Horng, T.W. Kao, T.L. Lin, C.L. Lee, Y. Pan, (2009). An improved method for forecasting enrollments based on fuzzy time series and particle swarm optimization, *Expert Syst Appl* 36. <https://doi.org/10.1016/j.eswa.2008.07.043>.
- [16] I.H. Kuo, S.J. Horng, Y.H. Chen, R.S. Run, T.W. Kao, R.J. Chen, J.L. Lai, T.L. Lin, (2010). Forecasting TAIEX based on fuzzy time series and particle swarm optimization, *Expert Syst Appl* 37. <https://doi.org/10.1016/j.eswa.2009.06.102>.
- [17] S. Davari, M.H.F. Zarandi, I.B. Turksen, (2009). An improved fuzzy time series forecasting model based on particle swarm intervalization, in: *Annual Conference of the North American Fuzzy Information Processing Society - NAFIPS*, <https://doi.org/10.1109/NAFIPS.2009.5156420>
- [18] L.Y. Hsu, S.J. Horng, T.W. Kao, Y.H. Chen, R.S. Run, R.J. Chen, J.L. Lai, I.H. Kuo, (2010). Temperature prediction and TAIEX forecasting based on fuzzy relationships and MTPSO techniques, *Expert Syst Appl* 37. <https://doi.org/10.1016/j.eswa.2009.09.015>.
- [19] C.H. Aladag, (2013). Using multiplicative neuron model to establish fuzzy logic relationships, in: *Expert Syst Appl*, <https://doi.org/10.1016/j.eswa.2012.05.039>.
- [20] O. Cagcag Yolcu, H.K. Lam, (2017). A combined robust fuzzy time series method for prediction of time series, *Neurocomputing* 247. <https://doi.org/10.1016/j.neucom.2017.03.037>.
- [21] U. Yolcu, O. Cagcag, C.H. Aladag, E. Egrioglu, (2014). An enhanced fuzzy time series forecasting method based on artificial bee colony, *Journal of Intelligent and Fuzzy Systems* 26. <https://doi.org/10.3233/IFS-130933>.
- [22] Q. Cai, D. Zhang, W. Zheng, S.C.H. Leung, (2015). A new fuzzy time series forecasting model combined with ant colony optimization and auto-regression, *Knowl Based Syst* 74. <https://doi.org/10.1016/j.knosys.2014.11.003>.
- [23] M. Jiang, L. Jia, Z. Chen, W. Chen, (2022). The two-stage machine learning ensemble models for stock price prediction by combining mode decomposition, extreme learning machine and improved harmony search algorithm, *Ann Oper Res* 309. <https://doi.org/10.1007/s10479-020-03690-w>.
- [24] C.H. Cheng, G.W. Cheng, J.W. Wang, (2008). Multi-attribute fuzzy time series method based on fuzzy clustering, *Expert Syst Appl* 34. <https://doi.org/10.1016/j.eswa.2006.12.013>.

- [25] S.T. Li, Y.C. Cheng, S.Y. Lin, (2008). A FCM-based deterministic forecasting model for fuzzy time series, *Computers and Mathematics with Applications* 56. <https://doi.org/10.1016/j.camwa.2008.07.033>.
- [26] F. Alpaslan, O. Cagcag Yolcu, (2012). A Seasonal Fuzzy Time Series Forecasting Method Based On Gustafson-Kessel Fuzzy Clustering, *Journal of Social and Economic Statistics* 1 1–13.
- [27] E. Egrioglu, C.H. Aladag, U. Yolcu, (2013). Fuzzy time series forecasting with a novel hybrid approach combining fuzzy c-means and neural networks, in: *Expert Syst Appl*, <https://doi.org/10.1016/j.eswa.2012.05.040>.
- [28] L.Y. Wei, C.H. Cheng, H.H. Wu, (2014). A hybrid ANFIS based on n-period moving average model to forecast TAIEX stock, *Applied Soft Computing Journal* 19. <https://doi.org/10.1016/j.asoc.2014.01.022>.
- [29] S.H. Cheng, S.M. Chen, W.S. Jian, (2016). Fuzzy time series forecasting based on fuzzy logical relationships and similarity measures, *Inf Sci (N Y)* 327. <https://doi.org/10.1016/j.ins.2015.08.024>.
- [30] B.Q. Sun, H. Guo, H. Reza Karimi, Y. Ge, S. Xiong, (2015). Prediction of stock index futures prices based on fuzzy sets and multivariate fuzzy time series, *Neurocomputing* 151. <https://doi.org/10.1016/j.neucom.2014.09.018>.
- [31] W. Wang, X. Liu, (2015). Fuzzy forecasting based on automatic clustering and axiomatic fuzzy set classification, *Inf Sci (N Y)* 294. <https://doi.org/10.1016/j.ins.2014.09.027>.
- [32] O. Cagcag Yolcu, (2018). F. Alpaslan, Prediction of TAIEX based on hybrid fuzzy time series model with single optimization process, *Applied Soft Computing Journal* 66. <https://doi.org/10.1016/j.asoc.2018.02.007>.
- [33] J. Sullivan, W.H. Woodall, (1994). A comparison of fuzzy forecasting and Markov modeling, *Fuzzy Sets Syst* 64. [https://doi.org/10.1016/0165-0114\(94\)90152-X](https://doi.org/10.1016/0165-0114(94)90152-X).
- [34] C. Kocak, (2013). First-order ARMA type fuzzy time series method based on fuzzy logic relation tables, *Math Probl Eng* 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/769125>.
- [35] C. Kocak, (2017). ARMA(p,q) type high order fuzzy time series forecast method based on fuzzy logic relations, *Applied Soft Computing Journal* 58. <https://doi.org/10.1016/j.asoc.2017.04.021>.
- [36] K. Huarng, T.H.K. Yu, (2006). The application of neural networks to forecast fuzzy time series, *Physica A: Statistical Mechanics and Its Applications* 363. <https://doi.org/10.1016/j.physa.2005.08.014>.
- [37] C.H. Aladag, U. Yolcu, E. Egrioglu, (2010). A high order fuzzy time series forecasting model based on adaptive expectation and artificial neural networks, *Math Comput Simul* 81. <https://doi.org/10.1016/j.matcom.2010.09.011>.
- [38] C. Kocak, A.Z. Dalar, O. Cagcag Yolcu, E. Bas, E. Egrioglu, (2020). A new fuzzy time series method based on an ARMA-type recurrent Pi-Sigma artificial neural network, *Soft Comput* 24. <https://doi.org/10.1007/s00500-019-04506-1>.
- [39] S.M. Chen, S.W. Chen, (2015). Fuzzy forecasting based on two-factors second-order fuzzy-trend logical relationship groups and the probabilities of trends of fuzzy logical relationships, *IEEE Trans Cybern* 45. <https://doi.org/10.1109/TCYB.2014.2326888>.
- [40] S.N. Arslan, O. Cagcag Yolcu, (2022). A hybrid sigma-pi neural network for combined intuitionistic fuzzy time series prediction model, *Neural Comput Appl* 34. <https://doi.org/10.1007/s00521-022-07138-z>.
- [41] O. Cagcag Yolcu, (2013). A hybrid fuzzy time series approach based on fuzzy clustering and artificial neural network with single multiplicative neuron model, *Math Probl Eng* 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/560472>.
- [42] T.H.K. Yu, K.H. Huarng, (2008). A bivariate fuzzy time series model to forecast the TAIEX, *Expert Syst Appl* 34. <https://doi.org/10.1016/j.eswa.2007.05.016>.
- [43] F. Alpaslan, O. Cagcag, C.H. Aladag, U. Yolcu, E. Egrioglu, (2012). A novel seasonal fuzzy time series method, *Hacettepe Journal of Mathematics and Statistics* 41.
- [44] U. Yolcu, C.H. Aladag, E. Egrioglu, V.R. Uslu, (2013). Time-series forecasting with a novel fuzzy time-series approach: An example for Istanbul stock market, *J Stat Comput Simul* 83. <https://doi.org/10.1080/00949655.2011.630000>.
- [45] S. ARSLAN, (2023). Gated recurrent unit network-based fuzzy time series forecasting model, *Afyon Kocatepe University Journal of Sciences and Engineering* 23. <https://doi.org/10.35414/akufemubid.1175297>.
- [46] S.M. Chen, N.Y. Chung, (2006). Forecasting enrollments using high-order fuzzy time series and genetic algorithms, *International Journal of Intelligent Systems* 21. <https://doi.org/10.1002/int.20145>.
- [47] C.H. Aladag, U. Yolcu, E. Egrioglu, A.Z. Dalar, (2012). A new time invariant fuzzy time series forecasting method based on particle swarm optimization, *Applied Soft Computing Journal* 12. <https://doi.org/10.1016/j.asoc.2012.05.002>.
- [48] B. Sarica, E. Egrioglu, B. Aşikgil, (2018). A new hybrid method for time series forecasting: AR–ANFIS, *Neural Comput Appl* 29. <https://doi.org/10.1007/s00521-016-2475-5>.
- [49] J.P.S. Catalão, H.M.I. Pousinho, V.M.F. Mendes, (2011). Hybrid wavelet-PSO-ANFIS approach for short-term electricity prices forecasting, *IEEE Transactions on Power Systems* 26. <https://doi.org/10.1109/TPWRS.2010.2049385>.

- [50] B.R. Chang, (2008). Resolving the forecasting problems of overshoot and volatility clustering using ANFIS coupling nonlinear heteroscedasticity with quantum tuning, *Fuzzy Sets Syst* 159. <https://doi.org/10.1016/j.fss.2008.04.003>.
- [51] C.H. Cheng, L.Y. Wei, Y.S. Chen, (2009). Fusion ANFIS models based on multi-stock volatility causality for TAIEX forecasting, *Neurocomputing* 72. <https://doi.org/10.1016/j.neucom.2008.09.027>.
- [52] C.H. Cheng, L.Y. Wei, J.W. Liu, T.L. Chen, (2013). OWA-based ANFIS model for TAIEX forecasting, *Econ Model* 30. <https://doi.org/10.1016/j.econmod.2012.09.047>.
- [53] Y.C. Ho, C.T. Tsai, (2011). Comparing ANFIS and SEM in linear and nonlinear forecasting of new product development performance, *Expert Syst Appl* 38. <https://doi.org/10.1016/j.eswa.2010.11.095>.
- [54] H.M.I. Pousinho, V.M.F. Mendes, J.P.S. Catalão, (2012). Short-term electricity prices forecasting in a competitive market by a hybrid PSO-ANFIS approach, *International Journal of Electrical Power and Energy Systems* 39. <https://doi.org/10.1016/j.ijepes.2012.01.001>.
- [55] I.B. Türkşen, (2008). Fuzzy functions with LSE, *Applied Soft Computing Journal* 8. <https://doi.org/10.1016/j.asoc.2007.12.004>.
- [56] C.H. Aladag, I.B. Turksen, A.Z. Dalar, E. Egrioglu, U. Yolcu, (2014). Application of Type-1 Fuzzy Functions Approach for Time Series Forecasting, *TJFS: Turkish Journal of Fuzzy Systems An Official Journal of Turkish Fuzzy Systems Association* 5.
- [57] C.H. Aladag, U. Yolcu, E. Egrioglu, I.B. Turksen, (2016). Type-1 fuzzy time series function method based on binary particle swarm optimisation, in: *International Journal of Data Analysis Techniques and Strategies*, <https://doi.org/10.1504/IJDATS.2016.075970>.
- [58] N. Tak, A.A. Evren, M. Tez, E. Egrioglu, (2018). Recurrent type-1 fuzzy functions approach for time series forecasting, *Applied Intelligence* 48. <https://doi.org/10.1007/s10489-017-0962-8>.
- [59] N. Tak, (2021). Forecast combination with meta possibilistic fuzzy functions, *Inf Sci (N Y)* 560. <https://doi.org/10.1016/j.ins.2021.01.024>.
- [60] S. Goudarzi, M.B. Khodabakhshi, M.H. Moradi, (2016). Interactively recurrent fuzzy functions with multi objective learning and its application to chaotic time series prediction, *Journal of Intelligent and Fuzzy Systems* 30. <https://doi.org/10.3233/IFS-151839>.
- [61] M.H.F. Zarandi, M. Zarinbal, N. Ghanbari, I.B. Turksen, (2013). A new fuzzy functions model tuned by hybridizing imperialist competitive algorithm and simulated annealing. Application: Stock price prediction, *Inf Sci (N Y)* 222. <https://doi.org/10.1016/j.ins.2012.08.002>.
- [62] S. YALAZ, A. ATAY, (2016). Fuzzy Linear Regression for the Time Series Data which is Fuzzified with SMRGT Method, *SDÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi* 20. <https://doi.org/10.19113/sdufbed.49849>.
- [63] J.C. Bezdek, (1981). Pattern Recognition with Fuzzy Objective Function Algorithms, <https://doi.org/10.1007/978-1-4757-0450-1>.
- [64] I.B. Türkşen, (2008). Fuzzy functions with LSE, *Applied Soft Computing Journal* 8. <https://doi.org/10.1016/j.asoc.2007.12.004>.
- [65] M. Kirisci, O. Cagcag Yolcu, (2022). A New CNN-Based Model for Financial Time Series: TAIEX and FTSE Stocks Forecasting, *Neural Process Lett* 54. <https://doi.org/10.1007/s11063-022-10767-z>.
- [66] E. Bas, E. Egrioglu, U. Yolcu, C. Grosan, (2019). Type 1 fuzzy function approach based on ridge regression for forecasting, *Granular Computing* 4. <https://doi.org/10.1007/s41066-018-0115-4>.
- [67] N. Tak, D. İnan, (2022). Type-1 fuzzy forecasting functions with elastic net regularization, *Expert Syst Appl* 199. <https://doi.org/10.1016/j.eswa.2022.116916>.
- [68] K.H. Huarng, T.H.K. Yu, Y.W. Hsu, (2007). A multivariate heuristic model for fuzzy time-series forecasting, *IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics, Part B: Cybernetics* 37. <https://doi.org/10.1109/TSMCB.2006.890303>.
- [69] S.M. Chen, Y.C. Chang, (2010). Multi-variable fuzzy forecasting based on fuzzy clustering and fuzzy rule interpolation techniques, *Inf Sci (N Y)* 180. <https://doi.org/10.1016/j.ins.2010.08.026>.
- [70] S.M. Chen, C.D. Chen, (2011). TAIEX forecasting based on fuzzy time series and fuzzy variation groups, *IEEE Transactions on Fuzzy Systems* 19. <https://doi.org/10.1109/TFUZZ.2010.2073712>.
- [71] S.M. Chen, G.M.T. Manalu, J.S. Pan, H.C. Liu, (2013). Fuzzy forecasting based on two-factors second-order fuzzy-trend logical relationship groups and particle swarm optimization techniques, *IEEE Trans Cybern* 43. <https://doi.org/10.1109/TSMCB.2012.2223815>.
- [72] Y.S. Chen, C.H. Cheng, W.L. Tsai, (2014). Modeling fitting-function-based fuzzy time series patterns for evolving stock index forecasting, *Applied Intelligence* 41. <https://doi.org/10.1007/s10489-014-0520-6>.
- [73] E. Bas, E. Egrioglu, C.H. Aladag, U. Yolcu, (2015). Fuzzy-time-series network used to forecast linear and nonlinear time series, *Applied Intelligence* 43. <https://doi.org/10.1007/s10489-015-0647-0>.
- [74] Y.S. Chen, C.H. Cheng, C.L. Chiu, S.T. Huang, (2016). A study of ANFIS-based multi-factor time series models for forecasting stock index, *Applied Intelligence* 45. <https://doi.org/10.1007/s10489-016-0760-8>.

- [75] S.M. Chen, W.S. Jian, (2017). Fuzzy forecasting based on two-factors second-order fuzzy-trend logical relationship groups, similarity measures and PSO techniques, *Inf Sci (N Y)* 391–392. <https://doi.org/10.1016/j.ins.2016.11.004>.
- [76] S.M. Chen, B.D.H. Phuong, (2017). Fuzzy time series forecasting based on optimal partitions of intervals and optimal weighting vectors, *Knowl Based Syst* 118. <https://doi.org/10.1016/j.knosys.2016.11.019>.
- [77] J.S.R. Jang, (1993). ANFIS: Adaptive-Network-Based Fuzzy Inference System, *IEEE Trans Syst Man Cybern* 23. <https://doi.org/10.1109/21.256541>.
- [78] E. Egrioglu, C.H. Aladag, U. Yolcu, E. Bas, (2015). A New Adaptive Network Based Fuzzy Inference System for Time Series Forecasting, *Aloy Journal of Soft Computing and Applications* 2.
- [79] O. Cagcag Yolcu, E. Bas, E. Egrioglu, U. Yolcu, (2020). A new intuitionistic fuzzy functions approach based on hesitation margin for time-series prediction, *Soft Comput*. <https://doi.org/10.1007/s00500-019-04432-2>.
- [80] N. Tak, (2020). Type-1 recurrent intuitionistic fuzzy functions for forecasting, *Expert Syst Appl* 140. <https://doi.org/10.1016/j.eswa.2019.112913>.
- [81] K. Huarng, (2001). Heuristic models of fuzzy time series for forecasting, *Fuzzy Sets Syst* 123. [https://doi.org/10.1016/S0165-0114\(00\)00093-2](https://doi.org/10.1016/S0165-0114(00)00093-2).
- [82] H.K. Yu, (2005). Weighted fuzzy time series models for TAIEX forecasting, *Physica A: Statistical Mechanics and Its Applications* 349. <https://doi.org/10.1016/j.physa.2004.11.006>.
- [83] S.M. Chen, K. Tanuwijaya, (2011). Fuzzy forecasting based on high-order fuzzy logical relationships and automatic clustering techniques, *Expert Syst Appl* 38. <https://doi.org/10.1016/j.eswa.2011.06.019>.
- [84] C.H. Aladag, U. Yolcu, E. Egrioglu, E. Bas, (2014). Fuzzy lagged variable selection in fuzzy time series with genetic algorithms, *Applied Soft Computing Journal* 22. <https://doi.org/10.1016/j.asoc.2014.03.028>.
- [85] S. Askari, N. Montazerin, M.H.F. Zarandi, (2015). A clustering based forecasting algorithm for multivariable fuzzy time series using linear combinations of independent variables, *Applied Soft Computing Journal* 35. <https://doi.org/10.1016/j.asoc.2015.06.028>.
- [86] O. Cagcag Yolcu, E. Bas, E. Egrioglu, U. Yolcu, (2020). A new intuitionistic fuzzy functions approach based on hesitation margin for time-series prediction, *Soft Comput* 24. <https://doi.org/10.1007/s00500-019-04432-2>.
- [87] H.J. Sadaei, R. Enayatifar, M.H. Lee, M. Mahmud, (2016). A hybrid model based on differential fuzzy logic relationships and imperialist competitive algorithm for stock market forecasting, *Applied Soft Computing Journal* 40. <https://doi.org/10.1016/j.asoc.2015.11.026>.
- [88] F. Ye, L. Zhang, D. Zhang, H. Fujita, Z. Gong, (2016). A novel forecasting method based on multi-order fuzzy time series and technical analysis, *Inf Sci (N Y)* 367–368. <https://doi.org/10.1016/j.ins.2016.05.038>.
- [89] Y. Wan, Y.W. Si, (2017). Adaptive neuro fuzzy inference system for chart pattern matching in financial time series, *Applied Soft Computing Journal* 57. <https://doi.org/10.1016/j.asoc.2017.03.023>.
- [90] C.H. Cheng, J.H. Yang, (2018). Fuzzy time-series model based on rough set rule induction for forecasting stock price, *Neurocomputing* 302. <https://doi.org/10.1016/j.neucom.2018.04.014>.
- [91] H. Wu, H. Long, J. Jiang, (2019). Handling forecasting problems based on fuzzy time series model and model error learning, *Applied Soft Computing Journal* 78. <https://doi.org/10.1016/j.asoc.2019.02.021>.
- [92] G.E.P., Box, G.M., and Jenkins, G. Reinsel, (2008). *Time Series Analysis, Forecasting and Control*, 4th edition. Wiley, Prentice-Hall, Englewood Cliffs.
- [93] R.G. Brown, (1957). Exponential Smoothing for predicting demand, in: *Oper Res*.
- [94] D.E. Rumelhart, G.E. Hinton, R.J. Williams, (1986). Learning representations by back-propagating errors, *Nature* 323. <https://doi.org/10.1038/323533a0>.

Investigation of Mechanical Properties of Aloe Vera Gel (AVG)/PVA/PLLA Layered Nanobiocomposites

Ahmet Özgür AĞIRGAN ¹, Emine Dilara KOÇAK ², Mehmet AKALIN ²

¹Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi, Çorlu Mühendislik Fakültesi, Tekstil Mühendisliği Bölümü, Tekirdağ,

²Marmara Üniversitesi, Teknoloji Fakültesi, Tekstil Mühendisliği Bölümü, İstanbul, Türkiye

Abstract

Aloe Vera Gel (AVG) is a product obtained from the leaf portion of the *Barbadensis Miller* plant and known for its wound-healing properties. PVA is a water-soluble, biologically disintegrated polymer. PLLA, the stereoisomer of the biodegradable polylactic acid obtained from corn, is a thermoplastic polymer and has properties such as strength and elasticity. In this study, in the first stage, PLLA polymer was converted into nanoweb form as a carrier layer. In the second stage, two-layer nanobiocomposites were produced by applying aloe vera (AVG)/PVA mixture on the existing PLLA nanoweb on the collector of the electrospinning device. The effects of the AVG addition of AVG/PVA/PLLA nanobiocomposite structures containing 0 %, 5 %, 10 %, and 20 % of AVG were examined by using instrumental methods such as viscosity, conductivity, pH, SEM, tensile strength, stretch %, delicacy, FT-IR, and XRD. As a result, the percentage of crystallization due to the AVG ratio in the mixtures increased and has been found to provide resistance to the structure. This feature will be the source for the formation of biocurable resistant materials in future medical studies related to AVG.

Keywords: PLLA (poly-L-lactic acid), PVA (Poly(vinyl alcohol)), AVG (Aloe Vera Gel), Nanobiocomposite, Electrospinning

I. INTRODUCTION

Aloe Vera is among "Selected Medicinal Plants" by (WHO World Health Organization) and principally this species is called as Aloe Barbadensis Miller. It is an approximately 12-years old plant that has 30-50 cm height and its leaves have 10 cm width at its deep parts and that has fine and sparse tubular shaped light yellow flowers at the mid parts that includes a colourless gel at inner parts (parenchyma region) and a plant that grows so many tropical and hot regions like all Mediterranean mainly upper parts of "Nile" river located in Sudan African Continent and Asia, Bahamas, Central America, Mexico, south part of USA, Southeast Asia and West India [1-2]. Aloe Vera Barbadensis Miller plant has totally 200 components that 75 of these components have a biological activity. Gel part of plant is constituted from 99,5% water and 0,5% solid matter content [3]. The materials like (β (1, 4) acetylated mannose, xylose, mannose, galactose and arabinose, Lupeol (a triterpenoid), cholesterol, campesterol and β-sitosterol) constituted by long chain polysaccharides that are known as glucose and mannose are constituted from 1,4 glycosides bonds, polymers at branched linear structure and acidified glaucoma's are water soluble [4-5]. AVG (Aloe Vera Gel) is a type of nectar that have different effects like scar treatment [6-7], skin renovation [1], wrinkle correction [8-10], skin damage renovation bound to UV and X-ray [11], antibacterial [12], antimicrobial [6], anti-inflammatory and antiarthritic [13].

PVA (Poly(vinyl alcohol)) is a water-soluble and hydrophilic polymer same as AVG and it is the most produced artificial adhesive in the world. It is used in a significant number of commercial products because of its excellent chemical resistance, physical and biodegradable properties. It is used as equalizer for coating material, sizing agent, adhesive, emulsion stabilizer and colloid suspensions in textile and paper industry [14-15]. It is a widely used advantageous polymer due to being a biodegradable polymer constituting degradation products like H₂O and CO₂, as well as easy processing feature especially for biomedical applications and drugs and also being a biological adhesive that is not toxic and carcinogenic [15-17].

Corresponding Author: EMİNE DİLARA KOÇAK, Tel: 0216 777 3968, E-mail: dkocak@marmara.edu.tr

Submitted: 10.05.2024, **Revised:** 30.07.2024, **Accepted:** 22.02.2025

Poly(lactic acid) (PLA) has a leading position in bio plastic market with regard to the demand situation and the appropriate production costs. It is aliphatic polyester produced from lactic acid and it also is relatively naturally occurring acid and a food additive. PLA is a thermoplastic material having similar rigidity and transparency to polystyrene and polyester. Different end-use products like flexible and rigid film packages, injection moulds, extrusion coating and textile fibers are produced from PLA polymer. It is a bio-based and biodegradable polymer that is absorbable in the soil under industrial recycling conditions [18].

Uslu et al. (2010) added AVG into biopolymers, such as PVA, PVP (Polyvinyl pyrrolidone, PEG (Polyethylene glycol) etc., to produce nanofibers and they investigated the effects of AVG on pH, surface stretching, viscosity and conductivity of nanofibers by using characterisation techniques. It was observed that the fiber diameter was 200-500nm, homogenous, tandem and linear and it was reported that a crystalline and cross-linked hybrid polymer occurred when 3%wt ratio of Aloe Vera was added [19]. In another study, a nanofiber structure was produced by adding HPMC (hydroxypropyl methylcellulose) and AVG (2%, 4% and 6%) into the PVA/PVP/PEG solution with the aims of water retention and wound healing properties, respectively. It was observed that amorphous ratio, T_m (Melting temperature) and T_g (Glass temperature) values and correspondingly thermal stability were increased with increase in AVG ratio inside smooth fine fibers in 100-900 nm diameter. It was also seen that its wound healing and bacteria protection properties increased with increase in number of pores [20]. Serincay et al. (2013) reported that nanofiber porous structure produced by adding 0.2g ciprofloxacin HCl (Hydrochloric acid) and 0,08 g AVG into PVA/PAA (Polyacrylic acid) solution at different ratios showed an appropriate humidity, oxygen transmittance and thermal stability and it was also bacteria proof that addition of ciprofloxacin HCl and AVG into the solution prevented bacteria passage and ciprofloxacin HCl drug was released in 120 minutes [21]. Kim et al. solved PLLA polymer in dichloromethane and dimethyl acetamide mixture solution and added $AgNO_3$ (silver nitrate) nano particles at different ratios and produced nanofiber by electro spinning. Produced nanofiber structure contained 0%, 3%, 6% and 9% wt. ratio of $AgNO_3$. The nanofiber structure was investigated under UV spectrophotometer, It was seen that bead formation in the solution was decreased with an increase in number of silver particles that resulted an improved electro spinning process. It was observed that the structure contained 10% PLA and 6% showed the best result, thinner and smoother fiber diameter [22]. Tomaszewski et al. produced nanofiber and microfiber structures from poly-L-lactic acid (PLLA) by single jet and multi jet electro spinning and then investigated tensile properties. They observed that thickness and quality of fiber was directly proportional to viscosity of

solution concentration. Furthermore, it was reported that durability and mechanical properties improved with an increase in crystalline region as seen in their DSC and tensile strength test results [23].

The amount of AVG used in this study is the highest ratio in nanofiber materials up to now which constitutes a foresight for the studies to be conducted in medical field in the future. Fully biodegradation of polymer materials, healing properties of aloe vera gel and positive change in the mechanical properties of the nanobiocomposite material constitute the outline of this study.

In this study, mechanical properties of 2 stratified nanobiocomposite material composed of 2 nanofiber structures; one produced from PVA dissolved in deionised water and contained 5%, 10% or 20% AVG and the other one produced from PLLA dissolved in $CHCl_3$ (chloroform) /DMF(Dimethyl formamide) / mixture.

II. MATERIAL AND METHOD

2.1. Materials

The stabilized AVG product (whose tolerance was increased with chemical procedures for environment conditions) was purchased from Forever Living Products Company as Aloe Vera Gel (AVG) which was then subjected to filtration procedure by using a socket cartridge (Filter lab 100% Pure Cel. 33X80 MM REF: 1800) and purified from botanical residuals. PLLA polymer was purchased from (85,000-160,000g/mol) Sigma Aldrich Company. PVA (70,000g/mol), $CHCl_3$ (99.0%) which is used to dissolve the polymer, NaCl (Sodium chloride 99.0%) which is used to increase the conductivity and DMF (98.8%) solvent was purchased from Merck Company. All the chemicals were used as obtained without any further purification.

The whole study was conducted in 3 three parts; (a) solution preparation and its properties, (b) electro spinning process and nanobiocomposite production (c) characterization of produced structures.

2.2. Solution Preparation

In this study, to form a nanobiocomposite structure, firstly a nanofiber structure was produced from PLLA (poly-L-lactic) (1g/10 ml (10% wt.) polymer which was dissolved in the $CHCl_3$ (chloroform) 80%: DMF (dimethyl formamide) 20% by using electro spinning method. Two stratified nanobiocomposite structure was produced by forming the second nano fiber structure, which was produced from a solution containing 12% wt. ratio of PVA dissolved in water and stabilised Aloe Vera Gel (95:05, 90:10, 80:20) in different proportions, onto the first one by using the spinning technique.

