



FEN BİLİMLERİ VE MATEMATİK ALANINDA YENİLİKÇİ YAKLAŞIMLAR

Kitap Adı : **Fen Bilimleri ve Matematik Alanında Yenilikçi Yaklaşımlar**

İmtiyaz Sahibi/Publisher : Gece Kitaplığı

Genel Yayın Yönetmeni/Editor in Chief : Doç. Dr. Atilla ATIK

Proje Koordinatörü/Project Coordinator : Ethem BİLİCİ

Kapak&İç Tasarım/Cover&Interior Design : Özge ERGENEL

Sosyal Medya/Social Media : Arzu ÇUHACIOĞLU

Yayına Hazırlama : Gece Akademi  Dizgi Birimi

Sertifika/Certificate No : 34559

ISBN : 978-605-288-808-7

Editör/Editors

Prof. Dr. Hüsniye AKA SAĞLIKER

Doç. Dr. Sadık ÇOĞAL

Doç. Dr. Seçkin KÖROĞLU

The right to publish this book belongs to Gece Kitaplığı. Citation can not be shown without the source, reproduced in any way without permission. Gece Akademi is a subsidiary of Gece Kitaplığı.

Bu kitabın yayın hakkı Gece Kitaplığı'na aittir. Kaynak gösterilmeden alıntı yapılamaz, izin almadan hiçbir yolla çoğaltılamaz. Gece Akademi, Gece Kitaplığı'nın yan kuruluşudur.

Birinci Basım/First Edition ©Aralık 2018/ Ankara/TURKEY ©copyright



Gece Publishing

ABD Adres/ USA Address: 387 Park Avenue South, 5th Floor, New York, 10016, USA

Telefon/Phone: +1 347 355 10 70

Gece Kitaplığı

Türkiye Adres/Turkey Address: Kızılay Mah. Fevzi Çakmak 1. Sokak Ümit Apt. No: 22/A Çankaya/Ankara/TR

Telefon/Phone: +90 312 431 34 84 - +90 555 888 24 26

web: www.gecekitapligi.com — www.gecekitap.com

e-mail: geceakademi@gmail.com



FEN BİLİMLERİ
VE MATEMATİK
ALANINDA
YENİLİKÇİ
YAKLAŞIMLAR

İÇİNDEKİLER

CHAPTER 1

BİTKİLERDE ABİYOTİK STRES VE MELATONİN

Armağan KAYA.....7

CHAPTER 2

BAKTERİYEL DİRENCİN KESİRSEL MERTEBEDEN
MATEMATİKSEL MODELİNİN KARARLILIK ANALİZİ

Bahatdin DAŞBAŞI, İlhan ÖZTÜRK..... 25

CHAPTER 3

ALLEE ETKİSİYLE POPÜLASYON BÜYÜME MODELİNİN
KARARLILIK ANALİZİ VE TÜRKİYE NÜFUS TAHMİNİ

Bahatdin DAŞBAŞI..... 45

CHAPTER 4

RİEMANN TİP q -İNTEGTAL İÇEREN İKİ DEĞİŞKENLİ
 q -BALÁZS-SZABADOS-KANTOROVICH
OPERATÖRLERİNİN YAKLAŞIM ÖZELLİKLERİ

Esmâ YILDIZ ÖZKAN 75

CHAPTER 5

TOKSİKOLOJİ ANALİZLERİNDE *In Vitro* YAKLAŞIMLAR

In Vitro APPROACHES TO TOXICOLOGICAL ANALYSIS

*Güllü KAYMAK, Harika Eylül ESMER DURUEL,
Sena Kardelen DİNÇ, Şeyma KIZILKAYA,
Figen Esin KAYHAN*..... 89

CHAPTER 6

MİKRO ELEKTROMEKANİK SİSTEM (MEMS) GYROLARI
KULLANILARAK ÜÇ BOYUTLU SİSTEM KONTROLERİNİN
YAZILIMI VE ELEKTRONİK DEVRE TASARIMLARININ
GELİŞTİRİLMESİ

Ömer Faruk YILMAZ, Hamdi ERCAN,
Muharrem Selim CAN.....155

CHAPTER 7

LQR VE PID KONTROL METOTLARI KULLANILARAK BİR
İNSANSIZ HAVA ARACININ RÜZGAR ETKİSİNDE
KONTROLÜ

Muharrem Selim CAN, Hamdi ERCAN171

CHAPTER 8

α MERTEBELİ KONVEKS VE YILDIZIL FONKSİYONLAR

Hasan BAYRAM.....183

CHAPTER 9

MAĞARALARDA BİYOÇEŞİTLİLİK VE ANTİBİYOTİK
DİRENÇLİLİĞİ

Fatma Seçil KOÇ, Nermin SARIGÜL199

CHAPTER 10

CANOPY KÜMELEME ALGORİTMASI- WEKA
UYGULAMASI

Serpil SEVİMLİ DENİZ.....223

CHAPTER 11

BOR-KATKILI TETRAGONAL KARBON (T-C5)'İN İLK-
PRENSİPLERLE İNCELENMESİ FIRST-PRINCIPLES
INVESTIGATION OF BORON-SUBSTITUTED TETRAGONAL
CARBON (T-C5)

Sezgin AYDIN
237



BİTKİLERDE ABİYOTİK STRES VE MELATONİN



Armağan KAYA¹

1. Bitkilerde Stres

Bitkilerin büyüme, gelişme, üreme kapasitesi ya da hayatta kalmasını etkileyen her türlü dışsal faktör “stres” olarak tanımlanır. Bitkilerde stres abiyotik stres (kuraklık, tuzluluk, yüksek ya da düşük sıcaklık, kirleticiler vb.) ve biyotik stres (bakteri, fungus vb) olarak iki ana grupta sınıflandırılır (Tablo 1). Bitkiler doğal koşullarda ya da tarımsal koşullarda bu stres faktörlerine maruz kalabilirler. Stres bitki büyüme ve gelişmesini olumsuz yönde etkileyerek ürünlerde nitelik ve nicelik kayıplarına yol açmakta ve bu nedenle insan ve hayvanların beslenmelerini de olumsuz yönde etkilemektedir (Kaçar ve ark. 2002).

¹ Alanya Alaaddin Keykubat Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Mühendislik Temel Bilimleri Bölümü



Abiyotik Stres Faktörleri			Biyotik Stres Faktörleri
Fiziksel Faktörler	Stres	Kimyasal Stres Faktörleri	
Kuraklık		Hava kirliliği	Rekabet
Sıcaklık		Allelokimyasallar	Allelopati
Radyasyon		Tuzlar	Simbiyosis
Sel		Toksinler	İnsan Tahribi
Makinalar		Pestisitler	Hastalık etkenleri
Elektrik		Besinler (inorganik mad)	Böcekler
Magnetik alan, Rüzgar		Toprak pH'sı	

Tablo 1. Bitkilerde stres kaynakları (Kadioğlu, 2007)

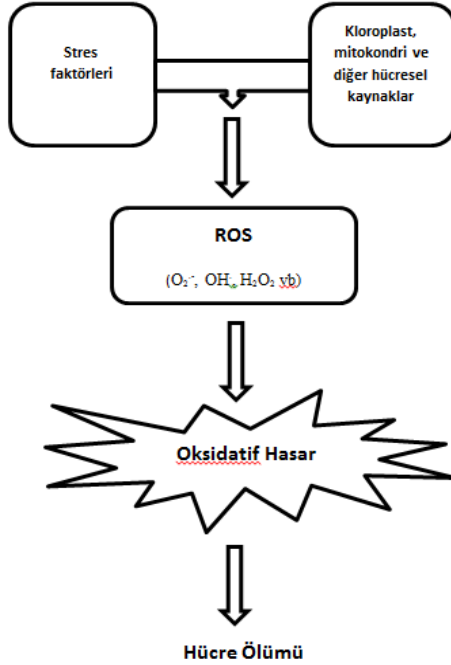
Bitkilerin stres şartları ile başa çıkabilme yeteneği stres direnci olarak kabul edilir. Bitkiler strese karşı direnç sağlayan birtakım adaptasyonlara sahiptirler. Örneğin ısı stresine maruz kalan bitkilerde yaprak alanının küçültülmesi, absorblanan ışığın azalması için yaprakların kıvrılması ve kondüksiyona bağlı ısı kaybı ısı stresine karşı geliştirilen adaptasyonlardır. Yaprak alanının küçülmesi ve yaprakların kalın bir kütikula ile sahip olması, yaprakların absisyonu, kökün toprağın derinlerine doğru ilerlemesi ve stomaların kapatılması ise bitkilerin kuraklığa karşı geliştirdiği mekanizmalara örnek olarak verilebilir. Ayrıca bitkilerin bir strese maruz kalması onların strese alışma yeteneğini artırır (Taiz ve Zeiger, 2008)

Doğada bitkiler aynı anda birden fazla sayıda stres faktörüne maruz kalabilirler. Çevresel stres faktörlerinin etkileri birbirinden bağımsız olmayıp ilişki halindedir. Örneğin tuzluluk ve donma stresleri su stresini de tetikleyebilir. Çözünmüş maddelerin yüksek konsantrasyonda bulunması kök bölgesinde toprakta su potansiyelini azaltarak su eksikliğine benzer bir ortam oluşturmakta ya da bitki dokularında hücre dışı buz oluşumu hücrel dehidrasyona yol açabilmektedir.



Stres faktörleri arasındaki interaksiyonlar bitkilerin strese karşı oluşturdukları cevapları da etkilemektedir (Rhodes ve Nadolska-Orczyk, 2001). Bu etkileşim antagonistik ya da sinerjistik olabilir (Rejeb ve ark. 2014). Kaya (2017) pestisit stresine maruz kalan ayçiçeğinde herbisitın meydana getirdiği olumsuz etkilerin tuz stresi uygulanması ile daha da arttığını rapor etmiştir. Şahin ve ark. (2018) kuraklık ve tuzluluk streslerinin ayrı ayrı uygulandığında lahanada gelişimi olumsuz yönde etkilediğini, bu streslerin eş zamanlı uygulanmasının bitkide görülen olumsuz etkileri arttırdığını bildirmiştir. Slama ve ark. (2015) *Sesuvium portulacastrum* bitkisinde su stresine ve tuzluluğa eş zamanlı maruz kalan gruplarda sadece su stresine maruz kalan gruplara kıyasla bazı stres cevaplarında değişimler saptandığını rapor etmişlerdir. Araştırmacılar eş zamanlı strese maruz kalan bitkilerde sadece su stresine maruz kalanlara kıyasla MDA, karotenoid ve yaprak su içeriklerinde azalma ve prolin birikiminde artış görüldüğünü belirlemişlerdir.

Stres faktörleri bitkilerde oksidatif hasara sebep olan reaktif oksijen türlerinin (ROS) birikimini teşvik ederler. ROS serbest radikallerden (süperoksit radikali (O_2^-), hidroksil radikali ($OH\cdot$) vb) ve radikal olmayan formlar (hidrojen peroksit (H_2O_2) ve singlet oksijen (1O_2))'dan oluşur. ROS bitkilerde büyüme, gelişme, hücre döngüsü, programlanmış hücre ölümü, sistemik sinyal oluşumu gibi süreçlerle ilgili genlerin ifadesini etkiler. Normal koşullarda ROS hücreSEL metabolizmanın bir sonucu olarak üretilebilir ancak hücrede ROS'un üretilmesi ve temizlenmesi arasında bir denge vardır. Stres şartlarında bu denge bozulur ve ROS'un hücreSEL seviyesi artar (Gill and Tuteja, 2010, Caverzan et al.). Artan ROS bitkilerde protein lipid, karbonhidrat ve DNA'ya zarar vererek oksidatif hasara yol açar (Şekil 1).



Şekil 1. ROS üretimi ve hücre ölümü
(Gill and Tuteja, 2010)

Bitkiler stresin olumsuz etkilerinden korunmak amacıyla moleküler düzeyde bazı mekanizmalar geliştirmiştir. Bu mekanizmalar ozmolitler, ısı şok proteinleri ve LEA proteinleri gibi koruyucu moleküllerin sentezi, makromolekül ve iyonların homeostazisi ve ROS'un sentezi ve detoksifikasyonunu içerir. Stres şartlarında bitkiler yaşamlarını sürdürebilmek için ROS'un kontrolünü ve detoksifikasyonunu sağlayan bir antioksidan sisteme sahiptir (Büyük ve ark. 2012). Antioksidan sistem stres altındaki bitkilerde artan ROS birikimini ve dolayısıyla oksidatif hasarı engeller. Antioksidan sistem enzimatik (süperosit dismutas, katalaz, askorbat peroksidaz, peroksidaz vb) ve non-enzimatik (askorbik asit (C vitamini), α -tokoferol vb) bileşenlerden oluşmaktadır.



Antioksidan bileşenler ROS'u temizleyerek ya da daha az zararlı türlere dönüştürerek stres şartlarında bitkinin hayatta kalmasına yardım eder (Mandal et al 2009).

Antioksidan enzimler	Enzim kodları	Katalizlenen Reaksiyonlar
Süperoksit dismutaz (SOD)	EC 1.15.1.1	$O_2^- + O_2^- + 2H^+ \rightarrow 2H_2O_2 + O_2$
Katalaz (CAT)	EC 1.11.1.6	$H_2O_2 \rightarrow H_2O + \frac{1}{2} O_2$
Askorbat peroksidaz (APX)	EC 1.11.1.11	$H_2O_2 + AA \rightarrow 2H_2O + DHA$
Guaiaacol peroksidaz (GPX)	EC 1.11.1.7	$H_2O_2 + GSH \rightarrow H_2O + GSSG$
Monodehidroaskorbat redüktaz (MDHAR)	EC 1.6.5.4	$MDHA + NAD(P)H \rightarrow AA + NAD(P)^+$
Dehidroaskorbat redüktaz (DHAR)	EC 1.8.5.1	$DHA + 2GSH \rightarrow AA + GSSG$
Glutatyon Redüktaz (GR)	EC 1.6.4.2	$GSSG + NAD(P)H \rightarrow 2GSH + NAD(P)^+$

Tablo 2. Bazı antioksidan enzimler ve katalizledikleri reaksiyonlar (Gill ve Tuteja, 2010)

Yukarıdaki tabloda bitki dokusunda bulunan antioksidan enzimler ve katalizledikleri reaksiyonlar görülmektedir. Bununla birlikte bitki dokusunda bulunan ve enzimatik olmayan antioksidanlar da ROS hasarına karşı hücrel koruma sağlarlar. Örneğin askorbik asit bitki dokusunda bol miktarda bulunan bir antioksidan olup O_2^- , OH^- ve H_2O_2 'yi doğrudan temizler. Tokoferoller ROS'u ve lipit radikallerini temizleyerek lipit peroksidasyonunun kırılmasında rol oynarlar. Enzimatik olmayan antioksidanların bir diğer örneği olan glutatyon ise hem oksidatif strese karşı koruyucu rol oynar hem de enzimatik düzenleme, hücrelerin farklılaşması, hücre ölümü gibi süreçlerle ilişkilidir (Büyük ve ark. 2012).

Olumsuz çevresel koşullarda strese cevap olarak bitkilerde antioksidan bileşiklerin seviyeleri değişiklik gösterir. Kaya ve Doganlar (2016) herbisit stresine maruz kalan tütünde APX, CAT, GST ve GR enzim aktivitelerinin strese cevap olarak arttığını belirtmiştir. Benzer şekilde Cui ve ark (2018) kuraklık stresi

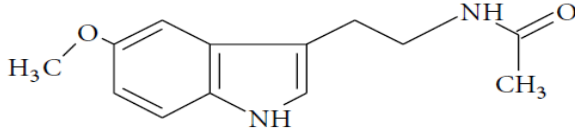


uygulanan buğdayda stresin şiddetinin artışına paralel olarak APX, GPX, GST, GR ve MDHAR enzim aktivitelerinin arttığını, Ding ve ark (2017) soğuk stresine maruz kalan domates fidelerinde SOD, CAT, APX ve GPX aktiviteleri ile GSH içeriğinin kontrole kıyasla arttığını rapor etmişlerdir.

Antioksidan savunma sistemi dışında bitkinin strese karşı adaptasyonunda rol oynayan bir diğer mekanizma bitki hormonlarıdır. Bitki hormonları bitkilerde büyüme, gelişme ve hücre farklılaşması gibi çeşitli metabolik süreçleri etkileyen organik moleküllerdir. Hem normal şartlarda hem de stres şartlarında önemli fizyolojik süreçleri düzenlerler. Stres şartları altında bir takım savunma cevaplarının düzenlenmesine aracı olarak bitkilerin stres adaptasyonunu artırmada önemli rol oynarlar. Bitki hormonları ayrı ayrı ya da birbiri ile koordinasyonlu olarak fonksiyon görebilirler (Nadeem et al. 2016). Strese maruz kalan bitkilerde bir savunma cevabı olarak hormon seviyeleri değişebilir (Yurekli et al., 2004; Doganlar, 2012; Iqbal et al., 2014; Kaya ve Doganlar 2016). Ayrıca yapılan pek çok çalışmada bitkilere eksojen olarak uygulanan bitkisel hormonların bazı fizyolojik ve biyokimyasal süreçleri etkileyerek bitki stres dayanıklılığını arttırdığını göstermektedir (Wang et al., 2007; Cui et al., 2010; Li et al., 2011; Wang et al., 2011; Liang et al., 2012; Agami and Mohamed, 2013, Kaya ve Doganlar 2016).

2. Melatonin

Melatonin (N-acetyl-5-methoxytryptamine) ilk kez 1958 yılında sığır beyin üstü bezinden izole edilmiş bir indolik bileşiktir (Lerner et al. 1958) (Şekil 2). Melatoninin hayvansal organizmalarda ruh hali, uyku, retina fizyolojisi, üreme davranışları, sirkadiyen ritim ve immünolojik gelişimi düzenlediği bilinmektedir. Bakterilerde, tek ve çok hücreli alglerde, omurgasızlarda ve funguslarda da bulunan melatoninin varlığı 1995 yılında bitkilerde de keşfedilmiştir (Dubbels et al. 1995; Hattori et al, 1995; Arnao ve Hernandez-Ruiz, 2006).



Melatonin

(N-acetyl-5-methoxytryptamine)

Şekil 2. Melatoninin moleküler yapısı (Arnao, 2014)

Yirmiden fazla monokotil ve dikotil familyasından elde edilen melatonin bitkilerin kök, sürgün, meyve, yaprak, çiçek, tohum gibi organlarında bulunmaktadır. Melatonin seviyesi sadece farklı bitki türleri arasında değil aynı zamanda aynı türün farklı çeşitleri arasında da değişiklik göstermektedir (Van Tassel et al, 2001; Hattori et al, 1995; Dubbes et al. 1995; Manchester et al 2000; Posmyk and Janas, 2009). Aynı bitkinin farklı organlarında ve farklı gelişim dönemlerinde de melatonin içeriği değişebilmektedir. Örneğin Korkmaz ve ark (2014) iki farklı biber çeşidi üzerinde yaptıkları araştırmada her iki biber çeşidinde de melatonin birikiminin kotiledon aşamasındaki fidelerde ve olgun tohumlarda arttığını ve bitkinin gelişimsel dönemine bağlı olarak yaprak, meyve ve köklerdeki melatonin konsantrasyonunun değiştiğini belirtmişlerdir.

Bitkilerde önemli bir sinyal molekülü olan melatoninin sentezinde iki önemli yol vardır. İlki normal şartlar altında gerçekleşen triptofan/triptamin/N-asetilserotonin/melatonin biyosentez yoluken ikinci yol fazla miktarlarda serotonin üretildiği zaman meydana gelen triptofan/triptamin/serotonin/5-metoksitriptamin/melatonin biyosentez yoludur. Bitkilerin melatonin biyosentez kapasitesi serotoninin melatonine dönüşmesinden çok triptofanın serotonine dönüşmesi ile ilişkilidir. Melatonin biyosentezinde birçok ara ürün kloroplast, endoplazmik retikulum ve sitoplazma gibi hücre içi kısımlarda üretilir. Biyosentez



yoluna bağılı olarak, melatoninin sentezindeki en son hücre içi kısım kloroplast ya da sitoplazmadır ve bu durum bitkilerde melatoninin hareket yönünü etkiler (Back ve ark. 2016).

Melatonin bitkilerde oksin, etilen, absisik asit, jasmonik asit ve salisilik asit gibi bilinen fitohormonların görevleri ile örtüşen çok sayıda etkiye sahiptir. Ancak melatoninin hormon olarak sınıflandırılabilmesi için özellikle yüksek affiniteli bağlanma bölgelerinin ve sinyal iletim yolu öğelerinin tanımlanması ve serbest taşıyan melatoninin ve onun organizma içindeki hareketinin belirlenmesini içeren birtakım kriterlerin araştırılması gerekir (Hardeland, 2016). Melatonin bitkilerde IAA, giberellin, sitokinin, absisik asit ve etilen metabolizmasının yanı sıra oksin taşıyan proteinler gibi bitki hormonları ile ilişkili gen ifadelerinin düzenlenmesinde de önemli bir rol oynar (Arnao ve Hernandez-Ruiz, 2018). Bitkilerde melatoninin en önemli görevlerinden biri bitkilerde büyüme ve gelişmenin düzenlenmesinde rol oynamasıdır. Melatoninin ve indol asetik asit (IAA)'nın biyosentezi triptofan aminoasiti üzerinden başlar ve hem melatonin hem de IAA benzer yapısal fonksiyonel gruplara sahiptir (Park, 2011). Bu nedenle melatonin bitki büyüme ve gelişmesinde IAA'ya benzer şekilde rol oynar. Melatonin bitkilerde hücre bölünmesi, kök ve koleoptil gelişimi, tropizma cevaplarının oluşması ve sirkadiyen ritmin düzenlenmesinde rol oynamaktadır. Melatonin bitkilerde hem büyüme ve çimlenme oranını hem de bitki verimliliğini artırır ve yaprak senesensini geciktirir, Ayrıca melatonin farklı stres koşullarına maruz kalan bitkilerde strese karşı toleransı arttırmaktadır (Posmyk ve Janas 2009; Park 2011; Arnao 2014).



3. Abiyotik Stres ve Melatonin İlişkisi

3.1. Strese Maruz Kalan Bitkilerde İçsel Melatonin Seviyeleri

Melatonin sıcak, soğuk, kuraklık, toksik kimyasallar, bakteri ve funguslarla enfeksiyon gibi çoğu stres durumunda iyileştirici etkiye sahip olup bunlara ek olarak yara iyileşmesini destekler, senesensi geciktirir ve bir antioksidant ve fotoprotektan olarak rol oynar (Hardeland, 2016). Melatonin hücre redoks statüsünü stabilize edip ROS birikimine ve diğer zararlı çevresel etkilere karşı hücreleri koruduğu için antioksidan özelliğe sahiptir. Melatonin düşük konsantrasyonlarda hem suda hem de yağda çözündüğü için hidrofilik ve hidrofobik bir antioksidandır. Ayrıca melatoninin küçük boyutlu oluşu ROS birikimine karşı hücreleri korumak amacıyla bu bileşiğin hücresel kompartmanlar arasındaki hareketini kolaylaştırır (Posmyk ve Janas, 2009).

Olumsuz çevre koşullarında melatonin stresle ilişkili genlerin ifadelerini ve antioksidan enzim aktivitelerini arttırarak ve lipit peroksidasyonunu azaltarak bitkilerin stres toleransını teşvik eder (Campos ve ark. 2019). Bitki dokularındaki melatonin seviyesi çevresel şartlardan etkilenir. Ortamın ışık ya da sıcaklığındaki ani değişimlerin ya da çevresel stres ajanlarının etkisi ile bitkilerdeki melatonin seviyesi artar. Örneğin çevresel kirleticilere karşı yüksek toleransa sahip akuatik bir bitki olan su sümbülü yüksek bir melatonin içeriğine sahiptir. Su sümbülünün yüksek melatonin seviyesi su ve toprak kirleticilerine karşı bitkinin stres toleransını arttırır (Tan ve ark 2007). Benzer şekilde ozon hasarına karşı bitkilerin duyarlılıkları birbirinden farklıdır. Ozon hasarına dayanıklı türlerdeki melatonin içeriği hassas olan türlerden daha yüksektir (Dubbels ve ark 1995). Yüksek melatonin içeriği filizlenen tohumlarda da koruyucu rol oynar. Örneğin filizlenen ayçiçeği tohumlarında melatonin seviyesi artar (Cho ve ark 2018). Çünkü germ dokusu oksidatif strese karşı çok



hassastır ve melatonin bir antioksidan olarak germ dokusunu ROS'un yol açtığı oksidatif hasardan korur (Manchester ve ark 2000, Zhang et al 2014). Olumsuz çevre koşullarına maruz kalan çeşitli bitkilerde içsel melatonin seviyesinin arttığını gösteren çok sayıda araştırma mevcuttur. Afreen ve ark (2006) UV ye maruz kalan *Glycyrrhiza uralensis* bitkisinde içsel melatonin miktarının arttığını saptamış ve melatonin içeriğindeki artışı melatoninin antioksidan savunmadaki rolü ile ilişkilendirmişlerdir. Araştırmacılar melatoninin UV stresi etkisi ile üretilen ROS'un sebep olduğu oksidatif hasara karşı bitkiyi koruduğunu belirtmişlerdir. Korkmaz ve ark. (2016) üşüme stresine maruz kalan biber fidelerinde içsel melatonin seviyesinin önemli ölçüde arttığını ve dışarıdan uygulanan melatoninin bitki dokularındaki melatonin seviyesinin artışı teşvik ettiğini belirtmişlerdir. Araştırmacılar içsel melatoninin seviyesindeki artışı bitkinin üşümeye karşı bir stres cevabı olarak değerlendirmişlerdir. Arnao ve Hernandez-Ruiz (2009a) farklı kimyasal ajanlara maruz kalan arpa bitkisinin köklerinde stresin etkisi ile melatonin biyosentezinin teşvik edildiğini ve dokularda melatonin içeriğinin önemli derecede arttığını gözlemlemiş ve bu artışı kimyasal stres ajanlarına karşı melatoninin bitkiyi koruyucu rolü ile ilişkilendirmişlerdir.

3.2. Dışsal melatonin uygulamalarının bitkilerde stres toleransı üzerine etkileri

Bitkilerin stres dayanıklılığının dokularındaki yüksek melatonin içeriği ile alakalı olduğunun ortaya çıkması ile birlikte bilim insanları bitkilerde melatonin seviyesini arttırıcı yönde araştırmalar yapmaya başlamıştır. Bu çalışmaların bir kısmı transgenik bitkiler üzerine odaklanmıştır. Genetik mühendisliği alanında yapılan çalışmalar ile içsel melatonin seviyesi yüksek ve bu nedenle strese dayanıklı transgenik bitkiler üretilmiştir. Bitkilerde endojen melatonin seviyesini arttırmanın bir diğer yolu ise bitkiye dışarıdan melatonin uygulaması yapmaktır. Bitkilere melatoninin dışsal uygulaması



sadece stres toleransını arttırmaz, aynı zamanda vejetatif ve reproduktif gelişim süreçlerini de etkiler. Dışsal melatonin uygulaması yapraklara püskürtme yolu ile, tohum uygulaması olarak ya da sulama suyu ile köklerden yapılabilir (Park, 2011; Yakupoğlu ve ark 2018).

Dışsal melatonin uygulaması yapılan arpa bitkisinin yapraklarında uygulanan melatonin konsantrasyonundaki artışa paralel olarak hem içsel melatonin seviyesi artmış hem de klorofil kaybının azalması ile birlikte yaprak senesensi gecikmiştir (Arnao ve Hernandez-Ruiz, 2009b). Melatoninin senesens üzerindeki geciktirici etkisi bir anti-senesens hormonu olan sitokinininden daha fazladır (Thomas ve Howarth, 2000).

Melatonin hem bitkilerdeki antioksidan enzim aktivitelerini hem de bu enzimlerle ilgili hücrel mRNA seviyelerini etkiler (Rodriguez ve ark. 2004). Dışsal melatonin uygulaması olumsuz çevre koşullarına maruz kalan bitkilerde stres direncini arttırmaktadır. Kaya ve İnan (2018) kuraklık ve tuzluluk streslerine maruz kalan tütünde dışsal melatonin uygulamasının lipid peroksidasyonunun son ürünü olup oksidatif hasarın önemli bir göstergesi olan MDA birikimini azaltıp, pigment ve prolin içerikleri ile antioksidan enzim aktivitelerini arttırdığını ve bu nedenle dışsal uygulanan melatoninin tütünde stres direncini geliştirdiğini rapor etmiştir. Tuz stresine maruz kalan *Brassica napus*'da dışsal melatonin uygulaması sonucu antioksidan enzim aktiviteleri artmış, prolin ve çözünür proteinin birikimi indüklenmiştir. Ayrıca melatonin uygulaması tuz stresi altındaki *Brassica napus* fidelerinde biyokütleyi ve kök gelişimini arttırmıştır (Zeng ve ark 2018). Benzer şekilde Ding et al. (2017) soğuk stresine maruz kalan domatestede, Cui et al. (2017) kuraklığa maruz kalan buğdayda ve Korkmaz ve ark. (2016) üşüme stresine maruz kalan biberde melatonin ön uygulamasının antioksidan enzim aktivitelerini artırarak bitki stres toleransını geliştirdiğini rapor etmişlerdir. Melatonin bir antioksidan olarak antioksidan enzimleri oksidatif



hasardan koruyabilir ya da onların biyosentezini teşvik edebilir (Posmyk ve Janas, 2009). Üşüme, kuraklık ve ağır metal kirliliği gibi stres koşullarında melatonin antioksidan sistemle ilişkili genlerin ifadelerini indükleyerek bitkilerin stres toleransını artırır (Li ve ark. 2019; Nawaz ve ark 2018; Cui ve ark. 2017).

Sonuç olarak bitkiler yetiştikleri çevrede pek çok stres faktörüne ayrı ayrı ama genellikle de eş zamanlı maruz kalabilirler ve stres şartlarında hayatta kalabilmek için bazı savunma mekanizmaları geliştirmişlerdir. Antioksidan sistem ROS'u temizleyerek ya da daha az zararlı türlere dönüştürerek stres altındaki bitkilerin hayatta kalmasında anahtar rol oynar. Melatonin bitkilerde hücre bölünmesi, kök ve kaleoptil gelişimi, tropizma cevaplarının oluşması ve sirkadiyen ritmin düzenlenmesi gibi fizyolojik süreçlerde rol oynamakla birlikte aynı zamanda bitkilerin strese karşı toleransını artırır. Dışsal uygulanan melatoninin soğuk, kuraklık ve ozmotik stres gibi çeşitli streslere maruz kalan bitkilerde bazı anti-stres genlerinin up-regülasyonu düzenlemesi ve çevresel stresler altında endojen melatonin seviyesinin artışı melatoninin abiyotik streslere karşı bir sinyal molekül olarak önemli rol oynadığını göstermektedir (Arnao ve Hernandez-Ruiz, 2014). Melatoninin çevresel streslere karşı bitki toleransını arttırdığının belirlenmesi ile birlikte yüksek düzeyde melatonin sentezleyebilen strese dayanıklı transgenik bitkiler üretilmiştir (Zhang ve ark 2014).

Kaynaklar

1. Afreen F., Zobayed S.M.A., Kozai T. 2016. Melatonin in *Glycyrrhiza uralensis*: response of plant roots to spectral quality of light and UV-B radiation. Journal of Pineal Research, 41, 108–115.
2. Agami R.A., Mohamed G.F. 2013. Exogenous treatment with indole-3-acetic acid and salicylic acid alleviates cadmium toxicity in wheat seedlings. Ecotoxicology and Environmental Safety 94, 164–171.
3. Arnao M. B. 2014. Phytomelatonin: discovery, content, and role in plants. Advances in Botany.



4. Arnao M.B., Herna' ndez-Ruiz J. (2014). Melatonin: plant growth regulator and/or biostimulator during stress? Trends in Plant Science, 19(12), 789-797.
5. Arnao M.B., Herna' ndez-Ruiz, J. 2006. The physiological function of melatonin in plants. Plant Signaling & Behavior 1:3, 89-95.
6. Arnao M.B., Hernandez-Ruiz J. 2009a. Chemical stress by different agents affects the melatonin content of barley roots. Journal of Pineal Research. 46, 295-299.
7. Arnao M.B., Hernandez-Ruiz J. 2009b. Protective effect of melatonin against chlorophyll degradation during the senescence of barley leaves. Journal of Pineal Research, 46 (1), 58-63.
8. Arnao M.B., Herna' ndez-Ruiz J. 2018. Melatonin and its relationship to plants hormones. Annals of Botany. 121, 195-207.
9. Back, K., Tan D-X., Reiter R. J. 2016. Melatonin biosynthesis in plants: multiple pathways catalyze tryptophan to melatonin in the cytoplasm or chloroplasts. Journal of Pineal Research. 426-437.
10. Büyük, İ., Soydam-Aydın, S., Aras, S. 2012. Bitkilerin stres koşullarına verdiği moleküler cevaplar. Türk Hij. Den. Biyol. Derg. 69(2) : 97 – 110.
11. Campos C.N., Avile R.G., Dazio de Souza K.R., azevedo L.M., Alves J.D. 2019. Melatonin reduces oxidative stress and promotes drought tolerance in young *Coffea arabica* L. plants. Agriculture Water Management. 211, 37-47.
12. Caverzan A., Casassola A., Patussi Brammer S. 2016. Reactive oxygen species and antioxidant enzymes involved in plant tolerance to stress. Abiotic and Biotic Stress in Plants - Recent Advances and Future Perspectives. Intech publication.
13. Cho M.H., No H.K., Prinyawiwatkul W. 2008. Chitosan treatments affect growth and selected quality of sunflower sprouts. Journal of Food Science 73, 70-77.
14. Cui, G., Zhao, X., Liu, S., Sun, F., Zhang, C., Xi, Y. 2017. Beneficial effects of melatonin in overcoming drought stress in wheat seedlings. Plant Physiology and Biochemistry. 118, 138-149.



15. Cui, J., Zhang, R., Wu, G .L., Zhu, H. M.,Yang, H. 2010. Salicylic acid reduced napropamide toxicity by preventing its accumulation in rapeseed (*Brassica napus* L.). Archives of Environmental Contamination and Toxicology. 59, 100–108
16. Ding F, Liu B, Zhang S. Exogenous melatonin ameliorates cold-induced damage in tomato plants. Scientia Horticulturae. 2017;219:264–271.
17. Doganlar, Z. B. 2012. Physiological and genetic responses to pesticide mixture treatment of *Veronica beccabunga*. Water, Air Soil Pollution. 223, 6201–6212.
18. Dubbels R, Reiter RJ, Klenke E, Goebel A, Schnakenberg E, Ehlers C, Schiwara HW, Schloot W. 1995. Melatonin in edible plants identified by radioimmuno assay and high performance liquid chromatography-mass spectrometry. Journal of Pineal Research. 18, 28-31.
19. Gill, S. S., Tuteja, N. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. Plant Physiology and Biochemistry. 48, 909–930.
20. Hardeland R. 2016. Melatonin: Another phytohormone? Research & Reviews: Journal of Botanical Sciences. 5(2), 1-4.
21. Hattori A, Migitaka H, Iigo M, Itoh M, Yamamoto K, Ohtani-Kaneko R, Hara M, Suzuki
22. Iqbal, N., Umar, S., Khan, N. A., Khan, M. I. R. 2014. A new perspective of phyto- hormones in salinity tolerance :regulation of proline metabolism. Environmental and Experimental Botany. 100, 34–42.
23. Kaçar B., Katkat V., Öztürk, Ş. 2013. Bitki Fizyolojisi, Nobel Yayıncılık, Ankara.
24. Kadioğlu A. 2011. Bitki Fizyolojisi, Trabzon.
25. Kaya A. 2017. Exogenous ascorbic acid improves defence responses of sunflower (*Helianthus annuus*) exposed to multiple stresses. Acta Biologica Hungarica 68(3), 290–299.
26. Kaya A., Inan M. 2018. Kuraklık ve Tuz Streslerine Maruz Kalan Tütün (*Nicotiana tabacum* L.) Bitkisinde Bazı Fizyolojik ve Biyokimyasal Parametreler Üzerine Melatoninin Etkiler. KSÜ Tarım ve Doğa Bilimleri Dergisi 21(4), 559-564.



27. Kaya, A., Doganlar, Z.B. 2016. Exogenous jasmonic acid induces stress tolerance in tobacco (*Nicotiana tabacum*) exposed to imazapic. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 124, 470-479.
28. Korkmaz A., Değer Ö., Cuci Y. 2014. Profiling the melatonin content in organs of the pepper plant during different growth stages. *Scientia Horticulturae*, 172, 242-247.
29. Korkmaz A., Demir Ö., Kocaçınar, F., Cuci Y. 2016. Enhancing chilling stress tolerance in pepper seedlings by foliar application of melatonin. *KSU Journal of Natural Sciences*, 19(3), 348-354.
30. Lerner A.B., Case J.D., Takahashi Y. 1958. Isolation of melatonin, a pineal factor that lightness melanocytes. *Journal of the American Chemical Society*, 80, 2587-2591.
31. Li Y., Zhao H., Duan B., Korpelainen H., Li C. 2011. Effect of drought and ABA on growth, photosynthesis and antioxidant system of *Cotinus coggygia* seedlings under two different light conditions. *Environmental and Experimental Botany*. 71, 107-113.
32. Li J., Arkorful E., Cheng S., Zhou Q., Li H., Chen X., Sun K., Li X. 2018. Alleviation of cold damage by exogenous application of melatonin in vegetatively propagated tea plant (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze). *Scientia Horticulturae*. 238, 356-362.
33. Liang L., Lu Y.L., Yang H. 2012. Toxicology of isoproturon to the food crop wheat as affected by salicylic acid. *Environmental Science and Pollution Research* 19(6), 2044-54.
34. Manchester L.C., Tan D-X, Reiter R.J, Park W., Monis K., Qi W. B. 2000. High levels of melatonin in the seeds of edible plants possible function in germ tissue protection. *Life Sciences*. 67, 3023-3029.
35. Mandal S., Yadav S., Yadav S., Nema R.K. 2009. Antioxidants: A Review. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 1(1), 102-104.



36. Nadeem S.J., Ahmad M., Zahir Z. A., Kharal M. A. 2016. Role of phytohormones in stress tolerance of plants. *Plant, Soil and Microbes*, 385-421.
37. Nawaz, M.A., Jiao, Y., Chen, C., Shireen, F., Zheng, Z., Imtiaz, M., Bie, A., Huang, Y. 2018. Melatonin pretreatment improves vanadium stress tolerance of watermelon seedlings by reducing vanadium concentration in the leaves and regulating melatonin biosynthesis and antioxidant-related gene expression. *Journal of Plant Physiology*, 220, 115-127.
38. Park W.J. 2011. Melatonin as an endogenous plant regulatory signal: debates and perspectives. *Journal of Plant Biology*. 54, 143-149.
39. Posmyk M.M., Janas K.M. (2009). Melatonin in plants. *Acta Physiologiae Plantarum*, 31, 1-11.
40. Rejeb I. B., Pastor V., Mauch-Mani B. 2014. Plant responses to simultaneous biotic and abiotic stress: molecular mechanisms. *Plants* 3, 458-475.
41. Rhodes D., Nadolska-Orczyk A.2011. *Plant Stress Physiology*, Encyclopedia Of Life Science. Nature Publishing Group.
42. Rodriguez C., Mayo J.C., Sainz R.M., Antolin I., Herrera F., Martin V., Reither R.J. 2004. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role of melatonin. *Journal of Pineal Research*. 36, 1-9.
43. Sahin U., Ekinici M., Ors S., Turan M., Yildiz S., Yildirim E. 2018. Effects of individual and combined effects of salinity and drought on physiological, nutritional and biochemical properties of cabbage (*Brassica oleracea* var. capitata). *Scientia Horticulturae*, 240, 196-204.
44. Slama I, Rabet R. M., Ksouri R., Talbi O., Debez A., Abdelly C. 2015. Water deficit stress applied only or combined with salinity affects physiological parameters and antioxidant capacity in *Sesuvium portulacastrum*, *Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*. 213, 69-76.
45. Hattori A., Migitaka H., Ligo M., Itoh M., Yamamoto K., Kaneko R.O., hara M., Suzuki T., Reiter R.J. 1995. Identification of melatonin in plants and its effects on plasma melatonin levels and binding to melatonin receptors in vertebrates. *Biochemistry and Molecular Biology international*. 35, 627-34.
46. Taiz L., Zeiger E. 2008. *Bitki Fizyolojisi*, Palme Yayıncılık, Ankara.



47. Tan D-X., Manchester L. C., Helton P., Reiter R.J. 2007. Phytoremediative capacity of plants enriched with melatonin. *Plant Signaling & Behavior* 2:6, 514-516.
48. Thomas H., Howarth C.J. 2000. Five ways to stay green. *Journal of Experimental Botany* 51, 329-337
49. Van Tassel D.L., Roberts N.J., Lewy A., O'Neill S.D. 2001. Melatonin in plant organs. *Journal of Pineal Research*. 31, 8-15.
50. Wang, H. H., Shan, X. Q., Wen, B., Owens, G., Fang, J., Zhang, S. Z. 2007. Effect of indole-3-acetic acid on lead accumulation in maize (*Zea mays* L.) seedlings and the relevant antioxidant response. *Environmental and Experimental Botany*. 61, 246-253.
51. Wang, C., Zhang, S., Wang, P. F., Hou, J., Qian, J., Ao, Y., Lu, J., Li, L., 2011. Salicylic acid
52. involved in the regulation of nutrient elements uptake and oxidative stress in *Vallisneria natans* (Lour.) Hara under Pb stress. *Chemosphere* 84 (1), 136-142.
53. Yakupoğlu G., Köklü Ş., Korkmaz A. 2018. Bitkilerde melatonin ve üstlendiği görevler. *KSÜ Tarım ve Doğa Dergisi* 21(2):264-276.
54. Yurekli, F., Porgalı, Z. B., Turkan, I. 2004. Variations in abscisic acid, indol-3-asetic acid, gibberellic acid and zeatin concentrations in two banana species subjected to salt stress. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*. 46, 201-212.
55. Zeng, L., Cai, J.S., Li, J.J., Lu, G.Y., Li, C.S., Fu, G.P., Zhang, X.K., Ma, H.G., Liu, Q.Y., Zou, X.L., Cheng, Y. 2018. Exogenous application of a low concentration of melatonin enhances salt tolerance in rapeseed (*Brassica napus* L.) seedlings. *Journal of Integrative Agriculture*, 17(2), 328-335.
56. Zhang, N., Sun, Q., Zhang, H., Cao, Y., Weeda, S., Ren, S., Guo, Y.D. 2014. Roles of melatonin in abiotic stress resistance in plants. *Journal of Experimental Botany*, 66(3), 647-56.



BAKTERİYEL DİRENCİN KESİRSEL MERTEBEDEN MATEMATİKSEL MODELİNİN KARARLILIK ANALİZİ

CHAPTER 2

Bahattin DAŞBAŞI¹,
İlhan ÖZTÜRK²

1. Giriş

Biyoloji matematiksel fikirler açısından zengin bir kaynaktır. Dolayısıyla literatürde farklı senaryolar altında geliştirilen birçok biyolojik popülasyon büyüme modelleri bulunmaktadır [1]. Özellikle enfeksiyonların matematiksel olarak modellenmesi ile ilgili birçok çalışma mevcuttur [2].

Enfeksiyonlar, insanlık tarihi boyunca hastalıkların ana nedeni olmuşlardır. Bu enfeksiyonlar arasında özellikle bakteriyel enfeksiyonlar dikkati çekmektedir. Bakteriyel enfeksiyonlarla mücadelede bilinen en kullanışlı ve eski yöntem antibiyotik kullanımıdır [3]. Bu tür tedavi yönteminde antimikrobiyal ajanlara karşı direnç kavramı, insan enfeksiyonlarını tedavi etmek için bu ajanları kullanmanın hem kaçınılmaz hem de doğal sonucudur [4]. Antibiyotiklerin kullanımının sonucu olarak bakteriler tarafından geliştirilen direnç, bakterileri ya kontrol etmek ya da yok etmek için üretilen antibiyotiklerin etkilerine direnmek için bakteri yeteneği olarak tanımlanır [5]. Tedavi yöntemi olarak

¹ Dr. Öğr. Üyesi, Kayseri Üniversitesi Uygulamalı Bilimler Fakültesi

Muhasebe ve Finans Yönetimi Bölümü

² Prof. Dr. Erciyes Üniversitesi Fen Fakültesi Matematik Bölümü



antibiyotiğin her bir yeni sınıfının geliştirilmesi, kısa süre sonra bu sınıfa direnç kazanan bakterinin yeni bir türünü ortaya çıkarmaktadır [6]. Bir antibiyotik, fonksiyonu bakterinin gelişimini durdurmak olduğunda bakteriyostatik etkiye, fonksiyonu bakteriyi yok etmek olduğunda bakteriyosidal etkiye sahip olarak ifade edilir. Ama bu fark, bakteri türüne ve gelişim aşamasına ve kullanılan ilaç konsantrasyonuna bağlı olduğu için açıkça belli değildir. Dolayısıyla *Mycobacterium tuberculosis* ve *Helicobacter pylori* gibi bakterilerle mücadelede birden fazla antibiyotik ilaçlarının kullanımı gerekmektedir [7]. Bakteriyel direncin bu sıkıntılarına rağmen bu tür enfeksiyonlarla mücadele etmek için bilinen en yaygın metot yine antibiyotik ilaçlarının kullanımıdır.

Matematiksel modeller, sadece bireylerin belli bir popülasyonundaki bulaşıcı hastalıkların yayılımını analiz etmez, aynı zamanda bir bireydeki enfeksiyon ve muhtemel yeniden enfeksiyon süreçlerinin büyüklüğünü ve zamanlamasını tahmin eden, kullanışlı ve önemli yardımcı araçlardandır. Bu modeller, önceden genellikle planlama, önleme ve kontrol stratejileri için kullanılıyorken, daha sonradan özel bir patojene maruz kalan bireyleri tedavi etmek için uygun tedavi/müdahale programlarında etkili olarak kullanılmaya başlanmıştır [8].

Kesirsel mertebeden diferansiyel denklemlerde denge noktasının kararlılık bölgesi en azından onların tam mertebeli olanları kadardır. Bu bağlamda burada önerilen matematiksel model; bakterinin sebep olduğu enfeksiyon durumunda, hassas ve dirençli bakteri yoğunlukları ve çoklu antibiyotik tedavisinin etkileşimini inceleyen bir kesirsel mertebeden matematiksel modeldir. Ayrıca çalışmada kullanılan parametrelere bağlı olarak modelin kararlılık analizi yapıldı ve grafiksel olarak bu analizin sonuçları incelenmiştir.

2. Temel Tanım ve Kavramlar

Bu kısımda Caputo anlamında kesirsel mertebeden integral ve diferansiyel kavramları tanıtıldı. Daha sonra



2-boyutlu lineer olmayan otonom kesirsel mertebeden diferansiyel denklem sistemlerinin denge noktalarının kararlılıkları ile ilgili kriter verilmiştir.

Tanım 2.1. $t > 0$ için $f(t)$ fonksiyonun Caputo anlamında $\beta \in R^+$ mertebeli kesirli integrali:

$$I^\beta f(t) = \int_0^t \frac{(t-s)^{\beta-1}}{\Gamma(\beta)} f(s) ds \quad (2.1)$$

ile ve $\alpha \in (n-1, n]$ mertebeli kesirli türevi ise

$$D^\alpha f(t) = I^{n-\alpha} D^n f(t), \quad D = \frac{d}{dt}. \quad (2.2)$$

şeklinde tanımlanır [9].

Lemma2.1. $\alpha \in (0,1]$ olmak üzere,

$$x(0) = x_0 \text{ ve } y(0) = y_0 \quad (2.3)$$

başlangıç koşullarıyla verilen,

$$\begin{aligned} D^\alpha x(t) &= f(x, y) \\ D^\alpha y(t) &= g(x, y) \end{aligned} \quad (2.4)$$

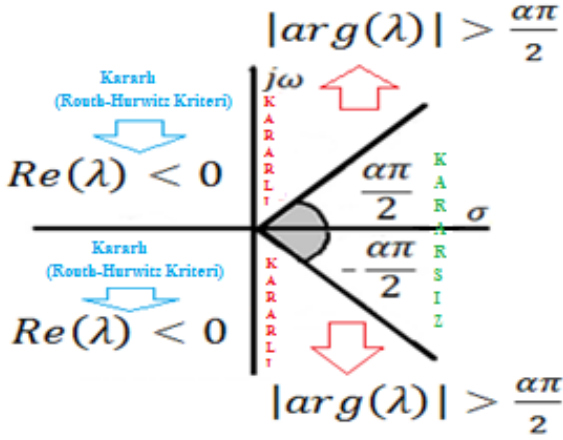
2-boyutlu lineer olmayan otonom kesirsel mertebeden diferansiyel denklem sistemi göz önüne alınsın. Ayrıca $f(x^*, y^*) = g(x^*, y^*) = 0$ denklem sisteminden elde edilen denge noktası (x^*, y^*) ile

gösterildiği varsayalım. $J = \begin{bmatrix} \frac{\partial f}{\partial x} & \frac{\partial f}{\partial y} \\ \frac{\partial g}{\partial x} & \frac{\partial g}{\partial y} \end{bmatrix}$ ile (2.4) sisteminin

jakobiyen matrisini göstermek üzere, $Det(J_{(x,y)=(x^*,y^*)} - \lambda I_2) = 0$ denkleminde elde edilen λ_1 ve λ_2 öz değerleri ;

$$\left(|arg(\lambda_1)| > \frac{\alpha\pi}{2}, \quad |arg(\lambda_2)| > \frac{\alpha\pi}{2} \right), \quad (2.5)$$

koşullarını sağlar ise (x^*, y^*) denge noktası (2.4) sistemi için lokal asimptotik kararlı (LAS) denge noktasıdır [10]. Kesirsel mertebeden diferansiyel denklem sistemleri için denge noktasının kararlılık bölgesi tam mertebeliye göre daha geniştir. (2.5) de ifade edilen koşullar aşağıdaki gibi detaylandırılabilir.



Şekil 2.1. (2.4) deki kesirsel mertebeden sistemin özdeğerlerinin durumlarına göre denge noktasının kararlılık bölgesi

$j = \sqrt{-1}$ için σ ve ω sırasıyla özdeğerlerin reel ve sanal kısımlarını göstermek üzere (2.4) deki α kesirsel mertebeden diferansiyel denklem sisteminin kararlılık bölgesi Şekil 2.1 de gösterilmiştir. Bu şekilden açıkça görüleceği üzere kesirsel mertebeli durumdaki kararlılık bölgesi tam mertebeli olana göre daha geniştir.

$\text{Det}(J_{(x,y)=(x^*,y^*)} - \lambda I_2) = 0$ denkleminde elde edilen λ öz değerlerine ait karakteristik polinom:

$$p(\lambda) = \lambda^2 + a_1\lambda + a_2 = 0. \quad (2.6)$$

şeklinde olsun. Hem (2.5) koşulları hem de (2.6) polinomu birlikte dikkate alındığında; (x^*, y^*) denge noktasının lokaliasimtotik kararlılık koşulları ya Routh-Hurwitz kararlılık koşullarını ($a_1, a_2 > 0$) sağlaması ya da

$$a_1 < 0, 4a_2 > (a_1)^2, \left| \tan^{-1} \left(\frac{\sqrt{4a_2 - (a_1)^2}}{a_1} \right) \right| > \frac{\alpha\pi}{2}. \quad (2.7)$$

koşullarını sağlaması olarak verilebilir [11,12].



3. Matematiksel Model

Bu çalışmada önerilen model Mondragón ve arkadaşlarının [7] önerdikleri modelin kesirsel mertebeden ve çeşitli senaryolar altında farklı parametreler eklenerek modifiye edilmiş ifadesi şeklindedir. Ayrıca bu çalışmada [11] de ifade edilen çalışmadan farklı olarak bakterilerin büyüme biçimlerinin üstel olarak varsayılmasının yanı sıra hem çoklu antibiyotiğe dirençli bakterinin direnç kaybı hem de çoklu antibiyotiğe hassas ve dirençli bakterilerin eşleşerek direnç kazanımı gibi faktörler de gözönüne alınmıştır [4]. Bu doğrultuda, t zamanındaki çoklu antibiyotiğe hassas bakteri popülasyon boyutu $S(t)$ ile dirençli bakteri popülasyon boyutu $R(t)$ ile ve $i = 1, 2, \dots, n$ olmak üzere i -inci antibiyotik konsantrasyonu ise $A_i(t)$ ile gösterilmiş olup $q, (0, 1]$ aralığındaki reel sayı için $(n + 2)$ tane kesirsel mertebeden oluşan lineer olmayan otonom diferansiyel denklem sistemi şeklindeki matematiksel model;

$$\begin{aligned} D^q S &= \beta_S S - S \sum_{i=1}^n \alpha_i A_i - S \sum_{i=1}^n d_i A_i + cR - \sigma SR \\ D^q R &= \beta_R R + S \sum_{i=1}^n \alpha_i A_i - cR + \sigma SR \\ D^q A_i &= -\mu_i A_i, i = 1, 2, \dots, n \end{aligned} \quad (3.1)$$

olarak önerilmiştir. Modelde D^q , q -inci mertebeden Caputo anlamındaki kesirseltürevi ifade etmektedir. Ayrıca $i = 1, 2, \dots, n$ için

$$c, \sigma, d_i, \alpha_i, \mu_i > 0. \quad (3.2)$$

eşitsizliği sağlanır. Modelde $S \equiv S(t), R \equiv R(t), A_i \equiv A_i(t)$ ve başlangıç koşulları ise $S(t_0) = S_0, R(t_0) = R_0, A_i(t_0) = A_{i_0}$ biçimindedir. (3.1) modelinde kullanılan parametrelerin ifadeleri aşağıda verilmiştir.

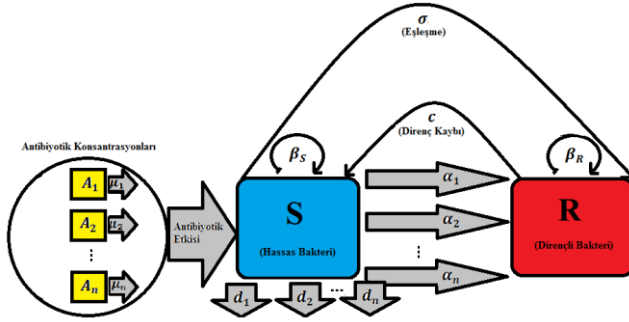
Bakterilerin üstel bir şekilde çoğaldıkları varsayılmıştır. Dolayısıyla β_S ve β_R sırasıyla çoklu antibiyotiğe hassas ve dirençli bakteri popülasyonlarının net gelişim oranlarıdır (doğum oranı-ölüm oranı). Kimyasal kontroller sonucunda direncin ortaya çıkmasına sebep olan spesifik mutasyonlar, bakterilerin



çoğalma kapasitesi ve/veya rekabet yeteneğini azaltmasıyla sonuçlanan kalıtsal bir uyum bedeline sahiptir. Dolayısıyla β_S ve β_R rasyonel sayıları için

$$\beta_S > \beta_R \quad (3.3)$$

olarak kabul edilmektedir. i -inci antibiyotik uygulaması sırasında, bu antibiyotiğe maruz kalan hassas bakterilerin mutasyonlarına bağlı olarak bir miktar dirençli bakteri ortaya çıkabilir. α_i , i -inci antibiyotiğe maruz kalma nedeniyle hassas bakterilerin mutasyon oranı olmak üzere bu durum modelde $\alpha_i A_i S$ terimi vasıtasıyla gösterilmiştir. Hassas bakteriler ayrıca antibiyotiklerin etkisi nedeniyle ölürler ki modelde bu durum $\bar{d}_i$, i -inci antibiyotiğe maruz kalma nedeniyle hassas bakterilerin ölüm oranı olmak üzere $\bar{d}_i C_i S$ terimi vasıtasıyla gösterilmiştir. Buna ek olarak, antibiyotiğe karşı en yaygın direnç kazanım biçimi, hassas ve dirençli bakteriler arasında genlerin transferini içeren eşleşme (conjugation) yoluyla olur. Bu transfer iyi karışmış bir popülasyonda bitişik bakteriler arasında gerçekleştiği için popülasyondaki antibiyotiğe hassas ve direnç bakteri düzeylerine orantılı olan σ eşleşme oranıyla kütle hareket kinetiğine sahip olduğu modelde varsayıldı. Dirençli bakterilerin direnç kaybı oranı c dir. Son olarak, i -inci antibiyotik konsantrasyonubirey başına sabit bir μ_i oranında vücuttan atılır. Böylece yukarıdaki senaryolar altında (3.1) modelindeki değişkenlerin arasındaki ilişkiler şematik olarak aşağıdaki şekilde gösterilebilir.



Şekil 3.1.(3.1) modelindeki bakteri popülasyonları ve antibiyotik konsantrasyonları arasındaki etkileşimin parametrelere göre şematik gösterimi

Şekil 3.1. de gösterilen bakteri popülasyonları ve çoklu antibiyotik konsantrasyonları arasındaki ilişki genelleştirilmiş bir bakteriyel enfeksiyon durumunu tarif etmektedir.

Tanım 3.1. (3.1) de verilen kesirsel mertebeden model $0 < q \leq 1, t \in (0,1]$ olmak üzere aşağıda gösterilen matris formunda yeniden yazılabilir:

$$\begin{aligned} D^q X(t) &= AX(t) + x_1(t)BX(t) \\ X(0) &= X_0. \end{aligned} \quad (3.4)$$



Burada,

$$\begin{aligned}
 X(t) &= \begin{pmatrix} S(t) \\ R(t) \\ A_1(t) \\ A_2(t) \\ \vdots \\ A_n(t) \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} x_1(t) \\ x_2(t) \\ x_3(t) \\ x_4(t) \\ \vdots \\ x_{n+2}(t) \end{pmatrix}, X_0 = \begin{pmatrix} S(0) \\ R(0) \\ A_1(0) \\ A_2(0) \\ \vdots \\ A_n(0) \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} x_1(0) \\ x_2(0) \\ x_3(0) \\ x_4(0) \\ \vdots \\ x_{n+2}(0) \end{pmatrix}, \\
 A &= \begin{pmatrix} \beta_s & c & 0 & 0 & \dots & 0 \\ 0 & (\beta_r - c) & 0 & 0 & \dots & 0 \\ 0 & 0 & -\mu_1 & 0 & \dots & 0 \\ 0 & 0 & 0 & -\mu_2 & \dots & 0 \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ 0 & 0 & 0 & 0 & \dots & -\mu_n \end{pmatrix}, \\
 B &= \begin{pmatrix} 0 & -\sigma & -(\alpha_1 + d_1) & -(\alpha_2 + d_2) & \dots & -(\alpha_n + d_n) \\ 0 & \sigma & \alpha_1 & \alpha_2 & \dots & \alpha_n \\ 0 & 0 & 0 & 0 & \dots & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & \dots & 0 \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ 0 & 0 & 0 & 0 & \dots & 0 \end{pmatrix},
 \end{aligned} \tag{3.5}$$

şeklinde dir.

Tanım 3.2. Tanım 3.1. göz önüne alınmak üzere, $X(t) = (S(t) R(t) A_1(t) \dots A_n(t))^T$ için $C^*[0, T]$ seti $[0, T]$ aralığında $X(t)$ sürekli sütun vektörlerinin seti olsun. Bu durumda $X(t) \in C^*[0, T]$ vektörünün normu $\|X(t)\| = \sum_{i=1}^{n+2} \sup_t |x_i(t)|$ olarak yazılır.

Önerme 3.1. Eğer $X(t) \in C^*[0, T]$ ise (3.4) sistemi tek bir çözüme sahiptir.

İspat $D^\alpha X(t) = AX(t) + x_1(t)BX(t)$ olsun. Bu durumda, $X(t) \in C^*[0, T]$ vektörü $F(X(t)) \in C^*[0, T]$ şeklindedir. Ayrıca, $X(t), Y(t) \in C^*[0, T]$ ve $X(t) \neq Y(t)$ olacak şekildeki vektörler için:

$$\begin{aligned}
 &\|F(X(t)) - F(Y(t))\| \\
 &= \|(AX(t) + x_1(t)BX(t)) - (AY(t) + y_1(t)BY(t))\| \\
 &= \|AX(t) + x_1(t)BX(t) - AY(t) - y_1(t)BY(t)\| \\
 &= \left\| A(X(t) - Y(t)) + x_1(t)BX(t) - y_1(t)BY(t) \right. \\
 &\quad \left. - \underbrace{(x_1(t)BY(t) - x_1(t)BY(t))}_0 \right\| \\
 &= \|A(X(t) - Y(t)) + x_1(t)B(X(t) - Y(t)) + (x_1(t) - y_1(t))BY(t)\|
 \end{aligned}$$



$$\begin{aligned}
 &\leq (\|A(X(t) - Y(t))\| + \|x_1(t)B(X(t) - Y(t))\| \\
 &\quad + \|(x_1(t) - y_1(t))BY(t)\|) \\
 &\leq \left(\|A\| \|X(t) - Y(t)\| + \|B\| |x_1(t)| \|X(t) - Y(t)\| \right. \\
 &\quad \left. + \|B\| \frac{|x_1(t) - y_1(t)|}{\|X(t) - Y(t)\|} \|Y(t)\| \right) \\
 &\leq (\|A\| + \|B\| |x_1(t)| + \|B\| \|Y(t)\|) \|X(t) - Y(t)\| \\
 &\leq \left(\|A\| + \|B\| \left(\frac{|x_1(t)|}{\|X(t)\|} + \|Y(t)\| \right) \right) \|X(t) - Y(t)\|, \\
 &\leq (\|A\| + \|B\| (\|X(t)\| + \|Y(t)\|)) \|X(t) - Y(t)\|
 \end{aligned}$$

ve böylece

$$\|F(X(t)) - F(Y(t))\| \leq L \|X(t) - Y(t)\|$$

elde edilir. Burada $L = (\|A\| + \|B\|(M_1 + M_2)) > 0$ ve M_1 ve M_2 pozitif sabitler olup $X(t), Y(t) \in C^*[0, T]$ olduğundan dolayı $\|X(t)\| \leq M_1$, $\|Y(t)\| \leq M_2$ biçimindedir. Dolayısıyla (3.4) sisteminin tek bir çözümü vardır.

4. (3.1) Matematiksel Modelinin Kalitatif Analizi

Bu kısımda (3.1) de ifade edilen modelin denge noktaları bulunarak bu denge noktalarının kararlılık analizi yapılmıştır.

4.1. Denge Noktaları (3.1) sisteminin denge noktalarının genel ifadesi $E(\bar{S}, \bar{R}, \bar{A}_1, \bar{A}_2, \dots, \bar{A}_n)$ olarak gösterilsin.

Önerme 4.1. (3.1) sistemindeki modelini $i = 1, 2, \dots, n$ için enfeksiyondan bağımsız denge noktası olan $E_0(0, 0, 0, \dots, 0)$ noktası her zaman vardır. Ayrıca $\beta_S, -\beta_R > 0$ olduğunda $E_1(\frac{c-\beta_R}{\sigma}, \frac{\beta_S}{\beta_R} \frac{\beta_R-c}{\sigma}, 0, \dots, 0)$ denge noktası biyolojik olarak anlamlı olup vardır.

İspat (3.1) sisteminin denge çözümü aşağıdaki sistemin çözümü ile bulunur.



$$\begin{aligned}
 \beta_S \bar{S} - \bar{S} \sum_{i=1}^n \alpha_i \bar{A}_i - \bar{S} \sum_{i=1}^n d_i \bar{A}_i + c \bar{R} - \sigma \bar{S} \bar{R} &= 0 \\
 \beta_R \bar{R} + \bar{S} \sum_{i=1}^n \alpha_i \bar{A}_i - c \bar{R} + \sigma \bar{S} \bar{R} &= 0 \\
 -\mu_i \bar{A}_i &= 0, \quad i = 1, 2, \dots, n
 \end{aligned} \tag{4.1}$$

$-\mu_i \bar{A}_i = 0$ eşitliğinden elde edilen $\bar{A}_i = 0$ ifadesi (4.1) sistemindeki birinci ve ikinci denklemlerde yerine yazılırsa,

$$\begin{aligned}
 \beta_S \bar{S} + c \bar{R} - \sigma \bar{S} \bar{R} &= 0 \\
 \bar{R}(\beta_R - c + \sigma \bar{S}) &= 0
 \end{aligned} \tag{4.2}$$

elde edilir. (4.2) sistemindeki ikinci denklemden ya $\bar{R} = 0$ ya da $\bar{S} = \frac{c - \beta_R}{\sigma}$ bulunur.

- $\bar{R} = 0$ olsun. Bu durumda (4.2) sisteminin ilk denklemden $\bar{S} = 0$ elde edilir. Böylece $E_0(0, 0, 0, \dots, 0)$ denge noktası elde edilir. Bu denge noktası biyolojik olarak anlamlıdır.
- Diğer durum olan $\bar{S} = \frac{c - \beta_R}{\sigma}$ olsun. Bu değer yine (4.2) sisteminin ilk denkleminde yerine yazılmasıyla $\bar{R} = \frac{\beta_S \beta_R - c}{\beta_R \sigma}$ değeri elde edilir. Dolayısıyla denge noktası $E_1(\frac{c - \beta_R}{\sigma}, \frac{\beta_S \beta_R - c}{\beta_R \sigma}, 0, \dots, 0)$ şeklinde bulunur. Bu denge noktasının biyolojik olarak anlamlı olabilmesi için $\frac{c - \beta_R}{\sigma} > 0$ ve $\frac{\beta_S}{\beta_R} < 0$ olmalıdır. (3.2) ve (3.3) eşitsizlikleri birlikte gözönüne alındığında bu denge noktasının biyolojik olarak anlamlı olabilmesi için

$$\beta_S, -\beta_R > 0 \tag{4.3}$$

koşulu bulunur.



Böylece sonuç olarak aşağıdaki tablo verilebilir.

Tablo 4.1. (3.1) modelinin denge noktaları ve bu noktalar için biyolojik varlık koşulları

Denge Noktası	Biyolojik Varlık Koşulu
$E_0(0,0,0,\dots,0)$	Her zaman vardır.
$E_1(\frac{c-\beta_R}{\sigma}, \frac{\beta_S \beta_R - c}{\beta_R \sigma}, 0, \dots, 0)$	$\beta_S, -\beta_R > 0$

4.2. Denge Noktalarının Kararlılık Analizi: $i = 1, 2, \dots, n$ için (3.1) sisteminin sağ tarafındaki fonksiyonlar,

$$\begin{aligned}
 f(S, R, A_1, \dots, A_n) &= \beta_S S - S \sum_{i=1}^n \alpha_i A_i - S \sum_{i=1}^n d_i A_i + cR - \sigma SR \\
 g(S, R, A_1, \dots, A_n) &= \beta_R R + S \sum_{i=1}^n \alpha_i A_i - cR + \sigma SR \\
 h_i(S, R, A_1, \dots, A_n) &= -\mu_i A_i
 \end{aligned} \tag{4.4}$$

şeklinde olsun.

Önerme 4.2. (3.1) sisteminin enfeksiyonsuz (enfeksiyondan serbest) denge noktası olan $E_0(0,0,0,\dots,0)$ noktası eğer $\beta_S < 0$ ise kararlıdır. Ayrıca (4.3) eşitsizlikleri sağlandığında ortaya çıkan $E_1(\frac{c-\beta_R}{\sigma}, \frac{\beta_S \beta_R - c}{\beta_R \sigma}, 0, \dots, 0)$ denge noktası kararlıdır.

İspat $J = \begin{pmatrix} f_S & f_R & f_{A_1} & \dots & f_{A_n} \\ g_S & g_R & g_{A_1} & \dots & g_{A_n} \\ (h_1)_S & (h_1)_R & (h_1)_{A_1} & \dots & (h_1)_{A_n} \\ \vdots & \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ (h_n)_S & (h_n)_R & (h_n)_{A_1} & \dots & (h_n)_{A_n} \end{pmatrix}$ olacak şekilde

(4.4)deki denklemlerden elde edilen jakobiyen matris;



$$J = \begin{pmatrix} \left(\beta_S - \sum_{i=1}^n (\alpha_i + d_i) A_i - \sigma R \right) & (c - \sigma S) & -S(\alpha_1 + d_1) & \dots & -S(\alpha_n + d_n) \\ \left(\sum_{i=1}^n \alpha_i A_i \right) + \sigma R & (\beta_R - c + \sigma S) & S\alpha_1 & \dots & S\alpha_n \\ 0 & 0 & -\mu_1 & \dots & 0 \\ \vdots & \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ 0 & 0 & 0 & \dots & -\mu_n \end{pmatrix} \quad (4.5)$$

şeklinde dir.

- $E_0(0,0,0,\dots,0)$ denge noktasında hesaplanan (4.5) deki matris:

$$J(E_0) = \begin{pmatrix} \beta_S & c & 0 & \dots & 0 \\ 0 & (\beta_R - c) & 0 & \dots & 0 \\ 0 & 0 & -\mu_1 & \dots & 0 \\ \vdots & \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ 0 & 0 & 0 & \dots & -\mu_n \end{pmatrix} \quad (4.6)$$

olup bu matrizen elde edilen özdeğerleri $i = 1, \dots, n+2$ için λ_i ile gösterilsin. Bu noktadaki $3, 4, \dots, n$ için $\lambda_k = -\mu_i < 0$, olduğu aşıkardır. Dolayısıyla denge noktasının kararlılık kriteri gözönüne alındığında bu özdeğerlerin negatif olduğu böylece kararlılık şartını bozmadığı görülür. Dolayısıyla bu denge noktası için λ_1 ve λ_2 özdeğerlerinin elde edileceği $J(E_0)$ jakobiye matrisinin blok matrisi olan ve aşağıda gösterilen

$$J_{E_0}^B = \begin{pmatrix} \beta_S & c \\ 0 & (\beta_R - c) \end{pmatrix} \quad (4.6)$$

matrisinin incelenmesi yeterlidir. (4.6) matrisine karşılık gelen λ özdeğerlerine ait karakteristik denklem:

$$\lambda^2 - \lambda(\beta_S + (\beta_R - c)) + \beta_S(\beta_R - c) = 0 \quad (4.7)$$

olarak elde edilir. Bu denklemin diskriminantı;

$$\Delta = (\beta_S + (\beta_R - c))^2 - 4\beta_S(\beta_R - c) =$$



$(\beta_S - (\beta_R - c))^2$ şeklinde olacağından

$$\text{özdeğerler: } \lambda_1 = \frac{(\beta_S + (\beta_R - c)) - |\beta_S - (\beta_R - c)|}{2} \lambda_2 = \frac{(\beta_S + (\beta_R - c)) + |\beta_S - (\beta_R - c)|}{2}$$

ve böylece

$$\lambda_1 = \beta_S, \lambda_2 = (\beta_R - c) \quad (4.8)$$

olur. Dolayısıyla (3.2) ve (3.3) eşitsizlikleri birlikte dikkate alındıklarında, eğer

$$\beta_S < 0 \quad (4.9)$$

ise o zaman $\lambda_1, \lambda_2 < 0$ olup enfeksiyondan bağımsız denge noktası olan $E_0(0,0,0,\dots,0)$ noktasının kararlı olacağı görülür.

- (4.3) eşitsizliği sağlansın. Bu durumda $E_1(\frac{c-\beta_R}{\sigma}, \frac{\beta_S}{\beta_R} \frac{\beta_R-c}{\sigma}, 0, \dots, 0)$ denge noktasında hesaplanan (4.5) deki matris;

$$J(E_1) = \begin{pmatrix} \left(\beta_S - \frac{\beta_S}{\beta_R}(\beta_R - c) \right) & \beta_R & -\frac{c-\beta_R}{\sigma}(\alpha_1 + d_1) & \dots & -\frac{c-\beta_R}{\sigma}(\alpha_n + d_n) \\ \frac{\beta_S}{\beta_R}(\beta_R - c) & 0 & \frac{c-\beta_R}{\sigma}\alpha_1 & \dots & \frac{c-\beta_R}{\sigma}\alpha_n \\ 0 & 0 & -\mu_1 & \dots & 0 \\ \vdots & \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ 0 & 0 & 0 & \dots & -\mu_n \end{pmatrix} \quad (4.10)$$

olarak elde edilir. Benzer şekilde bu noktada $k = 3, 4, \dots, n$ için $\lambda_k = -\mu_i < 0$, olduğu aşıkardır. Dolayısıyla $J(E_1)$ jakobiyen matrisinin blok matrisi

$$J_{E_1}^B = \begin{pmatrix} \left(\beta_S - \frac{\beta_S}{\beta_R}(\beta_R - c) \right) & \beta_R \\ \frac{\beta_S}{\beta_R}(\beta_R - c) & 0 \end{pmatrix} \quad (4.11)$$

şeklinde elde edilir. Burada $\text{Trace} J_{E_1}^B = \beta_S + \frac{\beta_S}{\beta_R}(c - \beta_R) = \frac{\beta_S}{\beta_R}c$ ve $\text{Det} J_{E_1}^B = \frac{\beta_S}{\beta_R}(c - \beta_R)\beta_R$ olur. (3.2), (3.3) ve (4.3) eşitsizlikleri birlikte gözönüne alınsın. Bu durumda $\text{Trace} J_{E_1}^B < 0$ ve $\text{Det} J_{E_1}^B > 0$ olup E_1 denge noktası için (2.6) ve



(2.7) ye göre Routh-Hurwitz kararlılık koşulları sağlanacağından dolayı bu nokta kararlıdır.

Tablo 4.2. (3.1) sisteminin denge noktalarının kararlılık koşulları

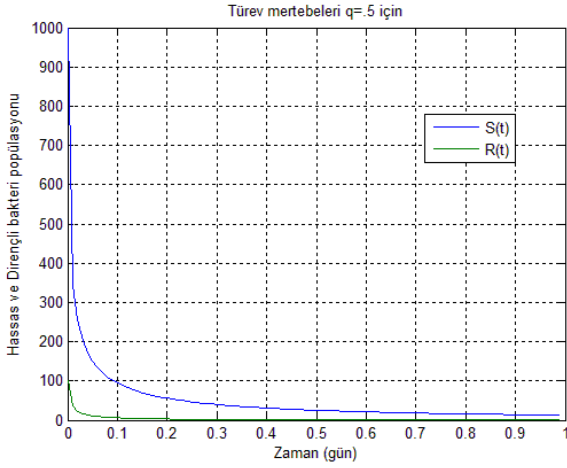
Denge Noktası	Kararlılık Koşulu
$E_0(0,0,0,\dots,0)$	$\beta_S < 0$
$E_1\left(\frac{c - \beta_R}{\sigma}, \frac{\beta_S \beta_R - c}{\beta_R \sigma}, 0, \dots, 0\right)$	$\beta_S, -\beta_R > 0$

5. Nümerik Çalışmalar

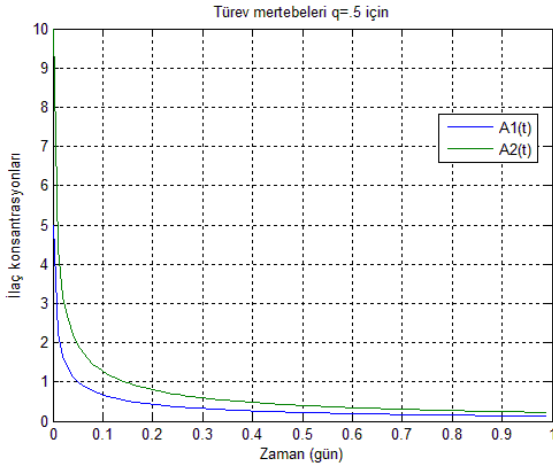
Bu kısımda (3.1) sisteminde kullanılan parametrelere değerler verilerek sistemin kalitatif analizi nümerik simülasyonlar vasıtasıyla desteklenmiştir. Bu doğrultuda parametreler

$$\begin{aligned} \beta_S &= -0.1, \beta_R = -0.15, c = 0.1, \sigma = 0.0001, \alpha_1 = 10^{-4}, \\ \alpha_2 &= 10^{-5}, d_1 = 0.0039, d_2 = 0.00375, \mu_1 = 0.05, \mu_2 = 0.06 \end{aligned} \quad (5.1)$$

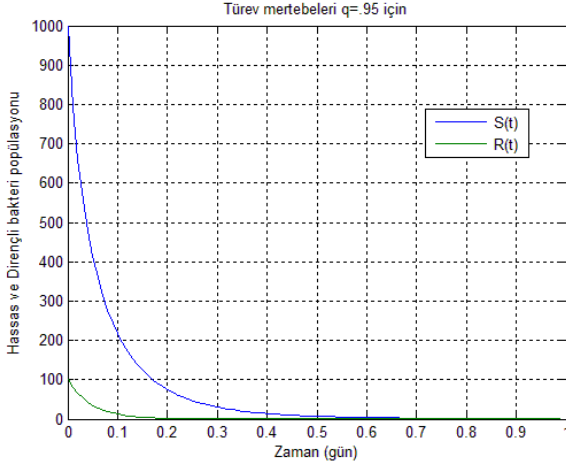
ve başlangıç koşulları ise (1000,100,5,10) olarak alındığında Şekil 5.1.-5.4. elde edilir.



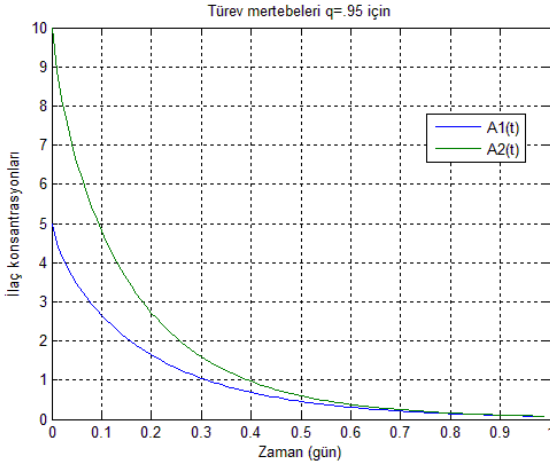
Şekil 5.1. $q = .5$ için (5.1) parametre değerlerine göre (3.1) modelindeki hassas ve dirençli bakteri popülasyonlarının boyutlarındaki zamana bağlı değişimlerinin grafiksel gösterimi



Şekil 5.2. $q = .5$ için (5.1) parametre değerlerine göre (3.1) modelindeki ilaç konsantrasyonlarının zamana bağlı değişimlerinin grafiksel gösterimi



Şekil 5.3. $q = .95$ için (5.1) parametre değerlerine göre (3.1) modelindeki hassas ve dirençli bakteri popülasyonlarının boyutlarındaki zamana bağlı değişimlerinin grafiksel gösterimi



Şekil 5.4. $q = .95$ için (5.1) parametre değerlerine göre (3.1) modelindeki ilaç konsantrasyonlarının zamana bağlı değişimlerinin grafiksel gösterimi

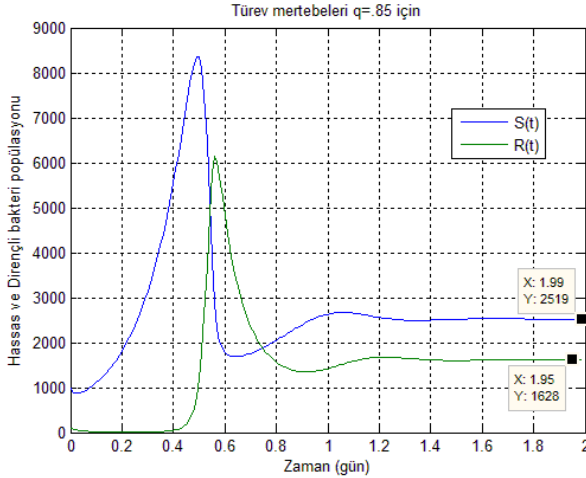


(3.1) modeli için Şekil 5.1. ve Şekil 5.2. de türev mertebeleri $q = .5$ ve Şekil 5.3. ve Şekil 5.4. de türev mertebeleri $q = .95$ olarak alınmıştır. Bu şekillerde $E_0(0,0,0,0)$ denge noktasının kararlılığı gözlemlenmektedir. Bunun nedeni E_0 denge noktasının kararlılık koşulu olan $\beta_S = -0.1 < 0$ şartının sağlanmış olmasından dolayıdır.

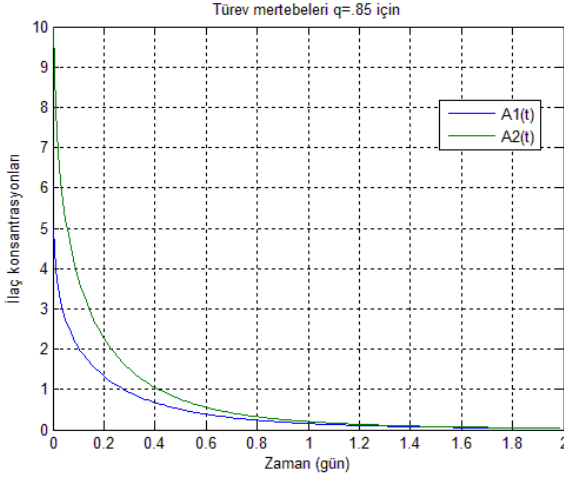
Parametreler;

$$\begin{aligned} \beta_S = 0.1, \beta_R = -0.15, c = 0.1, \sigma = 0.0001, \alpha_1 = 10^{-4}, \\ \alpha_2 = 10^{-5}, d_1 = 0.0039, d_2 = 0.00375, \mu_1 = 0.05, \mu_2 = 0.06 \end{aligned} \quad (5.2)$$

olarak verilsin. Ayrıca türev mertebeleri $q = .85$ ve başlangıç koşulları ise $(1000, 100, 5, 10)$ olarak alınsın. Bu durumda Şekil 5.5. ve Şekil 5.6. elde edilir.



Şekil 5.5. $q = .85$ için (5.2) parametre değerlerine göre (3.1) modelindeki hassas ve dirençli bakteri popülasyonlarının boyutlarındaki zamana bağlı değişimlerinin grafiksel gösterimi



Şekil 5.6. $q = .85$ için (5.2) parametre değerlerine göre (3.1) modelindeki ilaç konsantrasyonlarının zamana bağlı değişimlerinin grafiksel gösterimi

$\beta_S, -\beta_R > 0$ olduğundan dolayı $E_1(2500, 1666, 0, 0)$ denge noktasının kararlılığıyla ilgili durumlar Şekil 5.5. ve Şekil 5.6. da görülmektedir.

Kaynaklar

1. M.V. Barbarossa ve C. Kuttler, "Mathematical Modeling of Bacteria Communication in Continuous Cultures," *Applied Sciences*, 6(149), 1-17, 2016.
2. L.J.S. Allen, *An Introduction to Mathematical Biology*, 2007, ISBN 10: 0-13-035216-0.
3. B. Daşbaşı ve I. Öztürk, "Mathematical modelling of bacterial resistance to multiple antibiotics and immune system response," *SpringerPlus*, 5(408), 1-17, April 2016.
4. L. Ternent, R.J. Dyson, A.M. Krachler ve S. Jabbari, "Bacterial fitness shapes the population dynamics of antibiotic resistant and susceptible bacteria in a model," *J. Theor. Biol.*, 372, 1-11, 2014.
5. D.P. Arya, *Aminoglycoside Antibiotics: From Chemical Biology to Drug Discovery*. New Jersey: Wiley, 2007.



6. K. Lewis, "Platforms for antibiotic discovery," *Nat. Rev. Drug Discov.*, 12, 371-387, 2013.
7. E.I. Mondragón, S. Mosquera, M. Cerón, E.M. Burbano-Rosero, S.P. Hidalgo-Bonilla, L. Esteve ve J.P. Romero-Leitón, "Mathematical modeling on bacterial resistance to multiple antibiotics caused by spontaneous mutations," *BioSystems*, 117, 60-67, 2014.
8. Whitman ve H. Ashrafiuon, "Asymptotic theory of an infectious disease model," *J. Math. Biol.*, 53(2), 287-304, 2006.
9. Podlubny, *Fractional Differential Equations*. New York: Academic Press, 1999.
10. E. Ahmed, A.M.A. El-Sayed ve H.A.A. El-Saka, "Equilibrium points, stability and numerical solutions of fractional-order predator-prey and rabies models," *J. Math. Anal. Appl.*, 325, 542-553, 2007.
11. B. Daşbaşı, "The Fractional-Order mathematical modeling of bacterial resistance against multiple antibiotics in case of local bacterial infection," *Sakarya University Journal of Science*, 251(3), 1-13, 2017.
12. B. Daşbaşı ve D. Boztosun, "Çoklu Kesirli Mertebeden Diferansiyel Denklemler ile Palomba Ekonomi Modelinin Kararlılık Analizi," *Journal of International Social Research*, 11(59), 901-907, 2018.



ALLEE ETKİSİYLE POPÜLASYON BÜYÜME MODELİNİN KARARLILIK ANALİZİ VE TÜRKİYE NÜFUS TAHMİNİ



Bahatdin DAŞBAŞI¹

Giriş

Matematiksel modelleme, gerçek hayat durumunun matematik diline aktarılma ve matematiksel olarak ifade edilme sürecidir. Bilimin birçok alanında çalışan araştırmacılar ve uygulayıcılar araştırdıkları sistemlerin matematiksel modellerini kullanmaktadır [1]. Dolayısıyla matematiksel modellemefizik, kimya, biyoloji, yer bilimi, meteoroloji gibi doğa bilimlerinde, bilgisayar bilimi, yapay zekâ gibi mühendislik disiplinlerinde, tıpta ve bunların yanı sıra iktisat, işletme, finans, ekonomi, psikoloji, sosyoloji ve siyaset bilimi gibi sosyal bilimlerde çokça kullanılmaktadır [2]. Modelleme sürecinde genellikle fark denklemleri [3,4] ve diferansiyel denklemler gibi çeşitli matematiksel denklemlerden yararlanılmaktadır. Diferansiyel denklemler yardımıyla matematiksel modelleme sürecinde adi diferansiyel denklemlerin [5,6]yanısıraimpulsif diferansiyel denklemler[7,8], kesirli mertebeden diferansiyel denklemler[9,10] ve parçalı diferansiyel denklemler [11,12]literatürde sıklıkla kullanılmaktadır.

¹ Dr. Öğr. Üyesi Kayseri Üniversitesi Uygulamalı Bilimler
Fakültesi Muhasebe ve Finans Yönetimi Bölümü



Bir bölgedeki gelecekteki nüfus büyüklüğünün istatistiksel veya matematiksel olarak tahmin edilmesi ile ülkenin planlı, dengeli ve sürdürülebilir kalkınma hedefi ile uyumlu bir nüfus yapısına ulaşmak amacıyla toplumun eğitim, sağlık ve insan gücü yönünden niteliklerinin iyileştirilmesi ve yaşam kalitesinin yükseltilmesine yönelik nüfus politikalarının belirlenmesi açısından çok büyük bir önem taşımaktadır. Bir bölgedeki bir türün popülasyonunun büyüklüğündeki değişimin matematiksel olarak tahmin edilmesinde de diferansiyel denklemlerden çokça yararlanılmaktadır[13].

Bu çalışmada kesirli mertebeden diferansiyel denklemler kullanılarak kuadratik Allee etkisiyle lojistik popülasyon büyüme modeli önerildi. Popülasyonun yokolduğu denge noktasının yanısıra muhtemel pozitif denge noktaları bulundu. Popülasyonun taşıma kapasitesinin kararlılığının aksine, Allee parametrelerine bağlı bu kapasiteden daha küçük olan muhtemel pozitif denge noktalarının kararlılıkları incelendi. Uygulama olarak Türkiye'nin 2008-2017 yıllarındaki nüfus verilerinden yararlanılarak modelin sonuçları grafiksel olarak elde edildi. Bu bağlamda 2018-2053 yılları için tahmin yapıldı.

Aşağıdaki bölümde çeşitli popülasyon büyüme modelleri tanıtılmıştır.

Büyüme Modelleri

Gelişim ya da büyüme, çeşitli organizmaların yanı sıra hayvan ve bitki türleri ve popülasyonlarının çeşitli düzeylerinde oluşan biyolojik sistemlerin temel bir özelliğidir. Hatta teknolojiye büyüme eğrileri, belirli bir veri aralığındaki çeşitli yöntemlerle geliştirilmesiyle bir veri setinin uygun teknolojik performansını tahmin etmek için kullanılırlar. Gelişim süreçlerinin modellenmesi üzerine birçok araştırma mevcuttur ve bunu yapmanın, mekanistik modeller, zaman serileri, stokastik diferansiyel denklemler gibi birçok yöntemi vardır.



Doğumlar ve ölümler gibi değişiklikler sürekli meydana geldiğinde, o zaman nesiller örtüşür ve sürekli zamanlı bir model (diferansiyel denklemler) ayrık zamanlı modelden (fark denklemleri) daha uygundur. Diferansiyel denklemlerde zaman aralığı sürekli ve bu aralık ya sınırlıdır ($t_0 < t < \infty$ için $[t_0, T)$) ya da sınırsızdır ($[t_0, \infty)$). Fark denklemlerinde ise zaman aralığı $t = 0, 1, 2, \dots$ ayrık değerlerinin bir setidir.

Diferansiyel denklemler temel alınarak geliştirilen ve günümüzde önerilen matematiksel modellerin temel aldığı bazı büyüme modelleri Malthus, Gompertz, Lojistik ve Kemostat olarak verilebilir.

2.1. Malthus Büyüme Modeli

Çoğu zaman "üstel kanunlara göre popülasyonbüyümesi"[14] olarak adlandırılan Malthus (Malthusian) büyüme modeline göre "Eğer bir popülasyondaki bireylerin yaşadığı ortam sabit kalırsa, popülasyon üstel bir şekilde gelişir yada azalır" [15]. Malthusian adı İngiliz ekonomist Thomas Malthus' un (1755-1845) popülasyonbüyüme teorisi için katkılarından dolayı verilmiştir. Bu model, en iyi bilinen ve en basit popülasyon büyüme modelidir. Malthus büyüme modeli lineer ve otonom bir diferansiyel denklem şeklinde olup modelde büyüme oranının popülasyonun boyutuna orantılı olduğunu varsaymaktadır. x , t zamanındaki popülasyon boyutu olsun. Popülasyondaki bireylerin doğum oranı b (> 0) ve ölüm oranı ise d (> 0) olmak üzere model:

$$\frac{dx}{dt} = rx, \quad x(t_0) = x_0 \quad (2.1)$$

şeklinde olup burada $r = b - d$ parametresi kişi başı büyüme oranı veya içsel büyüme oranı olarak isimlendirilmektedir [16]. $x(t_0) = x_0$ başlangıç koşulu ile bu diferansiyel denklemin çözümü değişkenlerine ayırarak aşağıdaki şekilde bulunur:

$$\frac{dx}{x} = r dt, \int_{x_0}^{x(t)} \frac{dy}{y} = \int_{t_0}^t r d\tau, \ln \left[\frac{x(t)}{x_0} \right] = r(t - t_0).$$



Böylece çözüm $x(t) = x_0 e^{r(t-t_0)}$ veya $t_0 = 0$ için $x(t) = x_0 e^{rt}$ şeklindedir. Popülasyon zamanla üstel olarak büyür veya küçülür.



Şekil 2.1. Malthus' un temel teorisinin grafiksel gösterimi

Eğer $b > d$ (yani $r > 0$) ise popülasyon üstel olarak gelişir ve eğer $b < d$ (yani $r < 0$) ise popülasyon yok olur. Üstel büyüme sadece büyüme sınırlandırması olmadığı sürece gerçekçidir. Çoğu sistemler, bazı kapasite sınırlandırması ortaya çıkana kadar başlangıçta bu şekilde gelişirler. Böyle durumlarda Gompertz veya Lojistik büyüme modelleri daha makuldürler.

2.2. Gompertz Büyüme Modeli

Kapasite sınırlandırmaları dikkate alındığında önerilen model Gompertz' in kurallarına göredir [17]. Modelin adı İngiliz sigortacı Benjamin Gompertz (1779-1865) tarafından adlandırılmış olup Malthus büyüme modeli çeşitli varsayımlar altında geliştirilerek tasarlanmıştır. Gompertz tarafından 1825' de "On the Nature of the Function Expressive of the Law of Human Mortality" adlı eserinde geliştirilen bu model [18], özellikle katı tümörlerin büyümesine uygulanabilir.

Modelde, t zamanındaki popülasyon hacmi $x(t)$, popülasyonun zamana bağlı net büyüme oranı



$r(t)$ ve $\frac{dr}{dt} = -\alpha r, r(0) = r_0$ ve $\alpha > 0$ olmak üzere bu oranın çözümü:

$$r(t) = r_0 e^{-\alpha t} \quad (2.2)$$

şeklinde dir. Böylece lineer ve otonom olmayan model şu şekildedir;

$$\frac{dx}{dt} = r(t)x \text{ ya da } \frac{dx}{dt} = r_0 e^{-\alpha t} x \quad (2.3)$$

olarak verilmiştir [16]. (2.3) diferansiyel denklemi değişkenlerine ayrılarak çözülüp $x(0) = x_0$ başlangıç koşulu uygulandığında çözüm;

$$x(t) = x_0 e^{\frac{r_0 - r(t)}{\alpha}} = x_0 e^{\frac{r_0}{\alpha}(1 - e^{-\alpha t})} \quad (2.4)$$

olarak bulunur. Ayrıca modelde popülasyon boyutu olan $x(t)$ zamanla birlikte Malthus büyüme modelindeki gibi devamlı üstel biçimde gelişmez. Bu bağlamda $x = x(t)$ fonksiyonunun dönüm ya da büküm noktası (konvekslikten konkavlığa geçtiği nokta) için (2.2) ve (2.3) denklemleri yardımıyla

$$\begin{aligned} \frac{d^2 x}{dt^2} &= \frac{d}{dt} \frac{dx}{dt} = \frac{d}{dt} [rx] = x \frac{dr}{dt} + r \frac{dx}{dt} \\ &= x(-\alpha r) + r(rx) = rx(-\alpha + r) = 0 \end{aligned}$$

denklemden $r(t) = \alpha$ değerini aldığında bu nokta bulunur. Dolayısıyla bu değer in (2.2) eşitliğinde yerine yazılmasıyla $t = \frac{\ln(\frac{r_0}{\alpha})}{\alpha}$ ve (2.4) eşitliğinde yazılması ile $x = x_0 e^{\frac{r_0 - \alpha}{\alpha}}$ bulunur. Böylece dönüm (büküm) noktası

$$(t_{\text{dönüm}}, x_{\text{dönüm}}) = \left(\frac{\ln(\frac{r_0}{\alpha})}{\alpha}, x_0 e^{\frac{r_0 - \alpha}{\alpha}} \right) \text{ şeklindedir. Ayrıca}$$

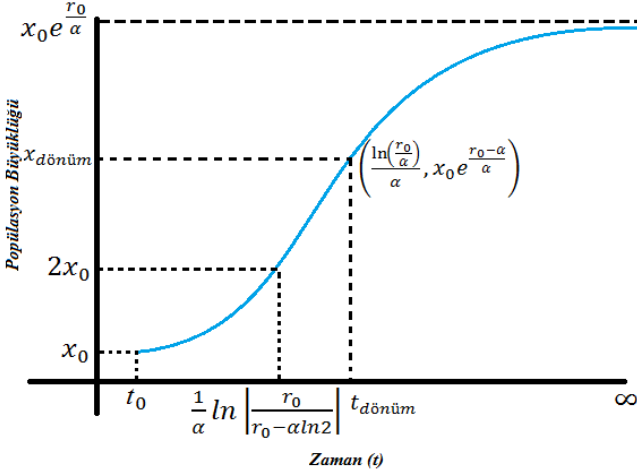
(2.4) denklemi göz önüne alındığında, popülasyonunun üreme fonksiyonu olan $r(t)$, büyüklük fonksiyonu olan $x(t)$ cinsinden,

$$r(t) = r_0 - \alpha \ln \left(\frac{x(t)}{x_0} \right) \quad (2.5)$$

şeklinde yazılabilir. Buradan $t \rightarrow \infty$ için (2.2) denklemden $r(t) \rightarrow 0$ ve (2.5) denklemden ise $x(t) = x_0 e^{\frac{r_0}{\alpha}}$ değeri elde edilir. Bu değer popülasyon hacminin $t \rightarrow \infty$ için yaklaşacağı değerdir. Ayrıca popülasyon hacminin başlangıç değerinin iki katı olan



$2x_0$ değerine ulaştığında geçen süre t_1 olmak üzere (2.5) denkleminde büyüme oranı $r(t_1) = r_0 - \alpha \ln 2$ ve böylece zaman $t_1 = \frac{1}{\alpha} \ln \left| \frac{r_0}{r_0 - \alpha \ln 2} \right|$ olarak bulunur.



Şekil 2.2. (2.3) denklemi için Gompertz büyüme eğrisi

Bu model, başlangıçta yalnızca sigortacılar tarafından kullanılmıştır, ancak son zamanlarda biyolojik ve ekonomik olaylar, cep telefonu alımı ve Internet [19], sınırlandırılmış bir yerdeki popülasyon ve tümör büyümesinin modellenmesi gibi durumlarda kullanılmaktadır [20].

2.3. Pearl-Verhulst Lojistik Modeli

(2.1) modeli dikkate alınır ve bu denkleme organizmanın ürününü (popülasyon için kaynaklar) sınırlandırmak için besin konsantrasyonunu tanımlayan bir y fonksiyonunu eklendiğinde,

$$\frac{dx}{dt} = bxy, \frac{dy}{dt} = -abxy \quad (2.6)$$

sistemi elde edilir. Burada $x \equiv x(t)$ ve $y \equiv y(t)$ şeklindedir. Ayrıca $x(t_0) = x_0$ veya $y(t_0) = y_0$ olmak üzere,



(2.6) sisteminin çözümünü elde etmek için $\alpha \frac{dx}{dt} + \frac{dy}{dt} = \frac{d(\alpha x + y)}{dt} = 0$ olarak dikkate alındığında,

$$y = y_0 - \alpha x \quad (2.7)$$

bulunur. (2.7) eşitliğinin (2.6) sisteminin ilk denkleminde yerine yazılmasıyla:

$$\frac{dx}{dt} = by_0 x \left(1 - \frac{x}{\frac{y_0}{\alpha}} \right) \quad (2.8)$$

denklemini elde edilir. (2.8) denkleminde; $by_0 = r$ ve $\frac{y_0}{\alpha} = K$ olarak alındığında bu denklemin sağ tarafı, lojistik denklem olarak adlandırılan aşağıdaki denkleme dönüşür.

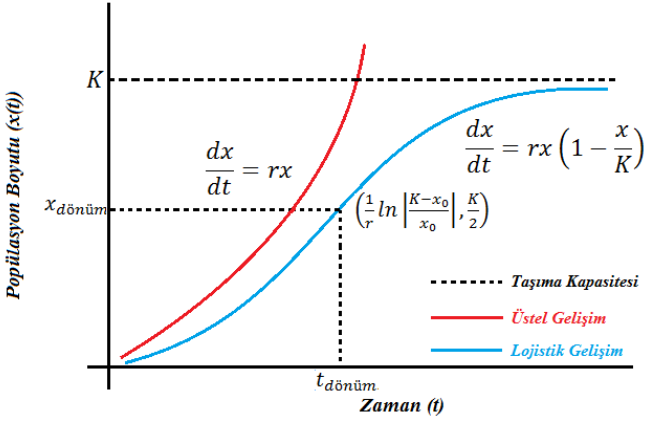
$$\frac{dx}{dt} = rx \left(1 - \frac{x}{K} \right) \quad (2.9)$$

(2.9) modeli; gelişim oranı ve taşıma kapasitesi K olan popülasyon boyutunu ifade eden otonom bir diferansiyel denklemdir. $x > K$ olduğunda büyüme oranı negatiftir ve benzer biçimde $x < K$ ise pozitifdir [16]. Ayrıca (2.9) lojistik diferansiyel denklemin çözümü değişkenlerine ayrılarak $x(t) = \frac{x_0 K}{x_0 + (K - x_0)e^{-rt}}$ olarak bulunur. Pozitif başlangıç koşuluyla $x(t)$ popülasyon boyutu taşıma kapasitesine yaklaşır. Yani $\lim_{t \rightarrow \infty} x(t) = K$ olur [21].

Ayrıca (2.9) denklemini için

$$\begin{aligned} \frac{d^2x}{dt^2} &= \frac{d}{dt} \frac{dx}{dt} = \frac{d}{dt} \left[rx \left(1 - \frac{x}{K} \right) \right] = r \left(\left(1 - \frac{x}{K} \right) \frac{dx}{dt} + x \frac{d \left(1 - \frac{x}{K} \right)}{dt} \right) = \\ r \frac{dx}{dt} \left(\left(1 - \frac{x}{K} \right) - \frac{x}{K} \right) &= 0, \end{aligned}$$

olacağından dönüm noktası için $x_{dönüm} = \frac{K}{2}$ değeri bulunur. Bu değer $x(t)$ çözümünde yerine yazılmasıyla $t_{dönüm} = \frac{1}{r} \ln \left| \frac{K - x_0}{x_0} \right|$ elde edilir. Böylece (2.9) lojistik diferansiyel denklemini için dönüm noktası $(t_{dönüm}, x_{dönüm}) = \left(\frac{1}{r} \ln \left| \frac{K - x_0}{x_0} \right|, \frac{K}{2} \right)$ şeklindedir.

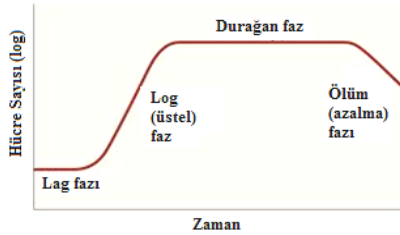


Şekil 2.3. Lojistik büyüme ve üstel büyüme eğrilerinin mukayesesi

Bu denklem başlangıçta Verhulst [22] tarafından nüfus dağılımı çalışmaları için geliştirildi ve denklemin geniş çapta ve vazgeçilmez bir şekilde kullanılması Pearl ve Reed [23] tarafından sağlandı.

2.4. Kemostat Modeli

Kemostat, mikroorganizmaların gelişimini kontrol eden bir aygıttır. Temel olarak bu aygıt mikroorganizmanın çoğaldığı bir büyüme yeri ve besi yeri tarafından belirlenen bir biçimdedir. Kemostat'ın amacı, zamanındaki bir yarı sürekli mikroorganizma boyutu x ve besin konsantrasyonu y olmak üzere sabit bir oranda mikroorganizma hasatına izin vermektir. Bu aynı zamanda statik anlamıdır. Dolayısıyla "Chemostat" adı "**chemical**" ve "**static**" kelimelerinden türemiştir [24].



Şekil 2.4. Kemostat modeli için sabit besin konsantrasyonuna bağlı popülasyon büyüme eğrisi

(2.6) denklem sisteminde y yerine Holling tip 2 yanıt olan $K(y) = K_{max} \frac{y}{K_n + y}$ yazılır ve rezervuardan besin giriş ve çıkışı ile hasat edilen mikroorganizmaların çıkışı dikkate alınır,

$$\frac{dx}{dt} = xK(y) - \frac{F}{V}x, \quad \frac{dy}{dt} = -\alpha xK(y) - \frac{F}{V}y + \frac{F}{V}y_0 \quad (2.10)$$

sistemi elde edilir. Burada $\frac{F}{V}x$, hasat edilen mikroorganizma akışını, $\frac{F}{V}y$ besin miktarındaki çıkışı $\frac{F}{V}y_0$ ise besin miktarındaki girişi temsil eder. Mikroorganizmalar, sınırsız bir konsantrasyon bölgesinde olmadıkları için sınırsız bir şekilde çoğalamazlar. $K(y)$ fonksiyonu bir üst limit olarak çoğalma oranına sahiptir ve K_n ise $K = \frac{1}{2}K_{max}$ 'daki besin konsantrasyonu ya da maksimum büyüme oranının yarısında mikroorganizmanın gelişmesi için gerekli olan besin konsantrasyonudur [16].

2.5. Allee Etkisi ve Popülasyon Büyümesi Arasındaki İlişkisi

Allee etkisi, sosyal davranışlar ve hayvanların kümelenmesi üzerine yaptığı kapsamlı araştırmalardan dolayı Amerikalı zoolog Warder C. Allee için kullanılmaktadır. Allee etkisi, düşük popülasyon büyüklükleri veya yoğunluklarında olan popülasyonların büyümedeki düşüş veya azalan uyum (fitness) gücü anlamına gelir. Popülasyon boyutu ya da yoğunluğu düştüğünde, popülasyonun soyunun tükenmesine yol



açan doğum oranları azalır ve doğum için eşleşme bulmak çok zorlaşır. Allee etkisi, popülasyonun yok olmasının altında bir eşik seviyesi olduğu varsayımına sahip modellerde ortaya çıkar [16]. Popülasyon dinamiklerinin klasik görünümü, kaynakların rekabeti nedeniyle, bir popülasyonun daha yüksek yoğunlukta daha düşük bir genel büyüme oranı ve daha düşük yoğunlukta artan büyüme oranı yaşayacağını belirtmiştir. Diğer bir deyişle, bir popülasyon içindeki bireyler sınırlı miktarda kaynak nedeniyle daha az sayıda birey olduğunda daha iyi olacaktır (lojistik büyüme). Bununla birlikte Allee etkisi kavramı, popülasyon yoğunluğu düşük olduğunda, tersinin geçerli olduğu fikrini ortaya koymuştur [25].

Popülasyondaki birey başına çoğalma oranı popülasyon boyutunun kuadratik bir fonksiyonu yani: $a(x) = a_1 + a_2x + a_3x^2$ (lojistik modeldeki lineerlik olan $(1 - \frac{x}{K})$ ifadesinin yerine) şeklindeki bir fonksiyondur. Dolayısıyla, Allee etkisiyle popülasyon büyüme modeli;

$$\frac{dx}{dt} = xa(x) = x(a_1 + a_2x + a_3x^2), \quad (2.11)$$

biçimine sahiptir. Bu modelde kullanılan a_1 , a_2 ve a_3 parametreleri için

$$a_1 < 0, a_2 > 0, a_3 < 0 \text{ ve } a_2^2 - 4a_1a_3 > 0 \quad (2.12)$$

eşitsizlikleri sağlanır. (2.12) eşitsizlikleri dikkate alındığında $0 < \alpha_1 < \alpha_2$ olacak şekildeki α_1 ve α_2 pozitif reel sayıları için $a(x)$ fonksiyonu

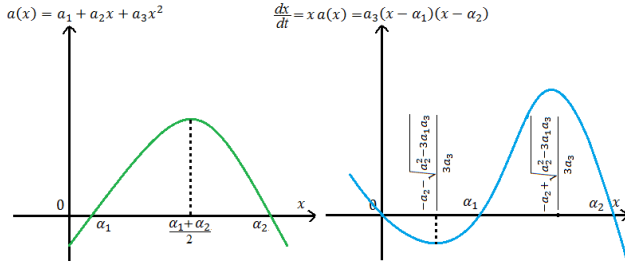
$$a(x) = a_3(x - \alpha_1)(x - \alpha_2) \quad (2.13)$$

şeklinde yeniden yazılabilir. Dolayısıyla (2.11) model $\dot{x} = 0$, $x = \alpha_1$ ve $x = \alpha_2$ denge noktalarına sahip olup popülasyon orta yoğunlukta iken maksimum birey büyüme oranına sahiptir. Ayrıca $xa(x)$ fonksiyonu için ekstremum değerleri bu fonksiyonun birinci türevini sıfır yapan değerler olduğundan;

$$\frac{d(xa(x))}{dt} = \frac{d^2x}{dt^2} = 3a_3x^2 + 2a_2x + a_1 = 0$$



denkleminin kökleri $x = e_1 = \frac{-a_2 - \sqrt{a_2^2 - 3a_1a_3}}{3a_3}$ ve $x = e_2 = \frac{-a_2 + \sqrt{a_2^2 - 3a_1a_3}}{3a_3}$ olarak bulunurlar.



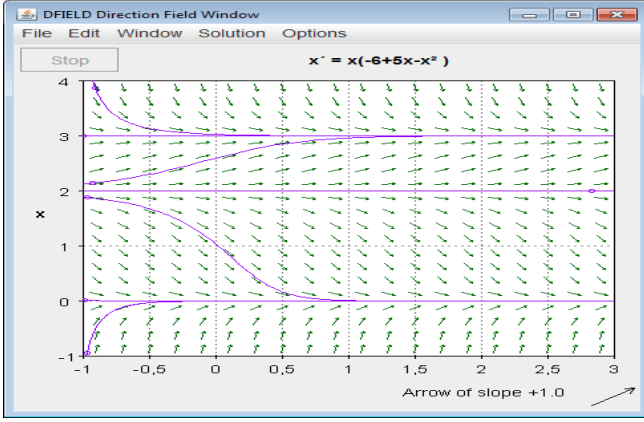
Şekil 2.5. (2.11) diferansiyel denklemleri için $a(x)$ ve $xa(x)$ fonksiyonlarının grafiksel gösterimleri

Şekil 2.5 den görüleceği üzere $(-\infty, e_1)$ aralığında $\frac{dx}{dt}$ fonksiyonu azalan dolayısıyla $\frac{d^2x}{dt^2} < 0$ olduğundan dolayısıyla $x = 0$ denge noktası kararlı, (e_1, e_2) aralığında $\frac{dx}{dt}$ fonksiyonu artan dolayısıyla $\frac{d^2x}{dt^2} > 0$ olduğundan dolayı $x = \alpha_1$ denge noktası kararsız ve $(e_2, +\infty)$ aralığında $\frac{dx}{dt}$ fonksiyonu azalan dolayısıyla $\frac{d^2x}{dt^2} < 0$ olduğundan dolayı $x = \alpha_2$ denge noktası kararlı denge noktasıdır.

Örnek olarak (2.11) denkleminde $a_1 = -6$, $a_2 = 5$ ve $a_3 = -1$ olarak alındığında,

$$\frac{dx}{dt} = x(-6 + 5x - x^2) \quad (2.14)$$

diferansiyel denklemleri elde edilir.



Şekil 2.6.(2.14) denklemi için faz-düzlem şekli

Şekil 2.6. için ok yönleri takip edilerek $x = 0$ ve $x = \alpha_2 = 3$ denge noktalarının kararlı ve $x = \alpha_1 = 2$ denge noktasının kararsız denge noktası olduğu kolaylıkla görülebilir.

Yöntem

(2.9) lojistik diferansiyel denklemi ile ifade edilen modele çeşitli varsayımlar altında yeni parametreler eklenerek ya da bu denklemi fark denklemleri ya da bu çalışmada olduğu gibi kesirli mertebeli diferansiyel denklemler şeklinde ifade ederek modele farklı bakış açıları kazandırılabilir. Kesirli mertebeli diferansiyel denklemlerde denge noktasının kararlılık bölgesi tam mertebeliye göre daha geniş olmasından dolayı parametrelere bağlı olarak göz ardı edilebilen denge noktalarının kararlılık bölgesiyle ilgili bazı durumlar hesaba katılır [26]. Ayrıca bu çalışmada önerilen modelde (2.11) deki gibi quadratik Allee etkisi parametreleri de eklenmiştir. Dolayısıyla Allee etkisiyle lojistik büyüme modelini temel alan bir popülasyon büyüme modeli kesirli mertebeli diferansiyel denklem olarak verilmiştir.



$t(t \geq 0)$ zaman parametresini gösterebilir. $x(t)$ bir bölgedeki belirli bir türün t zamanındaki popülasyon boyutunu göstermek üzere Allee etkisiyle önerilen kesirli mertebeden diferansiyel denklem biçimindeki popülasyon büyüme modeli;

$$D^q x = f(x) = rx \left(1 - \frac{x}{K}\right) (x - \alpha_1)(x - \alpha_2) - dx \quad (3.1)$$

şeklinde. Burada D^q ifadesi q -inci mertebeden Caputo anlamında kesirli türevi ifade etmektedir. Ayrıca $x \equiv x(t)$ ve başlangıç koşulu $x(0) = x_0$ şeklindedir. (3.1) modelinde; popülasyonun büyüme oranı r ile, popülasyonun taşıma kapasitesi K ile, popülasyonun doğal ölüm oranı d ile vekuadratik Allee etkisi parametreleri α_1 ve α_2 ile gösterilmiştir. Dolayısıyla burada

$$r, K, \alpha_1, \alpha_2, d > 0 \quad (3.2)$$

ve

$$\alpha_2 > \alpha_1 \quad (3.3)$$

olarak tanımlanmıştır. (3.3) eşitsizliğinin sağlanmadığı durumda parametrelerin yer değişimiyle benzer durum elde edilir. Ayrıca K parametresi taşıma kapasitesini gösterdiği için

$$\alpha_1, \alpha_2 < K \quad (3.4)$$

olarak kabul edilmiştir.

Bulgular

Bu kısımda (3.1) de önerilen popülasyon büyüme modelinin denge noktaları, bu noktalarının varlıkları ve kararlılıkları incelenmiştir.

Önerme 4.1.(Denge Noktaları) $\bar{x}$, (3.1) modelinin denge noktalarının genel halini gösterebilir. Bu nokta $D^q x = f(x) = 0$ denkleminin çözümü ile bulunur. Dolayısıyla; $r\bar{x} \left(1 - \frac{\bar{x}}{K}\right) (\bar{x} - \alpha_1)(\bar{x} - \alpha_2) - d\bar{x} = 0$ denkleminde ilk denge noktası,

$$\bar{x} = 0 \quad (4.1)$$

olarak bulunur. Diğer denge noktası (ya da noktaları) ise



$$r \left(1 - \frac{\bar{x}}{K} \right) (\bar{x} - \alpha_1)(\bar{x} - \alpha_2) - d = 0 \quad (4.2)$$

denkleminin çözümü ile elde edilir. Dolayısıyla(4.2) denklemi düzenlenerek;

$$\begin{aligned} \bar{x}^3 + a_1 \bar{x}^2 + a_2 \bar{x} + a_3 &= 0, \\ a_1 &= -(K + (\alpha_1 + \alpha_2)) \\ a_2 &= (K(\alpha_1 + \alpha_2) + \alpha_1 \alpha_2) \quad (4.3) \\ a_3 &= K \left(\frac{d}{r} - \alpha_1 \alpha_2 \right) \end{aligned}$$

olarak ifade edilen üçüncü dereceden denklem bulunur.(3.2) eşitsizliği dikkate alındığında;

$$-a_1, a_2 > 0 \quad (4.4)$$

olduğu açıktır. (4.2) kübik denklemi için Descartes işaret kuralı dikkate alınsın. Bu durumda iki farklı durum ile köklerin varlığı analiz edilir.

Şöyle ki;

$$\frac{d}{r} - \alpha_1 \alpha_2 < 0 \quad (4.5)$$

olsun. Bu durumda $a_3 < 0$ olup (4.3) denkleminin katsayılarının işaretleri sırasıyla $++-$ şeklinde olup bu kurala göre işaret değişim sayısı üçtür. Bu da pozitif kök sayısının ya 3 tane ya da 1 tane olduğu anlamına gelir. xyerine $-x$ yazılarak negatif kök sayısı benzer şekilde incelenir. Bu bağlamda (4.3) denkleminin katsayılarının işaretleri $---$ olduğundan dolayı işaret değişim sayısı 0 olup negatif kök yoktur. Dolayısıyla (4.5) eşitsizliği sağlandığı durumda (4.3) denkleminin ya 3 tane pozitif kökü vardır ya da 1 tane pozitif kökü ve 2 tane komplekskökü (eşlenik) vardır.

Şimdi de

$$\frac{d}{r} - \alpha_1 \alpha_2 > 0 \quad (4.6)$$

olsun. Bu durumda $a_3 > 0$ olup (4.3) denkleminin katsayılarının işaretleri sırasıyla $+++$ şeklindedir. Yine Descartes işaret kuralına göre işaret değişim sayısı 2 olduğundan dolayıbu denklemin ya 2 tane pozitif kökü vardır ya da pozitif kökü yoktur. Benzer şekilde negatif kök sayısı için katsayıların işaretleri sırasıyla $---$ olduğundan işaret değişim sayısı 1 dir. Bu da negatif kök



sayısının 1 tane olduğu anlamına gelmektedir. Dolayısıyla (4.6) eşitsizliği sağlandığı durumda (4.3) denkleminin ya 2 tane pozitif ve 1 tane negatif kökü vardır ya da 1 tane negatif kökü ve 2 tane kompleks kökü (eşlenik) vardır.

Böylece sonuç olarak aşağıdaki tablo verilebilir.

Tablo 4.1. (4.3) denkleminin köklerini varlığı ve işaretlerine göre (3.1) denkleminin muhtemel pozitif denge noktaları

Durum	Pozitif köklerin varlığı
$\frac{d}{r} < \alpha_1 \alpha_2$	Ya 3 tane pozitif kökü vardır ya da 1 tane pozitif kökü ve 2 tane kompleks kökü vardır.
$\frac{d}{r} > \alpha_1 \alpha_2$	Ya 2 tane pozitif ve 1 tane negatif kökü vardır ya da 1 tane negatif kökü ve 2 tane kompleks kökü vardır.

Tablo 4.1. aşağıdaki gibi daha ayrıntılı olarak incelenebilir. Bu bağlamda (4.3) denkleminin kökleri olan (3.1) modelinin pozitif denge noktaları

$$g(x) = h(x)$$

$$g(x) = (K - x)(x - \alpha_1)(x - \alpha_2) \text{ ve } h(x) = K \frac{d}{r} \quad (4.7)$$

olacak şekilde g ve h fonksiyonlarının grafiksel olarak kesişimlerinden elde edilir. Dolayısıyla g ve h fonksiyonlarının $x - y$ düzleminin birinci bölgesindeki kesişim sayıları (4.3) denkleminin pozitif kök sayısını yani (3.1)de önerilen modelin pozitif denge sayısını verecektir. Ayrıca (4.7) eşitliğinde tanımlanan kübik polinom olan $g(x)$ fonksiyonunun ekstremum noktaları $\frac{dg(x)}{dx} = 0$ denkleminin köklerinden elde edilir. Bundan

dolayı $\frac{dg(x)}{dx}$ türevi

$$-3x^2 + 2(\alpha_1 + \alpha_2 + K)x - (K(\alpha_1 + \alpha_2) + \alpha_1 \alpha_2) = 0$$

olup bu denklemin diskriminantı;

$$\Delta = 4 \left[((\alpha_1 + \alpha_2) + K)^2 - 3(K(\alpha_1 + \alpha_2) + \alpha_1 \alpha_2) \right] \quad (4.8)$$



ve böylece,

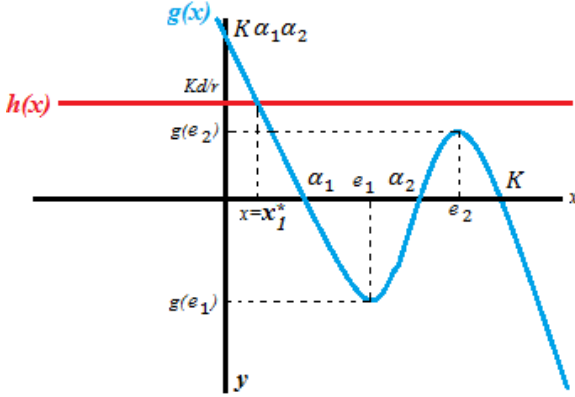
$$\Delta = 4[(\alpha_1 - \alpha_2)^2 + (K - \alpha_1)(K - \alpha_2)] \quad (4.9)$$

şeklinde. (3.2) ve (3.4) eşitsizliklerinden dolayı (4.9) eşitliğinde tanımlanan diskriminant için $\Delta > 0$ olduğu açıktır. Dolayısıyla $g(x)$ fonksiyonunun 2 farklı ekstremum noktası vardır. (4.8) eşitliği dikkate alındığında bu ekstremum noktaları ise

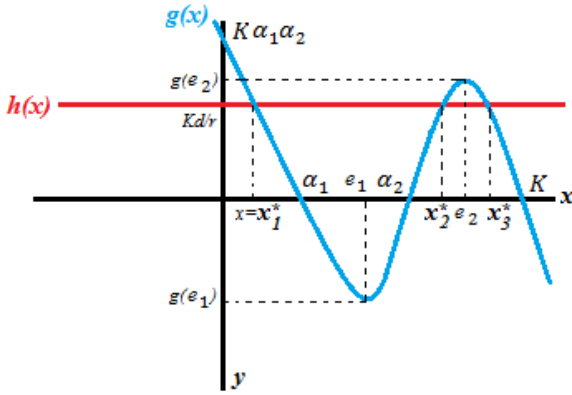
$$e_1 = \frac{((\alpha_1 + \alpha_2) + K) - \sqrt{((\alpha_1 + \alpha_2) + K)^2 - 3(K(\alpha_1 + \alpha_2) + \alpha_1\alpha_2)}}{3} \quad (4.10)$$

$$e_2 = \frac{((\alpha_1 + \alpha_2) + K) + \sqrt{((\alpha_1 + \alpha_2) + K)^2 - 3(K(\alpha_1 + \alpha_2) + \alpha_1\alpha_2)}}{3}$$

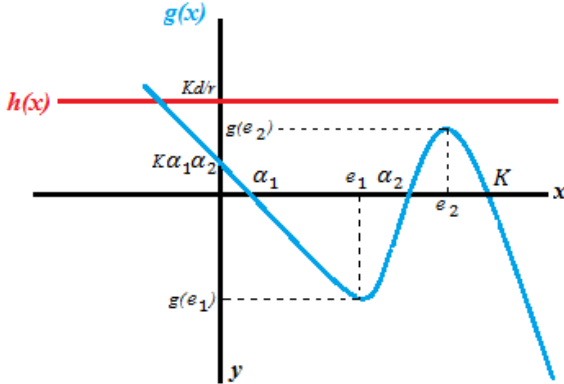
olarak elde edilirler. Burada $e_{1,2} > 0$ ve $e_1 < e_2$ oldukları görülmektedir. Kübik polinomların grafikleri düşünüldüğünde (4.7) de tanımlanan $g(x)$ fonksiyonu için yerel minimumunu $x = e_1$ noktasında ve yerel maksimumunu ise $x = e_2$ noktasında alacaktır. Bu durumda (4.7) eşitliğinde tanımlanan $g(x)$ ve $h(x)$ fonksiyonları için aşağıdaki şekiller elde edilir.



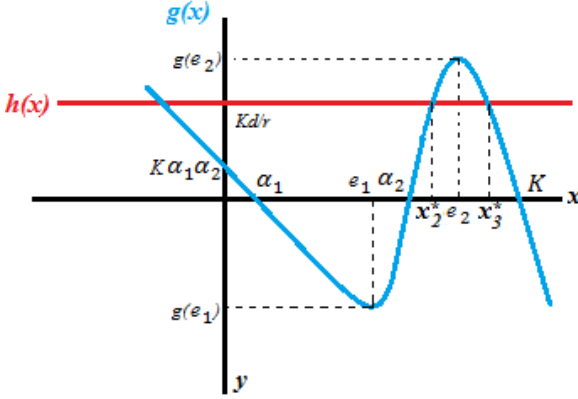
Şekil 4.1. $\alpha_1\alpha_2 > \frac{d}{r}$ ve $g(e_2) < K\frac{d}{r}$ olduğunda $g(x)$ ve $h(x)$ denklemlerinin $x - y$ düzleminin birinci bölgesindeki kesişimlerinin $x = x_1^*$ noktasında olduğunu gösteren grafik



Şekil 4.2. $\alpha_1\alpha_2 > \frac{d}{r} \vee g(e_2) > K\frac{d}{r}$ olduğunda $g(x)$ ve $h(x)$ denklemlerinin $x - y$ düzleminin birinci bölgesindeki kesişimlerinin $x = x_1^*$, $x = x_2^*$ ve $x = x_3^*$ noktalarında olduğunu gösteren grafik



Şekil 4.3. $\alpha_1\alpha_2 < \frac{d}{r}$ ve $g(e_2) < K\frac{d}{r}$ olduğunda $g(x)$ ve $h(x)$ denklemlerinin $x - y$ düzleminin birinci bölgesindeki kesişimlerinin olmadığını gösteren grafik



Şekil 4.4. $\alpha_1\alpha_2 < \frac{d}{r}$ ve $g(e_2) > K\frac{d}{r}$ olduğunda $g(x)$ ve $h(x)$ denklemlerinin $x - y$ düzleminin birinci bölgesindeki kesişimlerinin $x = x_2^*$ ve $x = x_3^*$ noktalarında olduğunu gösteren grafik

Bu önermenin sonucu olarak aşağıdaki tablo verilebilir.

Tablo 4.2. (3.1) denkleminin denge noktaları ve bu noktaların biyolojik varlık koşulları

Denge noktası	Biyolojik varlık koşulu	Denge Noktasının Bulunduğu Aralık
$\bar{x} = 0$	Her zaman vardır.	-
$\bar{x} = x_1^*$	$\alpha_1\alpha_2 > \frac{d}{r}\text{veg}(e_2) < K\frac{d}{r}$	$0 < x_1^* < e_1$
$\bar{x} = x_1^*, x_2^*, x_3^*$	$\alpha_1\alpha_2 > \frac{d}{r}\text{veg}(e_2) > K\frac{d}{r}$	$0 < x_1^* < e_1, e_1 < x_2^* < e_2$ ve $e_2 < x_3^* < K$
$\bar{x} = x_2^*, x_3^*$	$\alpha_1\alpha_2 < \frac{d}{r}\text{veg}(e_2) > K\frac{d}{r}$	$e_1 < x_2^* < e_2$ ve $e_2 < x_3^* < K$

e_1 ve e_2 ekstremum değerleri (4.10) denklemlerinde tanımlanmıştır.

Önerme 4.2. (Denge Noktalarının Kararlılık Analizi) Tablo 4.2. de gösterilen denge noktalarının kararlılıklarını (lokal asimptotik kararlılık) incelemek için (3.1) denkleminden $\frac{df(x)}{dx}$ türevi:

$$\frac{df(x)}{dx} = \frac{r}{K} \left(\frac{(x - \alpha_1)(x - \alpha_2)(K - 2x)}{x(K - x)(2x - (\alpha_1 + \alpha_2))} \right) - d \quad (4.11)$$



şeklinde elde edilir. $\bar{x}$ denge noktası için eğer $\left. \frac{df(x)}{dx} \right|_{x=\bar{x}} < 0$ ise bu nokta lokalasimtotik kararlıdır değilse kararsızdır [27]. Tablo 4.2. de gösterilen denge noktaları aşağıdaki gibi incelenir.

- $\bar{x} = 0$ denge noktası için $\left. \frac{df(x)}{dx} \right|_{x=0} = r \left(\alpha_1 \alpha_2 - \frac{d}{r} \right)$ olarak bulunur. Eğer $\alpha_1 \alpha_2 < \frac{d}{r}$ ise $\left. \frac{df(x)}{dx} \right|_{x=0} < 0$ olup bu denge noktası kararlıdır.
- Muhtemel pozitif denge noktaları (4.7) eşitliğindeki $g(x) = h(x)$ denklemi ile elde edildiği dikkate alınsın. Bu denge noktalarının kararlılıklarını inceleme kolaylığı açısından, (3.1) de tanımlanan $f(x)$ fonksiyonu (4.7) de tanımlanan $g(x)$ ve $h(x)$ fonksiyonları cinsinden, $f(x) = x(g(x) - h(x))$ (4.12)

şeklinde ifade edilir. Buradan $f'(x) = \frac{df(x)}{dx}$ türevi yeniden hesaplanırsa;

$$\frac{df(x)}{dx} = (g(x) - h(x)) + x(g'(x) - h'(x)) \quad (4.13)$$

bulunur. Dolayısıyla $i = 1, 2, 3$ için $x = x_i^*$ pozitif denge noktasında (4.13) türevi dikkate alınarak hesap edilmesiyle;

$$\left. \frac{df(x)}{dx} \right|_{x=x_i^*} = (g(x_i^*) - h(x_i^*)) + x_i^* (g'(x_i^*) - h'(x_i^*)) \quad (4.14)$$

elde edilir. Pozitif denge noktalarında $g(x_i^*) = h(x_i^*)$ olduğundan dolayı $g(x_i^*) - h(x_i^*) = 0$ ve $h(x)$ sabit fonksiyon olduğu için $h'(x_i^*) = 0$ olduğu (4.14) eşitliğinde dikkate alınmasıyla;

$$\left. \frac{df(x)}{dx} \right|_{x=x_i^*} = x_i^* g'(x_i^*) \quad (4.15)$$

bulunur. Denge değerlerinde $x_i^* > 0$ olduğu açıktır. Dolayısıyla $g'(x_i^*)$ in işaretini incelemek pozitif denge noktalarının kararlılıklarını belirlemek için yeterlidir. Yani eğer $g'(x_i^*) < 0$ ise x_i^* denge noktası kararlı $g'(x_i^*) > 0$ ise x_i^* denge noktası kararsız olarak söylenir. Şekil 4.1.-4.4. den görüleceği üzere $g(x)$ fonksiyonu $(-\infty, e_1)$ aralığında azalan (e_1, e_2) aralığında



artan ve $(e_2, +\infty)$ aralığında ise azalandır. $g(x)$ fonksiyonunun azalan olduğu aralıklarda $g'(x_i^*) < 0$ ve artan olduğu aralıklarda ise $g'(x_i^*) > 0$ olduğu göz önüne alınsın. Bu durumda $(-\infty, e_1)$ ve $(e_2, +\infty)$ aralıklarında muhtemel var olan pozitif denge noktaları kararlı ve (e_1, e_2) aralığı için ise kararsızdır.

Dolayısıyla Tablo 4.2. deki denge noktaları için aşağıdaki kararlılık tablosu elde edilir.

Tablo 4.3. (3.1) modeli için bulunan denge noktalarının biyolojik varlık ve kararlılık koşulları

Denge noktası	Biyolojik varlık koşulu	Denge Noktasının Bulunduğu Aralık	Kararlılık Koşulu
$\bar{x} = 0$	Her zaman vardır.	-	$\alpha_1 \alpha_2 < \frac{d}{r}$
$\bar{x} = x_1^*$	$\alpha_1 \alpha_2 > \frac{d}{r} \text{ve} g(e_2) < K \frac{d}{r}$	$0 < x_1^* < e_1$	x_1^* Kararlı,
$\bar{x} = x_1^*, x_2^* \text{ve} x_3^*$	$\alpha_1 \alpha_2 > \frac{d}{r} \text{ve} g(e_2) > K \frac{d}{r}$	$0 < x_1^* < e_1, e_1 < x_2^* < e_2 \text{ ve } e_2 < x_3^* < K$	x_1^* Kararlı, x_2^* Kararsız, x_3^* Kararlı,
$\bar{x} = x_2^*, x_3^*$	$\alpha_1 \alpha_2 < \frac{d}{r} \text{ve} g(e_2) > K \frac{d}{r}$	$e_1 < x_2^* < e_2 \text{ ve } e_2 < x_3^* < K$	x_2^* Kararsız, x_3^* Kararlı,

e_1 ve e_2 ekstremum değerleri (4.10) denklemlerinde tanımlanmıştır.

Sonuç 4.1. Tablo 4.3. den görüleceği üzere, sadece 1 tane pozitif denge noktasının bulunduğu durumda bu pozitif denge noktası kararlı, 3 tane pozitif denge noktası bulunduğu durumda sadece büyüklük bakımından ortadaki denge noktası kararsız diğerleri kararlı ve 2 pozitif denge noktası bulunduğu durumda ise büyüklük bakımından küçük olanı kararsız büyük olanı ise kararlıdır.



(3.1) Modeli İçin Uygulama

Bu kısımda (3.1) de ifade edilen kesirli mertebeden diferansiyel denklem şeklinde olan ve quadratik Allee etkisiyle popülasyon büyümesini tanımlayan matematiksel modelin Tablo 4.3. de özetlenen sonuçları bir uygulama ile desteklenmiştir. Uygulamada Türkiye'nin nüfus büyümesi tahmin edilmeye çalışılmıştır. Dolayısıyla uygulama için modelde kullanılan parametreler ve referansları, Tablo 5.1. de gösterilmiştir.

Tablo 5.1. 2008-2017 yılları temel alındığında Türkiye nüfusu ile ilgili bazı veriler [28]

Yıl	Nüfus (P)	Canlı doğumlar (B)	Ölümler (D)	Kaba doğum hızı $r_B = \frac{B}{P}$ ($\times 10^{-6}$)	Kaba ölüm hızı $e_D = \frac{D}{P}$ ($\times 10^{-6}$)	Allee etkisiyle r değeri $\left(r = \frac{r_B}{(P-\alpha_1)(P-\alpha_2)(1-\frac{P}{K})} \right) (\times 10^{-32})$	r değerini n ardışık yıllara göre artış oranı
2008	71517100	1295511	215562	18115	3014	1332156200811690	1.035741
2009	72561312	1266751	368390	17458	5077	1363485467144790	1.013895
2010	73722988	1261169	365190	17107	4954	1431516781013720	1.049895
2011	74724269	1248550	375923	16709	5031	1486601109293010	1.038480
2012	75627384	1292380	376000	17089	4972	1609372715944000	1.082585
2013	76667864	1294088	372686	16879	4861	1700622646922490	1.056699
2014	77695904	1345286	391009	17315	5033	1869008944190910	1.099014
2015	78741053	1325783	405218	16837	5146	1954257656108060	1.045612
2016	79814871	1309771	422135	16410	5289	20579779961134190	1.053075
2017	80810525	1291055	425781	15976	5269	2158778662922800	1.048979
9 yıllık sürede e_D değerinin değişiminin oranı (2008 yılı için e_D değeri, diğer yıllara göre daha düşük olduğundan dolayı dikkate alınmamıştır.)					1.03781	10 yıllık sürede r değerinin değişiminin oranı (artış oranları çarpımı)	1.662653



Tablo 5.2. Türkiye nüfusunun tahmini için (3.1) modelinde kullanılan parametrelerin dikkate alınan değerleri ve referansları

Parametre	Tanım	Değer			
K	Taşınma Kapasitesi [21]	182580656			
α_1	Allee	100.000.000			
α_2	Parametreleri	150.000.000			
q	Türev Mertebesi	1 (Daha iyi sonuçlar vermesi için 1 alınmıştır. Bu değerden daha az sonuçlar verildiğinde kesirli türevin özelliğinden dolayı grafiksel değişimler gözlemlenmesi için zaman daha uzun sürmektedir.)			
Yıllara Göre Parametrelerin Hesaplanan Değerleri		2017 – 2026	2026 – 2035	2035 – 2044	2044 – 2053
r	Büyüme Oranı	$2158778662922800 \cdot 10^{-32} \cdot 1.662653^1$	$2158778662922800 \cdot 10^{-32} \cdot 1.662653^2$	$2158778662922800 \cdot 10^{-32} \cdot 1.662653^3$	$2158778662922800 \cdot 10^{-32} \cdot 1.662653^4$
d	Ölüm Oranı	$5269 \cdot 10^{-6} \cdot 1.037817^1$	$5269 \cdot 10^{-6} \cdot 1.037817^2$	$5269 \cdot 10^{-6} \cdot 1.037817^3$	$5269 \cdot 10^{-6} \cdot 1.037817^4$
x_t	Başlangıç Değeri	$x_{2017} = 80810525$	$x_{2026} = 90020000$	$x_{2035} = 95110000$	$x_{2044} = 97400000$

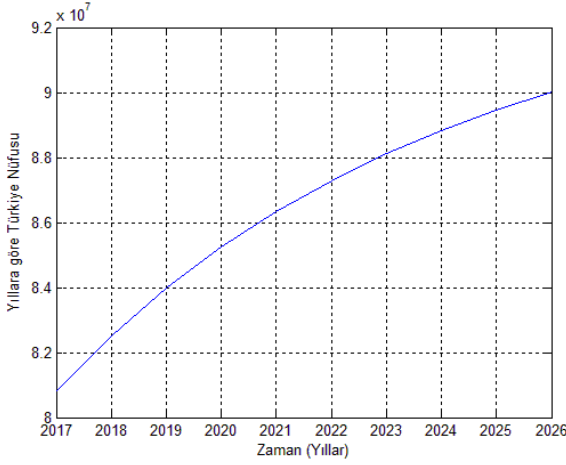
rved değerleri için **2017** yılı verileri temel alınmıştır. Ayrıca bu değerler her 10 yılda bir değişkenlik göstereceğinden dolayı ***r*** değeri 10 yıl sonundaki değişim oranı olan 1.662653 ile ve ***d*** değeri ise 1.037817 ile çarpılmıştır. Bir sonraki 10 yıl için bu değişim oranlarının kareleri daha sonra ise küpü alınarak bu şekilde devam edilerek olabildiği kadar yakın sonuçlar bulmaya çalışılmıştır.