With the aim of increased conductivity and gravitation of the solution during electro spinning process, 0.2 g NaCl was added into PLLA (10%wt) solution, and stirred for 24 hours in a magnetic stirrer. The solution was put in the capped glass vials and homogenized by applying 20 kVA power for 10 min in an Everest branded ultrasonic bath.

PVA with a weight ratio of 12% was dissolved in deionised water by being stirred with a magnetic stirrer. Stabilized AVG at different proportions like 95:05, 90:10, and 80:20 was added to prepared PVA solution

and 10 ml PVA/AVG solutions mixed by a magnetic stirrer for 24 hours was homogenised in the bath for 10 minutes. pH and ($\mu\text{S}/\text{cm}$) values of the prepared solution was measured with “WTW Cond 3110” branded Manual type conductivity meter and viscosity values of the solution was measured with “Brookfield DV-E” branded viscometer device. Small sample adaptor (for the solutions that are 10 ml and below) s21 number spindle (rotating shaft) was used for viscosity measurement of samples in small quantities and the values were read as cP (centipoise) at 100 rpm and 25°C. The measured values are given at (Table 1.)

Table 1. Polymer Solution Properties Prepared for Electro spinning Process

Polymer solutions	Blend ratio (%)	Viscosity (cP)	Conductivity ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	pH
AVG (%100) + H ₂ O	100	14.8±1.1	3.25±1.7	5
PVA (% 12) + H ₂ O	100	215±1.8	519±2.8	5
PLLA (% 10) CHCl ₃ /DMF	100	45±2.2	1.1±2.0	5
PVA (% 12) + H ₂ O/AVG (%100)	95/5	58±2.3	1020±2.1	5
PVA (% 12) + H ₂ O/AVG (%100)	90/10	113±1.5	1030±1.9	5
PVA (% 12) + H ₂ O/AVG (%100)	80/20	123±1.2	1216±1.7	5

2.3. Electrospinning Process

The electro spinning process was carried out with NS24 laboratory type device of Invenso company that work in accordance with vertical production principle (the needle is below and assembler cylinder is above). Polymer solution drawn into the injector and located on dosing unit was pumped with the help of ml/min adjustable speed injector pump to a gauge with a diameter of 20. The polymer jet taken from the

spinneret was directed to 8 cm diameter assembler cylinder, which is 15-30 cm above the spinneret, oscillating from the centre to right and left at 35 d/min rotational speed and electrical field constituted with averagely 30 kV AC alternative current voltage and nano fiber 2 layered composite structures was produced. (Figure 1) Nano composite production was done at 26-30 °C and 30-42% relative humidity (Table 2).

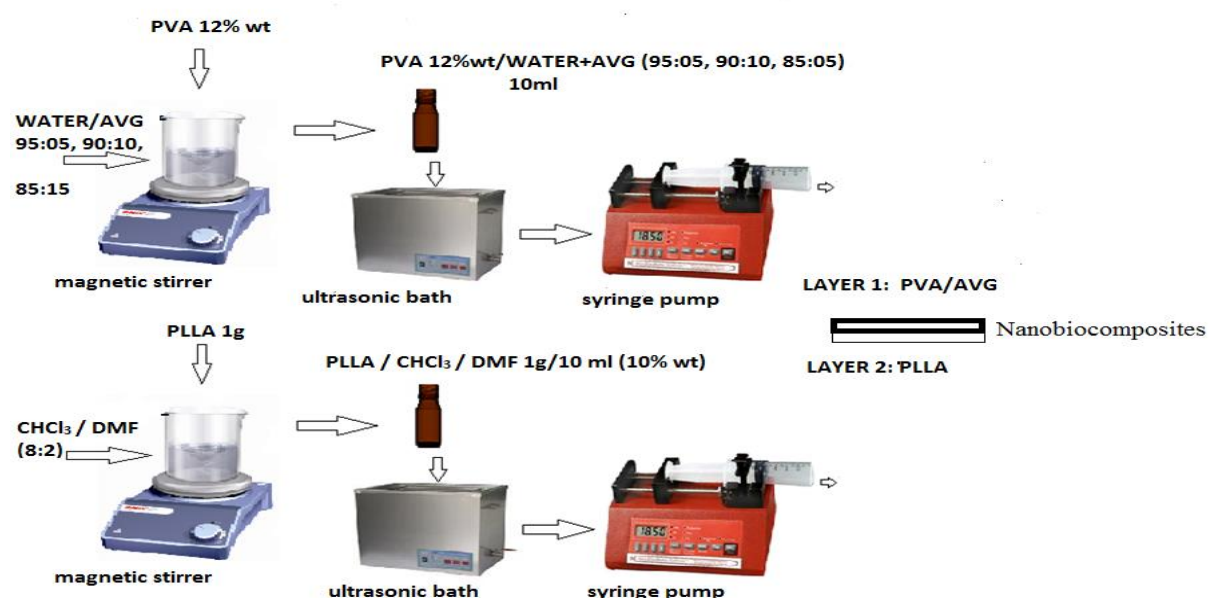


Figure 1. Nanobiocomposites Production Chart

Table 2. Electro Spinning Production Parameters

Polymer solutions	NaCl (g)	Production rate (ml/h)	Collector distance (cm)	Temperature (⁰ C)	Relative humidity (%)	AC current (kV)
PVA/AVG	-	1	15	26	40	33
PLLA	0.2	0.30	27	29	32	30

2.4. Nanofiber Characterization

2.4.1. Morphological characterization

In this study, nano fiber structures were first coated with gold and then viewed under JEOL JMS-5910 type scanning electron microscope (SEM) with magnifications of 10000x and 20000x at 20 kV. Statistical analysis of SEM images and measurements obtained from 60 different regions by using image J program via computer and the images were examined with mean and standard deviation methods. (ASTM D 130)

2.4.2. X-ray Diffractometer

Diffraction angle 2θ of samples was determined by clearance of a specific group planes by using Rigaku XRD analyze at X-ray diffraction. Preference orientation along 200 reflection intensity was observed as $30-40^\circ$ according to this value calculated with the help of Bragg equality for all AVG samples (ASTMD4294)

2.4.3. FT-IR

Thermo Scientific Nicolet iS50R brand device was used in the study. Nanobiocomposite materials were examined at 4 cm⁻¹ solubility by carrying out 5 different test for per sample between 500 cm⁻¹ and 4000 cm⁻¹ wavelength. (ASTM D7414)

2.5. Mechanical Properties

Test samples were 30x10 mm and in dry condition and they were prepared in the machine and material width direction. Firstly material thickness measurement was carried out with RB Cloth Thickness Tester branded thickness meter from James & Heal Co. Ltd. Tensile strength of nanobiocomposite samples were measured with Instron 4411 branded device under 50 N (Newton) force at 10m/min speed.

Carrying out a test according to tensile strength test standards (according to ASTM D 882-10) applied to film or cheesecloth based fabrics was seen as the most common and most appropriate method in the mechanical property investigations of nanofibers [25]. Nanobiocomposite structures were cut in the shape of rectangular or dumbbell (standard towing bar) and subjected to disjuncture strength and elongation test at towing bar [26]. An alternative towing sample was prepared by Huang et al. (2004) for nanofiber cheesecloth based fabrics. The tensile strength of nanocomposite structures which was assembled over the adhesive tape bind on the surface of assembler

cylinder was carried out after being cut 30 mm in length, 10 mm and ~0,3 mm thickness in width and put into towing device in the shapes of strips [27]. In this study, tensile strength measurement was carried out by taking same method as basis. 0.01 mm thick Aluminium folio, which prevents the fabric being adhered on assembler instead of adhesive tape, was used as carrier.

III. RESULTS

3.1. Morphological Properties

Trace amount of salt (0.2 g) was added to increase the conductivity which was decreased due to AVG addition. Since AVG addition into PVA was carried out homogenously, there was no visible phase separation or any other formation in the SEM images (Figure 2).

The fineness of nanofibers produced from PVA/AVG blend by electro spinning process was decreased with the increase in AVG in the blend. It was thought that the reason for this was the increase of AVG ratio which caused decrease in viscosity and an increase in conductivity of the solution (Table1.)

In the evaluation of the nanofibre thickness, it was seen that the material produced from PVA/AVG blends constituted the finest fibers (Table3). It was assumed that the increase in PVA ratio caused an increase in nanofiber diameter. It was also seen that the increase in PLLA amount in the nanobiocomposite structure caused an increase in nanofiber diameter. The reason for that was semi-crystalline structure of PLLA and amorphous structure of others. Therefore, electro static intensity and polymer concentration had a significant effect on fiber morphology and diameter [24,28-29].

It was thought that decrease of PVA ratio in PVA/AVG blends caused the increase of load density over polymer elongation of jet inside strength field constituted by electrostatic powers and jet showing more elongation and fibers being refined. PVA polymer provided a good adhesive Figure 2.(a) by harmonized with PLLA polymer in Figure 2.(b) and PVA/AVG polymer blend in Figure 2.(c) and Figure 2.(d). (Beats occurred due to the change in electrical field which can be seen in SEM image of PVA/AV 80:20 in Figure 2.(e). It was investigated that distribution of nanofiber structure was appropriate for PLLA/PVA mixtures in every direction as seen in Figure 2.(f). It was seen at Figure 2. (g, h, i) that nanobiocomposite structures had homogenous fineness and direction.

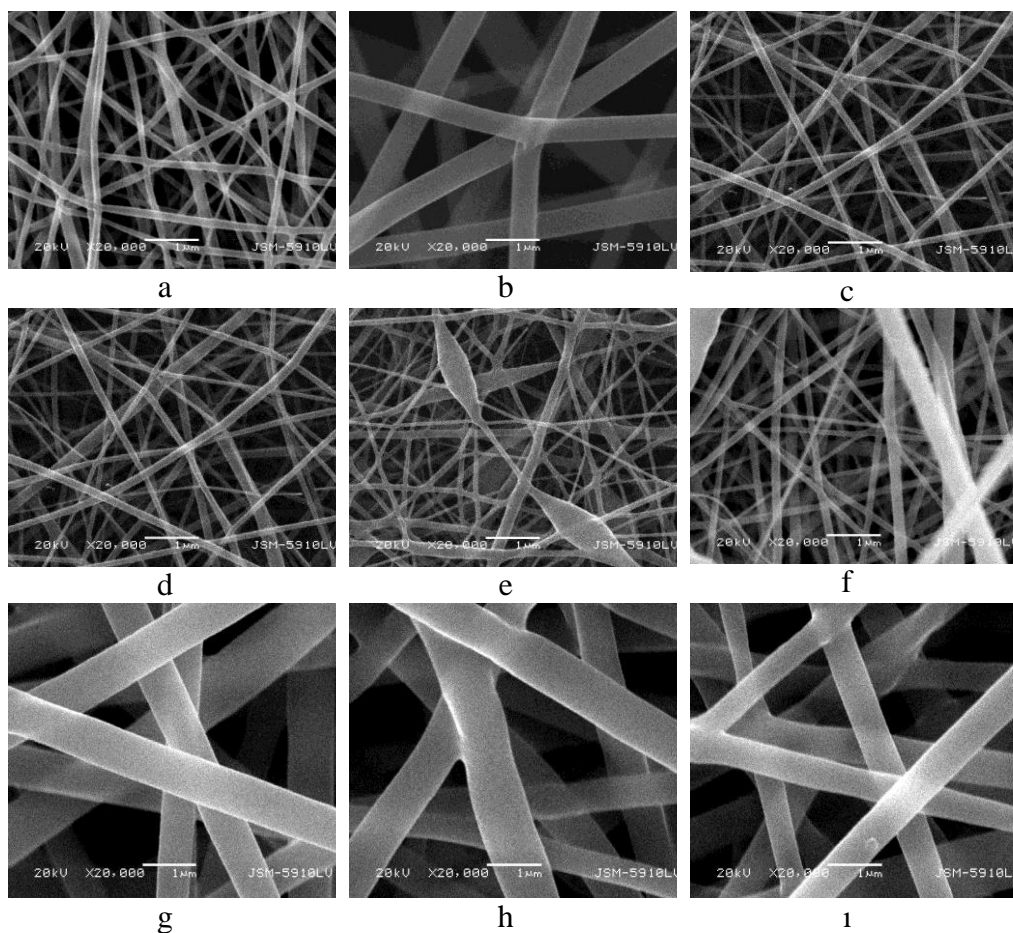


Figure 2. SEM images of produced nano fiber and nano composite materials (a) PVA 100%, (b) PLLA100%, (c) PVA/AVG 95:5% (d) PVA/AVG90:10%, (e) PVA/AVG 80:20%, (f) PLLA/PVA 100%, (g) PLLA PVA/AVG 95:5%, (h) PLLA PVA/AVG 90:10% (i) PLLA PVA/AVG 80:20%

Table 3 Mixture ratios and fineness of nanofiber

Polymer solutions	Blend ratio (%)	Nanofiber fineness (nm)
PVA (% 12)	100%	167±55
PVA (% 12)/AVG	%95/5	129±47
PVA (% 12)/AVG	%90/10	96±50
PVA (% 12)/AVG	%80/20	83±28
PLLA (%10)	100%	534±187

3.2. Mechanical Properties

Strength values of PVA/AVG blends for machine direction and machine width direction are given in Figure 3. A decrease in strength values was seen as AVG ratio was increased in the blends, in spite of that, the lowest values were recorded in both directions of 100% PVA structures. The best result at strength values according to machine direction was at PVA/AVG (95/5%). Decreases in strength values were seen at elongation values, machine width and material direction. But the best value was (90/10 %) against the decreases at elongation values at material width direction.

In Figure 3, the tensile strength values of nanobiocomposite structures produced by adding PLLA polymer into PVA/AVG blend. Decreases in tensile strength values were seen with the addition of AVG to nanobiocomposite structure. When tensile strength results were taken into account in the direction of material width, the highest tensile strength value was PLLA/PVA/AVG (95:5) nanobiocomposite structure.

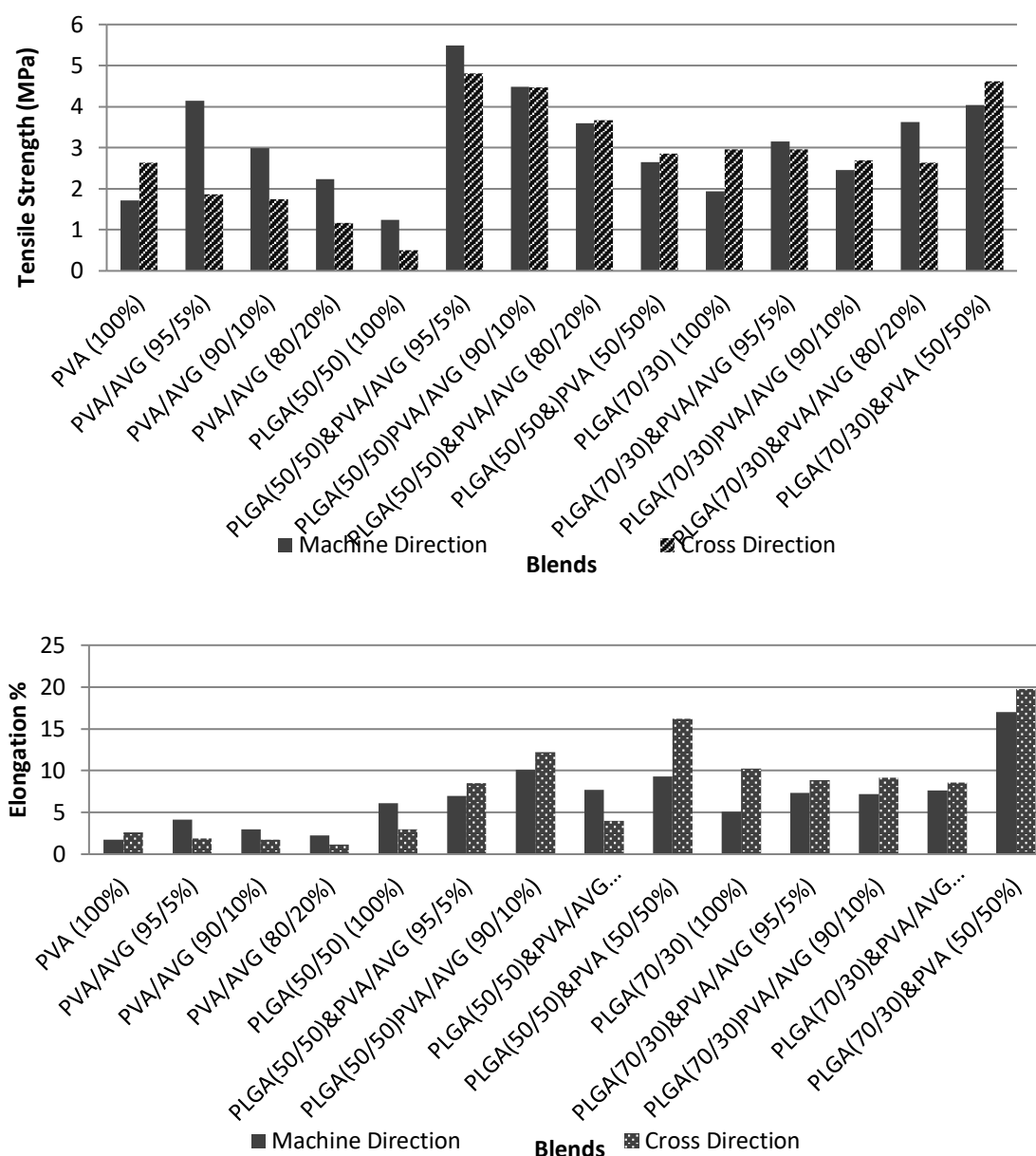


Figure 3. Strength and % Elongation Values of nanobiocomposites.

When tensile strength properties were evaluated by taking material width and machine direction into consideration, optimum strength value was recorded in composite structures containing 5% of AVG in the blend. When % elongation values were taken into account, it was expected that PVA would have the highest elongation values [30]. When % elongation values were taken into consideration, an increase was observed in elongation values with an increase in AVG amount. While a stable increase in tensile strength in the machine direction, the deformation in the machine direction was decreased. When elongation values of

nano fiber structure produced by using PLLA polymer were compared with elongation values of PVA/AVG, it was seen that they provided 5% elongation values which is the optimum value in the machine direction. In bio composite structures, it was observed that the elongation ratio was increased in material width direction. It was thought conceived that the reason was the increase of AVG amount added in stratified bionanocomposites materials produced from PLLA polymer caused to have better elasticity of semi crystalline rigid structure of PLLA.

3.3. FT-IR

FT-IR spectrum of PVA nano fiber is seen in Figure 5. Stretching bands belonging to -OH groups that made a strong intermolecular and intermolecular hydrogen bond at PVA molecule gave wide and severe bands at 3334 cm^{-1} . Two severe peaks at 2947 cm^{-1} and 2933 cm^{-1} were characteristic bands belonging to respectively asymmetric and symmetric C-H stretching. The band belonging to stretching intensities of C=O groups was 1735 cm^{-1} . C=O bands were carbonyl functional group belonging to acetate groups remaining after preparation of PVA with hydrolyse of

oxidation or polyvinyl acetate during manufacture. Absorption bands at 1435 cm^{-1} and 1255 cm^{-1} were resulted from CH_2 leaning vibrations and CH_2 shaking movement, respectively. They were absorption bands belonging to C-H and OH deflections at 1333 cm^{-1} . It was noted that the band at 1093 cm^{-1} belonged to C-C and C-O-C stretching vibrations. In the literature, it was reported that CH_2 deflection vibrations for PVA was resulted from 1417 cm^{-1} and 1270 cm^{-1} CH_2 shaking movement and 1417 cm^{-1} band belonged to C-C and C-O-C stretching vibrations [20].

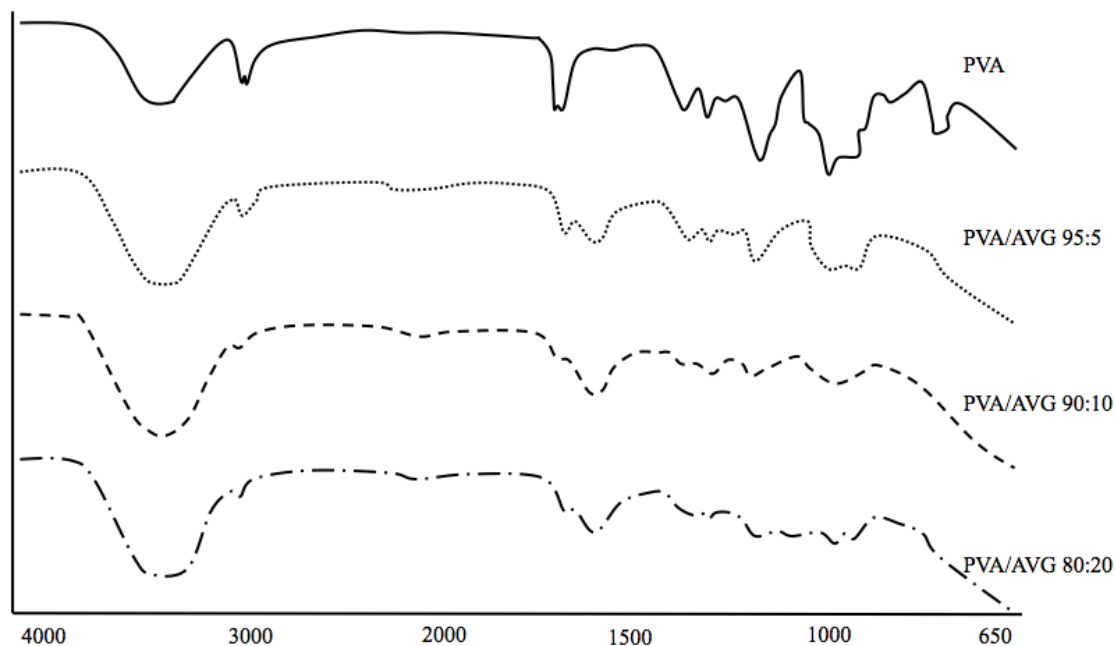


Figure 5. FT-IR Analyze Graphic of PVA/AVG Nanofibers and Nanobiocomposites Structure

Characteristic absorption band showing existence of C=O groups at ester groups over characteristic bands of PLLA chains belonging to PLLA fibers was seen at 1749 cm^{-1} (Figure 6). The peak at 1082 cm^{-1} shows stretching band of C-O, while peaks at 1382 cm^{-1} and 2946 cm^{-1} shows the scissoring (sagging) of -CH- stretching and vibration bands of -CH- , respectively [37]. It was seen in the literature that stretching vibrations of C-H groups for PLLA gave similar values in FTIR analyzes [31]. Characteristic absorption band showed that existence of C=O groups was respectively seen at 1751 cm^{-1} (95:05), 1749 cm^{-1} (90:10), 1639 cm^{-1} (80:20) for PLLA/PVA/ AVG nanobiocomposite structure. Furthermore, scissoring (sagging) of -CH- groups was seen at 1382 cm^{-1} , 1382 cm^{-1} , 1378 cm^{-1} ,

stretching of C-O groups was seen at 1086 cm^{-1} , 1084 cm^{-1} , 1089 cm^{-1} and stretching vibration bands of -CH- groups was seen at 2946 cm^{-1} , 2996 cm^{-1} and 2948 cm^{-1} . Stretching vibrations of -OH groups of PVA nanofibers in PLLA/PVA nanobiocomposites structure gave wide and severe bands at 3325 cm^{-1} . The peak at 2943 cm^{-1} was the characteristic band of asymmetric C-H. It was thought that wide and mid-severe N-H (amine and amide) at 3300 cm^{-1} was from the texture of AVG sap and PVA bio polymer. In previous studies, phenolic powerful and severe stretching's of OH groups were seen in phenolic, flavonoid, and antracinnon available in AVG extract [32] that was seen at 3300 cm^{-1} in this study (Figure 6).

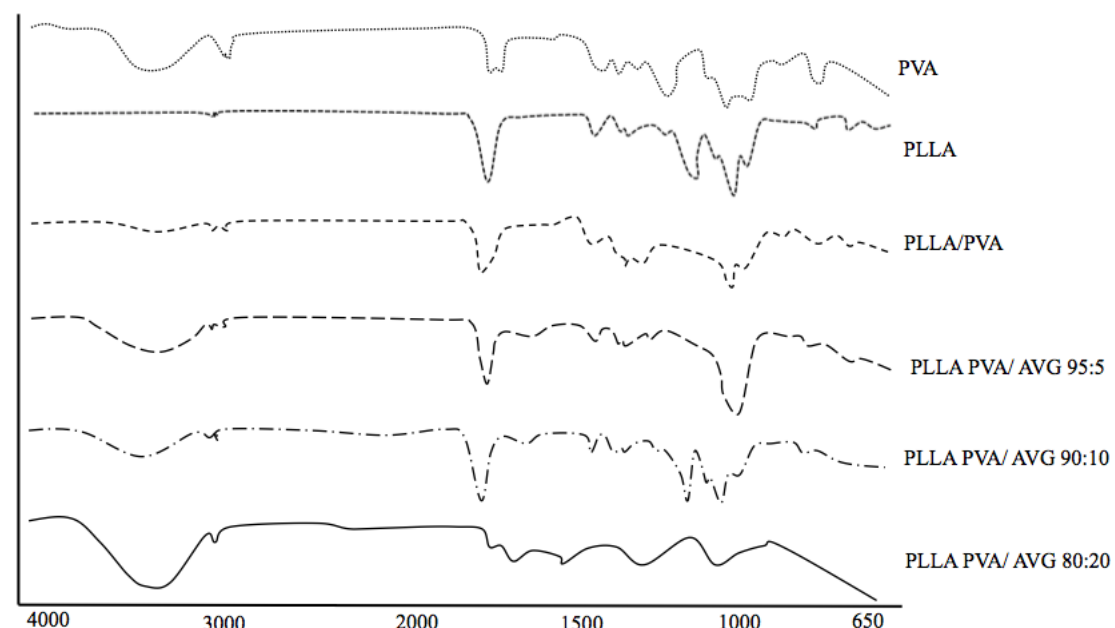


Figure 6. FT-IR analyze Graphic of PLLA/PVA/AVG Nanofiber and Nanobiocomposites Structure.

3.4. XRD analyze

Diffraction angle of samples was detected by the distinctness between 2θ a specific group planes by using Riguku XRD branded device at X-ray diffraction analyze. It was observed that preference orientation along 200 reflection intensity planes was $30\text{-}40^\circ$ according to the value calculated with the help of Bragg

equality for all AVG samples. Diffraction way of peak shifted to left and showed an amorphous structure [33].

It is seen that PVA wide peak was 20° centred. $2\theta = 19^\circ$ is totally lost (Figure 7). It is possible to define maximum 2θ of PLLA fibers approximately at 15° [34].

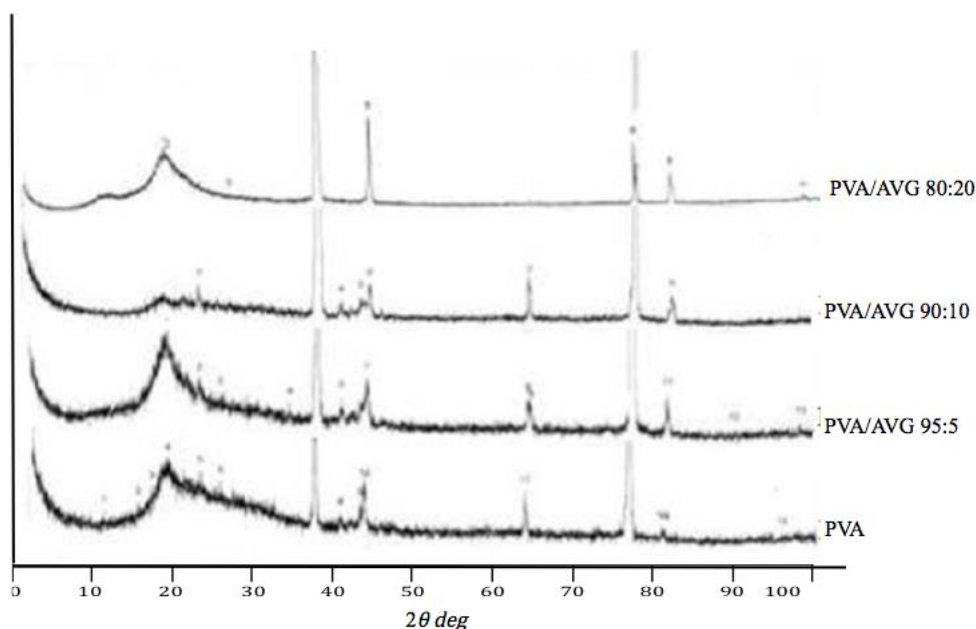


Figure 7. XRD analyze of 100% PVA Nanofiber and PVA/AVG Mixture Nanofibers

The maximum 2θ of PLLA was approximately 15° in literature that can be seen in Figure 8. In the literature, peaks for PLLA polymer were defined at $10^\circ\text{-}25^\circ$ in XRD analysis. It is assumed that a 2θ approximately

15° wide peak was constituted as a result of coincide of PLLA/PVA peaks. Figure 7., 8. The values in the literature coincide with the data determined [34-35].

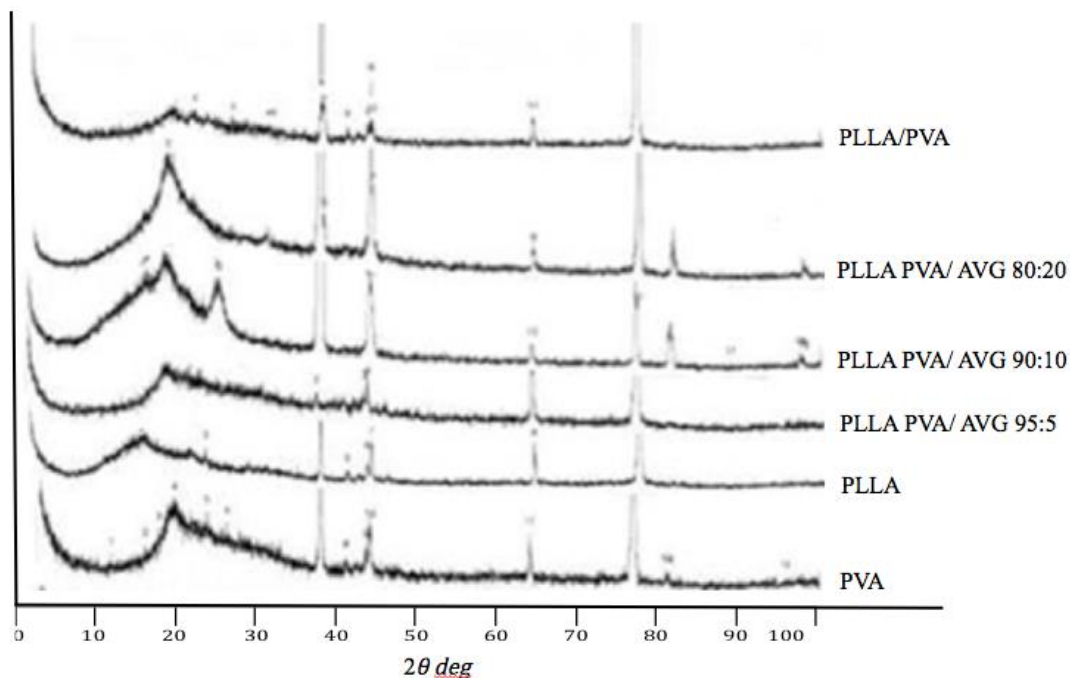


Figure 8. XRD analyze of 100% PLLA Nanofiber nanobiocomposites Structure Constituted with PVA/AVG

It was observed that PVA, PVA/AVG nanofibers constituted the only wide and severe peaks on $2\theta = \sim 20^\circ$ at x-ray diffractometers of nanofiber and nanobiocomposite structure. Calculation of these peak fields revealed out that PVA polymer had 23,7% crystallinity. An increase in the crystallinity was observed with an increase in AVG amount in the blend (Table 4). Crystallinity was calculated according to the

equation given below (1).

$$Crl \% = \frac{x_1 - x_2}{x_2} \times 100 \quad (1)$$

$Crl \%$: Crystallinity %
 X_1 : Maximum peak value
 X_2 : Minimum peak value [36].

Table 4. XRD analyze results of nano fiber and nanobiocomposite structure

Nanofiber /Nanobiocomposites	Blend ratio %	Reflection intensity 2θ ($^\circ$)	Crystallinity Crl (%)
PVA	100	20	23.7
PLLA	100	17	52.1
PVA/AVG	95:05	20	16
PVA/AVG	90:10	20	17.9
PVA/AVG	80:20	20	18.2
PLLA/PVA	100+100	19	43.6
PLLA/PVA/AVG	100+95:05	20	20.5
PLLA/PVA/AVG	100+90:10	19	21.5
PLLA/PVA/AVG	100+80:20	20	23

Reflection intensity of nanobiocomposites and nanofiber ranges between $2\theta = 19^\circ - 20^\circ$ structures produced from PLLA polymer. Crystallization percentage of PVA/AVG blends increased depending on AVG ratio. Even though PLLA/PVA/AVG layered nanobiocomposite structure showed lower crystallinity as compared to 100% PLLA polymer, an increase in crystallinity was still observed with the increase of AVG percentage (Table 4). The reason is that PLLA polymer has a semi crystallized structure and PVA/AVG blends is in accordant with each other and constitutes an accordant structure.

IV. CONCLUSION

In this study, firstly, PLA carrier polymer nanofiber floor, which is the biodegradable feature, was created by using PVA/AVG mixture nanofibers and the electrospinning method by using a two-layer nanobiocomposite structure. Then, to characterize the samples, strength, % elongation measurement, sem, contact angle, FT-IR, DSC, and XRD analyses were applied to the nanofiber and nanocomposite structures. Observation made on viscosity and conductivity values shows that viscosity decreased, but conductivity increased due to the amount of AVG increase depending on the amount of polymer found in the

solution and molecular weight. Again, the increase in the amount of PLLA in nanofiber has increased nanolyphic thickness. Considering the standard deviation values, the PVA/PLLA mixture shows that nanobiocomposite structure provides the best machine direction and strength values in the direction of material width. As the amount of AVG added to the structure of nano biocompositis increased, there was a decrease in strength. When the DSC thermograms are examined, PLLA polymer is semi-crystalline, and other polymers and aloe vera gel (AVG) used in the study were determined by peaks obtained from amorphous structure. DSC thermograms show that in nanobiocomposite structures obtained from PLLA polymer, TG and TM values decrease and heat stability increases. This is considered to be caused by the cross-bond made by PVA polymer and AVG. In PLLA/ PVA/ AVG Nanobiocomposites structures, the characteristic absorption band that shows the presence of C = O groups, the scissoring of the -CH₂- groups, the stretching of C-O groups, the stretching vibration bands of the -CH₂-groups, the AVG plant extract and the structure of the PVA biopolymer. It is seen that it is similar to two characteristic groups. In the light of all data obtained in XRD analysis, PLLA polymer's semi-crystalline structure and AVG and PVA molecular structure are considered to be amorphous materials. It is seen that the reflection intensity value in the diffractograms obtained contains a wide and severe peak specific to the structure of amorphous materials and constitutes close peak values.

As a result, it has been observed that AVG participation has positive contributions to the thermal properties of nanobiocomposite structures. It is considered that different solvents and additional additives are used to improve strength properties. The fact that the biopolymers and AVG used in the study have a completely biological disintegration feature indicates that it is an environmentally non-toxic substance. In addition, the presence of AVG plant extract in nanobiocomposites obtained constitutes a prediction for studies in the future medical field.

ACKNOWLEDGEMENT

This study was supported within the scope of Marmara University Scientifically Coordination Centre project no BAPKO FEN-C-DRP-130511-167.

REFERENCES

- [1] Reynolds, T., (2004) "Aloes: The genus Aloe" book CRC Press chapter :8,7 USA
- [2] WHO, (1999) "Monographs on selected medicinal plants" Volume 1 World Health Organization, ISBN 92 4 154517 8, Geneva
- [3] Saeed M.A., Ahmad I., Yaqub U., Akbar S., Waheed A., Saleem A., (2004) "Aloe Vera: A Plant Of Vital Signifinaces" Science Vision Vol.9 No.1-2

- [4] Ahlawat, K.S., Khatkar, B.S., (2011) "Processing, food applications and safety of aloe vera products: a review" J Food Sci Technology Vol. 48 (5) :525-533
- [5] Lee J.K., Lee M.K., Yun Y.P., (2001) "Acemannan purified from Aloe vera induced phenotypic and functional maturation of immature dendritic cells" Int Immunopharmacol Jul;1 (7) :1275-85,
- [6] Bassetti A., Saia S., (2005) "THE GREAT ALOE BOOK History, botany, composition, and pharmacological aspects of this legendary plant." Zuccari Pty Ltd Via Maccani, 34 - 38100 Trento USA 31
- [7] Jing Yin, Lan Xu, (2020) Batch preparation of electrospun polycaprolactone/chitosan/aloe vera blended nanofiber membranes for novel wound dressing, International Journal of Biological Macromolecules, Volume 160, 2020, Pages 352-363, ISSN 0141-8130,
- [8] Surjushe, A., Vasani, R. and Saple, D. G. (2008) "Aloe vera: A short review". Indian Journal of Dermatology 53:163-166.
- [9] Solaberrieta, Ignacio, Alfonso Jiménez, Ilaria Cacciotti, and Maria C. Garrigós (2020). "Encapsulation of Bioactive Compounds from Aloe Vera Agrowastes in Electrospun Poly(Ethylene Oxide) Nanofibers" Polymers 12, no. 6: 1323. <https://doi.org/10.3390/polym12061323>
- [10] Davis, R. H., Parker, W. I. and Samson, R. T., (1991) "Isolation of a stimulatory system in an aloe extract" J. American Podiatric Medical Assoc. 81:473-478.
- [11] Alven, S.; Khwaza, V.; Oyedeji, O.O.; Aderibigbe, B.A. (2021) Polymer-Based Scaffolds Loaded with Aloe vera Extract for the Treatment of Wounds. Pharmaceutics 21, 13, 961. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13070961>
- [12] Christaki E.V., Florou-Paneri P., (2010) Aloe vera: A plant for many uses, Journal of Food, Agriculture & Environment 8 (2) : 245-249,
- [13] Barbosa R, Villarreal A, Rodriguez C, De Leon H, Gilkerson R, Lozano K. (2021) Aloe Vera extract-based composite nanofibers for wound dressing applications. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl. 2021. doi: 10.1016/j.msec.2021.112061.
- [14] Bootdee K., Nithitanakul M. (2021) Poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanospheres within composite poly(vinyl alcohol)/aloe vera electrospun nanofiber as a novel wound dressing for controlled release of drug, International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials, 70:4, 223-230, DOI: 10.1080/00914037.2019.1706512
- [15] Cai W., Gupta, B.R., (2002) "Hydrogels", Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology Wiley, New York, NY Online

- [16] Hikmawati, D., Maharani, N. P., & Putra, A. P. (2020). The Effect of Ultraviolet Exposure on Physical Properties of Electrospun Nanofiber Membrane Based on Polyvinyl Alcohol and Aloe vera. In *Key Engineering Materials* (860, 244-250). Trans Tech Publications Ltd
- [17] Pala, N., Aral, N., & Nergis, B. (2022). Emulsion electrospinning of pva nanofibers containing hypericum perforatum oil. *Tekstil ve Mühendis*, 29(128), 267-271.
- [18] H. Tsuji, Y. Ikada, (1996) "Crystallization from the melt of poly (lactide) s with different optical purities and their blends" *Macromol. Chem. Phys.* 197, 3483–3499.
- [19] Uslu İ., Keskin S., Gül A., Karabulut C., Aksu M.L., (2010), "Preparation and Properties of Electrospun Poly (vinyl alcohol) Blended Hybrid Polymer with Aloe vera and HPMC as Wound Dressing" *Hacettepe J. Biol. & Chem.*, 38 (1) 19-25
- [20] Uslu İ., Aytimur A., (2011) "Production and Characterization of Poly (vinyl alcohol)/Poly (vinylpyrrolidone) Iodine/Poly (ethylene glycol) Electrospun Fibers with (Hydroxypropyl) methyl Cellulose and Aloe Vera as Promising Material for Wound Dressing", *Journal of Applied Polymer Science*, 124 – 4 3520-3524
- [21] Serinçay H., Özkan S., Yılmaz N., Koçyiğit S., Uslu İ., Gürcan S., Arısoy M., (2013), "PVA/PAA-Based Antibacterial Wound Dressing Material with Aloe Vera", *Polymer-Plastics Technology and Engineering*, 52: 1308–1315.
- [22] Kim E.S., Kim S.H., and Lee C. H., (2010), "Electrospinning of Polylactide Fibers Containing Silver Nanoparticles", *Macromolecular Research*, 18(3), 215-221
- [23] Tomaszewski W., Duda A., Szadkowski M., Libiszowski J., Ciechanska D., (2008), "Poly(L-lactide) Nano- and Microfibers by Electrospinning: Influence of Poly(L-lactide) Molecular Weight", *Macromol. Symp.* 272, 70–74
- [24] Li WJ, Laurencin CT, Caterson EJ, Tuan RS, Ko FK. (2002) "Electrospun nanofibrous structure: A novel scaffold for tissue engineering". *J. Biomed. Mater. Res.* 60, 613–621
- [25] Andrady A.L., (2008) "Science and Tecnology of Polymer Nanofibers", A John Wiley Sons Inc., ISBN 978-0-471-79059-4
- [26] Ding, B., J. H. Kim, Y. Miyazaki, and S. M. Shiratori (2004) . "Electrospun nanofibrous membranes coated quartz crystal microbalance as gas sensor for NH₃ detection." *Sensors and Actuators B: Chemical* 101 (3) :373–380.
- [27] Huang, Z. M., Y. Z. Zhang, S. Ramakrishna, and C. T. Lim (2004) . "Electrospinning and mechanical characterization of gelatin nanofibers." *Polymer* 45 (15) : 5361–5368.
- [28] Pala Avcı, N., Aral Yılmaz, N., & Nergis, F. B. (2024). The Effect Of Polymer Concentration On Coaxial Electrospinning Of Pvp/Pcl Core-Sheath Nanofibers. *Politeknik Dergisi*, 27(5), 1781-1787.
- [29] Avcı, N. P., Yılmaz, N. A., & Nergis, F. B. (2024). The effect of essential oil on fiber morphology and surface properties in coaxial nanofibers. *Uludağ Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Dergisi*, 29(1), 125-138.
- [30] Peresin, M.S., Habibi, Y., Vesterinen, H.A., Rojas, O.J. Pawlak J.J, Seppa J.V., (2010) "Effect of Moisture on Electrospun Nanofiber Composites of Poly (vinyl alcohol) and Cellulose Nanocrystals", *Biomacromolecules*, 11, 2471–2477
- [31] Clarisse Ribeiro C., Sencadas V., Costa C.M., Luís J., Ribelles G., and Mendez S.L., (2011), "Tailoring the morphology and crystallinity of poly (L-lactide acid) electrospun membranes" *Sci. Technol. Adv. Mater.* 12 , 9
- [32] Ray A., Gupta S.D., Ghosh S., (2013), "Evaluation of anti-oxidative activity and UV absorption potential of the extracts of Aloe vera L. gel from different growth periods of plants", *Industrial Crops and Products*. 49, 712– 719
- [33] Gunalan S., Sivaraj R., Venkatesh R., (2012) "Aloe barbadensis Miller mediated green synthesis of mono-disperse copper oxide nanoparticles: Optical properties", *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 97, 1140–1144
- [34] Paragkumar N1, Edith D, Six J.L, (2006) "Surface characteristics of PLA and PLGA films", *Applied Surface Science* 253 2758–2764
- [35] Cao D., Wu Y.P., Fu Z.F., Tian Y., Li C.J., Gao C.Y., (2011) "Cell adhesive and growth behavior on electrospun nanofibrous scaffolds by designed multifunctional composites", *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 84 26–34
- [36] Guimarães J.L., Frollini E., Silva C.G., Wypych F., Satyanarayana K.G., (2009), "Characterization of banana, sugarcane bagasse and sponge gourd fibers of Brazil", *Industrial Crops and Products* 30, 407–415
- [37] Agirgan M., Taskin V., (2020): Nonwoven Production from Waste Rice Straw by Using Enzymatic Method, *Journal of Natural Fibers*, DOI:10.1080/15440478.2018.1546637

PSMB8 as a Novel Target for AML Therapy: Uncovering Synergistic Potential with PI3K Inhibitors

AML Tedavisinde Yeni Bir Hedef Olarak PSMB8 ve PI3K İnhibitörleri ile Sinerjik Potansiyelin Belirlenmesi

Onur ATEŞ¹ , Yağmur Kiraz¹ 

¹Department of Genetics and Bioengineering, Faculty of Engineering, İzmir University of Economics, İzmir, Turkey

Abstract

Acute myeloid leukemia (AML) is a bone marrow condition that arises from abnormalities in hematopoietic stem cells due to genetic mutations in progenitor blood cells. These mutations lead to the uncontrolled proliferation of malignant clonal myeloid stem cells. Although extramedullary symptoms such as myeloid sarcomas and leukemia cutis can arise, the main issue continues to be the disturbances in hematologic cell production. Despite the high complete remission rate in elderly patients, a notable number of patients experience relapse within three years. To address this issue, new objectives must be identified. In a previous study, PSMB8 drew our attention due to its elevated expression levels in AML patients exhibiting lower survival rates compared to those with reduced expression levels. PSMB8 was used for drug repurposing studies by performing in silico drug screening, an ADMET analysis which is followed by Molecular Dynamics (MD) simulations. Three ligand molecules were identified as potential treatment options for AML which were Adozelesin, Fiduxosin and Omipalisib. Omipalisib is known as a PI3K/mTOR inhibitor which was taken our attention for cytotoxic analysis due to overexpression of PI3K/mTOR pathway proteins in AML development. In the subsequent phase, we assessed the cytotoxicity of Omipalisib in comparison to ONX-0914, an inhibitor of PSMB8, in the HL60 cell lines. This research indicated that PSMB8 could be a possible target for Acute Myeloid Leukemia and that a potential medication can be utilized for targeted treatment.

Keywords: Omipalisib, ONX-0914, AML, PI3K/mTOR, PSMB8, Proteasome

Öz

Akut miyeloid lösemi (AML), progenitör kan hücrelerindeki genetik mutasyonlar nedeniyle hematopoetik kök hücrelerde meydana gelen düzensizliklerden kaynaklanan bir kemik iliği hastalığıdır. Bu mutasyonlar, malign klonal miyeloid kök hücrelerin kontrolsüz çoğalmasına yol açar. Miyeloid sarkomlar ve lösemi kutisi gibi ektramedüller belirtiler ortaya çıkabilse de, temel sorun hematolojik hücre üretimindeki bozulmalardır. Yaşlı hastalarda tam remisyon oranı yüksek olmasına rağmen, önemli sayıda hasta üç yıl içinde nüks yaşamaktadır. Bu sorunun üstesinden gelmek için yeni hedeflerin belirlenmesi gerekmektedir. Önceki çalışmamızda, AML hastalarında PSMB8'in yüksek ekspresyon seviyeleri göstermesi ve düşük ekspresyon seviyelerine sahip hastalara kıyasla daha düşük sağkalım oranları ile ilişkilendirilmesi dikkatimizi çekmiştir. Daha önceki çalışmamızda, PSMB8 hedef alınarak sanal ilaç taramaları, ADMET analizi ve ardından Moleküler Dinamik (MD) simülasyonları gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalar sonucunda AML tedavisi için üç potansiyel ilaç adayı belirlenmiştir: Adozelesin, Fiduxosin ve Omipalisib. PI3K/mTOR inhibitörü olarak bilinen Omipalisib, AML gelişiminde PI3K/mTOR yolak proteinlerinin aşırı ekspresyon göstermesi nedeniyle sitotoksitesite analizi için dikkatimizi çekmiştir. Sonraki aşamada, HL60 hücre hattında Omipalisib'in sitotoksitesitesi, PSMB8 inhibitörü olan ONX-0914 ile karşılaştırılmıştır. Bu araştırma, PSMB8'in Akut Myeloid Lösemi için olası bir hedef olabileceğini ve potansiyel bir ilacın hedefli tedavi için kullanılabileceğini gösterdi.

Anahtar Kelimeler: Omipalisib, ONX-0914, AML PI3K/mTOR, PSMB8, Proteazom

I. INTRODUCTION

Acute myeloid leukemia (AML) is a bone marrow disorder stemming from genetic abnormalities in hematopoietic stem cells, leading to malignant clonal expansion of myeloid precursors. While extramedullary manifestations such as myeloid sarcomas and leukemia cutis may occur, the primary pathology involves dysregulated hematopoiesis. In most cases, AML arises from chromosomal aberrations or gene mutations, although the exact mechanism remains unclear. Although some instances have been linked to prior chemotherapy or chemical

exposure, these represent exceptions rather than the predominant cause. Recognizing these genetic mutations is essential for assessing patient risk and guiding appropriate treatment approaches [1].

Acute myeloid leukemia (AML) represents the most common type of acute leukemia among adults, with its incidence rising progressively in older populations. The standard induction chemotherapy regimen, which includes a combination of anthracycline and cytarabine, has been established over the past several decades and remains the primary treatment approach in clinical practice [2]. Whereas at least 85% of identified patients under 60 show a positive response to chemotherapy induction and reach complete remission, a notable proportion relapse within three years [3]. The incorporation of molecularly targeted therapies has led to the use of multidrug regimens in combination with hematopoietic stem cell transplantation (HSCT), achieving a five-year survival rate of approximately 25% among patients [4]. The prognosis of AML is considerably poorer in elderly patients and those who are not fit for standard induction chemotherapy, resulting in a median survival of between 5 and 10 months, with a mere 5% of individuals surviving beyond five years [5]. The classification of acute myeloid leukemia (AML) has evolved from just depending on blast percentage to a broader method that includes cytogenetic and molecular indicators. Diagnosis generally necessitates the presence of more than 20–30% myeloid blasts in the blood or bone marrow or the identification of specific genetic abnormalities. At this point, a comprehensive assessment involving morphology, flow cytometry, and genomic analysis is crucial. The two primary classification systems, WHO and ICC, show slight differences; for instance, ICC requires a minimum of 10% blasts in cases with recurring genetic abnormalities, whereas WHO offers more flexibility. Furthermore, ICC established a category for patients exhibiting 10-19% blasts to expand treatment alternatives. Although there are slight variations, both categorizations highlight the significance of molecular and cytogenetic profiling for precise prognosis and treatment coordination in AML. Acute myeloid leukemia requires immediate diagnosis and frequently arises as an urgent medical condition. Although early symptoms may be nonspecific, patients typically show various indicators associated with immunosuppression, myelosuppression (like severe anemia or thrombocytopenia), and leucocytosis, indicating a potential hematological malignancy [6].

The immunoproteasome enhances protein degradation, generating antigenic peptides that are subsequently presented by major histocompatibility complex class I (MHC-I). The 26S proteasome, responsible for breaking down polyubiquitinated proteins, is composed of a 20S core proteasome coupled with 19S regulatory subunits [7]. The 20S core proteasome is composed of

seven α -type subunits that form a gating mechanism, while its seven β -type subunits serve as the proteolytic active site [8]. The beta type-8 proteasome subunit (PSMB8), known as LMP7 or $\beta 5i$ [9], typically serves as a subunit of the immunoproteasome, activated by TNF- α and IFN- γ [10]. Unlike the conventional proteasome, the immunoproteasome demonstrates enhanced chymotrypsin-like and trypsin-like enzymatic activity, facilitating the production of antigenic peptides for MHC-I presentation [11]. The expression of this immunoproteasome affects cell metabolism, immune regulation, and differentiation. Mutations in PSMB8 have been associated with disorders such as autoinflammation and lipodystrophy in humans, highlighting its function in sustaining dynamic equilibrium [12]. Moreover, PSMB8 inhibits neovascularization in glioma cells through the modulation of the ERK1/2 and PI3K/AKT signaling pathways [13].

Research has established links between the expression of the PSMB8 gene and acute myeloid leukaemia (AML). Analysis of AML datasets highlights a positive correlation between increased PSMB8 levels and the upregulation of galectin-9 (Gal-9), a molecule also highly expressed in AML. This suggests that both play a synergistic role in cellular signaling, survival, and the progression of AML [14]. Another study demonstrated that PSMB8 expression is elevated in AML and strongly correlates with HCP5, a long non-coding RNA found within the HLA Complex P5. Interestingly, silencing HCP5 led to a significant reduction in PSMB8 levels, while its expression remained high in cells with HCP5 overexpression. Furthermore, it appears that the activation of the PI3K/AKT pathway in AML is influenced by HCP5's regulation of PSMB8. Consequently, the activation of PI3K/AKT via PSMB8 in AML is suggested to play a role in driving tumor progression [15]. In addition to these studies, our group have previously conducted an *in silico* analysis concerning PSMB8 in AML for drug repurposing [16]. In our prior research, we explored the essential survival genes within the Cancer Genome Atlas (TCGA) and the LAML (Acute Myeloid Leukemia) dataset using the GEPIA (Gene Expression Profiling Interactive Analysis) tool [17]. Of all the genes associated with survival outcomes, PSMB8 was recognized as a notable candidate in the LAML dataset, drawing from results of earlier studies. With extensive findings, our interest was taken on PSMB8 as a potential target for AML for drug repurposing study [17].

Drug repurposing is among the most commonly employed methods for discovering new uses for medications that have already been approved [18]. This method seeks to significantly reduce both the expenses and duration of research [19]. Drug repurposing initiatives have demonstrated greater efficiency, reduced risk, and cost-effectiveness compared to traditional drug development and discovery methods

[20]. By leveraging repurposed drugs that have already been tested in humans, we gain a more thorough understanding of the drug's pharmacokinetics, pharmacodynamics, dosage, metabolic profiles, molecular pathways, mechanism of action, and a host of other target interactions. As a result, that may reduce the necessity for further research into the pharmacokinetics and toxicity profiles of the medication.

In a previous study conducted by our team, we identified three potential drug candidates for AML treatment: Adozelesin, Fiduxosin, and Omipalisib. Among three drug molecule, various filters have let us with the only available Omipalisib agent which is also a PI3K/mTOR inhibitor that have been found to have strong interactions with PSMB8. Additionally, since the PI3K/mTOR pathway is known to be overly active in AML patients [21], Omipalisib would be well suited to target the PI3K/mTOR pathway as well as being a repurposed drug against PSMB8. On the other side, PSMB8 has known inhibitor molecule as called ONX-0914. In our study, we explored the cytotoxic effects of these drugs on AML cell line HL60 through both individual and combinational treatment approaches. Therefore we have explored for the first time in the literature that PSMB8 could actually be an AML-related novel molecule and it has a potential to be targeted through a drug repurposing approach.

II. MATERIAL AND METHODS

2.1. Cell Growth Conditions

To evaluate the in vitro effectiveness of the drugs, human cell lines were utilized. For this purpose, HL60 cell lines were chosen for testing the selected drugs on AML. HL60 cells were cultured according to standard protocols, using RPMI-1640 medium enriched with 10% Fetal Bovine Serum (FBS) and 1% penicillin/streptomycin, as previously outlined [22].

2.2. MTT Assay

In order to assess cytotoxic effects of ONX-0914 and Omipalisib on the HL60 cell lines, MTT assay was employed. Total number of 1×10^4 cells/well were plated into 96 well plates with various concentrations. After 48 and 72 hours of incubation, MTT reagent with a volume of 20 μ l/well was added to wells and incubated for an additional 4 hours at 37 $^{\circ}$ C. After this period, the supernatants were gently discarded, and DMSO with volume of 100 μ l used to dissolve the leftover formazan crystals. The plates were subsequently incubated for another 30 minutes at 37 $^{\circ}$ C. Ultimately, the optical density (OD) readings were recorded [23].

2.3. Cell Growth Curve

The IC₅₀ values determined for ONX-0914 and Omipalisib were tested against HL60 to determine cytotoxic effects with trypan blue staining. 3×10^5

cells/ml were seeded in 6 well plate and incubated for 72 hours and at 48 and 72th hour, samples collected and counted with trypan blue 3 times/sample. The data was using to creation of growth curve, with and absence of the selected drugs [24].

2.4. Flow Cytometry

To evaluate apoptosis using Flow Cytometry, HL60 cells were grown in a 6-well plate with a concentration of 3×10^5 cells/ml, cells treated with drugs for 48 and 72 hours. Subsequently, 1×10^6 cells were gathered, washed two times with PBS, and the pellet was resuspended in 100 μ l of binding buffer. Subsequently, 5 μ l of Annexin APC was introduced to the binding buffer and pellet mixture, followed by the addition of 10 μ l of PI to the mixture after a 10-minute interval. The mixture was kept at room temperature, in pitch dark conditions, for 15 minutes, after which 400 μ l of binding buffer was added. Flow cytometry was then employed to analyze the stained cell lines [25].

2.5. Western Blot

To evaluate apoptosis, a western blot was conducted by measuring the alterations in the expression of PARP and β -Actin, which served as a control. Cell groups were initially exposed to the specified drug concentrations for 48 and 72 hours. Following treatment, cell pellets were harvested, and protein concentrations were determined using the BSA Protein Assay Kit, in accordance with the provided protocol. For the running procedure, a 10% SDS gel was used. The samples were prepared with 5X Loading buffer featuring 100mM β -Mercaptoethanol (BME), 1% Bromophenol blue, 50% Glycerol, SDS 8%, Tris-Cl (250mM, pH 6.8), and H₂O loaded into each well. The gel inserted into the Biorad western blot system and voltages were set to compete the run. The membrane transfer then was conducted using the Biorad Transblot - Turbo Transfer system. For immunodetection, PARP and β -Actin antibodies were prepared following their established protocols. Finally for chemiluminescent detection, ECL substrate is used to incubate the membrane followed by imaging [26].

2.6 Statistical Analysis

All the statistical analysis were done by using GraphPad Prism software (v10.3.1). All data obtained from cytotoxic assays performed through this study. Data expressed as mean \pm SD and Two-way ANOVA test was applied for multiple comparison. Statistical significance level was accepted as $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ (***) and $p < 0.0001$ (****).

III. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Cytotoxic Impact of ONX-0914 and Omipalisib on the HL60 Cells

Omipalisib was previously discovered through molecular docking and dynamics studies and selected for evaluation on the AML cell line, HL60, in

comparison with ONX-0914 to assess cytotoxic effects. To achieve this, every drug was applied separately to

the HL60 cell line and incubated for 48 and 72 hours, after which analysis was conducted using MTT assays.