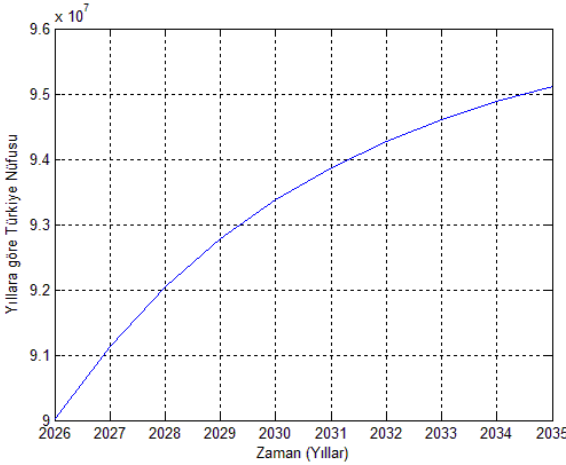
Tablo 5.3. Tablo 5.2. de verilen değerler ile Tablo 4.3. de verilen denge noktaları ve bu noktaların kararlılıkları ile ilgili bazı hesaplamalar

Hesaplanan Değerler	Tanım	2017 – 2026	2026 – 2035	2035 – 2044	2044 – 2053
e_1	(4.10) dakiextremum değerleri		120180000		
e_2			168210000		
$\alpha_1\alpha_2 \frac{d}{r}$	Tablo 4.3. de verilen bazı parametreler	1.5238e+14	9.5132e+13	5.9393e+13	3.7080e+13
$K \frac{d}{r} g(e_2)$		2.7821e+22	1.7369e+22	1.0844e+22	6.7701e+21
$\alpha_1\alpha_2 > \frac{d}{r} \text{veg}(e_2) < K \frac{d}{r}$	Bir pozitif denge noktasının varlık koşulu	Sağlanır.	Sağlanmaz.	Sağlanmaz.	Sağlanmaz.
$\alpha_1\alpha_2 < \frac{d}{r} \text{veg}(e_2) > K \frac{d}{r}$	İki pozitif denge noktasının varlık koşulu	Sağlanmaz.	Sağlanmaz.	Sağlanmaz.	Sağlanmaz.
$\alpha_1\alpha_2 > \frac{d}{r} \text{veg}(e_2) > K \frac{d}{r}$	Üç pozitif denge noktasının varlık koşulu	Sağlanmaz.	Sağlanır.	Sağlanır.	Sağlanır.
$\bar{x}$	Denge noktaları	$x_1^* = 94336000$	$x_1^* = 96260000$ $x_2^* = 165580000$ $x_3^* = 170750000$	$x_1^* = 97570000$ $x_2^* = 157520000$ $x_3^* = 177490000$	$x_1^* = 98440000$ $x_2^* = 154420000$ $x_3^* = 179720000$
$\alpha_1\alpha_2 < \frac{d}{r}$	$\bar{x} = 0$ denge noktasının kararlılık koşulu	Sağlanmaz.	Sağlanmaz.	Sağlanmaz.	Sağlanmaz.
Kararlı noktaları göre)	pozitif denge (Sonuç 4.1. e (Her zaman kararlıdır.)	94336000	96260000 (x_2^* dan küçük ve pozitif başlangıç koşullarında) 170750000 (x_2^* dan büyük başlangıç koşullarında)	97570000 (x_2^* dan küçük ve pozitif başlangıç koşullarında) 177490000 (x_2^* dan büyük başlangıç koşullarında)	98440000 (x_2^* dan küçük ve pozitif başlangıç koşullarında) ve 179720000 (x_2^* dan büyük başlangıç koşullarında)

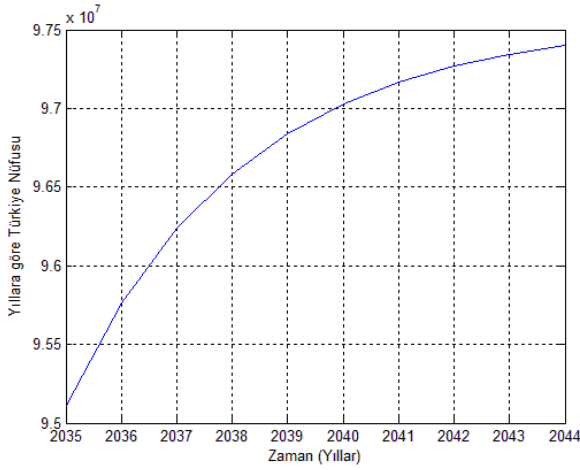
Tablo 5.3. den her bir 10 yıl için aşağıdaki eğriler elde edilmiştir.



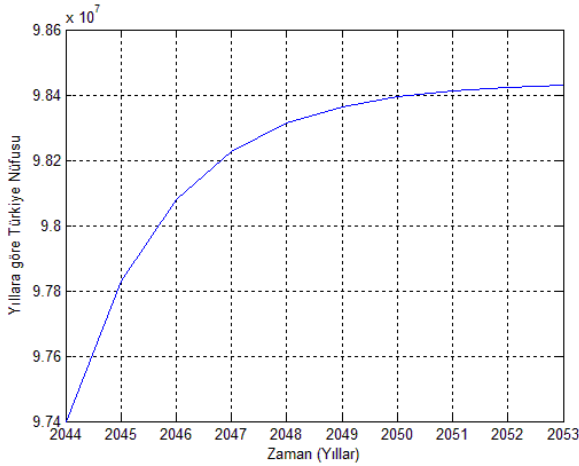
Şekil 5.1. Tablo 5.2. değerleri (3.1) denkleminde dikkate alındığında, 2017-2026 yılları arasında Türkiye'nin toplam nüfus eğrisi tahmini ($x_1^* = 94336000$ noktasının kararlılığı)



Şekil 5.2. Tablo 5.2. değerleri (3.1) denkleminde dikkate alındığında, 2026-2035 yılları arasında Türkiye'nin toplam nüfus eğrisi tahmini ($x_1^* = 96260000$ noktasının kararlılığı)



Şekil 5.3. Tablo 5.2. değerleri (3.1) denkleminde dikkate alındığında, 2035-2044 yılları arasında Türkiye'nin toplam nüfus eğrisi tahmini ($x_1^* = 97570000$ noktasının kararlılığı)



Şekil 5.4. Tablo 5.2. değerleri (3.1) denkleminde dikkate alındığında, 2044-2053 yılları arasında Türkiye'nin toplam nüfus eğrisi tahmini ($x_1^* = 98440000$ noktasının kararlılığı)



Tablo 5.4. Şekil 5.1-5.4 dikkate alındığında, Türkiye toplam nüfus tahmini için elde edilen değerler

Yıllar	Nüfus	Yıllar	Nüfus
2017	80810525	2036	95762614
2018	82514760	2037	96236362
2019	83978520	2038	96582758
2020	85240804	2039	96837375
2021	86333402	2040	97025254
2022	87282343	2041	97164285
2023	88109049	2042	97267383
2024	88831259	2043	97343956
2025	89463744	2044	97400893
2026	90018877	2045	97829045
2027	91138724	2046	98078901
2028	92041714	2047	98225764
2029	92775209	2048	98312559
2030	93374147	2049	98364017
2031	93865323	2050	98394583
2032	94269562	2051	98412759
2033	94603234	2052	98423574
2034	94879330	2053	98430013
2035	95108248		

Klasik lojistik diferansiyel denklemler ile kurulan büyüme modellerinde, popülasyon büyüklüğünün zamanla taşıma kapasitesine yaklaşacağı ileri sürülmektedir. Bu çalışmada önerilen modelde popülasyon büyüklüğünün yokolduğünokta ve taşıma kapasitesi noktası arasında muhtemel pozitif denge noktalarının olacağı Allee etkisi incelenmiştir. Bu etkiyle önerilen modelde muhtemel pozitif denge noktalarının varlığı ve kararlılıkları karakterize edilmiştir. Uygulama olarak 2008-2017 yıllarındaki Türkiye nüfus verilerinden faydalanarak 2018-2053 yıllarındaki nüfus büyüklüğü tahmin edilmeye çalışılmıştır. Bunlara ek olarak Türkiye'nin 2008 yılı için doğurganlık oranı 2.10 iken bu oran 2017 yılında 2.06 ya düşmüştür. Dolayısıyla tahmin işleminden elde edilen sonuçlar dikkate alındığında bu oranın azalmasıyla paralel sonuçların elde edildiği görülebilir.



Kaynaklar

1. S.S. Köksal, N.T. Sipahioğlu, E. Yurtsever ve S. Vehid, "Temel Sağlık Düzeyi Göstergeleri Açısından Türkiye ve Avrupa Birliği Ülkeleri," *Turkish Journal of Family Medicine and Primary Care*, 10(4), 205-212, 2016.
2. B. Daşbaşı ve D. Boztosun, "Çoklu Kesirli Mertebeden Diferansiyel Denklemler ile Palomba Ekonomi Modelinin Kararlılık Analizi," *The Journal of International Social Research*, 11(59), 901-907, 2018.
3. Öztürk, S. Zengin ve F. Bozkurt, "On The Difference Equation $Y(N+1)=[\text{Alfa}+\text{Beta}.\text{(Exp}(-Y(N)))]/(\text{Gama}+ Y(N-1))$," *Applied Mathematics And Computation Computation*, 181, 1387-1393, 2006.
4. F. Bozkurt, I. Öztürk ve S. Özen, "The Global Behavior On The Difference Equation," *Studia Universitatis Babeş-Bolyai Mathematica*, 2, 3-12, 2009.
5. B. Daşbaşı ve I. Öztürk, "Mathematical modelling of bacterial resistance to multiple antibiotics and immune system response," *SpringerPlus*, 5(408), 1-17, 2016.
6. M.B. Koç, I. Boztosun ve D. Boztosun, "On the Numerical Solution of Black-Scholes Equation," *International Workshop on MeshFree Methods*, 1-6, 2003.
7. A.S. Abdel-Rady, A.M.A. El-Sayed, S.Z. Rida ve I. Ameen, "On some impulsive differential equations," *Math. Sci. Lett.*, 2, 105-113, 2012.
8. Impulsive Differential Equations and Applications, "Katya Dishlieva," *J. Applied Computat. Mathemat.*, 1-6, 2012.
9. Öztürk ve M. Shkhanekov, "Difference Method For The Differential Equation With Fractional Derivative," *Indian Journal of Pure Mathematics*, 30, 517-523, 1999.



10. B. Daşbaşı, I. Öztürk ve N. Menekşe, "Stability Analysis of the FDE Mathematical Model Examining the Effects of the Specific Immune System Cells and the Multiple Antibiotic Concentration against Infection," *International Journal of Engineering & Applied Sciences*, 10(3),207-236, 2018.
11. F. Gürcan, Ş. Kartal, I. Öztürk ve F. Bozkurt, "Stability and bifurcation analysis of a mathematical model for tumor-immune interaction with piecewise constant arguments of delay," *Chaos, Solitons & Fractals*, 68,169-179, 2014.
12. Öztürk, F. Bozkurt ve F. Gürcan, "Stability Analysis Of A Mathematical Model In A Microcosm With Piecewise Constant Arguments," *Mathematical Biosciences*, 240, 85-91, 2012.
13. B. Daşbaşı, D. Boztosun ve S. Aksoylu, "Bir İşletmenin Üretim Durumunun Kısıtlayıcı Koşullar Altında Matematiksel Analizi," *The Journal of Academic Social Science*, 5(48),124-143, 2017.
14. T.R. Malthus, *An Essay On The Principle Of Population as it Affects The Future Improvement of Society*. London: J. Johnson, 1798.
15. P. Turchin, "Does population ecology have general laws?," *Oikos*, 94,17-26, 2001.
16. L.J.S. Allen, *An Introduction to Mathematical Biology*. London: Pearson Education, 2007, ISBN 10: 0-13-035216-0.
17. B. Gompertz, "On the nature of the function expressive of the law of human mortality, and on a new mode of determining the value of life contingencies," *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 115,513-585, 1825.
18. C.P. Winsor, "The Gompertz curve as a growth curve," *Proceedings of the national academy of sciences*, 18(1),1-8, 1932.



19. G.C. Chow, "Technological change and the demand for computers," *The American Economic Review*, 57(5),1117-1130, 1967.
20. P.W. Durbin, N. Jeung, M. H. Williams ve J. S. Arnold, "Construction of a growth curve for mammary tumors of the rat," *Cancer Research*, 27,1341-1347, 1967.
21. B. Daşbaşı, D. Boztosun ve E. Baraz, "Matematiksel Modelleme ile Nüfus ve Yapay Sinir Ağları Yardımıyla Kişi Başına Düşen Milli Gelir Tahmini: Türkiye Örneği," *Journal Of Social & Humanities Sciences Research (JSHSR)*, 4(5),841-850, 2017.
22. P.F. Verhuslt, "Notice sur la loi que la population suit dans son accroissement," *Correspondance mathematique et Physique*, 10,112-121, 1838.
23. R. Pearl ve L.J. Reed, "On the rate of growth of the population of the united states since 1790 and its mathematical representation," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 6(6),275 - 288, 1920.
24. P.E. Strannndberg, "The chemostat. Tech. rep.," *Univeristy of Linköping*, 2003.
25. E. Bowen ve W.C. Allee, "Studies in animal aggregations: mass protection against colloidal silver among goldfishes," *Journal of Experimental Zoology*, 61(2),185-207, 1932.
26. Petráš, "Stability of Fractional-Order Systems with Rational Orders," *An International Journal for Theory and Applications*, 12(3),269-298, 2009.
27. B. Daşbaşı, "Çoklu Kesirli Mertebeden Diferansiyel Denklem Sistemlerinin Kalitatif Analizi, Analizdeki Bazı Özel Durumlar ve Uygulamasi: Av-Avcı Modeli," in *Fen Bilimleri ve Matematik'te Akademik Araştırmalar*, 1st ed. Ankara: Gece Kitaplığı, 2018,127-157.
28. Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK), Nüfus ve Vatandaşlık İşleri Genel Müdürlüğü, 2018, Türkiye Nüfus İstatistikleri.

**RİEMANN TİP q-İNTEGTAL İÇEREN
İKİ DEĞİŞKENLİ
q-BALÁZS-SZABADOS-KANTOROVICH
OPERATÖRLERİNİN
YAKLAŞIM ÖZELLİKLERİ**

Esma YILDIZ ÖZKAN

Giriş

f , $[0, \infty)$ üzerinde tanımlı reel değerli sürekli bir fonksiyon olmak üzere, Bernstein tip rasyonel fonksiyonlar Balázs tarafından

$$R_n(f; x) = \frac{1}{(1 + a_n x)} \sum_{k=0}^n f\left(\frac{k}{b_n}\right) \binom{n}{k} (a_n x)^k,$$

olarak tanımlanmıştır. Burada $x \geq 0$ ve her $n \in \mathbb{N}$ için a_n ve b_n , x den bağımsız seçilmiş uygun reel sayı dizileridir.

Balázs, $\alpha \in \mathbb{R}$ olmak üzere $|f(x)| = O(e^{\alpha x})$ koşuluna sahip $[0, \infty)$ üzerinde tanımlı reel değerli her f fonksiyonu ve yeterince büyük n doğal sayıları için $a_n = n^{-1/3}$ ve $b_n = n^{2/3}$ olacak şekilde a_n ve b_n dizileri, $A > 0$ olmak üzere $[0, A]$ kapalı aralığı üzerinde süreklilik modülü yardımıyla

$$|f(x) - R_n(f; x)| \leq c_0 \omega_{2A}(n^{-1/3})$$

üst tahminini vermiştir. Burada $\delta > 0$ ve $f \in C[0, 2A]$ için

$$\omega_{2A}(\delta) = \lim_{|y-x| \leq \delta, x, y \in [0, 2A]} |f(x) - f(y)|$$

ve c_0, α ve A ya bağlı bir sabittir (Balázs, 1975).

Daha sonra Balázs ve Szabados, a_n ve b_n uygun olarak seçilmiş diziler olmak üzere, f düzgün sürekli bir fonksiyon ise, bu durumunda pozitif reel eksenin tamamı üzerinde

$$|f(x) - R_n(f; x)| \leq 2(1 + x^{1/2(1-\beta)}) \omega_f\left(\sqrt{\frac{x}{n^\beta}}\right), 0 \leq x < \infty.$$

ağırlıklı yaklaşım sonucunu elde etmişlerdir. Burada f , $[0, \infty)$ üzerinde düzgün sürekli bir fonksiyon $n \in \mathbb{N}$ ve $0 < \beta \leq \frac{2}{3}$ için $a_n = n^{\beta-1}$ ve $b_n = n^\beta$, $\delta > 0$ ve $f \in C[0, \infty)$ için

$\omega_f(\delta) = \sup_{|y-x| \leq \delta, x, y \in [0, \infty)} |f(x) - f(y)|$ dir. Özellikle $\beta = \frac{2}{3}$ için elde edilen

tahmin daha iyi bir tahmindir (Balázs ve Szabados, 1982).

Atakut ve İspir, iki değişkenli Bernstein tip fonksiyonları tanımlamışlar ve bu fonksiyonlar için süreklilik modülü yardımı ile yaklaşım derecesi ve Voronovskaja tip teoremi vermişlerdir (Atakut ve İspir, 2004).

q -Analizdeki bazı temel kavramları verelim. Bu konuyla ilgili detaylar (Andrews, Askey & Roy, 1999; Kac & Cheung, 2002) referanslı makalelerde bulunabilir.

Negatif olmayan bir r tamsayısı için r nin q tamsayısı

$$[r]_q = \begin{cases} \frac{1 - q^r}{1 - q}, & q \neq 1 \text{ ise} \\ r, & q = 1 \text{ ise} \end{cases}$$

olarak tanımlanır. q pozitif bir reel sayı olmak üzere, $r \in \mathbb{N}$ için r nin q -tamsayısı,

$$[r]_q = \begin{cases} 1 + q + q^2 + \dots + q^{r-1}, & q \neq 1 \text{ ise} \\ r, & q = 1 \text{ ise} \end{cases}$$

şeklinde de yazılabilir. q -faktöriyel ve q -binom katsayısı $[r]_q!$ ve $\begin{bmatrix} n \\ r \end{bmatrix}_q$ ile gösterilir ve

$$[r]_q! = \begin{cases} [1]_q [2]_q \dots [r]_q, & r = 1, 2, \dots \text{ ise} \\ 1, & r = 0 \text{ ise} \end{cases}$$

ve

$$\begin{bmatrix} n \\ r \end{bmatrix}_q = \frac{[n]_q!}{[r]_q! [n-r]_q!}$$

şeklinde tanımlanır.

$0 < a < b$ ve $0 < q < 1$ olmak üzere, $[a, b]$ kapalı aralığında tanımlı reel değerli bir f fonksiyonunun Riemann tip q -integrali

$$\int_a^b f(t) d_q^R t = (1 - q)(b - a) \sum_{j=0}^{\infty} f(a + (b - a)q^j) q^j$$

olarak tanımlıdır.

q -Taylor formülü,

$$(x + a)_q^n = \sum_{j=0}^n \begin{bmatrix} n \\ j \end{bmatrix}_q q^{j(j-1)/2} a^j x^{n-j}$$

olarak tanımlıdır. Bu formül dikkate alınarak, (a_n) uygun bir reel sayı dizisi olmak üzere,

$$\prod_{s=0}^{n-1} (1 + q^s a_n x) = (a_n)^n \left(\frac{1}{a_n}, x \right)_q^n = \sum_{j=0}^n \begin{bmatrix} n \\ j \end{bmatrix}_q q^{j(j-1)/2} (a_n x)^j$$

eşitliği yazılabilir.

Balázs ve Szabados tarafından verilen rasyonel tip fonksiyonların tek ve iki değişkenli q -genelleştirmesi Doğru tarafından $x \geq 0$, $0 < \beta \leq \frac{2}{3}$ ve $l_{n,q}(x) = \prod_{s=0}^{n-1} (1 + q^s x)$ olmak üzere

$$R_n^{[\beta]}(f; q, x) = \frac{1}{l_{n,q}([n]_q^{\beta-1} x)} \sum_{k=0}^n q^{k(k-1)/2} f\left(\frac{[k]_q}{[n]_q^\beta}\right) \begin{bmatrix} n \\ k \end{bmatrix}_q ([n]_q^{\beta-1} x)^k$$

olarak tanımlanmış(Doğru, 2006).

Tek değişkenli Riemann tip q -integral içeren q - Balázs-Szabados-Kantorovich operatörleri

$$\tilde{R}_n(f; q, x) = \frac{b_n}{\prod_{s=0}^{n-1} (1 + q^s a_n x)} \sum_{j=0}^n q^{j(j-1)/2} \begin{bmatrix} n \\ j \end{bmatrix}_q (a_n x)^j \int_{\frac{q[j]_q}{b_n}}^{\frac{[j+1]_q}{b_n}} f(t) d_q^R t$$

olarak tanımlıdır. Burada f , $[0, \infty)$ üzerinde tanımlı reel değerli sürekli bir fonksiyondur, $x \geq 0$, $q \in (0, 1]$, $0 < \beta \leq \frac{2}{3}$ ve her $n \in \mathbb{N}$ için $a_n = [n]_q^{\beta-1}$ ve $b_n = [n]_q^\beta$ dir. $\tilde{R}_n$, lineer ve pozitif bir operatördür.

$\tilde{R}_n$ operatörleri için aşağıdaki eşitlikler doğrudur:

$$\tilde{R}_n(1; q, x) = 1, \quad (1)$$

$$\tilde{R}_n(t; q, x) = \frac{x}{1 + a_n x} + \frac{1}{[2]_q b_n}, \quad (2)$$

$$\tilde{R}_n(t^2; q, x) = \frac{\left(1 - \frac{a_n}{b_n}\right) q x^2}{(1 + a_n x)(1 + a_n q x)} + \frac{([2]_q + 2)x}{[2]_q b_n (1 + a_n x)} + \frac{1}{[3]_q b_n^2} \quad (3)$$

$$\tilde{R}_n(t-x; q, x) = -\frac{a_n x^2}{1+a_n x} + \frac{1}{[2]_q b_n} \quad (4)$$

$$\begin{aligned} \tilde{R}_n((t-x)^2; q, x) \\ = -\frac{\left(1-q+\frac{a_n}{b_n}q\right)x^2 + (1-q)a_n x^3 + a_n q x^4}{(1+a_n x)(1+a_n q x)} \\ + \frac{([2]_q+2)x}{[2]_q b_n(1+a_n x)} - \frac{2x}{[2]_q b_n} + \frac{1}{[3]_q b_n^2} \end{aligned} \quad (5)$$

(Yıldız Özkan, 2018).

İki Değişkenli Operatörün Tanımı

Tanım 1. Riemann tip q -integral içeren iki değişkenli q - Balázs-Szabados-Kantorovich operatörleri

$$\tilde{R}_{n,m}(f; q_1, q_2, x, y)$$

$$= \sum_{j=0}^n \sum_{k=0}^m p_{n,j}(x; q_1) v_{m,k}(y; q_2) \int_{\frac{q_1[j]_{q_1}}{b_n}}^{\frac{[j+1]_{q_1}}{b_n}} \int_{\frac{q_2[k]_{q_2}}{b_n}}^{\frac{[k+1]_{q_2}}{b_n}} f(t, s) d_{q_2}^R s d_{q_1}^R t$$

olarak tanımlayalım. Burada f , $[0, \infty) \times [0, \infty)$ üzerinde tanımlı reel değerli bir fonksiyon, $q_1, q_2 \in (0, 1]$, $(x, y) \in [0, \infty) \times [0, \infty)$, $0 < \beta_1, \beta_2 \leq \frac{2}{3}$, her $n, m \in \mathbb{N}$ için $a_n = [n]_{q_1}^{\beta_1-1}$, $b_n = [n]_{q_1}^{\beta_1}$, $c_m = [m]_{q_2}^{\beta_2-1}$ ve $d_m = [m]_{q_2}^{\beta_2}$ olmak üzere

$$p_{n,j}(x; q_1) = \frac{b_n q_1^{j(j-1)} (a_n x)^j}{\prod_{s_1=0}^{n-1} (1 + q_1^{s_1} a_n x)}$$

ve

$$v_{m,k}(y; q_2) = \frac{d_m q_2^{k(k-1)} (c_m y)^k}{\prod_{s_2=0}^{m-1} (1 + q_2^{s_2} c_m y)}$$

olarak verilir.

Riemann tip q -integral içeren iki değişkenli q -Balázs-Szabados-Kantorovich operatörleri tensör çarpım tip bir lineer pozitif operatördür. Bu nedenle bu operatörler aşağıdaki lemmada verildiği gibi tanımlanabilir.

Lemma 1: Riemann tip q -integral içeren iki değişkenli q -Balázs-Szabados-Kantorovich operatörleri aşağıdaki denk olan iki ifade ile tanımlanabilir.

- (i) $\tilde{R}_{n,m}(f; q_1, q_2, x, y) := \tilde{R}_{n,q_1}^x(R_{m,q_2}^y(f; y); x),$
(ii) $\tilde{R}_{n,m}(f; q_1, q_2, x, y) := \tilde{R}_{m,q_2}^y(R_{n,q_1}^x(f; x); y).$

Burada

$$\tilde{R}_{n,q_1}^x(f; x) = \sum_{j=0}^n p_{n,j}(x; q_1) \int_{\frac{q_1[j]_{q_1}}{b_n}}^{\frac{[j+1]_{q_1}}{b_n}} f(t, y) d_{q_1}^R t,$$

$$\tilde{R}_{m,q_2}^y(f; y) = \sum_{k=0}^m p_{m,j}(y; q_2) \int_{\frac{q_2[k]_{q_2}}{b_n}}^{\frac{[k+1]_{q_2}}{b_n}} f(x, s) d_{q_2}^R s$$

şeklinde tanımlı lineer operatörlerdir.

Lemma 2. Riemann tip q -integral içeren iki değişkenli q -Balázs-Szabados-Kantorovich operatörleri için aşağıdaki eşitlikler doğrudur:

$$\tilde{R}_{n,m}(1; q_1, q_2, x, y) = 1, \quad (6)$$

$$\tilde{R}_{n,m}(t; q_1, q_2, x, y) = \frac{x}{1+a_n x} + \frac{1}{[2]_{q_1} b_n}, \quad (7)$$

$$\tilde{R}_{n,m}(s; q_1, q_2, x, y) = \frac{y}{1+c_m y} + \frac{1}{[2]_{q_2} d_m}, \quad (8)$$

$$\begin{aligned} \tilde{R}_{n,m}(t^2; q_1, q_2, x, y) = \\ \frac{\left(1 - \frac{a_n}{b_n}\right) q_1 x^2}{(1+a_n x)(1+a_n q_1 x)} + \frac{([2]_{q_1} + 2)x}{[2]_{q_1} b_n (1+a_n x)} + \frac{1}{[3]_{q_1} b_n^2} \end{aligned} \quad (9)$$

$$\begin{aligned} \tilde{R}_{n,m}(s^2; q_1, q_2, x, y) = \\ = \frac{\left(1 - \frac{c_m}{d_m}\right) q_2 y^2}{(1+c_m y)(1+c_m q_2 y)} + \frac{([2]_{q_2} + 2)y}{[2]_{q_2} d_m (1+c_m y)} + \frac{1}{[3]_{q_2} d_m^2} \end{aligned} \quad (10)$$

$$\tilde{R}_{n,m}(t - x; q_1, q_2, x, y) = -\frac{a_n x^2}{1+a_n x} + \frac{1}{[2]_{q_1} b_n} \quad (11)$$

$$\tilde{R}_{n,m}(s - y; q_1, q_2, x, y) = -\frac{c_m y^2}{1+c_m y} + \frac{1}{[2]_{q_2} d_m}, \quad (12)$$

$$\tilde{R}_{n,m}((t - x)^2; q_1, q_2, x, y) =$$

$$\begin{aligned}
& - \frac{\left(1 - q_1 + \frac{a_n}{b_n} q_1\right) x^2 + (1 - q_1) a_n x^3 + a_n q_1 x^4}{(1 + a_n x)(1 + a_n q_1 x)} \\
& + \frac{([2]_{q_1} + 2)x}{[2]_{q_1} b_n (1 + a_n x)} - \frac{2x}{[2]_{q_1} b_n} + \frac{1}{[3]_{q_1} b_n^2}
\end{aligned} \tag{13}$$

$$\begin{aligned}
& \tilde{R}_{n,m}((s - y)^2; q_1, q_2, x, y) = \\
& - \frac{\left(1 - q_2 + \frac{c_m}{d_m} q_2\right) y^2 + (1 - q_2) c_m y^3 + c_m q_2 y^4}{(1 + c_m y)(1 + c_m q_2 y)} \\
& + \frac{([2]_{q_2} + 2)y}{[2]_{q_2} d_m (1 + c_m y)} - \frac{2y}{[2]_{q_2} d_m} + \frac{1}{[3]_{q_2} d_m^2}
\end{aligned} \tag{14}$$

Tanımlar ve Yardımcı Teorem

Tanım 2: $D, \mathbb{R}^2$ de kapalı ve sınırlı bir bölge olmak üzere, $C(D)$, D bölgesinde tanımlı reel değerli sürekli fonksiyonların kümesi olsun. $C(D)$,

$\|f\|_{C(D)} = \max_{(x,y) \in D} |f(x, y)|$
normu ile bir Banach uzayıdır.

Tanım 3: $(f_{n,m})$, $C(D)$ üzerinde bir fonksiyon dizisi olmak üzere

$\lim_{n,m \rightarrow \infty} \|f_{n,m} - f\|_{C(I^2)}$
 $= \lim_{n,m \rightarrow \infty} \max_{(x,y) \in I^2} |f_{n,m}(x, y) - f(x, y)| = 0$
koşulu sağlanıyorsa, $(f_{n,m})$ fonksiyon dizisi D üzerinde f ye düzgün yakınsaktır denir.

Tanım 4: $\delta_1 > 0$, $\delta_2 > 0$ ve $f \in C(I^2)$ olmak üzere, iki değişkenli fonksiyonlar için süreklilik modülü

$$\begin{aligned}
\omega(f; \delta_1, \delta_2) = \sup\{|f(t, s) - f(x, y)| : (t, s), (x, y) \in I^2, |t - x| \\
\leq \delta_1, |s - y| \leq \delta_2\}
\end{aligned}$$

şeklinde tanımlanır.

Eğer $f \in C(I^2)$ ise, bu durumda

$$\lim_{\delta_1, \delta_2 \rightarrow 0^+} \omega(f; \delta_1, \delta_2) = 0$$

olduğu açıktır(Stancu, 1972).

Tanım 5: $0 < \theta \leq 1$ olmak üzere iki değişkenli fonksiyonlar için Lipschitz sınıfı her $(t, s), (x, y) \in I^2$ için

$$\begin{aligned} Lip_M(f; \theta) &= \{f \in C(I^2): |f(t, s) - f(x, y)| \\ &\leq M((t - x)^2 + (s - y)^2)^{\theta/2}\} \end{aligned}$$

şeklinde tanımlanır.

İki değişkenli bir lineer pozitif operatörler dizisinin $\mathbb{R}^2$ 'nin kapalı ve sınırlı bir bölgesindeki düzgün yakınsaklığı aşağıdaki Volkov teoremi yardımıyla gösterilebilir:

Volkov Teoremi(Volkov, 1957): $D, \mathbb{R}^2$ de kapalı ve sınırlı bir bölge, $C(D)$, D bölgesinde tanımlı reel değerli sürekli fonksiyonların kümesi ve $L_{n,m}(f(t, s); x, y)$, $C(D)$ üzerinde tanımlı bir lineer pozitif operatörler dizisi olsun. $f_0(t, s) = 1$, $f_1(t, s) = t$, $f_2(t, s) = s$ ve $f_3(t, s) = t^2 + s^2$ olmak üzere $i = 0, 1, 2, 3$ için $L_{n,m}(f_i; x, y)$ lineer pozitif operatörler dizisi D bölgesi bölgesi üzerinde f_i fonksiyonlarına düzgün yakınsak ise, bu durumda her $f \in C(D)$ için $L_{n,m}(f; x, y)$ lineer pozitif operatörler dizisi D bölgesi üzerinde f fonksiyonuna düzgün yakınsar.

İki Değişkenli Operatörün Düzgün Yakınsaklığı ve Yakınsama Oranı

$0 < q_{1,n}, q_{2,m} \leq 1$ olmak üzere $(q_{1,n})$ ve $(q_{2,m})$

$$\lim_{n \rightarrow \infty} q_{1,n} = 1, \lim_{n \rightarrow \infty} (q_{1,n})^n = g, 0 \leq g < 1, \quad (15)$$

$$\lim_{m \rightarrow \infty} q_{2,m} = 1, \lim_{m \rightarrow \infty} (q_{2,m})^m = h, 0 \leq h < 1, \quad (16)$$

koşullarını gerçekleyen diziler olsunlar. (9) ve (10) koşulları altında

$$\lim_{n \rightarrow \infty} a_n = \lim_{n \rightarrow \infty} \frac{1}{b_n} = 0 \quad (17)$$

ve

$$\lim_{m \rightarrow \infty} c_m = \lim_{m \rightarrow \infty} \frac{1}{d_m} = 0. \quad (18)$$

Teorem 1. $I^2 = [0, A] \times [0, A]$, $0 < q_{1,n}, q_{2,m} \leq 1$ olmak üzere $(q_{1,n})$ ve $(q_{2,m})$, (15) ve (16) ile verilen koşulları sağlayan diziler olsun. Bu durumda her $f \in C(I^2)$ için $\tilde{R}_{n,m}(f; q_{1,n}, q_{2,m}, x, y)$ operatörler dizisi I^2 üzerinde $f(x, y)$ ye düzgün yakınsaktır.

İspat. Teoremin hipotezinden elde edilen (17-18) dikkate alınarak, Lemma 2 (6-10) dan, her $i = 0,1,2,3$ için $\tilde{R}_{n,m}(f_i; q_{1,n}, q_{2,m}, x, y)$ lineer pozitif operatörler dizisi I^2 üzerinde f_i fonksiyonlarına düzgün yakınsaktır. Volkov teoreminden ispat açıktır.

Teorem 2: $0 < q_{1,n}, q_{2,m} \leq 1$ olmak üzere $(q_{1,n})$ ve $(q_{2,m})$, (15) ve (16) ile verilen koşulları sağlayan diziler olsun. Bu durumda her $f \in C(I^2)$ için aşağıdaki eşitsizlik doğrudur:

$$\|\tilde{R}_{n,m}(f; q_{1,n}, q_{2,m}, \cdot) - f\|_{C(I^2)} \leq 4\omega(f; \delta_{1,n}, \delta_{2,n}).$$

Burada

$$\delta_{1,n} = \left(\tilde{R}_{n,m}((t-x)^2; q_{1,n}, q_{2,m}, x, y) \right)^{1/2}$$

ve

$$\delta_{2,m} = \left(\tilde{R}_{n,m}((s-y)^2; q_{1,n}, q_{2,m}, x, y) \right)^{1/2}$$

İspat: $\omega(f; \delta_1, \delta_2)$ nin monotonluğundan

$$\begin{aligned} |f(t, s) - f(x, y)| &\leq \omega(f; |t-x|, |s-y|) \\ &\leq \omega(f; \delta_1, \delta_2) \left(\frac{|t-x|}{\delta_1} \right) \left(\frac{|s-y|}{\delta_2} \right) \end{aligned} \quad (19)$$

yazılabilir. $(x, y) \in I^2$ için $\tilde{R}_{n,m}$ nin lineerliği ve (19) ile verilen eşitsizlik dikkate alınarak

$$\begin{aligned} &|\tilde{R}_{n,m}(f(t, s); q_{1,n}, q_{2,m}, x, y) - f(x, y)| \\ &\leq \tilde{R}_{n,m}(|f(t, s) - f(x, y)|; q_{1,n}, q_{2,m}, x, y) \\ &\leq \omega(f; \delta_1, \delta_2) \left\{ \frac{1}{\delta_1 \delta_2} \tilde{R}_{n,m}(|t-x||s-y|; q_{1,n}, q_{2,m}, x, y) \right. \\ &\quad \left. + \frac{1}{\delta_1} \tilde{R}_{n,m}(|t-x|; q_{1,n}, q_{2,m}, x, y) \right. \\ &\quad \left. + \frac{1}{\delta_2} \tilde{R}_{n,m}(|s-y|; q_{1,n}, q_{2,m}, x, y) \right\} \end{aligned}$$

yazılabilir. Son eşitsizliğe Cauchy-Schwarz eşitsizliği uygulanırsa

$$\begin{aligned} &|\tilde{R}_{n,m}(f(t, s); q_{1,n}, q_{2,m}, x, y) - f(x, y)| \\ &\leq \omega(f; \delta_1, \delta_2) \\ &\quad \times \left\{ \frac{1}{\delta_1 \delta_2} \left(\tilde{R}_{n,m}((t-x)^2; q_{1,n}, q_{2,m}, x, y) \right)^{1/2} \right. \\ &\quad \left. \times \left(\tilde{R}_{n,m}(1; q_{1,n}, q_{2,m}, x, y) \right)^{\frac{1}{2}} \right\} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
& \times \left(\tilde{R}_{n,m}((s-y)^2; q_{1,n}, q_{2,m}, x, y) \right)^{\frac{1}{2}} \\
& \times \left(\tilde{R}_{n,m}(1; q_{1,n}, q_{2,m}, x, y) \right)^{1/2} \\
& + \frac{1}{\delta_1} \left(\tilde{R}_{n,m}((t-x)^2; q_{1,n}, q_{2,m}, x, y) \right)^{1/2} \\
& \times \left(\tilde{R}_{n,m}(1; q_{1,n}, q_{2,m}, x, y) \right)^{1/2} \\
& + \frac{1}{\delta_2} \left(\tilde{R}_{n,m}((s-y)^2; q_{1,n}, q_{2,m}, x, y) \right)^{1/2} \\
& \times \left(\tilde{R}_{n,m}(1; q_{1,n}, q_{2,m}, x, y) \right)^{1/2} \}
\end{aligned}$$

elde edilir. Lemma 2 de (6), (13) ve (14) dikkate alınarak, $\delta_1 := \delta_{1,n}$ ve $\delta_2 := \delta_{2,m}$ seçerek ve eşitsizliğin her iki tarafının maksimumu alınırsa istenen sonuç elde edilir.

Teorem 3: $0 < q_{1,n}, q_{2,m} \leq 1$ olmak üzere $(q_{1,n})$ ve $(q_{2,m})$, (15) ve (16) ile verilen koşulları sağlayan diziler olsun. Bu durumda her $f \in C(I^2)$ için aşağıdaki eşitsizlik doğrudur:

$$\|\tilde{R}_{n,m}(f; \cdot) - f\|_{C(I^2)} \leq M \left((\delta_{1,n})^\theta + (\delta_{2,m})^\theta \right).$$

Burada

$$\delta_{1,n} = \left(\tilde{R}_{n,m}((t-x)^2; q_{1,n}, q_{2,m}, x, y) \right)^{1/2}$$

ve

$$\delta_{2,m} = \left(\tilde{R}_{n,m}((s-y)^2; q_{1,n}, q_{2,m}, x, y) \right)^{1/2}.$$

İspat: $\frac{1}{u} + \frac{1}{v} = 1$ olacak şekilde $u = \frac{2}{\theta}$ ve $v = \frac{2}{2-\theta}$ seçilirse Hölder eşitsizliğinden

$$\begin{aligned}
& |\tilde{R}_{n,m}(f(t, s); q_{1,n}, q_{2,m}, x, y) - f(x, y)| \\
& \leq M \left(\tilde{R}_{n,m}((t-x)^2; q_{1,n}, q_{2,m}, x, y) \right)^{1/2} \\
& \quad \times \left(\tilde{R}_{n,m}(1; q_{1,n}, q_{2,m}, x, y) \right)^{1/2} \\
& \quad + M \left(\tilde{R}_{n,m}((s-y)^2; q_{1,n}, q_{2,m}, x, y) \right)^{1/2} \\
& \quad \times \left(\tilde{R}_{n,m}(1; q_{1,n}, q_{2,m}, x, y) \right)^{1/2}
\end{aligned}$$

yazılabilir. Lemma 2 de (6), (13) ve (14) dikkate alınarak, $\delta_1 := \delta_{1,n}$ ve $\delta_2 := \delta_{2,m}$ seçerek ve eşitsizliğin her iki tarafının maksimumu alınırsa istenen sonuç elde edilir.

Sonuç 1: Teorem 2 ve Teorem 3 de

$\lim_{n \rightarrow \infty} \delta_{1,n} = 0$ ve $\lim_{m \rightarrow \infty} \delta_{2,m} = 0$
sağlanır. Dolayısıyla

$\lim_{n,m \rightarrow \infty} \omega(f; \delta_{1,n}, \delta_{2,n}) = 0$
dır.

Sonuç olarak, Teorem 2 ve Teorem 3, $\tilde{R}_{n,m}$ operatörlerinin yakınsama oranını verir.

Genelleştirilmiş Boolean Toplam Operatörlerinin Tanımlanması Ve Yakınsama Oranı

Tanım 6: X ve Y , $\mathbb{R}$ nin kompakt iki alt kümesi, $f: X \times Y \rightarrow \mathbb{R}$ bir fonksiyon olsun. $(x_0, y_0) \in X \times Y$ için

$$\Delta_{(x,y)} f[x_0, y_0; x, y] = f(x, y) - f(x, y_0) - f(x_0, y) + f(x_0, y_0)$$

ile gösterilsin. Eğer

$$\lim_{(x,y) \rightarrow (x_0,y_0)} \Delta_{(x,y)} f[x_0, y_0; x, y] = 0$$

ise, bu durumda f ye $(x_0, y_0) \in X \times Y$ noktasında Bögel süreklidir denir ve bu kısaca “ f , B -süreklidir” diye ifade edilir. $A \subseteq \mathbb{R}^2$ olsun. Eğer her $(x, y), (t, s) \in A$ için

$$|\Delta_{(x,y)} f[x_0, y_0; x, y]| \leq M$$

olacak şekilde bir $M > 0$ mevcut ise, bu durumda f ye A üzerinde Bögel sınırlıdır denir ve bu kısaca “ f , B -sınırlıdır” diye ifade edilir. (Bögel, 1934;1935).

Eğer $A \subseteq \mathbb{R}^2$ kompakt bir alt küme ise, bu durumda her B -süreklili fonksiyon B -sınırlıdır. A kümesinden $\mathbb{R}$ ye tanımlı tüm sürekli (veya sınırlı) fonksiyonların sınıfını $C(A)$ (veya $B(A)$) ile gösterelim. $C(A)$ ve $B(A)$,

$$\|f\|_{\infty} = \sup\{|f(x, y)|: (x, y) \in A\}$$

normuyla bir Banach uzayıdır. $C(A) \subseteq C_b(A)$ dır.

$r > 0$ olmak üzere, $I = [0, r]$ ve $I^2 = I \times I$ olsun. $C(I^2)$, I^2 üzerinde sürekli, reel değerli fonksiyonların sınıfı olsun. Her $f \in C(I^2)$ için

$$\|f\|_{C(I^2)} = \sup\{|f(x, y)|: (x, y) \in I^2\}, C(I^2)$$

üzerinde tanımlı normdur.

Tanım 7: Riemann tip q -integral içeren iki değişkenli q -Balázs-Szabados-Kantorovich operatörlerinin ait genelleştirilmiş Boolean toplam operatörü her $f \in C_b(I^2)$ için

$$B_{n,m}(f(t, s); q_1, q_2, x, y) \\ := \tilde{R}_{n,m}(f(t, y) + f(x, s) - f(t, s); q_1, q_2, x, y)$$

olarak tanımlanır.

Tanım 8: $f \in C_b(I^2)$ olsun. f nin karışık düzgünlük modülü $\delta_1, \delta_2 \in (0, \infty)$ her $(t, s), (x, y) \in I^2$ için

$$\omega_{mixed}(f; \delta_1, \delta_2) \\ := \sup\{|\Delta_{(x,y)}f[x_0, y_0; x, y]| : |t - x| \\ \leq \delta_1, |s - y| \leq \delta_2\}$$

olarak tanımlıdır. (Badea, 1995; Badea&Cottin, 1990).

$\lambda_1, \lambda_2 > 0$ olmak üzere, karışık düzgünlük modülü

$$\omega_{mixed}(f; \lambda_1\delta_1, \lambda_2\delta_2) \leq (1 + \lambda_1)(1 + \lambda_2)\omega_{mixed}(f; \delta_1, \delta_2) \quad (20)$$

eşitsizliğini sağlar.

Tanım 9: Her $(t, s), (x, y) \in I^2, 0 < \theta_1, \theta_2 \leq 1$ ve $f \in C_b(I^2)$ için

$$|\Delta_{(x,y)}f[t, s; x, y]| \leq M|t - x|^{\theta_1}|s - y|^{\theta_2} \quad (21)$$

eşitsizliği sağlanıyorsa f ye B -süreklili fonksiyonlar için Lipschitz sınıfı denir ve bu kısaca " $f \in B - Lip_M(\theta_1, \theta_2)$ " ile gösterilir. (Badea, 1995; Badea&Cottin, 1990).

Sonuç 2: Eğer $f \in C_b(I^2)$ ise, bu durumda her $(x, y) \in I^2$ için

$$(i) |B_{n,m}(f(t, s); q_1, q_2, x, y) - f(x, y)| \\ \leq 4\omega_{mixed}(f; \delta_{1,n}, \delta_{2,m})$$

$$(ii) |B_{n,m}(f(t, s); q_1, q_2, x, y) - f(x, y)| \\ \leq M(\delta_{1,n})^{\theta_1}(\delta_{2,m})^{\theta_2}, 0 < \theta_1, \theta_2 \leq 1$$

eşitsizlikleri doğrudur. Burada

$$\delta_{1,n} = \left(\tilde{R}_{n,m}((t - x)^2; q_1, q_2, x, y) \right)^{1/2}$$

ve

$$\delta_{2,m} = \left(\tilde{R}_{n,m}((s - y)^2; q_1, q_2, x, y) \right)^{1/2}$$

olup, bu ifadeler Lemma 2 de (14) ve (15) ile verilmiştir.

Kaynaklar

1. Andrews, G.E., Askey, R.& Roy, R. (1999). Special functions, Cambridge Univ Press, Cambridge, 1-245.
2. Atakut, Ç.&İspir, N. (2004). On Bernstein type rational functions of two variables. *Math.Slovacka*, 54.
3. Badea, C. (1995) K-functionals and moduli of smoothness of functions defined on compact metric spaces. *Comput. Math.Appl.* 30, 23-31.
4. Badea, C.& Cottin, C. (1990) Korovkin-type theorems for generalized Boolean sum operators. *Colloquia Mathematica Societatis Janos Bolyai. In: Approximation Theory, Kecskemet (Hungary)*, 58, 51-68.
5. Balázs, K. (1975). Approximation by Bernstein type rational functions. *Acta Math. Acad.Sci. Hungar.*, 26:123-134.
6. Bernstein, S.N. (1912). Démonstration du théorème de Weierstrass fondée sur le calcul de probabilités. *Commun. Soc. Math. Kharkow.*, 13(2):1-2.
7. Balázs, K.&Szabados, J. (1982). Approximation by Bernstein type rational functions II. *Acta Math. Acad.Sci. Hungar*, 40:331-337.
8. Bögel, K. (1934) Mehr dimensionale Differentiation von Funktionen mehrerer Veränderlicher. *J. Reine Angew. Math.* 170, 197-217.
9. Bögel, K. (1935) Über die mehrdimensionale Differentiation, Integration und beschränkte Variation. *J. Reine Angew. Math.* 173, 5-29.
10. Dogru, O. (2006) On statistical approximation properties of Stancu type bivariate generalization of q -Balazs-Szabados operators. *Proceedings. Int. Conf on Numerical Analysis and Approximation Theory Cluj-Napoca Romania*, 179-194.
11. Kac, V.&Cheung, P. (2002). Quantum calculus. *Springer-Verlag*, 1-85.
12. Stancu, D.D. (1972) A new class of uniform approximation polynomial operators in two and several variables. *Proceeding of the conference on constructive theory of functions, Budepest, Akademiai Kiado*, 443-445.
13. Volkov, V.I. (1957) On the convergence of sequence of linear positive operators in the space of continuous functions of two variables. (Russian) *Dokl. Akad. Nauk. SSSR (N.S.)*, 115:17-19.
14. Yıldız Özkan, E. (2018) Weighted statistical approximation Kantorovich type q -Balazs-Szabados operators including the Riemann type q -integral. *Academic Researches in Mathematic*

and Sciences 9. Gece Kitaplığı Publishing, April 2018, Ankara, Turkey ISBN 978-605-288-392-1.

**RIEMANN TİP q-İNTEGTAL İÇEREN
İKİ DEĞİŞKENLİ
q-BALÁZS-SZABADOS-KANTOROVICH
OPERATÖRLERİNİN
YAKLAŞIM ÖZELLİKLERİ**

Esmâ YILDIZ ÖZKAN

Giriş

$f, [0, \infty)$ üzerinde tanımlı reel değerli sürekli bir fonksiyon olmak üzere, Bernstein tip rasyonel fonksiyonlar Balázs tarafından

$$R_n(f; x) = \frac{1}{(1 + a_n x)} \sum_{k=0}^n f\left(\frac{k}{b_n}\right) \binom{n}{k} (a_n x)^k,$$

olarak tanımlanmıştır. Burada $x \geq 0$ ve her $n \in \mathbb{N}$ için a_n ve b_n , x den bağımsız seçilmiş uygun reel sayı dizileridir.

Balázs, $\alpha \in \mathbb{R}$ olmak üzere $|f(x)| = O(e^{\alpha x})$ koşuluna sahip $[0, \infty)$ üzerinde tanımlı reel değerli her f fonksiyonu ve yeterince büyük n doğal sayıları için $a_n = n^{-1/3}$ ve $b_n = n^{2/3}$ olacak şekilde a_n ve b_n dizileri, $A > 0$ olmak üzere $[0, A]$ kapalı aralığı üzerinde süreklilik modülü yardımıyla

$$|f(x) - R_n(f; x)| \leq c_0 \omega_{2A}(n^{-1/3})$$

üst tahminini vermiştir. Burada $\delta > 0$ ve $f \in C[0, 2A]$ için

$$\omega_{2A}(\delta) = \lim_{|y-x| \leq \delta, x, y \in [0, 2A]} |f(x) - f(y)|$$

ve c_0, α ve A ya bağlı bir sabittir (Balázs, 1975).

Daha sonra Balázs ve Szabados, a_n ve b_n uygun olarak seçilmiş diziler olmak üzere, f düzgün sürekli bir fonksiyon ise, bu durumda pozitif reel eksenin tamamı üzerinde

$$|f(x) - R_n(f; x)| \leq 2(1 + x^{1/2(1-\beta)}) \omega_f\left(\sqrt{\frac{x}{n^\beta}}\right), 0 \leq x < \infty.$$

ağırlıklı yaklaşım sonucunu elde etmişlerdir. Burada $f, [0, \infty)$ üzerinde düzgün sürekli bir fonksiyon $n \in \mathbb{N}$ ve $0 < \beta \leq \frac{2}{3}$ için $a_n = n^{\beta-1}$ ve $b_n = n^\beta$, $\delta > 0$ ve $f \in C[0, \infty)$ için



TOKSİKOLOJİ ANALİZLERİNDE *In Vitro* YAKLAŞIMLAR

In Vitro APPROACHES TO TOXICOLOGICAL ANALYSIS



Güllü KAYMAK¹,
Harika Eylül ESMEK DURUEL²,
Sena Kardelen DİNÇ³,
Şeyma KIZILKAYA⁴,
Figen Esin KAYHAN⁵

1. Giriş

“Kötü modeller ile iyi bilim yapılamaz.” ifadesinin açıkça belirttiği üzere; mevcut en iyi model, bize en iyi sonucu veren yani en güvenilir, tekrarlanabilir ve en uygun olan modeldir. Basit ve karmaşık modeller, sadece eldeki hedefe bağlı olarak değerlidir. Basit modeller genellikle daha tekrarlanabilirdir ve amaç basit bir şey bulmak olduğunda daha uygundurlar. Bir çok bilimin yeniden üretildiği bir alanda, düzenleyici toksikoloji için pek çok sonuç yayınlanamamıştır; ancak tüketicilerin ve hastaların güvenliği için, aynı zamanda bir ürünün kaderi için önemli kararlar alınmakta ve bunun için çaba gösterilmektedir. Çoğu klinik öncesi araştırmada yapıldığı gibi yanlış sonuçların unutulması zamana bırakılamaz. Resmi doğrulama, belirli bir amaç için güvenilirliği ve uygunluğu sağlamak için temel araçtır. İyi modeller, başarılı doğrulama için ve anlamlı sonuçlar

¹ Marmara Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji
Bölümü, Göztepe, İstanbul.

²

³

⁴

⁵



elde etmek için doğrulamadan önceki başlangıç noktasıdır.

İnsan hücre kültürleri gittikçe daha fazla araştırma ve klinik öncesi ilaç geliştirme aracı haline gelmektedir. Araştırmacıların sayısı sürekli artarken, kullanılan hayvan sayısı ABD ve İngiltere İstatistiklerine göre 2000 yılına kadar yaklaşık % 50 oranında güçlü bir şekilde düşmüştür. Avrupa'da son on yıl içinde artan yatırımlara rağmen ilaç geliştirme, aynı zamanda hayvan kullanımında % 30 düşüşü sağlamıştır. Bu durum, yaşam bilimlerinin stratejik, ilerici, daha az kaynakla ve sınırlı alanlarının yeni yaklaşımlara yönelmekte olduğunu ortaya koymaktadır (Rovida ve ark., 2015). Hücre kültürleri ile çalışmayı sağlayan ve hücreleri muhafaza etmeye yönelik teknolojilerin geliştirilmesi ve maddelerin test edilmesinde kullanımı, 20. yüzyıl boyunca sürekli olarak gelişmiştir. Özellikle, insan kök hücreleri ve ilgili farklılaşma protokolleri mevcut son haline gelene kadar, yüksek kaliteli insan hücrelerine erişim çok sınırlıydı. Kök hücre teknolojileri, toksikoloji dahil tüm yaşam bilimlerini güçlü bir şekilde etkilemektedir (Suter-Dick ve ark., 2015). Hücre teknolojileri ve biyomühendislik alanındaki ilerlemeler gün geçtikçe hızlanmakta ve kombinasyon halinde eski teknolojinin yerini alan ve endüstriyi sarsan bir sinerji etkisi yaratmaktadır (Marx ve ark., 2016).

Genellikle 21. Yüzyıl için toksikoloji alanını modernize etme çabalarında, *in vitro* yaklaşımlara çok güvenilmektedir (Hartung ve Leist, 2008; Leist ve ark., 2008; Hartung, 2009). Hücre kültürü sistemleri, uzun zamandan beri mevcut olan modellerin sayısına ve özelliklerine rağmen, diğer biyomedikal bilimlere göre toksikolojik disiplinlere daha sonra girmiştir. 1981'de, 1976-1979 yıllarını kapsayan 51 bilimsel derginin taranması sonucunda, deneysel bir model olarak hücre kültürlerini kullanan sadece 300 makale bulunmuştur (Paganuzzi-Stammati ve ark., 1981). Bu araştırma sonucunda, hücre kültürü sistemlerinin toksikolojik araştırmalar için gerçek uygunluğu veya en azından en karlı ve güvenilir kullanımları konusunda birçok



sorunun hala devam ettiği ortaya çıkarılmıştır (Zucco, 1980). Bu yaklaşım, daha sonraki yıllarda ortaya çıkmış olan diğer değerlendirmelerin de gösterdiği gibi, daha fazla ilgi gösterilmiş ve seçkin kurumlar tarafından bir dizi toplantı yapılmışsa da çok hızlı bir şekilde gelişmemiştir (Rees, 1980; Dexter, 1983; Lechat ve Adolphe, 1984; Acosta ve ark., 1985).

Gerçekten de, 1980'lerin ortalarına kadar hücre kültürü teknolojisi, Avrupa Komisyonu tarafından finanse edilen bir çalışmada belirtildiği gibi, toksikolojik araştırmalarda henüz yaygın olarak kullanılmamıştır (Ryan ve McSweeney, 1986). Bu gözlem, Grisham ve Smith'in (1984) ifadesiyle, "kimyasal toksisite analizi için memeli hücre kültürü sistemlerinin tam potansiyelinin henüz pratikte gerçekleştirilmediği" şeklinde kabul edilmiştir. 1980'lerin ikinci yarısı, bu deneysel modelin toksikolojide yaygın olarak kullanılmaya başlandığı ve bu yıldan beri bir disiplin olarak "*in vitro* toksikoloji" nin teorik ve pratik çerçevesinin geliştirildiği yıllar olmuştur. Bu yeni doğmuş araştırma alanının yakın tarihi, Avrupa *İn vitro* Toksikoloji Derneği (Zucco ve Vignoli, 1998) adına hazırlanan Avrupa Komisyonu raporunda belirtilmiştir. Bu raporda, *in vitro/in vivo* konuyla ilgili tartışmalar dahil kurumsal, düzenleyici, toplumsal ve etik yönler açıklanmıştır.

Paganuzzi-Stammati ve ekibinin 1981'de yayınladığı derlemede çalışmanın bazı genel özelliklerine göre, literatürden elde edilen makaleleri gruplandırmak için üç alan belirlenmiştir. Bunlar; genel toksikoloji incelemeleri, hücrelere özgü toksikoloji araştırmaları ve metabolik araştırmalardır. Günümüzde, alanın evrimi nedeniyle eski kriterlere uymak imkansızdır. Artık bu deneysel sistemlerin sunduğu avantajları ve fırsatları sorgulamak, daha çok toksikolojik araştırmalarda kullanmak için sürekli ilerlemeleri takip etmek gereklidir (Paganuzzi-Stammati ve ark., 1981).

Bu derlemenin amacı, alanda kaydedilen büyük ilerlemelere odaklanmak, sadece genel bilimsel ve teknolojik yeniliklerle değil, aynı zamanda: (a) hücre kültürü tekniklerinin toksikolojik deneylerin



ihtiyaçlarına uyarlanmasına (b) *in vitro/in vivo* doğrulama prosedürlerinde güçlü bir taahhüt sağlanmasına, (c) hücrel ve moleküler toksisite mekanizmalarının araştırılmasına yönelik yenilikçi bir yaklaşım sağlamaktır.

2. Sitotoksosite

Sitotoksosite genel olarak, hücrenin bir sitotoksin tarafından öldürülmesi ve analizlerle birlikte bunun yansıtılmasıdır. Sitotoksosite değerlendirilmesinde; hücrel mekanizmalardaki farklılıklar, farklılıklardan doğan çıktılar ve farklılıkla meydana gelen aktivitelerin sonucunun değerlendirilmesi gibi yaklaşımlar vardır (Freshney, 1994). Hayvanlar üzerinde yapılan deneyleri azaltma isteği ve ekonomik gerekçeler sebebiyle *in vitro* analizlere gereksinim duyulmuştur. Bu sebeple de toksinlere karşı oluşturulan hücrel yanıtlar incelenmeye ve türe en uygun yanıtı veren deney planları yapılmaya başlanmıştır. Sitotoksinlerin geri dönüşü olan veya olmayan etkileri olabilir. Ayrıca bu etkiler hemen veya birkaç haftada ortaya çıkabilir. Sitotoksin çeşitleri şunlardır:

- (1) Hızlı bir şekilde fizyokimyasal hasarlar ile birlikte canlılık kaybına neden olan sitotoksinler,
- (2) Bir saat veya daha uzun bir süre boyunca metabolizma üzerinde hafif ama ilerleyici bir etkiye sahip olabilen çevresel veya farmasötik sitotoksinler,
- (3) Potansiyel üreme kaybı meydana getiren sitotoksinler.

2.1. Yanıt Çeşitleri

Fiziko-kimyasal hasara maruz kalan hücreler genellikle; sızma, hücre içi organellerin parçalanması ve esas olarak lizozomlardan salınan otolitik enzimlerin salınması sonucu nekrozla ölebilirler. Ancak aynı zamanda hücreler, spesifik fizyolojik sinyallere yanıt olarak programlanmış hücre ölümü (apoptoz)



sonucunda da ölebilirler (Wyllie, 1993). Bu sinyaller, hücre içi DNA hasarına yanıt olarak veya hücre dışı doku gelişimi ve hücre popülasyon büyüklüğünde gerekli olan homeostazı sağlayan parakrin faktörlerine yanıt olarak da verilebilir. Toksik etkiler her zaman, hemen gerçekleşen bir hücre ölümü ile sonuçlanmaz. Hücreler herhangi bir canlılık kaybı göstermeksizin metabolik değişimlere uğrayabilir veya hücre döngüsünü durdurabilir. Bu, sitostatik bir yanıttır ve genellikle geri dönüşlüdür. Besin veya büyüme faktörü yoksunluğundan veya negatif bir büyüme düzenleyicisinin varlığından kaynaklanır. Hücreler apoptozise, yaşlanmaya veya farklılaşmaya indüklendiğinde geri dönüşsüzdür.

Gözlemlenebilir etkiler çoğunlukla sınıflandırılması zor olan iltihap veya tahriş ile ilişkili sistemik hücresel yanıtlardır. Genellikle geri dönüşümlü olan bu etkiler, doku hasarı, çevresel alerjenler veya farmasötik bileşikler ve kozmetikler tarafından, hücre içi veya hücre yüzeyi reseptörlerinin aktivasyonuna neden olur. Ardından hücreler tarafından bir veya daha fazla sitokin, prostaglandin veya nitrik oksit ekspresyonuna yol açan bir sinyal kaskadı tarafından başlatılır. Yapılmasına ihtiyaç duyulan testlerin büyük bir kısmını temsil etmelerine rağmen, henüz geçerli *in vitro* test sayısı oldukça azdır.

Uç noktalarda bariz farklılıklar olmasına rağmen genel olarak toksik cevap ile fizyolojik cevap arasında net bir sınır yoktur. Potansiyel olarak, çevresel değişimlere verilen yanıtlar, fenotipik değişimlere ve genotoksik hasara varan katastrofik canlılık kaybına kadar çok geniş aralıkta olabilmektedir. Bu geniş aralığı dikkate aldığımızda, tüm hücreler için tamamen ortak olan bir sitotoksosite testi olamayacağı fark edilmektedir. Sitosidal ve sitostatik etkileri belirlemek için çok sayıda test vardır. Sitotoksiteyi araştırmak isteyen birçok grup, ilk olarak yeni bir deney yöntemi geliştirmeye çalışmaktadır. Ancak bu tip bir yaklaşıma gerek yoktur. Kullanılan testlerin fazlalığı, farklı grupların sonuçları ile karşılaştırma konusunda zorluk çıkarmaktadır (Eliason, 1993). Aynı zamanda doğrulama sürecini ve herkes



tarafından kabul görme sürecini yavaşlatmaktadır. Bu sebeple yeni test yöntemi geliştirmeyi denemeden önce mevcut testlerin gereksinimi karşılaması durumu göz önünde bulundurulmalıdır (Wilson, 1992). Sitotoksiste deneyleri genellikle belirli kategorilere ayrılır ve çalışmanın gereksinimlerine göre seçilidir.

2.2. Sitotoksiste Yönteminin Hedefleri

Sitotoksiste yöntemine yönelik iki ana yaklaşım vardır: birincisi, sitotoksiste bulgularının olumsuzlu bildirme etkisi (evsel su kaynağının kirlenmesinin veya kozmetiklerin kalite güvencesinde kullanılması gibi); diğeri, seçici toksiste değerlendirmesi olarak olumlu yönde bildirme etkisidir (anti kanser ilaçlarının geliştirilmesinde kullanılması gibi). Bu yaklaşımlar için kullanılan yöntemler en yüksek hassasiyette olmalıdır. Örneğin, testin yanlış negatiflerden arınması için hücreler uygulanan maddeye uzun süre maruz bırakılmalı, daha sonraki testlerde yanlış pozitiflerden kaçınmak için mikrotitrasyon, kısa bir maruziyetten sonra klonlama ya da yeterli iyileşme süresi gibi daha koruyucu yöntemler tercih edilmelidir.

Yöntemlerin kullanılma nedenlerinden biri de bileşiklerin aktivitelerinin; büyüme kinetiklerine, geçirgenliklere ve fenotipe olan etkilerinin belirlenmesinde hücre biyolojisiyle ilişki kurarak yorumlamaktır.

Sinerjik ve antagonistik etkiler toksik olmayan bileşiklerde toksiste meydana getirebilmektedir. Yani, yeni olan bir sitotoksik ilacın başka bir ilaçla birleşerek etkisinin artabileceği ya da azalabileceği durumlar göz önünde bulundurulmalıdır (Larsson ve ark., 1993). Hücre kültürü toksik etkileri ölçmenin yanı sıra, antikanser ilaçlara direnç mekanizmalarının saptanması için de yaygın olarak kullanılmaktadır (Harrison, 1995). Ancak *in vitro* yöntem ile elde edilen direnç derecesi, klinik olarak geliştirilenden çoğu zaman daha fazladır.



3. Avantajlar ve Sınırlamalar

3.1. *In Vitro* Yöntemin Avantajları

In vitro sistemlerin son zamanlardaki temel ilgi alanları; özgün doku özelliklerinin, hücre-hücre etkileşimlerinin ve genel anlamda *in vivo* ortamın simüle edilmesidir. Ayrıca, hedef organlarda gerçekleşen spesifik toksik etkilere bağlı olan aşamaların, *in vitro* sonuçlarının belirlenmesi de çok ümit vericidir. Günümüzde organotoksikite değerlendirmesi için *in vitro* sistemler birçok organ ve doku için geliştirilmiştir. Bu sistemler arasında öngörü değeri en yüksek olanlar: nefrotoksik (Pfaller ve Gstraunthaler, 1998), nörotoksik (Tiffany-Castiglioni ve ark., 1999), hepatotoksik (Battle ve Glyn, 2001), hematotoksik (Gribaldo ve ark., 1996) ve intestinal toksisite modelleridir (Sambury ve ark., 2001). Her durumda, farklı hiyerarşik sıralama ile izole edilmiş perfüze organlar, doku dilimleri, birincil hücre kültürleri, hücre hatları ve hücre içi fraksiyonlar gibi farklı tipte preparatlar kullanılabilir (Spielmann ve ark., 1998). Carere ve arkadaşları tarafından 2002 yılında yapılan bir araştırmada geçmiş ve günümüzde yapılan teknikler karşılaştırılmıştır, *in vivo* karmaşıklığa çözüm olarak *in vitro* yeniden yapılandırma konusunda geliştirilen yöntemler vurgulanmıştır (Carere ve ark., 2002).

In vitro sitotoksikite deneyleri, fiziko-kimyasal ve fizyolojik ortamın dikkatli bir şekilde kontrol edilmesini ve karakterize edilen hücre suşlarının kullanıldığı örneklemeler ile tekrarlanabilir olmasını sağlar. Bu durum istatistiksel analizi kolaylaştırır ve gereken tekrarlama sayısını azaltır. İlaç konsantrasyonu ve maruz kalma süresi (Konsantrasyon x Zaman), sık sık değiştirilen veya perfüze edilen kültürün değişmez veya metabolik olarak kararsız bileşikler için bile *in vivo*'dan daha doğru şekilde kontrol edilebilir. *In vitro* analizler genellikle göreceli olarak daha avantajlıdır. Analizleri kolaydır, özellikle mikrotitrasyon sistemleri ile sarf ve işçilik maliyetleri düşüktür.



In vitro modellerin bir başka önemli ve iyi bilinen avantajı, toksikolojik risk değerlendirmesi için daha kapsamlı ve güvenilir verilerin üretilmesine yardımcı olabilmesidir. Gerçekçi bir yaklaşıma göre, tüm hedef organlar için onaylanmış toksisite test sistemlerine sahip olması en büyük yararı sağlamaktadır (Eisenbrand ve ark., 2002). Hücre kültürü tekniklerinin son zamanlardaki gelişimi, hücre hatlarının toksikolojide kullanımını yaygınlaştırmaktadır.

Hayvan organizmalarındaki *in vivo* durumdan farklı olarak, kullanılan hücre hatlarının çoğunun, gelişim, farklılaşma ve yaşlanmanın tüm aşamalarında *in vitro* gerçekleştirilemediğini ve “Peter Pan” gibi, sonsuza kadar genç kalacağını unutmamak önemlidir (Tiffany-Castiglioni ve ark., 1999). Akılda tutulması gereken önemli bir nokta da, hücre hatları kullanımının normal dokudan daha farklı olduğudur. Hücreler “normal” karakterlerini ifade edebilecek, iyi ve güvenilir *in vitro* modelleri temsil edebilmelerine rağmen, hızlı ve kolay bir şekilde kültür yapılabilmeleri, tek tercih sebebi olamaz.