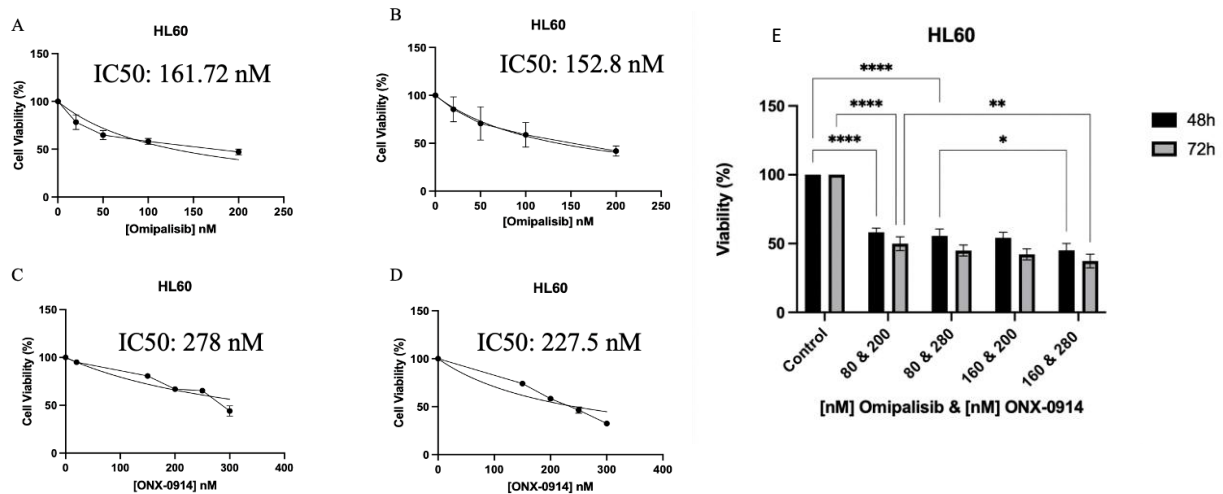


Figure 1. The effects of Omipalisib at 48h (A) and 72h of treatment (B) ONX-0914 at 48h (C) and 72h of treatment (D) on cell viability of HL60 cells. IC50 values were calculated based on MTT assay cell counting measures for each treatment. (E) The effects of combinational treatment of Omipalisib and ONX-0914 at 48 and 72h of treatments on HL60 cells. The viabilities were calculated based on MTT assay cell counting measures for each treatment. Each experiment was conducted as triplicates and error bars represent SD values.

The results showed that, in comparison to ONX-0914, Omipalisib demonstrated greater efficacy, with IC50 values recorded at 161.7nM and 152.8nM for the 48 and 72-hour marks as seen in figure 1A and figure 1B, while IC50 values for ONX-0914 were 277.7nM and 227.5nM as seen in figure 1C and figure 1D.

After administering individual doses of Omipalisib and ONX-0914, combination therapies were implemented. The selected concentrations were 80 nM and 160 nM for Omipalisib, and 200 nM and 280 nM for ONX-0914, based on their IC50 values. Omipalisib had IC50 values of 161 nM and 153 nM, which were very close; therefore, 160 nM was chosen. Additionally, 80 nM was selected to minimize toxicity when combined with ONX-0914. ONX-0914 had IC50 values of 278 nM and 227.5 nM, so 280 nM was chosen for simplicity in calculations, along with 200 nM. Using these concentrations, four distinct combinations were formed: 80nM Omipalisib with 200nM ONX-0914, 160nM Omipalisib with 200nM ONX-0914, 80nM Omipalisib with 280nM ONX-0914, and 160nM Omipalisib with 280nM ONX-0914. Utilizing these concentrations, an MTT assay was conducted over 48 and 72 hours (Figure 1E). Within 48 hours, the sole combination of 160nM Omipalisib and 280nM ONX-0914 reduced viability by 50%, which corresponds to 43.5% viability. Conversely, after 72 hours, the viabilities were found to be 46.5%, 43.3%, 42.2%, and 34.0% respectively. This leads to the most efficient combination of 160nM Omipalisib and 280nM ONX-0914

3.2. Growth Curves Revealed Anti-Proliferative Effects of ONX-0914 and Omipalisib on the HL60 cells

To assess the anti-proliferative effects of Omipalisib and ONX-0914 on HL60 cells, trypan blue cell counting was conducted using specific concentrations for both drugs. Omipalisib was tested at 80 and 160 nM, while ONX-0914 was tested at 200 and 280 nM. Cell counting with trypan blue was performed at 48 and 72 hours for every treatment group, in addition to a control group. In addition to single doses, combination therapies were utilized to assess the antiproliferative impacts of medications on HL60. As shown in Figure 2A, the untreated control group exhibited significant proliferation at both 48 and 72 hours, consistent with the expected growth of HL60 cells under normal conditions. In contrast, cells treated with 80 nM Omipalisib exhibited a noteworthy decrease in proliferation, with further decline observed at 160 nM. This dose-dependent decrease highlights Omipalisib's ability to successfully inhibit cell growth over time.

Similarly, Figure 2B shows the anti-proliferative effects of ONX-0914. The control group again exhibited substantial proliferation, while cells treated with 200nM ONX-0914 displayed reduced growth. The most notable suppression was observed at 280 nM, where cell proliferation was blocked. Notably, the decrease in cell count from 48 to 72 hours in the high concentration group suggests that ONX-0914's efficacy may increase with longer exposure.

In combinational therapies, in most instances, viability diminishes as the concentration of a medication rises. For treatments of 48 hours, the average viable cell counts were computed as 0.35×10^6 cells/ml, 0.28×10^6 cells/ml, 0.31×10^6 cells/ml and 0.16×10^6 cells/ml

based on the established treatment groups. After 72 hours of treatments the viability levels declined to 0.28×10^6 cells/ml, 0.13×10^6 cells/ml, 0.225×10^6 cells/ml and 0.09×10^6 cells/ml as seen in Figure 5.

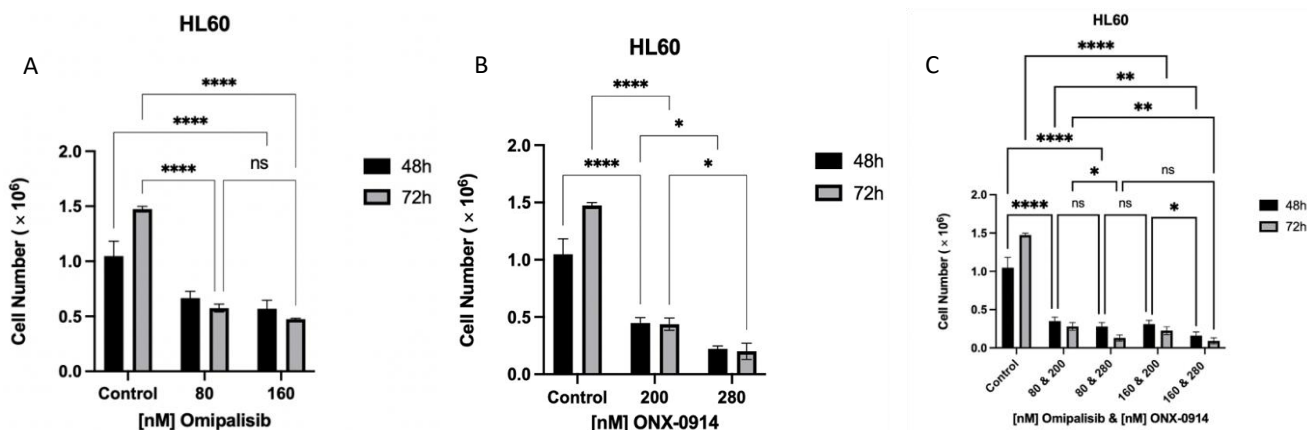


Figure 2. (A) Evaluation of cell viability and proliferation in HL60 cells using Trypan Blue after Omipalisib treatment for 48 and 72h. (B) Evaluation of cell viability and proliferation in HL60 cells using Trypan Blue after ONX-0914 treatment for 48 and 72h. (C) Evaluation of cell viability and proliferation in HL60 cells using Trypan Blue after ONX-0914 and Omipalisib treatment for 48 and 72h. Cell samples were collected at 48 and 72 hours and counted as triplicates. Error bars represent the SD values

In summary, both Omipalisib and ONX-0914 demonstrated dose- and time-dependent actions that reduce the proliferation of HL60 cells. Nevertheless, increased doses of ONX-0914 led to a more significant reduction in cell viabilities than Omipalisib. These findings support the potential therapeutic applications of these drugs in targeting myeloid leukemia cells.

3.3. Flow Cytometry Revealed the Induced Apoptosis in Response to ONX-0914 and Omipalisib Treatment on HL60 cells

To assess the apoptotic effects of the chosen drug, Omipalisib, the Annexin/PI staining technique was utilized. The experiment spanned 72 hours, with measurements gathered at the 48th and 72nd hour intervals using a flow cytometer. Throughout the study, HL60 cells received individual treatments of 80nM and 160nM Omipalisib at specified time intervals. As a positive control, HL60 cells were exposed to 100nM doxorubicin. Annexin/PI staining demonstrated that doses of 80 nM and 160 nM of Omipalisib as shown in Figure 3 led to a steady rise in apoptosis. Additionally, these results validated the consistency of the doses established via the MTT assay. Omipalisib induced a time-dependent increase in apoptosis, with no significant difference between 80 nM and 160 nM at 48 hours, but a significant apoptotic increase at 160 nM by 72 hours ($p < 0.05$). This suggests that Omipalisib's pro-apoptotic effect intensifies over time rather than being purely dose-dependent.

To compare Omipalisib and evaluate the effect of PSMB8 inhibition on cell viability, ONX-0914 was

chosen for treatment at concentrations of 200nM and 280nM. The study was carried out over 72 hours, with data gathered at the 48th and 72nd hour marks using a flow cytometer as seen in Figure 4.

ONX-0914 induced dose- and time-dependent apoptosis, with 200 nM significantly increasing apoptosis compared to the control, and 280 nM leading to an even greater effect ($p < 0.0001$). The difference between 200 nM and 280 nM was significant at both 48 and 72 hours, confirming that higher ONX concentrations further enhance apoptosis as seen in Figure 4.

Ultimately, the combinations identified previously were employed to identify apoptotic cell populations following treatments for 48 and 72 hours. Combination therapy with 80 nM Omi & 200 nM ONX and 160 nM Omi & 200 nM ONX led to significant increases in apoptosis, with stronger effects observed at 72 hours. The most potent combinations were 80 nM Omi & 280 nM ONX and 160 nM Omi & 280 nM ONX, where apoptosis levels approached 70-77%, indicating a synergistic effect of the higher ONX concentration as seen in Figure 5.

In conclusion, either single or combined use of Omipalisib and ONX-0914 can be proposed to use in the treatment of AML. The findings indicate that blocking PSMB8 may serve as a viable treatment option for AML. Combined therapies demonstrate heightened toxicity across all groups, achieving peak levels of apoptosis during the treatment process.

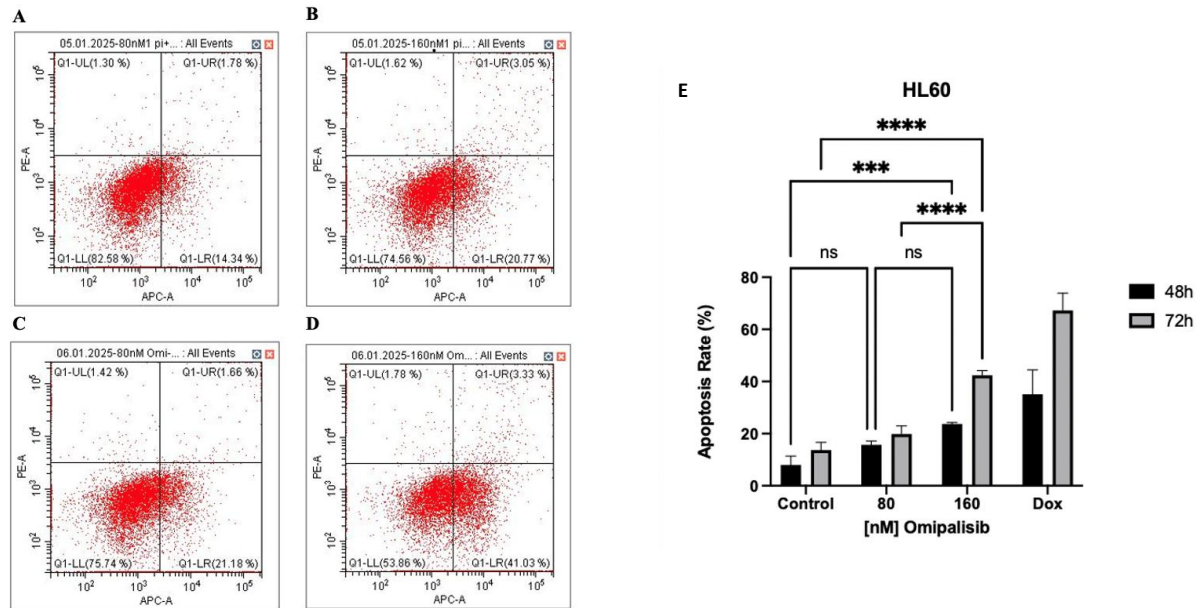


Figure 3. Flow cytometry analysis of apoptosis in HL60 cells treated with Omipalisib. Cells were treated with 80 nM and 160 nM Omipalisib for 48 or 72 hours, followed by Annexin V/PI staining A) 80nM Omipalisib for 48 hr, B) 160nM Omipalisib for 48 hr, C) 80nM Omipalisib for 72 hr, D) 160nM Omipalisib for 72 hr. The quadrants denote distinct cell populations: Q1-UL (necrotic cells), Q1-UR (late apoptotic cells), Q1-LL (live cells), and Q1-LR (early apoptotic cells). E) Apoptosis analysis of HL60 cells treated with Omipalisib for 48 and 72 hours, assessed by flow cytometry. Apoptotic cell percentages were determined using annexin V/PI staining. The data represent the mean \pm standard deviation (SD) from three independent experiments, with error bars denoting the standard deviation.

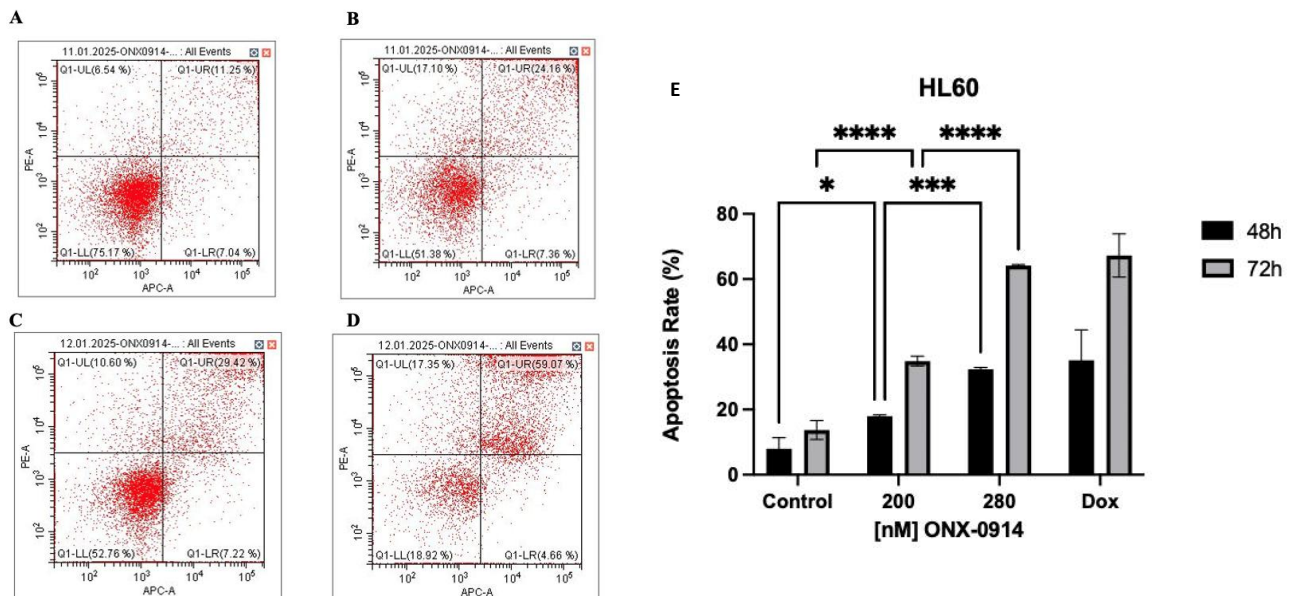


Figure 4. Flow cytometry analysis of apoptosis in HL60 cells treated with ONX-0914. Cells were treated with 200 nM and 280 nM Omipalisib for 48 or 72 hours, followed by Annexin V/PI staining A) 200nM ONX-0914 for 48 hr, B) 280 nM ONX-0914 for 48 hr, C) 200nM ONX-0914 for 72 hr, D) 280nM ONX-0914 for 72 hr. The quadrants denote distinct cell populations: Q1-UL (necrotic cells), Q1-UR (late apoptotic cells), Q1-LL (live cells), and Q1-LR (early apoptotic cells). E) Apoptosis analysis of HL60 cells treated with ONX-0914 for 48 and 72 hours, assessed by flow cytometry. Apoptotic cell percentages determined using annexin V/PI staining. Data represent the mean \pm standard deviation (SD) from three independent experiments. Error bars indicate standard deviation.

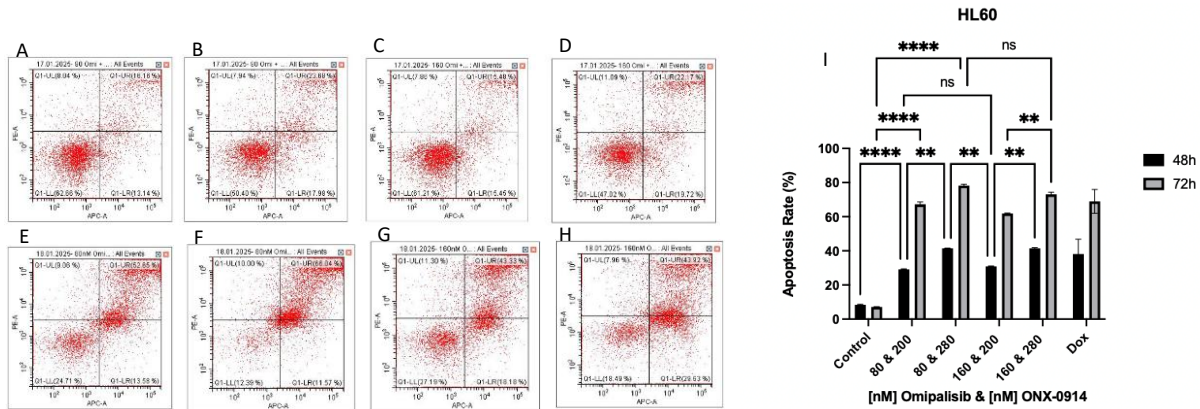


Figure 5. Flow cytometry analysis of apoptosis in HL60 cells treated with Omipalisib and ONX-0914 in combination. Cells treated with 200 and 280 nM Omipalisib for 48 hours, followed by Annexin V/PI staining A) 80nM Omipalisib & 200 nM ONX-0914, B) 80nM Omipalisib & 280 nM ONX-0914, C) 160nM Omipalisib & 200 nM ONX-0914, D) 160 Omipalisib & 280 nM ONX-0914. Flow cytometry analysis of apoptosis in HL60 cells treated with Omipalisib and ONX-0914 in combination. Cells treated with 200 and 280 nM Omipalisib for 72 hours, followed by Annexin V/PI staining E) 80nM Omipalisib & 200 nM ONX-0914, F) 80nM Omipalisib & 280 nM ONX-0914, G) 160nM Omipalisib & 200 nM ONX-0914, H) 160 Omipalisib & 280 nM ONX-0914. Apoptosis analysis of HL60 cells treated with Omipalisib and ONX-0914 for 48 and 72 hours, assessed by flow cytometry. Apoptotic cell percentages were determined using annexin V/PI staining. The data represent the mean ± standard deviation (SD) from three independent experiments, with error bars denoting the standard deviation.

3.4 Western Blotting determines the Apoptotic Marker, Cleaved PARP Protein, on ONX-0914 and Omipalisib Treated HL60 Cells

In earlier chapters, we noted that both individual and combined therapies led to cell death in HL60 cells. Specifically, after assessing the percentage of apoptotic cells using flow cytometry, we intended to analyze the levels of cleaved PARP during apoptosis, along with β-actin as a loading control, concentrating on alterations noted during individual treatments. PARP-1 is generally present in a cell; however, it was observed that PARP-1 becomes cleaved by caspase-3 when cells go through apoptosis [27]. In this assay, the primary objective was to identify cells undergoing apoptosis because of PARP-1 for the single treatment at 48 hours.

The western blot analysis indicated that control cells do not exhibit any cleaved PARP-1; Doxorubicin was chosen as a positive control, resulting in a certain cell death. Doxorubicin revealed strong bands for cleaved PARP-1 in western blot analysis. At both concentrations of ONX-0914 (200nM and 280nM), cleaved PARP-1 was observed, and the band intensity increased with elevated concentrations of this agent. Additionally, PARP-1 cleavage was also observed, although not that significant with Omipalisib treatment at both 80nM and 160nM concentrations which suggests additional mechanisms being involved when cells undergo apoptosis by Omipalisib treatment (Figure 6).

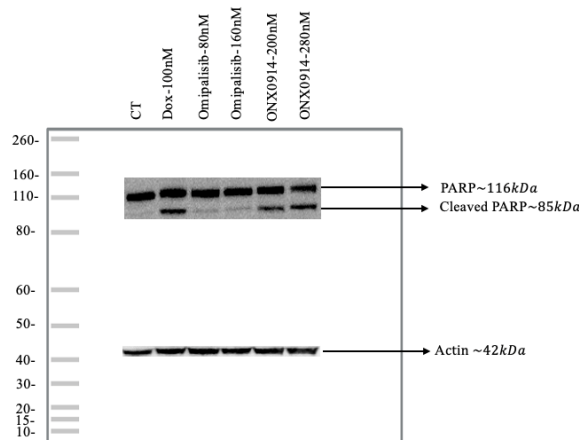


Figure 6. Apoptosis marker protein, cleaved Parp, detection assessed via western blot. HL60 cells treated with Omipalisib or ONX-0914 for 48 hours. Doxorubicin selected as positive control. The experiments repeated three times.

IV. CONCLUSION

In this study, we examined PSMB8 as a potential therapeutic target for Acute Myeloid Leukemia (AML) and assessed the possible efficacy of Omipalisib and ONX-0914 as treatment options. Our findings from *in silico* studies previously showed that PSMB8 is significantly overexpressed in AML patients and correlates with poorer survival outcomes, emphasizing its promise as a new target for drug development. Through *in silico* drug repurposing, we identified Omipalisib, a PI3K/mTOR inhibitor, as a promising candidate for AML treatment. Our *in vitro* analyses revealed that Omipalisib and ONX-0914 exert cytotoxic and pro-apoptotic effects on HL60 cells, with their impact varying according to concentration and exposure duration. Furthermore, combination therapy enhanced cell death more effectively than individual therapies, suggesting a synergistic effect that may help overcome drug resistance in aggressive AML subtypes. These findings lay a solid groundwork for future research on targeting PSMB8 in AML and highlight the importance of further preclinical and clinical evaluations to confirm the therapeutic potential of these inhibitors, particularly in more aggressive AML subtypes, such as those with FLT3 mutations and other chromosomal abnormalities.

ACKNOWLEDGEMENT

This study is completed as a part of Master Thesis submitted to İzmir University of Economics, Graduate School, Master's Program in Bioengineering by Onur Ateş in 2025. The authors thank TUBITAK ULAKBIM, High Performance and Grid Computing Center (TRUBA resources) for the calculations by their computational resources used to led this study.

REFERENCES

- [1] Pelcovits, A., & Niroula, R. (2020). Acute Myeloid Leukemia: A Review. *103*(3), 38-40.
- [2] Kishtagari, A., Levine, R. L., & Viny, A. D. (2020). Driver mutations in acute myeloid leukemia. *27*(2), 49-57.
- [3] Döhner, H., Weisdorf, D. J., & Bloomfield, C. D. (2015). Acute Myeloid Leukemia. *The New England Journal of Medicine*, *373*(12), 1136–1152.
- [4] Vosberg, S., & Greif, P. A. (2019). Clonal evolution of acute myeloid leukemia from diagnosis to relapse. *Genes, Chromosomes & Cancer*, *58*(12), 839–849.
- [5] Xu, J., & Niu, T. (2020). Natural killer cell-based immunotherapy for acute myeloid leukemia. *Journal of Hematology & Oncology* *2020* *13*:1, *13*(1), 1–20.
- [6] DiNardo, C. D., Erba, H. P., Freeman, S. D., & Wei, A. H. (2023). Acute myeloid leukaemia. *The Lancet*, *401*(10393), 2073–2086.
- [7] Kloetzel, P. M. (2001). Antigen processing by the proteasome. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *2*(3), 179–187.
- [8] Murata, S., Yashiroda, H., & Tanaka, K. (2009). Molecular mechanisms of proteasome assembly. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *10*(2), 104–115.
- [9] Rivett, A. J., & Hearn, A. R. (2004). Proteasome function in antigen presentation: immunoproteasome complexes, Peptide production, and interactions with viral proteins. *Current Protein & Peptide Science*, *5*(3), 153–161.
- [10] Kimura, H., Caturegli, P., Takahashi, M., & Suzuki, K. (2015). New Insights into the Function of the Immunoproteasome in Immune and Nonimmune Cells. *Journal of Immunology Research*, 2015.
- [11] Lai, C., Doucette, K., & Norsworthy, K. (2019). Recent drug approvals for acute myeloid leukemia. *Journal of Hematology and Oncology*, *12*(1), 1–20.
- [12] Agarwal, A. K., Xing, C., Demartino, G. N., Mizrachi, D., Hernandez, M. D., Sousa, A. B., Martínez De Villarreal, L., Dos Santos, H. G., & Garg, A. (2010). PSMB8 Encoding the $\beta 5i$ Proteasome Subunit Is Mutated in Joint Contractures, Muscle Atrophy, Microcytic Anemia, and Panniculitis-Induced Lipodystrophy Syndrome. *American Journal of Human Genetics*, *87*(6), 866.
- [13] Chang, H. H., Cheng, Y. C., Tsai, W. C., & Chen, Y. (2020). PSMB8 inhibition decreases tumor angiogenesis in glioblastoma through vascular endothelial growth factor A reduction. *Cancer Science*, *111*(11), 4142–4153.
- [14] Zhang, Y., Xue, S., Hao, Q., Liu, F., Huang, W., & Wang, J. (2021). Galectin-9 and PSMB8 overexpression predict unfavorable prognosis in patients with AML. *Journal of Cancer*, *12*(14), 4257–4263.
- [15] Lei, M., Jingjing, Z., Tao, J., Jianping, M., Yuanxin, Z., Jifeng, W., Lianguo, X., Lidong, Z., & Ying, W. (2020). LncRNA HCP5 promotes LAML progression via PSMB8-mediated PI3K/AKT pathway activation. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, *393*(6), 1025–1032.
- [16] Tükel, E. Y., Ateş, O., & Kiraz, Y. (2024). *In Silico Drug Repurposing Against PSMB8 as a Potential Target for Acute Myeloid Leukemia Treatment*. *Molecular Biotechnology*, 1–11.
- [17] Tang, Z., Li, C., Kang, B., Gao, G., Li, C., & Zhang, Z. (2017). GEPIA: a web server for cancer and normal gene expression profiling and interactive analyses. *Nucleic Acids Research*, *45*(W1), W98–W102.
- [18] Corsello, S. M., Bittker, J. A., Liu, Z., Gould, J., McCarren, P., Hirschman, J. E., Johnston, S. E., Vrcic, A., Wong, B., Khan, M., Asiedu, J., Narayan, R., Mader, C. C., Subramanian, A., & Golub, T. R. (2017). The Drug Repurposing Hub: a next-generation drug library and information resource. *Nature Medicine*, *23*(4), 405–408.

- [19] Sleire, L., Førde-Tislevoll, H. E., Netland, I. A., Leiss, L., Skeie, B. S., & Enger, P. Ø. (2017). Drug repurposing in cancer. *Pharmacological Research*, 124, 74–91.
- [20] Xue, H., Li, J., Xie, H., & Wang, Y. (2018). Review of Drug Repositioning Approaches and Resources. *International Journal of Biological Sciences*, 14(10), 1232.
- [21] Darici, S., Alkhaldi, H., Horne, G., Jørgensen, H. G., Marmiroli, S., & Huang, X. (2020). Targeting PI3K/Akt/mTOR in AML: Rationale and Clinical Evidence. *Journal of Clinical Medicine*, 9(9), 2934.
- [22] Maciej Serda, Becker, F. G., Cleary, M., Team, R. M., Holtermann, H., The, D., Agenda, N., Science, P., Sk, S. K., Hinnebusch, R., Hinnebusch A, R., Rabinovich, I., Olmert, Y., Uld, D. Q. G. L. Q., Ri, W. K. H. U., Lq, V., Frxqw, W. K. H., Zklfk, E., Edvhg, L. V. (2012). Enalapril-induced Apoptosis of Acute Promyelocytic Leukaemia Cells Involves STAT5A. *ANTICANCER RESEARCH*, 32(7), 343–354.
- [23] Fan, Y., Chiu, J. F., Liu, J., Deng, Y., Xu, C., Zhang, J., & Li, G. (2018). Resveratrol induces autophagy-dependent apoptosis in HL-60 cells. *BMC Cancer*, 18(1), 1–10
- [24] Jenkins, T. W., Downey-Kopyscinski, S. L., Fields, J. L., Rahme, G. J., Colley, W. C., Israel, M. A., Maksimenko, A. V., Fiering, S. N., & Kisselev, A. F. (2021). Activity of immunoproteasome inhibitor ONX-0914 in acute lymphoblastic leukemia expressing MLL–AF4 fusion protein. *Scientific Reports*, 11(1), 10883.
- [25] Lakshmanan, I., & Batra, S. K. (2013). Protocol for Apoptosis Assay by Flow Cytometry Using Annexin V Staining Method. *Bio-Protocol*, 3(6), e374.
- [26] Petsri, K., Yokoya, M., Tungsukruthai, S., Rungrotmongkol, T., Nutho, B., Vinayanuwattikun, C., Saito, N., Takehiro, M., Sato, R., & Chanvorachote, P. (2020). Structure–Activity Relationships and Molecular Docking Analysis of Mcl-1 Targeting Renieramycin T Analogues in Patient-derived Lung Cancer Cells. *Cancers*, 12(4), 875
- [27] Ordueri, N. E. G., Elgün, T., Şahin, P., Kuşcu, N., & Özenci, Ç. Ç. (2018). Postnatal fare testis gelişiminde kaspaz-bağımlı ve kaspaz-bağımsız apoptozun değerlendirilmesi. *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 44(2), 103–109.

Mikroakışkan Temelli Floresans Mikroskop Sistemi ile Otofloresan Flavin Koenzimlerinin Fotofiziksel Geçişleri Üzerine Nümerik Modelleme Çalışmaları

Numerical Modeling Studies on Photophysical Transitions of Autofluorescent Flavin Coenzymes with A Microfluidic-based Fluorescence Microscope System

Selim Can DİRİCAN¹, Bahar TEZCAN², Süleyman Yiğit DÖLEK³, Barış DEMİRBAŞ⁴

¹Makine Mühendisliği Bölümü, Mühendislik Fakültesi, Özyeğin Üniversitesi, İstanbul, Türkiye

²Bilgisayar Mühendisliği Bölümü, Mühendislik Fakültesi, Özyeğin Üniversitesi, İstanbul, Türkiye

³Elektrik-Elektronik Mühendisliği Bölümü, Mühendislik Fakültesi, Özyeğin Üniversitesi, İstanbul, Türkiye

⁴Mühendislik Temel Bilimleri Bölümü, Mühendislik Fakültesi, Özyeğin Üniversitesi, İstanbul, Türkiye

Öz

Bu araştırmada ışığa ve çözücü ortamına oldukça hassas, çok küçük uyarım kesit alanına sahip ve zayıf floresan ışımaya yapabildiği flavin mononükleotit (FMN) ve flavin adenin dinükleotit (FAD) koenzimlerinin fotofiziksel geçişlerini çözümü kapasitesine sahip mikroakışkan temelli bir floresans mikroskop sistemi için nümerik modelleme çalışmaları sunulmuştur. FMN ve FAD'nin moleküler yapısı, fotofiziksel özellikleri ve girdikleri kimyasal reaksiyonlar dikkate alınarak her iki molekül için farklı fotofiziksel modeller kullanılmıştır. Bu modellerde yer alan elektronik durumlar 1. mertebeden lineer diferansiyel denklem sistemi olarak ele alınmış olup her bir elektronik durum popülasyonu zamana bağlı olarak çözülmüş, mikroakışkan çip ile lazer uyarım alanının geometrik boyutları ve mikroskop parametreleri kullanılarak görüntü ve sinyal verisi olarak elde edilmiştir. İki farklı akış hızında lazer uyarım şiddeti, çözücüye eklenen etanol, askorbat ve triptofan gibi redoks ajanlarının normalize floresan sinyaline ve elektronik durum popülasyonlarına olan etkisi simüle edilmiştir. Sinyal ve elektronik durum analizlerine ek olarak sinyallerin oluşturulmasında kullanılan sCMOS görüntü verileri farklı deneysel koşullar için simüle edilmiş ve lazer uyarım alanıyla kıyaslanmıştır. Araştırmada önerilen yöntem farklı akış hızlarında farklı karanlık durum popülasyonlarının birbirinden ayırt edilebilirliğini ve farklı deneysel koşullarda değişen karanlık durumların normalize floresan sinyaline ve kamera görüntülerine olan etkisini çözümü kapasitesine sahip olduğunu göstermiştir. Mevcut yöntemlerle kıyaslandığında, elde edilen sayısal bulgular, çalışmada sunulan yöntemin flavin foto-bozunumunu büyük ölçüde önleyebilme potansiyelini ispatlamıştır ve farklı moleküllerin fotofiziksel özelliklerinin hangi koşullarda gözlemlenebileceği ile ilgili optimizasyon çalışmalarının yapılmasına olanak sağlamaktadır.

Anahtar Kelimeler: Flavin mononükleotit, flavin adenin dinükleotit, fotofizik, floresans spektroskopisi ve mikroskopu, elektronik durum modeli, nümerik simülasyon.

Abstract

In this research, numerical modeling studies are presented for a microfluidic-based fluorescence microscope system capable of resolving photophysical transitions of flavin mononucleotide (FMN) and flavin adenine dinucleotide (FAD) coenzymes that are very sensitive to light and solvent environment, have very small excitation cross-section and weak fluorescence. Different photophysical models were used for both molecules considering the molecular structure, photophysical properties and chemical reactions of FMN and FAD. The electronic states in these models were considered as a first order linear differential equation system and each electronic state population was solved in time, and image and signal data were obtained using the geometric dimensions of the laser excitation area and microscope parameters with the microfluidic chip. The laser excitation intensity at two different flow rates and the effects of redox agents such as ethanol, ascorbate and tryptophan added to the solvent on the normalized fluorescence signal and electronic state populations were simulated. In addition to signal and electronic state analyses, sCMOS image data used in generating the signals were simulated for different experimental conditions and compared with the laser excitation field. The method proposed in the study showed that it has the capacity to distinguish different dark state populations from each other at different flow rates and to resolve the effect of different dark states on normalized fluorescence signals and camera images under different experimental conditions. When compared with existing methods, the numerical findings demonstrate the potential of the method presented in the study to prevent flavin photodegradation to a large extent and enable optimization studies to be conducted regarding the conditions under which photophysical properties of different molecules can be observed.

Keywords: Flavin mononucleotide, flavin adenine dinucleotide, photophysics, fluorescence spectroscopy and microscopy, electronic state model, numerical simulation.

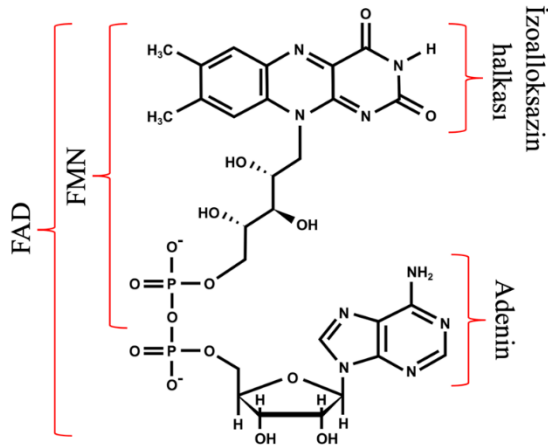
I. GİRİŞ

Biyolojik araştırmalarda floresans temelli yöntemler özellikle son on yıl içinde yüksek çözünürlüklü mikroskopların geliştirilmesi ve hedef moleküllere konjuge edilebilen akıllı floresan işaretleyicilerin (florofor) ortaya çıkmasıyla birlikte büyük bir önem kazanmıştır [1, 2]. Hücrelerde yer alan spesifik organel, vezikül, ekzozom, protein veya ribonükleik asit (RNA) gibi makro boyutlu molekülleri işaretleyebilen ve lazer uyarımı altında floresan ışına yapabilen floroforlar, yüksek çözünürlüklü floresans mikroskoplarda dedektör olarak kullanılan CCD veya sCMOS kameralar yardımıyla lokalize edilebilmektedir [3]. Özellikle de floresans temelli biyolojik görüntüleme alanında kullanılan floroforların yüksek şiddeteki lazer uyarımlarına karşı dayanıklı olması ve yüksek uyarım kesit alanına ($\sigma_{exc} \sim 10^{-16} \text{ cm}^2$) sahip olmaları tercih edilir [4]. Bu tip işaretleyici floresan moleküller genellikle düşük lazer uyarımlarında bile yüksek parlaklık değerlerinde ışına yapmaktadır ve rodamin bazlı floroforlar bu sınıfa örnek olarak verilebilir. Düşük uyarım kesit alanına ($\sigma_{exc} \sim 10^{-17} \text{ cm}^2$) sahip ve aynı zamanda Keratakonus gibi göz rahatsızlıklarında çapraz bağlayıcı malzeme olarak kullanılan flavin gibi otofloresan koenzim moleküller ise oldukça zayıf ışına yaptıklarından dolayı bu tip moleküllerde optimal seviyede foton emisyonunun elde edilebilmesi için daha yüksek lazer uyarımına ihtiyaç duyulmaktadır [5-8]. Ancak bu tip zayıf moleküllerde yüksek uyarım şiddetlerinin kullanılması ışıkla ağartma (photobleaching) reaksiyonuna, yani kullanılan floroforların kalıcı olarak floresans ışına yapamayacak şekilde fotokimyasal bozunumuna sebep olmaktadır. Görüntüleme yüksek dozda ışık şiddetinin özellikle hayvan hücresi gibi yaşamsal faaliyetler gösteren ortamlarda uygulanması hücre içinde flavin ve benzeri koenzimlerin bozunumuna ve fototoksisiteye neden olmaktadır [9]. Bu tür, dışarıdan ekstra bir moleküle işaretlenmeye ihtiyacı olmayan otofloresan koenzimler optimal dozlarda uygulanan uyarım şiddeti ile fotokimyasal bozunuma uğramadan ışına yapma kapasitesine sahiptir. Ancak düşük veya ortalama dozlarda uygulanan lazer uyarım şiddetlerinde bu moleküllerden zayıf floresans ışına sinyali elde edilir ve görüntüleme çalışmalarında düşük sinyal gürültüye neden olmaktadır. Lazer uyarım şiddetindeki kademeli artış, moleküllerdeki floresans ışımının saturasyon seviyesine ulaşması sonrasında ölçülen floresans sinyalinde artış yerine kısa süre içinde azalmalar görülebilmektedir. Sinyallerde görülen bu zayıflamanın sebebi başlangıçta yalnızca ışığın ağartma reaksiyonu gibi düşünülse de sürekli uyarım kesildikten kısa bir süre sonra bu moleküller yeni bir lazer uyarımı ile tekrar uyarıldıklarında başlangıçtaki benzer şiddette ışına yapabilmektedirler. Sürekli

uyarım altında floresans sinyalinin azalmasının temel sebeplerinden biri floresan molekülün uyarılmış singlet halinde yer alan elektronların kuantum mekaniksel olarak yasaklı olan üçlü (triplet) duruma geçişleri veya triplet halden redoks reaksiyonlarının gerçekleştiği radikal durumlara geçişlerinden kaynaklanmaktadır [10, 11]. Uyarılmış singlet durumdan triplet veya redoks gibi floresans ışımaya göre daha uzun ömürlü olan bu durumlar arasındaki elektronik geçişler, esasında floroforların bulunduğu hücre veya bir çözelti içinde gözden kaçan biyokimyasal mekanizmalar ve moleküller arası etkileşimler hakkında oldukça önemli bilgi taşımaktadır. Genellikle nanosaniyeler içinde gerçekleşen floresans ışımaya kıyasla mikrosaniyeler (μs) ve milisaniyeler (ms) içinde oluşan bu elektronik durumlar karanlık hal olarak tanımlanmaktadır [12]. Deney ortamındaki oksijen konsantrasyonu [13], çözücünün viskozitesi [14], ortamda veya molekül yapısında yer alan ağır atomlar [15, 16], polarite [17], floresan molekülün konformasyonel değişimi [18-20], foto-redüksiyon [21] ve foto-oksidasyon [22] gibi redoks reaksiyonları floroforların karanlık elektronik durum popülasyonlarını etkileyen önemli faktörlerdir. Sürekli lazer uyarımı altında bu tür fotofiziksel fenomenlerin gerçekleşmesi durumunda ölçülen floresans sinyalinde zayıflama görülmesi kaçınılmazdır.

Floresan moleküllerin karanlık elektronik durum popülasyonlarını kantitatif olarak ölçmek amacıyla geliştirilmiş iki önemli yöntem mevcuttur. Bu yöntemlerden birincisi 1972'de ilk kez Madge, Elson ve Webb tarafından ortaya atılan, floroforların konsantrasyonunu, difüzyonunu, triplet durum popülasyonunu ve moleküllerdeki protonasyonu ölçebilen floresans korelasyon spektroskopisidir (FCS) [23, 24]. Biyofizikte analitik bir metot olarak kullanılan FCS, konfokal mikroskop, sürekli lazer uyarımı ve fotodedektörlerden oluşan kompleks bir sistemdir [25, 26]. Bu yöntem mikroskop objektifinde femtolitre büyüklüğünde elipsoit şekilli bir algılama hacmi içine difüzyonla rastgelen giren moleküllerden floresans ışımaya yayılan fotonları zamana bağlı olarak ölçmektedir [27]. Aynı tip 2 dedektör tarafından belirli bir süre eş zamanlı olarak kaydedilen foton sayıları birbiri ile korele edilerek logaritmik zamana göre değişen korelasyon eğrisi elde edilir. Korelasyon eğrileri birkaç μs içinde gerçekleşen protonasyon ve triplet geçişleri hakkında bilgi verirken, ms skalasında floresan moleküllerin difüzyon süreleri kantitatif olarak tayin edilebilmektedir. FCS yönteminde moleküllerin lazerle uyarıldığı algılama hacminin boyutu oldukça küçük ($\sim 10^{-15} \text{ L}$) olduğu için genellikle nanomolar (nM) çözelti konsantrasyonu kullanılmaktadır [28]. Bu tür düşük konsantrasyonlu florofor çözeltilerindeki

floresan molekül sayısı tek molekül seviyesinde olduğundan, yeterli miktarda foton, yani floresans sinyali elde edebilmek için seçilen floroforların yüksek parlaklık değerlerine sahip olması gerekmektedir [29]. Düşük parlaklık ve küçük uyarım kesit alanına sahip floresan moleküllerde çok yüksek seviyede lazer uyarımları kullanılarak FCS sinyali artırılabilir ancak bu durum kullanılan moleküllerin fotokimyasal bozunumuna doğrudan sebep olmaktadır. Bu nedenle flavin gibi otofloresan moleküllerin fotofiziksel özellikleri ve karanlık durumlara geçişleri, FCS gibi tek molekül algılama temelli spektroskopik bir yöntem ile doğru bir biçimde tayin edilemez.

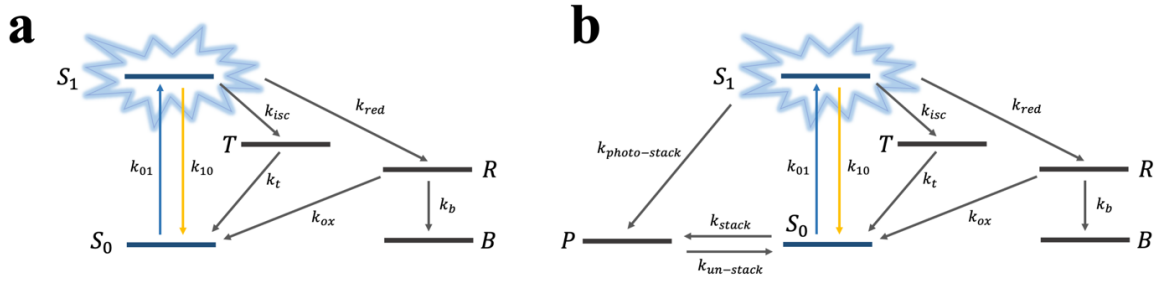


Şekil 1. FMN ve FAD moleküllerinin kimyasal yapısı

Floroforların hem karanlık hal popülasyonlarını ölçebilmek hem de zayıf floresan ışımaya sahip molekülleri ideal lazer uyarımlarında hasar vermeden görüntülemek amacıyla Widengren ve arkadaşları TRAST adını verdikleri floresans temelli spektroskopik bir yöntem geliştirmişlerdir [30, 31]. TRAST spektroskopisi mikroskop objektifi üzerinde konfokal uyarıma alternatif olarak geniş uyarım alanı da sağlamakta olup, yüksek konsantrasyonlarda florofor çözeltilerinin kullanılabilmesine olanak sağlamaktadır [32]. Moleküllerin lazerle uyarılmasında geniş uyarım alanı kullanıldığında lazer şiddetinin ortalama etkisi daha düşük olduğundan moleküllerin fotokimyasal bozunumu yüksek ölçüde önlenmektedir. TRAST spektroskopisi yöntem olarak 100 ns ve 10 ms zaman aralığında rastgele seçilen, kesikli (pulsed) lazer uyarımlarına karşı moleküllerden yayılan floresans sinyalini ölçmekte olup ölçülen bu değerleri logaritmik zamana göre değişen grafik verisi olarak vermektedir [33]. Normalize edilmiş floresans sinyal değerlerinin zamana göre değişimlerine bakarak triplet, protonasyon, redoks veya trans-cis durum popülasyonlarına ait fotofiziksel geçiş hızları tayin edilebilmektedir [34]. Bu yöntem aynı zamanda hücrelerde floresan moleküllerle işaretlenmiş olan

organel veya makromoleküllerin fotofiziksel özelliklerini de inceleyebilmektedir. Ancak immunoışaretlenmiş (immunostained) hücreler petri kabında veya lamel üzerine sabitlendiği için ve ölçümler sırasında aynı hedef moleküller tekrar ışıkla uyarılacağı için hem işaretleyici moleküllerde hem de otofloresan flavinlerde fotokimyasal bozunuma sebebiyet vermektedir. Işıkla ağartmadan kaynaklanan fotokimyasal bozunum, Şekil 1'de kimyasal yapısı verilen, ölçümler sırasında çözücü içinde serbest Brownian hareketi yapan flavin mononükleotit (FMN) ve flavin adenin dinükleotit (FAD) molekülleri için TRAST spektroskopisi kullanılarak deneysel olarak kanıtlanmıştır [35]. Bu nedenle zayıf ışımaya yapan ve ışığa hassas olan bu tür moleküllerin karanlık hal geçişlerini çalışabilmek için yeni nesil spektroskopik yöntemlerin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

Bu makalede, bahsedilen problemleri çözümlenebilen ve mevcut spektroskopik yöntemlere alternatif olarak kullanılacak mikroakışkan temelli, geniş alan uyarımlı bir floresans mikroskop tasarımı geliştirilmiş; bu sistemin flavin fotofiziği için uygulaması nümerik simülasyon sonuçları ile sunulmuştur. Önerilen spektroskopik tasarımda amaç floroforların elektronik geçiş parametrelerini, mikroakışkan çipin geometrisini ve ayrıca geniş alan mikroskobunun optik parametrelerini kullanarak normalize floresans sinyallerini simüle etmek ve floroforların karanlık durum popülasyonlarını kantitatif olarak belirleyebilmektir. Bu sayede ışığa duyarlı, zayıf moleküller deneysel olarak mikroskopta ölçülmeden önce, nümerik simülasyonlar yapılarak özellikle deneysel çalışan araştırmacılara yapılması planlanan deneylerle ilgili optimizasyon imkânı ve ölçümlerle ilgili öngörü sağlayacaktır. Nümerik simülasyonlarla sunulan bu tasarımın iki önemli deneysel avantajı olacaktır. Bunlardan birincisi, mikroakışkan çip içinde sabit akış hızıyla hareket ederek uyarım alanından geçen floroforların floresans sinyali bir sCMOS kamera yardımıyla kaydedilerek çok sayıda görüntü verisi elde edilecek ve bu nedenle küçük uyarım kesit alanına sahip otofloresan moleküller için yeterli foton istatistiği sağlayacaktır. İkinci avantaj olarak ise; floresan moleküller lazer uyarım alanından yalnızca bir kez geçeceği için kullanılan lazerin her bir molekülü ağartma riski önemli derecede azaltılacak olup bu yöntem ile elde edilen sinyaller daha güvenilir fotofiziksel analizler sağlayacaktır. Önerilen yöntemin başarısını ispatlamak amacıyla, foto-fiziksel modelleri ve karanlık hal geçiş parametreleri raporlanmış FMN ve FAD molekülleri için çeşitli nümerik simülasyonlar yapılmıştır. Bu moleküller için kullanılan foto-fiziksel



Şekil 2. (a) FMN ve (b) FAD molekülünün elektronik durum (fotofizik) modeli.

modellere ilişkin ayrıntılar, seçilen deneysel parametreler ve nümerik simülasyonlarla karanlık duruma geçişlerin hangi ideal koşullarda gözlemlenebileceği sırasıyla aşağıdaki başlıklarda verilmiştir.

II. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. FMN ve FAD İçin Elektronik Durum (Fotofizik) Modelleri

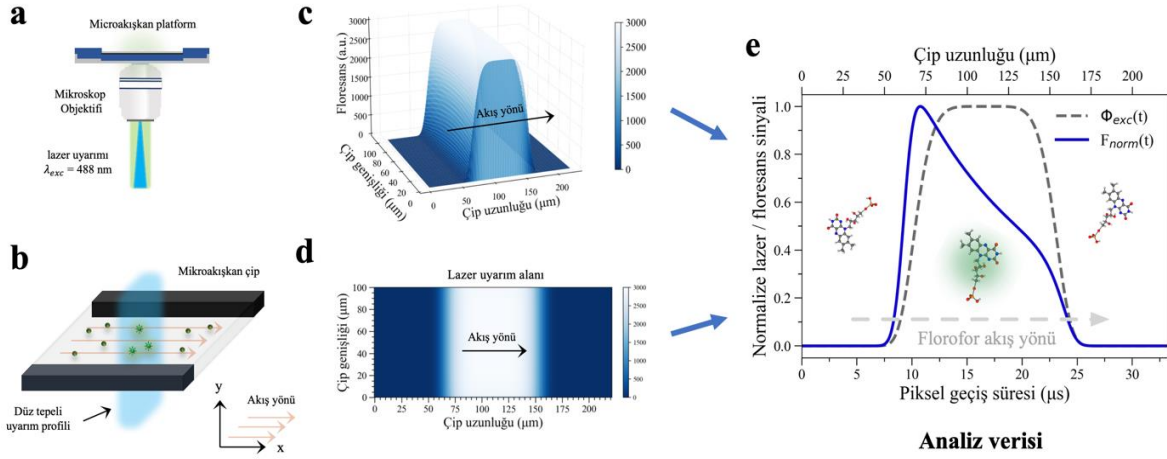
FMN ve FAD moleküllerinin floresans sinyallerini simüle etmeden önce bu moleküller için singlet ve karanlık hal durumlarının birbiriyle etkileştiği elektronik durum modellerinin oluşturulması gereklidir. Karanlık, geçici elektronik durumları içeren floresans sinyalini nümerik olarak modelleme aşamasında belkemiği olarak kullanılacak elektronik durum modelini örneklendirmek ve kuramsal yöntemi açıklamak amacıyla FMN ve FAD moleküllerinin fotofiziksel modelleri sırasıyla Şekil 2(a) ve (b)'de verilmiştir [35]. Her iki modelde de 5 temel durum olan singlet taban durum (S_0), floresan ışımaya yapan 1. uyarılmış singlet durum (S_1), triplet durum (T), redoks reaksiyonlarını temsil eden radikal durum (R) ve ışıkla ağartılmış durum (B) ortak olarak yer almaktadır. İki modelde de T, R ve B uzun ömürlü, karanlık geçici elektronik durumları temsil etmektedir. FAD floroforu FMN'den farklı olarak molekül yapısında izomerizasyona sebep olan adenin grubu barındırmaktadır (Şekil 1). İzomerizasyona bağlı olarak adenin grubunun izoalloksazın halkası ile çarpışması durumunda oluşan katlanmış yapı P ile temsil edilen farklı bir karanlık durumu oluşturur ve katlanmış durumdaki FAD molekülleri floresan ışımaya yapamaz. FAD molekülü P durumuna hem S_0 hem de S_1 durumundan geçiş yapabilmektedir. Geniş alan mikroskopu üzerinde oluşturulan düz tepeli lazer uyarım alanı konfokal mikroskoba kıyasla oldukça geniş olduğundan molekülün lazerle uyarım hızı (k_{01}) oldukça düşüktür. Bu sebeple daha yüksek seviyelerde uyarılmış singlet ve triplet durumları Şekil 2'deki modellere dahil edilmemiştir. Singlet S_0 ve S_1

durumları FMN ve FAD dahil ışımaya yapan her florofor için var olan temel elektronik durumlardır. İki molekülde de S_0 durumunda bulunan elektronlar lazerle uyarıldıklarında S_1 durumuna k_{01} hızı ile geçiş yapar ve bu hızın matematiksel ifadesi aşağıda gibi verilebilmektedir [36]:

$$k_{01} = \sigma_{exc} \Phi_{exc} = \sigma_{exc} \frac{I_0}{E_{foton}} \quad (1)$$

Denklem 1'de yer alan σ_{exc} , Φ_{exc} , I_0 ve E_{foton} parametreleri sırasıyla floroforların uyarım kesit alanı, uyarılma akısı, lazer uyarım şiddeti ve foton enerjisidir. Sürekli lazer uyarımına maruz kalan floroforlarda, S_1 durumuna uyarılan elektronlar taban durumuna k_{10} hızı ile geçiş yaparak floresan ışımaya yapmaktadır. S_1 durumuna yüksek I_0 değeri ile uyarılan moleküller floresan saturasyonuna uğrayarak, S_1 durumundaki elektronlar T durumuna sistemler arası geçiş (intersystem crossing) hızı olarak bilinen k_{isc} ile geçiş yapar. T durumundaki elektronlar S_0 durumuna k_t hızı ile gevşemektedir. Moleküllerin lazerle uyarımı, μs 'ler içinde oluşan T ve P durumlarına ek olarak daha uzun ömürlü (birkaç ms) olan redoks temelli radikallerin (R) oluşumuna sebep olmaktadır. Şekil 2'de verilen fotofiziksel modellerde T durumundan R durumuna geçiş foto-redüksiyon, k_{red} hızı ile belirlenmektedir. R durumundaki elektronlar S_0 durumuna foto-oksidasyon, k_{ox} parametresi ile geri dönerek tüm elektronik sistem geçici olarak dengeye ulaşır. FMN ve FAD molekülleri çok daha yüksek I_0 değerinde uyarıldığında moleküller R durumundan B durumuna kalıcı olarak ışıkla ağarmaktadır. Bu geçişler k_b hızı ile ölçülmektedir. FMN koenziminin floresan ışımaya şiddetini doğrudan etkileyen k_{10} hızının matematiksel ifadesi diğer geçiş hızları cinsinden aşağıdaki gibi yazılabilir:

$$k_{10} = \frac{1}{\tau_f} - k_{isc} - k_{red} \quad (2)$$



Şekil 3. (a) Floroforlar mikroskop objektifinin arka açıklığına odaklanmış lazer (mavi) ile uyarılmaktadır ve floresan ışınım (açık yeşil) görüntü verisi olarak hesaplanmaktadır. **(b)** Mikroakışkan platformun içine gömülü çipin gösterimi: çip üzerinde akış yönüne dik yönde uzatılmış düz tepeli uyarım ışını (mavi) sabit hızla hareket eden tüm molekülleri benzer lazer şiddetinde uyararak floroforların karanlık elektronik durumlara geçişlerine sebep olmaktadır. Oklar, x eksenini boyunca moleküllere uygulanan ideal, laminar akışın yönünü göstermektedir. Düz tepeli lazer uyarım alanının **(c)** 3-boyutlu ve **(d)** 2-boyutlu simülasyonu. **(e)** Yöntemle elde edilebilecek temsili bir veri örneği: nümerik simülasyonlarla elde edilen lazer profilinin ($\Phi_{exc}(t)$) ve zamana bağlı değişen karanlık elektronik durumların $F_{norm}(t)$ 'ye etkisi gösterilmektedir. Burada karanlık durumlara geçişlerin olmaması durumunda $F_{norm}(t)$ sinyalinin Φ_{exc} sinyali ile tamamen örtüşmesi beklenmektedir.