Toksikolojide *in vitro* olarak en çok kullanılan modeller hala hücre hatlarıdır. Ancak, bu çalışmalara ek olarak uygun *in vitro* hücresel sistemler şu şekildedir: birincil hücreler, genetik olarak değiştirilmiş hücreler, ölümsüzleştirilmiş hücreler, kök hücreler, farklılaşmış hücreler ve/veya farklılaşma aşamaları, farklı hücre tiplerinin ortak kültürleri, üç boyutlu kültürler, bariyer sistemleri. Toksikolojik açıdan bakıldığında, hepsi aynı düzeyde gelişmeye ve yararlılığa ulaşmamıştır.

3.2. *In Vitro* Yöntemin Sınırlamaları

Hücre kültüründe konstantrasyon ve zaman özellikleri standartlaştırabilirken, emilim, dağılım, bağlanma, metabolizma ve atılımın *in vivo* farmakokinetiğini taklit etmek zordur. *In vitro* yöntemde metabolik stabilite sadece hedef hücrelerin aktivitesine bağlıyken *in vivo* sistemik dağılımda birçok farklı dokunun etkisi olmaktadır. Özellikle, karaciğer enzimleri



bazı bileşikler aktive ederken bazılarını inaktif edebilir. Karaciğer mikrozomal enzimleri ("S9 fraksiyonu"), hepatositlerle birlikte ko-kültür veya hedef hücrelerin metabolize edici enzimlerle transfeksiyonu etkileyerek bu *in vitro* modelleme girişimlerinde ilginç yaklaşımları temsil edebilir. Ancak henüz *in vivo* yöntemler ile tamamen uyumlu değildir.

Hücre kültürleri, büyümenin üstel fazında kullanıldığında en tutarlı yapıyı göstermektedir. Ancak sadece küçük bir farklılaşmamış kök hücre veya *in vivo* döngü içinde yer alan progenitör hücre havuzu aynı tutarlılığı göstermeyebilir. Bu nedenle, büyüme oranı oldukça düşüktür. Bu oran nadiren % 10'dan büyükken ve sıklıkla % 1'den küçüktür. Hücre döngüsü süreleri, tümör hücrelerinde genellikle normal hücre popülasyonlarından daha uzun sürmekle birlikte, *in vitro* ortamlarda kültür koşullarına ve besin varlığına göre değişerek daha kısa sürelerde meydana gelebilir.

Hüresel geçirgenliğin sınırlamaları, bariyerlerin vasküler endotelyumda olması ve dokunun kalınlığı/karmaşıklığı tarafından belirlenir. Uygun hedef hücreler çalışma için seçilirken bu durum göz önüne alınır. Benzer geçirgenliğe sahip hücreler tercih edilir. Ancak hormonal düzenlemeden veya iyonik ortamdan kaynaklanan fenotipik değişiklikler olabilir.

Kültürü yapılan hücreler, özellikle sürekli hücre hatları genetik instabiliteye eğilimlidir ve seçim baskısı ile birlikte, hücreler türetildiği dokudan farklı bir hücre popülasyonu oluşturabilir. Kültürler aynı zamanda *in vivo* olarak bir dokunun hücre tiplerinin karmaşıklığından yoksundur ve sonuç olarak farklılaşmış fenotipi sürdürmek için gerekli spesifik hücre ve matris etkileşiminden yoksundur. Bununla birlikte, doğal ve sentetik matrisler kullanılarak doku mikroçevresinin daha doğru bir şekilde modellenmesi ve üç boyutlu modellerinde (Hoffman, 1994), birden fazla hücre tipinin mevcut olması ve etkileşime girmesinin sağlanması için girişimlerde bulunmaktadır. Hastadan hastaya yüksek oranda bir değişkenliğe sahip olduğu için *in vivo* farmakokinetiği çoğaltmak daha zordur. Ancak,



farmakokinetik profiller, perfüzyon sistemleri ve uygun şekilde hazırlanan perfüze içindeki metabolitler ile modellenebilir. *In vitro* modeller potansiyel olarak daha uygun hale gelmekle birlikte, rutin bir tarama durumunda tekrarlanması zor olmaktadır.

4. Genel Toksikoloji İncelemeleri

In vitro deneyler üç ana gruba ayrılabilir: sağkalımın kısa süreli analizleri, sağkalımın uzun süreli analizleri ve hücre proliferasyonunu kullanarak yapılan analizler veya canlılığı ölçmek için metabolik sonlanma deneyleri. Bunlar doğru zamanlama ile uygun büyüme periyodunda sitotoksin içeren test grubu ve kontrol grubu arasındaki farklılıkların olduğu maruz kalma süresi göz önüne alındığında, bir sağkalım analizini taklit etmek için kullanılabilirler. Bu analizler genellikle metabolik bir sonlanmaya sahip olmakla birlikte, hücre sayısını tahmin etmek için de kullanılmaktadır. Metabolik olarak, ilaç maruziyeti sırasında ölçüldüğünde doğru sonuca ulaşılmayabilir, çünkü bu, bileşiğin metabolik parametre üzerindeki herhangi bir doğrudan etkisini ortaya çıkarabilir ve analiz kısa sürede gerçekleştiğinden hücre çoğalmasının gözlenmesini etkisiz kılabilir. Metabolik sonlanma, ilacın sitostatik etkisi, antimetabolik etkisi ve herhangi bir sitosidal etkiden kaynaklanan popülasyonun tükenmesi arasındaki bir ilişkidir.

4.1. Yaşayabilirlik

Canlılık deneyleri genellikle, maruziyet anında hücrenin durumunun hızlı veya anlık bir ölçümünü veren analizler olarak kabul edilir. Bunlar, dondurma ve çözündürmeden sonra hayatta kalmayı tahmin etmek için ve canlı hücrelerin oranını hesaplamak için uygundur, ancak hücrelerin maruziyetinden bir süre sonra (günler) hayatta kalmalarını doğru bir şekilde tahmin edemeyecektir. Deneylerin çoğunda, tripan mavisi gibi bir boyanın eklenmesiyle plazma membranının bütünlüğü ölçülür.



Canlı hücreler, radyoaktif krom (51Cr) ve nötral kırmızı veya diasetil fluoresein (DAF) gibi boyaları alır ve tutar. Ölü hücreler geçirgen hale gelir ve cihazla tespit edilebilecek bir şekilde bağladığı kromu serbest bırakır. DAF, canlı hücreler tarafından alınır. Asetat ve fluoresein içinde hidrolize edilir. Canlı hücre zarı, fluoresein için geçirgen değildir, ancak ölü hücrelerde geçişi serbesttir. Canlı hücreler ayrıca propidyum iyodür için geçirimsiz olduğundan ve ölü hücreler geçirgen hale geldikçe, bu boya çoğu zaman DAF ile birleştirilir, böylece hem canlı hem de ölü hücreler ölçülebilir. Ölçümler bir flowsitometride veya floresan mikroskopu ile gerçekleştirilebilir. Canlı hücreler ayrıca hücre tipleri arasında değişken olsa da nötral kırmızıyı alırlar (Wilson, 1992).

Canlılık deneylerinin dezavantajları olarak, genellikle hayatta kalma oranlarını fazla göstermesi ve analizlerinin objektif olmaması verilebilir. Avantajları olarak ise, hızlı ve basit olabilmeleridir. Dondurulma ve çözülme, birincil kültür için dokunun ayrıştırılması veya yavaş büyüyen veya kırılğan bir hücre hattının alt kültürünün ardından pasajlamada canlı hücre sayılarını ayarlama nokta kontrolleri için uygundur.

4.2. Sağkalım

Hücresinin toksik bir maddeye maruz kalmasının ardından, bir süre duyarsız kalması ya da etkinin tersine çevrilebilmesi mümkün olduğundan, bu süre zarfında hayatta kalabilmesini test edilmesi sağkalım testiyle sağlanır. Sağkalım, hücrelerin seyreltik bir tek hücre süspansiyonundan koloniler oluşturma yeteneği (rejeneratif kapasite) olarak tanımlanır. Tek tek hücrelerden meydana gelen koloniler, deneyi doğru yorumlamak adına klonojenik hale getirilir. Klonojenik deneyler, yapışkan olan veya olmayan hücrelerde; transgenik ya da normal hücre süspansiyonunda gerçekleştirilebilir. Tek tabakalı klonlar hem manuel hem de otomatik sayıcılar tarafından daha kolay sayılırken, hematopoetik sistemden başka,



süspansiyondaki klonojenitede, transgenik hücreler tercih edilir.

Sağkalım, yüzey kaplama verimliliği KE'nin belirlenmesiyle hesaplanır (KE= klonlama etkinliği)

$$KE = \frac{\text{Koloni sayısı}}{\text{Kontrolde yer alan ortalama koloni sayısı}} \times 100$$

Kaplayan hücre sayısı

Sağkalım, bir test numunesinin kontrole göre yüzey kaplama verimliliğidir.

$$SF = \frac{\text{Testte yer alan ortalama koloni sayısı}}{\text{Kontrolde yer alan ortalama koloni sayısı}}$$

Kontrolde yer alan ortalama koloni sayısı

Genellikle kolonilerin iki haftalık inkübasyonundan sonra hesaplandığında yaklaşık 50 hücrelik (5 - 6 jenerasyon) bir yoğunluk ayarlamak gerekir. Çoğu sürekli hücre dizisi, iki haftada 10 jenerasyondan fazla (> 1000) hücre elde edecektir, ancak daha yavaş büyüyen hücreler kullanılıyorsa, inkübasyon süresinin uzatılması gerekebilir. Doğru sayım için, koloniler ayrı olmalı, üst üste gelmemeli ve yayılmadan ziyade yoğunlaştırılmalıdır (özellikle otomatik koloni sayımı için). Birincil kolonilerden ayrılan hücrelerden meydana gelen sekonder koloniler önlenmelidir. Zayıf yapışan HeLaS₃ gibi birçok transgenik hücre ile çalışırken dikkatli olunmalıdır. Bunlar genellikle çok daha küçük oldukları için (koloniler olgunlaştıktan sonra ortaya çıkma eğilimi gösterirler) kabul edilebilirler. Fakat klonlanan kültürleri deney süresi boyunca çok sık kullanılmayan ayrı bir inkübatöre yerleştirerek harici titreşim riski en aza indirgenmelidir. $1 \times 10^{-7}M$ - $1 \times 10^{-5}M$ aralığındaki glikokortikoid hücre-hücre adezyonunu artırabilir (Guner ve ark., 1977), daha yüksek bir kaplama verimi ve daha kompakt koloniler verebilir. Ancak bu durum sitotoksin cevabını etkileyebilir ve direkt olarak kullanılmamalıdır. Sağkalım analizleri genellikle bir dizi sitotoksin konsantrasyonu üzerinde

gerçekleştirilir. Genel olarak sağkalım eğrisini çizmek için bir günlük skala kullanıldığında IC50 tercih edilmektedir. Yeni bir bileşik ile ilk denemede, konsantrasyon aralığı geniş olmalıdır ($1 \times 10^{-9}M$ - $1 \times 10^{-2}M$). Etkili konsantrasyon aralığı oluşturulduğunda, analiz daha doğru bir IC90 oluşturmak için daha dar, doğrusal bir aralıkta tekrarlanır. Sağkalım eğrisinin alt ucunda çok az sayıda koloni olabileceğinden, pasajlama konsantrasyonunu kompanse etmek için arttırılabilir. Bu, daha fazla koloni ve daha büyük istatistiksel doğruluk verecektir. Fakat inokulumun hayatta kalmayan bileşeni beslenme etkisi yaratabileceğinden dolayı kaplama etkinliğini artırabilir, hataya da eğilimlidir. Yüzey kaplama veriminin zaten yüksek olduğu durumlarda (>% 50) bu önemli bir etkiye sahip olmayabilir, ancak daha düşük yüzey kaplama verimliliği olan hücreler için bu durum geçerlidir. Bu durumda, bir besleyici tabakaya pasajlamak gerekir. Besleyici katmanlar klonlama etkinliğini artırır ve yokluğunda görünür olmayan dirençli bir fraksiyonu ortaya çıkarabilir, ancak otomatik koloni sayımını daha da zorlaştırabilir.

Klonojenik deneyler, istenen periyot boyunca flasklarda üstel büyümede hücreler işlenir. Daha sonra, testler ve kontroller için seyrilmeyi belirlemek üzere kontrolde hücre sayımı kullanılarak, ayrı koloniler gibi, düşük yoğunlukta tripsinize edilerek pasajlaması yapılabilir. Deney istenen düzeye 1-2 haftada ulaşacaktır (Freshney, 1994). Pasajlanan hücrelerin sayısı, kaplama verimliliğine bağlıdır. Örneğin; Kaplama verimi % 50 ise, 100 hücre/50 mm'lik plakada 50 koloni verecektir. Daha düşük kaplama verimliliği daha yüksek pasajlama yoğunluğunu gerektirir ve bunun tersi de geçerlidir. Kaplama verimliliğini belirlemek için ilk önce bir dizi pasaj yoğunluğundaki hücreleri klonlamak ve sayılabilir bir plaka üretmek için kaç hücre gerektiğini belirlenmesi tavsiye edilir.

Koloniler, koloni başına yaklaşık 1000 hücreye ulaştığında, plakalar yıkanır, sabitlenir, boyanır, koloniler sayılır ve her bileşik konsantrasyonu için SF'ler



hesaplanır. Sağkalım eğrisinin dik olması, hücrelerin hassasiyetinin veya bileşiğin toksisitesinin arttığı şeklinde yorumlanır. Tersine, eğitimde, daha az duyarlı hücrelerin veya daha az toksik bileşiğin varlığından söz edilebilir.

Özetle, klonojenik analizler rejeneratif potansiyel ile hayatta kalmayı ölçmektedir. Dezavantajları olarak, yoğun bir çaba gerektirmesi, hücre yoğunluğunun anormal derecede düşük olması (bir besleme tabakası kullanılarak geliştirilmiş) ve klonlanan hücrelerin tüm popülasyonu temsil etmemesi söylenebilir. Sadece makul bir verimlilik (>1) ile klonlanan hücreler ile mümkündür. Avantajları olarak ise, genel olarak kabul görmeleri, birkaç jenerasyon için büyümeye izin vermeleri ve sitotoksiteyi sitostazdan ayırt edebilmeleridir. Artan sitotoksite, daha düşük bir sağkalım (daha az koloni) verirken, sitostazın artması koloni boyutunu azaltacaktır, ancak hücreler klonlamadan önce maruz kaldığında da koloni sayısını azaltabilir.

4.3. Mikrotitrasyon

Kısa süreli canlılık analizlerinin güvenilirliğinin azlığı ve klonojenik analizlerin yetersiz olduğu durumlar nedeniyle, ara sürede gerçekleşen bir dizi analiz geliştirilmiştir. Bunların çoğu, kullanım kolaylığı nedeniyle mikrotitrasyon plakalarına dayanmaktadır. Çok sayıda yinelenen kültür, çok çeşitli ilaç konsantrasyonlarında ve çeşitli farklı bileşiklerle işlenebilir. Deneyin sonunda üretilen veriler elektrondur ve bilgisayar analizleriyle oluşturulur. İlaç etkileşimleri, konsantrasyon gradyanları ile kolayca hesaplanabilir. Yani A bileşiği, plaka boyunca yatay olarak titre edilebilirken; B bileşiği, levhaya dikey olarak yukarı veya aşağı doğru titre edilir. Etkileşimler bir izobologram olarak çizilerek analiz edilir (Steel, 1977).

Bir mikrotitrasyon analizinde, ilaç veya bileşik başlangıçta uygulanmalı ve test boyunca muhafaza edilmelidir. Mikrotitrasyon analizi bu açıdan daha



sınırlıdır, çünkü hücreler, her aşamada üstel büyümede kalmalıdır, bu yüzden süre, üstel periyodun uzunluğu ile sınırlıdır. Yaklaşık $1 - 2 \times 10^4$ hücresi pasajlanan sürekli hücre hattı için yaklaşık bir hafta/ml olmuştur.

Hem bir test bileşiğine maruz bırakma protokolünde hem de kullanılan uç noktada farklı birkaç mikrotitrasyon analizi vardır. Hücreler bir mikrotitrasyon plakasının kuyularına ekilir ve daha sonra test bileşimi, genellikle hücreler büyüme döngüsünün üstel fazına girdiğinde (paralel plakalarda belirlenir) eklenir. Maruziyet, bileşiğin aktivitesine bağlı olarak birkaç saat ile üç gün arasında olabilir. 3 boyutlu maruziyet yapıldığında, bileşik ortam değiştirilerek günlük olarak yenilenmelidir. Bileşik daha sonra çıkarılır ve hücreler 2-3 gün iyileşmeye bırakılır. Bu süre zarfında, üstel büyümede kalmalı ve büyüme eğrisinin plato safhasına girmemelidir. IC50'de hücreler kısmen tükendiğinden, daha yavaş büyüyen, etkilenmemiş kuyulara ve kontrollere doğru belirgin bir kaymaya yol açacaktır. "İyileşme" döneminden sonra (aynı zamanda toksik etkinin zamanla arttığı bir dönem olabilir), ortam tekrar değiştirilir ve MTT analizi ile canlılık belirlenebilir (Plumb ve ark., 1989). MTT (3- [4,5-dimetiltiazol-2-il] - 2,5-difeniltetrazolyum bromürü) DMSO veya izopropil alkol içinde çözündürülmüş, çözünmeyen bir formazana bağlı ve bir ELISA plaka okuyucusu üzerinde okunan absorbans ile belirlenen bir yöntemdir. Yaşayan hücrelerin tespitinde kullanılır.

MTT'ye alternatif olarak, ortamda çözünebilir ve doğrudan okunabilir XTT yöntemi de vardır. XTT yöntemi için fenol kırmızısı içermeyen ortam gereklidir. Yeni bir hücre hattı veya yeni bir bileşik grubu ile çalışırken, test bileşiğinin varlığında/yokluğunda, hücre sayısı ile doğrusal bir ilişki taşıyan absorbans aralığının belirlenmesi önemlidir. Bazı bileşikler hücre sayısından bağımsız olarak formazan kuşağının oranını etkileyebilir. Eğer doğrusal absorbans, bileşik konsantrasyonuna karşı kontrolün bir yüzdesi olarak çizilirse, yüzde inhibisyon eğrisini verecektir. Doğrusal bir ölçekte, % 50'lik bir



formazan inhibisyonuna neden olan bileşik IC50 konsantrasyonunun uygun türevidir.

4.4. Büyüme Eğrileri

Hücreler bir kültür flaskına pasajlandığında, kültürün büyümesi gerçekleşir (Freshney, 1994). Büyüme eğrileri, farklı bileşiklerin anti-proliferatif veya sitotoksik etkilerini karşılaştırmak için kullanılabilir ve çok sayıda bileşik veya hücre hattı incelenebilir. Bir ilacın varlığında veya yokluğunda hücreleri pasajlamak ve daha sonra hücreleri saymak suretiyle basit büyüme deneyleri gerçekleştirilebilir.

Bununla birlikte, belirli bir zamanda hücre sayısı, çeşitli parametrelere bağlıdır: Bunlar; gecikme süresi, pasajlama sırasında sitotoksik bileşik tarafından indüklenen hayatta kalma fraksiyonunda azalma, iki katına çıkma süresi ve platoya ulaşmak için geçen süre. İlk kez yeni bir bileşik veya hücre grubuyla çalışıldığında tam bir büyüme eğrisinin çizilmesi için sayımların üstel fazı tercih edilir.

Özetle, hücre sayım deneyleri ve MTT deneyleri, doğru bir şekilde planlanmış ve kontrollü, hücre proliferasyonuna dayanan hızlı ve esnek deneyler sağlayabilir. Alternatif olarak, kısa süreli bir testte, MTT yaşayabilirlik ölçümünde bir düşüş kaydedecektir. Mikrotitrasyon analizleri ayrıca [3H] -timidin veya [3H] -leusin veya [35S] -metiyonin gibi amino asitler ve radyo-izotopik nükleotidlerle ölçülebilir. Muamele edilen plaka daha sonra bir plaka sayacı üzerinde, sayılarak veya otoflorografi ile analiz edilebilir (Morgan ve ark., 1993).

Mikrotitrasyon ve büyüme eğrisi deneylerinin dezavantajları, hücre kaybı ve metabolik inhibisyonu ayırt edememeleridir. Bir IC50 hesaplamasında, kuyu başına % 50 hücre kaybı veya metabolik kapasitede % 50 azalma olabilir. Ayrıca, tersinir hücre hasarı ve dirençli hücrelerin bir kısmının aşırı büyümesi arasında veya sitotoksikite ve sitostaz arasında ayırım yapamazlar. Avantaj olarak, mikrotitrasyon analizlerinin veri yakalama ve analiz dahil olmak üzere hızlı ve kolayca

otomatikleştirilmesi verilebilir. Birçok tekrara, değişkene, yüksek bir hücre ve reaktif gereksinimine sahip yüksek numune kapasitesine sahiptirler. Klonojenik sağkalım ile genellikle iyi bir korelasyon vardır (Freshney ve ark., 1994).

4.5 Ko-Kültür

Saf ve monoklonal kültürlerin üretilmesi için, hücre kültürü çalışmalarında çok fazla çaba harcanmaktadır. Tek bir hücre tipinin cevabının değerlendirilmesinde, doğal ortamdaki etkileşimlerden ve koordineli cevaplardan yoksun olduğu göz önünde bulundurulur.

Birçok organın muazzam karmaşıklığı göz önüne alındığında dokuların çoğaltılması oldukça zordur. Örneğin akciğerde 40'ın üzerinde hücre tipi bulunmaktadır (Franks ve ark., 2008; D'Arcangelo ve McGuigan, 2015; Oliveira ve ark., 2015).

Doku kültüründe en azından bu doku mimarisinin bir kısmı ile başlanır. Ancak izolasyonda meydana gelen hasar, aşırı büyüme ve dediferansiyasyon bu durumu hızla bozabilir (Fisher ve Vickers, 2013). Doku kalınlığı, oksijene ve besin maddelerine erişim gibi teknik özelliklerle sınırlı olarak, doku mimarisinin ne kadarının kültür ile aktarılabilceğini sınırlar. Bazı teknikler doku parçalarının veya bütün halde organların perfüzyonuna izin verse de, kan perfüzyonunun olmaması esas nedenidir (Huang ve ark., 2012). Dokuların ayrışması ve bunların daha sonra yeniden bir araya getirilmesi hücrelerin zarar görmesine neden olur (Layer ve ark., 2002; Kelm ve Fussenegger, 2004).

Ko-kültürler, hepatosit/Kupffer hücre ko-kültürleri için , inflamatuvar yanıtlar gibi hücresel etkileşimler gösterebilir (Hartung ve Wendel, 1992). Diğer etkileşimler arasında toksik maddelerin metabolik aktivasyonu (örn., Kükürtlenmiş karaciğer hücreleri), aksonların miyelinasyonu, kan-beyin bariyerinin oluşumu bulunur.



4.6. Üç Boyutlu (3-D) Kültür

Tek tabakalı hücre kültürleri, hücre-hücre etkileşiminin optimize edildiği fizyolojik durumu temsil etmemektedir. Hücreler çoğaldıkça, hücreler arası bağlantılar daha sık hale gelmekte ve bu durum hücre büyümesinde azalma ve farklılaşmış özelliklerin ifadesinde bir artışa neden olmaktadır (Berthiaume ve ark., 1996). Dokuların üç boyutlu özelliğini yansıtan kültürlerin, organizmaya fizyolojik olarak daha fazla benzediği kabul edilmektedir. Hücre-hücre temasları, farklılaşmayı indüklemenin yanı sıra etkileşimlerin anahtarıdır. Üç boyutlu kültürlerin avantajları arasında; hücre sağkalımının artması, artmış farklılaşma, hücre-hücre etkileşiminin artması ve organın karmaşıklığının daha rahat anlaşılması gösterilebilir (Alepee ve ark., 2014). Bu, üç boyutlu (3-D) matris üzerinde hepatositlerin kültürlenmesinin, primer kültürlerin yüksek düzeyde spesifik gen ekspresyonunu sürdürmesine neden izin verdiğini açıklayabilmektedir. Kollajen ile kaplanan yüzeylerdeki hepatositlerin büyümesi hepatositlerin canlı kalmasında bir miktar iyileşme sağlamaktadır (Guery ve ark., 1993). Şimdilerde iyi bilinen "Kollajen Sandviçi" Tekniğinin kullanımı, sıçan hepatosit kültürlerinin yaşayabilme yeteneği ve işlevselliğinin süresi üzerinde büyük bir etkiye sahipken ikinci bir kollajen tabakasının insan hepatositleri üzerine olan etkisi çok dikkat çekici olmamaktadır (Knop ve ark., 1995). Bu teknik aynı zamanda büyüme faktörlerinin etkisini ortadan kaldırmakta ve genellikle karaciğer hücresinin canlılığını arttırmaktadır (Hu ve ark., 1995). Diğer bir yandan, fareye ait transplantasyon yapılabilir sarkomadan elde edilen laminin proteinince zengin bir bazal membran jelinde hepatositlerin kültüre edilmesiyle yüksek oranda farklılaşma sağlanmıştır (Bissell ve ark., 1987). Yapılan bir çalışma, kitinin deasilasyonu ile türetilen biyo-uyumlu bir polimer olan kitosanın, hepatosit bağlanması için bir yapı iskeleti olarak ümit verici olduğunu göstermiştir. Doku mühendisliği alanında, gerilim bütünlüğü (Ingber, 1993), dinamik karşılık (Roskelley ve Bissell, 1995) gibi önemli



kavramların hücre-hücre etkileşimini, hücre-hücre dışı matris etkileşimlerini ve onların doku fonksiyonu üzerinde etkilerinin olduğu bilinmektedir. Üç boyutluluk sağlanamasa da bu elementler tam olarak bütünleştirilemez ve aydınlatılamazdı. Doku modellemesinde hücreler farklılaşma, hücre etkileşimlerinin artırılması ve hücrelerin üç boyutlu büyüme olasılığı; kanser tedavisinin geliştirilmesi gibi araştırma alanlarının önünü açmıştır (Mueller-Klieser, 1997). 3-D yapısı, kendi başına hücreler düzeyindeki varyasyonları indükler ve spesifik hücreler arası ve hücre içi kuvvetleri üretir. Bu kuvvetler, ECM-bağımlı sitoskeletal bileşenlerin spesifik olarak yeniden düzenlenmesini ve hücre sitoplazmasında viskoziteye meyil oluşmasını sağlar. Böylece hücre içinde ikincil haberleşme ağı olarak özel yollar üretilir ve aynı zamanda gen ifadesi düzenlenir.

Ayrıca üç boyutlu hücre kültürlerinin en önemli özelliklerinden biri, yapı ve fonksiyon arasında doğrudan bir ilişki ve hücreler etkileşimleri koruma olasılıkları sağlayan iyi tanımlanmış geometrileridir. Tümör terapisi çalışmalarında ilaç direnci için *in vitro* model olarak yaygın bir şekilde kullanılmıştır. Aynı zamanda sferoidler olarak da adlandırılan topaklaşan hücre kültürleri, farklı yapay destekler (jelatin süngerleri, agaroz, kollajen) üzerinde yetiştirilen, belirlenmiş hücre dizileri, fetal hücreler veya birincil eksplantlar olarak birkaç hücreler tipten türetilir. Homotipik veya heterotipik kültürler (fibroblastlar ile çeşitli hücrelerin birlikte kültürlenmesi) elde etmek mümkündür. En sık kullanılan sferoid modeller, hormon üreten dokulardan (pankreas, hipofiz bezi ve tiroid), karaciğer, beyin, kondrosit ve embriyolardan (pluripotent kök hücrelerden elde edilen embriyoid cisimcikleri) türetilmiştir. Bu sistemler sınırlı bir süre boyunca ana hücreler fonksiyonları koruyabilir ve genellikle zayıf bir farklılaşma derecesine sahiptirler (Mueller-Klieser, 1997).

Üç boyutlu kültür üretimi için farklı yaklaşımlarda bulunmaktadır (Hogberg ve ark., 2013; Lancaster ve



ark., 2013; Zhang ve ark., 2015; Jastrzebska ve ark., 2016; Kim ve ark. 2016). İki boyutlu kültürden farklı olarak hücrenin bulunduğu konum ve oluşturduğu yükseklik farklıdır. Oluşturulan yükseklik sebebiyle meydana gelen oksijene ve besine erişim farklılığından dolayı yüzeydeki hücreler ve merkezdeki hücreler birbirinden farklıdır. Pek çok organoid homojen olmamakla beraber polarizasyonlar ya da daha fazla/daha az fizyolojik yapı oluşturmaktadır. Tek seferde yetiştirilen organoidler arasında boyut, form ve hücre kompozisyonu farklılıkları oluşabilir. Özellikle test sistemlerini tasarlamak için, örneğin toksikoloji veya etkinlik testi için bu farklılıklar büyük bir problemi temsil eder.

Hücreleri üç boyutlu halde tutabilmek çok fazla çaba gerektirir. Hücreler genellikle bağlanmaya çalışır ve büyür, bu sebeple organoidleri sürekli hareket halinde çalkalayıcı/ biyoreaktörlerde tutmak alternatif bir yöntem olarak kullanılmaktadır.

Üç boyutlu modellerin kalınlığı ve yüksekliğinden dolayı, birçok mikroskopik veya spektrometrik ölçüm, organoidlere kolayca uygulanamaz. Yüksek çözünürlükte daha kalın biyolojik örnekler görüntüleyebilen teknikler arasında konfokal mikroskopi, multifoton mikroskopi ve optik koherens tomografi bulunmaktadır (Graf ve Boppart, 2010).

Organoidlerin karmaşıklığı ve bunların üretilmesi için; süre uzunluğu, karmaşık protokoller, standardizasyondaki zorluklar, düşük tekrarlanabilirlik, enfeksiyonlara yatkınlık ve bununla ilgili olarak uzman personelin zorunluluğu dezavantajları arasındadır.

4.7. Homeostatik Kültür

Homeostatik kültürün anahtarı perfüzyondur. Mikroakışkanlarla oluşur. Mikroakışkanlar, mikroeletro-mekanik sistemler (MEMS) ve akışkan kanalların birleşiminden doğar ve küçük miktarlarda sıvıların mikrometre ölçeğinde manipüle edilmesine izin verir (Whitesides, 2006). Perfüzyon tüm kültür

yöntemlerinde uygulanabilir, liflerle yapılabilir veya organlardan (hücresel) kan damarları kullanılarak oluşturulabilir. Perfüzyon, aslında statik koşullara daha yakındır. Ancak oksijen ve besin maddelerinin sürekli olarak yenilenmesini gerektirir. Bunun için teknik çözüm olan ve tüm süreci kontrol eden sensörler, deney düzeneğini daha da karmaşık hale getirmektedir. Çoğunlukla homeostatik kültür koşullarından daha fazlasını mümkün kılarlar. Yöntem çoğu zaman insan-çip yaklaşımı olarak adlandırılan birkaç organoid türünü bile barındırır (Marx ve ark., 2012). Perfüzyon sistemleri, bu tür bir proteinin teknolojisi ile ilgili bazı zorluklar taşır ve iletken tüplerdeki materyallerin birikmesine bağlanan test maddesini içerir. İki boyutlu kültürlerin perfüzyonu uzun bir süredir yapılmaktadır (Marx ve ark., 2016). Üç boyutlu perfüzyon ise daha karmaşıktır.

Tüm perfüzyon yöntemleri için bazı zorluklar vardır: Düşük hücre kütlelerine karşı perfüzyon çoğu zaman sorun teşkil etmektedir, tüm hücrelere eşit olarak ulaşan homojen bir akış sağlanamamaktadır. Tekrarların sayısı çoğu zaman mevcut olan pompa ve paralel birimlerin sayısı ile sınırlıdır, ancak bunlar mühendislik zorluklarıdır ve bu teknolojilere sağlanan maddi destek ve artan ilgiyle daha uygun çözümler oluşturulabilir.

4.8. Doku Mimarisi ve İşlevsellik

Hücrelerin bir kısmı, farklı hücre tiplerinde veya perfüze olsa bile, hala bir organın sadece temsidir (Hartung, 2014). Bu organ işlevselliğini tam olarak yansıtmaz. Doğru bir yanıt oluşturabilmek için doku mimarisinin oluşturulması gereklidir. Bu mimari özellikle kök hücre kaynaklı sistemlerde kullanılabilir. Akciğer veya bağırsak gibi bazı organoidler (Huh ve ark., 2012; Oliveira ve ark., 2015) fiziksel gerilmeden faydalanır. Etkileyici teknik çözümler bulunmaya çalışılmakta, ancak bunlar perfüzyon kültürlerine göre daha fazla karmaşıklık göstermektedir.



4.9. Nekroz ve Apoptoz

In vitro toksisite çalışmalarında, apoptoz ile ilgili araştırmalar sadece hücrelerin farklı şekillerde ölebildiğini göstermekle kalmayıp, aynı zamanda mekanik temelli son noktaları aramanın sorununu da çözmüştür. Gerçekten de apoptoz belirli bir programın sonucudur. Apoptoz ile ilgili adımlar ve bunların düzenlemeleri, geniş çapta araştırılmıştır. Apoptoz birçok temel hücresel fonksiyonla ilgilenir ve sinyalleme yolunda yer alan önemli faktörlerdeki varyasyona işaret eder. Özel morfolojik ve biyokimyasal değişiklikler; nükleus (kondenzasyon ve apoptotik cisim oluşumu), hücresel membran (fosfatidilserin eksternalizasyonu), mitokondri (sitokrom c salımı ve transmembran potansiyelinin kaybı) ve spesifik proteazlar (kaspazlar) seviyesinde meydana gelir. Ayrıca bir dizi proto-onkogenler ve tümör baskılayıcı genler, çeşitli hücrelerde ve dokularda farklı şekillerde aktive olabilen apoptozun (p53, c-myc, bcl-2 familyası, vb.) düzenlenmesinde rol oynarlar.

Hücre ölümünü değerlendirmek için daha güncel bir stratejiye sahip olmanın önemi, test amaçlı olarak Zucco tarafından ele alınmıştır (Zucco, 1993). Araştırmasında, bir hücrenin kimyasal bir uygulama sonucu ölmesiyle atılan ilk adımların apoptoz ile nekroz arasında paylaşılabileceği ve sonuçların ilerleyen seçimlerin bir sonucu olabileceği ileri sürülmüştür. Bu nedenle, belirli bir etki mekanizmasını aydınlatılabileceğinden, bir veya diğer hücre ölümüne yol açan farklı adımların izlenmesine izin veren noktaların ve maruz kalma koşullarının belirlenmesi tavsiye edilmiştir. Lemaire (1998), kaspaz inhibitörlerinin varlığında nekrozdan apoptoza geçişin olduğunu göstermiştir. Formigli ve arkadaşları (2000) kimyasal olarak indüklenen hipoksiye bağlı hücre ölümüne 'aponekroz' adını önermiştir. Bu yazarlara göre, uygulama hücredeki ATP'yi kısmen yok etmek için yeterince güçlü ise, apoptotik programın sadece birkaç adımı meydana gelebilir, ardından nekroz oluşabilir. McConkey (1998), yaptığı incelemede ATP'nin tükenmesinin, reaktif oksijen

türlerinin oluşmasının (ROS), GSH tüketiminin, apoptoz ve nekroz gibi hücre ölüm faktörlerinin BCL-2 inhibisyonuna sebep olduğunu vurgulamaktadır. Bununla birlikte, uygulanan maddenin yoğunluğuna veya etki tarzına göre değişmekte olduğu belirtilmiştir. Denecker ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada (2001), aktif kaspazdan bağımsız bir nekrotik sinyal yolunu indükleyebilen ölüm bölgesi reseptörleri açısından nekrotik ve apoptotik yollar tarif edilmiştir.

Toksisite çalışmalarında apoptoz ile ilgili mekanizmalarla ilgili olarak, metaller, ditiyokarbamatlar, benzen gibi çevresel kirletici maddelerin, muhtemelen ROS üreterek apoptozu indüklediğine dair kanıtlar mevcuttur. TCDD (2,3,7,8-Tetraklorodibenzo-p-dioksin), PCB'ler (poliklorlu bifeniller), PAH'lar (poliaromatik hidrokarbonlar) gibi diğer bileşikler, aril hidrokarbon reseptörüne (AHR, bir ligand ile aktive edilen transkripsiyon faktörü) bağlanır. Apoptoz sadece hücrenin ölmesi için bir yol oluşturmazken düzenleme ve ilgili değişiklikler ile hücrenin uzaklaştırılması, çoğalması, farklılaşması veya tümör oluşumunda da rol oynayabilir. Granville ve arkadaşlarının (1998) ve Kong ve arkadaşlarının (1999) yaptıkları çalışmalarla, önleyici veya tedavi edici stratejiler oluşturmak için ilaç veya toksinlere maruz kaldıktan sonra hücrenin olası kaderini bilmenin önemi vurgulanmıştır. Bununla birlikte, programlanmış hücre ölümü olarak apoptoz üzerine büyük miktarda bilgi birikimi elde etmiş olsak da, birçok ksenobiyotiklerin sitotoksik etkileriyle ilgili spesifik mekanizmalar ayrıntılı olarak incelenmeye devam edilmektedir (Robertson ve Orrenius, 2000).

Apoptotik mekanizmaları, etkileri ve molekülleri araştırmak için pek çok hassas ve güvenilir teknik mevcuttur. Bunlar arasında, bu araştırma alanının başlangıcından bu yana, apoptozda morfolojik gözlemlere atanan rol nedeniyle mikroskopi öne çıkmaktadır. Bilgisayarlı görüntüleme ve immüno Floresan problemleri ile verilen destek, bu tür çalışmalara pek çok bilgi sağlamaktadır (Allen ve ark., 2000). Üstelik, yüksek verimli biyokütle teknolojisi,



ölmek ya da yaşamak için bir hücreye katılan molekülleri (genleri ve proteinleri) bulmamızı sağlar (Wang ve ark., 1999). Hücre sinyallemedeki dengenin daha iyi anlaşılmasının yolu bu şekilde açıklanmıştır, hücrede meydana gelen olayların daha iyi kontrol edilmesi sağlanabilir.

5. Karaciğer Hücrelerinde *In Vitro* Analizler

Karaciğer, zehirli kimyasalların ortadan kaldırılmasını, albümin gibi çok sayıda plazma proteininin sentezlenmesini, detoksifikasyonu sağlayan oldukça güçlü bir organdır. Bu nedenle, hücre kültüründe hepatik yanıtlar üretilmesi toksikolojik çalışmalar için hayati bir önem kazanmıştır. Biyokimyasal özelliklerine rağmen, asinöz adı verilen histolojik birimi oluşturan hücresel yapısının karmaşık olmaması şaşırtıcıdır (Rappaport ve ark, 1954). Karaciğerin hücresel yapısı, venöz sinüzoidal boşlukları ile ayrılmış olan hepatosit plaklarını içerir. Venöz sinüzoidler; bakteri ve diğer yabancı maddeleri fagosite etme yeteneğine sahip retikular-endotelial tip hücreler olan Kupffer hücreleri ve endotelial hücreler ile kaplıdır. Bu endotelial tabakanın bazal bölgesinde, endotelium ile lenfatik damarlara giden hepatositler arasında perisinüzoidal boşluk (Disse aralıkları) denilen bir alan bulunmaktadır. Hepatosit tabakalarının karşı tarafında, hücre sekresyonlarını toplayan ve bunları safra kanalcıklarına taşıyan safra kanalları bulunur. Karaciğer fonksiyonlarının çoğunu yerine getiren baskın olarak bulunan hücre tipi, insanlarda bir gram karaciğer dokusu başına 108 hücre olacak şekilde yoğunluğu olan hepatositlerdir. Bununla birlikte, hepatositler, Kupffer hücreleri ve daha önce tarif edildiği gibi endotelial hücreler ve aynı zamanda safra kanalı hücreleri, mezenkimal hücreler ve sinir hücreleri de dahil olmak üzere karaciğerde birçok hücre tipi bulunmaktadır.

Hepatositlerin hücre bolluğu ve karaciğere fonksiyonel katkısı açısından baskınlığı; primer hepatosit kültürlerinin *in vitro* hepato-toksikoloji

çalışmaları için önemli bir araç olduğu anlamına gelmektedir.

Bazı metabolize edici enzimler endotel, Kupffer ve safra kanalı hücrelerinde bulunsalar da hepatositler, karaciğerin kimyasal biyotransformasyon (biyolojik dönüşüm) merkezidir (Steinberg ve ark., 1987). Hepatositler, Faz 1 ve Faz 2 olarak adlandırılan iki gruba ayrılan detoksifikasyon reaksiyonlarını ve bunların aktivasyonlarını sağlayan enzim kombinasyonunu yönetir.

5.1. *In Vitro* Hepatositler

Karaciğer; hücre içi fraksiyonlar, hücre hatları, izole edilmiş hücreler, karaciğer dilimleri (Smith ve ark., 1986), perfüze edilmiş izole karaciğerlerin (Belinsky ve ark., 1984; Plaa, 1993) kullanılmasıyla *in vitro* ortamlarda çalışılmıştır. Teknolojik gelişmeler ile 2-3 günün üzerinde metabolik veri elde edilebilen ve güvenilir bir şekilde 250 µm doku kesitleri hazırlanabilen karaciğer dilim modellerine olan ilginin yeniden canlanması sağlanmıştır. Buna rağmen, *in vitro* sistemlerde yaygın olarak izole edilmiş hepatositler kullanılmaktadır.

5.1.1. Primer Hepatositlerin Hazırlanması

Karaciğer hücreleri olan hepatositlerin boyutu, türler arasında değişmekte olup insanlarda (%80, Gates ve ark, 1961) sıçanlardan (%60, Daoust, 1958) daha büyüktür. Hepatositleri izole etmek için kullanılan saflaştırma tekniği olarak yüzdürme tekniği kullanıldığında (santrifüjlü ayırıştırma gibi) doğal hepatositlerdeki bu varyasyonlar dikkate alınmalıdır.

Hepatositlerin izole edilmesi için yetişkin karaciğer dokusunun ayrıştırılması işlemi, genellikle ilk olarak sıçanlar için geliştirilen (Berry ve Friend, 1969; Seglen 1976) ve sonrasında insan, domuz, tavşan ve köpek (Guguen-Guillouzo ve Guillouzo, 1986; Van't Klooster ve ark., 1992; McQueen, 1993; Ulrich ve ark., 1995) gibi



canlıların dokularına uyarlanan iki aşamalı perfüzyon tekniği ile gerçekleştirilmektedir. Bu protokol karaciğeri iki değerlikli katyon içermeyen bir tamponla perfüze etmeyi, komşu hücreler ve ekstrasellüler matris arasında bulunan desmozom ve i-dezmozom bağlantılarını etkili bir şekilde gevşetmeyi içermektedir. Daha sonra dikkatli bir şekilde pH, oksijen durumu ve sıcaklık kontrol edilerek matrisi sindirmek için jelatin üreten enzim grubu olan kollajenazlardan biri kullanılır. Hepatosit canlılığına zararlı olduğu bilindiği için mekanik parçalama gibi komple numune ayrıştırmasından kaçınılmalıdır (Strain, 1994). Perfüze karaciğer dokularının gram başına düşen hücre veriminin optimizasyonunun önemine rağmen, insan hepatositlerinin izolasyonu için kullanılan teknikler tamamen standardize edilmemiştir. Katyon gideriminin etkinliğini arttırmak için EGTA ve EDTA gibi şelatlaştırıcı maddenin kullanılması da popüler bir varyasyondur. Oluştğu yerde (*in situ*) bütün karaciğer perfüzyonu için bu teknik kullanılarak ortalama %94.6'lık canlılığa sahip domuz hepatositlerinin büyük miktarda eldesi sağlanmıştır. (Seilaff ve ark., 1995). Ayrıca; dispaz, hiyalüronidaz ve DNAaz gibi ek enzimlerin kullanılması önerilmektedir (Strain, 1994). Bu enzimlerden hiyalüronidaz, hücre ayrışmasının ve saflaştırılmasının mümkün olmadığı hasar görmüş hücrelerden salınan büyük jelatinimsi DNA zincirlerini sindirir.

Tüm karaciğer ayrıştırılması çoğunlukla küçük memeliler için uygulanırken büyük türler için sıklıkla kama biyopsileri kullanılmaktadır. Kupffer ve endotelial hücreler kollajenaz-pronaz uygulanması (Knook ve ark, 1977) ile hazırlanabilmekte ve primer endotelial hücrelerin kültürü başarıyla yapılabilmektedir (Brouwer ve ark., 1988).

5.1.2. İzole Edilmiş Primer Hepatositlerin *In Vitro* Kültürü

Cam veya plastik yüzeylerde büyüeyebilen hepatosit süspansiyonları polarite ve tek katlı epitel oluşturacaktır

(Maurice ve ark. 1988). Karaciğerin spesifik fonksiyonlarında genel bir düşüş izlenmesine ve bu durum dediferansiyasyon işlemine (Van Dyke ve ark., 1982) atfedilmiş olmasına rağmen; şekerler (Baur ve Heldt, 1977), aminoasitler (Kilberg, 1982) ve safra asitlerindeki (Schwarz ve ark., 1975) sodyuma bağımlı transport fonksiyonları gibi sayısız hepatosit fonksiyonu *in vitro* ortamda sürdürülmektedir. Hepatositler primer kültürlerde işlevselliğini erken kaybetme eğilimindedir ve bu farklılaşma kaybı çeşitli teknikler kullanılarak manipüle edilebilmektedir. Sıçan hepatositlerinde *in vitro* ortamda ilk 24-48 saatte (Begue ve ark., 1984) %50'ye varan CYP kaybı ve CYP aktivitesini yeniden kazanmak için indükleyiciler kullanılabilirken bu yanıt *in vivo* ortamla doğrudan karşılaştırılamayabilir (Watkins ve ark., 1986). Benzer değişiklikler UDP-glukuronil transferaz (Forster ve ark., 1986), glutatyon transferazlar (Vandenberghe ve ark., 1988), albümin ve sadece 24 saat sonra *in vitro* ortamda *in vivo* ortamdaki transkripsiyon oranlarının %10'undan daha az kayıp görülen transferrin gibi diğer karaciğere spesifik genlerde de gözlemlenmektedir. (Clayton ve Darnell, 1983; Fraslin ve ark., 1985). *In vitro* ortamda insan hepatositlerinin tüm ana CYP grubu aktivitelerinin korunduğu gösterilmesine rağmen, bu değişimler türler arasında değişiklik göstermektedir. (Morel ve ark., 1990).

Kültür ortamı, ortam takviyeleri (Ryan ve ark., 1993) ve belirli bazı aminoasit seviyelerinin (McGowan, 1986; Hasegawa ve ark., 1994) *in vitro* hepatositlerin fonksiyonlarında spesifik bir etkisinin olduğu bilinmektedir. Williams'ın E besi yeri kullanılan insan hepatositlerinin uzun süreli kültürleri benzer hücrelerin yetiştirildiği DMEM ile kıyaslandığında, erken evrede bozulma görülmesine rağmen maksimal albümin salgısının daha erken olduğu görülmüştür. (Ryan ve ark., 1993). Williams'ın E besi yeri; asparajin, sistein, prolin ve glutamat dahil olmak üzere ek amino asitler içerir. Bu son amino asit hepatosit yanıtını güçlendirir ve primer kültürdeki mitojenlere duyarlılığı azaltır



(Hasegawa ve ark., 1994). Prolin, sıçan hepatositlerinde DNA sentezi için temel bir bileşen gibi görünmektedir ve bu muhtemelen kollajen yapısının öneminden kaynaklanmaktadır. Cis-hidroksiprolin tarafından kollajen sentezinin spesifik inhibisyonu, hepatosit DNA replikasyonunun doza bağlı inhibisyonuna neden olur (McGowan 1986). Tek başına prolin, glutamik asitten daha az etkili olmasına rağmen epidermal büyüme faktörü kaynaklı DNA sentezini artırır. Hepatositlerin *in vitro* ortamda farklılaşması, kolajen gibi matris proteinlerinin transkripsiyonunu arttıran, ancak albümin gibi dokuya özel proteinler olmayan deksametazon gibi katkı maddeleri ile arttırılabilir (Reid ve ark., 1986). Başarılı primer hepatosit kültürü geleneksel olarak kültür ortamına bovin serum eklenmesine dayanmaktadır. Sığır pankreatik tripsin inhibitörü (moleküler ağırlığı: 8000 Da.) içermesi bu başarının muhtemel açıklamasıdır. Serumsuz kültürde oto-degradasyon görülmesi ve normal hepatositlerin plazma membranlarının tripsin benzeri bir proteaz barındırması, sığır pankreatik tripsin inhibitörünün hepatositlerin canlılığını korumasını kolaylaştırdığı bilinmektedir. Hepatosit büyüme faktörü, primer kültürde hepatositler için en güçlü mitojen olarak gösterilmiştir (Nakamura ve ark., 1989). Diğer büyüme faktörlerinin yokluğunda hepatositlerin büyümesini tamamen uyarabilmekte (Strain, 1994) ve tek tabakalı kültürde hepatosit dediferansiyasyonunu indükleyebilmektedir. Bu, hücrelerin reproduksiyonunun karşılıklı olarak düzenlenmesinin ve bunların farklılaşmasının göstergesidir (Hu ve ark., 1995). Hepatosit büyüme faktörü, sayısız fonksiyona sahip bir sitokin olarak bilinmekte ve karaciğer rejenerasyonunda rol oynamaktadır (Boros ve Miller, 1995). Hepatositlerin sinüzoidal hücreleri (Wanson ve ark., 1979) ve fibroblastları (Michalopoulos ve ark., 1979) gibi diğer hücre tipleri ile yapılan ko-kültürler, hepatositlerin yaşamasında gelişmeler sağlamıştır. Bununla birlikte, ko-kültürün en başarılı uygulamasında safra epitelinden elde edilmiş sıçan karaciğer epitel hücreleri kullanılmakta ve bu da Faz 1 ve Faz 2

enzimleri, plazma proteinlerinin sentezinin retansiyonu ile birkaç hafta hayatta kalabilmektedir (Lebreton ve ark., 1986; Conner ve ark., 1990; Lerche ve ark., 1997). Bununla birlikte, ko-kültürlerin analitik çalışmalarının yorumlanmasının zor olması, onların sınırlı alanda kullanılmasına neden olmaktadır. Hazırlık metodlarının, kültür ortamlarının ve substratların çeşitli oluşu, bu farklı yaklaşımları kullanarak verilerin karşılaştırılmasında bazı zorlukların olabileceği anlamına gelmektedir. Hepatosit kültürlerinin standardize edilme problemi Skett ve Bayliss tarafından detaylıca incelenmiştir (1996).

5.2. Üç Boyutlu Hepatosit Kültür Sistemleri

Üç boyutlu kültür sistemi kavramı hepatositler söz konusu olduğunda, farklılaşmayı teşvik etmek ve süspansiyonda çok hücreli sferoidlerin oluşumunu arttırmak amacıyla çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Bir çalışmada, süspansiyon kültürdeki domuz hepatositlerinin kültür başlangıcının 24 saati içinde 135 µm çapındaki agregatları oluşturulmuştur (Sakai ve ark., 1996). Taramalı elektron mikroskopu (SEM), yüksek oranda farklılaşmanın işareti olan bu sferoidlerin tüm yüzeyinden yansıyan çok sayıda mikrovillusu ortaya çıkarmıştır. Albümin sentezi ve amonyum giderimi açısından bakıldığında fonksiyonel ekspresyon seviyesi, tek katmanlı kültüre edilen hücrelerin eşdeğer sayısının 2-3 katı olduğu da gösterilmiştir. Bu tür veriler, primer kültürler ile biyo-yapay karaciğer oluşturulmasında ve bu alandaki gelişmelerin *in vivo* duruma benzeyen *in vitro* toksikoloji çalışmalarına model oluşturmaya yardımcı olabileceği dikkate alınmalıdır. Bu açıdan domuz sferoidlerinin biyoreaktör ortamında aljinat boncukları ile kaplanmış membranlarda domuz hepatositleri gibi iyi performans sergiledikleri gösterilmiştir (Fremond ve ark., 1996). Poli-hidroksietyl metakrilat (PolyHEMA) kullanılarak sferoid kültürlerinin üretilmesi; albümin ve transferrin gibi plazma proteinlerinin uzun süreli ekspresyonunu (Tong ve ark., 1992; Sakai ve ark., 1996) ve ekstraselüler matris



proteinlerinin birikimini (Knook ve ark., 1977) tetiklediği gösterilmiştir. (Unsworth ve Lelkes, 1998; Battle ve ark., 1998). Dönen Damar Duvarı (Rotating Wall Vessels) olarak adlandırılan daha sofistike cihazlar, düşük kayma gerilmeli kültür sistemleri elde etmek amacıyla gaz-büyüme ortamında meydana gelen türbülansı engellemek için kullanılmaktadır (Unsworth ve Lelkes, 1998; Battle ve ark., 1998). Bu sistemler, karaciğer histolojisi ile nispeten büyük doku parçalarının *in vitro* üretimini sağlamıştır (Maguire ve ark., 1998).

5.3. Kültür İçin İnsan Hepatosit Kaynakları

Hepatosit transplantasyonu ve gen terapisindeki potansiyel klinik uygulamaların dışında primer hepatosit kültürleri; karaciğer büyümesi, metabolizması ve toksikolojisi ile ilgili çeşitli *in vitro* çalışmalarda önemli rol oynamıştır (Strain, 1994). Farklılaşmış hepatositlerin önemleri ile birlikte dondurularak saklanmalarının (kriyoprezervasyon) ya da uzun süreli kültürde sürdürülmelerinin zor olması, iyi derecede farklılaşmış durumdaki hücrelerin yetiştirilmesi, saklanması, izole edilmesi için çeşitli tekniklerin geliştirilmesini sağlamıştır.

İnsan karaciğer dokusuna erişim sınırlıdır ve insan hepatositlerinin izolasyonu ve uzun süreli kültürüyle ilgili olarak domuz veya sıçan hepatositlerinden daha az bilinmektedir. (Ryan ve ark., 1993). Uygun kaynaklar; karaciğer ameliyatları (hepatektomi) sırasında elde edilen doku örnekleri, karaciğer nakli sırasında alıcıdan elde edilen karaciğer kesitleri ve nakledilen organ kısımlarını kapsamaktadır. Karaciğer nakli işleminde yapılan tam karaciğer perfüzyonunda primer biliyer siroz ve birincil sklerozan kolanjiti olan hastalardan hepatositler izole edilmiştir (Strain, 1994). 1982'den bu yana, çeşitli gruplar kısmi hepatektomi ameliyatlarından elde ettikleri örnekleri perfüze ederek canlı insan hepatositlerini yüksek verimle izole etmişlerdir (Guguen-Guillouzo ve Guillouzo, 1986). Bireysel hasta faktörleri ve intraoperatif faktörler, perfüze edilen

dokunun birim başına düşen hepatosit kütesinin fonksiyonu, kalitesi ve veriminde önemlidir. *In vitro* toksikolojideki değerine ek olarak, klinik uygulamalarda primer kültürleri uygulamak için yaklaşımlar geliştirilse de bu verilere duyulan ihtiyaç giderek daha da artacaktır.

5.4. Hepatik Karakterli Sürekli Hücre Hatları

Karaciğer karakteristiklerine sahip çok sayıda hücre hattı, tümör kültürlerinden izole edilmiş ve onkojenleri eksprese eden rekombinant yapılar kullanılarak ölümsüzleştirilmiştir (Tablo 1). C3A ve HepG2 gibi bazı hepatoma hücre hatları, hepatositlerin tipik bir dizi biyokimyasal sentez yolunu sürdürürken, sürekli hücre hatlarındaki hepatositler genel olarak doku hepatositlerinde bulunan sınırlı sayıda Faz I ve II enzimlerini eksprese ederler. Tek hücre hatlarında gerçekleşen enzim aktiviteleri, seri halinde yapılan pasajlarda zaman içinde değişkenlik gösterebilmektedir. Uygulamadaki başka bir sorun da hepatik hücre hatlarının diğer hücrelerle kontamine olma (çapraz kontaminasyon) riskidir. Chang Karaciğer Hücre Hattının tamamen HeLa hücrelerinden oluşması bu durumun bir örneğidir (Stacey ve ark., 1992). Birçoğu ölümsüzleştirilen yeni hepatosit hücre hatları geliştirilmiştir (Werner ve ark., 1999; Allen ve ark., 2000; Kobayashi ve ark., 2000; Lee ve ark., 2000). Ancak, çok sayıda pasaj geçilmesinin ardından gittikçe farklılaşan özellikler geliştirdikleri bildirilen hücre hatları ile dikkatli çalışılmalıdır (Kim ve ark., 2000). Parenkimal olmayan hücre hatları da tanımlanmıştır ve safra epiteliinden elde edilen sıçan karaciğer epitelyal hücre hatlarının *in vitro* ortamda süresiz olarak transforme ve çoğalma kapasitesi gösterilmiştir.

Toksikolojinin başlangıcından beri, bir ksenobiyotik metabolik yol ve metabolitlerinin bilgisi farmakolojik ve toksikolojik verilerin yorumlanmasında önemli bir adım olarak görülmüştür. Artık, uygulamadan veya kimyasal maddelere yanlışlıkla maruz kalmadan kaynaklanan



etkilerin genellikle ana bileşikten ziyade hücreler içinde oluşan aktif elektrofilik metabolitlerden kaynaklandığı kabul edilmektedir. Bu son yıllarda ilaç metabolizması, ilaç keşif sürecinin erken evresinde olduğu kadar, daha kapsamlı araştırmalar için erken hedef optimizasyonuna ve bileşiklerin seçimine de dahil olmuştur. Daha yakın zamanlarda, insan numunelerinin mevcudiyeti ve rekombinant sistemlerin kullanımı, *in vitro* verilerinden başlayarak *in vivo* ilaç klirensi ve ilaç etkileşimlerinin kantitatif tahminini geliştirmesini sağlamıştır (Ito ve ark., 1998). Ayrıca, *in vitro* insan modellerinden elde edilen verilerin, *in vitro* ve *in vivo* verilerle, allometrik ölçekleme yoluyla hayvanlara entegre edilmesi, belirli bir ilaç için insan hepatik klirensinin doğru ve kesin bir şekilde tahmin edilmesine yardımcı olabilir. (Lave ve ark., 1999).

Karaciğer, çoğu enzimin hepatositlerin içinde en yüksek ekspresyon ve katalitik aktivite göstermesi nedeniyle metabolizmanın ana bölgesidir. Bu, bu organın perfüzyonundan başlayıp tek enzim(ler) ile sonuçlanan, azalan karmaşıklık düzeylerine sahip karaciğer sistemlerinin, ilaç metabolizması çalışmaları için en yaygın *in vitro* modeli olmasının başlıca sebebidir. En basit model ile yani belirli bir ksenobiyotiğin biyotransformasyonundan sorumlu nihai enzim göz önüne alındığında, yeni teknolojilerin gelişiminin bu alandaki araştırmaları nasıl etkilediğini görmek mümkündür. Araştırmacıların çoğu, insan dahil olmak üzere farklı türlerde çok çeşitli ilaçların metabolizmasında yer alan birincil enzim süper ailesi olan sitokrom P450'ler (CYP) üzerinde odaklanmıştır (Testai, 2002). Geçmişte, izole edilmiş saflaştırılmış enzimlerin kullanımı, zaman harcanması ve komplike saflaştırma ve sulandırma prosedürleri nedeniyle çok popüler değildi. Moleküler biyolojideki olağanüstü gelişmeler, 1990'larda bakteriler (Gillam, 1998), maya, böcekler ve memeli hücreleri gibi birçok farklı heterolog sistemdeki rekombinant CYP'lerin ekspresyonunu sağlamıştır (Gonzales ve Korzekwa, 1995).

Tür	Hücre Hattı/Adı	Açıklamalar
İNSAN	WRL68	Embriyo hücrelerinden elde edilmiştir.
	PLC/PRF/5	Hepatit B dizileri içerir. Çok çeşitli virüslerin izolasyonu için kullanılır ve toksikolojide önemli bir yeri vardır.
	Hep3B	Fibrinojen, alfa-fetoprotein gibi çeşitli plazma proteinlerini üretir. C3 ve alfa-2 makroglobulinin tamamlayıcısıdır.
	HepG2	Protrombin, antitrombin II, alfa-fetoprotein gibi plazma proteinlerini üretir. C3 ve fibrinojenin tamamlayıcısıdır.
FARE	MC/9	Fetal hücreler, histamin ve lökotrien salgılar. Ayrıca antijene spesifik IgE'ye maruz kaldıktan sonra antijene karşı duyarlılığa izin veren IgE reseptörlerini ekspres eder.
	NCTC Klon 1469	NCTC 721'den türetilmiştir. Biyokimyasal ve beslenme çalışmalarında kullanılır ve Veziküler Stomatit Virüsüne karşı duyarlıdır.
RAT (SIÇAN)	ARL-6	Karsinogenez çalışmalarında kullanılır. Ratlarda tümör hücrelerinin tümör oluşturmalarının <i>in vitro</i> testinde kullanıldığında <i>in vivo</i> aşılama göre daha duyarlı olduğu bildirilmiştir.
	BRL3A	Transforme edilmemiş (normal) hücrelerin birincil olarak klonlanmasıyla üretilir. Serumsuz kültür koşulları altında mitojen benzeri peptidlerin salgılanması için not edildi.
	H4S	Normal karaciğerden üretilmiştir. <i>In vitro</i> karsinogenez ve beslenme çalışmalarında kullanılır.
	Phi 1	Fu5 hücrelerinden üretilmiştir. Tiyoguanine (6 mikrogram / ml) dirençlidir ve yüksek oranda farklılaştığı bildirilmiştir.

Tablo 1. Hepatik Sürekli Hücre Hattı Örnekleri



Karaciğer homojenatları ve farklı kaynaklardan alınan hücre içi fraksiyonlar, 1960'lardan beri ilaç metabolizmasında kullanılmıştır. Mikrozomların popülaritesi, karaciğer insan örneklerinin depolanması gerekliliğinden dolayı artmıştır (Buratti ve ark., 2003). Bozulmamış hepatositler, büyük olasılıkla indirgemeci yaklaşım ile *in vivo* duruma olabildiğince yakın olma zorunluluğu arasındaki en iyi uzlaşmayı temsil etmektedir. Metabolizma dışındaki toksikolojik sonuçların araştırılması için tipik olarak izole edilmiş bir süspansiyonun tamamlanmamış bir model olarak kabul edilebileceği gösterilmiştir. Çünkü katılımı gittikçe artan ilgi alanlarına sahip olan parenkimal olmayan hücreler çok zayıf bir şekilde temsil edilmektedir (< % 1) ve sağlam organlarda toplam hücre sayısının % 20-40'ını oluştururlar (Amman ve Maier, 1997). Kısa süreli süspansiyon kültüründe taze izole hepatositler, karaciğer parankimal hücrelerinin tam metabolik yeterliliğini göstermektedir. Bununla birlikte, en başından itibaren, uzun süreli testlerin (> 24 saat), ilaç metabolize edici enzim aktivitesinin ve dolayısıyla fenotipte meydana gelen değişikliklerin farklı olmasından dolayı hepatositler ile gerçekleştirilemeyeceği açıkça anlaşılmıştır (Guillouzo, 1998). Bu problemi çözmek için son yirmi yılda, kültür ortamının, dimetil-sülfoksit olarak hormonlar, büyüme faktörleri veya fizyolojik olmayan kimyasallar gibi çözülebilir faktörlerin eklenmesiyle modifiye edilmesi dahil olmak üzere birçok girişimde bulunulmuştur (Guillouzo, 1998). Aljinat taneciklerinde immobilizasyon, izole hepatositlere ticari olarak kolayca ulaşılabilmesine rağmen, tüm metabolik fonksiyonların sürdürülmesi ile sağkalım sorununa tam bir çözüm sağlamamıştır (Selden ve ark., 1998).

Matrigel, laminin açısından zengin bir jel matrisi (Schuetz ve ark., 1993), kolajen-sandviç kültürleri gibi teknikler ve hücre-hücre etkileşimlerini yeniden oluşturan sıçan epitel hücreleriyle birlikte hepatosit kök-kültürü gibi ekstraselüler matris üzerindeki bağlanma ümit verici sonuçlar vermiştir (Donato ve ark., 1991).

Primer hepatositlerin kriyoprezervasyon teknikleri, özellikle insan hepatositleri için uygun olan taze karaciğer dokusuna duyulan ihtiyacı azaltmaktadır. Bu teknik optimize edilmiş ve kısa süreli metabolizma veya toksisite çalışmaları için süspansiyonda tutulan kriyoprezervatif hepatositler önerilmiştir (Hengstler ve ark., 2000a). Ayrıca, bu hepatositler kullanılarak CYP aktivitelerinin indüklenmesi çalışmaları, indüksiyon mekanizmalarının tanımlanmasına ve ilaç-ilâç etkileşimlerinin değerlendirilmesine giden yolu açmıştır (Hengstler ve ark., 2000b). Karaciğer dilimleri, doku organizasyonu ve hücre-hücre etkileşimlerini muhafaza etmek daha karmaşıktır (Olinga ve ark., 1997). Karaciğer dilimleri, kısa süreli ilaç metabolizması testleri için güvenilir bir model olup uyuşturucu metabolizması çalışmalarını hem biyokimyasal etkiler hem de morfolojik değişiklikler ile birleştirerek histolojik inceleme de yapılabilmesini sağlar. Ne yazık ki, birkaç saat sonra ilaç metabolizması aktivitelerindeki düşüş farklılıkları nedeniyle, kullanımları uzun süreli çalışmalar için uygun değildir. Bu *in vitro* yöntemlerin geliştirilmesi oldukça geniş bir veri kümesinin toplanmasına olanak sağlamıştır, bu da sonuç olarak *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarla paralel olarak kullanılmak üzere *in silico* modellerinin oluşturulmasını teşvik etmiştir (Ekins ve ark., 2000).

Karaciğer ile karşılaştırıldığında, ekstrahepatik dokular için çok sınırlı veriler mevcuttur. Kantitatif olarak daha düşük olmasına rağmen, bazı durumlarda diğer dokudaki metabolizma son derece spesifik ve toksikolojik açıdan uygun olabilir.

6. İntestinal Hücrelerin *In Vitro* Toksikolojide Kullanımı

İnsan nüfusu, yutma, soluk alma (inhalasyon) ve dermal emilim yoluyla ksenobiyotiklere maruz kalmaktadır. Bununla birlikte bağırsak, terapötik ajanların ve çevresel kirlетici maddelerin, gıda ve su içinde bulunan diğer katkı maddelerinin ağızdan



alınmasıyla ksenobiyotiklere büyük ölçüde maruz kalan bir organdır. Bu nedenle bağırsak sistemi toksikolojide hem hedef organ, hem de ksenobiyotiklerin organizmaya erişim yeri olması açısından önem arz etmektedir.

Bağırsak mukozasında intestinal kriptlerde bulunan ve kök hücre içeren bölümler olması sebebiyle sürekli hücre değişimi meydana gelmektedir. Bağırsak lümenindeki maddelerin toksik etkileri, kriptlerdeki kök hücreleri etkilemekte ve böylece dokunun yenilenme kapasitesini ya da hızla değiştirilecek olan proliferatif olmayan farklılaşmış hücreleri etkileyebilmektedir. Bununla birlikte, ikinci durumda lümen yüzeyini kaplayan farklılaşmış hücrelerdeki hücre hasarı, lümen kan dolaşımına büyük ve kontrol edilemeyen potansiyel toksik maddelerin girişine izin vererek organizma seviyesinde daha zararlı etkilere yol açacaktır.

Toksikolojideki önemine ek olarak bağırsaklar, terapötik ajanların uygulanmasında genellikle ağız yolunun tercih edilmesi sebebiyle farmakolojide de önemli bir role sahiptir. Terapötik ajanların bağırsak seviyesinde emilim özelliklerinin incelenmesi, yeni ilaç formülasyonları için çok önemlidir. Bununla birlikte, tüm ksenobiyotiklerde olduğu gibi, terapötik maddeler toksik etkiler yaratabildikleri için farmakolojide de toksisite açısından son derece önemlidir.