Denklem 2'de yer alan τ_f floroforun floresan ışınım ömrüdür ve organik moleküller için bu değer genellikle birkaç nanosaniyedir. Hesaplanan k_{10} değeri FAD için sabit bir değerdir ve bu değer $131 \mu\text{s}^{-1}$ olarak bulunmuştur [35]. Şekil 2(b)'de verilen FAD molekülünün elektronik durum modeli göz önüne alındığında, uyarılmış S_1 durumundan P durumuna geçiş hızı olan $k_{photo-stack}$ hızını ifade etmek için aşağıdaki denklem kullanılmaktadır:

$$k_{photo-stack} = \frac{1}{\tau_f} - k_{10} - k_{isc} \quad (3)$$

FAD molekülü S_0 durumundan karanlık P durumuna k_{stack} hızı ile geçerek katlanmış yapı oluşturmaktadır. P durumundan S_0 durumuna geçerek ise molekül açık formuna $k_{un-stack}$ hızı ile geri dönebilmektedir. Fotofiziksel modellerde verilen k_{isc} , k_t , k_{red} , k_{ox} , k_b , k_{stack} ve $k_{un-stack}$ gibi geçiş hızları, TRAST spektroskopisi kullanılarak elde edilmiş olup bu çalışmadaki nümerik simülasyonlarda kullanılmıştır [35]. Bu yöntemle ölçülerek belirlenen bu parametreler bulgular ve tartışma bölümünde Tablo 1, 2, 3 ve 4'te listelenmiştir. Bununla birlikte k_{01} ve k_{10} hızlarını simüle edebilmek amacıyla $\sigma_{exc} = 1.9 \times 10^{-17} \text{ cm}^2$ olarak belirlenmiş olup, fosfat tamponlu tuzlu su (phosphate buffered saline) içinde çözündürülerek ölçümü yapılan FMN ve FAD molekülleri için τ_f değerleri $\tau_{FMN} = 4.7 \text{ ns}$ ve $\tau_{FAD} = 2.7 \text{ ns}$ olarak

kullanılmıştır. E_{foton} değerlerinin hesaplanabilmesi için lazer uyarım dalga boyu (λ_{exc}) 488 nm olarak seçilmiştir.

2.2. Mikroakışkan Çip Sistemi Ve Lazer Uyarım Alanının Nümerik Simülasyonu

Önerilen yöntemde lazerle sabit uyarım alanı üzerinden geçerek hareket eden FMN ve FAD moleküllerinin iki boyutlu floresans görüntü verileri, $F(x, y)$, nümerik simülasyonlarla oluşturulmuştur. Simüle edilen $F(x, y)$ görüntülerindeki her piksel farklı floresans sinyal değerine sahip olup bu ifadedeki x akış yönünü, y ise akış yönüne dik yöndeki Kartezyen koordinatları temsil etmektedir. Mikroakışkan çip sistemindeki akış hızı ve görüntü verisinin piksel boyutu bilgisıyla, moleküllerin her bir pikselden geçiş süresi hesaplanmıştır. Görüntü verisindeki moleküller için akış yönü boyunca simüle edilen floresans sinyali $F(x)$ ile gösterilecek olup $t = x/v$ (piksel uzunluğu/molekülün akış hızı) denklemi kullanılarak zaman ortalamalı floresans sinyali, $F_{ort}(t)$, elde edilmiştir. Uygulanan akış hızları, mikroakışkan çipin geometrik boyutu, kullanılan I_0 değerleri ve elektronik geçiş hızlarına bağlı olarak floroforların karanlık geçici durumları, normalize edilmiş, zaman ortalamalı floresans sinyalindeki $F_{norm}(t)$ değişimlere bakılarak analiz edilmiştir. Analizlerin doğru bir biçimde yapılabilmesi için, mikroakışkan çipin geometrik boyutlarının yanı sıra lazer uyarım alanının geometrisinin de dikkate alınması gerekmektedir.

Yapılan simülasyonlarda gerçek bir sCMOS kamera görüntü verisinin özellikleri sayısal veri olarak kullanılmıştır. sCMOS kameralarda üretilen görüntü verisi yatay ve dikey boyutlarda 2048 kare pikselden oluşmakta olup her bir pikselin uzunluk değeri yaklaşık 6.5 μm olarak belirlenmiştir [39]. Deneysel ölçümlerde sCMOS kameranın çok daha hızlı kayıt yapabilmesi için toplam piksel sayısı 4x4 grupta yöntemiyle genişletilerek 512 piksele düşürülebilmektedir. Gruplama ile bu sayede objektifte oluşan görüntü verisinin 1 piksel uzunluğu 26 μm olarak elde edilmiştir. Bu çalışmada üretilen lazer ve normalize floresans sinyalleri için görüntü verileri Python ortamında 2 boyutlu ızgara (grid) içinde simüle edilmiştir. Simüle edilen görüntüde çip genişliği (akış doğrultusuna dik yön) boyunca toplam 233, çip uzunluğu, yani akış yönü doğrultusunda ise toplam 512 piksel barındırmaktadır. Şekil 3(a) ve (b)'de resmedilen mikroskop üzerine yerleştirilmiş 60x büyütme su ile odaklanabilen mikroskop objektifinde oluşan görüntü verisinde bir piksel uzunluğu 0.43 $\mu\text{m}/\text{piksel}$ olarak hesaplanmıştır. Simülasyonlarda sCMOS kameranın görüş alanına giren mikroakışkan çipin uzunluğu ve yüksekliği bu durumda 220.16 μm ve 50 μm olarak belirlenmiştir. Çalışmamızda simüle edilmiş görüntü verilerinin akışa dik boyutu, yani çip genişliği 100.19 μm olacak şekilde belirlenmiştir. Bu ebatlardaki çipler Micronit isimli mikroakışkan sistemler geliştiren bir ticari firma tarafından kolaylıkla üretilebilmektedir [40]. Şekil 3(b)'de resmedilen mikroakışkan sistem ile karanlık durumlara geçişleri tetiklenmektedir. Süpergauss lazer ışın profilinin genelleştirilmiş matematiksel ifadesi, $n > 2$ mertebesindeki x ve y Kartezyen koordinatlarındaki optiksel yoğunluk profili $I(x,y)$ ile Denklem 4'teki gibi ifade edilebilmektedir [41, 42]:

$$I(x,y) = \begin{cases} I_0 \cdot e^{-2\left(\frac{x-x_0}{w}\right)^n} & y \in [0, L] \\ 0 & \text{diğer} \end{cases} \quad (4)$$

Denklem 4'te yer alan L çip genişliğini, w ise Gausyen profilin giriş bel yarı çapını ve n düz tepeli lazer profilinin mertebesini göstermektedir. Denklem 4 ile nümerik simülasyonlarda kullanılacak olan düz tepeli lazer uyarım alanı parametreleri sırasıyla $I_0 = 3000$ a.u., $L = 100.19$ μm , $w = 50$ μm ve $n = 6$ olarak seçilmiştir. Lazer ışınının simetri merkezinin koordinatı, çipin akış yönü boyunca tam orta noktasında ($x_0 = 110.08$ μm) olacak şekilde belirlenmiştir. İlk olarak 512 piksel değerine sahip çip uzunluğu boyunca $I(x, 0)$ sinyali $y = 0$ için Denklem 4 ile simüle edilmiştir. Aynı simülasyon çip genişliği boyunca yer alan 233 piksel için bir döngü algoritması (for loop) içinde tekrar edilerek $I(x,y)$ değerleri $y =$

$L = 100.19$ μm 'ye ulaşana dek hesaplanmıştır. Hesaplanan $I(x,y)$ değerleri 512 x 233 piksel² boyutunda oluşturulan grid içine kaydedilmiştir. Grid içinde her piksel için kaydedilen $I(x,y)$ değerlerinin oluşturulmasında kullanılan lazer profilinin 3 ve 2 boyutlu gösterimleri sırasıyla Şekil 3(c) ve (d)'de verilmiştir. Mikroakışkan çip içinde hareket eden flavin koenzimlerini lazerle uyarmak için kullanılan efektif optik güç P_{eff} , $I(x,y)$ cinsinden aşağıdaki bağıntıyla hesaplanabilmektedir:

$$P_{\text{eff}} = \int_{-\infty}^{\infty} \int_0^L I_0 e^{-2\left(\frac{x-x_0}{w}\right)^6} dy dx \quad (5)$$

Denklem 5'te P_{eff} için tanımlanan integralin I_0 için w , L ve gamma fonksiyonu (Γ) cinsinden çözümü aşağıdaki ifade ile bulunmuştur:

$$I_0 = \frac{1}{\Gamma(1/6)} \frac{3^{5/2} P_{\text{eff}}}{wL} \quad (6)$$

FMN ve FAD için farklı lazer şiddetlerinin normalize floresans sinyallerine olan etkisi Denklem 6'da bulunan çözüm kullanılarak incelenmiştir. Yapılan simülasyonlarda $\Gamma(1/6)$ değeri 5.57 olarak alınmıştır [43]. Floroforların I_0 'a bağlı karanlık durumlara geçişlerini kontrol etmek amacıyla Denklem 1'deki k_{01} hızı kullanılmaktadır ve bu denklemde yer alan I_0 değeri (kW/cm^2 cinsinden) Denklem 6'daki çözüm ile elde edilmektedir. 488 nm uyarım dalga boyuna sahip lazerlerde maksimum P_{eff} değeri 300 mW'a kadar ulaşabildiğinden, nümerik simülasyonlardaki I_0 değer aralığı 0.06 - 3.62 kW/cm^2 olarak belirlenmiş ve bu aralıkta farklı I_0 değerleri simülasyonlarda kullanılmıştır.

2.3. Zamana Bağlı Elektronik Durum Popülasyonları İle Normalize Floresans Sinyalinin Nümerik Simülasyonu

Lazer, mikroskop ve çip parametrelerini k_{01} hızını hesaplamak amacıyla belirledikten sonra karanlık durumları içeren floresans sinyallerinin simüle edilmesi için kullanılacak hesaplamalı yöntem bu başlıkta FMN molekülünün fotofiziksel modeli için örneklenmiştir. Şekil 2(a)'da FMN için verilen 5 temel elektronik durum ve bu durumlar arası geçiş hızları 1. mertebeden lineer diferansiyel denklem sistemi olarak ele alınıp, aynı yöntem FAD molekülüne uyarlanarak sayısal çözümler yapılmıştır. Diferansiyel denklem sisteminin çözümü özdeğer ve özvektör problemi olarak ele alınmış olup elektronik durum popülasyonlarını gösteren $\vec{S}(t)$ vektörü aşağıdaki ifade ile yazılabilmektedir [35]:

$$\frac{d}{dt} \vec{S}(t) = M \cdot \vec{S}(t) \quad (7)$$

$$\frac{d}{dt} \begin{bmatrix} S_0(t) \\ S_1(t) \\ T(t) \\ R(t) \\ B(t) \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} -k_{01} & k_{10} & k_t & k_{ox} & 0 \\ k_{01} & -k_{10} - k_{isc} - k_{red} & 0 & 0 & 0 \\ 0 & k_{isc} & -k_t & 0 & 0 \\ 0 & k_{red} & 0 & -k_{ox} - k_b & 0 \\ 0 & 0 & 0 & k_b & 0 \end{bmatrix} \cdot \begin{bmatrix} S_0(t) \\ S_1(t) \\ T(t) \\ R(t) \\ B(t) \end{bmatrix} \quad (8)$$

Denklem 7’de yer alan $\bar{S}(t)$ zamana bağlı elektronik durum popülasyon vektörünü temsil etmektedir, M ise bu durumlar arasındaki elektronik geçiş hızlarını kapsayan bir birleştirme matrisidir. FMN’nin fotofiziksel modeli baz alınarak M matrisi açık bir şekilde Denklem 8’deki gibi yazılmaktadır. FMN moleküllerinin elektronik durum popülasyonları olasılık değeri olarak göz önüne alındığında $S_0(t)+S_1(t)+T(t)+R(t)+B(t)=1 \quad \forall t$ koşulunun sağlanması gerekir. FMN molekülleri, $t = 0$ anında henüz uyarım alanından geçmedikleri ve lazerle uyarılmamış oldukları için elektronların tamamen taban durumunda (S_0) olduğu varsayılır [6] ve S_0 değeri bu durumda 1 olarak alınır. Elektronik durum vektörü için nümerik olarak çözülecek olan özdeğer-özvektör probleminde bu nedenle başlangıç koşulu vektör formunda aşağıdaki gibi ifade edilebilmektedir:

$$\begin{bmatrix} S_0(t) \\ S_1(t) \\ T(t) \\ R(t) \\ B(t) \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 1 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \end{bmatrix} \quad (9)$$

$t = 0$ ’da başlatılan sabit bir uyarım sonrasında FMN moleküllerinin herhangi bir t anında floresan ışımaya yapan S_1 durumunda bulunma olasılığı aşağıda verilen denklem ile hesaplanmaktadır [19]:

$$S_1(t) = \frac{k_{01}}{k_{01} + k_{10}} \left[1 - e^{-\lambda_{ab}t} - \sum_{i=1}^p (A_i - A_i e^{-\lambda_i t}) \right] \quad (10)$$

Bu denklemde yer alan p , S_0 ve S_1 dışındaki karanlık durum sayısını, λ_{ab} ve λ_i özdeğerleri ve A_i ise kararlı durumdaki elektronik durum popülasyonlarının genlik değerlerini göstermektedir. Lazer ışınlarındaki fotonların düzensiz dağılımının singlet $S_0 - S_1$ durumları arasındaki denge süresi (anti-bunching) $\tau_{ab} = 1/\lambda_{ab}$ ile elde edilmektedir [44]. Bu ifade $\lambda_{ab} = 1/(k_{01} + k_{10})$ şeklinde tanımlanmaktadır [45-47]. $S_0(t = 0) = 1$ başlangıç koşulunu kullanarak λ_i ve A_i değerleri, Şekil 2(a)’da görülen S_0 , S_1 , T , R ve B popülasyonları, Denklem 8’de verilen elektronik geçiş parametreleri cinsinden analitik olarak çözülmüştür. Denklem 10’da zamana bağlı olan $k_{01}(t)$ hızı moleküllerde floresan ışımının görüldüğü $S_1(t)$

popülasyonunu etkileyen en önemli parametredir. Mikroakışkan çipte uyarılan floroforların ışımaya yapması ve karanlık durumlara geçmesi durumunda $S_1(t)$ popülasyonu doğrudan etkilenmektedir. Moleküller uyarım alanı üzerinde hareket ederken simüle edilen/kaydedilen görüntülerde çip uzunluğu ve genişliği boyunca yer alan her piksel farklı $I(x,y)$ değerine sahip olacağından Denklem 10’da verilen $k_{01}(t)$ hızı her $I(x,y)$ için farklı ancak birbirine yakın değerler almaktadır. Floresans sinyali şiddetinin zamana bağlı simülasyonunda ilk olarak toplam 512 piksel değerine sahip çip uzunluğu boyunca, $I(t = x/v, 0)$ sinyali $y = 0$ için Denklem 4 ile elde edildikten sonra bulunan $I(t, 0)$ değeri Denklem 1 içinde kullanılarak $k_{01}(t)$ değerleri zamana bağlı olarak hesaplanmıştır. Aynı simülasyon çip genişliği boyunca yer alan 233 piksel için bir döngü algoritması içinde tekrar edilerek $k_{01}(t)$ değerleri $y = L = 100.19 \mu\text{m}$ ’ye ulaşana dek elde edilmiştir. Her piksel için hesaplanan k_{01} hızları Denklem 10 içinde kullanılarak 512×233 piksel² boyutunda oluşturulan başka bir 2 boyutlu grid içinde $S_1(t)$ popülasyonları elde edilmiştir. Şekil 3(c) ve 3(d)’deki görüntülerde kameranın grid içindeki her bir piksel için ölçebileceği, zamana bağlı ortalama floresan sinyali ($F_{ort}(t)$) aşağıdaki denklemle elde edilmektedir:

$$F_{ort}(t) = k_{10} q_f q_D S_1(t) \quad (11)$$

Denklem 11’de verilen q_f ve q_D sırasıyla floresans kuantum verimi ve kameranın floresans algılama kuantum verimi olarak bilinen sabit terimlerdir. Flavinler için normalize floresan sinyalleri ($F_{norm}(t) = F_{ort}(t) / F_{ortmax}(t)$) simüle edileceği için q_f ve q_D terimleri birbirini yok etmektedir ve bu terimlerin simüle edilen eğrilere bir katkısı bulunmamaktadır. Bu çalışmada FMN ve FAD molekülleri için simüle edilen görüntü verileri üzerinden moleküllerin akış yönü boyunca $F_{norm}(t)$ sinyalleri hesaplanarak analizler yapılmıştır. Elde edilen normalize floresans sinyali $F_{norm}(t)$ Şekil 3(e)’de örneklenmiştir. $F_{norm}(t)$ sinyalinin zamana bağlı değişim grafiğinin lazerin uyarım profilinden farklı olduğu durumlarda, bu değişimlerin fiziksel sebeplerinin hangi karanlık durumlara geçişlerden kaynaklandığı bulgular ve tartışma kısmında detaylıca açıklanmıştır.

III. BULGULAR VE TARTIŞMA

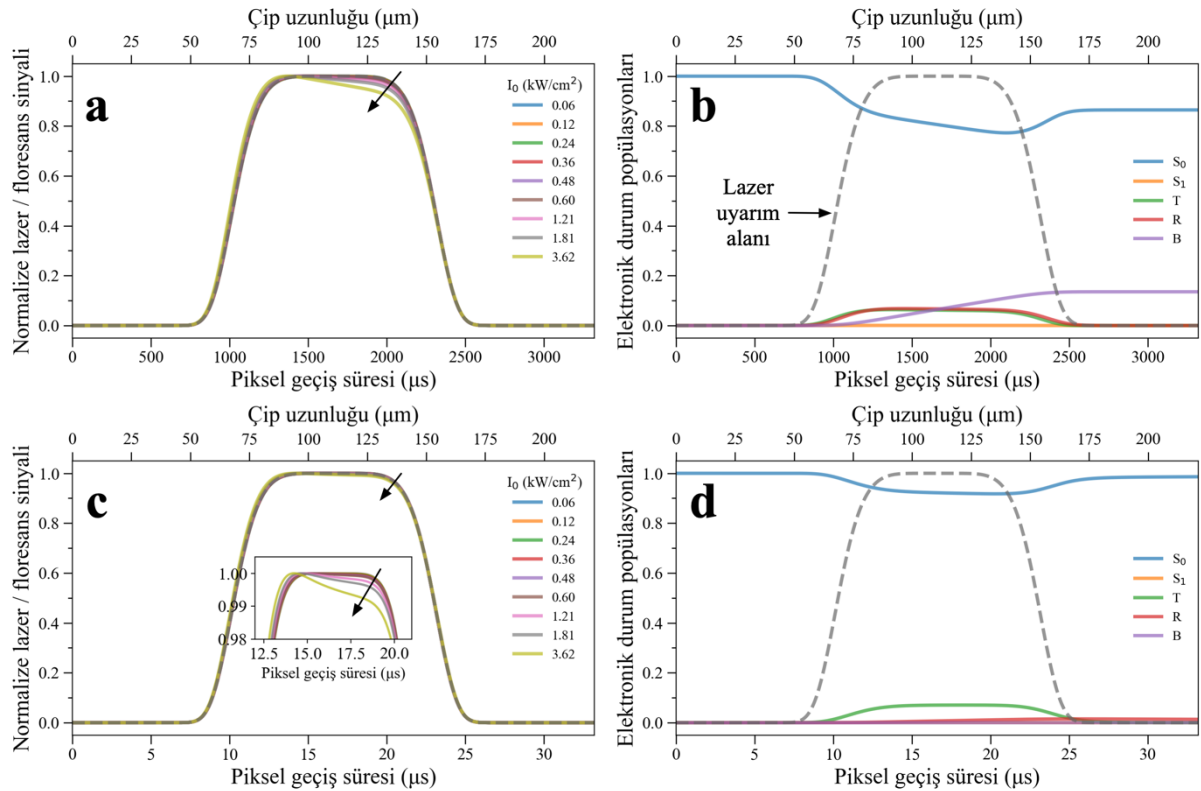
3.1. FMN Molekülü İçin Simülasyon Sonuçları

488 nm dalga boylu, düz tepeli lazer uyarımı alanından farklı akış hızlarında geçen FMN moleküllerinin normalize floresans sinyalleri Şekil 2(a)'da verilen fotofiziksel model kullanılarak ve Denklem 11 normalize edilerek farklı koşullar için simüle edilmiştir. Tornmalm ve Widengren tarafından TRAST kullanılarak belirlenmiş fotofiziksel geçiş hızları, önerilen mikroakışkan temelli floresans mikroskop sistemine uyarlanarak hangi elektronik geçişlerin net bir şekilde gözlemlenebileceği test edilmiştir. TRAST yöntemi ile elde edilen tüm ölçüm parametreleri Tablo 1, 2, 3 ve 4'te listelenmiştir [35]. FMN floroforu için

ilk olarak I_0 etkisi araştırılmış olup 20 $\mu\text{L}/\text{dk}$ ve 2000 $\mu\text{L}/\text{dk}$ akış hızları için simüle edilen normalize floresans sinyali eğrilerinde kullanılan parametreler Tablo 1'de, simülasyon sonuçları ise sırasıyla Şekil 4(a) ve (c)'de verilmiştir. 20 $\mu\text{L}/\text{dk}$ akış hızıyla uyarım alanından geçen FMN floroforuna ait normalize floresans sinyal eğrisinin lazer uyarım alanı boyunca I_0 şiddetinin artmasıyla kademeli olarak azaldığı gözlemlenmiştir. Lazerin konumlandığı bölgede normalize sinyal genliğindeki zamana bağlı azalmanın sebebinin floresan ışımaya yapan S_1 durumundan karanlık T, R ve B durumlarına geçişlerden kaynaklandığı açıktır. 20 $\mu\text{L}/\text{dk}$ gibi bir akış hızında lazer uyarım şiddetine oldukça hassas olan FMN molekülü lazer uyarım alanından ortalama 1500 μs gibi

Tablo 1. FMN molekülünün elektronik durumlarına I_0 değerinin etkisinin araştırılmasında kullanılan molekül akış hızları ve fotofiziksel parametreler.

Akış hızları ($\mu\text{L}/\text{dk}$)	τ_{FMN} (ns)	k_{isc} (μs^{-1})	k_t (μs^{-1})	k_{red} (μs^{-1})	k_{ox} (μs^{-1})	k_b (μs^{-1})
20-2000	4.7	82	0.81	0.017	0.020	0.0016



Şekil 4. (a) Akış hızı 20 $\mu\text{L}/\text{dk}$ olan FMN molekülünün normalize floresans sinyalinin farklı lazer uyarım şiddetlerinde incelenmesi, (b) aynı akış hızında FMN molekülünün elektronik durum popülasyonlarının 3.62 kW/cm^2 uyarım şiddeti altında zamana göre değişimi. (c) Akış hızı 2000 $\mu\text{L}/\text{dk}$ olan FMN molekülünün normalize floresans sinyalinin farklı lazer uyarım şiddetlerinde incelenmesi, (d) aynı akış hızında FMN molekülünün elektronik durum popülasyonlarının 3.62 kW/cm^2 uyarım şiddeti altında zamana göre değişimi. 4 grafikte de yer alan gri kesikli çizgi karanlık durumların olmadığı, lazerin kendi uyarım profilini göstermektedir.

bir sürede geçişini tamamlamaktadır ve bu süre içinde ışıkla ağararak foto-bozunuma uğrayıp B durumuna geçiş yapması beklenmektedir. Şekil 4(c)'de 2000 $\mu\text{L}/\text{dk}$ akış hızı için simüle edilen normalize sinyallerdeki zamana bağlı bu düşüş daha zayıftır.

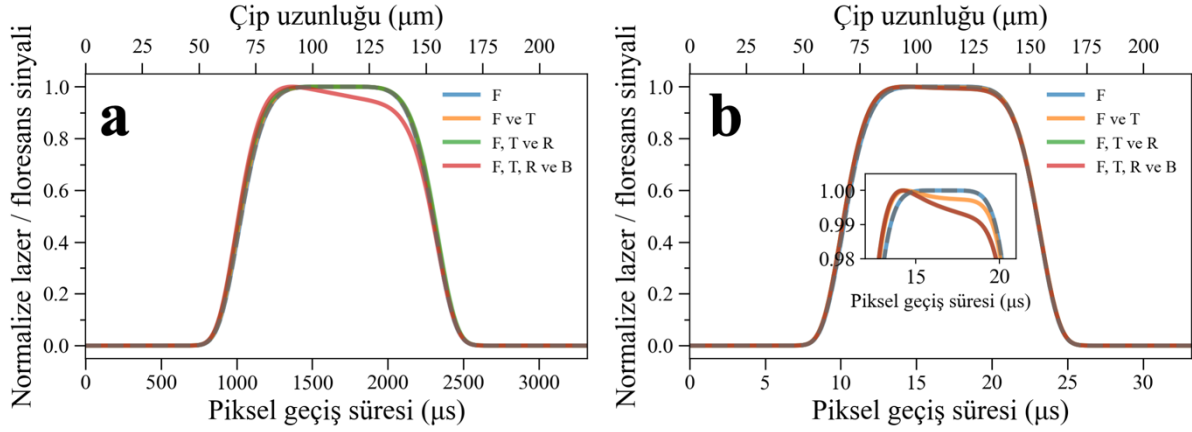
Her iki akış hızında da hangi spesifik karanlık duruma geçişin sinyal genliğinde düşüşe sebep olduğunu anlamak amacıyla bütün elektronik durum popülasyonlarının zamana bağlı değişim grafikleri kapsamlı bir şekilde incelenmiştir. $3.62 \text{ kW}/\text{cm}^2$ uyarım şiddeti altında uyarılan FMN molekülü için 20 $\mu\text{L}/\text{dk}$ ve 2000 $\mu\text{L}/\text{dk}$ akış hızındaki $S_0(t)$, $S_1(t)$, $T(t)$, $R(t)$ ve $B(t)$ popülasyonları Şekil 4(b) ve (d)'de sırasıyla verilmiştir. Her iki akış hızında FMN moleküllerinin lazer uyarım alanına girmeden önce moleküllerin tamamen S_0 durumunda olduğu açıkça görülmektedir. 20 $\mu\text{L}/\text{dk}$ akış hızında (Şekil 4(b)) bu moleküller uyarım alanına girmeye başladığı andan itibaren S_0 durumundaki FMN molekülleri ışıkla

uyarılarak S_1 durumuna ve hemen akabinde karanlık T, R ve B durumlarına da geçiş yapmaya başlamıştır. Düşük akış hızında bile moleküllerin R durumuna geçmeden önce T durumuna geçtikleri açıkça görülmektedir. Bu sonuç oldukça anlamlıdır çünkü T durumuna geçişler yalnızca birkaç μs sürerken, redoks radikallerinin oluşumu ms'ler içinde gerçekleşmektedir. Moleküller uyarım alanının en düz tepeli kısmına ulaştığında ise geri dönüşü olmayan B durumuna geçişlerin yüksek oranda artışı açık bir şekilde ortaya çıkmıştır. FMN moleküllerinin bir kısmı lazer uyarım alanından uyarılarak çıktıkları bölgede B durumuna geçerek foto-bozunuma uğradıkları için S_0 popülasyonunda başlangıca göre yaklaşık %10 oranında düşüş gözlemlenmiştir. Diğer yandan T, R ve B popülasyonlarına kıyasla S_1 popülasyonu uyarım alanı bölgesinde oldukça düşüktür ancak popülasyon değeri 0'a eşit değildir, bu sebeple diğer popülasyonlara kıyasla sinyal eğrisi düz çizgi olarak gözlemlenmiştir. Bu davranış fiziksel olarak oldukça

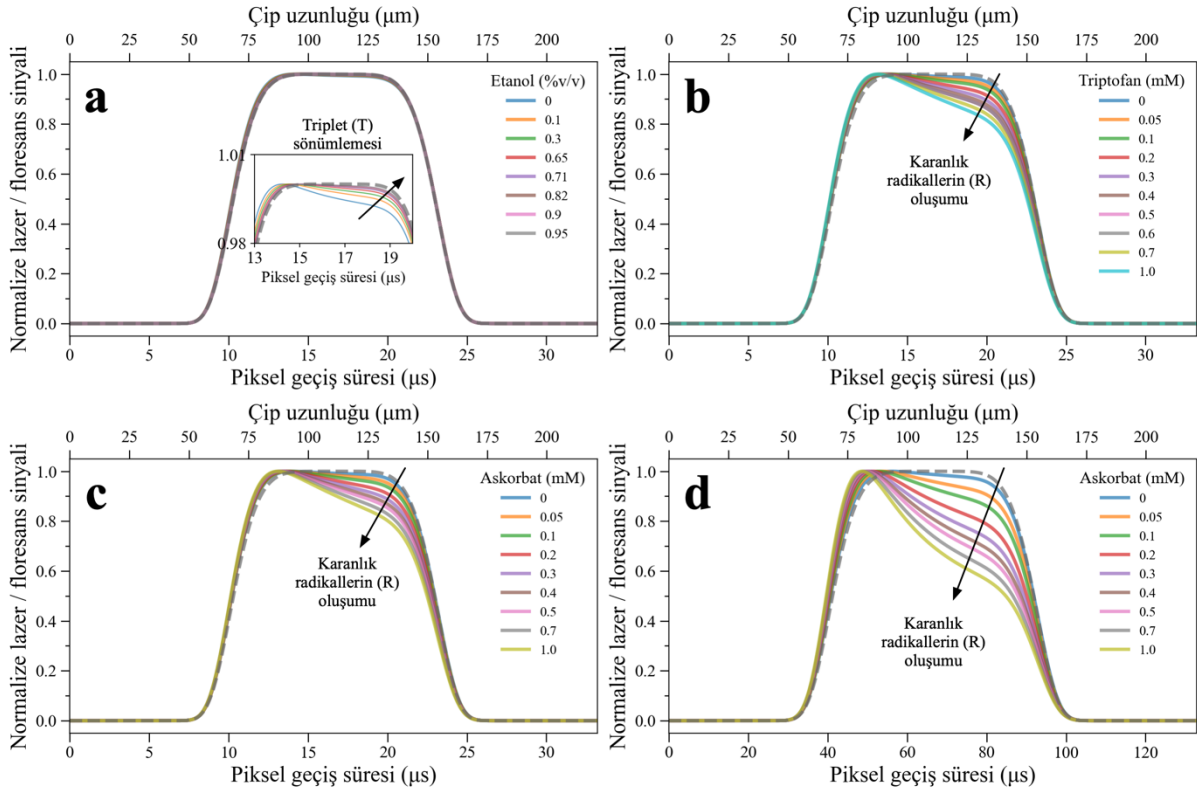
Tablo 2. FMN molekülünün elektronik durumlarına farklı konsantrasyonlarda eklenen etanol, askorbat ve triptofan moleküllerinin etkisinin araştırılmasında kullanılan molekül akış hızları ve fotofiziksel parametreler.

Eklenen Molekül	C* (%v/v-mM)	Akış hızları ($\mu\text{L}/\text{dk}$)	τ_{FMN} (ns)	k_{isc} (μs^{-1})	k_t (μs^{-1})	k_{red} (μs^{-1})	k_{ox} (μs^{-1})	k_b (μs^{-1})	
Etanol	0.0	20-2000	4.7	82	0.81	0.017	0.030	0.0016	
	0.1				1		0.025		
	0.3				1.20		0.021		
	0.65				1.52		0.018		
	0.71				1.98		0.015		
	0.82				2.48		0.013		
	0.9				3.04		0.011		
	0.95				3.62		0.009		
Askorbat	0.0	20-2000	4.7	82	0.72	0.327	0.019	0.0018	
	0.05								0.077
	0.1								0.127
	0.2								0.227
	0.3								0.427
	0.4								0.527
	0.5								0.727
	0.7								1.027
Triptofan	0.0	20-2000	4.7	82	0.76	0.335	0.028	0.0016	
	0.05								0.085
	0.1								0.135
	0.2								0.235
	0.3								0.435
	0.4								0.535
	0.5								0.635
	0.6								0.735
0.7	1.035								

*C eklenen molekülün konsantrasyon değerini temsil etmektedir.



Şekil 5. (a) 20 µL/dk ve (b) 2000 µL/dk akış hızıyla 3.62 kW/cm² uyarım şiddeti altında lazer uyarım alanından geçen FMN moleküllerinin normalize sinyal eğrilerine triplet (T), radikal (R) ve ışıkla ağarma (B) durumlarının tekil etkisi. Gri kesikli çizgi karanlık durumların olmadığı, lazerin kendi uyarım profilini göstermektedir.



Şekil 6. Maksimum lazer uyarım şiddeti (3.62 kW/cm²) altında 2000 µL/dk akış hızıyla lazer uyarım alanından geçen FMN moleküllerinin normalize floresans sinyallerine farklı kütle fraksiyonlarında (a) etanol, (b) triptofan ve (c) askorbat moleküllerinin etkisi. (d) Aynı uyarım şiddeti altında askorbat etkisinin 500 µL/dk akış hızında incelenmesi. Gri kesikli çizgi karanlık durumların olmadığı, lazerin kendi uyarım profilini göstermektedir.

anlamlıdır ve FMN molekülünün neden zayıf ışına yaptığını açık bir şekilde göstermektedir. Şekil 4(d)'de FMN molekülleri için 2000 µL/dk akış hızında simüle edilen elektronik durum popülasyonlarına bakıldığında ise T durumuna geçişlerin diğer karanlık durumlara göre çok daha belirgin bir şekilde görüldüğü ortaya çıkmıştır. Yüksek hızda hareket eden FMN molekülleri

uyarım alanından yalnızca birkaç µs içinde geçtikleri için ms zaman skalasında gerçekleşen foto-bozunum veya redoks reaksiyonlarına girecek süreye sahip değildir. Bu sebeple simüle edilen R ve B popülasyonlarının T popülasyonuna göre çok daha düşük seviyede olduğu gözlemlenmiştir. 2000 µL/dk akış hızı için yapılan elektronik popülasyon

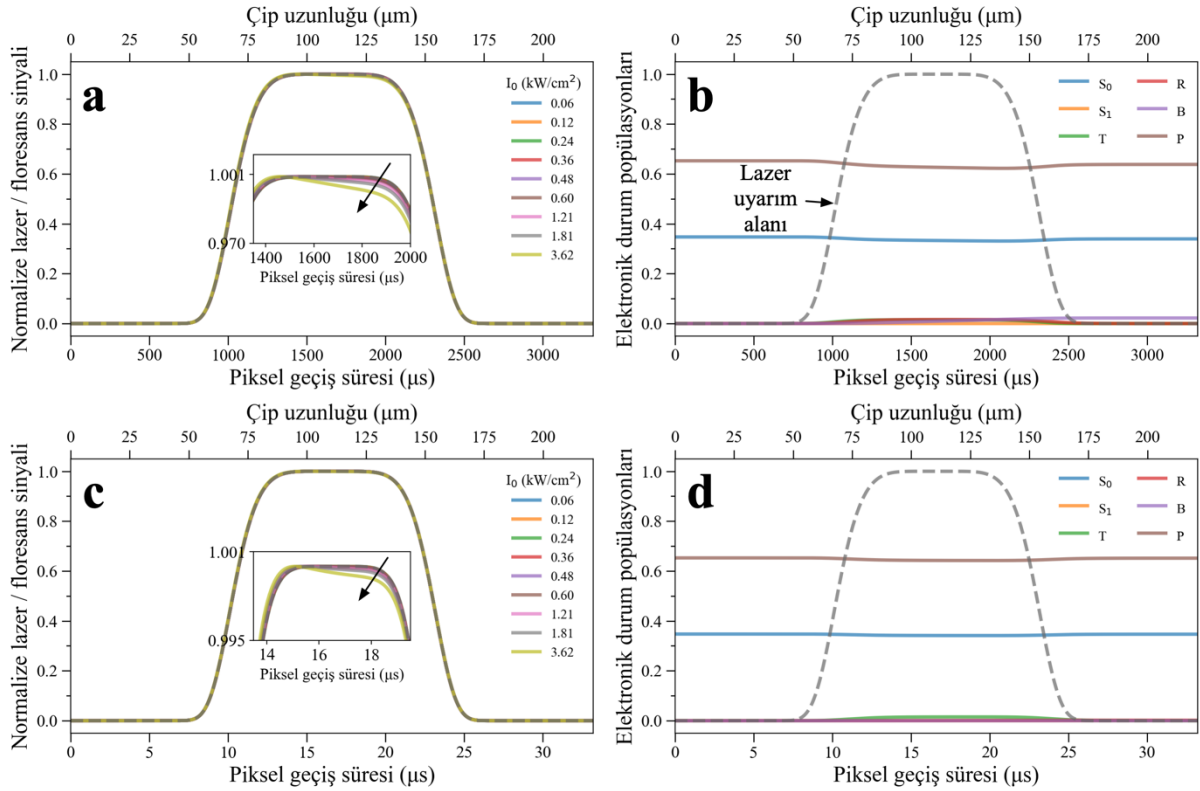
simülasyonlarında S_1 popülasyonunun 20 $\mu\text{L}/\text{dk}$ akış hızında elde edilene göre bir miktar daha yüksek olduğu görülmüştür. Bu nedenle Şekil 4(c)'deki normalize floresans sinyallerinin genlik değerlerindeki zayıflamanın Şekil 4(a)'da simüle edilen eğrilere göre daha az olduğu anlaşılmıştır.

Bu bulguları doğrulamak amacıyla Şekil 2(a)'da sunulan fotofiziksel modeldeki her bir karanlık durumun iki farklı akış hızındaki tekil etkisi ayrıca araştırılmıştır ve $3.62 \text{ kW}/\text{cm}^2$ uyarım şiddeti altında simüle edilen normalize floresans sinyalleri Şekil 5(a) ve (b)'de 20 $\mu\text{L}/\text{dk}$ ve 2000 $\mu\text{L}/\text{dk}$ akış hızları için sırasıyla verilmiştir. Her iki grafikte de F sinyali (mavi çizgi) tüm karanlık durumların ihmal edildiği normalize floresans sinyalini, F ve T sinyali (turuncu çizgi) F ile tek karanlık durum olarak tripletin var olduğu sinyali, F, T ve R sinyali (yeşil çizgi) F ile birlikte triplet ve radikal durumların var olduğu sinyali, F, T, R ve B (kırmızı çizgi) ise floresans sinyali dahil diğer tüm karanlık durumların var olduğu sinyali göstermektedir. Şekil 5(a)'da sunulduğu gibi 20 $\mu\text{L}/\text{dk}$ akış hızı boyunca simüle edilen normalize sinyaldeki genliğin azalmasının temel sebebi FMN moleküllerinin geri dönüşü olmayan B durumuna geçişleridir ve bu analiz önceki simülasyon sonuçlarını doğrulamaktadır [48]. B durumuna geçişin ihmal edilip yalnızca T ve/veya R durumları kullanılarak simüle edilen sinyaller (turuncu ve yeşil sinyaller) molekülün yalnızca F sinyaliyle (mavi sinyal) kıyaslandığında aralarında büyük bir fark olmadığı anlaşılmıştır. Yalnızca sürekli lazer uyarımının olduğu, redoks reaksiyonuna sebep olan ek ajan moleküllerinin eklenmediği bir deney ortamında R durum popülasyonunun önemli derecede değişmesi beklenmemektedir, dolayısıyla bu bulgular oldukça anlamlıdır. FMN moleküllerinin 2000 $\mu\text{L}/\text{dk}$ akış hızında F ile yalnızca T durumunun dahil edilerek simüle edildiği eğriden T durumuna geçişler Şekil 5(b)'de net bir biçimde ayırt edilebilmektedir. Bu tür yüksek akış hızında moleküller birkaç μs içinde uyarım alanında geçtiklerinden dolayı T durumuna geçişlerin çözümlenebilmesi beklenmektedir. R ve B durumlarına geçişlerin var olduğu sinyal eğrileri yalnızca tripletin olduğu (turuncu) eğri ile birbirine yakındır. Yalnızca B durumunun ihmal edildiği simülasyon eğrisi (yeşil) ile B durumunun dahil edildiği simülasyon eğrisinin (kırmızı) üst üste binmesi, B durumunun bu akış hızında etkisiz olduğunu ortaya çıkarmıştır. Bu hız değerinde molekülün uyarım alanından geçiş süresi floroforların ışıkla ağarması için yeterli değildir ve foto-bozunum önlenmektedir. Bu çalışma sonuçları önerilen yöntemin FMN gibi ışığa duyarlı olan otofloresan koenzimlere ait karanlık elektronik durum popülasyonlarının hangi akış hızlarında

ölçülebileceğini ve hangi deneysel parametrelerle manuel şekilde kontrol edilebileceğini ispatlamıştır.

FMN moleküllerinde T popülasyonu ortamdaki oksijen konsantrasyonuna doğrudan bağlıdır ve moleküller oksijen T popülasyonunu sönmüleyebilme (triplet quenching) özelliğine sahiptir [49]. FMN çözeltisine farklı hacim fraksiyonlarında etanol eklendiğinde oksijen çözünürlüğünün kontrol edilebileceği tartışılmaktadır. FMN çözeltisine eklenen etanolün T durumuna etkisi TRAST ile araştırılmış olup bu yöntemle elde edilen fotofiziksel parametreler Tablo 2'de verilmiştir. Bu çalışmada sunulan spektroskopik yöntem kullanılarak FMN molekülündeki karanlık T durumunun çözeltiye eklenen etanol miktarı ile kontrol edilip edilemeyeceğini ortaya çıkarmak amacıyla nümerik simülasyonlar yapılmıştır ve sonuçlar Şekil 6(a)'da sunulmuştur. $3.62 \text{ kW}/\text{cm}^2$ lazer uyarım şiddeti altında ve 2000 $\mu\text{L}/\text{dk}$ akış hızında FMN çözeltisindeki etanol miktarının artırılmasıyla ortamda oksijen konsantrasyonu artmıştır. Bu artışa bağlı olarak T popülasyonunun giderek azaldığı ve 95 %v/v etanol kütle fraksiyonuna ulaşıldığında ise T durumunun neredeyse tamamen sönmüldüğü açıkça gözlemlenmiştir. Bu bulgular önerilen yöntemin FMN molekülünün T popülasyonunu kontrol edebilme kapasitesine sahip olduğunu göstermektedir.

T'nin yanı sıra enzimatik reaksiyonlarda aktif olarak rol alan FMN molekülleri için radikal durumların oluşumları test edilmiştir. Tornmalm ve Widengren, FMN çözeltisine farklı konsantrasyonlarda triptofan ile askorbat ekleyerek FMN molekülünde radikal durumların nasıl etkilendiğini araştırmıştır ve buldukları fotofiziksel geçiş hızları Tablo 2'de raporlanmıştır. Redoks ajanlarının varlığında tekrar belirlenen geçiş hızları, bu çalışmada önerilen mikroskop sisteminde kullanılarak normalize sinyal eğrileri simüle edilmiştir. Şekil 6(b) ve (c)'de görüldüğü gibi FMN çözeltisindeki triptofan ve askorbat miktarı sistematik olarak artırıldığında karanlık R durumuna olan geçişlerin artması sebebiyle normalize sinyal eğrilerinde önemli miktarda zayıflama gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar TRAST yöntemiyle elde edilen deneysel bulgularla oldukça uyumludur [35]. Genlik değerindeki bu azalmanın temel sebebi statik sönmüleme olup bu fiziksel fenomen simüle edilen floresans sinyalinde şiddetli zayıflama olarak ortaya çıkmıştır [50]. Triptofan ve askorbat eklendiğinde T durumundan R durumuna elektron transferine bağlı olarak foto-indirgenmiş radikallerin oluştuğu düşünülmektedir ve bu radikallerin oluşması 2000 $\mu\text{L}/\text{dk}$ gibi yüksek akış hızında bile normalize floresans sinyal genliğinde düşüşe sebep olmuştur. Askorbat konsantrasyonuna bağlı bu etkinin daha düşük bir



Şekil 7. (a) Akış hızı 20 $\mu\text{L}/\text{dk}$ olan FAD molekülünün normalize floresans sinyalinin farklı lazer uyarım şiddetlerinde incelenmesi, (b) aynı akış hızında FAD molekülünün elektronik durum popülasyonlarının 3.62 kW/cm^2 uyarım şiddeti altında zamana göre değişimi. (c) Akış hızı 2000 $\mu\text{L}/\text{dk}$ olan FAD molekülünün normalize floresans sinyalinin farklı lazer uyarım şiddetlerinde incelenmesi, (d) aynı akış hızında FAD molekülünün elektronik durum popülasyonlarının 3.62 kW/cm^2 uyarım şiddeti altında zamana göre değişimi. 4 grafikte de yer alan gri kesikli çizgi karanlık durumların olmadığı, lazerin kendi uyarım profilini

molekül akış hızında da (500 $\mu\text{L}/\text{dk}$) gözlemlenebildiği Şekil 6(d)'de ayrıca araştırılmıştır. Bu akış hızında FMN molekülleri uyarım alanından daha uzun sürede geçtikleri için foto-indirgenmiş radikal R popülasyonlarının daha fazla elektron kazanarak artması ve floresans ışımaya değerini daha yüksek oranda düşürmesi oldukça anlamlı bir sonuçtur.

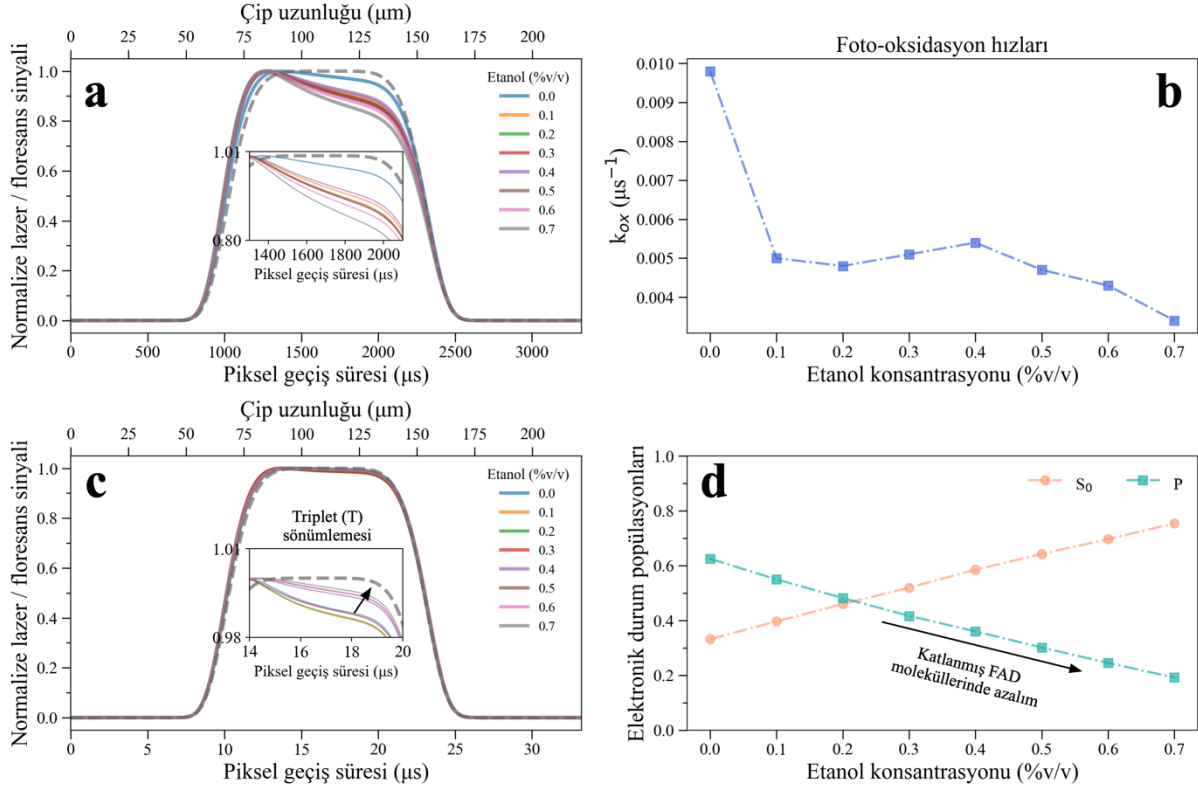
3.2. FAD Molekülü İçin Simülasyon Sonuçları

FMN koenzimlerinde fotofiziksel geçişler kapsamlı bir biçimde incelendikten sonra farklı bir flavin türevi olan FAD molekülü için benzer simülasyonlar yapılmıştır. FAD koenzimi için yapılan simülasyonlarda Şekil 2(b)'deki fotofiziksel model referans alınarak, her bir elektronik durum popülasyonu için Denklem 7 ve 9 nümerik olarak Python ortamında çözdürülmüştür.

Analizlerde ilk adım olarak I_0 etkisi araştırılmış olup 20 $\mu\text{L}/\text{dk}$ ve 2000 $\mu\text{L}/\text{dk}$ akış hızları için simüle edilen normalize floresans sinyali eğrilerinde kullanılan parametreler Tablo 3'te, grafik verileri ise sırasıyla Şekil 7(a) ve (c)'de verilmiştir. FMN'ye benzer şekilde, 20 $\mu\text{L}/\text{dk}$ akış hızıyla uyarım alanından geçen FAD moleküllerine ait normalize floresans sinyal eğrilerinin lazer uyarım alanı boyunca I_0 şiddetinin artmasıyla kademeli olarak azaldığı ortaya çıkmıştır. Aynı trend 2000 $\mu\text{L}/\text{dk}$ akış hızı için de gözlemlenmiştir. FAD molekülleri bu yüksek akış hızında karanlık durumlara geçebilmek için yeterli zamana sahip olmadığı için genlikteki azalış daha düşük çıkmıştır. Ancak bu iki akış hızında da elde edilen normalize genlik değerindeki azalışın FMN molekülüne kıyasla (Şekil 4(a) ve (c)) çok daha düşük olduğu gözlemlenmiştir. Bu

Tablo 3. FAD molekülünün elektronik durumlarına I_0 değerinin etkisinin araştırılmasında kullanılan molekül akış hızları ve fotofiziksel parametreler.

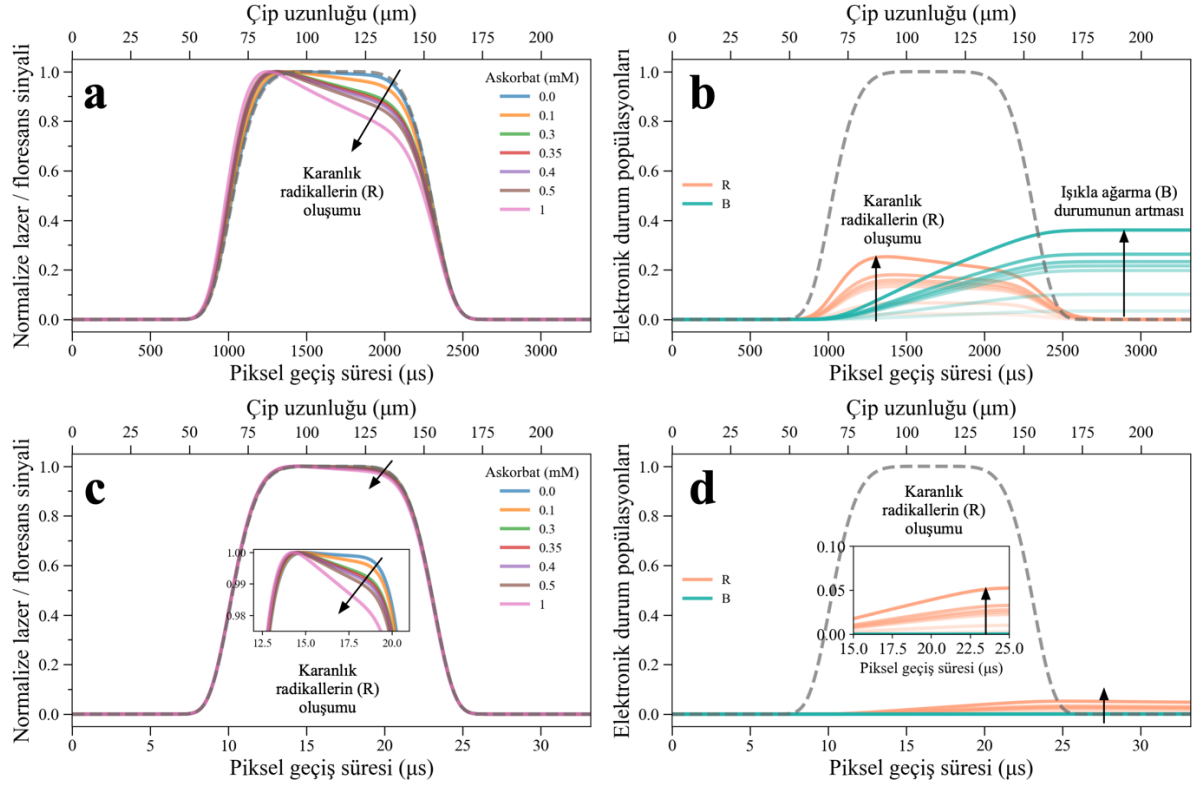
Akış hızları ($\mu\text{L}/\text{dk}$)	τ_{FAD} (ns)	k_{isc} (μs^{-1})	k_{t} (μs^{-1})	k_{red} (μs^{-1})	k_{ox} (μs^{-1})	k_{b} (μs^{-1})	k_{stack} (μs^{-1})	$k_{\text{un-stack}}$ (μs^{-1})
20-2000	2.7	82	0.81	0.010	0.0081	0.0011	62	33



Şekil 8. (a) Maksimum lazer uyarım şiddeti (3.62 kW/cm^2) altında $20 \text{ }\mu\text{L/dk}$ akış hızıyla lazer uyarım alanından geçen FAD moleküllerinin normalize floresans sinyallerine farklı kütle fraksiyonlarında etanol etkisi. **(b)** Foto-oksidasyon hızının etanol konsantrasyonuna göre değişimi. **(c)** Maksimum lazer uyarım şiddeti (3.62 kW/cm^2) altında $2000 \text{ }\mu\text{L/dk}$ akış hızıyla lazer uyarım alanından geçen FAD moleküllerinin normalize floresans sinyallerine farklı kütle fraksiyonlarında etanol etkisi. **(d)** Farklı etanol fraksiyonlarında S_0 ve P popülasyonlarının değişimi. **(a)** ve **(c)**'de gri kesikli çizgi ile gösterilen sinyal karanlık durumların oluşmadığı, lazer uyarımının normalize sinyalini göstermektedir.

durumun bir sebebi FAD molekülünün floresan ışımaya ömrünün ($\tau_{\text{FAD}} = 2.7 \text{ ns}$) FMN molekülünün ışımaya ömründen ($\tau_{\text{FMN}} = 4.7 \text{ ns}$) çok daha kısa olmasıdır. Bir diğer sebebi ise FAD molekülünde yer alan adenin grubunun izoalloksazin halkasına çarparak oluşturduğu katlanmış yapıda (P durumunda) bulunma olasılığıdır. FAD molekülleri farklı akış hızlarında lazer uyarım alanının dışında da S_0 ve P durumunda bulunma olasılığına sahiptir. Bu elektronik durum popülasyonlarının zamana göre değişim grafikleri $20 \text{ }\mu\text{L/dk}$ ve $2000 \text{ }\mu\text{L/dk}$ akış hızları için Şekil 7(b) ve (d)'de sırasıyla verilmiştir. Elde edilen grafiklerde görüldüğü gibi FAD moleküllerinin iki akış hızında da P durumunda bulunma olasılığı S_0 , S_1 , T, R ve B durumlarında bulunma olasılıklarına göre çok daha yüksektir. FMN molekülüne kıyasla FAD koenzimlerinde çok daha düşük oranda oluşan floresan S_1 durumundan T, R ve B durumlarına geçişler daha zayıftır ve bu durum Şekil 7(a) ve (c)'deki zayıf genlik kaybına sebebiyet vermektedir. Şekil 7(b)'de görüldüğü üzere $20 \text{ }\mu\text{L/dk}$ gibi yavaş akış hızlarında FAD molekülü için T, R ve B popülasyonlarının artışı açıkça gözlemlenmiştir. $2000 \text{ }\mu\text{L/dk}$ gibi daha yüksek

akış hızlarında ise T geçişleri oldukça net bir şekilde ortaya çıkmıştır. Bu sonuç ile FMN'e göre çok daha zayıf olan FAD gibi koenzimlerin karanlık durumlara geçişlerinin farklı akış hızlarında ayrı ayrı çözümlenebileceği ispatlanmıştır. Lazer uyarım alanına girmeden önce, katlanmış durumda olan FAD molekül popülasyonunun (P) katlanmamış açık yapıdaki molekül popülasyonuna (S_0) oranı 65:35 olarak bulunmuş olup bu sonuç TRAST yöntemi ve farklı deneysel yöntemler ile elde edilen oranlara oldukça yakındır [35, 51, 52]. Bu sonuca ek olarak $2000 \text{ }\mu\text{L/dk}$ akış hızında uyarım alanına giren FAD'lerde P durum popülasyonunun $20 \text{ }\mu\text{L/dk}$ akış hızına göre arttığı gözlemlenmiştir. Yüksek akış hızlarında FAD molekül yapısında bulunan adenin grubunun izoalloksazin halkasına çarpma olasılığı çok daha yüksek olduğu için P popülasyonundaki artış fiziksel olarak oldukça anlamlıdır. FAD molekülünün katlanma kinetiğinin kontrol edilebilirliğini tespit etmek ve karanlık durum popülasyonlarının nasıl etkilendiğini araştırmak amacıyla farklı konsantrasyonlarda etanol, sulu FAD çözeltisine eklenmiş olup TRAST yöntemi ile deneysel olarak çalışılmıştır. Bu deneylerden elde edilen



Şekil 9. Maksimum lazer uyarım şiddeti (3.62 kW/cm^2) altında 20 µL/dk akış hızıyla lazer uyarım alanından geçen FAD moleküllerinin (a) normalize floresans sinyallerine ve (b) R ile B popülasyonlarına askorbat etkisi. Aynı lazer uyarım şiddeti altında 2000 µL/dk akış hızıyla lazer uyarım alanından geçen FAD moleküllerinin (c) normalize floresans sinyallerine ve (d) R ile B popülasyonlarına askorbat etkisi. Gri kesikli çizgi ile gösterilen sinyal karanlık durumların oluşmadığı, lazer uyarımının normalize sinyalini göstermektedir. (b) ve (d)'de verilen eğrilerde askorbat konsantrasyonunun 0 mM 'den 1 mM 'ye artışı, renklerin açıktan koyuya doğru kademeli değişimi ile gösterilmiştir.

parametreler Tablo 4'te listelenmiştir. Şekil 8(a)'da gösterildiği gibi 20 µL/dk akış hızında hareket eden FAD moleküllerine 0.7 \%v/v oranına kadar farklı konsantrasyonlarda etanol eklendiğinde eğrilerdeki değişimlerde düzenli azalım veya düzenli artış elde edilmemiştir. Normalize floresan sinyal genliğinde sistematik olmayan bu değişimin Şekil 8(b)'de sunulan ve TRAST yöntemiyle elde edilmiş olan k_{ox} değerleri ile paralel olarak değiştiği anlaşılmıştır. Kademeli olarak etanolün eklenmesi ve ortamdaki oksijen seviyesinin artması ile FAD moleküllerinde triplet durumun sönmelenmesi beklenmektedir. Bu fenomeni araştırmak amacıyla, aynı parametreler kullanılarak 2000 µL/dk akış hızıyla uyarım alanından geçen FAD molekülleri için normalize floresans sinyalleri simüle edilmiş ve bulgular Şekil 8(c)'de verilmiştir. 0 ile 0.3 \%v/v arasındaki etanol konsantrasyonları için normalize floresans sinyal genliğinde artış görülmüş olup 0.3 \%v/v ve üzeri etanol konsantrasyonlarında genlik kademeli olarak azalmaya başlamıştır. 0 ile 0.3 \%v/v etanol değer aralığında genlikte azalma yerine artışın görülme sebebi, çözücü ortamında triplet popülasyonunu azaltmak için yeterli miktarda oksijenin

çözünmemesi ile açıklanabilir. Çözücü olarak suya göre daha polar olan etanol kademeli olarak eklendiğinde FAD moleküllerindeki katlanmış yapıların oluşma olasılığının azalması, yani P popülasyonunda düşüş beklenmektedir. Şekil 8(d)'de 2000 µL/dk akış hızı için simüle edilen P ve S_0 popülasyonlarının ortalama değerlerinin artan etanol konsantrasyonuna karşı nasıl değiştiği grafik veri ile sunulmuştur. Ortalama P değeri etanol konsantrasyonunun artması ile azalmış olup katlanmış durumdaki FAD moleküllerinin floresan ışına yapabildiği açık yapılar haline dönüştüğü ortaya çıkmıştır [53]. Böylelikle artan S_0 durumu ile FAD koenzimleri doğrudan karanlık P durumuna geçmek yerine S_1 durumuna geçerek floresan sinyalinde artışa sebebiyet vermiştir.