Ksenobiyotiklerin bağırsak emilimi ve toksisitesinin araştırılması, geleneksel olarak deney hayvanlarında *in vivo* yöntemlerle gerçekleştirilmiştir. Sitotoksikite ve metabolik çalışmalar da izole edilmiş hücreler veya mikrozomal preparasyon kullanılarak sıklıkla *in vitro* gerçekleştirilmiştir. *In vitro* ilaç emilim çalışmalarında ise organ kültüründe tutulan izole bağırsak segmentleri sıklıkla kullanılmıştır. Bununla birlikte, son yıllarda kültürde hücrelerin kullanıldığı yeni *in vitro* modeller, hem ilaçların emiliminin araştırılması için hem de ksenobiyotiklerin toksisite ve metabolizmasının incelenmesi için önerilmektedir.

Kültüre edilmiş hücrelerin daha geleneksel *in vitro* modellere kıyasla avantajları arasında insan dokusunun kullanılması, hücresel bütünlüğün korunması, hücre-hücre etkileşimleri, yüksek standardizasyon ve yeniden üretilebilirlik bulunmaktadır. Bununla birlikte, doku mimarisinin ve hücresel farklılaşmanın korunmasının kültürde sağlanması her zaman kolay değildir.

İzole edilmiş bağırsak hücreleri, iç ve dış çevre arasında bağırsak epitelyumuna seçici bariyer özelliğini kazandıran polar yapılarını hızla kaybederler. Bağırsak lümeni ve bağırsak ortamına bakan plazma membranı alanındaki membran proteinlerinin asimetrik dağılımı ve yüksek derecede organize olmuş yapılar, sıkı bağlantılar, komşu hücrelerin birleşmesi ve iki membran alanının birbirinden ayrılması gibi özellikler bağırsak mukozası boyunca gerçekleşecek sekresyon, transport ve emilim işlemlerine olanak sağlamaktadır (Rodriguez-Boulant, 1989). Bu özelliklerin *in vitro* olarak korunması, bu hücre tipindeki absorpsiyon, metabolizma ve toksisite çalışmaları için özellikle önemlidir.

6.1. Kültüre Edilmiş Bağırsak Epitel Hücre Modelleri

Bağırsak epitelyumunun karmaşık fonksiyonel ve morfolojik organizasyonunun *in vitro* korunması için birkaç farklı yaklaşım denenmiştir. Bunlar arasında:

- (1) Primer Hücre Kültürleri,
- (2) Normal Dokudan Hücre Hatları,
- (3) Düzenleyici Genler ile Transfekte Edilmiş Normal Hücre Hatları,
- (4) Tümör Kaynaklı Kurulmuş Hücre Hatları.

6.1.1. Primer Hücre Kültürleri

Primer bağırsak hücre kültürleri ince bağırsaktan (Evans ve ark., 1992; Perrault ve Beaulieu, 1998) ya da kolondan (Fonti ve ark., 1994; Latella ve ark., 1996) elde edilmekte olup kültürde farklılaşma süresi 3-10 gün



arasında değişmektedir. Mezenkimal orijinli dokunun altında bulunan epitel hücrelerinin izolasyonu, farklılaşma karakterlerinin hızlı bir şekilde kaybolmasına yol açmaktadır.

Bağırsak morfojenezi ve farklılaşması için epitelyal-mezenkimal temasın gerekliliği günümüzde çok iyi bilinmektedir. Aslında, doğum sonrası (postnatal) dönemde elde edilen primer kript hücre kültürleri ve kript hücre hatları (IEC hücreleri) (Quaroni ve ark., 1979) villus morfogenezi sağlamak ve çeşitli epitel hücre fenotiplerinin ortaya çıkışı ile birlikte tam bir hücre farklılaşmasını sağlamak için fetal mezenkim tarafından indüklenebilmektedir (Kedinger ve ark., 1986). Bu primer hücre modellerinden kısa süreli toksisite çalışmalarında yararlanılabilirken test şartlarının standardizasyonu, tekrarlanabilirlik ve kantitatif değerlendirme kolay olmadığından dolayı *in vitro* toksisite çalışmalarında yaygın olarak kullanılmamaktadır.

6.1.2. Normal Dokudan Elde Edilmiş Hücre Hatları

Primer kültürlerden zaman zaman yaşlanmaya bağlı olan ya da spontan gelişen değişimler olmaksızın birçok pasaj boyunca çoğalma ve hayatta kalma yeteneğini koruyan homojen hücre hatları elde etmek mümkündür. Genellikle sıçanların ince bağırsaklarından elde edilen bu bağırsak hücre hatları, villuslerden çok kriptlere tipik olan iyi şekilde farklılaşmamış bağırsak epitelyumunun karakterlerini göstermektedir.

IEC hatları, epiteloid morfolojisindeki hücrelerin tekrar tekrar klonlanmasından sonra yenidoğan (neonatal) sıçanların bakterisiz ince bağırsaklarının farklı yollarından izole edilmiştir. (Quaroni ve ark., 1979; Quaroni ve May, 1980). Benzer şekilde FRIC hatları (Plateroti ve ark., 1993); düşük serum içeren, 2-3 gün sonra büyüme maddeleri eklenen besi yerinde yetiştirilmiş fetal ince bağırsak eksplantlarından (yapay ortamdan yaşatılan doku) izole edilmiştir. Eksplanttan



elde edilen hücre kolonileri, yeterince çoğaldığında izole edilerek morfolojik olarak homojen olan hücre hatları elde edilerek alt klon haline getirilmiştir. IEC 16, IEC 17, IEC 18 ve FRIC B hücre hatları; sitokeratinler, organize F-aktin demetleri gibi tipik epitel belirteçlerini, jonksiyonel proteinleri (ZO1 ve desmoplakin proteinleri), villin ve ezrin gibi mikrovillüs proteinlerini eksprese etmektedir. Bununla birlikte, bu hücreler fonksiyonel sıkı bağlantılar oluşturmamakta veya tamamen polarize bir sütun şeklinde morfoloji geliştirmemekte, ince bağırsak disakkaritleri ve peptidazları yüksek derecede eksprese etmemektedirler. Karakteristik özellikleri açısından intestinal kriptlerin proliferatif hücrelerinininkilere benzeyen bu hücre dizilerinin bazıları, farklı ksenobiyotiklerin daha az farklılaşmış kript hücreleri üzerindeki etkilerini belirlemeyi amaçlayan *in vitro* toksisite çalışmalarında kullanılmaktadır. Bu hücre hatlarını kullanan bazı temsili çalışmalar Tablo 2'de listelenmiştir.



HÜCRE HATTI	İÇERİK	İNCELENEN PARAMETRE	REFERANS
IEC 17	Bakır, çinko, kadmiyum	Hücre çoğalması, metallothionein (MT) sentezi.	Bises ve ark., 1989; Scarino ve ark., 1988
IEC 17	Fenobarbital, naphthoflavone	Hayatta kalma; 7-etoksikumarin O-deetilaz aktivitesi.	Di Folco ve ark., 1990
IEC 17	Furazolidon	Hücre büyümesi.	Stammati ve ark., 1988/89
IEC 18	Kadmiyum	Canlılık; LDH salınımı; MT sentezi.	Groten ve ark., 1992
IEC 18	Kadmiyum	Canlılık; Bariyer fonksiyonları.	Duizer ve ark., 1999
IEC 18	Oleik asit / safra emülsiyonu	Tek tabakalı bütünlük ve hücre morfolojisi; lipid peroksidasyonu.	Kvietys ve ark., 1991
IEC 18	Reaktif oksijen metabolitleri	³ H-timidin alımı; ⁵¹ Cr salınımı, hücre morfolojisi.	Ma ve ark., 1991
IEC-6	Parakuat	Hücrenin hayatta kalması; parakuat alımı ve poliamin alımının rekabeti.	Grabie ve ark., 1993
IEC-17 IRD-98	Etanol	Canlılık; cAMP seviyeleri; membran akışkanlığı; prostaglandin analogu (enprostil) veya H ₂ bloker (simetidin) ile sitoproteksiyon.	Giannarelli ve ark., 1984
IEC 6	Herbisit / pestisit	Hücre çoğalması.	Greenman ve ark., 1997

Tablo 2. Bağırsak Hücre Hatları ile Yapılan Hayvan Kökenli Toksikolojik Çalışmalar

Bu hücre hatlarının olgunlaşmış ince bağırsak villus hücrelerine daha fazla farklılaşmasını sağlayan koşulları bulmak için yapılan çalışmalar arasında IEC-17 hücre

tabakalarının mezenkimal hücrelerle heterojen temas varlığında yetişkin sıçanların böbrek kapsülü altına implante edilmesiyle farklılaşmaya uğrayabileceğinin gösterilmesi sayılabilir. Farklı araştırma grupları, daha fazla farklılaşma elde etmek amacıyla normal bağırsak hücre hatlarının düzenleyici genler ile transfeksiyonu yöntemini de kullanmışlardır.

6.2. Ksenobiyotikler, Doğal Toksinler ve Patojenik Mikroorganizmaların Toksisitesi Çalışmalarında İnsan Hücre Hatlarının Uygulanması

Polikarbonat ya da diğer benzer materyallerden yapılmış mikro gözenekli kültür destekleri sayesinde daha fazla farklılaşmış bağırsak hücre hatları büyütülebilmektedir. Tek tabakalı olarak büyüyen kültür desteği üzerindeki hücreler, basolateral (BL) besi yerinin apikal (AP) besi yerinden hücreler ve mikroporlu filtre ile ayrıldığı yerde iki bölmeli bir sistem oluşturmaktadır. Bu düzenleme, *in vivo* olarak bağırsak mukozasının yapısal organizasyonunu yeniden üretmekte, hücre polaritesinin gelişmesini ve besin maddelerinin vektörel taşınmasını desteklemektedir. Bu destekler, *in vivo* ortamda bağırsak lümenine karşılık gelen AP yüzeyine ve *in vivo*da bağırsak yüzeyi, vasküler ve limpatik sistemlere bakan yüzey olan BL yüzeyine besin maddelerinin veya diğer maddelerin iyi erişilebilirliğini sağlamaktadır (Ferruzza ve ark., 2013).

Bu sistemden toksisite ya da transport çalışmalarında yararlanmak için sıkı bağlantıların fonksiyonel kapanmasını ve bütünlüğünün deney öncesinde ve deney boyunca görüntülenmesi gerekmektedir. Tek tabaka hücrelerin sürekliliği, bitişik hücrelere katılan ve zıt kısımdaki hücreler arasındaki maddelerin spesifik olmayan pasajlarını engelleyen oluşumlar tarafından sağlanmaktadır. Bu, tek hücre tabakasının TEER (trans-epitelyal elektriksel direnç) 'inin (Ranaldi ve ark., 1994) ya da fluoresin (Tchao, 1988) ya da 0-1 CH (N)] -mannitol gibi hücre dışı boşluk işaretleyicilerinin tek-



tabakası boyunca geçişinin (De Angelis ve ark., 1998; Ferruzza ve ark., 1999; Ranaldi ve ark., 1992) ölçülmesiyle başarılabılır.

TEER'in belirlenmesi basit ve genellikle AP ve BL ortamına yerleştirilen bir çift Ag/ AgCl elektrot kullanılarak filtrenin ve hücre tek tabakasının elektrik direncini ölçerek uygulandığı için hızlıdır. Konfluent tek hücre tabakalarının oluşturulması ve bunu takip eden farklılaşma süreci sırasında TEER değerleri, tam gelişmiş ve fonksiyonel sıkı bağlantıların oluşumuna karşılık gelen denge durum değerlerini elde etmeden önce bir zirveye ulaşmaktadır. Aynı periyotta, hücre dışı boşluk belirteçlerine geçirgenlik, kademeli olarak farklılaştıktan sonra düşük ve sabit bir değere ulaşmaktadır.

Sıkı bağlantıların geçirgenliği değiştirilebildiğinden ve ksenobiyotiklerin toksik etkileri tarafından bozulan tek hücre tabakasının bütünlüğü ksenobiyotiklerin toksik etkileri nedeniyle zarar görebildiğinden bu yöntemlerin bazıları son zamanlarda kültürlenmiş bağırsak hücre hatları üzerinde farklı maddelerin subletal etkilerini değerlendirmek için kullanılmaktadır.

6.2.1. Bağırsak Hücre Hatlarında Sitotoksisite Çalışmaları

Tümör kökenli insan hücre hatları, sitotoksisite çalışmaları için giderek daha fazla kullanılmaktadır. Bu çalışmalarda uygulanan testler, daha geleneksel *in vitro* toksisite analizlerinden (morfoloji, canlılık, protein sentezi, oksijen tüketimi, vb.) sıkı birleşimsel geçirgenlik, taşıma aktiviteleri, sitoskeletal protein ekspresyonu, lokalizasyonu ve aktiviteleri gibi bağırsak fonksiyonlarının spesifik analizleri yönünden değişiklik göstermektedir. Bağırsak hücre hatlarının farmakotoksikolojik uygulamaları üzerine kapsamlı incelemeler yayınlanmıştır (Zucco, 1993; Zucco ve Stamatii, 1993). Bağırsak epitel hücrelerinin morfolojik organizasyonunun ve polaritesinin kültürde korunması, enteropatojenik bakterilerin adezyon ve istila etme mekanizmaları üzerinde çalışmalar yapılmıştır (Falkow



ve ark., 1992; Pucciarelli ve Finlay, 1994; Collington ve ark., 1998; Kirkwood ve ark., 1998; Van Langendonck ve ark., 1998).

6.2.2. Bağırsak Hücrelerinde Subletal Toksisitenin Bir Göstergesi Olarak Sıkı Jonksiyonel Geçirgenlik

Ksenobiyotiklerin ağızdan emilimi, vücuttaki kaderleri için kritik bir faktördür ve esas olarak bağırsak epitelyumu boyunca geçişleri ile kontrol edilmektedir. Bağırsak mukozasının bariyer fonksiyonu, bitişik epitelyal hücrelerin birleştirilmesiyle oluşan sıkı bağlantılar, iyi düzenlenmiş yapıların varlığı ile yüksek oranda organize edilmiştir. Bununla birlikte, sıkı bağlantılar mutlak bir difüzyon bariyeri değildir; fakat yarı geçirgendir ve bir anlamda işaretleyicinin yüküne ve moleküler ağırlığına (MA) bağlı bir şekilde yayılımı kısıtlayan difüzyon işlevini yerine getirmektedir. Ayrıca hücreler arası geçirgenlik, farklı fizyolojik ve patolojik uyarılarla düzenlenmektedir (Madara, 1998; Mitic ve Anderson, 1998).

Bu yüksek derecede düzenlenmiş sistem toksik etkilerle bozulduğunda, sitotoksikite bağırsak hücrelerinin kaybına yol açmadan önce sıkı birleşme yapısının değişmesi, hücreler arasındaki lateral boşluklardan submukozal boşluğa ve kan dolaşımına geçmesine neden olabilmektedir. Bu nedenle, sıkı bağlantı üzerindeki ölümcül etkilerden kaynaklanan mukozal geçirgenlik değişimleri, sistemik düzeyde daha yaygın bir toksisiteye yol açabilmektedir.

Fonksiyonel sıkı bağlantıların kurulması, hücre dışı kalsiyum seviyeleri gibi henüz yeterince anlaşılmamış birkaç faktöre bağlıdır. Hem sıkı birleşme yapısına hem de düzenlemeye katkıda bulunan çeşitli proteinler tanımlanmıştır ve günümüzde jonksiyonel birleşim ve bariyer fonksiyonlarının tirozin kinazlar, hücre içi kalsiyum, protein kinaz C, heterotrimerik G proteinleri, kalmodulin, cAMP ve fosfolipaz C dahil olmak üzere klasik ikincil habercilerin ve sinyal yollarının tümünden



etkilendikleri iyi bilinmektedir. Ek olarak, sıkı birleşme yapıları sitoskeletonla bağlantılı olduğundan her türlü periferik aktin bozukluk, hücreler arası bariyerin geçirgenliğini değiştirecektir (Madara, 1998; Mitic ve Anderson, 1998). Bu nedenle birçok faktörün sıkı birleşme yapısında ve özelliklerinde meydana gelen değişimlere katkıda bulunması TEER değerlerinde düşüşe neden olmaktadır.

TEER değerleri, sıkı bağlantıların yapısında değişik olarak kendini gösteren erken subletal epitel toksisitesinin bir indikatörü olarak birçok çalışmada kullanılmıştır (Hecht ve ark., 1988; Tang ve ark., 1993; Hashimoto ve ark., 1994; Twiss ve ark., 1994; Rossi ve ark., 1996; Narai ve ark., 1997; De Angelis ve ark., 1998; Ferruzza ve ark., 1999). Sıkı bağlantılar genellikle hücreler arası çözülme hareketini sınırladığı için TEER sıkı jonksiyonel geçirgenliğin bir göstergesi olarak sıklıkla kullanılmaktadır.

Mannitol (MA:182), sodyum fluoresin (MA: 376), polietilen glikol (PEG, MA:4000), dekstran (MA:4000) ve inülin (MA: 4000) gibi hücre dışı boşluk işaretleyicilerinin transepitelyal akışının ölçümleri, sıkı bağlantıların geçirgenlik karakterlerinde toksik uyarıcıların etkilerinin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalar da toksik zararı takip eden sıkı bağlantıların açılma derecelerini değerlendirmek amacıyla farklı moleküler ağırlıklardaki belirteçlerin geçişi karşılaştırılmıştır. (De Angelis ve ark., 1998; Quan ve ark., 1998).

Sıkı bağlantılar üzerindeki belirli bir toksik bozulmanın etkisinin ne kadar geri çevrilebileceğini belirlemek için Caco-2 hücrelerinin kullanıldığı bazı çalışmalar, toksik tedavinin sonunda ve tam bir büyüme döneminden sonra TEER değerlerini ölçerek iyileşme deneylerini rapor etmiştir (Sakai ve ark., 1998b; Ferruzza ve ark., 1999). Literatürde sıkı jonksiyonel geçirgenliğin regülasyonu ile ilişkili olduğu bilinen bazı hücre içi fonksiyonlar ile TEER'deki ve hücreler arası akışlardaki değişiklikleri ilişkilendirerek sıkı birleşme seviyesindeki toksisite mekanizma sorunlarının ele

alındığı çalışmalar bulunmaktadır. F-aktinin ve bazı sıkı birleşme proteinlerinin yeniden dağıtımı ile birlikte, TEER ve paraselüler akış değişikliklerinde izlendiği gibi sıkı bağlantıların değişimleri arasında bir korelasyon olduğu bildirilmiştir (Schipper ve ark., 1997; De Angelis ve ark., 1998; Sakai ve ark., 1998a; Duizer ve ark., 1999). Başka bir çalışmada, reaktif oksijen türlerinin sıkı birleşmeler üzerindeki etkileri, protein tirozin fosforilasyonundaki değişikliklerle ilişkilendirilmiştir (Roa ve ark., 1997). Sıkı bağlantılar üzerindeki toksik etkiler şu şekillerde olabilmektedir:

1. Sıkı birleşim halindeki protein bileşenleri ile doğrudan etkileşmeleriyle,
2. Sıkı birleşme geçirgenliğini etkilediği bilinen ikinci haberci sistemleriyle,
3. Sıkı birleşmeye bağlı sitoskeleton proteinleri üzerindeki doğrudan ya da dolaylı etkilerle.

7. Sonuç

Toksikoloji alanında çalışan herkes Paracelsus'un "Her madde zehirdir, zehir olmayan madde yoktur. Zehir ile ilacı ayıran dozdur." sözünü bilir. Kimyasal tehlikeleri değerlendirmeden önce potansiyel maruziyetin bilinmesi veya tahmin edilmesi kimyasal güvenlik değerlendirmesi için kesinlikle bir anahtar noktadır. *In vitro* çalışmalarda, bileşiğin uygulanan konsantrasyonunun söz konusu hedef organın çevresindeki plazma konsantrasyonunun bir temsili olduğu varsayılarak çok önemli deneysel hatalar yapılmıştır. Zarara dozun miktarının sebep olduğu kabul edilirse bütün organizma için farmakokinetik prensipler ile ilgili doku için dozlar belirlenmelidir. Bu muhtemelen göz ardı etmekten daha fazlası olan tembellik faktöründen kaynaklanmaktadır. *In vitro* olarak elde edilen sonuçların risk değerlendirmesi için uygulanması, uygulanan bileşiğin serbest konsantrasyonunu ve maruziyet süresi boyunca hücre içi konsantrasyonunu bilmemizi gerektirmektedir. Bu bilgi olmadan, tespit ettiğimiz tehlikenin endişelenecek bir şey olup olmadığı



hakkında hiçbir fikrimiz olmaz. Ayrıca, herhangi bir farmakokinetik modellemesi veya *in vitro* verileri ile *in vivo* tahmini yapamayız. Biyokinetiğin ele alınmadığı durumda risk değerlendirmesi için yapılan tüm faaliyetler işe yaramamakta ve bu şekilde düzenleyici otoritelerin kabulünü almak çok zor olmaktadır. Tüm *in vitro* çalışmalarda bu karmaşıklık seviyesine ihtiyaç yoktur; aksine, mümkün olan en basit sistemi kullanmak için iyi bir sebep vardır. Ancak, modellere sunulan karmaşık soruların çoğu, *in vivo* benzeri yanıtlar ve dolayısıyla fizyolojik davranışları, yani organ işlevselliğini, hatta belki de organlar arası işlevselliği gerektirmektedir. Kompleks modeller *in vivo* koşulların simülasyonu için gerekli olmasına rağmen, sonuçta tamamen farklılaşmış ve yanıt veren kültürler vermek için tanımlanmış koşulların oluşturulabileceği ve bunların tepkilerinin, reseptör fosforilasyonu gibi basit bir kimyasal sinyal ile izlenebileceği düşünülmelidir. Gen ifadesinin izlenmesi için mevcut olan yerinde teknikler ve çıktıyı kaydetmek için kullanılabilir kantitatif görüntü analizi ile, toksik maddelerin etkisi hakkında daha fazla bilgi olduğunda oldukça karmaşık tepki analizleri üretmek daha uygun olabilir. Son yıllarda deneysel model ve teknolojilerin ithal edilmesinde, diğer bilimsel alanlarda farklı amaçlarla geliştirilmesinde, toksisite testi için bunların onaylanmasında ya da optimize edilmesinde ve daha sonra risk değerlendirmesi için yapılan tüm çabalar bu yöne doğru ilerlemektedir. Ayrıca, toksikologların aslında toksisite mekanizmalarını anlamaya çalıştıkları kapsamlı temel araştırmalar, sadece bilime büyük bir katkı sağlamakla kalmaz, aynı zamanda yeni testlerin geliştirilmesine daha sağlam bir zemin verir. Purchase (1997) tarafından belirtildiği gibi “Bu, *in vitro* yöntemlerin geliştirilmesi için gerekli olan içgörüyü sağlayacak olan hücre ve moleküler biyolojinin bilime dayalı anlayışıdır”. Buna göre, sadece bizim alanımızdaki en yeni ve gelecek vaat eden trendleri takip etmemeli, aynı zamanda diğer bilim alanlarında neler olup bittiğine dair sürekli takipte olmalıyız.



Yeni yaklaşımların titiz kalite güvencesi ve raporlaması, uygulamalarını rutin kullanıma ulaştırır, bu da onları amaca uygun hale getirir, güvenilirliği ve tekrarlanabilirliği artırır. Ticari kullanılabilirlikleri ve ortaya çıkan piyasa güçleri, bunları doğrulama ve kullanıma geçirme açısından önemli olacaktır. Geleceği tahmin etmeye çalışmak her zaman için riskli bir görevdir. Ancak, tartışılan konular ileriye dönük *in vitro* sistemlerin gelişimini yönetebilecektir. Normal insan hücrelerine daha çok odaklanmamız, mekanizmaları daha iyi anlamamız, sublethal zararların biyobelirteçlerinin geliştirilmesi ve biyokinetiği göz ardı etmeyi bırakmamız gerekmektedir.

İnsan pluripotent kök hücreleri için kültür tekniklerinin geliştirilmesi, başka bir *in vitro* hedeftir. İlk olarak, insan ve fare blastokistlerinin iç hücre kütlelerinden türetilen embriyonik kök hücrelerin, üç embriyonik germ katmanını temsil eden hücre tiplerine *in vitro* olarak ayırma yeteneği gösterildi. Uygun kültür koşulları altında, bu hücrelerin bazıları, miyokardiyal hücrelere kendiliğinden farklılaşabilmektedir. Bu yetenek teratojenik kimyasalların değerlendirilmesinde *in vitro* bir yöntem geliştirmek için kullanılmıştır (Spielmann ve ark., 1998). Dahası, daha ileri araştırmalar, yetişkin dokulardan gelen hücrelerin, ilişkisiz doku hücrelerine transdiferansiyasyon yapabildiğini de bildirmektedir. Örneğin, tüm kemik iliği hücreleri, iskelet kası, karaciğer, kalp kası, endotelial hücrelerde farklılaşabilirken; nöronal kök hücreler kan, embriyonik dokular ve iskelet kası oluşturabilir (Goodell, 2001). Bu bulgular bilimsel toplulukta güçlü bir beklenti ve potansiyel klinik uygulamaları için çok umut vermiştir; bununla birlikte, pratik kullanımlarından önce daha fazla iyileştirme yapılması gerekmektedir. Ayrıca iPSC'lerden (indüklenmiş pluripotent kök hücre) üretilen hücreler kullanılarak hasta duyarlılığını, populasyon dinamiklerini ele almak gerekecektir. Tek bir bireyden elde edilen bir hücre tipinin kültüre edilmesi aynı zamanda karmaşıklığı arttıracak ve bilim dünyasını vücutta çip kullanımı prensibine yaklaştıracaktır. *In vitro*



test sistemlerinin artan karmaşıklığı kaçınılmaz olarak verimi düşürmektedir. Bu yüzden binlerce bileşiği test etmek için planlı bir stratejiye ihtiyacımız olacaktır. Yakın gelecekte, bu tür test stratejileri tamamıyla kişiselleştirilmiş farmakolojiye ve kişiselleştirilmiş toksikolojiye dönüşecektir. İlaç etkinliğini ve toksisiteyi direkt olarak hedef hastanın hücrelerinde ve dokularında test edebilmek, ilaç endüstrisinde devrim yaratacaktır. Sonuç olarak, *in vitro* toksikoloji hızla gelişmekte olan bir bilimdir ve daha etik olduğu için değil, daha iyi olduğu için hayvansal testlerin yerini alarak gelecekteki insan kimyasal güvenlik değerlendirme rejimlerinin temelini oluşturacaktır.

Kaynaklar

1. Acosta, D., Sorensen, E.M.B., Anuforo, D.C., Mitchell, D.B., Ramos, K., Santone, K., Smith, M.A., 1985. An *in vitro* approach to the study of target organs toxicity of drugs and chemicals. *In vitro Cellular & Developmental Biology* 21, 495–504.
2. Alépée N, Bahinski T, Daneshian M, De Wever B, Fritsche E, Goldberg A, Hansmann J, Hartung T, Haycock J, Hogberg H, Hoelting L, Kelm JM, Kadereit S, McVey E, Landsiedel R, Leist M, Lübberstedt M, Noor F, Pellevoisin C, Petersohn D, Pfannenbecker U, Reisinger K, Ramirez T, Rothen-Rutishauser B, Schäfer-Korting M, Zeilinger K, Zurich MG. State-of-the-art of 3D cultures (organs-on-a-chip) in safety testing and pathophysiology – a t4 report. *ALTEX*. 2014; 31:441–477.
3. Allen. K.J.. Reyes. R .. Demmler. K .. Mercer. J.F .. Williamson. R. and Whitehead. R.H. (2000) Conditionally immortalized mouse hepatocytes for use in liver gene therapy. *J. GastroenteroL HepatoL*. 15(11). 1325-1332.
4. Amman, P., Maier, P., 1997. Preservation and inducibility of xenobiotic metabolism in long-term cultures of adult rat liver cell aggregates. *Toxicology In vitro* 11, 43–56.
5. Battle T., Glyn S. 2001. Cell culture models for hepatotoxicology, *Cell Culture Methods for In vitro Toxicology*. Springer, Dordrecht, 83-95.



6. Battle. T., Maguire. L. Mouldsdale, H.J. and Doyle. A. (1998) Progressive maturation resistance to Microcystin-LR cytotoxicity in two different hepatospheroidal models. *Cell Bioi. Toxicol* .. 15(1),3-12.
7. Baur, H. and Heldt. H.W. (1977) Transport of hexoses across the liver cell membrane. *Eur. J. Biochem* .. 74. 397-403.
8. Begue JM, Guguen-Guillouzo C. Pasdeloup N, Guillouzo A. (1984) Prolonged maintenance of active cytochrome P-450 in adult rat hepatocytes co-culture with another liver cell type. *Hepatology*, 4, 839- 842.
9. Belinsky, S.A., Kauffman. F.e., Ji, S., Lemasters. J.J. and Thurman. R.G. (1984) Rates of allyl alcohol metabolism in periportal and peri central regions of the liver lobule. *Mol. Pharmacol* .. 25,158-164.
10. Berry. M.N. and Friend, D.S. (1969) High yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells. *J. Cell Biol.*, 43.506-520.
11. Berthiaume F .. Moghe PV., Toner M., Yarmush M.L. (1996) Effect of extracellular matrix topology on cell structure. function, and physiological responsiveness: hepatocytes cultured in a sandwich configuration. *FASEB Journal* 10, 1471-1484.
12. Bises, G., Ranaldi, G., Scarino. M.L., and Zucco, F. (1989) Toxicological responses to zinc, copper and cadmium in a rat intestinal cell line. *ATLA* 17,8-15.
13. Bissell, D. M., Arenson. D. M .. Maher. IJ. and Roll. F. J. (1987) Support of cultured hepatocytes by a laminin-rich gel. *J. Clin. Inv.* 79.801-812.
14. Boros. P. and Miller, CM. (1995) Hepatocyte growth factor: a multifunctional cytokine. *The Lancet*. 345.293-295.
15. Brouwer, A., Wisse. E. and Knook. D.L. (1988) Sinusoidal endothelial cells and perisinusoidal fat- storing cells. in Arias LM .. Jakoby, W.B., Popper. H .. Schachter. D .. Shafritz, D.A.. (eds). *The Liver Biology and Pathobiology*, New York. Raven Press Ltd .. pp665-680
16. Buratti, F.M., Volpe, M.T., Meneguz, A., Vitozzi, L., Testai, E., 2003. The CYP-specific bioactivation by human liver microsomes. *Toxicology and Applied Pharmacology* 186, 143-154.

17. Carere A., Stammati A., Zucco F. 2002. *In vitro* toxicology methods: impact on regulation from technical and scientific advancements, *Toxicology Letters*, 127, 153-160.
18. Clayton. D.F. and Darnell. I.E. (1983) Changes in liver specific compared to common gene transcription during primary culture of mouse hepatocytes. *Mol. Cell. Biol.* 3. 1552-1561.
19. Collington, G., Booth, I., Donnenberg, M., Kaper, J, and Knutton, S. (1998) Enteropathogenic *Escherichia coli* virulence genes encoding secreted signalling proteins are essential for modulation of Caco-2 cell electrolyte transport. *Infect. Immun.* 66,6049-6053.
20. Conner, J, Vallet-Collom, I., Daveau, M., Delers, F., Lebreton, J.P. and Guillouzo, A. (1990) Acute phase response induction in rat hepatocytes co-cultured with rat liver epithelial cells. *Biochem. J.* 266.683-688.
21. D'Arcangelo E, McGuigan AP. Micropatterning strategies to engineer controlled cell and tissue architecture *in vitro*. *BioTechniques*. 2015; 58:13-23. [PubMed: 25605576]
22. Daoust R. (1958) The cell population of liver tissue and the cytological reference base. *Ann. Inst. Biol. Sci. Publ.*, 4,3-10.
23. De Angelis, A., Vincentini, O., Brambilla, G., Stammati, A., and Zucco, F.(1998) Characterization of furazolidone apical-related effects to human polarized intestinal cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 152, 119-127.
24. Denecker, G., Vercammen, D., Declercq, W., Vandenabeele, P., 2001. Apoptotic and necrotic cell death induced by death domain receptors. *Cellular and Molecular Life Sciences* 58, 356-370.
25. Dexter, J., 1983. Tissue culture—use or abuse? *Nature* 301, 555.
26. Di Folco, S., Stammati, A., Vittozzi. L.. and Zucco, F. (1990) Studies of cytotoxicity and metabolic competence with the rat intestinal cell line IEC 17. *Drug Chem. Toxicol.* 13,221-228.
27. Donato, M.T., Castell, J.V., Go´mez-Lecho´n, M.J., 1991. Co-cultures of hepatocytes with epithelial-like cell lines: expression of drug biotransformation activities by hepatocytes. *Cell Biology and Toxicology* 7, 1-14.



28. Duizer, E., Gilde, A., Versantvoort, c., and Groten, J.(1999) Effects of cadmium chloride on the paracellular barrier function of intestinal epithelial cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 155, 117-126.
29. Eisenbrand G., Pool-Zobel B., Baker V., Balls M., Blaauboer B.J., Boobis A., Carere A., Kevekordes S., Lhuguenot J.-C., Pieters R., Kleiner, J. 2002. Methods of *in vitro* toxicology, Food and Chemical Toxicology, 40, 193-236.
30. Ekins, S., Waller, C.L., Swaan, P.W., Cruciani, G., Wrigton, S.A., Wikel, J.H., 2000. Progress in predicting human ADME parameters in silico. Journal of Pharmacological and Toxicological Methods 44, 251-272. Formigli, L., Papucci, L., Schiavone, N., Tempestini, A., Orlandini, G.E., Capaccioli, S., Zecchi Orlandini, S., 2000. Aponecrosis: morphological and biochemical exploration of a syncretic process of cell death sharing apoptosis and necrosis. Journal of Cellular Physiology 182, 41-49.
31. Eliason, J. (1993) Multi-Center Collaborative *In vitro* Studies Using a Human Cancer Cell Line: The EORTC Preclinical Therapeutic Models Group Experience, *Stem cells* 11, 519-527
32. Evans, GS, Flint. N., and Somers, A.S.(1992) The development of a method for the preparation of rat intestinal epithelial cell primary culture. *J. Cell Sci.* 101, 219-231.
33. Falkow, S., Isbcrg, R., and Portnoy, D. (1992) The interactions of bacteria with mammalian cells. *Annu. Rev. Cell Biol.* 8,333-363.
34. Ferruzza, S., Rossi, C., Sambuy, Y., & Scarino, M. L. (2013). Serum-reduced and serum-free media for differentiation of Caco-2 cells. *ALTEX-Alternatives to animal experimentation*, 30(2), 159-168.
35. Ferruzza, S., Sambuy, Y., Rotilio, G., Ciriolo, M., and Scarino, M. (1999) The effect of copper on tight junctional permeability in a human intestinal cell line (Caco-2), in A. Leone and J. Mercer, (eds), *Coppert transport and its disorders: molecular and cellular aspects*. Kluwer Academic/ Plenum, New York. p. 219-222.
36. Fisher RL, Vickers AE. Preparation and culture of precision-cut organ slices from human and animal. *Xenobiotica*. 2013; 43:8-14.



37. Fonti, R., Latella, G., Bises, G., Magliocca, F., Nobili, F., Caprilli, R., and Sambuy, Y. (1994) Human colonocytes in primary culture: a model to study epithelial growth, metabolism and differentiation. *Int J. Colorectal Dis.* 9, 13-22.
38. Forster. U., Luippold, G. and Schwartz, L.R. (1986) Induction of monooxygenase and UDPglucuronyltransferase activities in primary cultures of rat hepatocytes. *Drug Metab. Dispos.*, 4, 353- 360.
39. Franks TJ, Colby TV, Travis WD, Tuder RM, Reynolds HY, Brody AR, et al. Resident cellular components of the human lung: current knowledge and goals for research on cell phenotyping and function. *Proc Am Thorac Soc.* 2008; 5:763–766. [PubMed: 18757314]
40. Fraslin, JM .. Kneip. B., Vaulont. S., Glaise. D., Munnich, A and Guguen-Guillouzo, C. (1985) Dependence of hepatocyte specific gene expression on cell-cell interactions in primary culture. *EMBOJ.*, 4,2487-2491.
41. Fremond, B., Joly, A., Desille, M., Desjardins, J.F .. Campion. JF. and Clement, B. (1996) Cell based therapy for acute liver failure: The extracorporeal bioartificial liver. *Cell. Bioi. Toxicol.*, 12,325-329.
42. Freshney R. 1994. Culture of Animal Cells a Manual of Basic Technique, Wiley-Liss, New York, ISBN 0-471-58966-7.
43. Gates, G.A., Henley, K.S., Pollard, H.M., Schmidt, E. and Schmidt, F.W. (1961) The cell population of human liver. *J. Lab. Clin. Med.*, 57,182-184.
44. Gillam, E.M.J., 1998. Human cytochrome P450 enzymes expressed in bacteria: reagents to probe molecular interactions in toxicology. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 25, 877–886.
45. Gonzales, F.J., Korzekwa, K.R., 1995. Cytochrome P450 expression systems. *Annual Reviews of Pharmacology and Toxicology* 35, 369–390.
46. Goodell, M.A., 2001. Stem cells: is there a future in plastics? *Current Opinion in Cell Biology* 13, 662–665.
47. Grabie. V .. Scemama. J. Robertson. J.. and Seidel. E. (1993) Paraquat uptake in the cultured gastrointestinal epithelial cell line IEC-6. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 122,95-100.



48. Graf BW, Boppart SA. Imaging and analysis of three-dimensional cell culture models. *Methods Mol Biol.* 2010; 591:211–227. [PubMed: 19957133]
49. Granville, D.J., Carthy, C.M., Hunt, D.W.C., McManus, B.M., 1998. Apoptosis: molecular aspects of cell death and disease. *Laboratory Investigation* 78, 893–913.
50. Greenman. S .. Rutten. M .. Fowler, W .. Scheffler. L.. Shortridge. L.. Brown, B .. Sheppard, B .. Deveney. K .. Deveney. C. and Trunkey. D. (1997) Herbicide/pesticide effects on intestinal epithelial growth. *Environ. Res.* 75:85-93.
51. Gribaldo L., Buere J., Deldar A., Hokland P., Meredith C., Moneta D., Mosesso P., Parchment R., Parent-Massin D., Pessina A., San Roman J., Schoeters G. 1996. The use of *in vitro* systems for evaluating hematotoxicity, *ATLA*, 24, 211–231.
52. Grisham, J.W., Smith, G.J., 1984. Predictive and mechanistic evaluation of toxic response in mammalian cell culture systems. *Pharmacological Reviews* 36, 151S–171S.
53. Groten, J.P. • Luten. JP .. Bruggeman. I.M .. Temmink. J.H.M .. and Van Bladeren. P.J. (1992) Comparative toxicity and accumulation of cadmium chloride and cadmium-metallothionein in primary cells and cell lines of rat intestine. liver and kidney. *Toxicol. in vitro* 6:509-517.
54. Guery, c., Stepniewski, J.P., Vannier, B .. Fournex, R. and Lorenzon, G. (1993) Long-term culture of rat hepatocytes on porous membranes in hormonally defined serum-free medium. *Toxicol. in vitro*, 7, 453-459.
55. Guguen-Guillouzo, C. and Guillouzo, A (1986) Isolation of adult hepatocytes, in Guillouzo, A, GuguenGuillouzo, C .. (eds). *Isolated and Cultured Hepatocytes*, Paris: Les Editions INSERM and John Libbey, Eurotext, pp 1-12.
56. Guillouzo, A., 1998. Liver cells models in *in vitro* toxicology. *Environmental Health Perspectives* 106, 511–532.
57. Guner M., Freshney R.I., Morgan D . Freshney M.G. Thomas D.G.T. Graham D. 1977. Effects of dexamethasone and betamethasone on *in vitro* cultures from human astrocytoma, *Brit. J. Cancer*, 35,439-47.



58. Harrison. DJ. (1995) Molecular mechanisms of drug-resistance in tumors, *J. Pa/hol.* 175, 7-12.
59. Hartung T, Leist M. Food for thought on the evolution of toxicology and phasing out of animal testing. *ALTEX.* 2008; 25:91-102.
60. Hartung T, Wendel A. Endotoxin-inducible cytotoxicity in liver cell cultures - II: demonstration of endotoxin-tolerance. *Biochem Pharmacol.* 1992; 43:191-196. [PubMed: 1310848]
61. Hartung T. 3D - a new dimension of *in vitro* research. *Adv Drug Delivery Rev.* 2014; 69:vi.
62. Hartung T. Toxicology for the twenty-first century. *Nature.* 2009; 460:208-212. [PubMed: 19587762]
63. Hasegawa, K., Mijata, Y. and Carr, B. (1994) Glutamic acid potentiates hepatocyte response to mitogens in primary culture. *J. Cell. Physiol.,* 158,365-373.
64. Hashimoto, K., Matsunaga, N., and Shimizu. M. (1994) Effect of vegetable extracts on the transepithelial permeability of the human intestinal Caco-2 cell monolayer. *Biasci. Biotech. Biochem.* 58, 1345 - 1346.
65. Hecht. G., Pothoulakis, C., La Mont, J.T., and Madara. J.L. (1988) Clostridium difficile toxin A perturbs cytoskeletal structure and tight junction permeability of cultured human intestinal epithelial monolayers. *J. Clin. Invest.* 82. 1516-1524.
66. Hengstler, J.G., Ringel, M., Biefang, K., Hammel, S., Milbert, U., Gerl, M., Klebach, M., Diener, B., Platt, K.L., Böttger, T., F. Zucco et al. / *Toxicology in vitro* 18 (2004) 153-163 161
67. Hengstler, J.G., Utesch, D., Steinberg, P., Platt, K.L., Diener, B., Ringel, M., Swales, N., Fisher, T., Biefang, K., Gerl, M., Böttger, T., Oesch, F., 2000a. Cryopreserved primary hepatocytes as a constantly available *in vitro* model for the evaluation of human and animal drug metabolism and enzyme induction. *Drug Metabolism Review* 32, 81-118.
68. Hoffman, R.M (1994) The 3-dimensional question - can clinically relevant tumor drug-resistance be measured in-vitro? *Cancer and metastasis reviews* 13, 169-173.



69. Hogberg HT, Bressler J, Christian KM, Harris G, Makri G, O'Driscoll C, Pamies D, Smirnova L, Wen Z, Hartung T. Toward a 3D model of human brain development for studying gene/environment interactions. *Stem Cell Res Ther.* 2013; 4(Suppl 1):S4. [PubMed: 24564953]
70. Hu M.Y., Cipolle M., Sielaff T, Lovdahl MJ., Mann H. J., Cerra F.B. Effects of hepatocyte growth factor on viability and bipotransformation functions of hepatocytes in gel entrapped and monolayer culture. *Critical Care Medicine* 1995; 23 (7): 1237-1242.
71. Huang Y, Williams JC, Johnson SM. Brain slice on a chip: opportunities and challenges of applying microfluidic technology to intact tissues. *Lab Chip.* 2012; 12:2103–2117. [PubMed: 22534786]
72. Huh D, Leslie DC, Matthews BD, Fraser JP, Jurek S, Hamilton GA, Thorneioe KS, McAlexander MA, Ingber DE. A human disease model of drug toxicity-induced pulmonary edema in a lung-on-a-chip microdevice. *Sci Transl Med.* 2012; 4:159ra147.
73. Ingber D. E. (1993) Cellular tensegrity: defining new rules of biological design that govern the cytoskeleton. *J. Cell Sci.* 104,613-627.
74. Ito, K., Iwatsubo, T., Kanamitsu, S., Nakajima, Y., Sugiyama, Y., 1998. Quantitative prediction of in vivo drug clearance and drug interactions from *in vitro* data on metabolism, together with binding and transport. *Annual Reviews of Pharmacology and Toxicology* 38, 461–499.
75. Jastrzebska E, Tomecka E, Jesion I. Heart-on-a-chip based on stem cell biology. *Biosens Bioelectron.* 2016; 75:67–81.
76. Kedingler. M ., Simon-Assman, P. Lacroix. B .. Marxer, A.. Hauri. H.P .. and Haffen, K.(1986) Fetal gut mesenchyme induces differentiation of cultured intestinal endoderm and crypt cells. *Dev. Biol.* 113. 474-483.
77. Kelm JM, Fussenegger M. Microscale tissue engineering using gravity-enforced cell assembly. *Trends Biotechnol.* 2004; 22:195–202.
78. Kilberg, M.S. (1982) Amino acid transport in isolated rat hepatocytes. *J. Membr. Biol.*, 69, 1-12.



79. Kim HJ, Li H, Collins JJ, Ingber DE. Contributions of microbiome and mechanical deformation to intestinal bacterial overgrowth and inflammation in a human gut-on-a-chip. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016; 113:E7-15. [PubMed: 26668389]
80. Kim, B.H., Sung, S.R., Choi, E.H., Kim, YI., Kim, KJ., Dong, S.H., Kim, HJ., Chang, YW., Lee, J.I. and Chang, R. (2000) Dedifferentiation of conditionally immortalized hepatocytes with long-term *in vitro* passage. *Exp. Mol. Med.*, 32(1). 29-37.
81. Kirkwood. C. Bishop. R., and Coulson. B. (1998) Attachment and growth of human rotaviruses RV-3 and S 12/85 in Caco-2 depend on VP4, *J. Virology*, 72.9348-9352.
82. Knook, D. L., Blansjaar, N. and Sleyster, E. (1977) Isolation and characterisation of Kupffer and endothelial cells from the rat liver. *Exp. Cell Res.*, 109, 317-329.
83. Knop, E., Bader, A., Boker, K., Pichlmayr, R. and Sewing, K-F. (1995) Ultrastructural and functional differentiation of hepatocytes under long-term culture conditions. *Anat. Rec.*, 242,337-349.
84. Kobayashi, N., Noguchi, H., Fujiwara, T, Westerman, K.A., Leboulch, P. and Tanaka, N. (2000) Establishment of a highly differentiated immortalized adult human hepatocyte cell line by retroviral gene transfer. *Transplant. Proc.*, 32(7). 2368-2369.
85. Kong, A.T., Mandekar, S., Yu, R., Lei, W., Fasanmade, A., 1999. Pharmacodynamics and toxicodynamics of drug action: signaling cell survival and cell death. *Pharmaceutical Research* 16, 790-798.
86. Kvietys. P .. Specian. R .. Grisham. M .. and Tso. P. (1991) Jejunal mucosal injury and restitution: role of hydrolytic products of food digestion, *Am. J. Physiol.* 261. G384-G391.
87. Lancaster MA, Renner M, Martin CA, Wenzel D, Bicknell LS, Hurles ME, Homfray T, Penninger JM, Jackson AP, Knoblich JA. Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. *Nature*. 2013; 501:373-379.



88. Larsson, R .. Fridborg, H .. Kristensen, J., Sundstrom. c., and Nygren. P. (1993) *In vitro* testing of chemotherapeutic drug combination in acute myelocytix leukaemia using the fluorometric microculture cytotoxicity assay (FMCA). *Br. 1. Cancer* 67. 969-974
89. Latella, G., Fonti. R., Caprilli, R" Marcheggiano. A .. Magliocca, F" Das, K.M .. Gambus, G .. and Sambuy, Y. (1996) Characterization of the mucins produced by normal human colonocytes in primary culture, *Int. J. C alareet. Dis.* II, 76-83.
90. Lave' , T., Coassolo, P., Reigner, B., 1999. Prediction of hepatic metabolic clearance based on interspecies allometric scaling techniques and *in vitro*-in vivo correlation. *Clinical Pharmacokinetics* 36, 211-231.
91. Layer PG, Robitzki A, Rothermel A, Willbold E. Of layers and spheres: the reaggregate approach in tissue engineering. *Trends Neurosci.* 2002; 25:131-134. [PubMed: 11852139]
92. Lebreton. J.P .. Daveau, M., Hiron, M., Fontaine, M., Biou, M., Gilbert. D. and Guguen-Guillouzo, C (1986) Long-term biosynthesis of complement component C3 and alpha-I glycoprotein by adult rat hepatocytes in a co-culture system with an epithelial liver cell-type. *Biochem. J.*, 235,421-427.
93. Lechat, P., Adolphe, M., 1984. Possibilite' s actuellement offertes par les cultures cellulaires animales pour les e'tudes pharmacodynamiques. *Annales Pharmaceutiques Franc,aises* 42, 403-415.
94. Lee, J.H., Kim. W.H., Park. H., Yun, c.. Kim. B.H., Kwak. S.J., Cho, H. and Kim, M.W. (2000) Production and characterization of immortalized rat hepatocytes secreting hepatocyte growth factor/scatter factor. *Hepatogastroenterol.* 47(34).978-983.
95. Leist M, Hartung T, Nicotera P. The dawning of a new age of toxicology. *ALTEX.* 2008; 25:103-114. [PubMed: 18551234]
96. Lemaire, C., 1998. Inhibition of caspase activity induces a switch from apoptosis to necrosis. *FEBS Letters* 425, 266-270.

97. Lerche, C, Fautrel. A., Shaw, P.M., Glaise. D., Ballet, F., Guillozo. A. and Corcos, L. (1997) Regulation of the major detoxification functions by phenobarbital and 3-methylcholanthrene in cocultures of rat hepatocytes and liver epithelial cells. *Eur. J. Biochem.*, 244, 98-106.
98. Ma, T., Hollander, D., Freeman, D., Nguyen, T., and Krugliak, P.(1991) Oxygen free radical injury of IEC-IS small intestinal epithelial cell monolayers. *Gastroenterology* 100,1533-1543.
99. Madara, 1. (1998) Regulation of the movement of solutes across tight junctions. *Annu. Rev. Physiol.* 60, 143-159.
100. Maguire, T., Mouldsdaile. HJ., Stacey, G.N. and Battle, T. (1998) Comparison of 3-D rat hepatocyte cultures in simulated microgravity conditions. *New Developments and Nell' Applications in Animal Cell Technology* Kluwer Acad. Publ.. Dordrecht, pp717-720.
101. Marx U, Andersson TB, Bahinski A, Beilmann M, Beken S, Cassee FR, Cirit M, Daneshian M, Fitzpatrick S, Frey O, Gaertner C, Giese C, Griffith L, Hartung T, Heringa MB, Hoeng J, de Jong WH, Kojima H, Kuehnl J, Luch A, Maschmeyer I, Sakharov D, Sips AJAM, Steger-Hartmann T, Tagle DA, Tonevitsky A, Tralau T, Tsyb S, van de Stolpe A, Vandebriel R, Vulto P, Wang J, Wiest J, Rodenburg M, Roth A. Biology-inspired microphysiological system approaches to solve the prediction dilemma of substance testing. *ALTEX*. 2016; 33:272-321.
102. Marx U, Walles H, Hoffmann S, Lindner G, Horland R, Sonntag F, Klotzbach U, Sakharov D, Tonevitsky A, Lauster R. Human-on-a-chip" developments: a translational cutting-edge alternative to systemic safety assessment and efficiency evaluation of substances in laboratory animals and man? *Altern Lab Anim.* 2012; 40:235-257. [PubMed: 23215661]
103. Maurice, M., E. Rogier, D. Cassio. and G. Feldmann. (1988) Formation of plasma membrane domains in rat hepatocytes and hepatoma celllines in culture. *J. Cell Sci.* 90,79-92.
104. McConkey, D.J., 1998. Biochemical determinants of apoptosis and necrosis. *Toxicology Letters* 99, 157-168.

105. McGowan, J.A (1986) Hepatocyte proliferation in culture. *Isolated and Cultured Hepatocytes*, J. Libbey & Co. Ltd., pp. 14-33
106. McQueen, e.A (1993) *Isolation and culture of hepatocytes from different laboratory species*. in Tyson, e.A and Frazier, J.M. (eds.) *in vitro Biological Systems. Methods in Toxicology*. Vol. I, Academic Press, San Diego, pp255-270.
107. Michalopoulos, G., Russel, F. and Biles E. (1979) Primary cultures of hepatocytes on human fibroblasts. *In vitro Dev. Cell Bioi.*, 15. 796-806.
108. Mitic, L., and Anderson, J. (1998) Molecular architecture of tight junctions. *Annu. Rev. Physiol.* 60,121- 142.
109. Morel, F., Beaune, P., Ratanasavanh, D., Flinois, J.P., Yang, e.S., Guengerich, F.P. and Guillouzo, A (1990) Expression of cytochrome P-450 enzymes in cultured human hepatocytes. *Eur. J. Biochem.*, 191,437-444.
110. Morgan, D. .. Freshney, R.I., Darling, J.L., Thomas, D.G.T. and Celik, F. (1993) Assay of anticancer drugs in tissue culture: cell cultures of biopsies from human astrocytoma, *Br. J. Cancer* 47,205-214.
111. Muller-Klieser W. (1997) Three-dimensional cell cultures: from molecular mechanisms to clinical applications" *Am. J. Physiol.*; 273: CII09-CI223.
112. Nakamura, T., Nishizawa, T., Hagiya, M., Seki, T. .. Shimonishi, M. .. Sugimura, A. Tashiro K. and Shimizu, S. (1989) Molecular cloning and expression of human hepatocyte growth factor. *Nature*, 342: 440-443.
113. Narai, A., Arai, S., and Shimizu, M. (1997) Rapid decrease in transepithelial electrical resistance of human intestinal Caco-2 cell monolayers by cytotoxic membrane perturbants. *Toxicol. In vitro* 11, 347 -354.
114. Olinga, P., Meijer, D.K.F., Slooff, M.J.H., Groothuis, G.M.M., 1997. Liver slices in *in vitro* pharmacotoxicology with special reference to the use of human liver tissue. *Toxicology In vitro* 12, 77-100.
115. Oliveira SM, Reis RL, Mano JF. Towards the design of 3D multiscale instructive tissue engineering constructs: Current approaches and trends. *Biotechnol Adv.* 2015; 33:842-855.
116. Paganuzzi Stamatii, A., Silano, V., Zucco, F., 1981. Toxicology investigations with cell culture systems. *Toxicology* 20, 91-153.

117. Perrault, N., and Beaulieu, J. (1998) Primary cultures offully differentiated and pure human intestinal epithelial cells. *Exp. Cell Res.* 245, 34-42.
118. Pfaller W., Gstraunthaler G. 1998. Nephrotoxicity testing *in vitro*— what we know and what we need to know, *Environmental Health Perspectives*, 106 (Suppl 2), 559-569.
119. Plaa, G.L. (1993) *Mecanismes des atteintes hepaticues d'origine chimique*, in Ballet, F., Thurman, R.G. (eds), *Foie iso/e perfuse*. Paris: Les Editions INSERM and John Libbey, pp411-426.
120. Plateroti, M., Sambuy, Y., Nobili, F., Bises, G., and Perozzi, G. (1993) Expression of epithelial markers and retinoid binding proteins in retinol- or retinoic acid-treated intestinal cells *in vitro*. *Exp. Cell Res.* 208.137-147.
121. Plumb, J.A., Milroy, R. and Kaye, S.B. (1989) Effects of the pH dependence of 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide-fornazan absorption on chemosensitivity determined by a novel tetrazolium-based assay, *Cancer Res.* 49. 4435-4440.
122. Pucciarelli, G., and Finlay, B. (1994) Polarized epithelial monolayers: model systems to study bacterial interactions with host epithelial cells. *Meth. Enzymol.* 236,438-447.
123. Purchase, I.F.H., 1997. Prospects for reduction and replacement alternatives in regulatory toxicology. *Toxicology in vitro* 11, 313-319.
124. Quan, Y., Hattori, K., Lundborg, E" Fujita, T., Murakami, M., Muranishi, S., and Yamamoto, A. (1998) Effectiveness and toxicity screening of various absorption enhancers using Caco-2 cell monolayers. *Biol. Pharm. Bull.* 21,615-620.
125. Quaroni, A., and May, R.J. (1980) Establishment and characterization of intestinal epithelial cell cultures *Meth. Cell Biol.* 21,403-427.
126. Quaroni, A., Wands, J., Trelstad, R.L., and Isselbacher, KJ. (1979) Epithelioid cell cultures from rat small intestine: characterization by morphologic and immunologic criteria. *J. Biol. Chem.* 80,248- 265.
127. Ranaldi, G., Islam, K., and Sambuy, Y. (1992) Epithelial cells in culture as a model for the intestinal transport of antimicrobial agents. *Antimierob. Agents Chemother.* 36. 1374-1381.



128. Ranaldi, G., Islam, K., and Sambuy, Y. (1994) D-cycloserine uses an active transport mechanism in the human intestinal cell line Caco 2. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38, 1239-1245.
129. Rappaport, A.M. .. Borowy, Z.I., Longheed, W.M. and Lotto W.N. (1954) Subdivision of hexagonal liver lobules into a structural and functional unit. Role in hepatic physiology and pathology. *Anatom. Rec.*, 119, 11-33.
130. Rees, K.R., 1980. Cells in culture in toxicity testing: a review. *Journal of the Royal Society of Medicine* 73, 261-264.
131. Reid, L., Masaki, N., Fujita, M. .. Murray, Z., Liverpool, e. and Rosenberg, L. (1986) *Matrix and hormonal regulation of differentiation in liver cultures.* in *Research in isolated and cultured hepatocytes.* J Lippey and Co. Ltd., pp 225-227.
132. Robertson, J.D., Orrenius, S., 2000. Molecular mechanisms of apoptosis induced by cytotoxic chemicals. *Critical Reviews in Toxicology* 30, 609-627.
133. Rodriguez-Boulton. E. (1989) Morphogenesis of the polarized epithelial phenotype. *Science* 245:718-725.
134. Roskelley, e.D. and Bissell. M.J. (1995) Dynamic reciprocity revisited: a continuous, bidirectional flow of information between cells and the extracellular matrix regulates mammary epithelial cell function. *Biochem. Cell J.*; 73, 391-397.
135. Rossi, A., Poverini. R. ., Di Lullo. G., Modesti. A. Modica. A., and Scarino, M. (1996) Heavy metal toxicity following apical and basolateral exposure in the human intestinal cell line Caco-2. *Toxicol. In vitro* 10:27-36.
136. Rovida C, Asakura C, Daneshian M, Hofman-Huether H, Leist M, Meunier L, Reif D, Rossi A, Schmutz M, Valentin JP, Zurlo J, Hartung T. Toxicity testing in the 21st century beyond environmental chemicals. *ALTEX*. 2015; 32:171-181. [PubMed: 26168280]
137. Ryan, e. M., Carter, EA, Jenkins. R.L., Sterling. L.M., Yarmush, M.L., Malt, RA and Tompkins R. G. (1993) Isolation and long-term culture of human hepatocytes. *Surgery*. 113:48-54.
138. Ryan, J., McSweeney, B., 1986. Development and use of *in vitro* toxicity tests in Europe. Final Report, Part I and II. *EC Biotech* 6, 240.



139. Sakai, M., Imai, T., Ohtake, H. .. and Otagiri. M. (1998b) Cytotoxicity of absorption enhancers in Caco-2 cell monolayers. 1. Pharm. Pharmacol. 50.1101-1108.
140. Sakai, M., Imai, T. .. Ohtake, H. .. Azuma, H. .. and Otagiri. M. (1998a) Effects of absorption enhancers on cytoskeletal actin filaments in Caco-2 cell monolayers. *Life Sci.* 63.45-54.
141. Sakai, Y., Naruse, K., Nagashima. 1.. Mito, T. and Suzuki, M. (1996) Short-term preservation of porcine hepatocyte spheroids using UW solution. *Cell Transplantation*, 5, 505-511.
142. Sambruy Y., Ferruzza S., Ranaldi G., De Angelis I. 2001. Intestinal cell culture models: applications in toxicology and pharmacology, *Cell biology and toxicology*, 17(4-5), 301-317.
143. Scarino, M.L., Bises. G., Leomporra. L.. and Zucco. F. (1988) Metal toxicity and metallothionein mRNA induction in a rat intestinal cell line. *ATLA (Alternatives to Laboratory Animals)* 16.42-47.
144. Schipper. N., Olsson, S. .. Hoogstraate. J. • de Boer. A. .. Varum, K. .. and Artursson, P. (1997) Chitosans as absorption enhancers for poorly absorbable drugs. 2: Mechanisms of absorption enhancement. *Pharm Res.* 14.923-929.
145. Schuetz, E.G., Li, D., Omiecinski, J., Muller-Eberhard, U., Kleinman, H.K., Elswick, B., Guzelian, P.S., 1993. Regulation of gene expression in adult rat hepatocytes cultured on a basement membrane matrix. *Journal of Cellular Physiology* 134, 309-323.
146. Schwarz, L.R., R. Burr, M. Schwese. E. Pfaff: and H. Greim (1975) Uptake of taurocholic acid into isolated rat liver cells. *Eur. J. Biochem.* .. 55, 617-623.
147. Seglen, P.O. (1976) Preparation of isolated rat liver cells. *Melb. Cell Bioi.* .. 13,29-83.
148. Seilaff. T.D. .. Hu. M. Y. .. Rao. S. .. Groehler. K. and Olson. D. (1995) A technique for porcine hepatocyte harvest and description of differentiated metabolic functions in static culture. *Transplantation*, 59, 1459-1463.
149. Selden, C., Roberts, E., Stamp, G., Parker, K., Winlove, P., Ryder, T., Platt, H., Hodgson, H., 1998. Comparison of three solid supports for promoting three-dimensional growth and function of human liver cell lines. *Artificial Organs* 22, 308-319.



150. Skett. P. and Bayliss. M. (1996) Time for a consistent approach to preparing and culturing hepatocytes? *Xenobiotica*, 26. 1-7.
151. Smith, P.F., Krack, G .. McKee. R.L Johnson. D.G .. Gandolfi, A1., Hruby. V.J., Krumdieck, e.L. and Brendel. K. (1986) Maintenance of adult rat liver slices in dynamic organ culture. *In vitro Cell Dev. Biol.*, 22(12), 706-712.
152. Spielmann H., Bochkov N.P., Costa L., Gribaldo L., Guillouzo A., Heindel J.J., Karol M., Parchment R., Pfaller, W., Prieto Pereira P., Zacharewski T. 1998. 13th meeting of the scientific group on methodologies for the safety evaluation of chemicals (SGOMSEC): alternative testing methodologies for organ toxicity, *Environmental Health Perspectives*, 106 (Suppl 2), 613-620.
153. Stacey, G.N., Bolton, B.J. and Doyle, A. (1993) Multilocus fingerprinting used for definitive identification of HeLa cell contamination in cell lines and determination of genetic diversity amongst HeLa cell clones. *In vitro Cell Develop, Biol.*, 29A, 123A
154. Stamatii. A. Trucchi. O .. Zampaglioni. F .. Macri. A. and Zucco. F.(1988/89) Cytotoxic effects of furazolidone on two cell lines. *In l"itro Toxieol.* 2.279-286.
155. Steel. G.G. (1977) Terrninology in the description of drug-radiation interactions. *Int. J. Radait. Oncol. Biol. Phys.* 5, 1145-1150.
156. Steinberg, P., Lafranchi, W.M., Wolf. R.W .. Waxman, D.J., Oesch. F. and Friedberg, T. (1987) Xenobiotic metabolizing enzymes are not restricted to parenchymal cells in rat liver. *Mol. Pharmacol.*, 32. 463-470.
157. Steinberg, P., Oesch, F., 2000b. Cultures with cryopreserved hepatocytes: applicability for studies of enzyme induction. *Chemico-Biological Interactions* 125, 51-73.
158. Strain, A (1994) Isolated hepatocytes: Use in experimental and clinical hepatology. *Gut*, 35,433-436.

159. Suter-Dick L, Alves PM, Blaauboer BJ, Bremm KD, Brito C, Coecke S, Flick B, Fowler P, Hescheler J, Ingelman-Sundberg M, Jennings P, Kelm JM, Manou I, Mistry P, Moretto A, Roth A, Stedman D, van de Water B, Beilmann M. Stem cell-derived systems in toxicology assessment. *Stem Cells Dev.* 2015; 24:1284–1296.
160. Tang. A.S., Chikhale, P.J., Shah, P.K., and Borchardt, R.T. (1993) Utilization of a human intestinal epithelial cell culture system (Caco-2) for evaluating cytoprotective agents. *Pharm. Res.* 10. 1620- 1626.
161. Tchao. R. (1988) Trans-epithelial permeability of fluorescein *in vitro* as an assay to determine eye irritants. *Progr. in vitro Tox.* 6.271 – 283.
162. Testai, E., 2002. Basic aspects of toxicology: metabolic pathways and individual factors of susceptibility to xenobiotics. In: Chyczewski, L. et al. (Eds.), *Endocrine Disruptors and Carcinogenic Risk Assessment*. IOS Press, Amsterdam, pp. 55–270.
163. Tiffany-Castiglioni E., Ehrich M., Dees L., Costa L.G., Kodavanti P.R., Lasley S.M., Oortgiesen M., Durham, H.D. 1999. Bridging the gap between *in vitro* and *in vivo* models for neurotoxicology, *Toxicological Sciences*, 51, 178–183.
164. Tong. I.Z. .. De Lagausie, P., Furlan. V., Cresteil. L Bernard. O. and Alvarez, F. (1992) Long-term culture of adult rat hepatocyte spheroids. *Exp. Cell Res.*, 200. 326-332.
165. Twiss. J.. de Water. R., den Hartigh. J., Sparidans. R., Ramp-Koopmanschap, W., Brill, H .. Wijdeveld, M., and Venneij. P. (1994) Cytotoxic effects of pamidronate on monolayers of human intestinal epithelial (Caco-2) cells and its epithelial transport. *J. Pharm. Sci.* 83,699-703.
166. Ulrich, R.G., Bacon, JA. Cramer. C.T., Peng, G.W .. Petrella. D.K .. Stryd, R.P. and Sun, E.L. (1995) Cultured hepatocytes as investigational models for hepatic toxicity: Practical applications in drug discovery and development. *Toxicol. Lett.*: 82183. 107-115.
167. Unsworth, B.R. and Lelkes. P.1. (1998) Growing tissues in microgravity. *Nature Medicine*, 4, 901-907.



168. Van Dyke, R.W. . Stephens, 1.E. and Scharschmidt. B.F. (1982) Bile acid transport in cultured rat hepatocytes. *Am. J. Physiol.*, 244. G484-G492.
169. Van Langendonck. N., Bottreau. E. • Billy, S. . Tabouret, M., Marly. J., Pardon. P., and Velge, P. (1998) Tissue culture assays using Caco-2 cell line differentiate virulent from non-virulent *Listeria monocytogenes* strains. *J. Appl. Microbiol.* 85,337-346.
170. Vandenbergh, Y., Glaise, D., Meyer, D.J., Guillouzo, A. and Ketterer, B. (1988) Glutathione transferase isoenzymes in cultured rat hepatocytes. *Biochem. Pharmacol.* ... 37, 2482-2485.
171. Van't Klooster. G.AE., Woutersen-Van Nijnanten. F.M.A, Klein, W.R., Blaauboer, B.J. . Noordhoek, 1. and Van Miert, AS.J.PAM. (1992) Effects of various medium formulations and attachment substrata on the performance of cultured ruminant hepatocytes in biotransformation studies. *Xenobiotica*. 22. 523-534.
172. Wang, E., Marcotte, R., Petroulakis, E., 1999. Signaling pathway for apoptosis: a racetrack for life or death. *Journal of Cellular Biochemistry Supplements* 32/ 33, 95-102.
173. Wanson, J.e., Mosselmans, R., Brouwer. A and Knook. D.L. (1979) Interaction of adult rat hepatocytes and sinusoidal cells in co-culture. *Biol. Cell*. 56. 7-16.
174. Watkins. P.B., Wrighton, SA, Schuetz, E.G. . Maurel P. and Guzelian, P.S. (1986) Macrolide antibiotics inhibit the degradation of the glucocorticoid-responsive cytochrome P-450p in rat hepatocytes *in vivo* and in primary monolayer culture. *J. Biol. Chem.* 261, 6264-6271.
175. Werner, A, Duvar, S. . Muthing. 1.. Buntmeyer. H., Kahmann, U., Lundsorf, H. and Lehmann, J. (1999) Cultivation and characterisation of a new immortalised human hepatocyte cell line. HepZ, for use in an artificial liver support system. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 875. 364-368.
176. Whitesides GM. The origins and the future of microfluidics. *Nature*. 2006; 442:368-373.
177. Wilson, AP. (1992) Cytotoxicity and viability assays. In R.1. Freshney (ed), *Animal Cell Culture. a Practical Approach*, Oxford University Press. Oxford. pp. 263 - 303.
178. Wyllie. AH. (1993) Apoptosis (The 1992 Frank Rose Memorial Lecture) *Br J Cancer* 67. 205-208.



179. Zhang YS, Aleman J, Arneri A, Bersini S, Piraino F, Shin SR, Dokmeci MR, Khademhosseini A. From cardiac tissue engineering to heart-on-a-chip: beating challenges. *Biomed Mater.* 2015; 10:034006. [PubMed: 26065674]
180. Zucco, F. and Vignoli, A.L. (1998) *In vitro Toxicology in Europe* (1986-1997), Lombardo, Rome, ppl- 219.
181. Zucco, F., 1980. Introduction to the workshop on the application of tissue culture in toxicology. *Toxicology* 17, 101-104.
182. Zucco, F., and Stamatii. A (1993) Research and testing in pharmaco-toxicology with human intestinal cells .. in V. Rogiers, W. Sonck, E. Shephard. and A Vercruysse (eds) *Human cells in vitro pharmacotoxicology*. Vub Press, Brussels. p. 1-10.
183. Zucco. F. (1993) Freshly isolated cells and cell lines from the intestine as an *in vitro* model for toxicologic studies. *Toxic. in vitro* 7,397-402.



MİKRO ELEKTROMEKANİK SİSTEM (MEMS) GYROLARI KULLANILARAK ÜÇ BOYUTLU SİSTEM KONTROLERİNİN YAZILIMI VE ELEKTRONİK DEVRE TASARIMLARININ GELİŞTİRİLMESİ

CHAPTER

6

Ömer Faruk YILMAZ¹,
Hamdi ERCAN²,
Muharrem Selim CAN³

Giriş

3B programların, kullanıcı sayısının ve kullanım sürelerinin artması ile birlikte 3B program kontrolü üzerine çalışmalarda artmaktadır. 3B programların kontrol performansının artırılması üzerine birçok çalışma yapılmıştır. 3B programın kontrolü incelenmiştir. Temin edilen Atalet Ölçü Birimi (Inertial Measurement Unit, IMU) örnekleme adedi ve doğruluğu bakımından incelenmiştir. IMU'nun mikrodenetleyici ile haberleşme protokolü hazırlanmış ve denetlenmiştir. Hedeflenen tolerans aralığında gerekli değerler okunabilmiştir. Gerekli gömülü yazılım C++ dilinde geliştirilir ve mikrodenetleyiciye yüklenerek testler yapılır.

Böylece hedeflenen tolerans değerleri aralığında işlenmiş veri elde edilebilmiştir. Böylelikle gömülü sistemden bilgisayara pitch (X), roll (Y) ve yaw (Z) açıları 40ms (milisaniye) aralıkla gönderilebilmiştir. Üç eksenin

¹ Erciyes Üniversitesi. Havacılık ve Uzak Bilimleri Fakültesi, Uçak Elektrik- Elektronik Bölümü.

² Doç. Dr.; Erciyes Üniversitesi. Havacılık ve Uzak Bilimleri Fakültesi, Uçak Elektrik- Elektronik Bölümü.

³ Araştırma Görevlisi; İskenderun Teknik Üniversitesi, Sivil Havacılık Yüksekokulu, Havacılık Elektrik Elektroniki Bölümü.



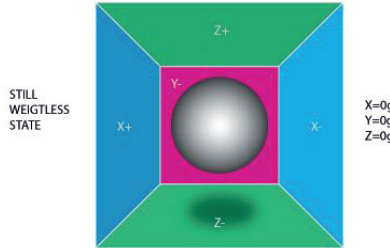
açı bilgileri Unity'de C# dili kullanılarak geliştirilen yazılım ile okunarak anlamlı hale getirilmiştir. Sonuç olarak, 3B nesnesinin kontrolü başarılmıştır (Guern, 2009).

MEMs Pozisyon Dinamik Denklemleri

İvmeölçer

İvmeölçerler üzerine düşen yer çekimi ivmesini veya dinamik (aniden hızlanma veya durma) ivmeyi ölçerler. Sensörden alınan değer m/sn^2 veya yer çekimi ivmesi (Gravitational Acceleration, g) türünden ifade edilir. Fakat neredeyse bütün uygulamalarda yerçekimi ivmesi türünden değer üretilmektedir. Uzayda veya yerçekimsiz alanda bulunulmaksızın dünyadaki bir ortamda sensör üzerine $1g$ 'lık yerçekimi kuvveti etki etmektedir. Bu değer de bilindiği üzere $9.80665 m/sn^2$ dir. Bu durum sensörün hangi enlemde olması ile değişse de bu yazıda ekvator çizgisi baz alınarak hesaplamalar gerçekleştirilecektir. Ölçü skalası $\pm 1g, \pm 2g, \pm 4g$ gibi değerler ile ifade edilmektedir.

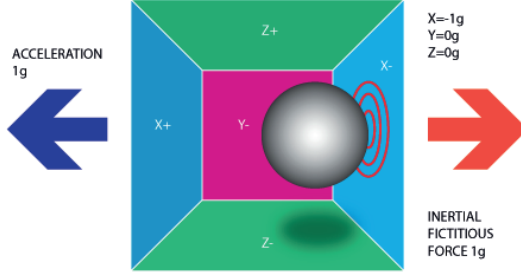
Uzayda yerçekimi etkisi olmadığından her nesnenin ağırlığı sıfırdır. Şekil 1'de görüldüğü üzere yerçekimi bulunmayan kutunun ortasında bir küre olduğu varsayılmak üzere küre herhangi bir yüzeye temas etmeden durağan bir şekilde varlığını sürdürmektedir.



Şekil 1. Kürenin yerçekimsiz ortamdaki durumu

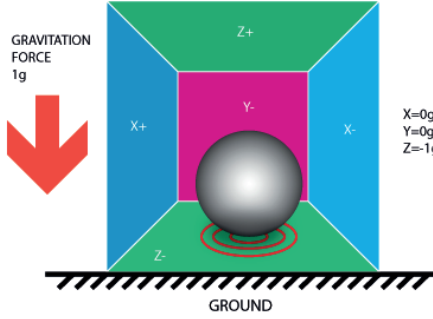


Kutuyu $+X$ yönünde $1g$ kuvveti ile hızlandırılması durumunda küre kutunun $-X$ yüzeyine eylemsizlikten dolayı $1g$ 'lık kuvvet uygulayacaktır. Bu durum Şekil 2'de ifade edilmiştir.



Şekil 2. Yer çekimsiz ortamda kutunun sola ivmelenmesindeki durumu

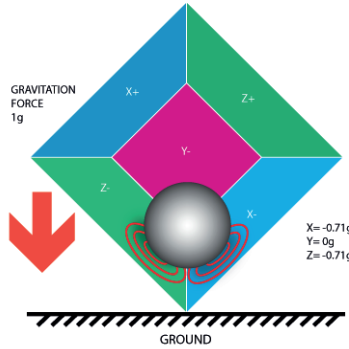
Fakat kutu Dünya ortamına getirildiği durumda Dünyanın $1g$ 'lık yer çekimi kuvveti küreye etki eder. Böylece küre $-Z$ yüzeyine $1g$ 'lık kuvvet uygulayacağı Şekil 3'te görülebilmektedir.



Şekil 3. Kutunun yer çekimli ortamdaki durumu



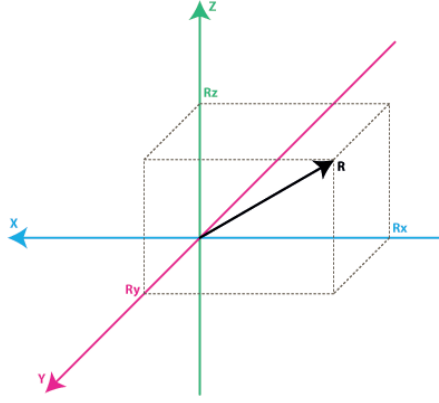
İvmeölçerlerde benzer bir şekilde çalışmaktadır. İvmeölçerin yüzeyleri basınca (piezoelektrik olabilir) veya manyetik alana tepki verir. Buradan hareketle, ivmeölçer bu tepkiyi ölçerek değer üretir. Sensörün yeryüzü ile yaptığı açı ile sensörün yüzeylerine uygulanan kuvvetin trigonometrik fonksiyonlardan geçirilmesi ile sensörün pozisyonu hesaplanabilmektedir. Örnek vermek gerekirse, sensör 45 derece yatırıldığında $-X$ ve $-Z$ yüzeylerine $1/\sqrt{2}$ kat sayılık kuvvet uygular bu kuvvet $0,707g$ 'ye eşittir. Söz konusu örnek Şekil 4'te gösterilmektedir.



Şekil 4. Kutunun 45 derecelik açıyla durması durumu



Kartezyen Sistemde İnceleme



Şekil 5. İvmelenmenin kartezyen sisteminde vektörel gösterimi

R vektörü sensöre etkiyen kuvvet vektörüdür. R vektörünün R_x, R_y, R_z olmak üzere üç bileşeni bulunmaktadır. R vektörü aşağıdaki denklem ile hesaplanır.

$$R^2 = R_x^2 + R_y^2 + R_z^2 \quad (1)$$

R_x, R_y, R_z değerleri bilindiğinde X, Y ve Z eksenleri ile arasındaki açı değeri bulunabileceğinden yeryüzüne göre pozisyonu da bulunabilmektedir. Bunu bir örnekle anlatmak konuyu anlaşılır kılacaktır.

Sensörün 3V3 gerilim ile beslendiği ve 10bit'lik bir Analog Dijital Dönüştürücü (Analog Digital Converter, ADC) kullandığı varsayılmaktadır. Sensör analog değerler üretmektedir. Bu değerler önce voltaj değerlerine ve sonrasında g değerine dönüştürülmesi gerekmektedir. Böylece trigonometrik fonksiyonlar ile açısal değerlere çevrilebilir. Alınan bir örneklemenin değerleri aşağıdaki Tablo 1'de gösterilmektedir.

**Tablo 1.**

ADC	Değer
$AdcRx$	586
$AdcRy$	630
$AdcRz$	561

Yukarıdaki değerler ham değerlerdir ve voltaj olarak ifade edebilmek için Denklem (2) kullanılmaktadır.

$$VoltRx = AdcRx * \frac{Vref}{(2^{ADCresolution})-1} \quad (2)$$

$$VoltRx = 586 * \frac{3.3}{(2^{10})-1} = 1.89V$$

$$VoltRy = 630 * \frac{3.3}{(2^{10})-1} = 2.03V$$

$$VoltRz = 561 * \frac{3.3}{(2^{10})-1} = 1.81V$$

Hesaplanan yukarıdaki değerler g türünden ifade edilmelidir. Her ivmeölçerin $0g$ 'de ürettiği sabit bir gerilim değeri vardır ve Zero-G değeri ismi ile anılmaktadır. Bu değer genellikle $Vdd/2$ olarak hesaplanır. Bununla birlikte kullanılan ürünün kılavuzunda bu değer belirtilmektedir.

$$VzeroG = \frac{3.3}{2} = 1.65V$$

Sensör hassasiyet bilgisi ürün kılavuzunda belirtilir. Bu örnek için aşağıdaki değer kullanılmıştır.

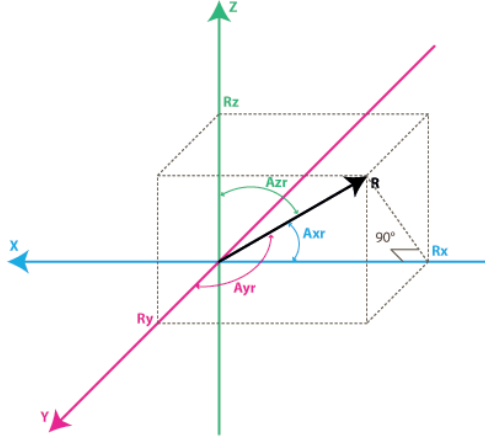
$$Sensitivity = 0.4785 V/g$$

Böylece eksenlere uygulanan g kuvvetleri Denklem (3-5) ile hesaplanabilir.

$$Rx = \frac{\left(\left(AdcRx * \frac{Vref}{(2^{ADCresolution})-1} \right) - VzeroG \right)}{Sensitivity} = \frac{\left(\left(586 * \frac{3.3V}{1023} \right) - 1.65V \right)}{0.4785V/g} = 0.5g \quad (3)$$

$$Ry = \frac{\left(\left(AdcRy * \frac{Vref}{(2^{ADCresolution})-1} \right) - VzeroG \right)}{Sensitivity} = \frac{\left(\left(630 * \frac{3.3V}{1023} \right) - 1.65V \right)}{0.4785V/g} = 0.79g \quad (4)$$

$$Rz = \frac{\left(\left(AdcRz * \frac{Vref}{(2^{ADCresolution})-1} \right) - VzeroG \right)}{Sensitivity} = \frac{\left(\left(561 * \frac{3.3V}{1023} \right) - 1.65V \right)}{0.4785V/g} = 0.33g \quad (5)$$



Şekil 6. Vektörel ivmelenmenin eksenlere izdüşümü

Şekil 6'da gösterildiği gibi R vektörünün X, Y ve Z eksenleri ile yaptığı açılar Denklem (6-11) ile bulunur.

$$Axr = \arccos(Rx / R) \quad (6)$$

$$Ayr = \arccos(Ry / R) \quad (7)$$

$$Azr = \arccos(Rz / R) \quad (8)$$

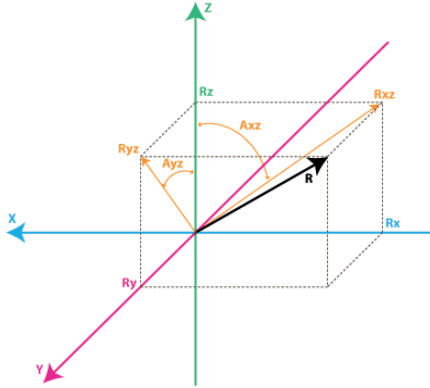
$$\cos(Axr) = Rx / R \quad (9)$$

$$\cos(Ayr) = Ry / R \quad (10)$$

$$\cos(Azr) = Rz / R \quad (11)$$

Jiroskopların Vektörel İncelenmesi

Bir nesnenin bir eksen etrafındaki dönüş hızı Dakikada Dönüş Sayısı (Revolutions Per Minute, RPM) olarak veya saniyedeki dönüş derecesi (*derece / sn*) olarak ifade edilmektedir. İvmeölçerlerde olduğu gibi bir, iki veya üç eksenle ölçüm yapan türleri mevcuttur. Genellikle IMU'lar ivmeölçer ve Jiroskopu bünyesinde beraber barındırır. Jiroskopların mantığı ve sonuç değerleri Şekil 7'deki model üzerinden anlaşılabilir.



Şekil 7. Vektörün dairesel hareketinin eksenlere izdüşümü

İki eksen Jiroskop kullanıldığında R vektörünün XZ uzayındaki izdüşümü Rxz, YZ uzayındaki izdüşümü ise Ryz olduğu görülmektedir. Bu vektörler Denklem (12)'deki Pisagor denkleminde hesaplanabilir.

$$Rxz^2 = Rx^2 + Rz^2 \quad (12)$$

Vektörlerin Z eksenine ile yapmış oldukları açılar Axz ve Ayz 'dir. Jiroskoplar temelde dönüş hızını ölçerler ve dönüş hızı zaman ile çarpıldığında sonuç dönüş açısını verir. t0 anındaki açı Axz0 ve t1 anındaki açı Axz1 ise dönüş hızı Denklem (13) ile bulunur.

$$(Axz1 - Axz0) = RateAxz * (t1 - t0) \quad (13)$$

Sensörden alınan değerlerin dönüş hızına çevrilmesi için ise Denklem (14) kullanılır. RateAxz Dönüş hızını, AdcGyroXZ jiroskoptan okunan ADC değerini, VzeroRate sıfır voltaj değerini ve Sensitivity ise hassasiyeti göstermektedir.

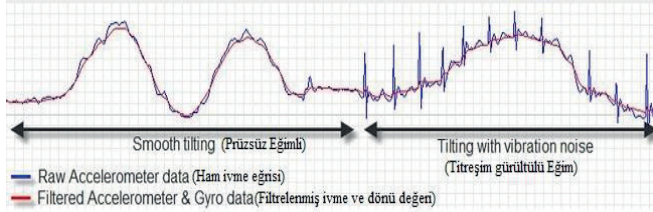
$$RateAxz = \left(\left(AdcGyroXZ * \frac{V_{ref}}{(2^{ADC_{resolution}} - 1)} \right) - VzeroRate \right) / Sensitivity \quad (14)$$



Atalet Ölçü Birimi (Inertial Measurement Unit - IMU)

Jiroskop ve ivmeölçerler tek başına yeterli, güvenli ve net bilgi vermediklerinden dolayı iki sensör birleştirilerek yönelim, hız ve pozisyon bilgileri tek bir üniteden alınır ki bu üniteye IMU(Inertial Measurement Unit) denir. Serbestlik derecesi DOF(Degrees of Freedom) ile ifade edilir.

İvmeölçerler kuvvete karşı aşırı duyarlı olmalarından dolayı en küçük titreşimlerde dahi yüksek gürültüler meydana getirirler. Jiroskoplar bu kuvvetlerden etkilenmezler. ivmeölçer çıkışlarının filtrelenmesinin sonucu Şekil 8’de gösterilmiştir.



Şekil 8.İvmeölçer çıkışının filtrelenmiş ve filtrelenmemiş sinyal eğrileri

Filtreleme için kullanılan pek çok filtreleme algoritmaları bulunmaktadır. En yaygın olarak kullanılanı ise kalman filtresidir. Sistemin bir önceki çıkışları ile yeni ölçülecek çıkışlarının tahmin edilmesi mantığı ile çalışmaktadır (Çayıroğlu, 2012).

Kalman filtresi algoritması Denklem (15-17) denklemleri ile açıklanabilir.

K_0 = Eski kalman değeri

C_0 = Eski kovaryans değeri

K_n = Yeni kalman değeri

C_n = Yeni kovaryans değeri

K_g = Kalman kazancı

C_k = Hesaplanan kalman değeri

input = ölçülen yeni değer



Kalman kazancı Denklem (15) ile hesaplanır.

$$Kg = \frac{Co+Q}{Co+Q+R} \quad (15)$$

Kalman değeri Denklem (16) ile hesaplanır.

$$Ck = Ko + (Kg * (input - Ko)) \quad (16)$$

Kalman değeri hesaplandıktan sonra bir sonraki hesap için yeni kovaryans değeri hesaplanmalıdır [2].

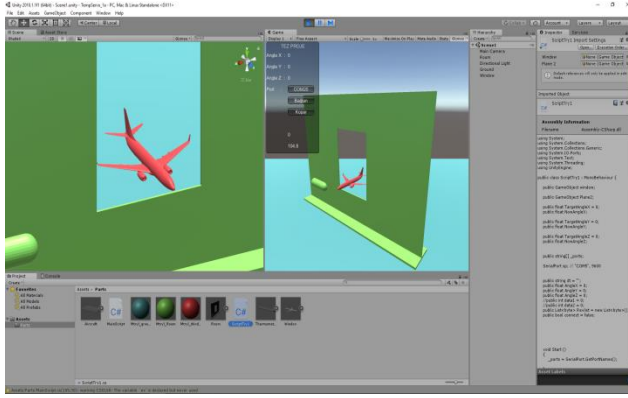
$$Cn = (1 - Kg) * Co \quad (17)$$

3B Nesnenin Kontrolü ve Donanım İle Bilgisayar Haberleşmesi

IMU'dan alınan değerlerin mikrodenetleyicideki algoritmadan geçtikten sonra elde edilen işlenmiş veriler bilgisayara ulaştırılır. Bu işlem için seriport kullanılmıştır. Bu haberleşme için 115200 baudrate, stopbit 0, databit 8 ve NoneParity parametreleri belirlenmiştir.

Elde edilen X, Y ve Z açı decimal değerden string değerine çevrilerek aralarına kesme karakteri olarak '#' belirlenmiştir. Oluşturulan yeni string değer byte dizinine çevrilmiştir. Veri iletim güvenliği için dizinin başına 0X68 ve Infactdata'nın uzunluk değeri eklenmiştir. Dizin sonuna ise checksum değeri ve 0X16 eklenmiştir. Elde edilen bu dizin oluşturulan seriporttan bilgisayara gönderilmiştir.

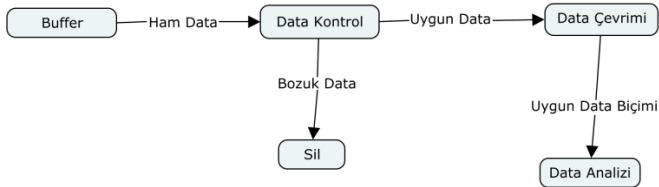
Bilgisayar tarafında ise kontrol edilecek nesne olarak bir adet uçak ve 3B uzayında kontrol edilecek nesnenin kontrol edildiğinin algılanması için sabit nokta referansı olarak çerçeve tasarlanmıştır. SolidWorks programı ile tasarlanan 3B nesneler Blender programı ile ölçeklendirilmiş ve kartezyen düzleminde gerekli pozisyona oturtulmuştur. Konumlandırılan 3B nesnesi stl formatında çevrilmiştir. Unity programına stl formatlı 3B nesneler aktarılmıştır. Tasarlanan 3B uzayı Şekil 9'da gösterilmektedir.



Şekil 9.Unity programı arayüzü

Kontrol programı C#Script ile yazılmıştır. Kontrol edilecek 3B nesne için GameObject sınıfı oluşturulmuştur. Bu sınıfın içine 3B tasarlanmış Plane nesnesi atanmıştır. Plane nesnesinin Kartezyen sistemine olan açıları NowAngleX, NowAngleY ve NowAngleZ isimli float değişkenlerde tutulmaktadır. Mikrodenetleyiciden okunan ve hedef alınan açı değerleri ise TargetAngleX, TargetAngleY ve TargetAngleZ isimli float değerlere atanır. Seri haberleşme için Seriport sınıfından sp isimli nesne oluşturulmuştur.

SerialPort üzerinden okunarak anlamlı hale getirilen açılal değerler hedef açılara kaydedilmiştir. SerialPort 'tan okuma akış diyagramı Şekil 10'da, algoritma kodları ise aşağıda belirtilmiştir.



Şekil 10.Veri okuma akış diyagramı

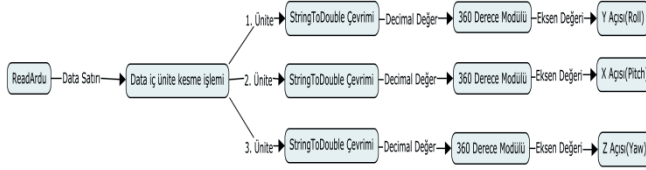


```
void ReadArdu()
{
    Thread thread_ = new Thread(() =>
    {
        Thread.Sleep(2000);
        while(connect)
        {
            if (sp.IsOpen)
            {
                try
                {
                    Revlist.Add((byte)sp.ReadByte());
                    if (1 <= Revlist.Count)
                    {
                        if (Revlist[0] == 0x68)
                        {
                            if (2 <= Revlist.Count)
                            {
                                if (Revlist[1] <= Revlist.Count)
                                {
                                    if (Revlist[Revlist[1] - 1] == 0x16)
                                    {
                                        string rprr =
                                        Encoding.UTF8.GetString(Revlist.ToArray(),
                                        2, Revlist.Count - 3);
                                        dt = rprr;
                                        AnalyzeData(dt);
                                        Revlist.Clear();
                                    }
                                }
                            }
                        }
                    }
                }
            }
            else
            { Revlist.Clear(); }
        }
    }
    catch (System.Exception ex)
    { }
    }
    thread_.Start();
}
```

Şekil 11. Veri Okuma kodları



Böylelikle okunan veri dt isimli string değişkenine atanmıştır. Okunan veri analiz edilerek sentezlenmek için açısai değerleri ayıklamak üzere AnalyzeData() isimli metoda gönderilir. Söz konusu analiz akış diyagramı Şekil 12’de, kodlar ise aşağıda yer almaktadır.



Şekil 12.Veri analizi akış diyagramı



```

void AnalyzeData(string Data)
{
    string unit = "";
    int count = 0;
    try
    {
        foreach (char item in Data)
        {
            if (item == '#')
            {
                if (count == 0)
                {
                    AngleY = (float)(Convert.ToDouble(unit));
                    TargetAngleY = AngleEditTo360DS(AngleY);
                    count++;
                }
                else if (count == 1)
                {
                    AngleX = (float)(Convert.ToDouble(unit));
                    TargetAngleX = AngleEditTo360DS(AngleX);
                    count++;
                }
                else if (count == 2)
                {
                    AngleZ = (float)(Convert.ToDouble(unit));
                    TargetAngleZ = AngleEditTo360DS(AngleZ);
                    count++;
                }
                unit = "";
            }
            else
            {
                unit += item;
            }
        }
    }
    catch (Exception ex)
    {
        AngleX = 0;
        AngleY = 0;
        AngleZ = 0;
    }
}

```

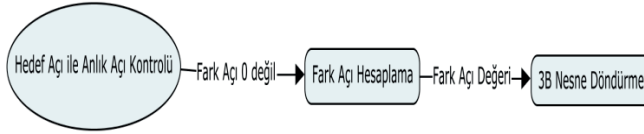
Şekil 13. Veri analizi kodları



Aşağıdaki işlem ile fark açıları hesaplanarak 3B nesnesinde transform.Rotate işlemi gerçekleştirilmiştir.

difference = TargetAngleX -
window.transform.eulerAngles.x;

Yukarıdaki işlem her eksen için saniyede 40 milisaniyede bir olmak üzere 25 hertz frekansta gerçekleşmektedir. Bu işlem Update() metodu içerisinde gerçekleştirilir. Bu metodun akış diyagramı Şekil 12'de, kodları ise aşağıda yer almaktadır.



Şekil 14.3B nesne pozisyon güncellemesi akış diyagramı

```
void Update ()
{
    if (TargetAngleX != Plane.transform.eulerAngles.x)
    {
        float difference = TargetAngleX - Plane.transform.eulerAngles.x;
        Plane.transform.Rotate(difference, 0, 0);
        NowAngleX = TargetAngleX;
    }

    if (TargetAngleY != Plane.transform.eulerAngles.y)
    {
        float difference = TargetAngleY - Plane.transform.eulerAngles.y;
        Plane.transform.Rotate(0, difference, 0);
        NowAngleY = TargetAngleY;
    }

    if (TargetAngleZ != Plane.transform.eulerAngles.z)
    {
        float difference = TargetAngleZ - Plane.transform.eulerAngles.z;
        Plane.transform.Rotate(0, 0, difference);
        NowAngleZ = TargetAngleZ;
    }
}
```

Şekil 15. 3B nesne pozisyon güncellenmesi kodları



Sonuçlar

Mikro Elektromekanik Sistem jiroskop ve ivmeölçer barındıran IMU'dan atalet ve dönü değerleri elde edilebilmesi için gerekli elektronik tasarım gerçekleştirilmiştir. IMU tarafından üretilen analog değerlerin açısal birimlere dönüştürülebilmesi için gerekli atalet ve trigonometrik denklemlerin algoritmaları C++ programlama dilinde geliştirilmiştir. Aynı zamanda elde edilen atalet değerlerinin gürültüsü kalman filtresi yöntemi ile optimize edilmiştir. Böylelikle ani dairesel hareketler yumuşatılarak kararlı hale getirilmiştir. Elde edilen açısal değerler Unity programında geliştirilen 3B arayüz programı ile ilişkilendirilerek 3B nesne üzerindeki etkisi gözlemlenebilmiştir. Donanım kartezyeni ile bilgisayardaki 3B nesne grafiği aynı kartezyen sistemine oturtulması sonucuna ulaşılmıştır.

Kaynaklar

1. Daniel Le Guern(December 29,2009). Guide D'utilisation D'un Module De Stabilisation Integre (Gyroscope + Accelerometer) En Application Embarquee
2. İbrahim Çayıroğlu(2012). Kalman Filtresi ve Programlama, Karabük Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Mekatronik Mühendisliği

LQR VE PID KONTROL METOTLARI KULLANILARAK BİR İNSANSIZ HAVA ARACININ RÜZGAR ETKİSİNDE KONTROLÜ

Muharrem Selim CAN¹ , Hamdi ERCAN²

Giriş

Bu çalışmanın amacı, İnsansız Hava Araçlarında (İHA) kullanılan kontrol metotlarının bozucu etkenlere olan dayanıklılıklarının karşılaştırılmasıdır. İHA'ların uçuşunu birçok dış kaynaklı bozucu etkiler olumsuz yönde etkilemektedir. Bu dış etkilerden bir tanesi rüzgardır. Rüzgar etkisi, İHA'nın uçuşu sırasında istenmeyen bir bozucu etkidir. Bu amaçla, İHA'nın bozuculara karşı cevaplarının test edilmesi için PID ve LQR kontrolcüler modellenmiştir. İHA'ların kontrolü, dış etkilere karşı dayanıklı olması daha güvenli bir uçuş açısından önem arz etmektedir. Her iki kontrol yöntemi de sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. Buradan hareketle; iki kontrol metodu için rüzgarlı bir havanın, İHA'nın hareketini nasıl etkilediği araştırılmıştır. Rüzgarlı ve rüzgarsız durumdaki kontrol performansları karşılaştırılmıştır.

Günümüzde, teknolojinin gelişmesi, günlük hayattaki birçok işin kolaylaşmasını da beraberinde getirmiştir. Eskiden zor olan ticari ve gündelik faaliyetler İHA'ların yardımı sayesinde daha kolay bir hal almıştır. Ticari kargo taşımacılığı, tarım faaliyetleri, havadan denetleme faaliyetleri vb. birçok faaliyetin başarılı sonuçlanmasında İHA'ların önemli bir katkısı olmaktadır. Endüstriyel birçok uygulamada İHA teknolojisinden yararlanılmasının yanı sıra İHA teknolojisinin gelişimi de devam etmektedir. İHA yapısında birçok elektronik kontrol sistemini barındırdığı için İHA'nın kontrolü üzerine birçok araştırma geliştirme yapılmaktadır. İHA'nın, bozucuların varlığında konumunun ve durumunun kontrolü için de çalışmalar yapılmıştır. Açık havada İHA'nın uçuşunu olumsuz yönde etkileyen birçok etken vardır. İHA'nın uçuşunu olumsuz etkileyen faktörlerden bir tanesi rüzgardır.

¹ (Araştırma Görevlisi); İskenderun Teknik Üniversitesi, Sivil Havacılık Yüksekokulu, Havacılık Elektrik Elektronik Bölümü.

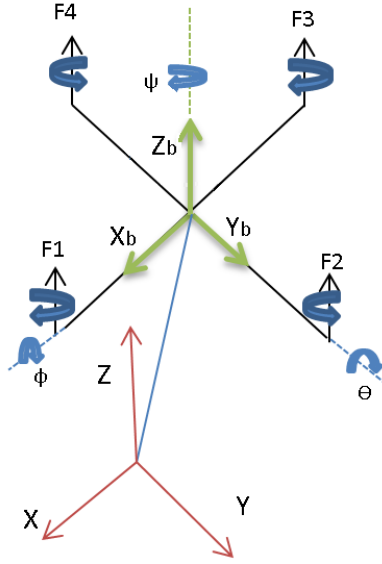
² (Doç. Dr.); Erciyes Üniversitesi. Havacılık ve Uzay Bilimleri Fakültesi, Uçak Elektrik- Elektronik Bölümü

Sandiwan ve arkadaşları, bir İHA için gürbüz oransal türev kontrol yöntemi kullanarak bozuculara karşı bir dengeleyici önermişlerdir. Önerdikleri kontrol kuralı rastgele bozucu ve eylemsizlik momenti matrisinin düzensizliğinde İHA'nın davranışının dengesini sağlamıştır (Sandiwan, 2017). İslam ve arkadaşları, sınırlı belirsizliğin olduğu durumda minyatür çok motorlu İHA için denge ve takip kontrol problemi üzerinde durmuşlardır. Belirsizlikleri; giriş bozucusu, modellenmemiş dinamikler ve uçuş çevresi gibi belirlemişlerdir. Lyapunov fonksiyonu kullanarak doğrusal olmayan gürbüz adaptif kayan kip kontrol algoritması geliştirmişlerdir. Geliştirdikleri gürbüz adaptasyon kuralı ile sınırlı parametrik belirsizliği dengelemeye çalışmışlardır. Önermiş oldukları yöntem diğer kontrol yöntemleri ile karşılaştırıldığında çoklu adımları, genişletilmiş yardımcı sinyalleri ve belirsizliğin kesin sınırlarını gerektirmemesi yönüyle kolay ve basit bir yapıdadır (İslam, 2017). Başka bir çalışmada, şiddetli rüzgarların varlığında İHA'nın manevra davranış kontrolü için sınırlı sonlu zamanlı optimal kontrolcü önerilmiştir. Önerilen metod ile İHA'nın doğru bir şekilde manevra davranışı yapabilmesi için rüzgarların bozucu etkilerini sönmülemişlerdir (Alexis, 2014).

Fernandez ve arkadaşları, Rüzgar tribününün gözlemlenmesi için bir dört motorlu İHA kullanılarak rüzgar bozucunun bastırılmasını incelemişlerdir. Çalışmalarında L1 adaptif kontrol yöntemini LQR ve PID kontrol yöntemleri ile karşılatırmışlardır. L1 adaptif kontrol yönteminin LQR ve PID kontrol yöntemlerine göre üstünlüğünü göstermişlerdir (Fernandez, 2017). Bannwarth ve arkadaşları, bir dört rotorlu İHA'nın rüzgar bozucunun varlığında kontrolünü araştırmışlardır (Bannwarth, 2016). Kukreti ve arkadaşları, İHA'nın rüzgar bozucunun etkisi altında kontrolü için LQR yöntemini kullanmışlardır (Kukreti, 2016). Kuantama ve arkadaşları, bir dört rotorlunun davranış kontrolü için PID ve Fuzzy-PID yöntemlerini incelemişlerdir. Çalışmalarında İHA'yı dairesel bir yörüngede hareket ettirmişlerdir. Fuzzy-PID'nin PID'ye göre daha başarılı olduğunu ortaya koymuşlardır (Kuantama, 2017).

Hava Aracının Dinamik Denklemleri

İHA'nın dinamik denklemleri Newton kanunlarından yola çıkılarak elde edilmektedir. Şekil 1'de eylemsizlik koordinat sistemi ve İHA'nın gövde koordinat sistemi gösterilmiştir. Şekil 1'de Euler açıları da gösterilmiştir.



Şekil 1 İHA'nın gövde eksen ve eylemsizlik eksen

Tablo 1'de rüzgar etkisinde kontrol edilmek istenen İHA'nın özellikleri gösterilmiştir.

Tablo 1 İHA'nın özellikleri

Mass	0.5 kg
Arm Length	0.25 m
I_{xx}	0.006 kg m ²
I_{yy}	0.006 kg m ²
I_{zz}	0.02 kg m ²

Newton Kanunu'ndan yola çıkarak İHA'ya etki kuvvetlerin toplamı F ile, İHA'nın kütlesi m ile İHA'nın lineer hızı v ile ve İHA'nın açısal hızı ω ile Denklem (1)'de gösterilmektedir.

$$\mathbf{F} = m\dot{\mathbf{v}} + \boldsymbol{\omega} \times \mathbf{v} \quad (1)$$

İHA'ya etki eden momentlerin toplamı $\mathbf{M}$ ile, İHA'nın eylemsizlik momenti Denklem (2) ve (3)'de gösterilmektedir.

$$\mathbf{M} = \mathbf{I}\dot{\boldsymbol{\omega}} + \boldsymbol{\omega} \times \mathbf{I}\boldsymbol{\omega} \quad (2)$$

$$\mathbf{M} = \begin{bmatrix} L \\ M \\ N \end{bmatrix} = \mathbf{I}\dot{\boldsymbol{\omega}} + \boldsymbol{\omega} \times \mathbf{I}\boldsymbol{\omega} \quad (3)$$

İHA'nın eylemsizlik moment matrisi Denklem (4) gösterildiği gibi simetrik matristir. I_{xx} x yönündeki eylemsizlik momentini, I_{yy} y yönündeki eylemsizlik momentini, I_{zz} z yönündeki eylemsizlik momentini göstermektedir.

$$\mathbf{I} = \begin{bmatrix} I_{xx} & 0 & 0 \\ 0 & I_{yy} & 0 \\ 0 & 0 & I_{zz} \end{bmatrix} \quad (4)$$

İHA'nın x,y ve z yönlerindeki ivmelenmeleri Denklem (5) ve (6)'da elde edilmiştir.

$$\begin{bmatrix} \dot{v}_x \\ \dot{v}_y \\ \dot{v}_z \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 0 \\ 0 \\ g \end{bmatrix} + \frac{1}{m} \begin{bmatrix} c\theta c\psi & s\phi s\theta c\psi - c\phi s\psi & c\phi s\theta c\psi + s\phi s\psi \\ c\theta c\psi & s\phi s\theta s\psi + c\phi c\psi & c\phi s\theta s\psi - s\phi c\psi \\ -s\theta & s\phi c\theta & c\phi c\theta \end{bmatrix} \begin{bmatrix} 0 \\ 0 \\ u_1 \end{bmatrix} \quad (5)$$

$$\begin{bmatrix} \dot{v}_x \\ \dot{v}_y \\ \dot{v}_z \end{bmatrix} = \frac{1}{m} \begin{bmatrix} u_1 (\cos(\phi) \sin(\theta) \cos(\psi) + \sin(\phi) \sin(\psi)) \\ u_1 (\cos(\phi) \sin(\theta) \sin(\psi) - \sin(\phi) \cos(\psi)) \\ mg + u_1 (\cos(\phi) \cos(\theta)) \end{bmatrix} \quad (6)$$

Denklem (7)'de gövde eksenindeki açılal ivmelenmeler elde edilmiştir.

$$\begin{bmatrix} \dot{p} \\ \dot{q} \\ \dot{r} \end{bmatrix} = \frac{1}{m} \begin{bmatrix} \frac{1}{I_{xx}}(I_{yy} - I_{zz})qr \\ \frac{1}{I_{yy}}(I_{zz} - I_{xx})pr \\ \frac{1}{I_{zz}}(I_{xx} - I_{yy})pq \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} \frac{1}{I_{xx}} & 0 & 0 \\ 0 & \frac{1}{I_{yy}} & 0 \\ 0 & 0 & \frac{1}{I_{zz}} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} L \\ M \\ N \end{bmatrix} \quad (7)$$

PID Kontrol

PID kontrol eski bir yöntem olmasına rağmen çok kullanılan bir yöntemdir. PID kontrol metodu, gerçekleştirilmesinin kolay oluşu ve basit yapısı sebebiyle birçok sistemin kontrolü için sıklıkla kullanılmaktadır. PID kontrol metodunun performansını etkileyen üç parametre vardır. Bu parametreler K_p , K_d ve K_i 'dir. PID kontrolcünün yapısı Denklem (8) ile gösterilmiştir (Tran, 2015).

$$u(t) = K_p e(t) + K_d \frac{d}{dx} e(t) + K_i \int_0^t e(\tau) d\tau \quad (8)$$

LQR Kontrol

Aşağıdaki Denklem (9) ve (10) ile lineer sürekli zamanlı bir sistemin durum uzay modeli gösterilmiştir. Bu model LQR kontrolcünün gerçekleştirilebilmesi için gereklidir.

$$\dot{x}(t) = \mathbf{A}x(t) + \mathbf{B}u(t) \quad (9)$$

$$y(t) = \mathbf{C}x(t) + \mathbf{D}u(t) \quad (10)$$

LQR yöntemi sistemlerin kontrolü için sıklıkla tercih edilen bir yöntemdir. Aynı zamanda optimal kontrol problemi olarak da bilinen LQR yöntemi, Denklem (11)'deki maliyet fonksiyonunu minimize edecek bir optimum çözümün bulunmasıdır. Denklem (12)'de gösterilen Riccati denklemi K matrisinin bulunabilmesi için çözülür. Böylece, K optimal kazanç matrisi Denklem (13) kullanılarak bulunur. Denklem (14)'te LQR yönteminde kullanılan geri besleme kuralı verilmiştir (Yu, 2013, Tran, 2015).

$$J = \int_0^{\infty} (x(t)^T Q x(t) + u(t)^T R u(t)) dt \quad (11)$$

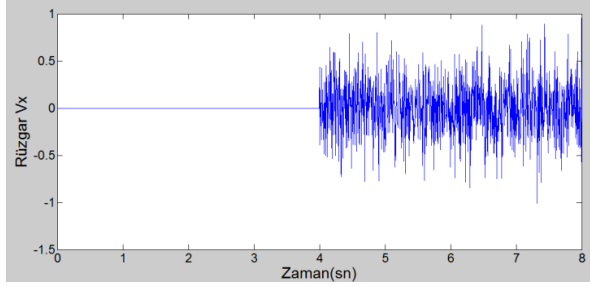
$$\mathbf{0} = \mathbf{A}^T \mathbf{X} + \mathbf{X} \mathbf{A} - \mathbf{X} \mathbf{B} \mathbf{R}^{-1} \mathbf{B}^T \mathbf{X} + \mathbf{Q} \quad (12)$$

$$\mathbf{K} = -\mathbf{R}^{-1} \mathbf{B}^T \mathbf{X} \quad (13)$$

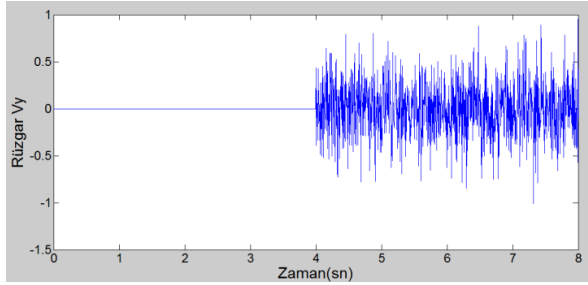
$$u(t) = -\mathbf{K}x(t) \quad (14)$$

Rüzgar Modeli

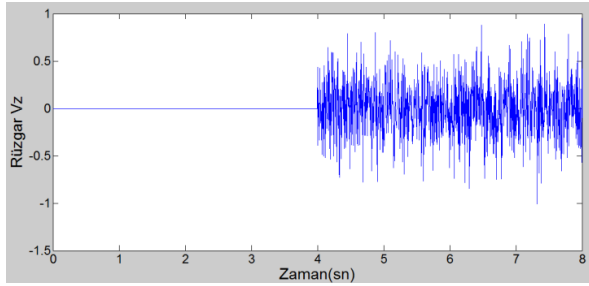
İHA'nın uçuşuna bozucu etkilerden bir tanesi rüzgardır. Rüzgar, yönü ve şiddeti olan vektörel bir büyüklüktür. Bu çalışmada rüzgar modeli rasgele olarak belirlenmiştir. İHA'nın kontrolü için PID ve LQR kontrol yöntemleri kullanılmıştır. Rüzgar bozucu etkisi aşağıdaki Şekil 2, Şekil 3 ve Şekil 4'te gösterilmiştir.



Şekil 2 x yönündeki rüzgar bozucu etkisi



Şekil 3 y yönündeki rüzgar bozucu etkisi

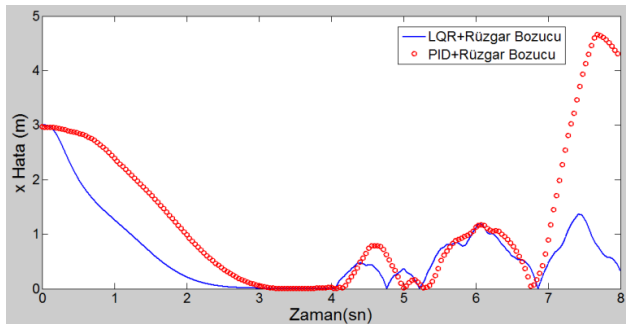


Şekil 4 z yönündeki rüzgar bozucu etkisi

Benzetim Sonuçları

Bu çalışmada LQR ve PID kontrol metotları kullanılarak İHA'nın rüzgar bozucusunun varlığında davranış kontrolü incelenmiştir. Rüzgar bozucusu rastgele beyaz gürültü olarak modellenmiştir. Her iki kontrolcünün kontrol performansları bozucuların olmadığı durumda ve bozucuların olduğu durumda olmak üzere karşılaştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre bozucunun olmadığı durumda LQR kontrol yönteminin performansı PID kontrol yöntemine göre daha başarılı sonuç vermiştir. Bozucunun olduğu durumda LQR yöntemi hafif bir dalgalanma ile İHA'nın davranışının kontrolünü sağlamıştır. PID kontrol yöntemi ise bozucunun olduğu durumda İHA'nın davranışının kontrolünü sağlayamamıştır.

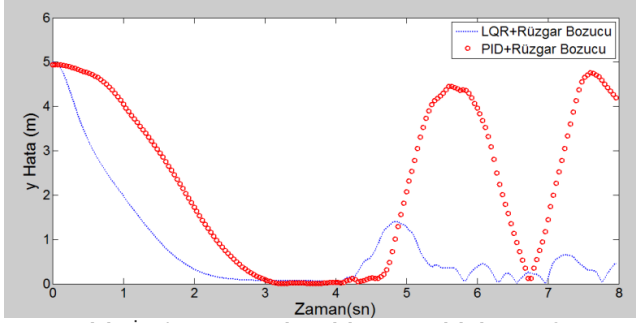
Rüzgar bozucu dördüncü saniyede sisteme etki etmeye başlamıştır. İlk dört saniyede rüzgar etkisi sıfırdır. Şekil 5'e göre x ekseninde rüzgar etkisi sıfırken LQR yöntemi ile yapılan kontrol sisteminin konum hatası PID yöntemine göre daha düşüktür. Aynı şekilde, dördüncü saniyede x eksenine göre rüzgar bozucu etkisi başladığı zaman LQR yönteminin PID yöntemine göre konum hatası yine düşüktür.



Şekil 5 İHA'nın Rüzgar etkisindeki x yönündeki hata grafiği

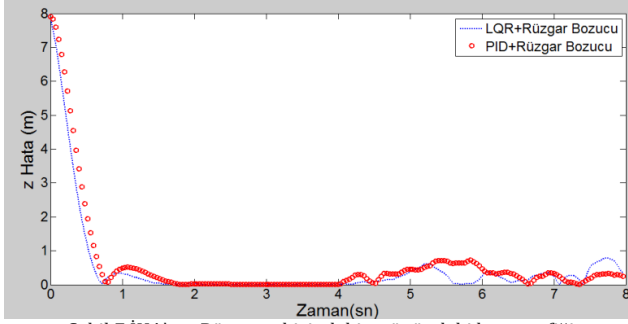
Şekil 6'da y ekseninde İHA'nın konum hatası gösterilmiştir. İlk dört saniyede rüzgar etkisi sıfırken y eksenine göre konum hatası LQR yöntemi

için PID yöntemine göre daha düşüktür. Buradan hareketle, dördüncü saniyede rüzgar etkisi başladığında LQR yönteminin PID yöntemine göre y eksenindeki konum hatası yine düşüktür.



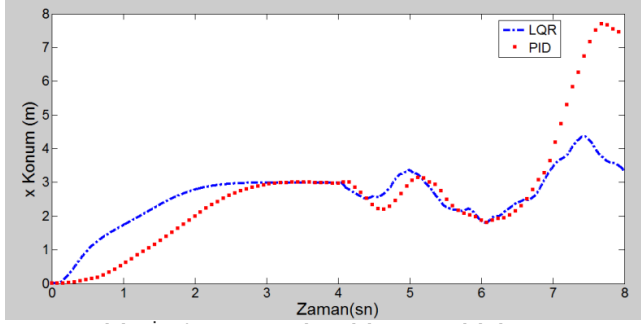
Şekil 6 İHA'nın Rüzgar etkisindeki x yönündeki hata grafiği

Şekil 7'de İHA'nın z eksenindeki konum hatası verilmiştir. İlk dört saniye İHA'ya rüzgar etkisi olmadığı takdirde LQR ve PID yöntemlerinin konum hataları birbirine çok yakın olup LQR yönteminin z eksenindeki konum hatası PID yöntemine göre daha düşüktür.



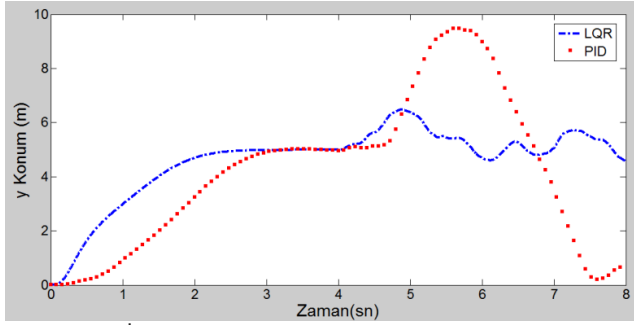
Şekil 7 İHA'nın Rüzgar etkisindeki z yönündeki hata grafiği

Şekil 8'de İHA'nın x yönündeki yer değiştirmesi gösterilmiştir. Grafiğin ilk dört saniyesinde rüzgar bozucu etkisi bulunmamaktadır. Rüzgar etkisinin bulunmadığı ilk dört saniyede LQR yöntemi PID yöntemine göre daha başarılıdır. Dördüncü saniyeden itibaren rüzgar bozucu etkisi başlamıştır. Grafikte LQR yönteminin rüzgar bozucunun varlığında x eksenine göre daha dengeli olduğu görülmektedir.



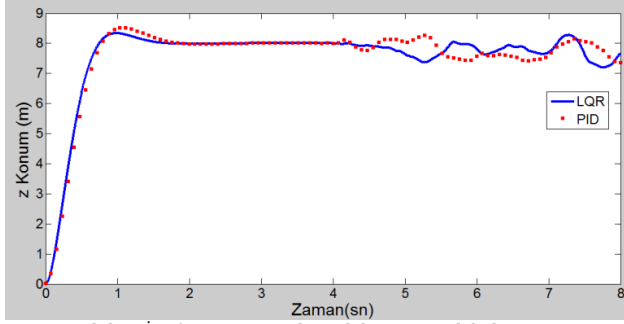
Şekil 8 İHA'nın Rüzgar etkisindeki x yönündeki konumu

Şekil 9'da İHA'nın y eksenine göre konumu gösterilmiştir. İHA ilk dört saniyede rüzgar bozucunun olmadığı durumda y ekseninde LQR yönteminde PID yöntemine göre istenilen konuma daha hızlı ulaşmıştır. Dördüncü saniyeden itibaren ise rüzgar bozucunun varlığında LQR yöntemi PID yöntemine göre daha başarılı bir sonuç vermiştir.



Şekil 9 İHA'nın Rüzgar etkisindeki y yönündeki konumu

Şekil 10'da İHA'nın z ekseninde irtifasını göstermektedir. Rüzgar bozucunun olmadığı ilk 4 saniyede LQR yöntemi ile PID yöntemi birbirine yakın performansta olup LQR yöntemi daha iyi sonuç vermiştir. Dördüncü saniyeden itibaren rüzgar bozucunun başlamasıyla birlikte yine LQR ile PID yönteminin performansı birbirine yakın olup LQR yöntemi daha başarılıdır.



Şekil 10 İHA'nın Rüzgar etkisindeki z yönündeki konumu

Sonuçlar

Bu çalışmada, rüzgar bozucunun bulunduğu ortamda bir İHA'nın kontrolünün sağlanması olarak belirlenmiştir. Bu amaç doğrultusunda, endüstriyel olarak sıklıkla kullanılan LQR ve PID kontrolcüler kullanılarak rüzgarın bozucu etkisi araştırılmıştır. Rüzgarın varlığında kontrolcülerin tepkisi incelenmiştir. İHA'nın istenilen konuma gelmesi ve o konumda kalması istenilmektedir. İHA'nın konumundaki hatalar grafiksel olarak verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre rüzgarın olmadığı ve olduğu durumda LQR yöntemi daha başarılı bir sonuç vermiştir.

Kaynaklar

1. Sandiwan, A. P., Cahyadi, A., & Herdjunto, S. (2017). Robust proportional-derivative control on SO (3) with disturbance compensation for quadrotor UAV. *International Journal of Control, Automation and Systems*, 15(5), 2329-2342.
2. Islam, S., Liu, P. X., & El Saddik, A. (2017). Nonlinear robust adaptive sliding mode control design for miniature unmanned multirotor aerial vehicle. *International Journal of Control, Automation and Systems*, 15(4), 1661-1668.
3. Alexis, K., Nikolakopoulos, G., & Tzes, A. (2014). Experimental constrained optimal attitude control of a quadrotor subject to wind disturbances. *International Journal of Control, Automation and Systems*, 12(6), 1289-1302.
4. Bannwarth, J. X. J., Chen, Z. J., Stol, K. A., & MacDonald, B. A. (2016, June). Disturbance accommodation control for wind rejection of a quadcopter. In *Unmanned Aircraft Systems (ICUAS), 2016 International Conference on* (pp. 695-701). IEEE.
5. Fernández, R. A. S., Dominguez, S., & Campoy, P. (2017, June). L1 adaptive control for Wind gust rejection in quad-rotor UAV wind turbine

- inspection. In Unmanned Aircraft Systems (ICUAS), 2017 International Conference on (pp. 1840-1849). IEEE.
6. Kukreti, S., Kumar, M., & Cohen, K. (2016, June). Genetically tuned LQR based path following for UAVs under wind disturbance. In Unmanned Aircraft Systems (ICUAS), 2016 International Conference on (pp. 267-274). IEEE.
 7. Kuantama, E., Vesselenyi, T., Dzitac, S., & Tarca, R. (2017). PID and Fuzzy-PID Control Model for Quadcopter Attitude with Disturbance Parameter. *International Journal of Computers Communications & Control*, 12(4), 519-532.
 8. Tran, N. K., Bulka, E., & Nahon, M. (2015, June). Quadrotor control in a wind field. In Unmanned Aircraft Systems (ICUAS), 2015 International Conference on (pp. 320-328). IEEE.
 9. Yu, B., Zhang, Y., Minchala, I., & Qu, Y. (2013, October). Fault-tolerant control with linear quadratic and model predictive control techniques against actuator faults in a quadrotor UAV. In *Control and Fault-Tolerant Systems (SysTol)*, 2013 Conference on (pp. 661-666). IEEE.



α MERTEBELİ KONVEKS VE YILDIZIL FONKSİYONLAR

CHAPTER 8

Hasan BAYRAM¹

1. Temel Bilgiler

1.1 Tanım. D kompleks düzlemde bir bölge olsun. $f : D \rightarrow \mathbb{C}$ fonksiyonu bire bir ise f fonksiyonuna D de *yalıncat* veya *univalent fonksiyon* denir. Başka bir deyişle $z_1, z_2 \in D$ için $z_1 = z_2$ olması $f(z_1) = f(z_2)$ olmasını gerektiriyorsa, f fonksiyonu D de yalıncattır. Geometrik anlamı; düzlemde $f(D)$ görüntü bölgesinin katlı bölge olmaması demektir.

D daireesinde analitik, yalıncat ve $f(0) = f'(0) - 1 = 0$ bağıntısını sağlayan $f(z) = z + \sum_{n=2}^{\infty} a_n z^n$ biçimindeki fonksiyon

anormalize edilmiş yalıncat analitik fonksiyon denir. D denormalize edilmiş bütün yalıncat analitik fonksiyonların sınıfı S ile gösterilir. Bundan böyle yalıncat fonksiyon denildiğinde yalıncat analitik fonksiyon anlaşılacaktır.

¹ Bursa Uludağ Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Matematik Bölümü



$f \in S$ fonksiyonu $f(z) = z + \sum_{n=2}^{\infty} a_n z^n$ tipinde

verilmiş ise, $|a_n| \leq n$ dir. Eşitlik $f(z) = k_{\theta}(z)$ fonksiyonu için geçerlidir.

1.2 Tanım. Bir $A \subset \mathbb{C}$ kümesi verilmişolsun. Eğer sabit bir $w_0 \in A$ noktasını, her bir $w \in A$ noktasına birleştiren doğru parçası A içinde kalıyorsa, yani her $t \in [0,1]$ için $(1-t)w_0 + tw \in A$ ise, A kümesine w_0 noktasına göre *yıldızlıküme* denir. Eğer bütün $w_1, w_2 \in A$ noktalarını birleştiren doğru parçası A içinde kalıyorsa, yani her $t \in [0,1]$ için $(1-t)w_1 + tw_2 \in A$ ise A kümesine *konveks küme* denir. Başka bir deyişle, eğer A kümesi her bir noktasına göre yıldızlı ise, A kümesine konvektir denir.

1.3 Tanım. $\gamma, \mathbb{C}$ de $z(t) = x(t) + iy(t)$, $a \leq t \leq b$, parametrik ifadesi ile verilmiş düzgün bir eğri ve f fonksiyonu γ eğrisini bulunduran bir bölgede analitik olsun. $f(\gamma) = \Gamma$, $w_0 \notin \Gamma$ ve $w \in \Gamma$ olduğunu kabul edelim. Eğer $\arg(w - w_0)$, t değişkeninin azalmayan tek değişkenli bir fonksiyonu, yani $a \leq t \leq b$ için

$$\frac{d}{dt} \arg(w - w_0) \geq 0$$

ise, Γ eğrisine w_0 noktasına göre *yıldızlı eğri* denir. Eğer Γ eğrisine teğet olan doğrunun τ argümenti t değişkeninin azalmayan bir fonksiyonu, yani $a \leq t \leq b$ için

$$\frac{d\tau}{dt} = \frac{d}{dt} \arg[f'(z)z'(t)] \geq 0$$

ise, Γ eğrisine *konveks eğri* denir.



1.4 Tanım. $D_r = \{z \in \mathbb{C} : |z| < r\}$ için $r \in (0,1]$, $f \in A(D_r)$ ve $z_0 \in D_r$ olsun. Eğer f fonksiyonu D_r de yalınkat ve $f(D_r)$ bölgesi $w_0 = f(z_0)$ noktasına göre yıldızlı ise, f fonksiyonuna D_r üzerinde z_0 noktasına göre *yıldızlı fonksiyon* denir. Orijine göre yıldızlı olan fonksiyonlara kısaca *yıldızlı fonksiyon* adı verilir. Ayrıca, f fonksiyonu D_r de yalınkat ve $f(D_r)$ bölgesi $\mathbb{C}$ de konveks ise f fonksiyonuna D_r üzerinde *konveks fonksiyon* denir.

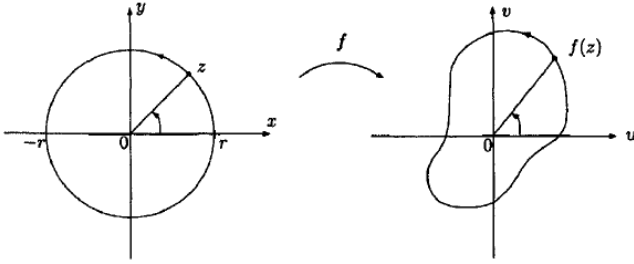
D_r dairesinde yıldızlı ve konveks fonksiyonların sınıfları sırasıyla, $S^*(D_r)$ ve $K(D_r)$ ile gösterilir. Özel olarak, $\mathbb{D}$ birim dairesinde $f(z) = z + \sum_{n=2}^{\infty} a_n z^n$ açılımına sahip yıldızlı ve konveks fonksiyonların sınıfları sırasıyla, S^* ve K ile gösterilir.

Aşağıdaki ikiteorem yıldızlı ve konveks fonksiyonların analitik karakterini ifade etmektedir.

1.5 Teorem. $f : \mathbb{D} \rightarrow \mathbb{C}$ analitik bir fonksiyon ve $f(0) = 0$ olsun. Butakdirde, f fonksiyonunun yıldızlı olması için gerek ve yeter şart $f'(0) \neq 0$ ve her $z \in \mathbb{D}$ için

$$\operatorname{Re} \left\{ \frac{z f'(z)}{f(z)} \right\} > 0$$

olmasıdır.

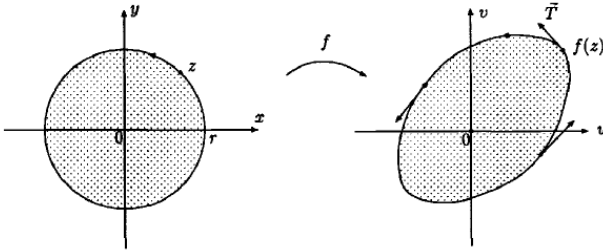


Şekil 1.1 $f(D_r)$ ninyıldızlılığı

1.6 Teorem. $f : D \rightarrow \mathbb{C}$ analitik bir fonksiyon olsun. f fonksiyonunun konveks olması için gerek ve yeter şart $f'(0) \neq 0$ ve $z \in D$ için

$$\operatorname{Re} \left[1 + \frac{zf''(z)}{f'(z)} \right] > 0$$

olmasıdır.



Şekil 1.2 $f(D_r)$ ninkonveksliği

1.7 Teorem. $f : D \rightarrow \mathbb{C}$ normalize edilmiş analitik bir fonksiyon olsun. $f \in K$ olması için gerek ve yeter şart, $z, \zeta \in D$ için



$$\operatorname{Re} \left[\frac{2zf'(z)}{f(z) - f(\zeta)} - \frac{z + \zeta}{z - \zeta} \right] \geq 0 \quad (1.1)$$

olmasıdır.

1.8 Teorem. $f \in S$ ve $0 \leq r < 1$ olsun. Ayrıca, $m'(r)$ ve $M'(r)$ reel değerli fonksiyonları için $m'(r) \leq |f'(z)| \leq M'(r)$ ise,

$$\int_0^r m'(t) dt \leq |f(z)| \leq \int_0^r M'(t) dt$$

dir.

1.9 Teorem. $f \in K$ ve $|z| = r < 1$ olsun.

$$\frac{r}{(1+r)} \leq |f(z)| \leq \frac{r}{(1-r)} \quad (1.2)$$

$$\frac{1}{(1+r)^2} \leq |f'(z)| \leq \frac{1}{(1-r)^2} \quad (1.3)$$

dir. Eşitlik, $\theta \in \mathbf{R}$ olmak üzere, $f(z) = z/(1 - e^{i\theta}z)$ fonksiyonu için geçerlidir.

1.10 Tanım. $\mathbf{D}$ de analitik, $f(0) = 1$ ve $z \in \mathbf{D}$ için $\operatorname{Re}\{f(z)\} > 0$ olan

$$f(z) = 1 + p_1z + p_2z^2 + \cdots = 1 + \sum_{n=1}^{\infty} p_n z^n \quad (1.4)$$

biçimindeki fonksiyonlara *reel kısmı pozitif analitik fonksiyon* denir. $\mathbf{D}$ de reel kısmı pozitif analitik fonksiyonların sınıfı P ile gösterilir.



1.11 Teorem. (Herglotz temsil teoremi). $f \in A(\mathbb{D})$ ve $f(0) = 1$ olsun. Bu takdirde $f \in P$ olması için gerek ve yeter şart $\mathbb{D}$ de

$$f(z) = \int_0^{2\pi} \frac{1 + ze^{-it}}{1 - ze^{-it}} d\mu(t) \quad (1.5)$$

olacak biçimde ve $\mu(2\pi) - \mu(0) = 1$ özelliğinde $[0, 2\pi]$ aralığında tanımlı azalmayan bir μ fonksiyonu vardır.

2. α Mertebeli Konveks ve Yıldızlı Fonksiyonlar

Burada birim dairede yıldızlı ve konveks fonksiyon kavramından hareketle tanımlanan, α mertebelikonveks ve yıldızlı fonksiyon sınıfları ve bu sınıflara ait özellikler üzerinde durulacaktır. Bu kavramlar ilk olarak Robertson (1936) tarafından verilmiş olup, diğer araştırmacılar tarafından geliştirilmiştir.

2.1 Tanım. $f : \mathbb{D} \rightarrow \mathbb{C}$ analitik bir fonksiyon olsun. $0 \leq \alpha < 1$, $f(0) = 0$ ve $f'(0) \neq 0$ olmak üzere, $z \in \mathbb{D}$ için

$$\operatorname{Re} \left[\frac{z f'(z)}{f(z)} \right] > \alpha$$

ise, f fonksiyonuna α mertebeliyıldızlı fonksiyon denir. Ayrıca $0 \leq \alpha < 1$ ve $f'(0) \neq 0$ olmak üzere, $z \in \mathbb{D}$ için

$$\operatorname{Re} \left[1 + \frac{z f''(z)}{f'(z)} \right] > \alpha$$

ise, f fonksiyonuna α mertebeli konveks fonksiyon denir.



$z \in \mathbb{D}$ için $f(z) = z + \sum_{n=2}^{\infty} a_n z^n$ biçiminde normalize edilmiş α mertebeli konveks ve yıldızl fonksiyonların sınıfı sırasıyla $K(\alpha)$ ve $S^*(\alpha)$ ile gösterilir.

K ve S^* sınıfları arasındaki Alexander tipi ilişki; $f \in K \Leftrightarrow z f'(z) \in S^*$ biçimindedir. Benzer ilişki $K(\alpha)$ ve $S^*(\alpha)$ sınıfları arasında da vardır:

2.2 Teorem. $f \in K$ ise $f \in S^*(1/2)$ dir. Sonuç kesin olup $1/2$ sabiti büyütülemez. (Suffridge 1970)

İspat. $f \in K$ olduğundan, 1.7 Teoremi gereği $z, \zeta \in \mathbb{D}$ için

$$\operatorname{Re} \left[\frac{2z f'(z)}{f(z) - f(\zeta)} - \frac{z + \zeta}{z - \zeta} \right] \geq 0$$

dir. Bu eşitsizlikte $\zeta = 0$ konumu yapılırsa, $z \in \mathbb{D}$ için

$$\operatorname{Re} \left[\frac{z f'(z)}{f(z)} \right] \geq \frac{1}{2}$$

bulunur. Harmonik fonksiyonlar için minimum prensibini kullanılarak istenilen sonuç elde edilir. Sonucun kesinliğini görmek için birim disk $\{w \in \mathbb{C} : \operatorname{Re} w > -1/2\}$ yarı düzlemine dönüştüren $f(z) = z/(1-z)$ fonksiyonunu göz önüne almak yeterlidir. ■

2.3 Sonuç. $f \in K$ ise $z \in \mathbb{D}$ için $\operatorname{Re}[f(z)/z] > 1/2$ dir. Sonuç kesin olup, sabit büyütülemez. (Suffridge 1970)

İspat. $f \in K$ olduğundan (1.1) bağıntısı sağlanır. $z, \zeta \in \mathbb{D}$ için



$$F(z, \zeta) = \frac{z f'(z)}{f(z) - f(\zeta)} - \frac{\zeta}{z - \zeta}$$

diyelim. (1.1) bağıntısından $z, \zeta \in \mathbf{D}$ için $F(z, \zeta) \geq 1/2$ eşitsizliği elde edilir. $\zeta \in \mathbf{D}$ sabiti için $F(z, \zeta)$ kuvvet serisi z değişkenine bağlı seçilirse,

$$F(z, \zeta) = 1 + \left(\frac{1}{\zeta} - \frac{1}{f(\zeta)} \right) z + \dots$$

elde edilir. Bu iki bağıntıyı eşitlersek $\varphi(z) = 2F(z, \zeta) - 1 \in P$ olur. 1.7 Teoremi gereği

$$\left| \frac{1}{\zeta} - \frac{1}{f(\zeta)} \right| \leq 1$$

eşitsizliği elde edilir. Her iki taraf ζ ile çarpılırsa,

$$\left| 1 - \frac{\zeta}{f(\zeta)} \right| \leq |\zeta| < 1$$

bulunur. Buradan $\operatorname{Re}[f(z)/z] > 1/2$ elde edilir. Eşitlik $f(z) = z/(1-z)$ fonksiyonu içine sağlanır. ■

Aşağıda 2.2 Teoreminin Jack (1971)'e ait olan bir genelleşmesi verilmiştir.

2.4 Teorem. $\alpha \in [0, 1)$ ve

$$\beta = \beta(\alpha) = \frac{2\alpha - 1 + \sqrt{(2\alpha - 1)^2 + 8}}{4} \quad \text{olmak üzere}$$

$f \in K(\alpha)$ ise $f \in S^*(\beta)$ dir.

Aşağıdaki sonuç S^* ile $S^*(\alpha)$ ve $K(\alpha)$ sınıfları arasındaki ilişkiyi verir. İspat tanım ve Alexander özelliği kullanılarak görülebilir.



2.5 Teorem. $\alpha \in [0,1)$ olsun.

(i) $z \in \mathbb{D}$ ve $g(z) = z[f(z)/z]^{1/(1-\alpha)}$ olmak üzere, $f \in S^*(\alpha)$ olması için gerek ve yeter şart $g \in S^*$ olmasıdır.

(ii) $z \in \mathbb{D}$ ve $h(z) = z[f'(z)]^{1/(1-\alpha)}$ olmak üzere $f \in K(\alpha)$ olması için gerek ve yeter şart $h \in S^*$ olmasıdır.