FMN gibi enzimatik reaksiyonlarda koenzim olarak rol alan FAD molekülleri için radikal grupların oluşumu ayrıca araştırılmıştır. FAD çözeltisine farklı konsantrasyonlarda askorbat eklenerek FAD koenzimlerinde radikal durumların nasıl etkilendiği TRAST spektroskopisi ile araştırılmış olup ölçülen

Tablo 4. FAD molekülünün elektronik durumlarına farklı konsantrasyonlarda eklenen etanol ve askorbat moleküllerinin etkisinin araştırılmasında kullanılan molekül akış hızları ve fotofiziksel parametreler. Bu parametreler kullanılarak 20 $\mu\text{L}/\text{dk}$ ve 2000 $\mu\text{L}/\text{dk}$ akış hızları için karşılaştırmalı simülasyonlar yapılmıştır.

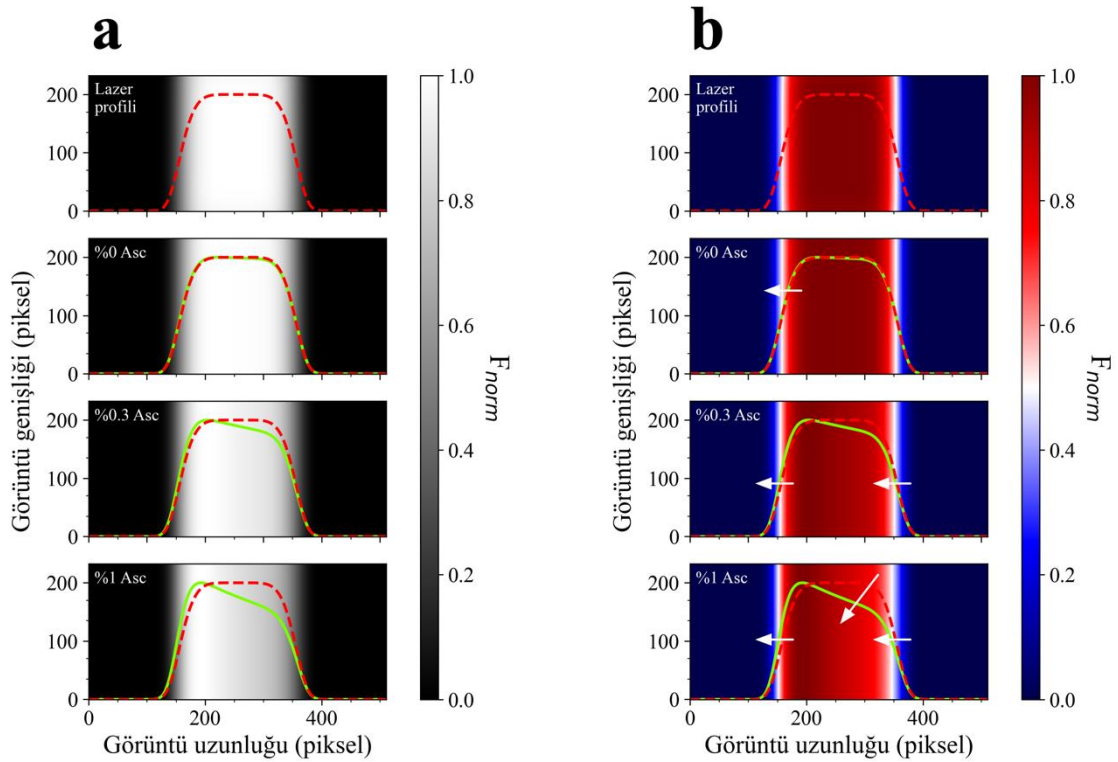
Eklenen Molekül	C* (%v/v-mM)	τ_{FAD} (ns)	k_{isc} (μs^{-1})	k_{t} (μs^{-1})	k_{red} (μs^{-1})	k_{ox} (μs^{-1})	k_{b} (μs^{-1})	k_{stack} (μs^{-1})	$k_{\text{un-stack}}$ (μs^{-1})
Etanol	0.0	2.7		0.62		0.0098		62	33
	0.1	3.0		0.66		0.0050		56.3	40.7
	0.2	3.1		0.72		0.0048		50.6	48.4
	0.3	3.4	82	0.82	0.011	0.0051	0.00077	44.9	56.1
	0.4	3.5		1.12		0.0054		39.2	63.8
	0.5	3.8		1.32		0.0047		33.5	71.5
	0.6	4.0		1.44		0.0043		27.8	79.2
	0.7	4.2		1.78		0.0034		22.1	86.9
Askorbat	0.0				0.017				
	0.1				0.057				
	0.3				0.137				
	0.35	2.7	82	0.81	0.157	0.011	0.0012	52	33
	0.4				0.177				
	0.5				0.217				
	1.0				0.417				

Yeni fotofiziksel geçiş hızları Tablo 4'te listelenmiştir. Bu geçiş hızları kullanılarak önerilen mikroskop sistemi için normalize floresans sinyal eğrileri ve elektronik durum popülasyonları 20 $\mu\text{L}/\text{dk}$ ve 2000 $\mu\text{L}/\text{dk}$ akış hızları için ayrı ayrı simüle edilmiştir. Şekil 9(a)'da görüldüğü gibi FAD çözeltisindeki askorbat miktarı 0 mM'den 1 mM'ye kademeli olarak artırıldığında karanlık R durumuna olan geçişlerin artışı sebebiyle normalize sinyal eğrilerinde önemli miktarda zayıflama gözlemlenmiştir. Bu zayıflamanın R ve B popülasyonlarındaki artıştan kaynaklandığı Şekil 9(b)'de simüle edilen popülasyon eğrileri ile ispatlanmıştır. Bu akış hızında yüksek konsantrasyonda eklenen askorbat moleküllerinin özellikle B popülasyonundaki artışı tetikleyerek foto-bozunuma sebebiyet verdiği açıkça ortaya çıkmıştır. Bu akış hızında FAD molekülleri uyarım alanından ms'ler içinde geçtikleri için foto-indirgenmiş R popülasyonlarının daha fazla elektron kazanarak artması ve floresans ışımaya değerinin düşmesi oldukça anlamlı bir sonuçtur. Askorbat konsantrasyonuna bağlı bu etkinin 2000 $\mu\text{L}/\text{dk}$ akış hızında nasıl değiştiği ayrıca araştırılmış ve sonuçlar Şekil 9(c) ve 9(d)'de özetlenmiştir. Bu akış hızında B durumuna geçişler tamamen önlenmiş olup normalize floresans sinyalindeki azalmanın sebebinin temel olarak R durumuna olan geçişlerden kaynaklandığı tespit edilmiştir (Şekil 9(d)). Bu sonuçlar FMN için elde edilen simülasyon sonuçları ve TRAST yöntemiyle elde edilen ölçüm verileriyle oldukça uyumludur [35].

Karanlık durum popülasyonlarındaki değişimlerin temel sebebi statik sönmüleme (static quenching) mekanizması olup bu fiziksel fenomen simüle edilen floresans sinyalinde şiddetli zayıflama olarak ortaya çıkmıştır. Florofor çözeltisine askorbat kademeli olarak eklendiğinde, T durumundan R durumuna geçişlerde elektron transferine bağlı olarak foto-indirgenmiş radikallerin oluştuğu düşünülmektedir ve Şekil 9(c)'de de görüldüğü gibi bu radikallerin oluşması yüksek akış hızında bile normalize floresans sinyalinde zayıflamaya sebep olmuştur.

3.3. sCMOS Kamera Görüntü Verilerinin Isı Haritaları Yöntemi İle Karşılaştırılması

Mikroakışkan çip içinde uyarım alanından geçen FMN ve FAD molekülleri için farklı deneysel koşullarda elde edilen normalize floresans sinyalleri sCMOS kamera görüntü verisinden üretilmektedir. Deneysel ölçüm esnasında mikroskop sistemine entegre edilmiş bir kamera ile bu koenzimlere veya farklı floroforlara ait karanlık durum geçişlerinin kaydedilerek bilgisayar ekranından canlı olarak takip edilmesi mümkündür [19]. sCMOS kamera görüntü boyutları akış alanına dik yönde 233 piksel ve akış yönü boyunca 512 piksel olarak belirlenmiş olup bu görüntüler üzerinde analizler yapılmıştır. 3.62 kW/cm^2 altında 20 $\mu\text{L}/\text{dk}$ akış hızıyla lazer uyarım alanından geçen FAD moleküllerine askorbat etkisi Şekil 10(a)'da görüntü verisi olarak sunulmuştur. Burada ilk görüntü verisi karanlık durumların oluşmadığı, yalnızca lazerin uyarım alanını



Şekil 10. 3.62 kW/cm² altında 20 µL/dk akış hızıyla lazer uyarım alanından geçen FAD moleküllerine farklı kütle fraksiyonlarında askorbat eklendiğinde oluşması beklenen kamera görüntülerinin ve normalize floresans sinyallerinin değişimleri. Simüle edilen görüntü verisinin (a) 2 renk ile (standart sCMOS kamera renk paleti) ve (b) 3 renkli ısı haritası yöntemleri ile gösterimi. Her görüntü verisinde yer alan kırmızı kesikli çizgi karanlık durumların oluşmadığı, lazerin kendi sinyalini göstermektedir.

gösterirken kırmızı kesikli çizgi ise bu uyarım alanından akış yönü boyunca elde edilen normalize uyarım sinyalini temsil etmektedir. Diğer görüntülerdeki yeşil çizgi ise akış yönü doğrultusunda görüntü verisinden elde edilen normalize floresans sinyalini temsil etmektedir. Kuvvetli redoks ajanı olan askorbatın kademeli olarak 0 mM'den 1 mM'ye artırılırken simüle edilen görüntülerin akış yönü boyunca parlaklık değerlerinin giderek zayıfladığı ve normalize floresans sinyal eğrilerinin lazerin kendi uyarım profiline göre giderek azaldığı açık bir şekilde gözlemlenmiştir. Lazer uyarım alanı boyunca oluşan bu zayıflamayı daha kapsamlı incelemek amacıyla aynı görüntü verileri 3 renkli ısı haritası yöntemi ile Şekil 10(b)'de yeniden simüle edilmiştir. Elde edilen ısı haritalarında askorbat miktarının artırılmasıyla oluşan görüntü alanının giderek sol tarafa doğru kaydığı ve görüntü alanının genişlediği açık bir biçimde gözlemlenmiştir. Karanlık radikallerin ve ışıkla ağarmış durumun oluşumunun üretilen ısı haritalarında kolaylıkla gözlemlenebilmesi, bu çalışmada önerilen yöntemin karanlık durum dedektörü olarak kullanılabilirliğini kanıtlamıştır.

IV. SONUÇ

Bu makalede ışığa ve çözücü ortamına duyarlı, çok küçük uyarım kesit alanına sahip ve zayıf floresan ışımaya yapabilen FMN ve FAD koenzimlerinin fotofiziksel geçişlerini çözme kapasitesine sahip mikroakışkan temelli bir floresans mikroskop sistemi için nümerik modelleme çalışmaları sunulmuştur. FMN ve FAD'nin moleküler yapısı, fotofiziksel özellikleri ve girdikleri reaksiyonlar göz önünde bulundurularak her iki molekül için farklı elektronik durum modeli kullanılmıştır. Bu modellerde yer alan elektronik durumlar 1. mertebeden lineer diferansiyel denklem sistemi olarak ele alınmış olup her bir elektronik durum popülasyonu zamana bağlı olarak çözülmüş, mikroakışkan çip ile lazer uyarım alanının geometrik boyutları ve mikroskop parametreleri kullanılarak görüntü ve sinyal verisi olarak elde edilmiştir. 20 µL/dk ve 2000 µL/dk akış değerleri için farklı deneysel koşullarda TRAST yöntemiyle ölçülmüş fotofiziksel geçiş hızları mevcut çalışmalardan toplanarak bu çalışmada önerilen yöntemle uyarlanmıştır. İki akış hızında da FMN ve FAD moleküllerinde lazer uyarım şiddetinin artırılmasıyla karanlık durumlara geçişlerin arttığı gözlemlenmiş olup normalize floresan

sinyalinde zayıflama gözlemlenmiştir. FMN molekülüne farklı miktarlarda etanol eklenerek ortamdaki oksijen miktarının artması sebebiyle triplet sönmülmesi 2000 $\mu\text{L}/\text{dk}$ akış hızında başarılı bir şekilde gözlemlenmiştir. Farklı akış hızlarında FMN molekülüne askorbat ve triptofan gibi redoks ajanları eklendiğinde simüle edilen sinyal eğrilerinde zayıflama görülerek foto-indirgenmiş karanlık radikallerin oluştuğu ortaya çıkmıştır. Normalize floresan sinyalindeki aynı zayıflama FAD molekülü için de gözlemlenmiş olup özellikle 20 $\mu\text{L}/\text{dk}$ akış hızında foto-indirgenmiş karanlık radikallerin oluşumuna ek olarak bu moleküllerin kuvvetli bir şekilde foto-bozunuma uğradığı ortaya çıkmıştır. FAD molekülüne kademeli olarak etanol eklenmesi sonucunda triplet sönmülmesinin ancak yüksek etanol konsantrasyonlarında gerçekleşebildiği ve etanol eklenmesi ile katlanmış yapıdaki FAD molekül popülasyonunun giderek azaldığı ortaya çıkmıştır. Sinyal analizlerine ek olarak, sinyallerin oluşturulmasında kullanılan görüntü verilerinin analizleri kapsamlı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. FAD fotofiziğine askorbat etkisi 2 renkli sCMOS kamera görüntü verisi olarak simüle edilmiş olup daha sonrasında 3 renkli ısı haritasına dönüştürülerek birbiriyle kıyaslanmıştır. Üretilen ısı haritalarından FAD moleküllerinde oluşan karanlık durumlar, lazer uyarım alanı üzerinde oluşan görüntüde genişleme, daralma ya da kayma gibi etkiler olarak ortaya çıkmıştır. Farklı deneysel yöntemlerle elde edilen fotofiziksel parametreler kullanılarak yapılan nümerik simülasyonlar, bu çalışmada önerilen yöntemin flavin gibi zayıf moleküllerin fotofiziksel geçişlerini başarılı bir şekilde çözümlenebildiğini kanıtlamıştır. Sunulan yöntem ve simülasyonlar ışına yapabildiği farklı tip floroforlara uyarlanabilecek olup hangi deneysel koşullarda daha etkin bir şekilde ölçümler yapılabileceği ile ilgili öngörü ve optimizasyon imkanı sağlayacaktır.

TEŞEKKÜR

Bu makale Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından fon desteğine hak kazanan 124F110 numaralı 3501 projesinin bilimsel bir ürünüdür. Yazarlar ve proje ekibi olarak bu çalışmaya katkılarından dolayı TÜBİTAK'a teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

[1] T. Ozawa, H. Yoshimura, and S. B. Kim, (2013). "Advances in fluorescence and bioluminescence imaging," *Analytical chemistry*, 85(2), 590-609.

- [2] C. Li, G. Chen, Y. Zhang, F. Wu, and Q. Wang, (2020). "Advanced fluorescence imaging technology in the near-infrared-II window for biomedical applications," *Journal of the American Chemical Society*, 142(35), 14789-14804.
- [3] S. Saurabh, S. Maji, and M. P. Bruchez, (2012). "Evaluation of sCMOS cameras for detection and localization of single Cy5 molecules," *Optics express*, 20(7), 7338-7349.
- [4] M. A. Albota, C. Xu, and W. W. Webb, (1998). "Two-photon fluorescence excitation cross sections of biomolecular probes from 690 to 960 nm," *Applied optics*, 37(31), 7352-7356.
- [5] P. A. van den Berg, J. Widengren, M. A. Hink, R. Rigler, and A. J. Visser, (2001). "Fluorescence correlation spectroscopy of flavins and flavoenzymes: photochemical and photophysical aspects," *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 57(11), 2135-2144.
- [6] J. Tornmalm, E. Sandberg, M. Rabasovic, and J. Widengren, (2019). "Local redox conditions in cells imaged via non-fluorescent transient states of NAD (P) H," *Scientific Reports*, 9(1), 15070.
- [7] B. Demirbay *et al.*, (2017). "Rheological properties of dextrin-riboflavin solutions under thermal and UV radiation effects," *Journal of Molecular Liquids*, 240, 597-603.
- [8] B. Demirbay, C. Akaoğlu, İ. Ulusaraç, and F. G. Acar, (2017). "Thermal and UV radiation effects on dynamic viscosity of gelatin-based riboflavin solutions," *Journal of Molecular Liquids*, 225, 147-150.
- [9] I. E. Kochevar, (1981). "Phototoxicity mechanisms: chlorpromazine photosensitized damage to DNA and cell membranes," *Journal of Investigative Dermatology*, 77(1), 59-64.
- [10] J. Widengren, (2022). "Transient State (TRAST) Spectroscopy and Imaging: Exploiting the Rich Information Source of Fluorophore Dark State Transitions in Biomolecular and Cellular Studies," Springer.
- [11] B. Demirbay, G. Baryshnikov, M. Haraldsson, J. Piguet, H. Ågren, and J. Widengren, (2023). "Photo-physical characterization of high triplet yield brominated fluoresceins by transient state (TRAST) spectroscopy," *Methods and applications in fluorescence*, 11(4), 045011.
- [12] G. Donnert, C. Eggeling, and S. W. Hell, (2007). "Major signal increase in fluorescence microscopy through dark-state relaxation," *Nature methods*, 4(1), 81-86.
- [13] R. Zondervan, F. Kulzer, S. B. Orlinskii, and M. Orrit, (2003). "Photoblinking of rhodamine 6G in poly (vinyl alcohol): Radical dark state formed through the triplet," *The Journal of Physical Chemistry A*, 107(35), 6770-6776.

- [14] P. Changenet, H. Zhang, M. Van der Meer, M. Glasbeek, P. Plaza, and M. Martin, (1998). "Ultrafast twisting dynamics of photoexcited auramine in solution," *The Journal of Physical Chemistry A*, 102(34), 6716-6721.
- [15] Y. Sasaki, N. Yanai, and N. Kimizuka, (2022). "Osmium complex–chromophore conjugates with both singlet-to-triplet absorption and long triplet lifetime through tuning of the heavy-atom effect," *Inorganic chemistry*, 61(16), 5982-5990.
- [16] S. C. Dirican and B. Demirbay, (2025). "A Novel Microfluidic-Based Fluorescence Detection Method Reveals Heavy Atom Effects on Photophysics of Fluorophores With High Triplet Quantum Yield: A Numerical Simulation Study," *Luminescence*, 40(1), e70090.
- [17] Y. Dong *et al.*, (2021). "Twisted BODIPY derivative: Intersystem crossing, electron spin polarization and application as a novel photodynamic therapy reagent," *Physical Chemistry Chemical Physics*, 23(14), 8641-8652.
- [18] E. Sandberg, J. Piguët, U. Kostiv, G. Baryshnikov, H. Liu, and J. Widengren, (2023). "Photoisomerization of Heptamethine Cyanine Dyes Results in Red-Emissive Species: Implications for Near-IR, Single-Molecule, and Super-Resolution Fluorescence Spectroscopy and Imaging," *The Journal of Physical Chemistry B*, 127(14), 3208-3222.
- [19] E. Sandberg, B. Demirbay, A. Kulkarni, H. Liu, J. Piguët, and J. Widengren, (2023). "Fluorescence Bar-Coding and Flowmetry Based on Dark State Transitions in Fluorescence Emitters," *The Journal of Physical Chemistry B*, 128(1), 125-136.
- [20] A. Kitamura, J. Tornmalm, B. Demirbay, J. Piguët, M. Kinjo, and J. Widengren, (2023). "Trans-cis isomerization kinetics of cyanine dyes reports on the folding states of exogenous RNA G-quadruplexes in live cells," *Nucleic acids research*, 51(5), e27-e27.
- [21] E. Sandberg, C. V. Srambickal, J. Piguët, H. Liu, and J. Widengren, (2023). "Local monitoring of photosensitizer transient states provides feedback for enhanced efficiency and targeting selectivity in photodynamic therapy," *Scientific Reports*, 13(1), 16829.
- [22] H. Hevekerl, J. Tornmalm, and J. Widengren, (2016). "Fluorescence-based characterization of non-fluorescent transient states of tryptophan—prospects for protein conformation and interaction studies," *Scientific Reports*, 6(1), 35052.
- [23] D. Magde, E. Elson, and W. W. Webb, (1972). "Thermodynamic fluctuations in a reacting system—measurement by fluorescence correlation spectroscopy," *Physical review letters*, 29(11), 705.
- [24] D. Magde, E. L. Elson, and W. W. Webb, (1974). "Fluorescence correlation spectroscopy. II. An experimental realization," *Biopolymers: Original Research on Biomolecules*, 13(1), 29-61.
- [25] S. A. Kim, K. G. Heinze, and P. Schwille, (2007). "Fluorescence correlation spectroscopy in living cells," *Nature methods*, 4(11), 963-973.
- [26] E. L. Elson, (2011). "Fluorescence correlation spectroscopy: past, present, future," *Biophysical journal*, 101(12), 2855-2870.
- [27] E. L. Elson, (2018). "Introduction to fluorescence correlation Spectroscopy—Brief and simple," *Methods*, 140, 3-9.
- [28] S. Sterrer and K. Henco, (1997). "Minireview: Fluorescence correlation spectroscopy (FCS)-A highly sensitive method to analyze drug/target interactions," *Journal of Receptors and Signal Transduction*, 17(1-3), 511-520.
- [29] P. Rigler and W. Meier, (2006). "Encapsulation of fluorescent molecules by functionalized polymeric nanocontainers: investigation by confocal fluorescence imaging and fluorescence correlation spectroscopy," *Journal of the American Chemical Society*, 128(1), 367-373.
- [30] J. Widengren, (2010). "Fluorescence-based transient state monitoring for biomolecular spectroscopy and imaging," *Journal of the Royal Society Interface*, 7(49), 1135-1144.
- [31] T. Spielmann, H. Blom, M. Geissbuehler, T. Lasser, and J. Widengren, (2010). "Transient state monitoring by total internal reflection fluorescence microscopy," *The Journal of Physical Chemistry B*, 114(11), 4035-4046.
- [32] V. Chmyrov, T. Spielmann, H. Hevekerl, and J. Widengren, (2015). "Trans-cis isomerization of lipophilic dyes probing membrane microviscosity in biological membranes and in live cells," *Analytical chemistry*, 87(11), 5690-5697.
- [33] Z. Du *et al.*, (2022). "Imaging Fluorescence Blinking of a Mitochondrial Localization Probe: Cellular Localization Probes Turned into Multifunctional Sensors," *The Journal of Physical Chemistry B*, 126(16), 3048-3058.
- [34] J. Mücksch, T. Spielmann, E. Sisamakias, and J. Widengren, (2015). "Transient state imaging of live cells using single plane illumination and arbitrary duty cycle excitation pulse trains," *Journal of Biophotonics*, 8(5), 392-400.
- [35] J. Tornmalm and J. Widengren, (2018). "Label-free monitoring of ambient oxygenation and redox conditions using the photodynamics of flavin compounds and transient state (TRAST) spectroscopy," *Methods*, 140, 178-187.

- [36] E. Sandberg, J. Piguët, H. Liu, and J. Widengren, (2023). "Combined Fluorescence Fluctuation and Spectrofluorometric Measurements Reveal a Red-Shifted, Near-IR Emissive Photo-Isomerized Form of Cyanine 5," *International Journal of Molecular Sciences*, 24(3), 1990.
- [37] N. Silaparasetty, (2020). Machine learning concepts with python and the jupyter notebook environment: Using tensorflow 2.0. Springer.
- [38] N. Silaparasetty and N. Silaparasetty, (2020). "Python programming in jupyter notebook," *Machine Learning Concepts with Python and the Jupyter Notebook Environment: Using Tensorflow 2.0*, 119-145.
- [39] B. Fowler *et al.*, (2009). "Wide dynamic range low light level CMOS image sensor," in *Proc. Int. Image Sensor Workshop*, 1-4.
- [40] N. Blow, (2007). "Microfluidics: in search of a killer application," *Nature Methods*, 4(8), 665-670.
- [41] R. Chityala and S. Pudipeddi, (2020). *Image processing and acquisition using Python*. CRC Press.
- [42] K. Gillen-Christandl, G. D. Gillen, M. Piotrowicz, and M. Saffman, (2016). "Comparison of Gaussian and super Gaussian laser beams for addressing atomic qubits," *Applied Physics B*, 122, 1-20.
- [43] R. Vidunas, (2005). "Expressions for values of the gamma function," *Kyushu Journal of Mathematics*, 59(2), 267-283.
- [44] M. Ehrenberg and R. Rigler, (1974). "Rotational brownian motion and fluorescence intensify fluctuations," *Chemical Physics*, 4(3), 390-401.
- [45] Ü. Mets, J. Widengren, and R. Rigler, (1997). "Application of the antibunching in dye fluorescence: measuring the excitation rates in solution," *Chemical Physics*, 218(1-2), 191-198.
- [46] P. Kask, P. Piksarv, and Ü. Mets, (1985). "Fluorescence correlation spectroscopy in the nanosecond time range: Photon antibunching in dye fluorescence," *European Biophysics Journal*, 12, 163-166.
- [47] T. Basché, W. Moerner, M. Orrit, and H. Talon, (1992). "Photon antibunching in the fluorescence of a single dye molecule trapped in a solid," *Physical review letters*, 69(10), 1516.
- [48] W. Holzer *et al.*, (2005). "Photo-induced degradation of some flavins in aqueous solution," *Chemical Physics*, 308(1-2), 69-78.
- [49] H. Görner, (2007). "Oxygen uptake after electron transfer from amines, amino acids and ascorbic acid to triplet flavins in air-saturated aqueous solution," *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 87(2), 73-80.
- [50] P. Heelis, (1982). "The photophysical and photochemical properties of flavins (isoalloxazines)," *Chemical Society Reviews*, 11(1), 15-39.
- [51] H. Chosrowjan, S. Taniguchi, N. Mataga, F. Tanaka, and A. J. Visser, (2003). "The stacked flavin adenine dinucleotide conformation in water is fluorescent on picosecond timescale," *Chemical physics letters*, 378(3-4), 354-358.
- [52] P. A. Van den Berg, K. A. Feenstra, A. E. Mark, H. J. Berendsen, and A. J. Visser, (2002). "Dynamic conformations of flavin adenine dinucleotide: simulated molecular dynamics of the flavin cofactor related to the time-resolved fluorescence characteristics," *The Journal of Physical Chemistry B*, 106(34), 8858-8869.
- [53] T. Nakabayashi, M. S. Islam, and N. Ohta, (2010). "Fluorescence decay dynamics of flavin adenine dinucleotide in a mixture of alcohol and water in the femtosecond and nanosecond time range," *The Journal of Physical Chemistry B*, 114(46), 15254-15260.