2.5 Teoremi kullanılarak $\alpha \in [0,1)$ için α mertebeli konveks fonksiyonlar için Robertson (1936)'a ait olan büyüme ve distorsiyon özellikleri aşağıda verilmiştir.

2.6 Teorem. $\alpha \in [0,1)$ ve $|z| = r < 1$ olmak üzere $f \in K(\alpha)$ ise,

$$\frac{1}{(1+r)^{2(1-\alpha)}} \leq |f'(z)| \leq \frac{1}{(1-r)^{2(1-\alpha)}} \quad (2.1)$$

dir. Eğer $\alpha \neq 1/2$ ise,

$$\frac{(1+r)^{2\alpha-1} - 1}{2\alpha - 1} \leq |f(z)| \leq \frac{1 - (1-r)^{2\alpha-1}}{2\alpha - 1} \quad (2.2)$$

dir ve $\alpha = 1/2$ ise,

$$\log(1+r) \leq |f(z)| \leq -\log(1-r) \quad (2.3)$$

dir. Yukarıdaki eşitsizlikler kesin olup, eşitlik hali

$$f(z) = \begin{cases} \frac{1 - (1-z)^{2\alpha-1}}{2\alpha - 1} & \alpha \neq 1/2 \\ -\log(1-z) & \alpha = 1/2 \end{cases} \quad (2.4)$$

fonksiyonu için sağlanır.

İspat. $f \in K(\alpha)$ ise,



$$\varphi(z) = \frac{1}{1-\alpha} \left[1 + \frac{zf''(z)}{f'(z)} - \alpha \right] = 1 + b_1 z + \dots$$

fonksiyonu P sınıfına aittir. Böylece, (1.3) bağıntısından $|z| = r < 1$ için

$$\left| \operatorname{Re} \varphi(z) - \frac{1+r^2}{1-r^2} \right| \leq \frac{2r}{1-r^2}$$

eşitsizliği sağlanır. Buradan mutlak değer özelliği gereği,

$$\frac{-2(1-\alpha)}{1+r} \leq \frac{\partial}{\partial r} \log |f'(z)| \leq \frac{2(1-\alpha)}{1-r}$$

bulunur. Her iki tarafın 0 dan r ye integrali alınırsa,

$$\log(1+r)^{-2(1-\alpha)} \leq \log |f'(z)| \leq \log(1-r)^{-2(1-\alpha)}$$

elde edilir. Bu ise (2.1) eşitsizliğinin sağlandığını gösterir. 1.8 Teoremi gereği, $\alpha \neq 1/2$ için (2.1) bağıntısından (2.2) eşitsizliği elde edilir. Eğer $\alpha = 1/2$ ise, (2.1) bağıntısı ve 1.8 Teoremi birlikte düşünülürse, (2.4) eşitsizliği gösterilmiş olur. ■

2.5 Teoremi ve (2.1) bağıntısından $S^*(\alpha)$ sınıfına ait fonksiyonlar için aşağıdaki büyüme teoremi elde edilir.

2.7 Teorem. $\alpha \in [0,1)$ ve $|z| = r < 1$ olmak üzere, $f \in S^*(\alpha)$ için

$$\frac{r}{(1+r)^{2(1-\alpha)}} \leq |f(z)| \leq \frac{r}{(1-r)^{2(1-\alpha)}}$$

dır. Sınırlar kesin olup, eşitlik $k^*(z, \alpha) = z(1-z)^{-2(1-\alpha)}$, $z \in \mathbb{D}$, fonksiyonu için geçerlidir.

α mertebeli konveks fonksiyonlar için gerek ve yeter şartı ifade eden aşağıdaki teorem, Brown (1989) tarafından elde edilmiştir. Bu sonuç, $|\zeta| < 1$ için $\mathbb{D}$ de konveks bir fonksiyonun her $|z - \zeta| < r < 1 - |\zeta|$



dairesini konveks bir bölge üzerine dönüştürdüğünü gösterir.

2.8 Teorem. $\alpha \in [0,1)$ ve $f : \mathbb{D} \rightarrow \mathbb{C}$ normalize edilmiş analitik bir fonksiyon olsun. $f \in K(\alpha)$ olması için gerek ve yeter şart, $|\zeta| < 1$ ve $|z - \zeta| < 1 - |\zeta|$ için

$$\operatorname{Re} \left\{ 1 + \frac{(z - \zeta)f''(z)}{f'(z)} \right\} > \alpha$$

olmasıdır.

İspat. İlk olarak, $|\zeta| < 1$ ve $|z - \zeta| < 1 - |\zeta|$ için $\operatorname{Re} \left\{ 1 + \frac{(z - \zeta)f''(z)}{f'(z)} \right\} > \alpha$ olduğunu kabul edelim. $\zeta = 0$ konumu yapılırsa, $f \in K(\alpha)$ olduğu görülür.

Tersine, $f \in K(\alpha)$ ise. ζ , $|\zeta| = r < 1$ özelliğinde belli bir nokta ve

$$A = 1 + \left(\frac{z - \zeta}{1 - \alpha} \right) \frac{f''(z)}{f'(z)}$$

olsun. Harmonik fonksiyonlar için minimum prensibi dikkate alınarak, $|z - \zeta| = \rho < 1 - r$ için $\operatorname{Re} A > 0$ olduğunu göstermek yetecektir. Bunun için $|z - \zeta| = \rho$ özelliğinde bir $z \in \mathbb{D}$ noktası seçelim. $f \in K(\alpha)$ olduğundan, $p \in P$ için

$$A = \frac{(z - \zeta)(p(z) - 1)}{z} + 1 \quad (2.5)$$

olarak yazılabilir. P sınıfının ekstrem noktaları, $\theta \in \mathbb{R}$ için, $p_\theta(z) = (1 + e^{i\theta}z)/(1 - e^{i\theta}z)$ fonksiyonları olduğu biliniyor. (2.5) eşitliğinin sağ tarafı P üzerinde bir afin dönüşüm olduğundan, $\min_{p \in P} \operatorname{Re} A$ değerini P sınıfının



bir ekstrem noktasında alır (Hallenbeck ve MacGregor 1984). $\zeta = r e^{i\varphi}$ ve $z = \zeta + \rho e^{i\phi}$ için, gerekli hesaplamalar neticesinde

$$\begin{aligned} \operatorname{Re} A &\geq \min_{0 \leq \theta < 2\pi} \operatorname{Re} \left[\frac{(z - \zeta)(p_\theta(z) - 1)}{z} + 1 \right] \\ &= \min_{0 \leq \theta < 2\pi} |1 - e^{i\theta} z|^{-2} [-\rho^2 + 1 - 2r \cos(\theta + \varphi) + r^2] \\ &\geq \min_{0 \leq \theta < 2\pi} |1 - e^{i\theta} z|^{-2} [(1 - r)^2 - \rho^2] > 0 \end{aligned}$$

bulunur. Bu ise ispatı tamamlar. ■

$S^*(\alpha)$ ve $K(\alpha)$ sınıflarına ait fonksiyonlar için Robertson (1936)'a ait katsayı tahminlerini verelim.

2.9 Teorem. $\alpha \in [0,1)$ ve $z \in D$ olsun.

(i) $f(z) = z + \sum_{n=2}^{\infty} a_n z^n \in S^*(\alpha)$ ise, $n = 2, 3, \dots$ için,

$$|a_n| \leq \frac{1}{(n-1)!} \prod_{k=2}^n (k - 2\alpha) \quad (2.6)$$

dir. Eşitlik, $k^*(z, \alpha) = z(1-z)^{-2(1-\alpha)}$ fonksiyonu için geçerlidir.

(ii) $g(z) = z + \sum_{n=2}^{\infty} b_n z^n \in K(\alpha)$ ise, $n = 2, 3, \dots$ için,

$$|b_n| \leq \frac{1}{n!} \prod_{k=2}^n (k - 2\alpha) \quad (2.7)$$

dir. Eşitlik (2.4) bağıntısında verilen fonksiyonlar için geçerlidir.

İspat. P fonksiyonu

$$p(z) = \frac{1}{1-\alpha} \left\{ \frac{zf'(z)}{f(z)} - \alpha \right\} = 1 + c_1 z + c_2 z^2 + \dots \quad (2.8)$$

biçiminde tanımlanırsa, $p \in P$ olur. (2.8) bağıntısından elde edilen $((1-\alpha)p(z) + \alpha)f'(z) = zf'(z)$



eşitliğinde seri açılımı yapılır ve n . dereceli terimlerin katsayıları eşitlenirse, $n = 2, 3, \dots$ için

$$na_n = a_n + (1 - \alpha)(c_1 a_{n-1} + c_2 a_{n-2} + \dots + c_{n-1}) \quad (2.9)$$

bulunur. $|c_n| \leq 2$ olduğu göz önüne alınırsa,

$$(n-1)|a_n| \leq 2(1 - \alpha)(1 + |a_2| + \dots + |a_{n-1}|)$$

olur. Bur eşitsizlikten, özel olarak,

$$|a_2| \leq 2 - 2\alpha,$$

$$|a_3| \leq \frac{1}{2}(2 - 2\alpha)(1 + |a_2|) \leq \frac{1}{2}(2 - 2\alpha)(3 - 2\alpha),$$

$$|a_4| \leq \frac{1}{3!}(2 - 2\alpha)(3 - 2\alpha)(4 - 2\alpha)$$

bulunur. Böylece, tümevarımla (2.6) eşitsizliğine ulaşılır.

(2.6) eşitsizliğinde özel olarak $\alpha = 1/2$ alınırsa, $|a_n| \leq 1$

ve $\alpha = 0$ alınırsa, $|a_n| \leq n$ olduğu görülür.

(2.7) eşitsizliğini göstermek için, $zg'(z) \in S^*(\alpha)$ ve (2.6) bağıntısını dikkate alınmak yetecektir. ■

Aşağıdaki teorem, $S^*(\alpha)$ sınıfındaki fonksiyonların integral temsilini vermektedir.

2.10 Teorem. $f \in S^*(\alpha)$ olması için gerek ve yeter şart, $z \in \mathbb{D}$ için,

$$f(z) = z \exp \left[-\frac{(1 - \alpha)}{\pi} \int_0^{2\pi} \log(1 - ze^{-i\theta}) d\mu(\theta) \right] \quad (2.10)$$

olacak biçimde, $\mu(2\pi) - \mu(0) = 2\pi$ özelliğinde, azalmayan bir $\mu(\theta)$ fonksiyonunun mevcut olmasıdır.

İspat. $f \in S^*(\alpha)$ ise, $\operatorname{Re}[zf'(z)/f(z)] > \alpha$ dır.



$$p(z) = \frac{1}{1-\alpha} \left\{ \frac{zf'(z)}{f(z)} - \alpha \right\} \quad (2.11)$$

denirse, $p \in P$ olur. Herlogz Temsil Teoremi gereği, $\mu(2\pi) - \mu(0) = 2\pi$ bağıntısını sağlayan azalmayan bir $\mu(\theta)$ fonksiyonu için,

$$p(z) = \frac{1}{2\pi} \int_0^{2\pi} \frac{1 + e^{-i\theta} z}{1 - e^{-i\theta} z} d\mu(\theta)$$

dir. (2.11) eşitliğinden,

$$\frac{f'(z)}{f(z)} = \frac{1}{2\pi} \int_0^{2\pi} \frac{1 + (1-2\alpha)ze^{-i\theta}}{z(1 - ze^{-i\theta})} d\mu(\theta)$$

bulunur. Bu ifadenin z_0 noktasından z noktasına integrali alınıp, $z_0 \rightarrow 0$ için limite geçilirse,

$$\log f(z) = \frac{1}{2\pi} \int_0^{2\pi} [\log z - (2-2\alpha) \log(1 - e^{-i\theta} z)] d\mu(\theta)$$

olur. Buradan (2.10) bağıntısı elde edilir. ■

$$f \in S^*(\alpha) \text{ için } g(z) = \int_0^z [f(\zeta)/\zeta] d\zeta \in K(\alpha)$$

olduğundan 2.10 Teoreminden aşağıdaki sonuç elde edilebilir.

2.11 Sonuç. $0 \leq \alpha < 1$ ve $z \in \mathbb{D}$ olsun. $f \in K(\alpha)$ olması için gerek ve yeter şart

$$f(z) = \int_0^z \exp \left[-\frac{(1-\alpha)}{\pi} \int_0^{2\pi} \log(1 - ze^{-i\theta}) d\mu(\theta) \right] \quad (2.12)$$

olacak biçimde $\mu(2\pi) - \mu(0) = 2\pi$ özelliğinde azalmayan bir $\mu(\theta)$ fonksiyonunun mevcut olmasıdır.

2.12 Teorem. $z \in \mathbb{D}$, $f(z) = z + \sum_{n=2}^{\infty} a_n z^n$ ve

$0 \leq \alpha < 1$ olsun. Eğer



$$\sum_{n=2}^{\infty} (n-\alpha) |a_n| \leq 1-\alpha \quad (2.13)$$

ise bu taktirde $f \in S^*(\alpha)$ dır.

İspat. (2.13) bağıntısından

$$\sum_{n=2}^{\infty} |a_n| \leq \sum_{n=2}^{\infty} \frac{n-\alpha}{1-\alpha} |a_n| \leq 1$$

bulunur. Ayrıca,

$$\begin{aligned} |zf'(z) - f(z) - (1-\alpha)f(z)| &= \left| \sum_{n=2}^{\infty} (n-1)a_n z^n - (1-\alpha) \left(z + \sum_{n=2}^{\infty} a_n z^n \right) \right| \\ &\leq \sum_{n=2}^{\infty} (n-1) |a_n| |z|^n - (1-\alpha) \left(|z| - \sum_{n=2}^{\infty} |a_n| |z|^n \right) \\ &\leq |z| \left(\sum_{n=2}^{\infty} (n-\alpha) |a_n| - (1-\alpha) \right) \leq 0 \end{aligned}$$

olur. Buradan

$$\left| 1 - \frac{zf'(z)}{f(z)} \right| \leq 1-\alpha$$

bulunur. Bu son eşitsizlikten $z \in \mathbb{D}$ için,

$$\operatorname{Re} \frac{zf'(z)}{f(z)} > \alpha$$

elde edilir. ■

Benzer bir sonuç $K(\alpha)$ sınıfı için aşağıdaki şekilde ifade edilebilir.

2.13 Teorem. $z \in \mathbb{D}$, $f(z) = z + \sum_{n=2}^{\infty} a_n z^n$ ve

$0 < \alpha < 1$ olsun. Eğer

$$\sum_{n=2}^{\infty} n(n-\alpha) |a_n| \leq 1-\alpha \quad (2.14)$$



ise, $f \in K(\alpha)$ dir.

İspat. (2.14) bağıntısından,

$$\sum_{n=2}^{\infty} |a_n| \leq \sum_{n=2}^{\infty} \frac{n(n-\alpha)}{1-\alpha} |a_n| \leq 1$$

bulunur. Ayrıca,

$$\begin{aligned} |z^2 f'' + z f' - (1-\alpha) z f'(z)| &= |z + \sum_{n=2}^{\infty} n^2 a_n z^n - (1-\alpha) z + \sum_{n=2}^{\infty} n a_n z^n| \\ &\leq |z + \sum_{n=2}^{\infty} n^2 |a_n| |z|^n - (1-\alpha) \left(|z| - \sum_{n=2}^{\infty} n |a_n| |z|^n \right)| \\ &\leq |z| + \sum_{n=2}^{\infty} n^2 |a_n| |z|^{n-1} - |z| (1-\alpha) + (1-\alpha) \sum_{n=2}^{\infty} n |a_n| |z|^n \\ &\leq |z| \left[\sum_{n=2}^{\infty} n(n-\alpha) |a_n| - (1-\alpha) \right] \leq 0 \end{aligned}$$

olur. Buradan,

$$\operatorname{Re} \left[1 + \frac{z f''(z)}{f'(z)} \right] > \alpha \text{ veya } \left| 1 + \frac{z f''(z)}{f'(z)} \right| \leq 1 - \alpha$$

elde edilir. ■

Kaynaklar

1. M.S. Robertson, *On the theory of univalent functions*, Ann. Math., **37** (1936), 374-408.
2. M.S. Robertson, *A remark on the oddschlicht functions*, Bull. Amer. Math. Soc., **42** (1936), 366-370.
3. T.J. Suffridge, *Some remarks on convex maps of the unit disc*, Duke Math. J. **37** (1970), 775-777.
4. T.J. Suffridge, *The principle of subordination applied to functions of several variables*, Pacif. J. Math., **33** (1970), 241-248.
5. I.S. Jack, *Functions starlike and convex of order α* , J. London Math. Soc., **3** (1971), 469-474.
6. D.J. Hallenbeck, T.H. MacGregor, *Linear Problems and Convexity Techniques in Geometric Function Theory*, Pitman, Boston, 1984.



MAĞARALARDA BİYOÇEŞİTLİLİK VE ANTİBİYOTİK DİRENÇLİLİĞİ

CHAPTER

9

Fatma Seçil KOÇ¹,
Nermin SARIGÜL²

Mağaralar; yüzeyle bağlantısı bulunan, en az bir insanın girişine olanak sağlayacak genişlik ve yüksekliğe sahip olan yeraltı boşlukları olarak tanımlanmaktadır (Northup ve Lavoie, 2001; Ozansoy ve Mengi 2006). Mağara habitatları insanlar ve hayvanlar tarafından çok uzun bir süre kullanılmıştır. Arkeolojik çalışmalar Paleolitik dönemde bile mağara kullanımının kanıtlarını göstermektedir. İnsanların mağaraları kullanma nedenleri arasında barınak, depolama, minerallerin kaynakları, sanatsal ifade yerleri ve kültürel, gömü ve/veya tören alanları gibi farklı kullanım amaçları bulunmaktadır. Günümüzde ise mağaraların insanlar tarafından kullanımı, çoğunlukla rekreasyon ve bilimsel keşifle sınırlıdır.

Mağaralar jeokimyasal özellikleri bakımından tek tip ortamlar değildir (Hoyos vd. 1998). Erozyonel mağaralar dalgaların vurması gibi mekanik etkiler ile gelişmiştir. Çözülme mağaraları erozyon mağaralarının zaman içerisinde değişime uğramasıyla oluşmaktadır. Volkanik mağaralar ve lav tüplerinin oluşumu ise çözülme mağaralarından farklıdır, bu tip mağaralar akan lavı çevreleyen soğutucu kabuktan meydana gelmiştir. Karstik mağaraların karakteristik özelliğikireçtaşı, dolomit, jips gibi çözünür kayalarla gelişmiş olmasıdır.

¹ Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü,
Burdur

² Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi,
Burdur



(Ford ve Williams, 2007) Karstik alanlar mikroorganizmalar için uzun vadeli bir rezervuar olarak hizmet etmektedir.

Mağaralar çeşitli jeolojik süreçler ile oluşmalarına rağmen 3 temel mekanizma vardır:

Karbonik asit ile çözünme: su, atıklardan ve topraktan geçerken biyogenik CO_2 'i absorblar ve seyreltik karbonik asit oluşur. Asitleşme suyun geçtiği yerlerdeki mikrobiyal aktivite ile de gerçekleşebilir. Eğer bu zayıf asit kireçtaşı (CaCO_3) ile temas ederse, kalsiyum karbonat çözünür. Çözünmenin devamı bir girinti ve mağara oluşumuna neden olur. Mağaranın dış kısmının açık hava ile temas etmesi içerdeki yoğun karbondioksitin dışarı salınmasına ve sarkıt ve diktler gibi ikincil karbonat oluşumlarına neden olmaktadır.

Sülfürik asit kaynaklı mağara oluşumu: hidrojen sülfid gazı su ile temas ettiğinde sülfürik asite oksitlenir ve bu da kireçtaşının çözünmesine neden olur. Mikroorganizmalar tarafından biyogenik sülfürik asit üretimi de aynı şekilde mağara oluşumuna neden olmaktadır.

Lav tüpü mağaraları: volkanik alanlarda aktif akan lav tarafından oluşturulur. Eriyik haldeki lav volkandan dışarı doğru akarken, lavın dış yüzeyi daha çabuk soğur ve altta akan lav için bir izolasyon oluşturur. Püskürme sona erdiğinde akışkan lav akmaya devam eder ve ardında boş tüp şeklinde bir kanal bırakır. Lav tüpü mağaralarının oluşumunda mikroorganizmaların etkinliği yoktur.

Oluşum şekillerine göre yapılan diğer bir sınıflandırmada mağaralar 4 gruba ayrılmaktadır.

Çözünme mağaraları: kireçtaşı ve dolomitten oluşan ana kayaç ile yeraltı sularının reaksiyona girmesi, bunun sonucunda erimesi ile oluşan en büyük ve en yaygın mağara tipleridir.

Erozyonal mağaralar: rüzgar ya da su akıntıları nedeni ile oluşmaktadır.



Lav mağaraları: volkanik aktiviteler sonucu oluşan lav tüpleridir.

Deniz mağaraları: denizdeki dalgaların kıyıya vurması sonucu, kıyıdaki büyük kayaların içinde oluşan mağaralardır.

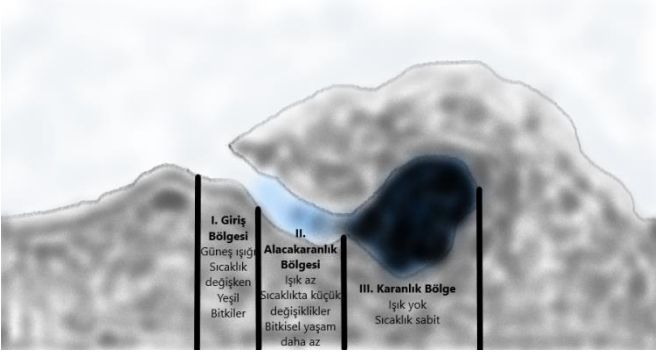
Ekstrem Çevreler Olarak Mağaralar

Ekosistemler karşılaştırıldığında bazı ortamların çeşitli fiziksel ve kimyasal faktörler açısından yaşam sınırlarını zorladığı bilinmektedir. Yer altı sistemlerine bakıldığında ve bir veya daha fazla sınırlayıcı faktöre sahip olan mağaralar, ekstrem ekosistemler olarak dikkat çekmektedir. Işık, sıcaklık, su/nem ve özellikle de besin maddelerinin kıtlığı birçok mağarada önemli sınırlayıcı faktörlerdendir. Mağara habitatını bu sınırlı faktörlere dayanıklı ve/veya adapte olmuş canlılar oluşturmaktadır (Sarbu vd. 1996; Yamaç, 2008; Barış, 2009). Besin maddelerinin kıtlığı birçok mağarada önemli sınırlayıcı faktörlerdendir (Sarbu vd. 1996). Kimyasal olarak kompleks yapıda sınırlı besin maddesinin mağara sistemine girmesine rağmen az sayıda mikrobiyal tür büyümeyi desteklemek için gerekli tüm alımları ve katabolik reaksiyonları kodlayabilmektedir. Buna ek olarak bu şartlarda yaşamak, biyofilm topluluklarında kaynak olarak rekabet yerine ortaklıklara bağlı olarak mümkün olmaktadır (Barton ve Jurado, 2007).

Mağaralarda ışık penetrasyonu ve yoğunluğuna bağlı olarak; (I) tam güneş ışığına maruz kalan ve günlük ışık döngüsünü deneyimleyen giriş bölgesi; (II) alacakaranlık bölgesi ve (III) ışığın girmediği karanlık bölge olmak üzere üç ana bölge bulunmaktadır (şekil 1). Bu doğal habitatlarda, ototrofik aktivite, enerji girişinin kaynağı olarak ışığın hala mevcut olduğu giriş bölgesinde gözlemlenebilmektedir. Işık azalınca ototrofik bir yaşam tarzı giderek daha az sıklaşır. Avcılar, oligotroflar ve yırtıcılar da dahil olmak üzere heterotroflar, mağaraların iç kesimlerinde bulunabilirler. Mağaralarda organik karbon, yaygın olarak çözünmüş organik karbon (DOC)



formunda bulunmaktadır. Yüzeydeki toprak kaynaklı ekosistemlerden kaynaklanan alloktan girişinin sonucu olarak DOC derinliğine ve yüzeye olan bağlantısına ve yakınlığına bağlı olacaktır (Barton ve Engel, 2015).



Şekil 1. Mağaralarda ışık maruziyetine bağlı olarak oluşan bölgeler

Mağaralardaki Mikrobiyal Biyoçeşitlilik

Arkealar, bakteriler, mayalar, mantarlar ve algleri içeren mikroorganizmalar grubu mağaralarda oldukça yaygındır (Saiz-Jimenez 2001; Schabereiter-Gurtner vd. 2002). Mikrobiyal toplulukların oluşumu ve yapısı; pH, besin maddelerinin durumu, ışık, oksijen, kükürt ve diğer metallerin bileşenleri, nem ve yüzey kolonizasyonuna dayanıklılık gibi çeşitli faktörlere bağlıdır.

Mağaralarda mikrobiyal aktivite ince kalsit tortuları ya da kayaç yüzeylerindeki değişimler olarak açıkça görülebilir. Bu özelliklerin saptanması mağarada mikrobiyal aktivitenin varlığına delil olarak gösterilebilir (Şekil 2. 3).

Yüzeylerdeki Noktalar: Abiyotik mineral tortular yüzeylerde nokta görünümüne neden olmaktadır. Genellikle şartlar uygun olduğunda mikroorganizmalar büyüyerek gözle görülecek büyüklükte koloniler oluşturur. Bu koloniler şekil olarak petri kutusundaki



kolonilere benzer ve her biri milyonlarca mikroorganizma içerir. Bu tip koloniler özellikle suların sızdığı alanlarda açıkça görülür.

Olağandışı Renklenme: Miroorganizmalar yüzeylerde büyüdüğünde yüzey alanının kimyasını değiştirebilirler ve kayalarda renk değişikliğine neden olurlar. Mağaralarda görülen kırmızı/ siyah kalıntılar bu durumun bilinen örnekleridir. Bu renk mekanizması bölgenin kimyası ve mikrobiyal aktiviteye göre bölgeden bölgeye değişebilmektedir.

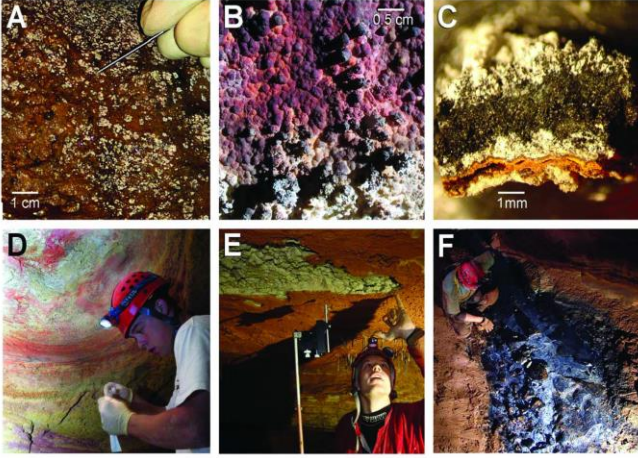
Çökeltiler: Mikroorganizmalar kimyasal gradientleri kullanarak enerji üretirler. Bu gradientler mikroorganizmaların çevresel koşullarını değiştirebilir ve minerallerin kimyasal özelliklerinde değişime yol açar. Demir ve mangan oksit gibi mineraller bu değişime neden olur ve çökelmelere yol açar. Bu mikrobiyal aracılı çöktürme sonucunda yüzeylerde mineral bantlı katmanlar oluşur.

Korozyon Artıkları: Kireçtaşı, dolomit ve minerallerle birlikte mikrobiyal etkileşimin sonucu olarak korozyon artıkları ortaya çıkmaktadır. Bu oluşumun mekanizması araştırmacılar tarafından henüz tam olarak açıklanmamıştır. Mikrobiyal metabolik aktivitenin kayalardaki çözünme ile ilgili olduğu varsayılmaktadır. Enerji oluşumunun ise sürekli mineral dönüşümü ve çökelmelerin neden olduğu kimyasal gradientlerden kaynaklandığı düşünülmektedir. Korozyon artıkları mağara ortamlarında jeomikrobiyal aktiviteyi sağlamakta ve besin yoksunluğu olan ortamlarda enerji oluşumunu sağlamada yararlı olmaktadır (Barton vd. 2005).

Yapısal Değişiklikler: Mikroorganizmalar kayalarla etkileşime girdiği zaman kayalarda kimyasal değişikliklere neden olabilirler. Bu değişiklikler; ince yapısal değişikliklerin sonucu olarak korozyon artıkları ile görülen parlak renk değişikliklerinden farklı olabilir. Bu oluşum mikrobiyal enerjinin ortaya çıkmasını sağlamaktadır.



Biyofilmler: Mağaralarda mikrobiyal aktivitenin en açık işaretlerinden biri biyofilmlerin varlığıdır. Bu tabakalar mikrobiyal komüniteleri içermektedir. Jel benzeri yapılarla birlikte yapışkan tampon, kaygan su altı tabaka ve kıl benzeri dallar gibi bazı yapıları da kapsamaktadır. Biyofilmler enerji girişi olan yerlerde sık görülmektedir ve mağara yaşamında enerji kaynaklarını destekleyen önemli bir kanıttır (Angert vd. 1998).



Şekil 2. 1: Mağaralarda Mikrobiyal Aktivite A) Noktalar-Kaya yüzeyindeki mikrobiyal kolonilerin hipodermik iğne ile örneklenmesi B) Renk- Kaya yüzeyinde renklenmeye neden olan mikrobiyal aktivite C) Çökeltiler- Kaya yüzeylerinde mikrobiyal aktivite ile oluşan bantlı mineralizasyon D) Korozyon Artıkları- Bir mağara tavanında oluşmuş parlak renkli korozyon kalıntısı E) Yapısal Değişiklikler- Yumuşak mağara tavanlarındaki kimyasal gradientlerin incelenmesi F) Biyofilmler- Mağara akarsularında görülen beyaz biyofilm kaplamaları (Barton, 2006)

Bakteriyel Biyoçeşitlilik

Bu güne kadar mağaralarda mikrobiyalekoloji üzerine yapılan birçok çalışmada bakteriyel çeşitlilik vurgulanmıştır. Bu çalışmalar ağırlıklı olarak mağaranın



duvarlarında ve tavanlarında, sudaki sedimentlerde ve speleoterm yüzeylerinde bulunan çökeltilere odaklanmıştır. Mikrobiyal kültürlerle dayanan mağaralarda yapılan çalışmalar öncelikle *Proteobacteria*, *Actinobacteria* ve *Firmicutes* gruplarının baskın olduğunu göstermiştir (Barton vd. 2015). Lee vd. (2012) tarafından mağaradaki mikroorganizmaların 16S rRNAfilogenetik analizi ortaya konmuştur. Bu sonuçlara dayanarak *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* ve *Chloroflexien* yaygın bakteriyel sınıflar olarak tanımlanmıştır. Bununla birlikte, bu sonuçlar her mağaranın özelliklerine göre değişebilmektedir. *Gammaproteobacteria* ve *Acidobacteria* ABD'de Wind Mağarasında baskın iken, *Gammaproteobacteria* ve *Epsilonproteobacteria* sulfidik mağara biyofilminde baskındır (Chelius ve Moore, 2004, Engel, 2010). Zhou vd. (2007); Avustralya, Çin, İspanya ve ABD'deki mağaraları karşılaştırmış ve *Proteobacteria*'nın İspanya ve Çin mağaralarında baskın grup olduğunu ve *Acidobacteria* 'nın ikinci baskın grup olduğunu bildirmiştir. Ferromanganez çökeltileri mezofilik *Crenarchaeota* ve *Euryarchaeota*'yı kapsayan bazı arkea gruplarını içermektedir ve bu arkea grubunun farklı çalışmalarda kaydedildiği bildirilmiştir (Northup vd. 2003). Farklı ülkelerdeki turistik mağaralarda yer alan mantarların jeomikrobiyolojisi üzerine yapılan çalışmalar, *Ascomycota*'nın hem kültüre bağımlı hem de kültürden bağımsız çalışmalarda baskın bir grup olduğunu göstermiştir (Docampo vd. 2010).

Günümüze kadar tamamlanan çalışmaların çoğu bakteri çeşitliliğini aydınlatmak için kültüre dayalı veya metagenomik yaklaşımlar uygulamıştır. Örneğin, 2014'te Vlikonja ve diğerleri tarafından Sloven karstik bir mağarada kültüre dayalı bir çalışma yapılmıştır (Barton ve Jurado, 2007). Mikrobiyalizolatların 16S rRNA gen profillemesini kullanarak incelenen 80 bakteri izolatının çoğunluğunun *Streptomyces*(% 25), *Micrococcus*(% 16) ve *Rhodococcus* (% 10) ' tan oluştuğu tespit edilmiştir. Diğer kültüre edilebilir bakteriler *Microbacter*, *Agrococcus*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Kocuria*, *Oerskovia*,



Bacillus, *Okskovia* ve *Oroskovia* olmak üzere *Pseudomonas* (% 9), *Agrobacterium* (% 8), *Lysobacter* (% 6) ve *Paenibacillus*, *Sphingomonas*, *Aerococcus* ve *Bosea* düşük oranda tespit edilmiştir.

Bir başka çalışmada, İspanya, Çek Cumhuriyeti ve Slovenya'da bulunan üç karstik mağaradaki mikrobiyal topluluklar analiz edilmiştir. Bu üç mağaradan elde edilen metagenomik DNA'dan 424 adet 16S rRNA gen klonu hazırlanmıştır. İstatistiksel analizde *Pseudonocardinae* (30–50%), c-Proteobacterial Chromatiales (6–25%) ve *Xanthomonadales* (0.5–2.0%) varlığı saptanmıştır. Sekansların% 7'si üç örnekleme alanında ortak, kalan % 35'i alana özgüdür. Bu bulgular, benzer phylotiplere ait mikrobik toplulukları barındıran farklı kireç taşı mağaralarında yapılan daha önceki çalışmaların sonuçlarına benzemektedir (Castainer vd. 1999).

Kartchner mağaralarında, 10 mağara üzerine inceleme yapılmıştır ve sonuç olarak *Actinobacteria*, *Proteobacteria* ve *Acidobacteria* olmak üzere 3 farklı taksonomik profil ortaya çıkarılmıştır.

İlginçtir ki, yapılan çalışmalarda daha düşük çeşitlilikte mikrobik toplulukları sergileyen örnekleme noktaları *Actinobacteria* tarafından baskın iken, daha çeşitli topluluklarda Proteobakteriler egemen olduğu görülmektedir. Ayrıca, Kartchner Mağaralarındaki örneklerin 16S klon kütüphanesi profillemesi, bakteriyel popülasyona hakim olan *Actinobacteria*'yı ortaya çıkarmıştır; bunların% 99'u kemoototrof ve oligotroflardır (Ortiz ve diğ. 2013;Wu ve diğ. 2015).

Benzer şekilde, Çin 'deki Jinjia Mağaralarının Kaya duvarı tortularında, su sedimentlerinde ve bataklık topraklarında bakteri varlığının incelenmesi hem *Proteobacteria* hem de *Actinobacteria* varlığını ortaya koymuştur (Wu vd. 2015). Bu iki çalışma (Kartchner ve Jinjia mağaraları) farklı coğrafi bölgelerde olmasına rağmen (Doğu Kuzey Amerika ve Doğu Asya) mikrobiyal toplulukların benzer olduğunu ortaya çıkarmıştır. Riquelme vd. 2015 volkanik mağaralarda (Azores,



Portekiz, Hawaii ve New Mexico, ABD'deki iki adadan) yaptıkları çalışmalarda volkanik mağaraların bilinmeyen *Actinobacteria*'lar için zengin bir rezervuar olduğunu ortaya çıkarmıştır (Riquelme vd. 2015).

Erzurum'da Elmalı ve Yıldızkaya Mağara Sistemlerinde damlataş oluşumuna katkıda bulunan bakterilerin karakterizasyon ve tanımlaması yapılmıştır (Barış, 2009). Yücel ve Yamaç (2010), 19 farklı mağaradan izole edilen *Streptomyces* spp.'nin antimikrobiyal aktivitelerini araştırmışlardır. İn vitro olarak Düzkır Mağarası'ndan (Aladağlar) izole edilen bakteriyel örneklerin antimikrobiyal aktivitelerini, statin-üretme kabiliyetlerini ve sitotoksik etkilerini araştırılmış, farelerde in vitro ve in vivo olarak test edilmiştir (Şen vd. 2011).

Arkea Biyoçeşitliliği

Arkea üyelerinin mağaraların kronik enerji stresine iyi adapte oldukları ve besin döngüsüne katkıda bulunarak besin değeri düşük mağara ekosistemlerinde önemli rol oynadığı düşünülmektedir. Arkealar çok uzun süre yalnız ekstrem koşullara atfedilmiştir (Woese vd. 1990). Bununla birlikte, yapılan çalışmalar mağaralarda ve diğer ekosistemlerde ve çeşitli toprak numunelerinde Arkea varlığını ortaya koymuştur (DeLong, 1998). Bu grupta belirlenen mikroorganizmalar aerobik, fakültatif veya tamamen anaerobik, kemotitrofik, kemoheterotrofik, asidofilik, termofilik veya halofilik olabilir. Bu organizmaların çoğu kükürtümetabolize edilmektedir (Cavicchioli vd. 2011).

Bu özelliklerden dolayı, arkealar küresel karbon ve azot döngülerinde önemli bir rol oynamaktadır. Bugüne kadar *Crenarchaeota* ve *Euryarchaeota*, arkealar içindeki en önemli gruplardır.

Mağara sistemlerinde Arkeaların bulunuşu hakkında çok az bilgi vardır. Sıklıkla tespit edilen arkealar *Crenarchaeota* ve *Euryarchaeota*'ya aittir. Mobile Mağarası'ndan (Chen vd. 2009) ve Wind Mağarası sedimentlerinden Chelius'un 16S rRNA gen



kütüphanesinde, arkeal 16S rRNA dizileri bulunmuştur. Frassassi mağara sistemine ait düşük pH içeren (pH 0-1, Grotta del Fiume) başka bir mağarada bir grup Archaea tanımlanmıştır ve snottitler içerisinde tanımlanan mikroorganizmaların% 40'ını oluşturduğu tespit edilmiştir (Macalady vd. 2007). Bu mağarada *Crenarchaeota*'dan herhangi bir temsilci bulunamamıştır ve popülasyonda ağırlıklı olarak azaltılmış sülfür bileşiklerini oksitleyebilen *Ferroplasma* cinsinin hakim olduğu görülmüştür (Tyson vd. 2004). Asidik ortamlarda yapılan çalışmalar pH ve *Ferroplasma*'nın egemenliği arasında bir korelasyon olduğunu göstermiştir (Golyshina ve Timmis 2005). Buna ek olarak, Yellowstone'daki asidik sular ve sıcak su akıntılarında arkealar belirlenmiştir. Son yıllarda Altamira Mağarası'nda, yeni bir psikrofilik *Crenarchaeota* üyesi saptanmıştır. Lechuguilla Mağarası'nda mezofilik *Crenarchaeota* ve *Euryarchaeota* tanımlanmıştır (Northup vd. 2003).

Fungal Biyoçeşitlilik

Mağara ortamlarında mantarlar çoğunlukla kayalardan, mağaranın sedimentlerinden, yarası guanosundan, mağara yüzeylerinden ve havadan izole edilmektedir. Çalışmaların çoğunda, kanıtlar Ascomycota'nın diğer şubelerden daha fazla tespit edildiğini ortaya koymaktadır. Çoğu mağara örneğinde *Penicillium*, *Aspergillus*, *Botrytis*, *Cladosporium* ve *Fusarium* cinslerinin hakim olduğu bilinmektedir (Man vd. 2005; Nováková, 2009). Son zamanlarda incelenen Kuzey Amerika mağaralarının çoğunda *Pseudogymnoascus destructans* türü tespit edilmiştir. Bu mantarın, White Nose Sendromu olarak adlandırılan ölümcül yarası enfeksiyonunun etken ajanı olduğu bilinmektedir. Mağara ortamlarında tespit edilen mantar taksonlarının çoğu saprofitlerdir; çoğunun karst yüzeyinde yaşadığı ve bozulan organik maddeleri kolonize ederek oligotrofik mağara mantarlarının büyümesini engellediği bilinmektedir (Northup ve Lavoie, 2015).



Biyofilm Çeşitliliği

Biyofilmlerin oluşumu, mikrobiyal toplulukların mağaralarda karşılaşılan ekstrem çevre stresi ile baş etme yollarından biridir. Jones vd. 2012'de İtalya'daki sülfid bakımından zengin Frasassi mağara sisteminin duvarlarından "snotit" olarak adlandırılan oldukça asitli (pH 0-1) biyofilmlerin yapısını ve işlevselliğini araştırmıştır. Snottitlerden alınan örneklerin 16S rRNAklon kütüphaneleri oluşturulmuştur; sonuçlara göre *Acidithiobacillusthiooxidans*'ın dominant (>% 70) grup olduğu, bunu *Thermoplasmatales* (>% 15) ve *Acidimicrobiaceae* (>% 5) takip ettiği belirlenmiştir.

Çeşitli çalışmalarda mağara tipi, mineral çeşitliliği ve mikrobiyal çeşitlilik ilişkileri incelenmiştir ve bu mikrobiyal toplulukların mağara çökeltilerinin oluşumunda rol oynayabileceğini ileri sürmüştür. Örneğin, Kuzey İsveç'te yer alan Tjuj-Ant Mağarası iki tür mağara çökeltilisi barındırmaktadır: (1) kangaloid, (patlamış mısır yapıları) ve (2) flowstone (ince yapılar). İnce yapılar Actinobacteria benzeri biyofilmler ve mantar toplulukları olmak üzere iki tip mikrobiyal topluluk barındırmaktadır (Sallstedt ve diğ. 2014). Meksika Villa Buz Mağarası'nda biyofilm oluşumuna rastlanmıştır (Şekil 2. 4). Bu mikrobiyal topluluklar mağara oluşumlarında önemli bir rol oynamaktadır ve bu nedenle mikroorganizma-mineral etkileşimlerindeki farklılıkları incelemek için bir model sunmaktadır (Lavoie vd. 2007).



Şekil 2. 2. Meksika Villa Luz Mağarasında biyofilm oluşumu (Lavoie vd. 2007)

Mağaralardaki Patojenik Mikroorganizmalar

Çeşitli mağaralarda bulunan ve izole edilen patojenler (*Aurantimonas*, *Legionella*, *Staphylococcus*, *Inquilinus*, *Afipia*, vb.) özellikle insanlar için risk oluşturmaktadır. Bununla birlikte, bu mikroorganizmaların virülans seviyeleri, aynı türlerin suşları içinde farklılık göstermektedir. Bu, türün izole edildiği ekolojik nişin özellikleri ile ilişkili olabilir ve mikroorganizmaya farklı patojenite faktörlerini kazandırabilir veya geliştirebilir.

Mağaralarda patojenlerin bulunup bulunmadığının yanı sıra, patojenlerin kültür temelli yöntemleri kullanarak ve kantitatif PCR ile ölçebilmek önemlidir. Öte yandan, mağaralarda izole edilen patojen suşların bulaşıcı kapasitesi hakkında bilgi edinmek, virülans kapasitelerini direk PCR yöntemleri ile virülans genlerini işaretleyiciler olarak incelemek ve diğer konak etkileşim testleri ile incelemek yerinde olacaktır. Mağaralarda



insan varlığına bağlı olarak, insandan mağaraya, birçok farklı patojenik seviyeye sahip yeni bakteri hatlarının gelişmesine yol açabilecek bir bakteri geçişinde yüksek bir risk vardır. Bu fenomen, Lavoie ve Northup (2006) tarafından önerilen insan indikatör bakterilerinin ölçülmesi ile değerlendirilebilir. Öte yandan, suşlar değiştirildikten sonra (insandan mağaraya veya tam tersine) adaptif faktörler; transkriptom ve karşılaştırmalı genomik çalışmalarla tanınabilir.

Sık ziyaret edilen veya hayvanların bulunduğu mağaralar patojenik mikroorganizmaların rezervuarlarıdır. Son yıllarda, mağaralarda yaşayan bazı bakteri, mantar ve virüslerin insanlarda ve hayvanlarda patojen olduğu bildirilmiştir. Özellikle tropikal bölgelerde bu tehlike daha fazladır. Belirli bir enfeksiyonu tek bir ziyaretle ilişkilendirmek zor olsa da, birçok tıbbi rapor, Afrika'daki mağaralarda yapılan ziyaretlerin ve madencilik faaliyetlerinin hastalık ve ölümcül kayıplar ile sonuçlandığını göstermektedir. Mağara mikroorganizmaları tarafından üretilen en sık görülen hastalıkların solunum sisteminde bulunduğu bilinmektedir (Candiroglu ve Gungor, 2017)

Yeni Antibiyotik Kaynağı Olarak Mağaralar

Antimikrobiyal ajanlar mikroorganizmaları öldüren ya da onların büyümesini engelleyen kimyasal maddelerdir (Cushnie ve Lamb, 2005). Bu terim antibakteriyel, antifungal, antiparaziter ve antiviral bileşenleri kapsamaktadır (Kujumgiev vd. 1999). Çoğu modern antibiyotik 1945 ve 1960 yılları arasında “Antibiyotik Keşfinin Altın Çağı” olarak bilinen dönemde keşfedilmiştir. Gram pozitif ve negatifleri içeren çeşitli patojenlere karşı etkili antibiyotiklerin çoğu bu dönemde tanımlanmıştır (Spector vd. 2012).

Mağaralar doğadaki eşsiz, keşfedilmemiş ve hakkında az çalışma mevcut olan ortamlardır (Cheeptham, 2013; Gabriel ve Northup, 2013). Bu ortamlar, son derece özelleşmiş mikroorganizmaların yaşayabildiği ve yeni biyoaktif bileşikler üretebilme potansiyeli taşıyan yeni



mikroorganizmaların keşfi için cazip yerler haline gelmiştir. Yeni biyoaktif türlerin taranması, yeni prokaryotik türlerin eşsiz biyoaktif bileşikler içerebileceği hipotezine dayanmaktadır. Bu olgu taksonomik çeşitliliğin kimyasal çeşitlilik ile ilişkili olduğu anlamına gelmektedir (Goodfellow ve Fiedler, 2010). Tablo 2. 1' de çeşitli mağaralardan izole edilen ve tanılanan potansiyel antibiyotik üreticileri gösterilmiştir (Gabriel ve Northup, 2013). Lee vd. (2000) tarafından Kore' de yapılan çalışmada toplanan toprak örneklerinde *Saccharothrix* ve *Saccharothrixviolacea* cinsine ait yeni türler keşfetmiştir. Lee (2006), Kore'deki doğal bir mağarada bakterilerin biyoçeşitliliği üzerine araştırma yapmış ve yeni bir aktinomiset olan *Nocardiajejuensis* sp.'i keşfetmiştir. Cheng vd. (2013) Çin' deki antik bir mağaradan *Microlunatuscaverna* sp.'i keşfetmiştir. Margesin vd. (2004) bir alp buz mağarasında *Arthrobacter* cinsine ait yeni türler kaydetmiştir. Bu mikroorganizmalar çok çeşitli mağaralarda dağılım göstermektedir.

Aktinomisetler, sekondermetabolit üretiminde en çok kullanılan bakterileri içermektedir. Volkanik bir mağaradan izole edilen *Streptomyces* cinsinin yüksek oranda sekondermetabolitlere sahip olduğu bildirilmiştir (Kay vd. 2013; Cheeptham, 2013).



Tablo 2. 1. Bazı mağaralardan izole edilen antibiyotik üretme potansiyeline sahip mikroorganizmalar (Cheeptam, 2013)

Mağara Lokasyonu	Bulunan Mikroorganizmalar
Altamira ve TitoBustillo mağarası, Kuzey İspanya	<i>Streptomycessp.</i> , <i>Nocardiasp.</i> , <i>Rhodococcus</i> , <i>Nocardioides</i> ve <i>Amycolatopsis</i> .
Cesspool mağarası, Virginia, Amerika Birleşik Devletleri	<i>Thiothrix</i> , <i>Helicobacter</i> , <i>Thiovulum</i>
Basalticseacaves, Kauai Hawaii, Amerika Birleşik Devletleri	Bacteria ve Cyanobacteriasuşları
Japonya'daki çeşitli mağaralar (20 kireç taşı mağarası ve volkanik mağara)	<i>Trichosporontürleri</i> , <i>Candidapalmioleophila</i> , <i>Clusitaniae</i> , <i>Debaryomyceshanseni</i> ve <i>Hanseniasporasp.</i>
Portekiz, Hawaii ve NewMexico'daki lav mağaraları	<i>Bacteroidetes</i> , <i>Chloroflexi</i> , <i>Nitrospirae</i> ve <i>Verrucomicrobia</i>
Buracos mağarası, Terceira adası, Portekiz	Genellikle <i>Proteobacteria</i> ve <i>Actinobacteria</i> ; <i>Gallionellasp.</i> and <i>Leptothrixsp.</i> SEM ile gözlenmiştir fakat diğer teknikler ile belirlenememiştir.

Antibiyotik Direnç Gen Rezervuarları Olarak Mağaralar

Direnç; bakterilerin antimikrobiyal bir ajanın öldürme ya da üremeyi durdurma etkisine karşı koyabilmesidir (Tenover ve Hugles, 1996). Direnç antibiyotiğin kendisi ve direnç genleri olmak üzere iki faktörün sonucu olarak gelişmektedir. Antibiyotik direnci, hedef değişikliği, ilaç alımı ve atılımının kontrolü ve yüksek oranda verimli enzim aracılı inaktivasyondahil olmak üzere birçok farklı mekanizma ile kendini göstermektedir (Tablo 2.2). Direnç, hedef genlerdeki bazı mutasyonlarda nispeten hızlı bir şekilde ortaya



çıkabilir ve antibiyotiklerin bu tür mutasyonları desteklediğine dair kanıtlar vardır. Bununla birlikte, çoğu antibiyotiğe karşı direnç, son derece etkili enzimlerin aracılığıyla gerçekleşir. Bu unsurlar doğal seleksiyon yoluyla evrimin sonucudur. Bu nedenle, antibiyotik direncinin uzun bir evrimsel geçmişe sahip olduğu ortaya çıktığı düşünülmektedir (Yücel ve Yamaç, 2010; Cheeptham vd. 2013; Rajput vd. 2012; Stankovic vd. 2012).

Tablo 2. 2. Antibiyotik ana sınıflarının hedefleri, direnç mekanizmaları ve etki biçimleri (Walsh, 2000)

Antibiyotik	Hedef	Etki biçimi	Direnç Mekanizması
Hücre duvarını etkileyenler			
β -laktamlar	Transpeptidazlar/ Transglikozilazlar	Peptidoglikan tabakasındaki çapraz bağ oluşumunu engeller	β -laktamazlar, penisilin bağlayıcı protein mutantları
Vankomisin	Peptidoglikan ve lipid II' nin D-Ala-D-Ala ucu	peptidoglikan tabasının oluşumunda gerekli olan substratları uzaklaştırarak bağlanmasını engeller	Lipid II ucundaki D-Ala ucunda değişiklik
Protein Sentezi			
Eritromisin sınıfındaki makrolidler	Peptidiltransferaz, ribozomun merkezi	Protein sentezi engellenir	Ribozomal RNA' yı metiller, antibiyotiğin hücre dışına atılması
Tetrasiklinler	Peptidiltransferaz	Protein sentezi engellenir	Antibiyotiğin hücre dışına atılması
Aminoglikozitler	Peptidiltransferaz	Protein sentezi engellenir	Antibiyotiğin enzimleri ile modifiye edilmesi
Oksazolidinonlar	Peptidiltransferaz	Protein sentezi engellenir	Etki şekli belirlenmemiştir
DNA replikasyonu/tamiri			
Florokinonlar	DNA giraz	DNA replikasyonu engellenir	DNA giraz enziminde yapısal değişiklik

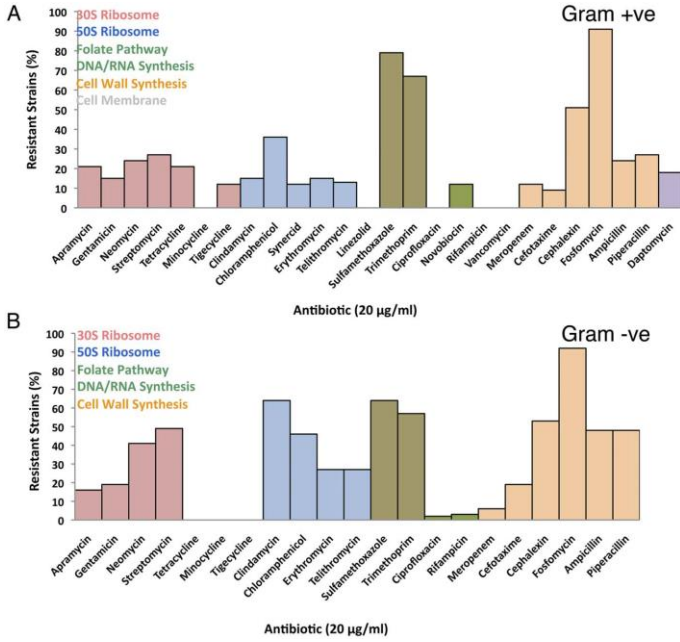


Çok sayıda yeni araştırma, direnç genlerinin sıklıkla antibiyotik kullanımının artışından kaynaklandığını belirtmektedir (Levy, 2002; Davies, 2010; Bhullar, 2011). Bununla birlikte, diğer çalışmalar, insanların tedavi amacıyla antibiyotik kullanımından önce de bazı dirençli genlerin var olduğunu ileri sürmektedir (White 2013). Hollanda'da antibiyotik öncesi ve sonrası dönemlerini (1940–2008) kapsayan toprak örnekleri üzerine yapılan bir araştırmada, antibiyotik öncesi dönem örneklerine kıyasla günümüze ait toprak örneklerinde majör antibiyotik aileleri (β -laktamlar, tetrasiklinler ve makrolidler) için antibiyotik direnç genleri taşıdığı gözlenmiştir (Knapp vd. 2010). Bu kanıt, yaygın direncin, antibiyotiklerin insan kullanımına bağlı olduğu hipotezi ile tutarlıdır.

Bilim adamları, farklı çevrelerden izole edilen bakterilerin direnç gen kaynaklarını tanımlamak için fonksiyonel çalışmalar gerçekleştirmişlerdir (White, 2013; Bhullar, 2011). Forsberg ve ark., 2012' de doğal ortamları, genlerin toprak bakterileri ve klinik patojenler arasında aktarılmasını sağlayan antibiyotik dirençli genlerin rezervuarları olarak tanımlamıştır (Forsberg vd. 2012). 2011'de Bhullar, Meksika'da bulunan Lechuguilla mağarasından izole edilen mikroorganizmalar üzerine araştırma yapmıştır. Bu tamamen izole edilmiş olan mağarada yaşayan mikroorganizmaların 4-6 milyon yıl yüzey suyu ile etkileşime girmesi muhtemel olmamakla birlikte günümüzde dahi bu mağaraya insan erişimi son derece sınırlıdır. Araştırma sonuçları mağara bakterilerinin doğal ortamlarında karşılaşma ihtimali olmayan, piyasada bulunan çeşitli antibiyotiklere karşı oldukça dirençli olduğunu göstermiştir (Şekil 2. 6). Evrim ve direnç yaygınlığını incelemadaki zorluklardan biri, antropojenik antibiyotiklerden etkilenmeyen antibiyotiğe maruz kalmamış doğal ortamları bulmadaki zorluktur. Bu tür ortamlardaki antibiyotik direnç çalışmaları, direnç gen prevalansı ve evrimin anlaşılması için gerekli olan direnç genetik çeşitliliğinin kritik bir ölçüsünü sağlamaktadır ve çeşitli araştırmacılar tarafından antibiyotik direncinin antik mikrobiyal genler



tarafından kodlanan doğal bir süreç olduğu ileri sürülmektedir (Hughes ve Datta, 1983; Barlow ve Hall, 2002; Bhullar, 2011).



Şekil 2. 3. Lechuguilla Mağarasından İzole Edilen Bakterilerin Çeşitli Antibiyotiklere Karşı 20 mg/ml Konsantrasyonda Direnç Seviyeleri (üstte) Gram pozitif suşlar (altta) Gram negatif suşlar. Antibiyotikler, her bir rengin farklı bir hedefi temsil ettiği etki/ hedef tarzlarına göre gruplandırılmıştır (Bhullar, 2011).

Kaynaklar

1. Angert, E., Northup, D., Reysenbach, A., Peek, A., Goebel, B., & Pace, N., 1998. Molecular phylogenetic analysis of a bacterial community in Sulphur River, Parker Cave. *Amerikan Mineralogist*, 83, 1583-1592.
2. Barış, Ö., 2009. Erzurum ilindeki mağaralarda damlataşı oluşumunda etkili bakterilerin izolasyonu, karakterizasyonu ve tanısı. Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Erzurum 135.



3. Barlow, H., Hall, B., 2002. Phylogenetic analysis shows that the OXA beta-lactamase genes have been on plasmids for millions of years, *Journal of Molecular Evolution*, 55 , 314-21.
4. Barton, H., Jurado, V., 2007. Whats Up Down There? Microbial Diversity in Caves. 132-138.
5. Barton, H., Luiszer, F., 2005. Microbial metabolic structure in a sulfidic cave hot spring: Potential mechanisms of biospeleogenesis. *Journal of Cave and Karst Studies*, 67, 28-38.
6. Bhullar, K., 2011. Investigation of Antibiotic Resistance in Isolated Lechuguilla, M. Sc. Thesis McMaster University, Department of Biochemistry.
7. Candiroglu B, Dogruoz Gungur N. Cave Ecosystems: Microbiological View. *Eur J Biol* 2017; 76(1): 36-42.
8. Castainer, S., Le Metayer-Levrel, G., Perthuisot, J., 1999. Ca-carbonates precipitation and limestone genesis-the microbiogeologist point of view, *Sedimentary Geology*, 126, 9-23.
9. Cavicchioli, R., Charlton, T., Ertan, H., Mohd Omar, S., Siddigui, K., Williams, T., 2011. Biotechnological uses of enzymes from psychrophiles, *Microbial Biotechnology*, 4, 449-60.
10. Cheeptam, N., Sadoway, T., Rule, D., Watson, K., Moote, P., Soliman, L., 2013. Cure from the cave: volcanic cave actinomycetes and their potential in drug discovery, *International Journal of Speleology*, 35-47.
11. Chelius, M.K., Moore J.C., 2004. Molecular phylogenetic analysis of archaea and bacteria in Wind Cave, South Dakota. *Geomicrobiology Journal*. 21, 123-34.
12. Chen Y, Wu L, Boden R, Hillebrand A, Kumaresan D, Moussard H, et al. Life without light: microbial diversity and evidence of sulfur and ammonium-based chemolithotrophy in Movile Cave. *ISME J* 2009; 3(9): 1093-104.
13. Cushnie, T., Lamb, A., 2006. Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 27, 181.
14. Davies, J., Davies, D. 2010. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol Mol Biol Rev.* , 74 (3), 417-33.
15. DeLong, E., 1999. Everything in moderation: Archaea as 'non-extremophiles, *Current Opinion in Genetics & Development*, 8, 649-654.



16. Docampo, S., Trigo, M., Recio, M., Melgar, M., Garcia-Sanchez, J., Calderon-Ezquerro, M., 2010. High incidence of *Aspergillus* and *Penicillium* spores in the atmosphere of the cave of Neija (Malaga, Southern Spain), *Aerobiologia* , 26, 89-98.
17. Engel, A.S., 2010. Microbial diversity of cave ecosystems. In: Barton, L.L., Mandl, M. and Loy, A. (eds) *Geomicrobiology: Molecular and Environmental Perspective*. Springer, the Netherlands, 219–238.
18. Ford, & Williams. (2007). Williams içinde, Karst Hydrogeology and Geomorphology (s. 562).
19. Forsberg. K.J., Reyes, A., Wang, B., Selleck, E.M., Sommer, M.O., Dantas, G., 2012. The shared antibiotic resistome of soil bacteria and human pathogens.
20. Gabriel, C., Northup, D., 2013. Microbial ecology: caves as an extreme. Cave Microbiomes: A Novel Resource for Drug Discovery, 85–108.
21. Goodfellow, M., Fiedler, H., 2010. A guide to successful bioprospecting: informed by actinobacterial systematic, *Antonie Van Leeuwenhoek*, 98, 119-142 .
22. Hoyos, Lascano., 1988. Nutritive value and preference for native forage species on the well drained savannas in the Eastern Llanos of Colombia, *Pasturas Tropicales*, 2-7.
23. Hughes, V., Datta, N., 1983. Conjugative plasmids in bacteria of the 'pre-antibiotic' era. *Nature*, 302, 725-726.
24. Kay, S., Cheeptham, N., 2013. Screening for antimicrobial activities of cave actinomycetes against honeybee pathogen, *Chiang Mai Journal of Science*, 40, 26-33.
25. Knapp, C., McCluskey, S., Singh, B., Campbell, C., Hudson, G., Graham, D., 2011. Antibiotic Resistance Gene Abundances Correlate with Metal and Geochemical Conditions in Archived Scottish Soils. *PLOS One*, 6, 11.
26. Kujumgiev, A., Serkedjieva, Y., Tsvetkova, I., Popov, S., 1999. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *Journal of Ethnopharmacology*, 64, 235-40.
27. Lavoie KH, Helf KL, Poulson TL. The biology and ecology of North American cave crickets. *Journal of Cave and Karst Studies*. 2007;69:114–134.



28. Lee, I., Liu, J., Lin, C., Oyama, K., Chen, C., Chen, C., 2012. Ionospheric plasma caves under the equatorial ionization anomaly, *Journal of Geophysical Research*, 117, 1-9.
29. Levy, S., 2002. Factors impacting on the problem of antibiotic resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 49, 25-30.
30. Macalady, J., Jones, D., Lyon, E., 2007. Extremely acidic, pendulous cave wall biofilms from the Frasassi cave system, Italy, *Environmental Microbiology*, 1402-1414.
31. Man, B., Wang, H., Xiang, X., Wang, R., Yun, Y., Gong, L., 2015. Phylogenetic diversity of culturable fungi in the Heshang Cave, Central China, *Frontal Microbiology*, 6, 1158.
32. Northup, D., Barns, S., Yu, L., Spilde, M., Schelble, R., Dano, K., 2003. Diverse microbial communities inhabiting ferromanganese deposits in Lechuguilla and Spider Caves, *Environmental microbiology*, 5, 1071- 1086.
33. Northup, D., Lavoie, K., 2001. Geomicrobiology of Caves: A Review, *Geomicrobiology Journal*, 18, 199-222.
34. Northup, D., Lavoie, K., 2001. Geomicrobiology of Caves: A Review, *Geomicrobiology Journal*, 18, 199-222.
35. Nováková, A., 2009. Microscopic fungi isolated from the Domica Cave system, Slovak Karst National Park, Slovakia, *International Journal of Speleology*, 38, 71-82.
36. Ortiz, M., Neilson, J.V., Nelson, W.M., Legatzki, A., Byrne, A., Yu, Y., Wing, R.A., Soderlund, C.A., Pryor, B.M., Pierson, L.S., Maier, R.M., 2013. Profiling bacterial diversity and taxonomic composition on speleothem surfaces in Kartchner Caverns, *Microbial Ecology*, 65, 371-383 p.
37. Ozansoy, C., Mengi, H., 2006. Mağarabilim ve Mağaracılık, Ankara: Tübitak Popüler Bilim Kitapları.
38. Rajput, Y., Biswas, J., & Rai, V. (2012). Potentiality test in antimicrobial activity and antibiotic sensitivity of subterranean *Streptomyces* strains isolated from Kotumsar Cave of India. *Int J Biol Chem* (6), 53-60.



39. Riquelme, C., Hathaway, J., Dapkevicius, M., Miller, A., Kooser, A., Northup, D., 2015. Actinobacterial diversity in volcanic caves and associated geomicrobiological interactions. *Frontiers Microbiology*, 6, 1342.
40. Saiz- Jimenez, C., Hermosin, B., 1999. Thermally assisted hydrolysis and methylation of dissolved organic matter in dripping water , *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 49, 337-347.
41. Sarbu, S., Kane, T., Kinkle, B., 1996. A Chemoautotrophically Based Cave Ecosystem. *Science*, 272, 1953-1955.
42. Schabereiter-Gurtner, C., Pinar, G., Saiz-Jimenez, C., Rölleke, S., 2002. Altamira cave Paleolithic paintings harbor partly unknown bacterial communities. *FEMS Microbiology Letters*, 211, 7-11.
43. Spector, W., Porter, J., Mello, G., 2012. Antibiotics Literary Licensing. *Handbook Of Toxicology*, 2.
44. Stankovic, N., Radulovic, V., Petkovic, M., Vuckovic, I., Jadranin, M., Vasiljevic, B., et al. (2012). *Streptomyces* sp. JS520 produces exceptionally high quantities of undecylprodigiosin with antibacterial, antioxidative, and UV-protective properties. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 96 (5), 1217-31.
45. Şen, M., Bayburt , C., Aydın ,S, Onder N.I., Incesu, Z., Atli, B., Yamac, M., 2011. Düz kır Mağarasından (Aladaglar) Elde Edilen Bakteri İzolatlarının Biyolojik Aktiviteleri, 5. Ulusal speleoloji sempozyumu, 18-21 Mart, İstanbul.
46. Tenover, F., Hugles, J., 1996. The challenges of emerging infectious diseases development and spread of multiply resistant bacterial pathogens, *The Journal of the American Medical Association*, 275, 300-304.
47. Tyson, G., Chapman, J., Hugenholtz, P., Allen, E., Ram, R., Richardson, P., 2004. Community structure and metabolism through reconstruction of microbial genomes from the environment, *Nature* , 37-43.
48. Walsh, C., 2000. Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. *Nature* (406), 775-781.
49. White, M., 2013. Living in a Bacterial World: Antibiotic-Resistant Bacteria Everywhere Pacific Standard. [online].
<http://www.psmag.com/science/living-bacterial-world-66260/>



50. Woese, C., Kandler, O., Wheelis, M., 1990, Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87, 4576-4579.
51. Wu, Y., Tan, L., Liu, W., Wang, B., Wang, J., Cai, Y., 2015. Profiling bacterial diversity in a limestone cave of the western Loess Plateau of China, *Frontiers Microbiology*, 6, 244.
52. Yamaç, M., 2008. Bir Mikrobiyoloğun Gözü ile Karstik Mağaralar. 4. Ulusal Speleoloji Sempozyumu. Ankara, 135-154.
53. Yücel, S., Yamaç, M., 2010. Selection of streptomyces isolates from Turkish karstic caves against antibiotic resistant microorganisms, *Journal of Pharmaceutical Sciences and Pharmacology*, 23, 1-6.
54. Zhou J. P., Gu Y.Q., Zou C. S., Mo M., 2007. Phylogenetic Diversity of Bacteria in an Earth-Cave in Guizhou Province, Southwest of China, *Journal of Microbiology*, 45, 10



CANOPY KÜMELEME ALGORİTMASI- WEKA UYGULAMASI

CHAPTER 10

Serpil SEVİMLİ DENİZ¹

Giriş

Veri madenciliğindeki temel konulardan biri de gözlem verilerindeki anlamlı yapıları keşfetmektir. Bu amaçla genel olarak kümeleme analizi gibi açıklayıcı veri analiz yöntemleri kullanılır (Prabhu ve Duraiswamy, 2013). Büyük veri kümelerini kümeleme ile ilgili birçok sorun olabilir. Veri kümesini büyük olarak tanımlayabileceğimiz üç farklı durum vardır: birincisi, veri kümesinde çok sayıda eleman bulunabilir, ikincisi, her elemanın birçok özelliği olabilir ve üçüncü olarak, keşfedilecek çok sayıda küme olabilir. Kümeleme; en genel tanımı ile dağınık bir veri kümesi içerisinde öznitelikleri birbirine benzeyen elemanların bir araya getirilerek gruplandırılması işlemi olarak tanımlanabilir (Han ve ark., 2012). Veri madenciliği alanında kümeleme önemli alanlardan biridir. Kümeleme işlemi sonucunda ortaya çıkan bir küme, kendi içerisinde benzer özniteliklere sahip elemanlar barındıran, ancak elemanları diğer kümelerin elemanlarının özniteliklerinden farklı olan bir grup olarak ifade edilebilir (Larose, 2005). Veri madenciliği birliktelik kuraları, kümeleme, sınıflandırma, regresyon işlevlerini yerine getiren denetimli öğrenme ve denetimsiz öğrenme algoritmalarını içerir. Denetimli öğrenme, girdileri istenen çıktılarına göre eşleyen bir fonksiyon



oluşturulur. Bir sınıflandırma probleminde, öğrenci bir fonksiyon haritasına yaklaşır; bir vektör, işlevin girdi çıktı örneklerine bakarak sınıflara ayrılır. Denetimli öğrenmenin, eğitim verisi olarak adlandırılan etiketli eğitim seti grubundan bir fonksiyonu çıkartan makine öğrenimi olduğunu söyleyebiliriz. Denetlenmeyen öğrenme, etiketlenmiş değerler olmayan vektörlerin eğitim seti ile ilgilenir. Bu durumda sorun, tipik olarak, eğitim setini bazı uygun yollarla alt kümelere ayırmaktır. Denetlenmeyen öğrenme yöntemleri, verileri anlamlı kategorilere ayırmakla ilgilidir. Denetimsiz öğrenim örneği kümeleme mekanizmasıdır. Kısacası, denetlenmeyen öğrenme algoritmalarının, etiketlenmemiş örneklerde, yani, istenen çıktılarının olduğu girişte çalıştığını söyleyebiliriz. Hiyerarşik kümelemede ihtiyaç duyulmasa da bölümleyici kümeleme algoritmalarında girdi olarak küme sayısı da kullanılmakta ve bu nedenle küme sayısının önceden bilinmesi gerekmektedir. Yapılan kümelemenin kalitesi önemli düzeyde bu girdi değerine bağımlı olmaktadır. Kümeleme kalitesi genellikle kümeleme sonrasında gerçekleştirilen küme geçerlilik ölçüleriyle belirlenmektedir. Bu durumda ise en uygun (optimal) kümeleme sonucuna ulaşmak için kullanılan algoritmaların ardı ardına çok sayıda çalıştırılması gerekmektedir (Krishnamoorthi, 2011).

Kümeleme algoritmaları 1990'lı yılların ortalarına kadar sadece hiyerarşik ve bölümleyici başlıkları altında sınıflandırılırken, artık bu sınıflandırma yetersiz kalmaktadır. Son yıllarda yoğunluk temelli, ızgara temelli, olasılık temelli, çizge temelli, alt uzay gibi başlıklar altında çeşitli kümeleme algoritmaları geliştirilmiştir ve geliştirilmeye devam etmektedir.

Hiyerarşik Temelli Küme Algoritmaları

Aynı zamanda bağlantı tabanlı kümeleme olarak da bilinen hiyerarşik küme algoritmaları, uzaklıklarına göre "kümeler" oluşturmak için "nesneleri" bağlar (Akpınar, 2014).



Tek bağlantı kümeleme
Tam bağlantı kümeleme
BIRCH
CURE
ROCK
CHAMELEON
Bu algoritmalara örnektir.

Bölümleyici Küme Analizi Algoritmaları

Merkez bazında kümelenmeler olarak da tanımlanır. Veri kümesi, merkezi bir vektör ile temsil edilir. Burada k küme merkezleri bulunur ve veriler kümeden alınan kare mesafeleri en aza indirecek şekilde en yakın küme merkezine atanır. Genellikle bölmeli temelli kümeleme algoritmaları 3 adımdan oluşur; başlatma, bölümleme ve düzeltme (Gionis ve ark., 2005).

k-means
k-medoids
PAM
CLARA
CLARANS
k-prototypes
k-modes
k-median
k-means++
Canopy
Bu algoritmalara örnektir.

Yoğunluk Temelli Küme Analizi Algoritmaları

Yoğunluğa dayalı kümelenmede kümeler, veri kümesinin geri kalanından daha yüksek yoğunluklu alanlar olarak tanımlanır.



DBSCAN

OPTICS

DENCLUE

Bu algoritmaların örneğidir.

Izgara Temelli Algoritmalar

Veri setini hücelere bölerek ızgaralı bir yapı oluşmasını sağlar ve kümeleme bu ızgaralı yapı üzerinde gerçekleşir (Wang, 2006). Bu algoritmaların temel odak noktası uzaysal veridir. Yani uzaydaki nesnelerin geometrik yapısı, ilişkileri, özellikleri ve işlemleri içeren veridir. Bu algoritmaların amacı birçok hücre içindeki veri setinin sayısını belirlemek ve bu hücelere ait nesnelerle çalışmaktır. Bu algoritma nesnelerin yerini değiştirmekten ziyade nesnelerin gruplarının birçok hiyerarşik düzeyini oluşturur. Bu bakımdan hiyerarşik algoritmalara benzer fakat ızgaraların ve dolayısıyla kümelerin birleştirilmesi bir uzaklık ölçüsüne bağlı değildir. Genellikle ızgaranın belirli bir hücrelerine düşen nesnelerin sayısına dayanan önceden tanımlı parametre tarafından karar verilir (Andritsos, 2004).

STING

CLIQUE

Alt Uzak Arama Algoritmaları

PROCLUS

SUBCLUE

Uzaklık ölçüleri

Kümeleme, benzer örnek veya nesnelerin gruplandırılması olduğundan, iki nesnenin benzer mi yoksa benzemez mi olduğunu belirleyen bir çeşit ölçü gereklidir. Bu ilişkiyi tahmin etmek için kullanılan iki temel önlem türü vardır: mesafe ölçümleri ve benzerlik ölçüleri.



Birçok kümeleme metodu, herhangi bir nesne çifti arasındaki benzerliği veya farklılığı belirlemek için mesafe ölçümleri kullanır. İki örnek arasındaki mesafeyi belirtmek için $d(x_i, x_j)$ kullanılır. Veriler arasındaki benzerliği hesaplamak için:

- a. Öklid mesafesi
- b. Manhattan uzaklığı
- c. Minkowski mesafesi

kullanılabilir.

Öklid mesafesi;

$$d(i, j) = \sqrt{(x_{i1} - x_{j1})^2 + (x_{i2} - x_{j2})^2 + \dots + (x_{in} - x_{jn})^2} \quad (1)$$

Burada $i = (x_{i1}, x_{i2}, \dots, x_{in})$ ve $j = (x_{j1}, x_{j2}, \dots, x_{jn})$ n boyutlu veri setleridir.

Manhattan mesafesi;

$$d(i, j) = |(x_{i1} - x_{j1})| + |(x_{i2} - x_{j2})| + \dots + |(x_{in} - x_{jn})| \quad (2)$$

Burada $i = (x_{i1}, x_{i2}, \dots, x_{in})$ ve $j = (x_{j1}, x_{j2}, \dots, x_{jn})$ n boyutlu veri setleridir.

Minkowski mesafesi;

$$d(i, j) = \sqrt[\lambda]{\sum_{k=1}^n |x_{ik} - x_{jk}|^\lambda} \quad (3)$$

METOD

K-Means Kümeleme

K-Means, en fazla bilinen kümeleme problemini çözen en basit ve en iyi denetlenmeyen öğrenme algoritmasıdır. Büyük veri kümelerinin kümeleneğinde etkilidir. Bu kümeleme algoritması MacQueen tarafından geliştirilmiştir. K-Means, belirli bir veri kümesi için k kümelerini bulacak bir algoritmadır. K kümelerinin sayısı kullanıcı tarafından tanımlanmıştır. Her küme,



centroid olarak bilinen tek bir nokta ile tanımlanır merkezlerin hepsi, kümedeki tüm noktaların ortalama değerini alarak güncellenir. K-Means algoritması, bir dizi nesneyi, özniteliklerine ve özelliklerine bağlı olarak, k'nin kullanıcı tarafından tanımlanan bir sabit olduğu k kümelerine ayırmayı amaçlar.

k-means kümeleme algoritmasının adımları

- 1- "k" küme sayısı rastgele belirlenir.
- 2- Veriler arasındaki mesafeler hesaplanır ve her veri, farklı merkezli bir kümeye atanır.
- 3- Merkezler, ilgili kümedeki tüm veri noktalarının ortalama değeri hesaplanarak güncelleştirilir.
- 4- Yeni merkezlere göre 2. adım tekrarlanır.
- 5- Veri noktaları için kümenin atanması değişirse, 3. adım tekrarlanır ve işlem durdurulur.

Canopy Kümeleme Algoritması

Büyük, yüksek boyutlu verileri kümelemek için kullanılan yeni bir tekniktir. Temel fikir, veriler canopy olarak adlandırılan üst üste binen alt kümelerle ayırmak için bir mesafe ölçüsü kullanmaktır. Kümeleme, sadece ortak bir canopyde meydana gelen noktalar arasındaki kesin mesafeleri ölçerek gerçekleştirilir. Canopyler kullanılarak, eskiden imkansız olan büyük kümelendirme sorunları pratik hale gelir. Denetlenmeyen kümeleme tekniklerindendir.

Kümeleme işleminde, işlemin doğası gereği, çok sayıda karmaşık işlemin tekrarlı olarak yapılmasını gerektiren teknikler kullanılmaktadır. Bu kapsamda, büyük boyutlu veriler üzerinde kümeleme işlemi, popüler kümeleme yöntemlerinin kullanıldığı yinelemeli (iteratif) yaklaşımların karmaşıklığından kaynaklanan nedenlerden ötürü, ciddi bir zaman maliyetine sahiptir. Bu nedenle, büyük veri kümelerini doğruluk kriterini ikinci plana atarak hızlı bir biçimde gruplandırmak, önemli bir ihtiyaç olarak ortaya çıkmaktadır. Bu probleme çözüm olarak geliştirilen Canopy, son derece basit, hızlı ve doğru sonuçlar üreten bir kümeleme



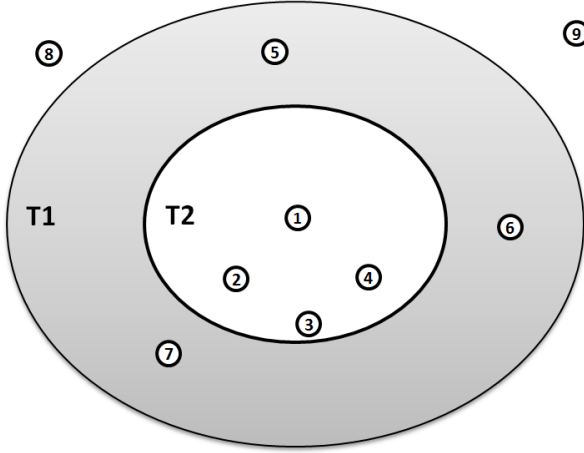
algoritmasıdır (McCallum, Nigam ve Ungar, 2000). Canopy, bu yapısı ile genellikle daha karmaşık kümeleme algoritmaları kullanılmadan önce, büyük veri kümesinin basit ancak hızlı bir biçimde gruplanması amacıyla kullanılmaktadır.

Algoritma günümüzde arama motorlarında ve özellikle Apache Hadoop projesi MapReduce modelinde önemli bir rol oynamaktadır.

Klasik algoritma iki aşamalı olarak tasarlanmıştır. Birinci aşamada veri dizileri basit uzaklık metrikleri kullanılarak kaba olarak kümelendirilirken, ikinci aşamada k-means gibi bir kümeleme algoritması kullanılarak birinci aşamada elde edilen kaba kümelerin iyileştirilmesi sağlanmaktadır. Birinci aşamada elde edilen canopy'ler aynı noktanın birden fazla canopy'de yer alabilmesi nedeniyle üst üste gelebilmektedir. Canopy kelimesi türkçede kubbe olarak ifade edilebilir. Birinci aşamada elde edilen kaba kümelerdir. Birinci aşamada elde edilen basit uzaklık metriklerinin kullanılması ve ikinci aşamada her bir canopy'nin ayrı bir veri dizisi gibi işlenmesi nedenleri ile kümeleme süreci hız kazanmaktadır.

Algoritmanın birinci aşamasında hızlı, ancak yaklaşık olarak hesaplanan bir metrik (fast approximate distance metric) kullanılır.

Canopy algoritması, Şekil 1'de gösterildiği gibi, çok boyutlu bir uzayda kümelenecek veri noktaları ile $T1$ ve $T2$ 'den oluşan ($T1 > T2$) iki eşik değerle kümeleme işlemine başlar. Öncelikle kümelenecek noktalardan rastgele bir nokta başlangıç küme merkezi olarak seçilir (şekilde 1 no'lu nokta). Sonraki aşamada hızlı bir mesafe belirleme formülü uygulanarak, merkez noktasının diğer tüm noktalara olan uzaklığı hesaplanır. Bu hesaplama sonunda, bazı noktalar küme merkezine olan $T2$ uzaklığında kalırken (şekilde 2, 3 ve 4 no'lu noktalar), bazı noktalar $T2$ uzaklığının dışında $T1$ uzaklığının içinde (şekilde 5, 6 ve 7 no'lu noktalar) ve bazı noktalarda $T1$ (şekilde 8 ve 9 no'lu noktalar) uzaklığının dışında kalır.



Şekil 1. Canopy kümeleme algoritması başlangıç durumu

Bu başlangıç hesaplamasında belirlenen küme merkezine, T2 uzaklığında bulunan bütün noktalar, bu kümenin bir elemanı olarak kabul edilir. Bu noktalar başka bir kümenin merkezi olamaz ve oluşan bu kümeye “canopy” adı verilir. Bunun yanında küme merkezine T2 mesafesinden daha uzak olan ancak T1 mesafesi içerisinde kalan diğer tüm noktalar, yeni canopy merkez noktası adayları olarak bir listeye yazılır ve bir aday küme merkez noktaları listesi oluşturulur. Sonraki aşamada, aday listede bulunan her bir nokta, yeni canopy merkezleri olarak seçilerek, küme elemanlarını belirleme işlemi, aday listedeki tüm noktalar bitene kadar tekrarlanır. Böylece, algoritmanın tüm yinelemeleri tamamlandığında, kümelerin merkezi noktaları ve bu kümelere ait olan elemanlar belirlenmiş olur (McCallum ve ark., 2000). Canopy algoritması sayesinde, başlangıçta oluşturulacak küme sayısının belirlenmesine gerek kalmadan veri hızlı bir biçimde gruplandırılabilir. Genellikle canopy tarafından üretilen kümeler, bir başlangıç kestirmesi olarak kullanılmakta ve bir sonraki aşamada k-ortalamalar,



KNN ya da hiyerarşik bir kümeleme algoritması kullanılarak sonuç kümeleri elde edilmektedir.

Weka Uygulaması

Veri Seti

Süsen Veri Seti (İris Data Set)

Kuzey Amerika da yaşayan süsen bitkisinin setosa, versicolor ve virginica cinslerine ait 50 şer gözlemden oluşan toplam 150 gözlemli veri seti, 1935 yılında Anderson tarafından toplanmış olup 1936 yılında ilk defa Fisher tarafından analiz edilmiştir. Bu yüzden süsen veri seti, Fisher iris veri seti olarak da bilinmektedir. Süsen veri seti, sırasıyla çanak yapraklarının (sepal) ve taç yapraklarının (petal) uzunluk (length) ve genişliklerini (width), santimetre cinsinden gösteren 4 değişken ve 150 gözlemden oluşmaktadır. Veri setindeki değişkenlerin ilk sütunu sepal length, ikinci sütunu sepal width, üçüncü sütunu petal length ve dördüncü sütunu petal width' e karşılık gelmektedir. Verilerin ilk 50' si setosa, ikinci 50' si versicolor ve üçüncü 50' si virginica cinslerine karşılık gelmektedir.

Data mining uygulamalarında, metodları test etmek amacıyla çok sık kullanılan ve Weka hazır data setlerinden biridir.

WEKA, Yeni Zelanda'da bulunan Waikato Üniversitesi tarafından geliştirilmiş, makine öğrenimi algoritmalarını da bir arada barındıran, işlevsel bir grafik arabirimine sahip, açık kaynak kodlu bir veri madenciliği programıdır (Witten ve ark., 2011). WEKA çeşitli veri ön işleme, sınıflandırma, regresyon, kümeleme, ilişkilendirme kuralları ve görselleştirme araçları içerir. Algoritmalar veri kümesine doğrudan veya Java kodundan çağrılarak uygulanabilir (Patterson ve ark., 2008). Aynı zamanda yeni makine öğrenme algoritmaları geliştirmek için de uygundur.

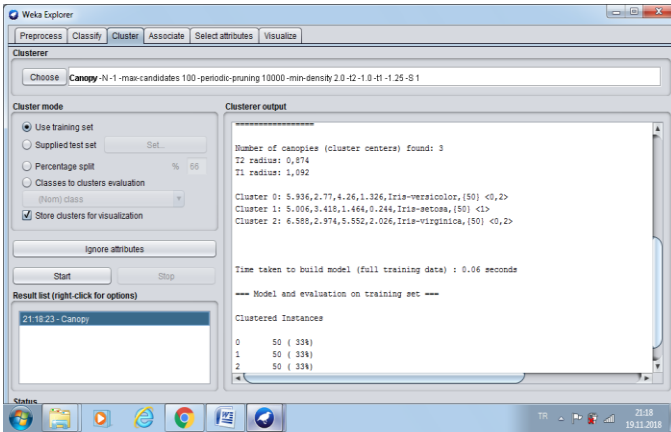
Program çalıştırıldığında Şekil 1'deki kullanıcı ara yüzü ekrana gelir. Bu ara yüz ekranında "Program", "Visualization", "Tools" ve "Help" menülerinden oluşan ana menü ve "Explorer", "Experimenter", "Knowledge



Flow” ve “Simple CLI” kısımlarından oluşan “Applications” bölümleri bulunmaktadır.



Uygun veri seti (.arff formatında) yüklendikten sonra Preprocess menüsünden veriler özetlenebilir. Cluster menüsünden Canopy seçilerek veri setinin kümelenmesi sağlanır.

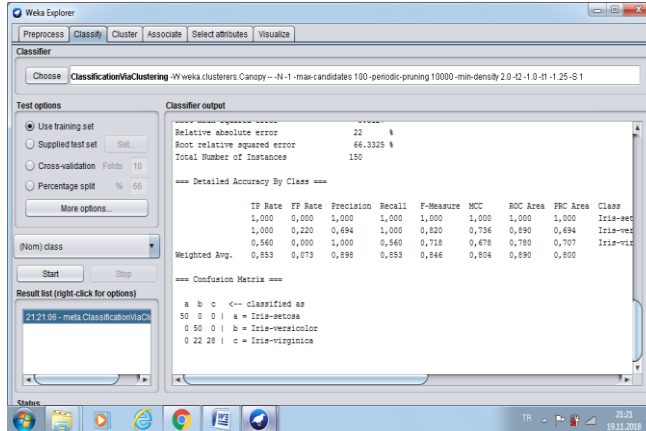
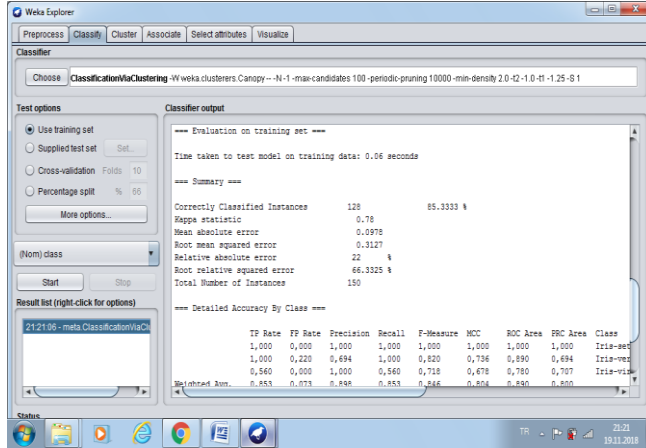


Zaten bilinen bir veri kümesi olan İris Data setini Canopy algoritmasının nasıl kümelediğini görmekteyiz.

Denetimsiz öğrenme, denetimli öğrenme için bir değerlendirme aracı olarak kullanılmaktadır. Birçok veri başlangıçta sınıf değişkenine sahip olmayabilir. Böyle bir



durumda kümeleme yöntemi kullanılarak sınıfların atanması ve ardından uygulanacak sınıflandırma analizi veya regresyon analizleri ile veri çözümlenmesi yapılabilir. Weka da bulunan Classificationviaclustering aracı bu amaçla kullanılabilir. Classify menüsünden Meta içerisindeki Classificationviaclustering seçilerek model değerlendirilebilir.



Canopy algoritmasının, İris veri setini kümelemedeki başarısını görmektedir. Burada, hesaplama süresi 0.06



saniye, verilerin 128 tanesini doğru kümelediği, ve % 85 oranında doğru kümeleme yaptığı görülmektedir.

$$\kappa = \frac{pr(a) - pr(e)}{1 - pr(e)} \quad (4)$$

Kappa değeri (-)1 ile (+)1 arasında değer alabilir ve bulunan değer şu şekilde yorumlanır (Dawson ve Trap, 2004):

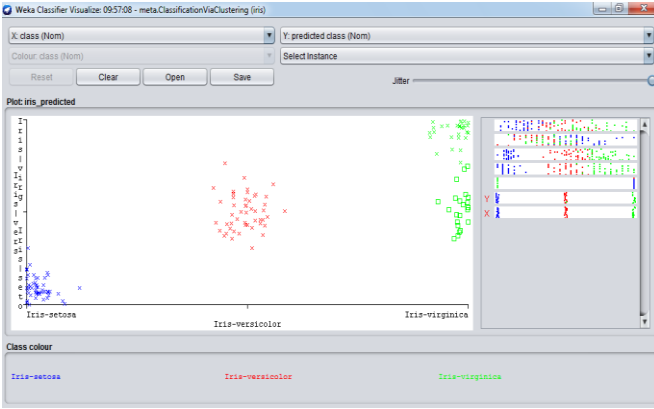
$\kappa = +1$ İki gözlemcinin sonuçları tümüyle birbiri ile uyumludur.

$\kappa = 0$ İki gözlemci arasındaki uyum sadece şansa bağlıdır.

$\kappa = -1$ İki gözlemci tümüyle birbirinin tersini değerlendirmektedir.

Kappa değerinin pozitif ve 0.78 olması modelin uyumlu olduğunu gösterir.

Yine Confusion matris incelendiğinde ilk iki türün %100 doğru kümelendiği, üçüncü türde 28 verinin doğru kümelendiği görülmektedir.



Burada Canopy kümeleme algoritması ile elde edilen kümeler de görülmektedir.



Sonuç

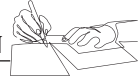
Canopy kümeleme algoritması, K-means kümeleme algoritması veya hiyerarşik kümeleme algoritmaları için genellikle ön işlem adımı olarak kullanılan denetimsiz bir kümeleme öncesi algoritmadır. Büyük veri kümelerinde kümeleme işlemlerini hızlandırma amaçlı kullanılır. Algoritma uzaklık fonksiyonları kullandığı ve mesafe eşiklerinin belirlenmesini gerektirdiği için, yüksek boyutlu veri için uygulanabilir. Bu yeni yöntemle, her adımdaki örneklerin sayısının karşılaştırılmasını azaltmıştır ve ortaya çıkan kümelere iyileştirildiğine dair bulgular vardır. Canopy kümeleme, gruplama için çok basit, hızlı ve şaşırtıcı derecede doğru bir yöntemdir. Ayrıca, k-means ve beklenti maksimizasyon (EM) gibi prototip tabanlı kümeleme yöntemlerini hızlandırmak için canopyler kullanılabilir.

Kaynaklar

- 1- Akpınar H., (2014). DATA. Papatya Yayıncılık.
- 2- Andritsos, P.(2004). "Scalable Clustering of Categorical Data and Applications", PHD Thesis, **Graduate Department of Computer Science, University of Toronto.**
- 3- Dawson B., Trap R.G.(2004). Basic and Clinical Biostatistics, Lange Medical Books/McGraw-Hill, Third Edition.
- 4- Gionis, A., Mannila, H., Tsaparas, P.,(2005). "Clustering Aggregation", **The 21 st International Conference on Data Engineering (ICDE).**
- 5- Han, J., Kamber, M., Pei, J. (2012) Data Mining Concepts and Techniques. Morgan Kaufman.
- 6- Krishnamoorthi (2011). Automatic Evaluation of Cluster in Unlabeled Datasets. *Proc. of Int.Conf. on Information and Network Technology*. IACSIT Press, Singapore.
- 7- Larose, D. T. (2005). Discovering knowledge in data: an introduction to data mining. Statistics(Vol. 1st). <https://doi.org/10.1016/j.cl.2007.10.008>



- 8- McCallum, A., Nigam, K. ve Ungar, L. H. (2000). Efficient clustering of high dimensional data sets with application to reference matching.
- 9- Patterson, D., Liu, F., Turner, D., Concepcion, A., Lynch, R. (2008). Performance Comparison of the Data Reduction System. Proceedings of the SPIE Symposium on Defense and Security, Mart, Orlando, FL.
- 10- Prabhu, P. and K. Duraiswamy (2012). Enhanced VAT for Cluster Quality Assessment in Unlabeled Datasets. *J. of Circuits, Systems and Computers*.
- 11- Witten I.H., Frank E., Hall MA. (2011). Data mining: practical machine learning tools and techniques. Elsevier, London.
- 12- Wang, W., (2006). "Data Mining Concept, Algorithms and Applications", ***Comp 290-090 Research Seminar***, University of North Carolina at Chapel Hill.

**CHAPTER
11****BOR-KATKILI TETRAGONAL
KARBON (T-C5)'İN
İLK-PRENSİPLERLE
İNCELENMESİ
FIRST-PRINCIPLES
INVESTIGATION OF BORON-
SUBSTITUTED TETRAGONAL
CARBON (T-C5)****Sezgin AYDIN¹**

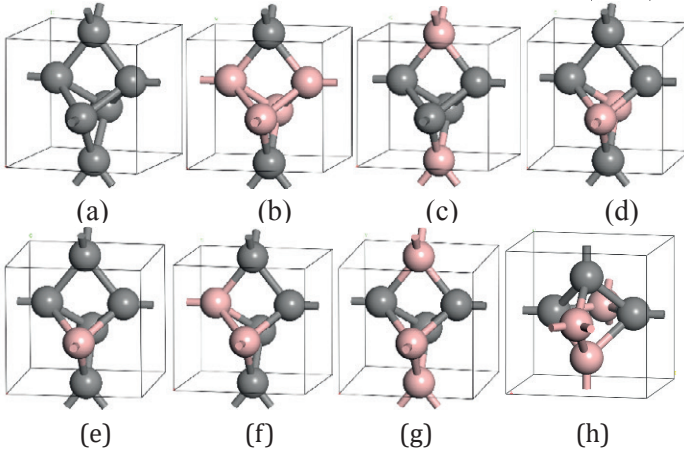
Karbon elementi eşsiz ve gelişmiş özelliklere sahip çok sayıda 3-boyutlu ve 2-boyutlu yapılar oluşturur[1-4]. Bu allotrop-largaz sensörlerinden[5] hidrojen depolamaya[6-8], kaygan yüzeylerden [9, 10]transistör üretimine [11] ve lityum-iyon bataryalardan [12]kontrollü elektronik özelliklere [13] kadar çok geniş bir yelpazede, hem deneysel hem de teorik olarak çok sayıda araştırmaya konu olmuştur. Bazı çalışmalarda mevcut allotropların fiziksel özellikleri araştırılıp hangi alanlarda kullanılabilecekleri sorgulanırken, bazı çalışmalarda “yeni” allotropların sentezlenmesi veya tasarlanması hedeflenir[14, 15]. Bu yoğun ilginin bir sonucu olarak çok fazla sayıda karbon allotropu ortaya çıkarılmıştır[16, 17] ve her geçen gün yeni bir allotrop rapor edilmektedir[18-20]. Karbon farklı yapılarda farklı bağlanma karakteristikleri sergiler ve neredeyse bütün elementlerle sınırsız çeşitlilikte bağ yapma yeteneğine sahiptir[1]. Böylece farklı fiziksel özellikler ortaya çıkar. Örneğin, zinkblend-elmas gibi yapılarda karbon atomları sp^3 hibritleriyle bağlanırlar ve oldukça sert yapılar elde edilir. Grafen gibi 2-boyutlu sistemlerde sp^2 hibritleriyle bağlanırlar, gelişmiş elektronik ve mekanik özellikler ortaya çıkar. Bunların ötesinde, sp^2 - sp^3 hibritlerini içeren[21, 22] veya sp - sp^2 hibritlerini içeren[23, 24] karma yapılar da mevcuttur.

1 Doç. Dr., Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Fizik Bölümü



Yukarıda verilen tartışmaya ek olarak, son zamanlarda, yeni bir karbon allotropu rapor edilmiş[25] ve tetragonal karbon (T-C5) olarak isimlendirilmiştir. Bu çalışmada, bor elementinin de karbon gibi değişik bağlanma karakteristikleri sergilemesinden ve bor-karbür bileşiklerinin yüksek mekanik özelliklerden [26, 27] süperiletkenliğe [28] kadar geniş yelpazede gelişmiş fiziksel özelliklere sahip olmasından yola çıkarak [29, 30], T-C5'in mevcut özelliklerini bor kontrollü olarak değiştirmek veya geliştirmek amacıyla, birim hücresinin farklı konumlarındaki ve farklı sayıdaki karbon atomları bor ile değiştirildi. Oluşturulan hipotetik bileşiklerin kararlılıkları ve fiziksel özellikleri teorik olarak incelendi.

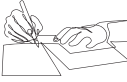
Çalışma kapsamındaki bütün ilk-prensipler yoğunluk fonksiyoneli hesaplamaları CASTEP paket programı ile yapıldı [31]. Değiş-tokuş ve korelasyon etkilerini tanımlamak için LDA (CA-PZ) fonksiyoneli [32, 33], iyonik kor ve değerlik elektronları arasındaki etkileşimleri modellemek için norm-korunum-lapseudopotansiyeller kullanıldı [34, 35]. Brillouin bölgesi Monkhorst-Pack [36] şemasıyla üretilen $10 \times 10 \times 10$ 'luk k -noktalar kullanılarak örnekledi (bu indislere karşılık gelen k -nokta aralığı $0.03 \text{ \AA}^{-1}$) ve düzlem dalga kesilim enerjisi 800 eV olarak seçildi. Geometri optimizasyonları yapılırken, atomik koordinatlar ve örgü vektörlerini kapsayan bütün hücre parametreleri Broyden, Fletcher, Goldfarb and Shanno (BFGS) metodu ile gevşetildi [37] ve yakınsaklık için şu kriterler kullanıldı: enerji için $5 \times 10^{-6} \text{ eV/atom}$, kuvvet için $0.01 \text{ eV/\AA}$, maksimum stres için 0.02 GPa ve maksimum atomik yer değiştirme için $5 \times 10^{-4} \text{ \AA}$. SCF toleransı $5 \times 10^{-7} \text{ eV/atom}$ ve "stress-strain" yöntemiyle [38-40] hesaplanan elastik sabitler için maksimum gerinim genliği 0.003 alındı. Son olarak, fonon dispersiyon eğrileri hesaplanırken "linear response" metodu [41, 42] kullanıldı.



Şekil 1. (a) Tetragonal karbon (T-BC5)'in kristal yapısı. Farklı konumlardaki karbon atomlarının bor ile yerdeğiştirmesisonucu elde edilen hipotetik bileşikler (b) tetragonal-BC1, (c) tetragonal-BC2, (d) ortorombik-BC3, (e)-(h) monoklinik-BC4-BC7. Pembe ve gri küreler sırasıyla bor ve karbon atomlarını temsil ediyor.

Çalışmaya konu olan tetragonal karbon (T-C5) allotropunabor-katkılanarak elde edilen yeni bileşiklerin birim hücreleri Şekil 1'de gösterildi. Bu bileşikler BC1-BC7 şeklinde isimlendirildi. Orijinal bileşik olan T-C5tetragonal kristal sistemindedir ve uzay grubu $P-4m2$ (No:115) dir[25]. Birim hücreinde 5-adet karbon atomu vardır, her atom 4'lü koordinasyona sahiptir ve Wyckoff konumları $4k(0.218\ 0.500\ 0.372)$, $1b(0.5\ 0.5\ 0.0)$ şeklindedir. BC1 ve BC2 yapıları T-C5 ile aynı kristal sistemindedir ve uzay grupları aynıdır. BC3 ortorombik sistemdedir ve uzay grubu $Pmm2$ (No:25) dir. BC4-BC7 monoklinik sistemdedir. BC5'in uzay grubu $A2$ (No:5) iken, BC4, BC6 ve BC7 nin uzay grubu PM (No:6) dır. Uzay gruplarında bu tür değişimlerin gözlenmesi, katkılanan bor atomlarının konumlarına bağlı olarak farklı simetriler oluşmasının doğal bir sonucudur.

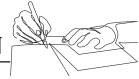
Tablo 1. Bileşikler için örgü parametreleri (a , b ve c , Å), örgü açıları (α , β ve γ , °) hacim (V , Å³) ve kohesif enerjiler (E_{koh} , eV/atom). n ve m sırasıyla birim hücredeki karbon ve bor atomlarının sayıdır.



	T-C5	BC1	BC2	BC3	BC4	BC5	BC6	BC7
n	5	1	4	3	4	3	3	3
m	0	4	1	2	1	2	2	2
a	3.395 3.395 ^a	3.379	3.500	3.303	3.361	3.641	3.718	3.188
b	3.395	3.379	3.500	3.508	3.435	3.641	3.615	3.615
c	3.205 3.205 ^a	3.900	3.153	3.481	3.356	3.157	3.187	3.718
α	90.00	90.00	90.00	90.00	90.00	90.07	90.00	90.00
β	90.00	90.00	90.00	90.00	87.00	90.07	79.25	79.26
γ	90.00	90.00	90.00	90.00	90.00	74.67	90.00	90.00
V	36.931	44.523	38.617	40.329	38.687	40.376	42.092	42.094
E_{koh}	9.24	7.33	8.68	8.46	8.73	8.38	8.44	8.44

Bileşiklerin yapısal parametreleri ve kohe-sif enerjileri Tablo 1'de listelendi. Kohesif enerji $E_{koh} = (n \times E_C + m \times E_B) - E_{final}$ ile hesaplandı, burada E_{final} birim hücrenin toplam enerjisidir, E_C ve E_B sırasıyla izole karbon ve bor atomunun enerjisidir. T-C5 için hesaplanan yapısal parametreler ve kohesif enerji literatürle uyum içindedir [25]^a. Bununla birlikte, bor-katkılı yapılar T-C5'ten daha düşük kohesif enerjiye sahiptirler. T-C5 kadar enerjistik kararlı değildirler. Yüksek kohesif enerji daha sıkı ve güçlü bağlanma ile ilişkilendirildiğinden, T-C5'ten daha güçlü bağlanma karakteristikleri sergilemeleri beklenmez. Tasarlanan yapılar arasında, BC1 en düşük kohesif enerjiye sahipken, BC4 en yüksek kohesif enerjiye sahiptir. Bütün yapıların örgü parametreleri birbirine yakın olmakla birlikte, bor-katkılı yapılar T-C5'ten daha büyük hacim değerlerine sahiptir. Ayrıca, daha fazla bor atomu bulunduran yapıların diğerlerinden daha büyük hacimlere sahip olduğu gözlemlendi.

BC1-BC7 bileşiklerinin elastik ve mekanik özellikleri T-C5 bileşiğinin özellikleri ile birlikte Tablo 2'de listelendi. Tetragonal bir kristal için 6-adet bağımsız elastik sabit vardır (C_{11} , C_{33} , C_{44} , C_{66} , C_{12} ve C_{13}) ve bu elastik sabitler mekanik kararlılık için aşağıda verilen Born kararlılık şartlarının tamamını sağlamalıdır[43, 44]:



$$C_{11} > 0, C_{33} > 0, C_{44} > 0, C_{66} > 0, (C_{11} - C_{12}) > 0,$$

$$(C_{11} + C_{22} - 2C_{12}) > 0,$$

$$[2(C_{11} + C_{12}) + C_{33} + 4C_{13}] > 0.$$

Tablo 2. BC1-BC7 bileşikleri için elastik sabitler

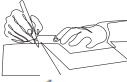
	T-C5	BC1	BC2	BC3	BC4	BC5	BC6	BC7
C_{11}	814.7 814.8 ^a	-374.3	793.1	454.2	452.4	311.1	557.6	305.2
C_{22}				784.8	744.3	443.4	801.9	801.7
C_{33}	830.6 831.5 ^a	660.8	452.5	656.0	740.3	215.8	304.6	557.6
C_{44}	132.7 131.6 ^a	19.1	76.9	107.9	119.1	216.8	31.2	68.6
C_{55}				73.9	80.5	59.7	63.2	62.9
C_{66}	81.3 79.4 ^a	10.8	86.2	55.7	59.8	117.0	61.1	23.8
C_{12}	22.2 22.2 ^a	731.0	52.9	12.2	62.0	196.8	40.8	19.3
C_{13}	64.0 64.0 ^a	60.2	76.8	30.7	86.2	119.1	102.1	101.1
C_{15}					38.5	8.0	32.5	5.3
C_{23}				104.3	92.7	262.1	20.8	41.6
C_{25}					8.2	0.0	3.3	-1.0
C_{35}					34.7	0.0	-10.7	-32.0
C_{46}					8.1	35.0	22.4	14.3

Tablo 2'den, T-C5 için hesaplanan elastik sabitlerin ve mekanik özelliklerin literatür ile çok iyi uyum içinde olduğu görüldü [25]^a. Bununla birlikte, tetragonal-BC2 mekanik kararlı olmasına rağmen, tetragonal-BC1'in kararlı kalamadığı tespit edildi. Diğer taraftan, ortorombik bir kristal için 9-adet bağımsız elastik sabit vardır (C_{11} , C_{22} , C_{33} , C_{44} , C_{55} , C_{66} , C_{12} , C_{13} , ve C_{23}) ve bu elastik sabitler mekanik kararlılık için aşağıda verilen kararlılık şartlarının tamamını sağlamalıdır [44],

$$C_{11} > 0, C_{22} > 0, C_{33} > 0, C_{44} > 0, C_{55} > 0, C_{66} > 0,$$

$$[C_{11} + C_{22} + C_{33} + 2(C_{12} + C_{13} + C_{23})] > 0,$$

$$(C_{11} + C_{22} - 2C_{12}) > 0,$$



$$(C_{11} + C_{33} - 2C_{13}) > 0,$$

$$(C_{22} + C_{33} - 2C_{23}) > 0.$$

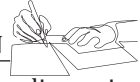
Tablo 2'den, ortorombik-BC3 bileşiğinin bütün şartları sağladığı ve bu sayede mekanik kararlı kaldığı gözlemlendi. Ayrıca, monoklinik bir kristal için 13-adet bağımsız elastik sabit vardır ($C_{11}, C_{22}, C_{33}, C_{44}, C_{55}, C_{66}, C_{12}, C_{13}, C_{23}, C_{15}, C_{25}, C_{35}$ ve C_{46}) ve mekanik kararlılık için aşağıdaki 12 şartın sağlanması gerekir [44]

$$\begin{aligned} C_{11} > 0, C_{22} > 0, C_{33} > 0, C_{44} > 0, C_{55} > 0, C_{66} > 0, \\ [C_{11} + C_{22} + C_{33} + 2(C_{12} + C_{13} + C_{23})] > 0, \\ (C_{33}C_{55} - 2C_{35}^2) > 0, \quad (C_{44}C_{66} - 2C_{46}^2) > 0, \\ (C_{22} + C_{33} - 2C_{23}) > 0 \\ [C_{22}(C_{33}C_{55} - C_{35}^2) + 2C_{23}C_{25}C_{35} - C_{23}^2C_{55} - C_{25}^2C_{33}] > 0 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} 2(X_1 + X_2 + X_3) - (X_4 + X_5 + X_6) + C_{55}g > 0, \text{ burada} \\ X_1 &= C_{15}C_{25}(C_{33}C_{12} - C_{13}C_{23}), \\ X_2 &= C_{15}C_{35}(C_{22}C_{13} - C_{12}C_{23}), \\ X_3 &= C_{25}C_{35}(C_{11}C_{23} - C_{12}C_{13}), \\ X_4 &= C_{15}^2(C_{22}C_{33} - C_{23}^2), \\ X_5 &= C_{25}^2(C_{11}C_{33} - C_{13}^2), \\ X_6 &= C_{35}^2(C_{11}C_{22} - C_{12}^2), \\ g &= C_{11}C_{22}C_{33} - C_{11}C_{23}^2 - C_{22}C_{13}^2 - C_{33}C_{12}^2 + 2C_{12}C_{13}C_{23}. \end{aligned}$$

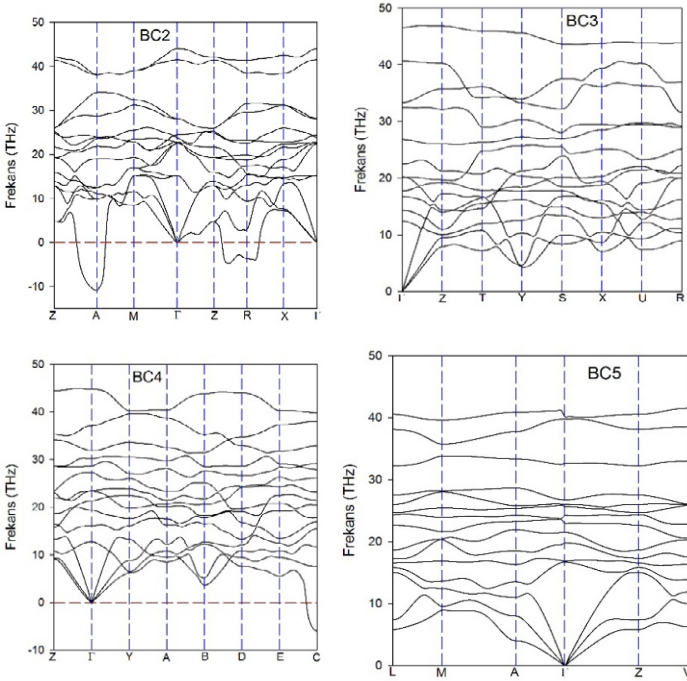
Tablo 2'de monoklinik-BC4, BC5, BC6 ve BC7 için listelenen elastik sabitlerin bu şartları sağladığı, böylece bu bileşiklerin mekanik kararlı kalabildikleri görüldü. Bütün bileşikler için ifade etmek gerekirse, bor atomunun konumuna ve miktarına bağlı olarak mevcut atomik etkileşmelerin kristal yönelimlerine bağlı olarak değiştiği ve mekanik kararlılık üzerinde etkili olduğu sonucuna varıldı.

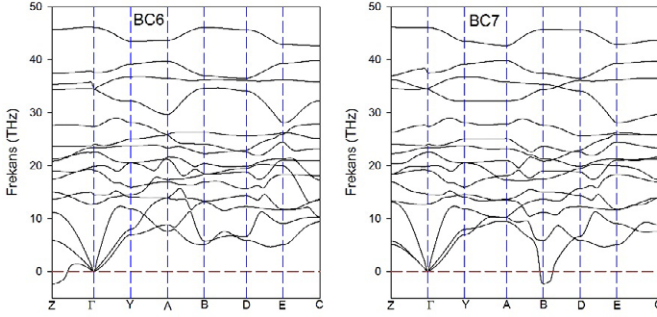
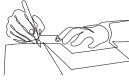
Bileşiklerin dinamik kararlılıklarını incelemek için fonon dispersiyon eğrileri hesaplandı ve Şekil 2'de gösterildi. Tetrag-



onal-BC1 zaten mekanik kararsız olduğundan fonon dispersiyon eğrileri hesaplanmadı. Şekil 2'den, BC2, BC4, BC6 ve BC7'nin negatif fonon frekanslarından dolayı, mekanik kararlı olmalarına rağmen dinamik kararlı olmadıkları, sadece BC3 ve BC5 bileşiklerinin pozitif frekanslar sayesinde dinamik kararlı oldukları görüldü. Negatif frekansların BC2 için E modundan (A noktasında -362.5 cm^{-1} ve R noktasında -126.3 cm^{-1}), BC4 için A" modundan (C noktasında -200.2 cm^{-1}), BC6 için A" modundan (Z noktasında -77.1 cm^{-1}) ve BC7 için A" modundan (B noktasında -76.8 cm^{-1}) kaynaklandığı belirlendi.

Diğer taraftan, Tablo 2'de listelenen elastik sabitler yardımıyla BC3, BC5 ve T-C5'in bulk modülü ve makaslama modülü gibi mekanik özellikleri Voigt-Reuss-Hill yaklaşımı [45] dahilinde Ref. [44]'deki bağıntılar kullanılarak hesaplandı (çok uzun olduklarından metin içinde verilmedi).





Şekil 2. BC2-BC7 bileşikleri için fonon dispersiyon eğrileri.

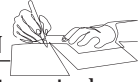
Ayrıca, daha ileri bir analiz sunmak amacıyla B/G oranı, evrensel anizotropi faktörü ve Vickers sertliğide hesaplandı. Sonuçlar Tablo 3'te listelendi. Evrensel anizotropi faktörü $A^U = 5G_V/G_R + B_V/B_R - 6$, bağıntısı ile hesaplandı [46]. V alt indisi ile verilen Voigt değeri modülün üst limitini tanımlarken, R alt indisi ile verilen Reuss değeri modülün alt limitini tanımlar. Bu iki değerin ortalaması alınarak modülün değeri bulunur. Bileşiklerin sertlikleri yarı-deneyssel, bağ iyonikliği ve popülasyonunu baz alan ve karmaşık kristal yapılar dahil çok sayıda bileşiğe başarıyla uygulanmış [47-49] olan Gao metodu ile hesaplandı [50, 51]. Bu metotta, X-Y atomlarından oluşan bir μ -bağının bireysel sertliği,

$$H_v^\mu = 350(N_e^\mu)^{2/3} e^{-1.191 f_i^\mu} / (d^\mu)^{2.5},$$

ile hesaplanır. Burada N_e^μ değerlik elektron yoğunluğu, f_i^μ bağın iyonikliği ve d^μ bağın uzunluğudur. Değerlik elektron yoğunluğu,

$$N_e^\mu = \left(\frac{Z_X}{N_X} + \frac{Z_Y}{N_Y} \right) \left[\sum_{\mu} (d^\mu)^3 n^\mu \right] / [V(d^\mu)^3]$$

ifadesiyle verilir. Burada Z_X ve Z_Y sırasıyla bağ oluşturulan X ve Y atomlarının değerlik elektron sayılarıdır. N_X ve N_Y sırasıyla X ve Y atomlarının en yakın koordinasyon sayılarıdır. n^μ birim



hücre içerisinde μ -bağının sayısıdır ve V birim hücrenin hacmidir.

Bir μ -bağının iyonikliği (f_i) Mulliken popülasyonu (P) yardımıyla

$$f_i = [1 - e^{-|P_C - P|/P}]^{0.735}$$

ifadesiyle hesaplanır; burada P_C tamamen kovalent bileşikten hesaplanan popülasyon değeridir (bu çalışmada 0.75 alındı). Bir kristal yapının sertliği hesaplanırken şu adımlar izlenir: Öncelikle ikili bağ sistemlerine ait Mulliken bağ popülasyonları çıkarılır ve pozitif olanlar tespit edilir, popülasyon değerleri yardımıyla bu μ -adet farklı bağın iyonikliği (f_i) hesaplanır. Kaç adet (n^μ) oldukları belirlenir, bağ uzunlukları ile birlikte o bağın değerlik elektron yoğunluğu (N_e^μ) hesaplanır. f_i ve N_e^μ değerleri kullanılarak her bir bağ için bireysel bağ sertlikleri (H_v^μ) belirlenir ve bunların geometrik ortalaması alınarak yapının toplam sertliği bulunur:

$$H_v = \left[\prod_{\mu} (H_v^\mu)^{n^\mu} \right]^{1/\sum n^\mu}$$

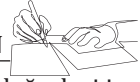
Görüleceği üzere, sertlik hesabına/tartışmasına başlamadan önce, Mulliken popülasyon analizi yardımıyla kristal yapıdaki bağlanma karakterinin aydınlatılması, bağlanma ve anti-bağlanma durumlarının belirlenmesi gerekir. Yapı içindeki herhangi bir bağa ait Mulliken bağ popülasyonunun pozitif olması bağlanma durumuna, negatif olması ise anti-bağlanma durumuna işaret eder [52]. Bununla birlikte, sıfıra yakın değerler iyonik bağlanma karakterini, artan pozitif değerler ise kovalent karakteri ortaya koyar.



Tablo 3. BC3, BC5 ve T-C5 bileşikleri için Bulk modülü (GPa), makaslama modülü (GPa), B/G oranı, evrensel anizotropi faktörü ve sertlik (GPa).

	T-C5	BC3	BC5
B	306.6	234.8	197.5
G	188.4	134.1	81.5
B/G	1.63	1.75	2.42
B_v	306.7	243.3	236.3
B_R	306.4	226.3	158.7
G_v	223.3	164.0	104.9
G_R	153.5	104.3	58.2
A^U	2.3	2.9	4.5
H_v	44.9	43.8	40.1

Tablo 3'ten, orijinal bileşik T-C5'in elastik ve mekanik özelliklerinin bor-katkılı yapılardan daha yüksek olduğu, bor ilavesiyle birlikte değişen geometrik yapı ve bağlanma karakteristiklerinden dolayı elastik sabitlerin ve modüllerin azaldığı, mekanik davranışın kötüleştiği gözlemlendi. Bundan başka, bulk modülü bir kristalin hacim değişimine karşı gösterdiği direnci tanımlarken, makaslama modülü kristal içindeki atomik düzlemlerin birbiri üzerinde kayması şeklinde ortaya çıkan harekete karşı gösterilen direnci tanımlar [53]. T-C5'ten daha düşük bulk ve makaslama modülü değerlerinden dolayı, bor ilavesinin bir sonucu olarak BC3 ve BC5 bileşiklerinin sıkışma direncinin ve kayma direncinin azaldığı tespit edildi. Ayrıca, B/G oranı (Pughkriteri) yardımıyla bileşiklerin/kristallerin sünek veya kırılgan karakterleri belirlenebilir. B/G oranı 1.75'ten büyük ise kristaller sünek, küçük ise kırılgan karakter sergilerler [54]. Tablo 3'te verilen B/G değerlerinden, T-C5 bileşiğini kırılgan karakter sergilerken, BC3 ve BC5 bileşiklerinin daha yüksek B/G oranlarından dolayı sünek karakterde oldukları tespit edildi. Diğer taraftan, sıfırdan oldukça yüksek A^U değerinden dolayı [55], yeni sunulan T-C5 allotropunun yüksek anizotropiye sahip olduğu, bor-katkısı ile beraber anizotropik karakterin



daha da arttığı gözlemlendi. Ayrıca, hesaplanan sertlik değerleri incelendiğinde T-C5'in 44.9GPa'lık sertlik değerinin literatürdeki 41.2 GPa [25]değeri ile uyumlu olduğu görüldü. Bor-katkısının yapıların mevcut bağlanma doğasında meydana getirdiği ve yüksek anizotropiye neden olan değişimlerden dolayı sertlik üzerinde önemli rol oynadığı sonucuna varıldı. Sertlik hesaplamalarının ayrıntıları ve ilişkili parametreler T-C5 için Tablo 4'te, BC3 için Tablo 5'te ve BC5 için Tablo 6'da verildi.

Tablo 4. T-C5 için bağ karakteristikleri, sertlik ile ilişkili parametreler ve bireysel bağ sertlikleri.

		X	Y	P	d^μ	n^μ	N_e^μ	f_i	H_v^μ
μ -	1	C	C	0.80	1.478	2	0.615	0.127	81.86
	2	C	C	0.39	1.530	4	0.554	0.689	35.86
	3	C	C	0.54	1.583	4	0.500	0.435	41.69

Tablo 5. BC3 için bağ karakteristikleri, sertlik ile ilişkili parametreler ve bireysel bağ sertlikleri.

		X	Y	P	d^μ	n^μ	N_e^μ	f_i	H_v^μ
μ -	1	C	C	1.10	1.394	1	0.845	0.384	86.19
	2	C	C	0.75	1.467	2	0.725	0.000	108.31
	3	B	B	0.26	1.628	1	0.884	0.886	33.17
	4	B	B	0.84	1.675	1	0.813	0.186	67.29
	5	B	C	0.17	1.646	2	0.684	0.976	24.47
	6	B	C	0.38	1.687	4	0.636	0.706	30.22

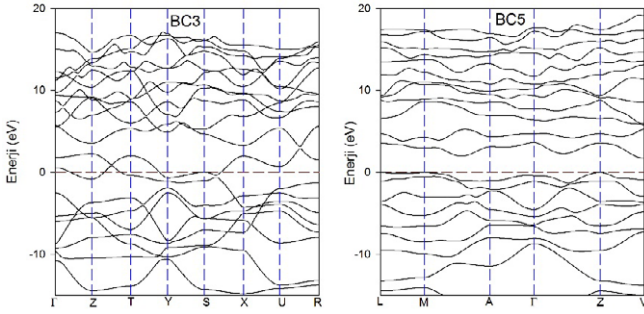


Tablo 6. BC5 için bağ karakteristikleri, sertlik ile ilişkili parametreler ve bireysel bağ sertlikleri.

		X	Y	P	d^μ	n^μ	N_e^μ	f_i	H_v^μ
μ -	1	C	C	0.31	1.583	2	0.438	0.816	24.24
	2	C	C	0.58	1.562	1	0.455	0.365	44.00
	3	B	C	1.01	1.500	2	0.514	0.336	54.66
	4	B	C	0.54	1.644	2	0.391	0.435	32.19
	5	B	C	0.80	1.565	2	0.453	0.127	57.86

Karbon atomlarının koordinasyon sayısı bütün yapılarda değişmezken, BC3'te bor atomlarının koordinasyonu 5 ve BC5'te bor atomlarının koordinasyonu 3'tür. Hesaplanan Mulliken bağ popülasyonu değerleri incelendiğinde BC3 için 2-tip C-C, 2-tip B-B ve 2-tip B-C olmak üzere toplam 6-tip bağın, BC5 için 2-tip C-C, 3-tip B-C olmak üzere toplam 5-tip bağın pozitif popülasyon değerlerine sahip olduğu ve bağlanma durumlarını oluşturdukları görüldü. T-C5'te ise 3-tip C-C bağı vardır. BC3 ve BC5'teki bağlardan bazıları T-C5'ten daha yüksek Mulliken popülasyonuna, yani daha yüksek kovalentliğe sahiptirler. Ancak, yüksek anizotropiden dolayı daha yüksek bireysel sertlik değerlerine sahip olmalarına rağmen, yapı genelindeki bütün bağlar birlikte dikkate alındıklarında T-C5'ten daha iyi bir bağlanma senaryosu ortaya koyamazlar. Diğer taraftan, bazı bağların popülasyon değerleri sıfıra yakındır, bu bağlarda iyonik karakter daha baskındır. Ayrıca, bağların Mulliken popülasyon değerleri hesaplanırken dikkatli olunmalı ve hesaplamalarda daha büyük hücreler kullanılmalıdır. Bu çalışmada Mulliken popülasyonları hesaplanırken $2 \times 2 \times 1$ 'lik süper hücreler kullanıldı. T-C5 için rapor edilenlerden daha yüksek popülasyon değerleri elde edildi.

Bundan başka, yapıların elektronik karakterini ortaya çıkarmak için band yapıları hesaplandı ve Şekil 3'te gösterildi. Ortorombik-BC3'ün metalik karakterde olduğu, BC5'in 1.74 eV band aralığına sahip bir yarıiletken olduğu tespit edildi.

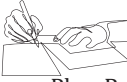


Şekil 3. BC3 ve BC5 için band yapıları. Yataydaki kırmızı renkli çizgi Fermi enerjisini temsil ediyor.

Sonuç olarak, tetragonal karbon allotropuna (T-C5) bor ilavesiyle oluşturulan yeni bileşiklerin fiziksel özellikleri yoğunluk fonksiyoneli teorisi kapsamında araştırıldı. Bor ilavesinin T-C5'in mevcut özelliklerinde meydana getirdiği değişimler tartışıldı. Tasarlanan 7-yapıdan sadece iki tanesinin (BC3 ve BC5) kararlı kalabildiği tespit edildi. Diğer 5-bileşik için kararsızlığa neden olan fonon modları belirlendi. Bor ilavesiyle birlikte birim hücre hacminin büyüdüğü, elastik ve mekanik özelliklerin azaldığı, bağlanma doğasının ve elektronik karakterin değiştiği gözlemlendi. BC3 ve BC5'in orijinal T-C5 ile kıyaslanabilir sertliğe sahip oldukları görüldü. Ayrıca, yüksek sertlik değerlerinden dolayı potansiyel süpersert malzeme olabilecekleri sonucuna varıldı. Bor-katkılamasının T-C5'in geometrisi dahil elastik ve dinamik davranışlarını önemli bir şekilde etkilediği, yapıyı daha anizotropik bir hale getirdiği görüldü. Böylece, yeni, kararlı süpersert bor karbür bileşikler geliştirilmiş oldu.

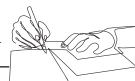
KAYNAKLAR

1. Hirsch, The era of carbon allotropes, Nature Materials 9 (2010) 868.
2. E.H. Falcao, F. Wudl, Carbon allotropes: beyond graphite and diamond, Journal of Chemical Technology & Biotechnology 82 (2007) 524-531.
3. Zhu, A.R. Oganov, M.A. Salvadó, P. Perterra, A.O. Lyakhov, Denser than diamond: Ab initio search for superdense carbon allotropes,



Phys Rev B 83 (2011) 193410.

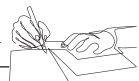
4. H. Niu, X.-Q. Chen, S. Wang, D. Li, W.L. Mao, Y. Li, Families of Superhard Crystalline Carbon Allotropes Constructed via Cold Compression of Graphite and Nanotubes, *Phys Rev Lett* 108 (2012) 135501.
5. A.R. Cadore, E. Mania, A.B. Alencar, N.P. Rezende, S. de Oliveira, K. Watanabe, T. Taniguchi, H. Chacham, L.C. Campos, R.G. Lacerda, Enhancing the response of NH₃ graphene-sensors by using devices with different graphene-substrate distances, *Sensors and Actuators B: Chemical* 266 (2018) 438-446.
6. H.G. Shiraz, O. Tavakoli, Investigation of graphene-based systems for hydrogen storage, *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 74 (2017) 104-109.
7. Y. Zhou, W. Chu, F. Jing, J. Zheng, W. Sun, Y. Xue, Enhanced hydrogen storage on Li-doped defective graphene with B substitution: A DFT study, *Applied Surface Science* 410 (2017) 166-176.
8. F. Bonaccorso, L. Colombo, G. Yu, M. Stoller, V. Tozzini, A.C. Ferrari, R.S. Ruoff, V. Pellegrini, Graphene, related two-dimensional crystals, and hybrid systems for energy conversion and storage, *Science* 347 (2015).
9. D. Berman, A. Erdemir, A.V. Sumant, Graphene: a new emerging lubricant, *Materials Today* 17 (2014) 31-42.
10. F.X. Chen, Y.J. Mai, Q.N. Xiao, G.F. Cai, L.Y. Zhang, C.S. Liu, X.H. Jie, Three-dimensional graphene nanosheet films towards high performance solid lubricants, *Applied Surface Science* 467-468 (2019) 30-36.
11. F. Schwierz, Graphene transistors, *Nature Nanotechnology* 5 (2010) 487.
12. Q. Cheng, Y. Okamoto, N. Tamura, M. Tsuji, S. Maruyama, Y. Matsuo, Graphene-Like-Graphite as Fast-Chargeable and High-Capacity Anode Materials for Lithium Ion Batteries, *Scientific Reports* 7 (2017) 14782.
13. Y. Zhang, T.-T. Tang, C. Girit, Z. Hao, M.C. Martin, A. Zettl, M.F. Crommie, Y.R. Shen, F. Wang, Direct observation of a widely tunable bandgap in bilayer graphene, *Nature* 459 (2009) 820.



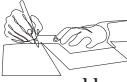
14. J.-T. Wang, C. Chen, E. Wang, Y. Kawazoe, A New Carbon Allotrope with Six-Fold Helical Chains in all-sp² Bonding Networks, *Scientific Reports* 4 (2014) 4339.
15. B.R. Sharma, A. Manjanath, A.K. Singh, pentahexoctite: A new two-dimensional allotrope of carbon, *Scientific Reports* 4 (2014) 7164.
16. D. Li, F. Tian, B. Chu, D. Duan, X. Sha, Y. Lv, H. Zhang, N. Lu, B. Liu, T. Cui, Ab initio structure determination of n-diamond, *Scientific Reports* 5 (2015) 13447.
17. G. Baldisson, D.J. Bull, n-Diamond: Dynamical stability of proposed structures, *Diam Relat Mater* 34 (2013) 60-64.
18. F. Delodovici, N. Manini, R.S. Wittman, D.S. Choi, M. Al Fahim, L.A. Burchfield, Protomene: A new carbon allotrope, *Carbon* 126 (2018) 574-579.
19. Y. Liu, X. Jiang, J. Fu, J. Zhao, New metallic carbon: Three dimensionally carbon allotropes comprising ultrathin diamond nanostripes, *Carbon* 126 (2018) 601-610.
20. X. Wang, Z. Feng, J. Rong, Y. Zhang, Y. Zhong, J. Feng, X. Yu, Z. Zhan, Planar net- τ : A new high-performance metallic carbon anode material for lithium-ion batteries, *Carbon* 142 (2019) 438-444.
21. Q. Wei, Q. Zhang, H. Yan, M. Zhang, B. Wei, A new tetragonal superhard metallic carbon allotrope, *J Alloy Compd* 769 (2018) 347-352.
22. Y. Xu, M. Hu, Z. Wang, J. Liang, J. Li, X. Zhu, M. Wang, A New Metallic Porous Carbon Phase tP-C12 with an sp²-sp³ Bonding Network: A First-Principle Calculation, *ChemistrySelect* 3 (2018) 8402-8406.
23. Q. Wei, Q. Zhang, M.-G. Zhang, H.-Y. Yan, L.-X. Guo, B. Wei, A novel hybrid sp-sp² metallic carbon allotrope, *Frontiers of Physics* 13 (2018) 136105.
24. L. Liu, M. Hu, C. Liu, X. Liang, Y. Pan, P. Ying, Z. Zhao, G. Gao, J. He, Y. Tian, Novel carbon polymorphs with cumulative double bonds in three-dimensional sp-sp² hybrid framework, *Phys Chem Chem Phys* 20 (2018) 15022-15029.
25. D.-D. Pang, X.-Q. Huang, H.-Y. Xue, C. Zhang, Z.-L. Lv, M.-Y. Duan, Properties of a predicted tetragonal carbon allotrope: First principles study, *Diam Relat Mater* 82 (2018) 50-55.



26. Z. Liu, J. He, J. Yang, X. Guo, H. Sun, H.-T. Wang, E. Wu, Y. Tian, Prediction of a sandwichlike conducting superhard boron carbide: First-principles calculations, *Phys Rev B* 73 (2006) 172101.
27. V. Nathalie, S. Jelena, B. Emmanuel, Boron carbides from first principles, *Journal of Physics: Conference Series* 176 (2009) 012002.
28. E. Bourgeois, E. Bustarret, P. Achatz, F. Omnès, X. Blase, Impurity dimers in superconducting B-doped diamond: Experiment and first-principles calculations, *Phys Rev B* 74 (2006) 094509.
29. M. Ma, B. Yang, Z. Li, M. Hu, Q. Wang, L. Cui, D. Yu, J. He, A metallic superhard boron carbide: first-principles calculations, *Phys Chem Chem Phys* 17 (2015) 9748-9751.
30. A. Jay, N. Vast, J. Sjakste, O.H. Duparc, Carbon-rich icosahedral boron carbide designed from first principles, *Appl Phys Lett* 105 (2014) 031914.
31. S.J. Clark, M.D. Segall, C.J. Pickard, P.J. Hasnip, M.J. Probert, K. Refson, M.C. Payne, First principles methods using CASTEP, *Zeitschrift Fur Kristallographie* 220 (2005) 567-570.
32. D.M. Ceperley, B.J. Alder, Ground State of the Electron Gas by a Stochastic Method, *Phys Rev Lett* 45 (1980) 566-569.
33. J.P. Perdew, A. Zunger, Self-interaction correction to density-functional approximations for many-electron systems, *Phys Rev B* 23 (1981) 5048-5079.
34. M. Schluter, D.R. Hamann, C. Chiang, Norm-Conserving Pseudopotentials, *Bulletin of the American Physical Society* 25 (1980) 394-394.
35. D.R. Hamann, Generalized Norm-Conserving Pseudopotentials, *Phys Rev B* 40 (1989) 2980-2987.
36. J.M. Hendrik, J.D. Pack, Special points for Brillouin-zone integrations, *Phys Rev B* 13 (1976) 5188.
37. B.G. Pfrommer, M. Cote, S.G. Louie, M.L. Cohen, Relaxation of crystals with the quasi-Newton method, *J Comput Phys* 131 (1997) 233-240.
38. N.W. Ashcroft, N.D. Mermin, Solid state physics, Holt, Rinehart and



- Winston, New York, 1976.
39. J.F. Nye, *Physical properties of crystals : their representation by tensors and matrices*, Clarendon Press, Oxford, 1957.
 40. V. Milman, M.C. Warren, Elastic properties of TiB₂ and MgB₂, *Journal of Physics: Condensed Matter* 13 (2001) 5585.
 41. S. Baroni, S. de Gironcoli, A. Dal Corso, P. Giannozzi, Phonons and related crystal properties from density-functional perturbation theory, *Reviews of Modern Physics* 73 (2001) 515-562.
 42. X. Gonze, First-principles responses of solids to atomic displacements and homogeneous electric fields: Implementation of a conjugate-gradient algorithm, *Phys Rev B* 55 (1997) 10337-10354.
 43. S.K.R. Patil, S.V. Khare, B.R. Tuttle, J.K. Bording, S. Kodambaka, Mechanical stability of possible structures of PtN investigated using first-principles calculations, *Phys Rev B* 73 (2006) 104118.
 44. Z.J. Wu, E.J. Zhao, H.P. Xiang, X.F. Hao, X.J. Liu, J. Meng, Crystal structures and elastic properties of superhard IrN₂ and IrN₃ from first principles, *Phys Rev B* 76 (2007) 054115.
 45. R. Hill, The Elastic Behaviour of a Crystalline Aggregate, *Proc. Phys. Soc. London* 65 (1952) 349.
 46. S.I. Ranganathan, M. Ostoja-Starzewski, Universal Elastic Anisotropy Index, *Phys Rev Lett* 101 (2008) 055504.
 47. J.L. He, L.C. Guo, X.J. Guo, R.P. Liu, Y.J. Tian, H.T. Wang, C.X. Gao, Predicting hardness of dense C₃N₄ polymorphs, *Appl Phys Lett* 88 (2006).
 48. X.Q. Chen, H.Y. Niu, C. Franchini, D.A.Z. Li, Y.Y. Li, Hardness of T-carbon: Density functional theory calculations, *Phys Rev B* 84 (2011).
 49. Z.Y. Liu, J.L. He, J. Yang, X.J. Guo, H. Sun, H.T. Wang, E. Wu, Y.J. Tian, Prediction of a sandwichlike conducting superhard boron carbide: First-principles calculations, *Phys Rev B* 73 (2006).
 50. F.M. Gao, J.L. He, E.D. Wu, S.M. Liu, D.L. Yu, D.C. Li, S.Y. Zhang, Y.J. Tian, Hardness of covalent crystals, *Phys Rev Lett* 91 (2003).
 51. X.J. Guo, J.L. He, Z.Y. Liu, Y.J. Tian, J. Sun, H.T. Wang, Bond ionicities



- and hardness of B13C2-like structured ByX crystals (X=C,N,O,P,As), Phys Rev B 73 (2006).
52. M.D. Segall, R. Shah, C.J. Pickard, M.C. Payne, Population analysis of plane-wave electronic structure calculations of bulk materials, Phys Rev B 54 (1996) 16317-16320.
 53. G.V. Sin'ko, N.A. Smirnov, Ab initio calculations of elastic constants and thermodynamic properties of bcc, fcc, and hcp Al crystals under pressure, J Phys-Condens Mat 14 (2002) 6989-7005.
 54. S.F. Pugh, XCII. Relations between the elastic moduli and the plastic properties of polycrystalline pure metals, The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science 45 (1954) 823-843.
 55. J. Yang, M. Shahid, C. Wan, F. Jing, W. Pan, Anisotropy in elasticity, sound velocities and minimum thermal conductivity of zirconia from first-principles calculations, Journal of the European Ceramic Society 37 (2017) 689-695.